

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月23日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08198

研究課題名(和文) 環状オリゴ糖を用いた葉酸レセプター高発現癌細胞選択的な抗癌剤デリバリー法の構築

研究課題名(英文) Design and evaluation of folate-appended cyclodextrin as a tumor-selective drug carrier

研究代表者

本山 敬一 (MOTOYAMA, KEIICHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・准教授

研究者番号：50515608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、葉酸多分岐修飾メチル化シクロデキストリン (FAn-M-_n-CyD) を用いて腫瘍細胞選択的な殺細胞効果を有する抗癌剤デリバリー法を構築することである。種々検討した結果、FAn-M-_n-CyD は、1) 細胞形質膜上の FR-_n を介して細胞内に取り込まれた後、エンドソームから脱出し、2) ミトコンドリアの膜電位を上昇させることでストレスを誘導し、3) オートファゴソーム形成およびマイトファジーを介して抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。一方、DOX/FAn-M-_n-CyD複合体は、DOX単独および DOX/M-_n-CyD複合体よりも優れた抗腫瘍活性を有することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とする FAn-M-_n-CyD は我々オリジナルの化合物であり、次のような特性を有する。1) 分子量が5000以下のシンプルな構造を有し、製造コストが安価である、2) FR を介して腫瘍細胞選択的に取込まれる、3) 葉酸は健康食品にも使用され、かつ本研究で使用する CyD は既に臨床応用されていることから、安全性が高い、4) CyD に導入する薬物を疾患に応じて変更可能である、5) 蛍光物質を付加させることにより、癌の画像診断に応用可能であるなどの多くの利点を有する。本研究で得られた成果は、基礎研究のみならず、臨床応用の可能性も有している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, to expand the application of folate-conjugated M-_n-CyD (FAn-M-_n-CyD) for cancer chemotherapy, we evaluated the potential of FAn-M-_n-CyD as a tumor-targeting anticancer drug carrier. FAn-M-_n-CyD formed an inclusion complex with doxorubicin (DOX) with a high stability constant. Antitumor activity of DOX was increased by the complexation with FAn-M-_n-CyD in KB cells, a folate receptor-_n (FR-_n)-expressing cell line. Also, FAn-M-_n-CyD increased antitumor activity of paclitaxel, but not 5-fluorouracil. Furthermore, FAn-M-_n-CyD enhanced cellular uptake of DOX through a complexation in KB cells, compared to FA-_n-CyD and M-_n-CyD. The DOX/FAn-M-_n-CyD complex markedly showed high antitumor activity, compared to DOX alone and DOX/M-_n-CyD complex, after an intravenous administration to FR-_n-expressing tumor cell-bearing mice. These findings suggest that FAn-M-_n-CyD is useful as a tumor-selective carrier for anticancer drugs.

研究分野：医療薬学

キーワード：シクロデキストリン 抗がん剤 ドラッグデリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メチル-β-シクロデキストリン (M-β-CyD) は、腫瘍細胞で発現が上昇する脂質マイクロドメイン (脂質ラフト) からコレステロールを遊離させることにより、その構造や機能に影響を与えることが知られている。また、Grosse らは M-β-CyD が担癌マウスにおいて抗腫瘍効果を示すことを報告した (*Br. J. Cancer*, 1998)。一方、葉酸レセプター (FR) は卵巣癌を始めとする各種上皮癌や癌幹細胞で過剰発現していることから、葉酸は癌標的リガンドとして汎用されている。これまで我々は、M-β-CyD の癌細胞特異性および抗腫瘍効果を増大させるために、葉酸 1 分子を導入した FA₁-M-β-CyD を調製し、FA₁-M-β-CyD が FR 高発現細胞であるヒト口腔癌細胞由来 KB 細胞に対して優れた殺細胞効果を示すことを見出した (*Sci. Rep.*, 2013, *J. Drug Target.*, 2014)。さらに、第 3 次対がん総合戦略事業 (厚生労働省プロジェクト) において、FA₁-M-β-CyD により誘導される細胞死は、多くの抗癌剤が誘導するアポトーシスではなく、オートファジーを介した新規作用機序を有することを報告した (*Sci. Rep.*, 2014)。

一方、我々は葉酸と β-CyD の間にカプロン酸 2 分子をスペーサーとして導入した葉酸多分岐修飾 β-CyD が、クラスター効果により FR と極めて高い会合定数を有すること、また、葉酸多分岐修飾 β-CyD が抗癌剤ドキソルビシン (DOX) と強固な包接複合体 (安定度定数: 10^6 M^{-1}) を形成することを明らかにした (*Bioconjug. Chem.*, 2013, *Biomacromolecules*, 2013)。一般に、CyD と薬物の安定度定数が 10^5 M^{-1} 以上であれば、CyD は血中에서도薬物を保持可能であるため、薬物/FAn-M-β-CyD 包接複合体は、生体内でも薬物を FR 発現細胞へデリバリー可能であると考えられる。さらに、我々は CyD の水酸基に抗癌剤 5-フルオロウラシルを化学結合させた抗癌剤/CyD 結合体をラットに経口投与したところ、盲腸や大腸内に存在するアミラーゼにより CyD 環が分解され、抗癌剤が大腸選択的に放出されることを報告した (*Int. J. Pharm.*, 2010)。また、抗癌剤/FAn-M-β-CyD 結合体を静脈内投与すると、腫瘍細胞に高発現する FR 選択的に取込まれた後、抗癌剤が解離し、抗腫瘍効果を発揮すると考えられる。つまり、FAn-M-β-CyD は抗癌剤と化学結合させることにより、経口および静脈内投与可能な新規腫瘍細胞選択的抗癌剤キャリアとなり得る。そこで本申請課題では、まず腫瘍細胞の脂質ラフト選択性および抗腫瘍効果が期待される M-β-CyD に、クラスター効果を応用した葉酸多分岐修飾 M-β-CyD (FAn-M-β-CyD) を新たに調製し、FR 高発現腫瘍細胞選択的キャリアを作成する。

2. 研究の目的

本研究では、まず FAn-M-β-CyD を新規に調製し、FAn-M-β-CyD の溶解性、安定性などの物理化学的性質を評価する。溶液中における FR と FAn-M-β-CyD の会合定数を表面プラズモン共鳴装置 (SPR) を用いて定量する。FR 高発現細胞株である KB 細胞および FR 非発現細胞株である A549 細胞を用いて、FAn-M-β-CyD が FR 発現細胞選択的に取込まれることを確認する。また、KB 細胞の脂質マイクロドメインに及ぼす FAn-M-β-CyD の影響を明らかにするため、コレステロールやリン脂質などの細胞膜脂質成分の漏出を調べる。これらの結果をもとに、最適な葉酸導入数および構造を決定する。次に、DOX/FAn-M-β-CyD 複合体を調製する。また、KB 細胞を用いて、DOX/FAn-M-β-CyD 包接複合体および結合体の FR 発現細胞選択的な抗腫瘍効果を確認する。さらに、FAn-M-β-CyD、DOX/FAn-M-β-CyD 複合体の細胞内動態を解析する。また、ヌードマウスに KB 細胞懸濁液を接種して作成した担癌マウスに、FAn-M-β-CyD 単独、DOX/FAn-M-β-CyD 複合体を腫瘍内、静脈内および経口投与した後、各投

与経路における *in vivo* 抗腫瘍効果を腫瘍体積、体重、生存率を指標に評価するとともに、結合体の体内動態を検討する。

3 . 研究の方法

本研究の目的は、葉酸多分岐修飾 CyD (FAn-M- β -CyD) を用いて腫瘍細胞選択的抗癌剤デリバリー法を構築することである。本研究目的を達成するために、まず FAn-M- β -CyD を新規に調製し、その物理化学的性質を評価する。溶液中における FR と FAn-M- β -CyD の会合定数を表面プラズモン共鳴装置 (SPR) を用いて定量する。KB 細胞を用いて、FAn-M- β -CyD が FR 発現細胞選択的に取込まれるか否かを明らかにする。これらの結果をもとに、FAn-M- β -CyD の最適な葉酸導入数および構造を決定する。次に、DOX/FAn-M- β -CyD 包接複合体および結合体を調製し、DOX/FAn-M- β -CyD 複合体および結合体の FR 発現細胞選択的な抗腫瘍効果を確認する。さらに、DOX/FAn-M- β -CyD 複合体の細胞内動態を解析する。また、担癌マウスに DOX/FAn-M- β -CyD 複合体を腫瘍内、静脈内および経口投与した後、抗腫瘍効果および体内動態を評価する。

4 . 研究成果

(1) FAn-M- β -CyD の調製

NH₂-M- β -CyD と FA との脱水縮合反応により、FAn-M- β -CyD を調製した。¹H-NMR および FAB MS スペクトルにより、FAn-M- β -CyD は M- β -CyD と FA がモル比 1 : 1 ~ 1 : 3 で結合していることを確認した。また、蛍光スペクトル法により算出した DOX と FAn-M- β -CyD との安定度定数は、 $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と極めて高いことが明らかとなった。また、イリノテカン(IRT)と FAn-M- β -CyD との安定度定数も、 $5.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と極めて高値を示した。

(2) FAn-M- β -CyD 複合体細胞障害活性と細胞会合

FAn-M- β -CyD が FR- α 高発現細胞選択的な抗腫瘍活性を有するか否かを検討するため、FR- α 高発現細胞であるヒト口腔がん細胞由来 KB 細胞 (FR- α (+))、卵巣がん細胞 SCOV 細胞 (FR- α (+)) および FR- α 低発現細胞であるヒト肺がん上皮細胞由来 A549 細胞 (FR- α (-)) を用いて FA₁-M- β -CyD の抗腫瘍活性を WST-8 法により評価した。FAn-M- β -CyD は、KB 細胞および SCOV 細胞において濃度依存的な殺細胞活性を示した。一方、A549 細胞において、FAn-M- β -CyD は 10 mM まで抗腫瘍活性を示さなかった。また、FAn-M- β -CyD は他の FR- α 高発現細胞であるヒトメラノーマ細胞由来 Ihara 細胞や M213 細胞においても有意に高い抗腫瘍活性を示した。これらの結果より、FAn-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的な抗腫瘍活性を有することが示唆された。

蛍光物質 TRITC を付加した TRITC-FAn-M- β -CyD を用いて、FR- α 高発現細胞との細胞会合に及ぼす FR 競合阻害剤の影響をフローサイトメトリーにて検討した。その結果、TRITC-FAn-M- β -CyD は KB 細胞および SCOV 細胞と会合することが示唆された。また、TRITC-FAn-M- β -CyD の会合を示すピークは、FR 競合阻害剤である FA 添加により左側にシフトした。さらに、KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) を 1 mM FAn-M- β -CyD 含有無血清

培地で 1 時間処理した後、1 M 水酸化ナトリウムで細胞を可溶化し、細胞内に取り込まれた FA の蛍光強度を蛍光分光光度計にて評価したところ、KB 細胞に対する FA_n-M-β-CyD の会合量は、A549 細胞の系よりも有意に高いことが示唆された。これらの結果より、FA_n-M-β-CyD は FR-α を介して細胞会合することが強く示唆された。

(3) 担癌マウスに対する FA_n-M-β-CyD の抗腫瘍活性

FA_n-M-β-CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性を検討するため、KB 細胞 (FR-α (+))を用いて作成した担がんマウスに FA_n-M-β-CyD を尾静脈内に単回投与し、腫瘍体積および生存率について検討した。マンニトール投与群と比較して、FA_n-M-β-CyD 投与群では顕著に腫瘍の成長を抑制した。これらの結果より、FA_n-M-β-CyD は *in vivo* においても優れた抗腫瘍活性を有することが示唆された。また、FA_n-M-β-CyD を KB 細胞を皮下に異種移植した担がんマウスの尾静脈内に単回投与 24 時間後の血液生化学的パラメータは、コントロール群と差異は認められなかったことから、FA_n-M-β-CyD は *in vivo* において安全性に優れることが示唆された。

(4) DOX/FA_n-M-β-CyD 複合体細胞障害活性

DOX と FA_n-M-β-CyD との複合体を KB 細胞 (FR (+)) および HCT116 細胞 (FR (+)) に 24 時間適用後の抗腫瘍活性を WST-8 法により評価した。各種 DOX/β-CyDs 複合体を KB 細胞 (FR (+))および HCT116 細胞 (FR (+)) に 24 時間適用後の抗腫瘍活性を検討したところ、DOX と天然 β-CyD に FA を修飾した FA₁-β-CyD との複合体である DOX/FA_n-M-β-CyD 複合体および DOX/M-β-CyD 複合体は DOX の抗腫瘍活性を増強させなかったのに対して、DOX/FA_n-M-β-CyD 複合体は、DOX 単独と比較して有意に高い抗腫瘍活性を示した。データには示さないが、同様な傾向が、IRT の系でも認められた。

(5) FA_n-M-β-CyD 複合体の *in vivo* 抗腫瘍効果

KB 細胞 (FR (+)) および HCT116 細胞 (FR (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスに DOX/FA_n-M-β-CyD 複合体溶液を静脈内単回投与後の腫瘍体積、体重変化および生存率について検討した。マンニトール、DOX 単独および DOX/M-β-CyD 複合体投与群と比較して、DOX/FA_n-M-β-CyD 投与群では有意に腫瘍の成長が抑制された。マンニトールおよび DOX 単独投与群では、腫瘍体積の増加に伴い、体重の顕著な増加が認められた。一方、DOX/FA_n-M-β-CyD 複合体投与群では腫瘍体積の減少に伴い、体重増加は緩やかであった。また、本複合体をマウス静脈内に単回投与 24 時間後の血液生化学検査値 (CRE, BUN, AST, ALT, LDH, CK) に変化はほとんど見られなかったことから、安全性にも優れる可能性が示唆された。

これらの結果より、FA₁-M-β-CyD は、1) 細胞形質膜上の FR-α を介して CLIC/GEEC 経路により細胞内に取り込まれた後、エンドソームから脱出し、2) ミトコンドリア膜のリピッドラフトに作用し、その膜電位を上昇させることでストレスを誘導し、3) オートファゴソームの形成およびマイトファジーを介して優れた抗腫瘍活性を示したものと考えられる。一方、DOX/FA_n-M-β-CyD 複合体は、DOX 単独および DOX/M-β-CyD 複合体よりも優れた抗腫瘍活性を有することが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Involvement of mitophagy-mediated cell death in colon cancer cells by folate-appended methyl- β -cyclodextrin
K.M. Elamin, Y. Yamashita, K. Motoyama, T. Higashi, H. Arima
J. Incl. Phenom. Macro. Chem, **89**, 333-342 (2017). 査読有
2. Induction of Mitophagy-mediated Antitumor Activity with Folate-appended Methyl- β -cyclodextrin
K. Kameyama, K. Motoyama, N. Tanaka, Y. Yamashita, T. Higashi, H. Arima
Int. J. Nanomedicine, **12**, 3433-3446(2017). 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Cyclodextrins as drug targeting vehicles and active pharmaceutical ingredients (invited lecture)
H. Arima, K. Motoyama, T. Higashi
The 19th International Cyclodextrin Symposium, Tokyo, Japan, April 29 (2018).
2. Folate-appended β -Cyclodextrin as a Promising Tumor Targeting Carrier for Antitumor Drugs
Y. Yamashita, A. Okamatsu, T. Hirotsu, K. Hattori, K. Motoyama, T. Higashi, H. Arima
9th Asian Cyclodextrin Conference (9ACC) 2017, Singapore, December 14-17 (2017)
3. The Use of Cyclodextrins as Drug Delivery Carriers and Active Pharmaceutical Ingredients
H. Arima, K. Motoyama, T. Higashi
9th Asian Cyclodextrin Conference (9ACC) 2017, Singapore, December 14-17 (2017)
4. Potential use of cyclodextrins as drug carriers and active pharmaceutical ingredients for cancer treatments
H. Arima, K. Motoyama, T. Higashi
International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences (ISDDPS), Kyoto, Japan, March 9-10 (2017)
5. 葉酸クラスター型シクロデキストリンを用いたイリノテカンのがん細胞選択的デリバリー
本山 敬一、山下 佳士、弘津 辰徳、服部 憲治郎、石橋 勇人、小野寺 理沙子、東 大志、有馬 英俊
日本薬学会第 139 年会、千葉、3/21-23 (2019).
6. 葉酸クラスター型シクロデキストリンによる新規大腸がん治療戦略の構築
山下佳士、弘津辰徳、服部憲治郎、本山敬一、東 大志、有馬英俊
日本薬剤学会第 33 年会、静岡、5/30-6/1 (2018).

7. ドキソルピシンの副作用回復薬としての葉酸修飾シクロデキストリンの有用性評価
桑野いづみ、東 大志、本山敬一、有馬英俊
日本薬学会第 138 年会、金沢、3/25-28 (2018).
8. シクロデキストリンの超分子機能を利用した医薬品原薬の開発
本山敬一
日本薬学会第 138 年会 一般シンポジウム、金沢、3/25-28 (2018).
9. 葉酸修飾シクロデキストリンによる腫瘍選択的抗がん剤デリバリー
弘津辰徳、岡松文香、服部憲次郎、東 大志、本山敬一、有馬英俊
第 34 回シクロデキストリンシンポジウム、愛知、8/31-9/1 (2017).
10. 葉酸修飾シクロデキストリンによるドキソルピシンの副作用軽減効果
桑野いづみ、本山敬一、東 大志、有馬英俊
第 41 回西日本薬剤学研究会、九州地区国立大学九重共同研修所、8/25-26 (2017).
11. シクロデキストリンの魅力再発見
有馬英俊、本山敬一、東 大志
日本薬剤学会第 32 年会、埼玉、5/11-13 (2017).

〔その他〕

ホームページ：熊本大学大学院生命科学研究部製剤設計学分野
<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/seizai/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし