

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790040

研究課題名（和文）：糖鎖多分岐修飾シクロデキストリンによる腫瘍細胞選択的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・准教授

研究者番号：50515608

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、葉酸修飾シクロデキストリンを用いて腫瘍細胞選択的な細胞障害性を有する抗癌剤キャリアを構築することである。即ち、腫瘍細胞上の脂質マイクロドメインとの相互作用が期待されるメチル-β-シクロデキストリン（M-β-CyD）に癌標的リガンドである葉酸（FA）を修飾した FA-M-β-CyD を調製し、腫瘍細胞選択的キャリアを構築することである。種々検討した結果、FA-M-β-CyD は、抗癌剤ドキソルビシン（DOX）と安定な複合体を形成し、癌細胞内に取り込まれた後、DOX の殺細胞効果を増強させることが示唆された。さらに、担がんマウスにおいて、DOX/FA-M-β-CyD 複合体は、静脈内投与において、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示した。以上の結果より、FA-M-β-CyD は、*in vitro* および *in vivo* において、FR 高発現細胞選択的抗がん剤キャリアとして優れた性質を有することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, to make an attempt to confer a tumor cell-selectivity to M-β-CyD, we newly synthesized folate-appended M-β-CyD (FA-M-β-CyD), and evaluated the potentials as its novel tumor-selective carrier for antitumor drugs. Doxorubicin/FA-M-β-CyD complex showed the potent antitumor activity after single intravenous injection to tumor-bearing mice, compared to doxorubicin alone and DOX/M-β-CyD complex. In conclusion, the present study demonstrated the potentials of FA-M-β-CyD as a novel tumor-selective carrier for antitumor drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー

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（ラフト）の中で、特にコレステロ

ールリッチリピッド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からラフト阻害剤として利用されている。また、Grosse らは

性を増強させなかったのに対して、DOX/FA-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、パクリタキセルの系でも認められた。

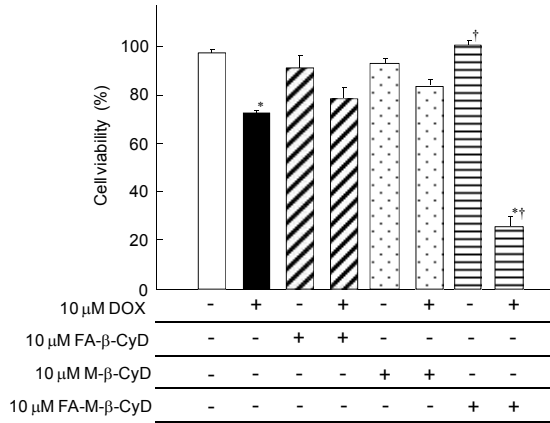


図 2. KB 細胞における DOX/ β -CyDs 複合体の細胞障害活性

(3) DOX の細胞内取り込みおよび細胞内局在性

前項において、FA-M- β -CyD による DOX の抗腫瘍活性増強には、両者の複合体形成が重要であることが示唆された。そこで本項では、KB 細胞および A549 細胞を用いて DOX の細胞内取り込み量に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を検討した。

DOX 単独およびいずれの DOX/ β -CyDs 複合体系においても、KB 細胞内に DOX 由来の蛍光が観察されたが、DOX/FA-M- β -CyD 複合体系の蛍光強度が最も強く (図 3)、細胞内取り込み量の結果 (図 3B) とよく符合した。一方、DOX 単独、DOX/FA- β -CyD および DOX/M- β -CyD 複合体系では、FA を添加しても KB 細胞内の DOX の蛍光強度はあまり変化しなかったが、DOX/FA-M- β -CyD 複合体系では FA 添加によりその蛍光強度が著しく低下した (図 4)。一方、A549 細胞では DOX/ β -CyDs 複合体のいずれにおいても、DOX の蛍光強度は低下した (データ未掲載)。

これらの結果より、DOX/FA-M- β -CyD 複合体は、FR を介して DOX の細胞内取り込みを上昇させることが示された。

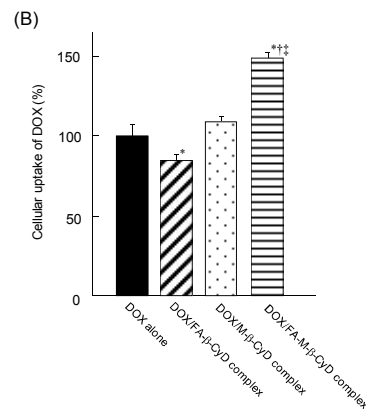
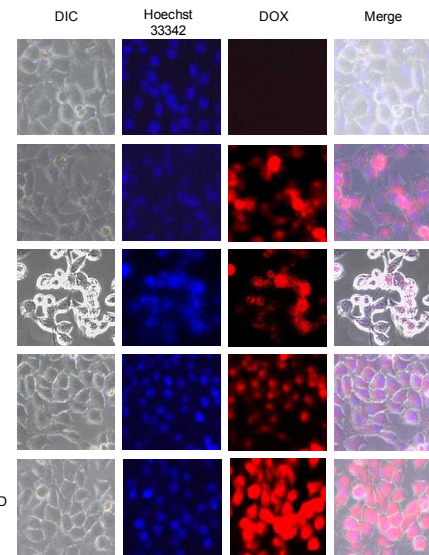


図 3 KB細胞における DOX の細胞内分布および細胞内取り込み量

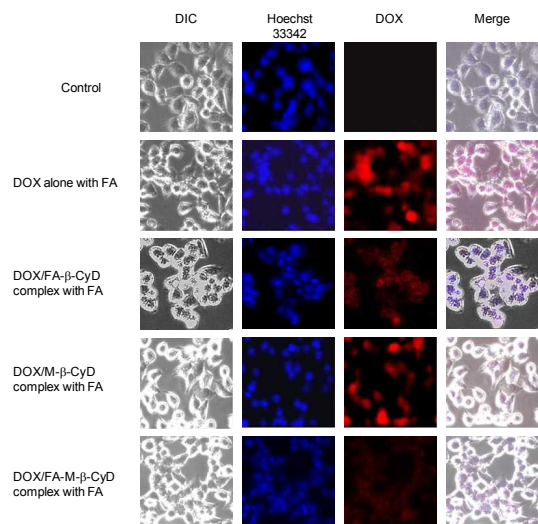


図 4 DOX の細胞内分布に及ぼす FA 添加の影響

(4) 担癌マウスにおける *in vivo* 抗腫瘍効果の検討

これまでの検討より、FA-M- β -CyD は DOX の抗腫瘍活性を増強することが示唆された。そこで本節では、Colon-26 細胞 (FR (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスに DOX/FA-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。

図 5A は、静脈内に単回投与後の腫瘍体積変化を示す。コントロール、DOX 単独および DOX/M- β -CyD 複合体投与群と比較して、DOX/FA-M- β -CyD 投与群では有意に腫瘍の成長が抑制された。コントロールおよび 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 (図 5B)。一方、DOX/FA-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。さらに、図 5C に示すようにコントロール、DOX 単独および DOX/M- β -CyD 複合体投与群では、65 日目までに全例死亡したのに対して、DOX/FA-M- β -CyD 投与群では、110 日目においても 50% の生存率を示した。

また、誌面の都合上、データを示さないが、本複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、DOX/FA-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。

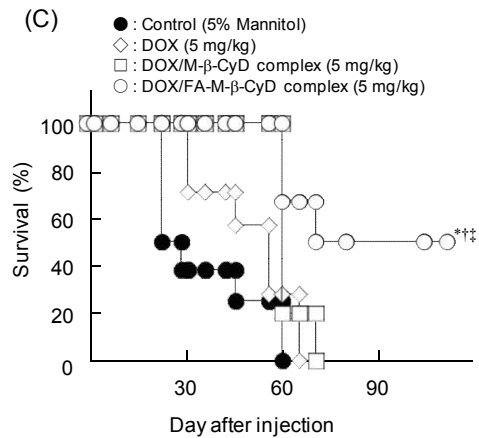
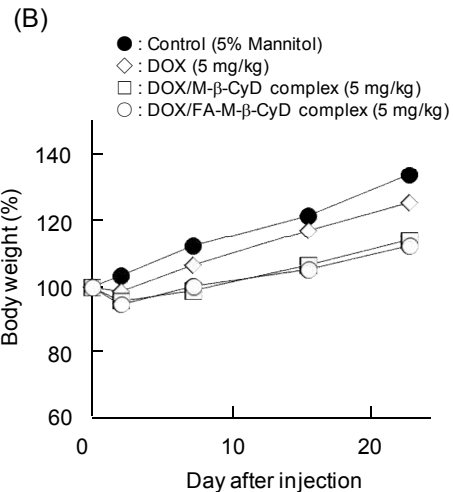
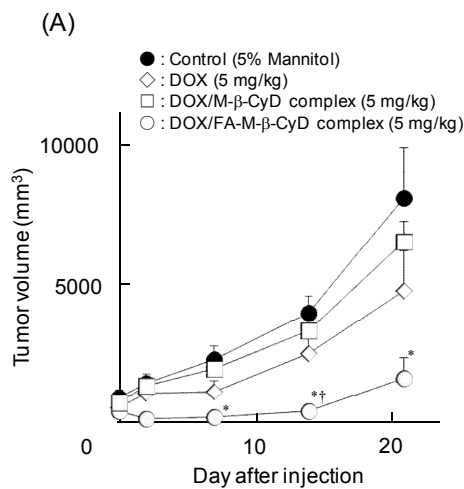


図 5 担がんマウスに対する FA-M- β -CyD の抗腫瘍効果 (静脈内単回投与)
(A) 腫瘍の大きさ、(B) 体重変化、
(C) 生存率

(5) 考察

本研究では、FA-M- β -CyD を新規に調製し、その腫瘍選択的抗がん剤キャリアとしての有用性を *in vitro* および *in vivo* にて評価した。

FR には、FR- α 、- β 、- γ の 3 つのアイソフォームが同定されている。なかでも FR- α は、正常細胞と比較して様々な上皮がん細胞選択的に過剰発現しており、その発現量は、腫瘍の悪性度と相関することが知られている。また、FR- α は FA の α -カルボキシ基を認識し、CLIC/GEEC エンドサイトーシスにより FA を細胞内に取り込むことが知られている。本研究において、FA-M- β -CyD は FA の γ -カルボキシ基と NH₂-M- β -CyD のアミ

ノ基との脱水縮合反応を利用して調製しており、FR- α の認識に必要な FA の α -カルボキシ基は構造中に保持されているものと考えられる。実際、Guaragna らは、FA の γ -カルボキシ基と抗がん剤であるクロラムブシルとの結合体が FR 高発現細胞選択的に認識されることを報告している。

一般に、薬物/CyD 包接複合体を生体内に投与すると、生体成分との競合包接により薬物は CyD から速やかに解離するため、CyD の薬物包接能を利用して抗がん剤キャリアを構築する場合、薬物と CyD との安定度定数 (K_c) が $10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ 以上という極めて強い相互作用が必要とされる。本実験条件下、M- β -CyD と DOX との安定度定数 (モル比 1:1) は $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であり、Bakkour らが報告した β -CyD と DOX との安定度定数 ($K_c = 1.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$) よりも約 1000 倍高い値を示した。M- β -CyD がこのように高い安定度定数を示したのは、メチル基の導入により CyD の疎水性空洞が広がり、DOX とより安定な複合体を形成したためと考えられる。一方、FA-M- β -CyD と DOX との安定度定数 (モル比 1:1) も、 $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と高値を示し、M- β -CyD の系と同程度であった (データ未掲載)。これは、FA-M- β -CyD の DOX 包接能が FA 修飾による影響を受けないことを示唆している。これらの結果より、FA-M- β -CyD は DOX と極めて安定な包接複合体 ($K_c = 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) を形成可能であり、静脈内に投与後、DOX の血中動態を制御できるものと推察された。

次に、DOX/FA-M- β -CyD 複合体の *in vitro* 抗腫瘍活性を検討した結果、FA-M- β -CyD は KB 細胞 (FR (+)) において DOX の抗腫瘍活性を増強したが、A549 細胞 (FR (-)) では増強しなかった。一方、KB 細胞 (FR (+)) における DOX/M- β -CyD 複合体の抗腫瘍活性増強作用は認められなかった。これらの結果から FA-M- β -CyD は、FR 高発現細胞選択的に DOX の抗腫瘍活性を増強することが強く示唆された。また、Gabizon らは KB 細胞 (FR (+)) において、FA 修飾 DOX 内封リポソームが FA 未修飾のリポソームと比較して、DOX の細胞内取り込み量を約 10 倍上昇させることを報告しており、FA 修飾により FA-M- β -CyD の細胞内取り込み量が増大したという結果と符合した (図 3)。FA-M- β -CyD が DOX の抗腫瘍活性を増強した理由として、1) FA-M- β -CyD が細胞膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させることで膜透過性を亢進し、DOX の受動輸送を促進した、2) DOX の受動輸送に加えて、FA-M- β -CyD が DOX と複合体を形成することにより、CLIC/GEEC エンドサイトーシス経路を介した細胞内取り込み量が増大したことなどが考えられる。しかしながら、

FA-M- β -CyD による DOX の抗腫瘍活性増強作用は FA 添加により有意に低下したこと、また、FA-M- β -CyD の前処理および後処理が DOX の抗腫瘍活性に影響を与えなかったことから (データ未掲載)、FA-M- β -CyD による抗腫瘍活性増強は、細胞形質膜との相互作用による DOX の細胞膜透過性の亢進というよりも、FR を介した複合体の細胞内取り込みの増大の寄与が大きいものと考えられる。一方、FA-M- β -CyD は KB 細胞 (FR (+)) においてパクリタキセル (PTX) の抗腫瘍活性も上昇させたが、5-フルオロウラシル (5-FU) の抗腫瘍活性には影響を与えなかった。これは疎水性薬物である DOX および PTX が、FA-M- β -CyD と安定な複合体を形成したのに対し、親水性薬物である 5-FU は FA-M- β -CyD と複合体を形成し難かったためと考えられる。このことは、M- β -CyD が DOX およびドセタキセルの抗腫瘍活性は増強するが、5-FU の抗腫瘍活性には影響を与えないという Grosse らの報告からも支持される。これらの結果より、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性増強作用は、抗がん剤/FA-M- β -CyD 複合体が CLIC/GEEC エンドサイトーシスを介して FR 高発現がん細胞選択的に取り込まれることに強く起因するものと考えられる。

Colon-26 細胞 (FR (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスに DOX/FA-M- β -CyD 複合体を静脈内に単回投与したところ、DOX 単独および DOX/M- β -CyD 複合体系と比較して、腫瘍の成長を著しく抑制し、マウスの生存率を有意に改善することが明らかとなった (図 5)。これは、FA-M- β -CyD が DOX と高い安定度定数 ($K_c = 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) を有するために、血中でも安定な複合体を形成し、DOX/FA-M- β -CyD 複合体が FR を介してがん細胞に取り込まれたためと推察される。近年、トポイソメラーゼ II β をコードする *Top2b* を心筋細胞特異的に欠損させると、DOX 誘導性の DNA 二本鎖切断とミトコンドリア生合成の異常や活性酸素 (ROS) 産生が低下し、進行性の心不全発症が抑制されることから、DOX が誘発する心毒性は心筋細胞のトポイソメラーゼ II β を介することが報告された。DOX は、投与量が 550 mg/m^2 に達すると 7 ~ 26% の症例で心不全を発症することが知られており、DOX の心臓移行量を減少させることは極めて重要である。今回、担がんマウスにおいて FA-M- β -CyD は DOX 単独処理により誘発される CK の上昇を有意に抑制したことから、DOX の心臓移行量を抑制し、心毒性の発症リスクを低減できるものと考えられる。今後、DOX の体内動態や心毒性などの副作用について詳細に解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) R. Onodera, K. Motoyama, A. Okamatsu, T. Higashi, H. Arima, Potential Use of Folate-appended Methyl- β -Cyclodextrin as an Anticancer Agent, *Sci. Rep.*, **3**, 1104, 1-9 (2013). 査読有.
- 2) R. Onodera, K. Motoyama, H Arima., Design and evaluation of folate-appended methyl- β - cyclodextrin as a new antitumor agent, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, **70**, 321-326 (2011). 査読有.

[学会発表] (計 13 件)

- 1) オートファジー細胞死を誘導する新規抗がん剤としての葉酸修飾メチル- β -シクロデキストリンの有用性評価、小野寺理沙子、岡松文香、本山敬一、東大志、有馬英俊、日本薬学会第 133 年会、パシフィコ横浜 (横浜, 3/27-30, 2013)
- 2) 小野寺理沙子、岡松文香、本山敬一、東大志、有馬英俊、葉酸修飾メチル化シクロデキストリンの抗腫瘍活性に及ぼすオートファジーの関与、第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (京都大学, 11/14-15, 2012)
- 3) 本山敬一、小野寺理沙子、岡松文香、谷吉雅俊、東大志、有馬英俊、葉酸修飾メチル β -シクロデキストリンの高い抗腫瘍効果におけるオートファジーの関与、第 29 回シクロデキストリンシンポジウム (東京, 星薬科大学, 9/6-7, 2012)
- 4) 本山敬一、小野寺理沙子、岡松文香、東大志、有馬英俊、腫瘍細胞選択的新規抗がん剤としての葉酸修飾メチル- β -シクロデキストリンの細胞死誘導機構、第 28 回日本 DDS 学会 (札幌コンベンションセンター, 7/4-5, 2012)
- 5) 小野寺理沙子、岡松文香、本山敬一、東大志、有馬英俊、葉酸修飾メチル化 β -シクロデキストリンの抗腫瘍活性および細胞死誘導機構、日本薬剤学会第 27 年会 (神戸国際会議場, 5/24-26, 2012)
- 6) 小野寺理沙子、岡松文香、本山敬一、東大志、有馬英俊、腫瘍細胞選択的新規抗がん剤としての葉酸修飾 β -シクロデキストリンの有用性評価、第 28 回 日本薬学会九州支部大会 (福岡大学, 12/10-11, 2011)
- 7) 本山敬一、小野寺理沙子、岡松文香、東大志、有馬英俊、新規抗がん剤としての葉酸修飾メチル- β -シクロデキストリンの有用性評価、第 28 回シクロデキストリンシンポジウム (秋田ビューホテル, 9/8-9, 2011)

- 8) Onodera R., Okamatsu A., Motoyama K., Higashi T., Arima H., Preparation and Evaluation of Folate-appended Methyl- β -cyclodextrin as New Antitumor Agents, *The 6th Asian Cyclodextrin Conference*, (Canberra, Australia. 8/28-31, 2011)
- 9) 小野寺理沙子、岡松文香、本山敬一、東大志、有馬英俊、新規抗がん剤としての葉酸修飾メチル化シクロデキストリンの有用性評価、第 27 回日本 DDS 学会 (東京大学, 6/9-10, 2011)
- 10) Onodera R., Akao T., Motoyama K., Arima H., Design and Evaluation of Folate-appended Methyl- β -Cyclodextrin as New Antitumor Agents, *The FIP World Congress 2010 in Conjunction with AAPS Annual Meeting*, (New Orleans, USA, 11/14-18, 2010)
- 11) Onodera R., Motoyama K., Arima H., Design and Evaluation of Folate-appended Methyl- β -cyclodextrin as Novel Anti-tumor Agents, *The 2nd Young Scientist Exchange Symposium for A3 Foresight Program in Daejeon*, (Seoul, Korea. 7/4-7, 2010)
- 12) 有馬英俊、小野寺理沙子、本山敬一、新規抗がん剤としての葉酸修飾メチル化シクロデキストリンの調製と評価、第 26 回日本 DDS 学会 (大阪国際交流センター, 6/17-18, 2010)
- 13) Onodera R., Motoyama K., Arima H., Design and Evaluation of Folate-appended Methyl- β -cyclodextrin as New Antitumor Agents, *The 15th International Cyclodextrin Symposium*, (Vienna, Austria. 5/9-12, 2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：腫瘍細胞選択的抗がん剤
発明者：有馬英俊、本山敬一、東大志
権利者：熊本大学
種類：発明特許
番号：特願 2012-117205
出願年月日：平成 24 年 5 月 23 日
国内外の別：国内

[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://seizai.pharm.kumamoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 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・准教授
研究者番号：50515608