

博士論文

難治性疾患治療薬の開発に関する研究

平成 25 年度

崇城大学 大学院工学研究科

応用生命科学専攻 博士課程

医用生体工学講座

1119D02

日 野 元 貴

## 目 次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの膜物性	5
2-1 序	5
2-2 実験	7
2-2-1 試料	7
2-2-2 ハイブリッドリポソームの調製	8
2-2-3 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの調製	9
2-2-4 動的光散乱法による膜直径の測定	9
2-2-5 培地中での膜安定性の検討	9
2-2-6 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの膜流動性の測定	10
2-3 結果と考察	11
2-3-1 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの安定性	11
2-3-2 培地中での膜安定性	13
2-3-3 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの膜流動性	14
2-4 総括	15
第 3 章 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞 に対する抗腫瘍効果	16
3-1 序	16
3-2 実験	18
3-2-1 試料	18
3-2-2 ハイブリッドリポソームの調製	18
3-2-3 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの調製	18
3-2-4 蛍光標識脂質含有ハイブリッドリポソームの調製	19
3-2-5 動的光散乱法による膜直径の測定	19
3-2-6 使用細胞	19
3-2-7 酵素活性測定法による 50%増殖抑制濃度の測定	20
3-2-8 共焦点レーザー顕微鏡による細胞への融合・蓄積の観察	21
3-2-9 全反射蛍光顕微鏡による細胞への融合・蓄積の観察	22
3-2-10 Annexin-V binding assay による初期アポトーシスの検出方法	24
3-2-11 TUNEL 法によるアポトーシスの検出方法	25
3-2-12 フローサイトメーターによる DNA 含量測定	26
3-2-13 カスパー活性測定	27
3-2-14 ミトコンドリア膜電位測定	28

3-2-15	細胞膜流動性測定	29
3-3	結果と考察	31
3-3-1	カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞に対する増殖抑制効果	31
3-3-2	カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞への融合・蓄積	37
3-3-3	カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞に対するアポトーシス誘導	41
3-3-4	アポトーシス誘導におけるカスパーズ-3 の活性化	45
3-3-5	アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与	47
3-3-6	ヒト大腸がん細胞膜の膜流動性	49
3-4	総括	51
第4章	ヒト大腸がん細胞移植モデルマウスに対するカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの治療効果	53
4-1	序	53
4-2	実験	55
4-2-1	試料	55
4-2-2	ハイブリッドリポソームの調製	55
4-2-3	カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの調製	55
4-2-4	担がんモデルマウスの作成	55
4-2-5	担がんモデルマウスに対する治療実験	55
4-2-6	HE 染色による組織切片観察	56
4-2-7	TUNEL 法によるアポトーシスの検出方法	56
4-2-8	血球への融合・蓄積の観察	56
4-3	結果と考察	58
4-3-1	担がんモデルマウスに対するカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの治療効果	58
4-3-2	カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞移植モデルマウスに対するアポトーシス誘導	63
4-3-3	カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの血球に対する安全性	65
4-4	総括	69

第5章 ヒト大腸がん細胞移植モデルマウスに対する ハイブリッドリポソームの治療効果	70
5-1 序	70
5-2 実験	72
5-2-1 試料	72
5-2-2 ハイブリッドリポソームの調製	72
5-2-3 蛍光標識脂質含有ハイブリッドリポソームの調製	72
5-2-4 担がんモデルマウスの作成	72
5-2-5 担がんモデルマウスに対する治療実験	72
5-2-6 HE 染色による組織切片観察	73
5-2-7 TUNEL 法によるアポトーシスの検出方法	73
5-2-8 CEA 免疫染色による組織切片観察	73
5-3 結果と考察	
5-3-1 担がんモデルマウスに対するハイブリッド リポソームの治療効果	74
5-3-2 HE 染色による組織切片観察	78
5-3-3 ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん 細胞移植モデルマウスに対するアポトーシス誘導	79
5-3-4 ハイブリッドリポソームの腫瘍細胞への選択的蓄積	80
5-4 総括	83
第6章 ハイブリッドリポソームのヒトリウマチ滑膜細胞に対する 増殖抑制効果	84
6-1 序	84
6-2 実験	86
6-2-1 試料	86
6-2-2 ハイブリッドリポソームの調製	86
6-2-3 蛍光標識脂質含有ハイブリッドリポソームの調製	86
6-2-4 動的光散乱法による膜直径の測定	86
6-2-5 使用細胞	86
6-2-6 酵素活性測定法による 50%増殖抑制濃度の測定	86
6-2-7 共焦点レーザー顕微鏡による細胞への融合・蓄積の観察	87
6-2-8 TUNEL 法によるアポトーシスの検出方法	87
6-2-9 フローサイトメーターによる DNA 含量測定	87
6-2-10 PhiPhi Lux を用いたカススペース-3 活性の観察	87
6-2-12 ミトコンドリア膜電位測定	87
6-2-13 細胞膜の流動性測定	87



6-3	結果と考察	89
6-3-1	ハイブリッドリポソームの滑膜細胞に対する増殖抑制効果	89
6-3-2	ハイブリッドリポソームの滑膜細胞への融合・蓄積	91
6-3-3	ハイブリッドリポソームの滑膜細胞に対するアポトーシス誘導	94
6-3-4	アポトーシス誘導におけるカスパーズ-3 の活性化	96
6-3-5	アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与	97
6-3-6	ヒトリウマチ滑膜細胞膜の膜流動性	98
6-4	総括	99
第7章	関節リウマチモデルマウスに対するハイブリッドリポソームの 治療効果	101
7-1	序	101
7-2	実験	102
7-2-1	試料	102
7-2-2	ハイブリッドリポソームの調製	102
7-2-3	関節リウマチモデルマウス作製法	102
7-2-5	関節リウマチモデルマウスに対する治療実験	102
7-2-6	スコア法による評価	103
7-2-7	HE 染色による組織切片観察	104
7-2-8	免疫染色による組織切片観察	104
7-3	結果と考察	105
7-3-1	関節リウマチモデルマウスの作製	105
7-3-2	関節リウマチモデルマウスに対するハイブリッド リポソームの治療効果	107
7-3-3	指組織切片観察	112
7-4	総括	117
第8章	総論	118
	参考文献	122
	謝辞	127

## 第1章 序論

難治性疾患は、昭和47年に厚生労働省により1)原因不明、治療方法未確立であり、かつ、後遺症を残すおそれが少なくない疾病、2)経過が慢性にわたり、単に経済的な問題のみならず介護等に著しく人手を要するために家族の負担が重く、また精神的にも負担の大きい疾病と定義されている。また、高齢化社会の到来と共に難治性疾患の中でも悪性腫瘍、膠原病の罹患率が増加しているため、これらの疾患に対する新規治療薬の開発を目指した。

腫瘍とは、からだの細胞の一部が何らかの原因で自己増殖を始め、かたまりとなったもので、これには良性のものと悪性のものがある。細胞が無制限に増殖して周囲の正常な細胞を破壊し、いろいろな部位に転移をおこし生命に危険をおよぼす腫瘍を、悪性腫瘍または悪性新生物といい、がんがその代表である。

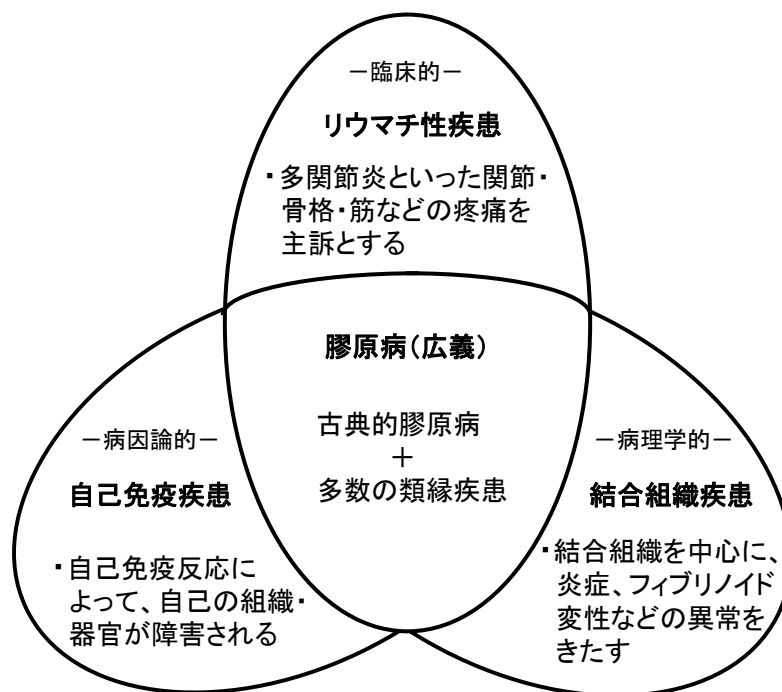
私たちのからだは約60兆個の細胞からなっている。これらの細胞はそれぞれの役割を果たし、ある一定の調和を保っている。がん細胞はこのような正常細胞が変化して出てくるもので、からだ全体の調和を無視して無秩序に増え続けるのが第一の特徴である。さらにがん細胞はまわりの正常な組織に侵入したり(浸潤)、血管やリンパ管を通して体のいたるところに定着し、そこで増殖する性質がある(転移)。すなわちがん細胞は、正常細胞に比べて細胞分裂が盛んで、正常細胞を押しよけて異常に分裂するため生命に関わる恐ろしい病気であるということが一般的に知られている<sup>1)</sup>。がんが他の病気と大きく異なるのはこれらの性質による。また浸潤や転移をする性質のため、がんは悪性の病気であるといえる。

近年、アメリカでは主要4大がん(肺、大腸、乳房、前立腺)は減少傾向にあるが<sup>2)</sup>、日本においてはかつて割合が少なかった大腸がんの罹患数は毎年10万人を超えるようになっており、2020年には胃がん、肺がんを抜き、男女あわせた日本人の大腸がん罹患数・罹患率はともに1位になると予測されている<sup>3)</sup>。年間約10万人の患者が新たに発生していると考えられ、2011年には45,744人が死亡している<sup>4)</sup>。早期大腸がんは、腫瘍が粘膜下層までにとどまっている状態で<sup>5)</sup>特徴的な症状はなく、良性疾患でもがんと類似した症状がおきる場合がある。大腸がんの診断では、注腸造影検査、大腸内視鏡検査、腫瘍マーカー、画像診断がある。治療法は、内視鏡的治療法・外科療法が中心で、がんの進行の程度や発生した場所によって方法が変わってくる<sup>6)</sup>。

がんの治療法は、主に外科療法・放射線療法・化学療法により行われており、これらは3大がん治療法と言われている。その他、免疫療法・遺伝子療法・凍結療法・生物学的治療・集学的治療など様々な治療法がある。外科療法は、進行性でない早期がんの治療に有効な治療法とされている。手術の範囲が大きく

なるほど患者への負担が大きくなるため、がんの範囲や患者の体力によっては外科手術がおこなえない場合がある。放射線療法は、局所療法でありがんに侵された臓器の機能と形態の温存ができ、全身的な影響が少なく高齢者にも適応できる治療法である。化学療法は、血液やリンパ管を通して転移したがん細胞に有効である。しかし、これらの治療法には問題がある。外科療法には手術後、がんを完全に取り除けなかった場合、その後急速にがんが増殖したり、転移することがある。また、手術で出来た傷によって、一時的に体力が消耗し病気に対する抵抗力も弱まる。さらに手術の部位や大きさによってさまざまな臓器に合併症が現れ、特に肺炎や気管支炎などの肺合併症が多い<sup>7)</sup>。放射線療法では、治療終了直後(急性期)のものと、終了して半年から数年たった後(晩期)から出てくるものがあり、皮膚炎・全身のだるさ・食欲不振・吐き気・嘔吐・めまい等の副作用がある。化学療法には、骨髄障害・胃腸障害・肺毒性・心毒性などの副作用がある。そのため、がん治療に対して安全な治療法は見つかっていない。

関節リウマチ(rheumatoid arthritis : RA)は、膠原病の一つであり、リウマチ病の部類のなかでも代表的な疾病である。膠原病とは自分の体の中で自分の体を構成する成分に対する自己抗体ができて、これが組織や臓器を攻撃するという自己免疫疾患に属する疾患群の総称である。また現在では、臨床的(症候群的)にはリウマチ性疾患、病因論的には自己免疫疾患、病理学的には結合組織疾患であるという3つの側面を併せもつ疾患概念と位置づけられている<sup>8)</sup>。



膠原病の位置づけ

RA 病因として、滑膜細胞の異常増殖と滑膜局所における自己免疫応答性の関与が明らかにされている<sup>9)</sup>。その中心を担っているのは T 細胞である。免疫応答により関節に T 細胞が集まると滑膜において炎症が起こり、集積した炎症細胞(免疫細胞)が活性化しインターロイキン(IL)-1、IL-6、腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ などの炎症性サイトカインが分泌される。これらが破骨細胞や軟骨細胞に作用し骨破壊や軟骨破壊を引き起こしたり、滑膜細胞の増殖を促すことでパニヌス(肉芽組織)が形成され軟骨および軟骨下骨を浸食し関節が破壊されていく<sup>8)</sup>。

RA の治療では、症状や進み具合に合わせて、薬物療法、手術療法、リハビリテーションなどが行われる。薬物療法は関節の腫れや痛みを抑え、関節破壊の進行を抑制する。手術療法には、増殖した関節の滑膜を取り除く滑膜切除術、破壊された関節を人工関節に置き換える機能再建術などがある。リハビリテーションには、関節の動く範囲を広げ、血液の流れをよくして痛みや筋肉のこわばりをとるための運動療法、患部を温めて痛みやこわばりを和らげる温熱療法、血液中の活性化した白血球を取り除き炎症をすみやかに鎮める白血球除去療法などがある。しかし、これらの治療法には、消化性潰瘍(胃潰瘍など)、アナフィラキシー、喘息発作、過敏性血管炎、皮膚粘膜眼症候群や中毒性表皮壊死症などの過敏症、溶血性貧血、顆粒球減少症や骨髓形成不全などの造血系障害、浮腫、急性腎不全、うっ血性心不全などの腎障害、肝機能障害、錯乱などの精神神経障害などの問題がある。

上岡らにより開発されたハイブリッドリポソーム(HL:Hybrid Liposome)<sup>10, 11)</sup>は、リン脂質と界面活性剤を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで容易に得られ(Fig. 1-1)、従来のリポソーム調製法のように有機溶媒を用いないことから有機溶媒の混入がなく、素材および組成比の選択により、形態やサイズ、相転移温度、疎水性および膜流動性のコントロールが可能な生体適合性指向の医用素材である<sup>12~15)</sup>。HL に制がん剤を含有させて薬物伝導システム(DDS:Drug Delivery System)として用いる<sup>16~18)</sup>以外にも、HL のみでのがん細胞に対する抗腫瘍効果<sup>19~23)</sup>やエイズウイルス感染細胞の増殖抑制効果<sup>24)</sup>が明らかとなっている。また HL は、がん細胞に特異的に融合・蓄積し<sup>25)</sup>、アポトーシスを誘導する<sup>26, 27)</sup>。さらに HL のヒト前骨髄性白血病(HL-60)細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムの全容が明らかになっている<sup>28)</sup>。

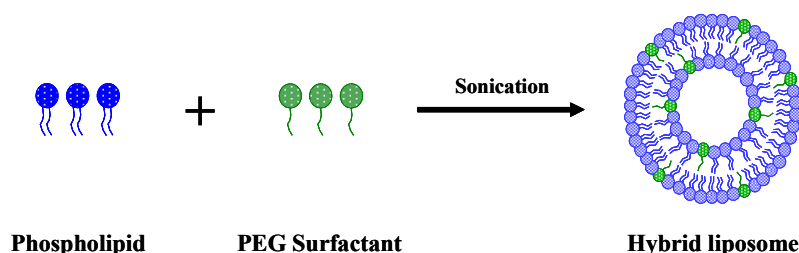


Fig. 1-1 Schematic representation of hybrid liposome.

また、担がんモデル動物に対する HL のみによる治療効果<sup>29-31)</sup>や肝転移抑制効果<sup>32)</sup>、正常動物に対する長期間反復投与毒性試験<sup>33)</sup>および体内動態試験<sup>34)</sup>において安全性が確認されている。さらに、生命倫理委員会承認後の臨床試験から、副作用がなく、延命効果および腫瘍の縮小効果が明らかとなっている<sup>35)</sup>。

本研究は、重篤な副作用の問題で低下している患者の Quality of Life(QOL)の向上を目指し、新規治療薬の開発を目的としたものである。既にごがん細胞に対して、アポトーシスを誘導し臨床応用されているハイブリッドリポソームに、PEG 系界面活性剤として日本薬局方に定められている C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>、さらに、カチオン性脂質として 2C<sub>14</sub>ECI を加えたカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソーム(DMPC/C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>/2C<sub>14</sub>ECI)を研究素材として用いた。これまでにカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームは、*in vitro* においてヒト腎臓がん(OS-RC-2)細胞に対してのみ、高い増殖抑制効果およびアポトーシスを誘導する<sup>36)</sup>ことが明らかとなっている。*in vivo* においては、担がんモデルマウスを用いた治療実験から延命効果<sup>37)</sup>が明らかとなっている。今回は、ヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する抗腫瘍効果および治療効果について検討を行った。また、PEG 系界面活性剤に日本薬局方に定められている C<sub>12</sub>(EO)<sub>25</sub> を用いた 95mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>25</sub> ハイブリッドリポソーム(HL-25)を用いた HCT116 細胞移植モデルマウスに対する *in vivo* での治療効果および体内動態について検討した。さらに、ヒト RA 滑膜(HFLS-RA)細胞に対する 95mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub> ハイブリッドリポソーム(HL-23)の増殖抑制効果および関節リウマチモデルマウスに対する治療効果について検討した。

本論文は、以下の 7 章より成り立っている。第 2 章では、カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの膜物性について述べる。第 3 章では、カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞に対する制がんメカニズムについて述べる。第 4 章では、ヒト大腸がん細胞移植モデルマウスに対するカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの治療効果について述べる。第 5 章では、肝転移モデルマウスに対するハイブリッドリポソームの治療効果および体内動態について述べる。第 6 章ではハイブリッドリポソームのヒト RA 滑膜細胞に対する増殖抑制効果について述べる。第 7 章ではハイブリッドリポソームの関節リウマチモデルマウスに対する治療効果について述べる。第 8 章は以上の研究成果の総論である。

## 第2章 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの膜物性

### 2-1 序

生体の基本的構成要素である細胞は、その表面の原形質膜により外界から区画されている。細胞の内部にはさらに各機能に特殊化した小器官があり、それらはやはり原形質膜と類似した膜に包まれている。生体膜は、これら原形質膜や細胞内小器官(オルガネラ)膜の総称である。生物はすべて生体膜に覆われ、外界とは全く異なった環境中で生命を営んでおり、生体膜は単に物理的に外と内を分け隔てているだけの壁ではなく、生命活動を行う上に重要な機能を種々有している。また生体膜には、生命の維持に必要な諸物質をその中に保持し、外界からの有害物質の侵入を防ぐ役割がある。その反面、細胞の代謝に必要な物質を特異的に受け入れ、不要な代謝産物を外界に送り出す役割もある<sup>38)</sup>。生物の細胞の膜構造を形成する脂質分子は、水中で自発的に二重層構造の膜状に配列し、直径数十ナノメートル～数十マイクロメートルの膜小胞を形成する。

リポソームとは、細胞膜と類似の構造をもち、細胞膜の構成成分であるリン脂質より人工的につくられる脂質膜小胞であり、1965年にA. Banghamにより初めて発見された<sup>39)</sup>。リポソームは生体膜と同じリン脂質二重層を有していることから、水溶性・脂溶性を問わず薬物を包含することが可能であり、リン脂質を主成分としているため毒性が低いことが知られている。組成比や素材の選択によりサイズの調節が可能であることから薬剤の封入が可能で、薬物送達システム (Drug Delivery System : DDS) としての利用が研究されており<sup>40-42)</sup>、薬剤の治療効果を高めるだけでなく副作用の軽減も期待できる。すでにアムホテリシンBを封入したAmBisome<sup>43)</sup>やドキシルビシンを封入したDoxil<sup>44)</sup>を含む多くのリポソーム静脈内投与製剤が臨床応用されている。腫瘍組織では血管透過性が著しく亢進しているため、リポソームのような微粒子でも血管外に流出し、血中滞留性を向上させれば腫瘍組織で浸透するリポソームの割合が増大する(受動的ターゲティング)<sup>45, 46)</sup>。また、細胞内遺伝子導入の武器としても多用され、リポソーム医薬品だけでなく化粧品や食品など様々な用途での利用価値が高まっている。

リポソームを薬剤として用いる場合、リポソームの安定性および物性は薬剤としての保存や体内動態において非常に重要である。リポソームの医薬品への応用研究は1970年代から始まったが、当初は大量生産方法(均一性・再現性保証、無菌性保証)、安定化方法、薬物の高保持率化方法などの製造工学的問題、あるいは体内で肝臓や脾臓などの細網内皮系(RES : reticuloendothelial system)に取り込まれやすい<sup>47)</sup>などの生物学的問題がある。これまでに大きさの異なるリポソームを用いて、担がんモデルマウスに投与し、200nm以下の小さなリポソーム

と 300nm 以上の大きなリポソームで RES 組織への集積が異なることが報告されている<sup>48)</sup>。RES 回避のためには、リポソームを直径 100nm 以下にする必要がある<sup>49)</sup>。

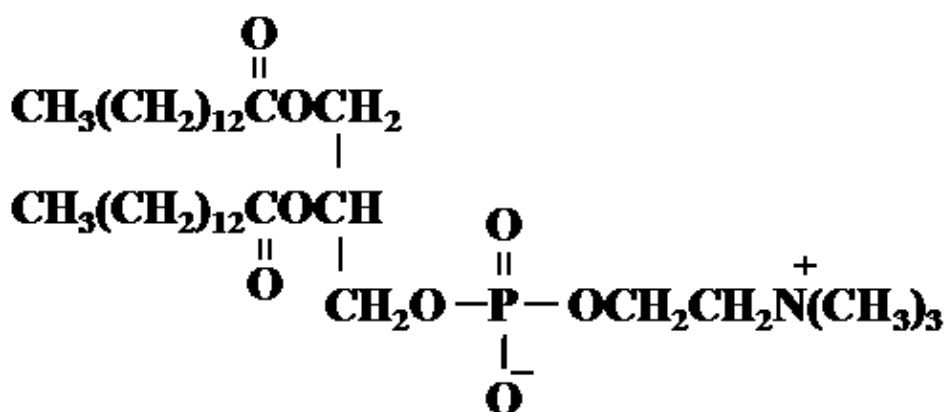
本章では、双性リン脂質である DMPC、PEG 系界面活性剤である C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub> およびカチオン性脂質である 2C<sub>14</sub>ECl を用いて創製したカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの膜物性について検討した。

## 2-2 実験

### 2-2-1 試料

#### <リン脂質>

$\text{L-}\alpha\text{-dimyristoylphosphatidylcholine}$  (DMPC)は、市販品(COATSOME MC-4040、MW=677.9、相転移温度:23℃、purity>99%、日本油脂(株))をそのまま使用した。以下に構造式を示す。



DMPC

#### <界面活性剤>

Polyoxyethylene (21) lauryl ether ( $\text{C}_{12}(\text{EO})_{21}$ )は、市販品(Mw=1110、日光ケミカルズ)をそのまま使用した。以下に構造式を示す。

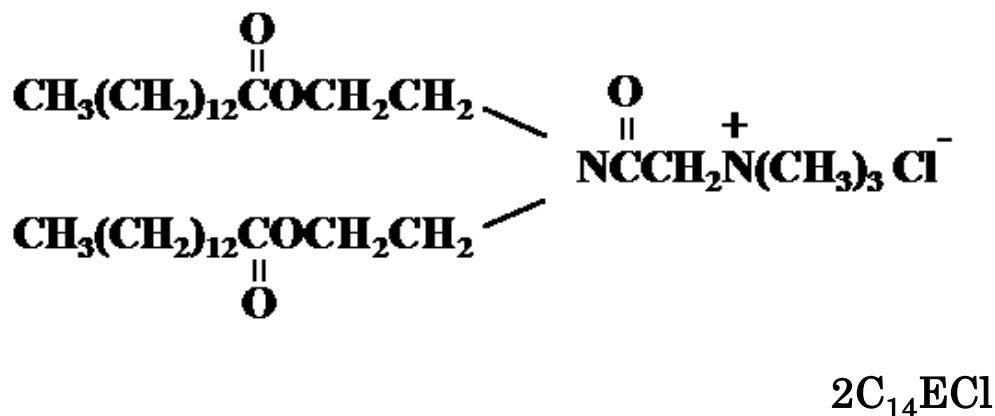


$\text{C}_{12}(\text{EO})_{21}$



<カチオン性脂質>

O,O'-ditetradecanoyl-N-( $\alpha$ -trimethylammonio acetyl) diethanolamine chloride (2C<sub>14</sub>ECl) は、市販品 (DC-6-14、Mw=661.4、相転移温度：34℃、相互薬工株式会社) をそのまま使用した。以下に構造式を示す。



## 2-2-2 ハイブリッドリポソームの調製法

リン脂質(DMPC)及び界面活性剤(C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>)を精秤し、5%ブドウ糖液(大塚製薬)中でバス型超音波照射器(VS-N300,VELVO-CLEAR：300W,45℃)<sup>50)</sup>により窒素雰囲気下で超音波照射処理(45℃, 1ml/min)を行い、均一な溶液が得られたことを確認した後、滅菌済みメンブレンフィルター(孔径 0.20μm, セルロースアセテート材質；13CP020AS, ADVANTEC)で濾過滅菌して試料溶液とした。

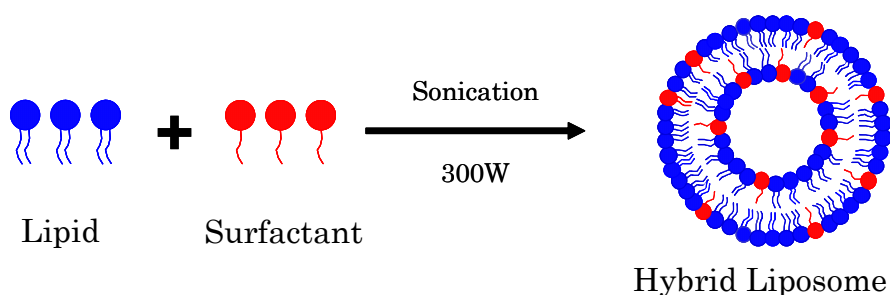


Fig. 2-1 Schematic representation of hybrid liposome.

### 2-2-3 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの調製法

リン脂質(DMPC)、界面活性剤( $C_{12}(EO)_{21}$ )及びカチオン性脂質( $2C_{14}ECl$ )を精秤し、5%ブドウ糖液(大塚製薬)中でバス型超音波照射器(VS-N300, VELVO-CLEAR : 300W, 45°C)<sup>50)</sup>により窒素雰囲気下で超音波照射処理(45°C, 1ml/min)を行い、均一な溶液が得られたことを確認した後、滅菌済みメンブレンフィルター(孔径 0.20 $\mu$ m, セルロースアセテート材質 ; 13CP020AS, ADVANTEC)で濾過滅菌して試料溶液とした。

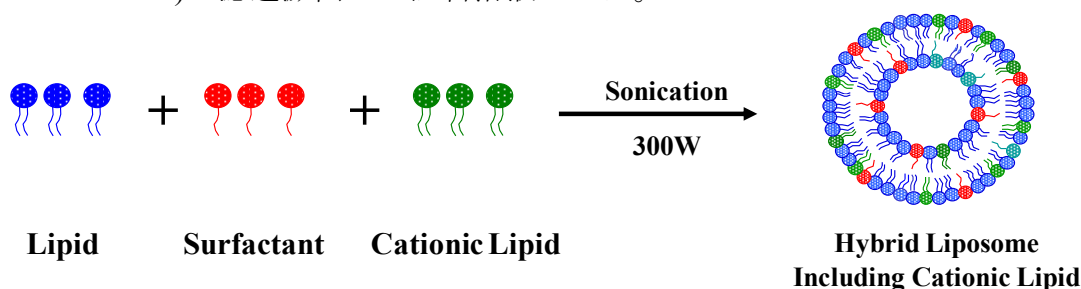


Fig. 2-2 Schematic representation of hybrid liposome including cationic lipids.

### 2-2-4 動的光散乱法による膜直径の測定

膜直径(hydrodynamic diameter :  $d_{hy}$ )は、光散乱光度計(ELSZ-0,大塚電子)を用い、動的光散乱法により測定した。光源として He-Ne レーザーの 633nm の発振線を出力 10mW で使用し、散乱角 90°で測定した。この測定で得られた拡散係数(D)と Stokes-Einstein の式((1)式)から、膜直径( $d_{hy}$ )を求めた。

$$d_{hy} = \kappa T / 3\pi\eta D \quad (1)$$

ここで、 $\kappa$  は Boltzmann 定数、T は絶対温度、 $\eta$  は溶媒の粘度である。

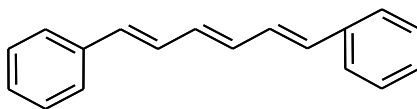
### 2-2-5 培地中での膜安定性の検討

培地中での膜安定性は、2ml の培地(RPMI1640 (Gibco BRL)+20% Fetal Bovine Serum (FBS ; HyClone Laboratories Inc.))に試料( $[DMPC]=3\times 10^{-2}M$ )を 200 $\mu$ l(最終濃度 : 3mM)添加し、所定の時間に光散乱光度計(ELSZ-0,大塚電子)を用い動的光散乱法により測定した。通常、培養に用いる培地は 10%FBS を用いるが、血液中での膜安定性を検討するために、より高い血清濃度(20%FBS)含有培地を実験に用いた。

## 2-2-6 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの膜流動性の測定

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの膜流動性は、分光蛍光光度計 (F-2000, 日立) を用い蛍光偏光解消法により測定した。蛍光プローブには、膜内部の流動性を反映させるといわれている 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH, ナカライテスク) を用いた。

試料を 1cm 角の石英セルに 2.5ml 分取し、循環恒温槽中で生体内と同じ 37°C とした後、DPH ( $[DPH]=1.0 \times 10^{-4} M$ , 溶媒: テトラヒドロフラン) を 2.5  $\mu l$  添加 (最終濃度:  $1 \times 10^{-7} M$ ) し、37°C で 15 分間放置後、励起波長 357nm にて 432nm の蛍光偏光強度成分を測定し、 $P=(I_{vv}-C_f I_{vh})/(I_{vv}+C_f I_{vh})$  より蛍光偏光度(P)を算出した。ここで、 $I_{vv}$  および  $I_{vh}$  は、それぞれ垂直直線偏光励起光の振動方向と垂直に振動する偏光強度成分及び平行に振動する偏光強度成分である。 $C_f$  は  $C_f=I_{hv}/I_{hh}$  より求められる補正係数であり、 $I_{hh}$  および  $I_{hv}$  は、それぞれ水平直線偏光励起光の振動方向と平行に振動する偏光強度成分及び垂直に振動する偏光強度成分である。



1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)

## 2-3 結果と考察

### 2-3-1 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの安定性

新規がん治療薬の開発を目的とし、リン脂質に DMPC、PEG 系界面活性剤に日本薬局方に定められている  $C_{12}(EO)_{21}$ 、カチオン性脂質には  $2C_{14}ECI$  を用いて調製したハイブリッドリポソーム ( $95\text{mol}\%DMPC/5\text{mol}\%C_{12}(EO)_{21}$  : HL21,  $87\text{mol}\%DMPC/5\text{mol}\%C_{12}(EO)_{21}/8\text{mol}\%2C_{14}ECI$  : HL/ $2C_{14}ECI$ ) および DMPC 単一リポソームの  $37^\circ\text{C}$  保存における膜物性について検討した。また、臨床応用を視野に入れ、調製溶媒に 5%ブドウ糖溶液を用いた。

$37^\circ\text{C}$  保存・測定における膜直径の測定結果を Fig. 2-3 に示す。DMPC 単一リポソームは、調製後から 28 日目まで直径  $200\sim 300\text{nm}$  を形成し、35 日目には沈殿した。HL は、調製後 7 日目まで直径  $100\sim 130\text{nm}$  であったが、7 日目以降徐々に膜直径が増大した。HL/ $2C_{14}ECI$  は、調製から 3 日目まで直径約  $90\sim 130\text{nm}$  と不安定だったが、7 日目以降直径約  $100\text{nm}$  で長期間安定な膜を形成した。

以上の事から、 $37^\circ\text{C}$  保存において、DMPC 単一リポソームおよび HL/ $2C_{14}ECI$  は長期間安定するが、HL21 は膜が不安定であることが明らかとなった。HL/ $2C_{14}ECI$  は膜直径約  $100\text{nm}$  以下であり、電子顕微鏡写真からも均一な膜を形成している<sup>36,37)</sup>ことから細網内皮系(Reticular Endothelial System: RES)を回避できる可能性があり、目的とする臓器・組織への送達が可能である薬剤として期待できる。

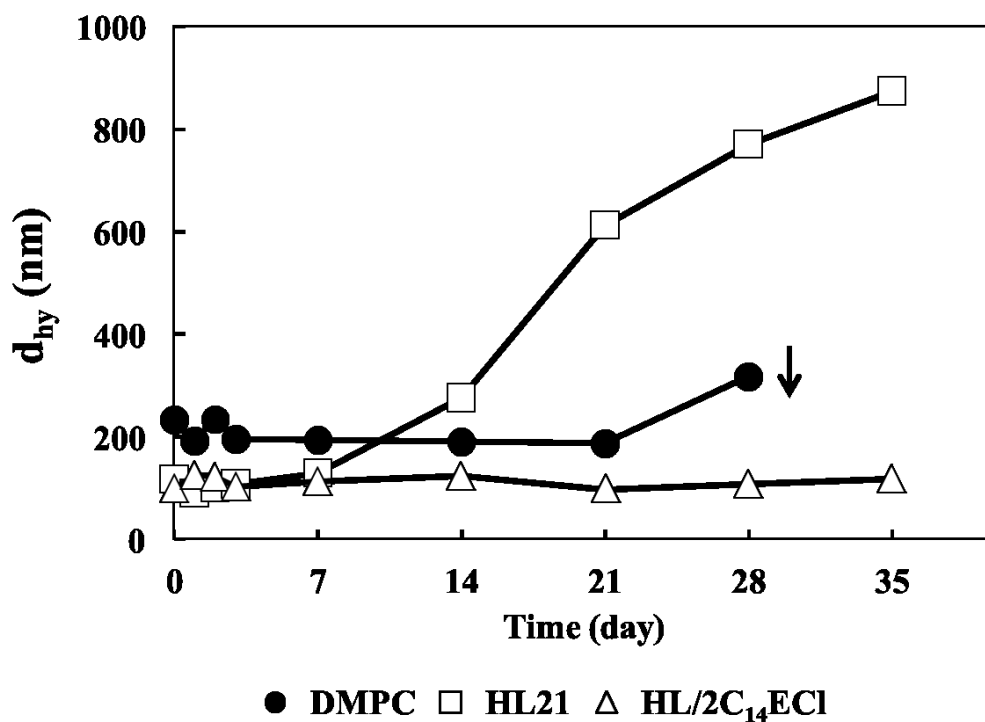


Fig. 2-3 Time courses of  $d_{hy}$  change for hybrid liposomes of DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  (HL21) and DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  (HL/2 $C_{14}ECI$ ) in 5%glucose solution, stored at 37°C.

DMPC : [DMPC]= $1.0 \times 10^{-2}$ M,

HL21 : [DMPC]= $1.0 \times 10^{-2}$ M, [ $C_{12}(EO)_{21}$ ]= $5.3 \times 10^{-4}$ M,

HL/2 $C_{14}ECI$  : [DMPC]= $1.0 \times 10^{-2}$ M, [ $C_{12}(EO)_{21}$ ]= $5.7 \times 10^{-4}$ M,  
[2 $C_{14}ECI$ ]= $9.2 \times 10^{-4}$ M,

Arrow : precipitation.

### 2-3-2 培地中での膜安定性

前節では、HL/2C<sub>14</sub>ECI の 5%ブドウ糖溶液中での安定性が明らかとなった。そこで、本節では HL/2C<sub>14</sub>ECI のがん細胞抑制効果を検討する際に用いる培地中での安定性について検討した。結果を Fig. 2-4 に示す。

図から明らかなように、HL21 は直径約 150nm、HL/2C<sub>14</sub>ECI は直径約 100nm で 3 時間安定であったが、DMPC 単一リポソームでは添加後 30 分で沈殿した。

以上の事から、生体内と同じ 37℃および血清存在の条件下で安定であることが明らかとなった。HL21 および HL/2C<sub>14</sub>ECI は、血清存在下の培地中での試験に用いることが可能である。

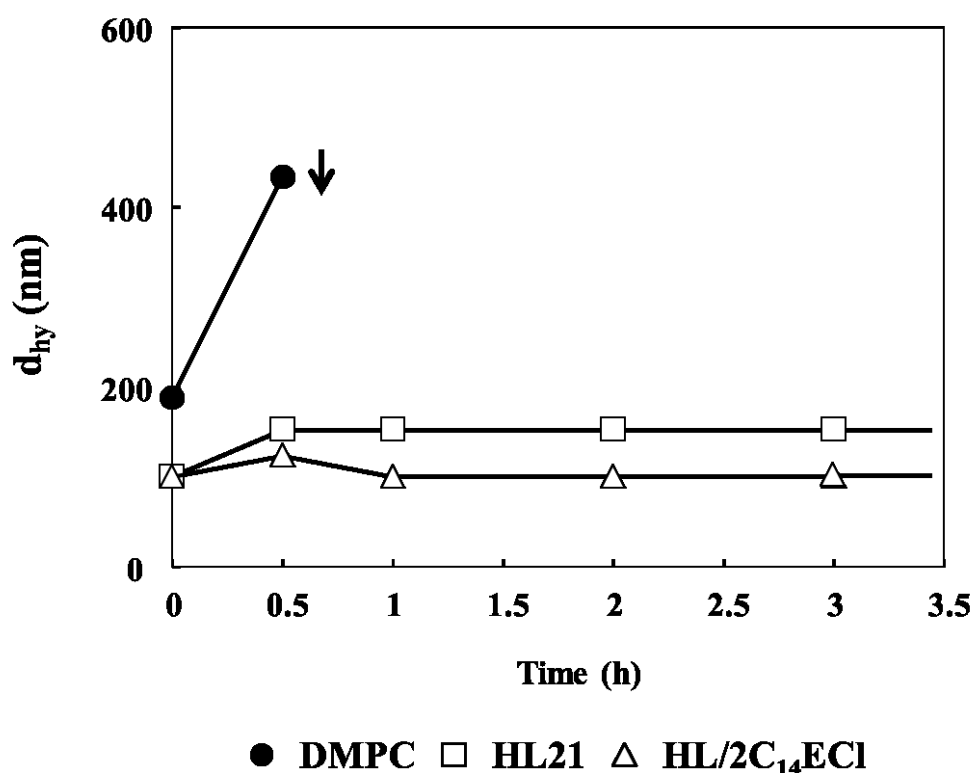


Fig. 2-4 Time courses of  $d_{hy}$  change for hybrid liposomes of HL and HL/2C<sub>14</sub>ECI in RPMI1640+20%FBS, stored at 37°C.  
Arrow : precipitation.

### 2-3-3 カチオン脂質含有ハイブリッドリポソームの膜流動性

カチオン脂質含有ハイブリッドリポソーム(HL/2C<sub>14</sub>ECl)の膜の揺らぎを検討するために、分光蛍光光度計により膜流動性の測定を行った。結果を Fig. 2-5 に示す。

DMPC 単一リポソームは P 値 0.135、HL21 は P 値 0.122、HL/2C<sub>14</sub>ECl は P 値 0.153 であり、HL21 の膜流動性が高く HL/2C<sub>14</sub>ECl の膜流動性は低いことが明らかとなった。

以上の事から、膜流動性の大きさは HL/2C<sub>14</sub>ECl < DMPC 単一リポソーム < HL21 であり、HL/2C<sub>14</sub>ECl は今回使用した試料の中では最も膜流動性が低いことが明らかとなった。

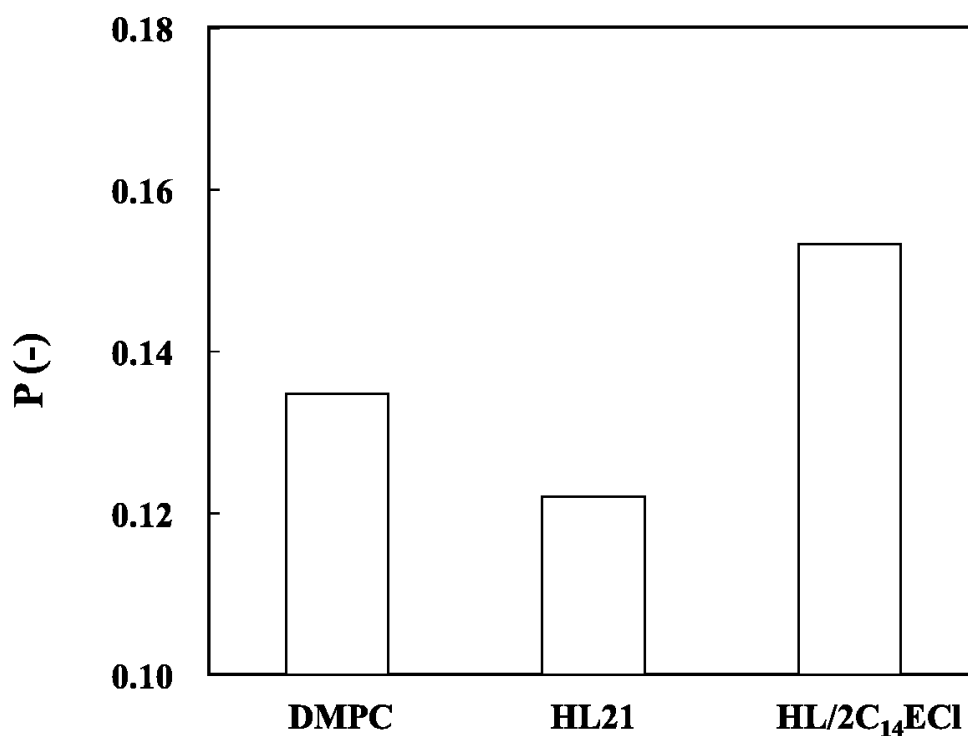


Fig.2-5 Fluorescence polarization (P values) change of DPH-labeled DMPC, HL21 and HL/2C<sub>14</sub>ECl.

## 2-4 総括

本章では、新規がん治療薬の創製を目的とし、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_2$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソーム(HL/ $2C_{14}ECI$ )の膜物性について検討し、以下のように興味深い知見が得られた。

1. 37°C保存において、HL21 は経時的に膜直径の増大が見られた。DMPC 単一リポソームは、調製後 28 日目までは 200~300nm の膜を形成し 35 日目には沈殿した。HL/ $2C_{14}ECI$  は約 100nm で長期間安定であることを明らかにした。
2. 血清を含む培地中での安定性を検討したところ、HL21 および HL/ $2C_{14}ECI$  は安定であり、がん細胞抑制試験に用いることが可能である。
3. 今回使用した試料の中では、HL21 が最も膜流動性が高く、HL/ $2C_{14}ECI$  が最も低いことが明らかになった。

以上の結果から、HL/ $2C_{14}ECI$  は、37°C保存および培地中において長期的安定な膜を形成することが明らかとなった。HL/ $2C_{14}ECI$  は、RES 回避可能なサイズであることから、目的の臓器まで到達可能で臨床応用において期待できる素材であることが示唆された。



### 第3章 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞に対する抗腫瘍効果

#### 3-1 序

大腸の長さは成人で約 1.5m であり、盲腸・結腸・直腸の 3 つに分けられる。人間の盲腸に特に役割はない。結腸は、上行結腸、横行結腸、下行結腸、S 状結腸の 4 つの部分に分けられる。直腸は S 状結腸から肛門までの約 20cm の部分を指す。大腸の壁は便が通る内側から粘膜、粘膜下層、筋層、漿膜からなり、主に液状の内容物から水分を吸収し、固形にして 1 日あたり約 100~250 g だけが糞便として排出される<sup>51)</sup>。

大腸がんは、結腸がんと直腸がんの総称で、世界的に死亡率・罹患率の高いがんである<sup>52)</sup>。大腸がんは粘膜から発生する悪性の腫瘍で、隆起型と陥没型の 2 種類に分けられる。前者はゆっくりと進行するが、後者は腸壁内層に食い込んでいくタイプで進行が極めて早い。男女ともに日本人に増えているがんのひとつで、その主な原因は、喫煙、運動不足、過度のアルコール摂取<sup>53, 54)</sup>、であり、発生率は年齢とともに増加している<sup>55)</sup>。大腸がんは、肝臓や肺、腹膜、リンパ節に転移しやすく、なかでも肝臓への転移は約 60% と高く、生存率はおおよそ 6~12 ヶ月である<sup>56)</sup>。大腸がんの症状は、がんが大腸のどの一片に出現したか、またがんの進行具合によって変貌する。代表的な大腸がんの症候には「血便、便通異常、胃痛」があるが、初期の大腸がんでは、はっきりとした自覚症状のようなものではなく、一般的な症候とされている血便などが生じた場合には、ある程度進行しているため、早期発見が困難であると考えられている。

大腸がんの治療には、化学療法 (分子標的薬)、放射線療法、免疫療法などがあるが、主に外科療法 (内視鏡手術、腹腔鏡手術、開腹手術) により行われる。外科療法には、薬から離脱できる・食事制限がなくなるなどのメリットがあるが、1 日の便の回数が永久的に増える・便が漏れることがある・上手く排便できないことがあるなどのデメリットもある。また、術後にはイレウス (腸閉塞)、縫合不全、創感染などの術後合併症が生じる<sup>57)</sup>。

化学療法は、術前補助化学療法と、術後補助化学療法の大きく 2 つの目的で行われる。これまで、日本では経口抗がん剤のユーエフティーの内服治療、または 5-FU とロイコボリン (アイソボリン) の併用療法が行われていたが、現在はオキサリプラチン (エルプラット) と 5-FU、ロイコボリンの併用療法である FOLFOX 療法が行われている<sup>58)</sup>。しかし、骨髄毒性 (白血球減少、赤血球減少、血小板減少) や、末梢神経障害<sup>58)</sup>などの問題がある。放射線療法も、化学療法と同様に大きく術前・術後に行われる。しかし、治療期間中に、食欲低下・吐き気・皮膚炎・排尿時の痛み・白血球の減少などの副作用がある。また、治療

が終わっても数カ月～数年後に腸管や膀胱などの炎症や出血などの副作用の問題がある。

多細胞生物の生命は、個体を形成する種々の細胞群の増殖と分化のみだけでなく、積極的な細胞死によって巧妙に制御されている。このような生理的な細胞死の様式は、1972年にアポトーシスという概念として提唱された<sup>59)</sup>。アポトーシスは、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、「管理・調整された細胞の自殺、すなわちプログラムされた細胞死」のことである。これに対し、血行不良や外傷などによる細胞内外の環境悪化によって引き起こされる細胞死は、ネクローシスと呼ばれ、これと区別されている。アポトーシスの特徴は、細胞が縮小し、核の断片化でアポトーシス小体が形成され、これをマクロファージが貪食・消化するため炎症反応を伴わない点である<sup>60)</sup>。一方、ネクローシスでは、細胞破壊により内容物が流出するため炎症反応を引き起こす<sup>60)</sup>。このことから、アポトーシスを誘導する副作用のない新しい治療法の開発が求められている。

本章では、カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの大腸がん治療への応用を目的とし、リン脂質(DMPC)、PEG系界面活性剤( $C_{12}(EO)_{21}$ )およびカチオン性脂質( $2C_{14}ECl$ )からなる87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECl$ ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する増殖抑制効果および制がんメカニズムについて検討した。

## 3-2 実験

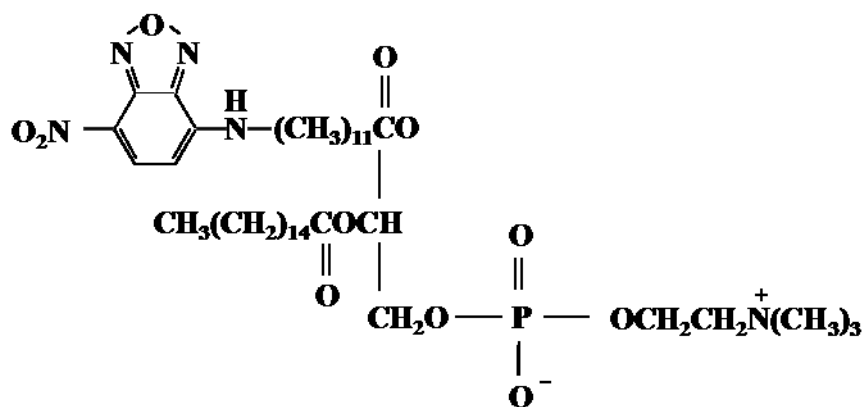
### 3-2-1 試料

リン脂質(DMPC)、界面活性剤( $C_{12}(EO)_{21}$ )、カチオン性脂質( $2C_{14}ECl$ )は、2-2-1と同様のものを使用した。

#### <蛍光標識脂質>

1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-*sn*-glycerol-3-phosphocholine (NBDPC)は、市販品( $M_w=856.05$ 、Avanti Polar Lipids)をそのまま使用した。

以下に構造式を示す。



NBDPC

### 3-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

ハイブリッドリポソームの調製は、2-2-2 と同様の方法で行った。

### 3-2-3 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの調製

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの調製は、2-2-3 と同様の方法で行った。

### 3-2-4 蛍光標識脂質含有ハイブリッドリポソームの調製

蛍光標識脂質を含有させたカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームは、リン脂質(DMPC)、界面活性剤( $C_{12}(EO)_{21}$ )、カチオン性脂質( $2C_{14}ECl$ )及び蛍光標識脂質(NBDPC)を精秤し、それぞれ 5%ブドウ糖液(大塚製薬)中でバス型超音波照射器(VS-N300, VELVO-CLEAR : 300W, 45°C)により窒素雰囲気下で超音波照射処理を行い(1ml/min)、均一な溶液が得られたことを確認した後、滅菌済みメンブレンフィルター(孔径 0.20 $\mu$ m, セルロースアセテート材質 ; 13CP020AS, ADVANTEC)で濾過滅菌して試料溶液とした。

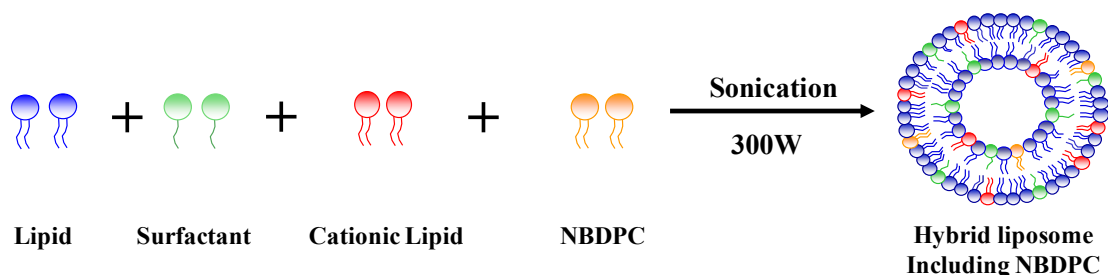


Fig. 3-1 Schematic representation of hybrid liposome including NBDPC.

### 3-2-5 動的光散乱法による膜直径の測定

動的光散乱法による膜直径の測定は、2-2-4 と同様の方法で行った。

### 3-2-6 使用細胞

ヒト大腸がん(HCT116 : CCL-247)細胞は、住商ファーマインターナショナル株式会社(ATCC)より購入したものを使用した。RPMI1640 (Gibco BRL)+10% Fetal Bovine Serum (FBS ; HyClone Laboratories Inc.)を培養培地として用い、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%の条件で培養を行った。

正常ヒト大腸由来線維芽(CCD-33Co : CRL-1539™)細胞は、住商ファーマインターナショナル株式会社(ATCC)より購入したものを使用した。Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM : ATCC)+10% Fetal Bovine Serum (FBS : ATCC)を培養培地として用い、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%の条件で培養を行った。

Cell name : 正常ヒト大腸由来線維芽細胞

Cell No : CRL-1539™

Lot.No : 5006425

Age : 7 (male)

### 3-2-7 酵素活性測定法による 50%増殖抑制濃度の測定

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する抗腫瘍効果は、酵素活性測定法である WST-1 assay<sup>61)</sup>により評価を行った。

脱水素反応において、細胞内のミトコンドリアの脱水素酵素が基質から 2 つの水素原子を引き抜き、1 つは水素イオンとして遊離し、1 つは酸化型である  $\text{NAD}^+$  の 4 位のピリジン環に移され、還元体の NADH となる。この NADH は、人工的電子キャリアーである 1-Methoxy PMS (1-Methoxy-5-methyl phenazinium methylsulfate) によって酸化型の  $\text{NAD}^+$  に戻され、代わりに 1-Methoxy PMS が還元体として生成される。還元体の 1-Methoxy PMS は WST-1 を還元することにより黄色の WST-1 formazan を生成する。この formazan は、水に溶解し呈色するので、その比色値を測定し比較することにより細胞増殖の指標とすることができる。また、従来の MTT assay では、生成する formazan が水に難溶な結晶として細胞表面に析出するために、吸光度測定の前に有機溶媒による formazan の溶解操作が必要である(Fig. 3-2)。そのため、formazan の不均一な溶解による測定誤差や溶解剤の種類による測定波長および感度の変動の問題も生じている。しかしながら、WST-1 assay において WST-1 formazan は、水溶性であり溶解操作が必要ないため簡便で測定誤差が少ない等の特徴を持っている。

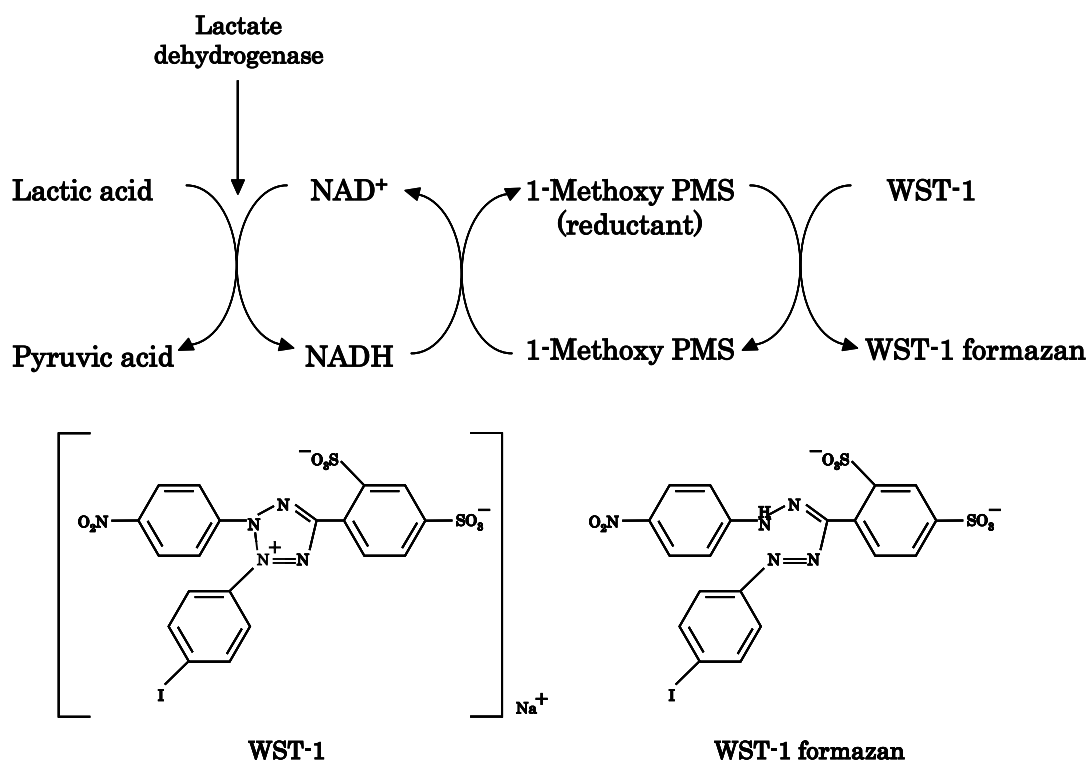


Fig. 3-2 Reaction scheme of WST-1 with NADH in the presence of 1-methoxy PMS.

96well マルチプレートに細胞懸濁液( $5.0 \times 10^4$  cells/ml)を 100 $\mu$ l( $5.0 \times 10^3$  cells)播種し、24 時間培養を行った後、試料溶液を 10 $\mu$ l/well 添加し 48 時間培養を行った。さらに、Cell Counting Kit 溶液(WST-1, 1-Methoxy PMS 混合液, 同仁化学研究所)を 10 $\mu$ l 添加し、3 時間培養を行った後、分光光度計(Emax, Molecular Devices Co.)を用いて波長 450nm の吸光度測定を行った。

試料添加したものを陽性対照検体とし、5%ブドウ糖液を添加したものを陰性対照検体、細胞懸濁液のみをブランクとして使用した。陽性対照検体の吸光度からブランクを引いたものを( $A_{\text{Mean}}$ )、陰性対照検体の吸光度からブランクを引いたものを( $A_{\text{Control}}$ )とし、細胞増殖抑制率はその比である( $A_{\text{Mean}} / A_{\text{Control}}$ ) $\times 100$  により算出した。50%増殖抑制濃度( $IC_{50}$ ; 50% inhibitory concentration)は、得られた増殖抑制率を縦軸に、サンプルの濃度を横軸にプロットし、シグモイド曲線により算出した(Fig. 3-3)。

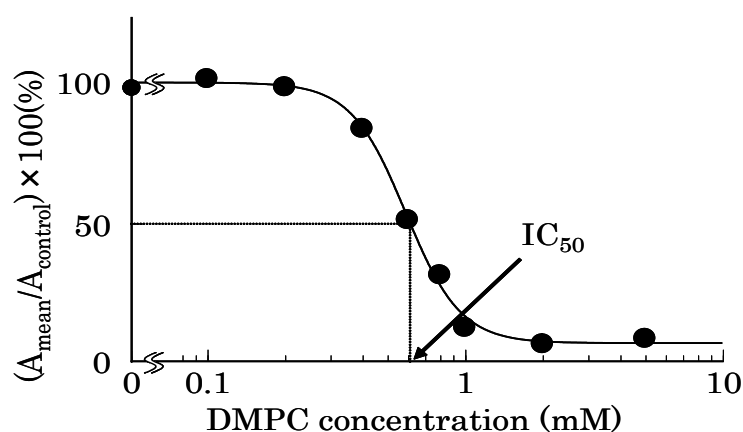


Fig. 3-3 Dose-response curve.

### 3-2-8 共焦点レーザー顕微鏡による細胞への融合・蓄積の観察

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの細胞への融合・蓄積を検討するため、蛍光標識脂質(NBDPC)を含有したカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームを調製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

35mm Glass bottom dish に、細胞懸濁液( $5.0 \times 10^4$  cells/ml)を 2ml( $1.0 \times 10^5$  cells)播種し、24 時間培養した。共焦点レーザー顕微鏡(TCS-SP, Leica Microsystem)に、培養条件制御装置(Stage Incubation System : Tempcontrol 37-2, CTI-Controller 3700, Leica)をセッティングし、暗所で 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 条件下でインキュベートした。上記のカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームを 0.2ml 添加し、4 時間のタイムラプス蛍光観察を行った(30 分毎に 1 回の撮影)。光源には Ar レーザー(488nm)を用い、波長域 505~555nm で蛍光を検出した。

### 3-2-9 全反射顕微鏡による細胞への融合・蓄積の観察

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの細胞への融合・蓄積は、蛍光標識脂質(NBDPC)を含有したカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームを用い、全反射蛍光顕微鏡で蛍光動態の観察より行った。

現在の細胞生物学では、より高い時間・空間分解能で細胞を観察して、一つの細胞レベルで、いつ・どこで・どのような変化が起こるかを解析することが非常に重要になってきている。従来の蛍光観察として落射蛍光観察法があったが、さらなる観察法として「全反射照明蛍光観察法」が注目されている。落射蛍光観察では光軸方向全体に励起光を照射し、その中で発する蛍光を観察するのに対して、全反射照明蛍光観察法ではその励起光を光軸方向全体ではなくカバーガラス近傍のごく限定された領域にのみ発生させ、その限定された領域における励起により生じる蛍光現象を観察できる。

全反射蛍光顕微鏡(エバネッセント場蛍光顕微鏡 : TIRF)は、カバーガラスに入射する励起光の入射角を大きくし、全反射を起こさせると、全反射面の裏側にはエバネッセント光(近接場光)が約数百 nm 染み出す。このエバネッセント場に試料を置くことで、顕微鏡観察における背景光を劇的に減らす。この方法で蛍光分子の動きを観察することができる。

全反射蛍光顕微鏡の原理は、屈折率が違う媒質の間を光が透過する場合の入射角  $\theta_1$  と出射角  $\theta_2$  の間には (1) の屈折の法則が成り立つ (Fig. 3-3)。

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (1)$$

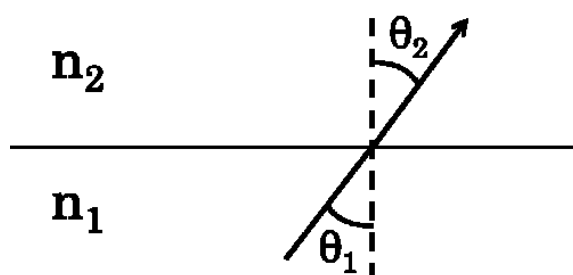


Fig. 3-3 Refraction of light.

従って、 $n_1 \geq n_2$  の場合は  $\sin\theta_1 \leq \sin\theta_2$  となる。ここで  $\theta_2=90^\circ$ 、つまり  $\sin\theta_2=1$  となる時の  $\theta_1$  を、臨界角  $\theta_c$  といい、(1)式から(2)の式が成り立つ。  
入射角  $\theta_1$  が臨界角  $\theta_c$  よりも大きくなると、光は媒質の境界面で全反射する(Fig. 3-4)。

$$\sin\theta_c = n_2 / n_1 \quad (2)$$

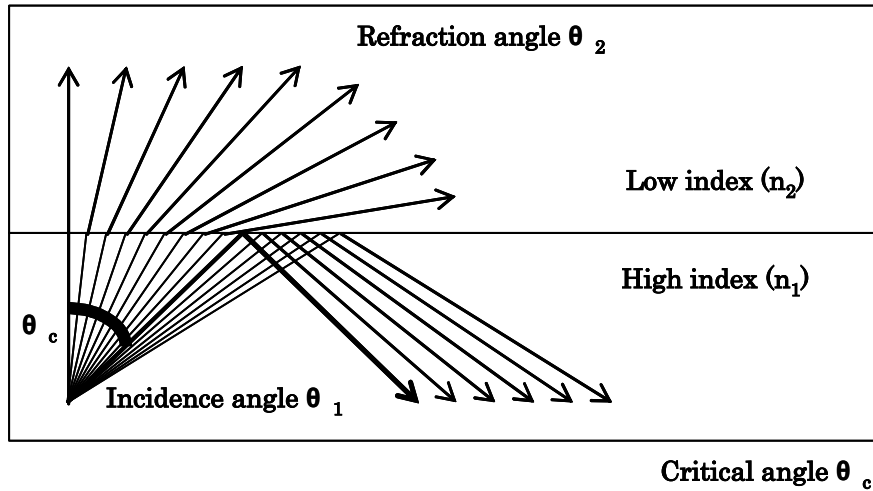


Fig. 3-4 Total internal reflection and critical angle.

この時、境界面の反対側に、わずかにしみ出す光のことをエバネッセント光という。全反射蛍光顕微鏡システム(TIRFM)はこのエバネッセント光を励起光として蛍光観察を行う顕微鏡であり、カバーガラス表面から 100nm 程度の範囲だけを励起することができるので、バックグラウンドが極めて低い蛍光観察を行うことができる(Fig. 3-5)。

また、全反射面からしみだす場の領域(深さ)は、強度を  $I$ 、深さを  $z$  とすると理論的に(3), (4)式となる。ここで、 $\lambda$  は真空中の波長、 $n_1$  は溶液の屈折率、 $n_2$  はガラスの屈折率、 $\theta$  は入射角である。なお、媒質の屈折率は、水  $n_2 \div 1.33$  および細胞  $n_2 \div 1.38$  である。

$$I(z) = I(0)e^{-z/d} \quad (3)$$

$$d = \lambda / 4\pi[(n_1^2 \cdot \sin^2\theta) - n_2^2]^{-1/2} \quad (4)$$



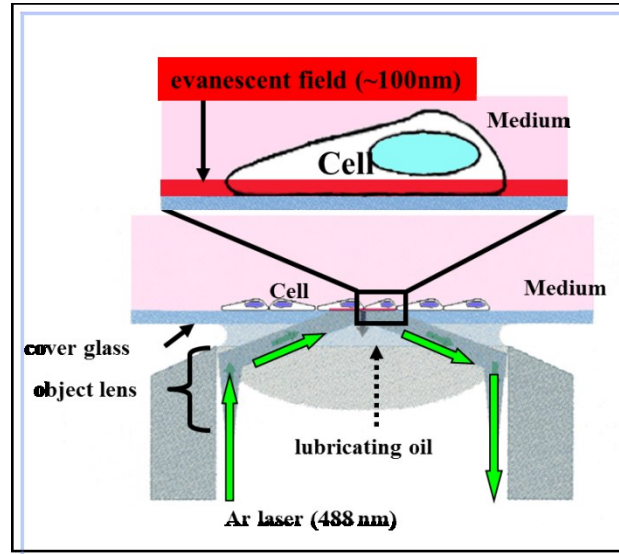


Fig. 3-5 Total Internal Reflection Fluorescence

35mm Glass bottom dish に細胞懸濁液( $5.0 \times 10^4$  cells/ml)を 2ml( $1.0 \times 10^5$  cells)播種し、24 時間培養を行った。全反射顕微鏡に、培養条件制御装置(Stage Incubation System : Tempcontrol 37-2, CTI-Controller 3700, Leica)をセッティングし、暗所で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下でインキュベートした。カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームを 0.2ml (最終濃度 : 0.18mM)添加し、30 分間インキュベートを行った。その後、Ar レーザーを照射しレーザーの照射角度をマイクロメーターで調整しエバネッセント光に合わせた後、10 分間のタイムラプス蛍光観察を行った(10 秒毎に 1 回の撮影)。光源には Ar レーザー(488nm)を用い、波長域 510~550nm で蛍光を検出した

### 3-2-10 Annexin-V binding assay による初期アポトーシスの検出方法

ヒト大腸がん(HCT116)細胞に対するカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの初期アポトーシス細胞の検出は、Annexin-V binding assay を用い、共焦点レーザー顕微鏡観察より行った。

初期アポトーシス細胞では、細胞膜内側にあるリン脂質のフォスファチジルセリン(PS : Phosphatidyl Serine)が外側に表出し、細胞外の環境にさらされる<sup>62, 63)</sup>。この PS に高い親和性を持つ Annexin-V は、Ca<sup>2+</sup>依存性のリン脂質結合タンパク質である。それゆえ、このタンパク質は、アポトーシス細胞の検出に最適な細胞外膜に曝露された PS の高感度なプローブとして使用できる。また、ネクロシス細胞では、膜構造が完全に崩壊するため、PI (Propidium Iodide)により DNA が染色され、細胞膜と核の両方で蛍光が観察される (Fig. 3-6)。

35mm Glass bottom dish (non coat dish)に細胞懸濁液( $5.0 \times 10^4$  cells/ml)を2ml( $1.0 \times 10^5$  cells)播種し、24 時間培養を行った後、試料溶液を 0.2ml 添加し所定時間培養を行った。上澄みを除去後、Incubation buffer (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche Diagnostics Inc.) で希釈した Annexin-V および PI (Incubation buffer : Annexin-V : PI = 50 : 1 : 1)を 100 $\mu$ l 添加し、暗所・氷冷にて 10~15 分染色を行った。上澄みを除去後、500 $\mu$ l の Incubation buffer を加え、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP, Leica Microsystem)を用いて観察した。Ar レーザー (488nm)を光源とし、Annexin-V-Fluorescein (500-562nm)および PI (638-693nm)の波長域で蛍光を検出した。

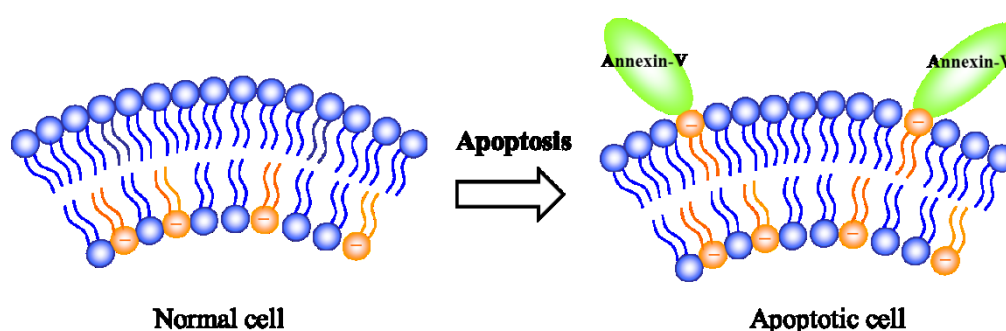


Fig. 3-6 Schematic representation of Annexin-V binding assay.

### 3-2-11 TUNEL 法による蛍光顕微鏡観察

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん (HCT116) 細胞に対する細胞死について、TUNEL 法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling) <sup>64)</sup>により評価を行った。

電子顕微鏡レベルで様々な細胞死を観察している過程で一定の形態学的特徴(核・細胞質の濃縮 <sup>65)</sup>・断片化、周辺細胞による迅速な取り込み、散発的・孤立的な発生)を示す細胞死 <sup>66-69)</sup>が見出されている。アポトーシスでは特に核の形態変化が顕著に観察される。アポトーシス後期には、活性化したエンドヌクレアーゼによる DNA フラグメンテーション(DNA の断片化)が起こり、その検出には外因性 TdT を触媒にした反応(TUNEL 法)が一般的に用いられている(**Fig. 3-7**)。

35mm Glass bottom dish(coat dish)に細胞懸濁液( $5.0 \times 10^4$  cells/ml)を2ml( $1.0 \times 10^5$  cells)播種し、24 時間培養後、試料溶液を 0.2ml 添加した。培養後、培地を回収してディッシュ上の細胞に 10%中性緩衝ホルムアルデヒド液 (4%ホルマリン含有) を 1ml 加え、室温で 30 分間静置して細胞固定を行った。細胞固定後、ホルマリンを除去し、2ml の PBS(-)で 1 回洗浄を行い、浸透化溶液(0.1%

クエン酸三ナトリウム二水和物、0.1% Triton X-100)を 1ml 添加し、暗下で 2 分間静置(4℃)した後に再び PBS(-)2ml で洗浄した。TdT(酵素溶液)50μl と fluorescein-dUTP (標識液) 450μl を混合した TUNEL 反応混合液(In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics Inc.)を 50μl 加えて、暗下で 60 分間反応(37℃)させ、1 回洗浄(PBS(-)2ml)後、TO-PRO-3 (10μl/ml, Molecular probes)を 100μl 加え、暗下で 20 分間反応(室温)させ、再び 1 回洗浄(PBS(-)2ml)後、共焦点レーザー顕微鏡(TCS-SP, Leica Microsystem)で観察した。TUNEL の光源には Ar レーザー (488nm) を用い、波長域 515～565nm で蛍光を検出した。TO-PRO-3 の光源には He-Ne レーザー(633nm)を用い、波長域 640～700nm で蛍光を検出した。ここで、すべての細胞は TO-PRO-3 により核が赤に、アポトーシス誘導された細胞は TUNEL 反応混合液により DNA の 3'-OH 末端が緑色に染色される。

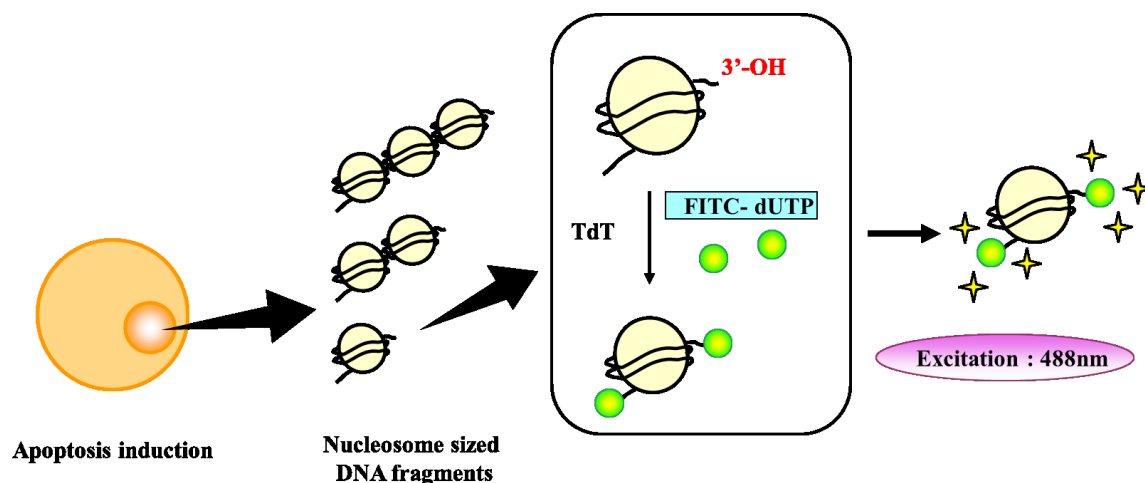


Fig. 3-7 Schematic representation of TUNEL method.

### 3-2-12 フローサイトメーターによる DNA 含量測定

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する断片化 DNA の検出をフローサイトメトリーを用いて行った。

フローサイトメトリー(flow cytometry : FCM)は、浮遊状態の細胞を単一のレベルでかつ短時間に数万から数十万個の単位で解析できる利点を持ち、細胞の大きさ(FSC : Forward Scattered Light)や細胞内構造の複雑さ(SSC : Side Scattered Light)を調べることができる<sup>70)</sup>。蛍光色素である PI (Propidium Iodide)は、細胞中の DNA の 2 重鎖に架橋的に結合し蛍光を発する。この蛍光量は DNA 含量を示

しており、個々の細胞の DNA 含量を調べることでアポトーシス細胞(Sub-G1 期)の割合を解析できる(Fig. 3-8)。

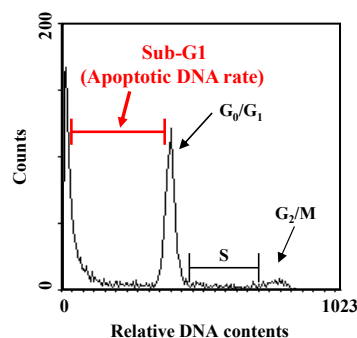


Fig. 3-8 Cell cycle analysis using flow cytometry.

培養フラスコ(培養面積 75cm<sup>2</sup>)に細胞懸濁液(5.0×10<sup>4</sup>cells/ml)を15ml(7.5×10<sup>5</sup>cells)播種し、24 時間培養(培養後の細胞数 1.5×10<sup>6</sup>cells)を行った後、試料溶液を 4.5ml 添加して所定時間培養を行った。培養後、細胞を Accutase(Innovative Cell Technologies Inc.)で処理して培養フラスコから剥離採取し、遠心分離(3000rpm, 5min)を行い、上澄み除去後、洗浄(2ml の PBS(-)で懸濁)し、氷冷 70%エタノールを加え、-20℃で一晩静置して細胞固定を行った。細胞固定後、遠心分離(3000rpm, 5min)を行い、上澄み除去後、洗浄(2ml の PBS(-)で懸濁)し再び遠心分離(3000rpm, 5min)後、上澄み除去を行った。次に、400knitz RNase (Ribonuclease A, Sigma)を 450μl、PBS(-)を 450μl 加え、37℃で 30 分間インキュベートし、RNA を分解した。この懸濁液に 0.50mg/ml PI 溶液を 100μl 加え、水中・暗所において 30 分静置し、DNA の染色を行った。その後、遠心分離(3000rpm, 5min)を行い、上澄み除去後、洗浄(2ml の PBS(-)で懸濁)を行い、再び遠心分離(3000rpm, 5min)し、上澄み除去後 500μl の PBS(-)で懸濁し測定サンプルとした。測定サンプルをフローサイトメーター(Epics XL system II, Beckman Coulter Inc.)を用いて DNA 含量測定を行った。光源には 488nm の Ar レーザーを出力 15mW で使用し、PI の蛍光波長は 580～750nm のため、FL3(605-635nm)センサーを用いて蛍光検出を行った。

### 3-2-13 カスパー活性測定

アポトーシスの過程で起こる多くの事象は、カスパーと呼ばれるシステインプロテアーゼファミリーによって仲介される<sup>71)</sup>。カスパーは、膜貫通型レセプターにおける外部因子への応答から細胞内成分のプロテアーゼによる分解まで、アポトーシスの過程のいくつかの信号伝達の段階で機能する。現在 14 種類の存在が確認されており、そのうちカスパー-2、3、6、7、8、9、12 がアポ

トーシスに大きく関与している<sup>72)</sup>。カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん(HCT116)細胞に対するアポトーシス経路におけるカスペースの関与について、Caspase fluorometric protease assay(Medical & Biological Laboratories)を用いて検討した<sup>73,74)</sup>。

アポトーシス誘導シグナルにより活性化したカスペースは、蛍光修飾基質(カスペース-3:DEVD-AFCを認識し、4個のアミノ酸配列と7-amino-4-trifluoromethyl coumarin(AFC)の間を切断することにより AFC が遊離し緑黄色の蛍光( $\lambda_{\text{max}} = 505\text{nm}$ )を発する。この遊離した AFC の蛍光強度とカスペース活性は比例関係にあり、AFC の蛍光強度を測定することにより、カスペース活性を測定することができる。

培養フラスコ(培養面積  $75\text{cm}^2$ )に細胞懸濁液( $1.0 \times 10^5$  cells/ml)を15ml( $1.5 \times 10^6$  cells)播種し、24時間培養(培養後の細胞数  $3.0 \times 10^6$  cells)を行った後、試料溶液を4.5ml添加し所定時間培養した。培養後、細胞をセルスクレーパー(NALGEN NUNC)を用いて培養フラスコから剥離し、遠心分離(3000rpm, 5min)を行い、上澄み除去後 $-80^\circ\text{C}$ で一晩保存した。その後、冷却した Cell Lysis Buffer を50 $\mu\text{l}$ 加え懸濁し、 $4^\circ\text{C}$ で20分間静置し細胞を溶解した。この細胞溶解液を、冷却した96well マルチプレートに50 $\mu\text{l}$ 播種し、Reaction Buffer(100mM HEPES pH 7.2, 0.2M NaCl, 2mM EDTA, 20% Sucrose)及び、10mM DTT の混合溶液を50 $\mu\text{l}$ 添加した。さらに、蛍光修飾基質を5 $\mu\text{l}$ 添加し、 $37^\circ\text{C}$ で2時間反応させ、分光蛍光光度計(Fluoroskan Ascent CF Fluorometer, Thermo Labsystems; 励起波長 390nm、蛍光波長 500nm)を用いて蛍光強度測定を行った。カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームによるカスペース活性の評価は、試験試料を添加した場合の蛍光強度( $\text{FI}_{\text{Treatment}}$ )から5%ブドウ糖液を添加(Control)した場合の蛍光強度( $\text{FI}_{\text{Control}}$ )を引いた  $\text{FI}_{\text{Treatment}} - \text{FI}_{\text{Control}}$  で評価した。

### 3-2-14 ミトコンドリア膜電位測定

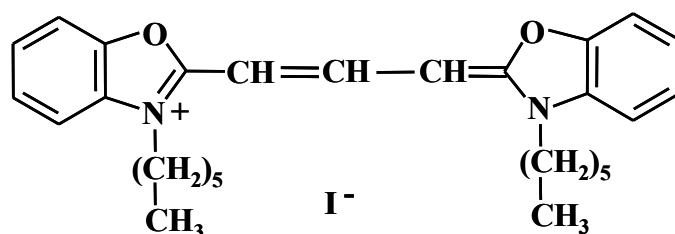
カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん (HCT116) 細胞に対するアポトーシス経路におけるミトコンドリアの関与について検討を行った。

アポトーシスには二つの経路が存在し、一つ目はミトコンドリアを中心とした内因性経路、二つ目は細胞膜上のデスレセプターを中心とした外因性経路である。内因性経路ではミトコンドリアが重要な役割を果たしており、DNA 損傷に誘発されて内膜と外膜の膜間に存在するシトクロム  $c^{75)}$ や Smac / DIABLO<sup>76)</sup>などのアポトーシス促進タンパク質が細胞質に放出される。

ミトコンドリアは、通常内外の膜電位差を利用してエネルギー産生を行い細胞「生存」に寄与するが、一旦ミトコンドリア機能傷害が起きて膜電位が低下する

と、逆にカススペースを活性化させアポトーシスを誘導することが明らかになってきた<sup>77)</sup>。また、ミトコンドリアは電子伝達系システムを持つため、様々な酸化還元色素で染色することができる。ミトコンドリア染色色素は一般的には正電荷を帯びた低分子の有機色素である。これらの色素は迅速に細胞膜を通過し、ミトコンドリア膜を染色することができる。

3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide(DiOC<sub>6</sub>(3))<sup>78)</sup>は陽電荷を有するシアニン色素で、ミトコンドリア膜電位に依存してミトコンドリア内に集積する特徴を持っている。レーザー光により励起すると、ミトコンドリア膜電位差に比例して緑色蛍光を発する蛍光色素である。DiOC<sub>6</sub>(3)は、市販品(Molecular Probes)をDMSOに溶解(1mM DiOC<sub>6</sub>(3))し、それをさらにPBS(-)溶液に溶解(400nM DiOC<sub>6</sub>(3))したものを使用した。



**3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3))**

25mm<sup>2</sup>フラスコに細胞懸濁液(5.0×10<sup>4</sup>cells/ml)を5ml(25×10<sup>4</sup>cells)播種し、24時間培養を行った後、試料溶液を0.6ml添加し所定時間培養を行った。測定30分前に400nM DiOC<sub>6</sub>(3)を5μl添加(培地濃度：40nM DiOC<sub>6</sub>(3))し、37℃、30分暗下でインキュベートした。インキュベート後、細胞をセルスクレーパー(NALGEN NUNC)で剥離し、遠心分離(3000rpm, 5min, 4℃)を行い、上澄み除去後、500μlのPBS(-)溶液に懸濁し、ナイロンメッシュを通過させ測定サンプルとした。細胞内に取り込まれた40nM DiOC<sub>6</sub>(3)の蛍光強度は、フローサイトメーター(Epics XL system II, Beckman Coulter Inc.)を用いて測定した。光源には488nmのArレーザーを出力15nWで使用し、DiOC<sub>6</sub>(3)の最大蛍光発光波長は519nmのため、FL1(505-545nm)センサーで測定した。

### 3-2-15 細胞膜の流動性測定

がん細胞および正常細胞の膜流動性は、分光蛍光光度計(F-4500, 日立)を用い蛍光偏光解消法により測定した。蛍光プローブには、膜内部の流動性を反映させるといわれている 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH, ナカライテスク)を用いた。

培養フラスコ(培養面積  $75\text{cm}^2$ )に細胞を 15ml 播種した。24 時間培養後、Trypsin で剥離し PBS(-)で回収した。遠心後、DPH([DPH]= $2.0\times 10^{-3}\text{M}$ , 溶媒: テトラヒドロフラン)を最終濃度  $2\mu\text{M}$  になるように添加し、 $37^\circ\text{C}$ で 5 分ごとにタッピングしながら、30 分間インキュベートした。PBS(-)で洗浄後、細胞数が  $25\times 10^4\text{cells/ml}$  になるよう調製した。細胞を 1cm 角の石英セルに 2.5ml( $6.0\times 10^6\text{cells}$ )分取し、循環恒温槽中で  $37^\circ\text{C}$ とした後、5 分間励起波長 357nm にて 432nm の蛍光偏光強度成分を測定し、さらに各試料を添加して 5 分間、 $P=(I_{vv}-C_f I_{vh}) / (I_{vv}+C_f I_{vh})$ より蛍光偏光度(P)を算出した。ここで、 $I_{vv}$ および  $I_{vh}$ は、それぞれ垂直直線偏光励起光の振動方向と垂直に振動する偏光強度成分及び平行に振動する偏光強度成分である。 $C_f$ は  $C_f=I_{hv}/I_{hh}$ より求められる補正係数であり、 $I_{hh}$ および  $I_{hv}$ は、それぞれ水平直線偏光励起光の振動方向と平行に振動する偏光強度成分及び垂直に振動する偏光強度成分である。

### 3-3 結果と考察

#### 3-3-1 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞に対する増殖抑制効果

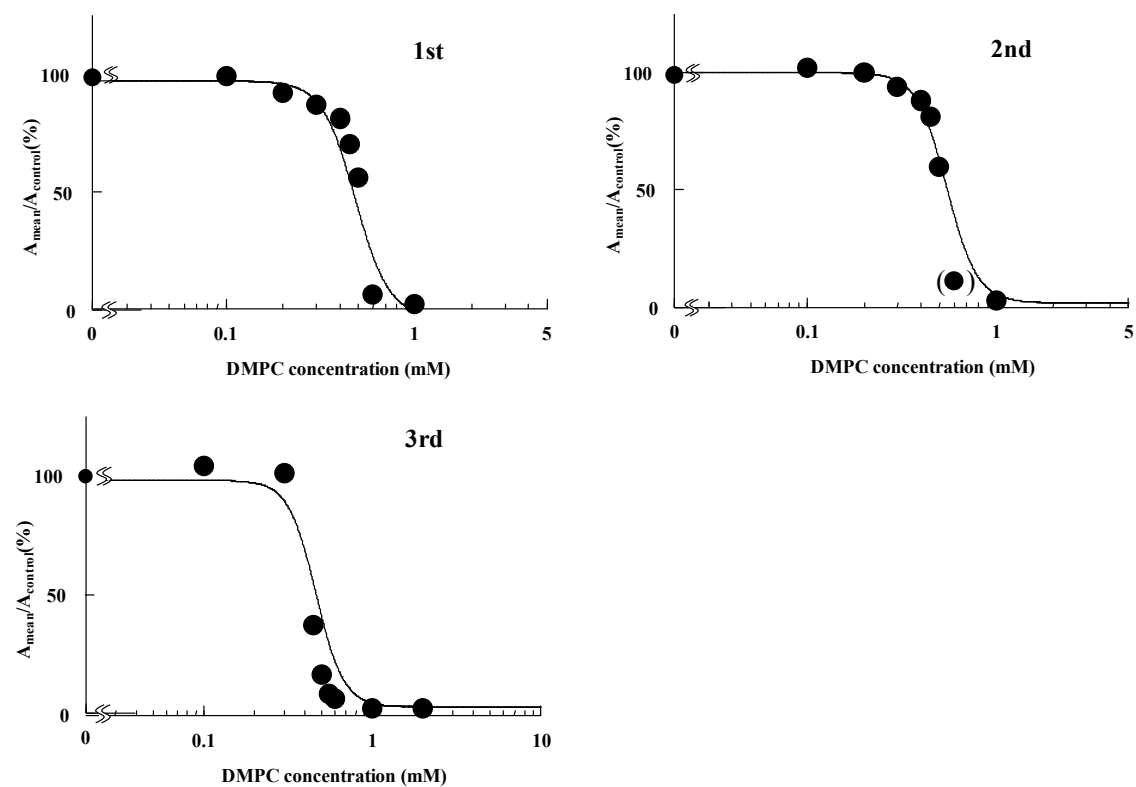
95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム (HL21) および 87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol%  $2C_{14}ECl$  ハイブリッドリポソーム (HL/2 $C_{14}ECl$ )のヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する 50%増殖抑制濃度( $IC_{50}$ : 50% Inhibitory Concentration)について検討を行った。結果を Fig.3-1～Fig.3-4 および Table3-1 に示す。各々の Fig. における  $C_{12}(EO)_{21}$  および  $2C_{14}ECl$  の濃度は、DMPC 基準で得られた  $IC_{50}$  値における各々の成分濃度を示した。

HCT116 細胞に対し、DMPC、HL21 および HL/2 $C_{14}ECl$  はいずれも濃度増加に伴い生存率の減少がみられ、濃度依存的な増殖抑制効果が得られた。特に HL/2 $C_{14}ECl$  の  $IC_{50}$  値は、DMPC の約 1/3、HL21 の約 1/2 であり高い増殖抑制効果を示すことが明らかになった。

以上の結果から、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol%  $2C_{14}ECl$  ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する顕著な細胞増殖抑制効果が得られた。



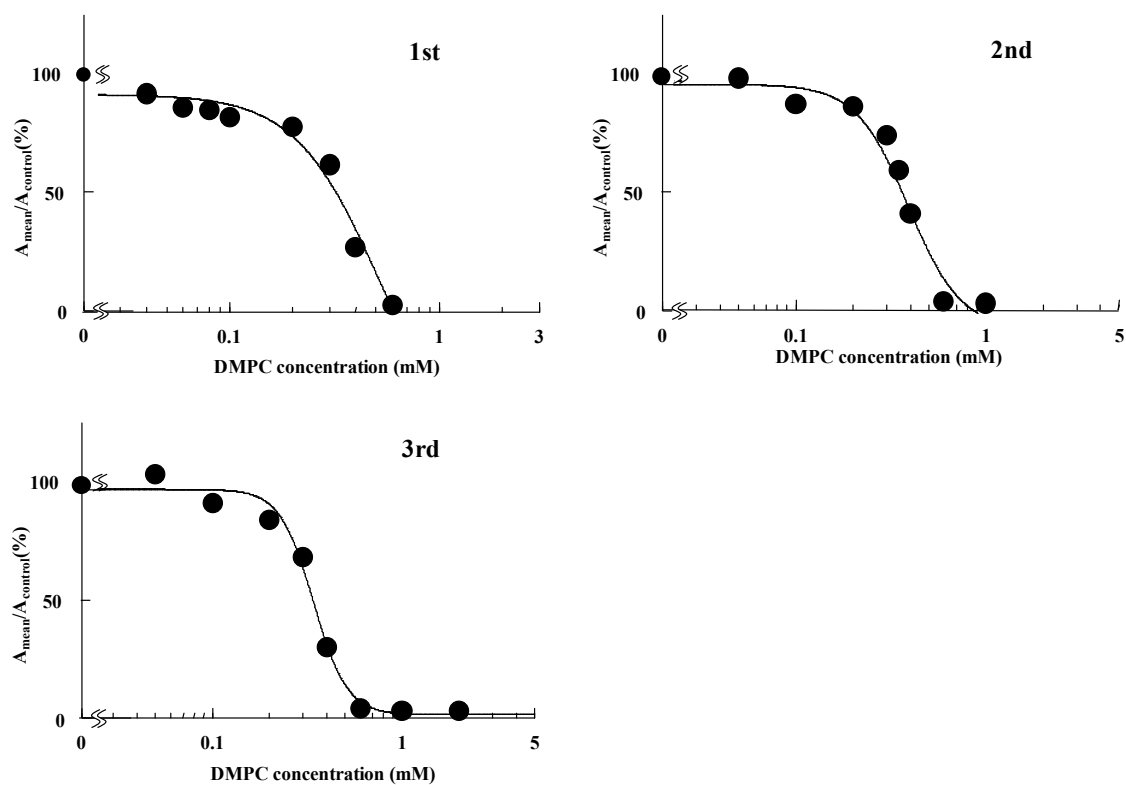
### DMPC Liposome



	IC <sub>50</sub> [mM]
	[DMPC]
1st	0.471
2nd	0.552
3rd	0.468
mean	0.497±0.039

Fig.3-1 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of DMPC liposomes on the growth of HCT116 cells.

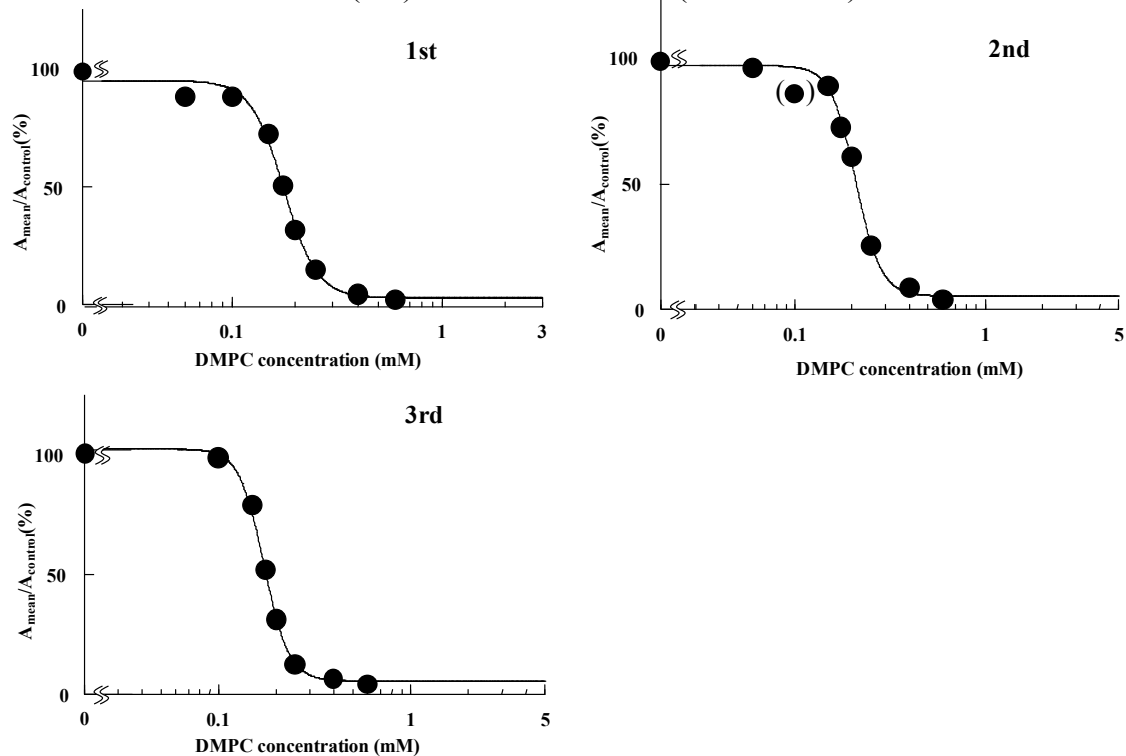
95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  : (HL21)



	IC <sub>50</sub> [mM]	
	[DMPC]	[C <sub>12</sub> (EO) <sub>21</sub> ]
1st	0.320	0.0168
2nd	0.433	0.0227
3rd	0.339	0.0178
mean	0.364±0.049	0.0191±0.0026

Fig.3-2 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of hybrid liposomes (HL21) composed of 95mol% DMPC and 5mol% $C_{12}(EO)_{12}$  on the growth of HCT116 cells.

87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECl$  : (HL/ $2C_{14}ECl$ )



	IC <sub>50</sub> [mM]		
	[DMPC]	[ $C_{12}(EO)_{21}$ ]	[ $2C_{14}ECl$ ]
1st	0.184	0.0106	0.0169
2nd	0.173	0.0099	0.0159
3rd	0.174	0.0100	0.0160
mean	0.177±0.005	0.010±0.0003	0.016±0.0005

Fig.3-3 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of hybrid liposomes (HL/ $2C_{14}ECl$ ) composed of 87mol% DMPC and 5mol% $C_{12}(EO)_{12}$  and 8mol% $2C_{14}ECl$  on the growth of HCT116 cells.

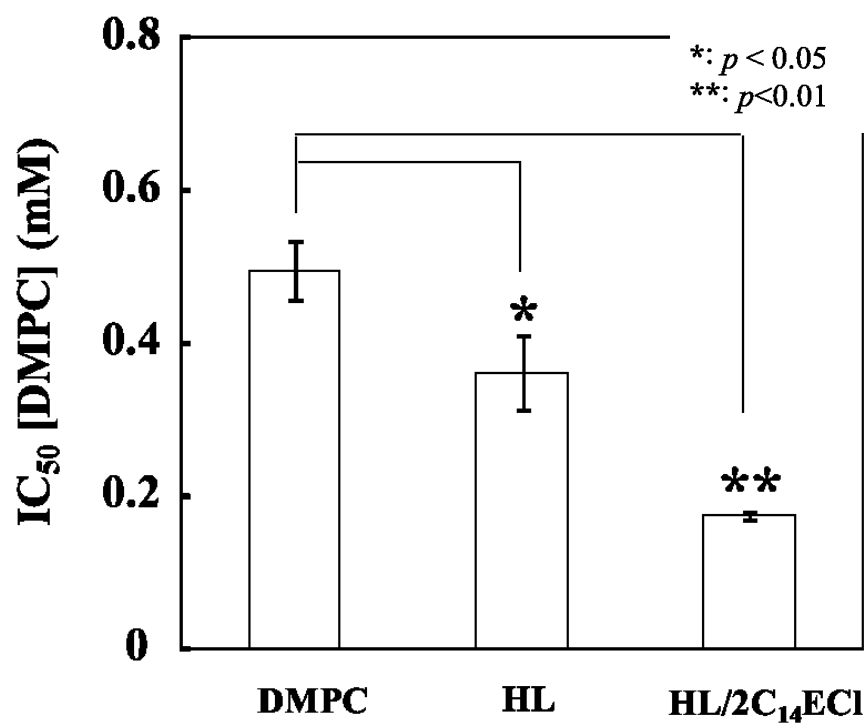


Fig.3-4 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) for HL/2C<sub>14</sub>ECI on the growth of HCT116 cells. Data represent the mean  $\pm$  S.D.

Table 3-1 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of HL/2C<sub>14</sub>ECI on the growth of HCT116 cells.

Sample	50% inhibitory concentration (mM)
	HCT116
DMPC liposomes	[DMPC]=0.497±0.039
HL21	[DMPC]=0.364±0.049
	[C <sub>12</sub> (EO) <sub>21</sub> ]=0.0191±0.0026
HL/2C <sub>14</sub> ECI	[DMPC]=0.179±0.01
	[C <sub>12</sub> (EO) <sub>21</sub> ]=0.010±0.0003
	[2C <sub>14</sub> ECI]=0.016±0.0005

Data represent the mean ±S.D.

### 3-3-2 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞への融合・蓄積

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの正常ヒト大腸(CCD33Co)細胞およびヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する融合・蓄積を検討するため、蛍光標識脂質(NBDPC)を含有した 96mol%DMPC/4mol%NBDPC(DMPC/NBDPC)、91mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>/4mol%NBDPC ハイブリッドリポソーム(HL21/NBDPC) および 83mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>/8mol%2C<sub>14</sub>ECI/4mol%NBDPC ハイブリッドリポソーム(HL/2C<sub>14</sub>ECI/NBDPC)を用いて共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。結果をそれぞれ Fig. 3-5 および Fig. 3-6 に示す。

HCT116 細胞において HL21/NBDPC では添加 2h から、HL/2C<sub>14</sub>ECI/NBDPC では HL21/NBDPC より早く添加 1h から融合・蓄積による緑色蛍光が観察された。特に HL/2C<sub>14</sub>ECI/NBDPC では時間経過に伴い蛍光量の増大が観察された。DMPC/NBDPC では、融合・蓄積は観察されなかった。一方、DMPC/NBDPC、HL21/NBDPC、HL/2C<sub>14</sub>ECI/NBDPC 添加後の CCD33Co 細胞膜に対しては、時間経過による NBDPC の蛍光強度の変化は見られず、正常細胞への融合・蓄積は認められなかった。

次に、全反射蛍光顕微鏡(TIRF)を用いて、カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん(HCT116)細胞への融合・蓄積を観察した。結果を Fig. 3-7 に示す。HL/2C<sub>14</sub>ECI/NBDPC 添加後、時間経過に伴い蛍光強度が増大し、HCT116 細胞膜への融合・蓄積が観察された。

以上の結果から、HL/2C<sub>14</sub>ECI は DMPC および HL21 に比べ短時間で HCT116 細胞に融合・蓄積することが明らかとなった。このことは、HCT116 細胞の高い膜流動性と細胞表面のフォスファチジルセリンなどのアニオン性物質を認識することで、HL/2C<sub>14</sub>ECI が短時間で融合・蓄積したものと考えられる。

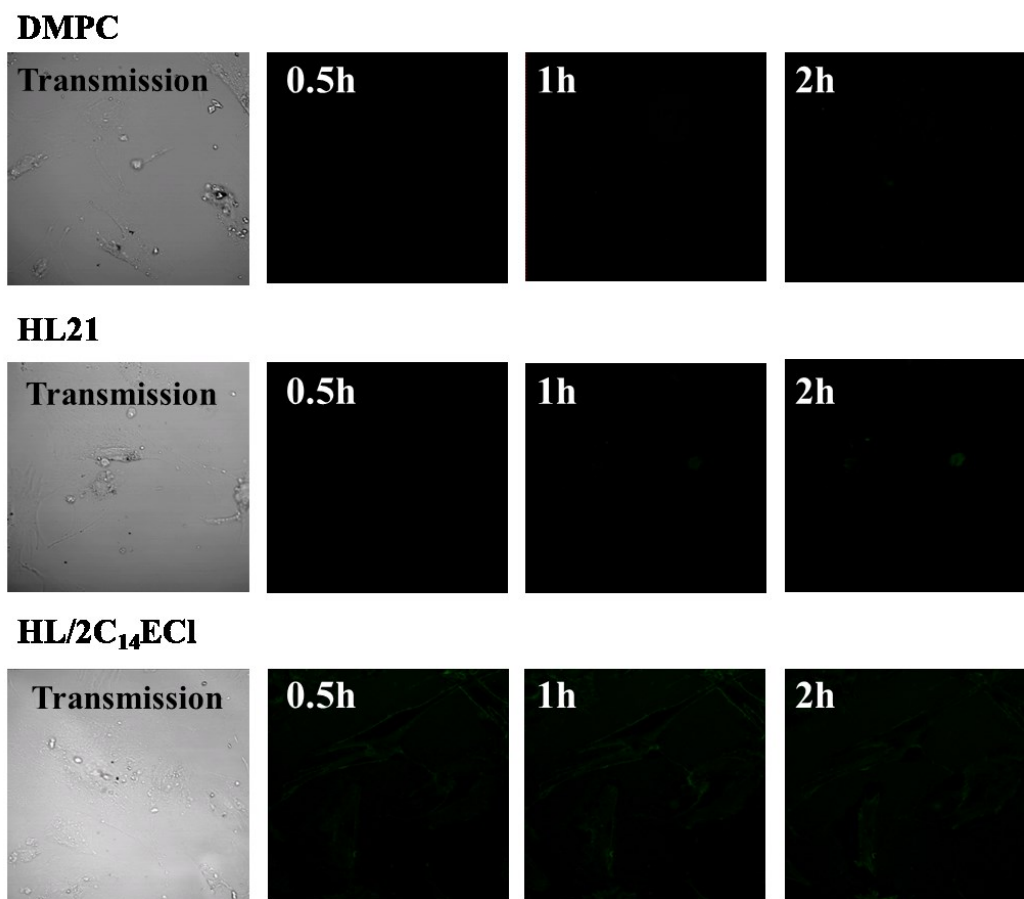


Fig.3-5 Fluorescence micrographs of CCD-33Co cells after the treatment with DMPC liposomes, HL21 and HL/2C<sub>14</sub>ECI including NBDPC. Magnification :  $\times 40$ .

[DMPC]=0.45mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>]=0.027mM, [2C<sub>14</sub>ECI]=0.044mM,[NBDPC]=0.022mM.

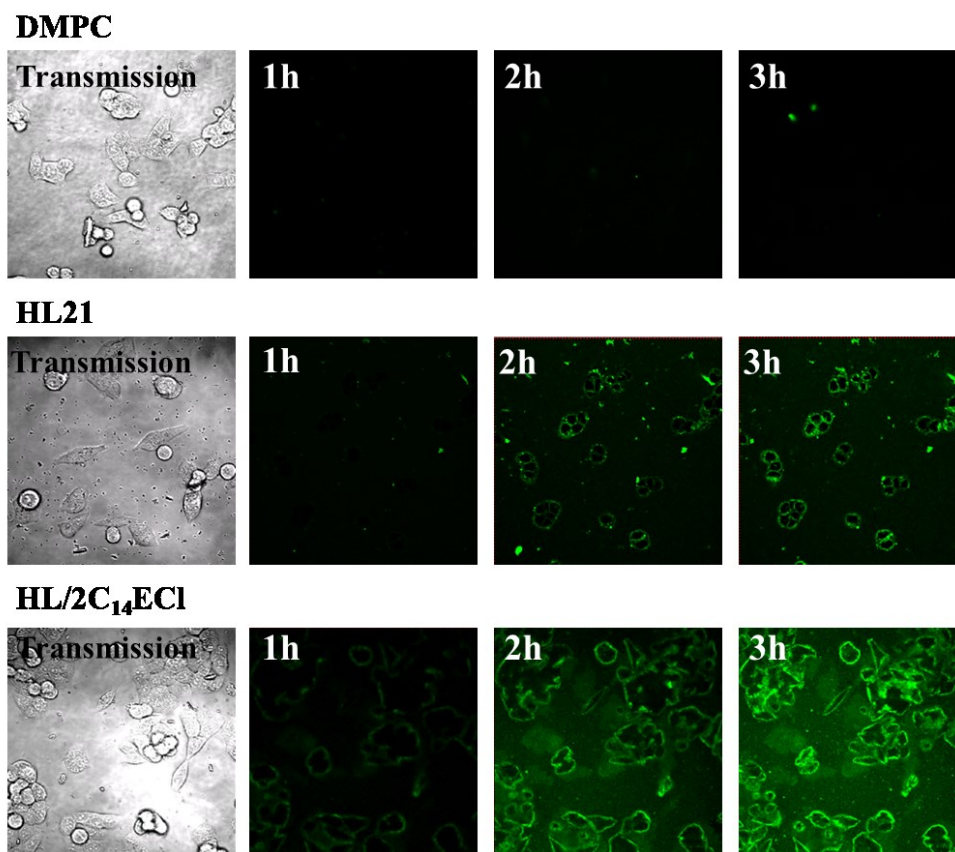
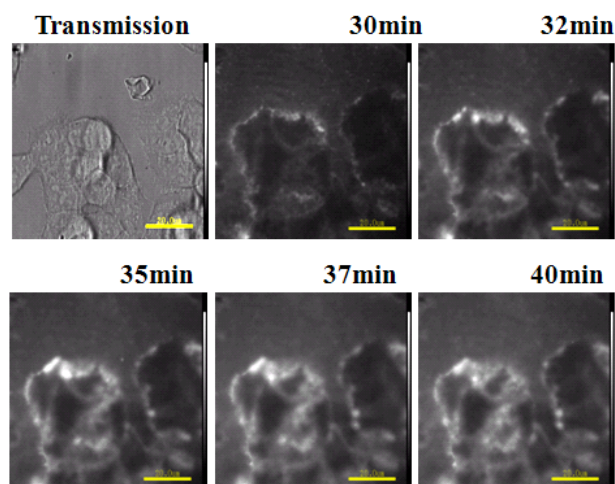


Fig.3-6 Fluorescence micrographs of HCT116 cells after the treatment with DMPC liposomes, HL21 and HL/2C<sub>14</sub>ECl including NBDPC. Magnification :  $\times 40$ .  
 [DMPC]=0.45mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>]=0.027mM, [2C<sub>14</sub>ECl]=0.044mM, [NBDPC]=0.022mM.



(A)



(B)

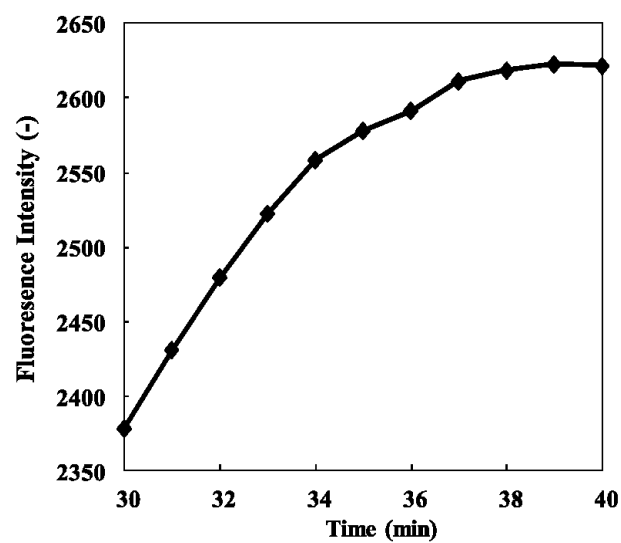


Fig. 3-7 Specific accumulation of HL/2C<sub>14</sub>ECl including NBDPC in HCT116 cell membranes.  
 (A) Total internal reflection fluorescence micrographs of HCT116 cells after the treatment with HL/2C<sub>14</sub>ECl including NBDPC. (B) Fluorescent intensity of NBDPC incorporated into HL/2C<sub>14</sub>ECl in HCT116 cells.  
 [DMPC]=0.18mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>]=0.010mM, [2C<sub>14</sub>ECl]=0.017mM. Scale bar : 20μm, Magnification : ×100.

### 3-3-3 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞に対するアポトーシス誘導

3-3-1 および 3-3-2 から、ヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する顕著な細胞増殖抑制効果および HCT116 細胞膜へのカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソーム(87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$ ; HL/ $2C_{14}ECI$ )の特異的な融合・蓄積が明らかとなったことから、本節ではアポトーシス誘導について、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察およびフローサイトメーターにより検討した。

初期アポトーシスを検出できる Annexin V binding assay の結果を Fig.3-8 に示す。DMPC および HL21 処理において緑色蛍光は観察されなかったが、HL/ $2C_{14}ECI$  処理 3h で Annexin V-Fluorescence の緑色蛍光が観察され、初期アポトーシスが確認された。

次に TUNEL 法を用いた細胞死観察の結果を Fig. 3-9 に示す。写真からも明らかのように、DMPC 処理ではアポトーシス陽性細胞は観察されなかったが、HL21 および HL/ $2C_{14}ECI$  処理 48h で緑色蛍光が観察され、アポトーシスを誘導していることが確認された。

さらに、フローサイトメーターを用いてアポトーシスにより断片化された DNA の含量を測定した。結果を Fig. 3-10 に示す。HL21 および HL/ $2C_{14}ECI$  とも濃度依存的に DNA 断片化率が増加した。また、HL/ $2C_{14}ECI$  は HL21 と比較して、低濃度の 0.2mM でも有意に高い DNA 断片化率が得られた。

以上のことから、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソームおよび 87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソームは、ヒト大腸がん(HCT116)細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソームは、正常ヒト大腸細胞に対し融合・蓄積しないことも明らかとなった。

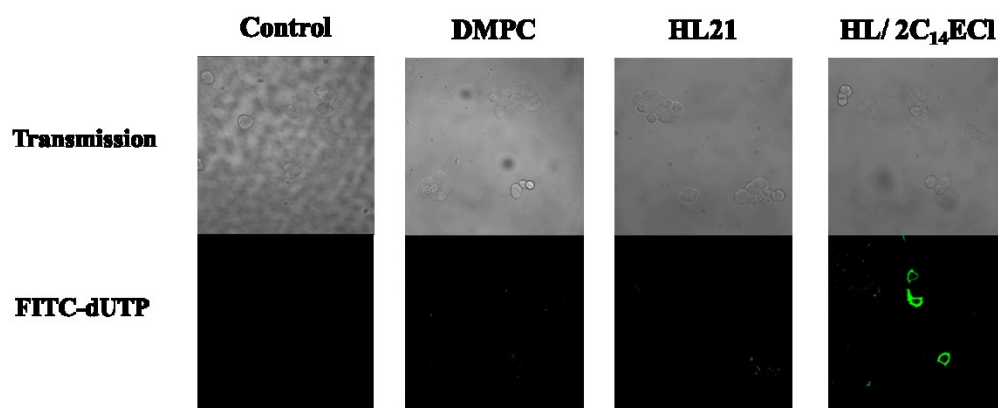


Fig.3-8 Fluorescence micrographs of HCT116 cells treated with HL/2C<sub>14</sub>ECI for 3h using Annexin-V binding assay.

HL/2C<sub>14</sub>ECI : [DMPC]=0.177mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>]=0.0101mM,  
[2C<sub>14</sub>ECI]=0.0163mM,Magnification : ×40.

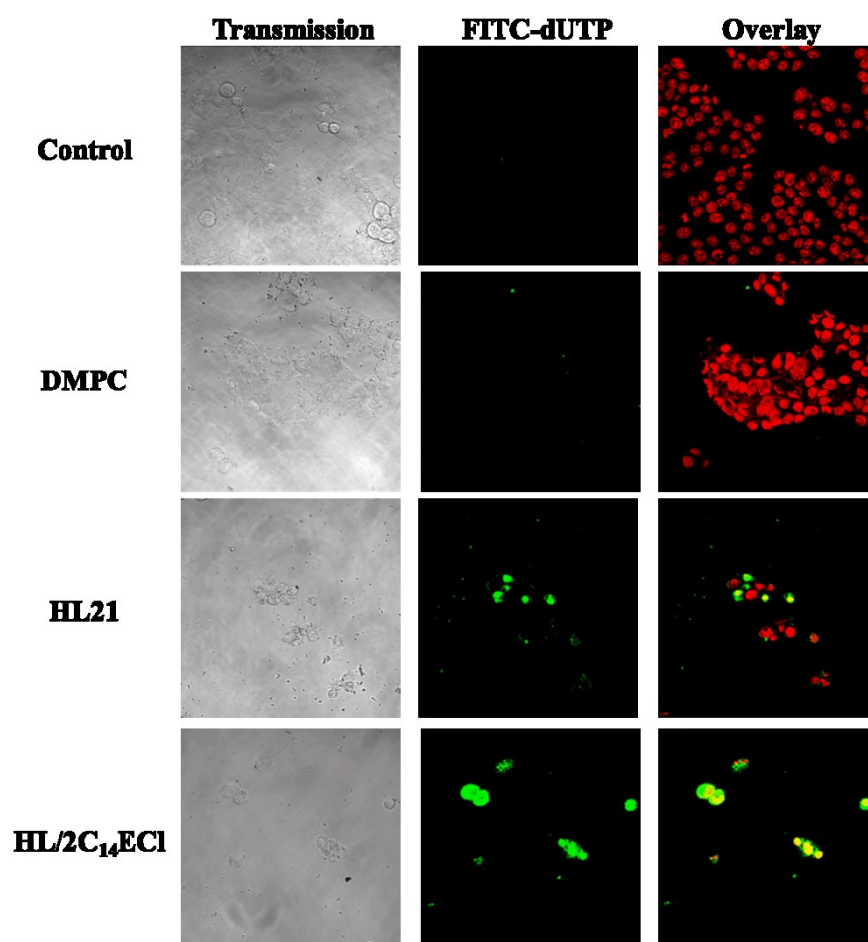


Fig.3-9 Fluorescence micrographs of HCT116 cells treated with HL/2C<sub>14</sub>ECI for 48h using TUNEL assay.

HL/2C<sub>14</sub>ECI : [DMPC]=0.364mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>]=0.021mM,  
[2C<sub>14</sub>ECI]=0.033mM, Magnification : ×80.

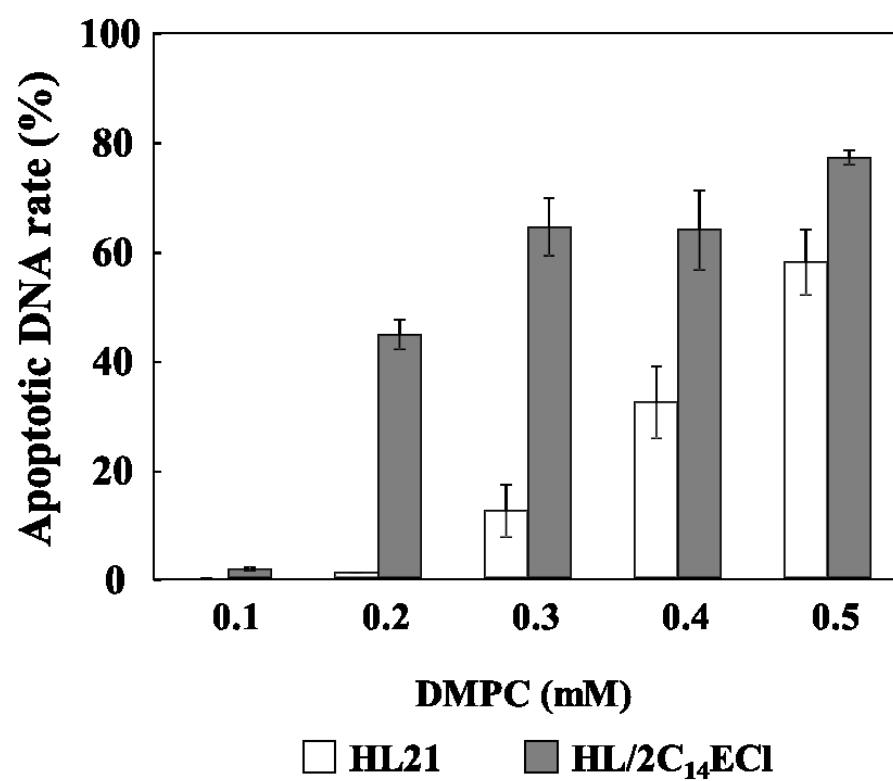


Fig. 3-10 Apoptotic DNA rate of HCT116 cells treated with HL and HL/2C<sub>14</sub>ECI for 48h. Data represent the mean  $\pm$  SD.

#### 3-3-4 アポトーシス誘導におけるカスパーズ-3 の活性化

3-3-3 においてアポトーシスを誘導することが明らかとなった、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム (HL21) および 87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソーム (HL/ $2C_{14}ECI$ ) のヒト大腸がん(HCT116)細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムにおける、カスパーズ-3 の関与を Caspase fluorometric protease assay により検討した。結果を、Fig. 3-11 に示す。

HL21 および HL/ $2C_{14}ECI$  で処理した HCT116 細胞において、処理後 1 時間から 2 時間にかけてカスパーズ-3 の高い活性が検出されたが、その後活性が低下した。この減少は、アポトーシス誘導による細胞数の減少に伴った相対的な低下と考えられる。また、HL/ $2C_{14}ECI$  は HL21 よりも短時間でカスパーズ-3 の活性が検出された。

以上の結果から、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソームは、ヒト大腸がん(HCT116)細胞に対しアポトーシスを誘導する際、カスパーズ-3 を活性化していることが明らかとなった。

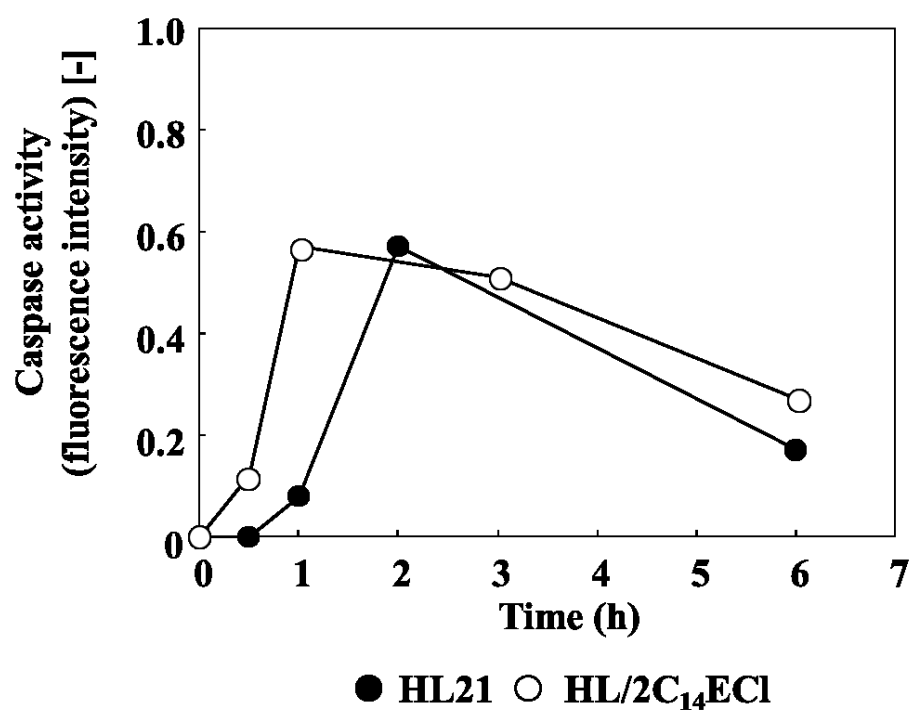


Fig. 3-11 Time courses for activation of caspase-3 of HCT116 cells treated with HL and HL/2C<sub>14</sub>ECI. Data represent the mean  $\pm$  S.D.

HL21 : [DMPC]=0.364mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>]=0.020mM

HL/2C<sub>14</sub>ECI:DMPC]=0.364mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>]=0.021mM, [2C<sub>14</sub>ECI]=0.033mM.

### 3-3-5 アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与

3-3-3 においてアポトーシスを誘導することが明らかとなった、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム (HL21) および 87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソーム (HL/ $2C_{14}ECI$ ) のヒト大腸がん (HCT116) 細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムにおける、ミトコンドリアの関与を検討した。結果を、Fig. 3-12 に示す。

HL21 および HL/ $2C_{14}ECI$  で処理した HCT116 細胞において、処理後 30 分で DiOC<sub>6</sub>(3) の蛍光強度が低下し、ミトコンドリア膜電位が低下していることが明らかとなった。

以上の結果から、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソームは、ヒト大腸がん (HCT116) 細胞に対しアポトーシスを誘導する際、ミトコンドリアを経由していることが確認された。また 3-3-4 と今回の結果から、HCT116 細胞に対するアポトーシス経路は、主にミトコンドリアを経由後、カスパーズ-3 を活性化していることが明らかとなった。



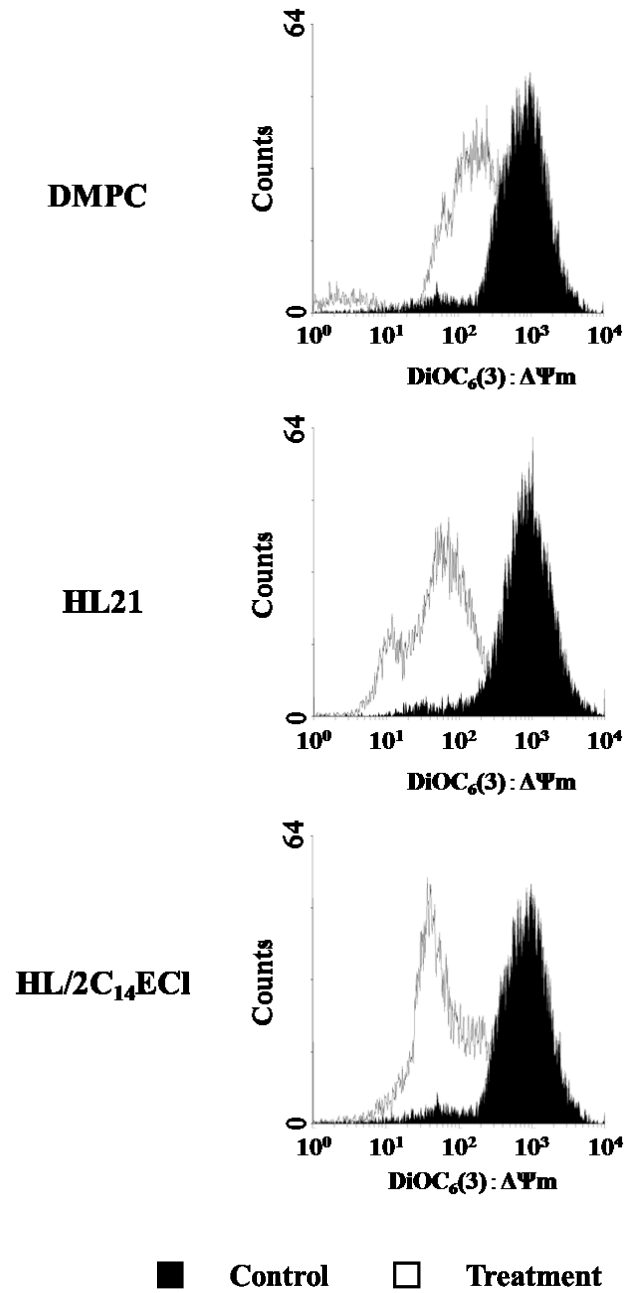


Fig. 3-12 Mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) disruption of mitochondria in HCT116 cells by DMPC, HL21 and HL/2C<sub>14</sub>ECI for 30min.  
 HL/2C<sub>14</sub>ECI:[DMPC]=11.5mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>]=0.662mM, [2C<sub>14</sub>ECI]=1.06mM.

### 3-3-6 細胞の膜流動性

95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム (HL21) および 87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソーム (HL/ $2C_{14}ECI$ )によるヒト大腸がん(HCT116)細胞膜流動性の変化について検討を行った。結果を Fig.3-13 に示す。

DMPC、HL21 および HL/ $2C_{14}ECI$  添加 5 分で、HCT116 細胞の細胞膜流動性が高くなった。また、いずれのリポソーム添加の場合も濃度依存的に流動性が高くなることが明らかとなった。

以上の結果から、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソームは、ヒト大腸がん(HCT116)細胞の膜流動性を短時間で変化させていることが確認された。リポソームが融合することにより、細胞膜自体の流動性が高くなる可能性が示唆された。また、DMPC 単一リポソームでも膜流動性を変化させるが、3-3-3 からアポトーシスを誘導しないことが示唆される。

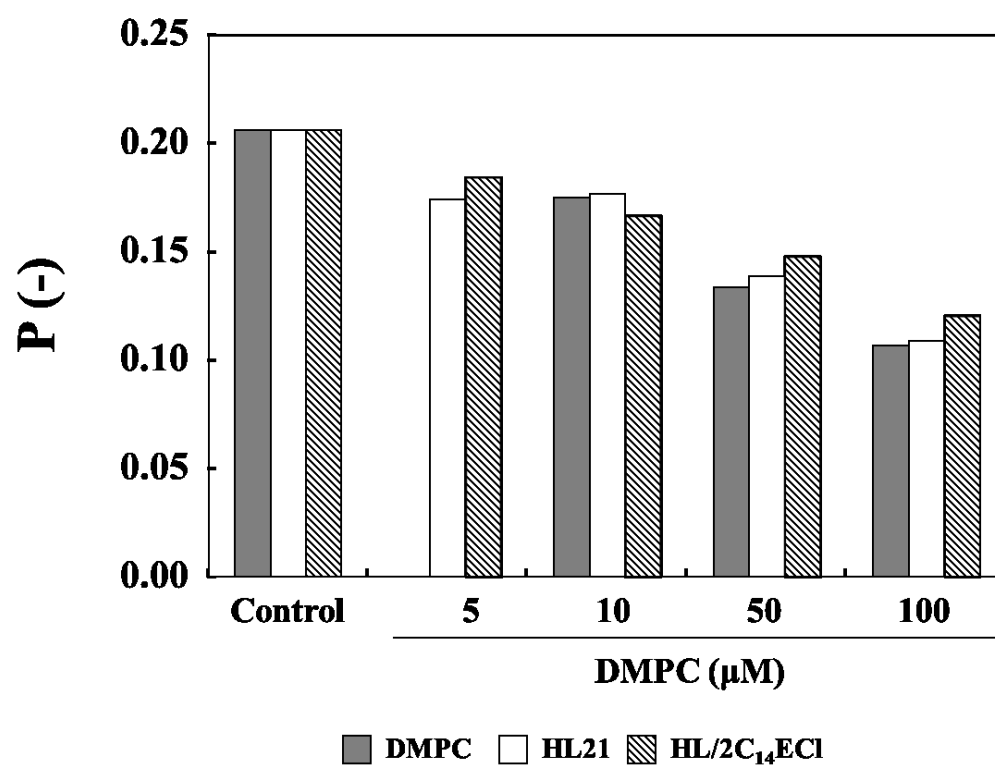


Fig.3-13 Fluorescence polarization (P values) change of DPH-labeled HCT116 cells after the treatment with DMPC, HL21 and HL/2C<sub>14</sub>ECI for 5min.

### 3-4 総括

本章では、87mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>/8mol%2C<sub>14</sub>ECI ハイブリッドリポソーム(HL/2C<sub>14</sub>ECI)のヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する抗腫瘍効果および制がんメカニズムについて検討し、以下のような興味深い知見が得られた。

1. HCT116 細胞に対し、DMPC、HL21 および HL/2C<sub>14</sub>ECI はいずれも濃度依存的な増殖抑制効果が確認された。特に HL/2C<sub>14</sub>ECI の IC<sub>50</sub> 値は、DMPC の約 1/3、HL21 の約 1/2 であり高い増殖抑制効果を示すことを明らかにした。
2. 蛍光標識脂質(NBDPC)を含有した HL/2C<sub>14</sub>ECI による共焦点レーザー顕微鏡および全反射顕微鏡を用いた融合・蓄積の観察から、HCT116 細胞に対して特異的に融合・蓄積することを明らかにした。一方、正常大腸(CCD33Co)細胞には、融合・蓄積しないことを明らかにした。
3. Annexin-V binding assay、TUNEL 法による画像解析およびフローサイトメーターを用いた解析から、アポトーシスを示す緑色蛍光が観察され、HL21 および HL/2C<sub>14</sub>ECI は HCT116 細胞に対してアポトーシスを誘導することを確認した。一方、DMPC ではアポトーシスを誘導しなかった。
4. Caspase fluorometric protease assay から、HL21 および HL/2C<sub>14</sub>ECI は、HCT116 細胞に対するアポトーシス誘導の際に、カスパー-3 が活性化することを明らかにした。
5. DiOC<sub>6</sub>(3)を用いたミトコンドリア膜電位の測定から、HCT116 細胞にアポトーシスを誘導する際に、ミトコンドリアが関与することを明らかにした。
6. DPH を用いた細胞膜流動性の測定結果から、DMPC、HL21 および HL/2C<sub>14</sub>ECI は、HCT116 細胞の膜流動性を短時間で変化させていることを明らかにした。

以上の結果から、HL/2C<sub>14</sub>ECI は HL21 より短時間でヒト大腸がん(HCT116)細胞に蓄積し、顕著に高い増殖抑制効果およびアポトーシス誘導を明らかとした。大腸がん細胞に対する HL/2C<sub>14</sub>ECI のアポトーシスシグナルは、ミトコンドリアを介してカスパー-3 を活性化することを初めて明らかにした。がん細胞は、正常細胞よりもアニオン性のホスファチジルセリン(PS)が多く露出しているため、カチオン性の HL/2C<sub>14</sub>ECI は静電的相互作用により短時間で、がん細胞に特異的に融合・蓄積し、アポトーシスを誘導したと考えられる<sup>79)</sup>。

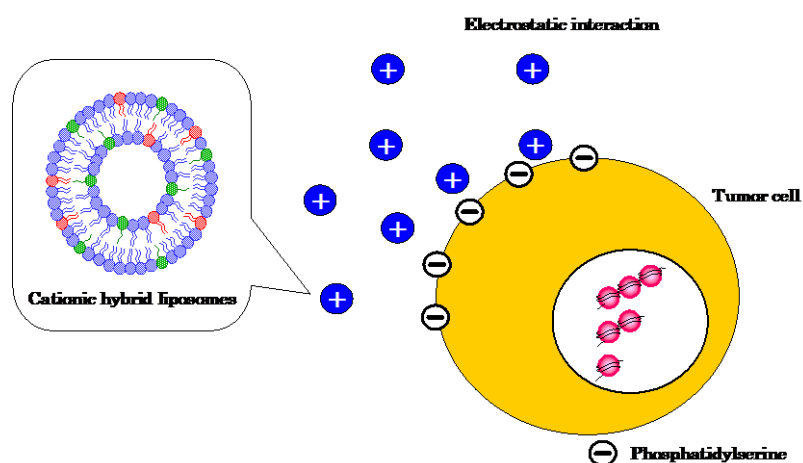


Fig. 3-6 A hypothetical mechanism for antitumor effects of cationic hybrid liposomes.

## 第4章 ヒト大腸がん細胞移植モデルマウスに対するカチオン性脂質含有 ハイブリッドリポソームの治療効果

### 4-1 序

かつては不治の病とされてきた多くの疾患が新たな医薬品の登場により克服され、人類の繁栄と幸福に貢献してきた。その一方で、医薬品は人体にとっては異物であり、薬理作用は常に望んでいる形で現れるとは限らない。そのため、人体に効果的かつ安全に使用するために必要な効果を伴うことで、はじめて「医薬品」となる<sup>80)</sup>。

新薬は、候補物質を創り出す基礎研究、動物実験などにより候補物質の有効性や安全性を調べる非臨床試験(前臨床試験)、健康な人や患者さんにおいて候補物質の効果や安全性を調べる臨床試験(治験)、医薬品としての製造販売承認を受けるための審査を受ける承認申請・審査を経て販売される。その為、新薬の開発には、10年以上の歳月と多額の費用が必要であると言われている。基礎研究では、何百万種類という合成あるいは天然の化合物群の中から目的の効果を持つ低分子化合物を、主にハイスループットスクリーニング法により新薬候補物質探索が行われる。基礎研究により発見された新薬候補物質は、次の非臨床試験で *in vitro* および *in vivo* での安全性試験、安全性薬理試験、薬効薬理試験、薬物動態試験から安全性と有効性が確認される。特に安全性試験では、信頼性を確保するため GLP (good laboratory practice) に従い実施される<sup>81)</sup>。臨床試験では通常、第Ⅰ相試験(フェーズⅠ)、第Ⅱ相試験(フェーズⅡ)、第Ⅲ相試験(フェーズⅢ)の3段階に分けて行われる。第Ⅰ相試験(フェーズⅠ)では、医薬品候補物質を健康人(健康な人)に投与し、最大許容投与量や薬物動態などの安全性を検討する。第Ⅱ相試験(フェーズⅡ)では、実際に病気を患っている患者さんに医薬品候補物質を試験的に使用し、有効性と安全性を検討する。第Ⅲ相試験(フェーズⅢ)では、より多くの患者さんに投与を行い、効果と安全性の確認をする。

薬物には、目的とする主作用のほかに副作用があり、人体にどう影響を与えるか等を細心の注意をもって調べる必要がある。しかし、ヒトを用いる研究には、当然厳しい限界があり動物実験が重要になる。動物実験では、ヒトに近い方が良質なデータを得られる可能性が高いと考えられるため、主にほ乳類が用いられる。大型動物としてサル、イヌ、ミニブタなどが、小型動物としてラットやマウス、モルモット、ウサギなどが用いられる。また、微生物学的なコントロールにより清浄度を高めた SPF(specific-pathogen free)動物や、特定の疾病を発症する疾患モデル動物やヌードマウス、さらには特定の遺伝子を組み換えたトランスジェニック動物、ノックアウト動物が用いられている。これらの動物を用いた実験は、診断・治療への応用に大きな役割を果たしている。しかし、動物愛護の問題から2005年の「動物の愛護及び管理に関する法律」に3R原則

が導入された。3R 原則とは、Replacement(代替法の利用)、Reduction(使用動物数の削減)、Refinement(実験方法の洗練、実験動物の苦痛軽減)をいう。そのため、動物実験は適正に実施することが重要である。

本章では、前章においてヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する抗腫瘍効果およびアポトーシス誘導が明らかとなった 87mol%DMPC/5mol% C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>/8mol%2C<sub>14</sub>ECI ハイブリッドリポソームを用いて、HCT116 細胞肝転移モデルマウスに対する治療効果について検討した。

## 4-2 実験

### 4-2-1 試料

リン脂質(DMPC)、界面活性剤( $C_{12}(EO)_{21}$ )およびカチオン性脂質( $2C_{14}ECl$ )は、2-2-1 と同様のものを使用した。

### 4-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

ハイブリッドリポソームは、2-2-2 と同様の方法で調製を行った。

### 4-2-3 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの調製

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームは、2-2-3 と同様の方法で調製を行った。

### 4-2-4 担がんモデルマウスの作製

動物は、BALB/c-R/J マウス<sup>82)</sup>(雄, 10~13 週齢)を使用した。室温  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 10\%$ 、水および餌はオートクレーブにより滅菌したものを自由に摂取させた。

移植日の体重をもとに、層別連続無作為化法により 1 群 4 匹で群分けを行った。群分け後、脾臓にヒト大腸がん(HCT116)細胞を移植( $3.0\times 10^6$  cells/body)し、肝転移モデルマウスの作製を行った<sup>83)</sup>。

### 4-2-5 担がんモデルマウスに対する治療実験

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの担がんモデルマウスに対する治療効果は、肉眼的観察および臓器重量測定により行った。

治療実験のスケジュールは、BALB/c-R/J マウス<sup>82)</sup>(雄, 10~13 週齢)の脾臓にヒト大腸がん(HCT116)細胞を移植して 1 時間後から移植 14 日後までの計 14 回、5% glucose(Control)、DMPC、HL21、HL/ $2C_{14}ECl$  を投与した。各サンプルは、10ml/kg(Dose : 203mg/kg)で尾静脈から投与を行った。投与期間中は一般状態観察および体重測定を行った。



#### 4-2-6 HE 染色による組織切片観察

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの *in vivo* における治療効果を、HE 染色を用いた組織切片観察により行った。

実験方法は、BALB/c-R/Jマウス<sup>82)</sup>(雄, 10~13週齢)の脾臓にヒト大腸(HCT116)がん細胞を移植し、移植1時間後から14日間投与した。投与終了翌日に、ジエチルエーテル麻酔下で解剖し、肝臓を採取後、中性ホルマリン溶液を用いて組織固定した。固定した組織はバイオ病理研究所に委託し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)組織切片を作製した。組織切片の観察は、Nikon DSカメラコントロールユニットで行った。

#### 4-2-7 TUNEL法によるアポトーシスの検出方法<sup>84)</sup>

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの *in vivo* におけるアポトーシス誘導の観察は、TUNEL 法を用い組織切片観察により行った。

実験方法は、BALB/c-R/Jマウス<sup>82)</sup>(雄, 10~13週齢)の脾臓にヒト大腸(HCT116)がん細胞を移植し、移植1時間後から14日間投与した。投与終了翌日に、ジエチルエーテル麻酔下で解剖し、肝臓を採取後、中性ホルマリン溶液を用いて組織固定した。固定した組織はバイオ病理研究所に委託し、TUNEL染色組織切片を作製した。具体的には、蒸留水およびPBS(-)で洗浄し、プロテアーゼ処理および過酸化水素水で内因性ペルオキシターゼを除去した。標本をPBS(-)で洗浄し、Equilibration buffer、Working strength TdT enzymeを添加し、湿潤箱において37°Cで1時間インキュベートした。インキュベート後、標本をWorking strength stop/washが入った容器に入れ、室温でインキュベートした。その後、PBS(-)で洗浄し、ジコキシゲニン抗体を標本組織表面に加え、湿潤箱内において室温で30分間インキュベートした。最後にPBS(-)で洗浄し、3, 3'-diaminobenzidine(DAB)溶液を加え染色し、さらにメチルグリーンを用いて核を染色した。組織切片の観察は、Nikon DSカメラコントロールユニットで行った。

#### 4-2-8 血球への融合・蓄積の観察

カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの *in vitro* での血球への融合・蓄積の観察は、蛍光脂質(NBDPC)含有ハイブリッドリポソームを用い共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

実験方法は、ジエチルエーテル麻酔下でWistarラット(雄, 九動)の腹部下大静脈から採血後、赤血球が $5.0 \times 10^4$  cells/mlになるように調製した。35mm Glass bottom dishに2ml( $1.0 \times 10^5$  cells)播種し、各サンプルを0.2ml([DMPC]=0.45mM)添加し、共

焦点レーザー顕微鏡(TCS-SP, Leica Microsystem)で1時間のタイムラプス蛍光観察を行った(15分毎に1回の撮影)。光源にはArレーザー(488nm)を用い、波長域505～555nmで蛍光を検出した。

## 4-3 結果と考察

### 4-3-1 担がんモデルマウスに対するカチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの 治療効果

87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソーム(HL/ $2C_{14}ECI$ )の *in vivo* における担がんモデルマウスに対する治療効果について検討した。

Fig. 4-1 に投与期間中の体重測定の結果を示す。いずれの群においても投与期間中における体重に変化は見られなかった。

投与終了翌日に採取した肝臓の写真を Fig. 4-2、臓器重量の結果を Fig. 4-3 に示す。DMPC 投与群は、がん細胞を移植した未治療の Control 群と同等の臓器重量で多くの転移が観察されたが、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム(HL21)投与群および HL/ $2C_{14}ECI$  投与群では、がん細胞を移植していない Normal 群と同等の臓器重量であり、顕著に肝転移を抑制していることが明らかとなった。

次に、HE 染色した肝臓組織切片の写真を Fig. 4-4 に示す。DMPC 投与群では、Control 群と同様の広範囲でのがん組織の増大と多数の転移結節などの異常な所見が認められた。一方、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム(HL21)および HL/ $2C_{14}ECI$  投与群においては、転移結節の著しい減少が確認され、Normal 群と同様の状態まで回復していた。

以上の結果から、担がんモデルマウスに対する 95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソームおよび 87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソームの肝転移抑制効果が明らかとなった。

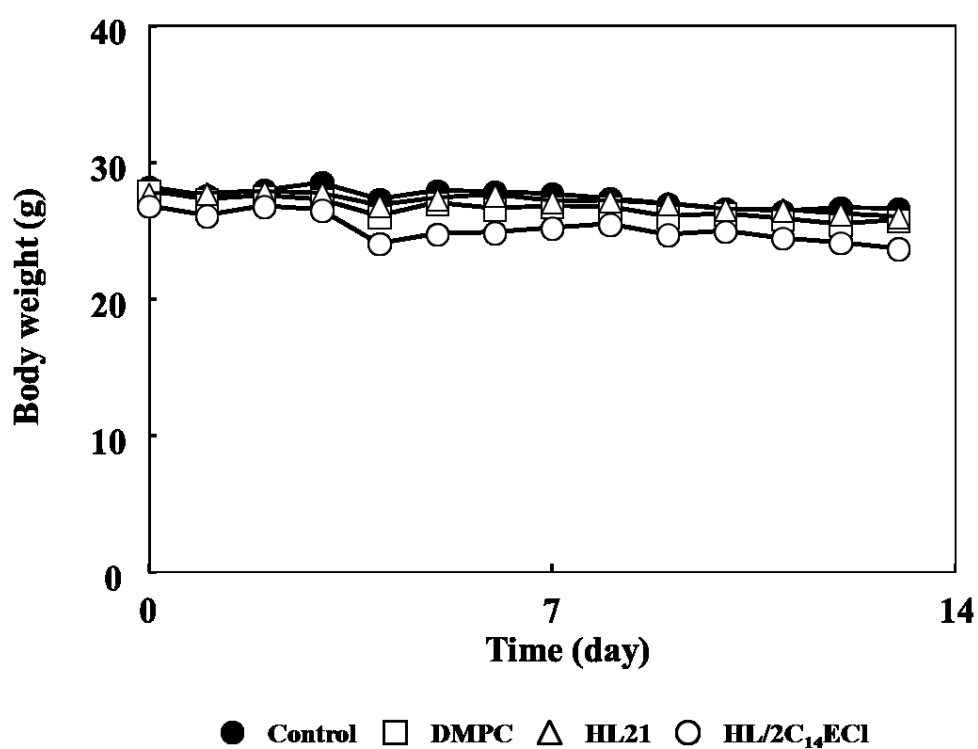


Fig.4-1 Body weight change of hepatic metastasis mouse models intravenously treated with DMPC, HL21, HL/2C<sub>14</sub>EC1 after intrasplenic inoculation of HCT116 cells.

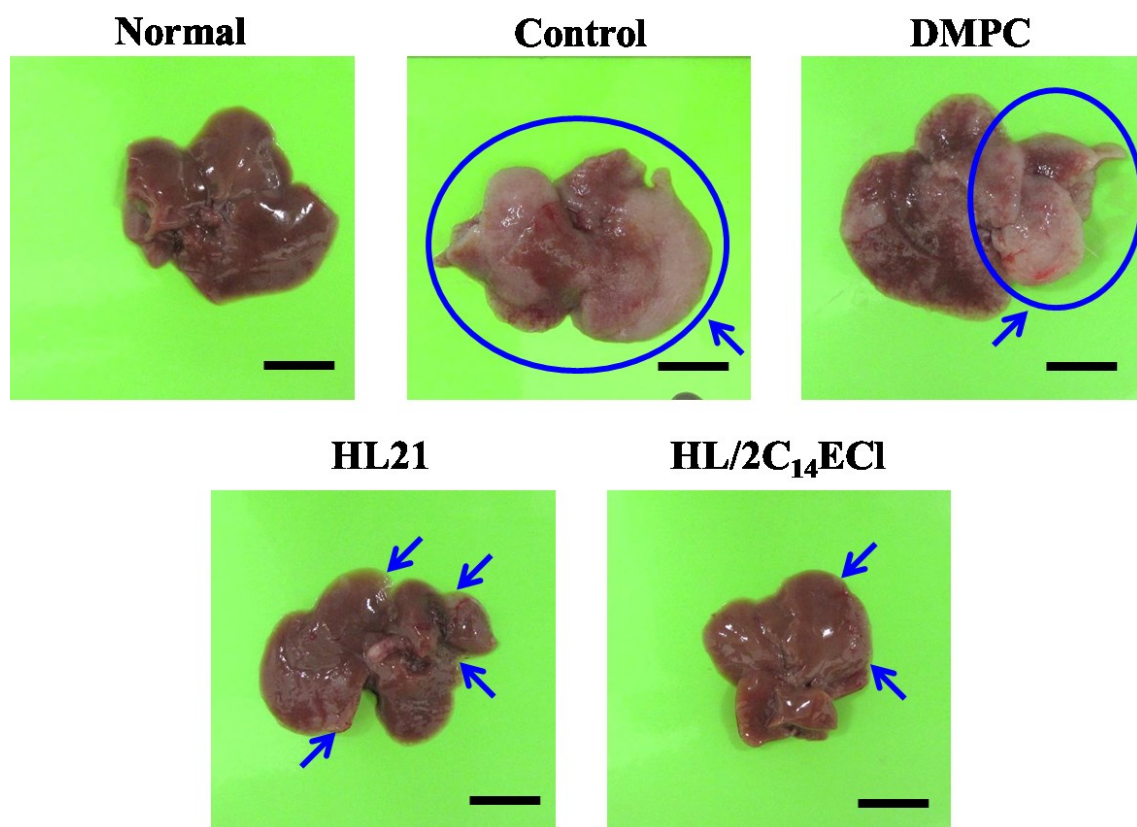


Fig. 4-2 Photographs of liver of hepatic metastasis mouse models treated with HL/2C<sub>14</sub>EC1 after the inoculation of HCT116 cells.

Arrows : tumor, Scale bar: 1cm

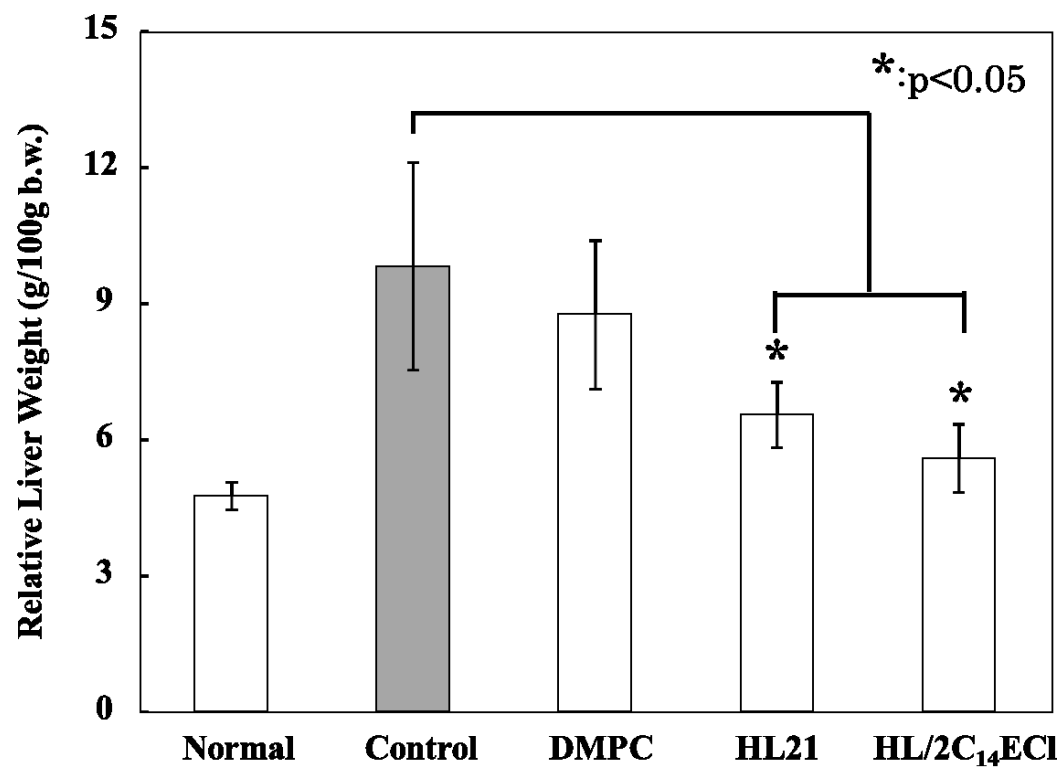


Fig. 4-3 Relative liver weight of mice after the inoculation of HCT116 cells.

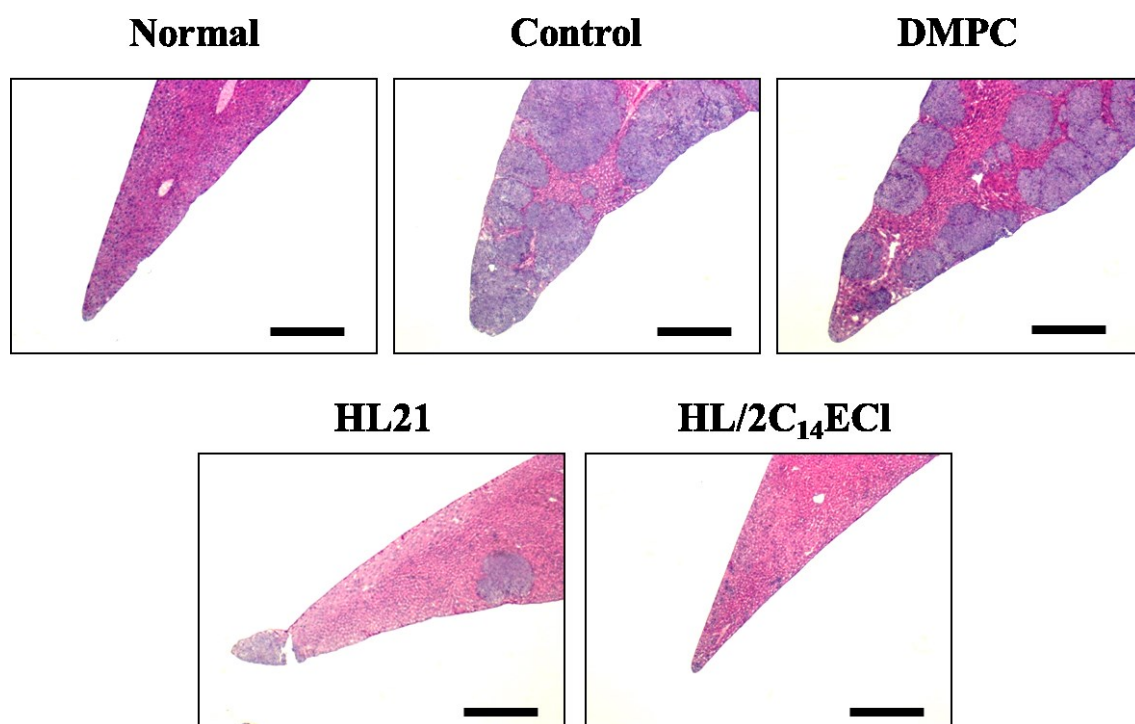


Fig. 4-4 Micrographs of liver tissue of hepatic metastasis mouse models treated with DMPC, HL21, HL/2C<sub>14</sub>EC1 after the inoculation of HCT116 cells using HE method.

Scale bar : 0.5mm, Magnification×40

#### 4-3-2 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん細胞移植モデルマウスに対するアポトーシス誘導

87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソーム (HL/ $2C_{14}ECI$ )の、*in vivo* における担がんモデルマウスの腫瘍組織におけるアポトーシス誘導について検討した。投与終了翌日に肝臓を採取後、パラフィン切片を作成し TUNEL 法により顕微鏡観察を行った。結果を Fig. 4-5 に示す。

HL/ $2C_{14}ECI$  投与群において、矢印で示したようにアポトーシス陽性細胞である茶色に染色された細胞が多数観察され、アポトーシス誘導が明らかになった。95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム (HL21) 投与群では、HL/ $2C_{14}ECI$  ほどではないがアポトーシス陽性細胞が確認された。一方、DMPC 単一リポソーム投与群においては、アポトーシス陽性細胞はほとんど見られなかった。

以上の結果から、担がんモデルマウスに対する 95mol%DMPC/5mol%  $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソームおよび 87mol%DMPC/5mol%  $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソームの肝転移抑制効果はアポトーシス誘導を伴うことが明らかとなった。



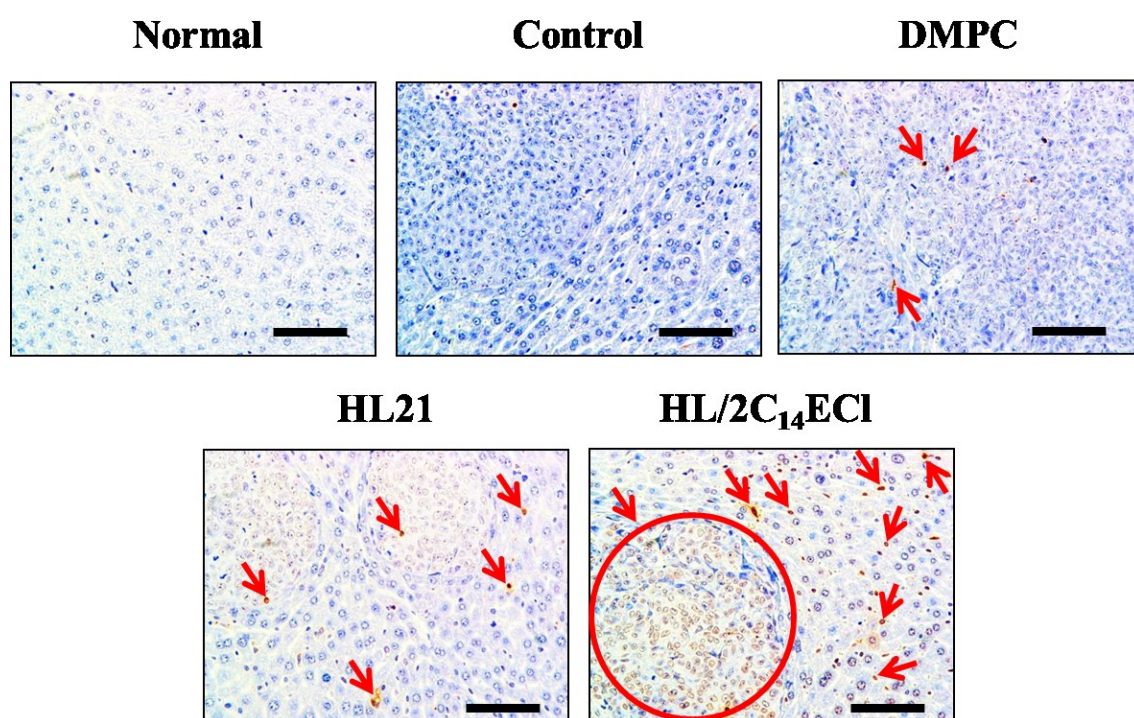


Fig. 4-5 Micrographs of liver tissue of hepatic metastasis mouse models treated with DMPC, HL21, HL/2C<sub>14</sub>EC1 after the inoculation of HCT116 cells using TUNEL method.

Arrows : apoptotic cells. Scale bar : 0.1mm, Magnification  $\times 200$ .

#### 4-3-3 カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの血球に対する安全性

87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECl$  ハイブリッドリポソーム (HL/ $2C_{14}ECl$ )の、*in vitro* における血球への安全性を検討するために融合・蓄積の観察を行った。結果を Fig. 4-6~4-8 に示す。

試料を添加して 1 時間の蛍光観察を行ったが、いずれにおいても緑色蛍光は観察できず、赤血球および白血球に対する蓄積は見られなかった。

以上の結果から、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECl$  ハイブリッドリポソームは、血液中では血球には蓄積しないことが明らかとなった。また、正常マウスを用いた体内動態試験において血液中に 3 時間以内存在し、その後すみやかに肝臓から代謝されることも確認しており、安全性が確認された。

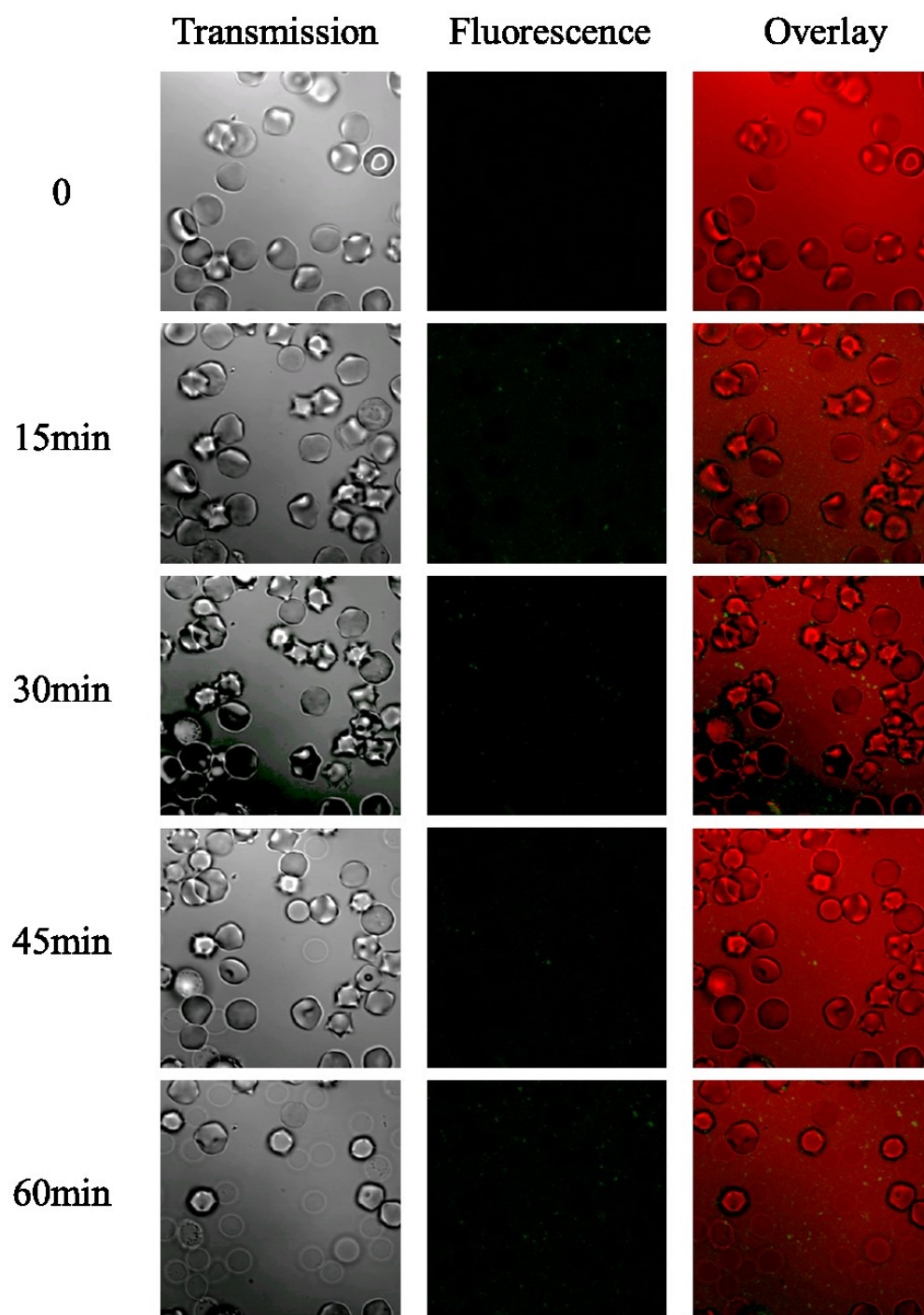


Fig.4-6 Fluorescence micrographs of red blood cell and white blood cell after the treatment with DMPC liposomes including NBDPC.  
[DMPC]=0.45mM, [NBDPC]=0.019mM, Magnification :  $\times 100$ .

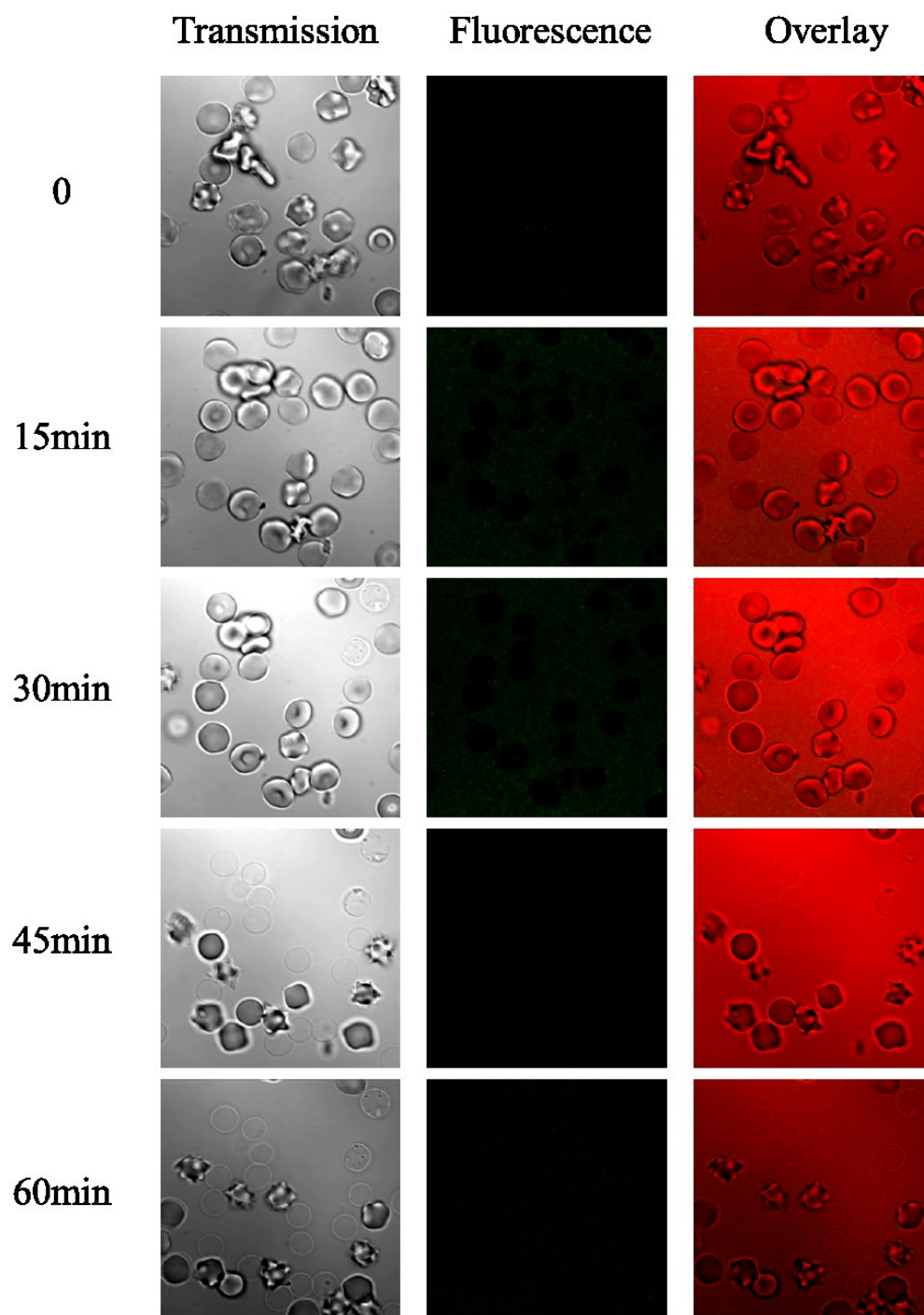


Fig.4-7 Fluorescence micrographs of red blood cell and white blood cell after the treatment with HL21 including NBDPC.  
 $[DMPC]=0.45\text{mM}$ ,  $[C_{12}(EO)_{21}]=0.025\text{mM}$ ,  $[NBDPC]=0.020\text{mM}$   
Magnification :  $\times 100$ .



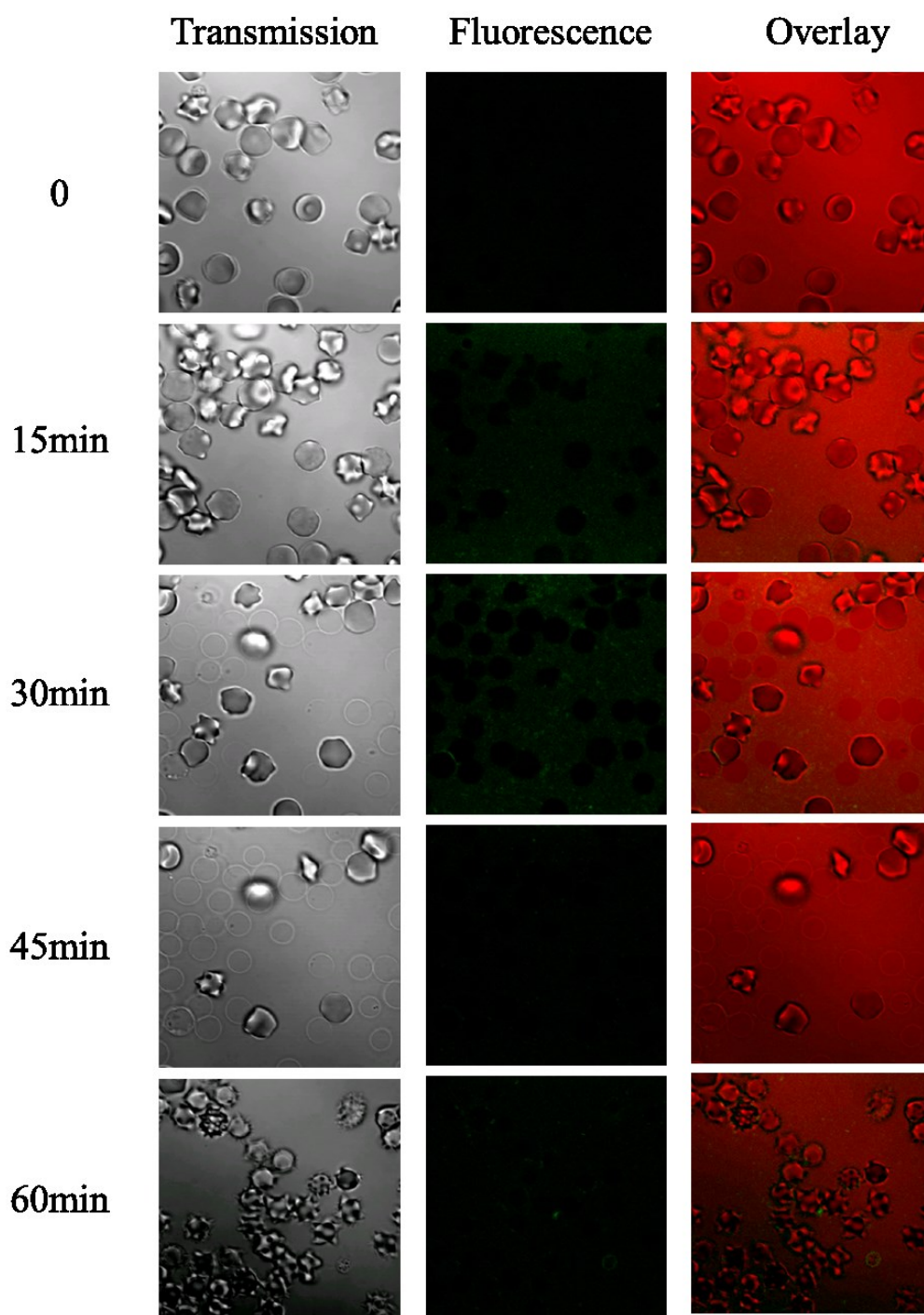


Fig.4-8 Fluorescence micrographs of red blood cell and white blood cell after the treatment with HL/2C<sub>14</sub>ECl including NBDPC.  
[DMPC]=0.45mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>]=0.025mM, [2C<sub>14</sub>ECl]=0.041mM,  
[NBDPC]=0.021mM, Magnification : ×100.

#### 4-4 総括

本章では、ヒト大腸がん(HCT116)細胞移植肝転移モデルマウスに対する87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$  ハイブリッドリポソーム(HL/ $2C_{14}ECI$ )の治療効果について検討し、以下のような興味深い知見が得られた。

1. 肉眼的観察および臓器重量測定の結果より、HL/ $2C_{14}ECI$  の HCT116 細胞移植肝転移モデルマウスに対する肝転移抑制効果を明らかにした。
2. HE 染色した肝臓組織切片観察から、HL/ $2C_{14}ECI$  投与群において転移結節の著しい減少が確認され、HCT116 細胞に対する転移抑制効果を明らかにした。
3. TUNEL 法による肝臓組織切片観察から、HL/ $2C_{14}ECI$  投与群において肝臓組織に TUNEL 陽性細胞が多数観察され、アポトーシス誘導を明らかにした。
4. 蛍光脂質(NBDPC)を含有した HL/ $2C_{14}ECI$  の血球への融合・蓄積の観察から、HL/ $2C_{14}ECI$  は血球に融合しないことを明らかにした。

以上の結果から HL/ $2C_{14}ECI$  のヒト大腸がん(HCT116)細胞移植肝転移モデルマウスに対する肝転移抑制効果は、アポトーシスによることが明らかとなった。また、血球に蓄積しないことから、腫瘍まで到達している可能性が示唆される。今後、大腸がん患者に対する臨床応用が期待できると考えられる。

## 第 5 章 ヒト大腸がん細胞移植モデルマウスに対するハイブリッドリポソームの治療効果

### 5-1 序

実験に用いられる動物は、合目的的に生産・供給される。実験動物は、遺伝学にかつ発育環境および近隣環境について十分制御されているのが理想であり、マウス・ラットなどはそれらの点に留意して生産されるものが多い。動物実験の目的は、供試動物に何らかの実験処置を加えて動物が示す“反応”を観察し、さらにその“反応”を通して加えた実験処置がヒトや他種動物にどのような効果をもたらすかを推測することにある<sup>85)</sup>。Table 5-1 に実験動物をまとめた。中でもマウスは 300 種類以上の近交系が存在するほど実験動物化が進んだ種である<sup>86)</sup>。また遺伝学、発生学、微生物学、腫瘍学、薬理学などの研究分野および医薬品、農薬、食品添加物などの安全性試験領域で広く使用されている動物種であり、使用される理由には Table 5-2 のような点がある<sup>87)</sup>。

がんの転移は局所における増殖、浸潤に始まり、脈管侵襲—血流内移動—接着—血管外逸脱—浸潤増殖といった一連の過程を経て成立する<sup>88)</sup>。また、浸潤・転移の機構に細胞管接着分子が大きな役割を果たしていることがわかってきおり、カドヘリン<sup>89)</sup>など約 20 種類近くの分子が同定されている<sup>90)</sup>。肝転移性は、肝臓以外の臓器にできたがんが血液にのって肝臓に転移したもので、ほぼすべてのがんが肝臓に転移する可能性がある。大腸がんの場合、肝臓、肺、腹膜、リンパ節に転移しやすく、中でも約 60%は肝転移<sup>91)</sup>する。

1980 年代に Fidler らによって大腸がん細胞を脾内移植することによる肝転移モデルマウス<sup>83)</sup>は開発された。この方法は、大腸がんが門脈内に侵入後の転移過程を検討するには有用であると考えられ、手技的に容易で短期間に評価可能で再現性にも優れている<sup>92)</sup>。

本章では、これまでにヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する抗腫瘍効果およびアポトーシス誘導<sup>93)</sup>、担がんモデルマウスに対する高い延命効果<sup>94)</sup>が明らかとなっている 95mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>25</sub> ハイブリッドリポソームを用いて、HCT116 細胞肝転移モデルマウスに対する治療効果について検討した。

Table5-1 実験用動物の分類

動物種	名称
哺乳類	マウス、ラット、ハムスター類、モルモット その他げっ歯類(ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ)
鳥類	ウズラ、ニワトリ
両生類・は虫類	アフリカツメガエル
魚類	メダカ
無脊椎動物	ショウジョウバエ(イエバエ、カ類、ゴキブリ類)

Table5-2 マウスを使用する利点

1. 環境に順応性があり、飼育が容易である。
2. 多産で、妊娠期間が短いため、多数の動物を一度にそろえることができる。
3. 世代更新が早く近交退化減少が起こりにくいので、多くの近交系が作出されている。
4. 大部分の染色体の形態学的同定が可能で遺伝子マップが作成されている。
5. さまざまな疾患モデル動物が作られている。
6. ノーマルデータが多い。
7. 自然発生腫瘍が多い。
8. 免疫機能が発達している。



## 5-2 実験

### 5-2-1 試料

リン脂質(DMPC)は、2-2-1 と同様のものを使用した。

＜界面活性剤＞

Polyoxyethylene (25) lauryl ether ( $C_{12}(EO)_{25}$ ) ( $M_w = 1286$ )は、市販品(日光ケミカルズ)をそのまま使用した。以下に構造を示す。



### 5-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

ハイブリッドリポソームは、2-2-2 と同様の方法で調製を行った。

### 5-2-3 蛍光脂質含有ハイブリッドリポソームの調製

蛍光脂質含有ハイブリッドリポソームの調製は、3-2-4 と同様の方法で調製を行った。

### 5-2-5 担がんモデルマウスの作製

動物は、SCID マウス(C.B-17/Icr-scid/scidJcl) (雌性、5 週齢、日本クレア)を用い、3 日間の馴化後、実験に使用した。室温  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 10\%$ 、水および餌はオートクレーブにより滅菌したものを自由に摂取させた。

移植日の体重をもとに、層別連続無作為化法により 1 群 5 匹で群分けを行った。群分け後、脾臓にヒト大腸がん(HCT116)細胞を移植( $5.0 \times 10^6$  cells/body)し、肝転移モデルマウスの作製を行った<sup>83)</sup>。

### 5-2-6 担がんモデルマウスに対する治療実験

95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$  ハイブリッドリポソーム(HL25)の担がんモデルマウスに対する治療実験は、延命率および組織切片観察により評価した。

治療実験のスケジュールは、ヒト大腸がん(HCT116)細胞移植 1 時間後に 5% glucose(Control)、DMPC、HL25 をマウスの尾静脈内へ 1 日 1 回投与(10ml/kg)し 14 日間投与を行った。治療効果の判定は(5-1)式により延命率(%)を求め、*in vivo*

における治療効果について検討した。

$$\text{Survival ratio(\%)} = T/C \times 100 \quad (5-1)$$

#### 5-2-6 HE 染色による組織切片観察

HE 染色による組織切片観察は、4-2-7 と同様の方法で行った。

#### 5-2-7 TUNEL法によるアポトーシスの検出方法<sup>84)</sup>

TUNEL法によるアポトーシスの検出は、4-2-7と同様の方法で行った。

#### 5-2-8 CEA免疫染色による組織切片観察

ハイブリッドリポソームによる肝転移抑制効果をCEA免疫染色により評価した。実験方法は、4-2-8と同様の方法でパラフィン切片を作成し、内因性ペルオキシターゼを除去した。その後、大腸がんの腫瘍マーカーの1つであるCEA(Carcinoembryonic Antigen)免疫染色を行った。

### 5-3 結果と考察

#### 5-3-1 担がんモデルマウスに対するハイブリッドリポソームの治療効果

95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$  ハイブリッドリポソーム(HL25)の *in vivo* における肝転移モデルマウスに対する治療効果について検討した。

Fig. 5-1 および Table 5-3 に示す。Control 群の平均生存日数  $30 \pm 0$  日と比較して、DMPC 単一リポソームでは  $32 \pm 5$  日、HL 投与群では  $38 \pm 6$  日であり、HL 投与群では顕著な延命効果(127%)が得られた。

投与終了翌日に解剖し採取した肝臓の写真を Fig. 5-2、体重比臓器重量を Fig. 5-3、Table 5-2 に示す。写真からも明らかなように、DMPC 投与群では Control 群と同様で多くの転移が見られ、臓器重量も増加した。HL25 投与群では転移が少なく、臓器重量のがん細胞を移植していない Normal 群と同様であり転移の抑制効果が得られた。

以上の事より、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$  ハイブリッドリポソーム(HL25)のヒト大腸(HCT116)細胞移植肝転移モデルマウスに対する延命効果が明らかとなった。

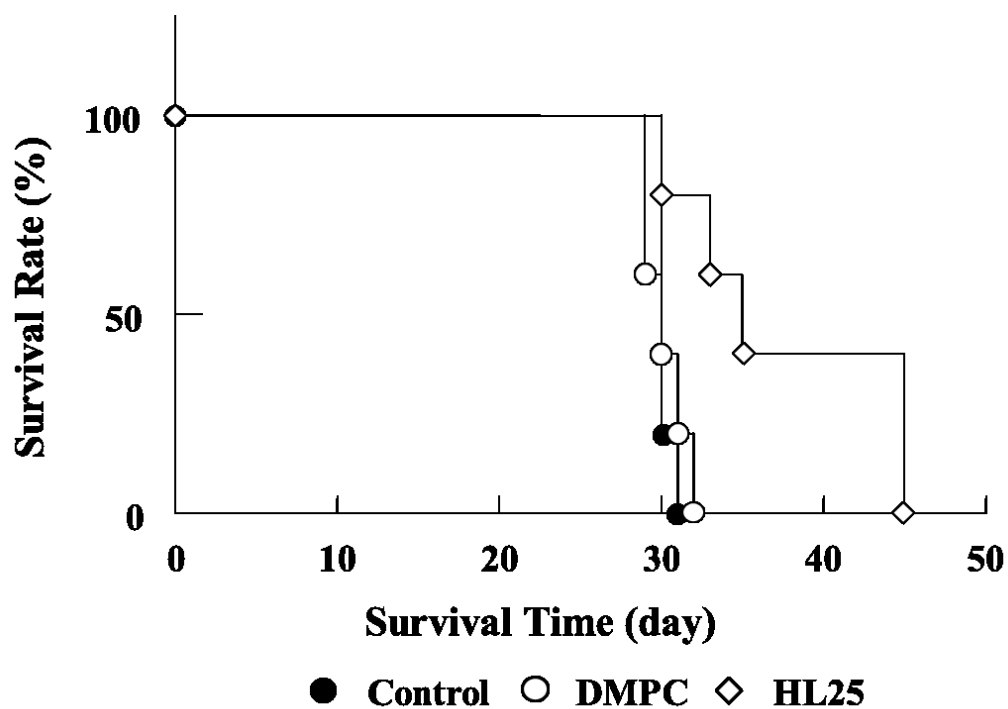


Fig. 5-1 Survival curves of mice treated with hybrid liposomes after the inoculation of HCT116 cells.

Table 5-3 Survival curves of mice treated with hybrid liposomes after the inoculation of HCT116 cells.

Sample	Mean survival time (day)	Survival rate (%)
● Control (5%glucose solution)	30±0	—
○ DMPC Liposome	32±5	107
◇ DMPC/5mol%C <sub>12</sub> (EO) <sub>25</sub>	38±6	127 *

\*: p < 0.05

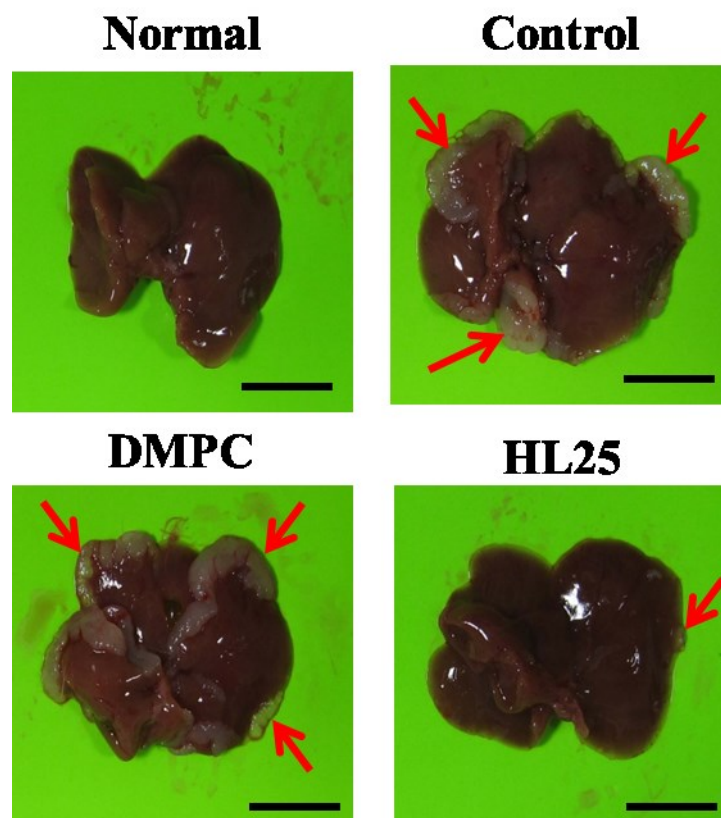


Fig. 5-2 Photographs of liver of hepatic metastasis mice models treated with HL25 after the inoculation of HCT116 cells.

Arrow : tumor, Scale bar: 1cm

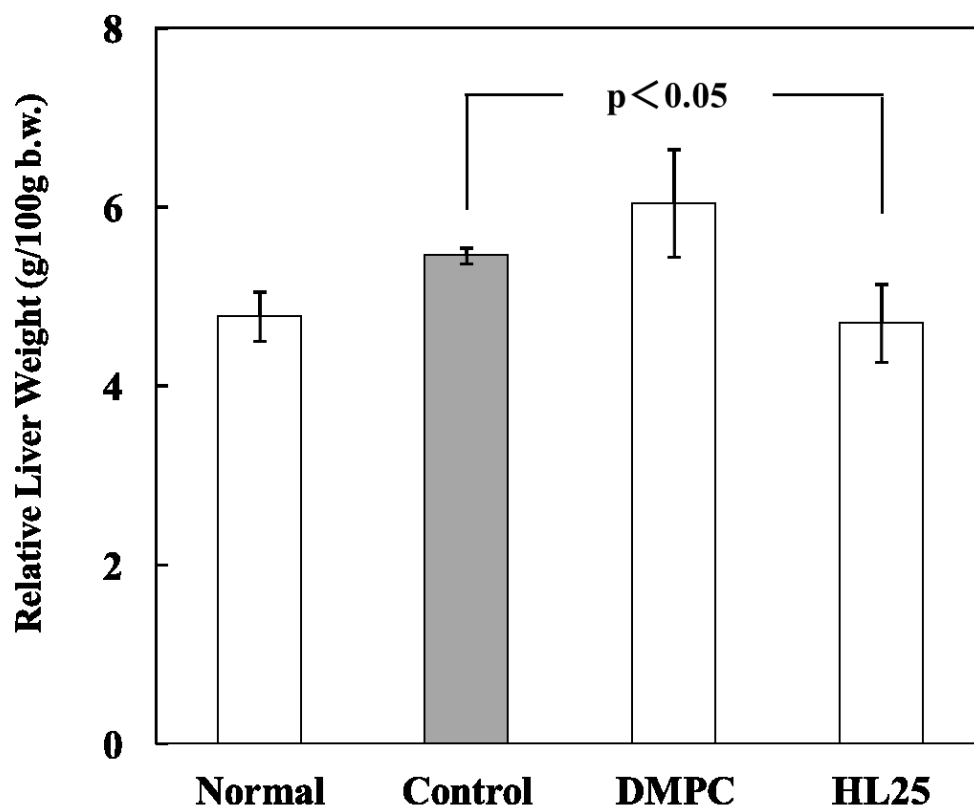


Fig. 5-3 Relative liver weight of hepatic metastasis mice models treated with HL25 after the inoculation of HCT116 cells.

Table 5-4 Liver weight of hepatic metastasis mice models treated with HL25 after the inoculation of HCT116 cells.

	Dose (mg/kg)	Relative liver weight (g/100g b.w.)
Normal		4.77±0.28
Control	—	5.45±0.09
DMPC liposomes	DMPC 136	6.04±0.61
DMPC/5mol%C <sub>12</sub> (EO) <sub>25</sub>	DMPC 136	4.70±0.44*
	C <sub>12</sub> (EO) <sub>25</sub> 11.7	

\* : p<0.05

### 5-3-2 HE 染色による組織切片観察

95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$  ハイブリッドリポソーム(HL25)の *in vivo* における肝転移モデルマウスに対する治療効果を、HE 染色した肝臓組織切片観察により評価した。結果を Fig. 5-4 に示す。

DMPC 投与群では、Control 群と同様に広範囲でのがん組織の増大と多数の転移結節などの異常な所見が認められた。しかし、HL25 投与群においては、転移結節の著しい減少が確認され、Normal 群と同様な結果が得られた。

以上の結果から、担がんモデルマウスに対する 95mol% DMPC/5mol%  $C_{12}(EO)_{25}$  ハイブリッドリポソームの肝転移抑制効果が確認された。

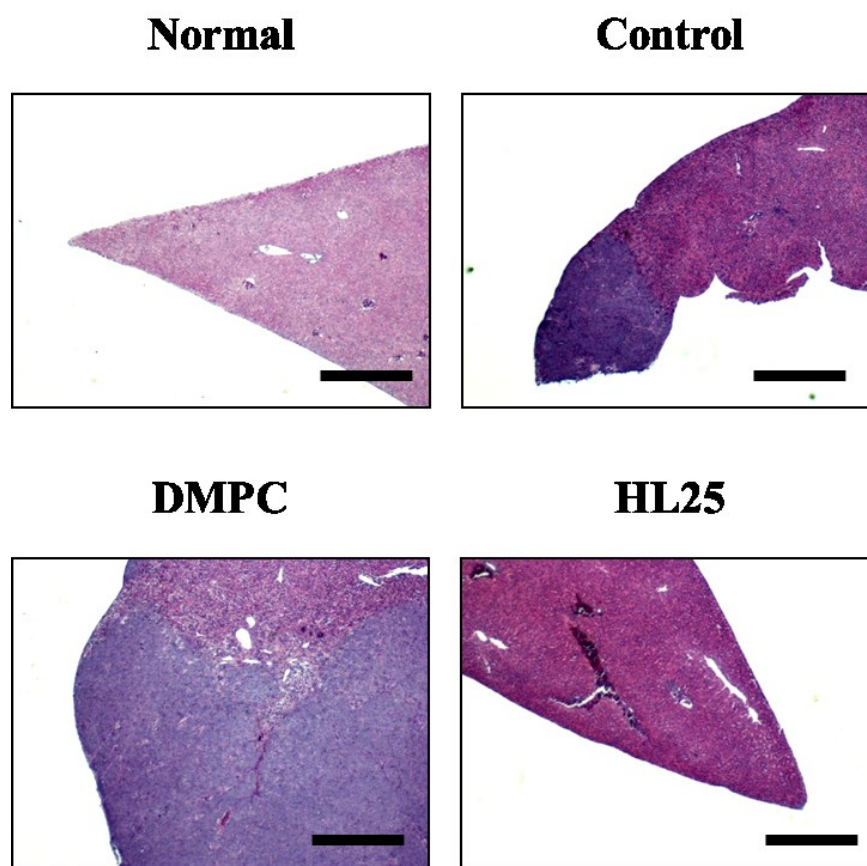


Fig. 5-4 Micrographs of liver tissue of hepatic metastatic mice models treated with HL25 after the inoculation of HCT116 cells using HE method. Scale bar : 0.5mm, Magnification :  $\times 40$

### 5-3-3 TUNEL 法によるアポトーシスの検出

95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$  ハイブリッドリポソーム(HL25)の、*in vivo* における担がんモデルマウスに対する腫瘍組織のアポトーシス誘導について検討した。投与終了翌日に肝臓を採取後、パラフィン切片を作成し TUNEL 法により顕微鏡観察を行った。結果を Fig. 5-5 に示す。

HL25 投与群において、矢印で示したようにアポトーシス陽性細胞である茶色に染色された細胞が多く観察され、アポトーシス誘導が明らかになった。DMPC 単一リポソーム投与群において、アポトーシス陽性細胞は観察されなかった。

以上の結果から、担がんモデルマウスに対する 95mol%DMPC/5mol%  $C_{12}(EO)_{25}$  ハイブリッドリポソームのアポトーシス誘導による肝転移抑制効果が明らかとなった。

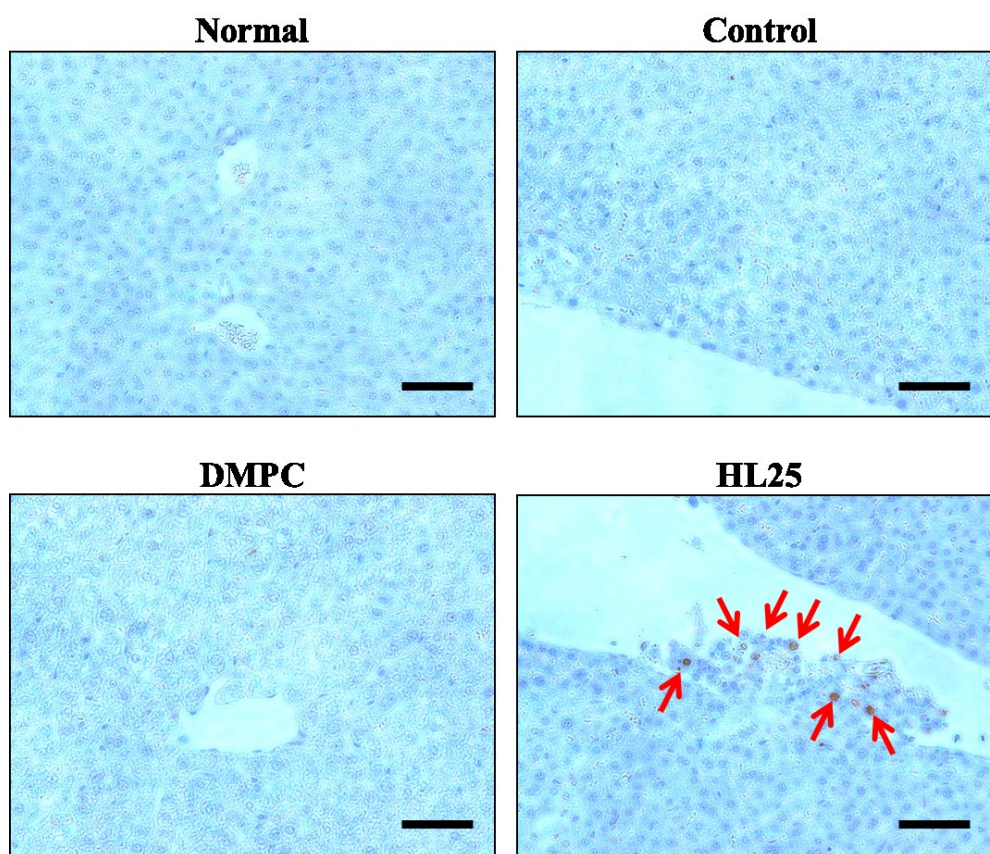


Fig. 5-5 Micrographs of liver tissue of hepatic metastatic mice models treated with HL25 after the inoculation of HCT116 cells using TUNEL method.

Arrows : apoptotic cells. Scale bar : 0.1mm, Magnification :  $\times 200$ .



#### 5-3-4 ハイブリッドリポソームの腫瘍細胞への選択的蓄積

95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$  ハイブリッドリポソーム(HL25)の、*in vivo* での腫瘍組織への集積を明らかにするために、蛍光標識脂質(NBDPC)を含有した 91mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$ /4mol%NBDPC ハイブリッドリポソーム(HL25/NBDPC)を用いた組織切片観察により検討した。

HL25/NBDPC 投与後の肝臓の蛍光顕微鏡画像を Fig. 5-6 に示す。肝転移モデルマウスに対して DMPC 単一リポソームを投与したところ、投与後 12 時間で蛍光の減少が見られ 24 時間後には代謝された。一方、HL25/NBDPC においては HL25 投与後 24 時間でも蛍光が見られ、長時間蓄積することが示唆された。一方、正常マウスでは HL25 投与後 30 分後に蛍光が見られ、3 時間後には蛍光が減少し、その後代謝されたことが確認され、これまでの結果と同様に健康な場合には数時間で肝臓において代謝されることが確認された。

次に、大腸がんの腫瘍マーカーである CEA 免疫染色した組織切片観察の結果を Fig. 5-7 に示す。HL25 の集積した領域と重複しており、また投与 24 時間後でも強い蛍光が観察されたことから、HL25 が腫瘍部位に特異的に長時間集積していることが確認された。

以上の結果から、ヒト大腸がん(HCT116)細胞移植肝転移モデルマウスに対して、DMPC 単一リポソームに比べて 91mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$ /4mol%NBDPC ハイブリッドリポソームでは投与後 24 時間でも蛍光が見られ、腫瘍部分へ長時間蓄積することで治療効果を示すことが示唆された。正常マウスに対しては、投与後 3 時間に蛍光量が減少し、速やかに代謝されることが確認された。

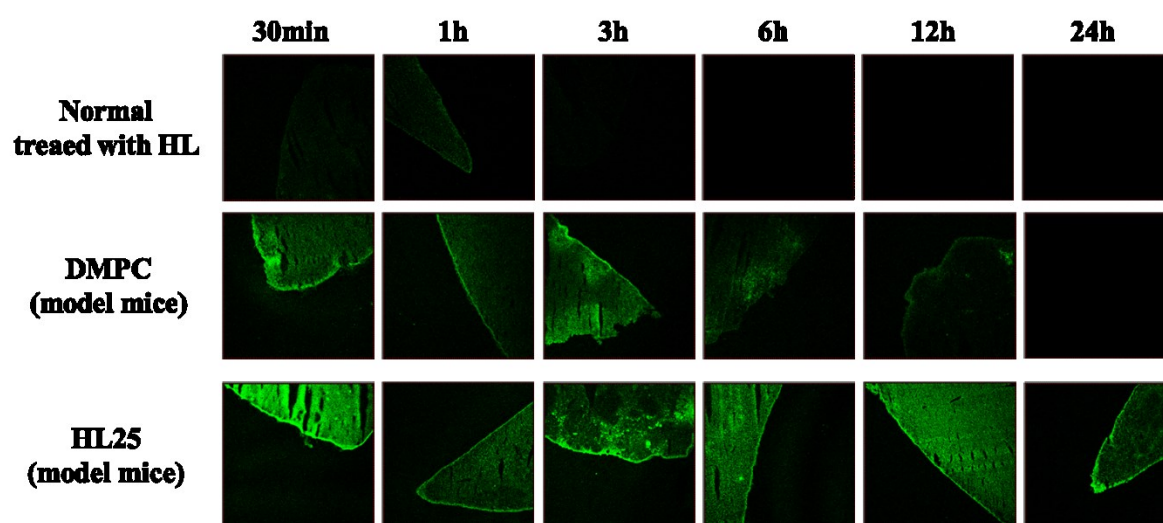
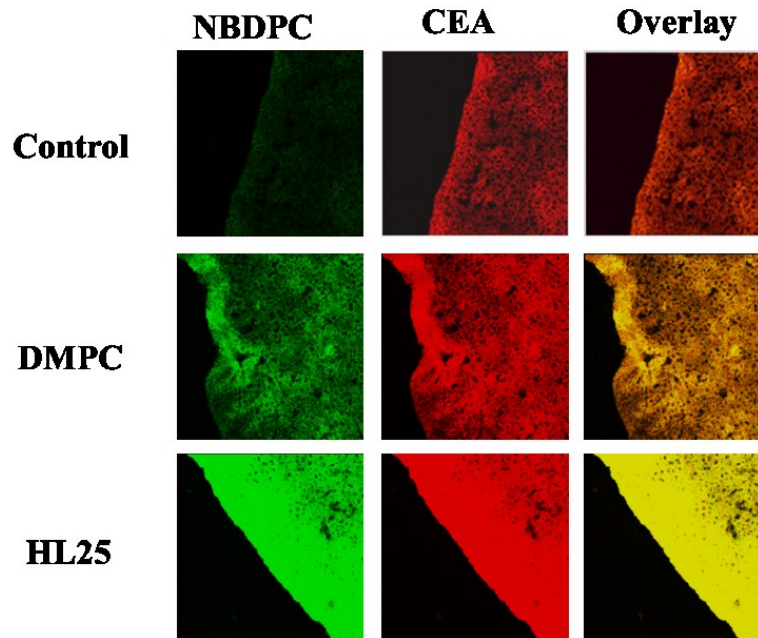


Fig. 5-6 Fluorescence micrographs of liver slices in hepatic metastasis mice models after the intravenous injection of HL25 including NBDPC.  
 [DMPC]=10mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>25</sub>]=0.6mM, [NBDPC]=0.44mM,  
 Magnification : ×10.

**(A)**



**(B)**

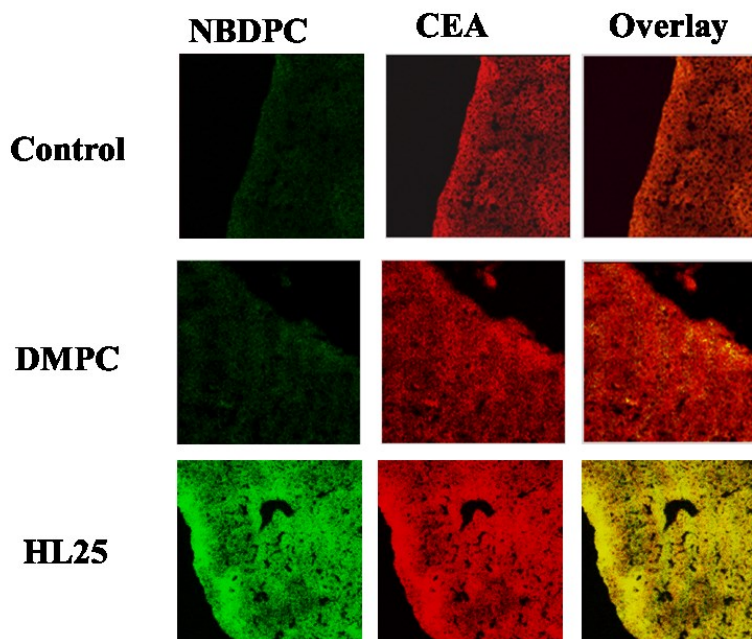


Fig.5-7 CEA immunostaining of liver tissue of hepatic metastatic mice models treated with HL25 including NBDPC of the intrasplenic inoculation of HCT116 cells for 6h (A) and 24h (B). Magnification :  $\times 20$ .

#### 5-4 総括

本章では、ヒト大腸がん(HCT116)細胞移植肝転移モデルマウスに対する95mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>25</sub> ハイブリッドリポソーム(HL25)の治療効果について検討し、以下のような興味深い知見が得られた。

1. HCT116 細胞移植肝転移モデルマウスに対する治療実験から、HL25 投与群では127%の延命効果が得られた。また、肉眼的観察および重量測定から、転移の抑制効果が明らかにした。
2. HE 染色した肝臓組織切片観察から、HL25 投与群において、腫瘍の増大および転移結節数が著しく抑えられており、HCT116 細胞に対する転移抑制効果を明らかにした。
3. TUNEL 法による肝臓組織切片観察から、HL25 投与群において肝臓組織にTUNEL 陽性細胞が多数観察され、アポトーシス誘導を確認した。
4. 腫瘍組織への融合・蓄積の観察および CEA 免疫染色した組織切片観察から、HL25 投与群ではサンプル投与後 24 時間でも蛍光が見られ、腫瘍に特異的に長時間蓄積することが示唆された。

以上の結果から、HL25 のヒト大腸がん(HCT116)細胞移植肝転移モデルマウスに対する肝転移抑制効果が明らかになった。HL25 は腫瘍に特異的に長時間蓄積し、アポトーシスを誘導することが確認された。

## 第6章 ハイブリッドリポソームのヒトリウマチ滑膜細胞に対する増殖抑制効果

### 6-1 序

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis : RA)は、膠原病などの自己免疫疾患のひとつとしてとらえられている。自己免疫疾患とは、免疫に異常が起こり、自分自身の正常な細胞や組織を異物とみなして攻撃し、排除しようとすることで起こる病気で、RA の場合は自分自身の関節(滑膜)を攻撃する<sup>95)</sup>。RA は手足の関節だけでなく全身に起こる<sup>96)</sup>。目の外側の強膜が炎症を起こす強膜炎、視力障害、肺の胸膜の炎症による胸膜炎、肺の組織の炎症の間質性肺炎、心臓の組織が炎症を起こす心筋炎などがある<sup>96)</sup>。

1942 年 P. Klemperer により提唱された膠原病は、フィブリノイド変性と結合組織が粘液性膨化する病理組織学的特徴がある<sup>97)</sup>。また、結合組織だけでなく血管にもおこるため、全身どこでも同時に複数起こる可能性がある<sup>98)</sup>。膠原病とは、症状に共通点を持つ病気の「グループの総称」であり、Table 6-1 に病名と症状をまとめた。

RA は、複数の遺伝的要因に環境因子が加わり自己免疫応答が惹起され、これらに関節の慢性炎症病態が対照的な部位の複数の関節に生じて、進行性の破壊性関節炎に至ると考えられている<sup>99)</sup>。遺伝的素因に環境因子が加わり T 細胞を中心とした自己免疫応答が誘発され、関節滑膜に炎症細胞(免疫細胞)が集まる。そして滑膜において炎症が起こり、集積した炎症細胞(免疫細胞)が活性化しインターロイキン(IL)-1、IL-6、腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ などの炎症性サイトカインが分泌される。これらが破骨細胞や軟骨細胞に作用し骨破壊や軟骨破壊を引き起こしたり、滑膜細胞の増殖を促すことでパヌス(肉芽組織)が形成され軟骨および軟骨下骨を浸食し関節が破壊されていく<sup>8)</sup>(Fig. 6-1)<sup>100)</sup>。

関節 RA の根治療法はまだ確立されておらず、現在の関節 RA 治療は薬物療法を中心とし、基礎療法、手術療法、リハビリテーション療法の 4 項目を柱として行われている。薬物療法では、関節破壊の進行を抑制する疾患修飾性抗 RA 薬(Disease Modifying Antirheumatic Drugs : DMARDs)、解熱・鎮痛・消炎を目的とした非ステロイド性抗炎症薬(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs : NSAIDs)、

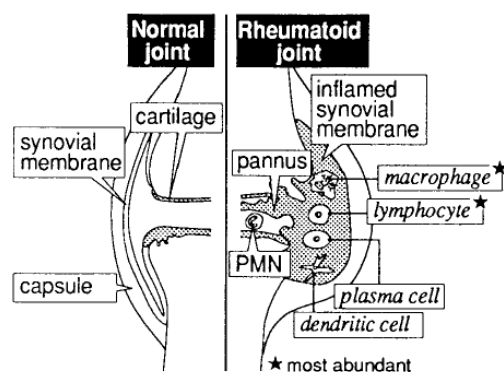


Fig. 6-1 Rheumatoid joint indicating major cell types and sites of joint destruction<sup>100)</sup>.

免疫系の働きや炎症を強く抑えるステロイド薬が用いられる。基礎療法では、患者さんが日頃の生活をいったいどのように送っていくべきかというような指導を行う。手術療法では、増殖した関節の滑膜を取り除く滑膜切除術、破壊された関節を人工関節に置き換える機能再建術などが行われる。また、リハビリテーションでは関節の動く範囲を広げ、血液の流れをよくして痛みや筋肉のこわばりをとるための運動療法、患部を温めて痛みやこわばりを和らげる温熱療法などが行われている。現在日本では生物学的製剤として、腫瘍壊死因子(TNF)阻害薬3種(インフリキシマブ、エタネルセプト、アダリムマブ)とIL-6阻害薬1種(トシリズマブ)が承認・販売されている。しかし、重篤な副作用として肺炎等の感染症や他の合併症に注意が必要である<sup>10)</sup>。

本章では、ハイブリッドリポソームの関節リウマチ治療への応用を目的とし、リン脂質(DMPC)、PEG系界面活性剤(C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub>)からなる95mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub>ハイブリッドリポソームのヒトRA滑膜(HFLS-RA)細胞に対する増殖抑制効果について検討した。

Table 6-1 膠原病の主な病気とあらわれやすい症状

病名	あらわれやすい症状
関節リウマチ	手指関節などのはれ、左右対称性の関節痛
全身エリテマトーテス	発熱、関節痛、紅斑、レイノー現象、脱毛、日光過敏、浮腫
強皮症	レイノー現象、皮膚の硬化、息切れ、胸やけ
多発性筋炎・皮膚筋炎	筋力低下、筋肉痛、関節痛、紅斑、発熱
混合性結合組織病	手指全体のはれ、レイノー現象、関節痛、三叉神経痛
抗リン脂質抗体症候群	習慣流産、若年性の血栓
シェーグレン症候群	口内の渇き、涙が出にくい、耳下線のはれ
スティル病	発熱、関節痛、皮疹、咽頭痛、リンパ節のはれ

## 6-2 実験

### 6-2-1 試料

リン脂質(DMPC)、蛍光標識脂質は、2-2-1 と同様のものを使用した。

#### <界面活性剤>

Polyoxyethylene (23) lauryl ether ( $C_{12}(EO)_{23}$ ) ( $M_w = 1217.5$ )は、Sigma より購入し、文献<sup>102)</sup>に従い精製した後用いた。以下に構造を示す。



### 6-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

ハイブリッドリポソームの調製は、2-2-2 と同様の方法で行った。

### 6-2-2 蛍光標識脂質含有ハイブリッドリポソームの調製

蛍光標識脂質含有ハイブリッドリポソームは、3-2-4 と同様の方法で行った。

### 6-2-4 動的光散乱法による膜直径の測定

動的光散乱法による膜直径の測定は、2-2-4 と同様の方法で行った。

### 6-2-5 使用細胞

正常ヒト滑膜(HFLS)細胞および慢性関節リウマチ患者由来ヒト滑膜(HFLS-RA)は住商ファーマインターナショナル株式会社(ATCC)より購入したものを使用した。ヒト滑膜細胞増殖培地(Basel Medium + Growth Supplements)を培養培地として用い、37°C、CO<sub>2</sub>濃度 5%の条件で培養を行った。

### 6-2-6 酵素活性測定法による 50%増殖抑制濃度の測定

ハイブリッドリポソームの正常ヒト滑膜(HFLS)およびリウマチ患者由来ヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対する 50%増殖抑制濃度の測定は、3-2-7 と同様の方法で行った。

#### 6-2-7 共焦点レーザー顕微鏡による細胞への融合・蓄積の観察

ハイブリッドリポソームの滑膜細胞への融合・蓄積の観察は、35mm Glass bottom dish に、細胞懸濁液( $3.5 \times 10^4$  cells/ml)を 2ml( $7 \times 10^5$  cells)播種し、24 時間培養後、3-2-8 と同様の方法で行った。

#### 6-2-8 TUNEL 法によるアポトーシスの検出

TUNEL 法によるアポトーシスの検出は、3-2-11 と同様の方法で行った。

#### 6-2-9 フローサイトメーターによる DNA 含量の測定

フローサイトメーターによる DNA 含量の測定は、3-2-12 と同様の方法で行った。

#### 6-2-10 PhiPhi Lux を用いたカスパーズ-3 活性の観察

ハイブリッドリポソームのヒト RA 滑膜(HFLS-RA)細胞に対するアポトーシス経路におけるカスパーズの関与について、(Caspase-3 Assay Kit) (PhiPhiLux-G1D2, フナコシ株式会社)<sup>103, 104)</sup>を用いて検討した。

35mm Glass bottom dish (coat dish)に細胞懸濁液( $5.0 \times 10^4$  cells/ml)を 2ml ( $1.0 \times 10^5$  cells) 播種し、24 時間培養後、試料溶液を 0.6ml 添加した。その後、10 $\mu$ M PhiPhi Lux 溶液(10%血清含有)を添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>で1時間染色した。染色した細胞は、Flow Cytometry dilution buffer で数回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP, Leica Microsystem)を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。光源には Ar レーザー(488nm)を用い、波長域 515～565nm で蛍光を検出した。

#### 6-2-11 ミトコンドリア膜電位測定

ミトコンドリア膜電位の測定は、3-2-14 と同様の方法で行った。

#### 6-2-12 細胞の膜流動性測定

滑膜細胞および正常滑膜細胞の膜流動性は、分光蛍光光度計(F-2000, 日立)を用い蛍光偏光解消法により測定した。蛍光プローブには、膜内部の流動性を反映させるといわれている 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH, ナカライテスク)を用いた。



培養フラスコ(培養面積  $25\text{cm}^2$ )に細胞を 5ml 播種した。他の実験条件と揃えるため 24 時間培養後、PBS(-)2ml に細胞数を  $2.0 \times 10^4$  cells/ml に調製した。細胞を 1cm 角の石英セルに 2.0ml 分取し、循環恒温槽中で  $37^\circ\text{C}$  とした後、DPH([DPH]= $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$ , 溶媒: テトラヒドロフラン)を  $2.0\mu\text{l}$  添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 15 分間放置後、励起波長  $357\text{nm}$  にて  $432\text{nm}$  の蛍光偏光強度成分を測定し、 $P=(I_{vv}-C_f I_{vh})/(I_{vv}+C_f I_{vh})$  より蛍光偏光度(P)を算出した。ここで、 $I_{vv}$  および  $I_{vh}$  は、それぞれ垂直直線偏光励起光の振動方向と垂直に振動する偏光強度成分及び平行に振動する偏光強度成分である。 $C_f$  は  $C_f=I_{hv}/I_{hh}$  より求められる補正係数であり、 $I_{hh}$  および  $I_{hv}$  は、それぞれ水平直線偏光励起光の振動方向と平行に振動する偏光強度成分及び垂直に振動する偏光強度成分である。

## 6-3 結果と考察

### 6-3-1 ハイブリッドリポソームの滑膜細胞に対する増殖抑制効果

95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソーム(HL23)の正常ヒト滑膜(HFLS)およびヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対する 50%増殖抑制濃度( $IC_{50}$  : 50% Inhibitory Concentration)について検討を行った。結果を Fig.6-2 および Table 6-2 に示す。

HFLS-RA 細胞に対する HL23 $IC_{50}$  値  $0.47\pm0.06mM$  は、HFLS 細胞の  $IC_{50}$  値  $0.66\pm0.06mM$  より有意に低く顕著な増殖抑制効果が明らかとなった。一方、DMPC 単一リポソームの  $IC_{50}$  値はいずれの細胞でも  $2mM$  以上であり、HFLS-RA 細胞の 3~4 倍の値を示した。このことから、HL23 は HFLS-RA 細胞に対してより低濃度で増殖抑制効果を示すことが明らかになった。

以上の結果から、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソーム(HL23)のヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対する顕著な細胞増殖抑制効果が得られた。また、正常細胞に対する毒性は低く、リウマチ患者由来の滑膜細胞に対して顕著な細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

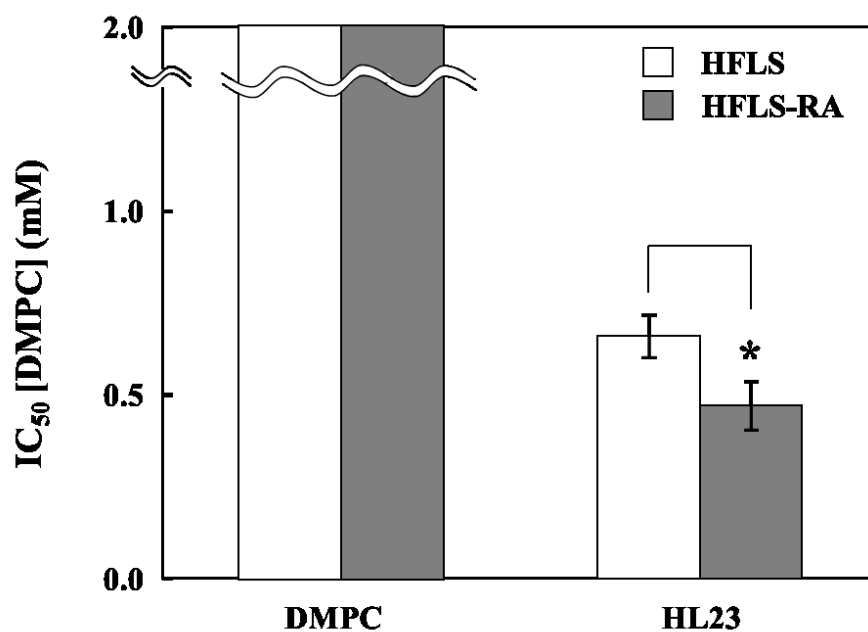


Fig.6-2 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) for HL23 on the growth of HFLS and HFLS-RA cells. Data represent the mean  $\pm$  S.D. \* :  $p=0.036$

Table 6-2 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) for HL23 on the growth of HFLS and

Sample	50% inhibitory concentration (mM)	
	HFLS	HFLS-RA
DMPC	[DMPC]>2.0	[DMPC]>2.0
HL23	[DMPC]=0.66 $\pm$ 0.06	[DMPC]=0.47 $\pm$ 0.06
	[C <sub>12</sub> (EO) <sub>23</sub> ]=0.035 $\pm$ 0.003	[C <sub>12</sub> (EO) <sub>23</sub> ]=0.025 $\pm$ 0.003

HFLS-RA cells.

Data represent the mean  $\pm$ S.D.

### 6-3-2 ハイブリッドリポソームの滑膜細胞への融合・蓄積

ハイブリッドリポソームの正常ヒト滑膜(HFLS)およびヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対する融合・蓄積を検討するため、蛍光標識脂質(NBDPC)を含有した 96mol%DMPC/4mol%NBDPC(DMPC/NBDPC) および 91mol%DMPC/5mol% C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub>/4mol%NBDPC ハイブリッドリポソーム(HL23/NBDPC)を用いて共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。結果を Fig.6-3 に示す。

HFLS-RA 細胞において、DMPC/NBDPC および HL23/NBDPC 添加直後では、融合・蓄積は観察されなかった。しかしながら、時間の経過に伴い細胞膜を透過して細胞質内で蛍光強度が高くなり、HFLS-RA 細胞への融合・蓄積が観察された。一方、HFLS 細胞においては DMPC/NBDPC および HL23/NBDPC とともに、融合・蓄積は観察されなかった。

以上の結果から、96mol%DMPC/4mol%NBDPC、91mol%DMPC/5mol% C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub>/4mol%NBDPC ハイブリッドリポソームはヒト RA 滑膜(HFLS-RA)細胞に融合・蓄積するが、正常ヒト滑膜(HFLS)細胞には融合・蓄積しないことが明らかとなった。

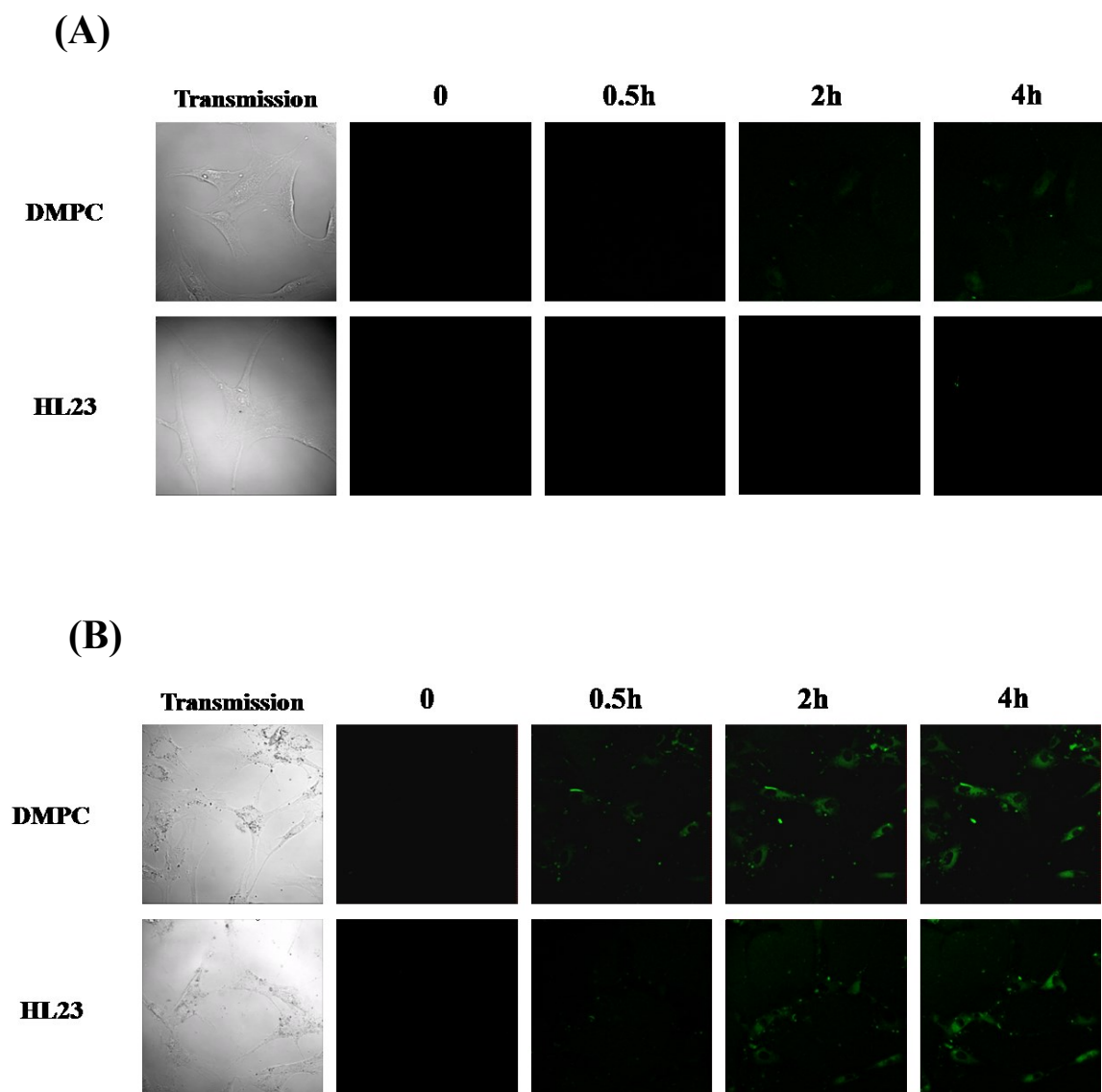


Fig.6-3 Fluorescence micrographs of HFLS (A) and HFLS-RA (B) cells after the treatment with DMPC liposomes and HL23 including NBDPC.

Magnification :  $\times 40$ .

[DMPC]=0.45mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub>]=0.025mM, [NBDPC]=0.020mM.

### 6-3-3 ハイブリッドリポソームの滑膜細胞に対するアポトーシス誘導

6-3-1 および 6-3-2 から、ヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対する細胞増殖抑制効果および細胞膜への特異的な融合・蓄積が明らかとなったことから、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソーム(HL23)のアポトーシス誘導を、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察およびフローサイトメーターにより検討した。

TUNEL 法を用いた細胞死観察の結果を Fig. 6-4 に示す。写真からも明らかなように、DMPC 処理ではアポトーシス陽性細胞は観察されなかったが、HL23 処理 24h で緑色蛍光が観察され、アポトーシスを誘導していることが確認された。

さらに、フローサイトメーターを用いてアポトーシスにより断片化された DNA の含量を測定した。結果を Fig. 6-5 に示す。DMPC 単一リポソームでは断片化は得られなかったが、HL23 では 24.8%の DNA 断片化率が得られた。

以上のことから、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソームは、ヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

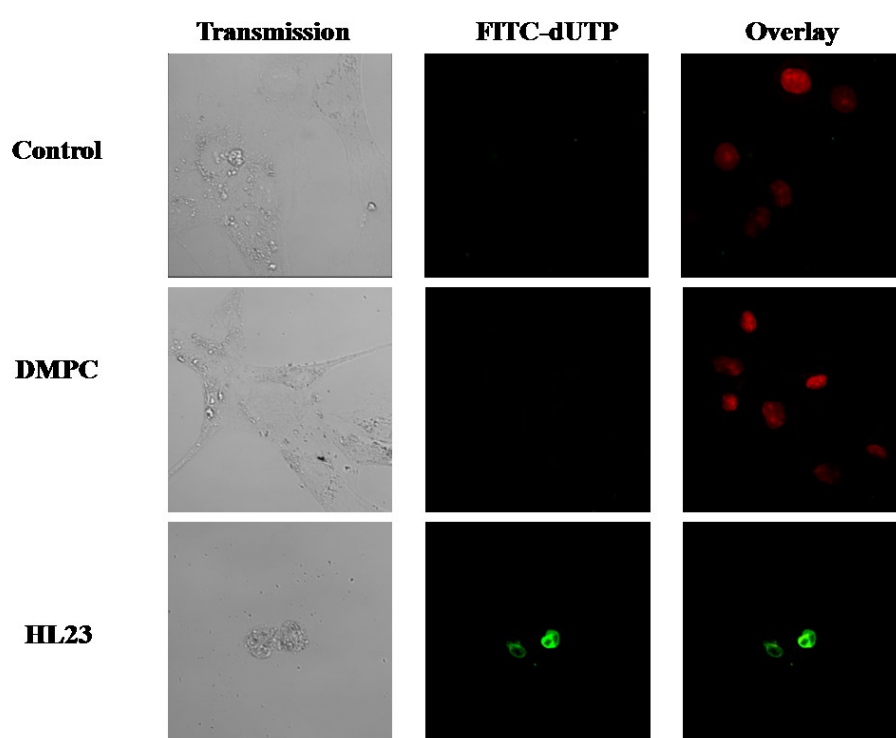


Fig.6-4 Fluorescence micrographs of HFLS-RA cells using TUNEL assay treated with HL23 for 24h. Magnification :  $\times 80$ .  
[DMPC]=11.5mM, [C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub>]=0.61mM.

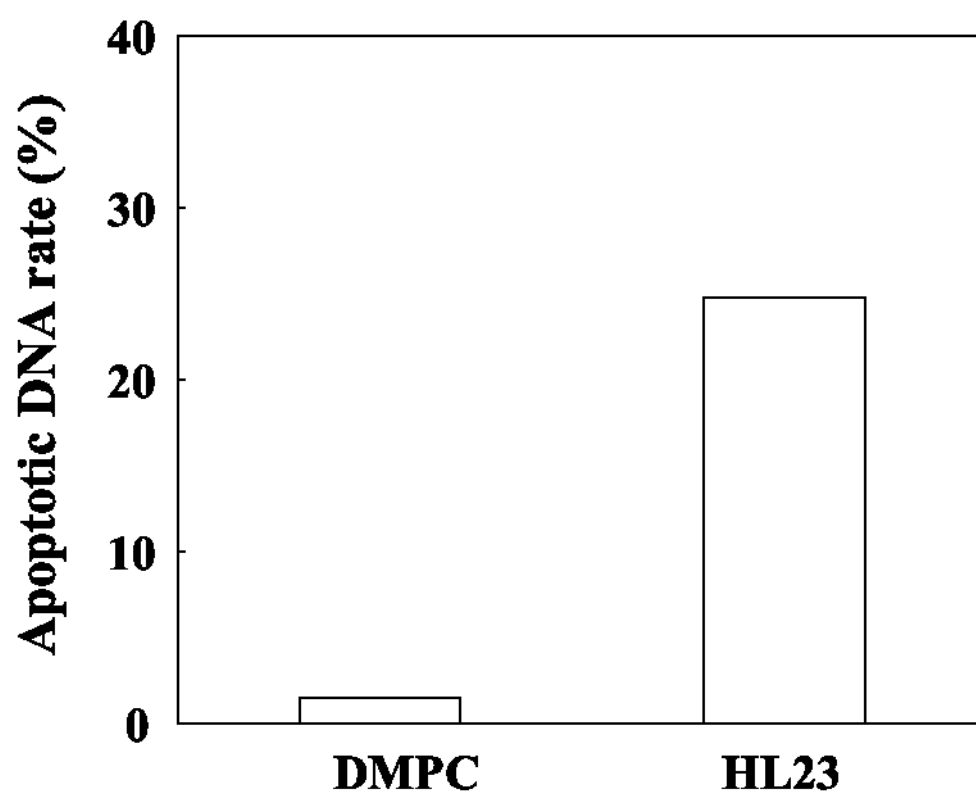


Fig. 6-5 Apoptotic DNA rate of HFLS-RA cells treated with DMPC liposomes and HL23 for 24h. Data represent the mean  $\pm$  SD.



#### 6-3-4 アポトーシス誘導におけるカスパーズ-3 の活性化

前節においてアポトーシスを誘導することが明らかとなった、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソーム(HL23)のヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムにおける、カスパーズ-3の関与を PhiPhi Lux により検討した。結果を Fig. 6-6 に示す。

HL23 で処理した HFLS-RA 細胞においては、6 時間でアポトーシスによる細胞の形態変化およびカスパーズの活性を示す緑色蛍光が観察されたが、DMPC 単一リポソームでは蛍光は見られなかった。

以上の結果から、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソームは、ヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対しアポトーシスを誘導する際、カスパーズ-3 を活性化していることが明らかとなった。

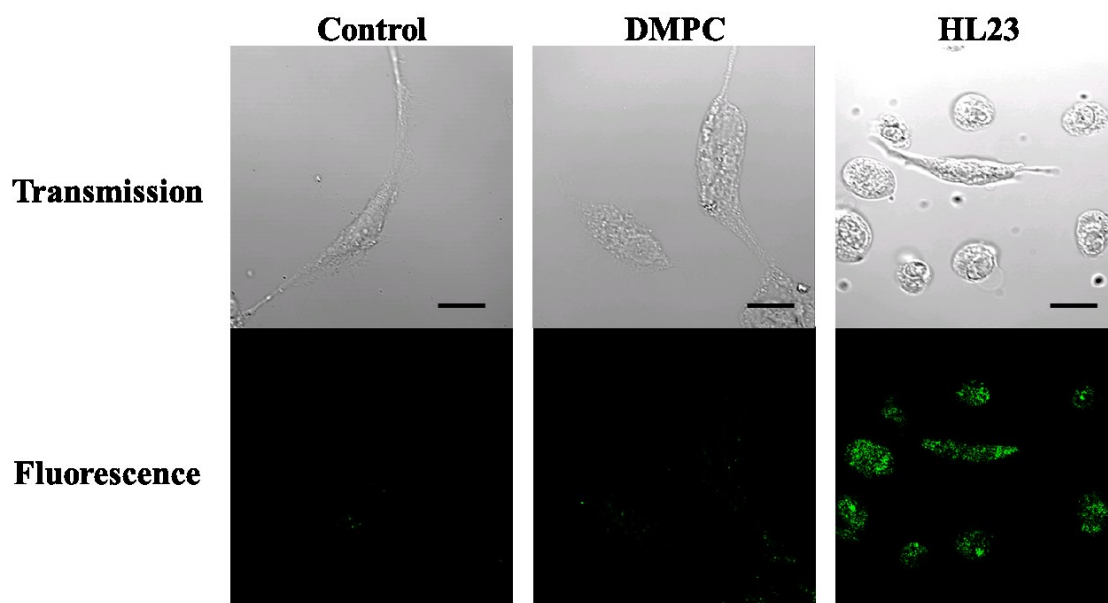


Fig. 6-6 Activation of caspase-3 of HFLS-RA cells treated with DMPC liposomes and HL23 for 6h.

DMPC : [DMPC]=11.5mM

HL23 : [DMPC]=11.5mM,[ $C_{12}(EO)_{23}$ ]=0.061mM

Scale bar : 20 $\mu$ m.

### 6-3-5 アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与

6-3-3 においてアポトーシスを誘導することが明らかとなった、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソーム(HL23)のヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムにおける、ミトコンドリアの関与を検討した。結果を Fig. 6-7 に示す。

HL23 で処理した HFLS-RA 細胞において、処理後 1 時間で DiOC<sub>6</sub>(3)の蛍光強度が低下し、ミトコンドリア膜電位が低下していることが明らかとなった。

以上の結果から、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソームは、ヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対しアポトーシスを誘導する際に、ミトコンドリアを経由することが確認された。また 6-3-4 と今回の結果から、HFLS-RA 細胞に対するアポトーシス経路は、カスパー-3 およびミトコンドリアを経由していることが明らかとなった。

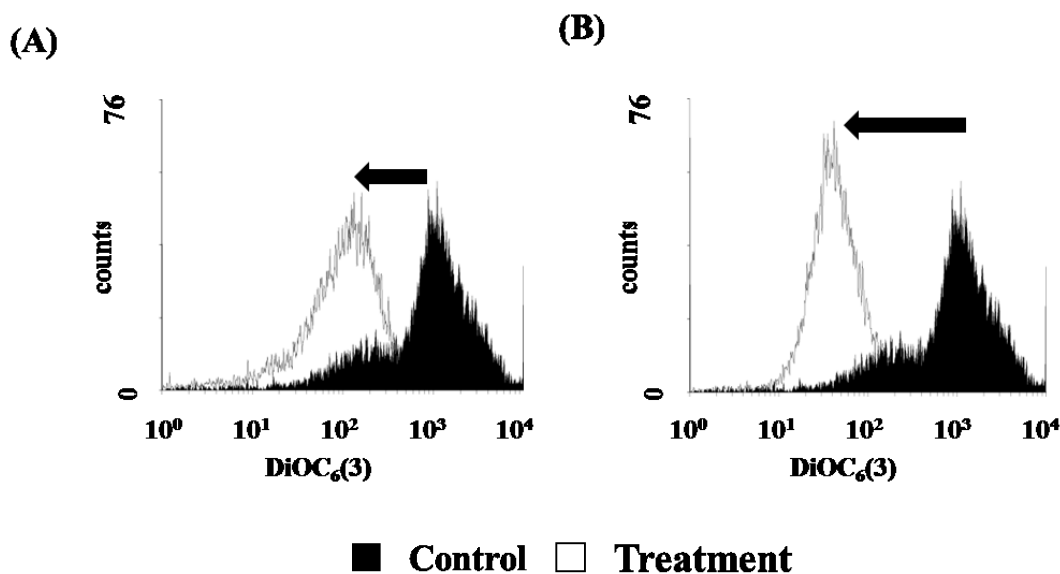


Fig. 6-7 Mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) disruption of mitochondria in HFLS-RA cells by HL23 for (A) 1h and (B) 3h.  
HL23 : [DMPC]=11.5mM, [ $C_{12}(EO)_{23}$ ]=0.61mM

### 6-3-6 ヒトリウマチ滑膜細胞膜の膜流動性

ヒト滑膜(HFLS-RA)細胞および正常ヒト滑膜(HFLS)細胞の細胞膜流動性を、分光蛍光光度計を用いて蛍光偏向解消法により検討した。結果をFig. 6-8に示す。

膜内部の流動性を反映する P 値は、正常滑膜細胞である HFLS 細胞と比較して HFLS-RA 細胞膜では減少しており、HFLS 細胞に比べ HFLS-RA 細胞膜の膜流動性が高いことが確認された。

以上の結果から、ヒト滑膜(HFLS-RA)細胞の膜流動性は、正常ヒト滑膜(HFLS)細胞の膜流動性より流動性が高いことが明らかとなった。HL23 は、膜流動性の大きな RA 滑膜細胞膜に特異的に融合・蓄積し、アポトーシスを誘導すると考えられる。異常増殖する疾患細胞としてがん細胞に対する HL23 の抑制効果およびアポトーシス誘導に加え、今回初めて HL23 の RA 細胞に対する増殖抑制効果およびアポトーシス誘導を明らかにした。

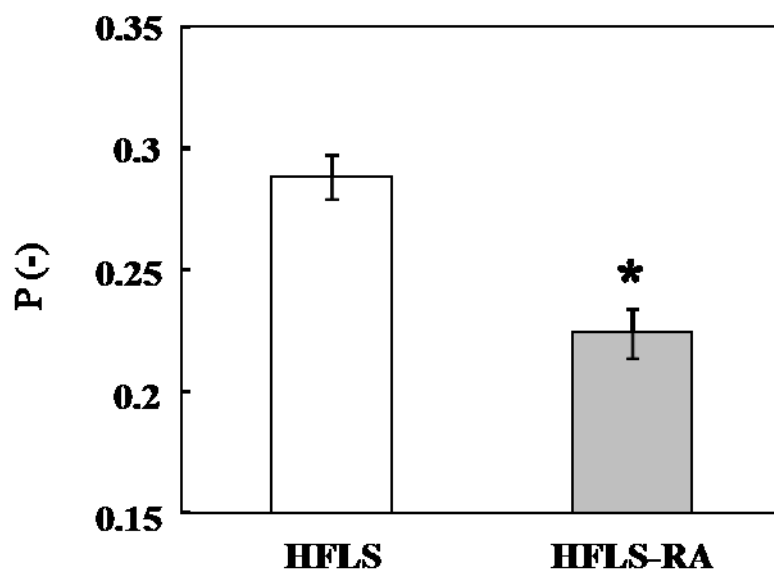


Fig.6-8 Fluorescence polarization (P values) change of DPH-labeled HFLS and HFLS-RA cells. \*: p=0.003

## 6-4 総括

本章では、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_3$  ハイブリッドリポソーム(HL23)のヒト滑膜(HFLS-RA)細胞に対する制がんメカニズムについて検討し、以下のような興味深い知見が得られた。

1. HL23 は HFLS-RA 細胞に対し顕著な増殖抑制効果したが、正常ヒト滑膜(HFLS)細胞に対しては低毒性であることを明らかにした。
2. 蛍光標識脂質(NBDPC)を含有した HL23 による共焦点レーザー顕微鏡を用いた融合・蓄積の観察から、HFLS-RA 細胞に対して特異的に融合・蓄積することを明らかにした。一方、HFLS 細胞には、融合・蓄積しないことを明らかにした。
3. TUNEL 法による画像解析から、アポトーシスを示す緑色蛍光が観察され、さらに、フローサイトメーターを用いた解析から、HL23 処理により高い DNA 断片化率が得られ、HL23 は HFLS-RA 細胞に対してアポトーシスを誘導することを確認した。一方、DMPC は HFLS-RA 細胞に対してアポトーシスを誘導しないことを明らかにした。
4. PhiPhi Lux を用いた解析から、HL23 は HFLS-RA 細胞に対するアポトーシス誘導の際に、カスパー-3 が活性化することを明らかにした。
5. DiOC<sub>6</sub>(3)を用いたミトコンドリア膜電位の測定から、HFLS-RA 細胞にアポトーシスを誘導する際に、ミトコンドリアが関与することを明らかにした。
6. DPH を用いた細胞膜流動性の測定結果から、HFLS-RA 細胞は正常滑膜細胞である HFLS 細胞の細胞膜流動性よりも膜流動性が高いことを明らかにした。

以上の結果から、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_3$  ハイブリッドリポソームが膜流動性の高いヒト滑膜(HFLS-RA)細胞膜に特異的に融合し、アポトーシスを誘導することを明らかにした。アポトーシスシグナルは、ミトコンドリアおよびカスパー-3 を経由することが確認できた。異常増殖する HFLS-RA 細胞は、がん細胞同様に膜流動性が大きく、HL23 が膜流動性の大きな疾患細胞膜をターゲットとして増殖抑制効果およびアポトーシスを誘導したと考えられる。また、

DMPC 単一リポソームも HFLS-RA 細胞に蓄積するが、アポトーシスを誘導しないことから、アポトーシス誘導シグナルが伝わっていない可能性が考えられる。

## 第7章 関節リウマチモデルマウスに対するハイブリッドリポソームの 治療効果

### 7-1 序

関節炎モデルは自然発症モデルと誘発モデルの2つに大別される。前者としては MRL/Mplpr(MRL/1)、NZB/NK マウスが、後者としてはアジュバント関節炎(AA)ラットとⅡ型コラーゲン関節炎(collagen-induced arthritis : CIA)ラットおよびマウス、プリスタン関節炎(PIA)、塩化水銀関節炎ラットなどが知られている<sup>105)</sup>。

CIA は、Trentham が 1977 年に抗コラーゲン抗体(抗ⅡC 抗体)を作製する目的でウシのⅡ型コラーゲン(ⅡC)をラットに免疫したところ、50%以上のラットに多発性関節炎が発症した<sup>106)</sup>。また 1980 年、Courtenary らによってマウスの CIA が作成された。CIA マウスは部分的ではあるがヒトの病態に近いモデルとしてリウマチ(RA)の病態解析および薬効評価系に繁用されている<sup>107)</sup>。

自然発症モデルである SKG マウスは、坂口らにより Balb/c マウスから樹立された<sup>108)</sup>。SKG マウスの関節炎は、生後 2 か月から前趾骨関節に左右対称性に生じ、その後後手関節や足関節に及ぶ。雌のほうが雄よりいくぶん進行が早く重症で、6 ヶ月後には全例が多発性関節炎を呈し関節硬直に至る特徴がある<sup>109)</sup>。

リウマチ発症早期に滑膜に見られる特徴的な変化としては、滑膜線維芽細胞の増殖、リンパ球を中心とした炎症性細胞浸潤、毛細血管の増殖などが挙げられる<sup>110)</sup>。炎症細胞は、接着分子の作用により毛細血管の内皮細胞に付着し、内皮細胞間を通り抜けて血管外に遊走し、活性化されて炎症を持続させる<sup>111)</sup>。また、絨毛状に増殖した滑膜組織は炎症細胞を含んだ肉芽腫(パンヌス)となり、マトリックスメタロプロテアーゼ(Matrix metalloproteases, MMPs)などの蛋白質分解酵素を発現して関節破壊を引き起こす<sup>112-114)</sup>。

本章では、前節においてヒト RA 滑膜(HFLS-RA)細胞に対する増殖抑制効果およびアポトーシス誘導が明らかとなっている 95mol%DMPC/5mol% C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub> ハイブリッドリポソームを用いて、2 種類の関節炎モデル(SKG, CIA)マウスに対する治療効果について検討した。

## 7-2 実験

### 7-2-1 試料

リン脂質(DMPC)、界面活性剤( $C_{12}(EO)_{23}$ )は、6-2-1 と同様のものを使用した。

### 7-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

ハイブリッドリポソームの調製は、2-2-2 と同様の方法で行った。

### 7-2-3 関節リウマチモデルマウスの作製法

慢性関節リウマチを自然発症するモデルは、SKG マウス<sup>108)</sup>(SKG/Jcl, 雄性, 5 週齢, 日本クレア)を用い、投与開始当日の体重をもとに層別連続無作為化法により 3 匹ずつ群分けを行った。その後、生理食塩水に溶解したラミナリン(100mg/ml、Sigam)を 0.3ml(30mg)マウスの腹腔内へ投与し作製した<sup>115)</sup>。

コラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルは、DBA マウス(DBA/1J Sea, 雌性, 5 週齢, 九動株式会社)を用い、初回免疫にウシⅡ型コラーゲン(ⅡC, Chondrex)と完全フロントアジュバント(FCA, テクノケミカル株式会社)の等量混合液 0.1ml をマウスの尾根部皮下に注射した。初回免疫の 21 日後、追加免疫としてウシⅡ型コラーゲンと不完全アジュバント(FIA, テクノケミカル株式会社)の等量混合液 0.1ml をマウスの尾根部皮下に注射し作製した<sup>116)</sup>。

### 7-2-4 関節リウマチモデルマウスに対する治療実験

ハイブリッドリポソームの関節リウマチモデルマウスに対する治療効果は、肉眼的観察および組織切片観察により行った。

SKG マウスを用いた治療実験のスケジュールは、ラミナリン投与後、サンプルを 1 日 1 回(10ml/kg、Dose : 136mg/kg)尾静脈から 2 週間反復投与し、その後 1 日おきに 105 日間投与した。投与期間中は毎日一般状態の観察および体重測定を行った。

DBA マウスを用いた治療実験のスケジュールは、DBA マウス(DBA/1J Sea, 雌性, 5 週齢, 九動株式会社)を用い、初回免疫当日の体重をもとに層別連続無作為化法により 8 匹ずつ Control 群と HL23 治療群の 2 群分けを行った。追加免疫後から、サンプルを 1 日 1 回(10ml/kg、Dose : 136mg/kg)腹腔内に 2 週間反復投与し、その後 1 日おきに 80 日間投与した。投与期間中は毎日一般状態の観察および体

重測定を行った。

#### 7-2-6 スコア法による評価

マウスの手足の腫れをリウマチスコアのカウント法により評価した<sup>117)</sup>。手の指、足の指については発赤と膨張があれば 0.1 とした。手首については、手首関節部のくびれがなくなった時を 0.5、それよりも凸に飛び出したときを 1.0 とした。足首についてはアキレス腱付着部が鈍角になりアキレス腱のまわりのくぼみが見えなくなった時を 0.5、さらに凸に飛び出した時を 1.0 とした(Fig. 7-1)。

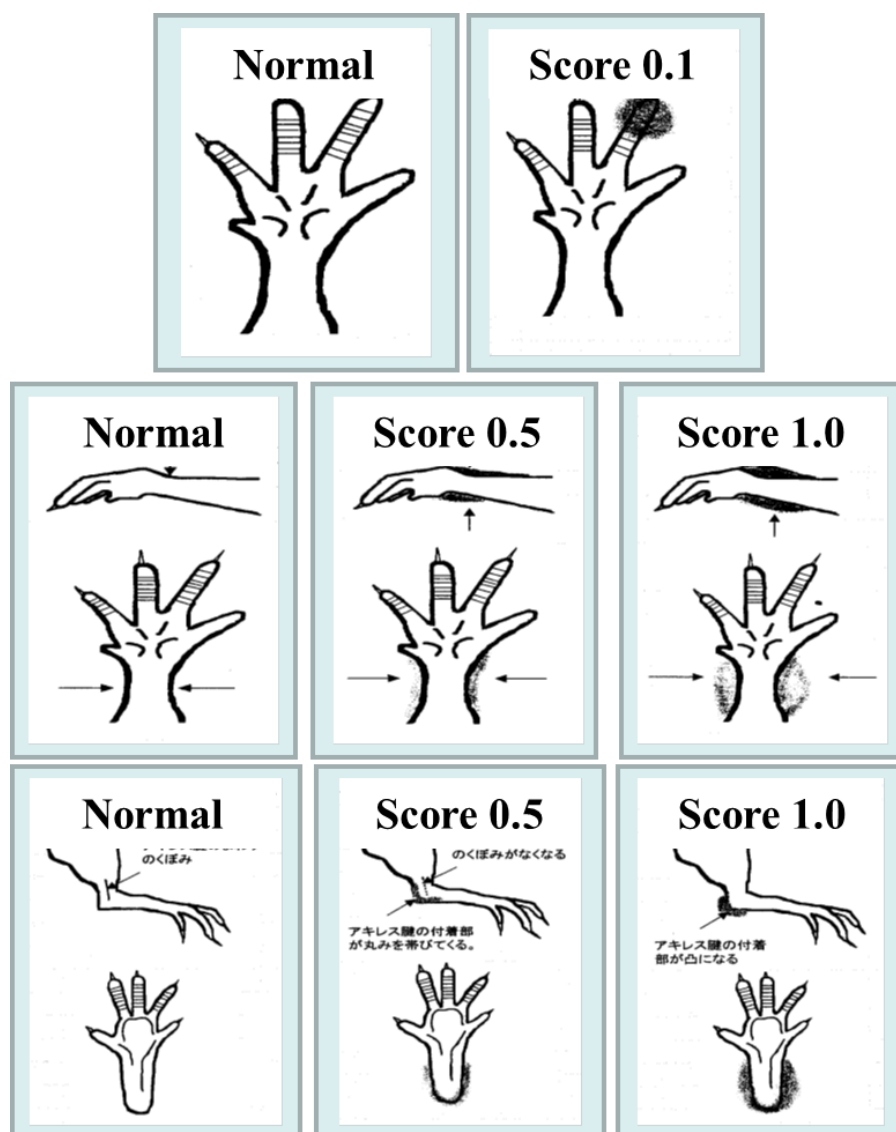


Fig. 7-1 Count method of score of RA model mouse.



### 7-2-7 HE 染色による組織切片観察

ハイブリッドリポソームの *in vivo* における治療効果を、HE 染色を用いた組織切片観察により行った。

実験方法は、SKGマウス(SKG/Jcl, 雄性, 5週齢, 日本クレア)およびDBAマウス DBAマウス(DBA/1J Sea, 雌性, 5週齢, 九動株式会社)を用いた。投与終了後、ジエチルエーテル麻酔下で指を採取後、中性ホルマリン溶液を用いて組織固定し、パラフィン切片を作成した。その後、キシレンおよびエタノールで脱パラフィン化し、ヘマトキシリン染色液で核を染色した。染色後、水洗しエオジン溶液で細胞質・間室を染色した。組織切片の観察は、Nikon DSカメラコントロールユニットで行った。

### 7-2-8 免疫染色による組織切片観察

ハイブリッドリポソームの *in vivo* における治療効果を、免疫染色を用いた組織切片観察により行った。

実験方法は、4-2-8 と同様の方法でパラフィン切片を作成し、キシレンで脱脂しエタノールで再水和した。その後、120℃で 10 分熱処理し抗原を活性化させ、PBS(-)と 1% 過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)でブロッキングした。PBS(-)で洗浄後、CD4 抗体(R&D Systems, U.S.A.)および TNF- $\alpha$  抗体(R&D Systems, U.S.A.)を加え 4℃で一晩反応させた。その後 PBS(-)で洗浄し、rabbit anti-goat immunoglobulins polyclonal antibody(HRP, USA)を加え一晩反応させた。組織切片の観察は、Nikon DS カメラコントロールユニットで行った。

## 7-3 結果と考察

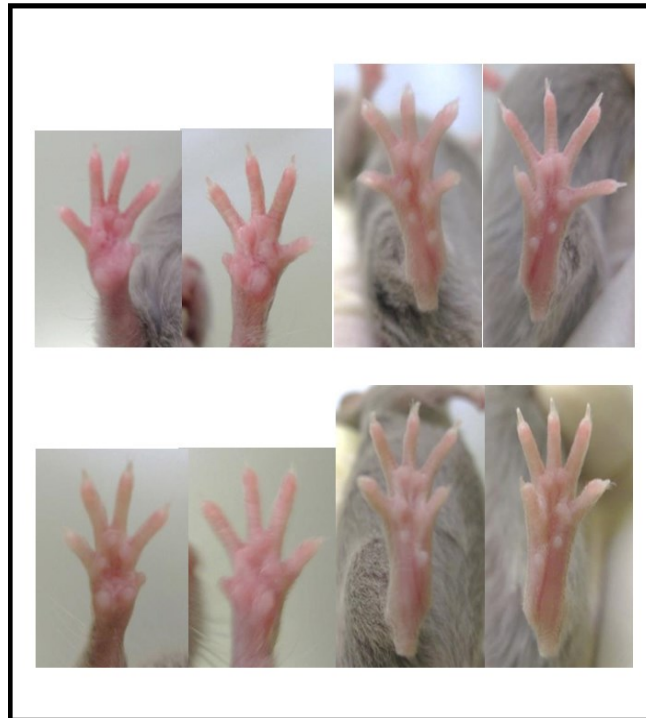
### 7-3-1 関節リウマチモデルマウスについて

ハイブリッドリポソームの *in vivo* における治療効果を検討するため、DBA マウスを用いてコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルマウスの作製を行った。コラーゲン投与前と投与後のマウスの肢の写真を Fig. 7-2 に示す。

写真からも明らかなように、初回免疫から 5 週間後で前肢の全体的な腫れおよび指関節の腫れが観察された。

以上の結果から、DBA マウスを用いた関節炎モデルマウスの作製において、初回免疫から 5 週間の短期間で関節リウマチモデルマウスの作製に成功した。

### 免疫投与前



### 免疫投与後

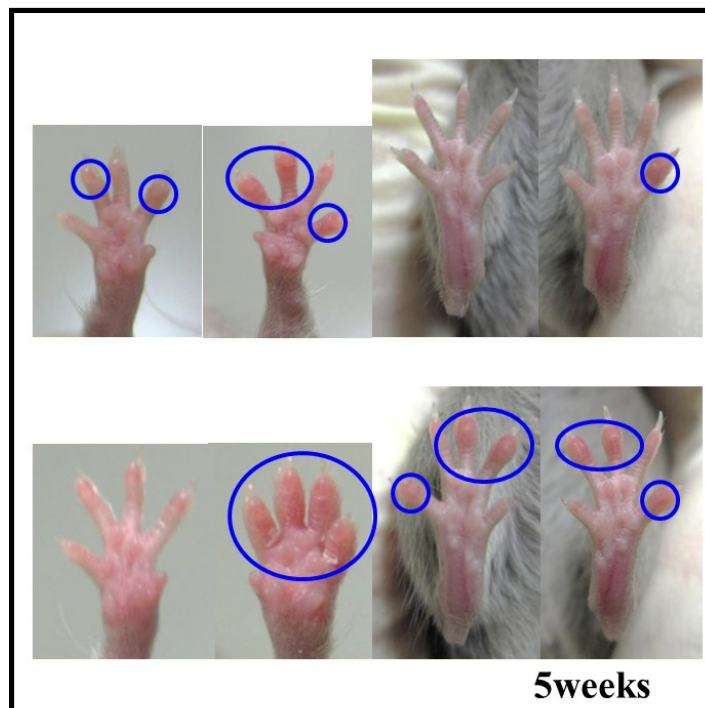


Fig. 7-2 Photographs of foot of CBA mice treated with booster for 5 weeks.  
Circle : rubor or swelling.

### 7-3-2 関節リウマチモデルマウスに対するハイブリッドリポソームの治療効果

ハイブリッドリポソームの *in vivo* における治療効果を検討するため、自然発症関節炎モデル(SKG)マウスおよびコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルマウスに対する治療効果を検討した。なお、Control 群は 5%ブドウ糖、HL23 群は HL23 を投与したマウスを示す。

投与開始後 38 週目の SKG マウスの肢の写真を Fig. 7-3 示す。写真からも明らかなように、Control 群では関節の腫れや変形が観察されたが、HL23 投与群においては、関節の腫れや変形は見られず抑制効果が得られた。また、スコア法による評価の結果を Fig. 7-4 に示す。グラフからも明らかなように、HL23 投与群ではスコアの増加が見られず、HL23 の治療効果が明らかとなった。

次に、投与開始 10 週目の CIA モデルマウスの肢の写真を Fig. 7-5 示す。Control 群では、指の発赤や膨張が見られたが、HL23 投与群では観察されなかった。また、スコア法による評価の結果を Fig. 7-6 に示す。グラフからも明らかなように、Control 群と HL23 投与群の統計的有意差( $p<0.05$ )が確認され、HL の治療効果が明らかとなった。

以上の結果から、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_3$  ハイブリッドリポソーム(HL23)の 2 種類の関節リウマチモデルマウスに対する治療効果が明らかとなった。

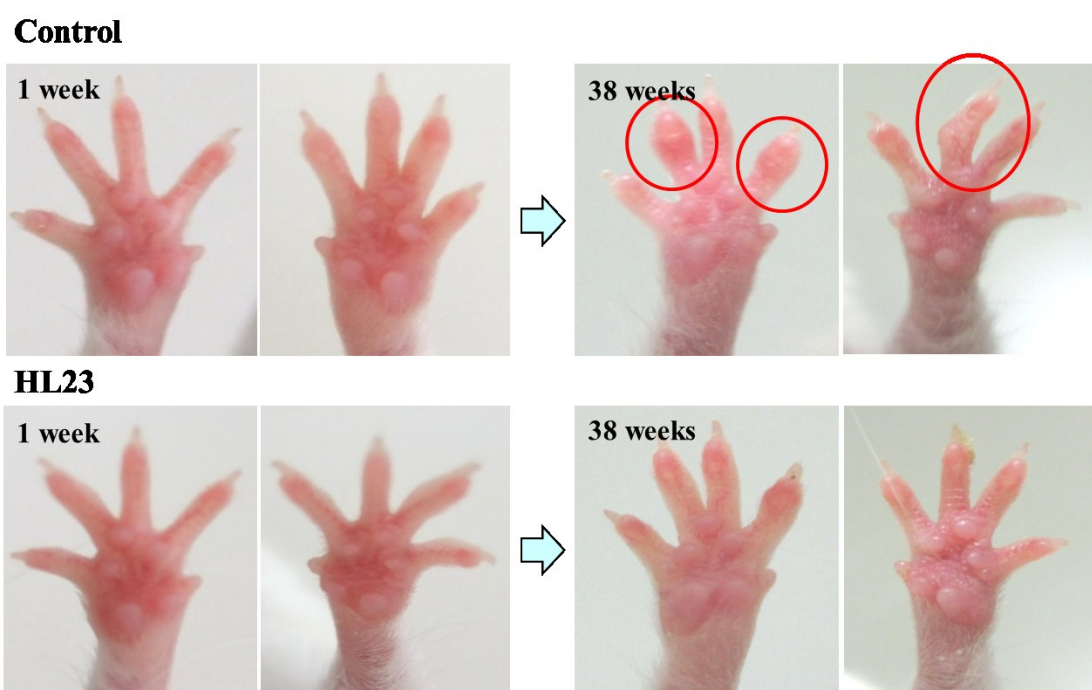


Fig.7-3 Therapeutic effects of HL23 for SKG mice of human RA.

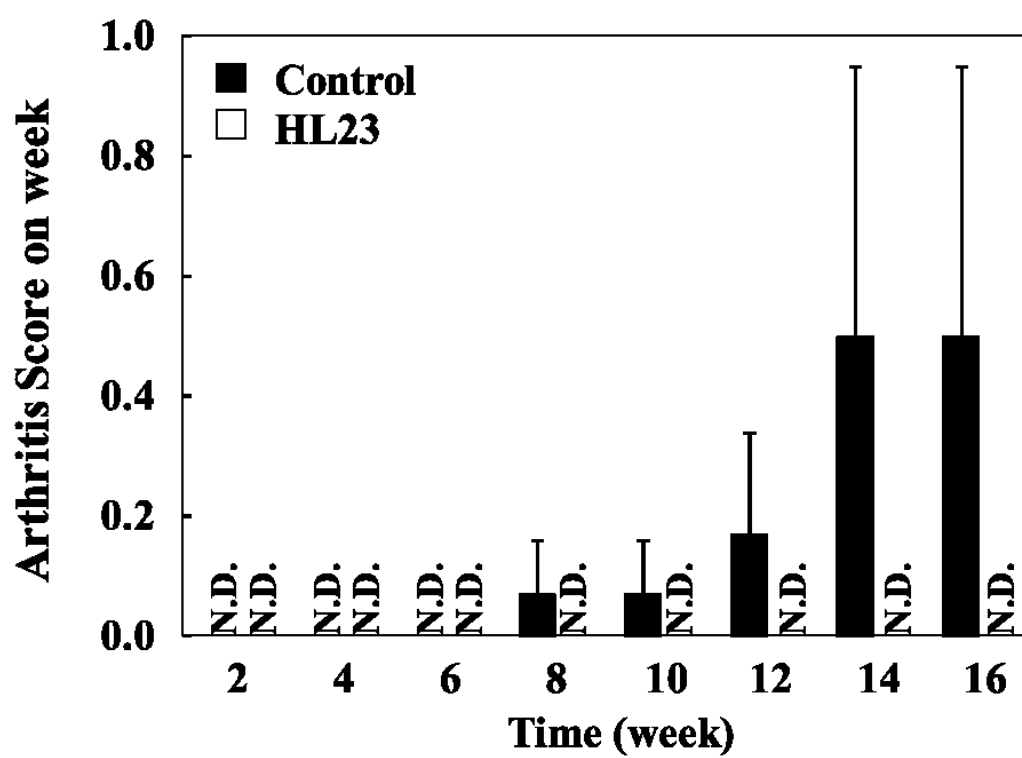
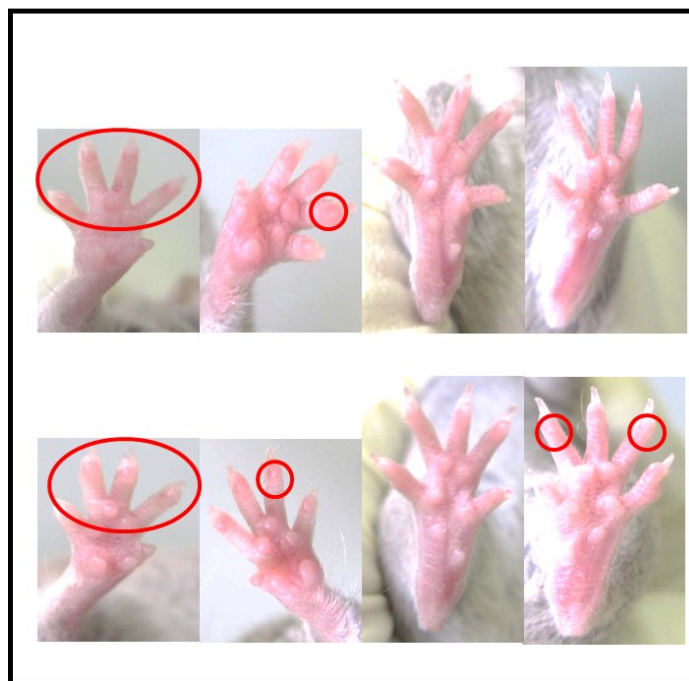
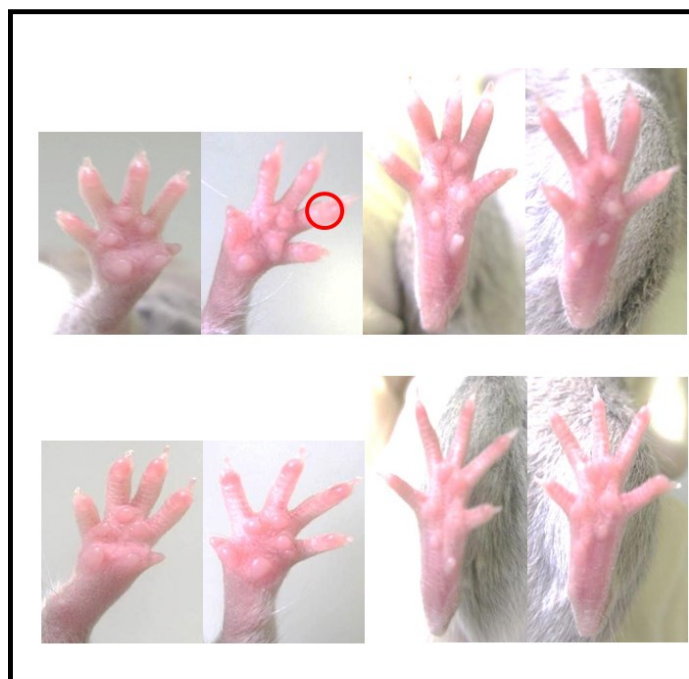


Fig. 7-4 Therapeutic effects of HL23 on the SKG mice with RA using score method .  
Data presented are mean  $\pm$  S.D.

## Control



## HL23



**10weeks**

Fig. 7-5 Therapeutic effects of HL23 for CIA model mice of human RA.

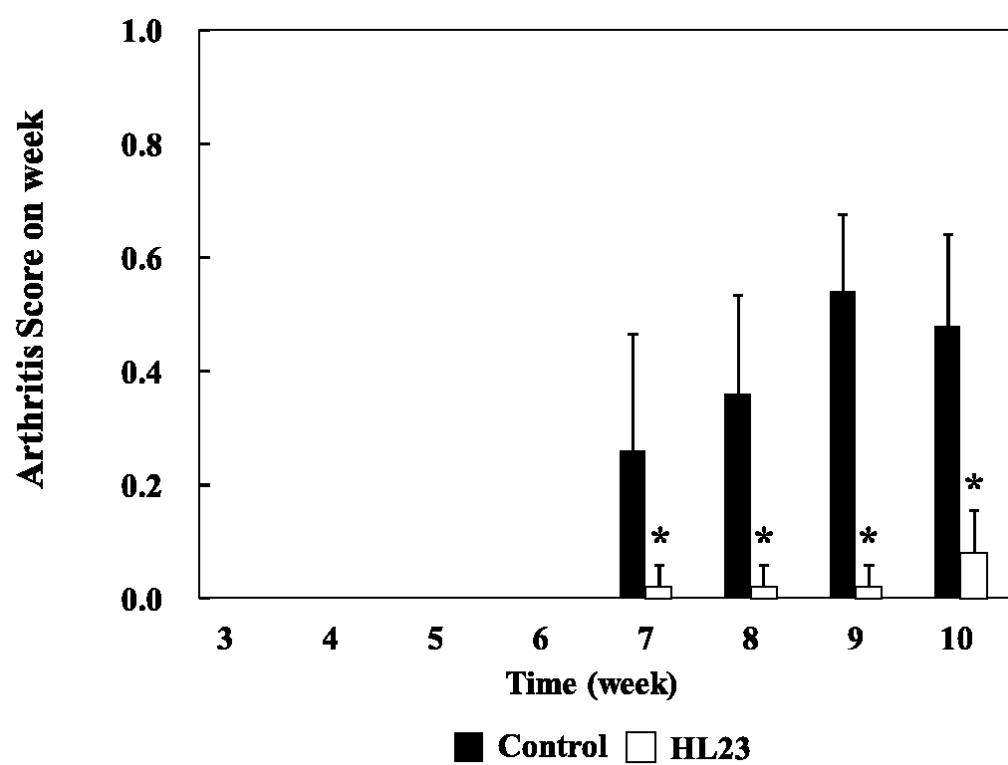


Fig.7-6 Therapeutic effects of HL23 on the CIA model mice with RA using score method .  
Data presented are mean  $\pm$  S.D. \*:p<0.05.



### 7-3-3 指組織切片観察

前節において、ハイブリッドリポソームの自然発症関節炎モデル(SKG)マウスおよびコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルマウスに対する治療効果が明らかになった。次に、ハイブリッドリポソームの治療効果を組織学的解析により評価した。なお、Normal 群は、関節炎を誘導していない正常なマウス、Control 群は 5% ブドウ糖、HL23 群は HL23 を投与したマウスを示す。

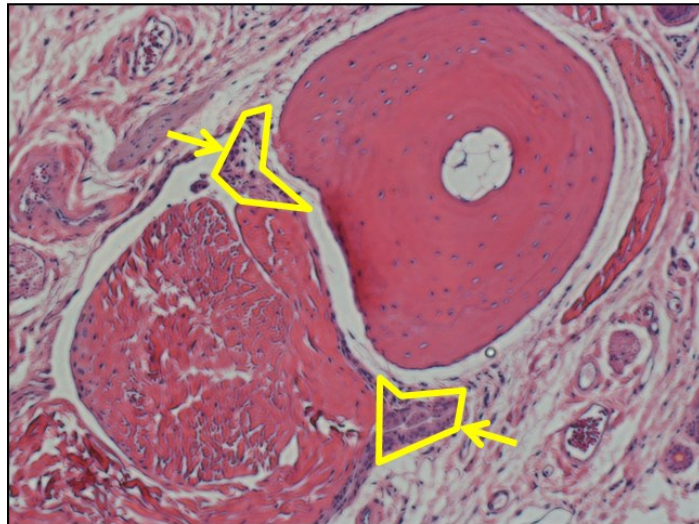
HE 染色した切片観察の SKG マウスの結果を Fig. 7-7 に示す。写真からも明らかなように、Control 群ではパンスの一部である浸潤性のリンパ球が観察されたが、HL23 投与群では観察されなかった。CIA モデルマウスの結果を Fig. 7-8 に示す。SKG マウスと同様の結果が得られた。

次に CD4 免疫染色した SKG マウスの結果を Fig. 7-8 に示す。Control 群では CD4 陽性細胞が多数観察されたが、HL23 投与群では顕著に減少した。

さらに炎症性サイトカインの 1 つである TNF- $\alpha$  を免疫染色した結果を Fig. 7-9 に示す。CD4 免疫染色の結果と同様、Control 群では CD4 陽性細胞が多数観察されたが、HL23 投与群では大きく減少した。

以上の結果から、95mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub> ハイブリッドリポソーム (HL23) は 2 種類の関節リウマチモデルマウスに対し、パンスの一部である浸潤性リンパ球および TNF- $\alpha$  を抑制することで、指関節の腫れや変形、発赤を抑制したと考えられる。

## Control



## HL23

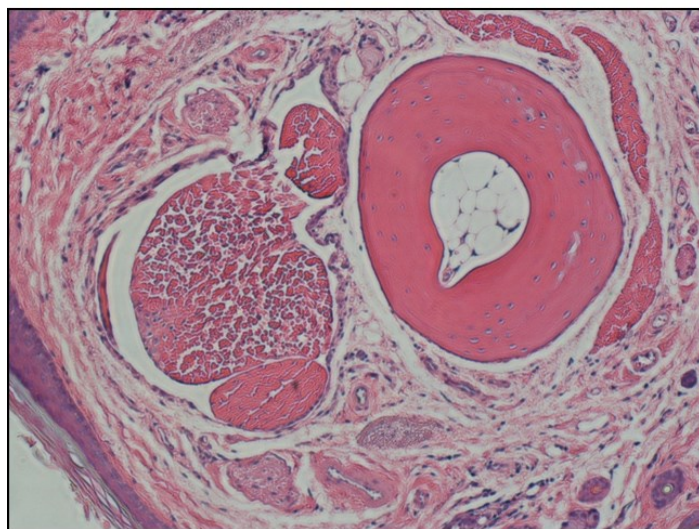
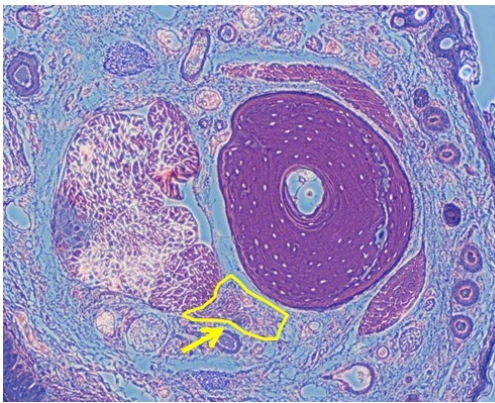


Fig.7-7 Therapeutic effects of HL23 on the SKG mice with RA on the basis of HE staining of tissue sections in finger.  
Arrows : inflammatory infiltrate lymphocytes in pannus.

## Normal



## Control



## HL23

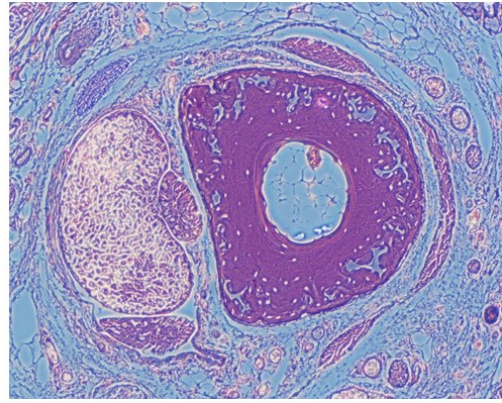
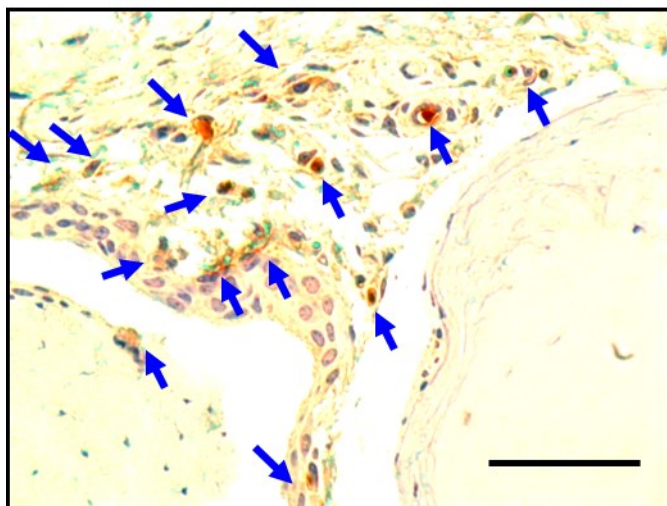


Fig.7-8 Therapeutic effects of HL23 on the CIA mice with RA on the basis of HE staining of tissue sections in finger.  
Arrows: inflammatory infiltrate lymphocytes in pannus.

## Control



## HL23

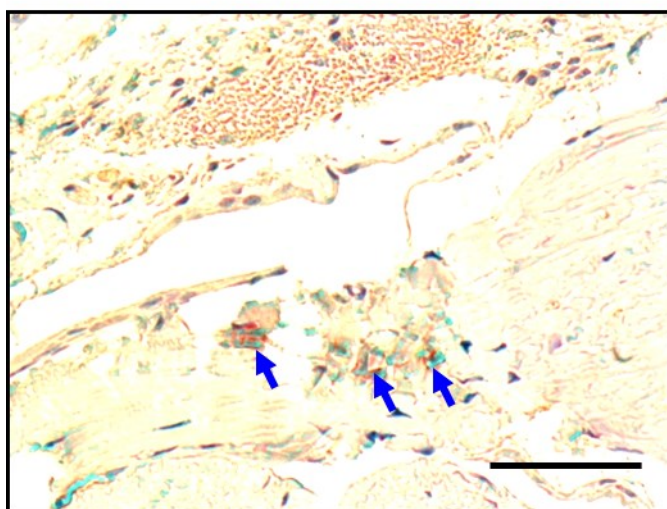
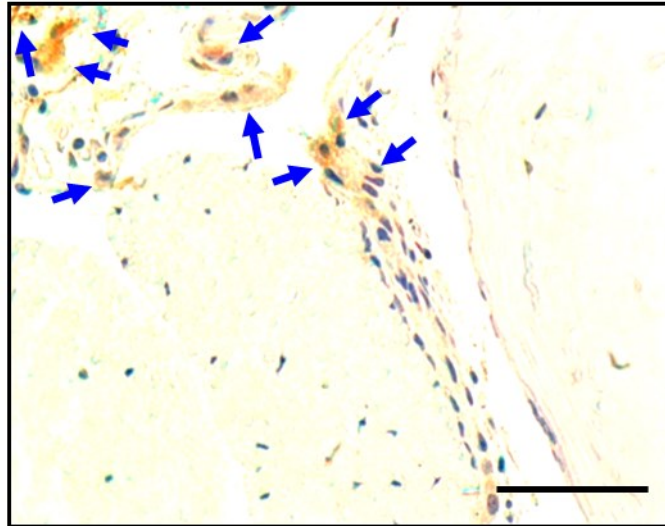


Fig. 7-9 Therapeutic effects of HL23 on the SKG mice with RA in tissue sections in finger using imunostaining of CD4.  
Arrows: CD4 positive cells. Scale bar : 0.05 $\mu$ m.



## Control



## HL23

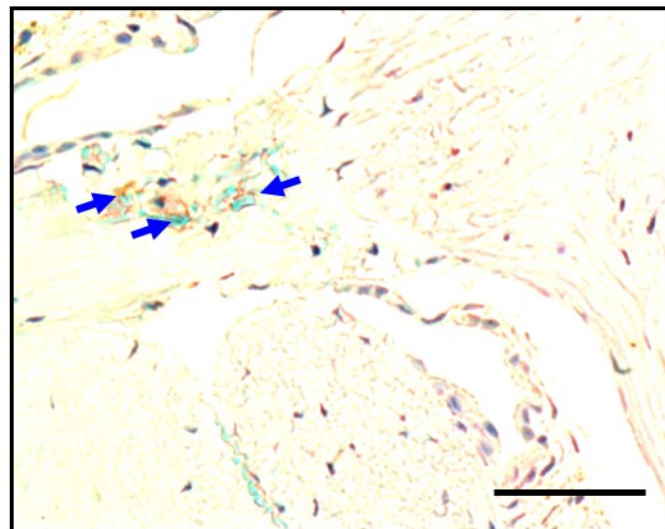


Fig. 7-10 Therapeutic effects of HL23 on the SKG mice with RA in tissue sections in finger using imunostaining of TNF- $\alpha$ .  
Arrows: TNF- $\alpha$  positive cells. Scale bar : 0.05 $\mu$ m.

#### 7-4 総括

本章では、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソーム(HL23)の自然発症関節炎モデル(SKG)マウスおよびコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルマウスに対する治療効果について検討し、以下のような興味深い知見が得られた。

1. DBA マウスは、コラーゲンを用いた初回免疫から 5 週間で全体的な腫れおよび指関節の腫れが観察され、短期間でコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルマウスの作製に成功した。
2. SKG マウスおよび CIA マウスの 2 種の関節リウマチモデルマウスに対する治療実験から、HL23 での指関節の腫れ、変形および発赤の抑制効果を明らかにした。
3. HE 染色および CD4、TNF- $\alpha$  免疫染色した指組織切片観察から、パンスの一部である浸潤性リンパ球および TNF- $\alpha$  の抑制効果が示唆された。

以上の結果から、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソームは、2 種類の関節リウマチモデルマウスに対し、パンスの一部である浸潤性リンパ球および TNF- $\alpha$  を抑制することで、指関節の腫れ、変形および発赤を抑制したと考えられる。

## 第8章 総論

現在がんの治療法には、外科療法、化学療法、放射線療法など様々な方法が用いられている。初期の段階で発見することができれば、治癒の可能性が高くなる。しかし、がんには初期症状がないものやある程度進行しないと症状が出ないことがある。現在は医療の進歩により、人間ドックや健康診断で初期のがんが発見されることもある。初期段階では外科療法で治療できるが、転移した場合は化学療法や放射線療法が行われる。しかし、いずれの治療法でも副作用が伴うため患者の QOL が問題であり、その軽減が課題である。

関節リウマチ(RA)の治療法には、薬物療法、手術療法、リハビリテーションなど様々な方法が用いられている。現在、RA 治療は薬物療法を中心として行われており、主に用いられるのが抗 RA 薬であり、軽症、中等症～重症といったタイプで薬の使い分けをするのが一般的である。しかし、薬によっては約 30~50% の人には効果がなく、効果があっても効き始めるまでに数ヶ月かかる。効果がある薬でも 2~3 年で効かなくなる(エスケープ現象)などの問題があり、それらを回避するのが課題である。

ハイブリッドリポソームは、種々の培養がん細胞に対して制がん効果を示し、担がんモデル動物を用いた治療実験から治療効果や肝転移抑制効果が、正常動物に対する長期間反復投与毒性試験および体内動態試験においては安全性が確認されている。さらに生命倫理委員会の承認を経て、悪性リンパ腫また肝臓がん患者らに対する顕著な治療効果が得られている。

本研究は、難治性疾患としてがんおよびリウマチに対する新規治療薬の開発を目的としたものである。ハイブリッドリポソームにカチオン性脂質を含有した、カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの培養がん細胞に対する抗腫瘍効果および担がんマウスに対する治療効果について検討した。さらに、ハイブリッドリポソームの RA 滑膜細胞に対する増殖抑制効果およびリウマチモデルマウスに対する治療効果について検討した。以下、各章ごとに得られた興味ある知見について述べる。

第2章では、リン脂質(DMPC)、PEG 系界面活性剤( $C_{12}(EO)_{21}$ )、カチオン性脂質( $2C_{14}ECl$ )を用いて 95mol%DMPC/5mol%  $C_{12}(EO)_{21}$  ハイブリッドリポソーム(HL21)、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECl$  ハイブリッドリポソーム(HL/2 $C_{14}ECl$ )を新しく創製し、リポソームの形態および 37℃保存における膜物性について検討した。なお、臨床応用を考慮し、調製溶媒に 5%ブドウ糖溶液を用い調製した。37℃保存で直径が約 100nm で安定し、長期間での保存が可能であることが明らかとなった。また、HL21 および HL/2 $C_{14}ECl$  は、血清を含む培地中においても安定であることが明らかとなった。

以上の結果から、HL/2 $C_{14}ECl$  は 37℃保存において均一で RES 回避可能なリポ

ソームを長期間形成することができ、また血清を含む培地中でも安定であることから臨床応用における長期保存が可能であることが明確となった。

第3章では、HL/2C<sub>14</sub>EC1 のヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する抗腫瘍効果を検討し、以下のような興味深い知見が得られた。HCT116 細胞に対し、DMPC、HL21 および HL/2C<sub>14</sub>EC1 はいずれも濃度依存的な増殖抑制効果が得られた。特に HL/2C<sub>14</sub>EC1 の IC<sub>50</sub> 値は、DMPC の約 1/3、HL21 の約 1/2 であり高い増殖抑制効果を示すことが明らかになった。次に正常ヒト大腸(CCD-33Co)細胞および HCT116 細胞に対する融合・蓄積の観察を、蛍光標識脂質(NBDPC)を含有した 96mol%DMPC/4mol%NBDPC(DMPC/NBDPC) 、 91mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>/4mol%NBDPC ハイブリッドリポソーム (HL21/NBDPC) および 83mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>/ 8mol%2C<sub>14</sub>EC1/4mol%NBDPC ハイブリッドリポソーム (HL/2C<sub>14</sub>EC1/NBDPC)を用いて検討した。HCT116 細胞に対し HL21/NBDPC および HL/2C<sub>14</sub>EC1/NBDPC は、添加 1h で緑色蛍光が観察され、その後蛍光量が増大し HCT116 細胞に融合・蓄積が確認された。特に、HL/2C<sub>14</sub>EC1 では時間経過に伴い蓄積の増加が観察された。一方、DMPC/NBDPC では、融合・蓄積は観察できなかった。また、CCD-33Co 細胞に対しては、いずれの試料においても蛍光は観察されなかった。このことから、HL21/NBDPC および HL/2C<sub>14</sub>EC1/NBDPC のがん細胞に対する選択性が確認された。次に Annexin-V binding assay、TUNEL 法による画像解析およびフローサイトメーターを用いた DNA 断片化率の測定結果から、HL21 および HL/2C<sub>14</sub>EC1 は、HCT116 細胞に対してアポトーシスを誘導し、DNA を断片化することが明らかとなった。次に、HL/2C<sub>14</sub>EC1 の HCT116 細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムについての検討を行ったところ、HL21 および HL/2C<sub>14</sub>EC1 は細胞膜に融合・蓄積後、ミトコンドリアおよびカスパー-3 を経由し、DNA を断片化するアポトーシス誘導経路であることが明確となった。さらに、DMPC 単一リポソーム、HL21 および HL/2C<sub>14</sub>EC1 添加後の HCT116 細胞の膜物性について、細胞膜流動性を反映する DPH を用いて検討を行ったところ、いずれも濃度依存的に膜流動性を増大させることが明らかとなった。

以上の結果から HL21 および HL/2C<sub>14</sub>EC1 は、HCT116 細胞に対してのみ特異的に融合・蓄積し、高い細胞増殖抑制効果を示す事が明らかとなった。また、その制がんメカニズムはアポトーシスであり、アポトーシスシグナル伝達はミトコンドリアを経由してカスパー-3 を活性化することを明らかとした。

第4章では、第3章で大腸がんにも有効であった HL/2C<sub>14</sub>EC1 の *in vivo* における治療効果を検討するために、HCT116 細胞移植肝転移モデルマウスに対する治療実験を行ったところ、HL21 および HL/2C<sub>14</sub>EC1 治療群では、肉眼的観察、臓器重量測定および組織切片の組織学的解析結果より、肝転移抑制効果が明らかとなった。また、血球に NBDPC を含有した試料を添加したところ、いずれの試料でも蛍光は観察されなかった。



以上の結果から、HCT116 細胞移植肝転移モデルマウスに対する治療効果は、静脈内に投与した試料が血球には蓄積せず腫瘍まで到達し、アポトーシスを誘導することで抗腫瘍効果を示したと示唆された。

第 5 章では、HCT116 細胞移植肝転移モデルマウスに対する 95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$  ハイブリッドリポソーム(HL25)の治療効果について検討したところ、約 127%の延命効果を示した。また、蛍光脂質含有 HL25 を投与したところ、腫瘍への長時間の蓄積が観察された。さらに HE および CEA 免疫染色組織切片観察から腫瘍の縮小効果が得られ、TUNEL 染色では TUNEL 陽性細胞が観察された。

以上の結果から、HL25 は HCT116 細胞移植肝転移モデルマウスに対して、長時間腫瘍に特異的に蓄積し、アポトーシス誘導により治療効果を示すことが明らかとなった。

第 6 章では、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$  ハイブリッドリポソーム (HL23) のヒト RA 滑膜(HFLS-RA)細胞に対する抗腫瘍効果を検討し、以下のような興味深い知見が得られた。HFLS-RA 細胞に対し、HL の高い増殖抑制効果が得られ、一方、正常ヒト滑膜(HFLS)細胞に対しては、低毒性であった。次に HFLS 細胞および HFLS-RA 細胞に対する融合・蓄積の観察を、蛍光標識脂質(NBDPC)を含有した 96mol%DMPC/4mol%NBDPC(DMPC/NBDPC) 、 91mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$ /4mol%NBDPC ハイブリッドリポソーム(HL23/NBDPC)を用いて検討した。HFLS-RA 細胞に対し HL23/NBDPC は、時間経過とともに緑色蛍光の増大が観察され融合・蓄積が確認された。一方、DMPC/NBDPC では、融合・蓄積は認められなかった。また、HFLS 細胞に対しては、いずれの試料においても蛍光は観察されなかった。このことから、ヒト RA 滑膜細胞に対する選択性が確認された。次に TUNEL 法による画像解析およびフローサイトメーターを用いた DNA 断片化率の測定結果から、HL23 は HFLS-RA 細胞に対してアポトーシスを誘導し、DNA を断片化することが明らかとなった。次に、HL23 の HFLS-RA 細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムについての検討を行ったところ、HL23 は細胞膜に融合・蓄積後、ミトコンドリアおよびカスパーズ-3 を経由し、DNA を断片化するアポトーシス誘導経路であることが明確となった。さらに、HFLS 細胞および HFLS-RA 細胞の膜物性について、細胞膜流動性の測定結果より、HFLS-RA 細胞膜は HFLS 細胞膜と比較して膜流動性が高いことが確認された。

以上の結果から HL23 は、細胞膜流動性の高い HFLS-RA 細胞に対してのみ特異的に融合・蓄積し、高い細胞増殖抑制効果を示す事が明らかとなった。また、その制がんメカニズムはアポトーシスであり、アポトーシスシグナル伝達ミトコンドリアを経由してカスパーズ-3 を活性化することを明らかとした。

第 7 章では、第 6 章で RA 滑膜細胞に対して増殖抑制効果を示した HL23 の *in vivo* における治療効果を検討するために、関節リウマチモデル(SKG, CIA)マウス

に対する治療実験を行ったところ、HL23 治療群では、肉眼的観察およびスコア法による結果から、手指関節の変形・腫れの抑制効果が得られた。また、HE 染色および TNF- $\alpha$ , CD4 免疫染色組織切片の組織学的解析から、浸潤性リンパ球および炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ )の減少が観察された。

以上の結果から HL23 は、関節リウマチモデルマウスに対し浸潤性リンパ球および炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ )を減少させることにより、手指関節の変形・腫れの抑制効果を示すことが示唆された。

以上に述べたように、双性リン脂質に DMPC、PEG 系界面活性剤に C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>、カチオン性脂質に 2C<sub>14</sub>ECl を用いて新しく調製した 87mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>21</sub>/8mol%2C<sub>14</sub>ECl ハイブリッドリポソーム (HL/2C<sub>14</sub>ECl) は、ヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する高い増殖抑制効果が得られた。HL/2C<sub>14</sub>ECl は、*in vitro* において大腸がん細胞膜のみに融合・蓄積し、アポトーシスを誘導することが確認された。*in vivo* においては、HL/2C<sub>14</sub>ECl の抗腫瘍効果が明らかとなり、今後、臨床応用の可能性が示されたことは有意義な研究成果と考えられる。また、95mol%DMPC/5mol%C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub> ハイブリッドリポソーム (HL23) は、ヒト RA 滑膜(HFLS-RA)細胞に対する高い増殖抑制効果が得られた。HL23 は、*in vitro* において RA 滑膜細胞膜のみに融合・蓄積し、アポトーシスを誘導することが確認された。*in vivo* においては、関節リウマチモデルマウスに対する治療効果が明らかとなった。HL は、異常増殖するリウマチ滑膜細胞に対して特異的に融合・蓄積後、アポトーシスを誘導することを初めて明らかにした。さらに多くの知見を蓄積することで、さまざまながんおよびリウマチなどの難治性疾患に対し臓器・組織への選択性の向上による副作用のない治療薬となることを期待したい。

## 参考文献

- 1) 永田親義, “がんはなぜ生じるのか 原因と発生のメカニズムを探る”, ブルーバックス (2007).
- 2) R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, *CA Cancer J Clin.*, **62**, 10 (2012).
- 3) 片野田耕太, “がんの統計 2007”, 財団法人がん研究振興財団 (2007).
- 4) 阿蘇品スミ子, “初心者も活用できるがん医療・がん看護—集学的治療・全人的ケアをめざして”, 南山堂 (2013).
- 5) LH Sobin, et al Eds, Wiley-Blackwell “TNM Classification of Malignant Tumours (7th Ed)”, International union against cancer (2010).
- 6) 赤須孝之, “専門医が語る 大腸がんがわかる本”, 法研 (2005).
- 7) 田中秀一, “がん治療の常識・非常識”, ブルーバックス (2008).
- 8) 岡庭豊, “病気がみえる Vol.6 免疫・膠原病・感染症”, 医療情報科学研究所 (2009).
- 9) 住田孝之, “膠原病・リウマチを科学する 初学者から専門家まで”, 診断と治療社 (2005).
- 10) R. Ueoka, R. A. Moss, S. Swarup, Y. Matsumoto, G. Strauss, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185 (1985).
- 11) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R. A. Moss, S. Swarup, A. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988).
- 12) Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **55**, 5797 (1990).
- 13) R. Ueoka, H. Dozono, Y. Matsumoto, H. Cho, K. Kitahara, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 219 (1990).
- 14) R. Ueoka, E. Yamada, O. Yamashita, Y. Matsumoto, Y. Kato, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6597 (1991).
- 15) K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **60**, 3342 (1995).
- 16) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Oyama, H. Takekura, M. Iio, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4640 (1988).
- 17) Y. Matsumoto, E. Yamada, J. Hitano, M. Iwahara, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 213 (1993).
- 18) I. Kitamura, M. Kochi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, J. Kuratsu, Y. Ushio, *Cancer Res.*, **56**, 3986 (1996).
- 19) R. Ueoka, Y. Matsumoto, *Bio Industry*, **10**, 221 (1993).
- 20) Y. Matsumoto, C. Imamura, T. Ito, C. Taniguchi, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1456 (1995).
- 21) Y. Matsumoto, T. Kato, S. Iseki, H. Suzuki, K. Nakano, M. Iwahara, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1937 (1999).

- 22) 松本陽子, 加藤俊博, 井関伸至, 鈴木仁士, 中野浩司, 上岡龍一, *薬学雑誌*, **119**, 280 (1999).
- 23) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 380 (2006).
- 24) R. Ueoka, Y. Komizu, Y. Matsumoto, Yu Zhong, R. Tanaka, N. Yamamoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 4578 (2008).
- 25) Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131, (2006).
- 26) Y. Matsuoka, M. Nagata, Y. Komizu, H. Ichihara, S. Kawase, Y. Sawada, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2010).
- 27) 行原真美子, 古水雄次, 田上修, 松下琢, 松本陽子, 上岡隆一, *薬学雑誌*, **130**, 1583 (2010).
- 28) Y. Matsumoto, Y. Iwamoto, T. Matsushita, R. Ueoka, *Int. J. Cancer*, **115**, 337 (2005).
- 29) A. Kanno, K. Tsuzaki, M. Miyagi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1013 (1999).
- 30) R. Ueoka, Y. Matsumoto, A. Kanno, K. Tsuzaki, H. Ichihara, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1262 (2000).
- 31) H. Ichihara, K. Funamoto, T. Matsushita, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **394**, 174 (2010).
- 32) 根岸由香, 吉沢譲治, 山崎洋次, 松本陽子, 上岡龍一, *日本小児科外科学会雑誌*, **41**, 930 (2005).
- 33) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **315**, 167 (2006).
- 34) 市原英明, 永見英明, 山本圭一, 松本陽子, 上岡隆一, *薬学雑誌*, **123**, 25 (2003).
- 35) H. Ichihara, H. Nagami, T. Kiyokawa, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2008).
- 36) M. Umebayashi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1816 (2008).
- 37) M. Umebayashi, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **30**, 327 (2010).
- 38) 香川靖雄, “イラストで見る生体膜と疾患分子の分子生物学”, 南山堂 (1993).
- 39) A. D. Bangham, M. N. Sandish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965).
- 40) D. D. Lasic, Ed, “Liposomes: From Physics to Applications”, Elsevier (1993).
- 41) D. D. Lasic, D. Papahadjopoulos, *Science*, **267**, 1275 (1995).
- 42) V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 145 (2005).
- 43) <http://meddic.jp/アムビゾーム>.
- 44) <http://www.anticancer-drug.net/antibiotic/doxil.htm>.
- 45) K. Maruyama, *Adv. Drug. Deliv. Revs.*, **63**, 161 (2011).
- 46) 菊池寛, 井上圭三, “油化学”, **34**, 784 (1985).

- 47) N. Oku, Y. Tokudome, H. Tsukada, S. Okada, *Biochim. Biophys. Acta*, **1238**, 86 (1995).
- 48) T.M. Allen, C. Hansen, *Biochim. Biophys. Acta*, **1068**, 133 (1991).
- 49) R. S. Bresalier. *Gut and Liver*. **2**, 69 (2009).
- 50) I. Kitamura, M. Kochi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, J. Kuratsu, Y. Ushio, *Cancer Res.*, **56**, 3986 (1996).
- 51) 石川隆, “カラー図解 生理学の基本がわかる事典”, 西東社 (2011).
- 52) I. Kitamura, M. Kochi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, J. Kuratsu, Y. Ushio, *Cancer Res.*, **56**, 3986 (1996).
- 53) M. A. Moore, T. Sobue, K. Tajima, S. Kono, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **6**, 427 (2005).
- 54) Ahmedin Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, *CA Cancer J. Clin.*, **61**, 69 (2011).
- 55) K. Cooper, H. Squires, C. Carroll, D. Papaioannou, A. Booth, RF. Logan, C. Maguire, D. Hind, P. Tappenden, *Health Technol Assess*, **14**, 206 (2010).
- 56) J. Homsí, C. R. Garrett, *Cancer control.*, **13**, 42 (2006).
- 57) 佐藤千史, 井上智子, “人体の構造と機能からみた 病態生理ビジュアルマップ[2]”, 医学書院 (2010).
- 58) A. Takei, R. Seyama, J. Ishida, K. Kanda, *Kitakanto Med. J.*, **61**, 145 (2011).
- 59) J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, *Br. J. Cancer.*, **26**, 239 (1972).
- 60) 北島政樹, 佐治 重豊, “がん治療におけるアポトーシスの応用”, 医薬ジャーナル社 (2001).
- 61) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sasamoto, M. Mizoguchi, P-G He, *Chem. Phram. Bull.*, **41**, 1118 (1993).
- 62) T. Utsugi, A. J. Schroit, J. Connor, C. D. Bucana, I. J. Fidler, *Cancer Res.*, **51**, 3062 (1991).
- 63) H. Schröder-Borm, R. Bakalova, J. Andrä, *FEBS Lett.*, **579**, 6128 (2005).
- 64) Y. Gavrieli, Y. Sherman, S. A. Ben-Sasson, *J. Cell Biol.*, **119**, 493 (1992).
- 65) 北中千史, *山形医学*, **23**, 83 (2005).
- 66) M. Sluyser, Ed. “Apoptosis in normal development and cancer.” Taylor & Francis, London (1996).
- 67) K. Schulze-Osthoff, D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg, M. E. Peter, *Eur. J. Biochem.*, **254**, 439 (1998).
- 68) S. Nagata, *Cell*, **88**, 355 (1997).
- 69) G. M. Cohen, *Biochem. J.*, **326**, 1 (1997).
- 70) 大槻勝紀, 渡辺慶一, 小路武彦, “臓器別アポトーシス証明法”, 南江堂 (2000).

- 71) E. S. Alnemri, D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, J. Yuan, *Cell*, **87**, 171 (1996).
- 72) 山本雅, 仙波憲太郎, “シグナル伝達イラストマップ”, 羊土社, (2004).
- 73) L. Casciola-Rosen, D. W. Nicholson, T. Chong, K. R. Rowan, N. A. Thornberry, D. K. Miller, A. Rosen, *J. Exp. Med.*, **183**, 1957 (1996).
- 74) Y. A. Lazebnik, S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier, W. C. Earnshaw, *Nature*, **371**, 346 (1994).
- 75) D. R. Green, J. C. Reed, *Science*, **281**, 1309 (1998).
- 76) C. Du, M. Fang, Y. Li, L. Li, X. Wang, *Cell*, **102**, 33 (2000).
- 77) D.W. Busija, T. Gaspar, F. Domoki, P.V. Katakam, F. Bari, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 1471 (2008).
- 78) B. R. Gasman, X. M. Yin, D. E. Johnson, E. Wieckowski, G. Q. Wang, S. C. Watkins, H. Rabinowich, *Cancer Res.*, **60**, 6811 (2000).
- 79) T. Utsugi, A. J. Schroit, J. Connor, C. D. Bucana, I. J. Fidler, *Cancer Res.*, **51**, 3062 (1991).
- 80) 大室弘美, 児玉庸夫, 成川衛, 古澤康秀, “医薬品開発入門” じほう (2013).
- 81) 河島進, 政田幹夫, 松山賢治, 内田享弘, “医薬品情報・評価学”, 南江堂 (2001).
- 82) A. Ono, S. Hattori, R. Kariya, S. Iwanaga, M. Taura, H. Harada, S. Suzu, S. Okada, *J. Biomed. Biotechnol.*, **26**, 539748 (2011).
- 83) R. Giavazzi, J. M. Jessup, D. E. Campbell, S. M. Walker, I. J. Fidler, *J. Natl. Cancer Inst.* **77**, 1303 (1986).
- 84) S. Juntrakul, P. Ruangvejvorachai, S. Shuangshoti, S. Wacharapluesadee, T. Hemachudha, *BMC Infect. Dis.*, **5**, 104 (2005).
- 85) 日本実験動物協会, “実験動物の基礎と技術 I 総論”, 丸善株式会社 (1988).
- 86) 佐藤徳光, “動物実験の基本”, 西村書店 (1996).
- 87) 日本実験動物協会, “実験動物の基礎と技術 II 各論”, 丸善株式会社 (1989).
- 88) L. A. Liotta, C. N. Rao, U. M. Wewer, *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 1037 (1986).
- 89) M. Takeichi, *Science*. **251**, 1451 (1991).
- 90) がん転移研究会, “がんの浸潤・転移研究マニュアル”, 金芳堂 (1994).
- 91) J. Homsy, C.R. Garrett, *Cancer Control*, **13**, 42 (2006).
- 92) 日本がん転移学会, “がん転移研究の実験手技”, 金芳堂 (2008).
- 93) Y. Komizu, H. Ueoka, K. Goto, R. Ueoka, *Int. J. Nanomedicine.*, **6**, 1913 (2011).
- 94) 上野純一, 修士論文 (2010).
- 95) 尾崎承一, “関節リウマチ 正しい治療がわかる本”, 法研 (2008).

- 96) 北村まさし, “サイトカインを正せばリウマチは克服できる”, 承文堂出版 (2010).
- 97) 百瀬弥寿徳, “疾病薬学”, 医学評論社 (2007).
- 98) 竹内勤, “リウマチ・膠原病”, PHP 研究所 (2011).
- 99) 日本リウマチ学会生涯教育委員会, “リウマチ病学テキスト”. 診断と治療社 (2010).
- 100) M. Feldmann, F. M. Brennan, R. N. Maini, *Cell*, **85**, 307 (1996).
- 101) 糸井恵, 明治国際医療大学誌, **2**, 1 (2009).
- 102) P. H. Elworthy, C. B. Macfarlane, *J. Chem. Soc.*, 537 (1962).
- 103) C. Marchetti, M. A. Gallego, A. Defossez, P. Formstecher, P. Marchetti, *Hum. Reprod.*, **19**, 1127 (2004).
- 104) M. Konopleva, T. Tsao, P. Ruvolo, I. Stiouf, Z. Estrov, C. E. Leysath, S. Zhao, D. Harris, S. Chang, C. E. Jackson, M. Munsell, N. Suh, G. Gribble, T. Honda, W. S. May, M. B. Sporn, M. Andreeff, *Blood*, **99**, 326 (2002).
- 105) 阿部千之, “SCID・疾患モデル研究”, 日本医学館 (1997).
- 106) D. E. Trentham, A. S. Townes, A. H. Kang, *J. Exp. Med.*, **146**, 857 (1977).
- 107) 安部千之, 澤井高志, “関節炎モデル”, 日本医学館, (2000).
- 108) N. Sakaguchi, T. Takahashi, H. Hata, T. Nomura, T. Tagami, S. Yamazaki, T. Sakihama, T. Matsutani, I. Negishi, S. Nakatsuru, S. Sakaguchi, *Nature*, **426**, 454 (2003).
- 109) 塩沢俊一, “膠原病学” 丸善出版 (2012).
- 110) 伊藤吉賢, 澤井高志, 臨床画像, **18**, 203 (2002).
- 111) 伊藤吉賢, 高橋幸洋, 澤井高志, 日臨, **63**, 96 (2005).
- 112) U. Müller-Ladner, R. E. Gay, S. Gay, *Curr. Opin. Rheumatol.*, **12**, 186 (2000).
- 113) T. Pap, Y. Shigeyama, S. Kuchen, J. K. Fernihough, B. Simmen, R. E. Gay, M. Billingham, S. Gay, *Arthritis. Rheum.*, **43**, 1226 (2000).
- 114) R. Lemaire, G. Huet, F. Zerimech, G. Grard, C. Fontaine, B. Duquesnoy, R. M. Flipo, *Br. J. Rheumatol.*, **36**, 735 (1997).
- 115) N. Sakaguchi, T. Takahashi, K. Hata, T. Nomura, T. Tagami, S. Yamazaki, T. Sakihama, T. Matsutani, I. Negishi, S. Nakatsuru, S. Sakaguchi, *Nature*, **426**, 454 (2003).
- 116) R. Holmdahl,\* L. Jansson, M. Andersson, E. Larsson, *Immunology*, **65**, 305 (1988).
- 117) H. Yoshitomi, N. Sakaguchi, K. Kobayashi, Gordon D. Brown, T. Tagami, T. Sakihama, K. Hirota, S. Tanaka, T. Nomura, I. Miki, S. Gordon, S. Akira, T. Nakamura, S. Sakaguchi, *J. Exp. Med.*, **201**, 949 (2005).

## 謝辞

本研究を行う上で、また、本論文を作成するにあたり、終始御懇切なご指導ならびにご鞭撻を賜りました松本陽子教授に深く感謝いたします。

本研究を行う上で貴重な御教授並びに御助言を賜りました上岡龍一名誉教授に深く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、松下琢教授、市原英明准教授には貴重な御教示並びにご助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、友重竜一教授には貴重な御教示並びにご助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり貴重な御教示並びに御助言を戴きました後藤浩一教授、古水雄志博士研究員に厚く御礼申しあげます。

さらに、大学院セミナー等を通じて、本学応用生命科学専攻の諸先生方には多大な御教示と御助言を賜りましたことを謹んで御礼申し上げます。

また、優れた研究成果を残していかれた先輩方をはじめ、苦楽を共にしてきた同研究室の学生諸氏、特に実験面に協力して頂いた下田真也氏、梅林雅代氏、竹村正規氏、上野純一君、山口剛毅君、上村昌弘君、坂本龍君、山之内萌さん、山中圭史君、仲裕之君、石川裕理さん、水成まどかさん、西上朋さん、栗山夏樹君に深く御礼申し上げます。