

葉酸修飾セラミド含有 PEG-リポソームの作成

—— 神経芽腫細胞株に対する至適葉酸、及びセラミド含有比の検討 ——

湊 進太郎¹⁾ 土田 明彦¹⁾ 長江 逸郎¹⁾

粕谷 和彦¹⁾ 高橋 総司¹⁾ 青木 達哉¹⁾

坂本 宜俊²⁾ 新 槿 幸彦³⁾

¹⁾東京医科大学外科学第三講座

²⁾松山大学薬学部製剤学研究室

³⁾東京薬科大学薬学部薬物送達学教室

【要旨】 神経芽細胞腫 stage III、stage IV には術前化学療法が行なわれるが、抗癌剤耐性例では有効な補助療法が確立されていない。このような症例に対し、アポトーシス誘導効果のあるスフィンゴ脂質のセラミドを候補とし、葉酸修飾セラミド (C6) 含有 PEG リポソームを作成した。最も殺細胞効果の高いリポソームの至適構成成分比を決めるため、成分比を変えたりリポソーム添加による神経芽腫細胞株 SK-N-F1 (MDR1+) と CHP-134 (MDR1-) の生存率を検討したところ、各成分の含有量 (mol 比) は、セラミド (C6) 40%、PEG は 10% でリポソーム投与量 62.5 μ M 以上であった。また、葉酸修飾により殺細胞効果の減弱はなく、標的細胞の指向性を高めることが可能であった。このリポソームは *in vivo* での検証を経て、抗癌剤耐性神経芽細胞腫への応用が期待される。

はじめに

神経芽腫は小児固形悪性腫瘍の中では 2 番目に多く、最も予後の悪い腫瘍である。厚生労働省治療基準¹⁾では、原則として 1 歳以上の stage III、IV は術前化学療法後に外科切除が行なわれる。抗癌剤投与無効例 (高リスク群) は 30% 超あり²⁾ 別の補助療法の必要性が検討されている。抗癌剤無効例では MDR1 遺伝子が高発現し、MDR1 遺伝子のコードする P-糖蛋白質が、抗癌剤排出ポンプとして機能することが知られている。神経芽細胞腫における MDR1 の発現は、主に化学療法施行症例においてその mRNA が high level になることが知られている³⁾。

今回我々は、細胞のアポトーシス誘導に関与するセラミドに着目した。セラミドは主に細胞の膜外側に存在し、細胞脂質二重膜のひとつであるスフィンゴ糖脂質の基本骨格である⁴⁾。また、生体膜ラフトとしてシグナル伝達に関与し、細胞内では伝達因子としてアポトーシス、細胞の分化誘導や増殖にも関わる⁵⁾。この様にセラミドと抗癌剤は異なる作用機序を有することから、セラミドによる抗癌剤耐性細胞への殺細胞効果が期待される。さらに正常細胞への毒性も弱い⁶⁾。しかしながら、自然界に存在する天然セラミドは細胞膜を通過しにくく、そのまま細胞外から作用させてもアポトーシスは誘導されない⁷⁾。そこで N-アシル基を短くした合成セラミドが開発された。Shabbits ら⁸⁾ は N-ア

2008 年 1 月 9 日受付、2008 年 2 月 14 日受理

キーワード：神経芽腫、リポソーム、セラミド、葉酸

(別冊請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学外科学第三講座 湊 進太郎)

Tel: 03-3342-6111 (内線 5080) Fax: 03-3340-4575

シル基の長さの異なる C2、C6、C8、C10、C14、C16-セラミドを合成し、ヒト乳癌細胞株 (MDA435/LCC6) に対する殺細胞効果を検討し、C6-セラミドが最も細胞膜通過性と殺細胞効果が高いと報告している。

1965年に Bangham ら⁹⁾¹⁰⁾によって発見されたリポソームは、生体膜由来の脂質膜で構成され、毒性や免疫原性がなく、生体適合性に極めて優れている。脂溶性薬物を膜の脂質相に、水溶性薬物を膜間や膜内の水相に化学結合を介することなく大量に封入することが可能であり、Drug delivery system (DDS) のキャリアーとして用いられている¹¹⁾¹²⁾。その一方、生体内では肝臓や脾臓などの網内系細胞へ容易に捕捉され、標的細胞へ到達しないといった問題点があった¹²⁾。1990年代には網内系細胞の貧食を回避し、長時間血液内に停滞することが可能な Polyethylene-Glycol (PEG)-リポソームが開発された。PEGによりリポソーム膜の表面に水和層が形成され、網内系細胞、特にマクロファージの貪食から回避可能となった¹³⁾¹⁴⁾。リポソーム表面を完全に PEG で被覆するためには、5~10%の mol 比の PEG が必要とされる¹⁵⁾。

近年、さまざまな腫瘍関連抗原が同定され、癌における遺伝子や蛋白質レベルの発現調節機序が解明されてきている。癌化した細胞表面上に発現する膜抗原は、癌細胞に特異的に発現する癌抗原と正常細胞に比べて癌細胞に過剰発現する抗原 (トランスフェリン受容体¹⁶⁾、葉酸受容体 (Folate receptor)¹⁷⁾、CD19¹⁸⁾、CD20¹⁹⁾、carcinoembryonic antigen (CEA) など) がある。リポソームはその表面を抗体やリガンドにより比較的容易に修飾可能であるため、いずれの抗原も DDS の標的抗原となり得る²⁰⁾。

ヒト葉酸受容体は 38kDa の GPI アンカー型の膜型糖タンパクであり、ヒト上咽頭癌 (KB 細胞)、大腸癌 (Caco-2) で発現亢進があり¹⁷⁾²¹⁻²³⁾、特に卵巣癌では腫瘍マーカーとしても用いられている²⁴⁾²⁵⁾。葉酸受容体と神経芽腫との関連を検索した報告はない。しかし葉酸 (Folic acid) は神経管の発生発達に関与し、二分脊椎や神経管閉塞のリスクを減らすことが知られている²⁶⁾。また、French ら²⁷⁾ は葉酸添加食物の摂取により神経芽腫の自然治癒比の増加を報告している。このことから、神経芽腫細胞には何らかの葉酸受容体が存在するものと考えた。正常細胞における葉酸受容体の存在は、腎臓、肺、脈絡層、及び胎盤に認められている。しかし胎盤以外は血流から離れた部位に受容体の分

布が限局していることから、たとえ葉酸を静脈内投与しても各臓器の受容体には接近しがたい²⁸⁾。したがって癌治療用 DDS の標的分子として癌細胞表面上の葉酸受容体を用いれば、神経芽腫の腫瘍細胞に特異的に薬物を送達可能と考えた。

今回我々は、葉酸受容体に対するリガンドである葉酸で修飾し、セラミドを含有する葉酸修飾セラミド含有 PEG-リポソームを作成した。また、神経芽腫細胞に対する至適な構成物質の比を検討した。

材料と方法

1. セラミド

C6-ceramide ; N-hexanyl-D-drythro-sphingosine (以下 C6) は、Biomol Reseach Laboratories (Plymouth Meeting, PA) より購入した。

2. 使用細胞

ヒト神経芽腫細胞株 CHP-134 を American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) より、SK-N-F1 を Riken Cell Bank (Ibaraki) よりそれぞれ購入し使用した。

SK-N-F1 は多剤耐性遺伝子 Multidrug resistance1 (MDR1) が高発現し、遺伝子産物である P 糖蛋白により細胞内薬物をすみやかに細胞外へ排出する。CHP-134 は同遺伝子と遺伝子産物の発現はない。

CHP-134 は 10% ウシ血清 (FBS ; Fetal Bovine Serum) を含む RPMI1640 (GibcoBRL, Burlington, ON, Canada) で、SK-N-F1 は 10%FBS を含む DMEM (Gibco) を用いて、37°C、5%CO₂ 条件下で培養し、対数増殖期にある細胞を以下の実験に用いた。

葉酸 (-) 培養液も、それぞれ Gibco より購入した。

3. 生存率の測定

細胞の生存率には Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto) を用い、以下の方法で測定した。

96 ウェル・マイクロプレート上に 1×10^4 個/ウェル/100 μ l の細胞を散布し、CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。後述する C 6 単独、または調整したリポソームを HEPES (Gibco) に希釈後、100 μ l/ウェル添加し、36 時間培養した。発色試薬の WST-8 (水溶性テトラゾリウム塩) を 20 μ l/ウェルを添加し、12 時間培養後、450 nm と 600 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー POWERSCAN[®] HT (Dainippon Pharmaceutical, Osaka) にて測定した。非添加群 (コ

Table 1 Liposomal ingredient ratio (upper) and its ceramide content (lower).

	Ingredients (mol%)			Ingredients (mol%)				
	EPC	Chol	C6	EPC	Chol	C6	PEG	
C6-0	6	4	0	P-C6-0	5	4	0	1
C6-1	6	3	1	P-C6-1	5	3	1	1
C6-2	6	2	2	P-C6-2	5	2	2	1
C6-3	6	1	3	P-C6-3	5	1	3	1
C6-4	6	0	4	P-C6-4	5	0	4	1

Ceramide content (μ M)							
C6-1		0.39	1.56	6.25	12.5	25	50
C6-2		0.78	3.13	12.5	25	50	100
C6-3		1.17	4.69	18.8	37.5	75	150
C6-4		1.56	6.25	25	50	100	200
Total lipid		3.9	15.6	62.5	125	250	500

EPC ; Phosphatidylcholine from egg yolk, Chol ; Cholesterol, C6 ; C6-ceramide liposome, P ; PEG-DSPE

ントロール) との比をもって、生存率 (Viability) とした。

4. リポソームの調整法

99.0% クロロホルム (Wako) に融解した溶液を、目的とする脂質組成比となるように試験管に分取した。窒素気流下、クロロホルムをロータリーエバポレーター Rotary Evaporator RE47 (Yamato Scientific Co., Ltd. Tokyo) を用いて減圧留去することで、脂質膜を調整した。60°C の HEPES を 5 ml 加えた後、5 分間のボルテックスし、さらに 30 分間のソニケーションを加えた。

コレステロール (Cholesterol ; Chol) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka) より購入した。N-(methoxy polyethyleneglycolglutaryl)distearoyl phosphatidylethanolamine (PEG-DSPE)、Phosphatidylcholine from egg yolk (EPC) は、Nippon Oil and Fat Co., Ltd. (Tokyo) より購入した。

Phosphoethanolamine-N-[Folate(Polyethylene-Glycol)2000], 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-, Ammonium Salt (Folate-PEG-DSPE) は、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) より購入した。

C6 含有リポソームは、C6 含有量 10%、20%、30%、40% (mol%) の 4 種類作成し、C6-1、C6-2、C6-3、C6-4 と表記した。C6 含有 0% を C6-0 と表記した。

PEG 修飾リポソームは、C6 含有量 10%、20%、30%、40% (mol%) の 4 種類を作成し、PC6-1、PC6-2、PC6-3、PC6-4 とした。

Table 2 Ingredient ratios of liposome with folic acid ornamentation. F-PC6-4 liposome (lower) contained the ceramide at the cholesterol ingredient ratio of F-PC6-0 liposome (upper).

	Ingredients (mol%)			
	EPC	Chol	PEG	Folate
F1-PC6-0	5	4	0.99	0.01
F2-PC6-0	5	4	0.975	0.025
F3-PC6-0	5	4	0.95	0.05
F4-PC6-0	5	4	0.9	0.1

	Ingredients (mol%)			
	EPC	C6	PEG	Folate
F1-PC6-4	5	4	0.99	0.01
F2-PC6-4	5	4	0.975	0.025
F3-PC6-4	5	4	0.95	0.05
F4-PC6-4	5	4	0.9	0.1

F ; Folate

葉酸修飾セラミド含有 PEG-リポソームは、10% PEG.40% セラミド (PC6-4) リポソームをベースに葉酸修飾量 0.1%、0.25%、0.5%、1.0% (mol%) の 4 種類を作成し、F1-PC6-4、F2-PC6-4、F3-PC6-4、F4-PC6-4 とした。

5. C6、及び C6 発現リポソームによる殺細胞効果の検討

1) C6 セラミド単独でのアポトーシスの誘導
200 μ M から 6.25 μ M まで倍希釈し、各セラミド溶

液 100 μ l を 3 ウェルずつ SK-N-F1、CHP-134 (細胞数 1×10^4 個/ウェル/100 μ l) へ添加した。その後、方法 3 に準じ、生存率を算出した。C6 添加時の細胞をヘキスト 33342 (Wako) で染色し、核形態を蛍光顕微鏡にて観察した。

2) C6 セラミドの至適含有量、及びリポソーム投与量の検討

添加 C6 リポソーム 500 μ M/ウェルから倍希釈し、同細胞に投与し、生存率を算出した。

3) 至適 PEG 修飾量の検討

添加 P-C6 リポソームを 500 μ M、250 μ M、125 μ M として投与し、生存率を算出した。

4) 10%PEG 修飾リポソームの至適 C6 セラミド含有量の検討

PEG の修飾量を 10% に固定し、500 μ M から 62.5 μ M の希釈率にて添加し、生存率を算出した。

5) PC6-4 リポソームにおける至適葉酸修飾量の検討

培養液中の遊離葉酸の影響を排除するため、以下の実験では葉酸を含まない培養液を使用した。Folate-PEG-DSPE の修飾量が 0.1%、0.25%、0.5%、1.0% (mol%) となるようにリポソームを調整し、添加リポソームを 500 μ M から 3.9 μ M まで倍希釈投与し、生存率を算出した。

6) 葉酸修飾 PEG リポソーム、及び同 C6 リポソームでの標的化の検討

リポソームを添加する際、細胞表面の葉酸受容体を充填するに充分量である 4 mM の葉酸 (Sigma) を同時に添加し、リポソーム量 500 μ M から 3.9 μ M にて生存率を算出した。

結 果

C6 セラミド単独添加時の生存率を示す (Fig. 1a)。両細胞株とも、C6 セラミドが 100 μ M 以上の投与濃度にて著明な生存率の低下が認められた。両細胞株ともに核の断片化が観察され、アポトーシスによる細胞死と判定した (Fig. 1b)。

C6 リポソーム添加時の生存率を示す (Fig. 2)。

両細胞株とも、C6-3、C6-4 において濃度依存性に生存率の低下が認められた。C6-4 においては、CHP-134 (MDR1-) が添加量 62.5 μ M 以上で著明な殺細胞効果が認められたのに対して、SK-N-F1 (MDR1+) では添加量 125 μ M 以上で効果の増強が認められた。C6-1、C6-2 では、いずれのリポソーム投与量においても明らかな殺細胞効果は見られなかった。この結果を踏まえ、以下の実験では C6-4 を用いた。

C6-4 リポソームの殺細胞効果に対する PEG 修飾時の生存率を示す (Fig. 3)。明らかな殺細胞効果が認

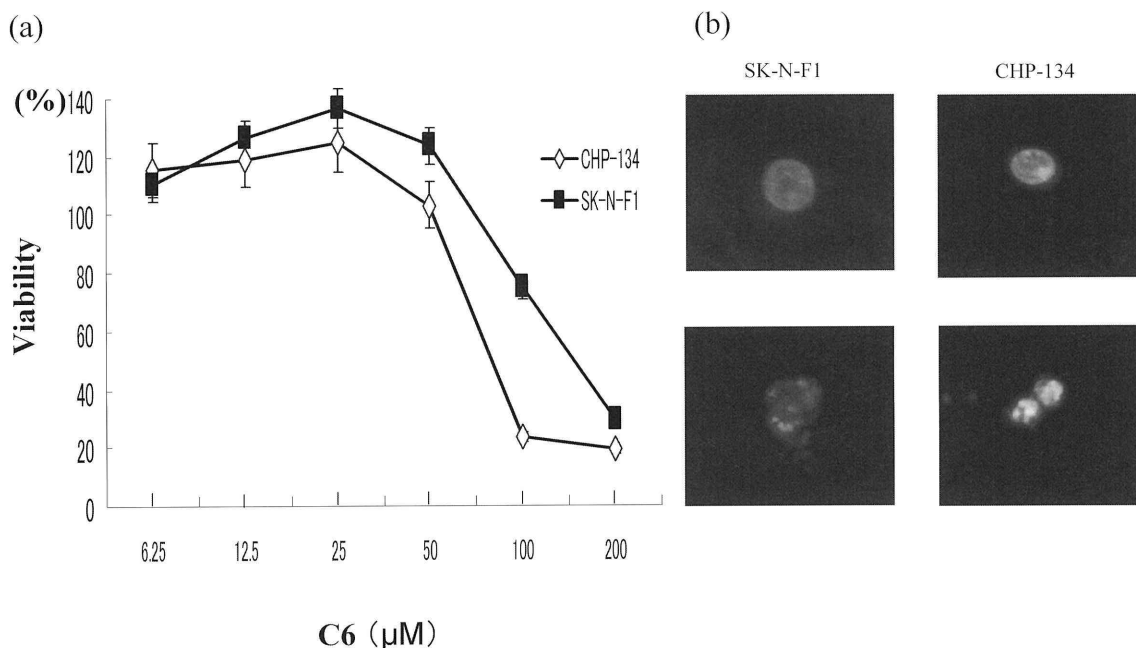


Fig. 1 Cytotoxicity of free C6-ceramide lipids. (a): With both cell lines (outlined diamond ; CHP-134, solid square ; SK-N-F1), the viability rate was decreased by the C6 ceramide at on administration level more than 100 μ M. CHP-134 was slightly higher in the cytotoxic effect of ceramide than SK-F-1. (b): Nuclear fragmentation was observed in both cell lines (photo in lower), and judged to be apoptosis.

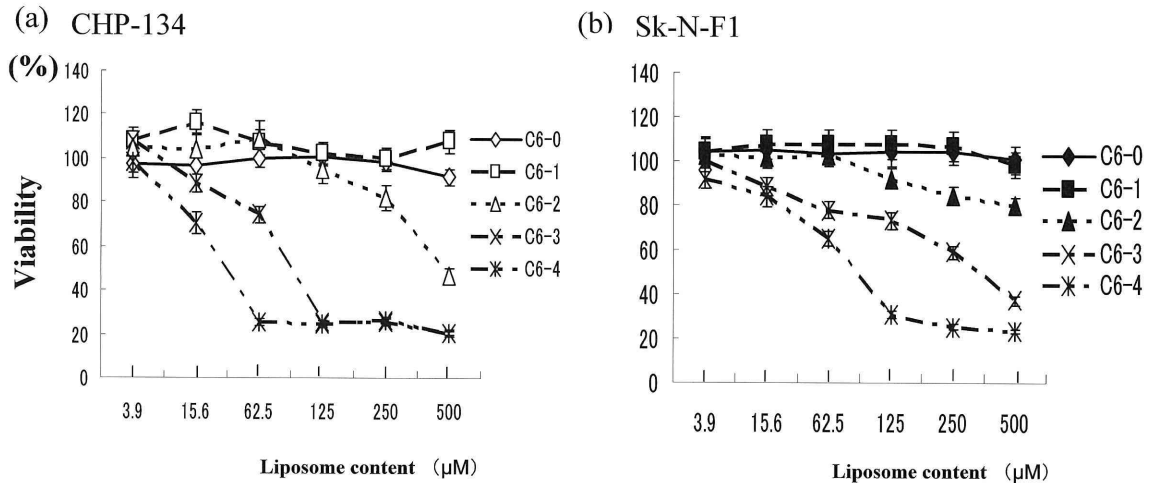


Fig. 2 Cytotoxicity of ceramide liposome. (a): When the quantity of C6-4 was more than 62.5 μM , CHP-134 cells showed cytotoxicity reaction. (b): In contrast, augmentation of the cytotoxicity effect was found at more than 125 μM with SK-N-F1 cells. C6-1, C6-2 liposomes had no remarkable cytotoxicity reaction at all liposomal dosages.

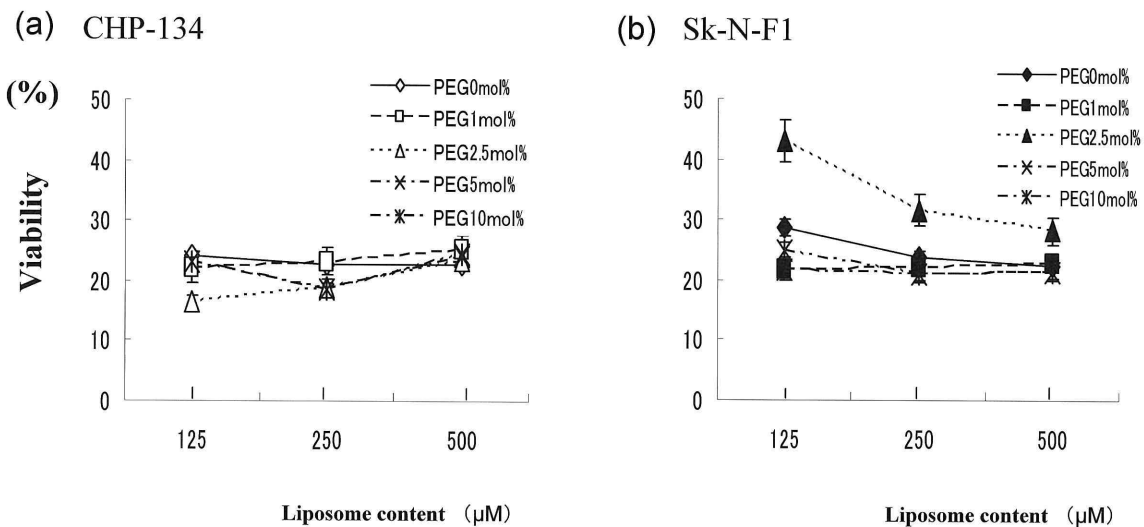


Fig. 3 Cytotoxicity of PEG-ceramide liposome. The difference of the quantity of PEG ornamentation affected a difference for cytotoxicity reaction of neither CHP-134 cells (a) nor SK-N-F1 (b).

められた総リポソーム濃度 (500 μM 、250 μM 、125 μM) において、CHP-134 と SK-N-F1 細胞株のいずれも PEG 修飾量の違いによる生存率に変化はなく、PEG による非特異的な毒性の増強は無いと判断した。この結果を踏まえ、以下の実験では 10%PEG リポソームを用いた。

10%PEG リポソームにおける各セラミド量別の生存率を示す (Fig. 4)。両細胞株とも、総リポソーム 500 μM から 62.5 μM で差がなかった。セラミド含有率では、P-C6-3、P-C6-4 において、殺細胞効果の増強が見られた。

葉酸修飾セラミド含有 PEG-リポソームの生存率

を示す (Fig. 5)。両細胞において、葉酸修飾することで P-C6-リポソームより高い効果が認められた。CHP-134 では葉酸修飾量が少ないほど効果が強く現れたが、SK-N-F1 では葉酸修飾量による差はほとんど認められず、細胞間での違いが見られた。

遊離葉酸の添加による生存率の変化を示す (Fig. 6)。

培地に高濃度の葉酸を付加することで、すべての葉酸修飾量で C6-0 と同程度まで、効果の減弱が認められた。また葉酸非修飾である PC6-4 添加時には、両細胞株とも濃度依存性に効果が認められたが、葉酸を含む通常の培養液中での結果と比べ殺腫瘍効果の減弱

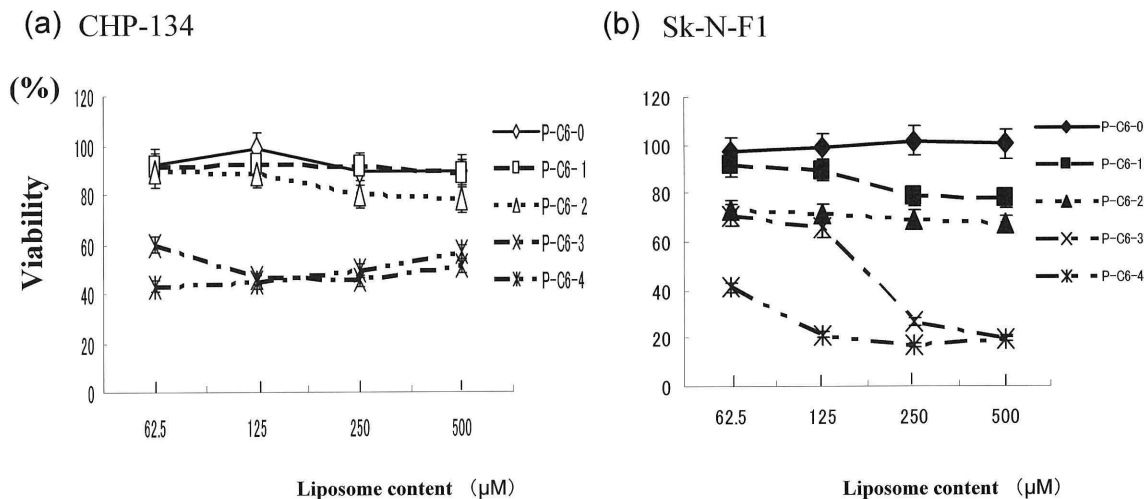


Fig. 4 The 10% PEG-liposomal toxicity according to the ceramide content. The cytotoxicity effect had no differences in any liposomal quantity from 500 μ M to 62.5 μ M either in CHP-134 cells (a) or SK-N-F1 cells (b). In P-C6-3, P-C6-4, augmentation of the cytotoxicity reaction was seen.

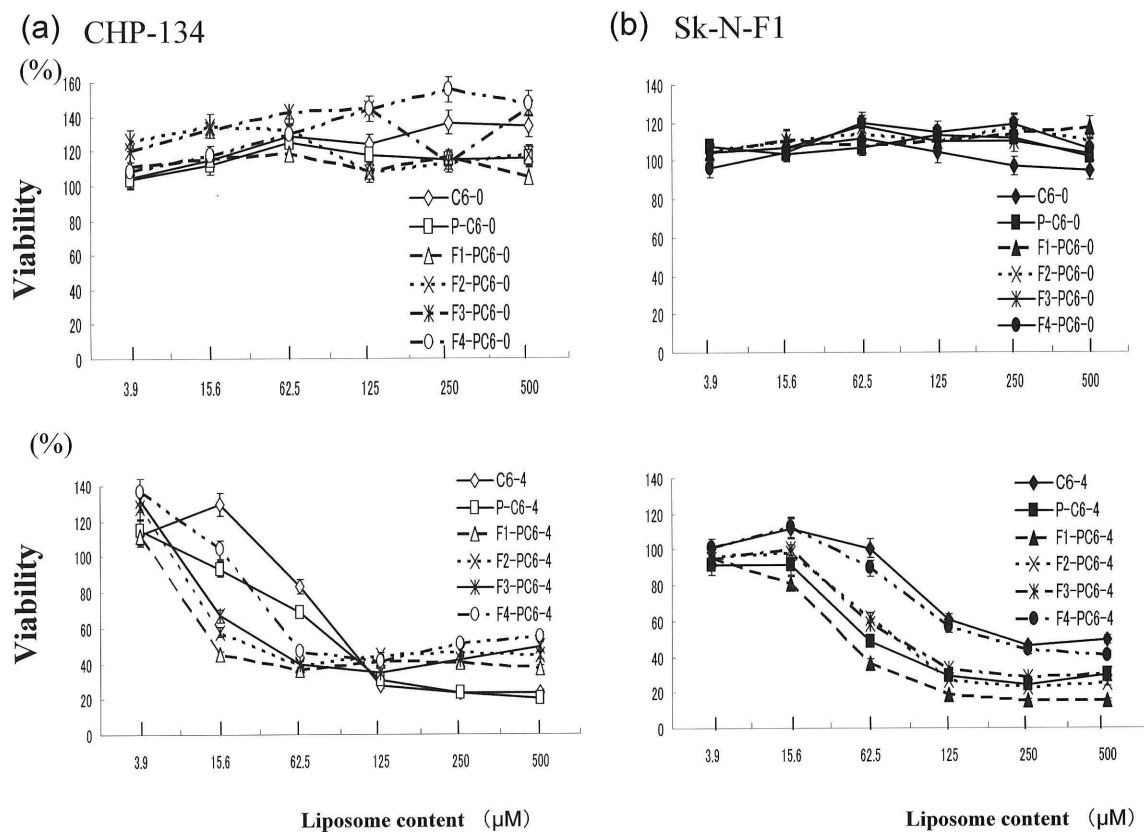


Fig. 5 Cytotoxicity of the folic acid ornamentation PEG-liposome containing C6 ceramide. The PEG-C6 liposome (lower graph) showed a higher effect by modification folic acid than those without folic modification. In particular, it was stronger in one with a little modifying folate quantity in CHP-134 (lower in Fig. a). In contrast, a small difference related to the quantity of folic acid ornamentation is shown in S-N-F1 cells (lower in Fig. b).

が認められた。

考 察

Bangham ら⁹⁾¹⁰⁾により発見されたりポソームは、

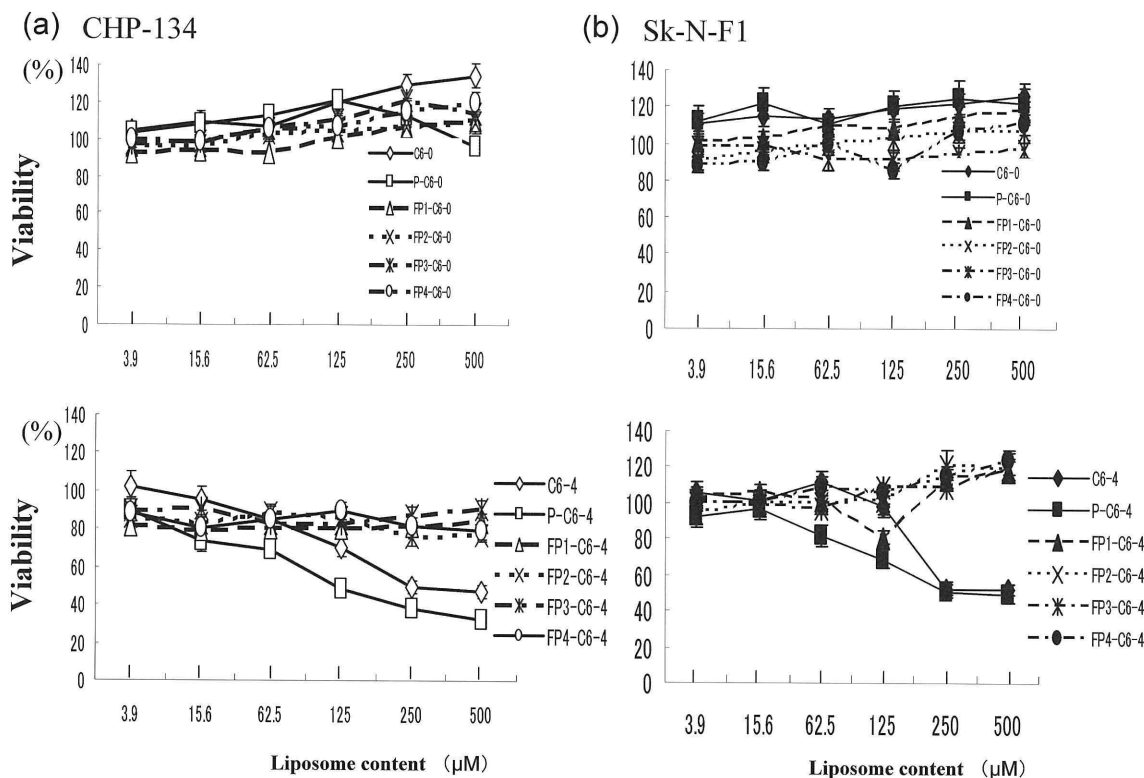


Fig. 6 A change of cell viability by addition of 4 mM of free folic acid. Free folic acid at a high density in culture media decreased the cytotoxicity until the same level as C6-0 liposome. The liposome which was not modified with folic acid (outlined diamonds and outlined square in Fig. a, and solid diamonds and solid square in Fig. b) included concentration-dependent cytotoxicity.

DDSのキャリアーとして多くの研究、開発が行なわれている。特にRESへの貪食から回避することが可能になったPEG-リポソームは、ドキソルビシンを封入した製剤 Doxil® (Sequus Pharmaceuticals, Menlo Park, CA, USA) として臨床で用いられている。またリポソームの表面を抗体によりコーティングし、標的細胞への結合特異性を増したイムノリポソームも開発され、高い腫瘍集積性を認めている。本研究で用いた葉酸修飾PEG-リポソームも肝や網内系細胞による貪食による消失を抑え、かつ腫瘍細胞膜に過剰発現する葉酸レセプターに対する結合特異性を高くした薬剤のキャリアーである。リポソームは構成脂質比を任意にコントロールすることで、膜電荷、pH感受性、温度感受性、組織遊走能、細胞結合能などを変え得ることが最大の長所とされる。そのことは、裏を返せば「至適な脂質比」は構成する薬剤の性状や表面をコーティングする抗体やリガンドの種類により、構成成分比が異なる事を意味する。今回、われわれは葉酸修飾セラミド含有PEG-リポソームを作成するにあたり、この至適構成成分比を詳細に検討した。

封入薬剤に用いたセラミドはアポトーシスを誘導

する性質を持っている⁵⁾。しかし天然型では細胞膜透過性が低く⁷⁾、そのままでは薬剤として使えない。そこで細胞膜透過性をもつセラミド誘導体を合成し、その抗腫瘍効果に期待がもたれている。野村ら²⁹⁾はC2-セラミドを合成し、細胞内からのLDH漏出量とDNAの断片化からアポトーシスの誘導を見出した。Shab-bitら⁸⁾はC2、C6、C8、C10、C14、C16-セラミドを合成し、それぞれのアポトーシス誘導性について検討している。同報告でもっとも効果の高かったタイプがC6セラミドである。C6セラミドにおける乳癌細胞株(MDA435/LCC6)のIC₅₀はC6で2.71±0.69であり、他のタイプのセラミドに比べ極めて細胞死の誘導に優れていた。さらにMDR1遺伝子を導入し、P糖蛋白を発現させることで薬剤の排出を高めた細胞株MDA435/LCC6^{MDR1}においてもIC₅₀は5.67±0.70であり、2倍程度の上昇に留まっていた。この結果は、本研究の対象疾患が小児神経芽腫の薬剤耐性症例であることを踏まえると、候補薬剤としてはC6-セラミドが最適と考えることが出来る。今回の検討で用いた神経芽腫細胞株2種はSK-N-F1がMDR1の高発現株であり、CHP-134はMDR1発現(-)である。恒常的

に MDR1 を発現する細胞株を用いることは、すなわち治療 (抗癌剤投与) を加えた際の MDR1 を高発現する状態を再現していることになる³⁾。

抗癌剤耐性細胞におけるスフィンゴミエリン量の検討では、MDR1 と BSEP、及び MRP2 トランスポーターと密接に関連が報告され、Iwamori ら³⁰⁾ は、抗癌剤耐性細胞では糖脂質合成は促進しているが、セラミドの除去経路とは関連していないことを示唆している。結果 (Fig. 1) に示したように C6 含有リポソームは MDR1 発現の有無によらず、細胞死を誘導し、Shabbit ら⁸⁾ や Iwamori ら³⁰⁾ の報告を裏付けるものであった。

では、至適なセラミド含有比はどの程度であるか。Stover ら³¹⁾ は乳癌細胞株に C6 を添加し、C6 の濃度依存性に殺細胞効果が上がると述べている。我々の実験でも、同様に C6-2、C6-3、C6-4 の順に濃度依存性に細胞死の誘導が認められた (Fig. 2, 3)。特に、Total lipid 濃度からそれぞれのリポソーム中のセラミドの含量に換算すると、C6-3、C6-4 リポソームを用いた場合では C6 単独添加時よりも同程度の細胞死を誘導するのに少ないセラミド量しか必要としなかった。さらに C6-3 リポソームより、C6-4 リポソームの方が少ない添加量でより効果が出ており、セラミド含有リポソームの構成脂質中のセラミド量を増加した方が効果が増強することが確認された。

リポソームの表面を PEG で覆うことにより、リポソーム膜は親水性が増し水和層が形成される。マクロファージは自己よりも疎水性の高い粒子を取り込む性質を持つことから、親水性の高い PEG リポソームは RES の攻撃より回避されると考えられている。Torchilin ら³²⁾ は PEG の分子量とリポソームの表面全部を覆うのに必要な PEG 分子数を算出している。それによると分子量 2,000 のリポソームでは、脂質に対し 2 mol% の PEG が必要となる。今回は 0-10% の mol 比で検討したが、いずれの比率でも殺細胞効果に差はなかった。DSPE-PEG を過量に添加してもそれぞれがミセルを形成し、結果的にはリポソーム内に入る PEG の量は限られているためと考えられた。

Yoshida ら³³⁾ は、癌細胞に過剰発現が認められている葉酸レセプターに特異的に結合するリガンドである葉酸を修飾した葉酸修飾リポソームを使用し、葉酸レセプターを有するヒト咽頭癌細胞株 (KB 細胞) に対する効果を検討している。同報告では、同リポソームの標的指向性による癌細胞特異的なアポトーシス

の誘導が可能であり、容量依存性に細胞への指向性が増大すると言及している。本検討では、葉酸の修飾量が低いほど細胞死の程度が高くなった。リガンド修飾量を高濃度にすると負のクラスター効果が生じ、レセプターの親和性が弱くなる可能性が考えられた。

葉酸修飾リポソームで誘導されるアポトーシスは、両細胞を遊離の葉酸で前処理することによりコントロールと同程度まで低下した。このことは、葉酸修飾リポソームと遊離の葉酸の両者が癌細胞株の表面にある葉酸レセプターへの結合を競合していることを示すと同時に、葉酸修飾リポソームは葉酸レセプターに特異的に結合していることを示唆する。これによりアポトーシスを誘導されたことは、同リポソームの癌特異性を示唆した。また、葉酸 (+) 培地での実験と比べ C6-4、P-C6-4 では細胞死の効果が低くなっており、葉酸濃度をあげることで培養液成分に差ができて、細胞増殖能が増加したものと考えた。

葉酸修飾セラミド含有 PEG-リポソームを用いての殺細胞効果の検討は、本研究が初めてである。本研究結果は、同リポソームの特性を損なうことなく作用させるための至適な構成成分比を明らかにした。このことは抗癌剤耐性となった腫瘍、特に小児神経芽腫に対して、より安全に、より選択的にセラミドを投与するための新しい DDS の可能性を示唆し得た。

謝 辞

稿を終るに臨み、研究指導を頂いた東京医科大学薬剤部関根祐介薬剤員、同外科学第三講座鈴木美奈子助手ならびに教室員各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 澤口重徳、金子道夫、中條俊夫: 統一プロトコールによる進行神経芽腫の治療—1998年9月における治療集計。日小外会誌 **26**: 121-127, 1990
- 2) 七野浩之: 神経芽腫。小児内科 **38** (五十嵐隆編集) 568-570, 東京医学社 (東京) 2006
- 3) Goldstein LJ, Fojo AT, Ueda K, Crist W, Green A, Brodeur G, Pastan I, Gottesman MM: Expression of the multidrug resistance, MDR1, gene in neuroblastoma. *J Clin Oncol* **8**: 128-136, 1990
- 4) 梅原久範、金 哲雄、宮地理彦、岡崎俊朗: Fas 依存性アポトーシスにおけるスフィンゴミエリンの役割。臨床免疫 **42**: 292-299, 2004
- 5) 伊東 信、沖野 望、谷元 洋、光武 進、森 薫: 中性セラミドラーゼの分子進化—病原因子とシグナリング分子—。蛋白質 核酸 酵素 **47**: 455-462, 2002

- 6) Stover T, Sharma A, Robertson G, Kaster M : Systemic delivery of liposomal short-Chain ceramide limits solid tumor growth in murine models of breast adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **11** : 3465-3474, 2005
- 7) 田嶋政郎, 岡崎敏郎 : セラミドとアポトーシス。血液・腫瘍科 **36** : 83-88, 1998
- 8) Shabbits JA, Mayer LD : Intracellular delivery of ceramide lipids via liposomes enhances apoptosis in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1612** : 98-106, 2003
- 9) Bangham AD, Standish MM, Watkins JC : Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* **13** : 238-252, 1965
- 10) Bangham AD : Liposomes : the Babraham connections. *Vhem Phys Lipids* **64** : 275-285, 1993
- 11) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR : Cell death the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68** : 251-306, 1980
- 12) Hsu MJ, Juliano RL : Interaction of liposome with the reticuloendothelial system. II : Nonspecific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* **720** : 441-419, 1982
- 13) Klivanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L : Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* **268** : 235-237, 1990
- 14) Vertut-Doi A, Ishiwata H, and Miyajima K : Binding and uptake of liposomes containing a poly (ethylene glycol) derivative of cholesterol (stealth liposomes) by the macrophage cell line J774 : influence of PEG content and its molecular weight. *Biochim Biophys Acta* **1278** : 19-28, 1996
- 15) Maruyama K : In vivo targeting by liposomes. *Biol Pharm Bull* **23** : 791-799, 2000
- 16) Keer HN, Kozlowski JM, Tsai YC, Lee C, McEwan RN and Grayhack JT : Elevated transferrin receptor content in human prostate cancer cell line assessed in vitro and in vivo. *J Urol* **143** : 381-385, 1990
- 17) Coney LR, Tomassetti A, Carayannopoulou L, Frasca V, Kamen BA, Colnaghi MI, Zurawski Jr VR : Cloning of a tumor-associated antigen : MOv18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein. *Cancer Res* **51** : 6125-6132, 1991
- 18) Haruta M, Soda Y, Tani K, Ooi J, Takizawa T, Chen M, Bai Y, Izawa K, Kobayashi S, Tomonari A, Nagamura F, Takahashi S, Uchimarui K, Iseki T, Tsuji T, Takahashi TA, Sugita K, Nakazawa S, Tojo A, Murayama K, Asano S : CD19-targeting liposomes containing imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **104** : 1442-1449, 2004
- 19) Vervoordeldonk SF, Merle PA, van Leeuwen EF, von dem Borne AE, Slaper-Cortenbach IC : Pre-clinical studies with radiolabeled monoclonal antibodies for treatment of patients with B-cell malignancies. *Cancer* **73** : 1006-1011, 1994
- 20) Moribe K, Maruyama K, Iwatsuru M : Encapsulation of characteristics of nystatin in liposomes : effects of cholesterol and polyethylene glycol derivatives. *Int J Pharm* **188** : 193-202, 1999
- 21) Kane MA, Elwood PC, Portillo RM, Antony AC, Kolhouse JF : The interrelationship of the soluble and membrane-associated folate-binding proteins in human KB cells. *J Biol Chem* **261** : 15625-15631, 1986
- 22) Mayor S, Rothberg KG, and Maxfield FR : Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* **264** : 1948-1951, 1994
- 23) Weitman SD, Lard RH, Coney LR, Fort DW, Frasca V, Zurawski Jr VR, Kamen BA : Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell line and tissues. *Cancer Res* **52** : 3396-3401, 1992
- 24) Campbell IG, Jones TA, Foulkes WD, Trowsdale J : Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res* **51** : 5329-5338, 1991
- 25) Mantovani LT, Miotti S, Menard S, Canevari S, Raspagliesi F, Bottero F, Colnaghi MI : Folate binding protein distribution in normal tissues and biological fluids from ovarian carcinoma patients as detected by the monoclonal antibodies MOv18 and MOv19. *Eur J Cancer* **30A** : 363-369, 1994
- 26) 宮嶋雅一, 新井 一, 大前一孝, 萩野郁子 : [本邦における二分脊椎の最新医学と最先端医療] 神経管形成モデル細胞における葉酸の Wnt シグナル伝達系と cadherin への影響。小児の脳神経 **31** : 424-427, 2006
- 27) French AE, Grant R, Wetzman S, Ray JG, Vermeulen MJ, Sung L, Greenberg M, Koren G : Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clin Pharmacol Ther* **74** : 288-294, 2003
- 28) Wang S, Low PS : Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. *J Contr Rel* **53** : 39-48, 1998
- 29) 野村靖幸 : 過酸化水素、セラミドによる神経細胞死。最新医学 **54** : 1710-1716, 1999
- 30) Iwamori M, Iwamori Y, Kubushiro K, Ishiwata I, Kiguchi K : Characteristic expression of lewis-antigenic glycolipids in human ovarian carcinoma-derived cells with anticancer drug-resistance. *Biochem* **141** : 309-317, 2007
- 31) Stover T, Kester M : Liposomal delivery enhances short-Chain ceramide-induced apoptosis of breast cancer cells. *JPET* **307** : 468-475, 2003
- 32) Torchilin VP, Omelyanenko VG, Papisov MI, Bogdanov AA Jr, Trubetskoy VS, Herron JN, Gentry CA : Poly (ethylene glycol) on the liposome surface : on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim Biophys Acta* **1195** :

- 11-20, 1994
- 33) Yoshida T, Oide N, Sakamoto T, Yotsumoto S, Negisi Y, Tsuchiya S, Aramaki Y: Induction of cancer cell-specific apoptosis by folate-labeled cationic liposomes. *J Control Release* **111**: 325-332, 2006

Preparation of folate ornamentation PEG-liposome containing ceramide
— Examination of optimal folate and the ceramide content
for the neuroblastoma cell lines —

Shintarou MINATO¹⁾, Akihiko TSUCHIDA¹⁾, Itsurou NAGAE¹⁾,
Kazuhiko KASUYA¹⁾, Soshi TAKAHASHI¹⁾, Tatsuya AOKI¹⁾,
Takatoshi SAKAMOTO²⁾, Yukihiko ARAMAKI³⁾

¹⁾Third Department of Surgery, Tokyo Medical University

²⁾Matsuyama University, College of Pharmaceutical Sciences, School of Clinical Pharmacy,
Department of Pharmaceutical technology

³⁾School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Abstract

Preoperative chemotherapy is performed in patients with stage III and stage IV neuroblastoma, but no effective adjuvant therapy has been established in the patients with drug tolerance. We examined ceramide of the sphingolipid as a candidate of the induction of apoptosis for such cases and made ceramide (C6)-contained PEG liposome modified with folic acid. Then, we investigated viability rates in two kinds of neuroblastoma cell lines (SK-N-F1; MDR1+, CHP-134; MDR1-) by some changes in the density of ceramide (C6) or component ratio to decide a high optimum of the most cytotoxic reaction. As a result, the ratio of the ceramide was 40% and that of PEG was 10%, and liposomal dosage was more than 62.5 μ M. This liposome was able to raise the directional ability against the target cells without diminishment of the cytotoxicity reaction by modification of folic acid. Our results suggested that this liposome may be suitable for neuroblastoma patients with anticancer drug-tolerance in future in vivo examinations.

<Key words> Neuroblastoma, Liposome, Ceramide, Folate
