

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860121

研究課題名(和文) 高悪性腫瘍への標的化とアポトーシス誘導を担うEGCG修飾リポソーム製剤の検討

研究課題名(英文) Examination of EGCG modified liposome for targeting malignant tumor and apoptosis induction

研究代表者

杉山 育美 (Sugiyama, Ikumi)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：80509050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：悪性度の高い腫瘍に高発現する67 kDaラミニンレセプター(67LR)を標的としたリポソーム製剤の開発を試みた。薬物キャリアとしてのみでなく、エピガロカテキンガレート(EGCG)による標的性の増大及びアポトーシスの誘導も期待したリポソーム製剤を検討した。EGCGのみを修飾したリポソームはマウスへ投与後速やかに血中より消失したが、ステルス性を付与したEGCG-ポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソームは血中滞留性を改善した。さらに、殺細胞検討においてEGCG-PEG修飾リポソームで強い効果が得られた。以上の結果より、EGCG-PEG修飾リポソームは抗腫瘍効果を増大させることが期待された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is increase of antitumor effect and decrease of adverse effect by liposomes which have high affinity with 67 kDa laminin receptor (67LR). When (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as one of the green tea polyphenol are connected with 67LR, apoptosis is induced on tumor cells. Then we have studied about EGCG modified liposome containing antitumor agent as drug delivery system. It was suggested that this effect was mediated with 67LR needed gallate base in the structure of EGCG. In mice experiment, EGCG-modified liposome rapidly disappeared from the blood circulation after injection. However, EGCG-modified liposome with polyethyleneglycol (PEG) had long circulation time in blood. Moreover, the cytotoxicity of EGCG-PEG-modified liposome was stronger than EGCG-modified liposome. In conclusion, it was expected that EGCG-PEG-modified liposome increases targeted ability to tumor cells and antitumor activity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リポソーム EGCG ラミニンレセプター

1. 研究開始当初の背景

(1) がん化学療法は治療効果と副作用との微妙なバランスの上で行われている。そのため、副作用の発現により治療が中断されることがあり、治療を妨げるだけでなく患者の Quality of Life (QOL) の低下を招く結果となっている。現在、副作用の発現を減少させるため、分子標的薬や薬物キャリアを用いた治療薬が開発され臨床応用に至っている。しかしながら、悪性度の高いがん細胞や薬物耐性細胞の出現などの理由により十分な治療効果が得られているとは言い難い。以上の背景より、がん細胞への標的性の向上や悪性度の高いがん細胞に対する治療増大を可能にする製剤の開発が期待されている。

(2) 薬物キャリアのひとつであるリポソームは、脂質二分子膜により形成されるナノ粒子であり、膜表面に種々の物理的・化学的修飾が可能である。本邦では制がん剤ドキシルピシン (DOX) を内封した DOXIL[®] や抗菌剤アムホテリシン B を内封した AmBisome[®] が発売されているが、今もなお効果の増大と副作用の軽減を期待し国内外で数多くの研究がなされている。近年ではリポソーム膜表面に葉酸 (M. García-Díaz et al. 2011, BBA) やラクトフェリン (M. Wei et al. 2012, Eur. J. Pharm.Sci.) を修飾し、腫瘍に発現した特異的な受容体を介した標的化により治療効果が増大したとの報告がある。

以上の背景とこれまでの自験データに基づき、新たな着眼点より「(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) を制がん剤内封リポソーム膜表面に修飾することは、優れた標的性と相乗効果により少ない副作用で悪性度の高いがんを治療することができる」との仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究は、悪性度の高いがん細胞に高発現する 67kDa ラミニンレセプター(67LR) を標的とした能動的ターゲティングを、緑茶成分のひとつである (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) を薬物キャリアのリポソーム膜表面に修飾することにより達成することを目的とした。EGCG の生理活性は正常細胞に強い毒性を示すものではないこと、67LR は悪性度の高いがんを高発現し EGCG と特異的に結合しアポトーシスを誘導することの 2 点より、転移を伴うがんへの治療に有用であると考えた。

3. 研究の方法

(1) EGCG 修飾リポソームの調製

リポソームは薄膜法により調製し、リポソーム表面へは EGCG-dipalmitate を修飾した。また、リポソームには制がん剤 DOX を内封した。調製したリポソームについて、粒

子径、ゼータ電位、DOX 内封量を測定した。EGCG の修飾率は DPPH 法を用いて行った。

(2) Western blotting 法による 67LR 発現の確認

P388 マウス白血病細胞、M5076 マウス卵巣肉腫細胞、B16F10 マウスメラノーマ細胞、U266 ヒト骨肉腫細胞における 67LR の発現を western blotting 法にて評価した。

(3) 殺細胞効果の検討

各細胞を 96 穴プレートにて培養し、サンプル添加 48 時間後に WST-8 assay にて細胞生存率を算出した (= 450 nm)

(4) EGCG 誘導体の合成

2 種類の EGCG 誘導体を合成した。ひとつは、サンフェノン EGCG (太陽化学) と polyethyleneglycol(PEG) の分子量が 2000 の SUNBRIGHT[®]GS020 (日油) を用いて EGCG-sunbright とした。もう一方は、サンフェノン EGCG (太陽化学) にアミノ基を導入し EGCG-S-Et-NH₂ とした。

(5) EGCG-PEG 修飾リポソームの調製

リポソームは薄膜法で形成し、制がん剤 DOX を内封した。リポソーム膜表面には EGCG-sunbright もしくは EGCG-S-Et-NH₂ と phospholipid-PEG-NHS を修飾し、EGCG-PEG 修飾リポソームを調製した。粒子径、ゼータ電位、DOX 内封量および EGCG の修飾量を測定した。

(6) 血中滞留性の評価

C57BL/6 マウスにリポソームを DOX として 2.5 mg/kg となるように尾静脈内投与した。採血した血液よりリポソームの血中滞留性を評価した。さらに各臓器を摘出し DOX の組織分布も評価した。

4. 研究成果

(1) EGCG-dipalmitate 修飾リポソームの物性評価

EGCG-dipalmitate 修飾リポソームをエクストルージョン法にて 100 nm のフィルターで調整した結果、粒子径は約 150 nm であった。ゼータ電位は - 31.6 mV であり、DOX 内封率は 95.7 % と高率での薬物封入が可能であった。リポソーム膜表面への EGCG 修飾量は 78.5 % であった。以上の物性データより、負電荷を有する安定な EGCG 修飾リポソームであることが示唆された。さらに、DOX 内封率や EGCG 修飾率も高く効率的に目的のリポソームの調製が可能であることが明らかとなった。

(2) 67LR 発現細胞の確認

異なる 4 種類の癌細胞について、67LR の発現の有無を評価した。P388 マウス白血病

細胞、M5076 マウス卵巣肉腫細胞では発現が認められなかった。B16F10 マウスメラノーマ細胞および U266 ヒト骨肉腫細胞では 67LR の発現を確認した。

(3) EGCG-dipalmitate 修飾リポソームの殺細胞効果

EGCG-dipalmitate を修飾したリポソームについて、67LR を発現している B16F10 マウスメラノーマ細胞および発現が認められなかった P388 マウス白血病細胞に対する殺細胞効果を検討した結果、その効果はいずれの細胞に対しても同等であり、強い殺細胞効果は認められなかった。そこで、これらの細胞に対する EGCG 水溶液の効果を検討した。IC₅₀ を比較すると、B16F10 マウスメラノーマ細胞では P388 マウス白血病細胞に比べて 2.2 倍の効果増強が認められ、これは 67LR の発現に依存した結果であると考えられた。

一方、67LR は EGCG のガレート基を認識してアポトーシスを誘導するとの報告があった。EGCG-dipalmitate は palmitoyl 基がガレート基に結合しているため、67LR を標的とすることができず、検討したふたつの細胞に対して EGCG-dipalmitate 修飾リポソームの殺細胞効果は同程度で、かつ期待される効果が得られなかったものと考えられた。すなわち、EGCG-dipalmitate とは異なる構造を有するリポソーム表面修飾物質について検討する必要があることが明らかとなった。

(4) EGCG-dipalmitate 修飾リポソームの血中滞留性評価

リポソーム製剤を標的部位に集積させるためには生体内への投与後、長時間血中を滞留した後に標的部位へ集積させる enhanced permeability and retention (EPR) 効果が重要である。そのため、治療効果の増大にはリポソームの血中滞留性が重要な因子となる。そこで、EGCG-dipalmitate 修飾リポソームの血中滞留性および組織分布を検討した。

分子量が 2000 の PEG 脂質をリポソーム膜表面に修飾したリポソーム (PEG2000 修飾リポソーム) は血中滞留性に優れ、抗腫瘍効果を増大させることがこれまでの検討より明らかとなっている。血中滞留性を評価するため、PEG2000 修飾リポソームと EGCG-dipalmitate 修飾リポソームについて比較検討した。その結果、PEG2000 修飾リポソームは投与 2 時間後においても高い血中濃度を示した一方で、EGCG-dipalmitate 修飾リポソームは投与 15 分後には制がん剤 DOX の血中濃度はほぼ認められず、血中より速やかに消失することが明らかとなった。このとき、EGCG-dipalmitate 修飾リポソームは細網内皮系組織である肝臓および脾臓に速やかに集積していた。リポソームは脂質の集合体であることより、生体内に投与後は異物認識され細網内皮系組織へ集積する。すなわち、EGCG-dipalmitate 修飾リポソーム

は生体に異物であると認識されたため、速やかに血中より消失したものと考えられた。

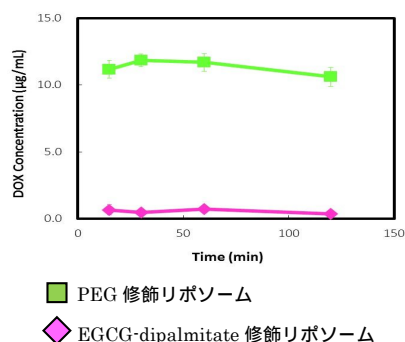


Fig. 1 血中 DOX 濃度

以上の (3) 殺細胞効果および (4) 血中滞留性評価の結果より、67LR を標的とした有用なリポソーム製剤の開発には、ガレート基を保持した EGCG 誘導体が必要であり、さらに血中滞留性を維持するためには PEG の修飾が不可欠であることが示唆された。よって、新たな EGCG 誘導体を合成し、検討することとした。

(5) EGCG 誘導体の合成

EGCG 誘導体として以下の 2 種類を合成した (Fig. 2)。いずれの誘導体もガレート基への結合は認められないことを確認した。Fig. 2(A) に示した EGCG-sunbright はリポソーム調製時に構成脂質と共に添加することにより、アンカー部がリポソーム膜へ挿入され修飾することができる。Fig. 2(B) に示した EGCG-S-Et-NH₂ には PEG を結合しておらず、リポソーム構成脂質と EGCG-S-Et-NH₂ を用いてリポソームを調製後、別に PEG を反応させることにより修飾し EGCG-PEG 修飾リポソームとした。

(A) EGCG-sunbright

(B) EGCG-S-Et-NH₂

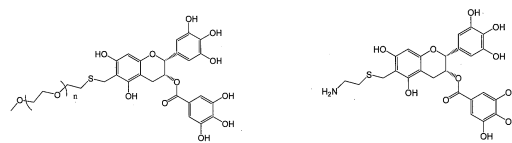


Fig. 2 EGCG 誘導体

(6) EGCG-PEG 修飾リポソームの物性評価

2 種類の EGCG 誘導体をリポソーム膜表面に修飾し、それぞれの EGCG 修飾率を算出した。EGCG-sunbright を修飾した場合、EGCG の修飾率は 9.7% であった一方で、EGCG-S-Et-NH₂ および PEG を修飾した EGCG-S-Et-NH₂-PEG 修飾リポソーム (EGCG-S-PEG リポソーム) の EGCG 修飾率は 50.6% と優れた修飾率が得られた。粒子径

はいずれも約 130 nm であった。DOX 内封率は EGCG-sunbright 修飾リポソームが 92.9%、EGCG-S-PEG 修飾リポソームが 53.9%であった。ゼータ電位はそれぞれ -42.2 mV と -9.0 mV であった。物性データとしてわずかに差が認められたが、いずれもリポソーム製剤として適切であると判断した。また、67LR を介したアポトーシスの誘導には EGCG 濃度として 20 μ M が必要であることより、リポソーム表面への EGCG 修飾率が重要な因子となると考えた。本検討では以降の検討に EGCG-S-PEG リポソームを用いて行うこととした。

(7) EGCG-S-PEG リポソームの血中滞留性評価

EGCG-S-PEG リポソームの血中滞留性を投与 2 時間後の血中 DOX 濃度より評価した。EGCG-S-PEG リポソームの血中 DOX 濃度は EGCG-dipalmitate 修飾リポソームの 7.2 倍であり有意に高いレベルとなった。すなわち、PEG を修飾することにより、異物認識機構を回避することが可能となり、血中滞留性を改善することができたと考えられ、EGCG-S-PEG リポソームの腫瘍集積性が期待される結果となった。しかしながら、このレベルは PEG2000 修飾リポソームには劣っていることより更なる改善が必要であることが示唆された。

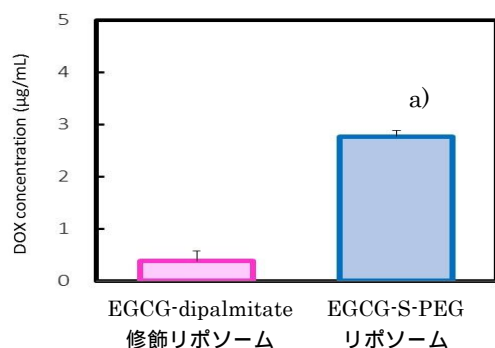


Fig. 3 投与 2 時間後の血中 DOX 濃度

Each column was given as mean \pm S.D (n=4-6)
Significant difference from EL-DOX group was a) $p < 0.001$.

(8) EGCG-S-PEG リポソームの殺細胞効果

EGCG-S-PEG リポソームの B16F10 マウスメラノーマ細胞に対する殺細胞効果を検討した。その結果、EGCG-S-PEG リポソームは EGCG-dipalmitate 修飾リポソームに比べ細胞生存率を 25%減少させた。すなわち、ガレート基への結合を有さない EGCG-S-PEG の EGCG が B16F10 マウスメラノーマ細胞の 67LR と反応しアポトーシスを誘導するなどの影響を与えたことにより殺細胞効果を増強させたことが示唆された。

「EGCG を制がん剤内封リポソーム膜表面に修飾することは、優れた標的性と相乗効果により 少ない副作用で悪性度の高いがんを治療することができる」との仮説のもと、EGCG 修飾リポソームについて検討した。67LR を発現した腫瘍細胞に対して EGCG 修飾リポソームが効果を発揮するためにはガレート基の保持と血中滞留性を維持することが重要な因子であることが明らかとなった。新たに 2 種類の EGCG 誘導体を合成し検討した結果、EGCG-S-PEG リポソームが血中滞留性と殺細胞効果を増大させ、EGCG のみを修飾したリポソームに比べて優れた効果を発揮することが期待された。

しかしながら、検討してきた EGCG-S-PEG リポソームに修飾されている EGCG の量はアポトーシスを誘導するために十分な量であるとは言い難い結果であった。

本リポソームは制がん剤を輸送するキャリアとしてのみではなく、EGCG を標的部位でのリガンドとして使用し、さらに EGCG 受容体である 67LR を介するアポトーシスを誘導させるという 3 つの効果を目指した新たな製剤である。今後、EGCG および PEG の修飾方法の検討など抗腫瘍効果増大を目指した検討を引き続き行う予定である。

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)

[学会発表](計 5 件)

杉山育美、佐塚泰之、悪性腫瘍に高発現するエピガロカテキンガレート受容体を標的とした薬物キャリアの検討、第 11 回日本カテキン学会年次学術大会(東京)、2014 年 11 月 22 日

杉山育美、佐塚泰之、67kDa ラミニンレセプターを標的とした EGCG 修飾リポソームの体内動態評価、第 73 回日本癌学会総会(横浜)、2014 年 9 月 27 日

杉山育美、開発邦宏、加藤修雄、佐塚泰之、(-)-Epigallocatechin-3-gallate 修飾リポソームの有用性検討、日本薬剤学会第 29 年会(さいたま)、2014 年 5 月 22 日

Ikumi Sugiyama, Yasuyuki Sadzuka, Liposomal doxorubicin with modified EGCG increased antitumor activity by topical targeting efficacy into tumor, Annual Meeting 2014 of the American Association for Cancer Research (San Diego), 2014 年 4 月 9 日

杉山育美、佐塚泰之、67kDa ラミニンレ
セプタ - を標的とした抗腫瘍効果増強検
討、第 72 回日本癌学会総会（横浜）、
2013 年 10 月 4 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉山 育美 (SUGIYAMA, Ikumi)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：80509050