

磁気リポソーム粒子を用いた癌の温熱療法の研究

名古屋大学大学院工学研究科 本多裕之、井藤 彰、新海政重、小林 猛

1. はじめに

リポソームとは、生体膜の構成成分であるリン脂質により形成される、生体適合性に優れた小胞であり、その小胞内に様々な薬物を封入できることから、薬剤のキャリアーとして広く利用されている。さらに、リポソームの荷電、粒子径、脂質成分を変えたり、リポソーム表面に抗原、抗体、糖などの特異的リガンドを結合させたりすることで、細胞あるいは組織に対して特異性を持たせることが出来ることから、ターゲティング可能な薬剤キャリアーとして注目を集め、抗ガン剤をはじめとした副作用が強い化学療法剤の運び屋として臨床応用されている。

筆者らはリポソームに直径 10nm の磁性ナノ微粒子であるマグネタイトを封入し、腫瘍へターゲティングさせる研究を行ってきた(図 1)。マグネタイトは Fe_3O_4 酸化鉄のコロイドであり、磁気共鳴イメージング (MRI) 法の造影剤として¹⁾、あるいは磁気をセンサーで感知すること (磁気センシング法²⁾) によって生体内におけるガンの存在位置を確認できる。さらに、患者の生体外部から交番磁界を印可して発熱させることで、ガンの温熱療法に利用できる。つまり、マグネタイトをガンに特異的に送達することが出来れば、ガンの診断と治療が同時に出来るシステムが確立できる。本稿では、私たちが長年進めてきた、ナノ微粒子であるマグネタイトを組織内加温素子として使う新しい癌温熱治療について紹介する。

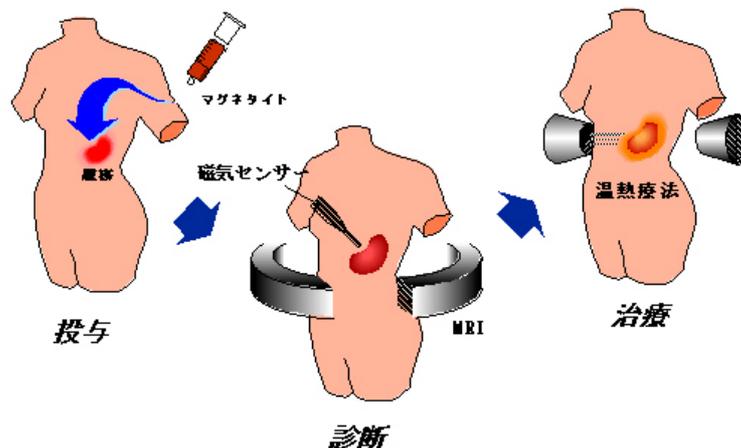


図 1 磁性微粒子を用いたガンの診断と治療

2. カチオンリポソーム

カチオンリポソームとはリポソーム膜の表面に4級アミン(- NH^3+)などの正電荷官能基を持つものである。リポソームの外面に正電荷を持たせることによって、負電荷を帯びた細胞との相互作用を増強させ、細胞内に薬剤を取り込ませることが出来る。その相互作用には、脂質交換反応、吸着、融合、エンドサイトーシスおよび受容体の関与などが挙げられる。

カチオニックリポソームは近年、遺伝子の細胞への非ウイルス性導入用キャリアーとして広く用いられるようになった。リポソームは形態学的には小さな1枚膜リポソーム (small unilamellar vesicles: SUV) と大きな1枚膜リポソーム (large unilamellar vesicles: LUV) と多重層リポソーム (multilamellar vesicles: MLV) に分類されている。正電荷を持つ SUV は遺伝子導入に最も一般的に用いられているリポソームである。そのサイズは 20-50 nm であり、添加された DNA は負の電荷を持つので、リポソームの外側に付着して複合体を形成する。一方、Yagi らは N-(trimethylammonioacetyl) didodecyl -D-glutamate chloride (TMAG), dilauroyl-phosphatidylcholine (DLPC), dioleoyl-phosphatidylethanolamine (DOPE) の3種類の脂質をモル比 1: 2: 2 で構成される MLV のカチオニックリポソーム内に DNA を封入した³⁾。ここで、TMAG がカチオン性脂質である。名古屋大学医学部では TMAG を用いたカチオニックリポソームによる、ヒト悪性脳腫瘍に対する型インターフェロン遺伝子治療の臨床研究が行われた⁴⁾。

筆者らは、この組成のカチオニックリポソームの内部に酸化鉄の 10 nm 程の微粒子であるマグネタイトを封入する方法を検討し、腫瘍局所投与による腫瘍へのターゲティングの研究を行った。クロロホルムに溶解した前述の組成脂質を含む溶液をロータリーエバポレーターにより蒸発留去して、形成された脂質フィルムを減圧乾燥後にマグネタイトを加えて、ボルテックスで処理し、さらに超音波処理するとマグネタイトカチオニックリポソーム (MCL) が得られる (図2左)。in vitro での MCL のラット脳腫瘍細胞 (T-9 rat glioma) への導入効率は、電荷を持たない中性のリポソームに封入したマグネタイト (マグネトリポソーム) と比較して 10 倍以上高かった (図2右)⁵⁾。そこで次に、このマグネトリポソームを用いたガン組織の温熱治療の研究を行った。

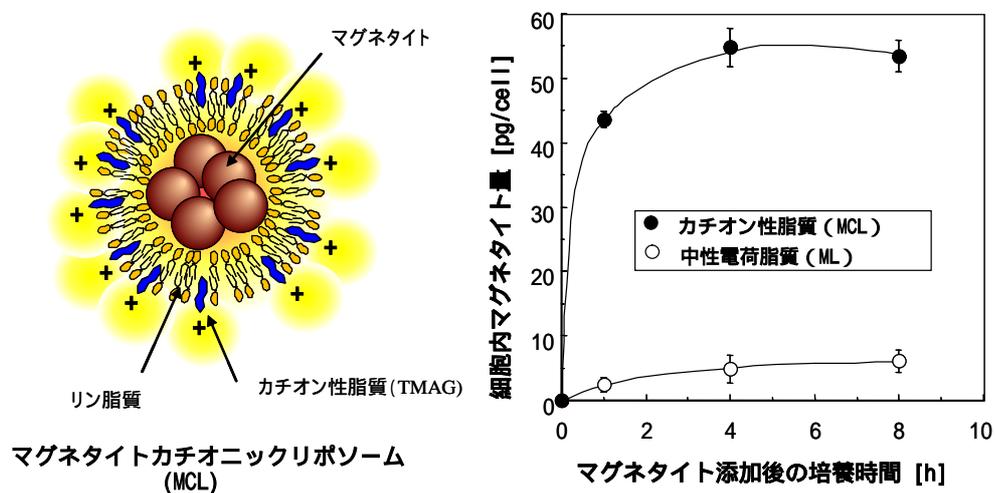


図2 MCL (左) とカチオニック脂質の効果 (右)。T-9 細胞を MCL 入り、あるいは ML 入り培地で培養し、細胞内のマグネタイト濃度を測定した (右)。

3. ナノ磁性微粒子を用いたガンの温熱療法

「薬で治らなければ手術で治すことができる。手術で治らなければ熱によって治すことができる。もし熱で治すことができなければ、それは不治の病だろう。(ヒポクラテス)」

温熱療法 (ハイパーサーミア) は、古代ギリシャから行われてきた古い治療法で、ガン細胞が正

常細胞に比べて熱に弱いという性質を利用した治療法である。多くのガン細胞は 42.5 以上で熱に対して感受性を示し、温度が高ければ高いほどガン細胞は殺傷される。現在、広く用いられている温熱療法は、電極で体を挟んでラジオ波を印可する誘電加熱法である。しかし、この加熱法では正常組織とガン組織が区別なく加熱されてしまうことから、ガンを十分に殺傷する温度に加熱する前に、正常組織が火傷してしまい、患者の苦痛が原因で加熱を中止しなくてはならない欠点がある。そこで我々は、マグネタイトを発熱素子とした誘導加熱法を開発した。マグネタイトを腫瘍組織に特異的に送達することができれば、ガン特異的な温熱治療が可能になり、腫瘍組織だけが死滅するまで加熱することができる。

マグネタイトは高周波磁場中でヒステリシス損によって発熱する。ここで、ヒステリシス損による発熱は、マグネタイトの粒子径に依存することが知られている。粒子径が 10nm 以下であると、マグネタイトは超常磁性 (SPIO) となりヒステリシス損が生じず、発熱しない。一方、粒子径が 25nm 以上になると、粒子自身の磁気により凝集が起こり、マグネタイトコロイドの水分散性が損なわれる。ここで、水分散性が悪く、沈殿が生じてしまうと、リポソームに包埋することができなくなる。前節で述べたように、超常磁性と強磁性の境界が最も MRI の造影剤として優れていること、といった二つの理由から、我々は 10nm のマグネタイトを主に使用している。

MCL は細胞への高い導入効率を示すので、高周波磁界を照射することで、温熱治療が可能な 42.5 まで上昇させることができる。in vitro では 40 分磁界を照射することで癌細胞は死滅した。さらに、in vivo における治療効果を調べるために、T-9 rat glioma 細胞をラットの大腿部皮下に移植したモデルを用いて検討した⁶⁾。カチオンリポソームのターゲティング能力は、カチオンリポソームの局所注入によって、その局所にある標的細胞に静電的相互作用によって達成

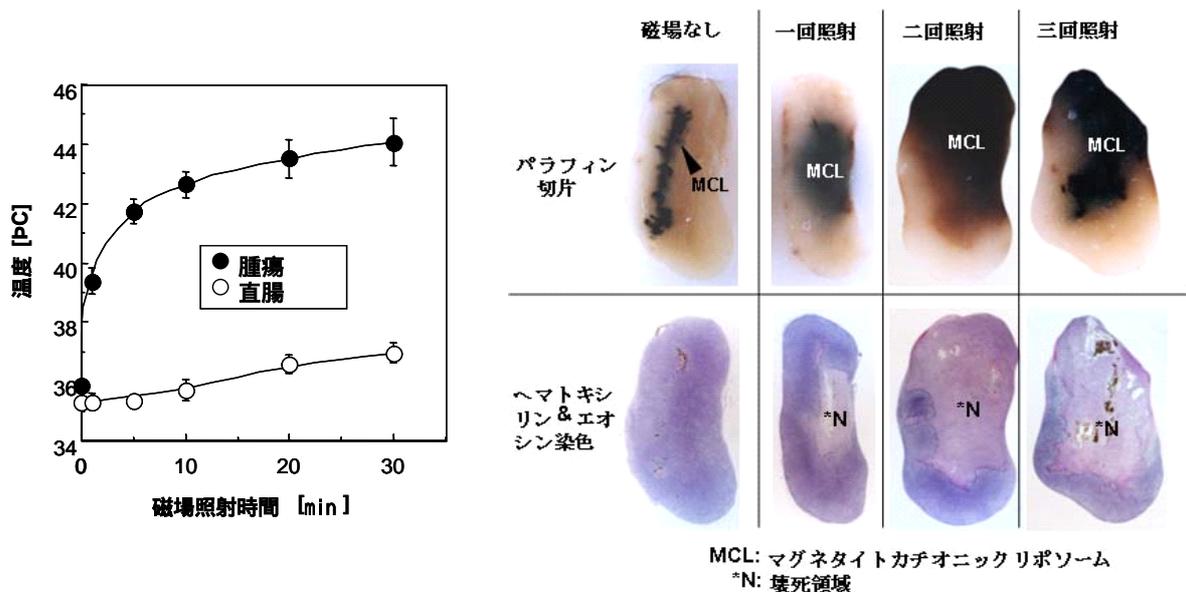


図3 温熱療法と組織切片の写真。交番磁場照射による温度上昇(左)とMCL注入4日後に摘出した腫瘍切片(右)

される。そこで、皮下腫瘍に対してMCLを腫瘍に直接注入した。MCL注入1日後に交番磁界を

照射したところ、腫瘍において顕著な温度上昇がみられた（図3左）。また、この温度上昇によって、腫瘍の壊死領域が MCL 注入部位の周辺に形成されることで、そこへマグネタイトが拡散していき、3 度にわたって磁界を照射することで腫瘍の大部分にマグネタイトが拡散し、腫瘍を壊死させる様子が観察された（図3右）。このことから、MCL の腫瘍組織へのターゲティングは、局所投与ではあるが、そこに留まることで結果的に腫瘍内の広範囲に分散し、腫瘍組織全体を加温できることから、DDS の観点からも温熱療法において非常に有用であると考えられる。

MCL の臓器への移行を調べるために、腫瘍局所投与してから4日後のラットから各臓器を摘出して、Berlin blue & Kernechtrot による鉄染色を行った。MCL は肝臓、肺、心臓には見られなかったが、脾臓において顕著に観察された。静脈内に投与した多重層リポソームは、細網内皮系（reticuloendothelial system, RES）の臓器である肝臓と脾臓に分布しやすいことが分かっている⁷⁾。比較的粒子径の小さなリポソームは、局所投与の場合であっても、組織から血液中に漏出して細網内皮系の臓器である肝臓と脾臓に分布する可能性がある。あるいは、組織間隙から毛細リンパ管に吸収される経路も考えられる。しかし MCL を皮下腫瘍に注入した場合に、なぜ同じ細網内皮系臓器である肝臓には集積せずに脾臓で多く集積しているのかは明らかではない。いずれにしても、腫瘍内に局所投与した MCL は結果的に血液中に漏出して、細網内皮系組織である脾臓のマクロファージによって捕捉されたと考えられる。

マクロファージは専門的抗原提示細胞の一つで、リポソームがマクロファージに貪食されやすいことを利用した免疫療法の研究が古くから行われている⁸⁾。最近、リポソームの表面電荷と腫瘍免疫における抗原性補強効果の関係が調べられ、カチオニックリポソームが抗原特異的な免疫応答を引き起こすことが報告された⁹⁾。筆者らは、MCL による温熱療法において腫瘍特異的な温熱療法が引き起こされることを見出している¹⁰⁾。温熱療法後の腫瘍内にはおびただしい数の免疫担当細胞が集積しており、その中にはマクロファージも多数見られた。また、筆者らは温熱療法によってガン細胞内でヒートショックプロテイン（HSP）の発現量が高まり、ガン細胞自身の免疫原性が高まることを見出している¹¹⁾。この腫瘍抗原をマクロファージなどの抗原提示細胞が貪食する際に、カチオニックリポソームの抗原性補強効果が働いているのかもしれない。つまり、カチオニックリポソームを利用することで、腫瘍局所に薬剤を留まらせる（腫瘍へのターゲティング）だけでなく、さらに抗原提示細胞に対して抗原性補強効果として働く（免疫系へのターゲティング）といった、治療にとって非常に強力な二つの働きを持っている可能性がある。

4．おわりに

リポソームは生体膜の基本構成成分からなる閉鎖小胞であるために、水溶性の薬物も脂溶性の薬物も封入可能であり、生体適合性も優れ、非常に有用なドラッグキャリアーであるが、まだ解決すべき問題点も多い。具体的には、体内動態をコントロール、つまり血中での安定性と RES による捕捉の問題をいかにして克服するか、次に血管内皮をどうやって通過して実質細胞に到達するか、実質細胞に到達できても、細胞内にどうやって送達するか、また、細胞内の標的部位にどうやって送達するかなどの問題が残されている。

血中安定性を増すためのリポソームの修飾法として、リポソームの表面を水溶性高分子ポリエチレングリコールで覆ったステルスリポソームがある。ステルスリポソームは、RES に取り込ま

れにくく、血中に長時間にわたって循環滞留する特性を有している。また、血管内皮からガン組織への移行については、腫瘍組織によって新生された血管は、透過性が亢進されており、さらに組織に移行したリポソームは主としてリンパ管から回収されるが、腫瘍組織ではその回収機構が弱いために、組織内に滞留しやすくなる効果(EPR 効果(enhanced permeability and retention effect))があることが知られている¹²⁾。つまり、リポソームのサイズを腫瘍血管の隙間を考慮して100-200nm にコントロールすることで、ある程度の量が血管内皮を通過して腫瘍組織へ集積することが期待できる。マグネタイトの場合は、癌細胞内の局在に依存せずに、そこで温熱を発生させることが出来る。また、核やミトコンドリアといったオルガネラは温熱でのダメージが大きいので、これらに送達するような細胞内デリバリーシステムが開発できれば、更なる抗腫瘍効果を生むのではないかと考えられる。

現在この治療法の実用化を目指して、ベンチャー企業を設立し、製剤の規格化、安全性試験、装置開発などが急ピッチで進めている。

引用・参考文献)

- 1) Suzuki M, et al.: Brain Tumor Pathol. 13 : 127-132, 1996
- 2) 新海政重ら : 化学工学論文集 24 : 174-178, 1998
- 3) Yagi K, et al.: Biochem Biophys Res Commun. 196 : 1042-1048, 1993
- 4) Natsume A, et al.: Gene Ther 6 : 1626-1633, 1999
- 5) Shinkai M, et al.: Jpn J Cancer Res 87 : 1179-1183, 1996
- 7) Tanaka T, et al.: Chem Pharm Bull (Tokyo) 23 : 3069-3074, 1975
- 8) Fidler IJ : Science 208 : 1469-1471, 1980
- 9) Nakanishi T, et al.: J Control Release 61 : 233-240, 1999
- 10) Yanase M, et al.: Jpn J Cancer Res 89 : 775-782, 1998
- 11) Ito A, et al.: Cancer Immunol Immunother 50 : 515-522, 2001
- 12) Dunkan R, et. Al.: Ann Oncol 9 : 39, 2001