

審査の結果の要旨

氏名 笠岡 敏

癌化学療法は癌治療において重要な手段の一つであるが、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、抗腫瘍薬の骨髄細胞毒性を軽減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り、この目的に適した送達システムを構築する必要がある。本研究は、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 の先端に骨髄細胞へ標的性がある G-CSF を結合させた G-CSF 結合型 PEG-リポソーム (GPL) を開発し、このリポソームに抗腫瘍薬の毒性を軽減する物質を封入し、その評価を行ったものである。

1. GPL 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、逆相蒸発法でリポソームを調製した。その後、エキストルーダーで 100 nm にサイジングを行い、rhG-CSF と 4℃ で 12 時間インキュベートして、GPL を調製した。なお、結合しなかった rhG-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、rhG-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. GPL の体内分布

静脈内投与後の GPL の分布を調べるために、³H-inulin を内封したリポソームをマウスに投与し、任意の時間に各臓器を摘出し、放射活性を測定した。また、骨髄細胞に標的化されたり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。リポソーム投与後 4 h で GPL 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、GPL 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. GPLの細胞内取り込み

In vitro において、GPL が G-CSF レセプターを介して、細胞内に送達されるかを 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 を用いて検討した。

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 15 min をピークとした内在化が確認された。また、内在化はモネンシン存在下で減少した。

以上のことから、GPL 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。

4. *In vitro*におけるオキシプリノール封入 GPL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 GPL 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。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。

5. *in vivo*におけるオキシプリノール封入 GPLによる 5-FU 毒性軽減効果

オキシプリノール封入 GPL、オキシプリノール未封入 GPL、PEG-リポソーム及び生食を正常マウス及び colon26 担癌マウスにそれぞれ i.v.投与し、2 時間後に 5-FU (10-50mg/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。GPL 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り、一方で抗腫瘍効果には影響を及ぼさないことが示された。

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 5-FU の毒性軽減物質であるオキシプリノールをデリバリーすることにより、*in vitro*, *in vivo* 条件下で 5-FU の毒性を軽減することができた。本担体は今後、様々な抗腫瘍薬の毒性軽減物質及び 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。

以上、本研究は、PEGを修飾することにより血液滞留性を獲得させたりポソームに、骨髄細胞への標的性があるG-CSFを結合させることにより、癌化学療法における抗腫瘍薬の骨髄細胞毒性を軽減する薬剤の送達システムを構築し、*in vitro*, *in vivo* 実験系においてその有用性を明らかにし、臨床応用への道を開くものとして、癌化学療法の適正化に寄与するところ大であり、よって博士（薬学）の学位に十分値するものである。