

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560732

研究課題名（和文） 糖含有複合脂質膜を用いるがん細胞膜インターフェイスの制御とがん抑制効果

研究課題名（英文） Control of Interface in Cancer Cell Membranes and Inhibitory Effects of Three-component Hybrid Liposomes Including Sugar Surfactant

研究代表者

松本 陽子 (MATSUMOTO YOKO)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：00133562

研究成果の概要（和文）：

本研究テーマで用いた複合脂質膜（ハイブリッドリポソーム）は、ベシクル分子とミセル分子を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで得られ、さらに、素材や組成比の選択によりサイズ、相転移温度、膜流動性や疎水性などの物性のコントロールが可能な機能性新素材である。本研究では、糖含有 HL のがん治療に関する以下の興味深い知見が得られた。

(A) ラクトース骨格を有する界面活性剤 (LactC₁₀) は、 β -lactoseoctaacetate (Ac-Lact) のグリコシル化と脱アセチルによって得られた decyl- β -lactoheptaacetate (Ac-LactC₁₀)からの効率的な合成に成功した。

(B) ラクトース骨格を有する LactC₁₀ 含有三成分 HL (HL/LactC₁₀) のヒト肝臓がん細胞 (Hep-G2、Huh-7) に対する制がん効果について検討したところ、二成分 HL の IC₅₀ より小さかった。

(C) HL/LactC₁₀ の固定水層 (TFAL) は、二成分 HL の約 2 倍であり、HL/LactC₁₀ の抑制性作用が、がん細胞における水和と関連がある可能性が明らかになった。

(D) HL/LactC₁₀ が、Hep-G2 と Huh-7 細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかになった。

適切な固定水層の厚さを持つ LactC₁₀ 含有三成分 HL (HL/LactC₁₀) のヒト肝臓がん細胞に対する増殖抑制効果と水和との関係の重要性を初めて実証した。

研究成果の概要（英文）：

Hybrid liposomes (HL) can be prepared by sonication of vesicular and micellar molecules in a buffer solution. The physical properties of HL such as size, shape, membrane fluidity, and the temperature of phase separation can be controlled by changing the constituents and compositional ratio. We have employed three-component hybrid liposomes (THL) composed of *L*- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), polyoxyethylene sorbitane monolaurate (Tween 20), and decyl- β -lactopranoside (LactC₁₀) (DMPC : Tween 20 : LactC₁₀ = 65 : 7 : 28) for the research of cancers and interesting results are as follows;

(A) LactC₁₀ was successfully produced from decyl- β -lactoheptaacetate (Ac-LactC₁₀), which was obtained by glycosylation and deacetylation of β -lactoseoctaacetate (Ac-Lact).

(B) IC₅₀ values of three-component hybrid liposomes including lactose surfactants (HL/LactC₁₀) for human hepatoma (Hep-G2, Huh-7) cells were smaller than those of two-component hybrid liposomes (HL).

(C) The thickness of fixed aqueous layer (TFAL) of HL/LactC₁₀ was about twice that of HL. The result suggests that the inhibitory effects of HL/LactC₁₀ could be related to hydration in tumor cells.

(D) Induction of apoptosis by HL/LactC₁₀ for Hep-G2 and Huh-7 cells were obtained.

Thus, this study demonstrated the importance of relation between hydration and inhibition of the growth of hepatoma cells using THL having specific fixed aqueous layers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能 バイオプロセス

キーワード：リポソーム（複合脂質膜）、がん化学療法、糖、脂質、アポトーシス、細胞膜

1. 研究開始当初の背景

本研究テーマで用いる複合脂質膜（ハイブリッドリポソーム）は、ベシクル分子とミセル分子を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで得られ、さらに、素材や組成比の選択によりサイズ、相転移温度、膜流動性や疎水性などの物性のコントロールが可能な機能性新素材である。とくに、天然のリン脂質と中性ミセル界面活性剤からなる複合脂質膜は、それ自身が培養がん細胞に対して顕著な増殖抑制効果を示すことが明らかになっている。また、担がんモデル動物に対して高い治療効果を示し、正常動物に対しては無毒性であり、副作用が無いことを報告している。さらに、複合脂質膜の制がんメカニズムが、がん細胞の細胞膜に特異的に融合・蓄積し（*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3251 (2002)）、アポトーシスを誘導することを見出しており、細胞膜から核にいたるアポトーシス誘導のシグナル伝達を明らかにした（*Int. J. Cancer*, **115**, 377 (2005)）。さらに、がん細胞への動的な膜融合の過程を観察している（*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 613 (2006)）。超高感度CCDカメラを搭載した全反射顕微鏡を用いてがん細胞膜のインターフェイスにおける構造の変化とアポトーシス誘導の相関性について解析を進めた。一方、国立熊本病院の生命倫理委員会の承認を得た後、再発悪性リンパ種の患者に対して複合脂質膜を投与したパイロットスタディにおいて、約1年間の治療期間中全く副作用はなく、高い安全性および延命効果が明らかとなっている。

2. 研究の目的

リポソーム単独での制がん効果は国内外ともに今までに例がない。リポソームをドラッグキャリアーとして利用する手法は広く知られており、抗がん剤含有リポソームの *in vivo* での制がん作用を Papahadjopoulos らが1980年に報告した。その後ドキソルビシン含有リポソームが市販されるに至っているが、

抗がん剤そのものの副作用に問題が残っている。一方、複合脂質膜（ハイブリッドリポソーム）は、副作用がなく安全であり、リポソーム単独の制がん剤としての可能性が高く、医薬分子の中でも画期的である。さらに、「リポソームの制がん効果」に「細胞膜インターフェイスにおけるラフトを含む生物物理化学的概念」を取り入れた例は皆無であり、新しい創薬研究の指標となることは必至である。

生体膜の構成成分である糖は、レクチンを含むレセプターを介して細胞膜上で細胞接着、情報伝達、分子認識に重要な役割を担っている。本研究では、糖成分を含有した複合脂質膜を創製し、副作用のない新しい制がん剤の開発を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 糖含有三成分系複合脂質膜の創製

鎖長および頭部極性基の異なる種々のリン脂質（ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン）、中性ミセル界面活性剤（Tween 20 など）及び糖ミセル（B型ラクトース系界面活性剤など）を適切な割合で混合し、緩衝水溶液中で超音波照射することにより新しい糖含有HLを得た。糖ミセルについては、市販品とともに、新規に合成した種々の糖骨格を有する糖ミセルを用いた。

(2) B型ラクトース系界面活性剤の合成

B型ラクトース系界面活性剤の合成を、β-lactoseoctaacetate (Ac-Lact) を出発物質とし、グリコシル化反応と脱アセチル化反応により行った。Ac-Lact および 1-decanol を dichloromethane に溶かし、boron trifluoride diethyl etherate を加え、二時間かくはんした。グリコシル化反応により得られた decyl-β-lactoseheptaacetate (Ac-LactC₁₀) を室温、窒素雰囲気下で無水メタノールに溶かし、sodium metoxide を pH 8-9 になるまで加え、2.5 時間かくはんした。TLC により反応終了を確認し

た後、Dowex 1×2 (OH) カラムを用いて分離精製を行った。目的物を含むフラクションよりエバポレーターで移動相を除去した後、40 °Cで一日減圧乾燥し、目的物である decyl-β-lactopranoside (LactC₁₀)を得た。

(3) 糖含有 HL の調製および物性評価

リン脂質、中性ミセル界面活性剤および糖ミセルを超音波照射処理して得られた糖含有複合脂質膜について、①粒径分布測定装置を用い、動的光散乱法により膜サイズを測定した。また、レーザードップラー法により固定水層を測定した。②示差走査型熱量計を用い、熱分析法により相転移の測定を行った。③蛍光分光光度計を用い、蛍光偏光解消法により流動性の測定を行った。

(4) がん細胞及び正常細胞に対する *in vitro* 増殖抑制試験

培養がん細胞として肝臓がん細胞 (Hep-G2, Huh-7)を用い、糖含有 HL および HL の *in vitro* での増殖抑制試験を行った。酵素活性測定法である WST-1 assay により制がん効果を評価した。さらに、正常細胞 (ヒト肝細胞: HC) に対する毒性試験を実施した。

(4) アポトーシス誘導と細胞膜の構造解析

がん細胞増殖抑制効果が観察された糖含有 HL および HL について、①がん細胞より DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動により DNA の断片化を観察してアポトーシス誘導の有無を調べた。②フローサイトメーターを用い、がん細胞の DNA をヨウ化プロピジウムで染色してアポトーシス誘導率を求めた。③高感度 CCD カメラを搭載した全反射蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用い、がん細胞への糖含有 HL の融合過程を観察した。

(5) 糖含有 HL によるアポトーシスシグナル伝達の解析

糖含有 HL および HL によるアポトーシス誘導のシグナル伝達を検討した。①AFC (7-アミノ-4-トリフルオロクマリン) 修飾蛍光基質として、Ac (アセチル) -DEVD (アスパラギン酸-グルタミン酸-バリン-アスパラギン酸) -AFC、Ac-IETD (イソロイシン-グルタミン酸-スレオニン-アスパラギン酸) -AFC、Ac-LEHD (ロイシン-グルタミン酸-ヒスチジン-アスパラギン酸) -AFC を用い、カスパーズ 3、8 および 9 の活性を蛍光分光光度計で測定した。②ミトコンドリア経路については、Bid (BH3-interacting domain death agonist) の活性化、さらに、膜電位低下をフローサイトメーターにより、シトクロム C の放出をウエスタンブロッティング法により明らかにした。③最下流のカスパーズ 3 経由後の PARP (ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ) 分解についてウエスタンブロッティング法で測定した。④糖含有 HL が腫瘍細胞に融合・蓄

積後アポトーシスシグナルを伝達する際の膜タンパクの関与について、免疫沈降法およびウエスタンブロッティング法で検討した。さらに、Fas および FADD に引き続きカスパーズ 8 の応答を同様にウエスタンブロッティング法で経時的に測定した。

4. 研究成果

ラクトース骨格を有する界面活性剤 (LactC₁₀, 図 1) を合成し、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) およびポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20) を構成成分とするハイブリッドリポソーム (HL) に LactC₁₀ を組込み、糖含有 HL を創製した。

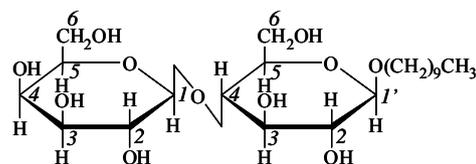
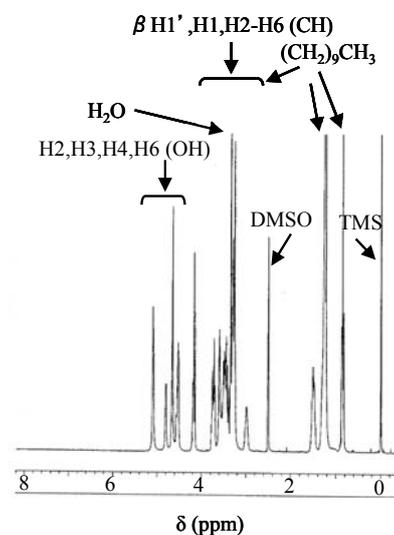


図 1 LactC₁₀ の構造と ¹H NMR スペクトル.

糖含有 HL の物性およびヒト肝臓がん細胞 (Hep-G2, Huh-7) に対する制がん効果について検討したところ、次のような興味ある知見が得られた。

(1) NMR (図 1)、IR 測定、元素分析などから、LactC₁₀ が高純度で合成できた。

(2) Hep-G2 および Huh-7 に対する IC₅₀ 値は HL に比べて小さく (図 2)、糖含有 HL による増殖抑制効果の向上が明らかになった。

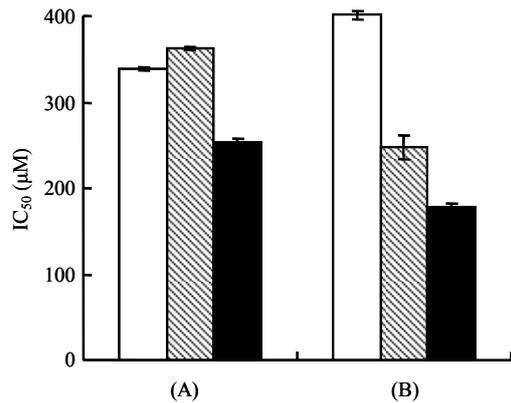


図 2 □, DMPC liposomes; ▨, HL; ■, HL/LactC₁₀ の IC₅₀.
(A)Hep-G2 および (B)Huh-7 細胞.

(3) 糖含有 HL は Hep-G2 および Huh-7 に対してアポトーシスを誘導し (図 3)、正常肝細胞に毒性がないことを確認した。糖含有 HL は、がん細胞のみに制がん効果を示し、アポトーシスを誘導することから、副作用のない新しい制がん剤としての臨床応用が期待できる。(高分子論文集, 65, 90 (2008))

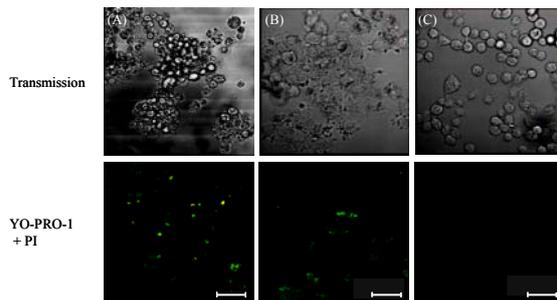


図 3 HL/LactC₁₀ で処理した (A)Hep-G2, (B)Huh-7, および (C)Hc のアポトーシス誘導観察.

ラクトース骨格を有する界面活性剤 (LactC₁₀) からなる糖含有 HL の固定水層は、HL の 2 倍に増大することが確認できた (図 4)。この固定水層はヒト肝臓がん細胞 (Hep-G2、Huh-7) に対する制がん効果との相関性が認められた。糖含有 HL の増殖抑制効果に糖の水和が関与している可能性を初めて明らかにした。したがって、物理化学的特徴 (固定水層の厚さ physicochemical characteristics) と生物学的特性 (がん細胞増殖抑制効果 biological specifics) との関係の重要性を初めて実証した。(Chem. Lett., 37, 118 (2008))

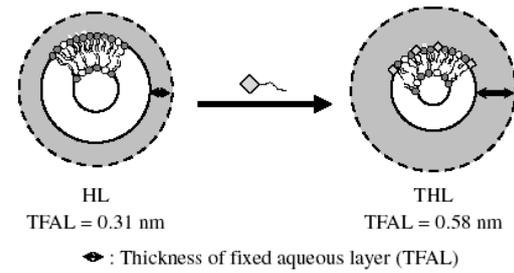


図 4 HL と HL/LactC₁₀ の固定水相の略図。

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 33 件)

- 1) Y. Komizu, S. Nakata, K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Membrane-Targeted Nanotherapy with Hybrid Liposomes for Tumor Cells Leading to Apoptosis, *ACS Med. Chem. Lett.*, (査読有) **2**, 275-279 (2011).
- 2) M. Umebayashi, T. Makizono, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Inhibitory Effects of Cationic Hybrid Liposomes on the Growth of Human Renal Cell Carcinoma, *Anticancer Res.*, (査読有) **30**, 327-338 (2010).
- 3) S. Shimoda, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Chemotherapy with Hybrid Liposomes for Human Breast Tumors along with Apoptosis *in Vivo*, *Int. J. Pharm.*, (査読有) **372**, 162-168 (2009).
- 4) 田中芳浩, 後藤浩一, 松本陽子, 上岡龍一, 糖含有三成分系ハイブリッドリポソームの物性と制がん効果に関する基礎研究, 高分子論文集, (査読有) **65**, 90-97 (2008).
- 5) Y. Matsumoto, Y. Tanaka, K. Goto, R. Ueoka, Specific Fixed Aqueous Layer of Three-component Hybrid Liposomes Related to Inhibition of Hepatoma Cells Growth, *Chem. Lett.*, (査読有) **37**, 118-119 (2008).

[学会発表] (計 41 件)

- 1) 【Invited Speaker】 Y. Matsumoto, 「Chemotherapy with Cationic Hybrid Liposomes Leading to Apoptosis Toward Renal Cell Carcinoma」 2011 年 2 月 28 日, Third Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: - Experiments and Simulations (韓国, 済州島).
- 2) 【Invited Speaker】 K. Goto, Y. Komizu, H. Ichihara, R. Ueoka, 「Specific Inhibitory Effects of Hybrid Liposomes on the Growth of HIV-latently Infected Cells and Primary

Effusion Lymphoma *in Vitro* and *in Vivo*」
2010年8月2日, BIT's 1st World Congress
of Virus and Infections-2010 (WCVI-2010)
(韓国, 釜山).

- 3) 【Invited Speaker】Y. Matsumoto,
「Chemotherapy with Cationic Hybrid
Liposomes Leading to Apoptosis toward
Renal Cell Carcinoma」2010年11月29日,
4th International Symposium on
Nanomedicine (ISNM2010) (愛知県)
- 4) Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka,
「Membrane Targeted Nanotherapy with
Hybrid Liposomes」2009年6月23日, The
10th Tetrahedron Symposium (フランス,
パリ)
- 5) 【Invited Speaker】Y. Matsumoto, R. Ueoka,
「Nanotherapy with Hybrid Liposomes for
Tumor in Relation to Fluctuation of
Membranes」2009年3月16日, The 2nd
Open Symposium “Molecular Science of
Fluctuations toward Biological Functions”
(愛知県).

〔図書〕(計1件)

- 1) 上岡龍一, 松本陽子, ハイブリッドリポ
ソーム, ナノメディスン ナノテクの医
療応用, (株)オーム社) pp.119-130
(2008).

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称：癌細胞増殖抑制性ハイブリッド型リポ
ソーム製剤

発明者：上岡龍一, 松本陽子

権利者：上岡龍一, 学校法人君が淵学園

種類：特許

番号：特許第4560150号

取得年月日：平成22年7月30日登録

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.life.sojo-u.ac.jp/biomed/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 陽子 (MATSUMOTO YOKO)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：00133562

(2)研究分担者

後藤 浩一 (GOTO KOICHI)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：30279377

市原 英明 (ICHIHARA HIDEAKI)

崇城大学・生物生命学部・助教