

されている⁸⁾。したがって、筋ジストロフィーに対する遺伝子治療では、できるだけ多くの筋肉細胞への遺伝子導入の実現が最大の課題と考えられる。

●筋肉での遺伝子発現の増強・改善

ウイルスベクターとは異なり、プラスミドDNAの筋肉注射による遺伝子導入では組み込み可能な遺伝子サイズに制限がないことから、非常に長い全長ジストロフィンcDNA (14 kb) を適用することができる。1991年には、*mdx* マウス (ジストロフィンを欠損する筋ジストロフィーモデルマウス) の筋肉に、ジストロフィン遺伝子をコードしたプラスミドDNAの注射によるジストロフィン発現が報告された⁹⁾。また、横隔膜に対しても同様にプラスミドDNAの局所注射による遺伝子発現が得られている。しかしながら、プラスミドDNAの筋肉注射で得られる遺伝子発現細胞数は対象筋肉中の1%前後であることが報告されている³⁾。プラスミドDNAにコードされた外来性遺伝子が筋肉細胞で発現するには、プラスミドDNAが細胞に取り込まれなければならない。したがって、遺伝子発現細胞数、すなわちジストロフィン陽性細胞数を増加するためには、多くの筋肉細胞への遺伝子デリバリーを実現するテクノロジーの開発が必要となる。

通常、筋肉注射による遺伝子導入時には生理食塩水などに溶解したプラスミドDNAが用いられるが、投与溶液量を増やすことで遺伝子発現が増強されることがある。これは溶液量が多いことによりDNAの組織内拡散が促進されること、および組織内圧の上昇によりプラスミドDNAの細胞内取り込みが亢進することによるものと推察される。マウスを用いた検討では、筋肉サイズに対して相対的に大容量のプラスミドDNA溶液を投与することが多く、このことがマウスでの効率的な遺伝子発現の一因と思われる。

これまでに、筋肉注射による遺伝子発現を改善する方法として、poly *N*-vinyl pyrrolidone や poly vinyl alcohol, poloxamer などのポリマーの利用が検討され、水溶液投与の場合と比較してより広範囲

な筋肉細胞での遺伝子発現が得られている^{10,11)}。一方、遺伝子デリバリーに汎用される正電荷リポソーム・高分子などの場合には、プラスミドDNAと複合体を形成することにより遺伝子発現が抑制される場合が多く、また遺伝子発現細胞の分布もさらに制限される傾向にある。

筋肉注射後の遺伝子発現量ならびに発現細胞数は、エレクトロポレーションにより劇的に増大できることがAihara & Miyazakiにより報告された¹²⁾。最近、Murakamiら¹³⁾は、ジストロフィン遺伝子をコードしたプラスミドDNAを筋肉注射し、エレクトロポレーションを用いることでジストロフィン陽性細胞数の増加に成功している。ここでは、マウス脛骨筋を対象とした検討から、筋肉注射のみの場合には1.6%の細胞しかレポーター遺伝子を発現しないのに対し、エレクトロポレーションを適用することで15.4%にまで増大できることが示されている。さらには、ジストロフィン遺伝子を用いた検討も行い、この場合には5.6%の筋肉細胞でジストロフィン発現を検出している。また、Gollinsら¹⁴⁾は結合組織の成分であるヒアルロン酸を分解する酵素を投与し、その後のプラスミドDNA投与とエレクトロポレーションにより22%の筋肉細胞でのジストロフィン発現を得ている。最近では、超音波の利用に関しても同様の検討が進められており、筋肉注射したプラスミドDNAからの遺伝子発現を改善するのに有効であることが報告されている。

しかしながら、これら筋肉注射による遺伝子導入では、プラスミドDNAが投与された筋肉以外での発現が得られる可能性はきわめて低い。治療効果を考える場合には、より広範な筋肉での遺伝子デリバリーに関する議論が必要である。

●血流を介するプラスミドDNAデリバリー

血管は、栄養物質や酸素を全身の細胞にデリバリーするための非常に優れたインフラである。したがって、多くの筋肉細胞に遺伝子デリバリーを試みる場合、プラスミドDNAの血管内投与が有望と考え

られるが、この投与方法を筋肉細胞での効率的な遺伝子発現に結びつけるには、血流中での分解の回避と血管壁透過障壁の克服が必須である。通常、プラスミドDNA単独の投与では、DNAが血中で分解されるために有意な遺伝子発現は得られず、分解を回避するためにしばしば正電荷ベクターが用いられる。しかしながら、門脈内投与による肝細胞への遺伝子導入に関する検討から、条件によってはプラスミドDNA単独でも遺伝子発現が得られることが示された¹⁵⁾。発現に至る詳細なメカニズムは不明であるが、大容量の高張マンニトール溶液投与により局所での浸透圧ならびに静水圧が上昇し、プラスミドDNAが肝細胞内に取り込まれるものと推察されている。こうした圧力による遺伝子導入は、その後マウス個体への大容量溶液の尾静脈内投与（ハイドロダイナミクス法）に適用された¹⁶⁾。これにより、肝臓をはじめとする種々臓器への遺伝子導入が可能であり、肝臓では実に40%の細胞での遺伝子発現が得られている。こうしたアプローチでは、短時間で細胞内へのデリバリーが完了することから、血中でのDNA分解が回避されるものと推察される。

同様のアプローチを筋肉組織に適用することにより、多数の筋肉細胞への遺伝子導入が可能と考えられる。肝臓や腎臓などとは異なり、筋肉の毛細血管は連続内皮で構成されており、通常分子量約5,000以上の物質は血管壁を透過できない。しかしながら、大容量溶液を投与することで局所での血管内圧が増大し、その結果プラスミドDNAが血管壁を透過可能になるものと考えられる。そこで、大動脈と大静脈をクランメで遮断することにより血流を一時的に停止し、マウス尾部血管内にプラスミドDNAを投与することで、下肢筋肉全体への遺伝子デリバリーを試みた。

静脈内に通常容量（200 μ l）でルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミドDNAを投与した場合には筋肉での遺伝子発現はほとんど認められなかったのに対し、同量のプラスミドDNAを大容量（2 ml）溶液投与することにより、下肢筋肉で高い遺伝子発現が検出された（図2）。このとき、動脈内への投

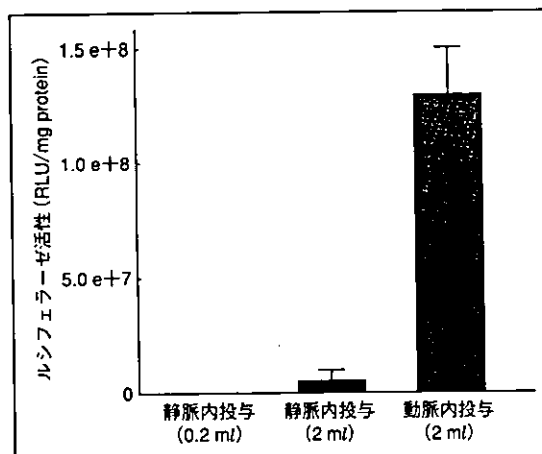


図2 プラスミドDNA血管内投与後の下肢筋肉での遺伝子発現

マウスを麻酔下開腹し、大動脈・大静脈をクランメで挟むことにより一時的に血流を遮断した。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNA（100 μ g）を種々の溶液量の生理食塩水に溶解し、尾静脈あるいは尾動脈内に瞬時投与した。投与後マウス腹部を縫合し、2日後に下肢筋肉を摘出、筋肉ホモジネート上清中ルシフェラーゼ活性を定量した。

与がより有効であり、静脈内投与と比較して約25倍高い（ $10^8 \sim 10^9$ RLU/mg protein）遺伝子発現が得られた。投与時の条件を種々検討した結果、溶液量およびプラスミドDNA量が多いこと、また注入速度が速いことが遺伝子発現に有利であった。一方、血流を遮断する時間に関しては短時間（15秒）で十分であり、それ以上長くても遺伝子発現は増大しなかった。以上の結果から、一時的な血管内圧の上昇により、プラスミドDNAが血管壁を透過し筋細胞に取り込まれることが示唆された。そこで、¹¹¹In標識プラスミドDNAを新たに開発し¹⁷⁾、種々の方法で投与したプラスミドDNAの筋肉組織への分布を評価した。その結果、本アプローチにより、プラスミドDNAの筋肉組織への分布が大きく亢進していることが明らかとなった（図3）。また、*mdx*マウスを用いた検討から、この投与方法がジストロフィン遺伝子のデリバリーにも有効であることが示された。

進行性横隔膜筋肉壊死が呼吸不全の原因となることから明らかのように、筋ジストロフィー治療に

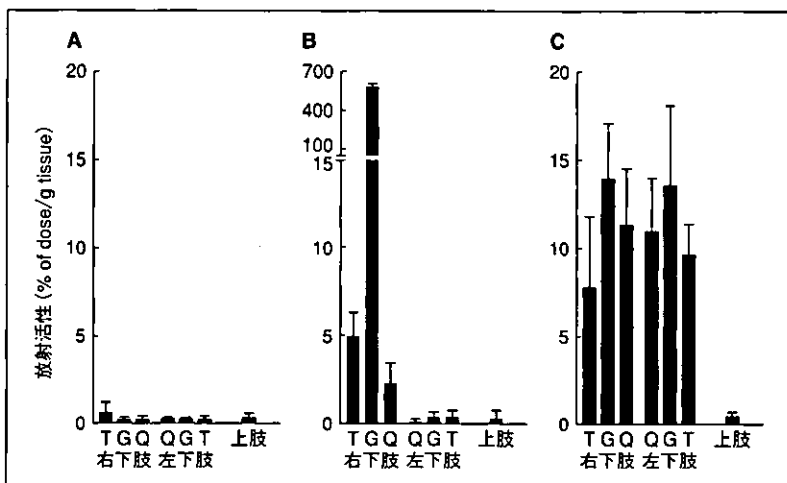


図3 プラスミドDNAの筋肉組織での分布

放射標識プラスミドDNAをマウスに種々の投与方法で投与し、10分後に各筋肉を回収して放射活性を測定した。A：尾静脈内注射（100 μl）、B：筋肉注射（右腓腹筋、20 μl）、C：図2に示す動脈内注射法（2 ml）。T：脛骨筋、G：腓腹筋、Q：大腿筋（n=3）

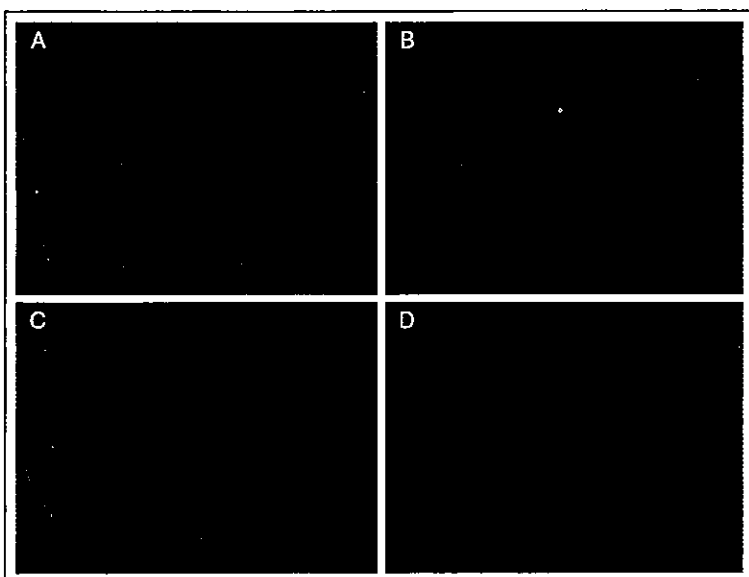


図4 横隔膜でのジストロフィン免疫組織染色像

マウスの横隔膜から凍結切片を作製し、抗ジストロフィン抗体および蛍光標識二次抗体を用いジストロフィンを染色した。

A：未処理 *mdx* マウス、B：C57BL/10 マウス（正常マウス）、C・D：ジストロフィン遺伝子をコードしたプラスミドDNA投与3日目（C）および7日目（D）の *mdx* マウス。

(Liu F, et al. *Mol Ther* 4, 45-51, 2001¹⁶⁾より)

においては心筋や横隔膜などへのジストロフィン遺伝子導入が望まれる。下肢筋肉に対して用いたアプローチをそのまま横隔膜に適用することには手技的な問題があり、また肝臓などに対する遺伝子導入の危険性が考えられる。そこで、血管内にプラスミドDNAを投与し、横隔膜組織での滞留時間の延長による遺伝子発現の改善を試みた¹⁸⁾。

ルシフェラーゼをコードするプラスミドDNAを尾静脈内投与直後に、横隔膜直下の大静脈をクランメで遮断し、一定時間の後に血流を再開した。横隔

膜ならびに種々臓器中遺伝子発現を測定したところ、横隔膜での発現が最も高く（ 5×10^6 RLU/mg protein）、肝臓など主要臓器での発現レベルは1/100以下であった。横隔膜での遺伝子発現は6か月後においてもピーク時（投与3日目）の約1/10程度認められ、長時間持続することが示された。*mdx* マウスに対しジストロフィン遺伝子をコードしたプラスミドDNAを投与したところ、横隔膜の約40%の筋肉細胞においてジストロフィンが検出された（図4）。筋肉組織の壊死-再生の指標である中心核

を有する横隔膜細胞は、ジストロフィン遺伝子導入前の *mdx* マウスでは約22%であったが、導入により4%にまで減少した。さらに、細胞膜機能を色素の浸潤により評価したところ、ジストロフィン遺伝子導入マウスでは色素浸潤細胞数が減少し、ジストロフィンの導入により筋細胞膜が安定化されていることが示された。

ここで取り上げたプラスミドDNAの血管内投与法は、多数の筋肉細胞への遺伝子導入が可能であり、筋ジストロフィー遺伝子治療を有効な治療法とするためにはこうした技術の応用が不可欠と考える。

おわりに

遺伝子治療の可能性が示されてから、単一遺伝子の欠損に起因する遺伝子疾患はその欠損タンパク質をコードする遺伝子の導入により根本的な治療が可能であると考えられてきた。遺伝子欠損の代表的な

疾患であるDMDについても早くから遺伝子治療に関する検討が行われてきたが、遺伝子デリバリー上の障壁¹⁹⁾のために効率的な遺伝子発現を得ることが困難である。また、細胞質から核内への遺伝子輸送効率はDNAの長さに比例して低下するとされており、効率的な遺伝子発現を実現するうえでジストロフィン遺伝子の長さも障害になるかもしれない。ウイルスベクターへの組み込みを目的に、マイクロ、あるいはミニジストロフィンが設計・開発されている²⁰⁾が、プラスミドDNAの場合にも遺伝子サイズに関する議論が必要である。今後、筋肉へのジストロフィン遺伝子導入を筋ジストロフィーに対する有効な治療法とするためには、デリバリー技術に関してさらなる改善が必要であるとともに、プロモーターの選択やジストロフィン遺伝子の改良など、プラスミドDNA構造の最適化が必要と考える。

文献

- 1) van Deutekom JC & van Ommen GJ. Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 774-83 (2003)
- 2) Hoffman EP, Brown RH Jr & Kunkel LM. Dystrophin : The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919-28 (1987)
- 3) Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247, 1465-8 (1990)
- 4) Nishikawa M & Hashida M. Nonviral approaches satisfying various requirements for effective *in vivo* gene therapy. *Biol Pharm Bull* 25, 275-83 (2002)
- 5) Nara E, Masegi M, Hatono T & Hashida M. Pharmacokinetic analysis of drug absorption from muscle based on a physiological diffusion model : Effect of molecular size on absorption. *Pharm Res* 9, 161-8 (1992)
- 6) Vilquin JT, Kennel PF, Paturneau-Jouas M, et al. Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther* 8, 1097-107 (2001)
- 7) Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101, 2963-72 (2003)
- 8) Phelps SF, Hauser MA, Cole NM, et al. Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic *mdx* mice. *Hum Mol Genet* 4, 1251-8 (1995)
- 9) Acsadi G, Dickson G, Love DR, et al. Human dystrophin expression in *mdx* mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 352, 815-8 (1991)
- 10) Mumper RJ, Duguid JG, Anwer K, et al. Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm Res* 13, 701-9 (1996)
- 11) Lemieux P, Guerin N, Paradis G, et al. A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 7, 986-91 (2000)
- 12) Aihara H & Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol* 16,

- 867-70 (1998)
- 13) Murakami T, Nishi T, Kimura E, et al. Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult *mdx* mice by electroporation. *Muscle Nerve* **27**, 237-41 (2003)
 - 14) Gollins H, McMahon J, Wells KE & Wells DJ. High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle. *Gene Ther* **10**, 504-12 (2003)
 - 15) Budker V, Zhang G, Knechtle S & Wolff JA. Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Ther* **3**, 593-8 (1996)
 - 16) Liu F, Song Y & Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* **6**, 1258-66 (1999)
 - 17) Nishikawa M, Nakano T, Okabe T, et al. Residualizing indium-111-radiolabel for plasmid DNA and its application to tissue distribution study. *Bioconjug Chem* **14**, 955-61 (2003)
 - 18) Liu F, Nishikawa M, Clemens PR & Huang L. Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of *Dmd*^{*mdx/mdx*} mice through systemic administration of plasmid DNA. *Mol Ther* **4**, 45-51 (2001)
 - 19) Nishikawa M & Huang L. Nonviral vectors in the new millennium : Delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* **12**, 861-70 (2001)
 - 20) Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, et al. Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into *mdx* mice as a transgene. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 1265-72 (2002)

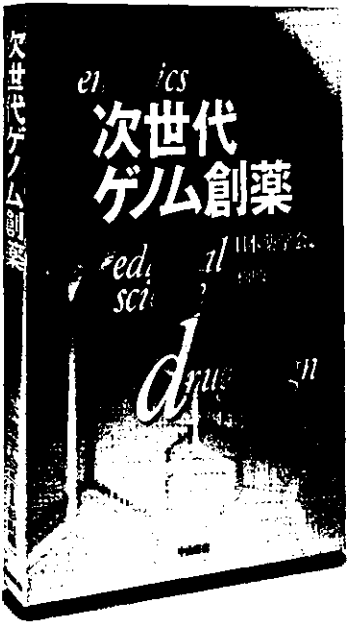
新しいパラダイムを迎えた創薬科学を基本からとらえる!

次世代 ゲノム創薬

編集
日本薬学会

編集代表
杉山 雄一
(東大薬学系分子薬物動態学)

創薬を巡る環境は、リード化合物の発見・最適化にかかわる手法の急速な発展とゲノム科学から得られた知見、情報データベースの整備により大きく様変わりしています。従来から行われている創薬研究のうえに、新しい知識、手段がどのように応用できるのか。大きなパラダイムシフトを迎えた創薬科学を基本から解説します。

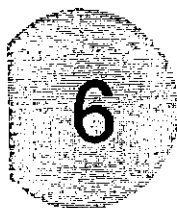


B5判/並製/288頁/図・表227点/定価**5,880**円(本体5,600円)

中山書店

〒113-8666 東京都文京区白山1-25-14
<http://www.nakayamashoten.co.jp/>

TEL : 03-3813-1100
FAX : 03-3816-1015



活性酸素消去酵素の ターゲティングと癌転移抑制

西川 元也*

Nishikawa Makiya

Summary

活性酸素、特に過酸化水素が癌転移の促進因子であることから、その分解酵素であるカタラーゼによる癌転移抑制が考えられる。その抑制機構が働くためには、活性酸素が生成する癌細胞近傍に、カタラーゼを効率よくデリバリーする必要がある。マウスを用いた検討から、肝細胞ターゲティング型のガラクトース修飾カタラーゼにより、結腸癌細胞の肝転移を大幅に抑制できることが示された。また、肺転移に対しては、血中滞留性を増大させたポリエチレングリコール修飾体が高い抑制効果を示した。癌細胞浸潤を促進するマトリックスメタロプロテアーゼなど、転移に関与する因子の発現を抑制することが、カタラーゼのターゲティングによる転移抑制のメカニズムであると考えられる。

1. はじめに

好気性生物であるヒトは、栄養物と酸素とを反応させることでエネルギーを獲得し、生命活動を営む上で、酸素に限らず毒性の強い活性酸素をも巧みに利用している。そのためには、活性酸素の生成・消去を厳密に制御することが重要である。実際、必要とする場所でのみ活性酸素を産生し、必要としない場所では効率良くこれを消去する抗酸化システムが備わっており、細菌感染などにより活性酸素レベルが変動した場合にも、ホメオスタシスにより正常値へと回帰する。

しかしながら、生体に備わる抗酸化システムの能力を超える量の活性酸素が生じた場合には、酸化-抗酸化バランスが崩壊し、結果としてさまざまな障害が惹起される。(図1)。最近の研究によ

り、発癌、アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血性疾患、炎症、アレルギーなど、非常に多岐にわたる疾患・病態に、活性酸素が関与することが明らかとされてきた。

複合的な遺伝子変異が原因で発生する癌は、現代日本における死因の第1位であり、総死亡数の約3割を占める。その治療を困難なものにしている最大の要因として、転移があげられる。癌転移は、癌細胞自身による血管外基質・基底膜の破壊に始まり、血管内への流入、流血中の移行、毛細血管への塞栓、血管内皮細胞への接着、血管基底膜の破壊、間質への浸潤、そして増殖により成立する¹⁾。これらの過程には、接着分子やマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、増殖因子、血管新生因子など、さまざまなタンパク質分子が関与することが示されている。

放射線照射や抗癌剤投与により生成する高濃度

*京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野・助教授

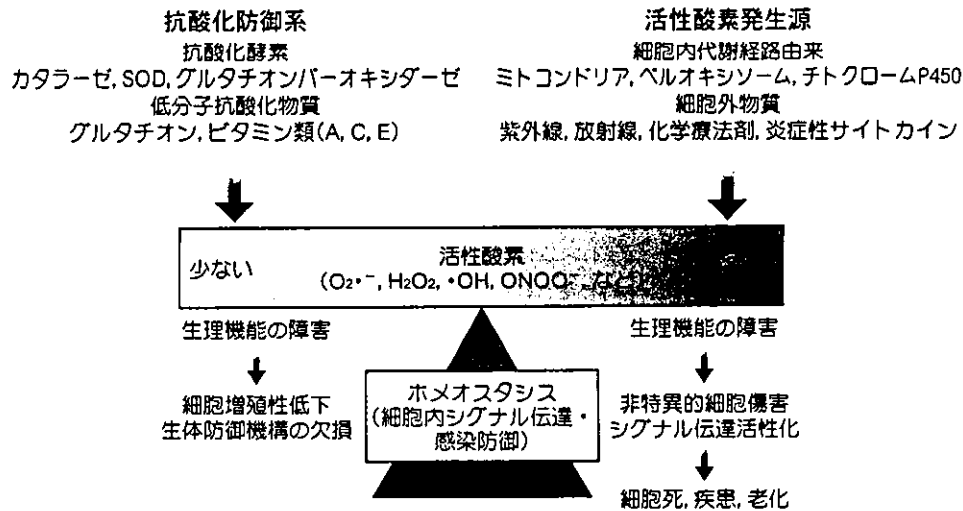


図1 生体の活性酸素ホメオスタシス機構

生体内で活性酸素は、生成と消去のバランスが保たれており、細胞内シグナル伝達や感染防御などに重要な役割を演じている。このホメオスタシスが崩れると、生理機能が障害され、生体防御機構の欠損、あるいは非特異的細胞傷害やシグナル伝達の活性化により老化や細胞死を招く。

SOD：スーパーオキシドディスムターゼ

(著者作成)

の活性酸素は、細胞を死に至らせる極めて毒性の強い分子であるが、比較的低レベルの場合には、増殖因子や MMP、血管新生因子などの発現を亢進し、結果として癌転移を増悪させることが報告されている。従って、癌転移抑制には、不必要な活性酸素の生成を抑制すること、あるいは生成した活性酸素を速やかに消去することが有効と考えられる。

これまでも、 α -トコフェロールなどの低分子抗酸化剤、あるいはスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼなどの活性酸素消去酵素が、活性酸素に起因する各種障害に対する有効な薬剤になるものとして期待されてきた。しかしながら、これら活性酸素消去剤を利用した疾患治療に際しては、薬剤を活性酸素発生部位に効率よくデリバリーすることが必須であり、そのためには体内での薬物動態を制御可能なドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が必要となる。ここでは、過酸化水素を分解するカタラーゼに対して分子構造修飾を施し、標的臓器にターゲティングすることによる癌転移抑制について述べる。

2. 分子構造修飾によるカタラーゼの肝臓ターゲティングと肝転移抑制

タンパク質などの高分子は、毛細血管壁および細胞膜の透過が制限されるため、物性に依存した特徴的な体内分布挙動を示す。我々は、多様な物理化学的性質を有する高分子の体内動態に関して、ファーマコキネティクスを基盤とした定量的解析を行い、高分子の物性と体内動態特性との関連を明らかにしてきた^{2)~5)}。

得られた相関をもとに、カタラーゼに対して分子構造修飾を施し、(1)肝実質細胞ターゲティング型(ガラクトース修飾体; Gal-CAT [galactosylated catalase]), (2)肝非実質細胞ターゲティング型(マンノース修飾体; Man-CAT [mannosylated catalase], フコース修飾体; Fuc-CAT [fucosylated catalase], スクシニル化体; Suc-CAT [succinylated catalase]), (3)血中滞留型(PEG修飾体; PEG-CAT [polyethylene glycol-conjugated catalase])をそれぞれ合成した。図2に、

¹¹¹In 標識体を用いて、各誘導体の肝臓構成細胞による取り込みを示すが、各誘導体はそれぞれの構造・物性に特徴的な分布パターンを示す⁶⁾。

前述のように、癌転移は多岐にわたる過程の結果として生じるが、実験的には血管内に癌細胞を注入することで再現可能である。(実験的転移モデル)。この場合には、原発巣からの癌細胞の離脱過程は含まれないが、一定数の癌細胞を投与するこ

とが可能であるため、結果の再現性が高い。

我々は、消化器癌の肝転移に対する有効なカタラーゼ DDS の開発を目的に、マウス門脈内への結腸癌細胞 colon26 の投与により作成した肝転移モデルマウスを用いて検討を行った⁷⁾。100,000 個の colon26 細胞を BALB/c マウスの門脈に投与した場合、14 日後の時点で肝臓表面に 50 を超える癌結節(コロニー)が検出された。このマウスに対し、癌細胞投与 3 日後に各種カタラーゼ誘導体を投与(35,000U/kg)し、癌細胞投与 14 日後に摘出した肝臓表面結節を計数した。(図 3)。

生理食塩水投与(無治療)群では、顕著な転移結節の形成が認められるのに対し、カタラーゼ誘導体投与群ではいずれの場合にも転移抑制効果が得られた。中でも、肝細胞ターゲティング型の Gal-CAT の効果が顕著であり、未修飾カタラーゼ投与群と比較して、肝臓表面の結節数は有意に減少した。一方、肝臓の虚血・再灌流時に問題となる活性酸素障害に対して有効な、肝非実質細胞ターゲティング型の Man-CAT, Suc-CAT は、癌転移に対しては未修飾体とほぼ同等の効果を示した。

こうしたカタラーゼのデリバリーによる癌転移抑制には、さまざまな分子の発現変動が関与していると考えられる。実際、*in situ* ザイモグラフィにより総 MMP 活性を評価したところ、転移性癌結節を含む肝臓では、類洞周辺に非常に高い MMP 活性が検出された。(図 4)。癌転移における重要な物理的障壁として、細胞外マトリックスや基底膜中の構成成分である IV 型コラーゲンの存在があげられ、これを分解する酵素として MMP-2 と MMP-9 がある⁸⁾。癌結節を含有する肝臓中に

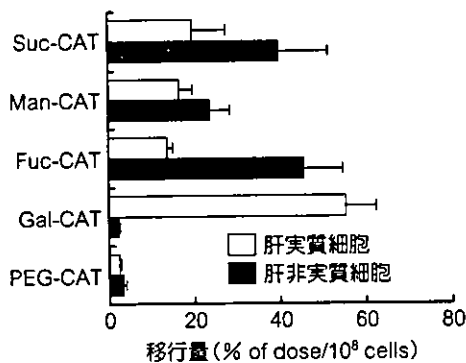


図2 カタラーゼ誘導体のマウス静脈内投与後の肝臓構成細胞間分布

放射標識を施したカタラーゼ誘導体をマウスに尾静脈内投与後、肝臓を肝実質細胞と肝非実質細胞とに分離したときの各細胞 10⁸ 個あたりの放射活性を投与量に対する率で示す。

- Suc-CAT : succinylated catalase
- Man-CAT : mannosylated catalase
- Fuc-CAT : fucosylated catalase
- Gal-CAT : galactosylated catalase
- PEG-CAT : polyethylene glycol-conjugated catalase

(文献 6 より)

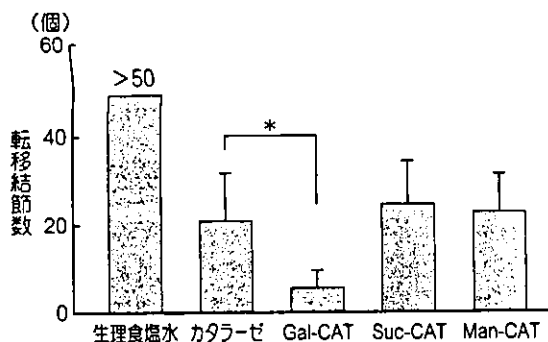


図3 カタラーゼ誘導体投与による colon26 細胞の肝転移抑制

100,000 個の colon26 細胞をマウス門脈内に投与 14 日後に評価した肝臓表面転移結節数を示す。各カタラーゼ誘導体は癌細胞移植 3 日目に 35,000U/kg の投与量で尾静脈内投与した。

- Gal-CAT : galactosylated catalase
- Suc-CAT : succinylated catalase
- Man-CAT : mannosylated catalase

(文献 7 より)

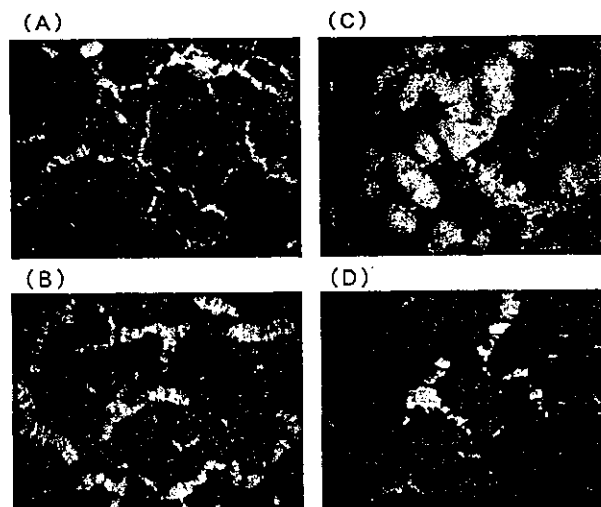


図4 肝転移モデルマウスから採取した肝臓の *in situ* ザイモグラフィ像

(A)は対照群, (B)は生理食塩水群, (C)はカタラーゼ投与群, (D)はGal-CAT投与群の剖検像。

Gal-CAT : galactosylated catalase

は、高いMMP-9活性が検出されたが、Gal-CATの投与により、この活性は有意に減少した。過酸化水素が、MMP活性を増大させることが報告⁹⁾¹⁰⁾されており、カタラーゼをガラクトース修飾することで肝臓にターゲティングし、癌細胞近傍の過酸化水素を効率よく消去することにより、MMP活性の増大が抑制され、結果的に癌転移が抑制されるものと推察される。

これとは別に、活性酸素の産生が亢進した条件下で増大する、肝臓血管内皮細胞上のICAM (intercellular adhesion molecule)-1発現は、カタラーゼ誘導体のターゲティングにより抑制されることも示されており¹¹⁾、カタラーゼのターゲティングによる癌転移抑制には、MMPに限らずICAM-1などの接着分子の発現変動も関与するものと思われる。

3. カタラーゼの血中滞留化と肺転移抑制

肺は、消化管を除く臓器・器官からの静脈血が最初に通過する臓器であることから、原発巣を離脱した癌細胞と遭遇する機会が多く、結果的に転

移好発臓器となる。肺へのターゲティングは、肺血管内皮表面抗原に対する抗体の利用、あるいはカチオン性リポソーム/プラスミドDNA(デオキ

(文献7より)

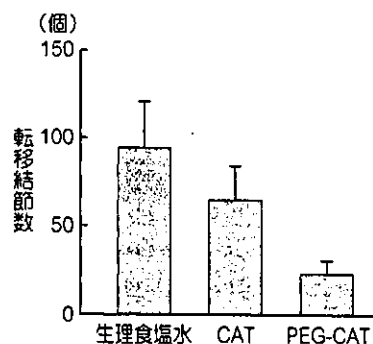


図5 カタラーゼ誘導体投与による colon26 細胞の肺転移抑制

100,000個の colon26 細胞をマウス尾静脈内に投与14日後に評価した肺表面転移結節数を示す。各カタラーゼ誘導体は癌細胞移植1時間後に35,000U/kgの投与量で尾静脈内投与した。

CAT : catalase

PEG-CAT : polyethylene glycol-conjugated catalase

(文献13より)

シリボ核酸)複合体⁵⁾などにより実現可能である。その一方、肺は非常に血流の豊富な臓器であることから、血液プール中に滞留させることが、肺を標的としたデリバリーの一手法となる可能性がある。

タンパク質の血中滞留化に関しては、幅広いタンパク質を対象とした検討から、ポリエチレングリコール(PEG)などの、水溶性不活性高分子を共有結合することの有用性が明らかにされている¹³⁾。これは、結合によって惹起されるサイズの増大による腎排泄、ならびに分子表面に形成される親水層による分子・細胞との相互作用の抑制によるものとされる。実際、カタラーゼの場合にも、PEG修飾(PEG-CAT)により、血中滞留性が増大した⁶⁾。

そこで、肺転移に対してもカタラーゼのデリバリーが有効であるかについて検討した¹³⁾。マウスに100,000個のcolon26細胞を静脈内投与すると、14日後には肺表面に平均93個の結節が形成された。このとき、PEG-CATを投与することで、カタラーゼを上回る効果が得られ、癌結節数は約22個と大幅に減少した。(図5)。不活化カタラーゼでは全く抑制効果が認められなかったことから、ここでも過酸化水素を分解することで、癌転移が抑制されているものと考えられる。また、ルシフェラーゼ遺伝子を安定に発現する癌細胞株を用いた検討を行い、PEG-CATが癌細胞の接着および増殖の、いずれの過程をも抑制可能であることを明らかにしている¹⁴⁾。

4. おわりに

カタラーゼは、体内に豊富に存在するタンパク質である。特に、赤血球中や肝臓、腎臓には大量に含まれる。また、カタラーゼの基質である過酸化水素は、電荷を持たないため比較的膜透過性が良好である。こうした背景から、活性酸素に関する疾患治療においては、しばしば過酸化水素はあまり考慮されず、活性酸素の代謝カスケードで上流に位置する、スーパーオキシドアニオンの消去に主眼が置かれてきた。

しかしながら、過酸化水素は直接細胞を障害す

るだけでなく、本稿で紹介したように、さまざまなタンパク質の転写を亢進するメディエーターとしても作用し、その結果として癌転移を亢進する。従って、癌細胞が転移する部位に、カタラーゼをターゲティング可能なDDSを開発することで、癌転移抑制が実現されるものと考えられる。

● 参考文献 ●

- 1) Engers R, Gabbert HE : Mechanisms of tumor metastasis : cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 126 (12) : 682-692, 2000.
- 2) Sezaki H, Hashida M : Macromolecule-drug conjugates in targeted cancer chemotherapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1 (1) : 1-38, 1984.
- 3) Takakura Y, Hashida M : Macromolecular carrier systems for targeted drug delivery : pharmacokinetic considerations on biodistribution. *Pharm Res* 13 (6) : 820-831, 1996.
- 4) Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M : Pharmacokinetic evaluation of polymeric carriers. *Adv Drug Delivery Rev* 21 (2) : 135-155, 1996.
- 5) Opanasopit P, Nishikawa M, Hashida M : Factors affecting drug and gene delivery : effects of interaction with blood components. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 19 (3) : 191-233, 2002.
- 6) Yabe Y, Nishikawa M, Tamada A, et al : Targeted delivery and improved therapeutic potential of catalase by chemical modification : combination with superoxide dismutase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 289 (2) : 1176-1184, 1999.
- 7) Nishikawa M, Tamada A, Hyoudou K, et al : Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice. *Clin Exp Metastasis* 21 (3) : 213-221, 2004.
- 8) Curran S, Murray GI : Matrix metalloproteinases : molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36 (13) : 1621-1630, 2000.
- 9) Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, et al : Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloproteinase-1. *J Biol Chem* 274 (36) : 25869-25876, 1999.

DDS が切り拓く新しい薬物治療

- 10) Nelson KK, Ranganathan AC, Mansouri J, et al : Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression : evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. Clin Cancer Res 9 (1) : 424-432, 2003.
- 11) Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, et al : Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. J Pharmacol Exp Ther 298 (3) : 894-899, 2001.
- 12) Harris JM, Chess RB : Effect of pegylation on pharmaceuticals. Nat Rev Drug Discov 2 (3) : 214-221, 2003.
- 13) Nishikawa M, Tamada A, Kumai H, et al : Inhibition of experimental pulmonary metastasis by controlling biodistribution of catalase in mice. Int J Cancer 99 (3) : 474-479, 2002.
- 14) Hyoudou K, Nishikawa M, Umeyama Y, et al : Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase : quantitative analysis with firefly luciferase-expressing melanoma cells. Clin Cancer Res (in press)



レドックス制御と抗酸化治療戦略

大阪市立大学大学院医学研究科・分子病態学教授 井上 正康 監訳

B 5 判 608頁 定価 9,975円(本体 9,500円+税 5%)送料実費

ISBN4-7532-1841-4 C3047

おもな内容

- I. 天然の抗酸化物質
 1. 抗酸化物質の種類と分子特性
 2. ビタミンCと疾患
 3. ビタミンEの代謝輸送制御
 4. グルタチオン関連分子群
 5. α -リポ酸と転写制御
 6. メラトニンの抗酸化作用
 7. ポリアミンの抗酸化キレート作用
 8. フラボノイドの抗酸化制癌作用
- II. 合成抗酸化物質
 1. 鉄キレート剤と抗酸化療法
 2. N-アセチルシステインの薬理学的考察及び臨床応用
 3. エプセレンと抗酸化病態制御
 4. 多機能抗酸化分子：セレン-Mn複合体
- III. 抗酸化酵素の誘導と病態制御
 1. 抗酸化治療薬のターゲティング
- IV. 活性酸素病態と抗酸化療法
 1. 酸化LDLと動脈硬化治療
 2. ARDSの抗酸化療法
 3. 囊胞性線維症と抗酸化療法
 4. 白内障と活性酸素病態
 5. 黄斑色素病態と抗酸化治療
 6. 神経疾患と活性酸素病態
 7. HIV感染と悪悪液質の子オール療法
 8. 肝疾患の抗酸化療法
 9. 糖尿病の抗酸化療法
 10. 皮膚の光老化と治療戦略
 11. 発癌制御と抗酸化食品戦略
2. レドックス制御遺伝子
3. 細胞死とレドックス制御
4. 中枢神経障害の抗酸化療法
5. タウン症と活性酸素病態
6. 炎症と遺伝子のレドックス制御

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号) 00910-1-33353
 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目1番1号・高橋セービル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369