

前立腺がんを標的としたレクチン修飾リポソームの開発

清水広介、大橋健人、奥 直人

1. 実験背景および目的

近年のめざましい医療技術の発達により、疾患に対する治療効果は飛躍的に向上したにも関わらず、がんは依然として死亡原因の1位にある。がんの化学療法に関しては、十分ながん治療効果を得るために分子標的治療薬などの新たな抗がん剤の開発も行われているが、従来の抗がん剤と同様、副作用により患者の生活の質(Quality of life, QOL)を著しく低くしてしまうケースもあり、その開発には多くの問題を抱えている。これらの問題を解決するべく、薬を目的の部位に、目的の濃度、目的の時間送達させる技術、ドラッグデリバリーシステム(Drug delivery system, DDS)の導入が試みられており、日本においても欧米に遅れること10年超、2007年にがん治療を目的とした抗がん剤封入リポソームが上市されるまでに至っている。

一方、レクチンは糖鎖に結合するタンパク質の総称であり、第3の生命鎖とも呼ばれ、細胞機能を制御する重要な分子であることが知られており、その詳細な解明研究がすすめられている。がんにおいては、シアリルルイスXなどがん細胞上に多く発現する糖鎖が、がんの成長や転移に関与することが知られており⁽¹⁾、また糖鎖はがんマーカーとしても実際に臨床の現場で用いられている。このため糖鎖は、がん標的治療における標的分子として十分期待できる。

本研究は、前立腺がんの細胞表面上に発現する糖鎖を特異的に認識するレクチン(LEC-1002)を用い、LEC-1002を表面に付加したレクチン修飾リポソームを作製することで、抗がん剤を効率的に前立腺がん組織に送達できる新たな薬物キャリアを開発し、がん治療の効率化を目指すものである。

2. 略語

用いた略語を以下に示す

BSA: Bovine serum albumin

DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DDS: Drug delivery system

Dil: 3, 3, 3', 3'-Tetramethylindocarbocyanine

DilC18: 1, 1'-Dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate

DPPC: Dipalmitoylphosphatidylcholine

DSPE: Distearoylphosphatidylethanolamine

EPR: Enhanced permeability and retention

HPLC: High performance liquid chromatography

NHS: N-Hydroxysuccinimide

PBS: Phosphate-buffered saline

PEG: Polyethylene glycol

QOL: Quality of life

SDS: Sodium dodecyl sulfate

UV: Ultraviolet

3. 実験材料および方法

3-1 レクチン

前立腺がんを標的とするレクチンLEC-1002は(株)J-オイルミルズから(財)杉山産業化学研究所を経由して入手した。

3-2 HPLCによるレクチンの定量

LEC-1002を10、30、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように0.1% SDS含有リン酸緩衝液で希釈して調製し、HPLC測定用のサンプルとした。LEC-1002検出のHPLC測定条件は以下のとおりである。HPLC装置: LaChrom Elite (Hitachi, Ltd.)、カラム: TSK-gel G3000 SWXL

(TOSOH Corporation)、移動相:0.1%SDS含有リン酸緩衝液、流速:0.5mL/min、注入量:50 μ L、カラム温度:40°C、検出器:UV (280 nm)、測定時間:30 min

3-3 レクチン修飾リポソームの作製

3-3-1 リポソームの作製

リポソームを構成する脂質はDPPC(ジパルミトイルホスファチジルコリン)とコレステロール(共に日本精化(株))を用いた。これらの脂質がモル比で2:1となるようにナスプラスコに分取し、エバポレーターにより溶媒(クロロホルム)を留去することで脂質薄膜を形成させた。次にデシケーター内で1時間真空乾燥し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)により水和させた。さらに液体窒素を用いて凍結融解を3回行った後、バス型ソニケーターにより10分間超音波処理を行った。得られたリポソーム溶液はエクストルーダー(Extruder, Lipex Biomembranes, Inc.)を用いて、100nmのポリカーボネートメンブレンフィルター(Nuclepore Track-Etch Membrane, Whatman Ltd)に通すことによりサイズ調整を行った。

3-3-2 リポソームへのレクチンの修飾

DSPE-PEG-NHS(日油(株))0.7mgとLEC-1002レクチン0.5mgをそれぞれ分取後ホウ酸緩衝液(pH8.3)に溶解して混合し、室温で一晩攪拌することでDSPE-PEG-NHSにレクチンを結合させた。得られた溶液を上記リポソーム溶液に加え、50°Cで15分間反応させることによりリポソームへのレクチンの修飾を行った。その後超遠心(100,000 rpm, 15分, 4°C, himac CS 120GXL, Hitachi Ltd.)を3回行い、さらにゲルろ過クロマトグラフィー(SepharoseTM 4 Fast Flow, GE Healthcare)を行うことにより、修飾されなかったレクチンを除去した。

3-3-3 レクチン修飾量の算出

分画して得られた各フラクションの吸光度(750nm)を測定することでリポソーム画分を決定し、さらに同フラクションにおけるレクチン量をHPLCにより定量することで、リポソームに修飾されたレクチン量を算出した。また得られたレクチン修飾リポソームはゼータサイザー(ZETA SIZER Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd)を用いることによりその粒子径および電位を測定した。

3-4 レクチン修飾リポソームのヒト前立腺がん細胞への結合

3-4-1 蛍光標識リポソームの作製

リポソームの蛍光標識にはDiIC₁₈ (Molecular Probes, Inc.)を用いた。リポソームの調製はDPPC、コレステロールとともにDiIC₁₈をモル比10:5:0.1となるように加え、その後の操作は前述(3-3)の方法と同様に行った。また本実験の対照群として、未修飾のコントロールリポソームおよび表面に牛血清アルブミン(BSA)を付加したBSA修飾リポソームも同様の方法で調製した。

3-4-2 レクチン修飾リポソームの前立腺がんへの結合量の定量

24穴プレートにヒト前立腺がんLNCaP細胞を 4×10^4 cells/well となるように播種し、一晚培養させた。DiIで蛍光標識したコントロールリポソーム(Cont-lip)、BSA修飾リポソーム(BSA-lip)およびレクチン修飾リポソーム(LEC-lip)をレクチン濃度として1、3、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにレクチン修飾リポソームを添加し(ただしCont-lipおよびBSA-lipについては同濃度のLEC-lipに含まれるDPPCと同じ濃度として)、37°Cで3時間インキュベートした。その後PBSを用いて細胞を洗浄し、1%SDSを含む細胞溶解液を加えて4°Cで1時間攪拌することにより、細胞を可溶化した。その後マイクロプレートリーダー(infinite M200, Tecan Group Ltd.)を用いてDiIの蛍光強度(Ex: 549 nm, Em: 565 nm)を測定した。

3-4-3 レクチン修飾リポソームの前立腺がん細胞への結合の観察

8穴チャンバースライド(Lab-Tek II Chamber slide, Thermo Fisher Scientific Inc.)にLNCaP細胞を 1.5×10^4 cells/wellとなるように播種し、一晚培養させた。3-4-1で調製したレクチン修飾リポソーム(LEC-lip)をレクチン濃度として10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し(ただしCont-lipおよびBSA-lipについては同濃度のLEC-lipに含まれるDPPCと同じ濃度として)、37°Cで3時間インキュベートした。PBSによる洗浄後、4%パラホルムアルデヒドにより細胞を固定し、さらに1%BSAによりブロッキングを行った。0.1%サポニンを含む3%BSAによる処理後、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDAPI (Dojindo Laboratories)を室温で15分インキュベートすることにより核を染色した。PermaFluor (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いてマウントした後、共焦点レーザー顕微鏡(LSM510META, Carl Zeiss)によりリポソームの細胞における分布を観察した。

4. 実験結果

4-1 HPLCによるレクチンの定量

HPLCを用いてレクチンの検出を行ったところ、Fig.1に示すようなチャートが得られた。そのチャートにおいて16分付近に鋭いピークが見られたため、レクチン由来の紫外線吸収であると考え、次に各濃度におけるピーク面積から検量線を作成した。その結果 R^2 値が0.999以上の近似直線が算出でき、レクチン濃度とピーク面積の相関が見られた(Fig.2)。また予備実験として移動相の溶媒を0.1%SDS含有0.1Mリン酸水素ナトリウム/0.3M硫酸ナトリウム緩衝液や0.1%SDS含有20mMトリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)などに変えて同様に検出を行ったが、0.1%SDS含有リン酸緩衝液ほどきれいなピークは見られなかったため、以降は移動相に0.1%SDS含有リン酸緩衝液を用いてHPLCによる定量を行うこととした。

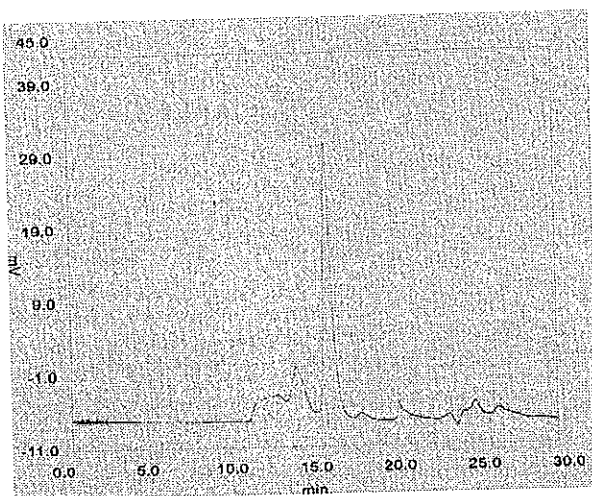


Fig. 1 Detection of LEC-1002 by HPLC

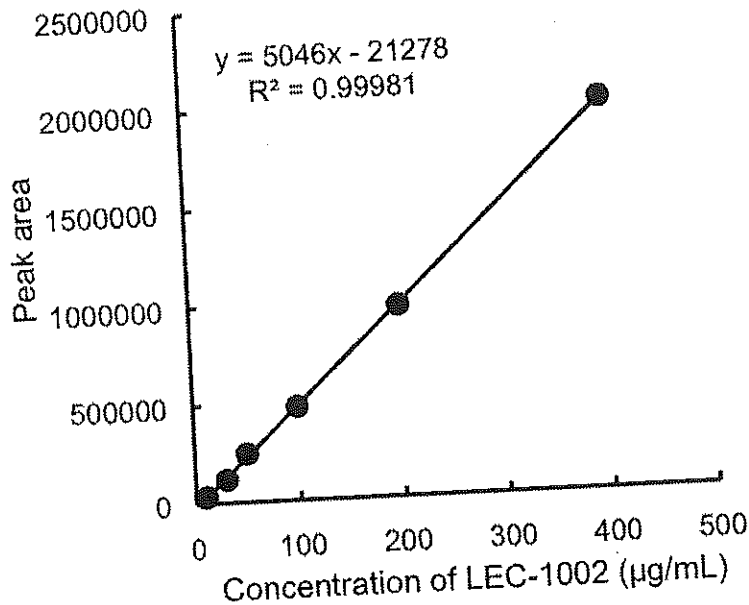


Fig. 2. Standard curve of LEC-1002

4-2 レクチン修飾リボソームの作製

レクチンのリボソームへの修飾法としてはポストインサージョン法を用いた。実験はあらかじめ調製した未修飾リボソームとレクチンを結合させたDSPE-PEG-NHS脂質をインキュベートさせることにより、リボソームへの修飾を行った。レクチン修飾リボソーム作製後は超遠心およびゲルろ過クロマトグラフィーにより修飾できなかったレクチンを除いた。この際の各フラクションにおける750 nmの紫外線吸収およびレクチン量を算出した結果をFig.3に示した。この結果、リボソーム画分として検出した750 nmにおける紫外線吸収が見られた同じフラクションにレクチンが検出された。これらの画分におけるレクチン量をFig.2で作成した検量線から求めたところ、レクチン量は82.1 µgであり回収率は16.4% (添加レクチン量は500 µg)であった。さらに作製したレクチン修飾リボソームの粒子径および表面電荷を測定したところ、平均粒子径が約140 nmで電位が-4.3 mVであった (Table 1)。

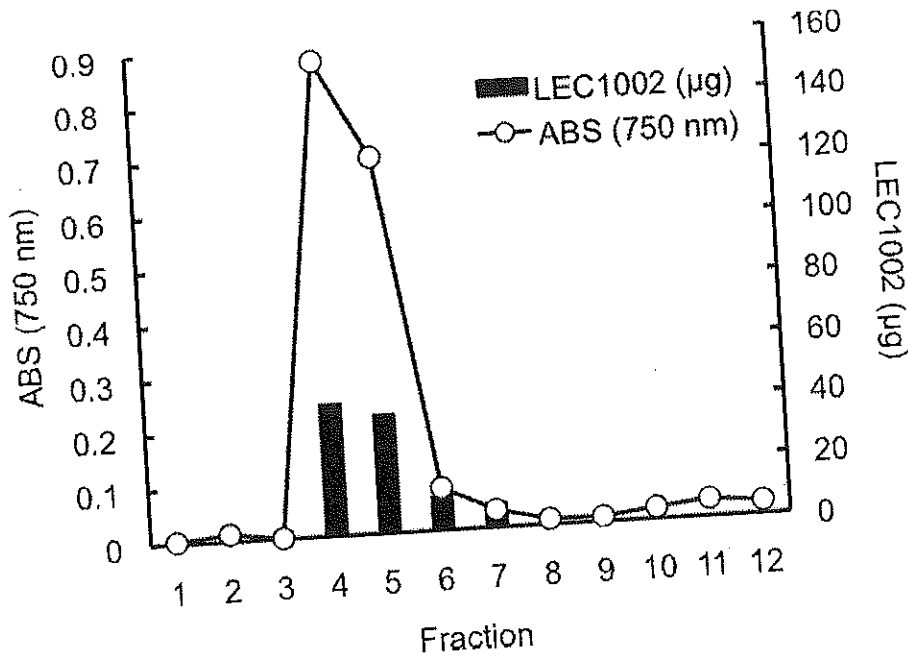


Fig. 3. Modification of LEC-1002 to liposomes

Prepared lectin-modified liposomes were separated by gel filtration chromatography to remove unmodified lectin and the absorbance at 750 nm in each fraction was measured to determine liposome fraction. The amount of LEC-1002 in each fraction was also measured by HPLC.

Table 1. Particle size and ζ -potential of liposomes

	Particle size (nm)	ζ -Potential (mV)
Cont-lip	133 \pm 23	0.27 \pm 0.71
BSA-lip	137 \pm 12	-3.93 \pm 0.53
LEC-lip	139 \pm 11	-4.34 \pm 0.75

4-3 レクチン修飾リポソームの前立腺がん細胞への結合

今回用いたLEC-1002はヒト前立腺がんの高い結合性を示すレクチンであるため、作製したレクチン修飾リポソームのヒト前立腺がん細胞株であるLNCaP細胞への結合性について調べた。実験は、DiIにより蛍光標識した未修飾リポソーム、BSA修飾リポソームおよびレクチン修飾リポソームをLNCaP細胞に添加し、細胞における蛍光強度を測定することによりリポソームの細胞への取り込み量を比較した。この結果、レクチン修飾リポソームはレクチン量依存的に細胞に結合し、また未修飾リポソームおよびBSA修飾リポソームに比べ有意に細胞内に取り込まれていることが明らかとなった (Fig.4)。

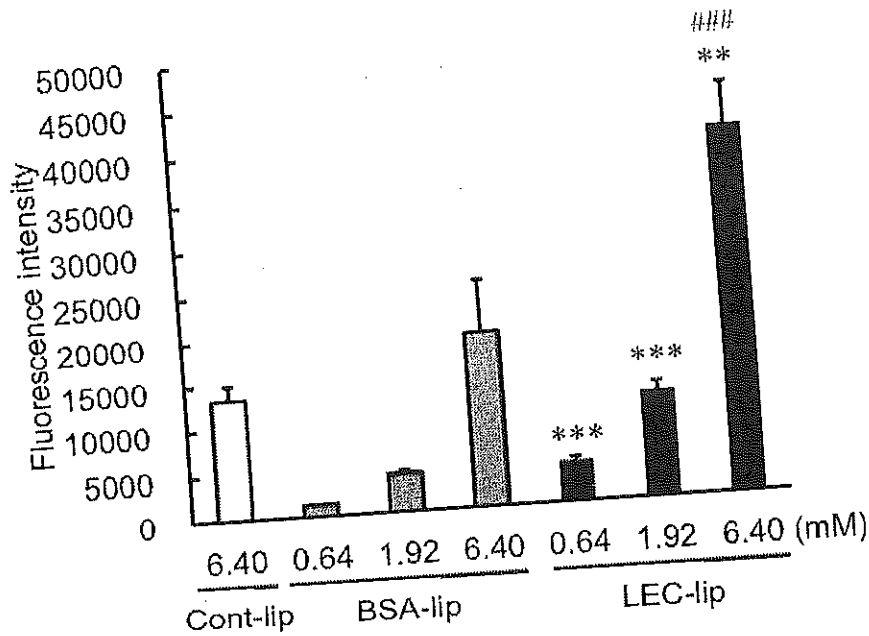


Fig. 4. Binding of LEC-lip to LNCaP cells

DiI-labeled Cont-lip, BSA-lip, or LEC-lip was added to human prostate cancer LNCaP cells and incubated for 3 h at 37°C. After wash, the cells were lysed and the fluorescence intensity of DiI was measured. Significant differences are shown (###, $P < 0.001$ vs Cont-lip; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ vs BSA-lip). Concentration of DPPC in each liposome was also shown.

さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いて、レクチン修飾リポソーム添加後のLNCaP細胞への結合の観察を行った。この結果、未修飾リポソームではほとんどリポソームの結合

が確認されなかったのに対し、レクチン修飾リポソームではリポソームの分布を示すDilの蛍光が非常に多く観察された。BSA修飾リポソームにおいても一部その蛍光は観察されたが、レクチン修飾リポソームと比較すると非常に少ないものであった。またレクチン修飾リポソームを添加した細胞において、細胞膜表面だけでなく細胞内にも取り込まれている様子が観察された(Fig.5)。

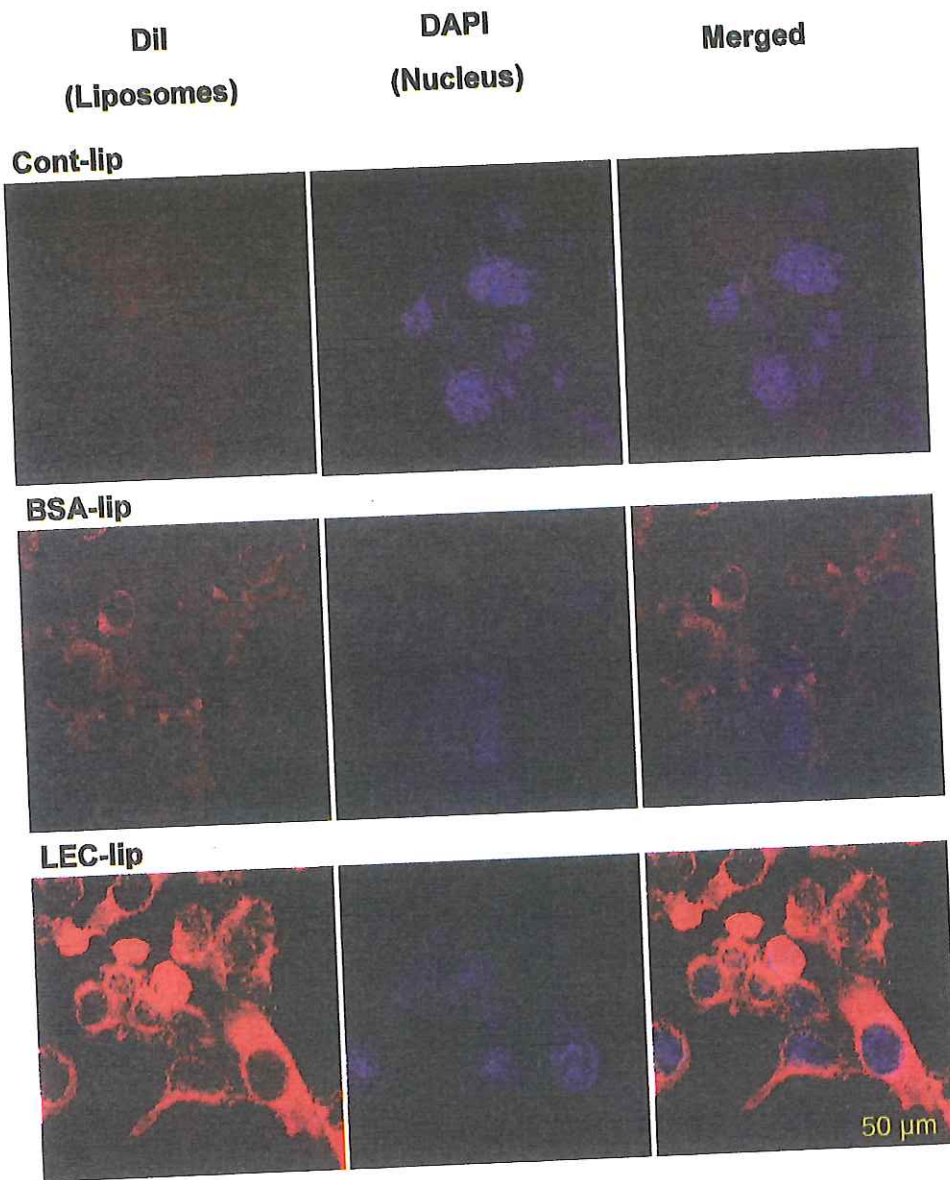


Fig. 5 Observation of liposome binding to LNCaP cells

DiI-labeled Cont-lip, BSA-lip, or LEC-lip was treated to human prostate cancer LNCaP cells and incubated for 3 h at 37°C. After wash the cells, the nucleus was stained with DAPI. Then the distribution of each liposome was observed under a confocal laser scanning microscope

5. 考 察

がんに対する治療戦略として、リポソームなどの薬物ナノキャリアを用いた抗がん剤の標的化戦略が注目を集めている。これら薬物ナノキャリアを用いたがん細胞へのターゲティングでは、がん細胞に多く発現するタンパク質や糖鎖などに対して特異的な認識を示す標的化プローブをアクティブターゲティングツールとして用いることが主流となっており、実験動物を用いた研究において良好ながん治療効果を示している⁽²⁾。これらの標的化戦略が成立するためには 1) 標的とする分子が正常細胞に比べがん細胞に多く発現していることと、2) 標的化プローブがそれら標的分子に対して特異的な認識を示すことが必須な条件である。1) に関しては、近年の分子生物学的技術の飛躍的な発展により、がんの発症や進行に関与する分子が数多く同定されており、実際に臨床の現場においてもがんの増殖に関与するサイトキニンやその受容体、トランスポーターや糖鎖等ががんマーカーとして用いられている^(3,4)。2) に関しては、その特異性および親和性の高さから抗体を用いることが望ましいが、コストや取り扱いの面などから、比較的安価なペプチドや低分子化合物を標的化プローブとして用いるケースが多い。一方でレクチンは、抗体ほどではないがある程度結合選択性を有した糖鎖に結合するタンパク質であり、前立腺がんのがんマーカー検出のためのツールとしても用いられているなど、その汎用性は高いと言える⁽¹⁾。本研究では前立腺がんに対する新たな治療法の確立に向け、前立腺に高い結合性を示すレクチンLEC-1002を標的化プローブとして用い、レクチン修飾リポソームの開発を行った。まず始めにHPLCを用いたLEC-1002の定量法の確立を行い、レクチン濃度とピーク面積から検量線を作成した(Fig. 1, 2)。次にレクチン修飾リポソームの調製を行った。我々はこれまでにペプチドや抗体などの標的化プローブを修飾したリポソームの開発研究を行ってきており⁽⁶⁾、本研究においてもその手法の一つであるポストインサージョン法を用いた。ゲルろ過クロマトグラフィーによる分離の結果、リポソーム画分と同画分にレクチンが検出されたため、レクチン修飾リポソームが調製できていることを確認した(Fig.3)。しかし、レクチンの回収量は16.4%であり、実際のリポソームの構成モル比として示すとDPPC:コレステロール:レクチンが2:1:1.4 x 10⁻⁵ であり、レクチンの修飾量としては少ないものとなった。これはレクチンの分子量が約 200 kDa と非常に大きいものであるため、リポソームへの修飾過程において一部障害が出たのではないかと考えている。しかし、実際

ヒト前立腺がんLNCaP細胞への標的性を調べたところ、未修飾リポソームやBSA修飾リポソームに比べ有意に高い結合および取り込みを示した (Fig. 4, 5)。これらの結果からリポソームのレクチンへの修飾は低かったが、十分標的性を有していることが明らかとなった。また得られたリポソームの平均粒子径および電位はそれぞれ約140 nm、-4.3 mVであった (Table 1)。粒子径を100~200 nm程度に調整したリポソームは、生体内に投与後、肝臓や脾臓などの細網内皮系組織への移行を回避すると共に、がん組織の血管透過性が高いことを利用したEnhanced permeability and retention (EPR)効果により、がん組織に多く集積することが知られている⁽⁶⁾。本研究で調製したレクチン修飾リポソームもEPR効果によるがん標的化も期待できるとともにレクチンによる前立腺がんに発現する糖鎖へのアクティブターゲティングも兼ね備えているため、前立腺がんへの抗がん剤の効率的な送達が可能で、がん治療において非常に有効であることが考えられた。

6. 結 論

本研究は前立腺がんを標的としたレクチン修飾リポソームの調製を行い、ヒト前立腺がん細胞に高い集積性を示すリポソームの開発に成功した。よってこのレクチン修飾リポソームに抗がん剤などの薬物を封入した製剤を用いることにより、前立腺がんに対する非常に効率的な治療が可能である。本研究の成果が、今後の前立腺がんに対する治療において有用なデータとなることを期待している。

7. 謝 辞

本研究は、2009年度杉山産業化学研究所研究助成により実施することができました。研究を助成していただいた財団法人杉山産業化学研究所に深く御礼申し上げます。

参考文献

- (1) Fuster, M.M., and Esko, J.D.: The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 5(7), 526-542 (2005)

- (2) Allen, T.M., and Cullis, P.R.: Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303(5665), 1818-1822 (2004)
- (3) Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Tanaka, S., Ishizuka, T., Kanai, Y., Endou, H., Nakajima, T., and Mori, M.: l-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci*, 99(12), 2380-2386 (2008)
- (4) Califice, S., Castronovo, V., and Van Den Brule, F.: Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol*, 25(4), 983-992 (2004)
- (5) Ichikawa, K., Urakami, T., Yonezawa, S., Miyauchi, H., Shimizu, K., Asai, T., and Oku, N.: Enhanced desensitization efficacy by liposomal conjugation of a specific antigen. *Int J Pharm*, 336(2), 391-395 (2007)
- (6) Shimizu, K., Asai, T., and Oku, N.: Antineovascular therapy, a novel antiangiogenic approach. *Expert Opin Ther Targets*, 9(1), 63-76 (2005)