

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590070

研究課題名(和文) 抗癌剤耐性化機構を標的とした高分子キャリアDDSに関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research of macromolecular DDS carriers aiming for resistance mechanism of anticancer drug

研究代表者

加藤 くみ子 (Sakai-Kato, Kumiko)

国立医薬品食品衛生研究所・薬品部・室長

研究者番号：10398901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：リポソーム製剤のキャリア成分の細胞内動態、細胞外排出に焦点を当て、抗癌剤耐性化の主要因であるP糖タンパク質(P-gp)からのドキソルビシン排出阻害特性を評価した。ドキソルビシン内包リポソームの*in vitro*細胞毒性におけるPEG修飾リン脂質の関与が示唆されたとともに、*in vitro*細胞毒性がリポソーム構成脂質のPEG修飾の有無や電荷等に大きく影響を受けることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the intracellular trafficking including efflux of liposome components. We further evaluated the ability of liposome components to inhibit the efflux of doxorubicin from P-gp whose over-expression in tumor cells can cause the resistance to anticancer drugs. It was indicated that the PEGylated lipid was involved in the *in-vitro* cytotoxicity of the doxorubicin-loaded liposomes. It was also found that PEGylation or charge of the liposome components largely affected the *in-vitro* cytotoxicity of the doxorubicin-loaded liposomes.

研究分野：医薬品評価科学

キーワード：ナノ医薬品 高分子キャリア 抗癌剤 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

近年、製剤に機能を持たせ、生体内安定性、放出性、標的指向性、体内動態等を調節することにより、有効性、安全性を高める製剤技術の重要性が増している。中でも、ナノテクノロジーによりナノメートルサイズの構成要素を有する医薬品「ナノメディシン」開発が世界的規模で加速されている。ナノメディシンの設計に当たっては、単に固形癌に集積し細胞外で抗癌剤を放出させるだけでなく、細胞内に取り込まれ、細胞内で抗癌剤を放出することにより抗癌作用を増強させ、より有効性、安全性の高い製剤設計を可能とする。

我々は、子宮頸癌由来 HeLa 細胞を用い polyethylene glycol(PEG)とポリアスパラギン酸からなるブロック共重合体の細胞内動態を詳細に解析した。その結果、ブロック共重合体の細胞外排出に P-糖タンパク質(P-gp)が関与していることを明らかにした[Sakai-Kato, et al. Int J Pharm. 2012, 423, 401-409]。

P-gp は、その基質となる抗癌剤の低濃度暴露により癌細胞膜上に発現誘導され、また極めて広範な基質認識特性を有する為、多種多様な抗癌剤に対する耐性化に関与することが知られている。抗癌剤の長期的使用による癌細胞の耐性化は、副作用回避の観点から低投与量の抗癌剤の継続的投与が通例となっている現在の癌化学療法においては、非常に重大な問題であり、臨床においても様々な対策が講じられている。DDS 技術の利用により P-gp 発現に基づく抗癌剤耐性化腫瘍に対して薬理活性が得られることが見出されているが、本研究開始当初においては、その詳細な機構解明には至っていない。[Ogawara et. al., J Control Release, 2009, 133, 4-10、Chao-Feng et. al., Biomaterials, 2010, 31, 2371-2379; Peng et. al., Biomaterials, 2011, 32, 5524-5533; Qianjun et. al., Biomaterials, 2011, 32, 7711-7720]。

2. 研究の目的

本研究課題では、リポソーム製剤など高分子キャリア成分の細胞内動態、細胞外排出に焦点を当て、DDS キャリアとして医療応用が注目されている高分子キャリアの、抗癌剤耐性化の主要因である P-gp に対する阻害特性の評価を行い、より阻害活性の高いキャリア設計のための基盤的研究を行う。また、キャリアによる細胞内への抗癌剤の導入効率も評価したうえで、得られた知見から、よりヒト癌細胞株に対する *in vitro* 細胞毒性の高い高分子キャリアを評価する。

3. 研究の方法

リポソームの作製

リポソームは脂質薄膜法により作製した [Bangham et al., J. Mol. Biol. 1965, 13, 238-252.]。ドキシソルピシン内包リポソームはリモートローディング法により作製した [Fritze et al., Biochim. Biophys. Acta. 2006, 1758, 1633-1640.]。

P-gp 高発現抗癌剤耐性癌細胞の構築

P-gp 阻害特性評価のためにドキシソルピシン耐性化癌細胞の構築には子宮頸癌由来 HeLa 細胞を選択し、培養液中に添加するドキシソルピシン量を段階的に増加することで P-gp 発現を誘導し、ドキシソルピシン耐性を有する癌細胞株を作製した。

ドキシソルピシンの P-gp 透過に関する *in vitro* システム

P-gp 発現ベシクル (PREDIVES Vesicular Transport Kit, SOLVO Biotechnology) を使用した。各ウェルにドキシソルピシン及びリポソーム構成脂質を加え、一定時間インキュベーション後にドキシソルピシン由来の蛍光を測定した。

高分子キャリアの細胞内動態

細胞内小器官染色像及び蛍光標識したキャリア各構成成分との共局在を共焦点レーザー顕微鏡観察することで、細胞膜上の P-gp に至る細胞内動態挙動を解析した。リポソームの細胞内取り込み量は、蛍光分光光度計を用い、細胞内に取り込まれた脂質の蛍光量を測定した。

細胞毒性評価

脂質組成の異なるドキシソルピシン内包リポソームを作製し、HeLa 細胞に対する細胞毒性を WST-8 assay (Cell Counting Kit-8 Solution, Dojindo)により評価した。

4. 研究成果

(1)ドキシソルピシンの P-gp 膜透過に及ぼす各種リポソーム構成脂質の影響

細胞内取込後の各種高分子キャリアによる P-gp に対する影響を評価することを目指した。各種リポソーム構成脂質が、P-gp 基質として知られているドキシソルピシンの膜透過に及ぼす影響を評価した結果、リポソームの主構成成分として汎用されるリン脂質やコレステロールと比較して、ポリエチレングリコール(PEG)修飾を施したリン脂質が極め

て高いドキシソルピシン膜透過の抑制作用を示すことが明らかとなった(図1)。

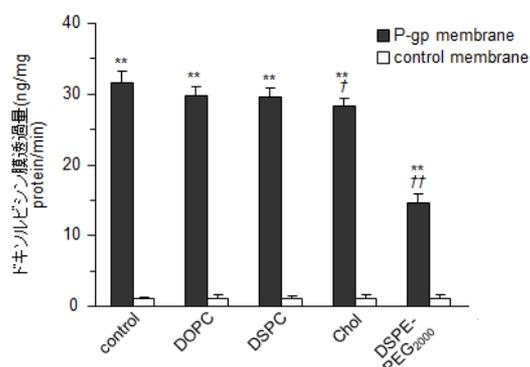


図1 リポソーム構成成分がドキシソルピシンの P-gp 介在性膜透過に及ぼす影響

control: 脂質未添加群、DOPC: 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine, DSPC:

1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine,

Chol: cholesterol, DSPE-PEG₂₀₀₀:

1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000],

** $P < 0.01$, compared with the corresponding group of control membrane.

†† $P < 0.01$, compared with the corresponding group of control.

次に、培養液中ドキシソルピシン濃度を段階的に増加することで P-gp を発現誘導したドキシソルピシン耐性ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞株 (HeLa/DXR) を樹立し、HeLa/DXR のドキシソルピシンに対する IC₅₀ 値が感受性株と比較して約 50 倍程度増大することを確認した。一般的に、PEG 修飾リポソームは細胞内取込効率が低く、内封薬物であるドキシソルピシンによる *in vitro* 細胞毒性効果が未修飾リポソームと比較して低いことが知られている。一方で、同濃度のリポソーム製剤が細胞内に取り込まれる条件下においては、PEG 修飾リン脂質をリポソーム構成脂質としてドキシソルピシンを内包させた場合は、PEG 修飾リン脂質を含まないリポソームより、ドキシソルピシンによる細胞毒性効果が増強された。本増強効果は、感受性株より HeLa/DXR の方が大きかった。本結果は、PEG 修飾リン脂質によるドキシソルピシンの細胞外排出抑制作用によるものと示唆される。

(2) リポソーム構成脂質の細胞内動態

リポソーム構成脂質として汎用されるリン脂質及びコレステロール、またポリエチレングリコール(PEG)修飾リン脂質やカチオン

性リン脂質等の細胞内動態評価を行い、各種リポソーム構成成分の細胞内動態特性を明らかにした。いずれのリポソーム構成脂質もリポソームとしてエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた。その後、リン脂質及びカチオン性リン脂質は小胞体-ゴルジ体輸送を受け、ゴルジ体との共局在が認められた一方で、PEG 修飾リン脂質ではゴルジ体との共局在が認められないことが示された(図2)。また、カチオン性リン脂質はミトコンドリアへの輸送特性を有する可能性が示唆された。さらに、リン脂質及びカチオン性リン脂質は主として ABCG1 を介して細胞外排出される一方、PEG 修飾リン脂質は ABCB1 を介して細胞外排出されることが示唆された。

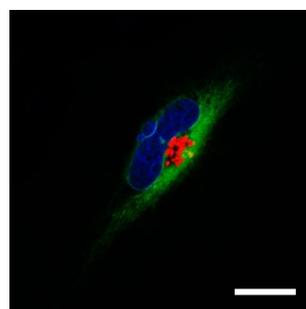


図2 蛍光標識 PEG リン脂質を含むリポソームの共焦点顕微鏡写真

赤: ゴルジ体を Bodipy-TR C₅-ceramide で標識、緑: DSPE-PEG₂₀₀₀-CF、青: 核を Hoechst 33342 で染色、Scale bar: 20 μ m

(3) リポソーム製剤の脂質組成と細胞毒性・薬物放出性との関連性

リポソーム製剤の脂質組成と細胞毒性・薬物放出性との関連性を明らかにした。PEG 修飾リポソームについて、リン脂質組成や PEG 鎖長の異なるリポソームにドキシソルピシンを内包させ、細胞毒性について調べたところ、カチオン性リン脂質である、DOTAP を有するリポソームで細胞毒性が高かった(図3)。この傾向は、細胞内へのドキシソルピシン取り込み量と関連していた。一方、PEG 鎖長の違い(平均分子量 2000 及び 5000)は、細胞内へのドキシソルピシン取り込み量やリポソームからのドキシソルピシンの放出量に影響を与えなかった。

以上、本研究によりドキシソルピシン内包リポソームの *in vitro* 細胞毒性における PEG 修飾リン脂質の関与が示唆されたとともに、リポソーム構成脂質の PEG 修飾の有無や電荷

等が in vitro 細胞毒性に大きな影響を与えることが明らかとなった。

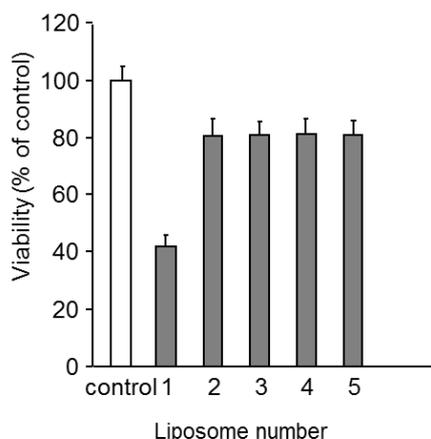


図3 リポソーム脂質組成と細胞毒性との相関性

リポソーム組成：#1：DOTAP:chol:PEG2000-DSPE (45:50:5 mol %) #2；DOPC:chol:PEG2000-DSPE (45:50:5 mol %)、#3；DSPC:chol:PEG2000-DSPE (45:50:5 mol %)、#4；DOPC:chol:PEG5000-DSPE (45:50:5 mol %)、#5；DSPC:chol:PEG5000-DSPE (45:50:5 mol %)

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 4 件)

Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y. "Effects of lipid composition on the properties of doxorubicin-loaded liposomes." Ther Deliv, in press

Un, K., Sakai-Kato, K., Goda, Y. "Intracellular trafficking mechanism of cationic phospholipids including cationic liposomes in HeLa cells", Pharmazie **69**, 525–531, 2014.
DOI:10.1691/ph.2014.3230.

Un, K., Sakai-Kato, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y. "Effects of liposomal phospholipids and lipid transport-related protein on the intracellular fate of encapsulated doxorubicin" Mol Pharm. **11**, 560–567, 2014.
DOI:10.1021/mp400505a

DOI:10.1021/mp400505a

Un, K., Sakai-Kato, K., Oshima Y., Kawanishi, T., Okuda, H., "Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes, Biomaterials **33**, 8131-8141, 2012.

DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.07.030.

〔学会発表〕(計 9 件)

加藤くみ子、桜井真理、合田幸広 “リポソーム構成脂質の細胞内動態における細胞種の影響” 日本薬学会第135年会 2015年3月26日 (神戸)
加藤くみ子、運敬太、合田幸広 “カチオン性リポソーム構成成分の細胞内動態に関する研究” 第29回日本DDS学会、2014年7月30日 (東京)

加藤くみ子、運敬太、川西徹、奥田晴宏、合田幸広 “リポソーム及び内包薬物の細胞内動態に関する研究” 第22回日本バイオイメージング学会学術集会、2013年9月15日 (東京)

加藤くみ子 “DDS製剤キャリアの動態とトランスポーター” 第29回日本DDS学会学術集会 2013年7月5日 招待講演 (京都)

運敬太、加藤くみ子、奥田晴宏 “リポソームに内封されたドキシソルピシンの細胞内動態に及ぼすリポソーム構成脂質の影響、第29回日本DDS学会、2013年7月4, 5日 (京都)

運敬太、加藤くみ子、奥田晴宏 “リポソーム中のポリエチレングリコール(PEG)修飾リン脂質の細胞内動態特性評価” 日本薬剤学会第28年会、2013年5月23日、(名古屋)

加藤くみ子、運敬太、川西徹、奥田晴宏 “リポソームの細胞内動態評価” 第21回日本バイオイメージング学会 2012年8月27日 国立国際会館 (京都)

加藤くみ子 “DDS製剤開発における産官学連携に向けた取り組みについて” 第28回日本DDS学会学術集会 2012年7月5日 招待講演 (札幌)

運敬太、加藤くみ子、川西徹、奥田晴宏 “リポソーム構成成分の細胞内動態特性評価” 日本薬剤学会第27年会 2012年5月26日 神戸国際会議場(兵庫)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

ナノ医薬品（ナノメディシン）に関する参考
情報

http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine_j/nano_j.html

NIHS Nanomedicine Regulatory Science

Research

http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine_e/nano_e.html

6．研究組織

(1)研究代表者

加藤 くみ子 (SAKAI-KATO, Kumiko)

研究者番号：10398901

(2)研究分担者

運 敬太 (UN, Keita)

研究者番号：80624535

(平成26年3月31日まで)