

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790060

研究課題名(和文) 脂溶性ビタミン二分子膜小胞体の創製と癌治療への応用

研究課題名(英文) Development of lipid bilayer membrane vesicles constructed by fat-soluble vitamin and application for cancer treatment

研究代表者

運 敬太 (UN, Keita)

国立医薬品食品衛生研究所・薬品部・研究員

研究者番号：80624535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コレカルシフェロール誘導体含有リポソームが、細胞表面のcaveolin-1と相互作用し、カベオラ介在性エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることを見出した。さらに、コレカルシフェロール誘導体含有リポソームが殺細胞効果を有すること、及び他の薬剤の薬理活性を増強し得ることを明らかにした。本研究で用いているコレカルシフェロール誘導体は、既に生体内における代謝・消失過程が詳細に把握されており、生体適合性に優れた構成成分である。そのため、本研究成果は有効かつ安全な治療計画の構築のための医薬品開発に資するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determined that cholecalciferol-derivative containing liposomes are interacted with caveolin-1 on the cell surface, and taken up into the cells via caveolae-mediated endocytosis. Moreover, we showed that cholecalciferol-derivative containing liposomes possess the cytotoxic activities, and increase the pharmaceutical activities of the other medicines such as anti-cancer agents. Since the cholecalciferol-derivatives used in this study have already been investigated the metabolic and eliminating process in the body, these components have high biocompatibility. Therefore, these results obtained from this study contribute to pharmaceutical development for the construction of effective and safe medication.

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：リポソーム コレカルシフェロール

1. 研究開始当初の背景

癌は本邦において昭和 56 年以来死亡原因の第 1 位に挙げられる疾病であり、今後も死亡者数の増加が予測されている。従って、癌の克服は 21 世紀の医療の最大の課題の一つと言える。こうした背景の下、患部にのみ選択的に抗癌剤を集中的に送達することができるドラッグデリバリーシステム(DDS)が、癌治療の切り札として注目されて久しい。ナノサイズの薬物キャリアを利用し、内封薬物を患部へ特異的に送達する DDS 製剤は、副作用の発現を抑制し、かつ癌治療の効果を最大限に発揮させ得る為、既に医薬品としても臨床現場においても実用化されるに至っている。一方、従来の DDS 医薬品開発では、抗癌剤等の活性本体をキャリアに封入し、生体内安定性を向上させ、標的部位に効率的に送達する戦略が推進されてきたが、内封薬物に薬理活性を委ねる本アプローチにおいては、生体内で放出された内封薬物による正常組織への非特異的暴露に伴う予期せぬ毒性の発現が懸念される。また、キャリアに起因した炎症反応や細胞毒性が報告されており、生体適合性と薬理活性を併せ持つ新規高機能性 DDS 製剤開発が喫緊の課題として挙げられる。

一方で、近年の生化学的分析手法の進展に伴い、ビタミン D3 等の脂溶性ビタミン類にアポトーシス誘導作用、抗炎症作用、血管新生阻害作用や抗癌剤耐性克服作用等の新規薬理活性が見出されていた。そのため、DDS キャリアとして汎用されるリポソームの主構成成分であるコレステロールに化学構造が類似するコレカルシフェロール(ビタミン D3)を利用することで、生体適合性に優れ、かつ抗腫瘍活性を有する DDS キャリア開発が可能になると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では生体適合性に優れ、かつ高い抗腫瘍活性等を示し得るコレカルシフェロール誘導体を構成成分とする新規リポソーム製剤を設計・構築し、その細胞内動態挙動を評価することを目的とする。他方、脂溶性ビタミンは欠乏症や過剰症の存在が知られており、生体内での濃度バランスが恒常性維持の為に極めて重要である。上述の脂溶性ビタミン D3 誘導体含有リポソームは過剰症として知られる肝機能障害や腎機能障害の誘発に繋がる可能性を孕んでいるため、低投与量で優れた薬理活性を発揮し得る製剤設計が求められる。そこでコレカルシフェロール誘導体を含有するリポソーム製剤開発を行い、各脂溶性ビタミンとしての投与量を減量することにより、有害事象の発現を抑え、かつ製剤としての有効性の向上を図り、癌治療の為に安全かつ有効なナノ医薬品開発への貢献を目指す。さらに最終的には当該製剤と内

封抗癌剤との相乗効果により低薬物投与量で高い薬理効果を達成する、有効かつ安全なナノ医薬品開発への貢献を目指す。

3. 研究の方法

(1) コレカルシフェロール誘導体含有リポソームの設計及び構築

コレカルシフェロール誘導体としてコレカルシフェロール、カルシジオール及びカルシトリオールを構成成分として含有するリポソーム製剤を構築した。具体的には、リン脂質、コレステロール及びコレカルシフェロール誘導体を一定比率でクロロホルム中に溶解した後、脂質薄膜法(パンガム法)を用いて脂質二分子膜構造を作製した。粒子径はエクストルーダーを用いて約 100nm に調整し、リン脂質又はコレステロール濃度を指標にリポソーム濃度を測定した。調製したリポソームの物理化学的特性は粒子径、並びに表面電荷測定を指標に評価した。

(2) 細胞内取込評価

コレカルシフェロール誘導体含有リポソームの細胞内導入機構を明らかにした。具体的には、蛍光標識を施したコレカルシフェロール誘導体含有リポソームを調製し、細胞内導入過程に関してクローロプロマジン(クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤)、ゲニステイン(カベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤)、エチルイソプロピルアミロライド(マクロピノサイトーシス阻害剤)の前処理条件下における製剤の細胞内取込への影響を蛍光強度測定、並びに共焦点レーザー顕微鏡観察により評価した。

(3) 抗腫瘍活性評価

コレカルシフェロール誘導体は、アポトーシス誘導に基づく抗腫瘍効果、抗炎症作用、並びに抗癌剤耐性克服作用を示すことが報告されている。そこで、コレカルシフェロール誘導体含有リポソームにおいても同様の効果が得られることを評価した。まず癌細胞にコレカルシフェロール誘導体含有リポソームを添加し、一定時間後における細胞生存率を WST-8 アッセイにより測定することで、製剤の抗腫瘍活性を評価した。

4. 研究成果

(1) コレカルシフェロール誘導体含有リポソームの物性評価及び細胞内取込特性評価

コレステロール類似構造を有する脂溶性ビタミンであるコレカルシフェロールを構成成分として導入したリポソーム製剤の調製を試み、その物性評価及び細胞内取込特性評価を行った。製剤調製法の最適化検討の結果、コレカルシフェロール単独では小胞体構

造が形成されず、補助脂質としてリン脂質又はコレステロールの添加が不可欠であることを見出した。調製したコレカルシフェロール誘導体含有リポソームの粒子径、PDI、及びゼータ電位は、それぞれ約 100 nm、約 0.12 及び約 -0.05 であり、コレカルシフェロール誘導体の種類による影響は認められなかった (Table 1)。

	Particle sizes, PDI, and ζ -potentials of liposomes		
	particle size (nm)	PDI	ζ -potential (mV)
DOPC:chol (50:50 (mol))	99.2 ± 0.22	0.141 ± 0.007	-0.052 ± 0.23
DOPC:chol:cholecalciferol (50:25:25 (mol))	99.0 ± 0.44	0.124 ± 0.021	-0.084 ± 0.18
DOPC:chol:calcitriol (50:25:25 (mol))	98.8 ± 0.48	0.125 ± 0.008	-0.034 ± 0.18
DOPC:chol:calcitriol (50:25:25 (mol))	98.7 ± 1.16	0.120 ± 0.014	-0.041 ± 0.21

Table 1. Particle sizes, PDI, and ζ -potentials of cholecalciferol-containing liposomes. Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

次にコレカルシフェロール誘導体含有リポソームの細胞内取込経路を明らかにするために、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞株を用いてエンドサイトーシス阻害実験を行った。その結果、通常のリポソーム製剤は過去の報告通り、クラスリン介在性エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた一方、コレカルシフェロール誘導体含有リポソームの細胞内取込には、一部カベオラ介在性エンドサイトーシスが関与していることが示唆された (Figures 1)。本現象は、非活性体であるコレカルシフェロール、及び代謝活性体であるカルシジオール及びカルシトリオールを含有するリポソームにおいても認められ、コレカルシフェロール誘導体の種類による影響は認められなかった。

また同様の検討を、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞株及びヒト大腸癌由来 HT-29 細胞株を用いて行った結果、細胞種によってカベオラ介在性エンドサイトーシスの関与に多寡が見出され、本現象には細胞種に応じた caveolin-1 発現量の差異が影響していることが示唆された。

さらに機能性脂質として汎用されるポリエチレングリコール (PEG) 修飾リン脂質をコレカルシフェロール誘導体含有リポソームの構成脂質として用いた場合の影響について評価した結果、カベオラ介在性エンドサイトーシスによるリポソームの細胞内取込特性が、PEG 修飾リン脂質含有時には消失することが示された。本知見は、リポソーム表面に一部露出したコレカルシフェロール誘導体と細胞表面に表出する caveolin-1 との相互作用が、コレカルシフェロール誘導体含有リポソームのカベオラ介在性エンドサイトーシスに関与している可能性を示唆するものである。以上、リポソーム構成脂質としてコレカルシフェロール誘導体を含有させることで、製剤の細胞内取込経路を制御できることが明らかとなった。

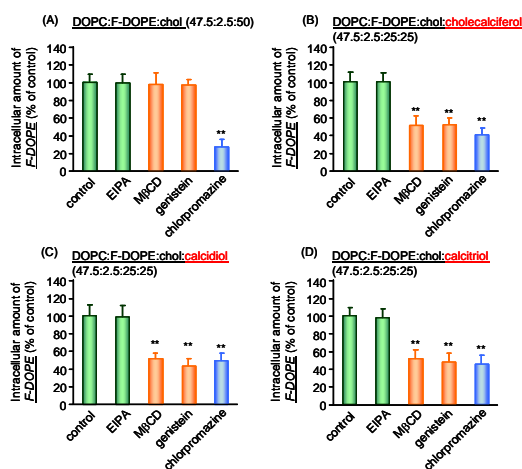


Figure 1. The intracellular uptake of conventional liposomes (A), cholecalciferol-containing liposomes (B), calcitriol-containing liposomes (C), and calcitriol-containing liposomes (D) at 2 hr after the addition of liposomes in HeLa cells. Each endocytosis inhibitor was added to cells at 30 min before the addition of liposomes. ** $P < 0.01$ compared with the corresponding control group. Each value represents the mean ± S.D. (n=6).

(2) 抗腫瘍活性評価

コレカルシフェロール誘導体は、アポトーシス誘導に基づく抗腫瘍効果、抗炎症作用、並びに抗癌剤耐性克服作用を示すことが近年報告されている。そこで、コレカルシフェロール誘導体含有リポソームにおいても同様の効果が得られるか否かを評価した。ビタミン D3 誘導体は、非活性体であるコレカルシフェロールと、代謝活性体であるカルシジオール及びカルシトリオールに大別される。まず細胞毒性評価として、複数種類の癌細胞に各種コレカルシフェロール誘導体含有リポソームを添加し、一定時間後における細胞生存率を WST-8 アッセイにより測定することで、製剤の抗腫瘍活性を評価した。HeLa 細胞、HT-29 細胞及び HepG2 細胞を用いて、コレカルシフェロール誘導体含有リポソームの細胞毒性評価を行った結果、全ての細胞種において、カルシトリオール含有リポソームで最も高い殺細胞効果が得られた (Figure 2)。また、既存の抗癌剤であるドキソルビシンと低濃度コレカルシフェロール誘導体含有リポソームの併用によって、ドキソルビシ

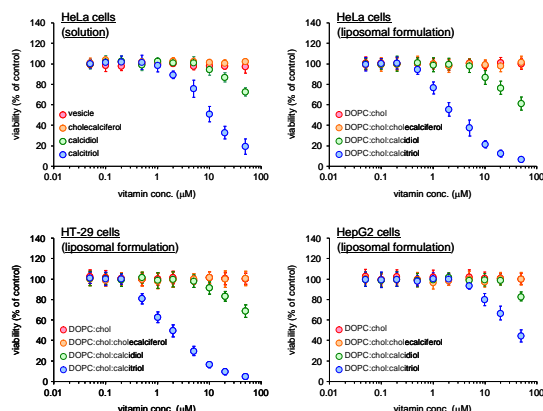


Figure 2. Cytotoxic effects by cholecalciferol-derivatives and cholecalciferol-derivative containing liposomes at 48 hr after the addition of liposomes in HeLa, HT-29, and HepG2 cells. Cytotoxicity was evaluated using a WST-8 assay. Values are presented as mean ± SD (n=4).

ンの殺細胞効果が増強されることを明らかにした。

さらに、これらの効果の発現メカニズムを解析した結果、コレカルシフェロール誘導体が細胞内カスパーゼ発現量を増強し、アポトーシスが亢進することで殺細胞効果、並びに既存抗癌剤の薬理活性増強効果が得られることを見出した。

本研究において用いているコレカルシフェロール誘導体は、既に生体内代謝・消失過程が詳細に把握されており、生体適合性に優れる構成成分であると共に、近年、多様な新規薬理活性が見出されつつある。従って、本研究成果は生体適合性に優れ、かつ高い抗腫瘍活性等を示し得るコレカルシフェロール誘導体含有リポソーム製剤を提供すると共に、有効かつ安全な治療計画の構築のための医薬品開発に資するものである。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

運 敬太、加藤くみ子、奥田晴宏、コレカルシフェロール含有リポソームの細胞内取込に関する研究、日本薬学会第133年会、2013年3月30日、横浜

運 敬太、加藤くみ子、合田幸宏、コレカルシフェロール含有リポソームによる抗腫瘍活性に関する研究、日本薬学会第134年会、2014年3月30日、熊本

6. 研究組織

(1)研究代表者

運 敬太 (UN, Keita)

国立医薬品食品衛生研究所・薬品部・研究官

研究者番号：80624535