

平成 22 年 4 月 16 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890166  
 研究課題名(和文) ジメチル- $\alpha$ -シクロデキストリンを用いた腫瘍細胞選択的新規  
 抗癌剤の構築  
 研究課題名(英文) Design and Evaluation of Novel Tumor Cell-selective Anti-cancer Drugs  
 Using Dimethyl- $\alpha$ -cyclodextrin

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・講師  
 研究者番号：50515608

研究成果の概要(和文): メチル化シクロデキストリン (M-CyD) を用いて腫瘍細胞選択的新規抗癌剤を構築するため、腫瘍細胞に高発現する葉酸レセプター (FR) に特異的に結合する葉酸 (FA) を修飾した葉酸修飾 M-CyD 結合体を調製した。葉酸修飾 M-CyD 結合体は、FR 発現細胞選択的に取り込まれ、強い細胞障害性を示した。これらの知見は、FA や M-CyD を用いた腫瘍細胞選択的新規抗がん剤の構築に際し、有用な基礎資料となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文): In the present study, we prepared folate (FA)-appended methylated cyclodextrin (M-CyD) to evaluate that of cancer cell-selective cytotoxicity, because FA specifically binds to folate receptor (FR), which expresses in many cancer cells. FA-appended M-CyD entered into folate receptor (FR) over-expressing cancer cells and showed significant cytotoxicity. These results suggest may provide useful information when we prepare the novel anti-tumor agents using FA and M-CyD.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	720,000	216,000	936,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,320,000	396,000	1,716,000

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：癌、薬学、シクロデキストリン、DDS

## 1. 研究開始当初の背景

がんは、わが国における死因第 1 位の疾患であり、2008 年の死亡者数は、約 34 万人以上である。一部のがんでは生存率は改善しているものの、進行がんでは未だ十分な治

療法がなく、より有効な治療法の開発が望まれており、特に抗がん剤を標的部位に選択的かつ効率よくデリバリーさせる薬物送達システム (Drug delivery system : DDS) の構築が期待されている。

DDS とは、薬物の体内動態を制御し薬物

治療の最適化を目指すものであり、薬物放出挙動の制御、薬物の吸収促進、薬物の標的組織へのターゲティングなどに分類される。キャリアにターゲティング能を付与させる方法として、抗体、糖鎖、葉酸、トランスフェリンなどのリガンド修飾が知られている。中でも葉酸は 1) 安価である、2) 葉酸レセプター (Folate receptor : FR) は、各種上皮がん細胞で過剰発現し、正常細胞では発現が低いいため、FR 介在性エンドサイトーシスによりがん細胞選択的に取り込まれる、3) 抗原性がないため反復投与が可能である、4) 分子量が比較的小さいことから、キャリアの細胞内動態に影響を与えにくい、などの利点からリガンド分子として汎用されている。

シクロデキストリン (CyD) はデンプンに CyD 生成酵素を作用させて得られる環状のオリゴ糖であり、種々の薬物をその疎水空洞内に取り込み包接複合体を形成する単分子的ホスト分子に分類される。CyDs の超分子的な包接特性は、食品、化粧品、臨床検査薬、膜学、高分子化学など多方面で利用されており、薬剤学・製剤学領域では、CyDs の機能性や生体適合性を利用して、複合体形成による医薬品の安定化、溶解性の調節、バイオアベイラビリティの向上などへの応用が試みられ、国内外で実際製剤に使用されている。近年、機能性や生体適合性を高めた種々の CyDs 誘導体が開発され、DDS の応用に関する基礎的研究が行われている。

一方、細胞膜上には、リピッドラフトと呼ばれるコレステロールやスフィンゴ脂質が局在する脂質マイクロドメインの存在が知られ、レセプターなどシグナル伝達に關与する種々のタンパク質が局在していることから、シグナル伝達において重要な足場として機能している。近年、FasL/Fas 系アポトーシスがリピッドラフトを介すること、Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス誘導因子 Bad がラフトに局在することなどから、アポトーシスシグナルに關与することが報告されている。一方、CyD は高濃度条件下、空洞サイズに応じて、赤血球膜などの生体膜から主な構成成分であるリン脂質やコレステロールなどの脂質類を熱力学的平衡に基づいて可溶化し、溶血、赤血球の形態学的変化、細胞障害性を惹起することが知られている。実際、当研究室はウサギ赤血球において、2,6-Di-*O*-methyl- $\alpha$ -CyD (DM- $\alpha$ -CyD) が、SLR に作用し、内方陥没型の形態変化を惹起し、一方、Methyl- $\beta$ -CyD (M- $\beta$ -CyD) および 2,6-Di-*O*-methyl- $\beta$ -CyD (DM- $\beta$ -CyD) は CLR に作用し、外方突起型の形態変化を誘起することを明らかにした。一方、Grosse らは、担がんマウスにおいて M- $\beta$ -CyD を腹腔内に単独投与すると DOX 単独投与系より高い抗腫瘍効果を示すことを報告した。さら

に服部らは、天然  $\beta$ -CyD の 1 級水酸基にカブロン酸 2 分子をスペーサーとして葉酸を結合させた葉酸修飾  $\beta$ -CyD を調製し、FR 介在性がん細胞選択的 DDS キャリアとしての有用性を報告した。これらのことから、メチル化 CyD に葉酸を修飾することにより、FR を介したがん細胞選択性に加えて、メチル化 CyD 自身によるリピッドラフトを介した細胞障害活性を有する新規抗がん剤や DDS キャリアの構築が可能と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍細胞において発現が上昇するリピッドラフトに特異的に作用することが示唆されているメチル化 CyD (DM- $\alpha$ -CyD、M- $\beta$ -CyD、DM- $\beta$ -CyD) を用いて腫瘍細胞選択的新規抗癌剤を構築することである。本申請課題では、メチル化 CyD に葉酸を修飾することで、FR 認識による腫瘍細胞選択性の向上、ならびにリピッドラフトとの相互作用による抗腫瘍効果の増大に関する検討を行った。

## 3. 研究の方法

葉酸修飾メチル化 CyD (FA-M-CyD) の調製法を検討し、Fast Atom Bombardment (FAB) MS スペクトル、 $^1\text{H-NMR}$ 、粉末 X 線回折および示差熱分析により調製の確認を行った。また、FA-M-CyD の葉酸置換度を  $^1\text{H-NMR}$  を用いて算出した。次に、FR 高発現細胞 (FR (+)) であるヒト口腔がん細胞由来 KB 細胞および FR 低発現細胞 (FR (-)) であるヒト肺がん細胞由来 A549 細胞を用いて、抗がん剤ドキシソルピシン (DOX) 存在または非存在下における FA-M-CyD の細胞障害活性を WST-1 法にて検討した。さらに、FA-M-CyD のコレステロール漏出作用、細胞障害活性に及ぼす FR 競合阻害剤添加の影響、ならびに KB 細胞 (FR (+)) および A549 細胞 (FR (-)) への細胞内取り込みを蛍光分光光度計にて検討した。

## 4. 研究成果

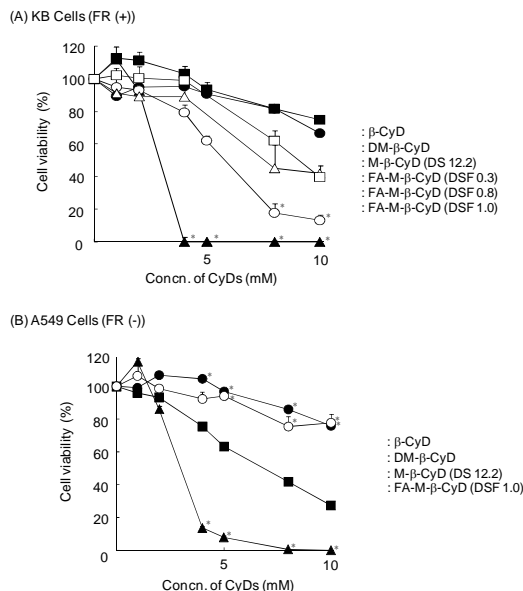
### (1). 葉酸修飾メチル化 CyD の調製

まず、メチル化 CyD (DM- $\alpha$ -CyD、M- $\beta$ -CyD、DM- $\beta$ -CyD) に FA を修飾することにより腫瘍細胞選択性を付与した FA-M-CyD の調製を試みた。FA-M-CyD は M-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 FA を結合させることにより調製した。得られた FA-M-CyD の構造を  $^1\text{H-NMR}$  により確認したところ、

DM- $\alpha$ -CyD および DM- $\beta$ -CyD 系では、FA の導入が確認されなかった。これは、DM- $\alpha$ -CyD および DM- $\beta$ -CyD 分子中のメチル基数が多すぎたために、立体障害により反応が十分に進行しなかったためと考えられる。一方、M- $\beta$ -CyD 系では FA の導入が確認され、FAB-MS による検討から、FA 置換度 (DSF) は、1.0 であった。さらに、粉末 X 線回折および示差熱分析による検討から、FA-M- $\beta$ -CyD は非晶質であり、未反応の FA の存在も少ないことが示唆された。これらの結果より、新規葉酸修飾 M- $\beta$ -CyD (FA-M- $\beta$ -CyD) が確認された。

## (2). FA-M- $\beta$ -CyD の細胞障害活性

膜損傷を受けた細胞のダメージを評価する方法として、細胞外の色素を細胞内に摂取させて酵素により発色させる方法 (MTT assay や WST-1) がよく知られている。本節では、FA-M- $\beta$ -CyD が FR 選択的な細胞障害活性を有するか否かを検討するために、FR 高発現細胞である KB 細胞 (FR (+)) および FR 低発現細胞である A549 細胞 (FR (-)) を用いて FA-M- $\beta$ -CyD の細胞障害性を WST-1 法により評価した。Fig. 1 は、各種  $\beta$ -CyDs (0-10 mM) を 2 時間適用後の細胞障害性を示す。 $\beta$ -CyD は、KB 細胞および A549 細胞において 10 mM まで細胞障害活性を示さなかったが、DM- $\beta$ -CyD は 5 mM 以上で強い細胞障害活性を示した。また、

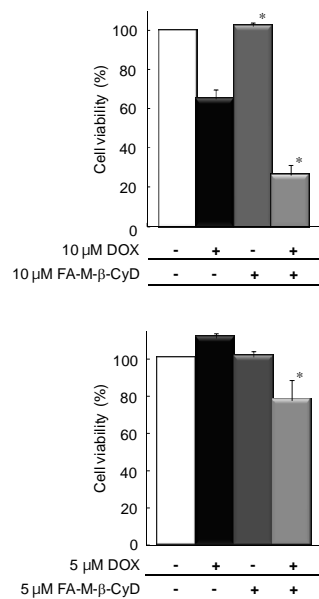


**Fig. 1. Cytotoxic Activity of  $\beta$ -CyDs for KB Cells (A) and A549 Cells (B) after Treatment for 2 h**

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 3 experiments. \* $p$  < 0.05, compared with M- $\beta$ -CyD.

M- $\beta$ -CyD は KB 細胞において 10 mM まで細胞障害活性を示さなかったのに対し、A549 細胞では濃度依存的に細胞障害活性を示した。一方、FA-M- $\beta$ -CyD は KB 細胞において濃度依存的かつ、M- $\beta$ -CyD と比較して有意に高い細胞障害活性を示したが、A549 細胞においては 10 mM まで細胞障害活性を示さなかった。これらの結果から、FA-M- $\beta$ -CyD は、FR 発現細胞選択的な細胞障害活性を有する可能性が示唆された。

次に、FA-M- $\beta$ -CyD の DDS キャリアとしての可能性を検討するため、抗癌剤ドキソルピシン (DOX)/FA-M- $\beta$ -CyD 混合溶液系における細胞障害活性を評価した。Fig. 2 は、DOX/FA-M- $\beta$ -CyD 混合溶液を 24 時間適用後の細胞障害性を示す。5  $\mu$ M DOX および 5  $\mu$ M FA-M- $\beta$ -CyD はともに単独では細胞障害活性を示さなかったが、DOX/FA-M- $\beta$ -CyD 混合溶液系では、DOX 単独と比較して有意に高い細胞障害活性を示し、その効果は 10  $\mu$ M DOX/FA-M- $\beta$ -CyD でさらに増強された。これらの結果より、FA-M- $\beta$ -CyD は新規抗がん剤としてだけでなく DOX 用 DDS キャリアとしての可能性も示唆された。



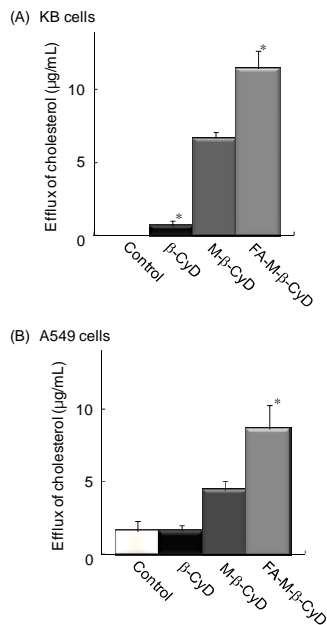
**Fig. 2. Cytotoxic Activity of DOX/FA-M- $\beta$ -CyD for KB Cells after Treatment for 24 h**

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 3-6 experiments. \* $p$  < 0.05, compared with DOX.

## (3). コレステロール漏出に及ぼす FA-M- $\beta$ -CyD の影響

FA-M- $\beta$ -CyD の高い細胞障害活性には、ラフト画分に存在するコレステロールなどのリビッドラフト局在性脂質の関与が推察される。そこで本節では、FA-M- $\beta$ -CyD とリビ

ッドラフトとの相互作用を調べるため、KB 細胞 (FR (+)) および A549 細胞 (FR (-)) からのコレステロール漏出に及ぼす FA-M- $\beta$ -CyD の影響について検討した。KB 細胞 (FR (+)) および A549 細胞 (FR (-)) を各種  $\beta$ -CyDs 含有無血清培地で 1 時間処理し、上清中のコレステロールをコレステロール E テストワコー® を用いて測定した。Fig. 3 は、KB (FR (+)) 細胞および A549 (FR (-)) 細胞からのコレステロール漏出量を示す。FA-M- $\beta$ -CyD (DSF 1.0) のコレステロール漏出量を M- $\beta$ -CyD と比較検討したところ、KB 細胞および A549 細胞ともに高いコレステロール漏出を示した。このことから、FA-M- $\beta$ -CyD は CLR と強く相互作用することが示唆された。

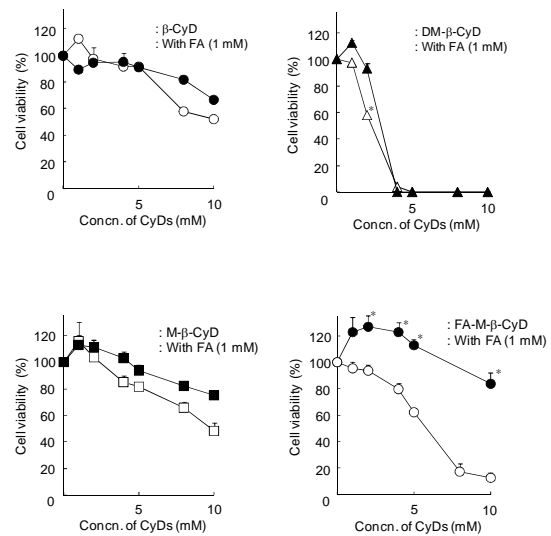


**Fig. 3. Effects of  $\beta$ -CyDs on Efflux of Cholesterol from KB Cells (A) and A549 Cells (B)**  
Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 4 - 7 experiments. \* $p$  < 0.05, compared with M- $\beta$ -CyD.

#### (4). 葉酸レセプター競合阻害剤の影響

前項では、FA-M- $\beta$ -CyD は FR 発現細胞選択的に高い細胞障害活性を有することが示唆された。そこで本項では、FA-M- $\beta$ -CyD の細胞障害性が FR を介したものであるか否かを確認するために、FR 競合阻害剤添加の影響を検討した。Fig. 4 は FR 競合阻害剤 FA 1 mM 存在下、各種  $\beta$ -CyDs (0-10 mM) を 2 時間適用後の細胞障害性を示す。 $\beta$ -CyD、DM- $\beta$ -CyD および M- $\beta$ -CyD の細胞障害活性は、FA 添加の影響を受けなかった。一方、FA-M- $\beta$ -CyD は、FA 非添加系と比較して細胞障害活性が有意に低下した。こ

れらの結果から、FA-M- $\beta$ -CyD はリッドラフトとの相互作用に加え、KB 細胞膜上に存在する FR を介して細胞障害活性を示すことが示唆された。

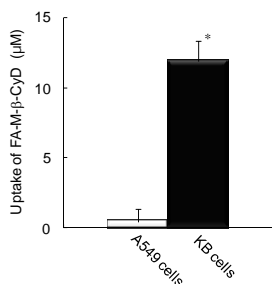


**Fig. 4. Effect of FA on Cytotoxic Activity of  $\beta$ -CyDs for KB Cells after Treatment for 2 h**

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 3 experiments. \* $p$  < 0.05, compared with  $\beta$ -CyDs with 1 mM FA.

#### (5). 葉酸レセプター発現細胞および葉酸レセプター非発現細胞に対する FA-M- $\beta$ -CyD の細胞内取り込み

前項において FA-M- $\beta$ -CyD の細胞障害活性は、FR を介することが示唆された。そこで本節では、蛍光分光光度計により FA-M- $\beta$ -CyD の KB 細胞 (FR (+)) および A549 細胞 (FR (-)) への取り込みを評価した。まず、KB 細胞 (FR (+)) および A549 細胞 (FR (-)) を 1 mM FA-M- $\beta$ -CyD 含有無血清培地で 1 時間処理し、上清を除去した。その後、1 N NaOH 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より評価した。Fig. 5 は、FA-M- $\beta$ -CyD の KB 細胞 (FR (+)) および A549 細胞 (FR (-)) へ取り込み量を示す。FA-M- $\beta$ -CyD の細胞内取り込み量は、A549 細胞 (FR (-)) と比較して KB 細胞 (FR (+)) で有意に高かった。一般に、CyDs は高水溶性かつ分子量が約 1000 以上と大きいため細胞膜透過性が低く、細胞内に取り込まれにくいことから、FA-M- $\beta$ -CyD は細胞表面上の FR を介して取り込まれたものと推察された。今後、FA-M- $\beta$ -CyD の細胞内取り込みに関して FR 競合阻害実験を行う予定である。



**Fig. 5. Cellular Uptake of FA-M-β-CyD into KB Cells and A549 Cells**

Each value represents the mean±S.E. of 3-4 experiments. \* $p < 0.05$ , compared with A549 cells.

以上述べたように、FA-M-β-CyD は、FR を介して FR 高発現細胞選択的な細胞障害活性を有することが示唆された。また、FA-M-β-CyD の細胞障害活性は、リピッドラフトからのコレステロール漏出作用および FR 介在性の細胞内取り込みに起因するものと推定された。さらに FA-M-β-CyD は、新規抗がん剤としてだけでなく DOX などの抗がん剤に対する DDS キャリアとして応用できる可能性が示唆された。これらの知見は、FA や M-β-CyD を用いた腫瘍細胞選択的新規抗がん剤の構築に際し、有用な基礎資料となるものと考えられる。

## 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 1 件 )

Motoyama K, Kameyama K, Onodera R, Araki N, Hirayama F, Uekama K, Arima H.,  
Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-*O*-methyl-β-cyclodextrin, not 2,6-di-*O*-methyl-α-cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 査読有, 38, 2009, 249-261.

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

小野寺理沙子、本山敬一、有馬英俊  
新規葉酸修飾メチル化シクロデキストリンの調製と物性評価、第 130 年会日本薬学会、2010 年 3 月 28 日、岡山コンベンションセンター ( 岡山県 )

小野寺理沙子、本山敬一、有馬英俊  
葉酸修飾メチル化シクロデキストリンの調製と物性評価、第 26 回日本薬学会九州支部大会、2009 年 12 月 13 日、九州大学 ( 福岡県 )

## 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・講師

研究者番号 : 50515608