

《研究室紹介》

リポソームテクノロジーを基盤とする“DDSと免疫療法”の構築

丸 山 一 雄 Kazuo Maruyama

帝京大学薬学部医療薬学 II 講座生物薬剤学教室

1. は じ め に

帝京大学薬学部は、昭和 52 年 4 月に開設され、本年で 30 年を迎えました。昭和 53 年 4 月に岩鶴素治教授（開設時は助教授，翌年に教授昇任，帝京大学名誉教授，平成 15 年 12 月に永眠）を迎え薬剤学教室が設置されました。発足当時の研究室は、岩鶴素治教授，清水清助手（現郡上市民病院），舟木朋雄助手（現大塚製薬）で，昭和 55 年には西郡秀夫助教授（帝京大学名誉教授），筆者，青山和教務職員（現 NIH）の総勢 6 人のスタッフで教育と研究が本格的にスタートしました。その頃は，たん白結合に関する研究，ミセル医薬品に関する研究，鶏胚白内障に関する研究とスタッフが多かったので多義にわたる分野の研究を行っていました。その後，教務職員の入替がありましたが，筆者が留学から帰国した平成 2 年以降は，滝澤知子助手，湯田勉助手（現仁厚会病院薬局長），石田理助手（現理化学薬品），森部久仁一助手（現千葉大助教授），笠岡敏助手（現広島国際大助手）等がスタッフとなり，リポソームの研究を主流とした DDS の研究にシフトしました。平成 14 年 3 月に岩鶴素治教授が定年退職され，その 4 月より筆者が教室を継続して担当することになりました。同時に，薬学部が小講座制から大講座制に移行することになり，医療薬学講座 II，生物薬剤学教室と名称を変更して今日に至っています。現在は，宇都口直樹助教授，滝澤知子助手，鈴木亮助手，小田早苗秘書と大学院修士課程 5 名，卒論研究生 16

名の合計 26 名が所属し，研究を行っています（写真 1）。研究テーマは，「リポソームテクノロジーを基盤とする“DDSと免疫療法”の構築」を掲げ日夜研究に励んでいます。メンバーの詳細についてはホームページ <http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/lab/syakuzai/index.html> をご参照下さい。

2. PEG-リポソームの基礎から応用

薬物治療の最適化を目指す DDS の観点から，放出制御や標的指向性およびセンサー機能など，薬物の生体内挙動を制御するための新しい機能を盛り込んだ機能性リポソームの研究開発に取り組んできました。脂質二分子膜からなるリポソームは，優れた生体適合性や生体内分解性の面から理想的な薬物キャリアーとして，実に多くの研究が行われてきました。しかし，静脈内投与した場合，肝臓，脾臓等の細網内皮系組織（RES）に圧倒的な割合で取り込まれるという重大な問題点があり，そのことでリポソームの研究は長く停滞し，その解決がリポソームの実用化に不可欠でした。1988 年，博士研究員として留学したテネシー大学・Leaf Huang 博士（現ノースカロライナ大学）のもとで，この問題の解決に取り組みました。その結果，ポリエチレングリコール（PEG）でリポソームの表面を覆うと，肝臓や脾臓に集積しにくく著しく高い血中濃度を維持する特性を見出し，RES 回避特性を有するリポソームの開発に成功しました¹⁾。FEBS Letter¹⁾の論文は，PEG-リポソームに関する世界で最初の論文です。PEG-リポソームのアイデアは，RES 取込みに関与しているマクロファージが，自己よりも疎水性の高い表面をもっている粒子をよく取り込むことから，

〒 199-0195 相模原市相模湖町寸沢嵐 1091-1
TEL: 042-685-3722, FAX: 042-685-3432
E-mail: maruyama@pharm.teikyo-u.ac.jp



写真1 平成18年度研究室のメンバー

リポソーム膜表面に PEG を付与し親水性を増加させれば、マクロファージを回避できるのではないかと考えました。実際には、リポソーム表面に水和層が形成され、C3 などのオプソニン分子の吸着が阻害されることを突き止めました²⁾。

PEG-リポソームの高い血中滞留特性は、新生血管の発達した固形癌組織への移行量の増大を導き、内封した薬物を高濃度に送達させることが可能となりました³⁾。この移行性にはサイズが重要で、300 nm を越えると著しく減少することも突き止めました⁴⁾。また、体温より僅かに高い相転移温度をもつ脂質を用いて作成される PEG-温度感受性リポソームは、癌部位局所のハイパーサーミアとの組合せで、加温時のみ薬物を放出させることができ、薬物を癌局所に高濃度に送達させることが可能となりました⁵⁾。抗真菌薬であるアムホテリシン B は、腎毒性が高いうえ、難溶性のため製剤化の難しい薬物ですが、PEG-リポソームに高率に内封させる方法を開発しました⁶⁾。これは、アムホテリシン B と DSPE-PEG が相互作用する結果で⁷⁾、毒性の軽減と高い治療係数を有していました⁸⁾。

イムノリポソームによるターゲティングに関しても詳細な研究を行いました。In vitro 系では高い標的細胞との結合性を持つイムノリポソームが、生体

内ではほとんど機能しないこと、抗体付与量の増加は RES への取り込みを増加させ、むしろ逆効果であることなどを実験的に示し⁹⁾、PEG-リポソームにすることで解決できることを示しました¹⁰⁾。この場合、PEG 鎖の先端に抗体を付与した PEG-ペンダント型イムノリポソームが有用であること^{11~13)}と全抗体の代わりにその Fab' フラグメントを用いれば、血中滞留性を損なわず、固形癌組織に標的させることが可能となることを示しました¹⁴⁾。現在、イムノリポソームを用いて樹状細胞に抗原を送り込み、新規癌免疫療法の開発に取り組んでいます¹⁵⁾。

トランスフェリン (TF) を修飾した TF-PEG-リポソームは、癌組織に移行後、レセプターを介したエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれることから¹⁶⁾、薬物のみならず遺伝子医薬の癌細胞内送達システムの構築が可能になりました¹⁷⁾。その応用として、京大原子炉研究所とボロン中性子捕捉療法 (BNCT) の研究を進めています。ボロン化合物自身には腫瘍集積性はほとんどありませんが、TF-PEG-リポソームの特性によって、十分な濃度を送達可能となり高い治療効果が実証されました^{18~20)}。TF-PEG-リポソームの特筆すべき点は、血中濃度が低くなくても、癌組織中の薬物濃度 (BNCT の場合ボロン濃度) が長時間に渡って高濃度維持される

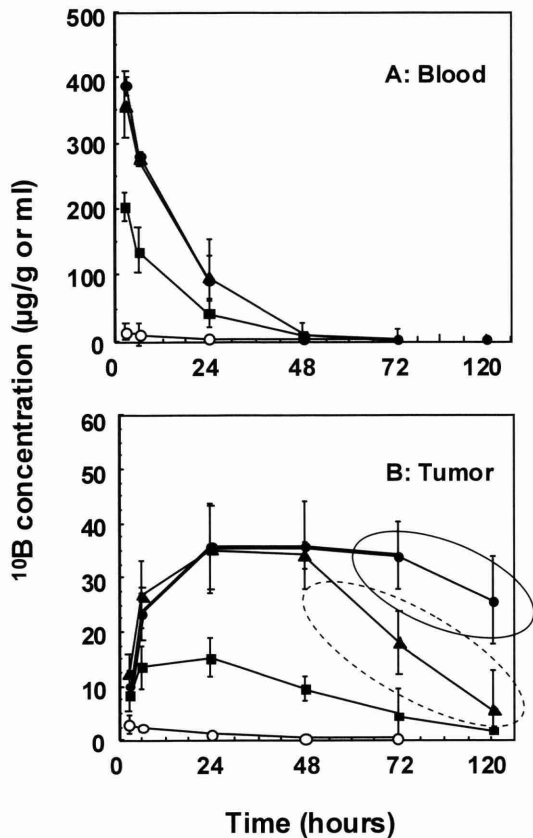


Fig. 1. Time Courses of Blood Residence (Panel A) and Tumor Accumulation (Panel B) of 10B Delivered by Each Kind of Liposomes Encapsulating BSH and by BSH Solution in Colon 26 Tumor-Bearing Mice.

Two hundred to 300 μ l of BSH-TF-PEG liposomes, BSH-PEG liposomes, BSH bare liposomes or BSH solution was injected into tumor-bearing mice *via* the tail vein at a dose of 35 mg 10B/kg. TF-PEG liposomes, with an average of 20 TF molecules per liposome, were used.

Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3-5$). ●, TF-PEG liposomes; ▲, PEG liposomes; ■, bare liposomes; ○, BSH solution.

点です (Fig. 1)。現在、TFの特徴を生かした新規な BNCT 用リポソームの開発にも取り組んでいます²¹⁾。その1例として、単独使用では有効性が認められない抗癌剤オキサリプラチンを TF-PEG-リポソームに内封すると、固形癌に対して高い有効性を示すことを示し、独立行政法人医薬品機構の助成を得て実用化の研究を進めてきました。この技術はメビオファーム社にライセンスされ、現在、米国において第1相臨床治験が進行中です。日本で開発された初の本格的リポソーム製剤の実用化を夢見ています。

3. リポソームテクノロジーを基盤とする “DDS と免疫療法” の構築

3.1 IgG 修飾リポソームの樹状細胞ワクチンへの応用¹⁵⁾

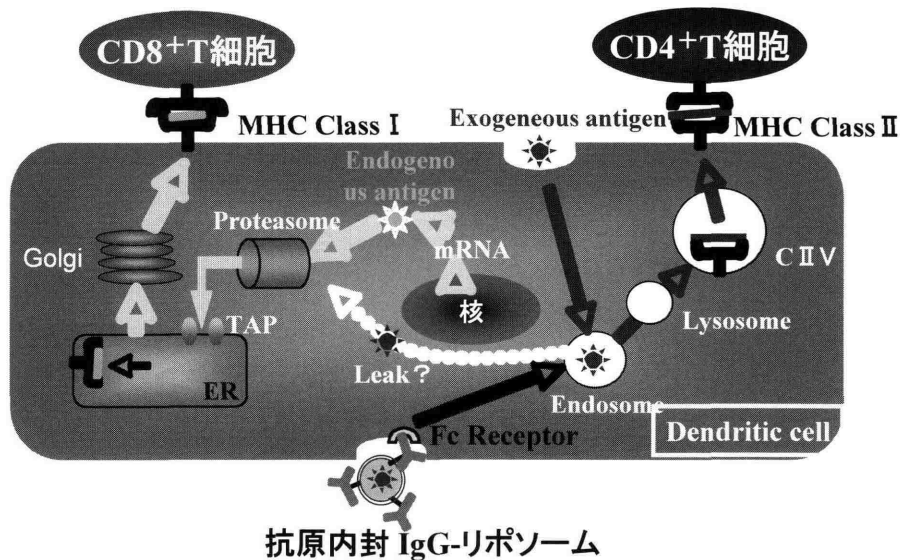
本研究は、鈴木助手と宇都口助教授主導で研究を進めています。近年、強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (Dendritic cells: DC) を用いた癌免疫療法が注目されています。癌細胞を効果的に拒絶するには細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化が不可欠です (Fig. 2)。CTL の活性化には、DC 上の腫瘍組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I に抗原提示させる必要があります。しかし、外来性抗原は主として MHC クラス II に抗原提示され、十分な CTL 活性が誘導できないことが知られています。一方、DC 上に発現している Fc レセプターを介して抗原が取り込まれると、MHC クラス I, MHC クラス II 両方の経路で抗原提示されることが報告されています。当研究室ではこの点に着目し、如何なる抗原でも封入可能なリポソームを用い、さらにその膜表面に IgG を付加した IgG-リポソームを作製しました。

これまでの研究でニワトリ卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として封入した、IgG-リポソームを DC に作用させると DC 上の MHC クラス I に OVA 由来ペプチドが提示され、効率良く抗原特異的 CTL を誘導可能であることを見出しました (Fig. 2)。また OVA 封入 IgG-リポソームを作用させた DC をマウスに免疫したところ、OVA 発現癌細胞の生着が完全に抑制されました。したがって、IgG-リポソームは DC を用いた癌免疫療法において、有用な抗原送達キャリアーであることが示唆され、現在、IgG-リポソームを作用させた DC における抗原提示機構の解明を進めています。

3.2 腫瘍組織新生血管を標的とした癌免疫療法

宇都口助教授が中心となって進めています。固形癌が増大する際に、酸素や栄養の供給および老廃物の除去を行うパイプとなる血管の新生が不可欠です。したがって癌組織部位の血管の破綻は、癌細胞のライフラインを絶つこととなり、癌組織の退縮が導かれます。ここで、癌細胞そのものではなく、癌組織の血管内皮細胞を標的とした場合、大きく分けて以下の利点が挙げられます。

- ① 効率の良さ：癌組織を構成する細胞は主に、



抗原内封 IgG-リポソーム

- Fc Rを介してDCに取り込まれた抗原は MHC class I、II 両方に効率よく提示される
- 粒子状の抗原は、少量の抗原量においても、DCの MHC class I に効率よく提示される

Fig. 2. IgG-リポソームを用いた抗原送達

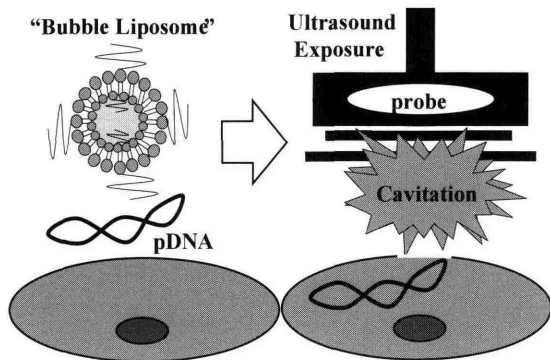


Fig. 3. Scheme of Gene Delivery with "Bubble Liposomes."

癌細胞と内皮細胞であるが、その細胞数比は 100 ~ 1,000 : 1 である。これは、1つの内皮細胞が 100 ~ 1,000 個の癌細胞を支えていることを意味し、1つの内皮細胞の死は、多数の癌細胞の死を誘導する。したがって 100 ~ 1,000 倍の効果が期待される。

② 幅広い癌種に適応可能：癌細胞を標的とした場合、癌種によって癌細胞の性質は大きく異なるため、それぞれの癌種に応じた標的を用意する必要があるが、内皮細胞をターゲットとした場合、どのような癌種であれ、標的は血管内皮細胞であり、共通の性質を有していると考えられ、幅広い癌種への適応の可能性がある。

③ 副作用の低さ：成人において血管新生が盛ん

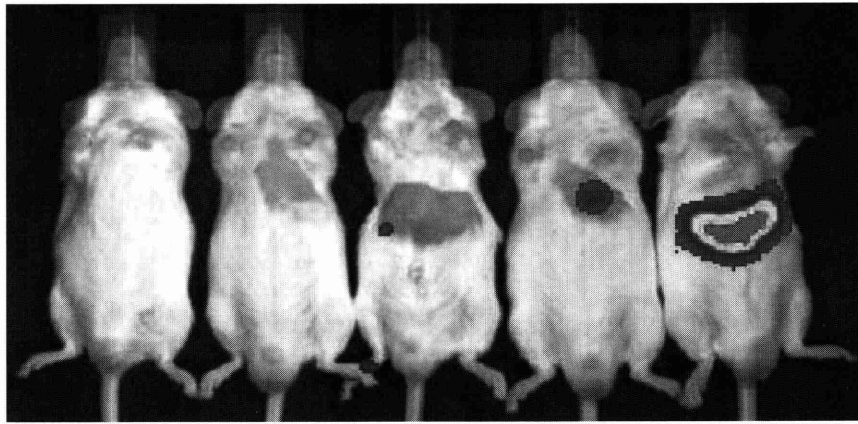
な部位は、癌組織以外では創傷治癒部位などに限定されるため、副作用が低いことが予測される。

④ 透過障壁の回避：血管内皮細胞は血液と直接、接しているため、抗体や免疫細胞が血管内皮細胞層を透過しなくても、標的に対して機能できる。

そこで、癌細胞そのものではなく、腫瘍組織血管を標的とし、免疫機構を利用して腫瘍誘導の血管を破綻させる新規癌免疫療法の開発を行っています。具体的には、腫瘍組織血管内皮細胞を抗原提示細胞である樹状細胞にパルスして、腫瘍組織血管内皮細胞に対する細胞傷害 T 細胞を活性化させ、腫瘍血管を破綻させるものです。現在、血管新生が関与する他の疾患への応用も検討中です。

3.3 バブルリポソームの開発と非侵襲治療システム

鈴木助手と滝澤助手を中心に進めています。PEG-リポソームに超音波造影ガスを封入したバブルリポソームの開発に成功し、非侵襲的に診断と治療を同時に行う DDS の開発に取り組んでいます。バブルリポソームに低周波数の超音波を照射すると、キャビテーションを起こし、その際に生じるジェット流で薬物やプラスミド DNA, siRNA などの核酸医薬を近傍の細胞内に送達できることを明らかにしました (Fig. 3)。そこで、分子標的バブルリ



pDNA	+	+	+	+	+
Bubble liposomes	-	-	-	+	+
US exposure site	-	Heart	Liver	Heart	Liver

Fig. 4. Imaging of Tissue-Specific Luciferase Expression with Non-Invasive Transfection by “Bubble Liposomes”.

ポソームと超音波技術をハイブリッドすることによって、外来遺伝子や siRNA などの核酸医薬を、特定の部位に、安全かつ確実に導入する新しい遺伝子送達システム (GDS) を考案しました。遺伝子治療を行う上で、安全かつ効率のよい遺伝子導入法は不可欠であり、深部の臓器組織に対して遺伝子治療を可能とする導入法の開発も極めて重要です。我々が確立したバブルリポソームは生体親和性が高く、しかも細胞内器官の単位 (ナノスケール) までサイズダウンしているため、これと超音波装置とのハイブリッドは、正常組織を傷害することなく、効率よく生体深部への遺伝子導入を可能とするシステムです (Fig. 4)。本システムによって、疾患の診断と遺伝子治療を施すことができることのみならず、治療効果も超音波で診断でき、すべてが非侵襲で治療が完結するという、画期的な診断治療システムが開発できます。本研究は、NEDO の産業技術研究助成および厚労省科研費萌芽の先端医療技術推進研究の助成を得て、診断と治療システムの開発および siRNA による癌治療を遂行中です。

4. お わ り に

DDS の基礎となる“魔法の弾丸”コンセプトを提唱したのは Paul Ehrlich です。2004 年 9 月、Nurnberg で Paul Ehrlich の生誕 150 周年記念 “World Conference on Magic Bullets” が開催されました。“魔法の弾丸”コンセプトは抗癌剤や抗生物質の開発を生み、平均寿命の延長をもたらす医療を大きく変

えました。しかし、副作用も強く、その軽減に向けた次の“魔法の弾丸”の開発、つまり DDS がここ 30 年来活発に進められてきました。そして、現在のナノテクノロジーを駆使した DDS キャリアーの開発研究につながっています。その中でも、リポソームは、Bangham らによる発見から約 40 年経過し、医薬業界における有用性が評価されつつあるキャリアーです。現在では、リポソーム製剤も 7 品目近く上市されるまでになり、副作用軽減や有効性向上に一役買っています。このように 21 世紀は、リポソームなどの薬物キャリアーを用いたナノメディシン時代の幕開けであり、既存医薬品を含めた新・旧医薬品の体内動態をいかに制御するかがポイントになります。

今後、我々はリポソーム研究を、積極的に臨床応用に結びつけていきたいと考えています。そのためには、臨床医の先生方との共同研究は実に心強く、常に新しい展開を取り入れ、幅広い知識と技術を吸収して役立てるよう努力していきたいと考えています。

岩鶴教授の指導下で薬学博士を取得後、1988 年～1990 年の 2 年間、テネシー大学の Leaf Huang 教授 (その後ピッツバーグ大を経て現在ノースカロライナ大) のもとに留学の機会を頂きました。そこで、リポソームの面白さとダイナミックさに取り憑かれ、これまでに多くの研究成果を出すことが出来ました。岩鶴教授と Huang 教授の寛大さにご指導

のたまものです。ここに深く感謝いたします。

また数多くの企業の方々にご協力・ご指導を頂きました。特に日本油脂の杉中氏、三栄ラップの山野氏には格別なご協力を頂き深謝申し上げます。菊池氏（第一製薬）、梅田氏（日水製薬）、田川氏（三菱ウエルファーマ）、早川氏・鈴木氏（ネッパジーン）の各氏には、格別なご指導を頂きました。PEG リポソームの研究では、佐々木教授（信大医）、谷教授（九大・医）、松村教授（国立がんセンター）、原島教授（北大薬）、免疫関連の研究では、中川教授・岡田先生（阪大薬）、門脇先生（京大医）、BNCTの研究では、柳衛先生（東大先端研）、中村教授（学習院大理）、小野教授（京大医）、バブルリポソームの研究では、萩沢先生（防衛医大）、西岡教授（埼玉医大）、立花教授（福大医）、根岸先生（東薬大）、数多くの先生と共同研究並びに多大なご指導を頂きました。ここに深謝申し上げます。

以上紹介した生物薬剤学教室（薬剤学教室を経て現在名）でのリポソームに特化して進めてきた研究を支え協力された多くの先生方、研究生、院生、卒業生諸君に感謝の意を表します。その中で、宇都口助教授は日本薬剤学会奨励賞（2006年）、鈴木助手は10th LRDでGenzyme賞（NC, 2006年）、滝澤助手は11th CWUMB（ソウル, 2006年）で若手研究奨励賞を受賞したことは、私にとって大きな喜びです。

引用文献

- 1) A.L. Klibanov, K. Maruyama, V.P. Torchilin, L. Huang, Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, *FEBS Lett.*, **268**, 235–237 (1990).
- 2) T. Yuda, Y. Pongpaibul, K. Maruyama, M. Iwatsuru, Activity of amphipathic polyethyleneglycols to prolong the circulation time of liposomes, *J. Pharm. Sci. Technol., Jpn.*, **59** (1), 32–42 (1999).
- 3) S. Unezaki, K. Maruyama, O. Ishida, A. Suginaka, J. Hosoda, M. Iwatsuru, Enhanced tumor targeting and improved antitumor activity of doxorubicin by long-circulating liposomes containing amphipathic poly (ethylene glycol), *Int. J. Pharm.*, **126**, 41–48 (1995).
- 4) O. Ishida, K. Maruyama, K. Sasaki, M. Iwatsuru, Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice, *Int. J. Pharm.*, **190**, 49–56 (1999).
- 5) S. Unezaki, K. Maruyama, N. Takahashi, M. Koyama, T. Yuda, A. Suginaka, M. Iwatsuru, Enhanced delivery and antitumor activity of doxorubicin using long-circulating thermosensitive liposomes containing amphipathic polyethylene glycol in combination with local hyperthermia, *Pharm. Res.*, **11**, 1180–1185 (1994).
- 6) K. Moribe, E. Tanaka, K. Maruyama, M. Iwatsuru, Enhanced encapsulation of Amphotericin B into liposomes by complex formation with polyethylene glycol derivatives, *Pharm. Res.*, **15** (11), 1737–1742 (1998).
- 7) K. Moribe, K. Maruyama, M. Iwatsuru, Molecular localization and state of amphotericin B in PEG liposomes, *Int. J. Pharm.*, **193**, 97–106 (1999).
- 8) T. Otsubo, K. Maruyama, S. Maesaki, Y. Miyazaki, E. Tanaka, T. Takizawa, K. Moribe, K. Tomono, T. Tashiro, S. Kohno, Long-circulating immunoliposomal amphotericin B against invasive pulmonary aspergillosis in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42** (1), 40–44 (1998).
- 9) K. Maruyama, E. Holmberg, S.J. Kennel, A. Klibanov, V.P. Torchilin, L. Huang, Characterization of *in vivo* immunoliposome targeting to pulmonary endothelium, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 978–984 (1990).
- 10) K. Maruyama, S.J. Kennel, L. Huang, Lipid composition is important for highly efficient target binding and retention of immunoliposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 5744–5748 (1990).
- 11) K. Maruyama, T. Takizawa, T. Yuda, S.J. Kennel, L. Huang, M. Iwatsuru, Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic polyethyleneglycols conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies, *Biochim. Biophys. Acta*, **1234**, 74–80 (1995).
- 12) M. Harata, Y. Soda, K. Tani, T. Takizawa, K. Maruyama, A. Tojo, S. Asano, CD19-targeting liposomes containing imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells, *Blood*, **104**, 1442–1449 (2004).
- 13) T. Mizoue, T. Horibe, K. Maruyama, T. Takizawa, M. Iwatsuru, K. Kono, H. Yanagie, F. Moriyasu, Targetability and intracellular delivery of anti-BCG antibody-modified, pH-sensitive fusogenic immunoliposomes to tumor cells, *Int. J. Pharm.*, **237**, 129–137 (2002).
- 14) K. Maruyama, N. Takahashi, T. Tagawa, K. Nagaike, M. Iwatsuru, Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol-coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors *in vivo*, *FEBS Lett.*, **413**, 177–180 (1997).
- 15) K. Kawamura, N. Kadowaki, R. Suzuki, S. Udagawa, S. Kasaoka, N. Utoguchi, T. Kitawaki, N. Sugimoto, N. Okada, K. Maruyama, T. Uchiyama, Dendritic cells that endocytosed antigen-containing IgG-liposomes elicit effective anti-tumor immunity, *J. Immunother.*, **29**, 165–174 (2006).
- 16) O. Ishida, K. Maruyama, H. Tanahashi, M. Iwa-

- tsuru, K. Sasaki, M. Eriguchi, H. Yanagie, Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors *in vivo*, *Pharm. Res.*, **18** (7), 1042–1048 (2001).
- 17) H. Iinuma, K. Maruyama, K. Okinaga, K. Sasaki, T. Sekine, O. Ishida, N. Ogiwara, K. Jyokura, Y. Yonemura, Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-PEG-liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer, *Int. J. Cancer*, **99**, 130–137 (2002).
- 18) H. Kobayashi, M. Satoh, M. Ethoh, K. Ogura, K. Maruyama, H. Yanagie, Microscopic response of radiation on imaging plates, *Radiation Protection Dosimetry*, **99**, 371–372 (2002).
- 19) H. Yanagie, K. Maruyama, T. Takizawa, O. Ishida, K. Ogura, T. Matsumoto, Y. Sakurai, T. Kobayashi, A. Shinohara, J. Rant, J. Skvarc, R. Ilic, G. Kuhne, M. Chiba, Y. Furuta, H. Sugiyama, T. Hisa, K. Ono, H. Kobayashi, M. Eriguchi, Application of boron-entrapped stealth liposomes to inhibition of growth of tumour cells in the *in vivo* boron neutron-capture therapy model, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **60**, 43–50 (2006).
- 20) K. Maruyama, H. Yanagie, O. Ishida, S. Kasaoka, T. Takizawa, N. Utoguchi, A. Shinohara, M. Chiba, H. Kobayashi, M. Iwatsuru, M. Eriguchi, Intracellular targeting of sodium mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) to solid tumors by transferrin-PEG liposomes, for boron neutron-capture therapy (BNCT), *J. Control. Release*, **98** (2), 195–207 (2004).
- 21) H. Nakamura, Y. Miyajima, T. Takei, S. Kasaoka, K. Maruyama, Synthesis and vesicle formation of a nido-carborane cluster lipid for boron neutron capture therapy, *Chem. Comm.*, 1910–1911 (2004).