

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進（医療機器開発

（ナノテクノロジーなど）総合推進）研究事業

腫瘍血管内皮細胞への薬物送達システムによる  
耐性癌の化学療法と臨床応用へ向けた製剤化

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 櫻井 遊

平成26（2014）年 5月

# 目 次

・ 総括研究報告	1
腫瘍血管内皮細胞への薬物送達システムによる 耐性癌の化学療法と臨床応用へ向けた製剤化	
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	9
・ 研究成果の刊行物・別刷り	10

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進（医療機器開発（ナノテクノロジーなど）総合推進）研究事業  
総括研究報告書

腫瘍血管内皮細胞への薬物送達システムによる耐性癌の化学療法と  
臨床応用へ向けた製剤化

研究代表者 櫻井 遊 北海道大学 大学院薬学研究院 特任助教

研究要旨

がん細胞自身ではなく血管新生を阻害することは耐性癌治療の有用な手段であり、薬物送達システム（DDS）による腫瘍血管内皮選択的な抗癌剤の送達は、効果の向上と副作用の軽減に有効である。申請者は標的化リガンドと細胞膜透過性ペプチドを組み合わせた dual-ligand リポソームにより腫瘍血管へ選択的な薬物送達と耐性癌治療に成功している。従来治療効果に乏しい癌種でも DDS で血管に薬物を送達し抗腫瘍効果が示されれば、既存の抗癌剤の適応拡大とライフサイクルの延長など医薬品産業の競争力を下支えする基盤技術として貢献が期待される。またポソーム製剤の開発を通じて医薬品レギュレーション行政へ貢献が期待される。本事業では、dual-ligand リポソームを用いた耐性癌化学療法を最終目的として、適応癌種拡大と非臨床試験へむけた製剤化の検討を行った。

平成 25 年度の研究では、閉鎖流路を用いたリポソームの大量製造に着手した。閉鎖流路として、有機化合物合成に用いられるマイクロリアクターとシリンジポンプを組み合わせたシステムを作成した。流速や脂質濃度などの検討を行うことで、目的の大きさを有する、およそ 100 mL/hr 単位でのリポソームの大量製造法の確立に成功した。

A . 研究目的

がん治療の際に外科的療法と並んで用いられる化学療法において、最も問題とされるのは薬剤耐性化である。原因としてよく知られているものは、白金製剤では白金を解毒するメタロチオネイン、その他の低分子化合物では薬剤の細胞外への排出を担う P 糖たんぱく質の発現後身である。これらの特性変化はがん細胞自身の増殖速度が通常の細胞と比較して非常に早く、それに伴いゲノム配列が変異

を起こしやすいという特徴に起因するとされている。こういった背景の元、がん細胞に酸素や栄養の供給を担う腫瘍内の血管を標的とした血管新生阻害療法が注目されており、薬剤耐性癌にも有効であることが報告されている。しかし、一方では消化管出血や腎障害など重篤な副作用が問題となっている。これは、がん組織以外の正常組織の血管においても既存の血管新生阻害剤の標的遺伝子が阻害され、正常組織のホメオスタシスが崩され

てしまうことが一因である。したがって、疾患部位であるがん組織の腫瘍血管に選択的薬物送達を可能とする薬物送達システム (Drug Delivery System; DDS) は治療効果の増強と副作用の軽減に有効な手立てとなる。

我々は、腫瘍血管内皮細胞に選択的に薬物を送達可能な腫瘍血管内皮標的化 dual-ligand リポソームの開発に成功している (PCT/JP2011/053963)。Dual-ligand リポソームは、腫瘍血管に特異的に発現している標的分子を認識する選択的リガンドと、細胞内取り込みを飛躍的に向上させる細胞膜透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide; CPP) が修飾されている。また、腫瘍血管への親和性の向上を目的として、直径を約 300 nm に制御している (Fig. 1)。これまでにドキソルビシン封入リポソーム Doxil<sup>®</sup>では全く効果の無い薬剤耐性がん種であるヒト腎細胞がんを用いた *in vivo* モデルにおいて、抗腫瘍効果が得られることを明らかにしている (Takara K *et al.*, *J Control Release* 2013)。本システムを臨床に応用することが可能となれば、既存の抗がん剤の適応拡大、すなわち医薬品のライフサイクルマネジメントが容易になることが期待される。さらに、リポソームは水相や疎水相に核酸を含む様々な医薬品分子を封入することができることから、今後革新的医薬品の創製にもつながり得ると考えられる。また、リポソ

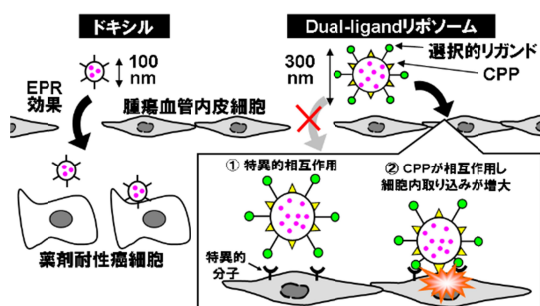


Fig. 1 Dual-ligand リポソームの概念図

ーム製剤の開発を通じて医薬品医療機器総合機構「医薬品・医療機器や久慈戦略相談」を活用し、ナノテクノロジーを基盤とする医薬に置いて必要な規格試験や特性解析などの検討を通じて、医薬品レギュレーション行政への貢献が見込まれる。

以上より、本研究事業の2年目（平成25年度）では、腫瘍血管へ抗がん剤を送達し薬剤耐性がんを治療可能な dual-ligand リポソームの臨床応用化を最終目的として、非臨床試験に向けた GMP 基準の製剤化に向けた大量調製法の確立を目的として研究を遂行した。また、粒子径の増大がもたらす腫瘍血管内皮細胞への結合力の増大メカニズムの解明も合わせて行った。

## B. 研究方法

### 新規 ligand 修飾ラージサイズリポソームの開発と *in vivo* での機能評価

本年度は、dual-ligand リポソームを修飾する標的化リガンドとして腫瘍血管内皮細胞に高発現する  $\alpha_v\beta_3$  integrin を認識する cyclic RGD ペプチドを用いた (RGD リポソーム)。初めにこれまでと同様大きな粒子径を有するリポソームが効果的に

腫瘍血管内皮細胞を標的化可能かの評価を行った。

本実験で用いたリポソームは単純水話法で調製を行った。Egg phosphatidylcholine (EPC) とコレステロール (chol)、polyethyleneglycol (PEG) 脂質、およびその他のリガンド、CPP 等を、EPC:chol が 7:3、その他が任意の顔料となるようにガラス試験管に滴下し、よく混合した。その後、減圧下有機溶媒を留去することで、脂質薄膜を得た。等張にした 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) あるいは 20 mM アンモニウム硫酸緩衝液 (pH 5.5) を加えて水和したのち、拡販することで脂質薄膜をかい離させた。その後、任意のサイズの小孔を有するポリカーボネート膜を用いて粒子径を整えた。粒子径ならびにゼータ電位は動的光散乱法 (Zetasizer Nano ZA ZEN3600、Malvern 社) によって測定した。

血管内皮細胞への RGD リポソームの取り込みはヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討を行った。取り込みを見る際には、RGD リポソームの脂質薄膜を調製する際に 0.1% の蛍光物質ローダミン標識脂質を添加することで、RGD リポソームに蛍光標識を施した。HUVEC 細胞への取り込みは、リポソームを添加してから 2 時間後に共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) あるいは細胞溶解液の蛍光強度を測定することにより求めた。

in vivo での機能評価はヒト腎細胞がん OS-RC-2 細胞  $1.0 \times 10^6$  細胞を免疫不全マウス (BALB/cAJcl nu/nu) の背部皮下に移植したがんモデルを用いた。移植して 10 日程度経過したのちに、蛍光標

識 RGD リポソームを尾静脈内より投与し、24 時間後に腫瘍の様子を CLSM (Nikon A1r) を用いて観察した。血管の造影にはフルオレセインで蛍光標識された *Griffonia simplicifolia* 由来の isolectin B4 40  $\mu\text{g}$  を腫瘍採取の 10 分前に静脈内投与することで行った。

ドキシソルビシン (DOX) 封入 RGD リポソームの薬理効果を調べる際には、先ほど同様に作製した担がんマウスに対して、DOX 量で 1.0 ~ 2.0 mg/kg body weight の投与量で投与したのちに、継時的に腫瘍体積を測定し、抗腫瘍効果の判定を行った。なお、全身毒性の目安としては体重をモニタリングすることで簡易的に評価した。

RGD リポソームの HUVEC 細胞との解離定数 (dissociation constant;  $K_D$ ) は、種々のリポソームを添加した際の細胞内取り込み量をプロットし、シグマプロットを用いて近似曲線を描くことにより算出した。

#### GMP 基準での製造に向けた、閉鎖流路でのリポソーム製造

閉鎖流路による連続式のリポソーム調製を行った。流路としてはワイエムシ社のマイクロリアクター (SUS 製、Deneb (helix) 型) を用いた。脂質アルコール溶液と緩衝液はそれぞれ 10 mL ディスポーザブルシリンジ (Henke-Sass, Wolf 社) をシリンジポンプ (ハミルトン社) を用いて任意の流速で射出ように操作した。

リポソーム溶液中のアルコールはタンジェンシャルフローろ過により除去した。

MicroKros (Spectrum 社、MWCO 50,000) を用いて、溶液を 500  $\mu$ L まで濃縮したのちに、PBS 5 mL を加え、再び 500  $\mu$ L まで濃縮した。この操作を 3 回行うことで、ICH ガイドラインに定められているアルコール残存量よりも理論的に少ないように設定している。

なお、本研究事業は動物実験を実施するため、北海道大学が定める「動物実験に関する規定」に基づく承認を取得済みであり、必要最低限の個体数やがん治療実験における適切なエンドポイントの設定など、動物愛護上の配慮をした上で、遂行した。

### C. 研究結果

#### 新規 ligand 修飾ラージサイズリポソームの開発と in vivo での機能評価

RGD モチーフを含む  $\alpha_v\beta_3$  integrin 標的リガンド修飾リポソームを 100 nm と 400 nm のポアサイズを持つポリカーボネート膜に通すことにより平均粒子径約 100 nm の small size リポソーム (Small) と 300 nm の large size リポソーム (Large) を得た (Fig. 2)。

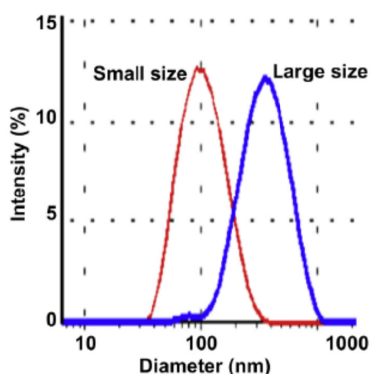


Fig. 2 各粒子径のリポソームの粒度分布  
蛍光標識を施した、これら異なるサイズを持つリポソームを HUVEC 細胞に添加

し、2 時間後に細胞を CLSM により観察した。その結果、Large においてより強い蛍光が細胞内に認められた (Fig. 3)。一方で、リガンドを修飾していないリポソームではこのような増大は認められなかった。

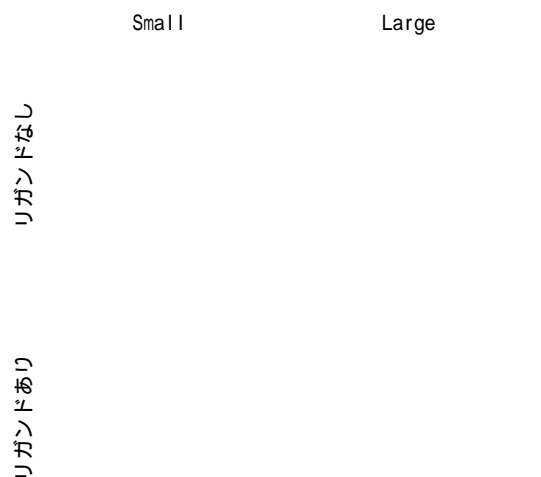


Fig. 3 リポソームの大きさが細胞内取り込み量に与える影響。赤はリポソーム、青は細胞核を表す。

同様に蛍光標識した Small と Large を細胞に脂質濃度で  $0.2 \sim 10 \times 10^{10}$  粒子となるように添加し、2 時間後の細胞内の蛍光量を定量した。これをプロットするこ

とで得た近似曲線から各々の  $K_D$  値を算出したところ Small で 6.96、Large で 0.62 粒子/well であった。このことから、細胞への結合力は Large のほうが 10 倍高いことが示唆された。

次に担がんマウスを用いて in vivo での検討を行った。担癌マウスはヒト腎細胞がん移植免疫不全マウスを用いた。初めに Large と Small の腫瘍血管内皮細胞への結合力の違いが in vivo でも見られるかを評価するために、Small と Large の各 RGD リポソームを担がんマウスの尾静脈内より投与を行い、腫瘍血管との共局在を CLSM によって観察した。その結果、Large において腫瘍血管とより多くのリポソームが共局在している様子が観察された (Fig. 4)。

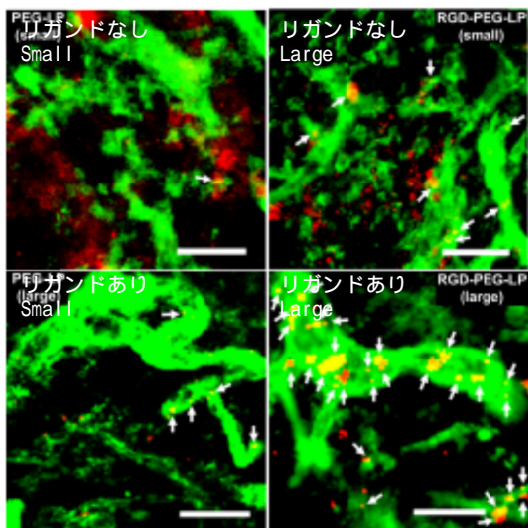


Fig. 4 リポソームの大きさが in vivo での腫瘍血管内皮細胞標的性に与える影響。赤はリポソーム、緑は血管を表す。

最後にこれまで見られてきた Large と Small の血管内皮細胞への結合力の違いが治療効果に影響を与えるのか検証を行った。ドキソルビシンをリガンドなしリ

ポソーム、Small、Large に封入し、ドキソルビシン量として 1.5 mg/kg で毎日 3 日間投与を行い、腫瘍の体積を継時的に測定した。その結果、Large においてのみ有意な抗腫瘍効果が認められた (Fig. 5)。

Fig. 6 閉鎖流路によるリポソーム調製の模式図

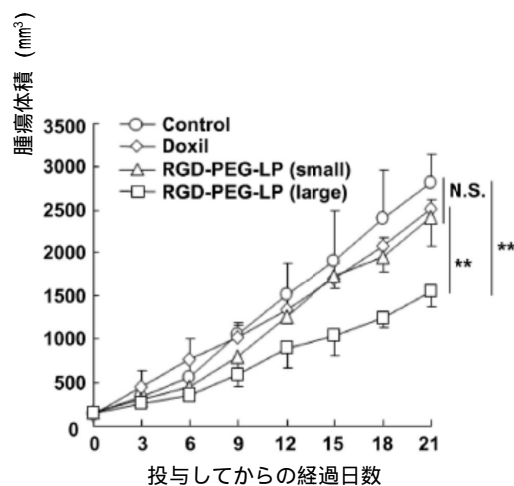


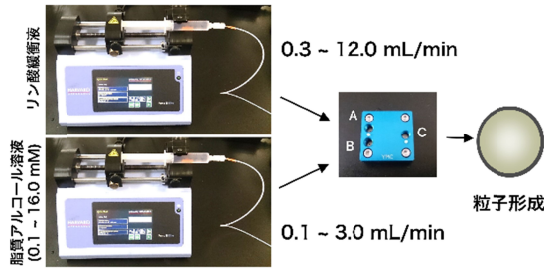
Fig. 5 ヒト腎細胞がん移植モデルにおける治療効果。

### GMP 基準での製造に向けた、閉鎖流路でのリポソーム製造

閉鎖流路によるリポソーム製造は下記の図に示すような装置を作成して行った (Fig. 6)。ワイエムシ社のマイクロリアクター (heix 型) に対して、ハミルトン社製のシリンジポンプを用いて、流路内にリン酸緩衝液と脂質アルコール溶液を注入した。リン酸緩衝液と脂質アルコール溶液は図に示すようなそれぞれ 0.3 ~ 12.0 mL/min、0.1 ~ 3.0 mL/min で流している。なお流速比については簡単な予備検討より、リン酸緩衝液と脂質アルコール溶液が 3:1 となるようにした。

初めに流速が粒子形成に与える影響の評価を行った。流速をそれぞれ上記のよ





うに変化させ、形成した粒子の物性を動的散乱法によって測定した。その結果、流速の増大に応じて粒子径は逆相関的に減少した (Fig. 7A)。このことから、流速の調節によって粒子のサイズは制御可能であることが示唆された。次に、脂質濃度と粒子サイズの相関について検討を行った。脂質濃度を 0.1 ~ 16.0 mM まで変化させて粒子を形成させた際の粒子物性を同様に動的散乱法によって決定した。その結果、2.0 mM 以上では安定に粒子形成が可能であることが明らかとなった (Fig. 7B)。

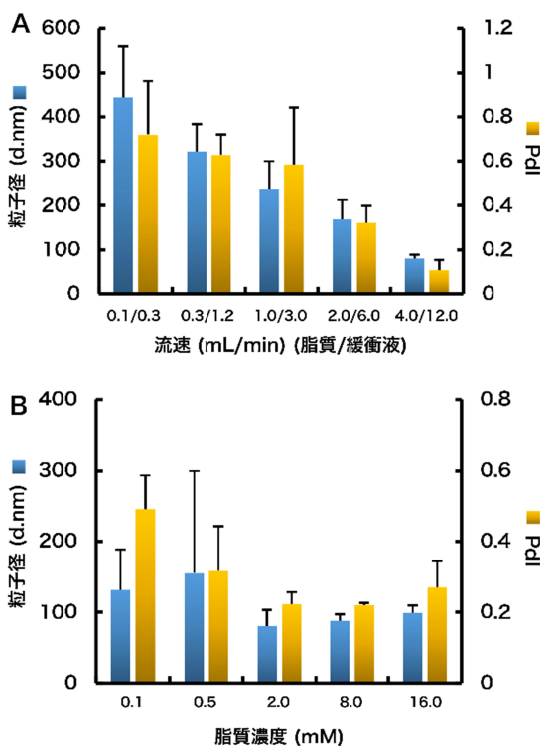


Fig. 7 閉鎖流路により調製したリポソームの物性。A) 流速を変えた際のリポソームの物性変化。B) 脂質濃度を変えた際のリポソームの物性変化。

さらに流速を 4.0/12.0 (脂質アルコール溶液/緩衝液) mL/min によって作成した粒子径の小さなリポソームについて過滅菌が可能かの検討も行った。0.2  $\mu\text{m}$  のセルロースアセテート、ポリエーテルスルホン製のフィルターを用いて過操作を行った。あらかじめ脂質膜に蛍光標識を施すことで過前後の脂質回収率を算出した。その結果、セルロースアセテート製のメンブレンを用いた際には過後にリポソームの脂質由来の蛍光は検出できなかった。一方で、ポリエーテルスルホン製のメンブレンを用いた際には過後も 90%程度の高い回収率で改修することが可能であった。

#### D. 考察

粒子増大による標的細胞に対する親和性の向上が認められた。これは、リポソーム上のリガンドが細胞と多価で結合することが可能になっているためだと考えられる (Fig. 8)。これにより、in vivo においても腫瘍血管内皮細胞への結合力が高まり、血中を循環する RGD リポソームが腫瘍血管内皮細胞への結合・細胞内取り込みが誘起されやすくなったものと推察される。

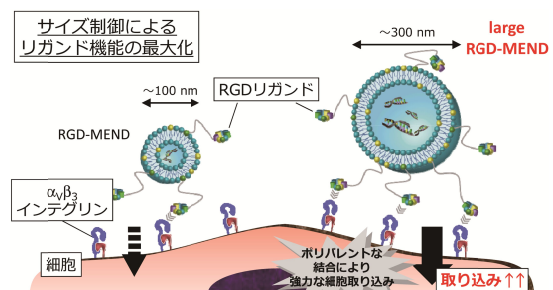


Fig. 8 粒子径を増大させた際の細胞への多面的結合



また、連続的な製剤調製に関しては、閉鎖流路を用いても特定の流速比、脂質濃度で溶液を注入することにより、任意の粒子径のリポソームを調製することに成功した。アルコールに溶解した脂質溶液を水溶液によって希釈してリポソームを形成する際には、それぞれの溶液の混合速度が重要であると報告されている。この結果は、過去のリポソーム形成の報告を満たすものであると言える。また、最終滅菌処理についても検討を行い、親水性のポリマーを使用することで脂質を損なうことなくリポソームをフィルター滅菌に供することが可能となった。今後、大きな粒子径を有するリポソーム調製の場合には原材料のろ過滅菌と最終製材の $\gamma$ 線による滅菌するなどすることで、無菌状態を担保した製剤の開発を行っていく予定である。

#### E . 結論

粒子サイズを大きくすることで細胞への親和性が大きく向上していることが明らかとなった。これは、細胞膜上の受容体とリポソーム上のリガンドがより多価の結合が可能となっていると考えられる。

また、製剤化においては目的とする粒子サイズへの制御を可能とする連続式製造法の確立に成功した。

#### F . 健康危険情報

特になし

#### G . 研究発表

#### 1 . 論文発表

- 1) Kibria G, Hatakeyama H, Harashima H. “Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system.” *Archives of Pharmacal Research*, 37(1): 4-15 (2014)
- 2) Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Ohga N, Hida K, Harashima H. “RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system.” *Journal of Controlled Release*, 173:110-118 (2014)
- 3) Akhter A, Hayashi Y, Sakurai Y, Ohga N, Hida K, Harashima H. “A liposomal delivery system that targets liver endothelial cells based on a new peptide motif present in the ApoB-100 sequence.” *International Journal of Pharmaceutics*, 456(1): 195-201 (2013)
- 4) Kibria G, Hatakeyama H, Ohga N, Hida K, Harashima H. “The effect of liposomal size on the targeted delivery of doxorubicin to Integrin  $\alpha\beta$ 3-expressing tumor endothelial cells.” *Bio-materials*. 34(22): 5617-5627 (2013)
- 5) 櫻井遊, “核酸医薬の現状と創薬のパラダイムシフト” *道薬誌*, 30 巻

12号: 4-10 ページ 2013  
年

(2013年10月で研究代表者の変更があ  
ったため、畠山と櫻井、両者の成果につ  
いて記載している。)

a pH-sensitive multifunctional  
envelope-type nano device (MEND)  
as an efficient nucleic acids  
delivery system”, July 21-24 2013,  
Hawaii Convention Center, Honolulu,  
Hawaii, U.S.A

## 2. 学会発表

- 1) 櫻井遊, 畠山浩人, 兵藤守, 秋田英  
万, 原島秀吉 “腫瘍血管内皮細胞  
標的型 siRNA デリバリーシステムの  
構築”, 日本薬剤学会第28年会、  
2013年5月23-25日、ウインクあい  
ち、名古屋
- 2) Hakeyama H et al., “Development of

(2013年10月で研究代表者の変更があ  
ったため、畠山と櫻井、両者の成果につ  
いて記載している。)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

本調製法に関しては、特許の出願に関  
して、本学の知財部と協議中である。

書籍  
該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kibria G, Hatakeyama H, Harashima H.	Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system.	Archives of Pharmacal Research	37 巻 1 号	4-15	2014 年
Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Ohga N, Hida K, Harashima H.	RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system.	Journal of Controlled Release	173 号	110-118	2014 年
Akhter A, Hayashi Y, Sakurai Y, Ohga N, Hida K, Harashima H.	A liposomal delivery system that targets liver endothelial cells based on a new peptide motif present in the ApoB-100 sequence.	International Journal of Pharmaceutics	456 巻 1 号	195-201	2013 年
Kibria G, Hatakeyama H, Ohga N, Hida K, Harashima H.	The effect of liposomal size on the targeted delivery of doxorubicin to Integrin $\alpha$ 3-expressing tumor endothelial cells.	Biomaterials	34 巻 22 号	5617-5627	2013 年
櫻井遊	核酸医薬の現状と創薬のパラダイムシフト	道薬誌	30 巻 12 号	4-10	2013 年