

平成 28 年度

メチル化 β -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

熊本大学大学院薬学教育部
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

Pharmaceutical Study on Mechanism of Differential Cell-death Activity Induced by Methylated β -Cyclodextrins

Kazuhisa Kameyama

Cyclodextrins (CyDs) and their hydrophilic derivatives form inclusion complexes with hydrophobic molecules. CyDs can improve the solubility, dissolution rate and bioavailability of the drugs, and so the widespread use of CyDs is well known in the pharmaceutical field. Of various CyDs, methylated β -cyclodextrins (M- β -CyDs) at high concentration are acknowledged to disrupt the structures of lipid rafts, which are lipid microdomains formed by lateral assemblies of cholesterol and sphingolipids in the cell membrane, through extraction of cholesterol from lipid rafts, resulting in the induction of cell-death. In addition, lipids rafts are highly expressing in cancer cells and regulating the tumor cell survival. Therefore, M- β -CyDs are expected to utilize as antitumor agents. However, it is still unclear the mechanism of cell-death induced by M- β -CyDs.

M- β -CyDs possess the potent cytotoxic activity in cancer cells *in vitro*. However, M- β -CyDs are not allowed the parenteral use in human, because the antitumor activities of M- β -CyDs have a lack of a tumor cell-selectivity. Meanwhile, the widespread use of folic acid (FA) as a tumor-targeting ligand has been known, because folate receptor- α (FR- α) overexpresses in various kinds of epithelial tumor cells. Most recently, we prepared the folate-appended M- β -CyD (FA-M- β -CyD), and evaluated the potentials as its novel tumor-selective carrier for antitumor drugs. As the results, FA-M- β -CyD provided selective antitumor activity in FR- α -expressing cells by the induction of autophagy. However, the mechanism of autophagy induction by FA-M- β -CyD remains unclear.

Therefore, in the present study, we firstly investigated the mechanism of cell-death induced by M- β -CyDs. Secondary, we also examined the mechanism of autophagy-mediated cell-death in FR- α -expressing cancer cells induced by FA-M- β -CyD and evaluated the *in vivo* antitumor activity in human cancer xenografted mice.

1. Mechanism of cell-death induced by M- β -CyDs

Of various CyDs, 2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin (DM- β -CyD) potentially caused apoptosis in NR8383, a rat alveolar macrophage cell line, A549, a human lung adenocarcinoma

epithelial cell line and Jurkat cells, a human T cell lymphoblast-like cell line, through cholesterol depletion from lipid rafts. DM- β -CyD induced apoptosis through the inhibition of the activation of PI3K-Akt-Bad pathway. On the other hand, neither p38 MAP kinase nor p53 were contributed to the induction of apoptosis by DM- β -CyD. DM- β -CyD potentially decreased mitochondrial transmembrane potential and caused release of cytochrome *c* to cytosol. Furthermore, we confirmed that down-regulation of pro-caspase-3 and activation of caspase-3 after incubation with DM- β -CyD. These results potentially suggest that DM- β -CyD induced apoptosis through PI3K-Akt-Bad pathway in NR8383 cells by cholesterol depletion from lipid rafts.

2. Mechanism of autophagy-mediated cell-death induced by FA-M- β -CyD

In contrast to M- β -CyD, FA-M- β -CyD entered KB cells (FR- α (+)), a human epidermoid carcinoma cells, through FR- α -mediated endocytosis. The transmembrane potential of isolated mitochondria after treatment with FA-M- β -CyD was significantly elevated. Additionally, FA-M- β -CyD lowered ATP production and promoted reactive oxygen species (ROS) production in KB cells (FR- α (+)). Importantly, FA-M- β -CyD enhanced light chain 3 (LC3) conversion (LC3-I to LC3-II) in KB cells (FR- α (+)) and induced PINK1 protein expression, which is involved in the induction of mitophagy. Furthermore, FA-M- β -CyD had potent antitumor activity in BALB/c *nu/nu* mice xenografted with KB cells (FR- α (+)) without any significant side effects. Taken together, these results suggest that the autophagic cell death induced by FA-M- β -CyD could be associated with mitophagy elicited by impaired mitochondrial function.

In conclusion, we demonstrated that DM- β -CyD induced apoptosis through the inhibition of the activation of PI3K-Akt-Bad pathway, leading to cholesterol depletion from lipid rafts in NR8383 cells. Meanwhile, we demonstrated the potentials of FA-M- β -CyD as a novel tumor-selective anticancer agent, due to the induction of mitophagy in the FR- α -expressing tumor cells. These findings will contribute in the development of an antitumor agent and a drug carrier using FA and M- β -CyDs.

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- (1) 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., **38**, 249-261 (2009).
Keiichi Motoyama, Kazuhiisa Kameyama, Risako Onodera, Norie Araki, Fumitoshi Hirayama, Kaneto Uekama, Hidetoshi Arima

- (2) Evaluation of Antitumor Effects of Folate-conjugated Methyl- β -cyclodextrin in Melanoma
Biol. Pharm. Bull., **38**, 374-379 (2015).
Keiichi Motoyama, Risako Onodera, Nao Tanaka, Kazuhiisa Kameyama, Taishi Higashi, Ryusho Kariya, Seiji Okada, Hidetoshi Arima

- (3) Induction of Mitophagy-mediated Antitumor Activity with Folate-appended Methyl- β -cyclodextrin
International Journal of Nanomedicine, **in press**.
Kazuhiisa Kameyama, Keiichi Motoyama, Nao Tanaka, Yuki Yamashita, Taishi Higashi, Hidetoshi Arima

目次

緒言	-----	1
第1章	メチル化 β -シクロデキストリン (M- β -CyDs) の殺細胞効果 とその機構解明	----- 14
第1節	序	-----14
第2節	M- β -CyDs による細胞障害性	-----15
第3節	M- β -CyDs によるアポトーシス誘導	-----17
第1項	DNA の断片化	-----17
第2項	細胞の形態学的変化	-----27
第3項	細胞膜構造の変化	-----28
第4節	界面活性剤によるアポトーシス誘導	-----31
第5節	細胞膜脂質成分に及ぼす M- β -CyDs の影響	-----33
第1項	細胞膜脂質成分の漏出	-----33
第2項	アポトーシス誘導に及ぼすコレステロールの影響	-----35
第6節	PI3K-Akt および MAPK 経路に及ぼす ジメチル- β -CyD (DM- β -CyD) の影響	-----36
第1項	アポトーシス誘導に及ぼす PI3K および MAPK 阻害剤 の影響	-----36
第2項	Akt 活性化に及ぼす DM- β -CyD の影響	-----39
第3項	Bad のリン酸化に及ぼす DM- β -CyD の影響	-----41
第7節	p53 経路に及ぼす DM- β -CyD の影響	-----42
第8節	アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与	-----43
第1項	ミトコンドリア膜電位	-----43
第2項	ミトコンドリアからの cytochrome c の放出	-----45

第9節	DM- β -CyD による caspase-3 の活性化	-----46
第10節	考察	-----48
第11節	小括	-----54
第2章	葉酸修飾メチル- β -シクロデキストリン (FA-M- β -CyD) の抗腫瘍効果 およびその機構解明	-----56
第1節	序	-----56
第2節	FA-M- β -CyD と葉酸結合タンパク質 (FBP) の相互作用	-----57
第3節	アポトーシスに及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----59
第1項	腫瘍細胞に対する FA-M- β -CyD の殺細胞効果	-----59
第2項	DNA 断片化に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----61
第3項	Caspase-3 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----62
第4節	FA-M- β -CyD の殺細胞効果におけるオートファジーの関与	-----64
第1項	FA-M- β -CyD の殺細胞効果に及ぼすオートファジー阻害剤の影響	-----64
第2項	FA-M- β -CyD によるオートファゴソームの形成	-----65
第5節	FA-M- β -CyD によるオートファジー誘導機構	-----67
第1項	LC3-II 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----67
第2項	p62 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----68
第3項	Beclin-1 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----70
第4項	Atg7 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----71
第5項	FA-M- β -CyD によるマイトファジー誘導	-----72
第6項	PINK1 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----74
第6節	FA-M- β -CyD の細胞内動態	-----75
第7節	ミトコンドリア機能に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----77
第1項	FA-M- β -CyD とミトコンドリアの共局在	-----77
第2項	細胞内ミトコンドリア数に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----79

第3項 単離ミトコンドリアの膜電位に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----80
第4項 ATP 産生に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----82
第5項 ROS 産生に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----85
第6項 FA-M- β -CyD のオートファジー誘導能に及ぼす ROS 阻害剤の影響	-----87
第8節 正常細胞に対する FA-M- β -CyD の影響	-----89
第1項 FA-M- β -CyD の細胞障害性	-----89
第2項 オートファゴソーム形成に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----91
第3項 ROS 産生に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----92
第4項 ATP 産生に及ぼす FA-M- β -CyD の影響	-----93
第9節 担がんヌードマウスに対する FA-M- β -CyD の抗腫瘍効果	-----94
第1項 KB 細胞を異種移植した担がんマウスに対する FA-M- β -CyD の抗腫瘍効果	-----94
第2項 Ihara 細胞を異種移植した担がんマウスに対する FA-M- β -CyD の抗腫瘍効果	-----97
第10節 考察	-----98
第11節 小括	-----104
総括	-----106
謝辞	-----110
実験の部	-----111
参考文献	-----126

緒 言

2015年の厚生労働省の人口動態統計において、死亡数130万2000人のうち、最も多い疾患は悪性新生物（がん）の37万人であり、次いで心疾患の19万9000人、肺炎の12万3000人、脳血管疾患の11万3000人と推計されている。このようにがんは、わが国における死因第1位の疾患であり、総死亡数の28.4%を占めている。早期発見率が向上し、一部のがんでは生存率の改善がみられるものの、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・診断法の開発が望まれている。一方、近年では、医薬品開発の急速な進歩により、これまで以上に治癒が期待される細胞毒性の強い抗がん剤が登場し、がん治療における化学療法の占める割合は増加傾向にある。しかし、ドキソルビシン (DOX)、ビンブラスチン (VBL) といった現状の抗がん剤は、がん細胞の高い増殖効果に着目した細胞障害性を有する化合物が主流であるため、骨髄細胞などのように生成回転が活発で高い増殖能を持つ正常細胞に対して強い障害性を示すことが深刻な問題となっている。これを改善するために、腫瘍の血管新生を選択的に阻害し、がん細胞の増殖を抑制する血管新生阻害剤イレッサ® やグリベック® など、細胞障害性とは異なるメカニズムでがん細胞の増殖を抑制する分子標的治療薬が上市されている。^{1, 2)} 近年では、がん免疫の賦活化をターゲットとした抗PD-1抗体薬ニボルマブ (オプジーボ®) が上市された。³⁾ 一方、オプジーボ®に代表される抗体医薬は、薬価が極めて高額であるために、患者の経済的負担および国内の医療経済の圧迫が懸念されている。このように、がん治療分野において、治療効果の増大だけではなく、副作用の軽減、高価格な医薬品開発の回避、ひいては患者の Quality of life (QOL) の向上が重要な課題となることから、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薬物投与形態の総称であり、標的部位で適切な濃度と放出パターンを得ることを目的としたコントロールドリリース、標的部位からの効率の良い吸収を目的とした薬物の吸収促進、薬物に標的部位を指向する能力を付与するターゲティングなどに分類される。特に DDS 研究において最も重要なアプローチといわれるターゲティングには、生体内の非特異的な物質輸送の特性を受動的に利用するパッシブターゲティングと、標的との明確な特異的相互作用を能動的に利用するアクティブターゲティングがある。これらターゲテ

ィングを実現するために、薬物の溶解性や血中安定性を飛躍的に向上させるリポソーム^{4,5)}や高分子ミセル^{6,7)}などの微粒子キャリア、シクロデキストリン (CyD) 結合体、⁸⁾ 抗体に代表される高分子キャリアなどが開発されている。^{9,10)} 既に臨床適応されているパッシブターゲティング製剤として、肝臓、脾臓などの細網内皮系 (Reticuloendothelial system : RES) を回避するポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソーム製剤である Doxil[®]¹¹⁾ が挙げられる。また、抗がん剤内包高分子ミセル製剤として、胃がんおよび乳がんを対象とした PTX 内包高分子ミセル NK105 (Phase III)¹²⁾ や膵臓がんを対象とした臨床試験が行われた DOX 内包高分子ミセル NK911 (Phase III)¹³⁾、など多くのパッシブターゲティング製剤が盛んに研究されている。残念ながら、NK105 の乳がんに対する有効性が Phase III で認められず、2016年7月に開発中止となったが、現在、固形がんに対してカルボプラチンとの併用による Phase I 試験が計画されている。しかし、このような微粒子製剤を用いることにより、薬物単独投与時には見られなかった副作用が生じるケースもある。例えば、Doxil[®] は、DOX 単独投与時に比べて心毒性は軽減されたものの、インフュージョンリアクションや手足症候群が副作用として現れるようになった。^{14, 15)} このことから、パッシブターゲティング能だけでは、抗がん剤由来の副作用を完全に払拭することは困難であり、標的細胞・組織へ積極的に移行させることが重要である。

キャリアに標的細胞・組織選択性を付与させる方法として、抗体、¹⁶⁾ 糖鎖、¹⁷⁾ 葉酸 (FA)、^{18, 19)} トランスフェリン、^{20, 21)} 上皮成長因子²²⁾ やインテグリン結合性を有する Arg-Gly-Asp-Ala-Pro-Arg-Pro-Gly ペプチド²³⁾ などのリガンド修飾が知られている。なかでも FA は 1) 安価である、2) 葉酸レセプター- α (Folate receptor- α : FR- α) 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、²⁴⁾ FR- α 介在性 Clathrin-independent carrier/Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein-enriched early endosomal compartment (CLIC/GEEC) エンドサイトーシスにより FA をがん細胞選択的に取り込む、3) 抗原性がなく、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。

抗がん剤を設計する上で、細胞死の概念を把握することは極めて重要である。細胞死にはアポトーシス、ネクローシス、ネクロトーシス、オートファジー、セネセンスなどが知られている。なかでも、アポトーシスは多くの抗がん剤が誘導する細胞死である。アポトーシスは個体の生命を維持するために、遺伝子によって制御された細胞死であり、個体発生における形態形成や神経系ネットワークの確立ばかりでなく、成

熟個体における細胞交替、内分泌系による恒常性の維持、免疫系の成立などに重要な役割を果たしている。^{25, 26)} さらにアポトーシスは、がん、自己免疫疾患、エイズなどのウイルス感染症、アルツハイマー病などの神経変性疾患などの発症に密接に関わっていることが明らかになっている。²⁷⁻³⁰⁾ アポトーシスの機構は様々なアポトーシスシグナルによる死の誘導から始まり、決定、実行という一連の過程をたどり整然と進行し、各段階で巧妙に制御されている。最近の研究から、アポトーシスの分子機構は特定のタンパク質とゲノム DNA の限定分解に収束することが明らかにされ、この機構により生命体は不要になった細胞や異常な細胞を除去することから、その機構が正常に働かない場合は、がんやエイズなどの生命を脅かす疾患の惹起につながるものと考えられている。³¹⁾

アポトーシスは、細胞の形態学的変化と、生化学的変化によって定義されている。³²⁻³⁴⁾ アポトーシス細胞の形態学的な特徴は、細胞の縮小、クロマチンの核膜周辺への凝縮、核の断片化および微絨毛の消失による細胞表面の平滑化などである。そして、細胞の表面に突出と彎入の構造 (blebbing) が形成され、細胞膜構造を維持したまま細胞自体が断片化してアポトーシス小体を形成し、マクロファージなどの食細胞や隣接する細胞により貪食除去される。一方、アポトーシス細胞の生化学的な特徴としては、形態学的変化に先立って、細胞内カルシウム濃度の上昇や特定タンパク質の限定分解がみられる。そして、ヌクレオソームコアをつなぐリンカー部位にエンドヌクレアーゼが作用して酵素的に DNA が切断され、アポトーシスの顕著な特徴であるクロマチン DNA のヌクレオソーム単位 (約 180 塩基対) での断片化が起こる。³⁵⁾ また、細胞膜脂質二重層の外層へのホスファチジルセリン (phosphatidylserine : PS) の移行などの細胞膜構造の変化が起こり、スカベンジャーレセプターや PS-specific receptor を介して食細胞により貪食除去される。³⁶⁻³⁸⁾

なお、アポトーシスによる細胞死は、短時間のうちに整然と進行し、組織内では散在的に起こり、細胞の内容物もほとんど漏れ出さないため、通常では炎症反応はみられない。これに対してネクローシスは、損傷を受けた細胞集団に一斉に起こり、細胞の内容物が漏出した部位へ白血球が集合し、炎症反応が惹起されるのが特徴である。³⁹⁻⁴¹⁾

アポトーシスの誘因となるシグナルの多くは細胞膜上のデスレセプターを介して伝達される。例えば、Fas リガンドはその特異的なレセプターである Fas (Apo-1, CD95) を介してアポトーシスシグナルを細胞内に伝える (Fig. 1)。⁴²⁾ アポトーシスを引き起こすシグナルとしては、増殖因子や神経栄養因子の除去、活性酸素、DNA 障

害、サイトカイン、薬物などによるストレスが主な要因となっている。このようにアポトーシスシグナルの直下にはさまざまなアダプター分子や PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)-Akt (serine/threonine kinase)、MAPK (mitogen-activated protein kinase) 系などによるリン酸化カスケードがある。^{43,44)} さらにその下流では、核内において p53 などの細胞の生と死の選択に重要な転写因子による制御が行われることにより、細胞の運命が決定されると考えられている。⁴⁵⁾

アポトーシスの実行過程では caspases による特定タンパク質 (PARP (poly (ADP-ribose) polymerase), ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) など) の限定分解が中心的な役割を果たしている。⁴⁶⁾ Caspases は、不活性な pro-caspases の状態で存在し、自己あるいは他の caspases の作用により限定分解され、二量体化して活性型に変換される。FasL/Fas 系、TNF (tumor necrosis factor)/TNFR (TNF receptor) 系ではそれぞれ caspase-8, -2 を頂点とする caspase-3, -7 の活性化のカスケードが示唆されている。⁴⁷⁾ 一方、ミトコンドリアからの cytochrome *c* の放出と Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) と dATP (または ATP) と pro-caspase-9 の複合体 (apoptosome) の形成による caspase-9 の活性化の経路がある。また、ミトコンドリアには、caspase-9 などの実行因子の活性化を制御する Bcl-2 ファミリータンパク質が存在する。さらに、IAP (inhibitor of apoptosis protein) や Smac (second mitochondria-derived activator of caspase)/DIABLO (direct IAP binding protein with low pH) などの caspase-9, -3 の活性化を制御する因子、AIF (apoptosis-inducing factor) など核のクロマチン凝集に関与する因子などが局在している。このように、ミトコンドリアと核の間で死の決定、実行に関する重要なシグナル伝達が行われている。ミトコンドリア以外にもアポトーシスに重要なオルガネラとして、小胞体が、アルツハイマー病の発症と関連して最近注目されている。

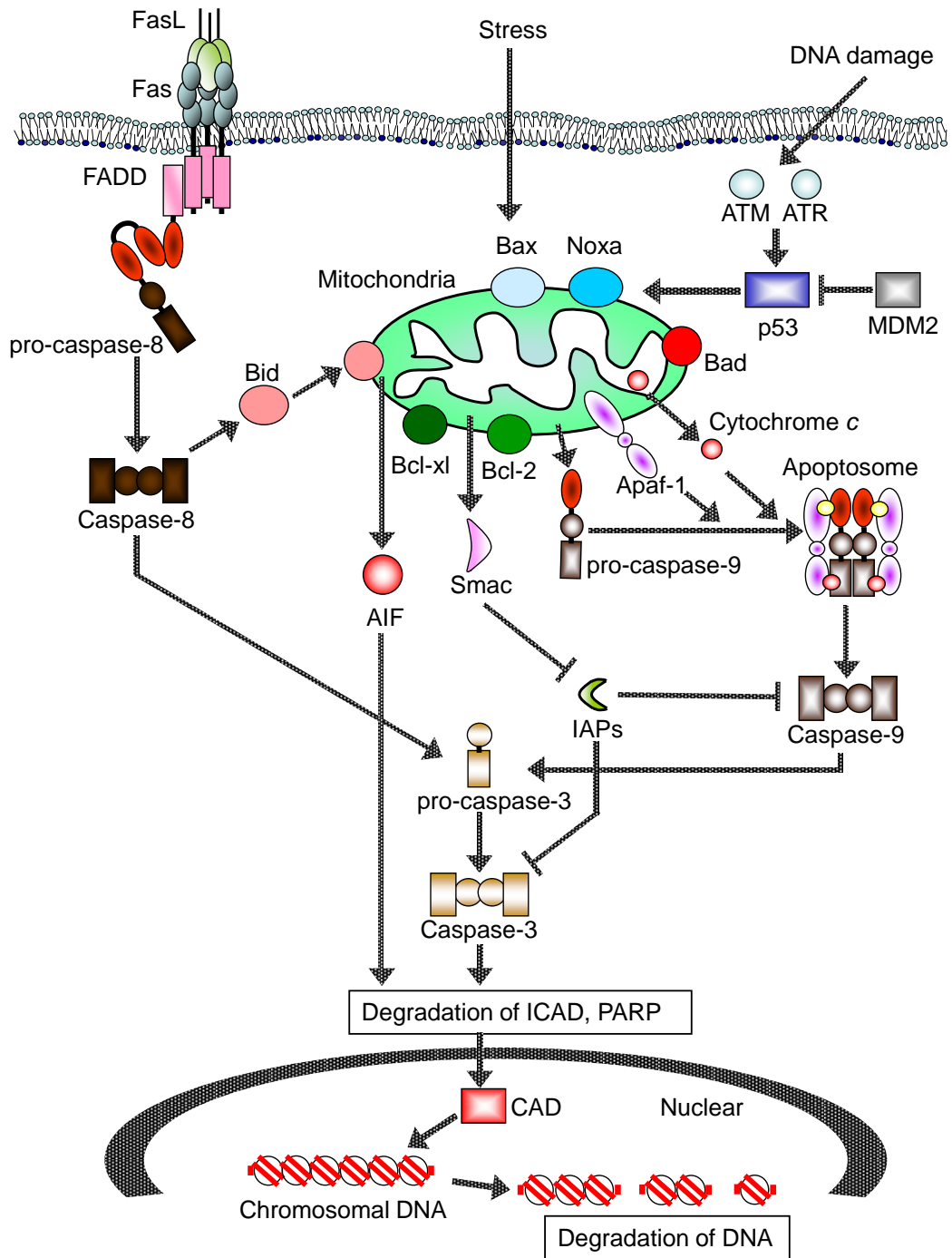


Fig. 1. Mechanism of Apoptosis Induction

先述したように、抗がん剤による細胞死誘導機構の多くはアポトーシスであることが知られているが、がん細胞では変異によりアポトーシスを回避する機構が働いており、アポトーシス抵抗性を示すものもあるため⁴⁸⁾、アポトーシス以外の細胞死へのアプローチも必要である。そこで近年、オートファジーを介した細胞死が注目されている。オートファジーとは、細胞が持つ、細胞内の不要な自己タンパク質の分解経路の一つであり、異常なタンパク質の蓄積防止や、飢餓状態での栄養確保を目的として行なわれている自食作用のことである (Fig. 2)。因みに、2016年に大隅良典氏 (東京工業大学名誉教授) がオートファジー研究の先駆者として、ノーベル生理学・医学賞を受賞した。オートファジーは細胞が持つ自己タンパク質分解経路のうち、主に長寿命タンパク質の分解を行っているリソソーム/液胞系に分類され、リソソーム内で加水分解されたタンパク質は、リソソームのトランスポーターから細胞質中へと放出され、アミノ酸プールに入り再利用される。また、現在までに考えられているリソソームへの細胞質タンパク質の輸送機構は、1) マクロオートファジー、2) ミクロオートファジー、3) Cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) 経路、4) シャペロン介在性オートファジー、5) ペキソファジーの 5 つに分類される。⁴⁹⁾ そのうちマクロオートファジーは、細胞質の一部がオートファゴソームと呼ばれる隔離膜によって取り囲まれることで 2 重膜構造を形成し、次にエンドソームと融合しながら成熟、最後にリソソームと融合することでオートリソソームとなり内容物を分解する。⁵⁰⁾ 隔離膜の形成は、Beclin-1 と PI3 Kinase class III の複合体が小胞膜上へ局在化し、下流で機能する PI3P 結合タンパク質のオートファゴソーム形成起点への局在化が誘導されることで生じる。さらに、Atg12-Atg5・Atg16L1 や LC3-II が隔離膜上に局在化し、隔離膜の伸長を促進することでオートファゴソームの形成に至る。p62 は、ユビキチン結合領域と LC3 結合領域を持つタンパク質であり、ユビキチン化された不要なタンパク質に結合し、オートファゴソーム膜状の LC3 へとリクルートし、自身もオートファジーの進行に伴い分解を受ける。

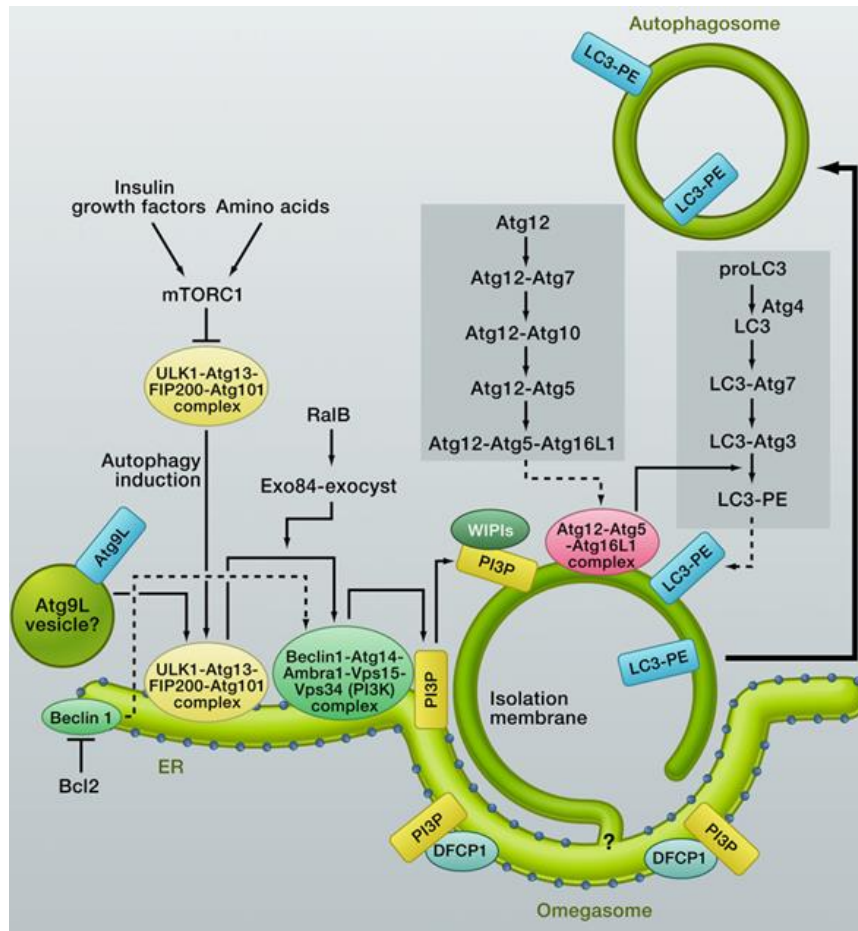
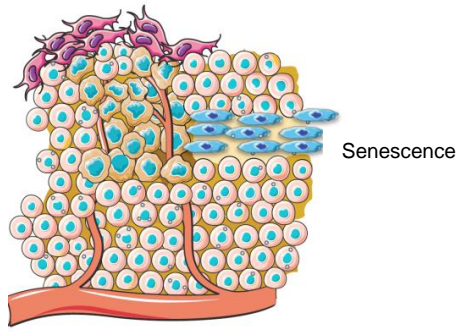


Fig. 2. Autophagosome Formation and Atg Proteins in Mammalian Cells⁵¹⁾

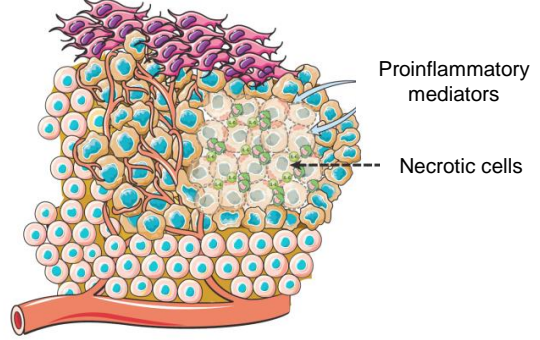
オートファジーはがんにおいて、促進効果と抑制効果の二面性を有することが知られている (Figs. 3, 4).⁵⁰⁾ オートファジー不全となった細胞では、ミトコンドリアの機能障害やゲノムの不安定化を引き起こし、腫瘍化が促進する。すなわち、オートファジーが亢進することで腫瘍化が抑制される。一方、ある程度の成長・進展を遂げた腫瘍組織内は低栄養・低血流状態であるために、腫瘍細胞はオートファジーを活性化させ、栄養不足を補っていることから、がんにおけるオートファジーの調節は重要である。実際に、マクロオートファジーの促進、または阻害を目的とした単独あるいは複数の化合物併用による治療戦略が各種細胞において検討され、一部では臨床試験が行われている。現在、臨床試験中のオートファジー誘導剤および抑制剤を Tables 1 および 2 に示す。⁵²⁾

(1) Functional autophagy



- ↑ Quality control
- ↑ Senescence

(2) Dysfunctional autophagy



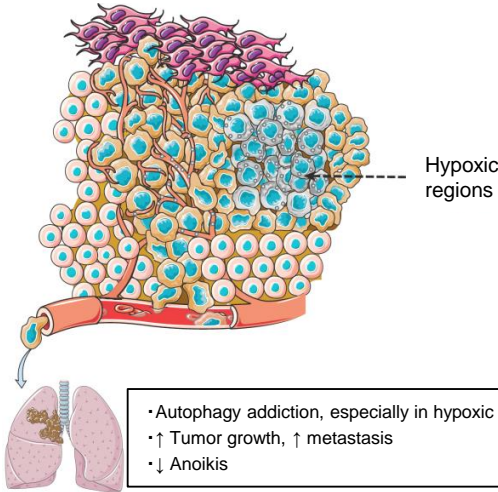
- ↑ ROS production, ↑ mitochondrial and DNA damages, ↑ genome instability
- ↑ p62 accumulation, ↑ protein-aggregates accumulation, ↑ Nrf2-ARE activity, ↑ proinflammatory NF-κB signaling, ↑ IL-6 production
- ↑ Macrophage infiltration
- ↑ Necrosis, when apoptosis is compromised

Key:

	Cancer Cell (CC)		Apoptotic CC		Senescent CC		Macrophage		Hypoxic/starved CC
	Hypoxic/starved ACC		Interleukin-6		Cancer-associated fibroblast (CAF)				

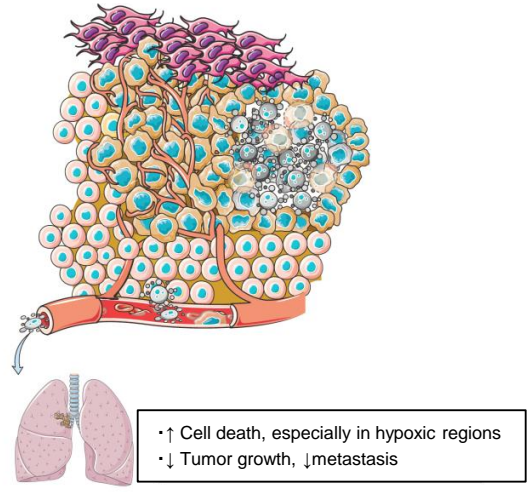
Fig. 3. Autophagy as Tumor Suppressor⁵⁰⁾

(1) Functional autophagy



- Autophagy addiction, especially in hypoxic regions
- ↑ Tumor growth, ↑ metastasis
- ↓ Anoikis

(2) Dysfunctional autophagy



- ↑ Cell death, especially in hypoxic regions
- ↓ Tumor growth, ↓ metastasis

Key:

	Cancer Cell (CC)		Apoptotic CC		Senescent CC		Macrophage		Hypoxic/starved CC
	Hypoxic/starved ACC		Interleukin-6		Cancer-associated fibroblast (CAF)				

Fig. 4. Autophagy as Tumor Promoter⁵⁰⁾

Table 1. Autophagy Inducers for Cancer Treatment ⁵²⁾

Compound	Target	Tumor type/cancer cell types
Temsirolimus (CCI-779)	mTORC1 inhibitors	Renal cancer ^a , Mantle cell lymphoma
Everolimus (RAD-001)	mTORC1 inhibitors	Renal cancer ^a , Acute lymphoblastic leukemia
Rapamycin	mTORC1 inhibitors	Glioma malignant, Chronic myeloid leukemia (CML) ^a
Imatinib (Gleevec)	Tyrosine kinase inhibitors; KIT	Gastrointestinal stromal tumor ^a and CML ^a
Dasatinib (Sprycel)	BCR-Abl, PDGFR and EGFR	Glioma
Erlotinib (Tarceva)	BCR-Abl, PDGFR and EGFR	Non-small cell lung cancer ^a
Bortezomib	Proteasome inhibitors	Multiple myeloma ^a
NPI-0052	Proteasome inhibitors	Prostate cancer
Vorinostat (Zolinza)	HDAC inhibitors	Cutaneous T-cell lymphoma ^a
Butyrate, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)	HDAC inhibitors	Multiple cancers, CML
Temozolomide (Temodar)	DNA alkylating agent	Glioblastoma, Metastatic melanoma ^a
GX15-070	Bcl2 inhibitor	Pancreatic carcinoma, Leukemia
Resveratrol	Antioxidant	Ovarian cancer

Table 2. Autophagy Inhibitors for Cancer Treatment ⁵²⁾

Compound	Target	Tumor type/cancer cell types
3-Methyladenine (3-MA)	Class III PI3 kinase inhibitor	Colorectal cancer
Chloroquine	Lysosomal pH	Malaria ^a , Breast cancer, Prostate cancer, Glioma Lymphoma
Hydroxychloroquine	Lysosomal pH	Malaria, Lupus, Rheumatoid arthritis ^a , Breast cancer
Monensin	Lysosomal pH	Glioma malignant
Bafilomycin A ₁	Vacuolar-ATPase	Glioma malignant, Breast cancer
Pepstatin A	Lysosomal protease (cathepsin inhibitor)	Cervical cancer

シクロデキストリン (CyD : Fig. 4) 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。⁵³⁻⁵⁶⁾ 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、油状あるいは低融点物質の粉体化、揮散性の防止、苦味・悪臭および局所刺激性の軽減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。⁵⁷⁻⁶⁰⁾ 一方、最近では天然 CyDs の機能をさらに高めた種々の CyDs 誘導体が開発され、CyDs 単独でも薬理作用を示すことが分かってきている。例えば、CyDs の水酸基をヒドロキシプロピル化し、 β -CyD の水溶性を高めた 2-ヒドロキシプロピル- β -CyD (HP- β -CyD) は、薬物の溶解性やバイオアベイラビリティの改善に最も広く用いられている誘導体である。⁶¹⁾ さらに、2009 年 3 月より、HP- β -CyD が脂質蓄積病であるニーマンピック病 C 型 (NPC) モデルマウスへの皮下投与により HP- β -CyD の NPC への有効性が証明されたことから、⁶²⁾ アメリカで双子の NPC 患者において人道的臨床応用が開始され、現在日本でも佐賀大医学部附属病院、奈良県立医科大学、自治医科大学附属さいたま医療センターにおいて、NPC 患者に対する HP- β -CyD の脳室内投与が行われている。

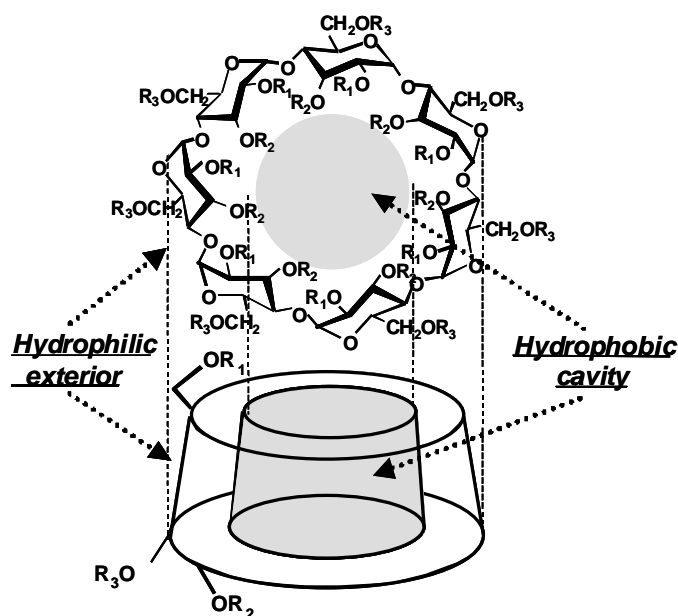


Fig. 4. Structure of β -CyDs

CyDs は空洞径に応じて種々のゲスト分子と包接複合体を形成する。例えば、プロスタグランジン (PG) をゲスト分子として例をあげると、空洞径の小さな α -CyD は PG の ω 鎖を優位に包接し、空洞径の大きな β -CyD は五員環部分と強く相互作用する。さらに、空洞径が大きな γ -CyD は PG 分子全体を緩く包接することが知られている。このような CyDs の包接特性は細胞膜との相互作用においても認められ、 α -CyD はリン脂質、 β -CyD はコレステロールと強く相互作用し、これらの脂質成分を細胞膜から引き抜き、高濃度では赤血球の溶血や生体膜の膜透過性変化を惹起するなど細胞障害性を有することが知られている。⁶³⁾ 最近、分子生物学や細胞生物学の分野において、 β -CyD や methyl- β -CyD (M- β -CyD) が、細胞膜上の脂質マイクロドメインであるリピッドラフトからコレステロールを引き抜くことにより、EGF (epithelial growth factor) receptor や Fc ϵ receptor I からのシグナル伝達を変化させることなど、リピッドラフト画分のコレステロールの役割を解明する研究に広く利用されている (Fig. 5)。⁶⁴⁾ このリピッドラフト画分には、種々のタンパク質が濃縮されており、Src ファミリーチロシンキナーゼをはじめ、Ras、G タンパク質 α サブユニット、プロテインキナーゼ C、GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型タンパク質などが局在することが報告されている。⁶⁵⁻⁶⁷⁾ 近年、FasL/Fas 系によるアポトーシス誘導や、TNF/TNFR 系による NF- κ B (nuclear factor κ B) の活性化がリピッドラフトを介すること、⁶⁸⁻⁷⁰⁾ Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス誘導因子 Bad がリピッドラフトに局在することが報告されている。⁷¹⁾ またこれまでに、 β -CyD や M- β -CyD をラットの静脈内に多量投与することにより、ネクローシス様の腎障害が誘導されることが報告されている。^{72,73)} しかしながら、CyDs の障害性によって起こる細胞死がアポトーシスか否かに関する詳細な検討はほとんど行われていない。

このような背景のもと、本論文の第 1 章では、M- β -CyD の殺細胞効果とそのアポトーシス誘導機構について検討した。

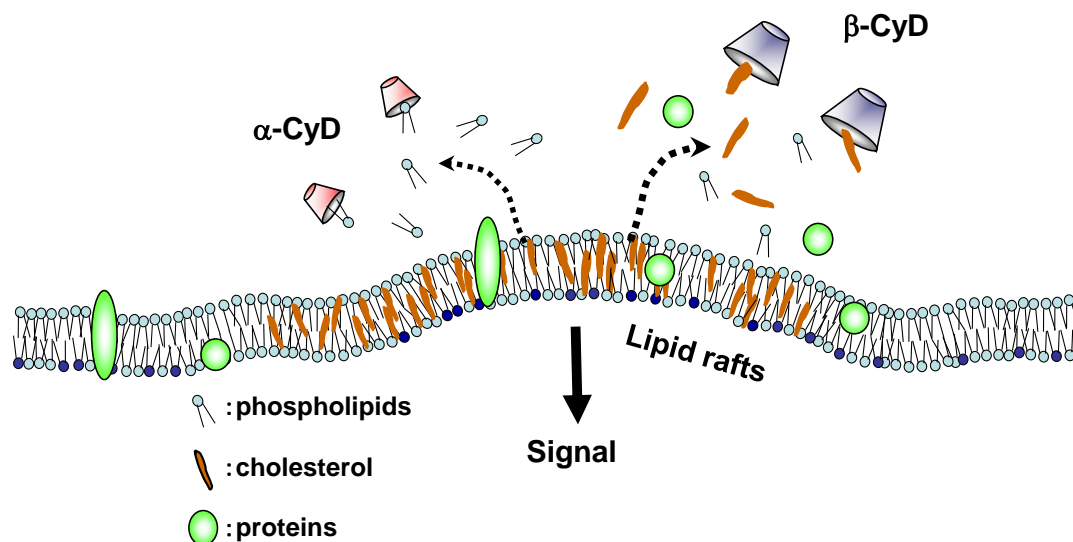


Fig. 5. Interaction of CyD with Phospholipids or Cholesterol

一方、Grosse らは、担がんマウスにおいて M-β-CyD を腹腔内に単独投与 (800 mg/kg) すると、DOX 単独投与系 (2 mg/kg) より高い抗腫瘍効果を示すことを報告した。⁷⁴⁾ これらのことより、M-β-CyD はリピッドラフトを介した抗腫瘍活性を有する新規抗がん剤として有用であると考えられる。そこで当研究室では、M-β-CyD の腫瘍選択性の向上を企図し、リガンドとして FA を修飾した FA-M-β-CyD (Fig. 6) を新規に調製し、その有用性を評価した。その結果、FA-M-β-CyD は *in vitro* において FR-α 高発現細胞選択的に取り込まれ、強力な抗腫瘍効果を有することが示された。^{75, 76)} また、マウス結腸がん由来細胞株である Colon-26 細胞 (FR-α (+)) を同種移植した担がんマウスに FA-M-β-CyD を静脈内に単回投与したところ、優れた抗腫瘍効果が誘導された。⁷⁶⁾ さらに、*in vitro* において、KB 細胞 (FR-α (+)) に 5 mM FA-M-β-CyD を 2 時間処理したところ、オートファゴソームマーカーである LC3 の発現が上昇したことから、FA-M-β-CyD の殺細胞効果にオートファジーが関与することが示唆された。⁷⁷⁾ しかしながら、FA-M-β-CyD オートファジー誘導機構の詳細は明らかになっていない。

そこで第 2 章では、FA-M-β-CyD の腫瘍細胞選択的新規抗がん剤の細胞死誘導メカニズムを明らかにするため、以下の検討を行った。まず、FA-M-β-CyD による抗腫瘍活性誘導機構の解明を企図して、ヒト口腔がん由来株化細胞である KB 細胞 (FR-α (+)) を用いて *in vitro* におけるオートファジー誘導能について検討した。さらに、これまで未検討であった KB 細胞 (FR-α (+)) を異種移植した担がんマウスを作製し、

FA-M-β-CyD を静脈内単回投与後の抗腫瘍活性を腫瘍体積、体重変化および生存率を指標に評価した。なお、本研究で用いた CyDs の構造を Table 3 に示す。

以下に本研究において得られた知見を詳述する。

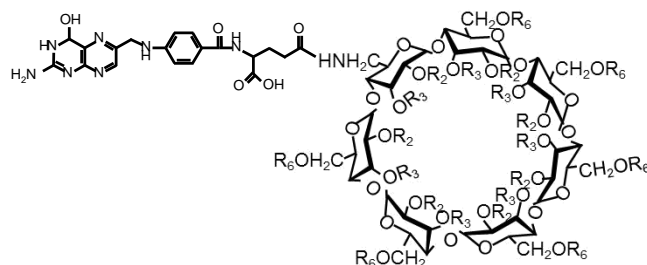
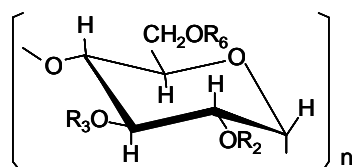


Fig. 6. Chemical Structure of FA-M-β-CyD

Table 3. Chemical Structures of CyD Derivatives Used in This Study



Compound	Abbreviation	R	DS ¹⁾
α-Cyclodextrin	α-CyD	H	-
β-Cyclodextrin	β-CyD	H	-
γ-Cyclodextrin	γ-CyD	H	-
Methyl-β-cyclodextrin	M-β-CyD	H or CH ₃	12.2
2,6-Di-O-methyl-α-cyclodextrin	DM-α-CyD	R ₂ , R ₆ = CH ₃ , R ₃ = H	12
2,6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin	DM-β-CyD	R ₂ , R ₆ = CH ₃ , R ₃ = H	14
2,3,6-Tri-O-methyl-β-cyclodextrin	TM-β-CyD	R ₂ , R ₃ , R ₆ = CH ₃	21
2-Hydroxypropyl-α-cyclodextrin	HP-α-CyD	[CH ₂ CH(CH ₃)O] _x H (x=0, 1, 2, ⋯)	4.1
2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin	HP-β-CyD	[CH ₂ CH(CH ₃)O] _x H (x=0, 1, 2, ⋯)	4.8
Sulfobutyl ether-β-cyclodextrin	SBE7-β-CyD	H or (CH ₂) ₄ SO ₃ Na	6.2
Folate-appended methyl-β-cyclodextrin	FA-M-β-CyD	H or CH ₃ or FA	12.2 (1) ²⁾

1) The average degree of substitution.

2) The average degree of substitution of folic acid.

第 1 章 メチル化 β -シクロデキストリン (M- β -CyDs) の殺細胞効果とその機構解明

第 1 節 序

環状マルトオリゴ糖である CyD は、分子内に疎水性の空洞を有し、空洞径に応じて種々のゲスト分子を取り込んで包接複合体を形成する。薬剤学・製剤学領域では、CyDs の包接作用を利用して、不安定な医薬品の安定化、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ている。しかしながら、CyDs は高濃度において細胞膜上の脂質成分であるコレステロールやリン脂質と相互作用して細胞膜成分を漏出させることにより、赤血球の溶血や膜透過性変化を惹起することが知られている。⁶³⁾ また、 β -CyD や M- β -CyD をラットの静脈内に多量投与すると、ネクロシス様の腎障害が誘導されることが報告されているが、^{72, 73)} CyDs の障害性によって起こる細胞死がアポトーシスか否かに関する詳細な検討はほとんど行われていない。^{78, 79)} そこで本章では、CyDs による各種細胞に対する細胞死がアポトーシス誘導か否かについて検討を行った。まず、本章第 2 節では、各種細胞に対する CyDs の細胞障害性を WST-1 法により評価した。また、第 3 節および第 4 節では DNA 断片化、クロマチンの凝縮、PS の細胞膜外層への露出を指標に、CyDs の細胞障害性がアポトーシスか否かについて検討した。さらに、メチル化 β -CyDs の中で最もアポトーシス誘導能の高かった DM- β -CyD に焦点を当ててアポトーシス誘導機構の解明を企図した。第 5 節では、NR8383 細胞の細胞膜脂質成分の漏出に及ぼす CyDs の影響について検討した。第 6 節および第 7 節では、細胞のアポトーシス誘導シグナルに深く関与している PI3K-Akt 経路、MAPK 経路および p53 経路に及ぼす DM- β -CyD の影響について検討した。さらに、第 8 節および第 9 節では、DM- β -CyD 誘導アポトーシスへのミトコンドリアの関与と caspase-3 の活性化について検討した。

第 2 節 M- β -CyDs による細胞障害性

膜が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細胞内酵素により発色させる方法 (MTT assay) と、細胞に存在する種々のタンパク質が細胞外へ放出される量を測定する方法 (LDH 法) がよく知られている。⁸⁰⁾

本節では、MTT assay の改良法である還元型発色試薬 WST-1 をラットマクロファージ様株化細胞である NR8383 細胞、ヒト肺上皮がん細胞 A549 細胞、ヒト急性 T 細胞性白血病細胞 Jurkat 細胞に処理後の細胞上清の吸光度変化を測定し、各種 CyDs 誘導体の細胞膜に対する障害性を評価した。その際、膜障害性の強い非イオン性界面活性剤 Tween 20 を positive control に使用した。Fig. 7A および 7B はそれぞれ、各濃度の CyDs を 24 時間処理後の NR8383 細胞および A549 細胞の生存率を WST-1 法により求めた結果を示す(未処理の細胞の生存率を 100% とした)。Fig. 7C は各濃度の CyDs を 4 時間処理後の Jurkat 細胞の生存率を示す。NR8383 細胞において DM- β -CyD および TM- β -CyD は 1 mM 以上で生存率を低下させ、5 mM で完全に死滅させた (Fig. 7A)。DM- α -CyD および M- β -CyD はそれぞれ 2 mM, 5 mM で生存率を約 50% 程度低下させ、10 mM で完全に死滅させた。一方、HP- α -CyD および HP- β -CyD は 10 mM においても生存率を低下させなかった。A549 細胞において DM- β -CyD は 1 mM 以上で生存率を低下させ、3 mM で完全に死滅させた (Fig. 7B)。一方、HP- β -CyD は 10 mM においてもほとんど生存率を低下させなかった。また Jurkat 細胞において DM- β -CyD は 2 mM で完全に死滅させ、HP- β -CyD は 5 mM においても生存率を低下させなかった (Fig. 7C)。なお、CyDs の低濃度領域で観察されたデヒドロゲナーゼ活性の増大は、障害性発現の前段階におけるミトコンドリア中の酵素活性の上昇に起因するものと考えられる。以上の結果から、メチル化 CyDs は NR8383 細胞、A549 細胞、Jurkat 細胞に細胞死を誘導することが明らかとなった。以下の節ではこの細胞死がアポトーシスであるか否かについて検討した。

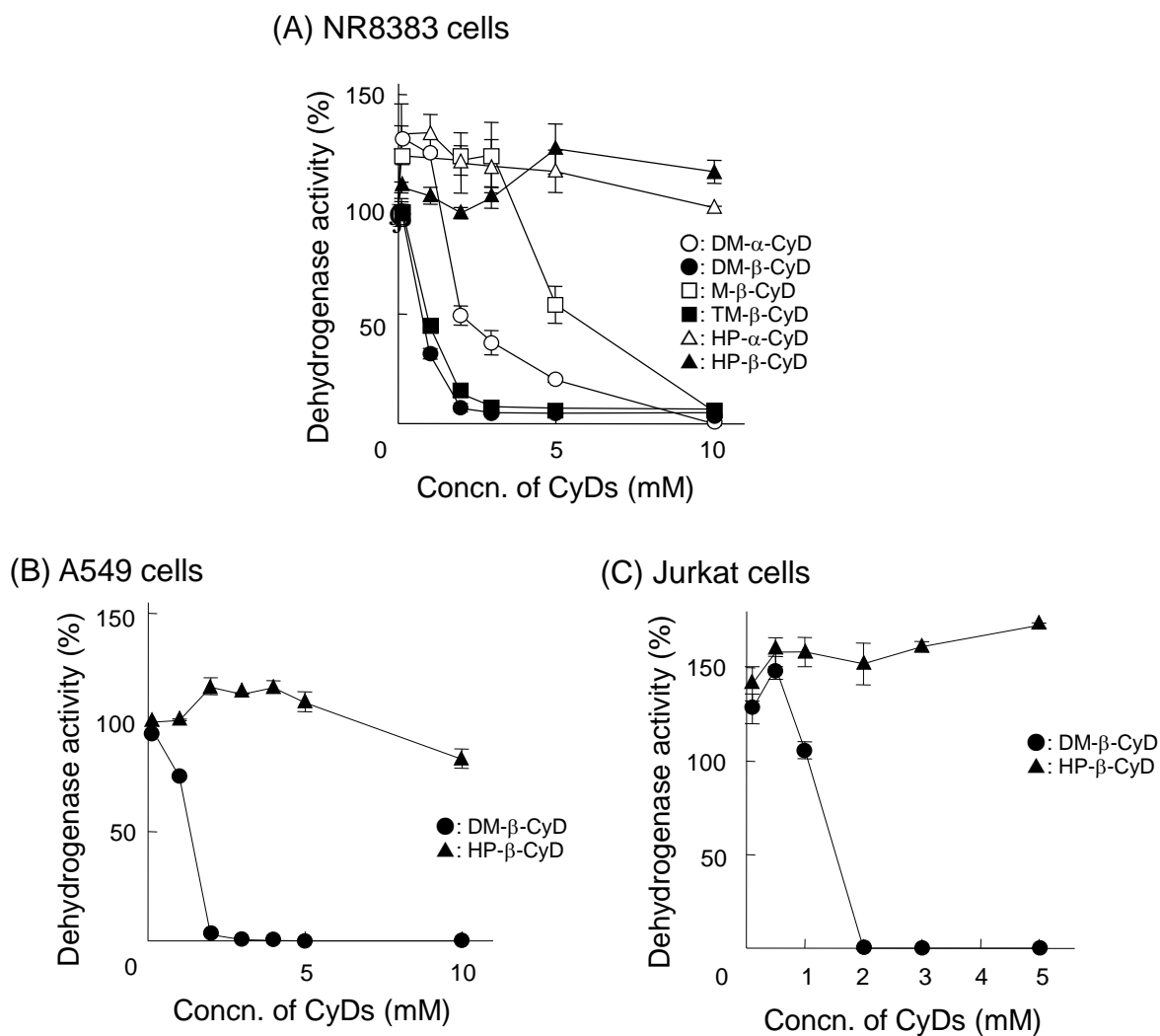


Fig. 7. Cytotoxicity of CyDs in NR8383 Cells (A), A549 Cells (B) and Jurkat Cells (C)

NR8383 cells (A) and A549 cells (B) were incubated with medium containing CyDs (0-10 mM) for 24 hr at 37°C. After washing twice with HBSS, cell viability was assayed by WST-1 method. Jurkat cells (C) were incubated with medium containing CyDs (0-5 mM) for 4 hr at 37°C. Then, cell viability was assayed by WST-1 method. Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第 3 節 M-β-CyDs によるアポトーシス誘導

第 1 項 DNA の断片化

Fig. 8 は DM-β-CyD で 24 時間処理した NR8383 細胞をヨウ化プロピジウム (PI) で染色後、DNA 含量をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。PI は、膜構造が保たれている場合には細胞膜を通過できないが、エタノール処理等で膜透過性を上昇させると細胞内に入り核内に移行し DNA の二重らせんに intercalate して蛍光を発するため、蛍光強度から DNA 含量をフローサイトメトリーで捉えることができる。また、アポトーシスが誘導され DNA が断片化した細胞をエタノール処理などで膜透過性を上昇させると、断片化された DNA は細胞から漏出するため DNA 含量が低下した細胞をアポトーシス細胞と見なすことができる。実際、5 mM DM-β-CyD で 24 時間処理した NR8383 細胞では、蛍光強度の低い細胞、すなわち DNA 含量が G₀ あるいは G₁ 期の細胞より低く検出された細胞の割合は未処理コントロールのものと比較して 90.1% の細胞に DNA 含量の低下が認められた (Fig. 8)。

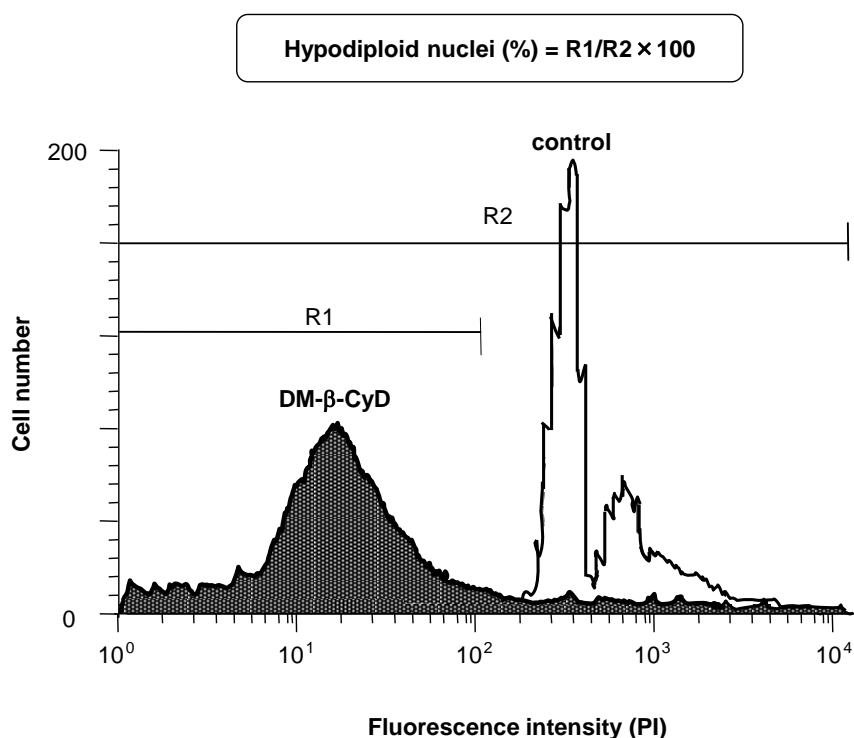


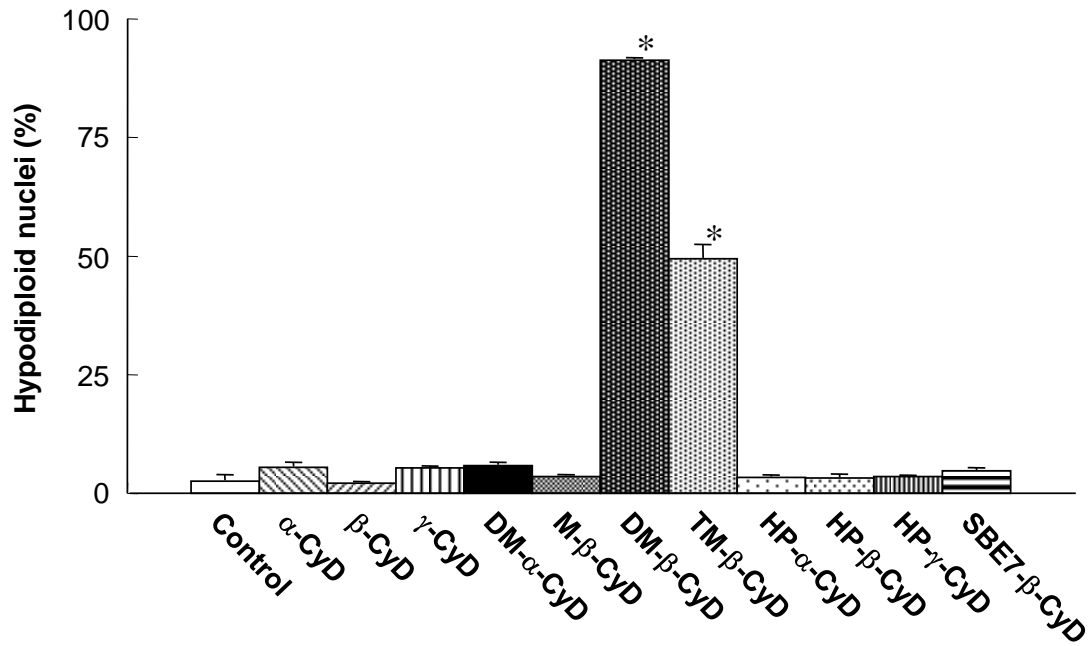
Fig. 8. Flow Cytometric Analysis of DNA Content in NR8383 Cells

NR8383 cells were treated with DM-β-CyD (5 mM). After incubation for 24 hr, cells were stained by PI, and the percentage of cells showing DNA degradation was quantified by flow cytometry.

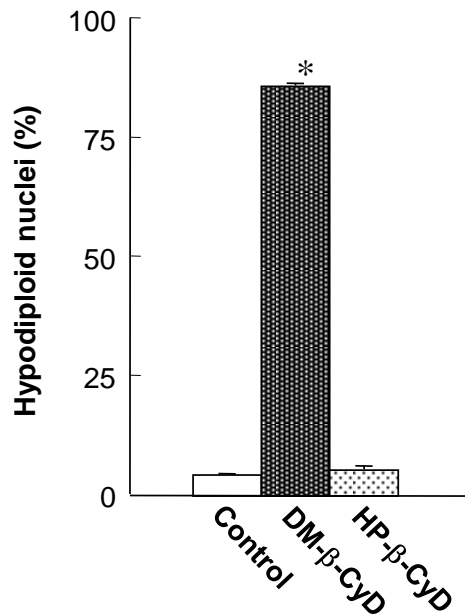
Fig. 9A は NR8383 細胞に 5 mM の CyDs を 24 時間処理し、PI で染色後、フローサイトメトリーにより DNA 含量を測定し、アポトーシスの誘導を評価した結果を示す。 Fig. 7 の細胞障害性の結果から細胞を完全に死滅させる条件で DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理を行うと、DNA 含量が低下した細胞の割合がそれぞれ 90.1%, 49.1% まで増大した。一方、約 80% の細胞障害性を示した DM- α -CyD 処理では、DNA 含量の低下した細胞の割合は未処理の場合と同程度であった。また、HP- α -CyD および HP- β -CyD 処理では細胞障害性を示さず DNA 含量の低下は認められなかった。同様に細胞障害性の低いことが報告されている HP- γ -CyD および SBE7- β -CyD 処理でも DNA 含量の低下は認められなかった。Fig. 9B, 9C に示すように DM- β -CyD 処理による DNA 含量の低下した細胞の増加は、A549 細胞および Jurkat 細胞においても観察された。

アポトーシス細胞から DNA を抽出しアガロースゲル電気泳動を行うと、DNA 断片化に伴いオリゴヌクレオソーム単位 (約 180 塩基対) の整数倍の DNA ladder のバンドが検出されることが知られている。³⁵⁾ Fig. 10A は 5 mM CyDs で 24 時間処理した NR8383 細胞を可溶化後、RNase, proteinase 処理し、アガロースゲル電気泳動を行った結果を示す。 α -CyD, β -CyD, DM- α -CyD, M- β -CyD, HP- α -CyD および HP- β -CyD で 24 時間処理した NR8383 細胞においては CyD 未処理のコントロールと同様に DNA ladder が検出されなかった。一方、DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理した NR8383 細胞では、DNA ladder が検出され、DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理により DNA の断片化が起こっていることが確認された。DM- β -CyD 処理による DNA の断片化は、A549 細胞においても観察された (Fig. 10B)。

(A) NR8383 cells



(B) A549 cells



(C) Jurkat cells

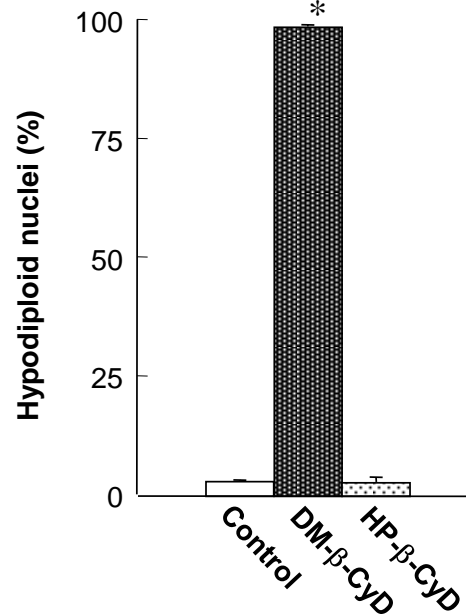
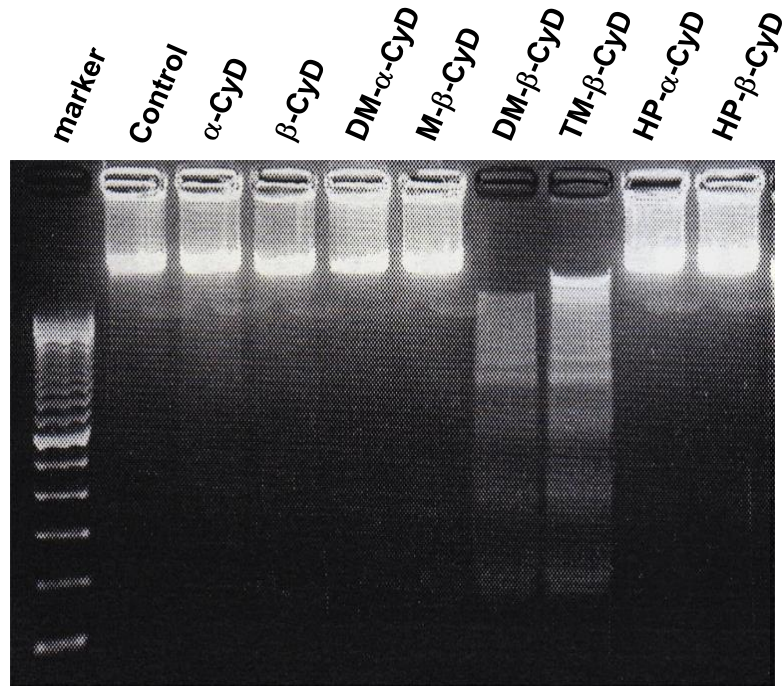


Fig. 9. Flow Cytometric Analysis of DNA Content in NR8383 Cells (A), A549 Cells (B) and Jurkat Cells (C) Treated with CyDs

NR8383 cells (A) and A549 cells (B) were incubated with medium containing CyDs (5 mM) for 24 hr at 37°C. After incubation, cells were stained by PI, and the percentage of cells showing DNA degradation was quantified by flow cytometry. Jurkat cells (C) were incubated with medium containing CyDs (5 mM) for 4 hr at 37°C. After incubation, cells were stained by PI, and the percentage of cells showing DNA degradation was quantified by flow cytometry. Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

(A) NR8383 cells



(B) A549 cells

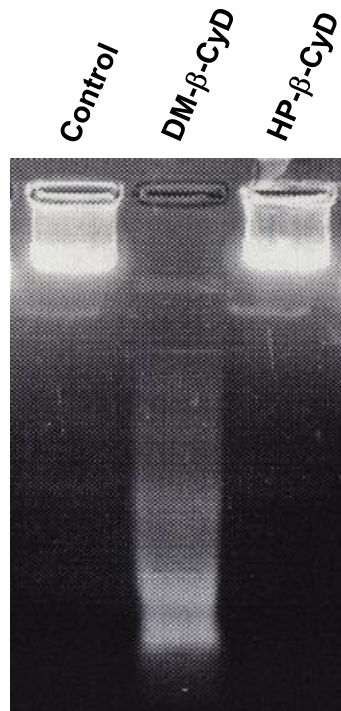
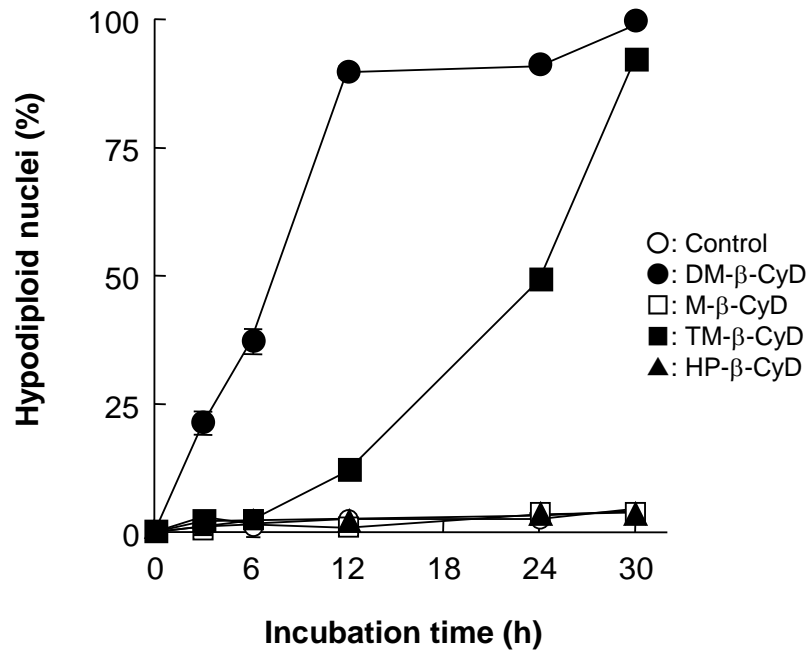


Fig. 10. Agarose Gel Electrophoresis of DNA Extracted from NR8383 Cells (A) and A549 Cells (B) Treated with CyDs

NR8383 cells (A) and A549 cells (B) were incubated with medium containing CyDs (5 mM) for 24 hr at 37°C. After incubation, cells were lysed, and then analyzed DNA fragmentation by gel electrophoresis.

Fig. 11 は NR8383 細胞 (A) およびマウスマクロファージ様株化細胞 RAW264.7 細胞 (B) の DNA 含量に及ぼす CyDs 処理時間の影響を示す。なお 処理濃度は 5 mM とした。DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理した NR8383 細胞において時間依存的に DNA 含量の低下した細胞の割合が増加した (Fig. 11A)。一方、M- β -CyD および HP- β -CyD 処理した NR8383 細胞では 30 時間後においても DNA の含量低下は認められなかった。また、DM- β -CyD 処理した RAW264.7 細胞では 36 時間後まで時間依存的に DNA 含量の低下した細胞の割合が増加した (Fig. 11B)。DM- β -CyD 処理による時間依存的な DNA 断片化の誘導は NR8383 細胞における DNA ladder のバンドからも確認された (Fig. 12)。

(A) NR8383 cells



(B) RAW264.7 cells

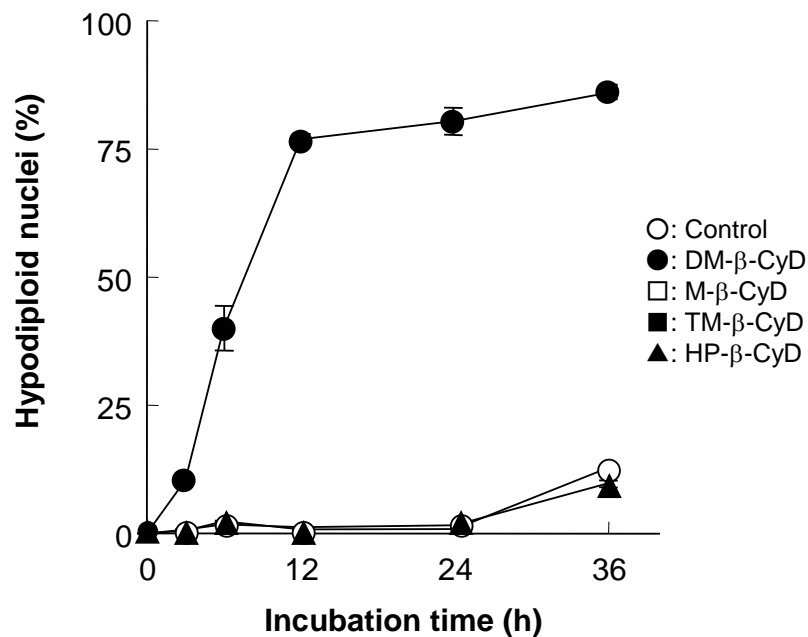


Fig. 11. Time-dependent Effects of β-CyDs on Apoptosis of NR8383 Cells (A) and RAW264.7 Cells (B)

NR8383 cells (A) and RAW264.7 cells (B) were incubated with medium containing CyDs (5 mM) for indicated time at 37°C. After incubation, cells were stained by PI, and the percentage of cells showing DNA degradation was quantified by flow cytometry. Each point represents the mean ± S.E. of 3 experiments.

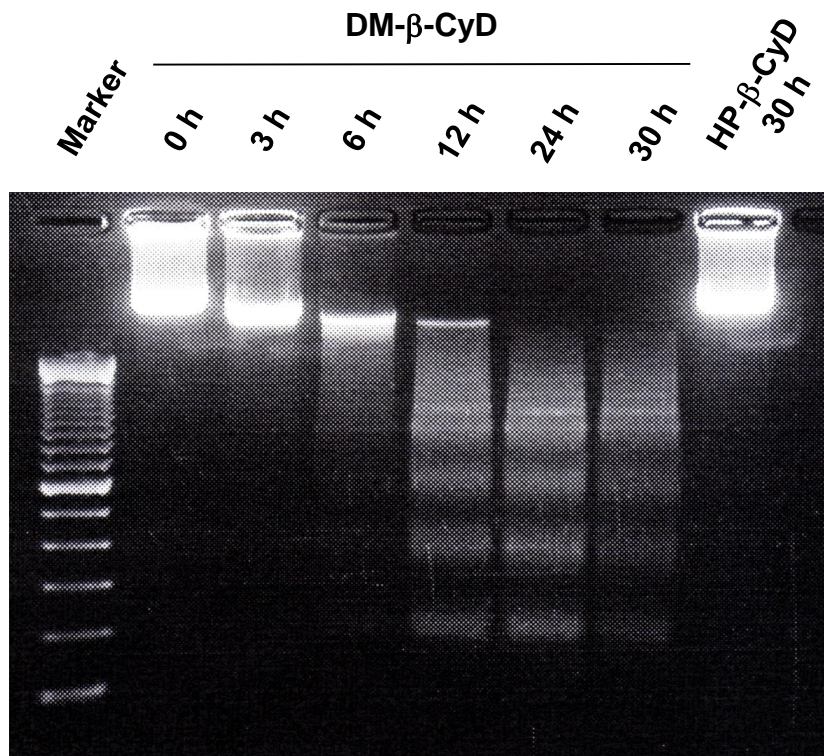


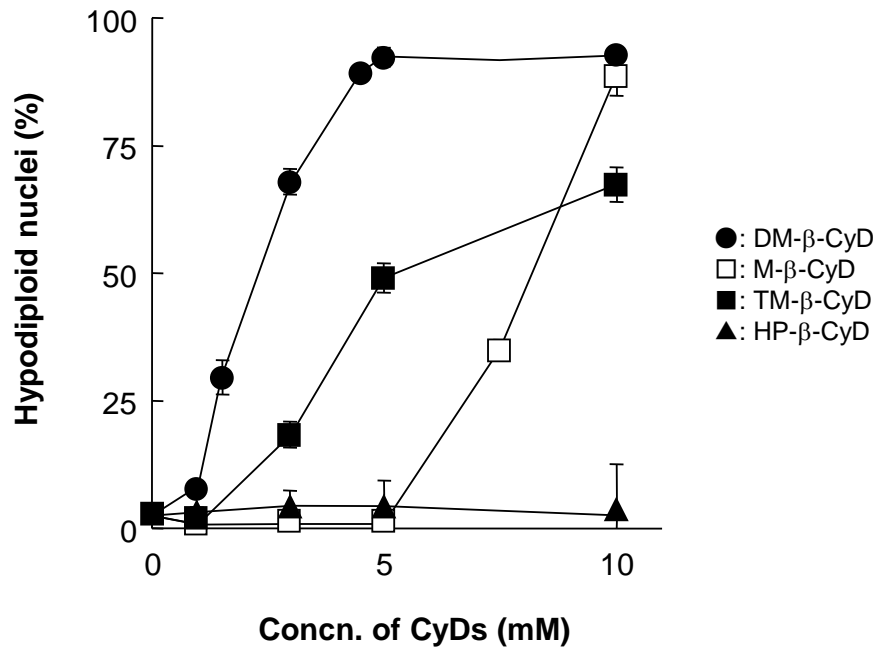
Fig. 12. Time-dependent Effect of β -CyDs on Apoptosis of NR8383 Cells

NR8383 cells were incubated with medium containing β -CyDs (5 mM) for indicated time at 37°C. After incubation, cells were lysed, and then analyzed DNA fragmentation by gel electrophoresis.

Fig. 13 は NR8383 細胞 (A) および RAW264.7 細胞 (B) の DNA 含量に及ぼす CyDs 濃度の影響を示す。なお処理時間は 24 時間とした。M- β -CyD, DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理した NR8383 細胞において濃度依存的に DNA 含量の低下した細胞の割合が増加した (Fig. 13A)。一方、HP- β -CyD 処理した NR8383 細胞では 10 mM でも DNA 含量の低下は認められなかった。また、DM- β -CyD 処理した RAW264.7 細胞においても濃度依存的に DNA 含量の低下した細胞の割合が増加した (Fig. 13B)。DM- β -CyD 処理による濃度依存的な DNA 断片化の誘導は NR8383 細胞における DNA ladder のバンドからも確認された (Fig. 14)。

以上の結果から、メチル化 β -CyDs は NR8383 細胞、A549 細胞、Jurkat 細胞に DNA の断片化を誘導することが明らかとなった。

(A) NR8383 cells



(B) RAW264.7 cells

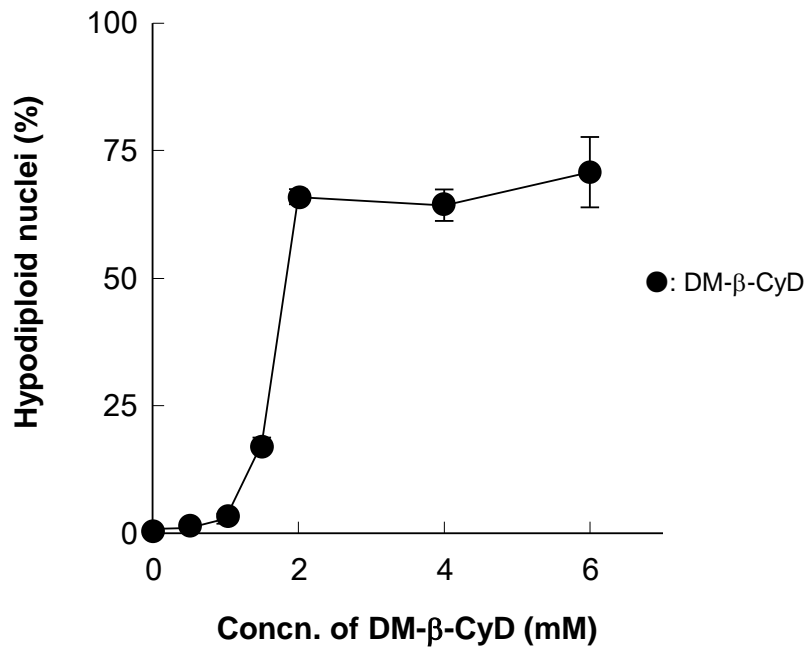


Fig. 13. Concentration-dependent Effects of β -CyDs on Apoptosis of NR8383 Cells (A) and RAW264.7 Cells (B)

NR8383 cells (A) and RAW264.7 cells (B) were incubated with medium containing β -CyDs at indicated concentration for 24 hr at 37°C. After incubation, cells were stained by PI, and the percentage of cells showing DNA degradation was quantified by flow cytometry. Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

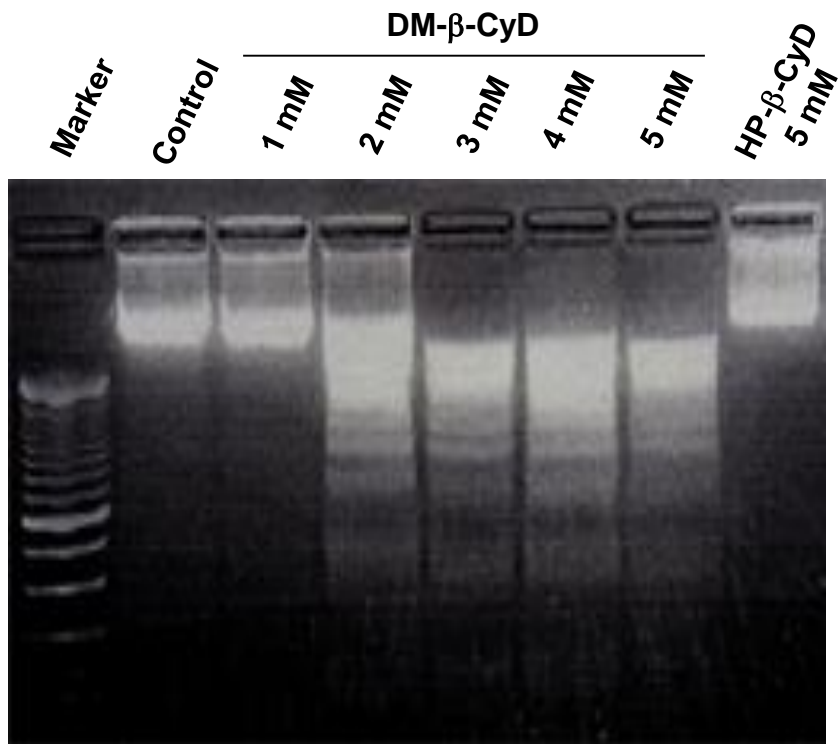


Fig. 14. Concentration-dependent Effect of β -CyDs on Apoptosis of NR8383 Cells

NR8383 cells were incubated with medium containing CyDs at indicated concentration for 24 hr at 37°C. After incubation, cells were lysed, and then analyzed DNA fragmentation by gel electrophoresis.

第 2 項 細胞の形態学的変化

Fig. 15A は NR8383 細胞を 5 mM CyDs で 24 時間処理後、DNA 結合性蛍光色素である Hoechst 33342 で染色し、アポトーシス細胞の形態学的特徴の一つであるクロマチンの凝縮を蛍光顕微鏡で観察したものである。また、Fig. 15B は細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した結果を示す。M- β -CyD および HP- β -CyD で NR8383 細胞を処理すると、CyD 未処理の場合と同様に網目状のクロマチン DNA の構造が認められ、クロマチンの凝縮像は観察されなかった (Fig. 15A)。これに対して、DM- β -CyD および TM- β -CyD で処理したものは濃染、小球状の像が観察され、クロマチンの凝縮像が認められた (Fig. 15A)。また、位相差顕微鏡観察の結果から、DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理した場合のみ細胞の縮小が認められた (Fig. 15B)。以上の結果から、DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理によりアポトーシス細胞の形態学的変化の特徴である核クロマチンの凝縮が誘導されることが明らかとなった。

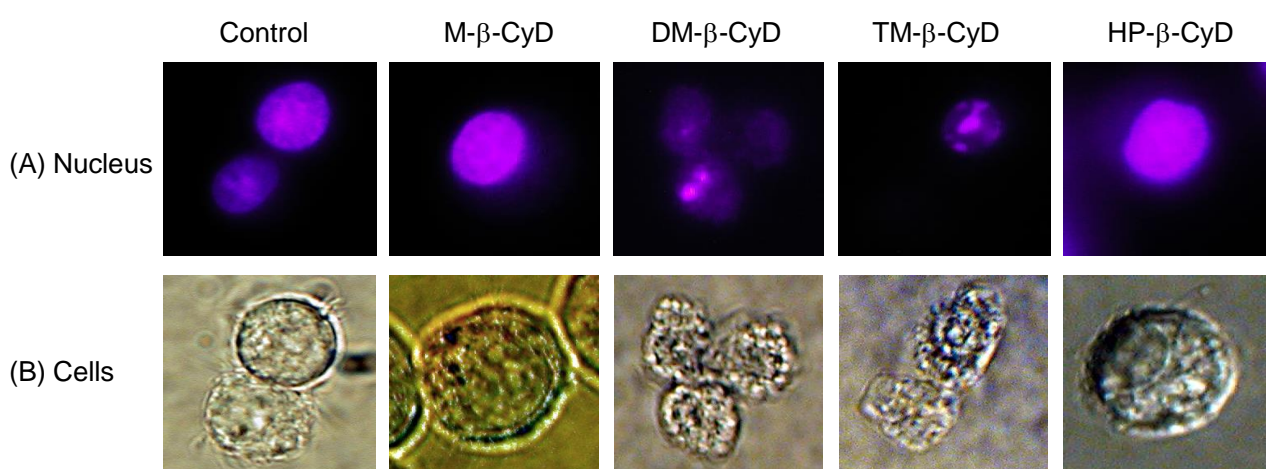


Fig. 15. Fluorescence (A) and Phase Contrast (B) Micrographs of NR8383 Cells Treated with β -CyDs

NR8383 cells were incubated with medium containing β -CyDs (5 mM) for 24 hr at 37°C. After incubation, cells were stained by Hoechst 33342, and condensations of chromatin were detected by fluorescence microscope. The left panels and right panels show fluorescence micrographs (A), phase contrast images (B), respectively.

第 3 項 細胞膜構造の変化

正常細胞の細胞膜ではリン脂質の多くが細胞膜脂質二重層間で非対称に存在しており、細胞膜を構成するリン脂質の一種である PS の大部分は細胞膜脂質二重層の内層に局在している。このようなリン脂質の非対称性は膜に存在するアミノリン脂質転移酵素やスクランブラーゼなどの複数の酵素の働きにより維持されている。アポトーシス細胞の特徴の一つに細胞膜構造の変化があり、アポトーシスの早期には細胞膜リン脂質の非対称性が失われ、アミノリン脂質転移酵素の不活性化およびスクランブラーゼの活性化により膜の構造を保持したままで PS が細胞膜外層に露出することが報告されている。⁸¹⁾ AnnexinV は、プロトロンビン活性の阻害、⁸²⁾ ホスホリパーゼ A₂ 活性の阻害、⁸³⁾ プロテインキナーゼ C の機能阻害⁸⁴⁾ などの生理活性を有するアミノ酸 320 個からなるタンパク質である。⁸⁵⁾ また、カルシウム存在下で PS に高い親和性を有していることから、アポトーシスの誘導に伴い細胞膜外層に露出した PS を検出するのに極めて有用な分子である。⁸⁶⁾

蛍光色素 FITC 標識 AnnexinV (AnnexinV-FITC) と PI を用いて細胞を染色すると、アポトーシス初期の細胞では、AnnexinV-FITC は細胞膜外層に露出した PS と結合するが、細胞膜構造は保たれているため、PI の細胞内への侵入や DNA との結合は起こらず、FITC の蛍光強度の増大のみが観察される。一方、アポトーシス後期およびネクローシスを起こした細胞では、細胞膜の構造が崩壊することが知られており、PI は細胞内に侵入し DNA と結合する。また AnnexinV-FITC は細胞膜外層の PS と結合するため FITC と PI の両方の蛍光強度が増大することから、初期のアポトーシスと後期のアポトーシスおよびネクローシスをフローサイトメトリーで区別することができる。そこで、AnnexinV-FITC と PI を用いて初期アポトーシスについて検討した。その結果、DM- α -CyD および HP- β -CyD で処理した NR8383 細胞では、AnnexinV-FITC の蛍光強度が CyD 未処理の場合と同程度で、PS の細胞膜外層への露出は観察されなかった (Fig. 16A)。また、Fig. 16B は Fig. 16A に示す FITC (+)/PI (-) の領域に存在する細胞の割合を棒グラフで示したものである。 Fig. 16B に示すように、M- β -CyD, DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理により、FITC (+)/PI (-) 領域に存在する細胞の割合はそれぞれ約 30%, 65%, 64% でありコントロールに比べて著しく高い値を示した。このことから、メチル化 β -CyDs 処理は NR8383 細胞にアポトーシスを誘導することが示唆された。

Fig. 17 は RAW264.7 細胞における PS の細胞膜外層への露出に及ぼす

DM-β-CyD 処理時間の影響を示す。DM-β-CyD 処理した RAW264.7 細胞において処理時間依存的に、PS が細胞膜外層へ露出した細胞の割合が増大した。

以上の結果から、メチル化 β-CyDs による細胞死はアポトーシスであることが明らかとなった。

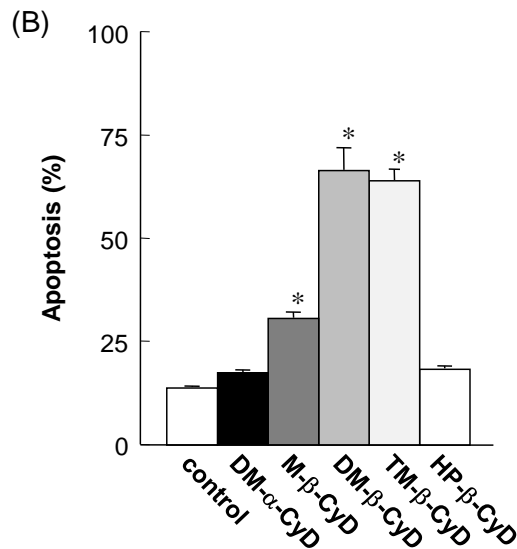
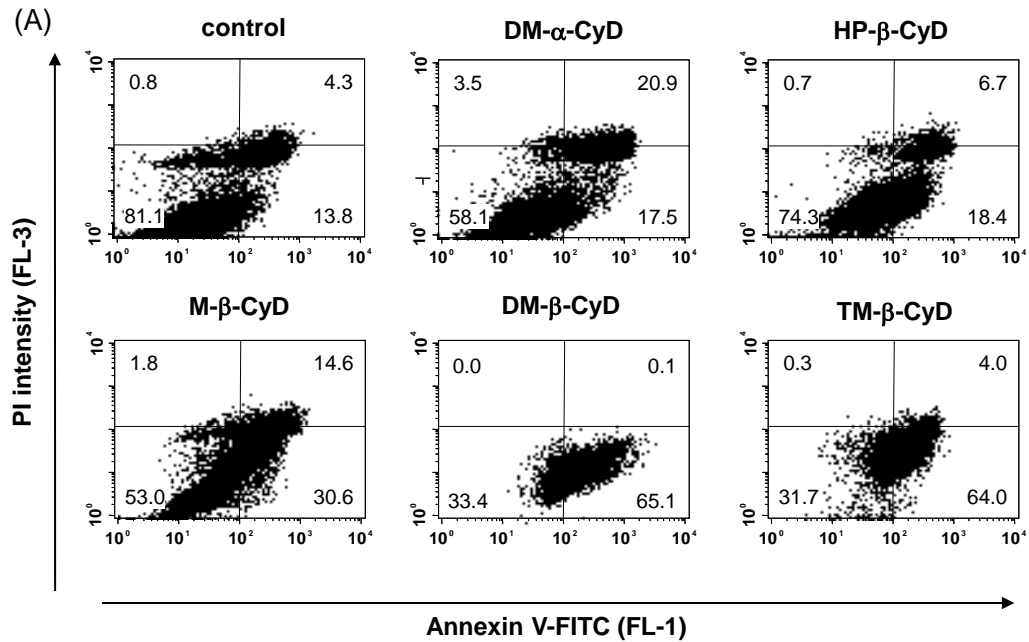


Fig. 16. Effects of CyDs on Exposure of PS in NR8383 Cells

NR8383 cells were incubated in medium with or without CyDs (5 mM) for 24 hr. Then cells were stained with AnnexinV-FITC and PI, and analysed by flow cytometry. (A) Data were plotted as the AnnexinV-FITC intensity (X axis) versus the relative number of PI-positive cells (Y axis). (B) The percentage of cells existing in FITC-positive and PI-negative fraction was shown. Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control

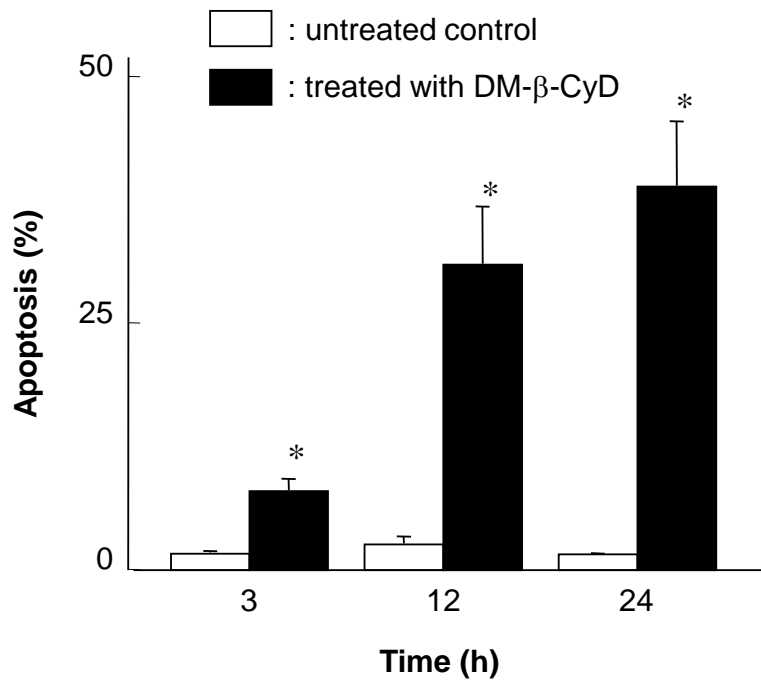


Fig. 17. Effect of DM-β-CyD on Exposure of PS in RAW264.7 Cells

RAW264.7 cells were incubated in medium with or without DM-β-CyD (2 mM) for indicated time. Then cells were stained with AnnexinV-FITC and PI, and analysed by flow cytometry. Each values represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

第 4 節 界面活性剤によるアポトーシス誘導

第 3 節までの検討によりメチル化 β -CyDs による細胞死はアポトーシスであることが明らかとなった。メチル化 β -CyDs は水溶性で分子サイズが大きいため細胞膜透過性が低く、細胞内に取り込まれてアポトーシスを誘導するとは考え難く、アポトーシス誘導のメカニズムとして、膜成分との相互作用が考えられる。本節では、メチル化 β -CyDs と同様に電荷を持たず、界面活性作用を有し、可溶化能を有する非イオン性界面活性剤を用いて、そのアポトーシス誘導能を比較検討した。なお、非イオン性界面活性剤として Tween 20, Tween 40, Tween 80, HCO60, Cremophor, Triton X-100 を用いた (Table 4)。⁸⁷⁾ Fig. 19 は NR8383 細胞に 1 mM の非イオン性界面活性剤を 24 時間処理し、PI で染色後、フローサイトメトリーにより DNA 含量を測定しアポトーシスの誘導を評価した結果を示す。DM- β -CyD および HP- β -CyD および Cremophor 処理した NR8383 細胞では DNA 含量の低下は認められなかった。また、Tween 20, Tween 40, Tween 80 処理によりそれぞれ約 84%, 35%, 20%、HCO60 処理により約 45%、Triton X-100 処理により約 98% の DNA 含量の低下が観察され、非イオン性界面活性剤処理による DNA 断片化の誘導は NR8383 細胞における DNA ladder のバンドからも確認された (Fig. 20)。これらの結果から、非イオン性界面活性剤は c.m.c. (critical micelle concentration) 以上の濃度において、ミセル形成に伴う細胞膜成分の可溶化効果によりアポトーシスを誘導することが示唆された。

Table 4. Critical Micelle Concentration for Some Nonionic Surfactants⁸⁷⁾

Surfactant	Commercial name	c.m.c. (mM) ¹⁾
PEG (20) sorbitan monolaurate	Tween 20	0.053
PEG (20) sorbitan monopalmitate	Tween 40	0.023
PEG (20) sorbitan monooleate	Tween 80	0.010
Polyoxyethylenehydrogenated castor oil 60	HCO60	0.026
Polyoxyl 35 castor oil	Cremophor	0.040
PEG (9-10) <i>p</i> -isooctylphenol	Triton X-100	0.240

¹⁾ Critical micelle concentration at 25°C.

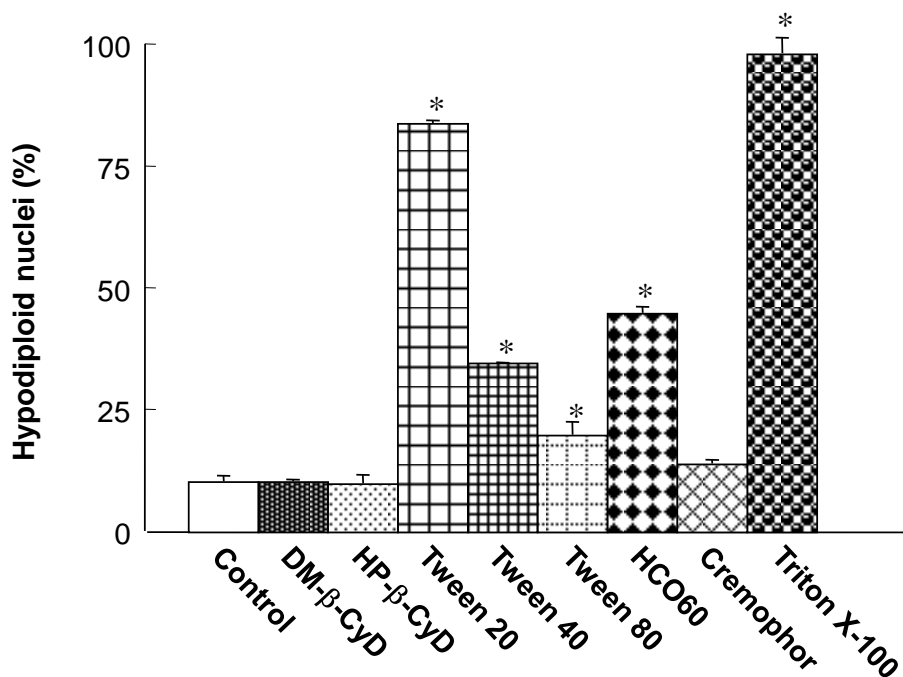


Fig. 19. Agarose Gel Electrophoresis of DNA Extracted from NR8383 Cells Treated with β -CyDs or Nonionic Surfactants

NR8383 cells were incubated with medium containing β -CyDs or nonionic surfactants at 1 mM for 24 hr at 37°C. After incubation, cells were lysed and then analyzed for DNA fragmentation by gel electrophoresis. * $p < 0.05$, compared with control.

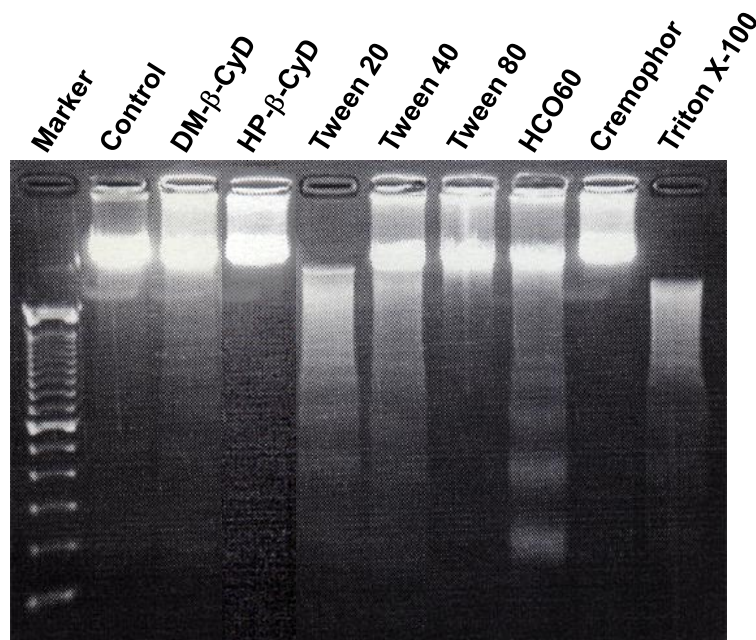


Fig. 20. Induction of Apoptosis in NR8383 Cells Treated with β -CyDs or Nonionic Surfactants

NR8383 cells were incubated with medium containing CyDs or nonionic surfactants at 1 mM for 24 hr at 37°C. After incubation, cells were lysed and then analyzed DNA fragmentation by gel electrophoresis.

第 5 節 細胞膜脂質成分に及ぼす M-β-CyDs の影響

第 1 項 細胞膜脂質成分の漏出

リピッドラフトはスフィンゴ脂質とコレステロールが集積した直径数 10 nm のマイクロドメインであり、シグナル分子を集積し、シグナル伝達の効率化を担う場として注目されている。リピッドラフトには Src、Ras、G タンパク質 α サブユニット、プロテインキナーゼ C、GPI アンカータンパク質、growth factor receptors などさまざまなシグナル伝達分子が局在する。⁶⁵⁻⁶⁷⁾ 近年、FasL/Fas 系によるアポトーシス誘導や、TNF/TNFR 系による NF- κ B の活性化がリピッドラフトを介すること、⁶⁸⁻⁷⁰⁾ Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス誘導因子 Bad がリピッドラフトに局在することが報告されている。⁷¹⁾ また、当研究室では DM-β-CyD が、リピッドラフトの一種であるカベオラ画分に存在するコレステロールを漏出させることにより、二次的に P-糖タンパク質 (P-glycoprotein) や MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) を漏出させ、排出ポンプ機能を抑制することを報告した。⁸⁸⁾ したがって、メチル化 β-CyDs によるアポトーシス誘導にはリピッドラフト画分からのコレステロールやスフィンゴ糖脂質などのリピッドラフト局在性細胞膜脂質成分と二次的に遊離されるタンパク質の関与が推察される。そこで本項では、NR8383 細胞からのコレステロールやリン脂質の漏出に及ぼす CyDs の影響について検討した。

NR8383 細胞を CyD 含有 HBSS 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オキシダーゼ・DAOS 法 (コレステロール E テストワコー[®])、上清中の総リン脂質量をコリンオキシダーゼ・DAOS 法 (リン脂質 C-テストワコー[®]) を用いて測定した。その結果、DM- α -CyD で処理した NR8383 細胞からのコレステロールの漏出はコントロール (未処理) と同程度であった。一方、β-CyDs 添加系でコレステロール漏出が観察され、コレステロール漏出量は HP-β-CyD < M-β-CyD < TM-β-CyD < DM-β-CyD の順に増大した (Fig. 21A)。総リン脂質量の場合、M-β-CyD, TM-β-CyD および HP-β-CyD 処理した NR8383 細胞からの漏出はコントロール (未処理) と同程度であった。一方、DM- α -CyD および DM-β-CyD で処理した NR8383 細胞において有意な総リン脂質の漏出が認められた (Fig. 21B)。NR8383 細胞からのコレステロール漏出は、β-CyDs 添加系でのみ観察され、その効果は HP-β-CyD < M-β-CyD < TM-β-CyD < DM-β-CyD の順に増大した。総リン脂質量は DM- α -CyD および DM-β-CyD 系で有意に高い漏出が認められた。

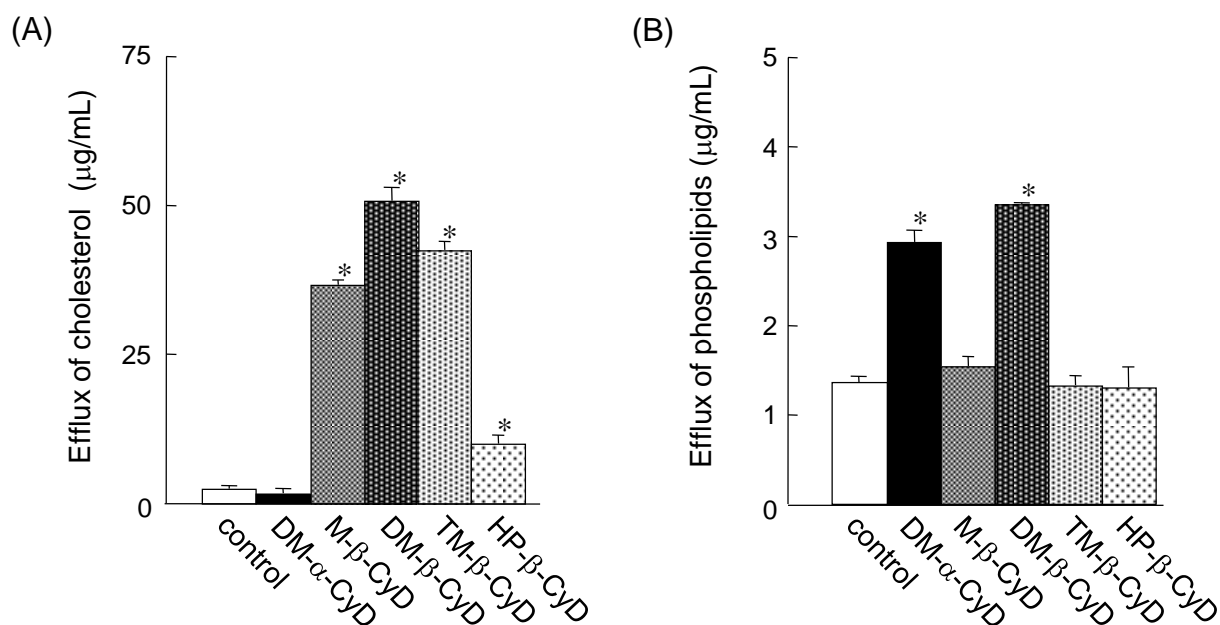


Fig. 21. Effects of CyDs on Efflux of Cholesterol (A) and Phospholipids (B) from NR8383 Cells

NR8383 cells were incubated in HBSS (pH 7.4) with or without CyDs (5 mM) for 1 hr. The concentrations of cholesterol and phospholipids in HBSS were determined by Cholesterol E-test Wako® and Phospholipids C-test Wako®, respectively. Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

第 2 項 アポトーシス誘導に及ぼすコレステロールの影響

前項の結果から DM- β -CyD 誘導アポトーシスへの細胞膜脂質成分の漏出の関与が示唆された。そこで、外来のコレステロールをあらかじめ添加してコレステロール包接能を低下させた DM- β -CyD 試験液を用いて検討を行った。Fig. 22 に示すように、外来のコレステロール添加により DM- β -CyD 誘導アポトーシスが有意に抑制された。

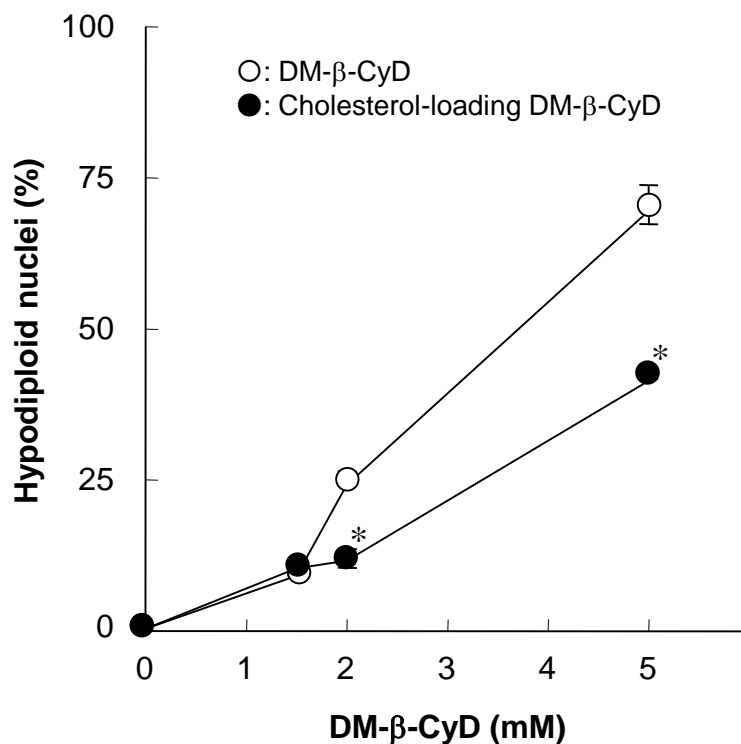


Fig. 22. Effect of Cholesterol on Apoptosis Induced by DM- β -CyD

NR8383 cells were treated with 5 mM DM- β -CyD or cholesterol-loading 5 mM DM- β -CyD for 24 hr at 37°C. After treatment, cells were stained by PI, and then the percentage of cells showing DNA degradation was quantified by flow cytometry. Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with DM- β -CyD.

第 6 節 PI3K-Akt および MAPK 経路に及ぼす DM-β-CyD の影響

細胞のアポトーシス感受性を大きく左右する因子として、リン酸化シグナルによるアポトーシスの決定・実行因子群の修飾が知られている。特に PI3K-Akt 経路はアポトーシスの誘導、決定、実行に関わる多種多様な分子群に作用し、主にアポトーシスシグナルを抑制することで生存シグナルとしての機能を発揮すると報告されている。⁴⁴⁾ 一方、JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase/stress activated protein kinase : SAPK), p38 MAP kinase に代表されるストレス応答性 MAPK 経路は、さまざまな細胞障害性ストレスや炎症性サイトカインによって活性化され、アポトーシスのシグナル伝達に重要な役割を果たすことが知られている。^{43, 89-91)} そこで本節では、PI3K-Akt および MAPK 経路に及ぼす DM-β-CyD の影響について検討した。

第 1 項 アポトーシス誘導に及ぼす PI3K および MAPK 阻害剤の影響

PI3K-Akt および MAPK 経路に及ぼす DM-β-CyD の影響について、それぞれの阻害剤を用いて検討した。PI3K-Akt 経路に関する検討では、NR8383 細胞を PI3K 阻害剤である LY294002 (10 μM) で 4 時間処理し溶液を除去後、種々の濃度の DM-β-CyD で 24 時間処理し、PI で染色後、フローサイトメトリーにより DNA 含量を測定し、アポトーシス誘導を評価した。DM-β-CyD 未添加の場合、LY294002 で前処理した NR8383 細胞では、約 15% の細胞に DNA 含量の低下が見られ、弱いアポトーシス誘導が確認された。一方、DM-β-CyD 添加系では、添加濃度依存的に DNA 含量の低下した細胞の割合が増加した。DM-β-CyD 添加濃度 1.25 mM 以下の濃度では、LY294002 前処理により未処理と比較して、DNA 含量の低下した細胞の割合が有意に増大し、アポトーシス活性に対して、DM-β-CyD と LY294002 との相加作用を示す傾向が認められた (Fig. 23)。また、MAPK 経路に関する検討において、NR8383 細胞を p38 MAP kinase 阻害剤である SB203580 (20 μM) で 2 時間処理し、以下、LY294002 処理の場合と同様の操作を行ったところ、DM-β-CyD 処理による DNA 含量の低下に対する SB203580 添加の影響は認められなかった (Fig. 24)。これらの結果から、今回の実験条件では、DM-β-CyD のアポトーシス誘導作用に対して、PI3K-Akt 経路は関与するが、p38 MAP kinase 経路の関与は小さいことが示唆された。

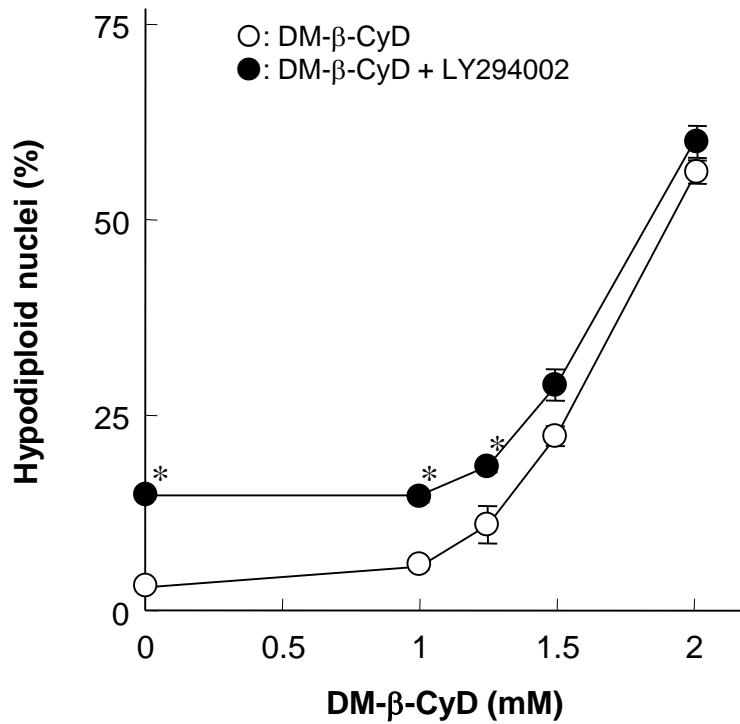


Fig. 23. Effect of Phosphoinositide 3-kinase Inhibitor on Apoptosis Induced by DM-β-CyD

NR8383 cells were treated with or without LY294002 (10 μ M) for 4 hr at 37°C, and then treated with DM-β-CyD (0-2 mM) for 24 hr at 37°C. After treatment, cells were stained by PI, and then the percentage of cells showing DNA degradation was quantified by flow cytometry. Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * p < 0.05, compared with DM-β-CyD.

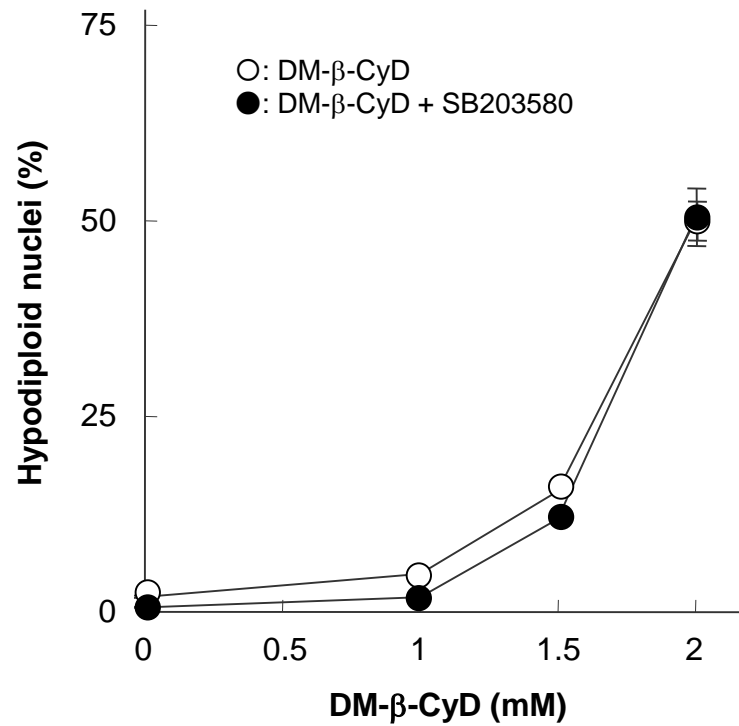


Fig. 24. Effect of p38 MAP Kinase Inhibitor on Apoptosis Induced by DM-β-CyD
NR8383 cells were treated with or without SB203580 (20 μM) for 2 hr at 37°C, and then treated with DM-β-CyD (0-2 mM) for 24 hr at 37°C. After treatment, cells were stained by PI, and then the percentage of cells showing DNA degradation was quantified by flow cytometry. Each point represents the mean ±S.E. of 3 experiments.

第 2 項 Akt 活性化に及ぼす DM-β-CyD の影響

増殖因子や熱処理などの刺激により活性化した PI3K は、PI (4,5) P₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) と PI (3,4,5) P₃ を産生する。産生した PI (3,4) P₂ と PI (3,4,5) P₃ はセカンドメッセンジャーとして働き、なかでも PI (3,4,5) P₃ は PH (pleckstrin homology) ドメインをもった様々な分子を細胞膜近傍へとリクルートすることにより、これらの分子の活性化を引き起こす。Akt や Akt の上流のキナーゼである PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) は、この PH ドメインを有しており、PI3K はこれらの分子の活性化を通して、細胞の生存・増殖・代謝につながるシグナルを伝達する。Akt は細胞膜近傍に存在する PDK1 により 308 番目のスレオニンがリン酸化を受けることにより活性化する。活性化した Akt は、アポトーシス実行分子の不活性化、アポトーシス誘導性分子の転写にかかわる転写因子の不活性化、生存促進分子の転写にかかわる転写因子の活性化などにより細胞の生存を誘導する。⁴⁴⁾

Akt の活性化について、NR8383 細胞を DM-β-CyD または HP-β-CyD で 24 時間処理し、抗 Akt 抗体および抗 phospho-Akt 抗体を用いた Western blot 法により検討した。Fig. 25 に示すように、HP-β-CyD 処理では Akt およびリン酸化 Akt のバンドが未処理のコントロールと同様に検出された。一方、DM-β-CyD 処理では Akt およびリン酸化 Akt バンドの消失が観察された (Fig. 25)。また、Akt のバンド強度は DM-β-CyD の処理時間依存的に減少した (Fig. 26)。これらの結果から、DM-β-CyD は Akt リン酸化の抑制および Akt の分解を誘導することが示唆された。

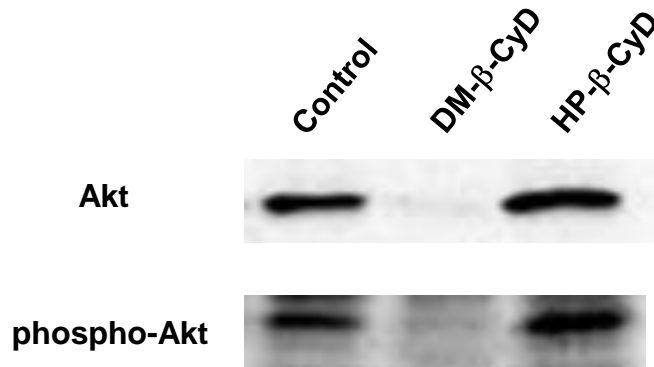


Fig. 25. Immunoblot Analysis of Akt and Phospho-Akt Following Treatment of NR8383 Cells with β -CyDs

NR8383 cells were treated with 5 mM β -CyDs for 24 hr at 37°C. Then cells were lysed and lysates were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Akt and phospho-Akt on the membranes were detected by Western blot.

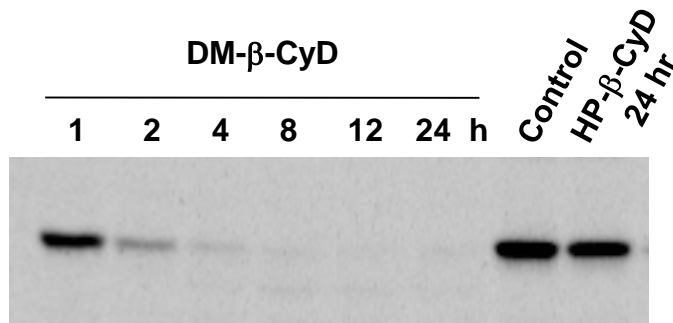


Fig. 26. Effect of β -CyDs on Akt Levels in NR8383 Cells

NR8383 cells were treated with 5 mM β -CyDs for the indicated time at 37°C. Cells were lysed and lysates were separated by SDS-PAGE, and then transferred onto nitrocellulose membrane. Akt on the membrane was detected by Western blot.

第 3 項 Bad のリン酸化に及ぼす DM-β-CyD の影響

アポトーシス誘導性の Bcl-2 ファミリー分子である Bad は、通常、活性化 Akt によって 136 番目のセリンがリン酸化されており、14-3-3 タンパク質と結合して細胞質に存在するが、リン酸化が抑制されて活性化すると 14-3-3 タンパク質から離れてミトコンドリアへ移行する。活性化した Bad はミトコンドリア膜上においてアポトーシス抑制因子である Bcl-x_L と結合し、アポトーシスを促進させることが知られている。^{92,93)}

Bad のリン酸化について、NR8383 細胞を DM-β-CyD および HP-β-CyD で 24 時間処理し、抗 Bad 抗体および抗 phospho-Bad 抗体を用いた Western blot 法により検討した。Fig. 27 に示すように、HP-β-CyD 処理では Bad およびリン酸化 Bad のバンドが未処理のコントロールと同様に検出された。一方、DM-β-CyD 処理ではリン酸化 Bad のバンドの消失が観察された。これらの結果から、DM-β-CyD は Bad のリン酸化を抑制し、PI3K-Akt 経路による細胞生存シグナルを阻害しているものと推察された。

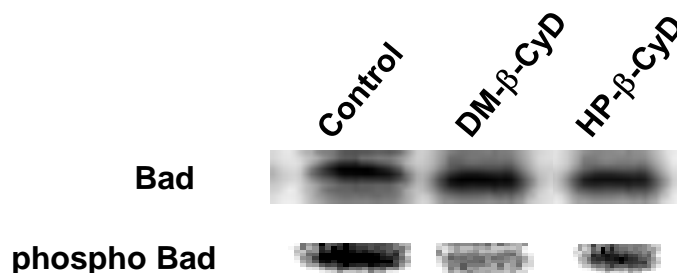


Fig. 27. Immunoblot Analysis of Bad and Phospho-Bad Following Treatment of NR8383 Cells with β-CyDs

NR8383 cells were treated with 5 mM β-CyDs for 24 hr at 37°C. Cells were lysed and lysates were separated by SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membranes. Bad and phospho-Bad on the membranes were detected by Western blot.

第 7 節 p53 経路に及ぼす DM- β -CyD の影響

p53 はアポトーシス関連遺伝子の転写制御により種々のアポトーシス誘導への関与が報告されている。⁴⁵⁾ また、最近 p53 はストレス刺激によりミトコンドリアにトランスロケートされた後、Bak と相互作用し、アポトーシスを誘導することが報告された。⁹⁴⁾ そこで DM- β -CyD 誘導アポトーシスへの関与を明らかにするため、p53 ノックアウトマウスから採取した腹腔マクロファージを用いて検討した。p53 ノックアウトマウスから採取した腹腔マクロファージを DM- β -CyD または HP- β -CyD で 24 時間処理し、Annexin V-FITC 染色後、フローサイトメトリーによりアポトーシス細胞を検出した。Fig. 28 に示すように、DM- β -CyD 処理した wild type マクロファージでは約 25% の細胞に PS の露出が観察された。一方、p53 欠損マクロファージでも DM- β -CyD 処理により約 25% の細胞に PS の露出が観察された。また、HP- β -CyD 処理した wild type および p53 欠損マクロファージでは、CyD 未処理のコントロールと同程度の PS の露出が観察された。これらのことから、DM- β -CyD 誘導アポトーシスへの p53 の関与は小さいものと考えられる。

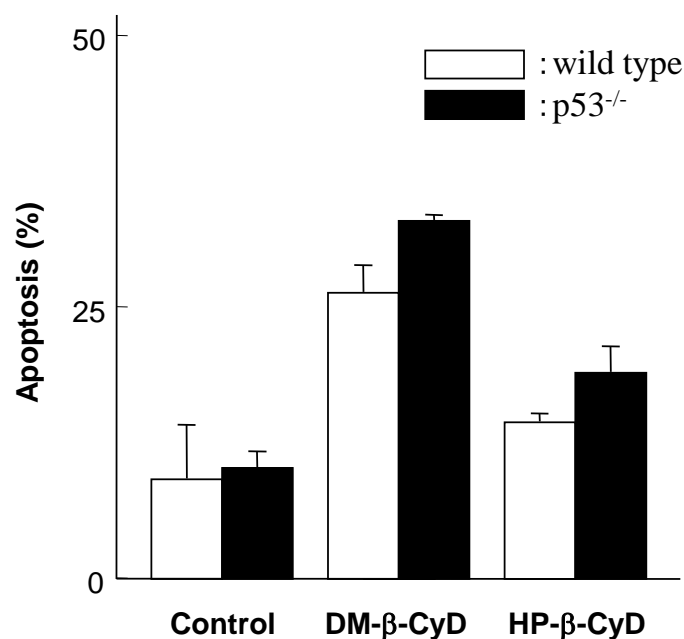


Fig. 28. Effects of β -CyDs on Exposure of PS in Peritoneal Macrophages Isolated from Wild Type or p53-Deficient Mice

Mouse peritoneal macrophages (wild type or p53^{-/-}) were treated with β -CyDs (5 mM) for 24 hr, and then stained with AnnexinV-FITC and PI, and analyzed by flow cytometry. Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第 8 節 アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与

アポトーシスシグナルは、ミトコンドリア依存的な経路とミトコンドリア非依存的な経路に大別される。前者の経路では、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) の低下や cytochrome *c* などのミトコンドリアタンパク質の細胞内への放出などが観察される。さらに、放出された cytochrome *c* により、種々の基質を限定分解しアポトーシスの実行に重要な役割を果たしているプロテアーゼである caspase-family の活性化が誘導されることが知られている。^{95,96)}

本節では、ミトコンドリア膜電位の変化ならびに cytochrome *c* の細胞質への放出を指標にして DM- β -CyD によるアポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与について検討した。

第 1 項 ミトコンドリア膜電位

$\Delta\psi_m$ は、電子伝達系による H^+ の汲み出しによって生じるミトコンドリア内膜のマトリックス側が負、外側が正となる電位勾配によって形成されており、通常は約 -180 mV の電位差を示す。Rhodamine 123 を投与すると電位差に応じてミトコンドリアに取り込まれるため、取り込み量を測定することによって膜電位を間接的に測定することができる。⁹⁷⁾ Fig. 29 に示すように、HP- β -CyD で 24 時間処理した NR8383 細胞の蛍光強度は CyD 未処理のコントロールと同程度であった。また、DM- α -CyD および M- β -CyD 処理により約 56%、DM- β -CyD 処理により約 1%、TM- β -CyD 処理により約 16% まで NR8383 細胞の蛍光強度が低下した。これらの知見から DM- β -CyD 処理により NR8383 細胞の $\Delta\psi_m$ が低下することが明らかになった。

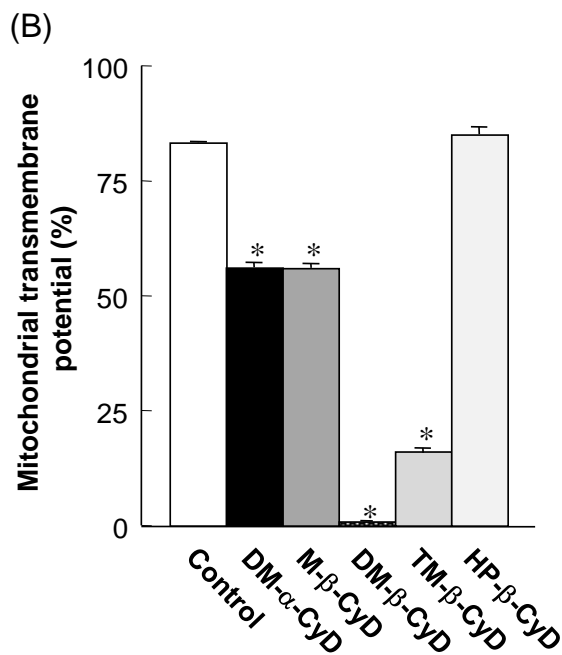
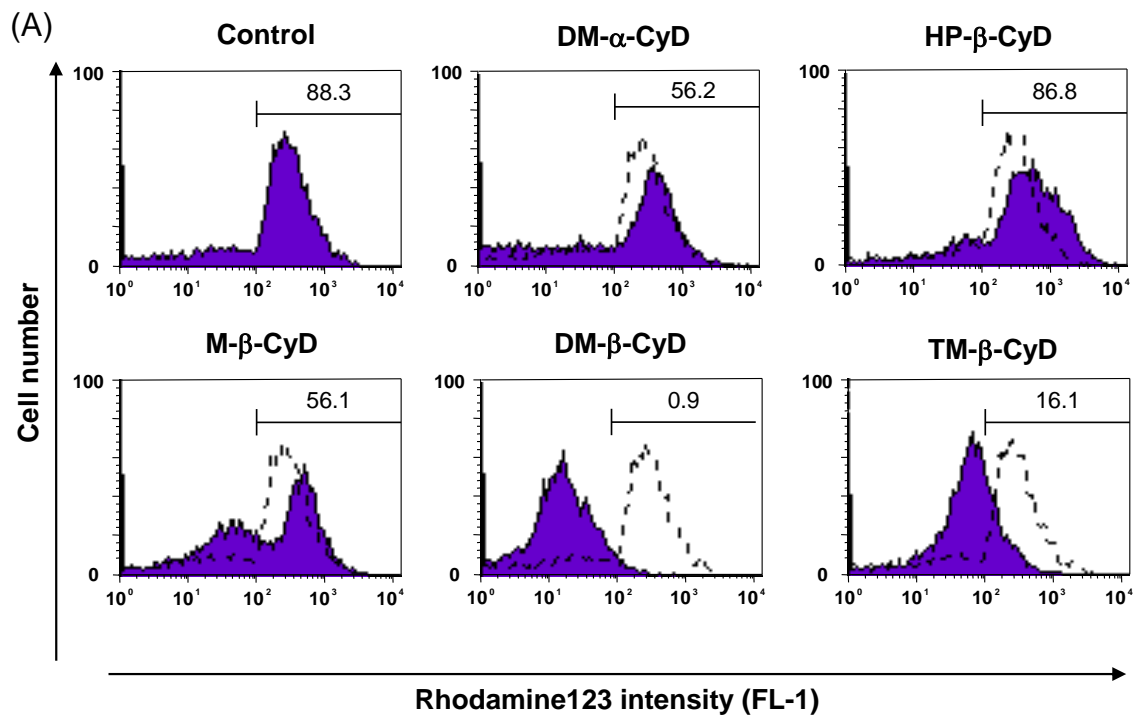


Fig. 29. Flow Cytometric Analysis of Mitochondrial Transmembrane Potential of NR8383 Cells Treated with CyDs

NR8383 cells were incubated in medium with or without CyDs (5 mM) for 24 hr. Cells were stained with rodamine 123 and mitochondrial transmembrane potential was analysed by flow cytometry. (A) Rodamine 123 intensity. Dotted line, untreated control; solid line, treated with CyDs. (B) Rate of mitochondrial transmembrane potential (%). Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

第 2 項 ミトコンドリアからの cytochrome *c* の放出

CyD で処理した NR8383 細胞のミトコンドリアから cytochrome *c* の放出を Western blot 法により検討した。Fig. 30 に示すように、DM- α -CyD, M- β -CyD および HP- β -CyD で 24 時間処理した NR8383 細胞から得たミトコンドリア画分における cytochrome *c* のバンド強度は CyD 未処理のコントロールと同程度であった。一方、TM- β -CyD 処理により cytochrome *c* のバンド強度は減少し、DM- β -CyD 処理により cytochrome *c* のバンドが消失した。ミトコンドリア画分が正しく調製されているか否かをミトコンドリアの電子伝達系の構成タンパク質である cytochrome oxidase IV を指標に Western blot 法により検討した。いずれのミトコンドリア画分においても cytochrome oxidase IV のバンド強度に差異は認められなかったことから (Fig. 30)、DM- β -CyD 処理による cytochrome *c* のバンドの消失は、ミトコンドリア画分を調製する際のアーティファクトとして得られた結果ではなく、ミトコンドリアから細胞質への放出に起因することが確かめられた。

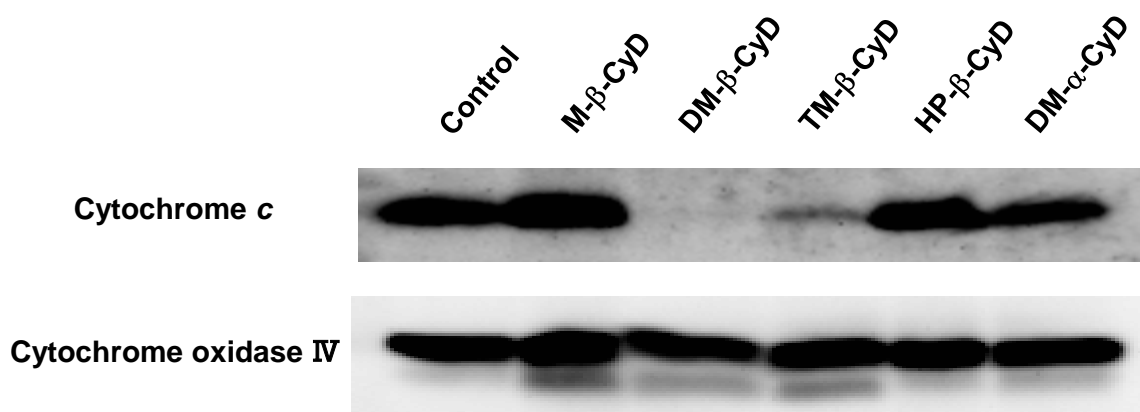


Fig. 30. Immunoblot Analysis of Cytochrome *c* Remaining in Mitochondria Following Treatment of NR8383 Cells with CyDs

NR8383 cells were treated with 5 mM CyDs for 24 hr at 37°C, mitochondrial fraction was isolated, and then cytochrome *c* levels were assayed by Western blot. To verify the purification of mitochondrial fraction, the analysis of cytochrome oxidase IV was also carried out.

第 9 節 DM-β-CyD による caspase-3 の活性化

Caspase は自らあるいは他の caspase を限定分解して、不活性型の前駆体 (pro-caspase) から活性型へと変換し、ICAD, PARP, actin などの基質を分解する。ミトコンドリアから細胞質内に放出された cytochrome *c* は Apaf-1、ATP および pro-caspase-9 と結合することで caspase-9 を活性化し、この caspase-9 により caspase-3 が活性化される。Caspase-3 は caspase-family の中でもアポトーシスの実行に中心的な役割を果たしており、通常は分子量 32 kDa の pro-caspase-3 として存在するが、caspase-9 などにより切断されると 20 kDa、19 kDa および 17 kDa の活性型へ変換する。そこで β-CyDs 処理による NR8383 細胞の caspase-3 の活性化について Western blot 法により検討した。HP-β-CyD で NR8383 細胞を 24 時間処理すると未処理のコントロールの場合と同様に不活性型の pro-caspase-3 のバンドのみが観察されたが、DM-β-CyD で処理すると不活性型の pro-caspase-3 のバンド強度の減少、および活性型 caspase-3 のバンド強度の増加が観察された (Fig. 31)。

Fig. 32 は NR8383 細胞中における actin の発現に及ぼす β-CyDs の影響を Western blot 法により検討した結果を示す。Actin は caspase-3 の基質であるため、⁹⁸⁾ Fig. 32 において actin のバンド強度が DM-β-CyD の処理時間依存的に減少したことは、actin が caspase-3 により分解されたことを示唆する。これらの結果から、DM-β-CyD 処理により caspase-3 の活性化が誘導されるものと推察される。

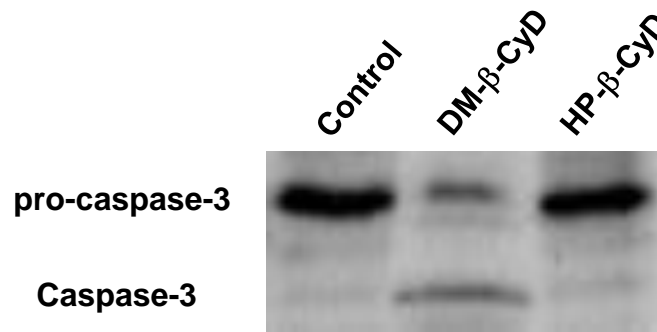


Fig. 31. Immunoblot Analysis of Caspase-3 Following Treatment in NR8383 Cells with β -CyDs

NR8383 cells were treated with 5 mM β -CyDs for 24 hr at 37°C. Cells lysates were separated by SDS-PAGE, and then transferred onto PVDF. Caspase-3 on the membrane was detected by Western blot.

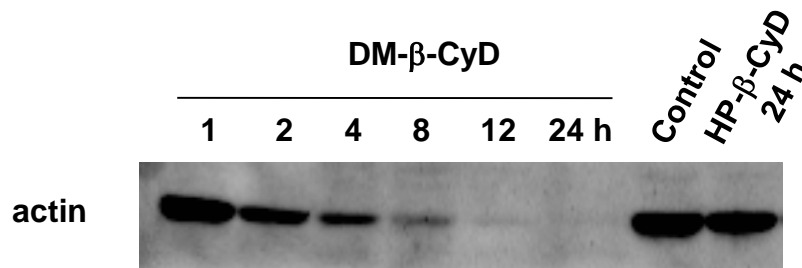


Fig. 32. Effects of β -CyDs on Actin Levels in NR8383 Cells

NR8383 cells were treated with 5 mM β -CyDs for 24 hr at 37°C. Cells lysates were separated by SDS-PAGE, and then transferred onto nitrocellulose membrane. Actin on the membrane was detected by Western blot.

第 10 節 考察

CyDs は高濃度において赤血球の溶血や生体膜の膜透過性変化を惹起するなど細胞障害性を有することが知られている。⁶³⁾ また、 β -CyD や M- β -CyD をラットの静脈内に多量投与すると、ネクロシス様の腎障害が誘導されることが報告されている。^{72, 73)} しかしながら CyDs の障害性によって起こる細胞死がアポトーシスか否かに関する報告は少ない。^{78, 79)} そこで本章では、CyDs による各種細胞に対する細胞死がアポトーシス誘導か否かについて検討した。

当研究室ではこれまでにヒト結腸がん細胞 Caco-2 細胞やマウスマクロファージ様株化細胞 RAW264.7 細胞に対する CyDs の細胞障害性を報告した。^{88, 99)} 本研究ではモデル細胞としてラットマクロファージ様株化細胞 NR8383 細胞、ヒト肺がん上皮細胞 A549 細胞、ヒト急性 T 細胞性白血病細胞 Jurkat 細胞を用いて、まずこれらの細胞に対する CyDs の細胞障害性を WST-1 法により評価した。その結果、Caco-2 細胞や RAW264.7 細胞の結果と同様に、メチル化 CyDs 処理により NR8383 細胞、A549 細胞、Jurkat 細胞に細胞死が誘導され、ヒドロキシプロピル化 CyDs 処理では細胞死は誘導されなかった (Fig. 9)。この CyDs による細胞死誘導効果の強さは赤血球の溶血活性の強さと対応することから、細胞死誘導機構は溶血の場合と同様に細胞膜成分の可溶化に起因するものと推定した。

アポトーシスとは、多細胞生物の生命を維持するために遺伝子によって制御された細胞死であり、細胞の生化学的変化と形態学的変化の二つで定義されている。前者に関しては、ヌクレオソームコアをつなぐリンカー部位に DNase I,¹⁰⁰⁾ DNase II,¹⁰¹⁾ CAD (caspase-activated endonuclease),¹⁰²⁾ DNase γ ¹⁰³⁾ 等のエンドヌクレアーゼが作用して、DNA が切断されることによって起こるヌクレオソーム単位での DNA 断片化、あるいはアミノリン脂質転移酵素の不活性化およびスクランブラーゼの活性化による PS の細胞膜外層への露出などの細胞膜構造の変化があげられる。⁸¹⁾ 後者に関しては、核クロマチン凝縮因子 Acinus (apoptotic chromatin condensation inducer in nucleus) によるクロマチンの凝縮¹⁰⁴⁾ が挙げられる。NR8383 細胞、A549 細胞、Jurkat 細胞を DM- β -CyD および TM- β -CyD で処理すると、染色体 DNA は G₀ あるいは G₁ 期の細胞より少ない細胞が検出され (Figs. 8, 9)、さらに DNA 断片化に伴う DNA ladder が検出された (Fig. 10)。また、CyDs 処理した NR8383 細胞を Hoechst 33342 で染色後、蛍光顕微鏡により形態を観察したところ、DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理によってクロマチンの凝縮が起こることが明らかになった (Fig. 15)。さらに

CyDs 処理した NR8383 細胞を AnnexinV-FITC および PI で染色しフローサイトメトリーで検出したところ、DM- β -CyD および TM- β -CyD により PS の細胞膜外層への露出が確認された (Fig. 16)。ネクロシスによる細胞死は、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の膨潤がおこり細胞全体が腫大し、結果として細胞溶解が起こり、DNA のヌクレオソーム単位の断片化やクロマチンの凝縮像は観察されないことが知られている。⁴⁰⁾ 本研究において、DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理で DNA 断片化やクロマチン凝縮像、さらに PS の細胞膜外層への露出が観察されたことから、DM- β -CyD および TM- β -CyD により誘導される細胞死はアポトーシスであることが明らかとなった。また、高濃度の M- β -CyD 処理では DNA 含量の低下した細胞の増加が観察されたことから (Fig. 13)、M- β -CyD も高濃度においてはアポトーシスを誘導することが示唆された。一方、興味深いことに DM- α -CyD は、細胞死を誘導したが (Fig. 7)、細胞の DNA 含量の低下、核の断片化、PS の露出を誘導しなかったことから (Figs. 9, 10, 16)、アポトーシス以外の細胞死を誘導しているものと推察される。一般に CyDs と膜成分との相互作用は CyD の空洞サイズに依存し、 α -CyD はリン脂質、 β -CyD はコレステロールと強く相互作用することが知られている。したがって、DM- α -CyD 処理でアポトーシスが観察されなかったことは、アポトーシス誘導に細胞膜成分の種類が関与していることを示唆する。なお、HP- α -CyD および HP- β -CyD は本実験条件下では細胞障害性を示さなかったため、アポトーシスも誘導しなかった。

以上の結果から CyDs の中で特にメチル化 β -CyDs によって種々の細胞にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。メチル化 β -CyDs は水溶性で分子サイズが大きいため、細胞膜透過性が低く、細胞内に取り込まれてアポトーシスを誘導することは考え難いため、アポトーシス誘導のメカニズムとして、膜成分との相互作用が考えられる。実際、CyDs 以外の非イオン性界面活性剤でも臨界ミセル濃度以上の濃度 (今回は 1 mM で検討した) でアポトーシス誘導が観察された (Figs. 19, 20)。これらのことから、高濃度のメチル化 β -CyDs によるアポトーシス誘導作用は、非イオン性界面活性剤の場合と同様に細胞膜成分との相互作用に起因するものと推察される。

次に、メチル化 β -CyDs により誘導されるアポトーシスの機構解明を企図して、様々な検討を行った。最近、分子生物学や細胞生物学の分野において、M- β -CyD は、細胞膜上の脂質マイクロドメインであるリピッドラフトに存在するコレステロールを引き抜くことにより、EGF receptor や Fc ϵ receptor I からのシグナル伝達を変化させることなど、リピッドラフト画分のコレステロールの役割を解明する研究に広く利用されている (Fig. 5)。また、FasL/Fas 系によるアポトーシス誘導や、TNF/TNFR 系

による NF- κ B の活性化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 がリピッドラフトに局在することが近年報告されている。⁶⁸⁻⁷¹⁾ したがって、メチル化 β -CyDs によるアポトーシス誘導にはリピッドラフト画分からのコレステロールやスフィンゴ糖脂質などのリピッドラフト局在性細胞膜脂質成分と二次的に遊離されるタンパク質の関与が推察される。そのため CyDs による細胞膜脂質成分の漏出の程度を比較した。その結果、M- β -、TM- β -CyD 処理は細胞膜から主にコレステロールを、DM- α -CyD は主にリン脂質を漏出させ、DM- β -CyD はコレステロール、リン脂質ともに漏出させた (Fig. 21)。メチル化 CyDs の中で DM- α -CyD 処理の場合のみアポトーシス誘導が観察されなかったことから (Fig. 9)、CyDs によるアポトーシス誘導にはコレステロール漏出の寄与が大きいことが推察される。実際に、DM- β -CyD 処理によるアポトーシス誘導がコレステロールの添加によって有意に抑制されたことは、この仮説を強く支持する (Fig. 22)。ただし、メチル化 β -CyDs の中で最も高いアポトーシス誘導能を示した DM- β -CyD はコレステロールだけでなくリン脂質も漏出させることから、リン脂質の関与も否定はできない。

主要な生存シグナル伝達経路である PI3K-Akt 経路に関わる分子は、多くのがんで遺伝子増幅や活性亢進が起きている。^{105, 106)} PI3K は PI (3,4,5) P₃ の産生により、PH ドメインを有する PDK1 と Akt を細胞膜近傍にリクルートし、Akt を活性化する。近年、この Akt の活性化がリピッドラフトを介して起こることが報告されている。Akt は Bad やヒト caspase-9 をリン酸化することにより、それらのアポトーシス誘導活性を抑制することが報告されている。¹⁰⁷⁾ そこでまず、PI3K の特異的阻害剤を用いて PI3K が不活性な条件下で DM- β -CyD 処理によるアポトーシス誘導について検討を行った。DM- β -CyD の濃度が 1.25 mM 以下では、LY294002 処理した細胞において、未処理の細胞に比べてアポトーシス細胞の割合が有意に高く、DM- β -CyD と LY294002 との相加効果が見られた。しかしながら、この効果は DM- β -CyD 濃度が 1.5 mM 以上では認められなかった (Fig. 23)。これは、DM- β -CyD によるアポトーシス誘導が PI3K 活性の阻害に起因するため、阻害剤の効果が打ち消されたためと推察される。また、DM- β -CyD 処理により、PI3K の下流シグナルである Akt のリン酸化が抑制され、Akt の基質である Bad もリン酸化が抑制されていた (Figs. 25, 27)。リン酸化 Bad は細胞質において 14-3-3 と結合しているが、リン酸化が抑制されるとミトコンドリア膜上においてアポトーシス抑制因子である Bcl-x_L と結合し、アポトーシスを誘導することが知られている。^{92, 93)} したがって、DM- β -CyD によるアポトーシス誘導に Akt/Bad 経路の関与が示唆された。さらに興味深いことに、

DM- β -CyD は Akt のリン酸化を抑制するだけでなく Akt の分解を誘導した (Fig. 26)。この分解作用も Bad のリン酸化の抑制に働いているものと推察される。ただし、これまでに Akt の分解に関して、caspase-3 依存的な経路¹⁰⁸⁾ とユビキチン-プロテアソーム系による経路が報告されているが、¹⁰⁹⁾ 本実験条件下で DM- β -CyD による Akt の分解がどの経路に依存しているかは明らかでない。今後、caspase-3 阻害剤やプロテアソーム阻害剤などを用いた詳細な検討が必要である。

種々の細胞増殖因子や発がんプロモーターであるホルボールエステルなど様々な刺激で共通に活性化されるセリン/スレオニンキナーゼとして同定された MAPK は ERK (extracellular signal-regulated kinase) と呼ばれ、細胞増殖、細胞分化および細胞周期制御などの様々なシグナル伝達において重要な役割を果たしている。¹¹⁰⁾ Furuchi らは、M- β -CyD による細胞膜のコレステロールの枯渇が ERK を介した遺伝子発現を誘導することを報告している。¹¹¹⁾ JNK および p38 MAP kinase は MAPK と一次構造が類似したセリン/スレオニンキナーゼであり、MAPK と合わせて MAPK スーパーファミリーと総称されている。ERK が細胞の増殖、分化、生存に関与するのに対して、JNK および p38 MAP kinase は、FasL や TNF- α などのアポトーシス誘導因子や放射線、紫外線、抗がん剤、血清除去などのアポトーシスを誘導する様々な物理化学的ストレスによって強く活性化され、アポトーシスのシグナル伝達に関与している。⁴³⁾ そこで、DM- β -CyD によるアポトーシス誘導における p38 MAP kinase の関与について、特異的阻害剤 SB203580 を用いて検討した。SB203580 阻害剤処理と未処理の NR8383 細胞を比較して、DM- β -CyD 処理による DNA 含量の低下に有意差は認められなかった (Fig. 24)。このことから今回の実験条件では、DM- β -CyD 誘導アポトーシスへの p38 MAP kinase の関与は小さいものと考えられる。

p53 は代表的ながん抑制因子であり、DNA 損傷などのさまざまなストレスに応答してアポトーシスを誘導する。p53 は無刺激状態でも恒常的に産生されているが、通常 MDM2 と結合することによりユビキチン/プロテアソーム系を介して速やかに分解され、その時のタンパク質の半減期は 30 分以内と非常に短い。一方、DNA 損傷などのストレス刺激に伴い、p53 がリン酸化、アセチル化、SUMO-1 化などの修飾を受けて MDM2 との結合および分解が抑制される。このために、p53 タンパク質が安定化され、核内に蓄積することで、標的遺伝子の転写を活性化し、その遺伝子産物によって細胞周期の停止、DNA 修復やアポトーシスの誘導を行っている。⁴⁵⁾ また、最近 p53 はストレス刺激によりミトコンドリアへトランスロケートされた後、Bak と相互作用し、アポトーシスを誘導することが報告されている。⁹⁴⁾ そこで DM- β -CyD

誘導アポトーシスへの関与 p53 ノックアウトマウスから採取した腹腔マクロファージを用いて検討した (Fig. 28)。Wild type マクロファージと p53 欠損マクロファージを比較しても DM- β -CyD 処理によるアポトーシス誘導に有意差は認められなかったことから、DM- β -CyD 誘導アポトーシスへの p53 の関与は小さいものと推定した。

アポトーシスの誘導に関わるシグナル伝達はミトコンドリア依存的な経路とミトコンドリア非依存的な経路に大別される。アポトーシスに先行してミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) が低下し、cytochrome *c* や AIF などのミトコンドリアタンパク質が膜間腔から細胞内へ放出され caspase-family の活性化が誘導されることから、ミトコンドリアはアポトーシスのシグナル伝達に重要な役割を果たしている。Figs. 29 および 30 に示したように、DM- β -CyD 処理によって、 $\Delta\psi_m$ の低下やミトコンドリアから cytochrome *c* の放出が誘導されたため、DM- β -CyD 処理による NR8383 細胞のアポトーシス誘導は、ミトコンドリア依存的な経路で誘導されることは明らかである。

アポトーシス誘導における $\Delta\psi_m$ の低下や cytochrome *c* の放出機構として PT (permeability transition) が注目されている。PT とは、Ca²⁺ 濃度依存的にミトコンドリア膜浸透性を変化させる現象であり、 $\Delta\psi_m$ の低下、ミトコンドリア膨張、マトリックスタンパク質の漏出などを伴う現象である。PT の正確な分子機構は不明であるが、PT に関わる pore (PT pore) の構成成分として、ミトコンドリア外膜の VDAC (voltage-dependent anion channel)、内膜の ANT (adenine nucleotide translocator)、マトリックスのシクロフィリン D のほか、種々のキナーゼが挙げられ、それらで構成される multi protein channel がその実体ではないかと推察されている。通常 VDAC は、pore の開閉を調節してミトコンドリアと細胞質間の ATP や呼吸基質などの物質輸送を行っているが、アポトーシス誘導性の Bcl-2 ファミリー分子 Bax が VDAC に結合すると VDAC はより大きな pore を形成し、ここから cytochrome *c* が漏出すると考えられている。^{112, 113)} 一方、Bcl-x_L は VDAC のチャンネル活性を抑制することによって cytochrome *c* の漏出を制御している。先に述べたように Bad によるアポトーシス誘導機構は、ミトコンドリア膜上において Bad が Bcl-x_L に結合し、アポトーシス抑制活性の阻害に起因するものである。^{92, 93)} つまり、DM- β -CyD 処理による Bad のリン酸化の抑制が $\Delta\psi_m$ の低下や cytochrome *c* の放出を誘導しているものと推察される。

ミトコンドリアから細胞質内に放出された cytochrome *c* は Apaf-1, ATP および pro-caspase-9 と結合することで caspase-9 を活性化し、活性化された caspase-9 により caspase-3 が活性化される。^{95, 96)} 本研究では DM- β -CyD 処理した NR8383 細胞

において活性型 caspase-3 のバンドが検出され、さらに基質である actin の分解が観察された (Figs. 31, 32)。また、データは示していないが、Jurkat 細胞を用いた検討では、広域 caspase 阻害剤である z-VAD-fmk 処理により DM- β -CyD 誘導アポトーシスが有意に抑制された。これらの知見から、DM- β -CyD 処理により caspase-3 の活性化が誘導されることが明らかとなった。

Fig. 33 は、本研究で得られた知見を基に DM- β -CyD のアポトーシス誘導機構を推定した模式図を示す。DM- β -CyD は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、Akt の分解を誘導し、さらに Akt リン酸化を抑制して、Bad リン酸化の抑制を誘導する (Figs. 20, 24, 26, 27)。その結果、ミトコンドリアの $\Delta\psi_m$ の低下や cytochrome c の放出を誘導して、caspase-3 を活性化し、アポトーシスを誘導するものと考えられる (Figs. 29, 30, 31)。しかしながら、JNK 経路の関与に関しては明らかではないため今後の検討課題である。また、細胞内でフリーコレステロールが蓄積すると小胞体ストレスを惹起し、アポトーシスを誘導することが最近報告された。¹¹²⁾ このためメチル化 β -CyDs によるコレステロール枯渇が小胞体ストレスを誘導するかどうかについても今後の検討が必要である。

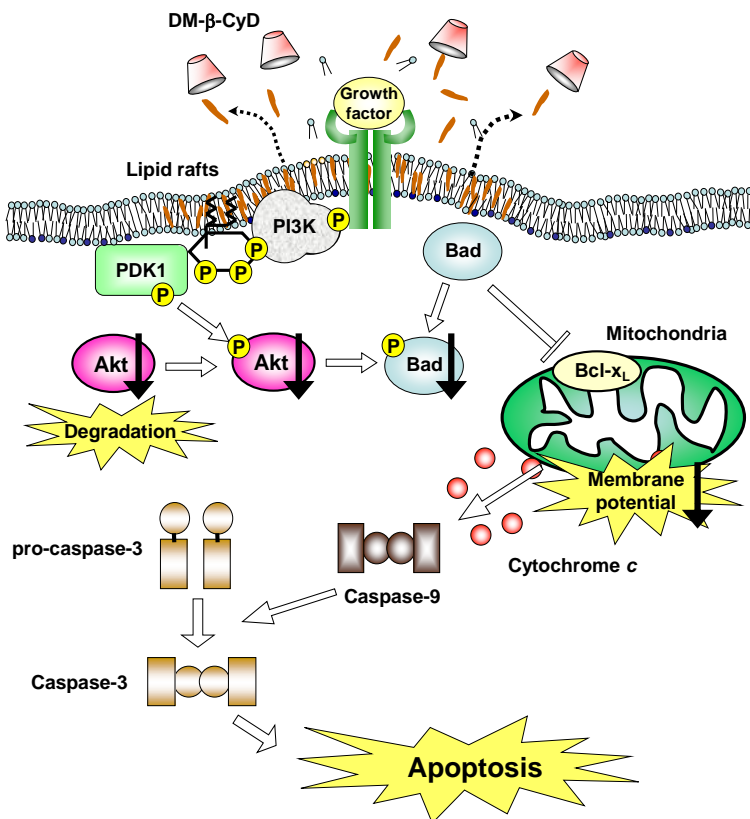


Fig. 33. Proposed Mechanism of Apoptosis Induced by DM- β -CyD

第 8 節 小括

本章では、CyDs による各種細胞に対する細胞死がアポトーシス誘導か否かを明らかにするため、CyDs 処理した細胞の細胞障害性、DNA 断片化、クロマチンの凝縮および PS の細胞膜外層への露出を検討した。DM- β -CyDs により誘導されるアポトーシスの機構解明を企図して細胞膜成分の漏出、PI3K-Akt および MAPK 経路、p53 経路に及ぼす CyDs の影響、ミトコンドリアの関与、caspase-3 の活性化について検討を行った。以下に得られた知見を要約する。

- 1) NR8383 細胞、A549 細胞、Jurkat 細胞に対する CyDs の細胞障害性を評価したところ、高濃度のメチル化 CyDs 処理により細胞死が誘導され、ヒドロキシプロピル化 CyDs 処理では細胞死は誘導されなかった。
- 2) NR8383 細胞、A549 細胞、Jurkat 細胞を DM- β -CyD および TM- β -CyD で処理すると、染色体 DNA が G₀ あるいは G₁ 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- β -CyD 処理では DNA 含量の低下した細胞が増加した。一方、DM- α -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。HP- α -CyD および HP- β -CyD は細胞障害性を示さなかったため、DNA 含量の低下、核の断片化も誘導しなかった。
- 3) 蛍光顕微鏡を用いた形態学的変化の観察から、DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理した NR8383 細胞においてクロマチンの凝縮が認められた。
- 4) M- β -CyD, DM- β -CyD および TM- β -CyD で処理した NR8383 細胞において、PS が細胞膜外層へ露出した細胞の割合が増加した。
- 5) 臨界ミセル濃度以上の非イオン性界面活性剤で処理した NR8383 細胞において、細胞の DNA 含量の低下、核の断片化が観察され、細胞膜成分の可溶化とアポトーシスの関連性が示唆された。
- 6) NR8383 細胞からの膜成分漏出に対する CyDs の影響を検討したところ、コレステロールの漏出は DM- α -CyD 処理では観察されず、 β -CyDs 添加系で観察され、その効果は HP- β -CyD < M- β -CyD < TM- β -CyD < DM- β -CyD の順に増大した。総リン脂質量の漏出に関しては、M- β -CyD, TM- β -CyD および HP- β -CyD 処

理系はコントロールと同程度であったが、DM- α -CyD および DM- β -CyD 処理において有意な総リン脂質の漏出が認められた。外来のコレステロール添加により DM- β -CyD 誘導アポトーシスが有意に抑制された。これらの結果から、DM- β -CyD 誘導アポトーシスへのコレステロール漏出が関与するものと推察された。

- 7) NR8383 細胞において、DM- β -CyD 誘導アポトーシスに対する PI3K 阻害剤の影響は、低濃度の DM- β -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- β -CyD 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、Akt の消失は処理時間依存的であった。さらに DM- β -CyD は Bad リン酸化の抑制を誘導した。これらの結果から、DM- β -CyD は PI3K-Akt 経路による細胞生存シグナルを阻害していることが推察された。
- 8) Wild type マクロファージと p53 欠損マクロファージを比較して DM- β -CyD 処理によるアポトーシス誘導に有意差は認められなかったことから、p53 の寄与は小さいものと推察された。
- 9) DM- β -CyD 処理した NR8383 細胞において、 $\Delta\psi_m$ の低下や cytochrome *c* のミトコンドリアからの放出が誘導されたため、DM- β -CyD 誘導アポトーシスはミトコンドリア依存的な経路であると推察された。
- 10) DM- β -CyD 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、さらに caspase-3 の基質である actin の処理時間依存的な分解が観察された。このことから、DM- β -CyD 処理により caspase-3 の活性化が誘導されるものと推察された。

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。一方、本実験条件下 HP- α -CyD および HP- β -CyD は細胞障害性を示さず、アポトーシスも誘導しなかった。また、DM- α -CyD はアポトーシス以外の細胞死を誘導する可能性が示唆された。さらに、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。

第 2 章 葉酸修飾メチル-β-シクロデキストリン (FA-M-β-CyD) の抗腫瘍効果およびその機構解明

第 1 節 序

これまで当研究室では、M-β-CyD にがん標的リガンドとして葉酸 (FA) を修飾した FA-M-β-CyD を調製し、Colon-26 細胞 (FR-α (+)) を同種移植した担がんマウスに尾静脈内単回投与したところ、強力な抗腫瘍効果を示すことを報告した。⁷⁶⁾ さらに、我々は FA-M-β-CyD の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。⁷⁷⁾ しかしながら、FA-M-β-CyD のオートファジーを介した細胞死誘導機構の詳細は明らかでない。

そこで本章では、FA-M-β-CyD の腫瘍細胞選択的な細胞死誘導機構を明らかにするため、以下の検討を行った。まず、FA-M-β-CyD と FR-α の結合定数を検討した。次に、FA-M-β-CyD による細胞死誘導機構の解明を企図して、FA-M-β-CyD 処理によるアポトーシスおよびオートファジー関連タンパク質の発現量を検討した。加えて、ミトコンドリアの機能に及ぼす FA-M-β-CyD の影響について、ミトコンドリアとの共局在、ATP 産生量、ROS 産生量を指標に検討した。さらに、FA-M-β-CyD によるオートファジー誘導に ROS が関与するか否かについても検討した。また、正常細胞に対する安全性評価として、ヒト肝細胞由来 Hepatocyte を用いて FA-M-β-CyD 処理後の細胞生存率、オートファジー誘導能、ROS 産生、ATP 産生に関して検討した。さらに、これまで未検討であったヒト由来がん細胞である KB 細胞 (FR-α (+)) およびヒトメラノーマ由来 Ihara 細胞 (FR-α (+)) を異種移植した担がんヌードマウスに対する *in vivo* 抗腫瘍活性を腫瘍体積、体重変化および生存率を指標に評価した。以下に本章において得られた知見を詳述する。

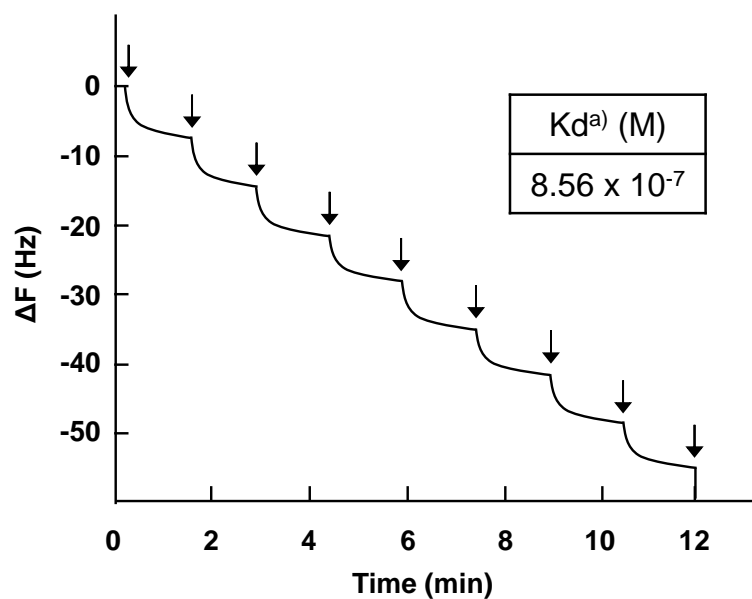
第 2 節 FA-M- β -CyD と葉酸結合タンパク質 (FBP) の相互作用

FR- α による葉酸の認識には、葉酸分子中の α -カルボキシ基が重要である。¹¹⁴⁾ 一方、FA-M- β -CyD は、主に葉酸の γ -カルボキシ基と結合しているため、 α -カルボキシ基を介して、FR- α と結合するものと考えられる。そこで本節では、FA-M- β -CyD が FR- α と結合するか否かを検討するため、FR- α のモデルタンパク質として葉酸結合タンパク質 (Folate binding protein: FBP) を用いて、FA-M- β -CyD と FBP の解離定数を水晶発振子マイクロバランス法 (Quartz crystal microbalance: QCM) により測定した。QCM は、電極表面におけるナノグラムオーダーの質量変化を、周波数変化として検出することが可能な高感度検出デバイスであり、気相中及び液相中において現在幅広く使用されている。

Fig. 34 に示すように、FBP を電極表面に固定化した後、FA-M- β -CyD 1 mg/mL を添加すると、良好な結合曲線が得られた。この曲線をミカエリス・メンテンプロットすることにより求めた FA-M- β -CyD と FBP の解離定数は 8.56×10^{-7} M であり、著しく低値を示した (Fig. 34A)。一方、M- β -CyD は FBP と相互作用せず、測定不能であった (Fig. 34B)。

これらの結果から、FA-M- β -CyD は M- β -CyD に FA を付与したことにより FR- α に認識されることが強く示唆された。

(A) FA-M- β -CyD



(B) M- β -CyD

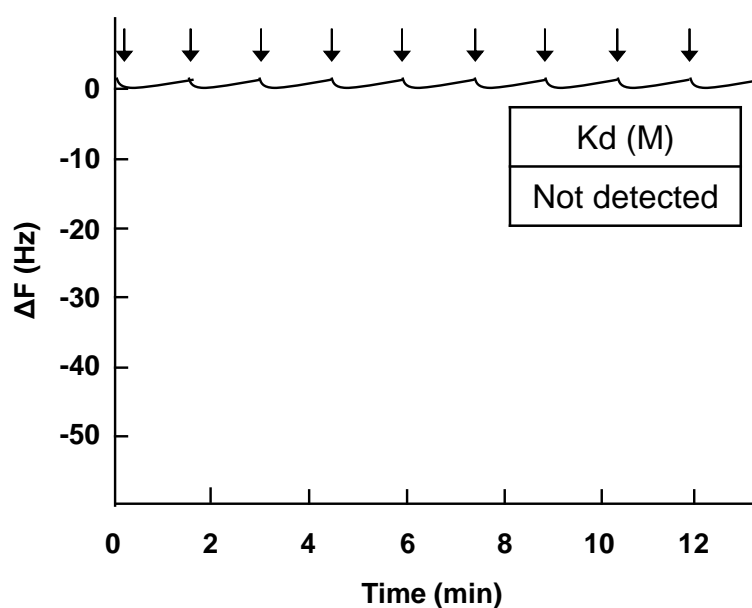


Fig. 34. Binding Curves of M- β -CyDs with Folate Binding Protein (FBP)

The binding curves were determined by a quartz crystal microbalance (QCM) method. The sample buffer was supplied with 0.02 M potassium phosphate, 0.15 M sodium chloride (pH 7.2, 37°C). After fixing of FBP by avidin-biotin system, M- β -CyDs (1 mg/mL) were added to the buffer. The arrows mean the injection point. a) K_d : Dissociation constant.

第 3 節 アポトーシスに及ぼす FA-M- β -CyD の影響

第 1 項 腫瘍細胞に対する FA-M- β -CyD の殺細胞効果

これまで当研究室では、FA-M- β -CyD が FR- α 高発現細胞選択的な殺細胞効果を誘導することを明らかにしてきた。¹¹⁵⁾ しかしながら、従来の *in vitro* での腫瘍モデルは、組織培養処理をしたプラスチックの堅い表面上で腫瘍細胞を培養する手法であり、細胞は非特異的に接着し、単層状に増殖する。結果として、これらの細胞は *in vivo* での腫瘍関連の遺伝子発現プロファイルと形態の両方を失ってしまうことが懸念される。そこで、より生理的環境に近い腫瘍システムを構築するために、多細胞スフェロイドを形成させ、FA-M- β -CyD の殺細胞効果を検討した。

まず、KB 細胞 (FR- α (+)) の細胞懸濁液にスフェロイド形成用 ECM (細胞外マトリックス, TRVIGEN 社製) を添加し、72 時間培養することでスフェロイド KB 細胞 (FR- α (+)) を調製した。本スフェロイドを 5 mM FA-M- β -CyD で 24 時間処理したところ、M- β -CyD 処理群と比較して有意に高い殺細胞効果が認められた (Fig. 35)。これらの結果より、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。

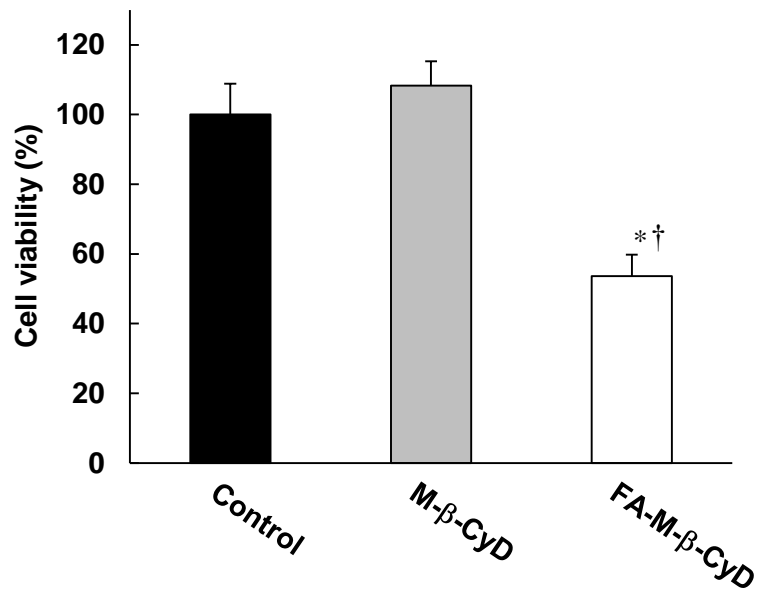


Fig. 35. Cytotoxic Activity of M-β-CyDs for Spheroid of KB Cells

KB cells (3×10^3 cells/well) were incubated for 72 h with RPMI medium (FA-free) and 10 Spheroid Formation ECM at 37°C. KB cells were incubated for 24 h with 50 μ L of medium containing M-β-CyDs (5 mM) at 37°C. After washing twice with RPMI to remove M-β-CyDs, 10 μ L of MTT reagent and 100 μ L of detergent reagent were added to plates, and incubated for 24 h at 37°C. The absorbance at 570 nm against a reference wavelength of 690 nm was measured. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with M-β-CyD.

第 2 項 DNA 断片化に及ぼす FA-M-β-CyD の影響

第 1 章では、DM-β-CyD が KB 細胞において、DNA 含量の低下および caspase-3/7 の活性化を誘導することを明らかにした。しかし、FA-M-β-CyD がアポトーシスを誘導するか否か、詳細は明らかではない。そこで本項では、KB 細胞 (FR-α (+)) において FA-M-β-CyD がアポトーシスの指標である DNA の断片化を誘導するか否かについて検討した。

実験は、KB 細胞 (FR-α (+)) を各種 5 mM M-β-CyDs 含有無血清培地で 2 時間処理し、TUNEL 法により検出した (Fig. 36)。TUNEL 法は、断片化 DNA をビオチン標識ヌクレオチドで標識した後、horseradish peroxidase (HRP) 標識ストレプトアビジンを反応させ、diamino benzidine (DAB) により染色する方法である。なお、M-β-CyD は本実験条件下、DNA の断片化を誘導できなかったため、今回は DM-β-CyD を比較対照として用いた。

Fig. 36 に示すように、ポジティブコントロールとして用いた DM-β-CyD において、KB 細胞は、茶色く染色されたのに対して、FA-M-β-CyD は、コントロール (未処理) と同様、染色されなかった。

これらの結果から、FA-M-β-CyD 処理により DNA の断片化は起こっていないことが示唆された。

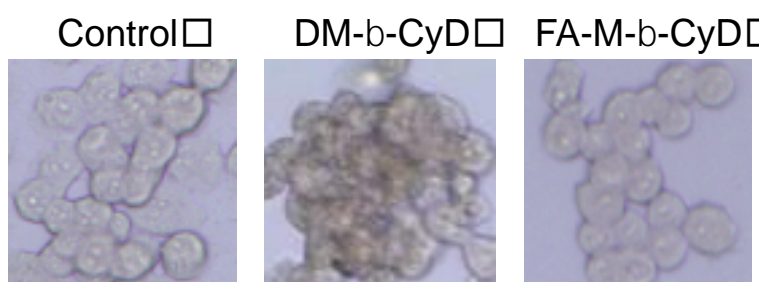


Fig. 36. Effects of M-β-CyDs on DNA Fragmentation in KB Cells (FR-α (+))

KB cells were treated with M-β-CyDs (5 mM) for 2 h. The fragmented DNA was detected by a TUNEL method. The experiments were performed independently three times, and then representative images are shown.

第 3 項 Caspase-3 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前節の結果より、FA-M- β -CyD は DNA の断片化を誘導しないことが示唆された。そこで本項では、アポトーシスが起きた際に DNA の断片化よりも上流で起こる caspase-3 の活性化について、ウエスタンブロット法により検討した。なお、M- β -CyD は本実験条件下、cleaved-caspase-3 の発現を誘導できなかったため、本検討では DM- β -CyD を比較対照として用いた。

Caspase-3 は caspase-family の中でもアポトーシスの実行に中心的な役割を果たしており、通常は分子量 32 kDa の pro-caspase-3 として存在するが、caspase-9 などにより切断されると 20 kDa、19 kDa および 17 kDa の活性型へ変換される。そこで 5 mM M- β -CyDs で 2 時間処理した後、KB 細胞 (FR- α (+)) の caspase-3 の活性化について western blot 法により検討した。DM- β -CyD 処理の細胞では不活性型の pro-caspase-3 のバンド強度の減少および活性型 caspase-3 のバンド強度の増加が観察されたのに対して、FA-M- β -CyD 処理の細胞ではコントロールの場合と同様に不活性型の pro-caspase-3 のバンドのみが観察された (Fig. 37)。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は本実験条件下、caspase-3 を活性化せず、アポトーシスを誘導しないことが示唆された。

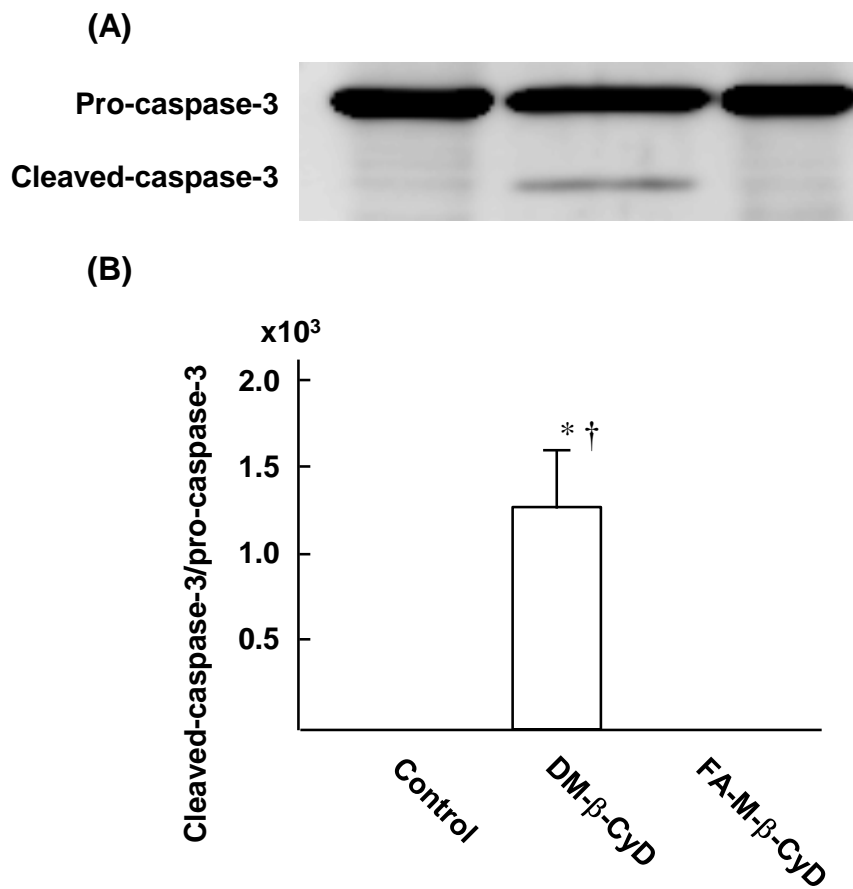


Fig. 37. Effects of M- β -CyDs on Caspase-3 Expression in KB cells (FR- α (+))

KB cells were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 24 h. The caspase-3 protein levels were detected by western blotting. The experiments were performed independently three times, and then representative data are shown. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with FA-M- β -CyD.

第 4 節 FA-M- β -CyD の殺細胞効果におけるオートファジーの関与

第 1 項 FA-M- β -CyD の殺細胞効果に及ぼすオートファジー阻害剤の影響

オートファゴソームの形成には、PI3K class III の活性化を介した隔離膜形成が必要と考えられている。これまで当研究室は FA-M- β -CyD 処理により、オートファゴソームの形成が誘導されることを報告した。⁷⁷⁾ しかしながら、FA-M- β -CyD の殺細胞効果に及ぼすオートファジー阻害剤の影響は明らかではない。そこで本節では、FA-M- β -CyD の殺細胞効果に及ぼす PI3K class III 阻害剤 (3-MA および LY294002) の影響について検討した。

Fig. 38 に示すように、5 mM FA-M- β -CyD を 2 時間処理後の殺細胞効果は、3-MA および LY294002 処理により減弱したことから、PI3K class III の活性化を介したオートファジーの関与が示唆された。

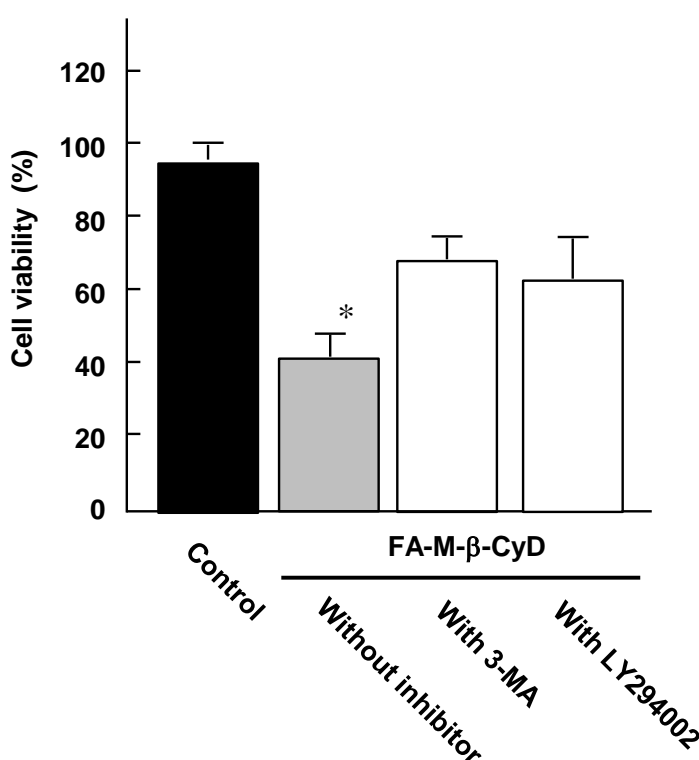


Fig. 38. Effects of Autophagy Inhibitors (3-MA and LY294002) on Cytotoxic Activity of FA-M- β -CyD in KB Cells (FR- α (+))

KB cells were incubated with 3-MA (50 mM) and LY294002 (50 μ M) at 37°C for 1 h, and then further incubated with medium containing FA-M- β -CyD (5 mM) at 37°C for 2 h. Each value represents the mean \pm S.E. of 7 experiments. * p < 0.05, compared with control.

第 2 項 FA-M- β -CyD によるオートファゴソームの形成

これまでの検討より、FA-M- β -CyD はアポトーシスではなく、オートファジー誘導を介して、殺細胞効果を発揮することが示唆された。また、小野寺らは KB 細胞 (FR- α (+)) に対して、5 mM FA-M- β -CyD で 2 時間処理後に、オートファゴソームの形成が誘導されることを報告している。⁷⁷⁾ そこで本項では、これまで未検討であった FA-M- β -CyD により誘導されるオートファゴソームの時間変化を検討した (Fig. 39)。なお、オートファゴソームは、マーカー分子である LC3-II^{116,117)} を Cyto-ID[®] を用いて染色し、蛍光顕微鏡により観察した。

Fig. 39 に示すように、コントロール (未処理) では、経時的に LC3-II 由来の蛍光強度が増大した。これは、血清および葉酸フリーの培地で処理したために細胞が飢餓状態に陥り、オートファジーが亢進したことに起因する。一方、FA-M- β -CyD は処理後 2 時間で LC3-II 由来の蛍光は観察され、その蛍光強度はコントロール (未処理) よりも有意に高かった。さらに、FA-M- β -CyD 処理後の蛍光強度は 6 時間で最大となり、12 時間後には減弱した。これらの結果より、FA-M- β -CyD は少なくとも処理後 2 時間でオートファゴソームの形成を誘導し、その効果は 6 時間まで増強されることが示唆された。

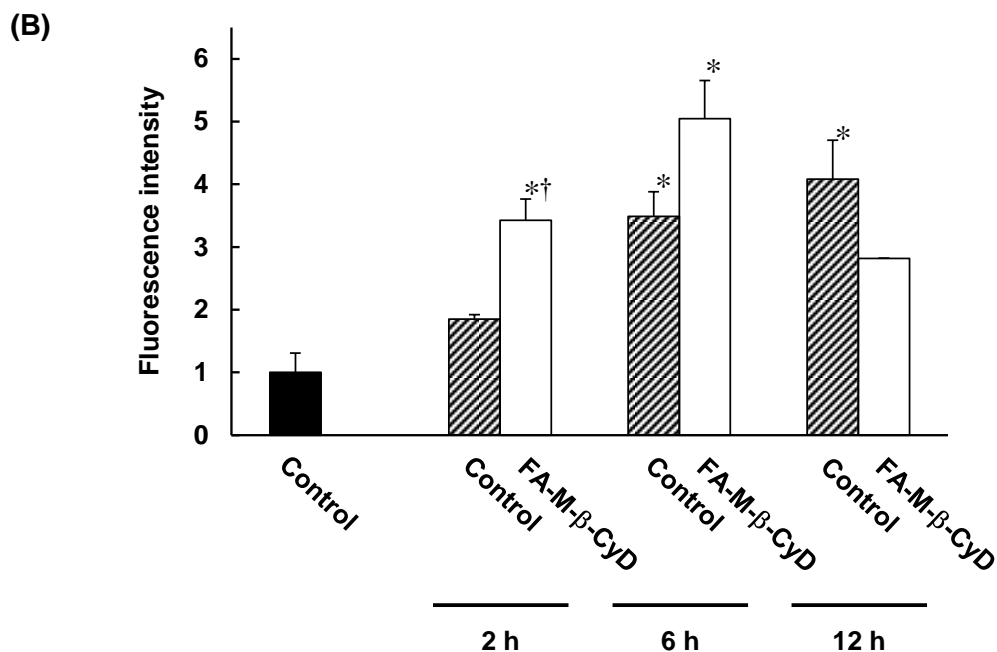
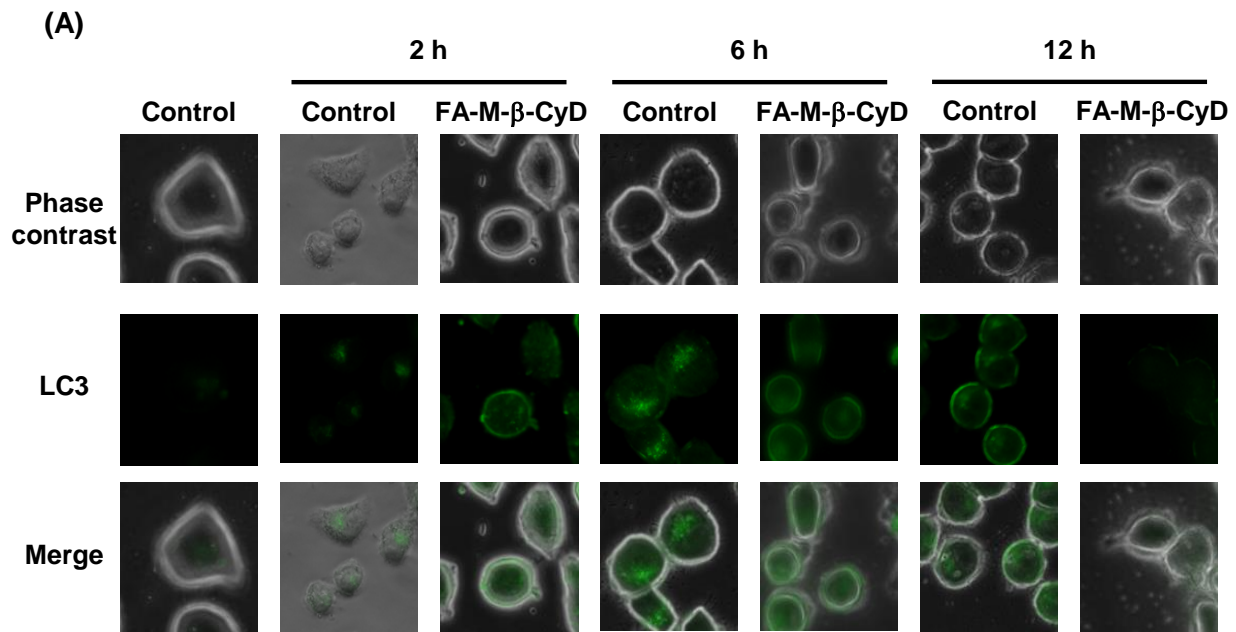


Fig. 39. Effect of FA-M- β -CyD on Autophagosome Formation in KB Cells (FR- α (+))

KB cells were treated with FA-M- β -CyD (5 mM) for 2, 6 and 12 h. Then, KB cells were treated with Cyto-ID[®] for 30 min. (A) The cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and then representative images are shown. (B) The fluorescence intensity was quantified by BZ-II analyzer. Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control (0 h). † $p < 0.05$, compared with control (2 h).

第 5 節 FA-M- β -CyD によるオートファジー誘導機構

第 1 項 LC3-II 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

小野寺らは FA-M- β -CyD 処理後の KB 細胞 (FR- α (+)) において、オートファゴソームマーカーとして知られる LC3 を蛍光標識し、その蛍光強度の増大からオートファゴソームの形成が誘導されることを明らかとした。⁷⁷⁾ 一般に、LC3 はオートファジーの進行に伴い、Atg4 などにより分解を受け LC3-I となり、さらに phosphatidyl ethanolamine により脂質化され、LC3-II となりオートファゴソーム膜に局在する。そこで本節では KB 細胞 (FR- α (+)) において、5 mM FA-M- β -CyD を 2 時間処理することにより、オートファゴソーム形成が進行するか否かを LC3-II のタンパク量を指標として評価した。Fig. 40 に示すように、M- β -CyD 処理の細胞ではコントロールの場合と同様に LC3-I のバンドのみが観察されたのに対して、FA-M- β -CyD 処理の細胞では LC3-I のバンド強度の減少および LC3-II のバンド強度の増大が観察された。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は LC3-II への脂質化を誘導し、オートファゴソームの形成を促進させることが示唆された。

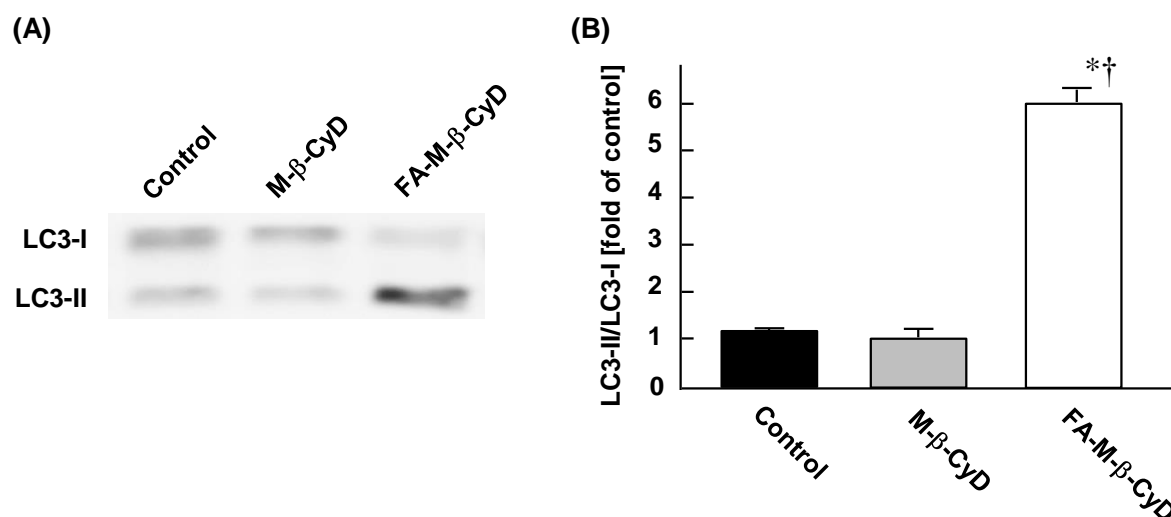


Fig. 40. Effects of M- β -CyDs on LC3-II Expression in KB Cells (FR- α (+))

KB cells were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 2 h. The LC3-II protein levels were detected by western blotting and quantified by Image Quant TL. The experiments were performed independently three times. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with M- β -CyD.

第 2 項 p62 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前項で、FA-M- β -CyD はオートファゴソームの形成を誘導することが示唆された。p62 は、ユビキチン結合タンパク質の一つであり、細胞内でクリアランスされるユビキチン化タンパク質凝集体など、オートファジーによって分解される細胞質カーゴを輸送するレセプターとして機能している。さらに、p62 はオートファゴソームマーカである LC3 にも結合し、ユビキチン化タンパク質凝集体と一緒にオートファジーにより分解を受けることから、p62 の発現レベルを調べることでオートファジーによるタンパク質分解の進行を追跡することができる。そこで本項では、KB 細胞 (FR- α (+)) において、FA-M- β -CyD 処理により p62 の分解、すなわちオートファジーの進行がみられるか否かを GFP 融合 p62 を用いて検討した。なお、GFP 融合 p62 は PremoTM Autophagy Sensor GFP-62 kit を用いて細胞内に導入した。Fig. 41 に示すように、5 mM FA-M- β -CyD を 2 時間処理したところ、コントロール (未処理) および M- β -CyD 処理と比較して、p62 由来の蛍光が有意に減弱した。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は p62 の分解を誘導し、オートファジーを進行させることが示唆された。

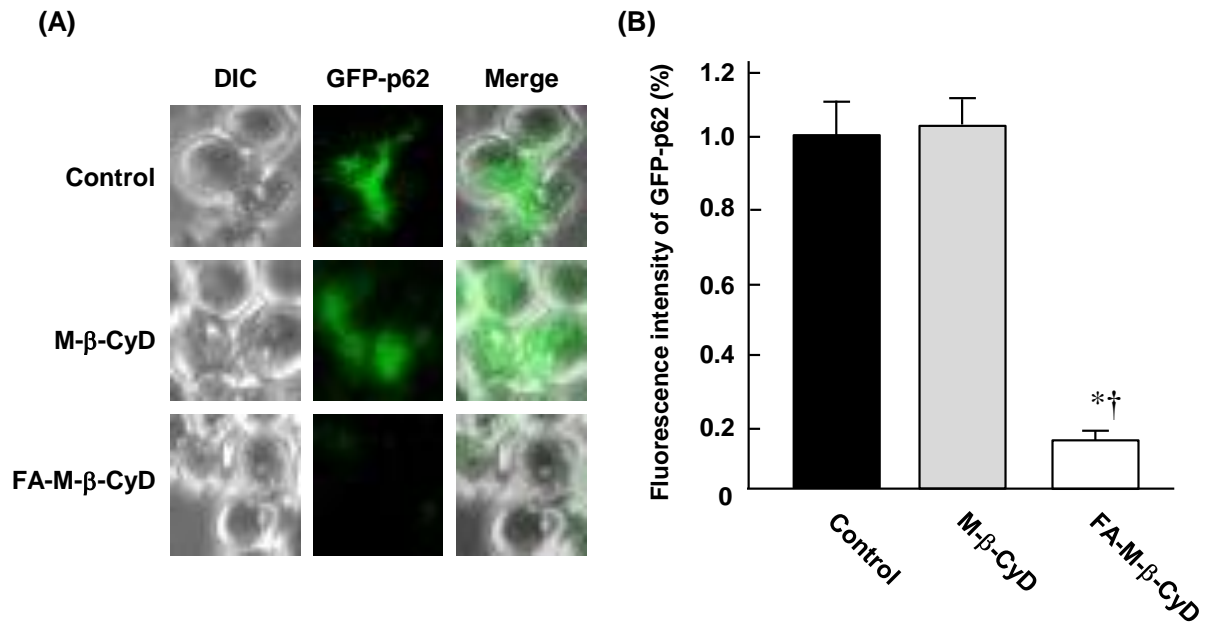


Fig. 41. Effects of M-β-CyDs on Degradation of GFP-labeled p62 in KB Cells (FR-α (+))

KB cells were treated with GFP-labeled p62 (50 μL) for 16 h. Then, cells were treated with M-β-CyDs (5 mM) for 1 h. After washed twice with culture medium (FA-free), cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative data are shown. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with M-β-CyD.

第 3 項 Beclin-1 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

オートファゴソームの形成には、Beclin-1 とフォスファチジルイノシトール 3 リン酸 (Phosphatidylinositol 3-phosphate : PtdIns3P) との複合体形成が必須であり、隔離膜の形成を誘導する上で重要な役割を果たすことが知られている。¹¹⁸⁻¹²¹⁾ そこで本項では、Beclin-1 の発現量に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を調べるため、KB 細胞 (FR- α (+)) を 5 mM M- β -CyDs で 2 時間処理した後、western blot 法により、Beclin-1 の発現量を評価した。

Fig. 42 に示すように、M- β -CyD で処理後の Beclin-1 のバンド強度は、コントロールと同程度であったのに対して、FA-M- β -CyD で処理後の Beclin-1 のバンド強度は著しく増大した。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は Beclin-1 の発現量を増大させ、オートファゴソームの形成を促進させることが示唆された。

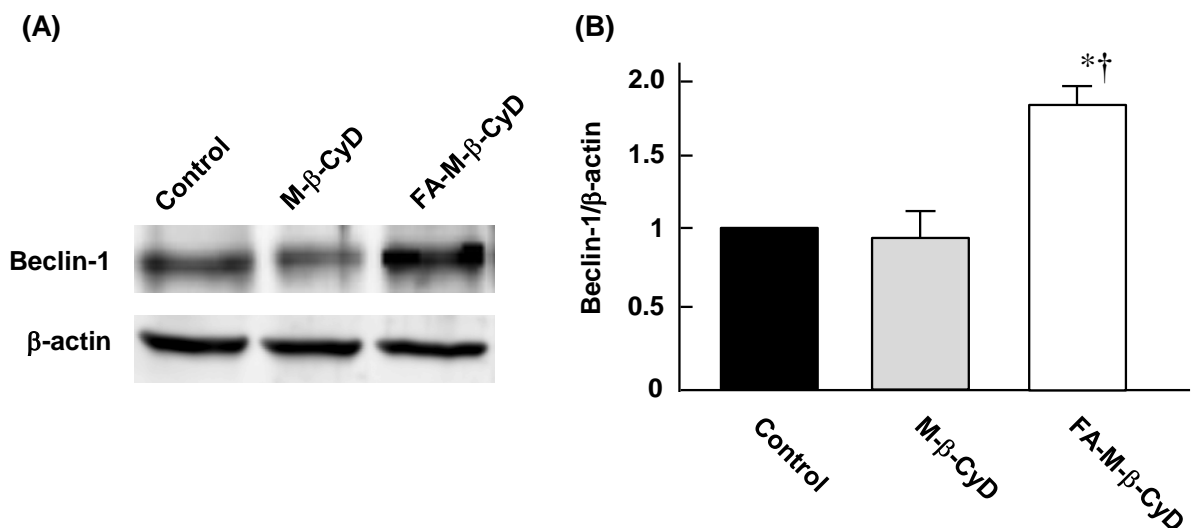


Fig. 42. Effects of M- β -CyDs on Beclin-1 Expression in KB Cells (FR- α (+))

(A) KB cells were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 2 h. The beclin-1 protein levels were detected by western blotting, and then quantified by Image Quant TL. The experiments were performed independently three times. (B) The band intensity of beclin-1/ β -actin ratio. * p < 0.05, compared with control. † p < 0.05, compared with M- β -CyD.

第 4 項 Atg7 発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

Atg5 および Atg7 はオートファジーに必須の遺伝子であるとされてきたが、近年、Atg5 および Atg7 を欠損させたマウス繊維芽細胞においてオートファゴソームの形成およびタンパク質の分解が認められたことから、Atg5/Atg7 非依存的なオートファジー誘導機構が存在することが報告された。¹²²⁾ そこで本項では、FA-M- β -CyD により誘導されたオートファジーが Atg5/Atg7 を介するか否かを検討した。

実験は、KB 細胞 (FR- α (+)) を 5 mM M- β -CyDs で 2 時間処理した後、Atg7 の発現量を western blot 法を用いて検討した。Fig. 43 に示すように、本実験条件下、M- β -CyD および FA-M- β -CyD 処理後の Atg7 のバンド強度は、コントロール (未処理) と同程度であった。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は Atg5/Atg7 非依存性のオートファジーを誘導する可能性が示唆された。

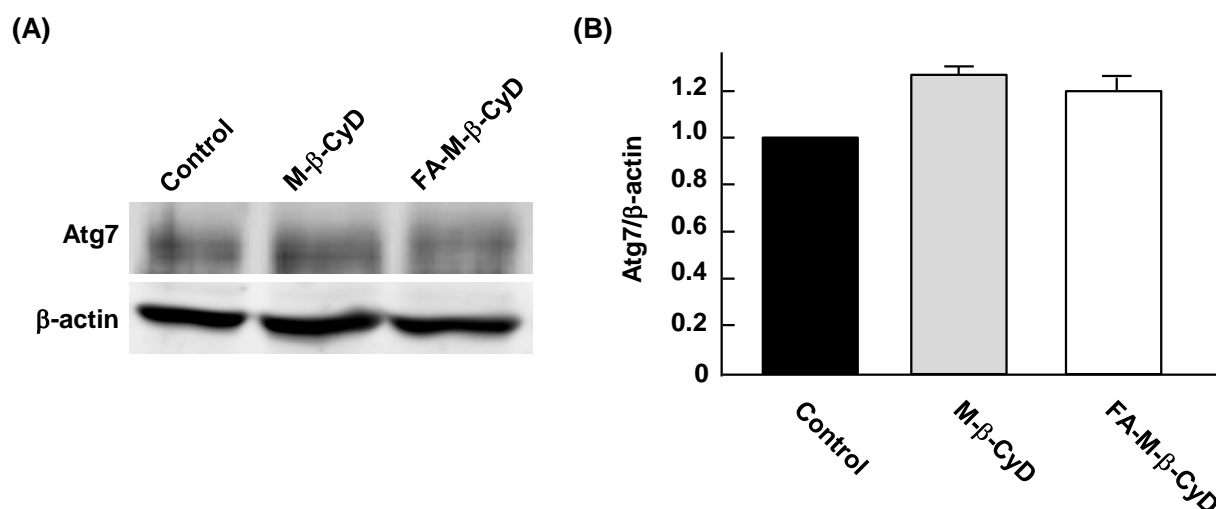


Fig. 43. Effects of M- β -CyDs on Atg7 Expression in KB Cells (FR- α (+))

(A) KB cells were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 2 h. The Atg7 protein levels were detected by western blotting, and then quantified by Image Quant TL. The experiments were performed independently three times. (B) The band intensity of Atg7/ β -actin ratio.

第 5 項 FA-M- β -CyD によるマイトファジー誘導

これまでの検討より、FA-M- β -CyD は KB 細胞に対してオートファジーを誘導することが明らかとなった。一方、我々は FA-M- β -CyD により誘導されたオートファゴソームがミトコンドリアと一部共局在することを報告した。⁷⁷⁾ そこで本項では、FA-M- β -CyD がオートファジーのなかでもミトコンドリアを選択的に分解するマイトファジーを誘導するか否かを検討した。なお、マイトファジーの検出には、Mtpagy Dye[®] (同仁化学) を用いた。Mtpagy Dye[®] は、生細胞膜を透過し、細胞内のミトコンドリアに集積した後、化学結合によりミトコンドリアに固定化される。通常、Mtpagy Dye[®] の蛍光強度は低い状態にあるが、マイトファジーが誘導されてミトコンドリアがリソソームと融合すると、Mtpagy Dye[®] の蛍光強度が著しく増大する。

実験は、KB 細胞 (FR- α (+)) を Mtpagy Dye[®] で 15 分間前処理した後、5 mM M- β -CyDs で 2 時間処理した。その後、Lyso Dye[®] にてリソソームを染色し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、Mtpagy Dye[®] 由来の赤色蛍光は、FA-M- β -CyD 処理した細胞において観察された (Fig. 44)。一方、M- β -CyD で処理した KB 細胞 (FR- α (+)) では Mtpagy Dye[®] 由来の蛍光は観察されなかった。これらの結果より、FA-M- β -CyD は KB 細胞 (FR- α (+)) においてマイトファジーを誘導する可能性が示唆された。

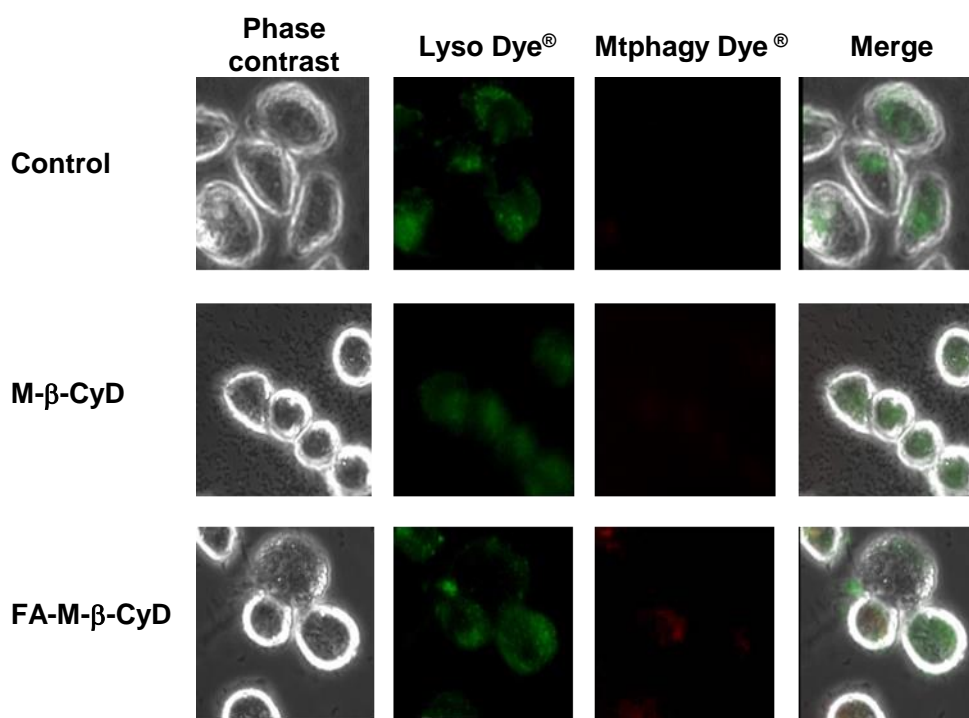


Fig. 44. Effect of M-β-CyDs on Mitophagy in KB Cells (FR-α (+))

KB cells were treated Mtphagy Dye[®] for 15 min. Then, KB cells were treated with M-β-CyDs (5 mM) for 2 h and then Lyso Dye[®] for 10 min. The cells were scanned with a fluorescence microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

第 6 項 PINK1 発現に及ぼす FA-M-β-CyD の影響

一般に、マイトファジーはミトコンドリアが損傷を受けたときに起こる膜電位の脱分極などをシグナルとして開始される。脱分極が起こると、細胞質内の PINK1 (PTEN induced putative kinase 1) がミトコンドリア外膜に集積する。正常なミトコンドリアにおいて、PINK1 はミトコンドリア内膜に輸送された後、内膜に局在する Rhomboid 様タンパク質 PARL によって 52 kDa のフォームに断片化され、プロテアソーム分解を受ける。一方、脱分極が起きたミトコンドリアでは、PINK1 のミトコンドリア内膜への輸送および PARL による分解が阻害され、断片化されなかった全長 PINK1 がミトコンドリア外膜のサイトゾル面に集積する。さらに、そこに集積したタンパク質 Parkin によって、マイトファジーが引き起こされる。したがって、PINK1 タンパク質はマイトファジー誘導のマーカー分子として考えられている。そこで本項では、FA-M-β-CyD は KB 細胞 (FR-α(+)) において、PINK1 タンパク質の発現を誘導するか否かをウエスタンブロッティング法により検討した。

Fig. 45 に示すように、FA-M-β-CyD は KB 細胞 (FR-α(+)) において、PINK1 の発現を誘導することが明らかとなった。一方、M-β-CyD では PINK1 の発現誘導は認められなかった。これらの結果より、FA-M-β-CyD はミトコンドリア膜上の PINK1 の発現を上昇させ、マイトファジーを誘導することが示唆された。

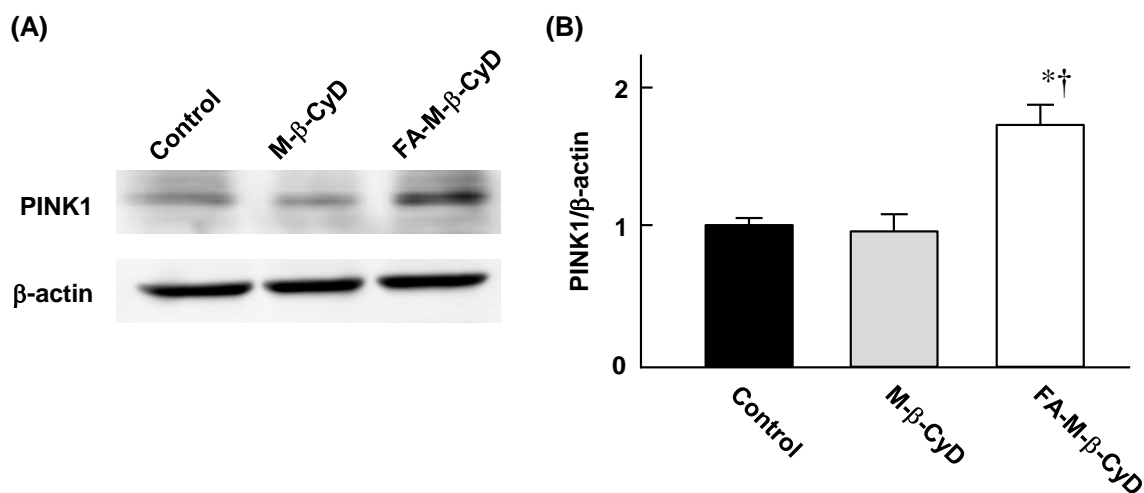


Fig. 45. Effects of M-β-CyDs on Expression of PINK1 in KB Cells

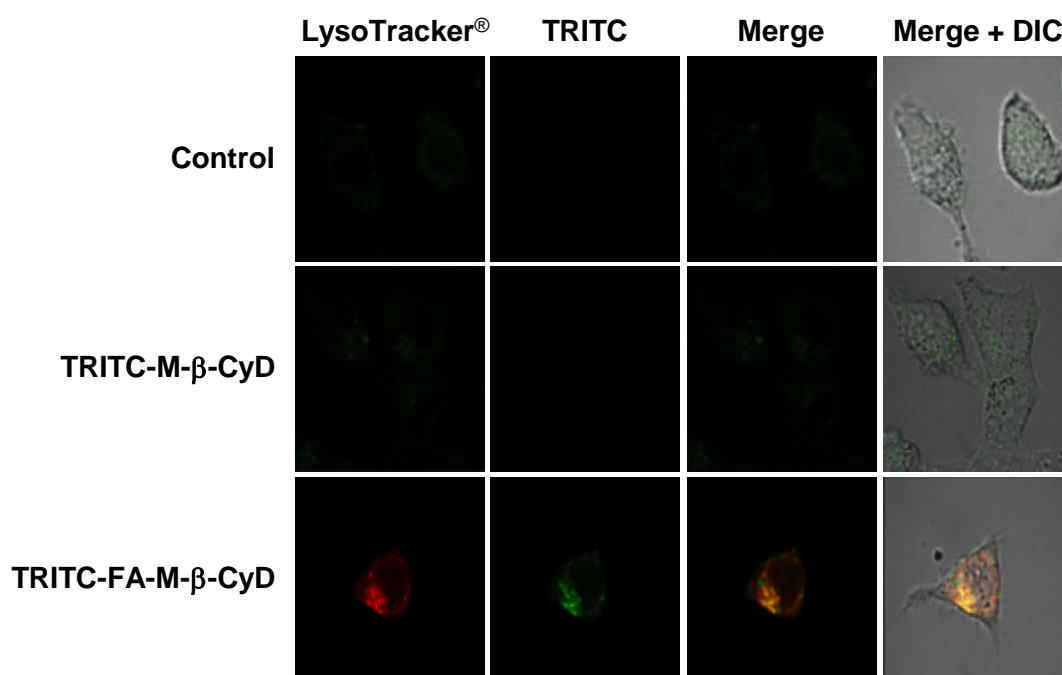
KB cells were treated with M-β-CyDs (5 mM) for 2 h. The PINK1 protein levels were detected by western blotting. The experiments performed independently three times. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with M-β-CyD.

第 6 節 FA-M- β -CyD の細胞内動態

これまで当研究室は、FA-M- β -CyD が FR- α を介して細胞内に取り込まれ、抗腫瘍効果を示すことを報告した。⁷⁷⁾ しかしながら、FA-M- β -CyD の細胞内動態については明らかではない。そこで本節では、KB 細胞に TRITC-M- β -CyDs (10 μ M) を 2 時間および 24 時間処理した後、FA-M- β -CyD の細胞内動態について、酸性オルガネラ染色剤である LysoTracker[®] との共局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

Fig. 46A は、KB 細胞に TRITC-M- β -CyDs (10 μ M) を 2 時間処理後の顕微鏡写真を示す。TRITC-M- β -CyD 処理では、細胞内に TRITC 由来の蛍光はほとんど観察されなかったのに対して、TRITC-FA-M- β -CyD 処理では、細胞内に TRITC 由来の蛍光が観察された。また、LysoTracker[®] と一部共局在したことから、FA-M- β -CyD は細胞内に取り込まれ、エンドソーム内に一部局在することが示された。一方、TRITC-FA-M- β -CyD 処理後 24 時間では、LysoTracker[®] と共局在している部分が減少したことから、FA-M- β -CyD の一部は何らか機構によりエンドソームを脱出し、核や細胞質に移行する可能性が示唆された (Fig. 46B)。

(A) 2 h



(B) 24 h

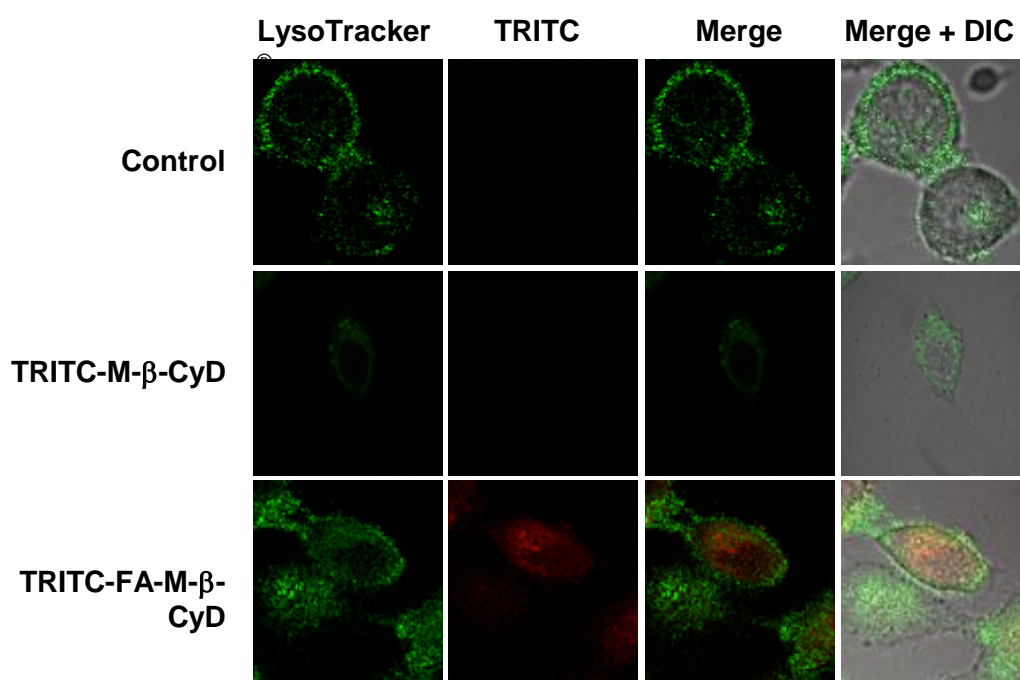


Fig. 46. Cellular Localization of TRITC-M-β-CyDs in KB Cells (FR-α (+))

KB cells were treated with TRITC-M-β-CyDs (10 μM) for 2 h (A) and 24 h (B), then the cells were treated with LysoTracker®. After washed twice with medium, the cells were scanned with a confocal laser scanning microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

第 7 節 ミトコンドリア機能に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

第 1 項 FA-M- β -CyD とミトコンドリアの共局在

近年、Hamasaki らによって、オートファゴソームの形成に必要な隔離膜は、ミトコンドリアと小胞体のコンタクトサイトにおいて形成されることが報告された。¹²³⁾ また、ミトコンドリアには葉酸トランスポーター (MFT) が発現していることから、^{124, 125)} FA-M- β -CyD がミトコンドリアに作用している可能性が考えられる。そこで本節では、FA-M- β -CyD のミトコンドリアへの影響を確認するために、KB 細胞を TRITC-M- β -CyDs (10 μ M) で 24 時間処理した後、FA-M- β -CyD の細胞内動態について、ミトコンドリア染色剤である MitoTracker[®] との共局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。なお、前節での検討で TRITC-M- β -CyDs (10 μ M) を 24 時間処理後において、より TRITC-FA-M- β -CyD が細胞質中に拡散している結果が得られたため、今回は 24 時間後における局在を観察した。

Fig. 47 は、KB 細胞に TRITC-M- β -CyDs (10 μ M) を 24 時間処理後の顕微鏡写真を示す。TRITC-M- β -CyD 処理において、細胞内に TRITC 由来の蛍光は観察されなかったのに対して、TRITC-FA-M- β -CyD 処理では、TRITC 由来の蛍光が観察され、MitoTracker[®] と一部共局在することが示された。これらの結果より、FA-M- β -CyD は細胞内に取り込まれ、一部はミトコンドリアに局在することが示唆された。

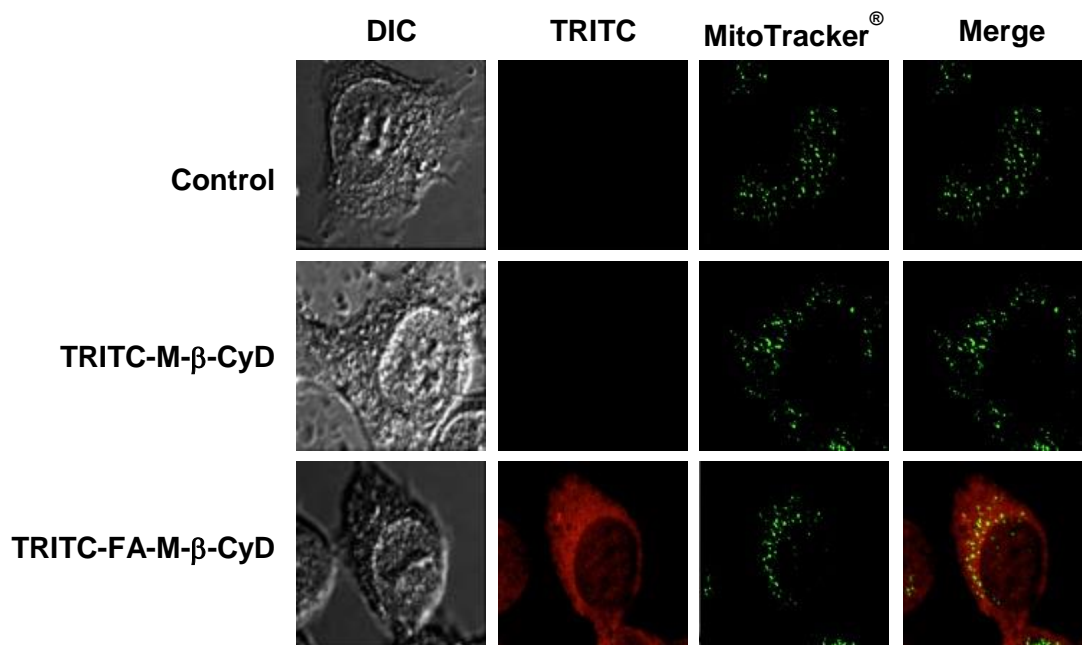


Fig. 47. Colocalization of TRITC-M-β-CyDs with Mitochondria in KB Cells (FR-α (+))

KB cells were treated with TRITC-M-β-CyDs (10 μM) for 24 h, and then the cells were treated with MitoTracker[®]. After washed twice with medium, the cells were scanned with a confocal laser microscope. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

第 2 項 細胞内ミトコンドリア数に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

マイトファジーは、ミトコンドリアを選択的に除去するシステムであり、進行に伴いミトコンドリアの数は減少する。そこで本項では、FA-M- β -CyD 処理により細胞内ミトコンドリア数が減少するか否かを検討した。なお、細胞内ミトコンドリア数は、細胞内ミトコンドリア DNA (mtDNA) コピー数を核 DNA (nDNA) を基準として、リアルタイム PCR 法により相対的に測定した。

Fig. 48 に示すように、5 mM FA-M- β -CyD で KB 細胞 (FR- α (+)) を 2 時間処理したところ、mtDNA コピー数がコントロール (未処理) と比較して有意に減少した。これらの結果より、FA-M- β -CyD はマイトファジーを誘導し、細胞内ミトコンドリア数を減少させることが示唆された。

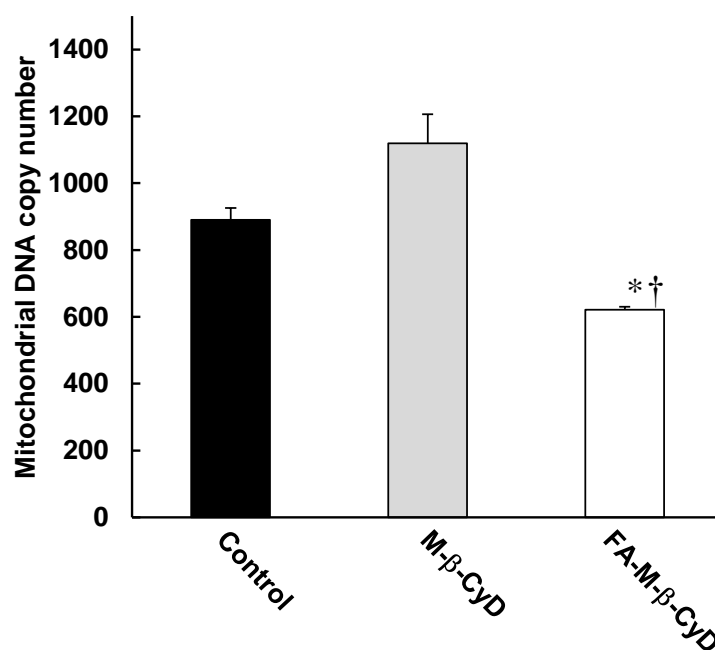


Fig. 48. Effects of M- β -CyDs on mtDNA Copy Number in KB Cells (FR- α (+))

KB cells were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 2 h. Mitochondrial DNA (mtDNA) to nuclear DNA (nDNA) copy number was measured by quantitative real time PCR. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments. * p < 0.05, compared with control. † p < 0.05, compared with M- β -CyD.

第 3 項 単離ミトコンドリアの膜電位に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

第 1 章 第 8 節で述べたように、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) は、電子伝達系による H^+ の汲み出しによって生じるミトコンドリア内膜のマトリックス側が負、外側が正となる電位勾配によって形成されており、通常は約 -180 mV の電位差を示す。Rhodamine 123 を細胞に処理すると電位差に応じてミトコンドリアに取り込まれるため、その取り込み量を測定することによって膜電位を間接的に測定することができる。⁹⁷⁾ 前節で述べたように、脱分極が起きたミトコンドリアでは、PINK1 のミトコンドリア内膜への輸送および分解が阻害され、Parkin によって、マイトファジーが誘導されることが知られている。¹²⁶⁾ そこで本項では、FA-M- β -CyD 処理後のミトコンドリア膜電位を検討した。

実験は、KB 細胞 (FR- α (+)) からミトコンドリアを単離し、 $50\text{ }\mu\text{M}$ FA-M- β -CyD を処理した後、Rhodamine 123 でミトコンドリアを染色し、その蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーで測定した。また、ミトコンドリア内膜には MFT が存在するため、MFT 競合阻害剤として葉酸添加系も評価に加えた。

Fig. 49 に示すように、単離ミトコンドリアの膜電位は FA-M- β -CyD 処理により有意に増大した。さらに、増大した単離ミトコンドリアの膜電位は、MFT 競合阻害剤である葉酸添加により、コントロール (未処理) と同程度まで低下した。一方、M- β -CyD 処理では、膜電位に変化はみられなかった。これらの結果より、FA-M- β -CyD は KB 細胞 (FR- α (+)) の MFT を介してミトコンドリア膜電位を上昇させることが示唆された。

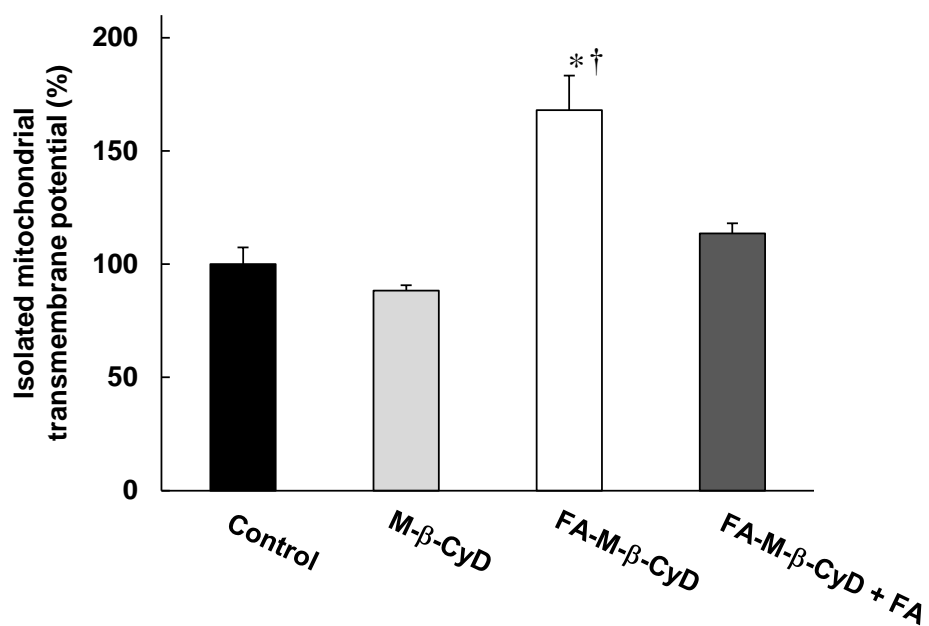


Fig. 49. Effects of M-β-CyDs on Mitochondrial Transmembrane Potential in Mitochondria Isolated from KB Cells (FR-α (+))

Isolated mitochondria was treated with M-β-CyDs (50 μM) with or without FA (500 μM) for 1 h. Mitochondrial transmembrane potential was determined by rhodamine 123 staining with fluorescent microplate reader. Each value represents the mean ± S.E. of 3-6 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with M-β-CyD.

第 4 項 ATP 産生に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前項の結果より、FA-M- β -CyD は KB 細胞 (FR- α (+)) の MFT を介してミトコンドリア膜電位を上昇させることが示唆された。また、本節第 1 項より、FA-M- β -CyD がミトコンドリアと一部共局在することが示唆された。これらのことから、FA-M- β -CyD はミトコンドリアの機能に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。代表的なミトコンドリアの機能の一つに ATP 産生がある。そこで本項では、ATP 産生量に及ぼす M- β -CyDs の影響について検討した。なお、ATP 産生量の変化はホタル・ルシフェラーゼ発光法を用いて検出した。さらに、FA-M- β -CyD がミトコンドリアの機能に影響を及ぼす場合、細胞内に取り込まれることが重要であるか否かを検討するため、FR- α 低発現細胞である A549 細胞および FR- α ノックダウン KB 細胞を比較対照として用いた。その際の FR- α の発現は RT-PCR 法により確認した。(Figs. 50, 51)

Fig. 52A に示すように、KB 細胞を 5 mM FA-M- β -CyD で 2 時間処理したところ、コントロール (未処理) と比較して、有意に ATP 産生量が低下した。一方、M- β -CyD 処理による ATP 産生量の変化は認められなかった。Fig. 52B に示すように、A549 細胞において、FA-M- β -CyD 処理による ATP 産生量の低下は認められなかった。しかしながら、FR- α ノックダウン KB 細胞において、ATP 産生量は FA-M- β -CyD 処理により低下した (Fig. 52C)。この理由として、FA は解糖系に必須であり、FR- α をノックダウンしたことにより ATP 産生に影響を及ぼした可能性が考えられる。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は細胞内に取り込まれることで、ミトコンドリアの機能を低下させる可能性が示唆された。

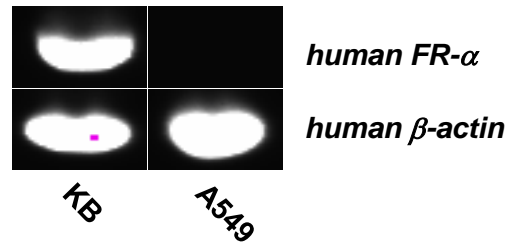


Fig. 50. *FR-α* mRNA Expression in KB Cells and A549 Cells
 The *FR-α* mRNA was detected by RT-PCR method.

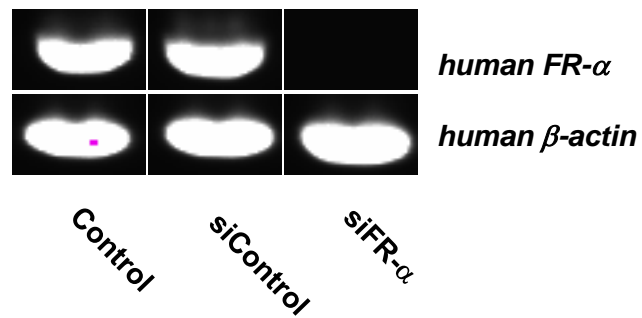


Fig. 51. *FR-α* mRNA Expression after Transfected with siFR-α in KB Cells
 KB cells were transfected with 100 nM Lipofectamine2000TM/siFR-α complex for 24 h. The *FR-α* mRNA was detected by RT-PCR method.

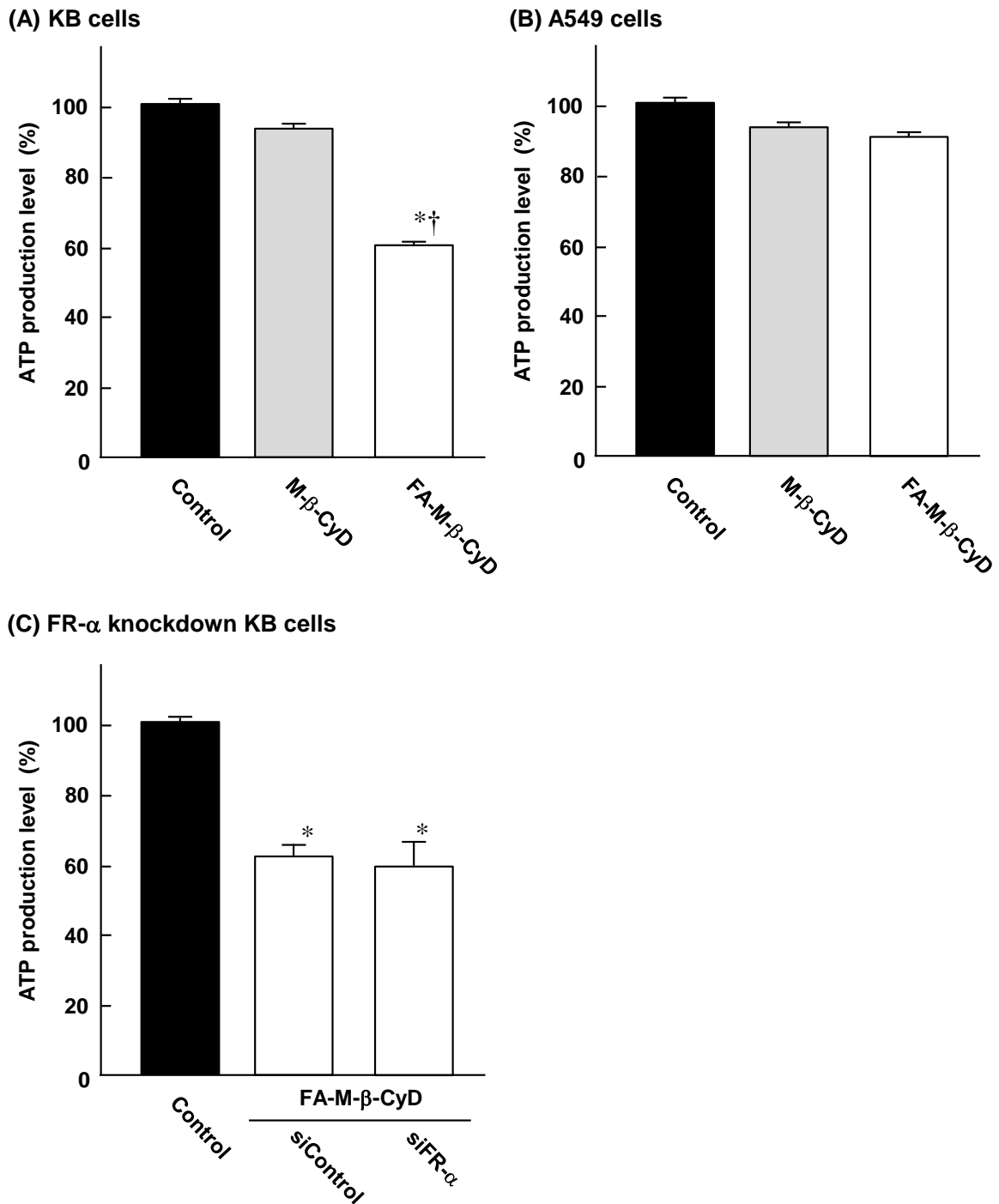


Fig. 52. Effects of M-β-CyDs on ATP Production in KB Cells (A), A549 Cells (B) and FR-α Knockdown KB Cells (C)

The cells were treated with M-β-CyDs (5 mM) for 2 h. After washed twice with culture medium, cells were treated with ATP detection reagent. Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with M-β-CyD.

第 5 項 ROS 産生に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前項での検討より、KB 細胞に 5 mM FA-M- β -CyD を 2 時間処理することにより、ATP 産生量を低下させることが明らかとなった。ミトコンドリアは細胞内で ROS を産生するオルガネラである。そこで本項では、細胞内の ROS 産生量に及ぼす FA-M- β -CyD の影響について検討した。なお、細胞内の ROS は、ROS により酸化されることで蛍光を発する Total ROS detection reagent を用いて蛍光顕微鏡により観察した。

Fig. 53A, B に示すように、KB 細胞に 5 mM M- β -CyD を処理後 2 時間で ROS 由来の蛍光は観察されなかった。一方、5 mM FA-M- β -CyD を 2 時間処理したところ、ROS 由来の蛍光が著しく増大した。さらに、FR- α 低発現細胞である A549 細胞および FR- α ノックダウン KB 細胞を FA-M- β -CyD で処理しても ROS 由来の蛍光は変化せず、コントロール (未処理) と同程度であった (Figs. 53C, D および 53E, F)。これらの結果より、FA-M- β -CyD は、FR- α 発現細胞選択的に ROS の産生を誘導することが示唆された。

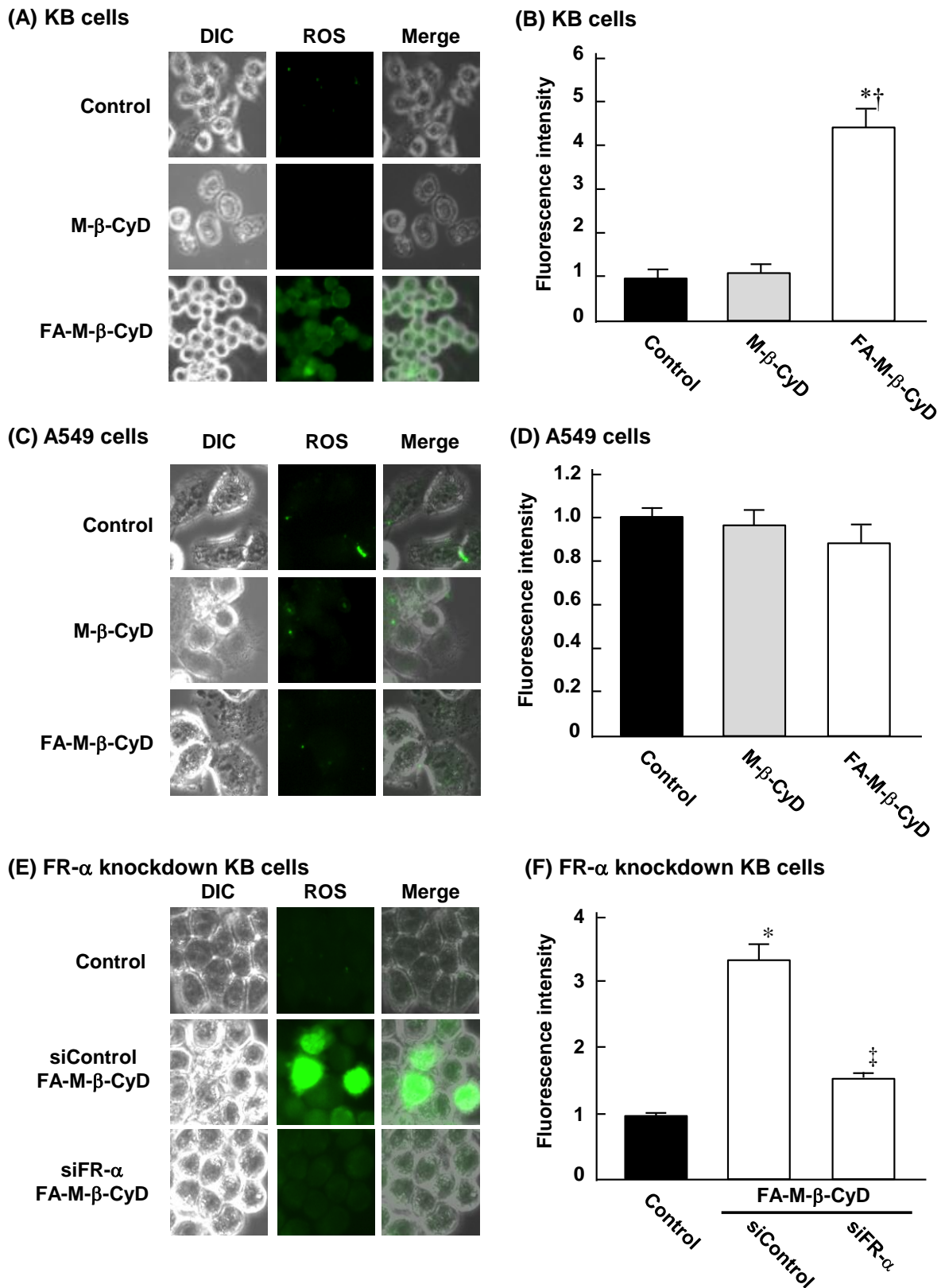


Fig. 53. Effects of M-β-CyDs on ROS Production in KB Cells (A, B), A549 Cells (C, D) and FR-α Knockdown KB Cells (E, F)

(A, C, E) Cells were treated with M-β-CyDs (5 mM) and ROS detection reagent for 2 h. (B, D, F) The fluorescence intensity was quantified by BZ-II analyzer. Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with M-β-CyD. ‡ $p < 0.05$, compared with siControl.

第 6 項 FA-M-β-CyD のオートファジー誘導能に及ぼす ROS 阻害剤の影響

前項において、KB 細胞に 5 mM FA-M-β-CyD を 2 時間処理することで ROS の産生が誘導されることを明らかにした。そこで本項では、FA-M-β-CyD により誘導されるオートファジーが ROS の産生を介するものであるか否かを ROS 阻害剤を用いて検討した。今回、ROS 阻害剤には、抗酸化剤である *N*-acetyl-cysteine (NAC) を用いた。

Fig. 54 より、KB 細胞において、5 mM FA-M-β-CyD の単独処理により増大した LC3 由来の蛍光強度は、FA-M-β-CyD と NAC の同時処理により減弱した。これらの結果より、FA-M-β-CyD のオートファジー誘導は、ROS の産生を介することが示唆された。一方で、A549 細胞および FR-α ノックダウン KB 細胞において、FA-M-β-CyD 処理によるオートファジー誘導は観察されなかった (Fig. 55)。

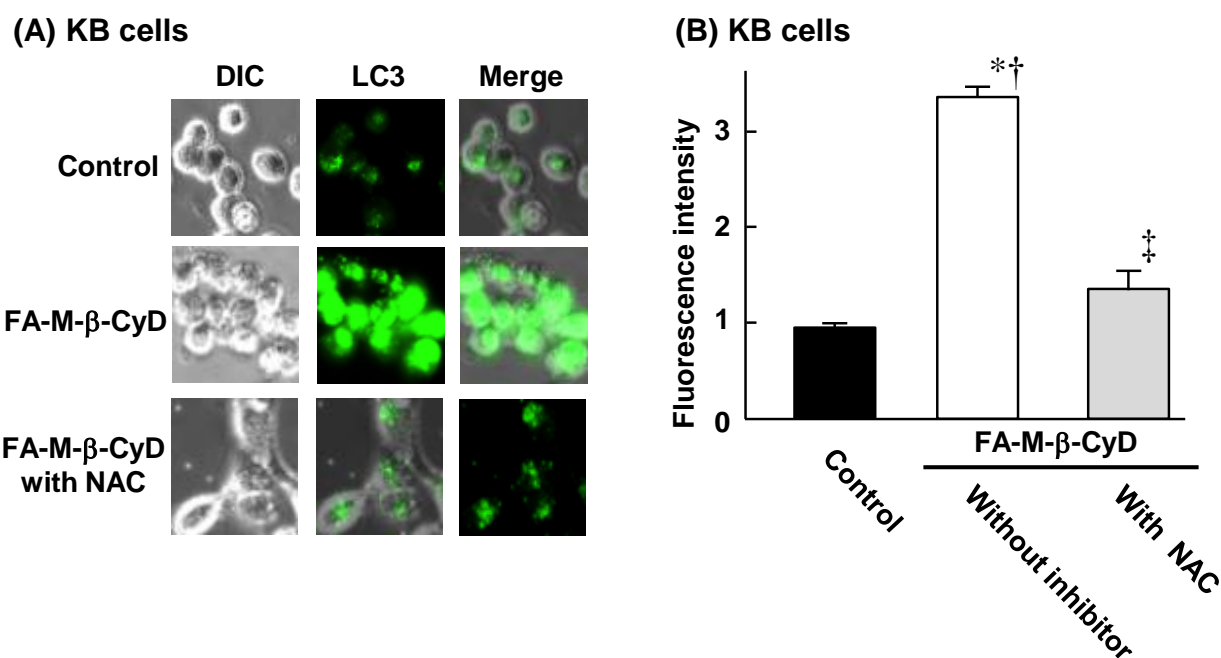
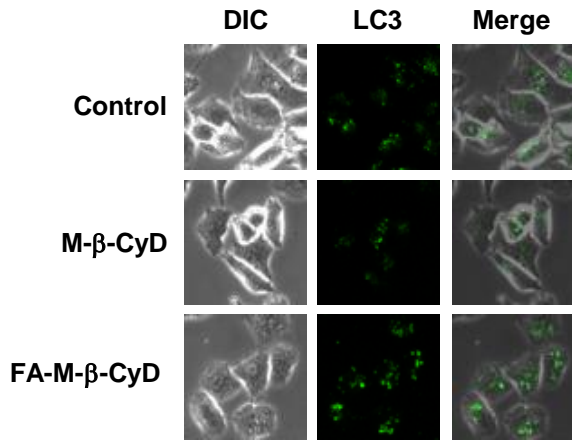


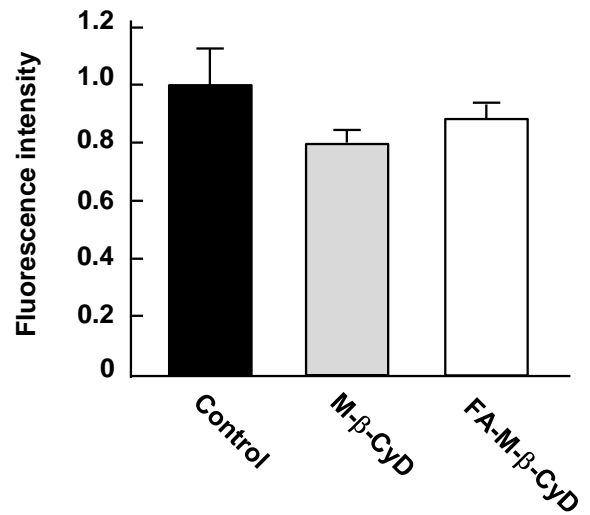
Fig. 54. Effects of ROS Inhibitor on Autophagosome Formation Induced by FA-M-β-CyD in KB Cells (FR-α (+))

KB cells were treated with FA-M-β-CyD (5 mM) and *N*-acetyl-cysteine (100 μM) for 2 h. Then, cells were treated with Cyto-ID[®] for 30 min. Fluorescence intensity was quantified by BZ-II analyzer. Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with FA-M-β-CyD with NAC. ‡ $p < 0.05$, compared with FA-M-β-CyD.

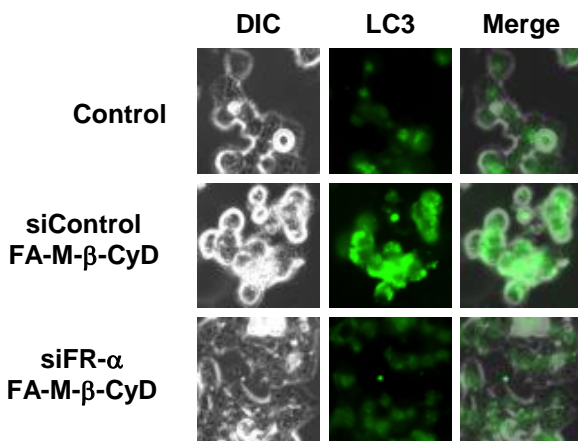
(A) A549 cells



(B) A549 cells



(C) FR-α knockdown KB cells



(D) FR-α knockdown KB cells

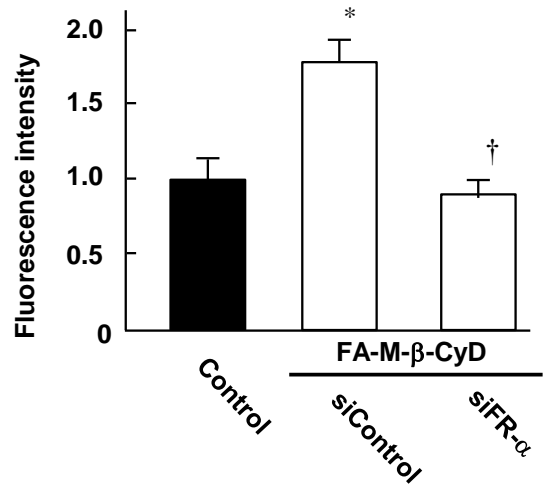


Fig. 55. Effects of M-β-CyDs on Autophagosome Formation in A549 Cells (A, B) and FR-α Knockdown KB Cells (C, D)

(A, C) Cells were treated with M-β-CyDs (5 mM) for 2 h. Then, cells were treated with Cyto-ID[®] for 30 min. (B, D) Fluorescence intensity was quantified by BZ-II analyzer. Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with siControl.

第 8 節 正常細胞に及ぼす FA-M-β-CyD の影響

第 1 項 FA-M-β-CyD の細胞障害性

FA-M-β-CyD により誘導される殺細胞効果は、FR-α 高発現がん細胞選択的であり、正常細胞には細胞障害性を惹起しないことが重要である。そこで本項では、FA-M-β-CyD の安全性評価として、正常細胞に対する細胞障害性について検討した。今回、正常細胞にはヒト肝実質細胞株である Hepatocyte を用い、WST-1 法により細胞障害性を評価した。

Fig. 56 に示すように、Hepatocyte における FR-α の発現量を RT-PCR 法により検討したところ、Hepatocyte はほとんど FR-α を発現していなかった。Fig. 57 より、細胞形質膜に作用しアポトーシスを誘導することが報告されている M-β-CyD¹²⁷⁾ は、Hepatocyte に対して強い細胞障害性を示し、20 mM、2 時間処理においてはほとんどの細胞を死滅させた。一方、FA-M-β-CyD は M-β-CyD と比較して細胞障害性は低く、20 mM、2 時間処理においても約 40% の細胞が生存していた。また、Fig. 57 の結果より算出した M-β-CyD および FA-M-β-CyD の IC₅₀ 値は、それぞれ 6.8 mM および 13.9 mM であった。

これらの結果より、FA-M-β-CyD は M-β-CyD と比較して正常細胞に対する細胞障害性が低く、安全性に優れることが示唆された。

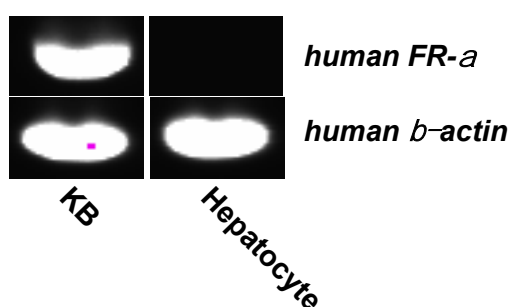


Fig. 56. FR-α mRNA Expression in Hepatocytes

The FR-α mRNA was detected by RT-PCR method.

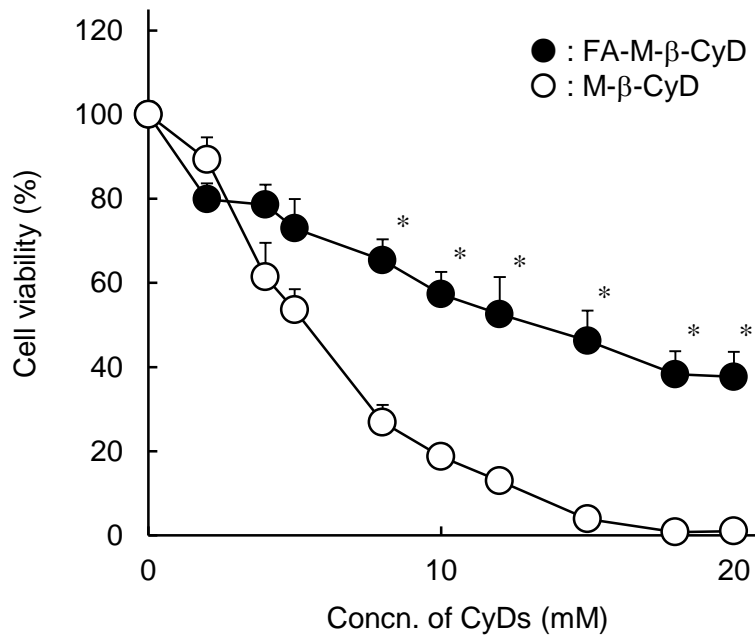


Fig. 57. Effects of M-β-CyDs on Cytotoxicity in Hepatocytes

Hepatocytes were incubated with 150 μL of medium containing M-β-CyDs (0-20 mM) at 37°C for 2 h. After washing twice with PBS to remove M-β-CyDs, 100 μL of fresh HBSS and 10 μL of WST-1 reagent were added to the plates, and then incubated at 37°C for 30 min. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm was measured. Each point represents the mean ± S.E. of 7 experiments. * $p < 0.05$, compared with M-β-CyD.

第 2 項 オートファゴソーム形成に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前項の結果より、FA-M- β -CyD は M- β -CyD と比較して、Hepatocyte に対する細胞障害性が低いことが示された。そこで本項では、FA-M- β -CyD が Hepatocyte においてオートファゴソームの形成を誘導するか否かについて検討した。オートファゴソームは、マーカー分子である LC3 を Cyto-ID[®] を用いて染色し、蛍光顕微鏡により観察した。また、BZ-II analyzer により蛍光強度を定量した。

Fig. 58 に示すように、Hepatocyte に 5 mM FA-M- β -CyD を 2 時間処理したところ、LC3 由来の蛍光強度はコントロール (未処理) および M- β -CyD と同程度であった。これらの結果より、FA-M- β -CyD は Hepatocyte に対して、オートファゴソーム形成を誘導しないことが示唆された。

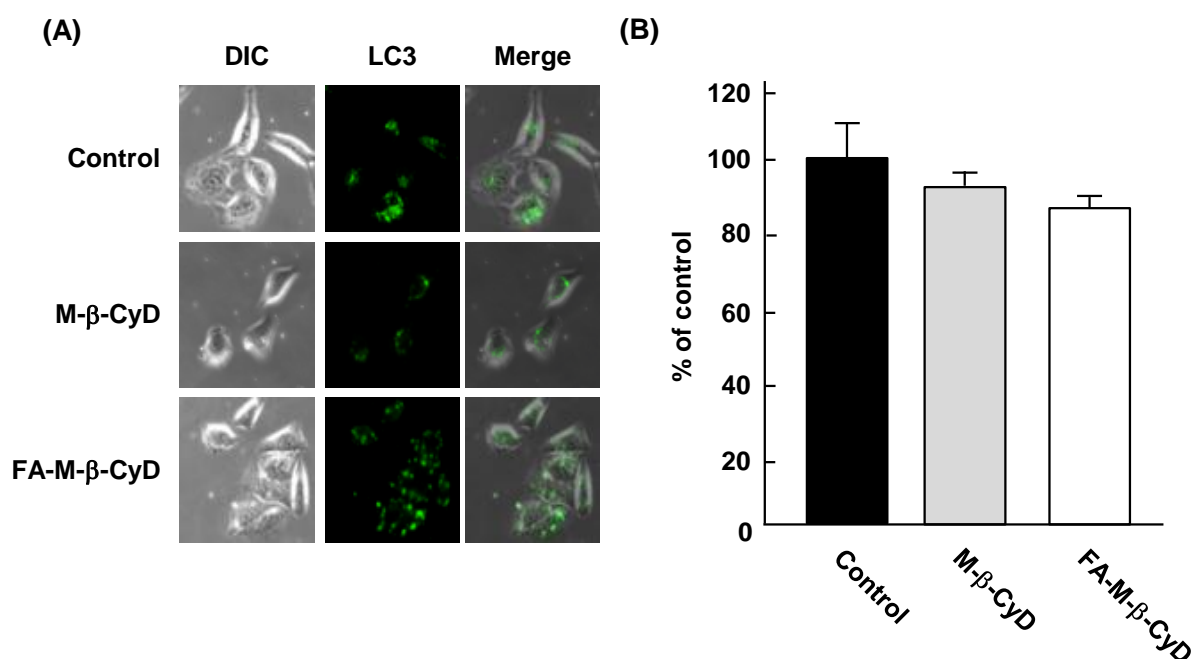


Fig. 58. Effects of M- β -CyDs on Autophagosome Formation in Hepatocytes

(A) Hepatocytes were treated with M- β -CyDs (5 mM). Then, hepatocytes were treated with Cyto-ID[®] for 30 min. After washed twice with culture medium, the cells were scanned with a fluorescence microscope. (B) Fluorescence intensity was quantified by BZ-II analyzer. (A) The experiments were performed independently three times, and representative images are shown. (B) Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第 3 項 ROS 産生に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前項より、FA-M- β -CyD は正常細胞においてオートファゴソームの形成を誘導しないことが示唆された。また、前節の結果より、FA-M- β -CyD のオートファジー誘導は ROS の産生を介することが示唆されている。そこで本項では、Hepatocyte における ROS 産生量に及ぼす FA-M- β -CyD の影響について検討した。ROS 産生量は、Total ROS detection reagent を用いて蛍光顕微鏡により観察した。

Fig. 59 に示すように、5 mM FA-M- β -CyD を 2 時間処理したところ、ROS 由来の蛍光強度はコントロール (未処理) および M- β -CyD と同程度であったことから、FA-M- β -CyD は Hepatocyte に対して、ROS の産生を誘導しないことが示唆された。

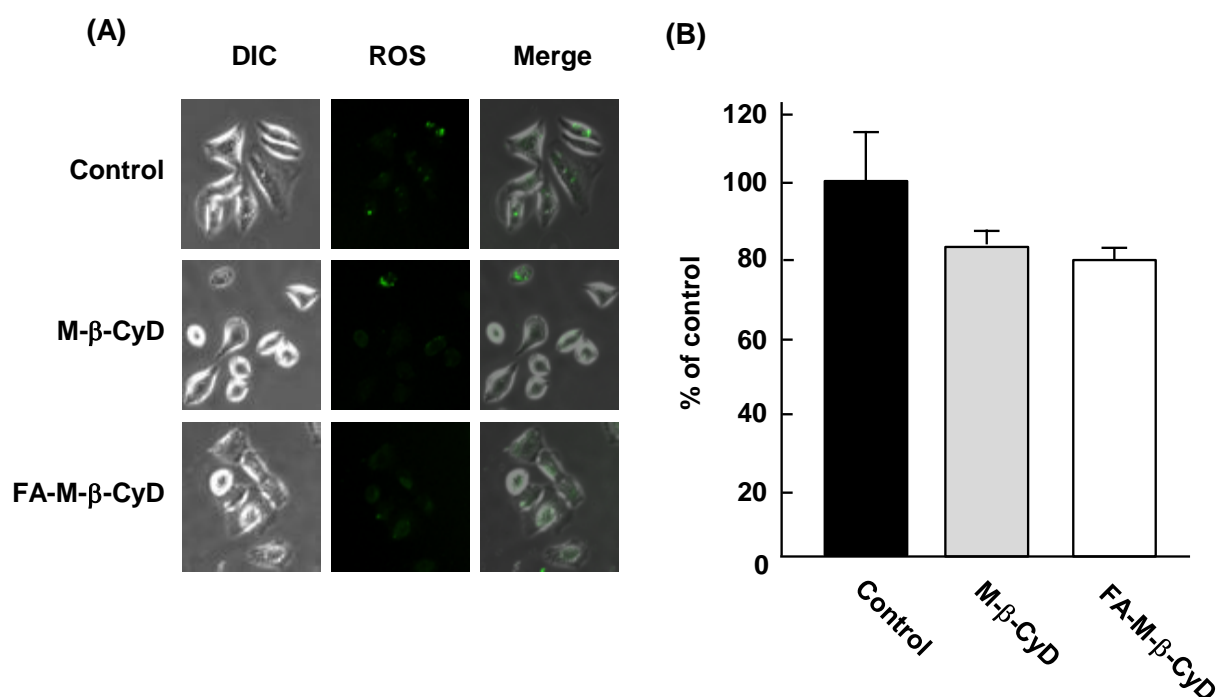


Fig. 59. Effects of M- β -CyDs on the ROS Production in Hepatocytes

(A) Hepatocytes were treated with M- β -CyDs (5 mM) and ROS detection reagent for 2 h. After washed twice with culture medium, cells were scanned with a fluorescence microscope. (B) Fluorescence intensity was quantified by BZ-II analyzer. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

第 4 項 ATP 産生量に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前項までの検討で、FA-M- β -CyD は M- β -CyD と比較して、正常細胞に対する細胞障害性が低く、オートファゴソーム形成および ROS 産生を誘導しないことが示唆された。そこで本項では、Hepatocyte における ATP 産生量を指標として、ミトコンドリアの機能に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を検討した。

Fig. 60 に示すように、5 mM FA-M- β -CyD を 2 時間処理しても、ATP 産生量はコントロール (未処理) および M- β -CyD と同程度であったことから、FA-M- β -CyD は Hepatocyte において、ミトコンドリアの機能に影響を与えないことが示唆された。

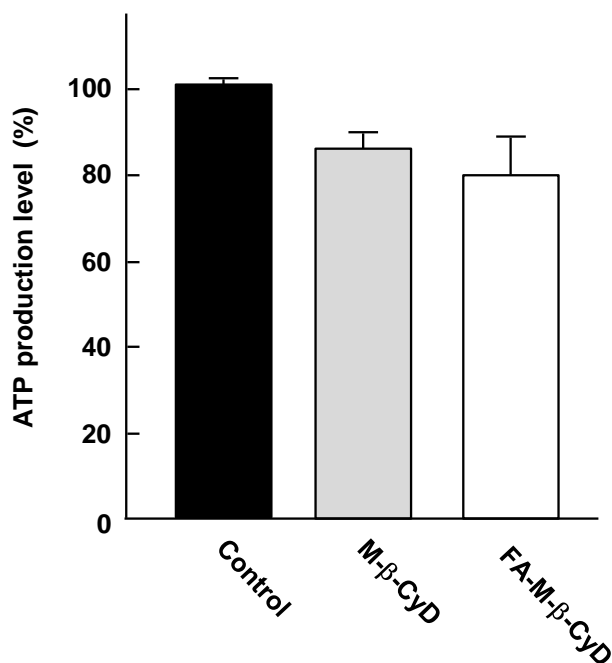


Fig. 60. Effects of M- β -CyDs on ATP Production in Hepatocytes

Hepatocytes were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 2 h. After washed twice with culture medium, cells were treated with ATP detection reagent. Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第 9 節 担がんヌードマウスに対する FA-M- β -CyD の抗腫瘍効果

前節までの検討より、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的にマイトファジーを介した殺細胞効果を誘導することが示唆された。これまで我々は、マウス結腸がん由来 Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を同種移植した担がんマウスに、FA-M- β -CyD を尾静脈内に単回投与したところ、優れた抗腫瘍効果を発揮することを報告した。⁷⁶⁾ 一方、抗がん剤の抗腫瘍効果はマウスとヒトのがん細胞で著しく異なるケースもあることから、ヒトのがん種で抗腫瘍効果を検討することは重要である。そこで本節では、*in vitro* 評価に使用してきたヒト口腔がん由来 KB 細胞に加え、難治がんであるヒトメラノーマ由来 Ihara 細胞を用いて担がんマウスを作製し、FA-M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍効果を検討した。

第 1 項 KB 細胞を異種移植した担がんマウスに対する FA-M- β -CyD の抗腫瘍効果

本項では、FA-M- β -CyD のヒトがん細胞に対する有用性を評価するため、KB 細胞 (FR- α (+)) をヌードマウスの左後肢に異種移植した担がんマウスに、DOX (5 mg/kg)、M- β -CyD (20 mg/kg)、FA-M- β -CyD (20 mg/kg) を尾静脈内に単回投与後、腫瘍体積および体重について検討した。なお、KB 細胞を皮下移植した BALB/c *nu/nu* マウスは、胸腺および T 細胞の欠如した免疫不全マウスである。

Fig. 61A, 61B より、5% マンニトール、DOX (5 mg/kg)、M- β -CyD (20 mg/kg) 投与群と比較して、FA-M- β -CyD (20 mg/kg) 投与群では 52 日間にわたり強力かつ持続的に腫瘍の成長を抑制し、40% のマウスにおいて腫瘍は完全に消失した。Fig. 61C より、全群において顕著な体重減少はみられなかった。これらの結果より、FA-M- β -CyD はヒト口腔がん由来 KB 細胞において優れた抗腫瘍効果を有することが示された。

また、静脈内投与後 24 時間における血液生化学検査値を測定したところ、コントロール群 (5% マンニトール) と FA-M- β -CyD 投与群のパラメータに有意な差異は認められなかった (Table 5)。これらの結果より、FA-M- β -CyD は安全性に優れる可能性が示唆された。

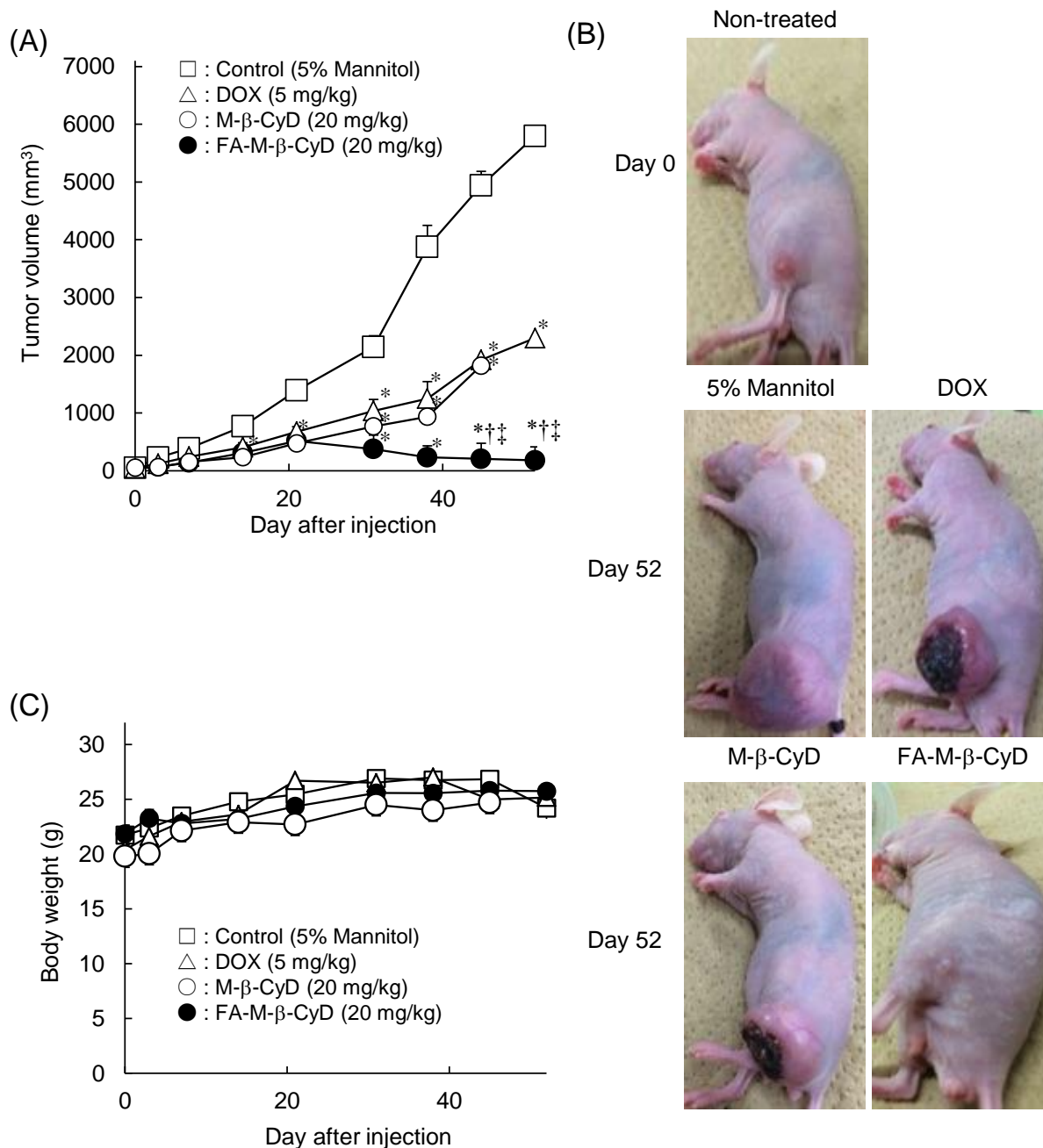


Fig. 61. Effects of Intravenous Administration of M-β-CyDs on Tumor Growth (A, B), Body Weight (C) in BALB/c *nu/nu* Mice Bearing KB Cells (FR-α (+))

DOX (5 mg/kg) and M-β-CyDs (20 mg/kg) were administered by the single intravenous injection to KB cells-bearing mice. The tumor volume and body weight changes of the tumor-bearing mice were monitored. Each point represents the mean ± S.E. of 4-5 experiments. **p* < 0.05, compared with control (5% mannitol solution). †*p* < 0.05, compared with DOX. ‡*p* < 0.05, compared with M-β-CyD.

Table 5. Blood Chemistry Data after Single Intravenous Injection of M- β -CyDs in BALB/c *nu/nu* Mice

	CRE ^{a)} (mg/dL)	BUN ^{b)} (mg/dL)	AST ^{c)} (U/L)	ALT ^{d)} (U/L)	LDH ^{e)} (U/L)	CK ^{f)} (U/L)
5% Mannitol	0.11 \pm 0.008	17.7 \pm 1.8	46.5 \pm 1.6	17.5 \pm 2.3	187.8 \pm 13.1	37.0 \pm 3.8
M- β -CyD	0.10 \pm 0.003	21.0 \pm 0.5	39.8 \pm 1.8	13.5 \pm 0.7	150.3 \pm 9.8	35.5 \pm 5.3
FA-M- β -CyD	0.11 \pm 0.008	19.4 \pm 1.6	41.0 \pm 1.2	12.5 \pm 1.0	196.0 \pm 33.4	40.7 \pm 5.4

a) Creatinine, b) Blood urea nitrogen, c) Aspartate aminotransferase, d) Alanine aminotransferase, e) Lactate dehydrogenase, f) Creatinine kinase. Twenty four h after intravenous administration of 100 μ L of solutions containing M- β -CyDs (20 mg/kg), serum was collected. Each value represents the mean \pm S.E. of 3-4 mice.

第 2 項 Ihara 細胞を異種移植した担がんマウスに対する FA-M- β -CyD の抗腫瘍効果

次に、難治がんであるヒトメラノーマ由来 Ihara 細胞を BALB/c Rag-2/Jak3 ノックアウトマウスの皮下に異種移植し、FA-M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍効果を検討した。なお、BALB/c Rag-2/Jak3 ノックアウトマウスは、岡田らによって確立された B 細胞、T 細胞、NK 細胞が完全に欠損した高度免疫不全マウスである。¹²⁸⁾

Fig. 62A, 62B に示すように、Ihara 細胞を異種移植した担がんヌードマウスに FA-M- β -CyD (10 mg/kg) を静脈内に単回投与したところ、腫瘍の増殖が抑制される傾向が示された。一方、FA-M- β -CyD 投与による体重の変化はほとんど認められなかった (Fig. 62C)。これらの結果より、FA-M- β -CyD はヒトメラノーマに対して、抗腫瘍効果を有することが示唆された。

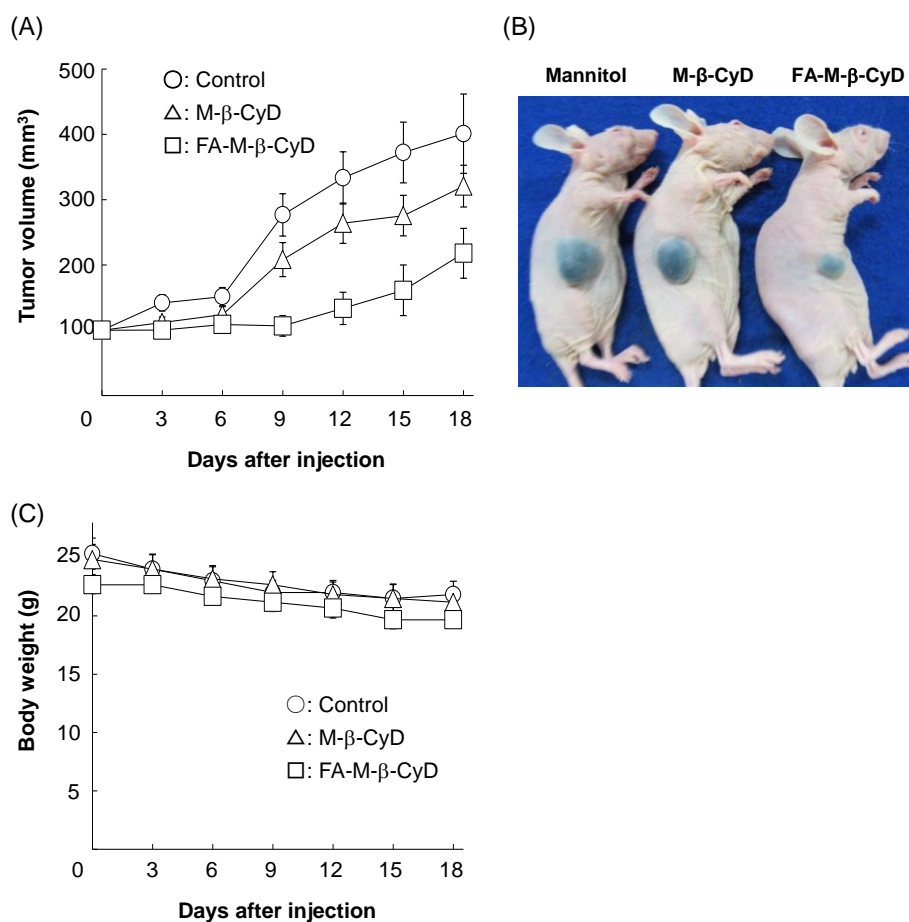


Fig. 62. Effects of Intravenous Injection of M- β -CyDs on Tumor Volume (A, B) and Body Weight (C) in BALB/c Nude Rag-2/Jak3 KO Mice Bearing Ihara Cells M- β -CyDs (10 mg/kg) were administered by the single intravenous injection to BALB/c nude Rag-2/Jak3 KO mice bearing Ihara cells. The tumor volume and body weight changes of the tumor-bearing mice were monitored. Each point represents the mean \pm S.E. of 12 experiments.

第 10 節 考察

本章では、FA-M- β -CyD の腫瘍選択的抗がん剤としての有用性を *in vitro* および *in vivo* において評価した。

FA-M- β -CyD は *in vitro* においてアポトーシスではなく、ATP 産生の減少および ROS 産生の誘導を介して、オートファジーを誘導することが示された。一般に、CyDs は水溶性で分子サイズが大きいため、細胞膜透過性が低く、細胞内に取り込まれにくい。当研究室では、M- β -CyD が細胞形質膜表面に存在するリピッドラフトのコレステロールと相互作用することにより、アポトーシスを誘導することを明らかにした。¹¹⁵⁾ しかしながら、FA-M- β -CyD は、M- β -CyD に葉酸を修飾したことにより、FR- α を介した細胞内への取り込まれるため、M- β -CyD とは異なる機構で細胞死を誘導したものと考えられる。実際、A549 細胞 (FR- α (-)) において、FA-M- β -CyD は 10 mM、2 時間処理まで、細胞障害性をほとんど示さないことから、⁷⁶⁾ FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に細胞形質膜との相互作用の関与は低いものと推察される。一方、FA-M- β -CyD は A549 細胞 (FR- α (-)) および FR- α ノックダウン KB 細胞においてオートファジーを誘導せず (Fig. 55)、ATP 産生の減少および細胞内 ROS の増加も認められなかった (Figs. 52, 53)。これらの結果は、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に FR- α を介した細胞内取り込みが重要であることを強く支持する。

オートファジーは、細胞質内の異常なタンパク質などをオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜で取り囲み、リソソームと融合することによってアミノ酸などに分解して再利用する生体の防御機構として働く仕組みである。オートファジー関連タンパク質である p62 は、ユビキチン結合領域と LC3 結合領域を持つために、ユビキチン化されたタンパク質をオートファゴソームへ運ぶ役割を果たすことが報告されている。^{116, 129)} また、LC3 と直接結合した後は、p62 自身も分解を受ける。オートファジー不全になると p62 タンパク質の蓄積量が増加することから、p62 をモニタリングすることでオートファジーの進行度を判別することができる。本検討において、FA-M- β -CyD は LC3-II タンパク質の発現量を上昇させただけでなく (Fig. 40)、p62 の分解を促進していたことから (Fig. 41)、オートファゴソームの形成を促進しただけでなく、リソソームとの融合および分解まで完遂させていることが示唆された。また、

Beclin-1 タンパク質の発現量が上昇していたことは、オートファジーの進行を強く支持するものである (Fig. 42)。さらに、FA-M- β -CyD 処理により、ATP 産生の減少 (Fig. 52) および 細胞内 ROS 量の増加 (Fig. 53) が認められたことから、FA-M- β -CyD によるオートファジー誘導にミトコンドリアの関与が強く示唆された。Ziolkowski らは、M- β -CyD がラット肝臓から回収したミトコンドリアのリピッドラフトからコレステロールを漏出し、その形態を変化させ、エネルギー代謝を抑制することを報告した。¹³⁰⁾ このことから、FR- α を介して CLIC/GEEC エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた FA-M- β -CyD は、エンドソームを脱出後、その一部がミトコンドリアに局在し (Fig. 47)、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エネルギー代謝の抑制に至ったものと推察される。一般に、分子量 5,000 以下の物質はミトコンドリア外膜を容易に透過できるため、分子量が約 1,700 の FA-M- β -CyD は外膜を透過して、ミトコンドリア内膜まで移行可能と考えられる。また、ミトコンドリア内膜には葉酸トランスポーター (MFT) が発現していることから、^{124, 125)} FA-M- β -CyD が MFT を介してミトコンドリア内膜に取り込まれ、その内膜のリピッドラフトからコレステロールを漏出させた可能性が考えられる。データには示さないが、siRNA で MFT をノックダウンした KB 細胞を FA-M- β -CyD で処理してもオートファゴソームの形成が誘導されないことを見出している。さらに、アダマンタンで FA-M- β -CyD の空洞を閉鎖した状態では、KB 細胞を処理にオートファジーが誘導されないことを明らかにしている。つまり、FA-M- β -CyD のオートファジー誘導には、葉酸修飾による MFT の認識および CyD 空洞によるミトコンドリア内膜のリピッドラフトとの相互作用が必要であると推察される。今後、FA-M- β -CyD がミトコンドリア膜上の MFT を介して取り込まれるか否かを明らかにし、ミトコンドリア内膜の脂質成分との相互作用について詳細に検討する必要がある。

オートファジーの種類は、主にマクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーの 3 種類に大別され、FA-M- β -CyD はオートファゴソームの形成を伴うことから、マクロオートファジーを誘導するものと考えられる。さらに、マクロオートファジーの中には、機能不全に陥ったミトコンドリアを選択的に分解するマイトファジーや、細胞内に侵入した菌を選択的に分解するゼノファジー

なども存在する。FA-M- β -CyD は、ミトコンドリアと共局在し、細胞内の ATP 産生の減少や ROS 産生の誘導など、ミトコンドリアの機能に影響を与えることが示唆された (Figs. 47, 52, 53)。これらの結果は、FA-M- β -CyD の細胞死誘導機構にマイトファジーの関与を示唆するものである。一方、大変興味深いことに、FA-M- β -CyD は単離ミトコンドリアの膜電位を上昇させること (過分極) が明らかとなった (Fig. 49)。一般に、マイトファジーはミトコンドリアの膜電位が低下すること (脱分極) により、PINK1 のミトコンドリア内膜への移行が抑制されるために、その分解が滞り、新たに集積した Parkin によってタンパク質のユビキチン化を生じて、隔離膜にトラップされる。¹³¹⁾ したがって、FA-M- β -CyD によるマイトファジー誘導は、これまでの報告にはない新たなメカニズムであると考えられる。今後、ミトコンドリア膜上で膜電位の調節や ATP 産生に関与する electron transport chain (ETC)¹³²⁾ などのタンパク質群に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を明らかにする必要がある。

正常細胞として用いた Hepatocyte (FR- α (-)) に対する FA-M- β -CyD の殺細胞効果は、KB 細胞 (FR- α (+)) と比較して低く、安全性に優れることが示唆された。過去の検討より、FA-M- β -CyD は、A549 細胞 (FR- α (-)) において優れたコレステロール漏出能を示したものの、殺細胞効果はほとんど示さなかった。⁷⁷⁾ このことから、FA-M- β -CyD の殺細胞効果は、FR- α 高発現がん細胞選択的であり、その効果に細胞形質膜との相互作用の寄与は少ないものと推定される。緒言でも述べたように、FR- α の発現量は、がんのステージが進行するにつれて著しく上昇することが知られているが、腎臓では FR- α の発現が高い正常細胞の存在が報告されている。²⁴⁾ したがって、腎臓に対する FA-M- β -CyD の障害性は慎重に評価する必要がある。重要なことに、FA-M- β -CyD をマウス静脈内に投与後 24 時間における BUN や CRE の値に大きな変化がなかったことから、本実験条件下、腎臓に対する安全性は比較的高いものと考えられる (Table 5)。腎臓の細胞は FR- α を高発現しているにも関わらず、FA-M- β -CyD の障害性が低かったのは、がん細胞と正常細胞でミトコンドリア機能障害に対する感受性が異なったものと推察される。今後、がん細胞と正常な腎細胞に対する FA-M- β -CyD の作用について、詳細に検討する必要がある。

メチル化 β -CyD により誘導される細胞死は、CyDs が細胞外から形質膜へ作用す

る場合と細胞内からオルガネラへ作用する場合では大きく異なるものと考えられる。本論文第 1 章において、DM- β -CyD は細胞外より形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させて、リピッドラフト直下に存在する PI3K-Akt 経路を抑制し、ミトコンドリア介在性のアポトーシスを誘導することを明らかにした。通常、メチル化 β -CyDs は分子量が約 1,000 以上であるために、細胞内には取り込まれにくい。しかしながら、FA-M- β -CyD のように、FR- α のリガンドである葉酸を修飾することにより、CyDs をがん細胞内に導入することが可能となる。さらに、FA-M- β -CyD は細胞内でミトコンドリア機能障害を惹起し、マイトファジーを誘導した。これまで、CyDs を積極的に細胞内へ導入し、細胞死誘導機構を検討した報告はほとんど存在せず、本論文の意義は大きい。一方、葉酸以外のリガンドを修飾して M- β -CyD を細胞内へ導入した場合、どのような細胞死や細胞内イベントが誘導されるのか非常に興味深い。

FR- α 高発現がん細胞である KB 細胞を異種移植した担がんヌードマウスにおいて、FA-M- β -CyD は優れた抗腫瘍活性を示した (Fig. 61)。このことから、FA-M- β -CyD はヒトのがん細胞においても抗腫瘍効果を発揮できることが示唆された。また、その効果は DOX および M- β -CyD 投与群と比較して FA-M- β -CyD の方が優れていた。腫瘍深部に抗がん剤を到達させるためには、抗がん剤キャリアとの複合体の粒子径が 30 nm 以下であることが好ましいとされる。¹³³⁾ 過去の検討より、動的光散乱法により測定した FA-M- β -CyD の粒子径はわずか数ナノメートルと非常に小さく、溶液中で粒子を形成しにくいものと推察されるため、FA-M- β -CyD は静脈内投与後、腫瘍組織の深部まで到達できたものと推察される。データには示さないが、FA-M- β -CyD を静脈内投与後の血中半減期は約 2.5 分と短く、血中滞留性が低かった。これは、FA-M- β -CyD の分子量が約 1,700 程度であり、水溶性が高いために速やかに腎排泄されたためと推察される。一方、静脈内に投与 3 時間後において、FA-M- β -CyD は肝臓、心臓、腎臓、脾臓、肺よりも腫瘍に最も集積した (data not shown)。これは、FA-M- β -CyD が腫瘍細胞表面の FR- α を効率よく認識したためと推定される。

KB 細胞異種移植した担がんマウスにおいて、FA-M- β -CyD 処理群は投与後 2 週目以降から腫瘍体積の減少が認められた (Fig. 61)。その理由として、本検討で用いた

BALB/c *nu/nu* マウスは胸腺および T 細胞が欠損した免疫不全マウスであるが、他の免疫担当細胞である NK 細胞およびマクロファージの活性化が影響している可能性が考えられる。近年、がん治療を考える上で、がん細胞のみならず、がんの微小環境を構成する間質細胞にも注目が集まっている。その中でも腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated Macrophage : TAM) は、腫瘍の微小環境の形成に働いているマクロファージで、腫瘍の増殖、維持、浸潤に深く関わっている。¹³⁴⁾ 特に、TAM には M1 型と M2 型があり、M2 型の TAM の量が多い程、予後不良といわれている。^{135, 136)} ここで、M2 型の TAM には FR- β が高発現していることが報告されていることから、¹³⁷⁾ FA-M- β -CyD は腫瘍細胞だけでなく、TAM に対しても殺細胞効果を発揮し、上述のような抗腫瘍効果を示したものと推察される。今後、FA-M- β -CyD の免疫賦活効果に関して、詳細に検討する必要がある。

一方、がん組織の中にわずかに存在するがん幹細胞は、自己複製能や多分化能、治療抵抗性を有し、がんの転移・再発の原因となることが知られている。臨床的に重要ながん幹細胞は、細胞周期が静止状態にあるため、細胞分裂を標的とする既存の抗がん剤に抵抗性を有する。重要なことに、がん幹細胞も FR- α が高発現することが報告されており、¹³⁸⁾ FA-M- β -CyD の標的となりうる。また、FA-M- β -CyD の殺細胞効果は細胞周期に依存せず、マイトファジーを介するために、抗がん剤耐性の問題も克服できる可能性がある。今後、がん幹細胞に対する FA-M- β -CyD の影響も評価する必要がある。

以上、本研究で得られた知見をもとに、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性誘導機構の推定図を Fig. 63 に示す。FA-M- β -CyD は、細胞形質膜上の FR- α を介して CLIC/GEEC 経路によりがん細胞内に取り込まれた後、エンドソーム (GEEC) から脱出し、細胞質中に拡散後、その一部がミトコンドリアと相互作用するものと推察される。その結果、ミトコンドリア膜電位の上昇および ATP 産生量の低下を引き起こし、ミトコンドリアへのストレスにより、ROS の産生が誘導される。これらのミトコンドリアの機能障害により、PINK1 の発現上昇が契機となって、マイトファジーが誘導されたものと推察される。

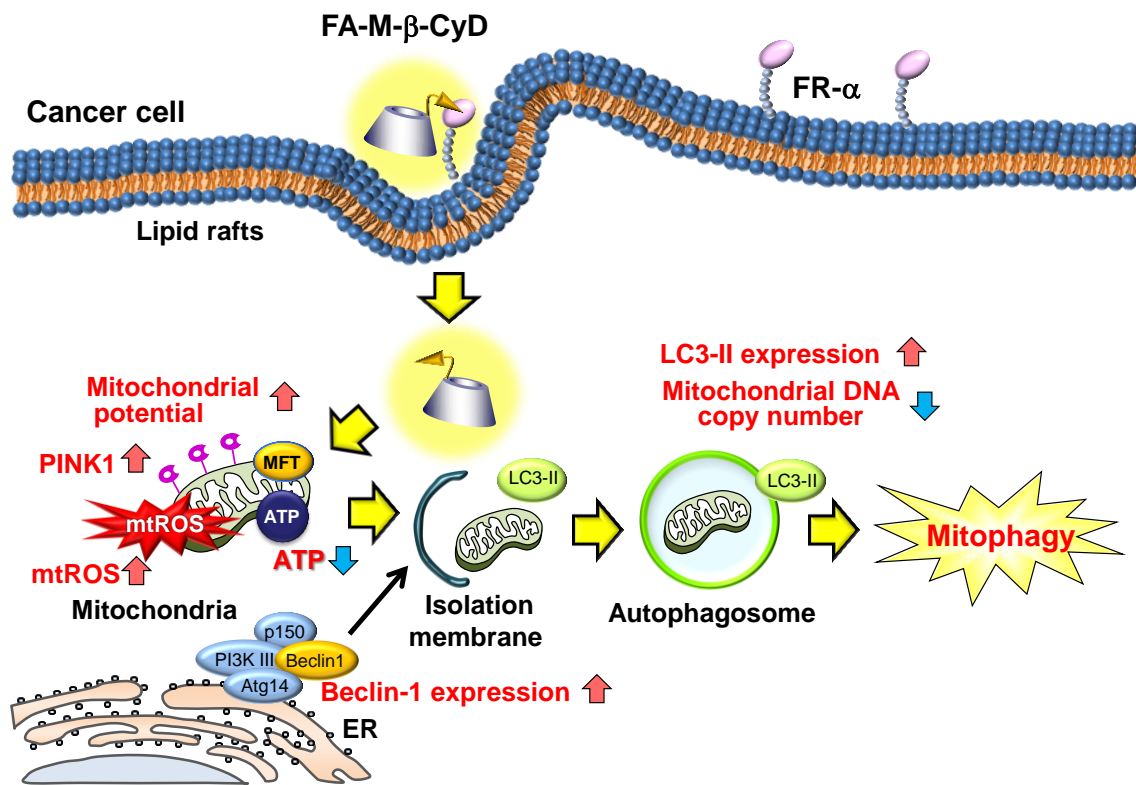


Fig. 63. Proposed Mechanism of Antitumor Activity of FA-M-β-CyD

第 11 節 小括

本章では、FA-M- β -CyD のがん細胞選択的抗腫瘍効果の機構について検討した。以下に得られた知見を要約する。

- 1) FA-M- β -CyD は、FBP と 8.56×10^{-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。一方、M- β -CyD は FBP とほとんど相互作用しなかった。
- 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) 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 の殺細胞効果は、オートファジー阻害剤である 3-MA および LY294002 の添加により減弱したことから、オートファジーを介することが示唆された。
- 5) FA-M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+)) において、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。一方、A549 細胞 (FR- α (-)) および FR- α ノックダウン KB 細胞において、オートファジーの誘導は認められなかった。
- 6) FA-M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+)) において、Atg7 の発現を増大しなかった。
- 7) FA-M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+)) において、PINK1 の発現を誘導し、ミトファジーを誘導することが示唆された。
- 8) 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。一方、A549 細胞 (FR- α (-)) や

FR- α ノックダウン KB 細胞において、それらのミトコンドリアの機能に変化は認められなかった。

- 9) FA-M- β -CyD のマイトファジー誘導は、ROS の産生を介することが示唆された。
- 10) 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。
- 11) 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、DOX 単独や M- β -CyD よりも優れた抗腫瘍効果を示した。
- 12) 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、FA-M- β -CyD は、FR- α を介して細胞内に取り込まれ、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。また、その細胞死誘導にミトコンドリアの機能障害の関与が示唆された。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。

総括

本研究では、抗がん剤としての応用が期待されるメチル化 β -CyDs の殺細胞効果とその細胞死誘導機構について検討をおこなった。第 1 章では、M- β -CyDs のアポトーシス誘導機構について検討した。第 2 章では、FA-M- β -CyD の FR- α 高発現がん細胞選択的な抗腫瘍効果誘導機構について検討した。以下に本研究で得られた知見を総括する。

【第 1 章】

- 1) NR8383 細胞、A549 細胞、Jurkat 細胞に対する CyDs の細胞障害性を評価したところ、高濃度のメチル化 CyDs 処理により細胞死が誘導され、ヒドロキシプロピル化 CyDs 処理では細胞死は誘導されなかった。
- 2) NR8383 細胞、A549 細胞、Jurkat 細胞を DM- β -CyD および TM- β -CyD で処理すると、染色体 DNA が G₀ あるいは G₁ 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- β -CyD 処理では DNA 含量の低下した細胞が増加した。一方、DM- α -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。HP- α -CyD および HP- β -CyD は細胞障害性を示さなかったため、DNA 含量の低下、核の断片化も誘導しなかった。
- 3) 蛍光顕微鏡を用いた形態学的変化の観察から、DM- β -CyD および TM- β -CyD 処理した NR8383 細胞においてクロマチンの凝縮が認められた。
- 4) M- β -CyD, DM- β -CyD および TM- β -CyD で処理した NR8383 細胞において、PS が細胞膜外層へ露出した細胞の割合が増加した。
- 5) 臨界ミセル濃度以上の非イオン性界面活性剤で処理した NR8383 細胞において、細胞の DNA 含量の低下、核の断片化が観察され、細胞膜成分の可溶化とアポトーシスの関連性が示唆された。
- 6) NR8383 細胞からの膜成分漏出に対する CyDs の影響を検討したところ、コレステロールの漏出は DM- α -CyD 処理では観察されず、 β -CyDs 添加系で観察され、その効果は HP- β -CyD < M- β -CyD < TM- β -CyD < DM- β -CyD の順に増大し

た。総リン脂質量の漏出に関しては、M- β -CyD, TM- β -CyD および HP- β -CyD 処理系はコントロールと同程度であったが、DM- α -CyD および DM- β -CyD 処理において有意な総リン脂質の漏出が認められた。外来のコレステロール添加により DM- β -CyD 誘導アポトーシスが有意に抑制された。これらの結果から、DM- β -CyD 誘導アポトーシスへのコレステロール漏出が関与するものと推察された。

- 7) NR8383 細胞において、DM- β -CyD 誘導アポトーシスに対する PI3K 阻害剤の影響は、低濃度の DM- β -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- β -CyD 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、Akt の消失は処理時間依存的であった。さらに DM- β -CyD は Bad リン酸化の抑制を誘導した。これらの結果から、DM- β -CyD は PI3K-Akt 経路による細胞生存シグナルを阻害していることが推察された。
- 8) Wild type マクロファージと p53 欠損マクロファージを比較して DM- β -CyD 処理によるアポトーシス誘導に有意差は認められなかったことから、p53 の寄与は小さいものと推察された。
- 9) DM- β -CyD 処理した NR8383 細胞において、 $\Delta\psi_m$ の低下や cytochrome *c* のミトコンドリアからの放出が誘導されたため、DM- β -CyD 誘導アポトーシスはミトコンドリア依存的な経路であると推察された。
- 10) DM- β -CyD 処理した NR8383 細胞において pro-caspase-3 のバンドの減少と活性化型 caspase-3 のバンドが検出され、さらに caspase-3 の基質である actin の処理時間依存的な分解が観察された。このことから、DM- β -CyD 処理により caspase-3 の活性化が誘導されるものと推察された。

【第2章】

- 1) FA-M- β -CyD は、FBP と 8.56×10^{-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。一方、M- β -CyD は FBP とほとんど相互作用しなかった。
- 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) 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 の殺細胞効果は、オートファジー阻害剤である 3-MA および LY294002 の添加により減弱したことから、オートファジーを介することが示唆された。
- 5) FA-M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+)) において、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。一方、A549 細胞 (FR- α (-)) および FR- α ノックダウン KB 細胞において、オートファジーの誘導は認められなかった。
- 6) FA-M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+)) において、Atg7 の発現を増大しなかった。
- 7) FA-M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+)) において、PINK1 の発現を誘導し、マイトファジーを誘導することが示唆された。
- 8) 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。一方、A549 細胞 (FR- α (-)) や FR- α ノックダウン KB 細胞において、それらのミトコンドリアの機能に変化は認められなかった。
- 9) FA-M- β -CyD のマイトファジー誘導は、ROS の産生を介することが示唆された。
- 10) 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た可能性が示唆された。
- 11) 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、DOX 単独や M- β -CyD よりも優れた抗腫瘍効果を示した。

12) 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、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。また、その細胞死誘導にミトコンドリアの機能障害の関与が示唆された。これらの知見は、M- β -CyD の殺細胞効果誘導機構が、がん細胞に取り込まれるか否かによって、異なる可能性を示唆する。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。

謝 辞

本研究を行うに際して終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました熊本大学 大学院生命科学研究部 製剤設計学分野 有馬英俊 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際して懇篤なる御指導と御助言を賜りました熊本大学 大学院生命科学研究部 製剤設計学分野 本山敬一 准教授ならびに 東 大志 助教に深く感謝の意を表します。

本研究に際して有益なる御助言と御校閲を賜りました熊本大学 薬学部 今井輝子 教授、熊本大学 大学院生命科学研究部 関 貴弘 准教授および 猿渡淳二 准教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、御協力頂いた岐阜薬科大学 薬物送達学大講座 製剤学研究室 小野寺理沙子 助教に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、御協力頂いた湧永製薬株式会社 田中奈歩 修士に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、御協力頂いた熊本大学 大学院生命科学研究部 製剤設計学分野 山下有希 学士に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際して有益なる御助言と御協力を賜りました熊本大学エイズ学研究センター 岡田誠治 教授に深く感謝の意を表します。

本研究に御協力頂いた熊本大学エイズ学研究センター岡田プロジェクト研究室 刈谷龍昇 博士に深く感謝の意を表します。

β -CyD を恵与して頂きました日本食品化工株式会社に深く感謝致します。

最後に、私の学生生活を温かく見守り、支え御協力頂いた家族ならびに多くの友人にこの場を借りて心より感謝致します。

平成 29 年 3 月

実験の部

1. 試料、器具および溶媒等

α -CyD	日本食品化工
β -CyD	日本食品化工
γ -CyD	日本食品化工
DM- β -CyD (DS 14)	日本食品化工
HP- α -CyD (DS 4.1)	日本食品化工
HP- β -CyD (DS 4.8)	資生堂
M- β -CyD (DS 12.6)	純正化学
TM- β -CyD (DS 21)	和光純薬工業
SBE7- β -CyD	CyDex、提供品
<i>p</i> -トルエンスルホニルクロライド	ナカライテスク
水酸化ナトリウム	ナカライテスク
25% アンモニア水	和光純薬工業
2-Chloro-2,6-dimethoxy-1,3,5-triazin	関東化学
THF (no stabilizer)	和光純薬工業
<i>N</i> -Methylmorpholine	和光純薬工業
葉酸 (FA)	ナカライテスク
ジメチルスルホキシド (DMSO)	和光純薬工業
ドキシソルビシン (DOX)	メルシャン
スペクトラ/ポア	FED
F-12K nutrient mixture	GIBCO
RPMI 1640 medium (FA-free)	GIBCO
RPMI 1640 medium (FA-containing)	日水製薬
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	日水製薬
7% 炭酸水素ナトリウム注射液	大塚製薬
L-グルタミン	Sigma Chemical
HEPES	和光純薬工業
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma
注射用硫酸ストレプトマイシン (力価 : 1 g)	明治製菓
注射用ペニシリンカリウム (20 万単位)	明治製菓
Fetal bovine serum (FBS)	ニチレイ
トリプシン 250	Difco Laboratories
グルコース	ナカライテスク
Rhodamine 123	Molecular Probes
Propidium iodide (PI)	Molecular Probes
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	ナカライテスク

Polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (Tween 40)	ナカライテスク
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80)	ナカライテスク
Triton X-100	ナカライテスク
Cremophor EL	Sigma
LY 294002	Sigma
SB 203580	Sigma
Hoechst 33342	Sigma
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (HCO60)	日光ケミカルズ
100 bp DNA ladder marker	Invitrogen
ブロックエース	大日本製薬
Skim milk	和光純薬工業
Cell Counting Kit (WST-1)	同仁化学
コレステロール E-テストワコー®	和光純薬工業
Cyto-ID® Autophagy Detection Kit	Enzo Life Science
Caspase-Glo™ 3/7 Assay	Promega
『細胞の』 ATP 測定試薬™	東洋インク
Total ROS detection kit	Enzo Life Science
Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)	フナコシ
LysoTracker® Green	Invitrogen
MitoTracker® Green	Invitrogen
LY294002	Promega
3-Methyladenine	Sigma
Lipofectamine™2000 Reagent	Invitrogen
siGL3	北海道システムサイエンス
siFR-α (sc39969)	Santa Cruz Biotechnology
Agarose S	ニッポンジーン
D-マンニトール	ナカライテスク
Tacs™ AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kits	R&D Systems
ECL Western blotting analysis system	Amersham Biosciences
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
リン脂質 C-テストワコー®	和光純薬工業
Premo™ Autophagy Sensor GFP-p62 Kit	Life technologies
Human mtDNA Monitoring Primer Set®	タカラバイオ
Mouse anti-cytochrome <i>c</i> antibody (7H8.2C12)	BD PharmMingen
Mouse anti-cytochrome oxidase subunit IV antibody	Molecular Probes
Rabbit anti-caspase-3 antibody	Santa Cruz Biotechnology
Mouse anti-Bad antibody	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-phospho-Bad antibody	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-actin antibody	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-Akt antibody	Cell Signaling

Mouse anti-phospho-Akt monoclonal antibody	Cell Signaling
Anti-mouse IgG antibody	EY Laboratories
HRP-anti-rabbit IgG antibody	Cappel
Anti-LC3	NOVUS Biologicals
Anti-Caspase-3	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Becclin-1	Cell Signaling Technology
Anti-Atg7	コスモバイオ
Anti-β-actin	Santa Cruz Biotechnology

上記以外の試薬類は市販特級品を用いた。細胞培養関連実験用の溶媒としての水はミリ Q 水 (ミリ Q 超純水製造装置 (ミリポア) により製造した比抵抗値 18.3 MΩ・cm 以上の純水) を使用し、それ以外はイオン交換精製水を 2 回蒸留して用いた。また、Hanks' balanced salt solution (HBSS) および phosphate-buffered saline (PBS) は pH 7.4 のものを使用した。

2. 動物

BALB/c nu/nu マウス 日本 SLC

3. 使用機器類

	メーカー	型式
電子天秤	IKA Works	ER-180A
pH メーター	HORIBA	F-12
減圧乾燥器	アズワン	AVO-2500N
凍結乾燥器	ヤマト科学	NEOCOOL
差動型示差熱天秤	リガク	TG-DTA DTA8120
マイクロプレートリーダー	Bio-Rad	Model 550
CO ₂ インキュベーター	ASTEC	APC-38
クリーンベンチ	日立	CCV
冷却遠心機	クボタ	1720
NMR 測定装置	日本電子	JNM-α-500
FAB MS 測定装置	日本電子	JMS-DX 303
ゲル泳動槽	コスモバイオ	Mupid-21
蛍光顕微鏡	KEYENCE	Biozero BZ-9000
生化学自動分析装置	日本電子	JCA-BM2250
トランスイルミネーター	FUJIFILM	Image Reader
FLA-9000		
振とう機	HORIBA	LA-100
蛍光マイクロプレートリーダー	TECAN	Infinite M1000
分子間相互作用解析装置	AS ONE	Single-Q

共焦点レーザー走査顕微鏡	オリンパス	FLUOVIEW FV300BX
LAS	富士フイルム	LAS-1000
Microplate spectrophotometer	BioTek	Epoch

Primer 配列

Human *FR- α*

Forward primer: 5'-CATGGCTGCAGCATAGAACCTCGC-3'

Reverse primer: 5'-GTAGTAGGGGAGGCTCAGACAAGG-3'

Human *β -actin*

Forward primer: 5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'

Reverse primer: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

4. 各種細胞の培養

(1) NR8383 細胞の培養: NR8383 細胞 8×10^5 cells を 15% (v/v) FBS 含有 F-12K 培地 (L-グルタミン 300 mg/L、7% 炭酸水素ナトリウム注射液 2,000 mg/L、ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1 g/L) 10 mL に懸濁し、プラスチックディッシュ (100 mm) に播種して、37°C、5% CO₂ 濃度下で培養した。

(2) RAW264.7 細胞および Jurkat 細胞の培養: RAW264.7 細胞および Jurkat 細胞 8×10^5 cells を 10% (v/v) FBS 含有 RPMI-1640 培地 (L-グルタミン 300 mg/L、7% 炭酸水素ナトリウム注射液 2,000 mg/L、ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1 g/L) 10 mL に懸濁し、プラスチックディッシュ (100 mm) に播種して、37°C、5% CO₂ 濃度下で培養した。

(3) マウス腹腔マクロファージの調製: Wild type および p53^{-/-} C57/BL6 マウス (8~9 週齢) に 3% チオグリコレート 1 mL を腹腔内投与した。4 日後、頸椎脱臼したマウスの腹腔を 1% ヘパリン、 4×10^5 U/L ペニシリン、0.2 mg/mL ストレプトマイシンを含む氷冷した HBSS 5 mL で 2 回洗浄後、トリス塩化アンモニウム緩衝液 (140 mM NH₄Cl, 17 mM Tris, pH 7.2) 10 mL で赤血球を溶血除去し、腹腔滲出細胞を得た。10% FBS 含有 RPMI-1640 培地で 2 回洗浄後、同培地に 5×10^5 cells/mL の濃度に懸濁し、wild type および p53^{-/-} マウス腹腔マクロファージとして使用した。

(4) KB 細胞の培養: ヒト口腔がん細胞由来の株化細胞である KB 細胞 8×10^5 cells を 10% (v/v) FBS 含有 RPMI 1640 (FA-free) 培地 (L-グルタミン 300 mg/L、7% 炭酸水素ナトリウム注射液 2,000 mg/L、ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1 g/L) 10 mL に懸濁し、プラスチックディッシュ (100 mm) に播種して、37°C、5% CO₂ 濃度下で培養した。セミコンフルエントに達した細胞を RPMI 1640 (FA-free) 培地によりディッシュから剥離し、3,000 rpm (885 x g) で 3 分間遠心分離後、上清を取り除き、得られたペレットを 10% (v/v) FBS 含有 RPMI 1640 (FA-free) 培地に 1×10^5 cells/mL の密度で分散した。

(5) A549 細胞の培養: ヒト肺上皮がん細胞由来の株化細胞である A549 細胞 8×10^5 cells を 10% (v/v) FBS 含有 low-グルコース DMEM 培地 (L-グルタミン 590 mg/L、7% 炭酸水素ナトリウム注射液 1,600 mg/L、ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1 g/L) 10 mL に懸濁し、100 mm culture dish に播種して、37°C、5% CO₂ 濃度下で培養した。セミコンフルエントに達した細胞をトリプシン-EDTA 法によりディッシュから剥離し、3,000 rpm (885 x g) で 3 分間遠心分離後、上清を取り除き、得られたペレットを 10% (v/v) FBS 含有 low-グルコース DMEM 培地に 1×10^5 cells/mL の密度で分散した。

(6) Hepatocyte の培養: ヒト肝細胞由来の株化細胞である Hepatocyte (8×10^5 cells) を 10% (v/v) FBS 含有 RPMI 1640 培地 (L-グルタミン 300 mg/L、7% 炭酸水素ナトリウム注射液 2,000 mg/L、ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1 g/L) 10 mL に懸濁し、100 mm culture dish に播種して、37°C、5% CO₂ 濃度下で培養した。セミコンフルエントに達した細胞をトリプシン-EDTA 法によりディッシュから剥離し、1500 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を取り除き、得られたペレットを 10% (v/v) FBS 含有 RPMI 1640 培地に 1×10^5 cells/mL の密度で分散した。

5. CyDs の細胞障害性の測定

細胞 (5×10^4 cells) を 96 well culture plate に播種した後、種々の濃度の CyDs 含有培地で処理した。HBSS 100 μ L で 3 回洗浄後、HBSS 100 μ L および WST-1 溶液 10 μ L を添加し、37°C、1 時間インキュベート処理後、マイクロプレートリーダーにてサンプル 405 nm、リファレンス 630 nm の吸光度を測定した。また、Tween 20 (1%) 含

有 HBBS および CyDs 非添加系の吸光度をそれぞれ生存率 0% および 100% として、CyDs の細胞生存率を計算した。

6. フローサイトメトリーによる DNA 含量の測定

細胞 (4×10^5 cells) を 24 well culture plate に播種した後、種々の濃度の CyDs 含有培地で一定時間処理した。PBS で洗浄後、100 μ L の冷 70% エタノール中に懸濁させ、4°C で 3 時間固定し透過処理を行った。遠心操作により上清を除去後、PBS に懸濁させ、室温で 30 分間インキュベートし、アポトーシス過程で生じた DNA 断片を漏出させた。RNase A 溶液 (100 μ g/mL) を加え、37°C, 30 分間インキュベートし RNA を分解除去した。遠心操作により上清を除去後、100 μ L の PI 溶液 (20 μ g/mL) に懸濁させ、氷上で 20 分間染色後、フローサイトメトリーにより細胞の蛍光強度を測定した。

7. アガロースゲル電気泳動による DNA ladder の検出

細胞 (1×10^6 cells) を 35 mm tissue culture dish に播種した後、種々の濃度の CyDs 含有培地で一定時間処理した。PBS で洗浄後、lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA \cdot 4Na, 0.5% Triton X-100) 中に懸濁し、細胞を溶解させた。RNase A を最終濃度が 400 μ g/mL となるように加え、37°C で 30 分間インキュベートした後、さらに proteinase K を最終濃度が 400 μ g/mL となるように加え、50°C で 1 時間インキュベートした。得られた細胞溶解液を ethidium bromide (0.1 μ g/mL) を含む 2% アガロースゲルを用いて電気泳動した。DNA のバンドは、トランスイルミネーターにより検出した。

8. 蛍光顕微鏡による観察

NR8383 細胞 (1×10^6 cells) を glass base dish に播種した後、5 mM の CyDs 含有培地で 24 時間処理した。PBS で洗浄した後、4% グルタルアルデヒドで 40 分間固定し、PBS で 3 回洗浄した。10 μ g/mL Hoechst 33342 含有 PBS を 1 mL 加え、37°C で 10 分間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。

9. 細胞膜構造変化の解析

PS の細胞膜外層への露出を TacsTM AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kits を用いて検出した。細胞 (1×10^6 cells) を 35 mm tissue culture dish に播種した後、CyDs 含

有培地で一定時間処理した。PBS で洗浄後、AnnexinV-FITC および PI で染色し、フローサイトメトリーにより細胞の蛍光強度を測定した。

10. 総リン脂質の漏出

NR8383 細胞 (1×10^6 cells) を 35 mm tissue culture dish に播種した後、HBSS で 2 回洗浄し、CyDs 含有 HBSS で 1 時間処理した。上清液を遠心分離 (10,000 rpm, 10 min) し、上清 0.5 mL をリン脂質 C-テストワコー発色試液 0.5 mL と混合して発色後、分光光度計で 600 nm の吸光度を測定し、総リン脂質量を算出した。

11. コレステロールの漏出

NR8383 細胞 (1×10^6 cells) を 35 mm tissue culture dish に播種した後、HBSS で 2 回洗浄し、CyDs 含有 HBSS で 1 時間処理した。上清液を遠心分離 (10,000 rpm, 10 min) し、上清 0.5 mL にクロロホルム/メタノール混液 (15/2) 1 mL を添加し 10 分間振盪した。下層 0.8 mL を蒸発乾固後、蒸留水 20 μ L を添加し、さらにコレステロール E-テストワコー発色試液 0.5 mL と混合して発色後、分光光度計で 600 nm の吸光度を測定し、コレステロール量を算出した。

12. Cholesterol-loading DM- β -CyD 溶液の調製

5 mM DM- β -CyD 含有培地 1 mL にコレステロール粉末 (20 mg) を加え 24 時間振盪した。その溶液を遠心分離後 (2,000 rpm, 5 min)、上清をフィルター (Advantec 製 DISMIC-3CP) でろ過し、cholesterol-loading DM- β -CyD 溶液を得た。

13. ミトコンドリア膜電位の ($\Delta\psi_m$) の測定

ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) は rhodamine 123 を用いて測定した。脂溶性カチオンである rhodamine 123 は電位差に応じてミトコンドリアに取り込まれるため、取り込み量を測定することによって膜電位を間接的に測定することができる。⁹⁷⁾ CyDs 含有培地で処理した NR 8383 細胞 (1×10^6 cells) を PBS で洗浄後、rhodamine 123 (10 μ M) 含有 PBS に懸濁し、37°C、15 分間インキュベートし、PBS で洗浄後、フローサイトメトリーにより蛍光強度を測定し、 $\Delta\psi_m$ を評価した。

14. ミトコンドリア画分の調製

Yang らの方法¹³⁹⁾に従って、ミトコンドリア画分を調製した。NR8383 細胞 ($5 \times$

10⁶ cells) を 60 mm tissue culture dish に播種後、CyDs 含有培地で処理し、PBS で洗淨後、extraction buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 73 μM pepstatin A, 0.1 mM leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 250 mM sucrose) 中に懸濁し 30 分間氷冷後、Dounce 型ホモジナイザーを用いてホモジナイズ (10 strokes) し、ホモジネートを得た。ホモジネートを遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) し、得られた上清をさらに遠心分離 (10,000 rpm, 15 min) して得られた沈殿をミトコンドリア画分のサンプルとして実験に使用した。

15. QCM : Single-Q にて、37°C、480 rpm で測定した。反応槽に 0.02 M リン酸カリウム、0.15 M 塩化ナトリウム (pH 7.2) 500 μL を添加し、FBP をオートインジェクション機能を用いてセンサーチップに固定化した後、同バッファーに溶解した FA-M-β-CyD 1 mg/mL を 2 μL オートインジェクションにて添加し、反応させた。結合曲線および解離定数は Q-UP ソフトを用いて解析した。

16. Western blot 分析

(1) 試料の調製① : NR8383 細胞 (5 x 10⁶ cells) を 60 mm tissue culture dish に播種後、CyDs 含有培地で各時間処理した後、溶液中および付着している細胞を全て回収し、PBS で洗淨後、Lysis buffer (20 mM Tris (pH 7.5), 1% NP-40, 1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 73 μM pepstatin A, 0.1 mM leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を 500 μL 添加し、4°C で 1 時間インキュベートした。遠心分離 (16,000 rpm, 10 min) 後、上清を分取し、lysate とした。

試料の調製②: KB 細胞を 35 mm tissue culture dish に 5 x 10⁵ cells/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地で 2 回洗淨した後、5 mM M-β-CyDs 含有無血清培地を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間処理した。その後、PBS 1 mL で 2 回洗淨後、Lysis buffer を 200 μL 添加し、4°C で 1 時間インキュベートした。遠心分離 (15,000 rpm, 10 min) 後、上清を分取し、試料とした。

(2) SDS-PAGE: 試料は 6 x sample buffer を加え、98°C で 5 分間加熱処理することにより還元状態の泳動試料とした。20 μg/lane になるように試料を各レーンに添加し、

電気泳動 (40 mA、30 分および 60 mA、2 時間) を行った。なお、ゲル中のアクリルアミド濃度は 12% running gel および 4% stacking gel であり、泳動用 buffer は、0.192 M glycine、0.1% SDS、0.125 M Tris-HCl (pH8.3) の組成のものを使用した。

(3) Akt、phospho-Akt、Bad、phospho-Bad、actin の検出

SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に転写 (50 V, 3 時間) した。転写したニトロセルロース膜に、ブロッキングバッファー (5% skim milk, 10 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) を用いて、25°C で 1 時間ブロッキングし、Akt, phospho-Akt, Bad, phospho-Bad および actin を検出するためにそれぞれの一次抗体 (rabbit anti-Akt antibody (1 : 1,000), mouse anti-phospho-Akt antibody (1 : 500), mouse anti-Bad antibody (1 : 100), rabbit anti-phospho-Bad antibody (1 : 200), rabbit anti-actin antibody (1 : 200)) を 4°C で一晩作用させた。TBS-Tween 20 (0.1%) 溶液で洗浄後、TBS-Tween 20 (0.1%) 溶液で希釈した二次抗体 (phospho-Akt, Bad ; peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG antibody (1 : 2,000), Akt, phospho-Bad, actin ; peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (1 : 2,000)) を 25°C で 1 時間作用させた。TBS-Tween 20 (0.1%) 溶液で洗浄後、ECL Western blotting analysis system を用いてそれぞれのバンドを検出した。

(4) Cytochrome *c*、cytochrome oxidase IV、caspase-3 の検出

SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写 (100 V, 3 時間) した。転写した PVDF 膜にブロッキングエースを用いて、25°C で 1 時間ブロッキングし、cytochrome *c*, cytochrome oxidase IV および caspase-3 を検出するためにそれぞれの一次抗体 (mouse anti-cytochrome *c* antibody (1 : 1000), mouse anti-cytochrome oxidase subunit IV antibody (1 : 1,000), rabbit anti-caspase-3 antibody (1 : 500)) を 4°C で一晩作用させた。PBS-Tween 20 (0.1%) 溶液で洗浄後、PBS-Tween 20 (0.1%) 溶液で希釈した二次抗体 (cytochrome *c*, cytochrome oxidase IV ; peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG antibody (1 : 2,000), caspase-3 ; peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (1 : 2,000)) を 25°C で 1 時間作用させた。PBS-Tween 20 (0.1%) 溶液で洗浄後、ECL Western blotting analysis system を用いてそれぞれのバンドを検出した。

(5) Caspase-3、LC3-II、Beclin-1、Atg7 の検出

SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に転写 (100V, 3 h) し、ブロッキングバッファー (5% スキムミルク含有 PBS) に浸し、4°C で一晩インキュベートした。0.1%

PBS-Tween20 溶液で洗浄後、同溶液で 1,000 倍希釈した一次抗体 (polyclonal rabbit anti-human caspase-3、polyclonal rabbit anti-human LC3B、polyclonal rabbit anti-human Beclin-1、polyclonal rabbit anti-human Atg7) を 4°C で一晩反応させた。再度、0.1% PBS-Tween 20 溶液で洗浄し、同溶液で 1,000 倍希釈した二次抗体 (anti-rabbit IgG-conjugated horseradish peroxidase) を室温で 1 時間反応させた。0.1% PBS-Tween 20 溶液で洗浄後、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents を用いて 5 分間反応させた。Caspase-3 および LC3-II のバンドは LAS-4000 により検出し、Image Quant TL により解析した。

17. p62 の発現に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

KB 細胞を 35 mm tissue culture dish に 1×10^5 cells/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有 RPMI 1640 (FA-free) 培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地 1 mL で 1 回洗浄後、p62-FP (Premo™ Autophagy Sensor GFP-p62 Kit) 50 μ L 含有無血清培地 1 mL を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 16 時間インキュベートした。その後、細胞を無血清培地で 2 回洗浄し、5 mM M- β -CyDs 含有無血清培地を 1 mL 添加し、1 時間処理した。無血清培地で 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察した。

18. TRITC-M- β -CyDs の調製

M- β -CyDs 10 mg および TRITC 1 mg を DMSO 400 μ L に溶解し、室温、遮光下にて 24 時間反応させた。その後、H₂O 中で 72 時間透析し、凍結乾燥により TRITC-M- β -CyDs を得た。

19. TRITC-M- β -CyDs の細胞内局在

KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 2×10^5 cells/dish になるように播種し、それぞれ 10% (v/v) FBS 含有 RPMI 培地で 24 時間培養した。細胞を PBS 1 mL で洗浄した後、10 μ M TRITC-M- β -CyDs 含有無血清培地を 150 μ L 添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間または 23 時間培養した。酸性オルガネラマーカである LysoTracker® (最終濃度 100 nM) を添加し、さらに 1 時間インキュベーション後、無血清培地 1 mL で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡により TRITC および LysoTracker® の蛍光を観察した。

20. TRITC-M-β-CyDs とミトコンドリアの共局在

KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 2×10^5 cells/dish になるように播種し、それぞれ 10% (v/v) FBS 含有 RPMI 培地で 24 時間培養した。細胞を PBS 1 mL で洗浄した後、10 μM TRITC-M-β-CyDs 含有無血清培地を 150 μL 添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間または 24 時間培養した。ミトコンドリアマーカである MitoTracker® (最終濃度 50 nM) を添加し、さらに 10 min インキュベーション後、無血清培地 1 mL で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡により TRITC および MitoTracker® の蛍光を観察した。

21. マイトファジー誘導に及ぼす FA-M-β-CyD の影響

KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 5×10^5 cells/dish になるように播種し、100 nM Mtpagy Dye® で 15 分間処理した。細胞を HBSS 1 mL で洗浄した後、5 mM M-β-CyDs 含有無血清培地を 150 μL 添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間インキュベートした。細胞を HBSS 1 mL で洗浄した後、1 μM Lyso Dye® で 15 分間処理した。細胞を HBSS 1 mL で洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。

22. ミトコンドリア DNA コピー数に及ぼす FA-M-β-CyD の影響

KB 細胞を 35 mm dish に 1.5×10^6 cells/dish になるように播種し、それぞれ 10% (v/v) FBS 含有 RPMI 培地で 24 時間培養した。細胞を PBS 1 mL で洗浄した後、5 mM M-β-CyDs 含有無血清培地を 1 mL 添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間処理した。その後、細胞を回収した後、total DNA をフェノール/クロロホルム (1/1 (v/v)) により抽出し、Epoch microplate photometer (BioTek instruments) にて DNA 含量を定量した。その後、ミトコンドリア DNA (mtDNA) および核 DNA (nDNA) を Human mtDNA Monitoring Primer Set® (TaKaRa Bio) を用いて、リアルタイム PCR にて定量した。

23. ATP 産生に及ぼす FA-M-β-CyD の影響

KB 細胞または A549 細胞を 96 well culture plate に 2×10^4 cells/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地 150 μL で 1 回洗浄した後、5 mM または 10 mM M-β-CyDs 含有無血清培地で 37°C、2 時間処理した。その後、『細胞の』 ATP 測定試薬™ を 100 μL ずつ添加し 10 分間インキュベート後、マイクロプレートリーダーにて発光量を測定した。

24. ROS 産生に及ぼす FA-M-β-CyD の影響

KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 2×10^5 cells/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。その後、無血清培地 1 mL で 2 回洗浄し、5 μM M-β-CyDs 含有無血清培地を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間処理した。その後、無血清培地 1 mL で 2 回洗浄後、total ROS detection reagent 含有無血清培地 1 mL を添加し、蛍光顕微鏡にて ROS 由来の蛍光を観察後、BZ-II 解析アプリケーションを用いて定量した。

25. オートファゴソーム形成の確認

KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 5×10^5 cells/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。無血清培地で 1 回洗浄し、5 mM M-β-CyDs を添加後、37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間インキュベーションした。その後、上清を除去し無血清培地で 2 回洗浄した後、Cyto-ID[®] 含有無血清培地 1 mL を添加し、37°C、30 分間インキュベーションした。その後、蛍光顕微鏡にて観察した。

26. M-β-CyDs の *in vitro* 殺細胞効果

KB 細胞および Hepatocyte : KB 細胞および Hepatocyte を 96 well culture plate に 2×10^4 cells/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地 150 μL で 2 回洗浄した後、種々の濃度の M-β-CyDs 含有無血清培地で 2 時間処理した。その後、PBS 150 μL で 2 回洗浄後、HBSS 100 μL および WST-1 溶液 10 μL を添加し、37°C、20 分間または 30 分間インキュベート後、マイクロプレートリーダーにてサンプル 450 nm、リファレンス 630 nm の吸光度を測定した。また、Tween 20 (1% (v/v)) 含有無血清培地および CyDs 非添加系の吸光度をそれぞれ生存率 0% および 100% として CyDs 処理時の細胞生存率を計算した。

27. 細胞内 mRNA の検出

(1) Total RNA の抽出: 細胞を PBS で 2 回洗浄後、TRIzol にて total RNA を抽出し、分光光度計にて 260 nm の吸光度を測定し、total RNA 量を求めた。なお、調製した RNA は OD_{260/280} 1.8 以上のものを用いた。

(2) Reverse transcription (RT) 反応: total RNA (0.5 μg) に対して、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて cDNA を得た。

(3) Real Time Polymerase chain reaction (Q-PCR) 反応: THUNDERBIRD® qPCR Mix 5 μ L、PCR Forward Primer 0.3 μ L (10 μ M)、PCR Reversed Primer 0.3 μ L (10 μ M)、template (cDNA) 1 μ L (< 100 ng) および dH₂O 3.4 μ L を混合後、Applied Biosystems 7500 を用い、95°C (30 s、20°C/s) の条件下、初期変性後、さらに 95°C (5 s、20°C/s)、55°C (30 s、20°C/s)、72°C (30 s、20°C/s) の条件下 40 サイクルの PCR 反応を行ない、cDNA を増幅させた。

(4) アガロースゲル電気泳動: PCR により増幅された DNA 10 μ L を、全量を 0.5 x TBE (Tris-borate EDTA; 45 mM Tris, 45 mM ホウ酸、1 mM EDTA) で調製した 1% アガロースゲルを用いて 100 V の定圧条件下で約 30 分間泳動した。泳動終了後、アガロースゲルを EtBr (100 ng/mL) を含む TBE 溶液中で 30 分間振とうし、染色した。染色終了後、トランスイルミネーターによりゲルを撮影した。

28. トランスフェクション

KB 細胞を 24 well plate に 1×10^5 cells/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地 300 μ L で 2 回洗浄後、Lipofectamine™2000/siFR- α 複合体を含む無血清 RPMI 1640 培地 270 μ L を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間インキュベートした。その後、FBS 30 μ L を添加し (最終濃度; 10% (v/v))、さらに 23 時間培養した。

29. FR- α ノックダウン KB 細胞における FA-M- β -CyD の ROS 産生の測定

前述の方法により作成した FR- α ノックダウン KB 細胞に 5 mM FA-M- β -CyD 含有無血清培地を 37°C、5% CO₂ 濃度下で 2 時間処理した。その後、無血清培地 1 mL で 2 回洗浄後、total ROS detection reagent 含有無血清培地 1 mL を添加し、蛍光顕微鏡にて ROS 由来の蛍光を観察後、BZ-II 解析アプリケーションを用いて定量した。

30. FR- α ノックダウン KB 細胞におけるオートファゴソーム形成

前述の方法により作成した FR- α ノックダウン KB 細胞を 35 mm glass bottom dish に 5×10^5 cells/dish になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。無血清培地で 1 回洗浄し、5 mM M- β -CyDs を添加後、37°C、5% CO₂ 濃度

下で 2 時間インキュベーションした。その後、上清を除去し無血清培地で 2 回洗浄した後、Cyto-ID® 含有無血清培地 1 mL を添加し、37°C、30 分間インキュベーションした。その後、蛍光顕微鏡にて観察した。

31. オートファジー阻害剤存在下の *in vitro* 殺細胞効果

KB 細胞を 96 well culture plate に 2×10^4 cells/well になるように播種し、10% (v/v) FBS 含有培地で 24 時間培養した。細胞を無血清培地 150 μ L で 2 回洗浄した後、50 mM 3-MA および 50 μ M LY294002 を添加し、37°C、5% CO₂ 濃度下で 1 時間インキュベーションした。その後、無血清培地で洗浄し、5 mM FA-M- β -CyD 含有無血清培地で 2 時間処理した。その後、M- β -CyDs の殺細胞効果と同様に細胞生存率を算出した。

32. *In vivo* 実験

(1) **KB 細胞皮下移植マウス:** BALB/c *nu/nu* 雄性マウス (4 週齢、20 g) の後肢に、2 日前から RPMI 1640 (FA-free) で培養した KB 細胞懸濁液 (1×10^6 cells/100 μ L) を接種した。約 14 日後、マウスの腫瘍の長径が 4 mm に到達したマウスを *in vivo* 実験に用いた。なお、マウスは搬入日より FA 非含有ガンマ線照射飼料にて飼育した。DOX (5 mg/kg)、M- β -CyD (20 mg/kg) および FA-M- β -CyD (20 mg/kg) を含む 5% マンニトール溶液 100 μ L を尾静脈内投与した。その後、経時的に腫瘍体積、体重を測定した。なお、生存率は、投与後 140 日目をエンドポイントとしてモニタリングした。

(2) **Ihara 細胞皮下移植マウス:** Rag-2/Jak3 をノックアウトした BALB/c *nu/nu* 雄性マウス (12 週齢、25 g) の背部皮下に、DMEM 培地で培養した KB 細胞懸濁液 (1×10^6 cells/100 μ L) を接種した。マウスの腫瘍の長径が 5 mm に到達したマウスを *in vivo* 実験に用いた。M- β -CyD (10 mg/kg) および FA-M- β -CyD (10 mg/kg) を含む 5% マンニトール溶液 100 μ L を尾静脈内投与した。その後、経時的に腫瘍体積、体重を測定した。なお、生存率は、投与後 18 日目をエンドポイントとしてモニタリングした。

(3) **担がんマウスの腫瘍体積測定:** 腫瘍体積は、Corbett らの方法¹⁴⁰⁾ に従い、腫瘍の長径および短径を測定し、Fig. 64 に示す計算式を用いて算出した。

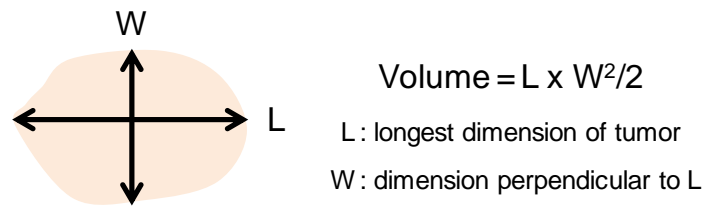


Fig. 64. Measurement of Tumor Volume in Mice

(4) 血液生化学的パラメータの算出: 担がんマウスをエーテル麻酔下、M- β -CyD および FA-M- β -CyD を含む 5% マンニトール溶液 100 μ L を尾静脈より投与した。24 時間後エーテル麻酔下、腹部大動脈より採血し、血清 200 μ L を分取し定量時まで凍結保存した。各種血液生化学検査値は生化学自動分析装置により定量した。

参考文献

- 1) Galluzzi L., Senovilla L., Zitvogel L., Kroemer G., The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs, *Nat Rev Drug Discov*, **11**, 215-233 (2012).
- 2) Jorgensen J. T., A challenging drug development process in the era of personalized medicine, *Drug Discov Today*, **16**, 891-897 (2011).
- 3) Specenier P., Nivolumab in melanoma, *Expert Rev Anticancer Ther*, **in press** (2016).
- 4) Maruyama K., Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects, *Adv Drug Deliv Rev*, **63**, 161-169 (2011).
- 5) Zhu L., Kate P., Torchilin V. P., Matrix metalloprotease 2-responsive multifunctional liposomal nanocarrier for enhanced tumor targeting, *ACS Nano*, **6**, 3491-3498 (2012).
- 6) Koo A. N., Min K. H., Lee H. J., Lee S. U., Kim K., Kwon I. C., Cho S. H., Jeong S. Y., Lee S. C., Tumor accumulation and antitumor efficacy of docetaxel-loaded core-shell-corona micelles with shell-specific redox-responsive cross-links, *Biomaterials*, **33**, 1489-1499 (2012).
- 7) Sawant R. R., Jhaveri A. M., Torchilin V. P., Immunomicelles for advancing personalized therapy, *Adv Drug Deliv Rev*, **64**, 1436-1446 (2012).
- 8) Salmaso S., Bersani S., Semenzato A., Caliceti P., New cyclodextrin bioconjugates for active tumour targeting, *J Drug Target*, **15**, 379-390 (2007).
- 9) Okada N., Mori N., Koretomo R., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction, *Gene Ther*, **12**, 129-139 (2005).
- 10) Yoshikawa T., Niwa T., Mizuguchi H., Okada N., Nakagawa S., Engineering of highly immunogenic long-lived DC vaccines by antiapoptotic protein gene transfer to enhance cancer vaccine potency, *Gene Ther*, **15**, 1321-1329 (2008).
- 11) O'Brien M. E., Wigler N., Inbar M., Rosso R., Grischke E., Santoro A., Catane R., Kieback D. G., Tomczak P., Ackland S. P., Orlandi F., Mellars L., Alland L., Tendler C., Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer, *Ann Oncol*, **15**, 440-449 (2004).
- 12) Kato K., Chin K., Yoshikawa T., Yamaguchi K., Tsuji Y., Esaki T., Sakai K., Kimura M., Hamaguchi T., Shimada Y., Matsumura Y., Ikeda R., Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer, *Invest New Drugs*, **30**, 1621-1627 (2012).
- 13) Davis M. E., Chen Z. G., Shin D. M., Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer, *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 771-782 (2008).
- 14) Gordon A. N., Fleagle J. T., Guthrie D., Parkin D. E., Gore M. E., Lacave A. J., Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated

- liposomal doxorubicin versus topotecan, *J Clin Oncol*, **19**, 3312-3322 (2001).
- 15) Gordon A. N., Tonda M., Sun S., Rackoff W., Long-term survival advantage for women treated with pegylated liposomal doxorubicin compared with topotecan in a phase 3 randomized study of recurrent and refractory epithelial ovarian cancer, *Gynecol Oncol*, **95**, 1-8 (2004).
 - 16) Harata M., Soda Y., Tani K., Ooi J., Takizawa T., Chen M., Bai Y., Izawa K., Kobayashi S., Tomonari A., Nagamura F., Takahashi S., Uchimaru K., Iseki T., Tsuji T., Takahashi T. A., Sugita K., Nakazawa S., Tojo A., Maruyama K., Asano S., CD19-targeting liposomes containing imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells, *Blood*, **104**, 1442-1449 (2004).
 - 17) Roche A. C., Fajac I., Grosse S., Frison N., Rondanino C., Mayer R., Monsigny M., Glycofection: facilitated gene transfer by cationic glycopolymers, *Cell Mol Life Sci*, **60**, 288-297 (2003).
 - 18) Chen H., Ahn R., Van den Bossche J., Thompson D. H., O'Halloran T. V., Folate-mediated intracellular drug delivery increases the anticancer efficacy of nanoparticulate formulation of arsenic trioxide, *Mol Cancer Ther*, **8**, 1955-1963 (2009).
 - 19) Lu Y., Low P. S., Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents, *Adv Drug Deliv Rev*, **54**, 675-693 (2002).
 - 20) Hatakeyama H., Akita H., Maruyama K., Suhara T., Harashima H., Factors governing the *in vivo* tissue uptake of transferrin-coupled polyethylene glycol liposomes *in vivo*, *Int J Pharm*, **281**, 25-33 (2004).
 - 21) Miyajima Y., Nakamura H., Kuwata Y., Lee J. D., Masunaga S., Ono K., Maruyama K., Transferrin-loaded nido-carborane liposomes: tumor-targeting boron delivery system for neutron capture therapy, *Bioconjug Chem*, **17**, 1314-1320 (2006).
 - 22) Kim I. Y., Kang Y. S., Lee D. S., Park H. J., Choi E. K., Oh Y. K., Son H. J., Kim J. S., Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice, *J Control Release*, **140**, 55-60 (2009).
 - 23) Schiffelers R. M., Koning G. A., ten Hagen T. L., Fens M. H., Schraa A. J., Janssen A. P., Kok R. J., Molema G., Storm G., Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin, *J Control Release*, **91**, 115-122 (2003).
 - 24) Parker N., Turk M. J., Westrick E., Lewis J. D., Low P. S., Leamon C. P., Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay, *Anal Biochem*, **338**, 284-293 (2005).
 - 25) Frankfurt O., Rosen S. T., Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates, *Curr Opin Oncol*, **16**, 553-563 (2004).
 - 26) Opferman J. T., Korsmeyer S. J., Apoptosis in the development and maintenance of the immune system, *Nat Immunol*, **4**, 410-415 (2003).
 - 27) Gougeon M. L., Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack, *Nat Rev Immunol*, **3**, 392-404 (2003).
 - 28) Mattson M. P., Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**,

- 120-129 (2000).
- 29) Perry G., Nunomura A., Lucassen P., Lassmann H., Smith M. A., Apoptosis and Alzheimer's disease, *Science*, **282**, 1268-1269 (1998).
 - 30) Ryan K. M., Phillips A. C., Vousden K. H., Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein, *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 332-337 (2001).
 - 31) Thompson C. B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science*, **267**, 1456-1462 (1995).
 - 32) Allen R. T., Hunter W. J., 3rd, Agrawal D. K., Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis, *J Pharmacol Toxicol Methods*, **37**, 215-228 (1997).
 - 33) Hale A. J., Smith C. A., Sutherland L. C., Stoneman V. E., Longthorne V. L., Culhane A. C., Williams G. T., Apoptosis: molecular regulation of cell death, *Eur J Biochem*, **236**, 1-26 (1996).
 - 34) White E., Life, death, and the pursuit of apoptosis, *Genes Dev*, **10**, 1-15 (1996).
 - 35) Wyllie A. H., Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, **284**, 555-556 (1980).
 - 36) Fadok V. A., Bratton D. L., Rose D. M., Pearson A., Ezekewitz R. A., Henson P. M., A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells, *Nature*, **405**, 85-90 (2000).
 - 37) Henson P. M., Bratton D. L., Fadok V. A., The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch?, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 627-633 (2001).
 - 38) Hoffmann P. R., deCathelineau A. M., Ogden C. A., Leverrier Y., Bratton D. L., Daleke D. L., Ridley A. J., Fadok V. A., Henson P. M., Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells, *J Cell Biol*, **155**, 649-659 (2001).
 - 39) Henson P. M., Johnston R. B., Jr., Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins, *J Clin Invest*, **79**, 669-674 (1987).
 - 40) Searle J., Kerr J. F., Bishop C. J., Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance, *Pathol Annu*, **17 Pt 2**, 229-259 (1982).
 - 41) Stern M., Savill J., Haslett C., Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by $\alpha v \beta 3$ /CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response, *Am J Pathol*, **149**, 911-921 (1996).
 - 42) Nagata S., Apoptosis by death factor, *Cell*, **88**, 355-365 (1997).
 - 43) Davis R. J., Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, *Cell*, **103**, 239-252 (2000).
 - 44) Franke T. F., Hornik C. P., Segev L., Shostak G. A., Sugimoto C., PI3K/Akt and apoptosis: size matters, *Oncogene*, **22**, 8983-8998 (2003).
 - 45) Fridman J. S., Lowe S. W., Control of apoptosis by p53, *Oncogene*, **22**, 9030-9040 (2003).

- 46) Cohen G. M., Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem J*, **326**, 1-16 (1997).
- 47) Riedl S. J., Shi Y., Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 897-907 (2004).
- 48) Hanahan D., Weinberg R. A., Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674 (2011).
- 49) He C., Klionsky D. J., Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy, *Annu Rev Genet*, **43**, 67-93 (2009).
- 50) Mizushima N., Yoshimori T., Levine B., Methods in mammalian autophagy research, *Cell*, **140**, 313-326 (2010).
- 51) Mizushima N., Komatsu M., Autophagy: renovation of cells and tissues, *Cell*, **147**, 728-741 (2012).
- 52) Cheong H., Lu C., Lindsten T., Thompson C. B., Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy, *Nat Biotechnol*, **30**, 671-678 (2012).
- 53) Bender M. L., Komiyama M., "Cyclodextrin Chemistry", *Springer-Verlag, Berlin*(1978).
- 54) Connors K. A., The stability of cyclodextrin complexes in solution, *Chem Rev*, **97**, 1325-1358 (1997).
- 55) Nabi I. R., Le P. U., Caveolae/raft-dependent endocytosis, *J Cell Biol*, **161**, 673-677 (2003).
- 56) Uekama K., Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation, *Chem Pharm Bull*, **52**, 900-915 (2004).
- 57) Loftsson T., Brewster M. E., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization, *J Pharm Sci*, **85**, 1017-1025 (1996).
- 58) Rajewski R. A., Stella V. J., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery, *J Pharm Sci*, **85**, 1142-1169 (1996).
- 59) Uekama K., Hirayama F., Irie T., Cyclodextrin drug carrier systems, *Chem Rev*, **98**, 2045-2076 (1998).
- 60) Uekama K., Otagiri M., Cyclodextrins in drug carrier systems, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **3**, 1-40 (1987).
- 61) Jarvinen T., Jarvinen K., Schwarting N., Stella V. J., β -cyclodextrin derivatives, SBE4- β -CD and HP- β -CD, increase the oral bioavailability of cinnarizine in beagle dogs, *J Pharm Sci*, **84**, 295-299 (1995).
- 62) Liu B., Turley S. D., Burns D. K., Miller A. M., Repa J. J., Dietschy J. M., Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the *npc1*^{-/-} mouse, *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 2377-2382 (2009).
- 63) Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., Pitha J., Differential effects of α -, β - and γ -cyclodextrins on human erythrocytes, *Eur J Biochem*, **186**, 17-22 (1989).
- 64) Pike L. J., Miller J. M., Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover, *J Biol*

- Chem*, **273**, 22298-22304 (1998).
- 65) Le Roy C., Wrana J. L., Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 112-126 (2005).
 - 66) Munro S., Lipid rafts: elusive or illusive?, *Cell*, **115**, 377-388 (2003).
 - 67) Palacios E. H., Weiss A., Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation, *Oncogene*, **23**, 7990-8000 (2004).
 - 68) Ha H., Kwak H. B., Lee S. K., Na D. S., Rudd C. E., Lee Z. H., Kim H. H., Membrane rafts play a crucial role in receptor activator of nuclear factor κ B signaling and osteoclast function, *J Biol Chem*, **278**, 18573-18580 (2003).
 - 69) Hueber A. O., Bernard A. M., Herincs Z., Couzinet A., He H. T., An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes, *EMBO Rep*, **3**, 190-196 (2002).
 - 70) Legler D. F., Micheau O., Doucey M. A., Tschopp J., Bron C., Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation, *Immunity*, **18**, 655-664 (2003).
 - 71) Ayllon V., Fleischer A., Cayla X., Garcia A., Rebollo A., Segregation of Bad from lipid rafts is implicated in the induction of apoptosis, *J Immunol*, **168**, 3387-3393 (2002).
 - 72) Frank D. W., Gray J. E., Weaver R. N., Cyclodextrin nephrosis in the rat, *Am J Pathol*, **83**, 367-382 (1976).
 - 73) Frijlink H. W., Eissens A. C., Hefting N. R., Poelstra K., Lerk C. F., Meijer D. K., The effect of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat, *Pharm Res*, **8**, 9-16 (1991).
 - 74) Grosse P. Y., Bressolle F., Pinguet F., Antiproliferative effect of methyl- β -cyclodextrin *in vitro* and in human tumour xenografted athymic nude mice, *Br J Cancer*, **78**, 1165-1169 (1998).
 - 75) Motoyama K., Onodera R., Tanaka N., Kameyama K., Higashi T., Kariya R., Okada S., Arima H., Evaluation of antitumor effects of folate-conjugated methyl- β -cyclodextrin in melanoma, *Biol Pharm Bull*, **38**, 374-379 (2015).
 - 76) Onodera R., Motoyama K., Okamatsu A., Higashi T., Arima H., Potential use of folate-appended methyl- β -cyclodextrin as an anticancer agent, *Sci Rep*, **3**, 1104 (2013).
 - 77) Onodera R., Motoyama K., Tanaka N., Ohyama A., Okamatsu A., Higashi T., Kariya R., Okada S., Arima H., Involvement of autophagy in antitumor activity of folate-appended methyl- β -cyclodextrin, *Sci Rep*, **4**, 4417 (2014).
 - 78) Gniadecki R., Depletion of membrane cholesterol causes ligand-independent activation of Fas and apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*, **320**, 165-169 (2004).
 - 79) Pisani D. F., Cabane C., Derijard B., Dechesne C. A., The topoisomerase 1-interacting protein BTBD1 is essential for muscle cell differentiation, *Cell Death Differ*, **11**, 1157-1165 (2004).
 - 80) Mori S., Watanabe W., Shigera S., A Colorimetric LDH Assay for the Titration of Infectivity and the Evaluation of Anti-Viral Activity against Ortho- and Paramyxoviruses,

- Tohoku J Exp Med*, **177**, 315-325 (1995).
- 81) Martin S. J., Reutelingsperger C. P., McGahon A. J., Rader J. A., van Schie R. C., LaFace D. M., Green D. R., Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *J Exp Med*, **182**, 1545-1556 (1995).
 - 82) Andree H. A., Reutelingsperger C. P., Hauptmann R., Hemker H. C., Hermens W. T., Willems G. M., Binding of vascular anticoagulant α (VAC α) to planar phospholipid bilayers, *J Biol Chem*, **265**, 4923-4928 (1990).
 - 83) Ahn N. G., Teller D. C., Bienkowski M. J., McMullen B. A., Lipkin E. W., de Haen C., Sedimentation equilibrium analysis of five lipocortin-related phospholipase A2 inhibitors from human placenta. Evidence against a mechanistically relevant association between enzyme and inhibitor, *J Biol Chem*, **263**, 18657-18663 (1988).
 - 84) Schlaepfer D. D., Jones J., Haigler H. T., Inhibition of protein kinase C by annexin V, *Biochemistry*, **31**, 1886-1891 (1992).
 - 85) Grundmann U., Abel K. J., Bohn H., Lobermann H., Lottspeich F., Kupper H., Characterization of cDNA encoding human placental anticoagulant protein (PP4): homology with the lipocortin family, *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 3708-3712 (1988).
 - 86) Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *J Immunol Methods*, **184**, 39-51 (1995).
 - 87) Helenius A., Simons K., Solubilization of membranes by detergents, *Biochim Biophys Acta*, **415**, 29-79 (1975).
 - 88) Yunomae K., Arima H., Hirayama F., Uekama K., Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl- β -cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cells, *FEBS Lett*, **536**, 225-231 (2003).
 - 89) Deng Y., Ren X., Yang L., Lin Y., Wu X., A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis, *Cell*, **115**, 61-70 (2003).
 - 90) Juo P., Kuo C. J., Reynolds S. E., Konz R. F., Raingeaud J., Davis R. J., Blenis J., Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases, *Mol Cell Biol*, **17**, 24-35 (1997).
 - 91) Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R. J., Greenberg M. E., Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis, *Science*, **270**, 1326-1331 (1995).
 - 92) Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L. H., Thompson C. B., Korsmeyer S. J., Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death, *Cell*, **80**, 285-291 (1995).
 - 93) Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S. J., Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L), *Cell*, **87**, 619-628 (1996).
 - 94) Leu J. I., Dumont P., Hafey M., Murphy M. E., George D. L., Mitochondrial p53

- activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex, *Nat Cell Biol*, **6**, 443-450 (2004).
- 95) Kroemer G., Reed J. C., Mitochondrial control of cell death, *Nat Med*, **6**, 513-519 (2000).
- 96) Wang X., The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes Dev*, **15**, 2922-2933 (2001).
- 97) Emaus R. K., Grunwald R., Lemasters J. J., Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties, *Biochim Biophys Acta*, **850**, 436-448 (1986).
- 98) Mashima T., Naito M., Noguchi K., Miller D. K., Nicholson D. W., Tsuruo T., Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis, *Oncogene*, **14**, 1007-1012 (1997).
- 99) Arima H., Nishimoto Y., Motoyama K., Hirayama F., Uekama K., Inhibitory effects of novel hydrophilic cyclodextrin derivatives on nitric oxide production in macrophages stimulated with lipopolysaccharide, *Pharm Res*, **18**, 1167-1173 (2001).
- 100) Peitsch M. C., Polzar B., Stephan H., Crompton T., MacDonald H. R., Mannherz H. G., Tschopp J., Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death), *EMBO J*, **12**, 371-377 (1993).
- 101) Barry M. A., Eastman A., Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis, *Arch Biochem Biophys*, **300**, 440-450 (1993).
- 102) Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, **391**, 43-50 (1998).
- 103) Tanuma S., Shiokawa D., Multiple forms of nuclear deoxyribonuclease in rat thymocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, **203**, 789-797 (1994).
- 104) Sahara S., Aoto M., Eguchi Y., Imamoto N., Yoneda Y., Tsujimoto Y., Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation, *Nature*, **401**, 168-173 (1999).
- 105) Vivanco I., Sawyers C. L., The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer, *Nat Rev Cancer*, **2**, 489-501 (2002).
- 106) Xu Z., Stokoe D., Kane L. P., Weiss A., The inducible expression of the tumor suppressor gene PTEN promotes apoptosis and decreases cell size by inhibiting the PI3K/Akt pathway in Jurkat T cells, *Cell Growth Differ*, **13**, 285-296 (2002).
- 107) Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S., Reed J. C., Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, *Science*, **282**, 1318-1321 (1998).
- 108) Rokudai S., Fujita N., Hashimoto Y., Tsuruo T., Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis, *J Cell Physiol*, **182**, 290-296 (2000).

- 109) Adachi M., Katsumura K. R., Fujii K., Kobayashi S., Aoki H., Matsuzaki M., Proteasome-dependent decrease in Akt by growth factors in vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett*, **554**, 77-80 (2003).
- 110) Sebolt-Leopold J. S., Herrera R., Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer, *Nat Rev Cancer*, **4**, 937-947 (2004).
- 111) Furuchi T., Anderson R. G., Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK), *J Biol Chem*, **273**, 21099-21104 (1998).
- 112) Feng B., Yao P. M., Li Y., Devlin C. M., Zhang D., Harding H. P., Sweeney M., Rong J. X., Kuriakose G., Fisher E. A., Marks A. R., Ron D., Tabas I., The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages, *Nat Cell Biol*, **5**, 781-792 (2003).
- 113) Shimizu S., Matsuoka Y., Shinohara Y., Yoneda Y., Tsujimoto Y., Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells, *J Cell Biol*, **152**, 237-250 (2001).
- 114) Chen C., Ke J., Zhou X. E., Yi W., Brunzelle J. S., Li J., Yong E. L., Xu H. E., Melcher K., Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors, *Nature*, **500**, 486-489 (2013).
- 115) Onodera R., Motoyama K., Okamatsu A., Higashi T., Kariya R., Okada S., Arima H., Involvement of cholesterol depletion from lipid rafts in apoptosis induced by methyl- β -cyclodextrin, *Int J Pharm*, **452**, 116-123 (2013).
- 116) Johansen T., Lamark T., Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins, *Autophagy*, **7**, 279-296 (2011).
- 117) Kim I., Lemasters J. J., Mitochondrial degradation by autophagy (mitophagy) in GFP-LC3 transgenic hepatocytes during nutrient deprivation, *Am J Physiol Cell Physiol*, **300**, C308-317 (2011).
- 118) Kihara A., Kabeya Y., Ohsumi Y., Yoshimori T., Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network, *EMBO Rep*, **2**, 330-335 (2001).
- 119) Kihara A., Noda T., Ishihara N., Ohsumi Y., Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol*, **152**, 519-530 (2001).
- 120) Kihara A., Kabeya Y., Ohsumi Y., Yoshimori T., Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network, *EMBO Rep*, **2**, 330-335 (2001).
- 121) Kihara A., Noda T., Ishihara N., Ohsumi Y., Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol*, **152**, 519-530 (2001).
- 122) Nishida Y., Arakawa S., Fujitani K., Yamaguchi H., Mizuta T., Kanaseki T., Komatsu M., Otsu K., Tsujimoto Y., Shimizu S., Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy, *Nature*, **461**, 654-658 (2009).
- 123) Hamasaki M., Furuta N., Matsuda A., Nezu A., Yamamoto A., Fujita N., Oomori H., Noda T., Haraguchi T., Hiraoka Y., Amano A., Yoshimori T., Autophagosomes form at

- ER-mitochondria contact sites, *Nature*, **495**, 389-393 (2013).
- 124) Lawrence S. A., Hackett J. C., Moran R. G., Tetrahydrofolate recognition by the mitochondrial folate transporter, *J Biol Chem*, **286**, 31480-31489 (2011).
- 125) Spaan A. N., Ijlst L., van Roermund C. W., Wijburg F. A., Wanders R. J., Waterham H. R., Identification of the human mitochondrial FAD transporter and its potential role in multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency, *Mol Genet Metab*, **86**, 441-447 (2005).
- 126) Youle R. J., Narendra D. P., Mechanisms of mitophagy, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 9-14 (2011).
- 127) 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*, **38**, 249-261 (2009).
- 128) Ono A., Hattori S., Kariya R., Iwanaga S., Taura M., Harada H., Suzu S., Okada S., Comparative study of human hematopoietic cell engraftment into BALB/c and C57BL/6 strain of rag-2/jak3 double-deficient mice, *J Biomed Biotechnol*, **2011**, 539748 (2011).
- 129) Weidberg H., Shvets E., Elazar Z., Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes, *Annu Rev Biochem*, **80**, 125-156 (2011).
- 130) Ziolkowski W., Szkatula M., Nurczyk A., Wakabayashi T., Kaczor J. J., Olek R. A., Knap N., Antosiewicz J., Wieckowski M. R., Wozniak M., Methyl- β -cyclodextrin induces mitochondrial cholesterol depletion and alters the mitochondrial structure and bioenergetics, *FEBS Lett*, **584**, 4606-4610 (2010).
- 131) Matsuda N., Sato S., Shiba K., Okatsu K., Saisho K., Gautier C. A., Sou Y. S., Saiki S., Kawajiri S., Sato F., Kimura M., Komatsu M., Hattori N., Tanaka K., PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy, *J Cell Biol*, **189**, 211-221 (2010).
- 132) Li X., Fang P., Mai J., Choi E. T., Wang H., Yang X. F., Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers, *J Hematol Oncol*, **6**, 19 (2013).
- 133) Chauhan V. P., Stylianopoulos T., Martin J. D., Popovic Z., Chen O., Kamoun W. S., Bawendi M. G., Fukumura D., Jain R. K., Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner, *Nat Nanotechnol*, **7**, 383-388 (2012).
- 134) Wyckoff J. B., Wang Y., Lin E. Y., Li J. F., Goswami S., Stanley E. R., Segall J. E., Pollard J. W., Condeelis J., Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors, *Cancer Res*, **67**, 2649-2656 (2007).
- 135) Quatromoni J. G., Eruslanov E., Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer, *Am J Transl Res*, **4**, 376-389 (2012).
- 136) Zhang M., He Y., Sun X., Li Q., Wang W., Zhao A., Di W., A high M1/M2 ratio of

- tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients, *J Ovarian Res*, **7**, 19 (2014).
- 137) Puig-Kroger A., Sierra-Filardi E., Dominguez-Soto A., Samaniego R., Corcuera M. T., Gomez-Aguado F., Ratnam M., Sanchez-Mateos P., Corbi A. L., Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages, *Cancer Res*, **69**, 9395-9403 (2009).
- 138) Galanzha E. I., Kim J. W., Zharov V. P., Nanotechnology-based molecular photoacoustic and photothermal flow cytometry platform for in-vivo detection and killing of circulating cancer stem cells, *J Biophotonics*, **2**, 725-735 (2009).
- 139) Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J., Peng T. I., Jones D. P., Wang X., Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked, *Science*, **275**, 1129-1132 (1997).
- 140) Corbett T. H., Griswold D. P., Jr., Roberts B. J., Peckham J. C., Schabel F. M., Jr., Biology and therapeutic response of a mouse mammary adenocarcinoma (16/C) and its potential as a model for surgical adjuvant chemotherapy, *Cancer Treat Rep*, **62**, 1471-1488 (1978).