

骨髄抑制軽減療法を目的とした G-CSF 結合型 PEG-リポソームの開発

平成 10 年度進学 笠岡 敏
指導教官 伊賀 立二

[序論]

現在、癌化学療法は癌治療において重要な手段の一つである。しかし、その治療効果が殺細胞的であるため、癌以外の正常組織、特に骨髄の血液幹細胞を傷害し、好中球減少などの副作用を伴う。そこで、抗癌剤の骨髄細胞毒性を中和できる薬剤を骨髄に選択的に送達することや、P-糖タンパク質をコードする MDR-1 遺伝子を骨髄で発現させることによって、骨髄抑制を軽減できると考えられる。しかし、単に薬剤を全身投与するだけでは、骨髄選択的な送達は不可能である。そのため本研究ではリポソームの表面に PEG (polyethylene glycol) を修飾し、良好な血中滞留性を獲得させた後に、その PEG の先端に G-CSF を結合させた新規リポソームを開発した。このリポソームを用いて受容体介在性エンドサイトーシス(receptor-mediated endocytosis)によって、骨髄細胞内に選択的に封入物を送達できるか否かを検討した。その後、実際に抗癌剤を併用し、骨髄抑制軽減ができるか否かを検討した。

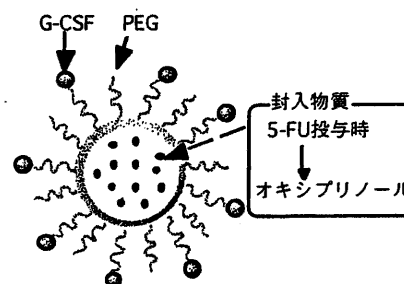


Fig. 1. G-CSF conjugated PEG-liposome

[研究内容]

1. G-CSF 結合型 PEG-リポソームの調製

Distearoyl phosphatidylcholine と cholesterol を 1:1 とした構成脂質に対して 5 mol% の PEG (M.W.=2000)-phosphatidylethanolamine と末端に maleimidyl 基を持った 1 mol% の PEG(M.W.=3400)-phosphatidylethanolamine を有機相 (CHCl₃ :iso-propylether =1:1, v/v) に溶解し、水相 (100mM MES buffer : pH 6.5) を加えた後に、プローブ型ソニケーターで良好なエマルジョンを形成し、直ちに 60℃ の温浴中で窒素を用いて有機相を飛ばし、リポソームを得た。その後、エキストルーダーで 100 nm にサイジングを行い、遺伝子組換え型ヒト G-CSF と 4℃ で 12 時間インキュベートして、G-CSF 結合型 PEG-リポソームを調製した。なお、結合しなかった G-CSF はゲル濾過によって除去した。このリポソームはリンの定量、G-CSF の ELISA 定量及び動的光散乱法による粒径の測定から、1 ベシクルあたり 10.3 ±1.9 個の G-CSF が結合していることが明らかとなった。

2. G-CSF 結合型 PEG-リポソームの体内分布

静脈内投与後の G-CSF 結合型 PEG-リポソームの分布を調べるために、³H-inulin を内封したリポソームを ddy 系雄性マウスに投与し、任意の時間に各臓器を摘出し Soluvable® を加え溶解した後、放射活性を測定した。一般にリポソームは骨髄内の網内系に取り込まれやすい性質を持っている。そこで、骨髄細胞に標的化されたリポソーム量を測定するために、

塩化ガドリニウム前処置群では、リポソーム投与の1日前、2日前に7 mg/kg 塩化ガドリニウムを尾静注して、網内皮系を飽和させた後に同様な実験を行った (Fig. 2)。リポソーム投与後4 hでG-CSF結合型PEG-リポソームは非結合型と比較して2.2倍の有意な骨髄集積性が認められ、また他の組織と比較しても、有意に高い集積性が認められた。また、血中滞留性では24時間後においても、G-CSF結合型は非結合型と同程度の20%以上の滞留性が確認され、G-CSFを結合することによる滞留性の低下は見られなかった。

以上の結果から、G-CSF結合型PEG-リポソームは骨髄選択的に集積できる長期滞留型の担体であることが示された。

3. G-CSF結合型PEG-リポソームの細胞内取り込み

*In vitro*において、G-CSF結合型PEG-リポソームがG-CSFレセプターを介して、細胞内に送達されるか否かを

G-CSFレセプターが発現しているヒト急性前骨髄球性白血病細胞HL-60を用いて確認した。HL-60細胞とリポソームを0℃で4hプレインキュベーションし、その後37℃でインキュベーションして、時間経過による内在化量と表面結合量を測定

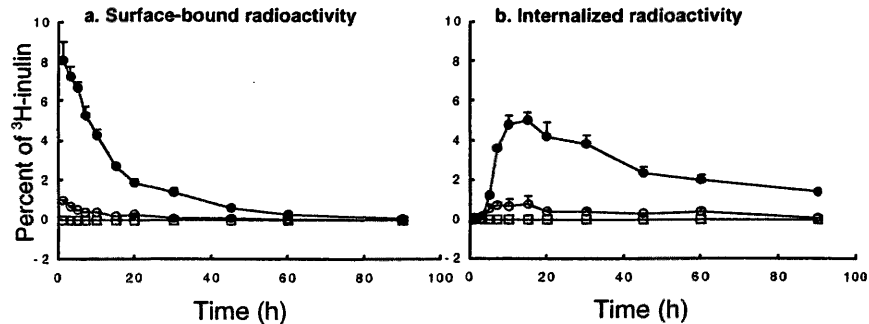


Fig. 3. Binding and internalization of G-CSF conjugated PEG-liposomes in the presence (○) and absence (●) of excess G-CSF, and PEG-liposomes (□) to the HL-60 cells, expressed as percentage of liposome-incorporated ³H-inulin associated with the cells. Each value represents the mean ± S.D. (n=5).

した (Fig. 3)。内在化量及び表面結合量は acid wash 法を用いて区別した。

G-CSF非結合型では0℃のプレインキュベーションでの表面結合はほとんど見られず、結合型においてのみ確認された。なお、この表面結合は過剰のG-CSFを前処理することによって、著明に減少した。また、G-CSFレセプターが発現していないK-562細胞では表面結合が見られなかった。リポソームのHL-60細胞表面結合量は経時的に減少し、一方では15minをピークとした内在化が確認された。

以上のことから、G-CSF結合型PEG-リポソームはG-CSFレセプターを介して、細胞内に取り込まれることが示唆された。

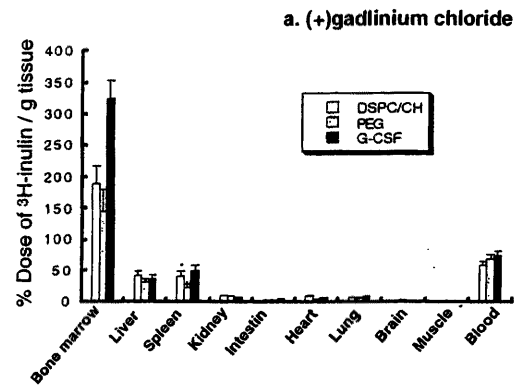


Fig. 2. Biodistribution of DSPC/CH-liposomes, PEG-Liposomes and G-CSF-Liposomes in mice at 4 h. Each value represents the mean ± SEM (n=5).

4. *In vitro* におけるオキシプリノール封入 G-CSF 結合型 PEG-リポソームによる 5-FU 毒性軽減効果

5-FU の拮抗物質であるオキシプリノールを封入した G-CSF 結合型 PEG-リポソーム及び 5-FU の存在下で G-CSF レセプターが発現している HL-60, KG-1a 細胞を培養し、その細胞数の変化を測定した (Fig.4)。また、オキシプリノール単独群及び、過剰量の G-CSF を前処理した各細胞におけるリポソームの効果についても検討した。

リポソーム併用群では HL-60, KG-1a 細胞いずれも、5-FU 単独群よりも有意に細胞の増殖率が上昇しており、また過剰の G-CSF を前処理することによって、増殖率は有意に低下した。また、G-CSF レセプターを発現していない K-562 細胞では、併用群において増殖率の上昇は見られなかった。

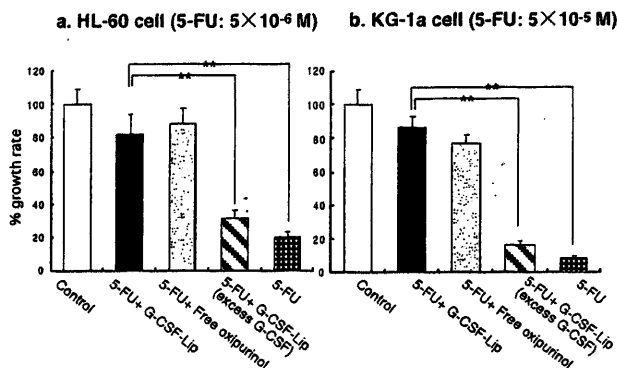


Fig. 4. Effects of oxipurinol-entrapped G-CSF conjugated PEG-liposomes and free oxipurinol on 5-FU-induced growth inhibition in HL-60 and KG-1a cells at 72 h. (**P<0.01) Each value represents the mean \pm S.D. (n=5).

5. *in vivo* におけるオキシプリノール封入 G-CSF 結合型 PEG-リポソームによる 5-FU 毒性軽減効果

オキシプリノール封入 G-CSF 結合型 PEG-リポソーム、empty G-CSF リポソーム、PEG リポソーム及び生食を ddy 系雄生マウスにそれぞれ i.v. 投与し、2 時間後に 5-FU (30mg/kg/day) をそれぞれ投与した。その後、白血球数を経時的に測定した (Fig. 5)。G-CSF 結合型リポソームを併用することによって、有意に白血球数の減少を抑制できることが明らかとなった。

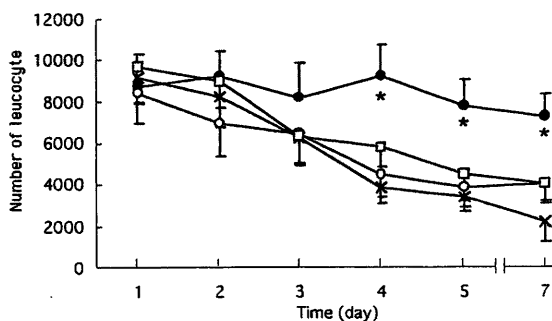


Fig. 5. Effectss of oxipurinol-entrapped G-CSF-conjugated PEG-liposomes (●), oxipurinol-entrapped PEG-liposomes (□), empty G-CSF- conjugated PEG-liposomes (○) and saline (×) on 5-FU-induced leucocyte toxicity in mice. *P<0.05 vs. saline treatment. Each value represents the mean \pm SEM (n=4-5).

[まとめ]

本研究で G-CSF レセプターを介して骨髄細胞に選択的に送達できるリポソームを開発することに成功し、これを用いて抗ガン剤の毒性中和物質をデリバリーすることにより、*in vitro*, *in vivo* 条件下で抗ガン剤の毒性を軽減することができた。本担体は今後、様々な抗ガン剤の拮抗薬及び *mdr-1* 遺伝子などの骨髄細胞への送達システムとしての応用が期待される。