

## メチル化 $\beta$ -シクロデキストリン類の異なる細胞死誘導効果とその機構解明に関する薬学的研究

創薬・生命薬科学専攻 ドラッグデリバリーコース 製剤設計学分野 亀山和久

シクロデキストリン (CyD) は、薬剤学・製剤学領域において、複合体形成による薬物の安定化、溶解性の改善、バイオアベイラビリティの向上などを目的に、医薬品添加物として使用されている。CyD の中でもメチル化  $\beta$ -CyDs (M- $\beta$ -CyDs) は、腫瘍細胞で発現が上昇するリポ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、抗がん剤としての応用が期待されている。しかしながら、M- $\beta$ -CyDs の細胞死誘導機構の詳細は不明である。一方、これまで我々はがん標的リガンドとして葉酸 (FA) を M- $\beta$ -CyD に導入した FA 修飾 M- $\beta$ -CyD (FA-M- $\beta$ -CyD) を調製し、その腫瘍細胞選択的な殺細胞効果にオートファジーが関与する可能性を報告した。しかしながら、FA-M- $\beta$ -CyD の細胞死誘導機構の詳細およびヒトのがん細胞を異種移植した *in vivo* 抗腫瘍効果に関する検討は行われていない。そこで本研究では、M- $\beta$ -CyDs および FA-M- $\beta$ -CyD の細胞死誘導効果ならびにその機構について検討した。以下に本研究で得られた知見を要約する。

### 【第1章】M- $\beta$ -CyDs の殺細胞効果とその機構解明

- 1) NR8383 細胞、A549 細胞、Jurkat 細胞を DM- $\beta$ -CyD および TM- $\beta$ -CyD で処理すると、染色体 DNA が G<sub>0</sub> あるいは G<sub>1</sub> 期の細胞より少ない細胞が検出され、さらに DNA 断片化に伴う DNA ladder が検出された。また、高濃度の M- $\beta$ -CyD 処理では DNA 含量の低下した細胞が増加した。一方、DM- $\alpha$ -CyD は、細胞死を誘導したが、細胞の DNA 含量の低下や核の断片化は見られなかった。
- 2) 蛍光顕微鏡を用いた形態学的変化の観察から、DM- $\beta$ -CyD および TM- $\beta$ -CyD 処理した NR8383 細胞において、クロマチンの凝縮および PS の細胞膜外層へ露出が認められた。
- 3) NR8383 細胞からのコレステロールの漏出は DM- $\alpha$ -CyD 処理では観察されず、M- $\beta$ -CyDs 添加系で観察された。また、外来のコレステロール添加により DM- $\beta$ -CyD によるアポトーシス誘導が有意に抑制された。
- 4) NR8383 細胞において、DM- $\beta$ -CyD 誘導のアポトーシスに対する PI3K 阻害剤の影響は、低濃度の DM- $\beta$ -CyD でのみ認められ、p38 MAP kinase 阻害剤の影響は認められなかった。DM- $\beta$ -CyD を処理した NR8383 細胞では、Akt およびリン酸化 Akt の消失が観察された。さらに、DM- $\beta$ -CyD は Bad のリン酸化を抑制した。これらの結果より、DM- $\beta$ -CyD は PI3K-Akt 経路による細胞生存シグナルを阻害することが推定された。
- 5) DM- $\beta$ -CyD を処理した NR8383 細胞において、ミトコンドリアの膜電位低下および cytochrome c の放出が誘導された。これらの結果より、DM- $\beta$ -CyD は、ミトコンドリア依存的なアポトーシスを誘導することが示唆された。
- 6) DM- $\beta$ -CyD を処理した NR8383 細胞において、pro-caspase-3 のバンドの減少と活性型 caspase-3 のバンドが検出された。このことから、DM- $\beta$ -CyD 処理によ

り、caspase-3 の活性化が誘導されることが示唆された。

## 【第2章】FA-M-β-CyD の抗腫瘍効果およびその機構解明

- 1) FA-M-β-CyD は、葉酸結合タンパク質と  $8.56 \times 10^{-7}$  M と著しく低い解離定数を示したことから、FR-α と強く相互作用することが示唆された。
- 2) FA-M-β-CyD は、スフェロイド KB 細胞 (FR-α (+)) において、優れた殺細胞効果を有することが示唆された。
- 3) KB 細胞 (FR-α (+)) において、FA-M-β-CyD は DNA の断片化および caspase-3 の発現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。
- 4) FA-M-β-CyD は、KB 細胞 (FR-α (+)) 内の LC3-II および Beclin-1 の発現を増大させ、p62 の発現を減少させたことから、オートファジーを介した細胞死を誘導することが示唆された。
- 5) FA-M-β-CyD は、ミトコンドリアの膜電位を上昇させ、ATP 産生の低下および ROS 産生の増大を誘導することが示唆された。
- 6) FA-M-β-CyD は、活性酸素種の産生を介してマイトファジー誘導することが示唆された。
- 7) ヒト肝細胞由来株化細胞 Hepatocyte (FR-α (-)) において、FA-M-β-CyD は M-β-CyD と比較して、細胞障害性が低いことから、正常細胞に対して安全性に優れる可能性が示唆された。
- 8) KB 細胞 (FR-α (+)) および Ihara 細胞 (FR-α (+)) を皮下に異種移植した担がんヌードマウスに、FA-M-β-CyD を静脈内に単回投与したところ、ドキソルビシン単独や M-β-CyD よりも優れた抗腫瘍効果を示した。
- 9) KB 細胞 (FR-α (+)) を皮下に異種移植した担がんヌードマウスに、FA-M-β-CyD を静脈内に単回投与したところ、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、メチル化 β-CyDs は高濃度で各種細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。DM-β-CyD によるアポトーシスの誘導機構は、DM-β-CyD が細胞膜から膜脂質成分であるコレステロールを漏出させ、生存シグナルとして機能している PI3K-Akt-Bad 経路の活性化を阻害し、ミトコンドリア依存的な経路を介した caspase-3 の活性化に起因するものと考えられる。一方、FA-M-β-CyD は、FR-α を介して細胞内に取り込まれ、ミトコンドリア機能障害を惹起し、マイトファジーを介した細胞死を誘導することが示唆された。これらの知見は、FA や M-β-CyD を用いたがん細胞選択的な抗がん剤や薬物担体の構築に際し、有用な基礎的資料になるものと考えられる。