

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870537

研究課題名(和文)葉酸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キャリアの構築

研究課題名(英文)Development 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍細胞選択的な細胞障害性を有する抗癌剤およびキャリアを構築するために、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FAn-M-β-CyDを調製した。種々検討した結果、FA1-M-β-CyDは、優れた殺細胞効果およびオートファジー誘導能を有することが明らかとなった。さらに、FA1-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。

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 (FA1-M-β-CyD), and evaluated the potentials as its novel tumor-selective carrier for antitumor drugs. FA1-M-β-CyD showed potent antitumor effects in FR-expressing tumor cells in vitro and in vivo. Furthermore, Doxorubicin/FA1-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 FA1-M-β-CyD as a novel tumor-selective carrier for antitumor drugs.

研究分野：医歯薬学

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システム

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 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。一方、葉酸レセプター (FR) は卵巣を始めとする各種上皮癌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の増大を企図して、M- β -CyD に葉酸 1 分子を導入した FA₁-M- β -CyD を新規に調製し、FA₁-M- β -CyD が非晶質性の高水溶性化合物であること、FR 高発現細胞であるヒト口腔癌細胞由来 KB 細胞に対して強い細胞障害性を有することを明らかにした。さらに我々は、FA₁-M- β -CyD により誘導される細胞死が、多くの抗癌剤が誘導するアポトーシスではなく、オートファジーであることを見出し、葉酸修飾 M- β -CyD の抗腫瘍活性は新規作用機序を有する可能性が強く示唆されている。

一方、服部らは、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 と極めて強い会合定数を有すること、また、葉酸多分岐修飾 β -CyD が抗癌剤ドキソルピシン (DOX) と強固な包接複合体 (安定度定数: 10^9 M^{-1}) を形成することを明らかにした。一般に、CyD と薬物の安定度定数が 10^7 M^{-1} 以上であれば、CyD は血中でも薬物を保持可能であるため、薬物/FA_n-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。そこで本申請課題では、まず腫瘍細胞の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 (FA_n-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

本研究の目的は、葉酸多分岐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デリバリー用キャリアを構築することである。即ち、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) との相互作用により抗腫瘍効果が期待されるメチル- β -シクロデキストリン (M- β -CyD) を用いて、新たに葉酸多分岐修飾 M- β -CyD (FA_n-M- β -CyD) を調製し、腫瘍細胞上に高発現する葉酸レセプター (FR) を特異的に認識する腫瘍細胞選択的な抗癌剤キャリアを構築する。さらに、抗癌剤ドキソル

ピシン (DOX) を FA-M- β -CyD に包接させることにより、腫瘍細胞選択的抗癌剤デリバリー能を付与させる。

3. 研究の方法

(1) FA₁-M- β -CyD の調製

FA₁-M- β -CyD の調製は、M- β -CyD の水酸基をトシル化し、続いてアミノ化した後、縮合剤を用いて末端に葉酸を結合させた。FA₁-M- β -CyD の確認および葉酸置換度の算出は、MALDI-TOF-Mass および ¹H-NMR により行った。

(2) 細胞障害活性

KB 細胞 (FR 高発現細胞) および A549 細胞 (FR 低発現細胞) に対する細胞障害活性は細胞内ミトコンドリア脱水素酵素活性を指標にして WST-1 法により評価した。

(3) 細胞内取り込みおよび細胞内局在性

FA₁-M- β -CyD または DOX/FA₁-M- β -CyD 複合体含有 PBS にて 1 時間処理後、FA₁-M- β -CyD および DOX の細胞内取り込みを蛍光顕微鏡にて観察し、BZ-II 解析アプリケーションを用いて定量した。

(4) 担癌マウスにおける *in vivo* 抗腫瘍効果の検討

BALB/c 雄性マウスの左後肢に Colon-26 細胞懸濁液 (2×10^5 cells; 100 μ L) を接種した。約 10 日後、腫瘍の直径が 8 mm に到達したマウスを *in vivo* 実験に用いた。FA₁-M- β -CyD または DOX/FA₁-M- β -CyD 複合体は、5% マンニトールに溶解させ、担癌マウスの尾静脈より投与し、腫瘍体積、体重、生存率を経時的に追跡した。

4. 研究成果

(1) FA₁-M- β -CyD の調製

NH₂-M- β -CyD と FA との脱水縮合反応により、FA₁-M- β -CyD を調製した。¹H-NMR および FAB MS スペクトルにより、FA₁-M- β -CyD は M- β -CyD と FA がモル比 1:1 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 FA-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。

(2) FA₁-M- β -CyD 複合体細胞障害活性

FA₁-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 (+)) 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-1 法により評価した。FA₁-M- β -CyD は、KB 細胞において濃度依存的かつ、DM- β -CyD には劣るものの、 β -CyD および M- β -CyD と比較して有意に高い抗腫瘍活性を示した。一方、A549 細胞において DM- β -CyD は KB 細胞と同様に強い細胞障害性を示したが、FA₁-M- β -CyD は 10 mM まで抗腫瘍活性を示さなかった。また、FA₁-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、FA₁-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。

(3) FA₁-M- β -CyD の細胞会合

一般に、CyD は親水性かつ分子量が約 1000 と大きいことから、細胞内に取り込まれにくいことが知られている。しかし、FA₁-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的に優れた抗腫瘍活性を有すること、さらにその抗腫瘍活性誘導に FR- α を介した細胞内取り込みが関与することが示唆された。そこで、TRITC を付加した TRITC-FA₁-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-FA₁-M- β -CyD は KB 細胞と会合することが示唆された。また、TRITC-FA₁-M- β -CyD のヒストグラムのピークは、FR 競合阻害剤である FA 添加により左側にシフトした。また、FR- α ノックダウン細胞においても TRITC-FA₁-M- β -CyD の細胞会合は抑制されることが示唆された。さらに、KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) を 1 mM FA₁-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 FA₁-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、FA₁-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。

(4) FA₁-M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性

FA₁-M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性を検討するため、Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を用いて作成した担がんマウスに FA₁-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。コントロール群と比較して、FA₁-M- β -CyD 投与群では顕著に腫瘍の成長を抑制した。さらに、コントロール群では、Colon-26 細胞を移植後 70 日目までに全例死亡したのに対して、FA₁-M- β -CyD 投与群

では、140 日目においても 100% の生存率を示した。これらの結果より、FA₁-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、FA₁-M- β -CyD を Colon-26 細胞を皮下に同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、FA₁-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。

(5) DOX/FA₁-M- β -CyD 複合体細胞障害活性

DOX と FA₁-M- β -CyD との複合体を KB 細胞 (FR (+)) および A549 細胞 (FR (-)) に 24 時間適用後の抗腫瘍活性を WST-1 法により評価した。各種 DOX/ β -CyDs 複合体を KB 細胞 (FR (+)) に 24 時間適用後の抗腫瘍活性を示す。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/FA₁- 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/FA₁-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。

(6) DOX の細胞内取り込みおよび細胞内局在性

前項において、FA₁-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 FA₁-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/FA₁-M- β -CyD 複合体系の蛍光強度が最も強く、細胞内取り込み量の結果とよく符合した。一方、DOX 単独、DOX/FA₁- 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/FA₁-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。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。これらの結果より、DOX/FA₁-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。

(7) DOX/FA₁-M- β -CyD 複合体の *in vivo* 抗腫瘍効果

これまでの検討より、FA₁-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/FA₁-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。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/FA₁-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。一方、DOX/FA₁-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、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/FA₁-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、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、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/FA₁-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。今回、申請研究では葉酸を多分岐させた CyD 誘導体で検討する予定であったが、葉酸を一置換した FA₁-M-β-CyD および DOX 複合体での検討が主体となった。多分岐修飾は現在合成条件が整い、予備検討の段階であったことから、今後も継続して研究を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Evaluation of Antitumor Effect of Folate-conjugated Methyl-β-cyclodextrin for Melanoma. K. Motoyama, R. Onodera, N. Tanaka, K. Kameyama, T. Higashi, R. Kariya, S. Okada, H. Arima. *Biol. Pharm. Bull.*, 2015, **38**, 374-379.(査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

環状オリゴ糖を基盤分子とした腫瘍細胞選択的オートファジーの誘導, 本山敬一, 田中奈歩, 山下有希, 東 大志, 有馬英俊, 第 3 回熊本医工連携フォーラム, 熊本大学医学部医学総合研究棟, 2015/12/14, .

葉酸化シクロデキストリンを用いた癌細胞選択的オートファジーの誘導, 本山敬

一, 田中奈歩, 山下有希, 小野寺理沙子, 東 大志, 渡部直樹, 有馬英俊, 医用光学・分光学系合同研究会, ホテルグランドヒル市ヶ谷, 2015/12/03.

葉酸修飾メチル化シクロデキストリンによるオートファジー介在性抗腫瘍活性の誘導 (招待講演), 本山敬一, 東 大志, 有馬英俊, 第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 熊本大学薬学部多目的ホール, 2015/11/19-20.

環状オリゴ糖を用いた、がん治療戦略の構築 (招待講演), 本山敬一, 東 大志, 有馬英俊, 第 3 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム, 熊本大学黒髪キャンパス百周年記念館, 2015/09/09.

葉酸修飾メチル-β-シクロデキストリンによるオートファジー介在性細胞死誘導機構, 山下有希, 田中奈歩, 小野寺理沙子, 本山敬一, 東 大志, 有馬英俊, 遺伝子・デリバリー研究会第 15 回夏期セミナー, 定山溪ビューホテル, 2015/09/07.

葉酸修飾メチル-β-シクロデキストリンによるオートファジー介在性細胞死誘導機構, 山下有希, 田中奈歩, 小野寺理沙子, 本山敬一, 東 大志, 有馬英俊, 熊本大学拠点 B シンポジウム, 阿蘇熊本空港ホテルエミナース, 2015/09/01.

葉酸修飾シクロデキストリンのがん細胞選択的抗腫瘍活性誘導機構, 本山敬一, 田中奈歩, 東 大志, 有馬英俊, 日本薬剤学会第 30 年会, 長崎ブリックホール, 2015/05/21.

Antitumor activity of folate-appended methyl-β-cyclodextrin in mice xenografted human solid tumor cells, Y. Yamashita, N. Tanaka, R. Onodera, K. Motoyama, T. Higashi, H. Arima, *Asian Federation for Pharmaceutical Sciences (AFPS) Conference*, Bangkok, Thailand, 2015/11/25.

Folate-appended Methyl-β-cyclodextrin as a Novel Autophagic Cell Death Inducer, K. Motoyama, N. Tanaka, R. Onodera, T. Higashi, H. Arima, *Joint Conference of 8th Asian Cyclodextrin Conference and 32nd Cyclodextrin Symposium*, Kumamoto, Japan, 2015/05/14.

〔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