

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06790

研究課題名(和文) 多剤耐性関連輸送体の一括阻害効果を兼備したがん特異的DDSの開発

研究課題名(英文) Development of cancer-specific drug carriers possessing comprehensive inhibitory effect of ABC transporters

研究代表者

森本 かわり (Morimoto, Kaori)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90401009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：デキストラン誘導体ががん多剤耐性克服能力を有する腫瘍特異的な薬物送達システムとして利用できる可能性について検討した。細胞膜ベシクルを用いた実験系において、4 kDa と 70 kDa の 2-hydroxypropyl-trimethylammonium-dextran (Q-D4 と Q-D70) はBCRPとMRP1を阻害したが、P-gp は阻害しなかった。構造活性試験の結果、BCRPの阻害にはカチオン側鎖が重要な役割を果たすと考えられた。しかし細胞を用いた試験では効果が認められなかった。デキストラン誘導体の細胞内濃度がトランスポーターの阻害濃度に到達しないことが原因であろうと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でカチオン修飾デキストランがBCRPとMRP1を阻害する能力を有するが、細胞レベルでは効果がないことを明らかにした。複数の薬物排出トランスポーターを同時に阻害するがん組織特異的ドラッグデリバリーシステムは、がん化学療法の有効性と安全性を高めるために有効である可能性があり、そのための基礎データとして有用な情報を得ることが出来たと考える。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether dextran and its derivatives inhibit BCRP, MRP1, and P-gp in vitro. In Sf-9 membrane vesicles overexpressing BCRP, MRP1, and P-gp, BCRP and MRP1 were significantly inhibited by 2-hydroxypropyl-trimethylammonium-dextran of 4 kDa and 70 kDa (Q-D4 and Q-D70); however, P-gp was not inhibited. A structure-activity study showed that Q-D4, Q-D70, and 40 kDa diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D40) significantly inhibited BCRP, while 4 kDa, 40 kDa, and 70 kDa dextrans, dextran sulfate, and the saccharide components of dextran did not. These results suggest that the cationic moieties are important for BCRP inhibition. However, cell-based efflux assay revealed that Q-D4, Q-D70, and DEAE-D40 did not increase the retention of fluorescent substrates in BCRP-, MRP1- and P-gp-overexpressing KB cells. The ineffectiveness in cellular systems is presumably due to inability of the dextran derivatives to access transporters located on the cytoplasmic side of the cell membrane.

研究分野：薬物動態学

キーワード：トランスポーター デキストラン誘導体 薬物送達システム 多剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん多剤耐性(multi-drug resistance, MDR)の原因の1つとして、Breast Cancer Resistance Protein (BCRP: ABCG2)、Multidrug Resistance associated Protein 1 (MRP1: ABCC1)、P-glycoprotein (P-gp: ABCB1)などのABC transporter (ABCT)によるがん細胞からの薬剤排出の増大が挙げられる。これは、癌化学療法の失敗の主要な原因の1つとなっている。これまでにABCT阻害剤によりMDRを克服する試みがなされてきたが、ほとんど成功していない。その原因の1つは、1つの腫瘍組織が複数種のABCTを発現していることである。もう1つは、正常組織のABCTを阻害すると薬物動態が変化し、経口バイオアベイラビリティと毒性が増加することである。従って、複数種のABCTを同時に阻害するがん組織特異的ドラッグデリバリーシステム(DDS)を確立することは、がん化学療法の有効性と安全性を高めるために有効である可能性がある。

直径5-10 nm以上あるいは分子量40 kDa以上の薬剤含有ナノ粒子は、EPR (Enhanced Permeability and Retention)効果により腫瘍内に集積し、正常組織での副作用を軽減することができると考えられている。EPR効果とは、がん組織では正常組織に比較して毛細血管内皮細胞間隙が大きく、リンパ系による大分子の回収が行われないため、大分子ががん組織に正常細胞の10~100倍高濃度に長く滞留することを言う。デキストランは、D-グルコースが α -グリコシド結合により繰り返された多糖であり、生体適合性、生分解性、安全性の観点から化学療法のナノキャリアとして研究がなされてきた。例えば、40kDaのドキシソルピシン搭載デキストランナノキャリアは、リンパ腫細胞の成長を抑制し、心毒性を低減することが示されている()。さらに、3.6 kDa以下のドキシソルピシン-デキストラン結合体は、P-gpを過剰発現した多剤耐性KB-V1細胞から薬剤感受性3-1細胞よりも効率的に除去されることが示されている()。富田らは、分子量4 kDaのFITC標識デキストランの結腸粘膜における透過性が非対称的で温度依存的であり、ペラパミルおよび10 kDaデキストランにより阻害されることを明らかにした()。これらのことから、4kDa以下の薬物-デキストラン結合体はP-gpの基質であり、デキストランやデキストラン誘導体はP-gpの阻害剤として応用できる可能性があることが推察された。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、がん組織でのみMDRを克服可能ながん特異的DDS基盤を確立することである。そこで、デキストラン誘導体をBCRP、MRP1、P-gpの直接阻害効果を有するキャリアとして応用可能か検討した。まず、4級アンモニウム側鎖を有する4 kDaと70 kDaの2-hydroxypropyl-trimethylammonium-dextran (Q-D4 and Q-D70、図1)に着目した。カチオンであるアンモニウム基がポリアニオンである生体膜表面への親和性を高めると予想されたためである。4 kDaを選択したのは、先行研究で4 kDa以下のデキストラン誘導体がP-gp阻害効果を有すると報告されていたため、その再現性を確認するためであり、70 kDaを選択したのは、EPR効果を期待できる分子量範囲でもABCT阻害効果があるかを検討するためである。これらを用いた*in vitro*阻害試験に続いて、阻害の構造選択性について検討を加え、デキストランをABCT阻害剤として応用するためには、どのような修飾が有効かを検討した。最後に細胞を用いた排出アッセイを行い、デキストラン誘導体が細胞系においてBCRP、MRP1、P-gpを阻害する能力を有するか否かを検討した。

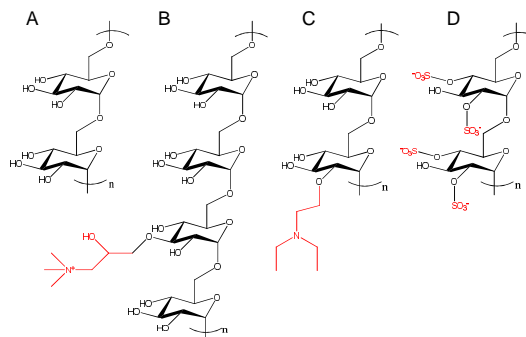


図1. デキストラン(A)、Q-デキストラン(B)、DEAE-デキストラン(C)、デキストラン硫酸(D)の化学構造

3. 研究の方法

(1) BCRP、MRP1、P-gp 高発現 Sf-9 細胞膜ベシクルを用いた阻害実験

BCRP、MRP1、P-gpを過剰発現させたSf-9膜ベシクル内への蛍光プローブの蓄積をデキストラン誘導体の存在または非存在下で測定した。BCRP、MRP1、P-gpのアッセイに使用した蛍光プローブとその最終濃度は、Lucifer Yellow (10 μ M)、BCECF (2.5 μ M)、およびN-methylquinidine (5 μ M)である。分子量40 kDa以上のデキストラン誘導体の最終濃度は最大溶解度の10分の1である0.5 mMとし、4 kDaのデキストランや溶解度の高い糖類の最終濃度は1 mMとした。50%以上の阻害が見られた場合は、0.1 mM(デキストランの臨床血漿中最大濃度付近)についても検討した。

(2) 細胞および細胞培養

BCRP (KB/BCRP)、MRP1 (KB/MRP1)、P-gp (KB/P-gp)を発現するヒト類表皮がんKB-3-1細胞お

よび、これらを発現していないKB-3-1細胞は、10%牛胎児血清、ペニシリン(100 U/mL)およびストレプトマイシン(100 µg/mL)添加ダルベッコ改変イーグル培地で37℃、5% CO2加湿インキュベーター中で培養した。細胞は播種後3ヶ月以内に実験に使用した。細胞株の表現型は、BCRP、MRP1、P-gp抗体を用いた免疫プロットにより確認した。

(3) KB/BCRP, KB/MRP1, KB/P-gp細胞を用いた蛍光基質の排出阻害実験

Choらによる報告()に基づき、若干の修正を加えて実験を行った。簡単に説明すると、KB/BCRP、KB/MRP1、KB/P-gp、またはKB-3-1細胞をコラーゲンIコート12ウェルプレートに 5×10^5 cells/wellの密度で播種し、一晚インキュベートした。排出実験の前に、細胞を10分間氷上に置き、1 mLの氷冷した緩衝液で洗浄し、0.3 mLの氷冷した蛍光プローブ溶液に置換した。BCRP、MRP1、P-gpの蛍光プローブとして、Hoechst33342 (5 µM)、BCECF-AM (1 µM)、Rhodamine123 (2 µM)を用いた。37℃で30分間、細胞にプローブを取り込ませた後、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)1 mLで洗浄し、37℃で2時間、デキストラン誘導体またはABCT特異的阻害剤(BCRPはKo143、MRP1はMK571、P-gpはベラパミル)存在または不在下でインキュベーションし、プローブの排出の程度を比較検討した。その後、1 mLのPBSで3回洗浄し、反応を停止させた。0.5% Triton X-100 0.2 mLで細胞を溶解し、細胞溶解液の蛍光とタンパク濃度を測定した。解析はリテンションファクター(RF)を求めることにより行った。

$$(RF) = (FLs/mg \text{ タンパク質}) / (FLc/mg \text{ タンパク質})$$

FLsとFLcは各々試料と対照の蛍光強度を表す。

4. 研究成果

(1) BCRP、MRP1、P-gpを過剰発現させたSf-9膜小胞への蛍光基質の取り込み輸送に対するQ-D4およびQ-D70の影響

BCRP、MRP1およびP-gpを介した蛍光基質輸送に対するデキストラン誘導体の阻害効果を、inside-out構造を取るSf-9膜小胞システムを用いて評価した。第四級アミン構造が細胞膜への親和性を向上させるのではないかと考えに基づき、まずQ-D4とQ-D70(図1)について検討を行った。BCRPを過剰発現した膜小胞はATP依存的にLucifer Yellow (10 µM)を取り込み、その取り込みはQ-D4 (1 mM, $p < 0.05$)とQ-D70 (0.5 mM, $p < 0.01$)によって著しく阻害された(図2A)。Q-D70による阻害は濃度依存的であり、 IC_{50} 値は0.1 mMと0.5 mMの間であった。同様に、ATP依存的なBCECFのMRP1発現小胞への取り込みは、Q-D4 (1 mM, $p < 0.05$)とQ-D70 (0.5 mM, $p < 0.05$)によってほぼ完全に抑制された(図2B)。BCECF対照のATPとAMPの差が小さいため、0.1 mMでの阻害実験は行わなかった。P-gpを過剰発現した膜小胞では、N-メチルキノジン(5 µM)のATP依存的な取り込みはQ-D4 (1 mM)またはQ-D70 (0.5 mM)により阻害されなかった(図2C)。

我々は当初、デキストランまたはその誘導体がP-gpの基質となると考えていた。しかし、4kDaおよび70kDaのQ-DextranはP-gpと相互作用しなかった。この理由は、使用したデキストランの側鎖の違いにあるのではないかと考えられた。FITCとドキシルピシンは比較的疎水性であるが、Q-Dextranは水溶液中で完全に解離する。D4とD10を用いたP-gp阻害実験は行わなかったが、もしデキストラン骨格自体がP-gp阻害剤であるならば、Q-DextranもP-gpを阻害するはずである。従って、FITC-dextranとdoxorubicin-dextranのP-gpとの相互作用は、それぞれFITCとdoxorubicinという置換基によるものと思われた。

Q-D4およびQ-D70がBCRPとMRP1阻害効果を有することは新たな発見であった。

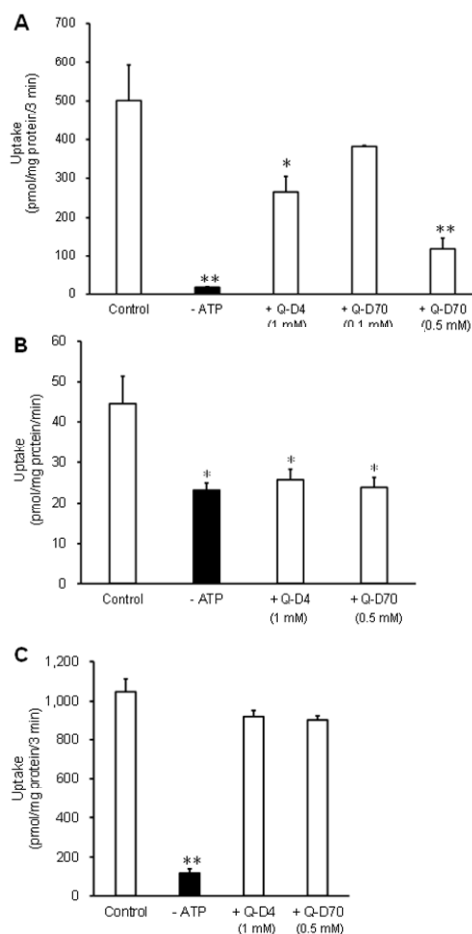


図2. BCRP (A), MRP1 (B), P-gp (C)を介した蛍光基質取り込みのQ-デキストランによる阻害作用。BCRP、MRP1、P-gpの蛍光基質としてLucifer Yellow、BCECF、N-methylquinidineを用い、Q-デキストラン存在、非存在下で膜ベシクルへの取り込み量を測定した。数値は平均±標準誤差(n=6~7)を表す。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

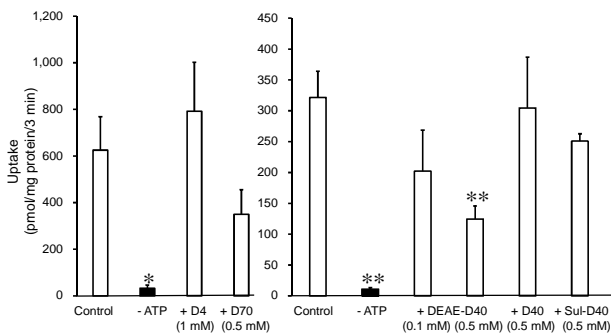


図3. BCRP 過剰発現膜小胞への Lucifer Yellow の取り込みに対するデキストランとその誘導体の効果。数値は平均 ± 標準誤差 (n = 3~12) を表す。*, p<0.05; **, p<0.01

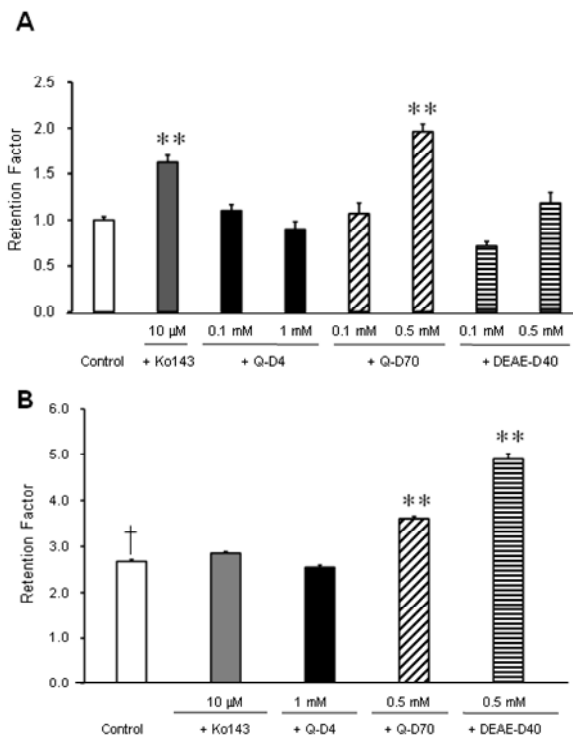


図4. KB/BCRP (A)および BCRP 非発現 KB-3-1 (B)細胞を用いた排出アッセイ。細胞は、Hoechst33342 を 37 °C で 30 分間取り込みさせた。その後、デキストラン誘導体の存在下または非存在下で、37 °C で 2 時間基質を排出させ、細胞内に残存した基質量を測定し、リテンションファクターを算出した。数値は平均 ± 標準誤差 (n = 6-18) を表す。**, p<0.01。†は、Fig.5A におけるコントロールとの統計的有意差を示す。†, p<0.01

(2) カチオン性デキストランの BCRP 阻害作用はカチオン性置換基に起因する

次に、BCRP を過剰発現させた小胞を用いて、BCRP の阻害に必要なデキストラン誘導体の部分構造を検討した。ロット差に起因すると思われるコントロール値の実験間差があったため、グラフは実験ごとに分けて表示している(図3)。検討したデキストラン誘導体、すなわち 4 kDa、40 kDa、70 kDa デキストラン (D4, D40, D70)、ジエチルアミノエチルデキストラン (DEAE-D40)、デキストラン硫酸 (SuI-D40) (図1)において、DEAE-D40 のみが濃度依存的に BCRP による Lucifer Yellow の取り込みを阻害した (0.5 mM, p<0.01; 0.1 mM, NS)(図3)。IC₅₀ 値は 0.1 mM から 0.5 mM の間であった。D70 は Lucifer Yellow の取り込みを阻害する傾向があったが、その効果は Q-D70 よりも弱かった。非修飾デキストランと同じ分子量の修飾デキストランの阻害率 (D4 vs Q-D4, D70 vs Q-D70, DEAE-D40 vs D40) の比較から、2-hydroxypropyl-trimethylammonium 基 (Q) や diethylaminoethyl 基 (DEAE) などの置換基が BCRP 阻害に寄与している可能性があることが示唆された。デキストラン骨格の糖成分であるマルトース、イソマルトース、D-グルコースはいずれも BCRP を介した輸送活性を阻害する効果はなかった。これらの結果から、デキストランの BCRP 阻害作用は、デキストランの骨格構造ではなく、3級アミンや 4級アミンなどのカチオン性置換基によるものであることが示唆された。

(3)細胞を用いた排出アッセイ

Inside-out 膜小胞システムで観察された結果は、*in vivo* の条件を反映していない可能性がある。阻害部位が細胞内である場合、デキストランは細胞膜を透過して阻害部位に到達しなければ阻害作用を発揮しない。そこで、KB/BCRP、KB/MRP1、KB/P-gp の各細胞を用いた排出アッセイを実施した。デキストランがトランスポーターを細胞内で阻害するか細胞外で阻害するかは不明であり、デキストランの細胞内濃度

は予測できないため、デキストラン誘導体の細胞外濃度をベシクルアッセイと同濃度に設定した。これにより、細胞系で阻害が見られない場合、デキストランの阻害部位は細胞内であると仮定することができる。

BCRP の膜透過性蛍光基質である Hoechst33342 の排出を、デキストラン存在下または非存在下でのリテンションファクター (RF) で評価した (図4)。BCRP 特異的阻害剤 Ko143 (10 μM) は KB/BCRP 細胞における Hoechst33342 の RF を有意に増加させ、この細胞を用いた排出アッセイの適切性を支持するものであった。評価したデキストラン (Q-D4、Q-D70、DEAE-D40) のうち、Q-D70 のみが 0.5 mM の濃度で RF を増加させた (p<0.01、図4A)。しかし、Q-D70 は BCRP を発現し

ていない KB-3-1 細胞でも Hoechst33342 の RF を有意に増加させた。KB-3-1 細胞のコントロール値は KB/BCRP 細胞のコントロール値より有意に高く、KB-3-1 細胞では BCRP による Hoechst33342 の排出がないことを反映していた ($p < 0.01$, 図 4B)。

Q-D4 と Q-D70 は KB/P-gp と KB/MRP1 細胞の RF に影響を与えなかった。

以上のことから、Q-Dextran や DEAE-D40 などのカチオン性デキストランは、臨床で使用されているデキストランの濃度に近い濃度で BCRP および MRP1 を *in vitro* で阻害するが、細胞系では顕著な阻害効果を示さないことが示唆された。デキストランはエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれることが知られているが、細胞内 ABCT 近傍濃度が十分な濃度に到達しないことが原因であろうと推測された。今後、デキストラン誘導体の細胞内への取り込みや ABCT 阻害能の向上を図り、腫瘍特異的な MDR 回復作用を有する DDS プラットフォームを確立するためのさらなる研究が必要であると考えられた。

< 引用文献 >

Fang Y, Wang H, Dou H-J, Fan X, Fei X-C, Wang L, Cheng S, Janin A, Wang L, Zhao W-L. Doxorubicin-loaded dextran-based nano-carriers for highly efficient inhibition of lymphoma cell growth and synchronous reduction of cardiac toxicity. *Int J Nanomedicine*, 13, 2018, 5673-5683

Lam W, Leung CH, Chan HL, Fong WF. Toxicity and DNA binding of dextran-doxorubicin conjugates in multidrug-resistant KB-V1 cells: optimization of dextran size. *Anticancer Drugs*, 11(5), 2000, 377-84

Tomita M, Menconi MJ, Delude RL, Fink MP. Polarized transport of hydrophilic compounds across rat colonic mucosa from serosa to mucosa is temperature dependent. *Gastroenterology*, 118(3), 2000, 535-43

Cho CW, Liu Y, Yan X, Henthorn T, Ng KY. Carrier-mediated uptake of rhodamine 123: implications on its use for MDR research. *Biochem Biophys Res Commun*, 279(1), 2000, 124-30

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaori Morimoto, Makoto Ishii, Yoshikazu Sugimoto, Takuo Ogihara, Mikio Tomita	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibitory effect of dextran derivatives on multidrug resistance-related efflux transporters in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol.Pharm.Bull.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本かおり、石井敬、杉本芳一、荻原琢男、富田幹雄
2. 発表標題 Cationic modification gives dextran a BCRP inhibitory effect
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本かおり、石井 敬、杉本 芳一、荻原 琢男、富田 幹雄
2. 発表標題 Dextranによる多剤耐性関連輸送体の阻害効果
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井敬、森本かおり、熊谷茉歩、富田幹雄
2. 発表標題 Dextranによる複数のABC transporterの同時阻害
3. 学会等名 第57回日本薬学会東北支部会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	荻原 琢男 (Ogihara Takuo) (80448886)	高崎健康福祉大学・薬学部・教授 (32305)	
研究 分担者	石井 敬 (Ishii Makoto) (00735714)	東北医科薬科大学・薬学部・助教 (31305)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------