

新規抗がん剤キャリアおよび抗がん剤としての葉酸修飾メチル-β-シクロデキストリンの有用性評価

生命薬科学専攻 医療薬学講座 製剤設計学分野 小野寺理沙子

がん治療の最適化を目指す DDS 研究において、薬物を投与部位から標的の臓器や組織に安定かつ効率良く送達させるターゲティング技術は、最も重要なアプローチの一つである。葉酸レセプター (FR-α) は各種上皮がん細胞で過剰発現しているため、葉酸 (FA) はがん細胞標的リガンドとして汎用されている。一方、シクロデキストリン (CyD) のなかでもメチル化 β-CyDs (M-β-CyDs) は、溶解性に優れ、天然 β-CyD と比較して優れた薬物包接能を有することが知られている。また、M-β-CyDs は腫瘍細胞で発現が上昇するリピッドラフトからコレステロールを漏出させることにより、細胞死を誘導することから、抗がん剤としての利用が期待される。しかし、M-β-CyD は腫瘍細胞選択性を持たないことから、正常細胞への細胞障害性が懸念される。そこで本研究では、まず腫瘍細胞選択的抗がん剤キャリアの構築を企図して、FA 修飾 M-β-CyD (FA-M-β-CyD) を新規に調製し、その有用性を検討した。次に、M-β-CyD および FA-M-β-CyD 自体の抗腫瘍活性ならびにその機構について検討し、それらの抗腫瘍活性およびその誘導機構の違いを比較した。以下に本研究で得られた知見を要約する。

- 1) FA-M-β-CyD は M-β-CyD をトシル化した後、アミノ化を行い、縮合剤を用いて FA のカルボキシ基と結合させることで調製した。また、¹H-NMR および FAB MS スペクトルにより、M-β-CyD と FA はモル比 1:1 で結合していることを確認した。
- 2) リン酸緩衝液中において FA-M-β-CyD は、ドキシソルビシン (DOX) と安定な複合体を形成し、その安定度定数は $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と著しく高い値を示した。
- 3) FR-α 高発現細胞である KB 細胞において FA-M-β-CyD は、DOX およびパクリタキセル (PTX) の抗腫瘍活性を増強したが、5-フルオロウラシル (5-FU) の抗腫瘍活性には影響を与えなかった。
- 4) KB 細胞 (FR-α (+)) において DOX/FA-M-β-CyD 複合体は、FR-α を介して DOX の細胞内取り込み量を上昇させることで、FR-α 高発現細胞選択的に DOX の抗腫瘍活性を増強することが示唆された。
- 5) Colon-26 細胞 (FR-α (+)) を皮下に同種移植した担がんマウスに DOX/FA-M-β-CyD 複合体を静脈内単回投与したところ、DOX 単独および DOX/M-β-CyD 複合体よりも優れた抗腫瘍活性を示した。
- 6) FA-M-β-CyD は同担がんマウスにおいて、DOX の副作用を軽減することが示唆された。
- 7) 同担がんマウスにおいて、M-β-CyD 自体は腫瘍内単回投与では優れた抗腫瘍活性

を示したが、静脈内単回投与では十分な効果を示さなかった。また、M-β-CyD を静脈内に単回投与した場合、血液または組織に障害性を惹起させることが示唆された。

- 8) KB 細胞において FA 非修飾体である M-β-CyD は、細胞内には取り込まれず、細胞膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させることで、ミトコンドリア介在性のアポトーシスを誘導することが示唆された。
- 9) FR-α 高発現細胞である KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞において、FA-M-β-CyD は優れた抗腫瘍活性を示した。一方、FR-α 低発現細胞である A549 細胞では抗腫瘍活性を示さなかった。
- 10) FA-M-β-CyD は FR-α 発現の有無に関わらず、細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを強く漏出させることが示唆された。
- 11) KB 細胞における FA-M-β-CyD の抗腫瘍活性は、FR 競合阻害剤である FA の添加および FR-α のノックダウンにより有意に低下したことから、FA-M-β-CyD の抗腫瘍活性は FR-α を介することが強く示唆された。
- 12) KB 細胞において、FA-M-β-CyD は M-β-CyD とは対照的に、細胞内 DNA 含量に影響を与えず、ミトコンドリア膜電位を顕著に上昇させ、さらにカスパーゼ-3/7 の活性化を誘導しなかったことから、アポトーシス非依存的経路を介して細胞死を誘導することが示唆された。
- 13) KB 細胞において、FA-M-β-CyD は M-β-CyD とは異なり、オートファゴソームの形成を促進した。また、FA-M-β-CyD の抗腫瘍活性は、オートファジー阻害剤であるバフィロマイシン A₁ およびクロロキンの添加により低下した。
- 14) KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞において、FA-M-β-CyD 処理により誘導されたオートファゴソームは、ミトコンドリアと一部共局在したことから、オートファジーを誘導することが示唆された。
- 15) Colon-26 細胞を皮下に同種移植した BALB/c マウスおよび M213 細胞を皮下に異種移植した BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスに FA-M-β-CyD を静脈内に単回投与したところ、両担がんマウスにおいて腫瘍の成長が有意に抑制され、生存率が著しく改善された。
- 16) FA-M-β-CyD を Colon-26 細胞を皮下に同種移植したマウスの尾静脈に単回投与後、血液生化学的パラメータはほとんど変化しなかったことから、FA-M-β-CyD は、*in vivo* において安全性に優れることが示唆された。

以上述べたように、FA-M-β-CyD は FR-α を介して細胞内に取り込まれることから、FR-α 高発現細胞選択的かつ安全性に優れる抗がん剤キャリアおよび抗がん剤として有用であることが示唆された。本研究で得られた知見は、CyDs を基盤分子とした抗がん剤キャリアおよび抗がん剤を開発する上で重要な基礎資料になるものと考えられる。