

博士論文

トレハロースリポソームを用いた
がん治療に関する研究

平成 29 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

1519D01

桑原 啓司

目 次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 トレハロースリポソームの膜物性	
2-1. 序	7
2-2. 実験	
2-2-1. 試料	9
2-2-2. トレハロースリポソームの調製	10
2-2-3. 動的光散乱法を用いた膜直径の測定	10
2-2-4. ネガティブ染色を用いた透過型電子顕微鏡による トレハロースリポソームの観察	11
2-3. 結果と考察	
2-3-1. トレハロースリポソームの膜直径	12
2-3-2. ネガティブ染色を用いた透過型電子顕微鏡による トレハロースリポソームの観察	15
2-4. 総括	17
第 3 章 トレハロースリポソームの白血病に対する <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での治療効果	
3-1. 序	18
3-2. 実験	
3-2-1. 試料	21
3-2-2. トレハロースリポソームの調製	21
3-2-3. 蛍光脂質含有トレハロースリポソームの調製	21
3-2-4. 使用細胞	21
3-2-5. 使用動物	21
3-2-6. 酵素活性測定法を用いた細胞増殖抑制試験	22
3-2-7. DNA 断片化率の測定	23
3-2-8. カスペース活性の測定	25
3-2-9. ミトコンドリア膜電位の測定	26
3-2-10. 蛍光脂質含有リポソームの細胞への融合・蓄積の測定	27
3-2-11. 蛍光偏光解消法を用いた細胞膜流動性の測定	27
3-2-12. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞膜脂質ラフトの観察	29

3-2-13. トレハロースリポソームの白血病細胞皮下移植モデルマウスに 対する治療実験	30
3-2-14. TUNEL 染色によるアポトーシスの検出	30
3-3. 結果と考察	
3-3-1. トレハロースリポソームの白血病細胞に対する制がん効果	31
3-3-2. トレハロースリポソームの白血病細胞に対する アポトーシス誘導	35
3-3-3. アポトーシス誘導におけるシグナル伝達	37
3-3-4. トレハロースリポソームの白血病細胞膜への影響	40
3-3-5. トレハロースリポソームの白血病細胞皮下移植モデルマウスに 対する治療効果	44
3-4. 総括	48
第4章 トレハロースリポソームの肺がんに対する <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での治療効果	
4-1. 序	50
4-2. 実験	
4-2-1. 試料	52
4-2-2. トレハロースリポソームの調製	52
4-2-3. 蛍光脂質含有トレハロースリポソームの調製	52
4-2-4. 使用細胞	52
4-2-5. 使用動物	52
4-2-6. 酵素活性測定法を用いた細胞増殖抑制試験	52
4-2-7. DNA 断片化率の測定	53
4-2-8. カスパーゼ活性の測定	53
4-2-9. ミトコンドリア膜電位の測定	53
4-2-10. 蛍光脂質含有リポソームの細胞へ融合・蓄積の測定	54
4-2-11. 蛍光偏光解消法を用いた細胞膜流動性の測定	54
4-2-12. Scratch assay を用いた転移抑制効果の検討	55
4-2-13. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた仮足の観察	55
4-2-14. invasion assay による浸潤抑制試験	56
4-2-15. MMP-14 発現量の測定	58
4-2-16. トレハロースリポソームの肺がん細胞皮下移植モデルマウスに 対する治療実験	58
4-2-17. TUNEL 染色によるアポトーシスの検出	59

4-2-18. トレハロースリポソームの肺がん細胞同所移植モデルマウスに対する治療実験	59
4-2-19. HE 染色を用いた腫瘍組織の観察	59
4-3. 結果と考察	
4-3-1. トレハロースリポソームの肺がん細胞に対する制がん効果	60
4-3-2. トレハロースリポソームの肺がん細胞に対するアポトーシス誘導	63
4-3-3. アポトーシス誘導におけるシグナル伝達	65
4-3-4. トレハロースリポソームの肺がん細胞膜への影響	68
4-3-5. トレハロースリポソームの肺がん細胞遊走抑制効果	71
4-3-6. トレハロースリポソームの肺がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果	78
4-3-7. トレハロースリポソームの肺がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果	84
4-4. 総括	90
第 5 章 トレハロースリポソームの乳がんに対する <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での治療効果	
5-1. 序	92
5-2. 実験	
5-2-1. 試料	95
5-2-2. トレハロースリポソームの調製	95
5-2-3. 蛍光脂質含有トレハロースリポソームの調製	95
5-2-4. 使用細胞	95
5-2-5. 使用動物	95
5-2-6. 酵素活性測定法を用いた細胞増殖抑制試験	96
5-2-7. DNA 断片化率の測定	96
5-2-8. TUNEL 法を用いたアポトーシスの観察	96
5-2-9. カスペース活性の測定	97
5-2-10. ミトコンドリア膜電位の測定	98
5-2-11. Cytochrome <i>c</i> 量の測定	98
5-2-12. pJNK 活性の測定	99
5-2-13. 蛍光脂質含有リポソームの細胞へ融合・蓄積の測定	99
5-2-14. 蛍光偏光解消法を用いた細胞膜流動性の測定	100
5-2-15. Scratch assay を用いた転移抑制効果の検討	100

5-2-16. トレハロースリポソームの乳がん細胞同所移植モデルマウスに 対する治療実験	101
5-2-17. TUNEL 染色によるアポトーシスの検出	101
5-3. 結果と考察	
5-3-1. トレハロースリポソームの乳がん細胞に対する制がん効果	102
5-3-2. トレハロースリポソームの乳がん細胞に対する アポトーシス誘導	107
5-3-3. アポトーシス誘導におけるシグナル伝達	112
5-3-4. トレハロースリポソームの乳がん細胞膜への影響	122
5-3-5. トレハロースリポソームの乳がん細胞遊走抑制効果	127
5-3-6. トレハロースリポソームの乳がん細胞皮下移植モデルマウスに 対する治療効果	130
5-4. 総括	135
第 6 章 トレハロースリポソームのマウスに対する安全性	
6-1. 序	139
6-2. 実験	
6-2-1. 試料	141
6-2-2. トレハロースリポソームの調製	141
6-2-3. 蛍光脂質含有トレハロースリポソームの調製	141
6-2-4. 使用動物	141
6-2-5. マウス血液を用いた溶血試験	141
6-2-6. 正常マウスに対するトレハロースリポソームの 急性毒性試験	142
6-2-7. トレハロースリポソームの体内動態試験	142
6-3. 結果と考察	
6-3-1. トレハロースリポソームの溶血試験	143
6-3-2. 正常マウスに対するトレハロースリポソームの安全性	145
6-3-3. トレハロースリポソームの体内動態	159
6-4. 総括	167
第 7 章 総論	168
参考文献	173

第1章 緒論

何もない虚無からインフレーションが起きビックバンを経て宇宙は誕生した。その 96 億年後、原始太陽の周りを周回するガス雲から生命の母体となる地球が生まれた。地球に最初の生命が誕生したのは 40 億年前と考えられており、その生命は膜で包まれた小胞の様なものと予想されている。小胞に包まれた生命は外界と細胞内を分けることにより、外界には存在し得ない高分子やエネルギーを造り出せるようになった。この生体高分子を合成しエネルギーをコントロールしながら蓄え利用し、守られた区画の中で複製する事を代謝の基本とした初期の生物は瞬く間に繁栄した¹⁾。その後、生命は機能を分担し組織化した多細胞生物となり、幾多の進化を続け今日のヒトが誕生した。

ヒトの細胞は体内や細胞自身の恒常性を維持する為に DNA や細胞外のシグナルによって常に制御されている。例えば擦り傷などの怪我をした場合、傷口周辺の細胞は増殖因子を感知することで増殖を開始し、傷口を覆うと増殖を停止するようになっている。しかし、何らかの原因によってその制御から解放された場合、体内の恒常性とは関係なく細胞が無秩序に増殖する「がん」となる。がん細胞は原発巣にて異常増殖した後、周辺細胞や基底膜を分解し血管へと浸潤していく。がん細胞が血管へ到達すると、血流に乗って遠隔臓器へと転移しそこで再度増殖を開始する。この無秩序な増殖の結果、栄養の枯渇による体力の消耗、悪質液の分泌、正常組織の置き換えや圧迫、転移による複数の臓器の機能不全により最終的には死に至る。

我が国の死因の第一位は 35 年以上連続でがんである (Fig. 1-1)。2016 年の死亡者数は 130 万であり、がんが原因で亡くなった人はその内の約 30% である 37 万人であった²⁾。この原因には喫煙や食生活の欧米化、高齢化などが深く関与していることが知られている。

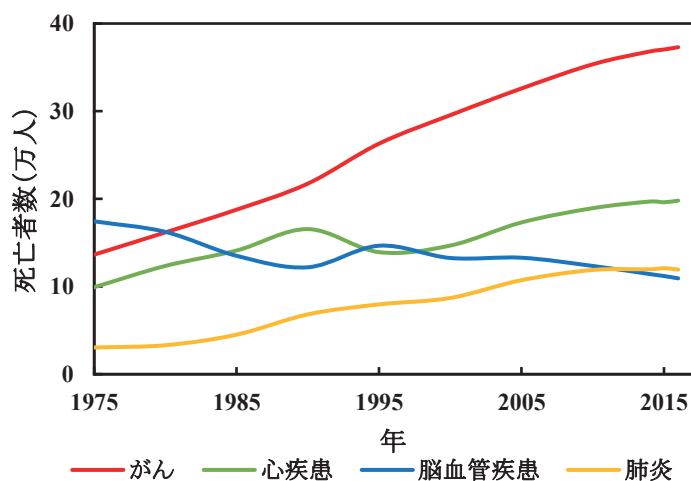


Fig. 1-1 日本における種々の疾患の死亡者数の推移²⁾

がん細胞は、遺伝子に放射線や化学物質等で傷がついた場合発生する。細胞の増殖をコントロールする遺伝子である *myc* や *ras* 等が異常をきたした場合、蛋白質を異常に合成することで細胞増殖へのアクセルが踏まれ続けた状態になる。また、そのようながん遺伝子を抑制する、*p53*、*RB*、*MLH1* 等のがん抑制遺伝子が細胞死の誘導、細胞増殖の抑制、DNA の修復によってブレーキをかけている。しかし、このがん抑制遺伝子が不活性化していると、がん遺伝子によってアクセル踏まれ続けたままになり、無秩序に増殖を繰り返すがん細胞へととなる。

がん治療には主に、外科療法、放射線療法、化学療法がある。外科療法では、がんの病巣を切除し、その臓器の周辺組織やリンパ節に転移があれば、一緒に取り除く。しかし、創部の治癒と全身の回復に時間がかかることや、臓器を切除することによって、臓器や体の機能が失われること、ごく小さな転移(微小転移)は治療できないこと、脳腫瘍などの手術不能な場所にできたがんには適応できないなどの問題がある。放射線療法は、がんの病巣部に放射線を照射し、がん細胞を死滅させる局所療法である。検査技術や照射方法の進歩により、がんだけに集中的に照射することができ、治療効果は格段に向上している。しかし、照射部位の炎症や、正常細胞に対して影響を与えてしまう。

化学療法は、進行性のがんや外科療法が行えない血液系のがんに有効とされている。主に複数の抗がん剤を投与する多剤併用療法が行われる。がん細胞は、正常細胞に比べ数多く分裂、増殖することが知られている。こうしたことから多くの抗がん剤は、がん細胞の遺伝情報をコード化する DNA の合成を直接的または間接的に障害することによって増殖を阻止する。しかし、体内には活発に増殖を繰り返す毛髪、腸細胞、白血球系の細胞等の正常細胞も存在する。これらの細胞は、がん細胞と同様に抗がん剤の影響を強く受けることとなり重篤な副作用を引き起こすこととなる。一般的に抗がん剤は濃度、時間に依存し効果を発揮することから、がん患者のように長期に渡り大量の抗がん剤の投与を受ける場合、その用量、期間に応じた副作用を被ることとなる。主な副作用に脱毛や出血、貧血、白血球の減少などの副作用が引き起こされる³⁾。また、近年分子標的薬の開発が進み様々な薬剤が臨床で使用されている。これまでの抗がん剤は細胞分裂の過程に直接作用するため、腫瘍細胞への特異性が低い。この結果、重篤な副作用が引き起こされることが欠点とされていた。一方で、分子標的薬は腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移に関わる分子を標的とし、腫瘍細胞の増殖を抑制するとともに、腫瘍の浸潤を阻害することによって、原発腫瘍の抑制のみならず、腫瘍の転移をも抑制することを目的に開発された薬剤である。現在、シグナル伝達阻害、血管新生阻害、血管内皮増殖因子(VEGF)、細胞周期調節をターゲットにした新規分子標的薬の開発が行われている。しかし、肺がん治療に用いられるイレッサの間質性肺炎のような致死的な副作用が大きな問題となっている。

ヒトの体内では毎秒約 100 万個の細胞が死んでいると言われている。この細胞の死は恒常性の維持や環境変化への適応の結果であり、これが起こらなかった場合がんや自己免疫疾患を引き起こす。逆に不必要なタイミングで細胞が死んだ場合は、脳出血、心筋梗塞などの傷害を招く。このように、細胞死はヒトが生きる上で重要な出来事だと言える。近年、細胞死の研究が進みアポトーシス (Apoptosis) やネクローシス (Necrosis)、オートファジー細胞死 (Autophagy) の他に、ピロトーシス (pyroptosis)、ネクロプトーシス (necroptosis)、アポネクローシス (aponecrosis)、パラプトーシス (paraptosis)、分裂期細胞死 (mitotic catastrophe) などの沢山の細胞死が報告されている (Fig. 1-2)⁴⁾。しかし、独自の種類とみなせるほど解明されておらず、現在は最初の 3 種類に含まれている。アポトーシスは組織から細胞が脱落していく様が、木から葉が落ちる様子に似ていることから作られた言葉である。アポトーシスが起ると細胞膜の一部が歪み水泡のようなブレブを形成する。核は潰れて高密度の状態である核濃縮を引き起こす。その後、アポトーシスした細胞の特徴である DNA のヌクレオソーム単位での断片化が起きる。細胞質では細胞小器官を細胞膜が取り込みアポトーシス小胞になる。アポトーシスが終了後、周囲の細胞やマクロファージが貪食し、そこに細胞があった形跡すらなくなる。オートファジーは、細胞が飢餓状態になり生きるための最低限の要素以外を分解することである。この自食が過剰に起き、細胞に必須の成分まで分解するとオートファジー細胞死が引き起こされると考えられている。この細胞死はアポトーシスが阻害されたときにも起き、細胞内に小胞が出現するのが特徴である。ネクローシスは細胞が物理的、化学的に損傷し引き起こされる。ネクローシスが起きると細胞小器官の膨潤や細胞の膨張によって最終的には破裂する。この細胞死ではアポトーシスであるような、クロマチンの凝集や、細胞膜のブレブ化はしない。ネクローシスが起ると、内部の蛋白質や酵素を外部に漏出する為、周辺組織にて炎症反応が示される⁴⁾。これが抗がん剤の副作用の原因になっている。副作用の軽減には、がん細胞にアポトーシスを誘導させることが重要である。

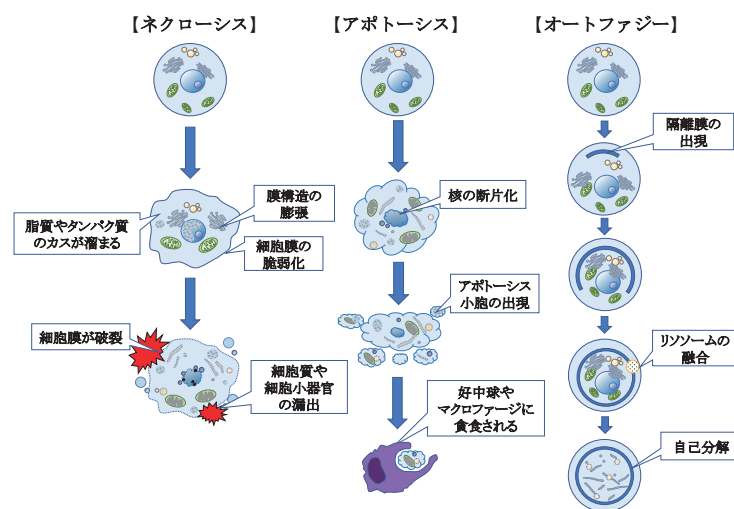


Fig. 1-2 細胞死の種類

ハイブリッドリポソーム(Hybrid Liposome : HL)^{5,6)}は、ベシクル分子とミセル分子から成るハイブリッド型リポソームで両分子を緩衝液中において超音波照射することで容易に得られる (Fig. 1-3)。また、調製時に有機溶媒の混入が一切なく、素材及び組成を変化させることによって膜直径、膜流動性、相転移温度等を調節することができる⁷⁻¹¹⁾。

HL は、酵素の持つ特異的触媒作用を人工系で再構築し、その機能の発現機構の解明を目的として研究が始められた。酵素反応に関わる諸因子を調節し、人工酵素の立体特異的触媒機能の制御が可能となっている¹²⁻²⁰⁾。

HL は脂溶性及び水溶性成分の両方を含有させることができる。この特徴を応用し、Drug Delivery System(DDS)に関する研究も行われている。HL を DDS キャリアーとして用い flavonoid や peplomycin などを HL に含有させることによって B リンパ腫瘍細胞に対する顕著な増殖抑制効果が報告されている^{21, 22)}。また、脂溶性のニトロソウレア系抗がん剤(Carmustine)を含有させた HL は、脳腫瘍モデルラットに対し顕著な延命効果を示すことも明らかとなっている²³⁾。

さらに、抗がん剤を含まない HL においても *in vitro* 及び *in vivo* において高い制がん効果があることが明らかとなっている。これまでにヒト肝臓がん細胞、ヒト肺がん細胞、ヒト乳がん細胞、ヒト前骨髄性白血病細胞、ヒト T リンパ腫細胞、ヒト大腸がん細胞、ヒト胆管がん細胞、エイズ関連リンパ腫細胞等多くのがん細胞に対して *in vitro* において制がん効果を示すことが明らかとなっている²⁴⁻³⁶⁾。また、動物を用いた体内動態試験において極めて高い安全性が確認されている³⁷⁾。さらに、担がんモデルマウスを用いた *in vivo* における治療実験においても HL の顕著な治療効果及び肝転移抑制効果があることが明らかとなっている^{32-34, 37-42)}。このように HL が種々のがん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ており、ヒト前骨髄性白血病細胞においてがん細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムが解明され、HL の制がんメカニズムの全容が報告された²⁷⁾。HL によるがん細胞へのアポトーシス誘導はまず、HL のがん細胞膜への特異的な融合・蓄積から始まる。その後デスレセプター(Fas)及びミトコンドリアへのシグナル伝達経路を経由し、カスパーゼを活性化し DNA の断片化を引き起こす。この誘導経路を通り、HL はがん細胞に対してアポトーシスを誘導すると報告されている。さらに、細胞の細胞膜流動性も HL のアポトーシス誘導に関係すると考えられており、がん細胞自体のもつ高い細胞膜流動性を識別することにより、がん細胞対してのみ HL が特異的に融合・蓄積すると考えられる。このことから、細胞膜流動性の低い正常細胞には融合・蓄積せずに細胞膜流動性の高いがん細胞に特異的に融合・蓄積しアポトーシスを誘導することも明らかとなっている^{31, 43)}。また、HL はがん細胞の増殖に影響を与えない低濃度においても短時間でがん細胞の細胞膜流動性を著しく増大させることも明らかとなっており、HL のがん細胞に対するアポトーシス誘導に細胞膜流動性が関係していると考えられる^{35, 43, 44)}。

HL は、その顕著な制がん効果及び高い安全性から、生命倫理委員会承認後の臨床試験において再発悪性リンパ腫の患者に対するパイロットスタディを行ったところ、副作用がなく、固形リンパ腫の縮小及び顕著な延命効果が得られ、高い安全性も明らかとなった^{45, 46)}。また、肝臓がん患者に対するパイロットスタディにおいても、肝臓がんの腫瘍マーカー(PIVKA-II)が減少し、顕著な治療効果を示している⁴⁷⁾。

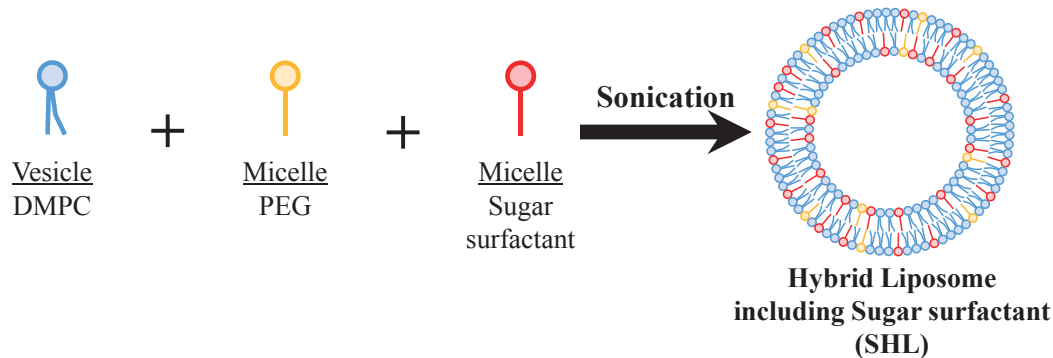


Fig. 1-3 糖系界面活性剤含有ハイブリッドリポソームの調製法

一方、スクロースミセルなど種々の糖系界面活性剤を含有させた HL は *in vitro* において肺がん、脳腫瘍および肝臓がん細胞に対し高い制がん効果が確認されている⁴⁸⁻⁵¹⁾ (Fig1-3)。この制がん効果はがん細胞の膜表面に糖含有 HL が糖成分を効率的に運ぶことで、がん細胞膜表面にある薄く構造化した水が糖の水酸基によってより構造化したことにより引き起こされることが示唆された。このことから、糖の中でも高い水和能力を持つトレハロース(Trehalose)を用いることで更なる制がん効果の向上を期待してトレハロースリポソームが創製された。

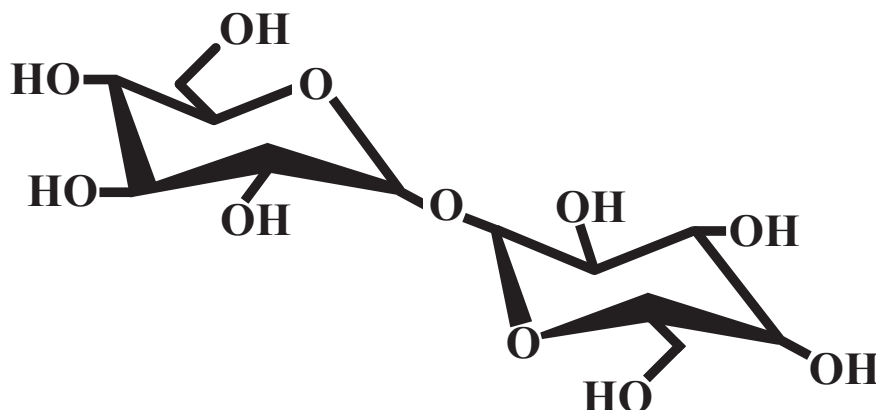


Fig. 1-4 トレハロース

トレハロース (Fig1-4) はグルコースが結合した二糖である。1832 年にウィーグズによってライ麦の麦角から発見され、1859 年にゾウムシの作るトレハロマンナから分離されトレハロースと命名された^{52,53)}。自然界に多く存在し、キノコ類、酵母等などの菌類や

微生物中に確認されている。トレハロースは、脱水・凍結などのストレス条件下で細胞膜を安定化させ細胞へのダメージを抑制する事から、様々な場面で保存剤として使用されている⁵⁴⁻⁶⁰⁾。また、トレハロースがヘキソース取り込みを阻害することによって肝細胞のオートファジーを誘導し、*in vivo* における非アルコール性肝疾患 (NAFLD) の治療効果を示すことが報告されている⁶¹⁾。

トレハロースは結核菌の細胞壁に糖脂質として存在している事も確認されており、様々な免疫反応に関与している事が明らかとなっている⁶²⁻⁶⁵⁾。結核菌細胞壁に存在するトレハロース-6, 6'-ジマイコレートは、*in vitro* 及び *in vivo* に於いて抗腫瘍効果を示す事が明らかとなっている⁶⁶⁻⁶⁸⁾。

トレハロースにアシル鎖を付与したトレハロースミセル (TreC14) とリン脂質から構成されるトレハロースリポソーム (DMTreC14 : Fig.1-5) は、胃がん、肝臓がん、大腸がん細胞に対して顕著な制がん効果を示し、正常肺細胞に対しては影響を与えないことが報告されている^{69, 70)}。DMTre の固定水層は、TreC14 濃度依存的に増大することが明らかとなっており、DMTre のがん細胞増殖抑制効果にトレハロースの水和が関与していると考えられている⁶⁹⁾。

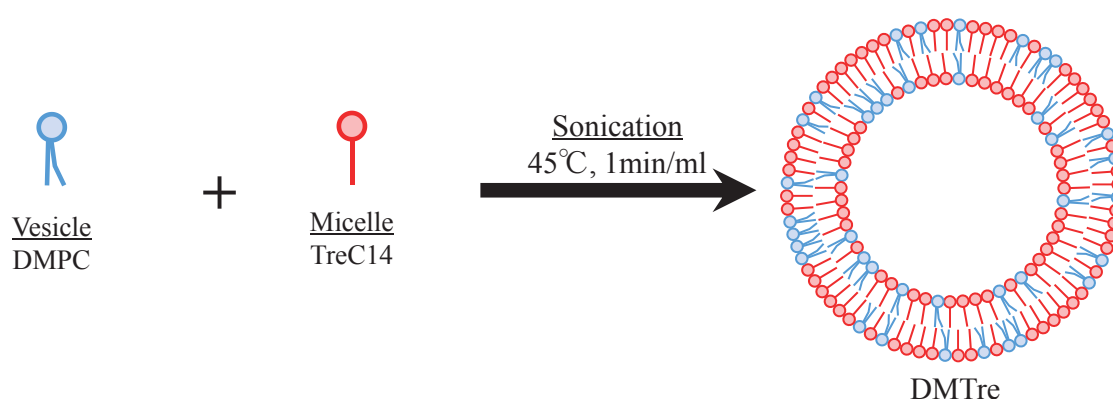


Fig. 1-5 トレハロースリポソームの調製法

本研究では、トレハロースリポソームのがん治療薬への応用を目指して *in vitro* では制がんメカニズムと転移抑制効果について検討した。また、*in vivo* における治療効果および安全性について検討を行った。本論文は、以下 6 章から成り立っている。第 2 章では、トレハロースリポソームの膜物性について述べる。第 3 章では、トレハロースリポソームの白血病に対する *in vitro* および *in vivo* での治療効果について述べる。第 4 章では、トレハロースリポソームの肺がんに対する *in vitro* および *in vivo* での治療効果について述べる。第 5 章は、トレハロースリポソームの乳がん治療に対する *in vitro* および *in vivo* での制がん効果について述べる。第 6 章は、トレハロースリポソームの安全性について述べる。第 7 章では以上の研究結果の総論である。

第2章 トレハロースリポソームの膜物性

2-1. 序

細胞膜は細胞と外界を隔てる生体膜である。細胞膜の役割は、外界との境界として内部物質の流出を防ぐほか、酵素による物質代謝、受容体による情報の感受、輸送体による選択的透過性、能動輸送および促進拡散、免疫特性の発現などがある。

生体膜の歴史は、1838年に発表されたシュライデン(Schleiden)による植物における説と1839年にシュワン(Schwann)が主に動物細胞に対して提唱した説から成る細胞説が確立されたことから始まる。細胞説により「細胞はすべての生物の構造および機能の単位」と示されたことから、細胞と細胞を隔てている障壁に注目が集まった。1895年 Overton は「脂溶性物質ほど良く細胞内に取り込まれやすいことから、隔壁を形成する膜は大部分脂質であることが推察される」、1925年 Gorter と Grendel が「赤血球から抽出した脂質を単分子膜にした際、面積は、赤血球表面積の約二倍になることから、赤血球膜の脂質は二重分子層又は二分子膜構造である」と提唱した。この2つの実験結果から、1935年 Danielli と Davson は「生体膜はリン脂質二重層がタンパク質で覆われた3重構造をしている」という生体膜の基本構造モデルが初めて提唱された。その後、1972年にシンガー(Singer)とニコルソン(Nicholson)が「生体膜は脂質二重層の中にタンパク質がモザイク状に入り混じっており、タンパク質は其中を浮遊して拡散によって移動している」という流動モザイクモデル⁷¹⁾を提唱し、今日まで幅広く受け入れられている^{72,73)}。流動性モザイクモデルとは脂質によって形成された二分子膜中にタンパク質が埋まっているというものである。水中の脂質と脂質、脂質とタンパク質、タンパク質とタンパク質間においてそれぞれ相互作用によって入り混じり(モザイク性)、膜中を自由に動き回れる(流動性)という考え方である⁷³⁾。当初の流動モザイクモデルにおいて、脂質分子は基盤平面上に一樣に分布しているような描き方をされていた。しかし、1990年初頭から脂質ラフトという概念が登場し、生体膜において特定の種類の脂質分子が他の分子に比べてお互いに寄り添っている確率が高いというように、同一膜上でありながらも脂質分子の分布には偏りがあるという様に見直された。細胞膜上において糖脂質やコレステロール、タンパク質から形成されるマイクロドメインが存在することが明らかになっており、この機能ドメインを脂質ラフトという^{74,75)}。

Liposome (リポソーム)は脂質(lipo)と細胞体(some)から合成されてできた言葉である。1964年に Bangham らによってレシチンを水溶液中で懸濁することで閉鎖小胞体(Vesicle)を形成することが電子顕微鏡観察によって明らかとなり、生体膜の熱力学的安定性をもたらす物質となることを発見した^{76,77)}。またこの閉鎖小胞体ベシクルは、各種イオンを内包することができ、それらの膜透過挙動が生体膜と類似していることから、リポソームと名付けられた。一方、生体膜の主な構成成分が脂質とタンパク質であることも新たに報告された。リポソームの発見以来様々な研究が行われ、合成脂質等

の天然の脂質でもリポソーム形成が起こることが明らかとなった。このリポソームはその特性からドラッグデリバリーシステム (DDS : Drug Delivery System) の研究にキャリアーとしてよく用いられている。リポソームを特性として以下の様なものが挙げられる。(1) 膜物性が調節できる。(2) 表面修飾が容易でターゲティング性の付加が可能。(3) 毒性が低く、抗原性が低い。(4) 生体内で代謝される。(5) 脂溶性、水溶性、両親媒性分子など幅広い分子を保持出来る。(7) リポソーム乾燥製剤の調製が容易である。(8) 大量生産や規格化が容易である⁷⁸⁾。また、長時間血中に滞留できるリポソーム⁶²⁾が開発され、肝臓の細網内皮系(Reticuloendothelial system : RES)を回避するリポソームも開発された^{79,80)}。現在ではアントラサイクリン系抗がん剤を RES 回避可能なリポソームに封入したリポソーム製剤が市販されている⁸¹⁾。このような RES 回避可能なリポソームは、長期血液滞留性が得られるだけでなく、血液透過性の高いがん組織に受動的に集積する Enhanced Permeability and Retention(EPR)効果も期待する事が出来る⁸²⁾。

これまでに松本らは、リポソームに糖系界面活性剤であるスクロースミセル、グルコースミセル、マルトースミセルなどの糖を組み込んだ糖含有ハイブリッドリポソームを創製している⁸³⁻⁸⁶⁾。さらに、糖含有ハイブリッドリポソームの脳腫瘍細胞、肺がん細胞、肝臓がん細胞に対する顕著な増殖抑制効果を報告している⁸³⁻⁸⁶⁾。

本章では、リン脂質(DMPC)とトレハロース界面活性剤(TreC14)から成るトレハロースリポソームの膜物性を動的光散乱法および透過型電子顕微鏡観察により検討した。

2-2. 実験

2-2-1. 試料

【リン脂質】

双性リン脂質であるL- α -Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC : M.W. = 677.9, 相転移温度 : 23.9°C)は、市販品 (Nippon Oil and Fast Co., Ltd., purity > 99%)をそのまま使用した。以下に構造式を示す。

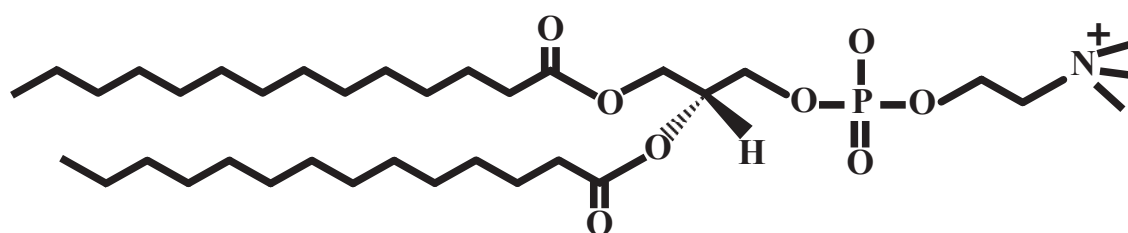


Fig 2-2-1. Chemical structure of L- α -Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC).

【糖系界面活性剤】

α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monomyristate (TreC14 : M.W. = 552.65)は、市販品 (DOJINDO)をそのまま使用した。以下に構造式を示す。

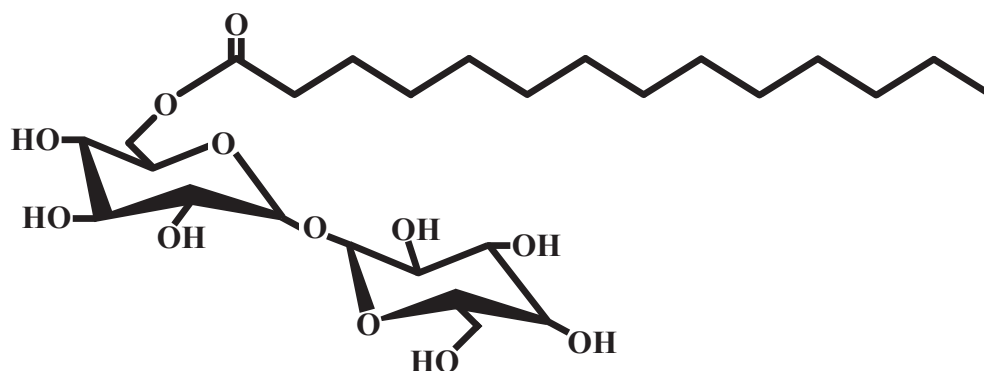


Fig 2-2-2. Chemical structure of α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monomyristate (TrehaloseC14 : TreC14).

2-2-2. トレハロースリポソームの調製

双性リン脂質の DMPC 及び、トレハロース界面活性剤の TreC14 を秤量し、ナス型フラスコに入れた後、5%ブドウ糖溶液中でバス型超音波照射器(WT-200-M, 200 W, 28/45 kHz, 45 °C)を用いて超音波照射(45 °C, 1 ml/ ml)を行った。得られた均一な溶液を孔径 0.45 µm フィルターで濾過滅菌したものを試料溶液として用いた。試料は 37°Cで保存した。

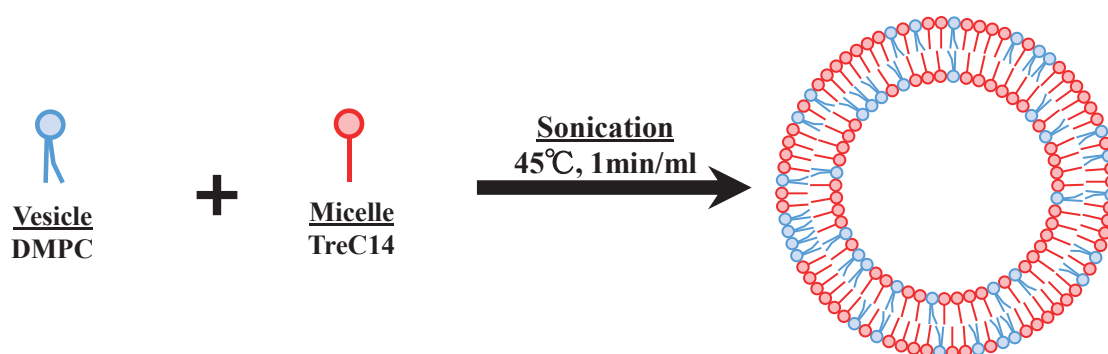


Fig. 2-2-3 Schematic representation of Trehalose liposome (DMTreC14).

2-2-3. 動的光散乱法を用いた膜直径の測定

溶液中に分散した粒子はブラウン運動をしており、その運動は粒子の大きさより変化する。溶液中の粒子にレーザーを照射すると、粒子からの散乱光はそれぞれのブラウン運動に応じた揺らぎを観測できる (Fig. 2-2-4)。

動的光散乱法 (Dynamic light scattering)¹⁾では、ブラウン運動により絶えず移動している粒子にレーザーを照射し、その粒子の散乱光の揺らぎを観察する。散乱光の干渉による強度分布は粒子のブラウン運動により、絶えず揺らいでいる。このため、ピンホール等の光学系を用いると、ブラウン運動の様子を散乱光強度の揺らぎとして測定することができる。この揺らぎから自己相関関数を求め、キュムラント法解析を用いることで、ブラウン運動速度を示す拡散計数、さらに粒子径や粒子径分布が明らかとなる。

トレハロースリポソームの膜直径 (Hydrodynamic diameter : d_{hy}) は、粒径分布測定装置 (ELS-Z, Otsuka electronics) を使用し動的光散乱法を用いて測定を行った。光源に He-Ne レーザー (632.8 nm) の発振線を出力 35 mW で使用し散乱角 90° で測定した。得られた拡散係数(D)を(1)式 (Stokes - einstein の式) に代入し膜直径を求めた。 κ は Boltzmann 定数、T は絶対温度、 η は溶液の粘度である、また、試料は 37 °C で保存・測定した。

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

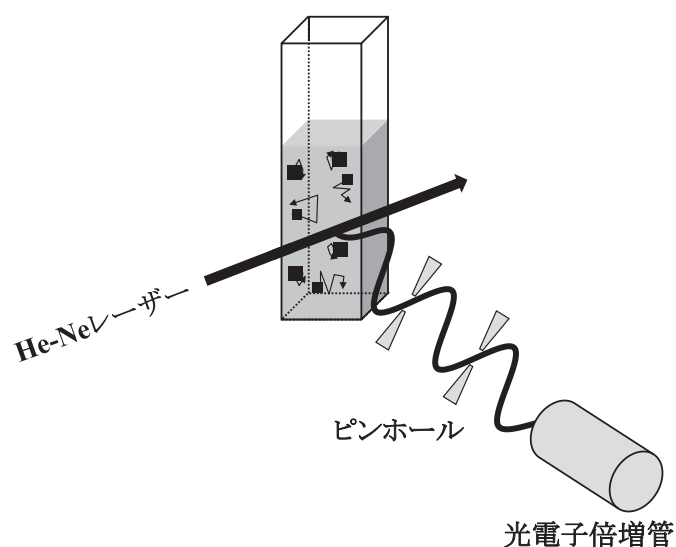


Fig. 2-2-4 Dynamic Light Scattering.

2-2-4. ネガティブ染色を用いた透過型電子顕微鏡によるトレハロースリポソームの観察

ネガティブ染色したトレハロースリポソームの電子顕微鏡観察は、(株)花市電子顕微鏡技術研究所に委託した。トレハロースリポソーム ($[DMPC]=1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[TreC14] = 2.33 \times 10^{-3} \text{ M}$) を蒸留水で 5 倍希釈したものをカーボン支持膜 (400 Cu グリッド) にマウント後、染色剤である 2% リンタングステン酸水溶液 (pH. 4) で 5 分間染色したものを透過型電子顕微鏡 (JEM1200EX at 8KV, JEOL) を用いて倍率 5 万倍で観察した。

2-3. 結果と考察

2-3-1. トレハロースリポソームの膜直径

動的光散乱法を用いて DMTreC14 の膜直径の経時変化を測定した。結果を Fig. 2-3-1 及び Table 2-3-1 に示す。DMPC および DMTreC14 10 mol%, 50 mol% は 100nm ~ 250 nm の膜直径で約一ヶ月以上安定した。また、DMTreC14 30 mol% は調製直後から不安定であった。一方、DMTreC14 70 mol% の膜直径は細網内皮系 (RES) を回避可能な 100 nm 以下で約一ヶ月以上安定した。

以上の結果から、DMTreC14 70 mol% は、膜直径が 100 nm 以下であり、静脈投与の際 RES からの捕捉を回避することができる為、臨床応用の有用性が高いと考えられる。

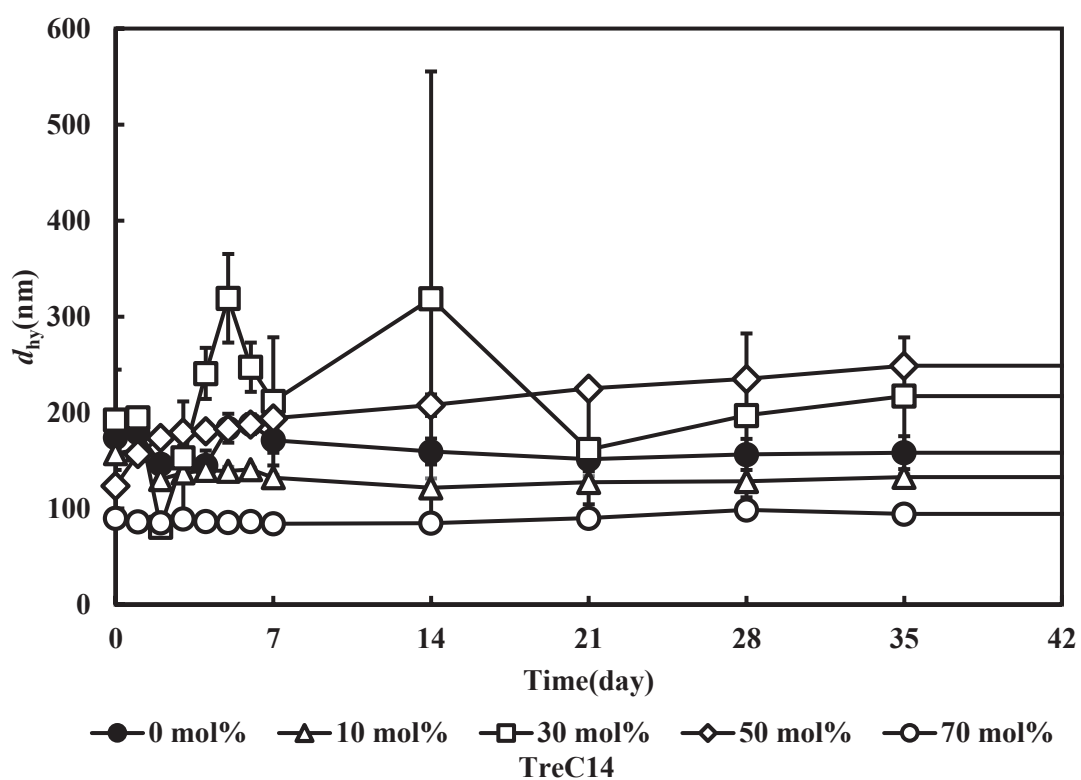


Fig. 2-3-1 Time course of diameter (d_{hy}) change for DMPC and DMTre in 5% glucose solution.

$$[\text{DMPC}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ M}, \quad [\text{TreC14}] = 0.1 \sim 2.33 \times 10^{-3} \text{ M}.$$

Table 2-3-1 Time course of diameter (d_{hy}) change for DMTrC14 and DMPC in 5% glucose solution.

Time (day)	Sample	0	1	2	3	4	5
d_{hy} (nm)	DMPC	174.1±11.2	179.1±17.4	146.3±8.8	152.1±13.2	144.9±15.6	183.7±15.1
	10 mol%	157.4±4.2	161.3	130.3	137.2±3.8	139.9±3.9	139.0±4.4
	30 mol%	192.5±52.2	194.6	80.7	152.9±58.7	240.8±26.6	319.1±46.2
	50 mol%	123.8±5.2	157.1	173.8	179.4±2.8	180.8±0.9	183.5±0.1
	70 mol%	90.1±1.6	86.1±3.1	85.4±3.8	89.1±3.2	86.6±1.6	85.6±1.6
Time (day)	Sample	6	7	14	21	28	35
d_{hy} (nm)	DMPC	187.9±10.3	171.2±13.0	159.5±13.5	151.4±12.5	156.4±16.2	158.2±17.0
	10 mol%	140.7±1.8	132.1±3.0	121.7±9.7	127.4±6.3	128.5±1.9	132.7±3.2
	30 mol%	247.3±25.7	211.7±66.7	318.6±236.8	161.6±57.2	197.1±85.4	217.3±61.1
	50 mol%	187.6±4.1	194.0±3.7	207.7±11.2	225±7.6	235.0±1.4	248.8±8.2
	70 mol%	86.7±2.5	84.2±5.0	84.8±6.1	90.1±3.3	98.6±6.5	94.3±5.6

2-3-2. ネガティブ染色を用いた透過型電子顕微鏡によるトレハロースリポソームの観察

トレハロースリポソームをネガティブ染色し透過型電子顕微鏡を用いて観察した。顕微鏡写真を Fig. 2-3-2 に示す。写真から明らかなように、トレハロースリポソームは均一な二分子膜構造を有する球形であることが示された。また、トレハロースリポソームは、動的光散乱法による測定結果と一致する 100 nm 以下の膜直径であることが明らかとなった。

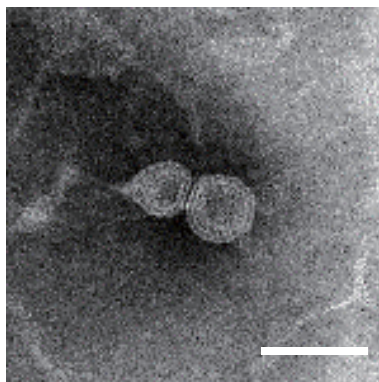


Fig. 2-3-2 An electron micrograph of DMTreC14 70 mol%.

Scale bar : 100 nm

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [DMTreC14] = 2.33×10^{-4} M.

2-4. 総括

本章ではトレハロースリポソーム(DMTreC14)の膜物性について検討したところ、以下のような知見が得られた。

1. DMPC および DMTreC14 10 mol%, 50 mol%は 100nm～250 nm の膜直径で約一ヶ月以上安定した。また、DMTreC14 30 mol%は調製直後から不安定であった。
2. DMTreC14 70 mol%の膜直径は細網内皮系 (RES)を回避可能な 100 nm 以下で約一ヶ月以上安定した。
3. 透過型電子顕微鏡での観察により、DMTreC14 70 mol%は均一な二分子膜構造を有する球形であることが明らかとなった。

以上のことから、DMTreC14 70 mol%は、直径約 100 nm 以下の均一な球形をしており、長期間安定なリポソームを形成することが明らかとなった。また、生体への静脈投与の際に、細網内皮系への取り込みを回避できることが示唆され、臨床応用において期待できることが明らかとなった。

また、この結果から以後の実験は DMTreC14 70 mol% (DMTre)を用いて行った。

第3章 トレハロースリポソームの白血病に対する *in vitro* および *in vivo* での治療効果

3-1. 序

血液は血管内を循環する粘稠な赤色の液体であり、血漿と呼ばれる淡黄色の液体成分と細胞成分に分けられる。血漿は pH の維持や、凝固反応に関わるフィブリノゲンなどの蛋白質、グルコースやアミノ酸などの栄養素、細胞から排出される老廃物を運搬している。細胞成分は赤血球、白血球、血小板に分けられる。赤血球の役割は酸素と二酸化炭素の運搬である。ガス交換は赤血球細胞膜を通して酸素と二酸化炭素が交換され、細胞質のヘモグロビンと酵素の働きで酸素と二酸化炭素は輸送される。白血球は生体免疫に関わる細胞である⁸⁷⁾。末梢血中の白血球には顆粒球・リンパ球・単球があり、顆粒球はギムザ染色による染色のされ方の違いによって好中球、好酸球、好塩基球の3つに分類される⁸⁸⁾。したがって白血球は通常、好中球・好酸球・好塩基球・リンパ球・単球の5種類に分類される。血小板は血栓の形成に中心的な役割を果たし、血管壁が損傷した時に血小板凝集を起こし止血する⁸⁹⁾。これらの血球は骨髄にて産生されている。骨髄では造血幹細胞が自己複製を行っている。増殖した造血幹細胞は、骨髄系幹細胞とリンパ系幹細胞に分化し、前駆細胞となりそれぞれの血球へ分化・成熟して行く。この造血幹細胞に異常が起き無秩序に増えることで、血球の造血を阻害する病が白血病である。

白血病は、白血病細胞が幼若な形態のまま増加していく「急性白血病」と白血病細胞が一見正常な血液細胞に見える「慢性白血病」に分けられる。更に、骨髄系細胞から発生する「骨髄性白血病」と、リンパ球系細胞から発生する「リンパ性白血病」に分類される。治療法は主に化学療法が用いられる。初めに複数の抗がん剤を4~5週間大量に投与し、白血病細胞を寛解させる「寛解導入療法」が用いられる。その後、5%以下になった白血病細胞をさらに減らす「地固め療法」が行われる。地固め療法では、寛解導入療法で用いた複数の抗がん剤を続けながら、別種の抗がん剤も加え更に数ヵ月間治療を行う。その後、完全寛解を維持する為に少量の抗がん剤による治療を1~2年間続け、完全寛解が5年以上持続した場合白血病は治癒したと考え治療が終了する。しかし、大量の抗がん剤を使用する為、脱力、吐き気、嘔吐、下痢、脱毛、貧血、血液凝固能の低下、食欲不振、易感染性等の副作用が生じ、患者の QOL (quality of life) の著しい低下が引き起こされる。

ヒトの体内では恒常性の維持や環境適応の為、毎秒訳 100 万個の細胞が死んでいく。細胞の死には主にアポトーシス、オートファジー細胞死、ネクローシスの3つに分類される。アポトーシス (Apoptosis) は DNA が凝集し、ヌクレオソーム単位に切断される。細胞質や細胞小器官は細胞膜により細分化されアポトーシス小体を形成する。

アポトーシス小体はマクロファージや隣接する細胞によって貪食される為、炎症反応は起きない。オートファジー (Autophagy) は細胞が飢餓状態の際、必要最小限の細胞小器官を残し、それ以外を分解し、自食することである。この過程が過剰に進み生きるのに必要な要素まで分解されると細胞は死に至ると考えられ、それをオートファジー細胞死 (Autophagic cell death) と呼ぶ。最後の細胞死はネクローシス (Necrosis) である。これは細胞が物理的な傷害によって引き起こされる事が多く、細胞が膨潤し、破裂することで細胞の内容物が流失し、炎症反応を引き起こす。アポトーシスの誘導はカスパーゼによって引き起こされる。カスパーゼ (Caspase : Cysteine protease that cuts proteins after aspartic acid residues) はエンドペプチターゼであり活性部位にシステインを含み、アスパラギン酸で終わる配列を切断する。ヒトのカスパーゼは 12 種類が同定されており、その中でもイニシエーター (誘導) とエフェクター (実行) に分類することができる。通常、カスパーゼは不活性状態のプロカスパーゼの状態で存在している。シグナル伝達経路の上流より開始のシグナルを受けて活性化したイニシエーターカスパーゼはプロカスパーゼを切断し活性化させる。活性化したエフェクターカスパーゼはアポトーシスを実行する為に、DNA の断片化や核ラミンの切断を行う⁴⁾。

がん治療に用いられる抗がん剤は、DNA 合成阻害、細胞分裂阻害、DNA 損傷、代謝拮抗、栄養阻害などがある。しかし、これらの抗がん剤はがん細胞のみではなく成長の盛んな正常細胞にまで影響を与える。また、一部の抗がん剤はがん細胞をネクローシスさせ病巣に炎症を引き起こす。この現象が抗がん剤の副作用へとつながっている。副作用を無くす為には、正常細胞とがん細胞を識別し、がん細胞をアポトーシスさせる薬剤が必要である。

本章では、トレハロースリポソームの急性白血病 (acute lymphoblastic leukemia : ALL, MOLT-4) 細胞に対する制がんメカニズムの解明及び *in vivo* での白血病細胞皮下移植モデルマウスに対するアポトーシス誘導による治療効果について検討した。

3-2. 実験

3-2-1. 試料

DMPC 及び TreC14 は 2-2-1 と同様のものを使用した。

【蛍光リン脂質】

蛍光リン脂質である蛍光脂質 1-palmitoyl-2-[12-(7nitro-2, 3-benzoxa- diazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine (NBDPC : M.W. = 856.05) は、市販品 (Aventi polar lipids) をそのまま使用した。以下に構造式を示す。

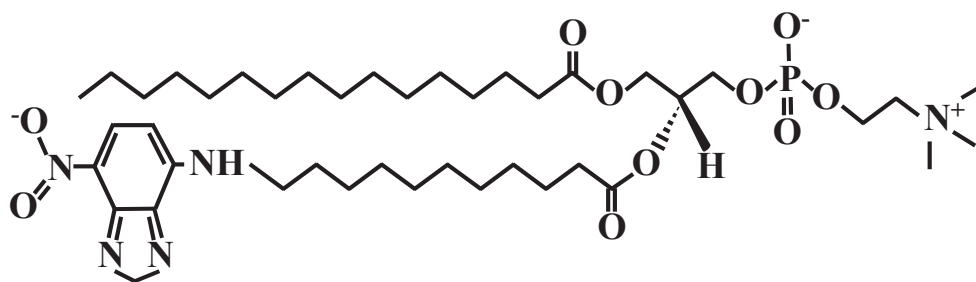


Fig. 3-2-1 Chemical structure of 1-palmitoyl-2-[12-(7nitro-2, 3-benzoxa- diazol-4-yl) amino] dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine (NBDPC).

3-2-2. トレハロースリポソームの調製

トレハロースリポソームは、2-2-2 と同様の方法にて調製した。

3-2-3. 蛍光脂質含有トレハロースリポソームの調製

双性リン脂質の DMPC、トレハロース界面活性剤の TreC14 及び蛍光脂質の NBDPC を秤量し、ナス型フラスコに入れた後、5%ブドウ糖溶液中でバス型超音波照射器 (WT-200-M, 200 W, 28/45 kHz, 45 °C) を用いて超音波照射 (45 °C, 1 min/ ml) を行った。得られた均一な溶液を孔径 0.45 µm フィルターで濾過滅菌したものを試料溶液として用いた。

DMTre/ NBDPC : (70 mol% TreC14 /29m mol% DMPC /1m mol% NBDPC)

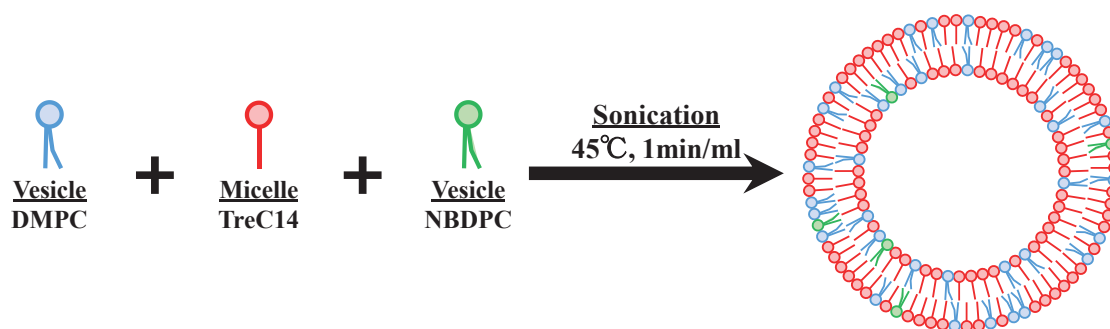


Fig. 3-2-3 Schematic representation of trehalose liposome (DMTre/NBDPC).

3-2-4. 使用細胞

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターより購入したヒト急性リンパ芽球性白血病 (MOLT-4) 細胞を用いた。培養培地として 90 % RPMI-1640/10 % FBS を使用した。また、培養は 37°C、湿度 95%、CO₂ 濃度 5% の条件で行った。

3-2-5. 使用動物

動物は岡田誠司教授 (熊本大学) より提供して頂いた、Jak3, Rag-2 遺伝子をノックアウトした高度免疫不全マウス (BALB/c-R/J)⁹⁰⁾ を自家繁殖させ使用した。

マウスは、恒温恒湿環境下 (室温 24±2 °C、湿度 55±10 %、照明時間 12 時間) のクリーンルーム内にて飼育した。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。

3-2-6. 酵素活性測定法を用いた細胞増殖抑制試験

トレハロースリポソームの MOLT-4 細胞に対する増殖抑制効果は、酵素活性測定法である WST-8 assay(Cell Counting Kitt-8, DOJIN)を用いて評価した。WST-8 assay⁹¹⁾は、細胞内電子伝達系における脱水素反応により高感度水溶性ホルマゼンを生成する WST-8 (2-[2-methoxy-4-nitrophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H-tetrazolium,monosodium salt)を発色基質として用いることにより、細胞の増殖活性の評価や生細胞数を算出する方法である。WST-8は、細胞外で乳酸脱水素酵素の補酵素である NADH から 1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate を介して電子を受け取ることで還元され、水溶性の WST-8 formazan を生成する。この WST-8 formazan の生成量は、生細胞数と比例関係にあるため、この比色値を吸光度として測定し比較することで、細胞増殖の指標とすることが出来る。

96 well マルチプレート(SUMIRON)に MOLT-4 細胞 (1.0×10^5 cells/ml)を 100 μ l/well で播種し、24 時間前培養を行った。その後、各試料を 10 μ l/well 添加し、インキュベートした(37°C, 5%CO₂, 湿度 95%, 48h)。48 時間後に Cell Counting Kit-8 を 10 μ l/well 添加し、2.5 時間の呈色反応を行った。呈色反応後、マイクロプレートリーダー (VERSA max microplate reader, Molecular Devices)を用いて波長 450 nm の条件で吸光度を測定した。

試料を添加したものを陽性対象とし、5%ブドウ糖溶液を添加したものを陰性対象、細胞懸濁液のみのものをブランクとして使用した。陽性対象からブランクを引いたものを A_{mean} , 陰性対象からブランクを引いたものを A_{control} とし、以下の式(3-1)より細胞の生存率を算出した。

$$\text{Viability (\%)} = (A_{\text{Mean}} / A_{\text{Control}}) \times 100 \quad \dots (3-1)$$

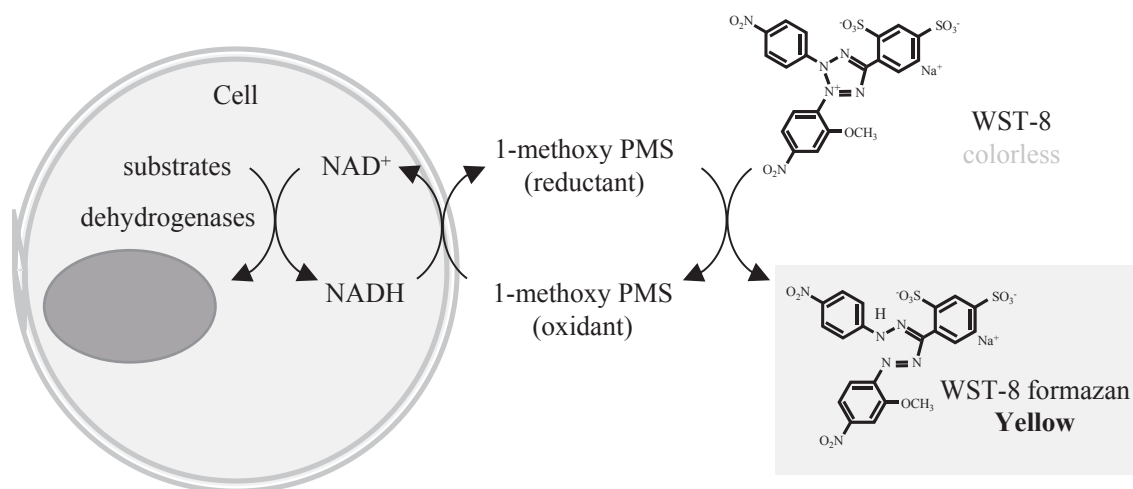


Fig. 3-2-4 Reaction scheme of WST-8.

3-2-7. DNA 断片化率の測定

DNA 断片化率を PI (Propidium iodide) 染色法を用いてフローサイトメーターにて測定した。フローサイトメーターにおける測定では細胞毎にレーザーを照射する必要があり、その状態はフローセルによって作られている。フローセルは流体力学に基づいて設計されており、サンプル溶液の流れとシース液の流れにより流層が形成される。サンプル液側の流速をシース液側の流速よりわずかに遅くすることにより、サンプル液はシース液との流層を作る段階で流体力学的絞り込みが生じ、細胞が一列に並ぶ。この状態でレーザー光が細胞を通過し、発される散乱光や蛍光をダイクロイックミラー (Dichroic mirror : DM) やバンドパスフィルター (Bandpass filter : BP) を用いて分光し、光電子増倍管 (Photomultiplier tube : PMT, 検出器) にて電圧パルスに変換することにより測定される。測定結果をパラメーターごとに解析することにより、細胞ひとつひとつの特性を分析することが出来 (Fig. 3-2-5)。散乱光はレーザー入射と同一直線上で前方散乱光 (forward scatter : FSC) と、垂直方向で側方散乱光 (Side scatter : SSC) として PMT によって検出され、FSC は細胞の大きさ、SSC は細胞の形や内部構造の複雑さを知ることが出来る (Fig. 3-2-6)⁹²⁾。蛍光は、細胞の微量のタンパク質などを蛍光物質にて特異的に染色することにより細胞内での発現量を調べることができる。これらの検出器を組み合わせ、免疫染色や蛍光染色を用いることにより多様なデータを一度に解析することが可能となった。

PI は、DNA の二重鎖に架橋的に結合することによって蛍光強度が 10 倍に、量子収集率は 24 倍になる蛍光色素である。さらに、光に対する安定性も良好かつ染色法もきわめて簡単であるため最も使いやすく、DNA 量測定に優れた染色方法である⁹³⁾。

100 mm dish に細胞 (1.0×10^5 cells/ml) を播種 (10 ml/ dish) し、24 時間培養した。その後、各試料を添加し、インキュベートした (37°C, 5%CO₂, 湿度 95%, 24h)。24 時間後に細胞を回収し、上澄みを除去した後に 0.1% Triton-X 100 を添加して浸透化処理をした。浸透化処理後に、RNase (1 mg/ml, SIGMA) により細胞内の RNA を分解除去した (室温, 5 min)。PBS(-) で再懸濁したものをナイロンメッシュに通過させ、テストチューブに入れた。PI (Fig. 3-2-7) を添加して DNA を染色し、フローサイトメーター (EPICS® EX, Beckman Coulter) を用いて細胞の DNA 断片化率を測定した。光源に Ar レーザー (488 nm, 15 mW) を使用し、FL3 センサー (605~630 nm) を用いて蛍光を検出した。

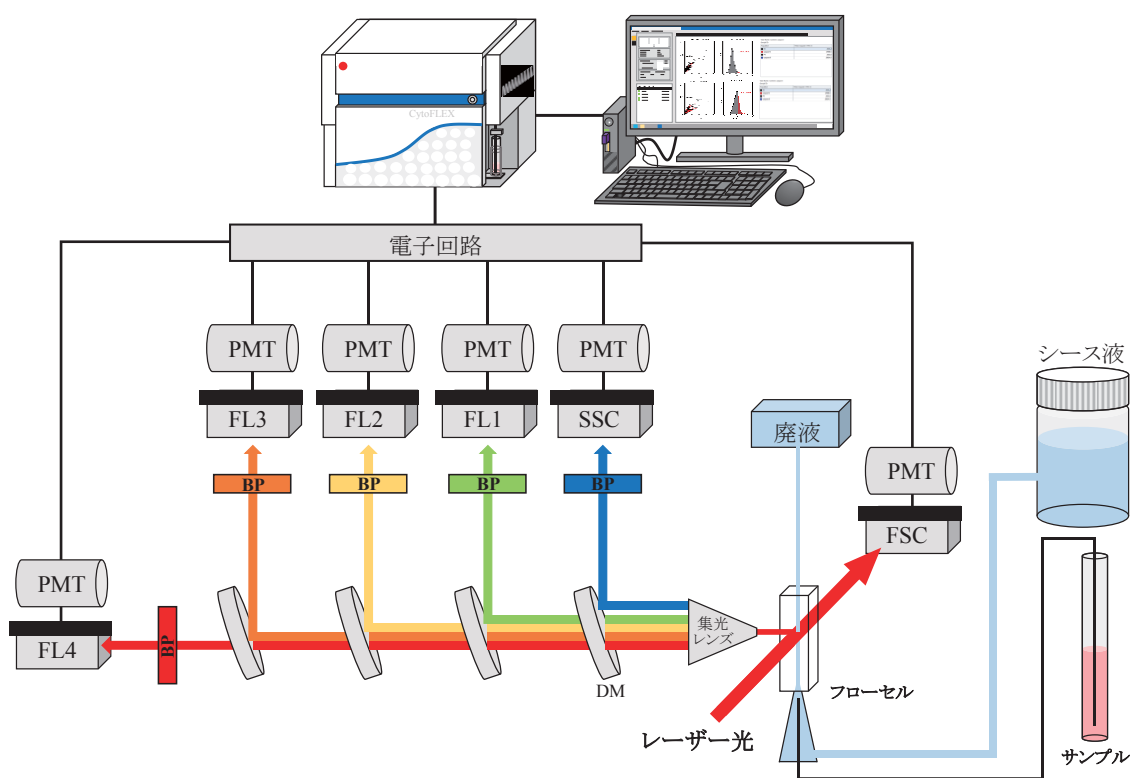


Fig. 3-2-5 Principle of flow cytometer.

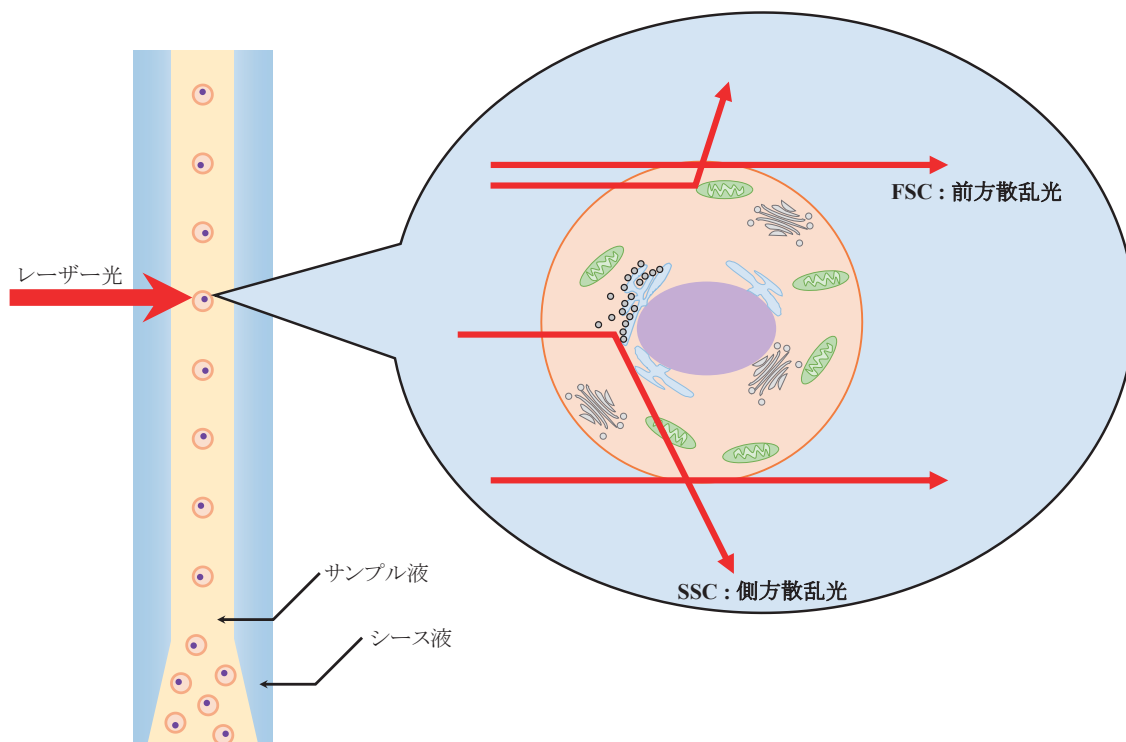


Fig. 3-2-6 Structure of flow cell.

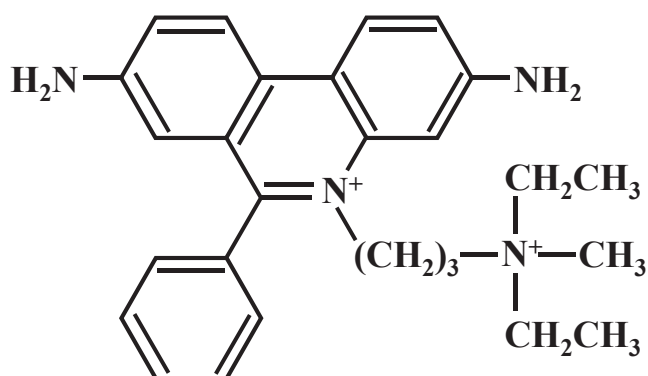


Fig. 3-2-7 Chemical structure of propidium iodide.

3-2-8. カスパーズ活性の測定

カスパーズ(caspase : Cysteine-aspartic-acid-protease)は、一般的にプロテアーゼ活性を有しない前駆体 pro-caspase として細胞内に存在し、アポトーシス誘導による刺激を受けた際にプロセッシングされて活性型となる。カスパーズの種類は現在確認されているだけで 14 種類存在し、その中の-2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12 がアポトーシス誘導に関与しているとされている⁹⁴⁾。

カスパーズ-3, -8, -9 活性の測定は、カスパーズに対して特異的な蛍光基質である PhiPhiLux と CaspaLux (OncoImmunit, Inc)を用いて評価した。PhiPhiLux はカスパーズ-3(Green Fluorescence, PhiPhiLux-G₁D₂)、CaspaLux はカスパーズ-8 (Green Fluorescence, CaspaLux 8-L₁D₂)およびカスパーズ-9 (Green Fluorescence, CaspaLux 9-M₁D₂)にそれぞれ特異的な認識配列(DEVDGI および IETDSG, LEHDG)を蛍光色素で標識した蛍光基質である (Fig. 3-2-8)。カスパーズ-3, -8, -9 によって基質配列中の GI および SG, DG が切断されることで蛍光を発する⁹⁵⁻¹⁰⁰⁾。

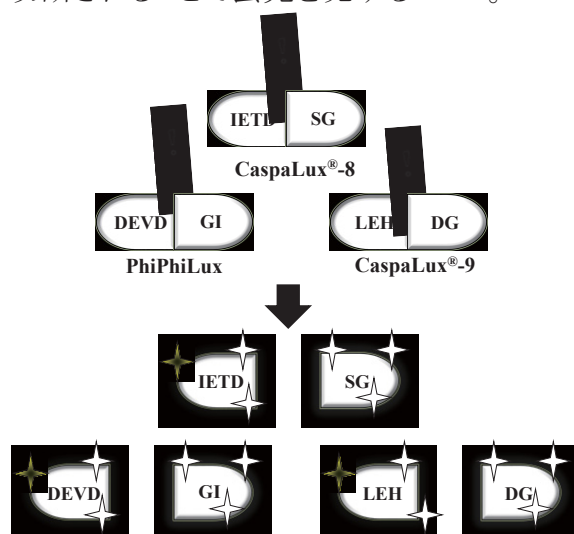


Fig. 3-2-8 Principle of PhiPhiLux and CaspaLux.

100 mm dish に細胞(1.0×10^5 cells/ml)を播種(10 ml/ dish)し、24 時間前培養した。その後、各試料を添加してインキュベート(37°C, 5%CO₂, 湿度 95%)し 24 時間後に細胞を回収した。3000 rpm, 3 min で遠心分離して上澄みを除去後、50 μ l (1.0×10^{-3} M)の PhiPhi Lux (10% FBS)または CaspaLux (10% FBS)で懸濁し、37°Cドライインキュベーターにて暗下、45 分間の条件で染色した。染色後、PBS(-)で洗浄してナイロンメッシュを通過させてテストチューブに入れ、フローサイトメーターを用いて蛍光量を測定した。蛍光量の測定は、光源に空冷 Ar レーザー(488 nm)を出力 15 mW で使用し、FL1 センサーにて一定波長域(505 nm ~ 545 nm)で蛍光を検出した。試料を添加していない細胞のヒストグラムを基準として、試料添加後の細胞内において活性化したカスパーによって切断された蛍光物質の蛍光強度の増加の割合をカスパー活性率として評価した。

3-2-9. ミトコンドリア膜電位の測定

アポトーシスにおけるシグナル伝達機構においてミトコンドリアは重要な役割を果たしている。ミトコンドリアに機能障害が起こると、ミトコンドリアの膜上に局在する Bax の活性化により cytochrome c や AIF が細胞質内に漏出することで膜電位が低下し、カスパーが活性化してアポトーシスが誘導される¹⁰¹⁻¹⁰³。シアニン色素である 3, 3'-dihexyloxacarbocyanin iodide (DiOC₆(3), Enzo) (Fig. 3-2-9)は電位変化によって膜内外の局在が変化する膜電位感受性色素である¹⁰⁴。ミトコンドリアの膜や細胞内タンパク質に結合して疎水的環境におかれることにより、蛍光強度が 10 倍前後増強する。この色素は、長鎖は細胞膜、短鎖はミトコンドリアといった指向性を示す。トレハロースリポソームのアポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与をみるために、DiOC₆(3)を用いてフローサイトメーターにて測定した。

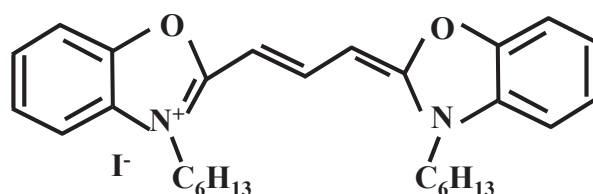


Fig. 3-2-9 Chemical structure of DiOC₆(3).

100 mm dish に細胞(1.0×10^5 cells/ml)を播種(10 ml/ dish)し、24 時間前培養した。その後、各試料を添加してインキュベート(37°C , 5% CO_2 , 湿度 95%, 24h)した。回収の 30 分前に $\text{DiOC}_6(3)$ を最終濃度 40 nM となるように添加し(37°C , 5% CO_2 , 湿度 95%, 30 min)、30 分後に細胞を回収した。3000 rpm, 3 min で遠心分離して上澄みを除去後、PBS にて再懸濁しナイロンメッシュを通過させた後、フローサイトメーターにて $\text{DiOC}_6(3)$ の蛍光量を測定した。光源には 488 nm の空冷 Ar レーザーを出力 15 mW で使用し、FL1 センサーにて一定波長域(505 nm ~ 545 nm)で $\text{DiOC}_6(3)$ の蛍光量を検出した。

3-2-10. 蛍光脂質含有リポソームの細胞への融合・蓄積の測定

蛍光脂質含有トレハロースリポソームの MOLT-4 細胞膜への融合蓄積は、フローサイトメーターを用いて細胞に融合・蓄積したリポソームの蛍光量を測定した。

100 mm dish に 1.0×10^5 cells/ml に調整した細胞懸濁液を播種(10 ml/ dish)し各試料を添加し、10 分間培養した。培養終了後、速やかに細胞を回収し 3000 rpm \times 3 分間の条件で遠心分離し、上澄みを除去した。その後、PBS(-)で再懸濁しナイロンメッシュを通過させ、フローサイトメーターで蛍光強度を解析した。蛍光脂質含有リポソームの蛍光量の測定には、光源に 488 nm の空冷アルゴンレーザーを出力 15 mW で使用し、波長 505~545 nm の FL1 センサーで NBDPC の蛍光量を検出した。

3-2-11. 蛍光偏光解消法を用いた細胞膜流動性の測定

蛍光偏光解消法は、偏光励起光を蛍光物質に照射することによって蛍光物質から発せられる蛍光が分子量に応じて異なった偏光度を示すという特徴を利用した測定方法である(Fig. 3-2-10)。蛍光プローブの励起光に偏光を用いると、一定の方向に配向した分子のみが励起され一定方向に蛍光を発する。これを励起光に対して垂直および水平な方向で測定すると、分子の動きが遅いときには垂直成分と水平方向に差が見られる。この蛍光の偏光度を測定することで分子の動きやすさを調べ、膜流動性の指標として用いた。脂質二分子膜のダイナミクスを知るのに一般的に用いられる 1, 6-Diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH, ナカライテクス)を蛍光プローブとして使用した¹⁰⁵⁾。

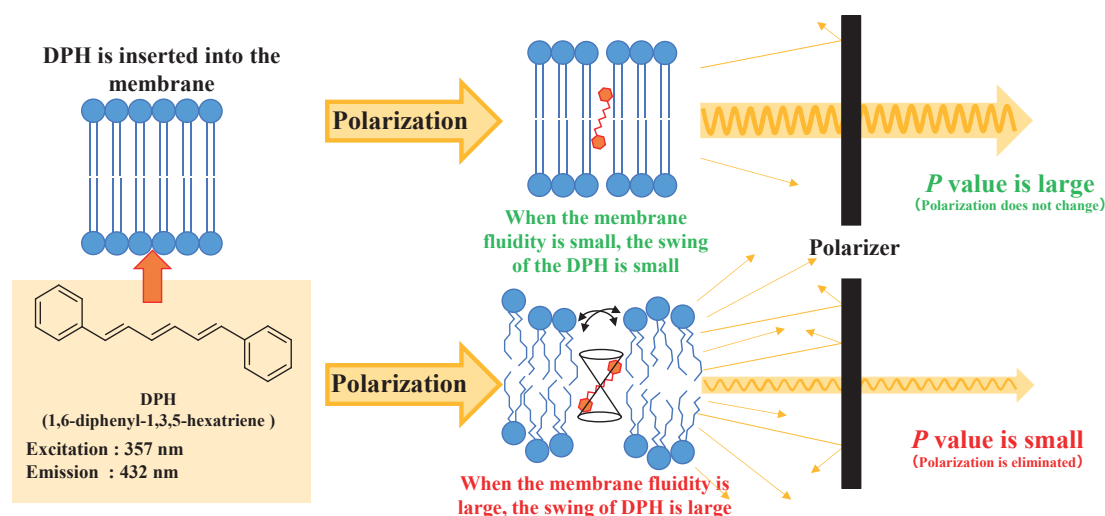


Fig. 3-2-10 Principle of fluorescence depolarization.

トレハロースリポソームの MOLT-4 細胞膜に与える影響は、蛍光偏光解消法を用いて分光蛍光光度計(F-4500, HITACHI)にて測定した。培養した細胞を遠沈管に回収し、1000 rpm, 5 min の条件で遠心した。アスピレーターにて上澄みを除去し、 1.0×10^6 cells/ml になるように遠沈管に播種し、HBSS で懸濁した。DPH ($[DPH] = 2.5 \times 10^{-3}$ M, 溶媒 : Tetrahydrofuran)を添加し(最終濃度 : $2 \mu\text{M}$)、遮光状態で 37°C にて 7 分ごとにタッピングを行い 35 分間染色した。HBSS で 3 回洗浄後、 5.0×10^5 cells/ml になるように遠沈管に播種した。遠沈管に播種した細胞を 1 cm 角の石英セルに 2.5 ml 分注し、循環恒温槽中で 37°C にした。1 分間 Control を測定後に試料を添加し、がん細胞膜流動性を測定した¹⁰⁶⁻¹¹¹)。DPH の蛍光偏光強度は、励起波長 357 nm で 432 nm の蛍光偏光強度成分を蛍光分光光度計にて測定し、蛍光偏光度(P : Fluorescence Polarization)を算出した。

Perrin-Weber の式で定義される(3-2)式に従って蛍光偏光強度(P)を算出した。

$$P = (I_{vv} - G_f I_{vh}) / (I_{vv} + G_f I_{vh}) \quad (3-2)$$

$$G_f = I_{hv} / I_{hh} \quad (3-3)$$

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および水平に振動する偏光強度成分である。 G_f は(3-3)式に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を水平に振動する偏光強度成分および垂直に振動する偏光強度成分である。

3-2-12. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞膜脂質ラフトの観察

細胞膜上の脂質ラフトの観察にはコレラ毒素 B サブユニット(CT-B)を用いて染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

三次元的は生物試料の表面及び内部の蛍光画像を鮮明に観察する事が可能である共焦点レーザー顕微鏡(Confocal Laser Scanning Microscopy : CLSM)は、細胞などの観察から固定試料の観察まで幅広く利用されている¹¹²⁾。レーザー発振器から発せられたレーザー光は、スキャナーを介してピンホール状になり、試料場を走査する。レーザー光で励起された蛍光はスキャナーから受光器へと届く。この受光器が受けた蛍光情報は、画像情報に変換され最終的にモニターへと表示される¹¹³⁾。

細胞膜上で行われる情報伝達は、ダイナミックに制御されており、細胞膜の形態や細胞骨格の変化などを観察する事でアポトーシスなどの動態を知ることが出来る。1960 年代に下村によって蛍光タンパク質である *Aequorea victoria green fluorescent protein*(GFP)発見されて以来、次々と天然由来の蛍光タンパクが単離されている¹¹⁴⁻¹¹⁷⁾。この蛍光タンパクを抗体などに結合させることで、細胞内のシグナル伝達やタンパク質の局在の解明に多く用いられている。

CT-B は、毒性がなく細胞膜脂質ラフト上に多く存在する糖脂質ガングリオシド(GM1)に特異的に結合する事から、GM1 の細胞内分布や動態を観察する際に一般的に用いられる^{118, 121)}。

CT-B 染色を用いた脂質ラフトの観察は、 1.0×10^5 cells/ml に調整した細胞懸濁液を 100 mm dish に播種(10 ml/ dish)し各試料を添加し 10min 培養した。培養終了後、細胞を回収し 3000 rpm, 3 min の条件で遠心分離を行い、上澄みを除去した。その後、Blocking Buffer(1% BSA / PBS)でブロッキングを行い、PBS(-)で洗浄した。洗浄後、CT-B 溶液(10 μ g/ml)で懸濁し氷中で 30 分間染色した。染色終了後、PBS(-)で洗浄し、35 mm D-lysine Coated Glass Bottom Dish (MatTek)に播種し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

共焦点レーザー顕微鏡は励起光 488 nm の Ar レーザーを用い、510~570 nm の赤色蛍光を検出した。

3-2-13. トレハロースリポソームの白血病細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験

BALB/c-R/J 雌性マウスを層別無作為化法にて群分けを行った。マウスの後背部に、マトリゲル(BD Bioscience)に懸濁した MOLT-4 細胞 (5.0×10^6 cells/body, 0.05ml) を皮下移植した。移植後 8 日目からサンプル(5 ml/kg)を 1 日 1 回腫瘍近傍の皮下に 14 日間投与した Table 3-2-1。移植 22 日目に麻酔下にて腫瘍組織の摘出を行った。摘出した腫瘍重量にて治療効果の評価を行った。

Table 3-2-1 Dose of DMtre.

群	Sample	Dose (mg/kg)	
		DMPC	TreC14
1	Control (5% glucose)		
2	DMPC	3.4	
3	DMTre (30mol%DMPC/70mol% TreC14)	3.4	7.5

3-2-14. TUNEL 染色によるアポトーシスの検出

3-2-13 にて摘出した腫瘍を生理食塩水(大塚製薬株式会社)にて洗浄し、10%中性緩衝ホルマリン溶液(Wako)にて固定した。摘出した腫瘍はバイオ病理研究所にて TUNEL 染色組織切片を作製した。組織の観察は、デジタル顕微鏡カメラヘッド(DS-Fi1, Nikon)を装着した培養倒立顕微鏡(TS100, Nikon)をデジタルイメージングコントローラ(DS-L2, Nikon)にて操作し行った。

TUNEL 法(TdT-mediated dUTP nick end labeling)¹²¹⁻¹²³⁾ を用いた組織切片の作製は、パラフィン包埋した腫瘍を薄切し蒸留水および PBS(-)にて洗浄した。プロテアーゼ処理を行い過酸化水素水にて内因性ペルオキシターゼ除去し、PBS(-)にて洗浄した。Equilibration buffer、working strength TdT enzyme を添加し、湿潤箱にてインキュベート(37°C, 1hour)した。インキュベート後に切片を Working strength stop/wash に入れ、室温にてインキュベートした。その後、PBS(-)にて洗浄し、ジゴキシゲニン抗体を腫瘍切片表面に加え、湿潤箱内にてインキュベートした。再度 PBS(-)にて洗浄を行い、3, 3'-Diaminobenzin (DAB)を加え染色した。最後に、メチルグリーンを用いて核染色を行った。

3-3. 結果と考察

3-3-1. トレハロースリポソームの白血病細胞に対する制がん効果

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト急性リンパ芽球性白血病(MOLT-4)細胞に対する制がん効果を酵素活性測定法である WST-8 assay にて測定した。

DMTre の MOLT-4 細胞に対する増殖抑制効果の検討結果を Fig.3-3-1~Fig.3-3-3 及び Table 3-3-1 に示す。DMTre 及び DMPC は MOLT-4 細胞の生存率を濃度依存的に減少させた。また、DMPC の IC_{50} 値が $136.4 \mu M$ であるのに対し DMTre は 1/2 以下である $40.9 \mu M$ であることが明らかとなった。

以上の結果から、DMTre は MOLT-4 細胞に対する顕著な増殖抑制効果が明らかとなった。

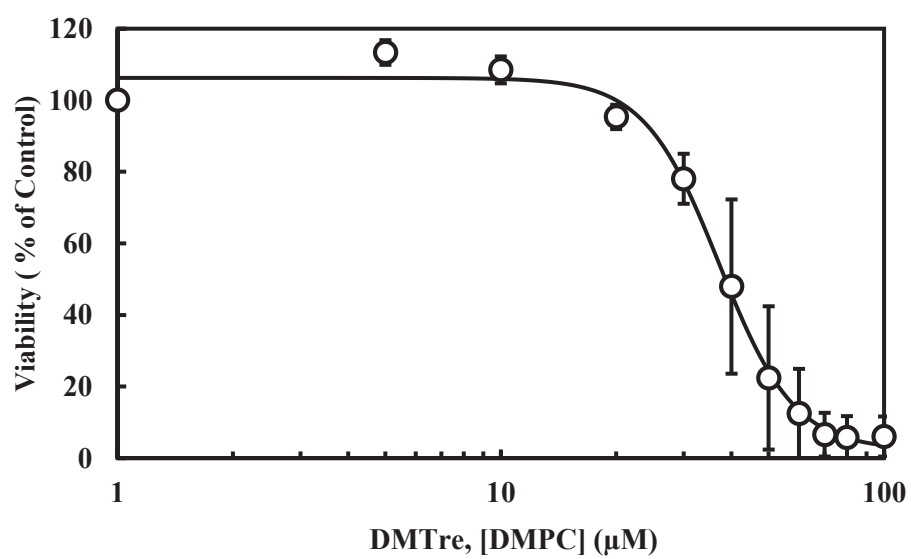


Fig. 3-3-1 Inhibitory effects of DMTre on the growth of MOLT-4 cells.

Data represent the mean \pm S.E.

[DMPC] = 0 \sim 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 0 \sim 2.33×10^{-4} M

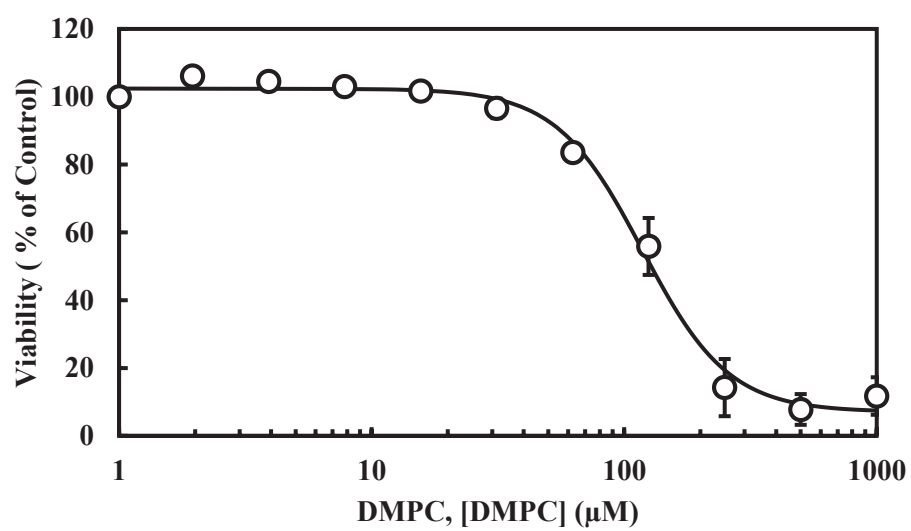


Fig. 3-3-2 Inhibitory effects of DMPC on the growth of MOLT-4 cells.

Data represent the mean \pm S.E.

[DMPC] = 0 ~ 1.0×10^{-3} M,

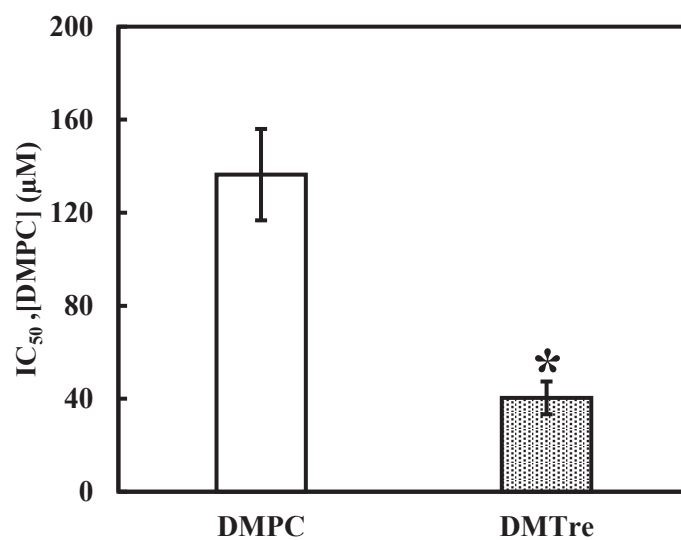


Fig. 3-3-3 Inhibitory concentration (IC₅₀) of DMTre and DMPC on the growth of MOLT-4 cells.

Data represent the mean ± S.E. (n = 4)

Incubation time : 48 h.

**p* < 0.05 (DMPC)

Table 3-3-1 IC₅₀ vales of DMTre and DMPC on the growth of MOLT-4 cells.

	IC ₅₀ (μM)
DMTre	40.4 ± 7.1
DMPC	136.4 ± 19.7

3-3-2. トレハロースリポソームの白血病細胞に対するアポトーシス誘導

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト急性リンパ芽球性白血病(MOLT-4)細胞に対するアポトーシス誘導をPI assayにて測定した。

DMTreのMOLT-4細胞に対するDNA断片化率の測定結果をFig.3-3-4に示す。DMTreは濃度依存的にMOLT-4細胞のDNAを断片化させた。また、DMTre 100 μ Mにおいては、約90%の高いDNAを断片化が得られた。

以上の結果から、DMTreはMOLT-4細胞のDNAを断片化し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

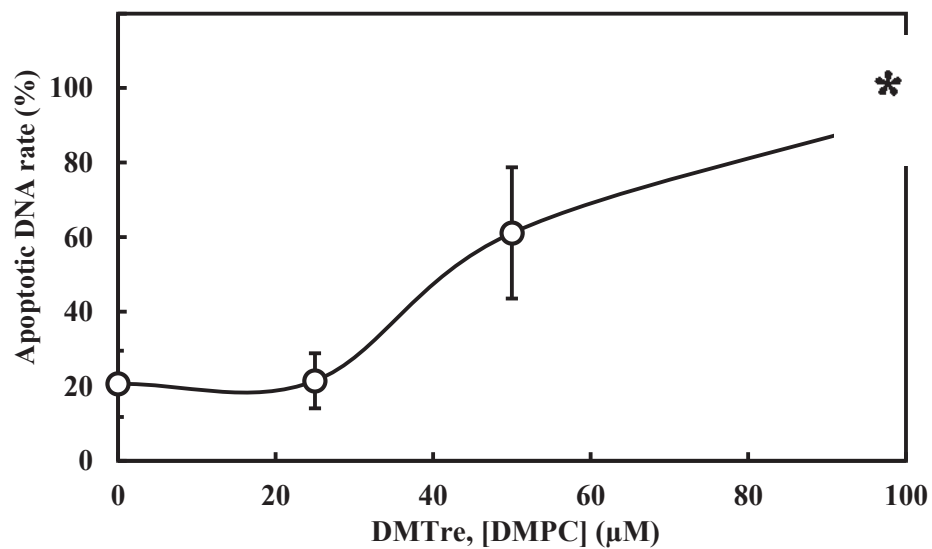


Fig. 3-3-4 Apoptotic DNA rate of MOLT-4 cells treated with DMTre and DMPC.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 6)

Incubation time : 48 h.

* $p < 0.05$ (Control)

[DMPC] = 0 ~ 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 0 ~ 2.33×10^{-4} M

3-3-3. アポトーシス誘導におけるシグナル伝達

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト急性リンパ芽球性白血病(MOLT-4)細胞に対するアポトーシス誘導経路について、フローサイトメーターにてカスパーゼ活性化及びミトコンドリア膜電位を測定することにより解明した。

DMTre の MOLT-4 細胞に対するカスパーゼ活性化率の測定結果を Fig.3-3-5 に示す。図から明らかなように DMTre で処理した MOLT-4 細胞は、Control 及び DMPC 処理した MOLT-4 細胞に比べ、カスパーゼ-3, -8, -9 の活性が約 70 ~ 80 %と顕著に高いことが明らかとなった。

DMTre の MOLT-4 細胞に対するアポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与の検討結果を Fig.3-3-6 に示す。図から明らかなように DMTre を処理した MOLT-4 細胞のミトコンドリア膜電位は、Control 及び DMPC を処理した MOLT-4 細胞と比べ有意に低下していることが示された。

以上の結果から、DMTre の MOLT-4 細胞のアポトーシス誘導において、カスパーゼの活性化とミトコンドリアを介していることが明らかとなった。

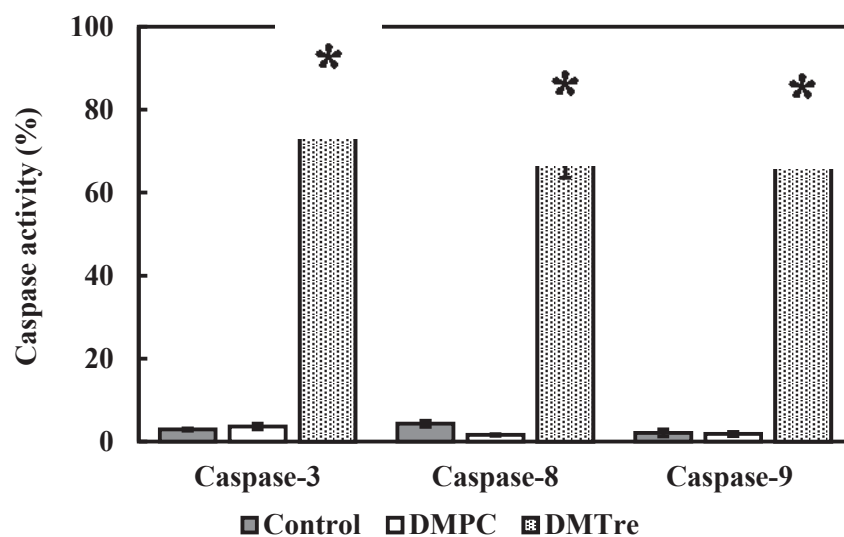


Fig. 3-3-5 Activation of caspase in MOLT-4 cells after the treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 5)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

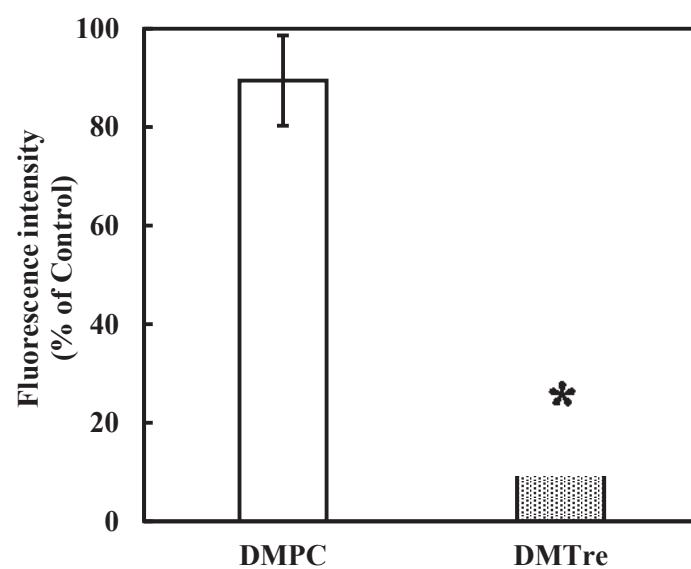


Fig. 3-3-6 Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) disruption of mitochondria membrane for MOLT-4 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 5)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

3-3-4. トレハロースリポソームの白血病細胞膜への影響

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト急性リンパ芽球性白血病(MOLT-4)細胞に対するアポトーシス誘導における DMTre の細胞膜に与える影響について、リポソームの細胞膜への融合・蓄積、細胞膜流動性への影響及び脂質ラフトのクラスター形成について検討した。

蛍光脂質含有 DMTre の MOLT-4 細胞膜への融合・蓄積の検討結果を Fig. 3-3-7 に示す。図から明らかなように、蛍光脂質含有 DMTre で処理した MOLT-4 細胞の蛍光強度が Control 及び蛍光脂質含有 DMPC で処理した MOLT-4 細胞に比べ顕著に増加している事が明らかになった。

DMTre の細胞膜流動性への影響の検討結果を Fig. 3-3-8 に示す。図から明らかなように、DMTre を添加した MOLT-4 細胞膜では、Control に比べ偏光度(P)が低下したことから、DMTre は MOLT-4 細胞膜の流動性を増大させる事が明らかとなった。

DMTre の MOLT-4 細胞膜脂質ラフトのクラスター形成を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。結果を Fig. 3-3-9 に示す。写真から明らかなように、Control 及び DMPC 処理した MOLT-4 細胞膜では、均一な膜構造をとっているのに対して、DMTre を処理した MOLT-4 細胞では、脂質ラフトのクラスター形成が観察された。

これらの結果から、DMTre は MOLT-4 細胞の細胞膜に融合・蓄積し、膜流動性を増大させ、脂質ラフトのクラスター形成を誘導することが明らかとなった。

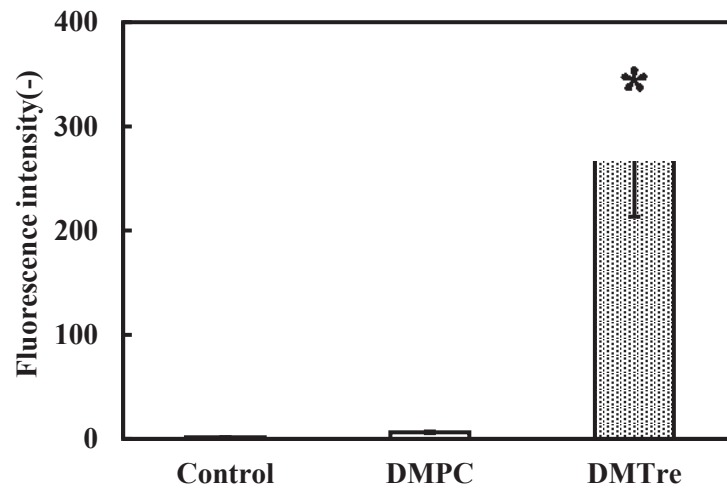


Fig. 3-3-7 Fusion and accumulation of DMTre/NBDPC for the MOLT-4 cells.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 6)

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

Incubation time : 10 min.

[DMPC] = 0.9×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M, [NBDPC] = 0.1×10^{-4} M

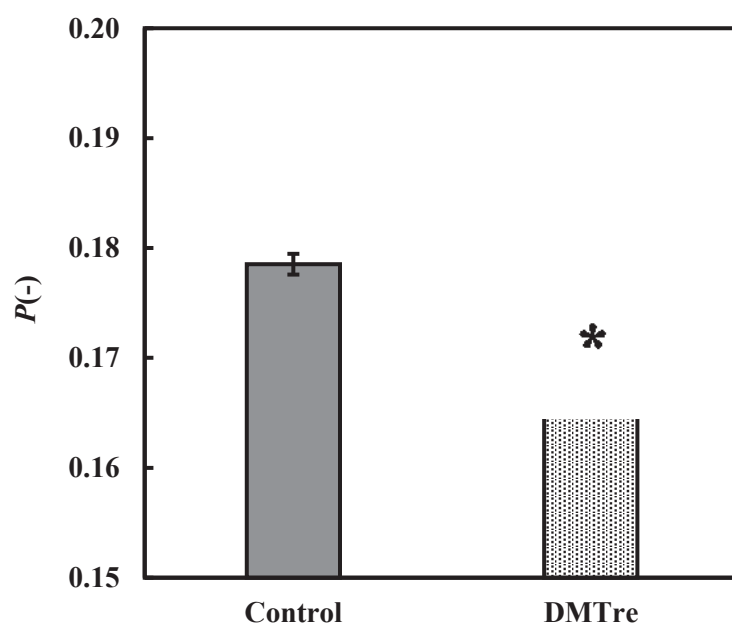


Fig. 3-3-8 Increase in membrane fluidity of MOLT-4 cells after the treatment with DMPC.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC) (n = 7)

Incubation time : 10 min.

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

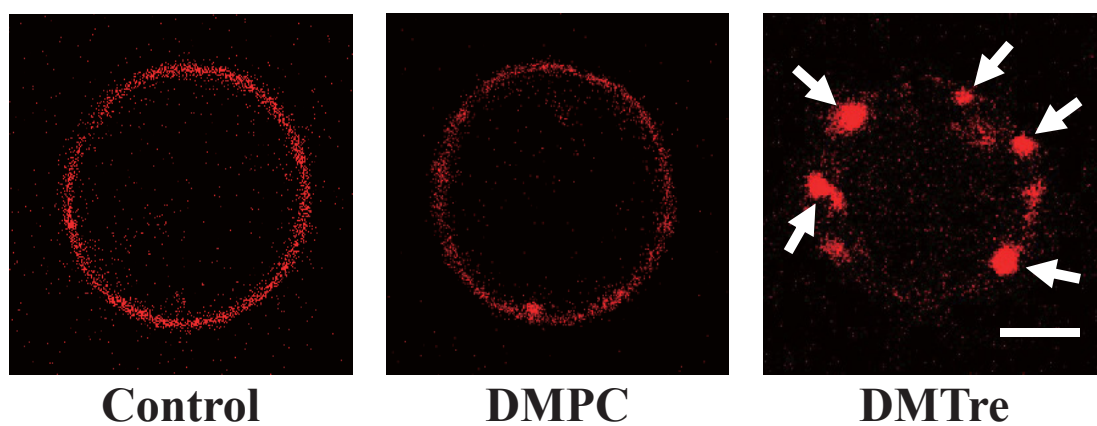


Fig. 3-3-9 Fluorescence micrographs of clustering formation on lipid rafts in MOLT-4 cell membranes after the treatment with DMTre.

Reaction time : 10min, ⇔ : Clustering point.

Scale bar : 10 μm

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreC14]= 2.33×10^{-4} M.

3-3-5. トレハロースリポソームの白血病細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果

トレハロースリポソームの *in vivo* での治療効果及びアポトーシス誘導を白血病細胞皮下移植モデルマウスにて検討した。

摘出した腫瘍写真を Fig. 3-3-10 に示す。写真から明らかなように DMTre 投与群の腫瘍は Control 群と DMPC 投与群の腫瘍と比べ縮小していることが明らかとなった。摘出した腫瘍の重量の測定結果を Fig. 3-3-11 に示す。Control 群及び DMPC 投与群において腫瘍重量の大きな差異は見られなかったのに対し、DMTre 投与群の腫瘍重量は顕著 ($p < 0.05$) に減少していることが明らかとなった。

摘出した腫瘍をパラフィン包埋し、薄切した切片を TUNEL 染色し光学顕微鏡にて観察した画像を Fig 3-3-12 に示す。写真から明らかなように、Control 群及び DMPC 投与群では褐色の TUNEL 陽性細胞が確認されなかったのに対し、DMTre 投与群では多数の TUNEL 陽性細胞が観察された。

以上の結果から、DMTre の白血病細胞皮下移植モデルマウスに対する顕著な治療効果および *in vivo* でのアポトーシス誘導が明らかとなった。

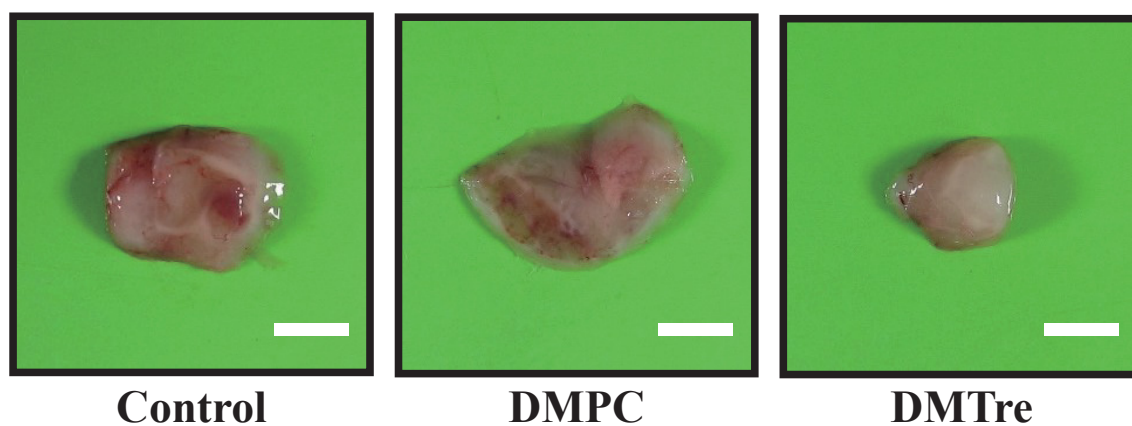


Fig. 3-3-9 Photographs of tumor in xenograft mouse models of *ALL* treated with DMTre after the inoculation of MOLT-4 cells.

Scale bar : 0.5 mm

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC14] = 2.33×10^{-3} M

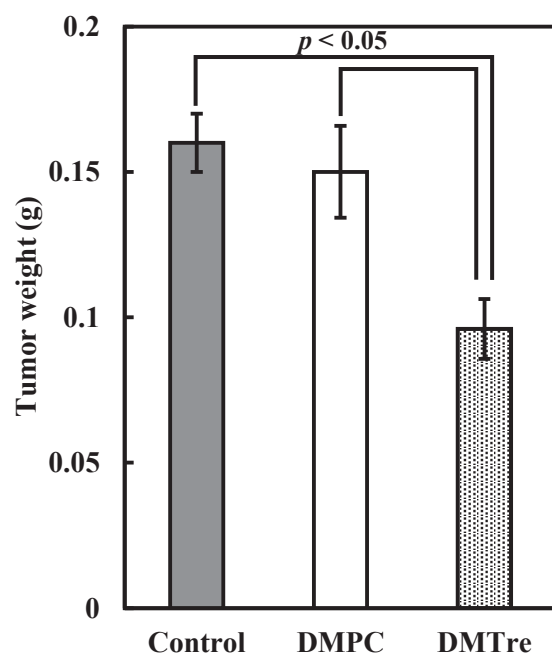


Fig. 3-3-10 Therapeutic effects of DMTre for xenograft mouse models of ALL after the inoculation of MOLT-4 cells.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3 ~ 6)

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC14] = 2.33×10^{-3} M

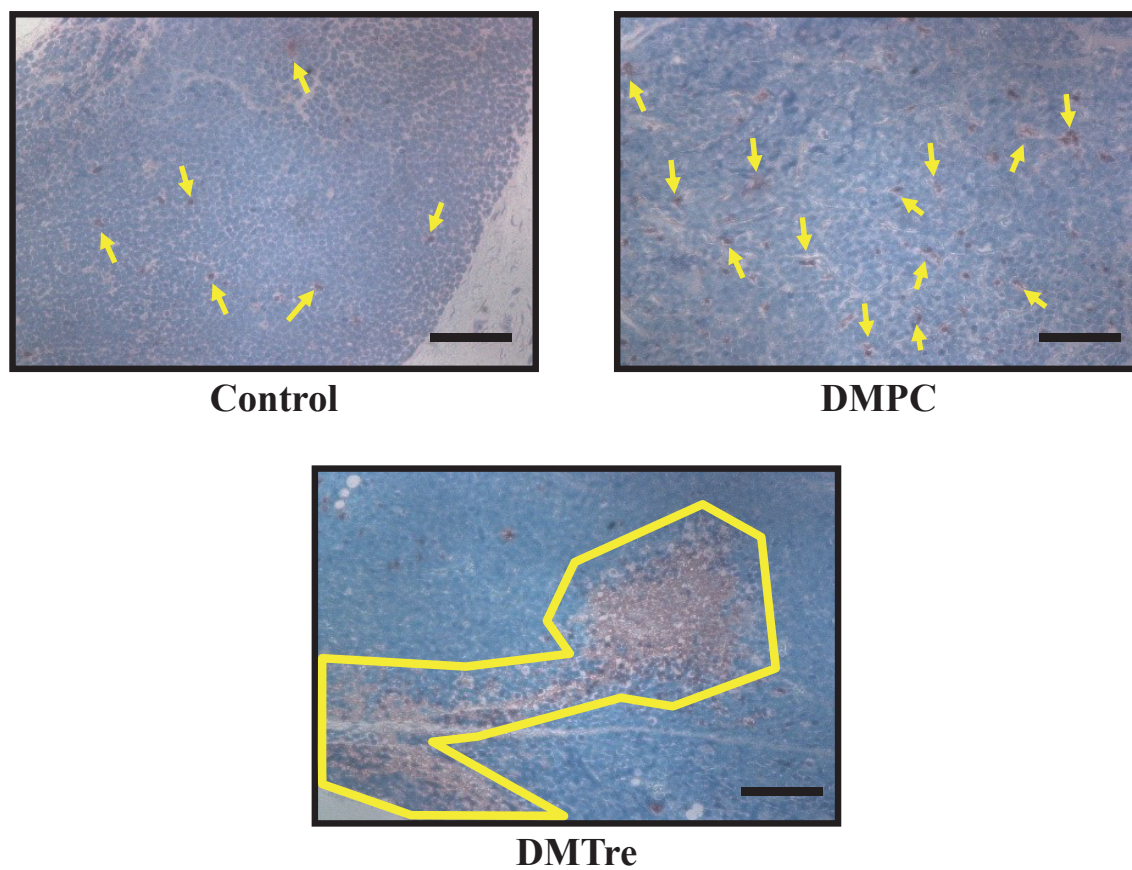


Fig. 3-3-11 Induction of apoptosis in the tissue section of tumor of xenograft mouse models of ALL treated with DMTre.

Scale bar : 50 μm , Arrows and yellow : apoptotic cells

$[\text{DMPC}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{TreC14}] = 2.33 \times 10^{-3} \text{ M}$

3-4. 総括

本章では、糖系界面活性剤を用いたトレハロースリポソーム(DMTre)のヒト急性リンパ芽球性白血病(MOLT-4)細胞に対する *in vitro* および *in vivo* での制がん効果について検討したところ、以下の様な興味深い知見が得られた。

1. DMTre は MOLT-4 細胞の生存率を濃度依存的に減少させた。また、DMPC の IC₅₀ 値が 136.4 μ M であるのに対し DMTre は 1/2 以下である 40.9 μ M であることが明らかとなった。
2. DMTre は濃度依存的に MOLT-4 細胞の DNA を断片化させた。また、DMTre 100 μ M においては、約 90 %の高い DNA を断片化が得られた。
3. DMTre で処理した MOLT-4 細胞は、Control 及び DMPC 処理した MOLT-4 細胞に比べ、カスパー-3, -8, -9 の活性が約 70 ~ 80 %と顕著に高いことが明らかとなった。
4. DMTre を処理した MOLT-4 細胞のミトコンドリア膜電位は、Control 及び DMPC を処理した MOLT-4 細胞と比べ有意に低下していることが示された。
5. 蛍光脂質含有 DMTre で処理した MOLT-4 細胞の蛍光強度が Control 及び蛍光脂質含有 DMPC で処理した MOLT-4 細胞に比べ顕著に増加している事が明らかになった。また、DMTre を添加した MOLT-4 細胞膜では、Control に比べ偏光度(*P*)が低下したことから、DMTre は MOLT-4 細胞膜の流動性を増大させる事が明らかとなった。さらに、MOLT-4 細胞膜脂質ラフトの観察から Control 及び DMPC 処理した MOLT-4 細胞膜では、均一な膜構造をとっているのに対して、DMTre を処理した MOLT-4 細胞では、脂質ラフトのクラスター形成が観察された。
6. DMTre は白血病細胞皮下移植モデルマウスの腫瘍を減少させた。また、TUNEL 染色の結果から、DMTre の *in vivo* でのアポトーシス誘導を確認した。

以上の結果から、DMTre のヒト急性リンパ芽球性白血病(MOLT-4)細胞に対する *in vitro* 及び *in vivo* での優れた治療効果が明らかとなった。また、DMTre は MOLT-4 細胞に対してアポトーシスを誘導する際にカスパー-3, -8, -9 及びミトコンドリアを介することが明らかとなった。さらに、DMTreC14 70mol%は、MOLT-4 細胞膜に融合・蓄

積し、細胞膜流動性を増加させ、細胞膜脂質ラフトのクラスター形成を誘導することが初めて明らかとなった。

DMTre は *in vivo* での治療効果およびアポトーシス誘導が確認され、新しい白血病治療薬として期待ができる。

第 4 章 トレハロースリポソームの肺がんに対する *in vitro* および *in vivo* での治療効果

4-1. 序

ヒトの細胞は、通常糖類を解糖系やミトコンドリア内で行われる *tricarboxylic acid cycle* (TCA) 回路や酸化的リン酸化にて代謝し、エネルギーの生産を行う。その主な最終生産物が二酸化炭素 (CO_2) である。 CO_2 は内呼吸により細胞から血液中に放出され、体内を循環し最終的には肺胞にて酸素とのガス交換が行われて体外へ排出される。取り込まれた酸素は赤血球のヘモグロビンと結合し体内の細胞へと輸送される。この呼吸において重要な臓器が肺である。肺は左右非対称であり右肺は上葉、中葉、下葉の 3 葉からなり、左肺は心臓が近くにあることから右肺と比べて小さく上葉、下葉から構成されている。肺の内部はガス交換を行う為に気道と血管から構成され、その二つは肺胞内にて I 型肺胞上皮細胞と基底膜にて接着している。肺胞の数は約 3 億個と言われ、その表面積は 70 m^2 である¹²⁴⁾。この肺胞が何らかの原因で機能しなくなりガス交換が阻害された場合重度の呼吸障害や呼吸不全が引き起こされる。

最も致死性の高いがんと言われている肺がんは、我が国の 2016 年のがん死亡者数にて第一位である²⁾。その理由の一つに初期症状がないことから重症化して発見されるため、効果的な治療ができないことが挙げられる。肺がんは主に小細胞性肺がんと非小細胞性肺がんに分けられる。小細胞性肺がんは増殖が速く、転移もしやすいが、化学療法や放射線療法の感受性が高い。一方、非小細胞性肺がんは放射線療法や化学療法に抵抗性を示すことが知られている¹²⁵⁾。初期の肺がんの治療は外科的療法にて病巣を切除し化学療法や放射線療法を用いて根治させる。しかし、発見が遅れ肺がんが進行していた場合、外科的療法は患者の QOL(Quality of life)を大きく低下させるため敬遠される。その為、化学療法が主に用いられる。一般的に DNA を架橋し複製を阻害するシスプラチンやカルボプラチン等の白金製剤を起点に微小管に結合し有糸分裂を阻害するドセタキセル、ビノレルビン、パクリタキセルの他、DNA 合成に必要な代謝物と拮抗して酵素反応を阻害するゲムシタビン、ペメトレキセドなどの代謝拮抗剤、DNA の複製を阻害するイリノテカン、マイトマイシンなどの抗生物質を用いる二剤併用化学療法が推奨されている。しかし、これらの抗がん剤は、がん細胞だけではなく正常細胞にも作用し重篤な副作用を引き起こしている。また、分子標的治療薬の上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬のゲフィチニブ (イレッサ)・エルロチニブ (タルセバ) で高い奏功率が報告されているが、間質性肺炎などの重篤な副作用が話題となった。

また、がん治療を難しくする要素に転移がある。転移とはがん細胞は原発巣から移動し、リンパ管や血管まで到達することにより他の臓器にて増殖し、同一種類の腫瘍を二次的に生じることである¹²⁶⁾。転移の第一段階はがん細胞の細胞間接着の減少や細

胞骨格が再編成される上皮間葉転換(EMT : epithelial to mesenchymal transition)が起き、運動能を獲得する¹²⁷⁾。第二段階は原発巣周辺にある細胞外マトリックス(ECM : extracellular matrix)や基底膜などの間質成分を破壊する浸潤能の獲得である。間質成分の破壊は主にマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP : Matrix metalloproteinase)が行っている。MMPは Zn^{2+} や Ca^{2+} を活性中心に持つタンパク質分解酵素であり、25種類が確認されている。膜結合型MMPと分泌型MMPに分類され、がん細胞はこれらのMMPを用いてコラーゲンやプロテオグリカンなどのECMを分解し、がん細胞が移動する隙間を作っていく。最終的に血管に辿り付いたがん細胞は血管基底膜を分解し血中へと遊離する。遊離したがん細胞は血小板と結合することで、免疫細胞の攻撃を回避し、遠隔臓器内の血管に着床する¹²⁸⁾。その後、がん細胞は血管を脱出し新たな転移巣を作り進行していく。この転移・浸潤を阻止することががんを治療する上で重要である。

本章では、トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト肺胞基底上皮腺がん(A549)細胞に対する *in vitro* ではトレハロースリポソームの肺がん細胞に対する制がん効果およびトレハロースリポソームの肺がん細胞に対する転移・浸潤抑制効果を検討した。*in vivo* では肺がん細胞皮下移植モデルマウスおよび同所移植モデルマウスに対するDMTreの制がん効果を検討した。

4-2. 実験

4-2-1. 試料

DMPC および TreC14 は 2-2-1 と同様のものを使用した。また、NBDPC は 3-2-1 と同様のものを使用した。

4-2-2. トレハロースリポソームの調製

トレハロースリポソームは、2-2-2 と同様の方法にて調製した。

4-2-3. 蛍光脂質含有トレハロースリポソームの調製

蛍光脂質含有トレハロースリポソームは 3-2-3 と同様の方法にて調製した。

4-2-4. 使用細胞

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターより購入したヒト肺胞基底上皮腺がん (A549) 細胞を用いた。培養培地として 10% FBS / DMEM を使用した。また、培養は 37°C、湿度 95%、CO₂ 濃度 5% の条件で行った。

4-2-5. 使用動物

動物は 3-2-5 と同様の BALB/c-R/J マウスを用いた。

4-2-6. 酵素活性測定法を用いた細胞増殖抑制試験

トレハロースリポソームの A549 細胞に対する増殖抑制効果は、3-2-6 と同様の WST-8 assay を用いて評価した。

96 well マルチプレートに細胞 (2.0×10^4 cells/ml) を 100 μ l/well で播種し、24 時間前培養を行った。その後、各試料を 10 μ l/well 添加し、インキュベートした (37°C, 5%CO₂, 湿度 95%, 48h)。48 時間後に Cell Counting Kit-8 を 10 μ l/well 添加し、2.5 時間の呈色反応を行った。呈色反応後、マイクロプレートリーダー (VERSA max microplate reader, Molecular Devices) を用いて波長 450 nm の条件で吸光度を測定した。

4-2-7. DNA 断片化率の測定

トレハロースリポソームの A549 細胞に対するアポトーシス誘導を検討する為に 3-2-7 と同様の PI assay を用いて DNA の断片化率の測定を行った。

100 mm dish に細胞 (1.0×10^4 cells/ml) を播種 (10 ml/ dish) し、24 時間培養した。その後、各試料を添加し、インキュベートした (37°C, 5%CO₂, 湿度 95%, 24h)。24 時間後に細胞を回収し、上澄みを除去した後に 0.1% Triton-X 100 を添加して浸透化処理をした。浸透化処理後に、RNase (1 mg/ml, SIGMA) により細胞内の RNA を分解除去した (室温, 5 min)。PBS(-) で再懸濁したものをナイロンメッシュに通過させ、テストチューブに入れた。PI を添加して DNA を染色し、フローサイトメーター (EPICS® EX, Beckman Coulter) を用いて細胞の DNA 断片化率を測定した。光源に Ar レーザー (488 nm, 15 mW) を使用し、FL3 センサー (605~630 nm) を用いて蛍光を検出した。

4-2-8. カスパー活性の測定

トレハロースリポソームの A549 細胞に対するアポトーシス誘導においてカスパーが関与するか検討するために 3-2-8 と同様の原理を用いて行った。

100 mm dish に細胞 (1.0×10^4 cells/ml) を播種 (10 ml/ dish) し、24 時間前培養した。その後、各試料を添加してインキュベート (37°C, 5%CO₂, 湿度 95%) し 24 時間後に細胞を回収した。3000 rpm, 3 min で遠心分離して上澄みを除去後、50 μ l (1.0×10^{-3} M) の PhiPhi Lux (10% FBS) または CaspaLux (10% FBS) で懸濁し、37°C ドライインキュベーターにて暗下、45 分間の条件で染色した。染色後、PBS(-) で洗浄してナイロンメッシュを通過させてテストチューブに入れ、フローサイトメーターを用いて蛍光量を測定した。蛍光量の測定は、光源に空冷 Ar レーザー (488 nm) を出力 15 mW で使用し、FL1 センサーにて一定波長域 (505 nm ~ 545 nm) で蛍光を検出した。

4-2-9. ミトコンドリア膜電位の測定

トレハロースリポソームの A549 細胞に対するアポトーシス誘導においてミトコンドリアの関与を検討するために 3-2-9 と同様のミトコンドリア膜電位測定プローブを用いてミトコンドリア膜電位変化を測定した。

100 mm dish に細胞 (1.0×10^4 cells/ml) を播種 (10 ml/ dish) し、24 時間前培養した。その後、各試料を添加してインキュベート (37°C , 5% CO_2 , 湿度 95%, 24h) した。回収の 30 分前に DiOC₆(3) を最終濃度 40 nM となるように添加し (37°C , 5% CO_2 , 湿度 95%, 30 min)、30 分後に細胞を回収した。3000 rpm, 3 min で遠心分離して上澄みを除去後、PBS にて再懸濁しナイロンメッシュを通過させた後、フローサイトメーターにて DiOC₆(3) の蛍光量を測定した。光源には 488 nm の空冷 Ar レーザーを出力 15 mW で使用し、FL1 センサーにて一定波長域 (505 nm ~ 545 nm) で DiOC₆(3) の蛍光量を検出した。

4-2-10. 蛍光脂質含有リポソームの細胞へ融合・蓄積の測定

蛍光脂質含有トレハロースリポソームの A549 細胞への融合・蓄積を検討するために共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。生細胞中の特定分子の細胞内局在変化を追跡する観察法であるタイムラプス法を用いた¹²⁹⁾。

滅菌済み 35mm Glass Bottom dish に細胞 (2.0×10^4 cells/ml) を播種 (2 ml/ dish) し前培養した。前培養終了後、各試料を添加した。試料添加後、0, 15, 30, 45, 60, 90 分のタイムラプス観察を共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。励起波長を 488 nm の Ar レーザーを用い、検出蛍光波長 505~555 nm で観察した。

4-2-11. 蛍光偏光解消法を用いた細胞膜流動性の測定

トレハロースリポソームの A549 細胞膜流動性に与える影響は、3-2-11 と同様の原理を用いて評価した。

培養した細胞を遠沈管に回収し、1000 rpm, 5 min の条件で遠心した。アスピレーターにて上澄みを除去し、 1.0×10^6 cells/ml になるように遠沈管に播種し、HBSS で懸濁した。DPH ($[\text{DPH}] = 2.5 \times 10^{-3}$ M, 溶媒 : Tetrahydrofuran) を添加し (最終濃度 : 2 μM)、遮光状態で 37°C にて 7 分ごとにタッピングを行い 35 分間染色した。HBSS で 3 回洗浄後、 5.0×10^5 cells/ml になるように遠沈管に播種した。遠沈管に播種した細胞を 1 cm 角の石英セルに 2.5 ml 分注し、循環恒温槽中で 37°C にした。1 分間 Control を測定後に試料を添加し、がん細胞膜流動性を測定した。DPH の蛍光偏光強度は、励起波長 357 nm で 432 nm の蛍光偏光強度成分を蛍光分光光度計にて測定した。

4-2-12. Scratch assay を用いた転移抑制効果の検討

細胞の 2 次元的な移動は、葉状仮足が形成される事から始まる。さらに、糸状仮足が形成され移動する。仮足の膜表面では、プロテアーゼ等によって細胞外マトリックスを分解しつつ移動する¹³⁰⁾。*in vitro* に於ける転移能は *in vivo* に於ける転移と関連する事が既に知られている¹³¹⁻¹³³⁾。

Scratch assay は、コンフルエント状態で細胞培養面に空間を作り、その空間に遊走して来る細胞の移動距離や充填された空間の面積によって移動能を評価する方法である¹³⁴⁾。トレハロースリポソームの A549 細胞に対する遊走抑制効果を Scratch assay により評価した。

滅菌済み 6well プレートに細胞 (2.5×10^5 cells/ml) を播種 (2 ml/ dish) し、24 時間前培養を行った。前培養終了後、細胞が well 内で monolayer になっているのを確認した後、定規を当て細胞培養面を均一に 200 μ l チップで引っ搔いて十字状に細胞を剥離させた。その後、培地を除去し、PBS(-)で洗浄した。洗浄後、新しく完全培地を満たし、試料を添加し 19 時間培養した。試料を添加した時間を 0 時間とし、0 時間と倍加時間内の培養後の 19 時間後に倒立型顕微鏡 (EVOS , Advanced microscopy group) を用いて細胞培養面の顕微鏡写真を撮影した。なお試料濃度は、A549 細胞に対してアポトーシスを誘導しない濃度とした。撮影した顕微鏡写真より、0 時間と 19 時間後の細胞剥離面積をそれぞれ定量化した。

4-2-13. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた仮足の観察

細胞が遊走するときの運動性は、細胞内部に存在する細胞骨格 (Cytoskeleton) の寄与によるものである。細胞骨格は、非常に細い繊維状のタンパク質から成っており、その種類及び役割は様々である。あるものは、運動性のみならず細胞分裂やオルガネラの移動にも関与している。細胞の様々な構造変化を支援し、具現化するネットワークこそが細胞骨格である¹³⁵⁾。

基本的に細胞骨格は 3 種に大別されるが、細胞の移動に関わっているのはアクチンフィラメント (Actin filament) と呼ばれる直径約 7 nm ほどの極細の細胞骨格である。アクチンフィラメントは、細胞の移動のみならず細胞分裂にも深く関与しており、生体に於いて非常に重要な役割を果たしている。また、アクチンフィラメントの存在は、細胞膜にダイナミズムをもたらしている。細胞は、このアクチンフィラメントが重合もしくは脱重合する事で移動する。アクチンフィラメントは、重合する事で進展し、脱重合する事で縮む事が知られている。これを繰り返す事で細胞は運動する。

35 mm Glass Bottom dish に細胞 (2.0×10^4 cells/ml) を播種 (2 ml/ dish) し 24 時間前培養した。前培養終了後、各試料を添加し 24 時間培養した。培養終了後、4%ホルマリンで固定、0.5% Triton-X 100 で浸透化した後、Actin-stain™ 488 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton) 1.0×10^{-4} M を加え F-actin を染色した。染色後、洗浄し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。なお、試料濃度は A549 細胞にアポトーシスを誘導しない濃度とした。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では励起波長を 488 nm の Ar レーザーを用い、検出蛍光波長 505~555 nm で観察した。

4-2-14. invasion assay による浸潤抑制試験

生体内のがん細胞は、結合組織や基底膜を分解しながら 3 次元的に動いている。基底膜の分解は細胞運動の先端部である仮足先端部で行われ、基底膜分解酵素が局在した Invadopodia を最初に形成するといわれている (Fig. 4-2-1)¹³⁶⁾。がん細胞の浸潤はこの Invadopodia を中心に進行する。基底膜を分解し、浸潤する能力 (浸潤能) を *in vitro* にて測定するモデルとして用いられているのが Invasion assay¹³⁷⁻¹³⁹⁾である。その中でも Boyden Chamber assay¹⁴⁰⁾がよく用いられている。この測定系において、Insert に被覆された Matrigel¹⁴¹⁾は基底膜モデルとなる。誘導物質として FBS を用いて、無血清培地中から Matrigel を浸潤・分解し Insert 底面に多数存在する孔 (8 μ m) を通り下層まで移動する。

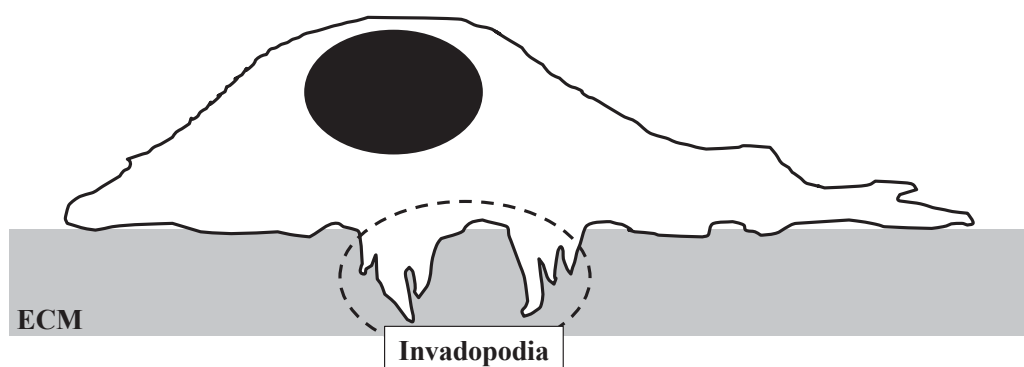


Fig. 4-2-1 Schematic representation of invadopodia.

Matrigel が被覆された BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber (BD Biosciences) の各 Insert と各 Chamber を無血清培地によりインキュベーター (5% CO₂, 37°C) 内にて 2 時間水和処理を行った後、無血清培地を除去し、細胞懸濁液 (8.0×10^4 cells/ml) を無血清培地 450 μ l にて播種し、同時に試料を 50 μ l 添加した。下部の Chamber には 10%FBS 含有培地を気泡の入らないように加え、インキュベーター (5% CO₂, 37°C)

で 24 時間培養した。Control には Matrigel の被覆されていない Control insert を使用した。培養終了後、Insert 内の非浸潤細胞と Matrigel を綿棒にて除去後、100%エタノールにて 30 分間固定した。その後、0.1%Crystal Violet/100%エタノールを用いて 30 分間室温にて染色し、デジタル顕微鏡カメラヘッド (DS-Fi1, Nikon) を装着した培養倒立顕微鏡 (TS100, Nikon) をデジタルイメージングコントローラ (DS-L2, Nikon) にて撮影を行った。(Fig. 4-2-2)

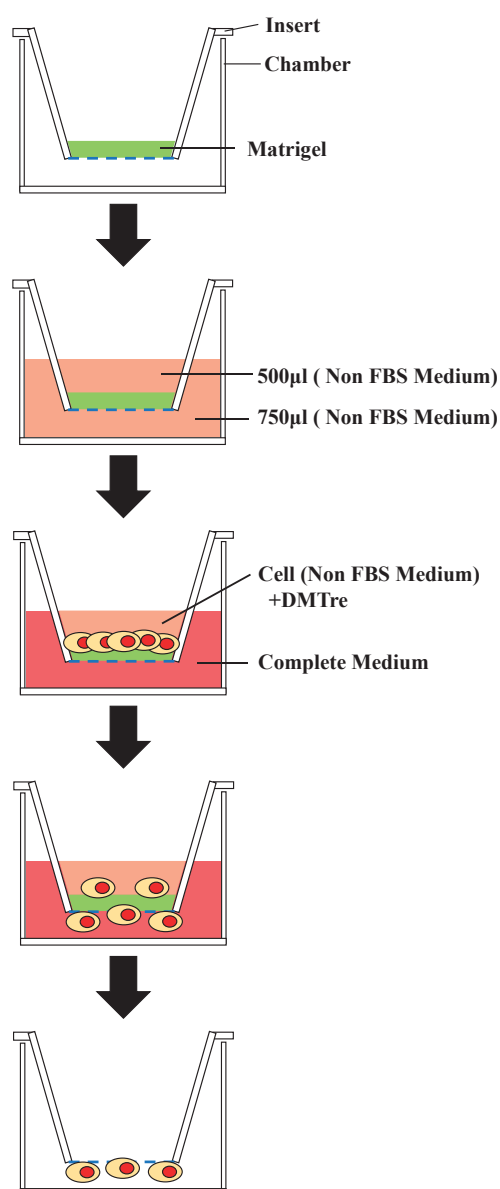


Fig. 4-2-1 Schematic representation of invasion assay.

4-2-15. MMP-14 発現量の測定

MMP には、分泌型 MMP と膜表在型 Membrane type-1 MMP(MT1-MMP : MMP14) が存在する。分泌型 MMP の活性化には MMP14 の活性化が必要であることから MMP14 の活性化こそががん細胞の浸潤の始まりとされる。MMP14 は細胞膜表面、特に浸潤突起上に多く発現している。浸潤突起膜表面上で二量体を形成し、生体内に於ける MMP 阻害物質である TIMP から分泌型 MMP を切り離す事で活性化される。活性化した分泌型 MMP は、基底膜の分解を促進させ、浸潤を進行させる¹⁴²⁾。

150 mm dish に 1.0×10^4 cells/ml に調整した細胞を播種(30 ml/ dish)し、24 時間前培養を行った。前培養終了後、各試料を添加しさらに 24 時間培養した。培養終了後、細胞を回収し 3000 rpm、3 分間の条件で遠心分離を行い上澄みを除去した。上澄みを除去後、4%ホルマリンで固定し、Blocking Buffer (5% Goat serum/PBS(-))で一晩ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、一次抗体 Anti-MMP14 rabbit monoclonal antibody (abcam)で染色した。一次抗体染色終了後、Wash Buffer (5% Goat serum/0.01% Triton-X 100 /PBS(-))で洗浄した。洗浄終了後、二次抗体 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)を使用し染色を行った。なお、一次抗体濃度は 1 μ g/ml、二次抗体濃度を 1:200 とした。本実験で用いた試料濃度は、A549 細胞に対してアポトーシスを誘導しない濃度 (4.0×10^{-5} M)を用いた。

染色した細胞はフローサイトメーターを用いて光源に 488 nm の空冷 Ar レーザーを出力 15 mW で使用し FL1 センサー(505~545 nm)での条件で測定した。

4-2-16. トレハロースリポソームの肺がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験

高度免疫不全マウス(BALB/c-R/J, 7 週齢, 雌)の体重をもとに層別連続無作為化法により群分けを行った。マウス後背部皮下にマトリゲルに懸濁した細胞 (1.0×10^6 cells/body)を移植した。移植 2 日目から腫瘍体積を 4-2-1 式から測定し、試料を 1 日 1 回腫瘍近傍の皮下に 28 日間反復投与(5 ml/kg)した(Table 4-2-1)。移植 28 日目に麻酔下にて腫瘍組織の摘出を行った。摘出した腫瘍重量および腫瘍体積にて治療効果の評価を行った。

$$\text{腫瘍体積(mm}^3\text{)} = \text{長径} \times (\text{短径})^2 \times 1/2 \cdots 4-2-1$$

Table 4-2-1 Dose of DMTre.

群	Sample	Dose (mg/kg)	
		DMPC	TreC14
1	Control (5% glucose)		
2	DMPC	3.4	
3	DMTre (30mol%DMPC/70mol% TreC14)	3.4	7.5

4-2-17. TUNEL 染色によるアポトーシスの検出

TUNEL 法を用いたトレハロースリポソームの *in vivo* でのアポトーシス誘導の評価は 3-2-14 と同様の原理を用いて評価した。

4-2-18. トレハロースリポソームの肺がん細胞同所移植モデルマウスに対する治療実験

高度免疫不全マウス (BALB/c-R/J, 7 週齢, 雄) の体重をもとに層別連続無作為化法により群分けを行った。生理食塩水に懸濁した細胞 (3.5×10^5 cells/body) を尾静脈より移植した。移植 1 時間後、マウス尾静脈より試料を 14 日間反復投与 (10 mg/kg) した投与終了翌日に麻酔下にて肺組織の摘出を行った。摘出した組織重量にて治療効果の評価を行った。

4-2-19. HE 染色を用いた腫瘍組織の観察

<HE 染色>

4-2-18 にて摘出した肺組織を生理食塩水 (大塚製薬株式会社) にて洗浄し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (Wako) にて固定した。摘出した腫瘍はバイオ病理研究所にて、HE 染色組織切片を作製した。組織切片の観察は、光学顕微鏡 (BZ-X700, KEYENCE) にて観察した。撮影した画像から組織面積を BZ-X Analyzer (KEYENCE) にて算出し、治療効果を評価した。

4-3. 結果と考察

4-3-1. トレハロースリポソームの肺がん細胞に対する制がん効果

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト肺胞基底上皮腺がん(A549)細胞に対する制がん効果を酵素活性測定法である WST-8 assay にて測定した。

DMTre の A549 細胞に対する増殖抑制効果の検討結果を Fig.4-3-1, Fig.4-3-2 および Table 3-2-1 に示す。DMTre は、A549 細胞の生存率を濃度依存的に減少した。また、DMPC の IC_{50} 値が $437 \mu M$ であるのに対し、DMTre は 1/10 以下の $40.9 \mu M$ であり著しい増殖抑制効果が明らかとなった。

以上の結果から、DMTre は A549 細胞に対する顕著な制がん効果を示すことが明らかとなった。

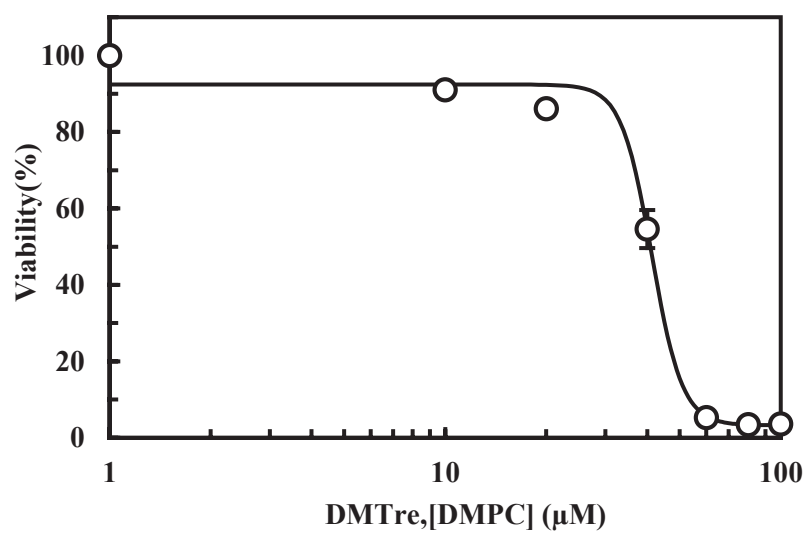


Fig. 4-3-1 Inhibitory effects of DMTre on the growth of A549 cells.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

[DMPC] = 0 ~ 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 0 ~ 2.33×10^{-4} M

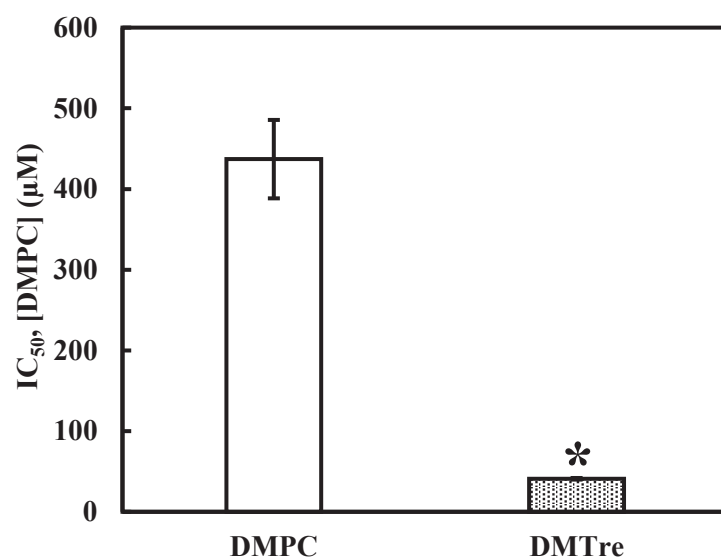


Fig. 4-3-2 Inhibitory concentration (IC₅₀) of DMTre and DMPC on the growth of A549 cells.

Data represent the mean ± S.E. (n = 3)

Incubation time : 48 h.

**p* < 0.05 (DMPC)

Table 3-2-1 IC₅₀ of DMTre and DMPC¹⁴³⁾ on the growth of A549 cells.

	IC ₅₀ (μM)
DMTre	40.9 ± 1.0
DMPC	437 ± 48.6

4-3-2. トレハロースリポソームの肺がん細胞に対するアポトーシス誘導

トレハロースリポソームの A549 細胞に対するアポトーシス誘導を検討する為に PI assay を用いて DNA の断片化率の測定を行った。

トレハロースリポソーム (DMTre) のヒト肺胞基底上皮腺がん (A549) 細胞に対する DNA 断片化率の測定および、細胞周期に与える影響の検討結果を Fig. 4-3-3 に示す。DNA の断片化を示す SubG1 の DNA 量を検討したところ、DMTre は A549 細胞の DNA の断片化する事が明らかとなった。200 μ M では約 95% という高い DNA 断片化率が観測された。また、IC₅₀ 以下の濃度にて DNA 断片化が起きていないことから、G0/1 期の DNA 量を検討したところ、G0/1 期の DNA 量の増加が見られた。

以上の結果から、DMTre は、A549 細胞に対して低濃度では G0/1 arrest を引き起こし、高濃度ではアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

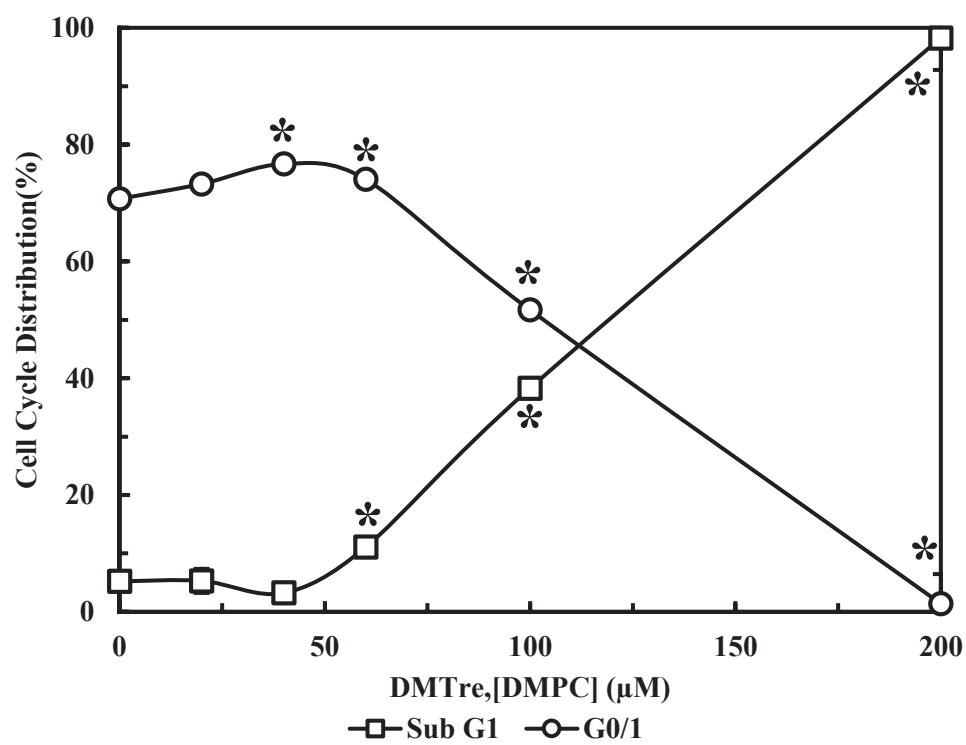


Fig. 4-3-3 Cell cycle distribution in A549 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 5)

Incubation time : 48 h.

* $p < 0.05$ (Control)

[DMPC]= $0.1 \sim 2.0 \times 10^{-4}$ M, [TreC14]= $0.233 \sim 4.66 \times 10^{-4}$ M.

4-3-3. アポトーシス誘導におけるシグナル伝達

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト肺胞基底上皮腺がん(A549)細胞に対するアポトーシス誘導経路を解明するために、フローサイトメーターにてカスパー活性及びミトコンドリア膜電位の測定を行った。

DMTre の A549 細胞に対するカスパー活性化率の測定結果を Fig.4-3-4 に示す。図から明らかなように DMTre で処理した A549 細胞は、未処理の Control 及び DMPC で処理した A549 細胞に比べ、カスパー-3, -8, -9 が著しく活性化した。特に、カスパー-3, -8 は約 50 ~ 80 %と非常に高くなっていることが明らかとなった。

DMTre の A549 細胞に対するアポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与の検討結果を Fig.4-3-5 に示す。図から明らかなように DMTre で処理した A549 細胞のミトコンドリア膜電位は、未処理の Control 及び DMPC で処理した A549 細胞と比べ有意に低下していることが示された。

以上の結果から、DMTre の A549 細胞のアポトーシス誘導においてカスパー活性化とミトコンドリアが関与していることが明らかとなった。

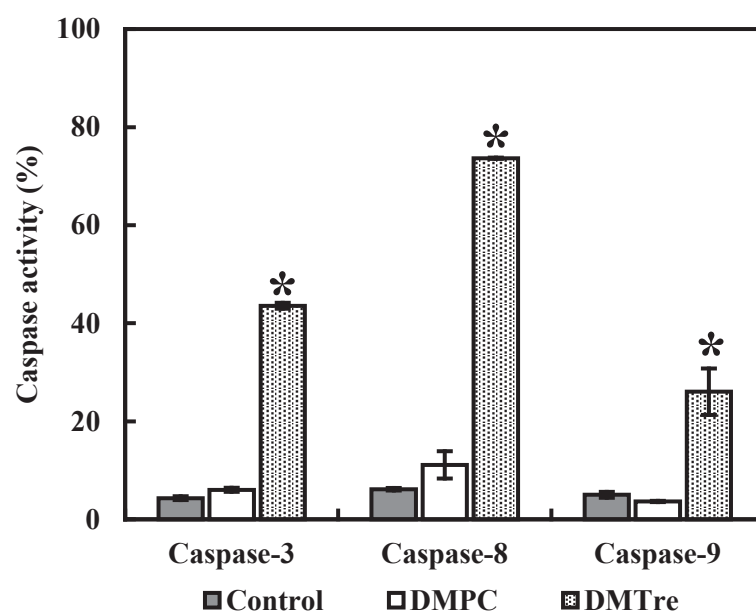


Fig. 4-3-4 Activation of caspase in A549 cells after the treatment with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 5)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

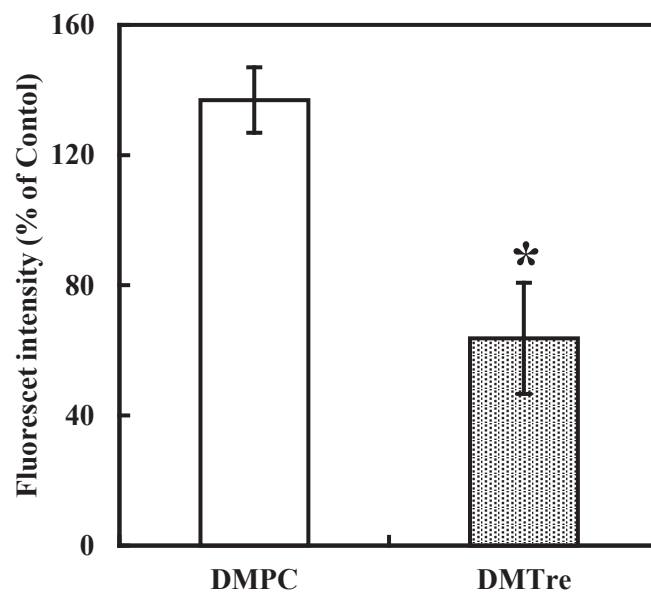


Fig. 4-3-5 Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) disruption of mitochondria membrane for A549 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n =3 ~ 5)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

4-3-4. トレハロースリポソームの肺がん細胞膜への影響

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト肺胞基底上皮腺がん(A549)細胞膜に与える影響について、リポソームの細胞膜への融合・蓄積、細胞膜流動性への影響について検討した。

蛍光脂質含有 DMTre の肺がん細胞膜への融合・蓄積を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。結果を Fig. 4-3-6 に示す。画像から明らかなように蛍光脂質含有 DMTre は添加後、30 分から緑色蛍光が観察され、経時的に蛍光強度が増大していることが明らかとなった。一方、蛍光脂質含有 DMPC では蛍光強度の増加は見られなかった。

このことから DMTre は、A549 細胞膜に融合・蓄積する事が明らかとなった。

DMTre の細胞膜流動性への影響の検討結果を Fig. 4-3-7 に示す。DMTre を添加した A549 細胞膜では、Control に比べ偏光度(P)が低下したことから、DMTre は A549 細胞膜の流動性を増大させる事が明らかとなった。

これらの結果から、DMTre は A549 細胞の細胞膜に融合・蓄積し、膜流動性を増大させることが明らかとなった。

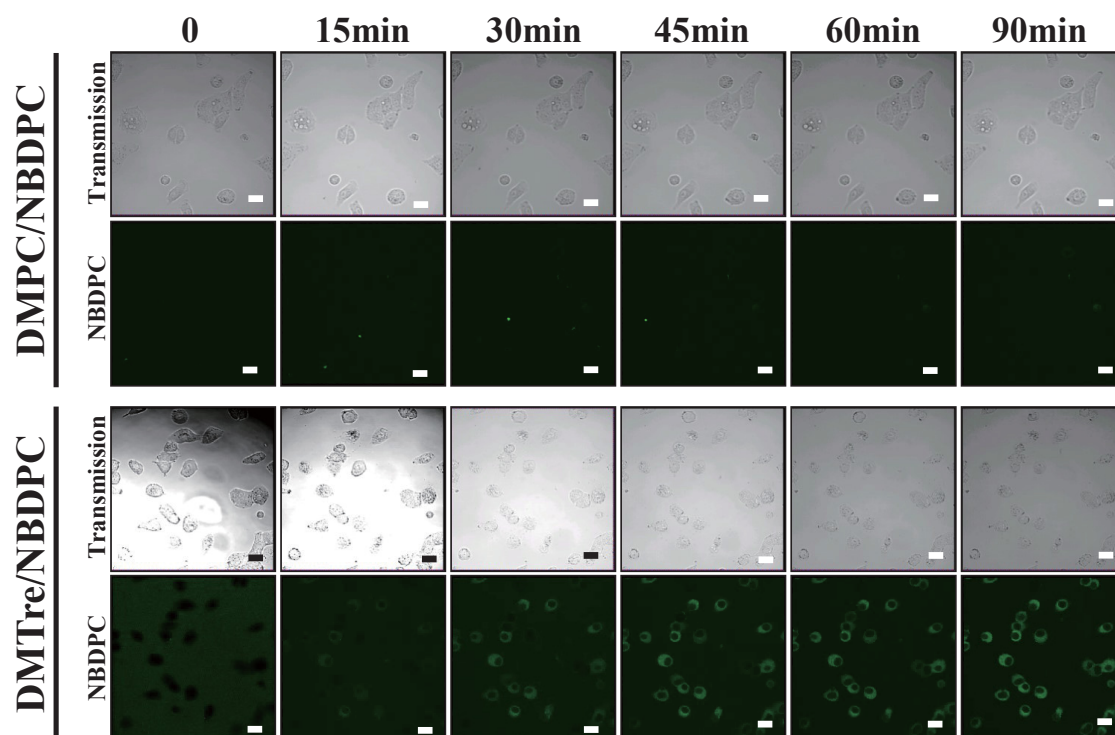


Fig. 4-3-6 Fluorescence micrographs of A549 cells treated with DMTre/NBDPC using confocal laser microscope.

Scale ber : 20 μ m

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreC14]= 2.59×10^{-4} M, [NBDPC]= 1.0×10^{-8} M

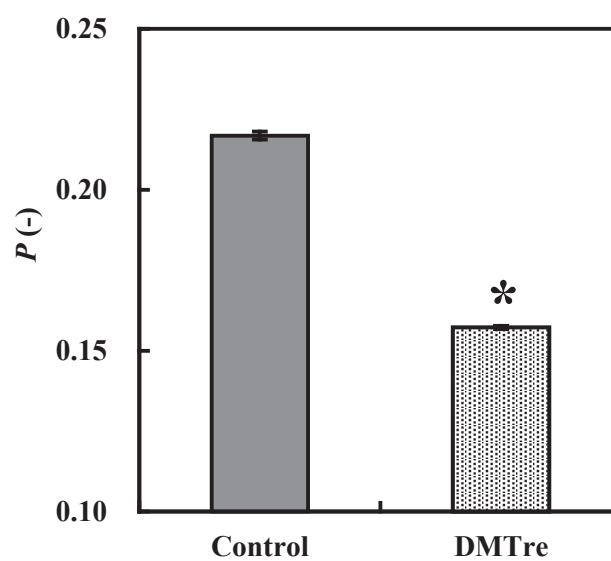


Fig. 4-3-7 Increase in membrane fluidity of A549 cells after the treatment with DMTre.

* $p < 0.05$ (Control) (n = 3)

Incubation time : 10 min.

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

4-3-5. トレハロースリポソームの肺がん細胞遊走抑制効果

トレハロースリポソーム (DMTre) のヒト肺胞基底上皮腺がん (A549) 細胞に対する浸潤抑制効果を Invasion assay を用いて検討した。また、遊走抑制効果の検討を細胞の二次元的な動きを観測する Scratch assay、細胞の移動に必要不可欠とされる仮足の形成をアクチン染色および細胞の浸潤に関係する MMP-14 の発現量を測定する事で評価した。

DMTre の A549 細胞に対する浸潤抑制効果の検討結果を Fig. 4-3-8 , Fig. 4-3-9 に示す。未処理の Control 及び DMPC 処理した A549 細胞は Matrigel を分解し、下層のチャンバーに移動した多数の浸潤細胞が見られたが、DMTre 処理を行った A549 細胞では浸潤細胞が顕著に減少した。

転移抑制効果の検討結果を Fig. 4-3-10 ~ Fig. 4-3-13 に示す。Fig. 4-3-10 から Control 及び DMPC 処理した A549 細胞では、2 次元的な移動が観察され、剥離面積が狭くなっていた。一方、DMTre を処理した A549 細胞では、Control 及び DMPC 処理した細胞に比べて A549 細胞の移動が抑制され、剥離面積が多く残っていた。顕微鏡写真の細胞移動面積を image-j にて定量化した結果を Fig. 4-3-11 に示す。Control の移動した細胞を 100%として評価した。DMPC 処理した A549 細胞の移動面積は 76.0%であったのに対し、DMTre で処理した A549 細胞の移動面積は 52.1%となった。DMTre で処理した A549 細胞は、移動面積が Control に比べ約 1/2、である事が明らかとなった。さらに、Fig. 4-3-12 の蛍光写真から明らかなように Control では多数の仮足が確認されたのに対し、DMTre で処理した A549 細胞では仮足が観察されなかった。

DMTre の A549 細胞に対する MMP-14 発現量の検討結果を Fig. 4-3-13 に示す。未処理及び DMPC 処理に比べ DMTre にて処理した A549 細胞では、MMP-14 の発現が抑制される事が明らかとなった。

以上の結果から、DMTre は、A549 細胞に対して仮足の形成を阻害し、転移・浸潤を抑制する事が示唆された。

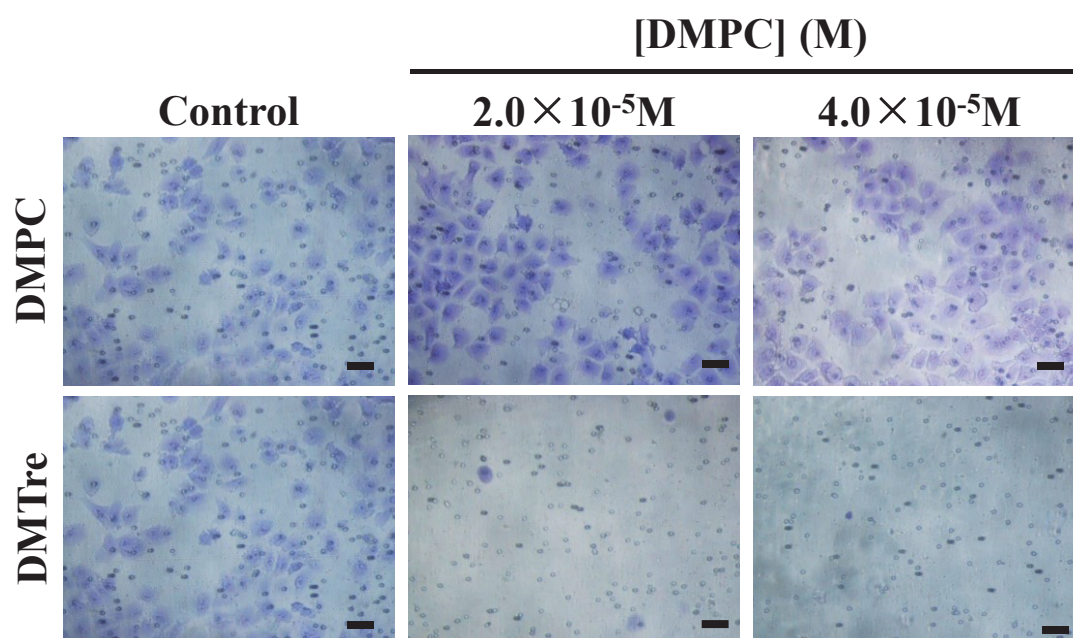


Fig. 4-3-8 Inhibitory effects of DMTre on the invasion of A549 cells. Photographs for invaded cells in the presence or absence of DMTre.

Scale bar : 50 μ m

[DMPC] = $2.0 \times 10^{-5} \text{ M} \sim 4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, [TreC14] = $4.66 \times 10^{-5} \text{ M} \sim 1.06 \times 10^{-4} \text{ M}$

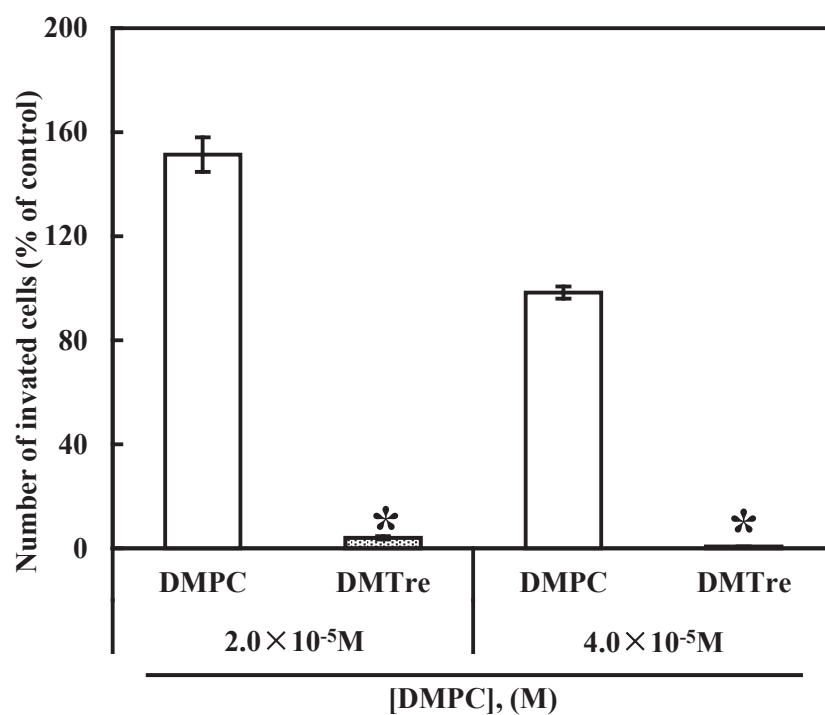


Fig. 4-3-9 Relative invaded A549 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = $2.0 \times 10^{-5} \text{ M} \sim 4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, [TreC14] = $4.66 \times 10^{-5} \text{ M} \sim 1.06 \times 10^{-4} \text{ M}$

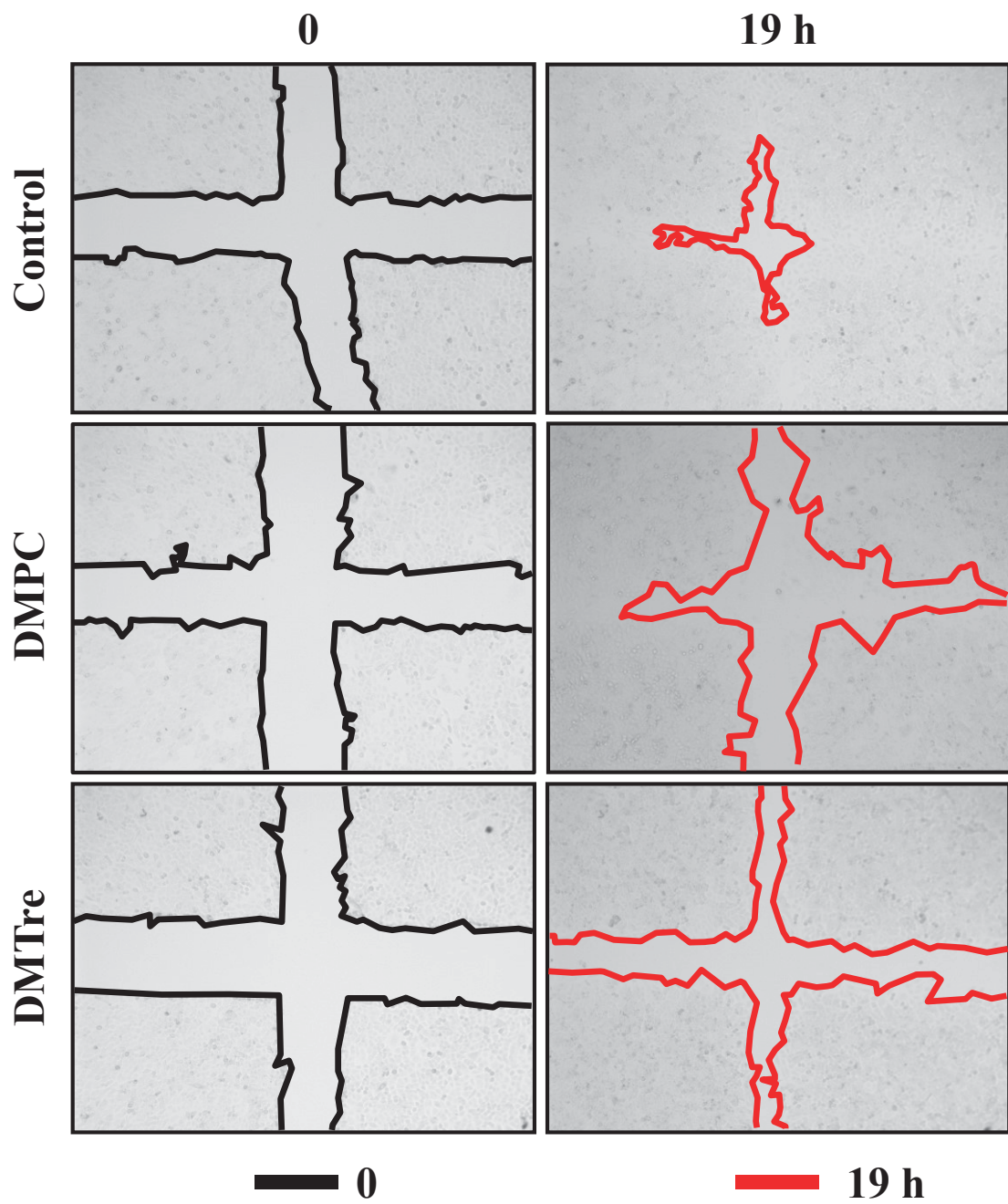


Fig. 4-3-10 Inhibitory effects of DMTre on the migration of A549 cells using wound scratch assay.

Incubation time : 19 h.

[DMPC]= 4.0×10^{-5} M, [TreC14]= 9.32×10^{-5} M

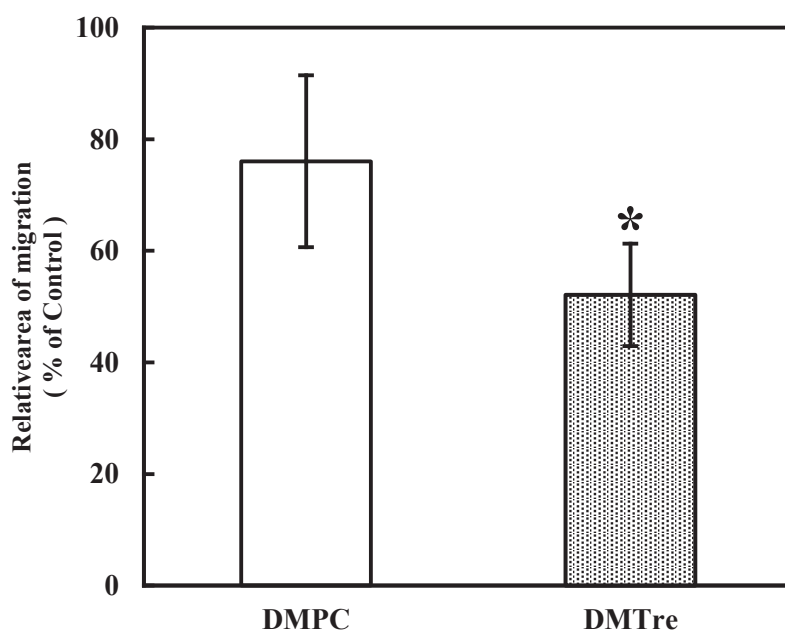


Fig. 4-3-11 Relative area of migration of A549 cells treated with DMTre for 19h.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 6)

Incubation time : 19 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC]= 4.0×10^{-5} M, [TreC14]= 9.32×10^{-5} M

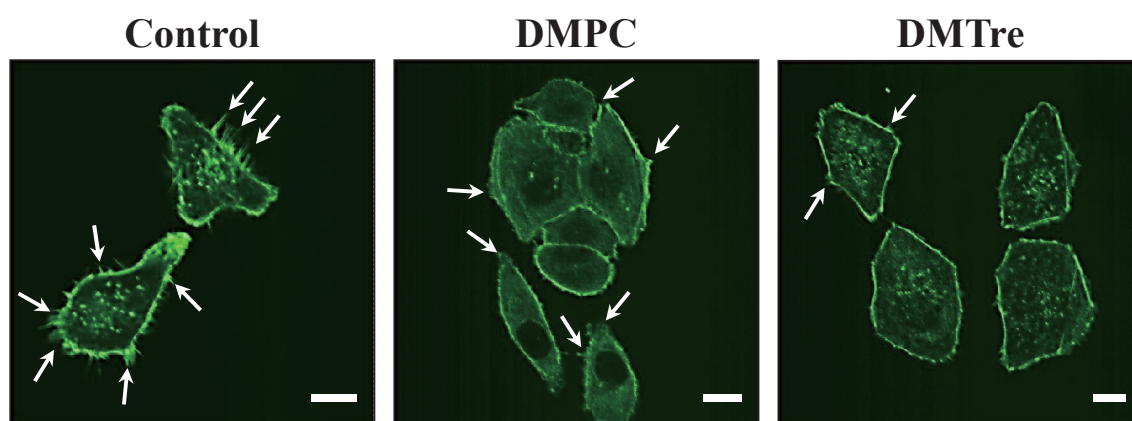


Fig. 4-3-12 Fluorescence micrographs of A549 cells treated with DMTre for 24h using confocal laser microscope.

Arrows : Invadopodia , Scale ber : 10 μ m
[DMPC]= 4.0×10^{-4} M, [TreC14]= 9.32×10^{-5} M.

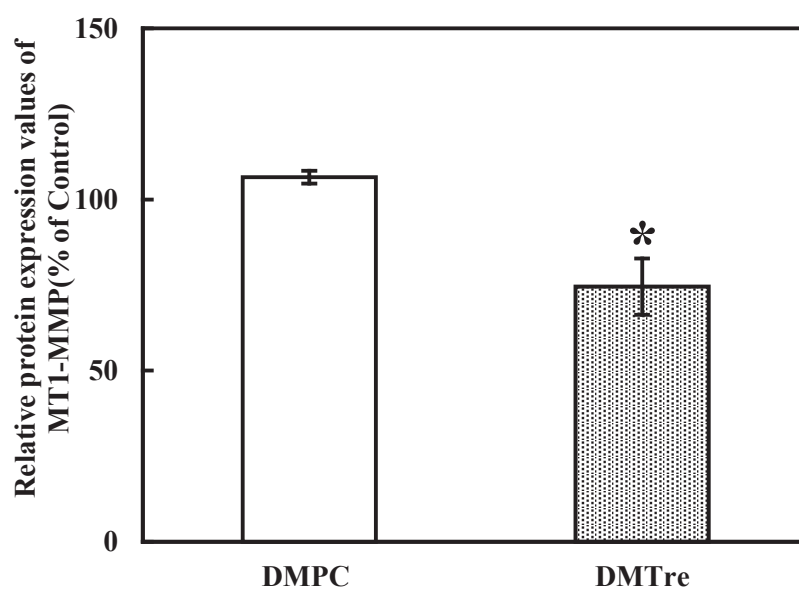


Fig. 4-3-13 Relative expression values of MT1-MMP (MMP-14) in A549 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 6)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 4.0×10^{-5} M, [TreC14] = 9.32×10^{-5} M

4-3-6. トレハロースリポソームの肺がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト肺胞基底上皮腺がん(A549)細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果およびアポトーシス誘導について検討した。

Fig. 4-3-14 に投与期間中のマウスの体重変化を示す。いずれの群においても投与期間中の体重の変化は見られなかった。

投与期間中の腫瘍体積の推移を Fig. 4-3-15 に示す。Control 群および DMPC 投与群において 14 日目から腫瘍の増大が確認された。一方、DMTre 投与群および TreC14 投与群においては腫瘍体積の増加は著しく抑制された。

投与終了翌日に解剖し、摘出した腫瘍の画像を Fig. 4-3-16 に示す。剖検により取り出された腫瘍写真から明らかなように DMTre 群で顕著な腫瘍縮小効果が得られた。腫瘍重量を Fig. 4-3-17 に示す。Control 群及び DMPC 投与群では腫瘍重量が 0.150 g 以上であるのに対し、DMTre 投与群の腫瘍重量は Control 群の約 1/5、DMPC 投与群の 1/3 である 0.050 g であったことから、DMTre の顕著な治療効果が得られた。

次に、TUNEL 染色した腫瘍切片の画像を Fig. 4-3-18 に示す。Control 群及び DMPC 投与群においてアポトーシス陽性細胞は確認されなかった。一方、DMTre 投与群の腫瘍では褐色のアポトーシス陽性細胞の集団が確認されたことから、DMTre の *in vivo* でのアポトーシス誘導が明らかとなった。

これらの結果から、DMTre は A549 皮下移植モデルマウスに対しアポトーシス誘導により顕著な治療効果を示ことが明らかとなった。

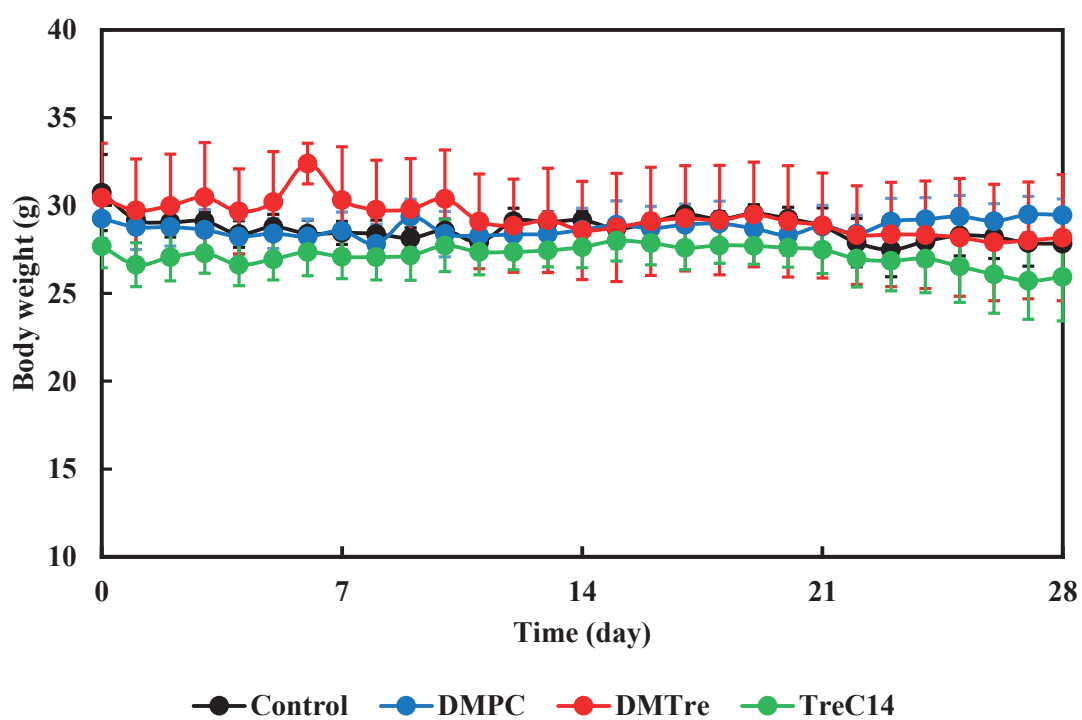


Fig. 4-3-14 Body weight change for subcutaneous lung carcinoma-bearing mice topically administered with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4)

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC14] = 2.33×10^{-3} M

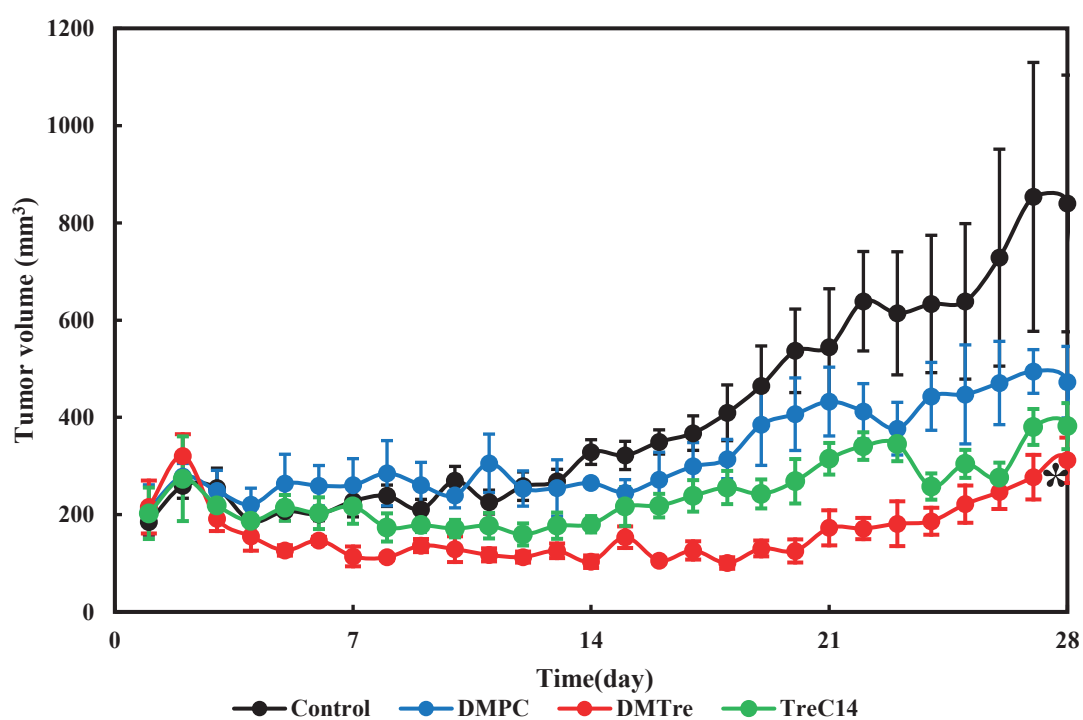


Fig. 4-3-15 Subcutaneous tumor volume for subcutaneous lung carcinoma-bearing mice topically administered with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4)

* $p < 0.05$ (Control)

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC14] = 2.33×10^{-3} M

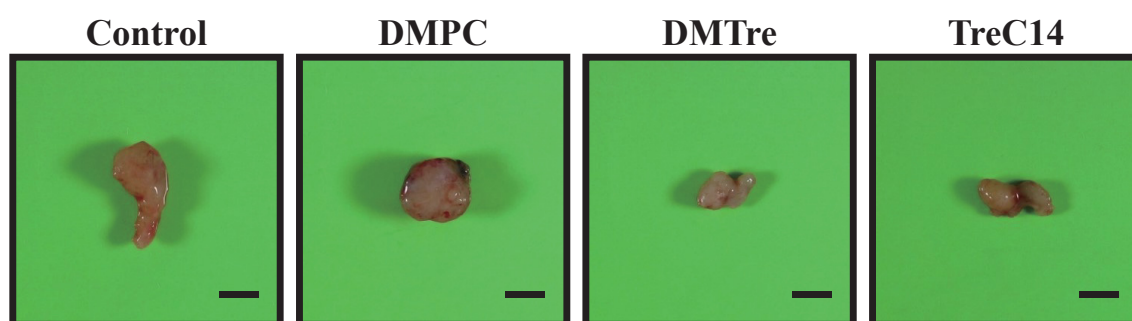


Fig. 4-3-16 Photographs of subcutaneous tumor for subcutaneous lung carcinoma-bearing mice topically administered with DMTre.

Scale bar : 5 mm

[DMPC] = $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$, [TreC14] = $2.33 \times 10^{-3} \text{M}$

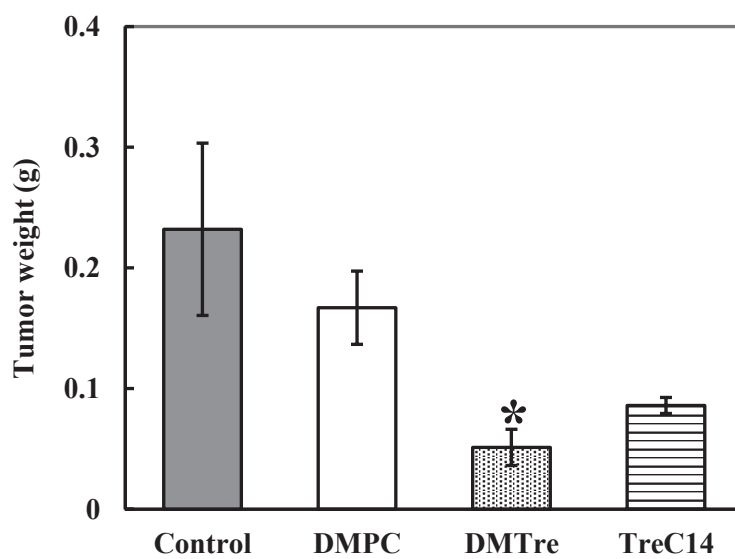


Fig. 4-3-17 Therapeutic effects of DMTre for subcutaneous lung carcinoma-bearing mice topically administered with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3 ~ 6)

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC14] = 2.33×10^{-3} M

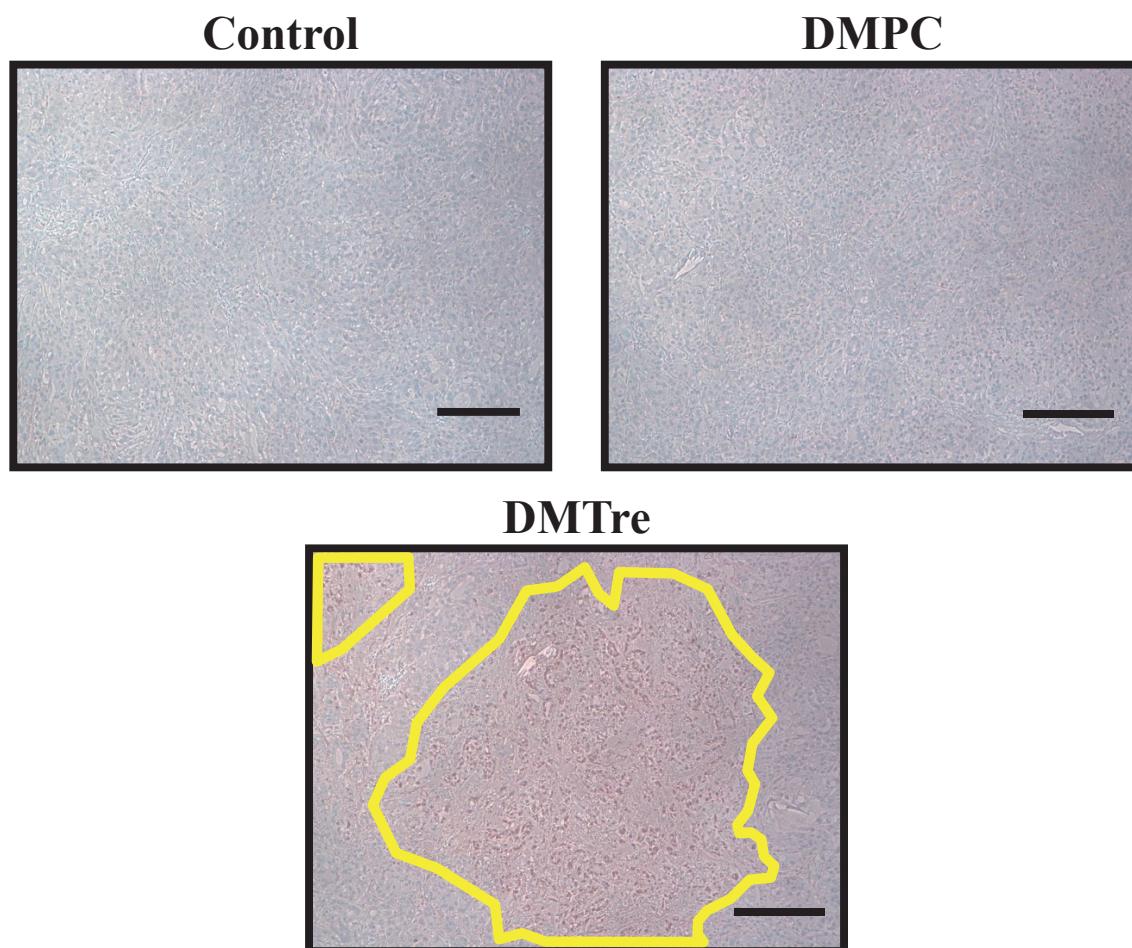


Fig. 4-3-18 Induction of apoptosis for A549 cells for subcutaneous lung carcinoma-bearing mice topically administered with DMTre.

Scale bar : 200 μm , yellow : apoptotic cells
 $[\text{DMPC}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{TreC14}] = 2.33 \times 10^{-3} \text{ M}$

4-3-7. トレハロースリポソームの肺がん細胞同所移植モデルマウスに対する治療効果

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト肺胞基底上皮腺がん(A549)細胞同所移植モデルマウスに対する治療効果およびアポトーシス誘導について検討した。

Fig. 4-3-19 に投与期間中のマウスの体重変化を示す。いずれの群においても投与期間中の体重の変化は見られなかった。

14 日間の投与終了翌日に解剖し、摘出した肺組織の写真を Fig. 4-3-20、相対臓器重量を Fig. 4-3-21 に示す。Fig. 4-3-20 から、Control 群及び DMPC 投与群の肺組織では、肺表面に腫瘍増加により凹凸が確認されたのに対し、DMTre 投与群では肺表面は正常な肺と変わらなかった。また、Fig. 4-3-21 から DMTre の相対臓器重量は Control 群及び DMPC 投与群と比べ顕著に減少($p < 0.05$)しており、DMTre の肺がんに対する著しい治療効果が明らかとなった。

次に、HE 染色した腫瘍切片の画像を Fig. 4-3-22 に示す。Control 群及び DMPC 投与群では、肺組織内にて腫瘍が増殖し、肺胞の空隙が減少していることが明らかとなった。一方、DMTre 投与群では腫瘍の増殖が抑制され、肺胞の空隙も正常な肺と同様であった。また、肺組織内の腫瘍面積を BZ-X Analyzer にて算出した結果を Fig. 4-3-23 に示す。Control 及び DMPC の腫瘍面積はそれぞれ $1212 \pm 23 \text{ mm}^2$ および $1202 \pm 40 \text{ mm}^2$ であったが、DMTre の腫瘍面積は $916 \pm 41 \text{ mm}^2$ であり統計的有意差が確認され、高い抑制効果が得られた。一方、DMTre を投与した肺癌の同所移植モデルマウスの腫瘍面積は、正常マウス($948 \pm 66 \text{ mm}^2$)と有意な差はなくほぼ同じ面積であり、DMTre の顕著な腫瘍抑制効果が明らかとなった。

これらの結果から、DMTre の A549 同所移植モデルマウスに対する顕著な治療効果が明らかとなった。

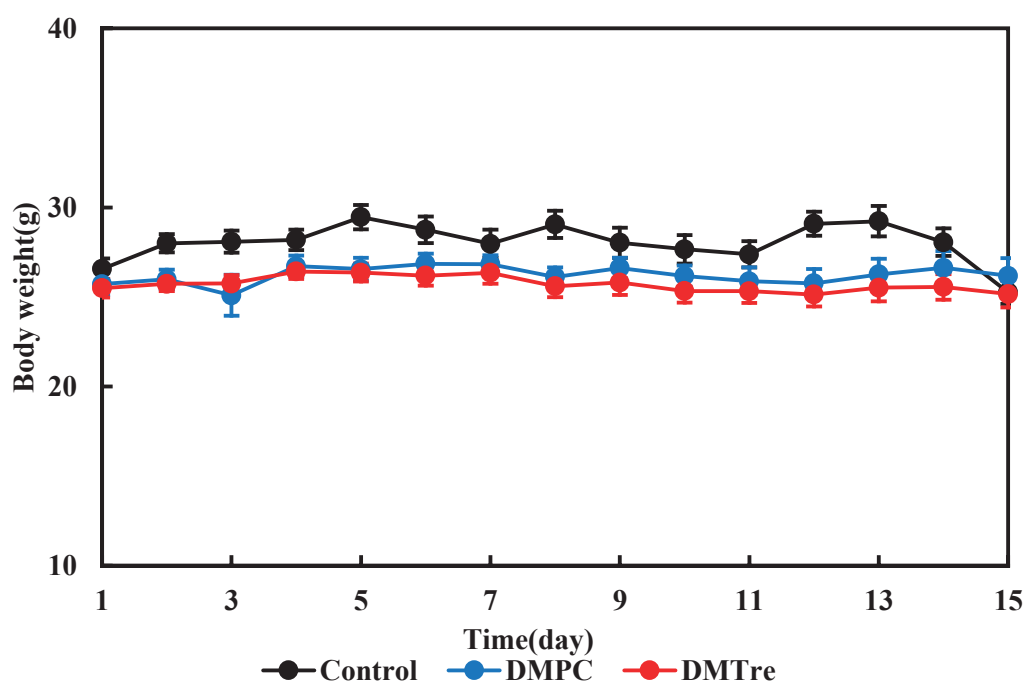


Fig. 4-3-19 Body weight change for lung on the orthotopic graft-bearing mice treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

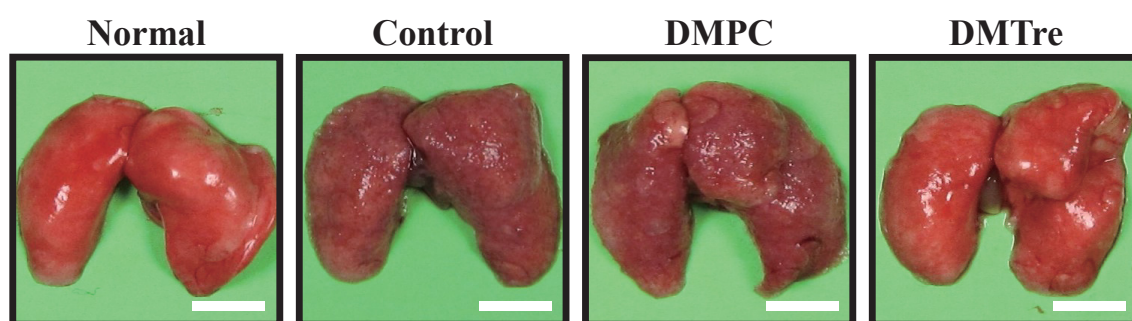


Fig. 4-3-20 Photographs of lung on the orthotopic graft-bearing mice of lung carcinoma intravenously administered with DMTre.

Scale bar : 5 mm

$[DMPC] = 4.0 \times 10^{-3} M$, $[TreC14] = 5.32 \times 10^{-3} M$

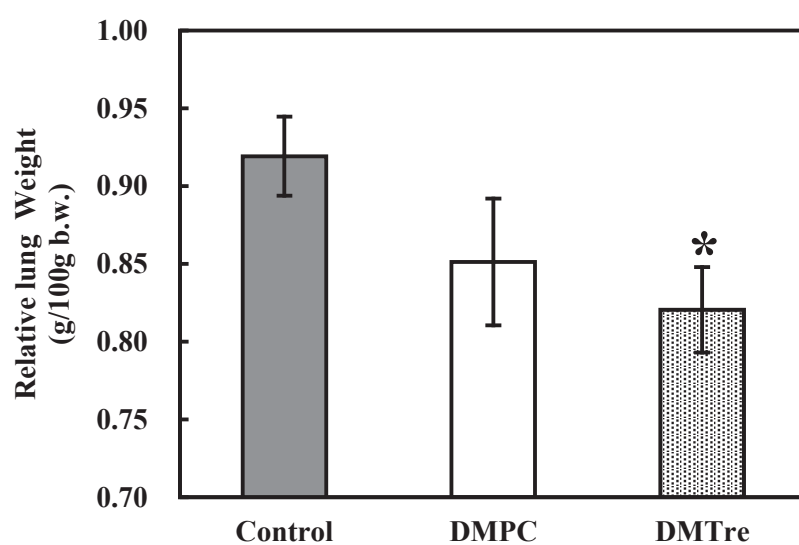


Fig. 4-3-21 Relative lung weight of orthotopic graft-bearing mice of lung carcinoma intravenously administered with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 8)

* $p < 0.05$ (Control)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

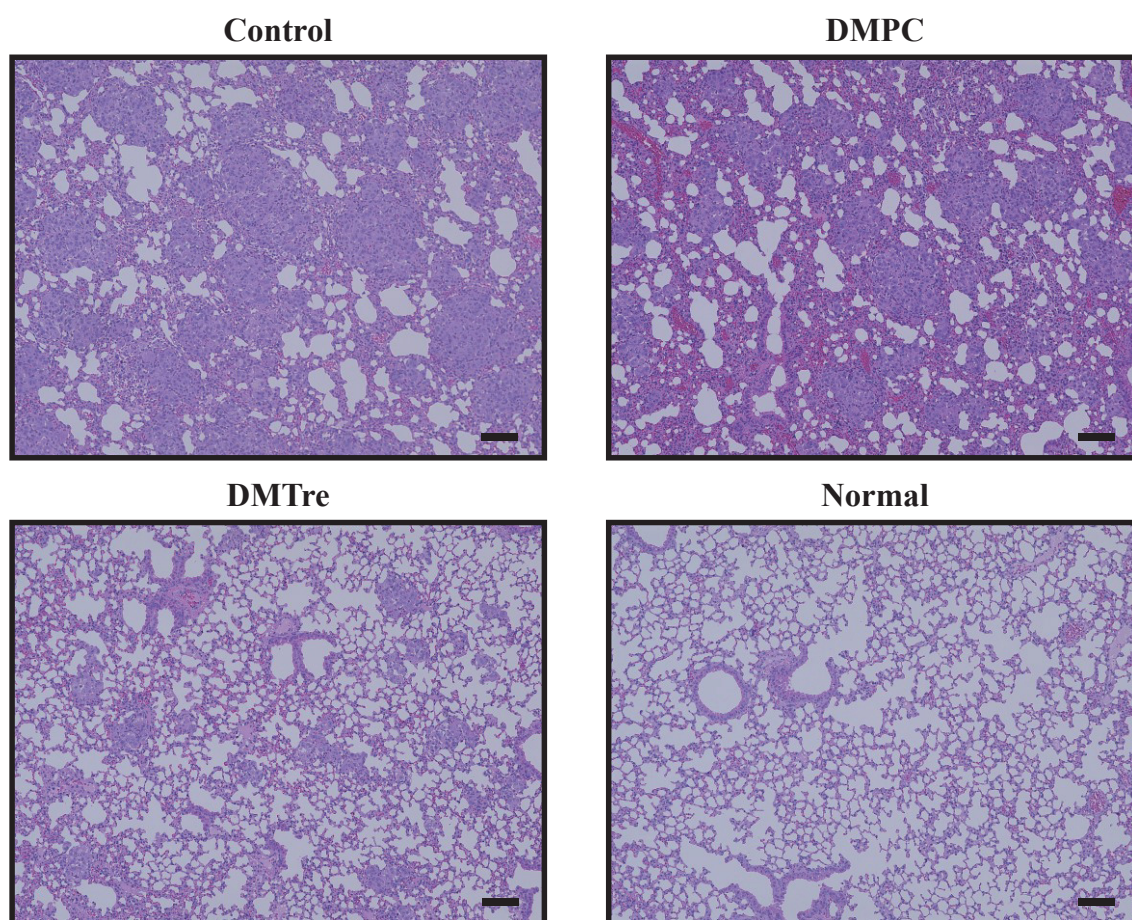


Fig. 4-3-22 Photographs of lung on the orthotopic graft-bearing mice of lung carcinoma intravenously administered with DMTre in histological analysis using the H&E staining.

Scale bar : 100 mm

$[DMPC] = 4.0 \times 10^{-3} M$, $[TreC14] = 5.32 \times 10^{-3} M$

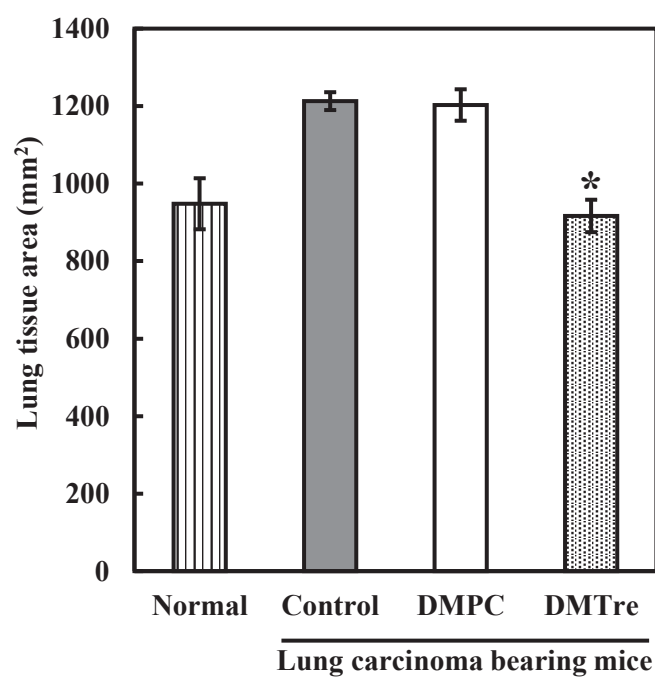


Fig. 4-3-23 Tissues are of lung on the orthotopic graft-bearing mice of lung carcinoma intravenously administered with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4)

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

4-4. 総括

本章では、糖系界面活性剤を用いたトレハロースリポソーム(DMTre)のヒト肺胞基底上皮腺がん(A549)細胞に対する *in vitro* での制がん効果および転移・浸潤抑制効果について検討した。また、*in vivo* では肺がん細胞皮下移植モデルマウスおよび同所移植モデルマウスに対する制がん効果について検討したところ、以下の様な興味深い知見が得られた。

1. DMTre は、A549 細胞の生存率を濃度依存的に減少した。また、DMPC の IC₅₀ 値が 437 μ M であるのに対し、DMTre は 1/10 以下の 40.9 μ M であり著しい増殖抑制効果が明らかとなった。
2. DMTre は濃度依存的に A549 細胞の DNA を断片化する事が明らかとなった。200 μ M では約 95%という高い DNA 断片化率が観測された。また、IC₅₀ 以下の濃度にて DNA 断片化が起きていないことから、G0/1 期の DNA 量を検討したところ、G0/1 期の DNA 量の増加が見られた。
3. DMTre で処理した A549 細胞は、未処理の Control 及び DMPC で処理した A549 細胞に比べ、カスパーズ-3, -8, -9 が著しく活性化した。特に、カスパーズ-3, -8 は約 50 ~ 80 %と非常に高くなっていることが明らかとなった。
4. DMTre で処理した A549 細胞のミトコンドリア膜電位は、未処理の Control 及び DMPC で処理した A549 細胞と比べ有意に低下していることが示された。
5. 共焦点レーザー顕微鏡にて観察した結果から蛍光脂質含有 DMTre は添加後、30 分から緑色蛍光が観察され、経時的に蛍光強度が増大していることが明らかとなった。また、DMTre を添加した A549 細胞膜では、Control に比べ偏光度(*P*)が低下したことから、DMTre は A549 細胞膜の流動性を増大させる事が明らかとなった。
6. Invasion assay の結果から、未処理の Control 及び DMPC 処理した A549 細胞は Matrigel を分解し、下層のチャンバーに移動した多数の浸潤細胞が見られたが、DMTre 処理を行った A549 細胞では浸潤細胞が顕著に減少した。さらに、Scratch assay 検討結果から、DMTre を処理した A549 細胞では、Control 及び DMPC 処理した細胞に比べて A549 細胞の移動が抑制され、剥離面積が多く残

っていた。image-j にて定量化した結果、DMPC 処理した A549 細胞の移動面積は 76.0%であったのに対し、DMTre で処理した A549 細胞の移動面積は 52.1%となった。DMTre で処理した A549 細胞は、移動面積が Control に比べ約 1/2、である事が明らかとなった。また、共焦点レーザー顕微鏡の蛍光写真から Control では多数の仮足が確認されたのに対し、DMTre で処理した A549 細胞では仮足が観察されなかった。MMP-14 発現量の検討したところ、未処理及び DMPC 処理に比べ DMTre にて処理した A549 細胞では、MMP-14 の発現が抑制されることが明らかとなった。

7. DMTre は肺がん細胞皮下移植モデルマウスの腫瘍を減少した。また、TUNEL 染色の結果から、DMTre の *in vivo* でのアポトーシス誘導が確認された。
8. DMTre は肺がん同所モデルマウスの相対臓器重量を減少させた。また、HE 染色の結果から、腫瘍面積が Normal と同様なまでに減少が確認され、*in vivo* での著しい治療効果が明らかとなった。

以上の結果から、DMTre は、ヒト肺胞基底上皮腺がん (A549) 細胞に対する *in vitro* 及び *in vivo* での優れた治療効果が明らかとなり、DMTre は A549 細胞に対して増殖抑制効果を示し、アポトーシスを誘導する事が明らかとなった。また、DMTre%は低濃度において A549 細胞の細胞周期に影響を与え G0/1 arrest を誘導することが初めて明らかとなった。DMTre は A549 細胞に低濃度において、A549 細胞の転移を抑制する事を始めて明らかとし、細胞の浸潤に関連する MMP-14 の発現を低下させることにより、A549 細胞に対して浸潤抑制効果を示すことが示唆された。DMTre は *in vivo* での制がん効果が得られ、今後の新しい肺がん治療薬として期待できるものと思われる。

第 5 章 トレハロースリポソームの乳がん治療に対する *in vitro* および *in vivo* での治療効果

5-1. 序

乳房は胸壁の上に位置し、皮膚、皮下組織、乳腺組織から構成される。乳腺は母乳をつくり、新生児、乳児への栄養や免疫機能を与える重要な組織である。乳腺は腺細胞とそれにつながる乳管細胞からなり乳管細胞は木の枝のようにつながって太くなり、乳頭に開口している。腺細胞は嚢状になって乳腺の腺房を形成し、それが 10～100 個ほど集まって小葉をつくり、さらに 20～40 集まってひとつの乳管を形成する。これらの乳腺組織は胸筋膜や腹壁筋膜と連続する線維性結合組織に覆われており、その周囲を脂肪組織が覆っている。

我が国での乳がん患者の死亡者数と罹患者数は年々増加しており、女性のがん罹患者では 1 位である (Fig. 5-1-1)²⁾。乳がんは発症初期に治療を行えば治るがんである。その為には、乳がん検診にて早期発見することが重要である。乳がん検診には、問診、視触診、マンモグラフィー検査、超音波検査などを行い、乳がんの疑いがある場合は、細胞診や組織診などの精密検査にて診断する。しかし、日本での乳がん検診を受ける人は少なく、その理由として、視触診に抵抗を感じることや、マンモグラフィーの不快感や痛み、細胞診や組織診の侵襲性が挙げられる。このため、低侵襲性の乳がん検診法が求められている。

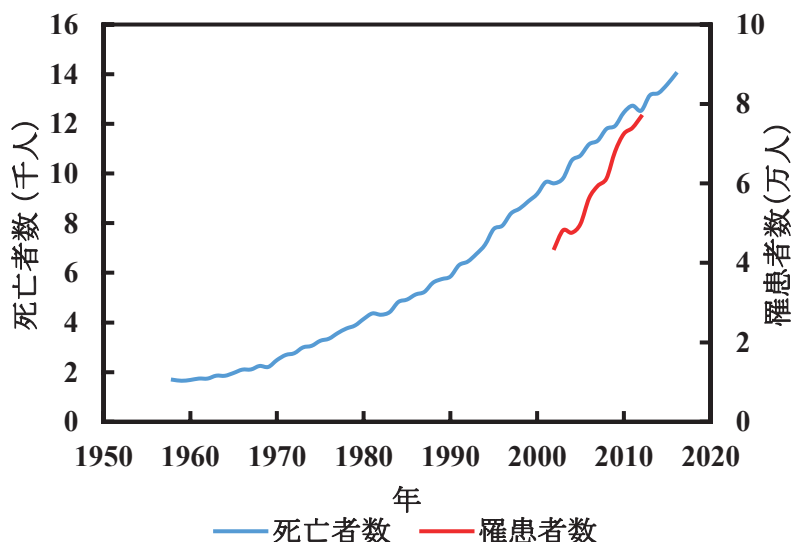


Fig. 5-1-1 日本における乳がん罹患者数と死亡者数の推移²⁾

乳がんは乳腺や小葉から発生し、浸潤性と非浸潤性と皮膚に現れる Paget 病に分類される。乳がんのステージは乳がんのシコリの大きさ、乳腺の領域にあるリンパ節転移の有無、遠隔転移の有無によって大きく 5 段階に分けられる (Table 5-1-1)。

Table 5-1-1 乳がんの臨床病期

0 期	乳がんが発生した乳腺にとどまっている。(非浸潤癌)
I 期	しこりの大きさが 2 cm 以下、脇下のリンパ節転移なし
II 期	II a 期
	しこりの大きさが 2 cm 以下で、脇下のリンパ節転移があり
	しこりの大きさが 2 ～ 5 cm で、脇下のリンパ節転移なし
	II b 期
	しこりの大きさが 2～5cm で、脇下のリンパ節転移があり
III 期	III a 期
	しこりの大きさが 2 cm 以下で、脇下のリンパ節転移があり、更にリンパ節が癒着、または周辺の組織に固定している状態
	脇下のリンパ節転移がなく胸骨の内側のリンパ節 (内胸リンパ節) が腫れている場合
	しこりの大きさが 5cm 以上で脇下あるいは胸骨の内側のリンパ節への転移がある場合
	III b 期
	しこりの大きさや脇下のリンパ節への転移の有無にかかわらず、しこりが胸壁にがっちり固定している、皮膚にしこりが顔を出したり皮膚が崩れたり皮膚がむくんでいる状態
	炎症性乳がん
	III c 期
	しこりの大きさにかかわらず、脇下のリンパ節と胸骨の内側のリンパ節の両方に転移のある場合
	鎖骨の上下にあるリンパ節に転移がある場合
IV 期	遠隔臓器 (骨、肺、肝臓、脳) に転移している場合

乳がんの治療は主に外科的療法や放射線療法、化学療法が用いられる。外科的療法では、乳房を大きく切除する為、患者の QOL を著しく損なう。また放射線療法では、皮膚の発赤や茶褐色の着色・乾燥・かゆみや手の浮腫などの副作用がある。化学療法では、内分泌薬や抗がん剤、分子標的治療薬の 3 種類を用いて治療を行う。化学療法の乳がんへの使い分けは、サブタイプ分類で行う。サブタイプ分類では、エストロ

Table 5-1-2 乳がんのサブタイプ分類

タイプ分類	ホルモン受容体		HER2	Ki67 値	選択される 薬物療法
	ER	PgR			
ルミナル A 型	陽性	陽性	陰性	低	内分泌療法 (化学療法)
ルミナル B 型 (HER2 陰性)	陽性 陰性	弱陽性 陰性	陰性	高	内分泌療法 化学療法
ルミナル B 型 (HER2 陽性)	陽性	陽性 陰性	陽性	低～高	内分泌療法 分子標的治療 化学療法
HER2 型	陰性	陰性	陽性	-	分子標的治療 化学療法
トリプルネガティブ	陰性	陰性	陰性	-	化学療法

化学療法にてがん細胞を攻撃すると、がん細胞は増殖やタンパク質合成ができなくなり死に至る。その際にがん細胞内のタンパク質や酵素が流出するネクローシスを引き起こし、周辺に炎症反応を示す。これが、抗がん剤や放射線によるがん治療において副作用として認識されている。この副作用を抑止する為には、がん細胞をアポトーシスにて殺す必要がある。一般的に細胞のアポトーシスシグナルはデスレセプターによって誘引される。デスレセプターには、腫瘍壊死因子受容体 1 (TNFR1)、Fas (CD95 / APO-1)、デスレセプター3 (DR3)、TRAIL1 受容体 (DR4)、TRAIL2 受容体 (DR5)、そしてデスレセプター6 (DR6) がある。このデスレセプターから、シグナルが発信されることによりカスパーズ-8 が活性化し、連鎖的にカスパーズ経路が稼働する。また、c-Jun キナーゼ (JNK) をリン酸化させミトコンドリア外膜透過性亢進 (MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization) により、ミトコンドリア内膜に係留されていた AIF が放出されアポトーシス誘導するミトコンドリア経路を活性化させる⁴⁾。抗がん剤でこのような経路を活性化させアポトーシスを誘導させることが副作用の軽減へと繋がる。

本章では、トレハロースリポソームの乳がん細胞に対する制がんメカニズムの解明及び *in vivo* での乳がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果について検討した。

5-2. 実験

5-2-1. 試料

DMPC 及び TreC14 は 2-2-1 と同様のものを使用した。また、NBDPC は 3-2-1 と同様のものを使用した。

5-2-2. トレハロースリポソームの調製

トレハロースリポソームは、2-2-2 と同様の方法にて調製した。

5-2-3. 蛍光脂質含有トレハロースリポソームの調製

蛍光脂質含有トレハロースリポソームは 3-2-3 と同様の方法にて調製した。

5-2-4. 使用細胞

<MCF-7>

ATCC より購入したヒト乳がん (MCF-7) 細胞を用いた。培養培地として 90 % RPMI-1640 / 10 % FBS を使用した。また、培養は 37°C、湿度 95%、CO₂ 濃度 5% の条件で行った。

<MDA-MB-453>

RIKEN BRC より購入したヒト乳がん (MDA-MB-453) 細胞を用いた。培養培地として 90 % L-15 / 10 % FBS を使用した。また、培養は T フラスコ (EasYFlask™ Cell Culture Flasks) を密閉し、37°C、湿度 95% の条件で行った。

5-2-5. 使用動物

動物は 3-2-5 と同様の BALB/c-R/J マウスを用いた。

5-2-6. 酵素活性測定法を用いた細胞増殖抑制試験

トレハロースリポソームの乳がん細胞に対する増殖抑制効果は、3-2-6 と同様の WST-8 assay を用いて評価した。

細胞(MCF-7 : 8.0×10^4 cells/ml, MDA-MB-453 : 2.0×10^5 cells/ml)を 100 μ l/well で播種し、24 時間前培養を行った。その後、各試料を 10 μ l/well 添加し、インキュベートした(37°C, 5%CO₂, 湿度 95%, 48h)。48 時間後に Cell Counting Kit-8 を 10 μ l/well 添加し、2.5 時間の呈色反応を行った。呈色反応後、マイクロプレートリーダー(VERSA max microplate reader, Molecular Devices)を用いて波長 450 nm の条件で吸光度を測定した。

5-2-7. DNA 断片化率の測定

レハロースリポソームの乳がん細胞に対する DNA の断片化率の測定は、3-2-7 と同様の PI assay を用いて行った。

細胞(MCF-7 : 1.2×10^5 cells/ml, MDA-MB-453 : 2.0×10^5 cells/ml)を播種し、24 時間培養した。その後、各試料を添加し、インキュベートした(37°C, 5%CO₂, 湿度 95%, 24h)。24 時間後に細胞を回収し、上澄みを除去した後に 0.1% Triton-X 100 を添加して浸透化処理をした。浸透化処理後に、RNase (1 mg/ml, SIGMA)により細胞内の RNA を分解除去した(室温, 5 min)。PBS(-)で再懸濁したものをナイロンメッシュに通過させ、テストチューブに入れた。PI を添加して DNA を染色し、フローサイトメーター(Cyto FLEX, beckman coulter)を用いて DNA 量の測定を行った。光源には青レーザー(Ex 488 nm, 50 mW)を使用し、PE チャンネル(Em 585/42 nm)を用いて蛍光検出を行った。

5-2-8. TUNEL 法を用いたアポトーシスの観察

トレハロースリポソームのアポトーシス誘導の観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

TUNEL 法(TbT-mediated dUTP nick end labeling)⁵⁴⁻⁵⁶⁾は、DNA のヌクレオソーム単位での切断を組織または細胞内で検出する方法として一般的に用いられている。

アポトーシスが誘導され、DNA が断片化されることにより多くの 3'-OH 末端ができる。3'-OH 末端に酵素 TbT (Terminal deoxytransferase)を用いてビオチン標識である Fluorescein -dUTP を結合することにより、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターを用いて

アポトーシス細胞を可視化することが可能である (Fig. 3-2-8)。

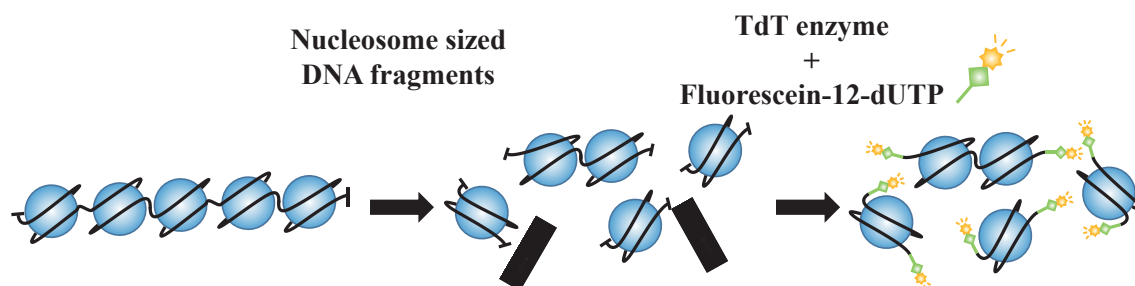


Fig. 3-2-8 Principle of TUNEL assay.

細胞 (MCF-7 : 1.2×10^5 cells/ml, MDA-MB-453 : 2.0×10^5 cells/ml) を 35 mm Glass Bottom Uncoated Dish (Mat Tek) に播種 (2 ml/dish) し、24 時間培養した。その後、各試料を添加してインキュベートした (37°C, 5%CO₂, 湿度 95%, 24h)。24 時間後に細胞を 10% 中性ホルマリン溶液にて室温で 30 分間固定した。PBS(-) で洗浄後、浸透化液 (0.1% クエン酸ナトリウム, 0.1% Triton-X100) を加えて氷上で 2 分間インキュベートした。浸透化液を PBS(-) で洗浄し、In Situ Cell Death Detection Kit (TdT, fluorescein - dUTP, Roche Diagnostics) を添加して 37°C, 暗下にて 60 分間反応させた。反応後に PBS(-) で洗浄し、TO-PRO-3 (Invitroge) で核をカウンター染色した。再度 PBS(-) で洗浄後、退色防止剤 (5% DABCO/Glycerol-PBS) を添加し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。光源には、Ar レーザー (488 nm) および He-Ne レーザー (633 nm) を用いた。

5-2-9. カスパー活性の測定

トレハロースリポソームの乳がん細胞に対するカスパー活性の測定は、3-2-8 と同様の原理を用いて行った。

細胞 (MCF-7 : 1.2×10^5 cells/ml, MDA-MB-453 : 2.0×10^5 cells/ml) を播種し、24 時間前培養した。その後、各試料を添加してインキュベート (37°C, 5%CO₂, 湿度 95%) し 24 時間後に細胞を回収した。3000 rpm, 3 min で遠心分離して上澄みを除去後、50 μ l (1.0×10^{-3} M) の CaspaLux 6-J1D2, PhiPhiLux-G1D2 (10% FBS), CaspaLux 8-L1D2 (10% FBS), CaspaLux 9-M1D2 (10% FBS) で懸濁し、37°C ドライインキュベーター内にて暗下、45 分間の条件で染色した。染色後、PBS(-) で洗浄してナイロンメッシュを通過させてテストチューブに入れ、フローサイトメーター (Cyto FLEX, beckman coulter) を用いて蛍光量を測定した。蛍光量の測定は、光源には青レーザー (Ex 488 nm, 50 mW) を使用し、FITC チャンネル (Em 525/40 nm) を用いて蛍光検出を行った。

5-2-10. ミトコンドリア膜電位の測定

トレハロースリポソームの乳がん細胞ミトコンドリア膜電位に与える影響の測定は、3-2-9と同様の原理を用いて行った。

細胞(MCF-7 : 1.2×10^5 cells/ml, MDA-MB-453 : 2.0×10^5 cells/ml)を播種し、24 時間前培養した。その後、各試料を添加してインキュベート(37℃, 5%CO₂, 湿度 95%, 24h)した。回収の 30 分前に DiOC₆(3)を最終濃度 40 nM となるように添加し(37℃, 5%CO₂, 湿度 95%, 30 min)、30 分後に細胞を回収した。3000 rpm, 3 min で遠心分離して上澄みを除去後、PBS にて再懸濁しナイロンメッシュを通過させた後、フローサイトメーターにて DiOC₆(3)の蛍光量を測定した。光源には 488 nm の空冷 Ar レーザーを出力 15 mW で使用し、FL1 センサーにて一定波長域(505 nm ~ 545 nm)で DiOC₆(3)の蛍光量を検出した。

5-2-11 Cytochrome *c* 量の測定

シトクロム *c* は核がコードしているタンパク質で、細胞質にてアポシトクロム *c* として合成されてミトコンドリアの外膜と内膜の間に運ばれる。そこで、ヘムリアーゼによりヘム族が付加され、成熟型蛋白(ホロシトクロム *c*)が合成される。アポトーシスシグナルがミトコンドリアへ伝達されると MOMP が起きシトクロム *c* などの可溶性物質が細胞質へと漏出する。漏出したシトクロム *c* は単量体のアダプタータンパク質である APAF-1 と結合し、APAF-1-シトクロム *c* 複合体を形成する。APAF-1-シトクロム *c* 複合体は多量体となりプロカススペース-9 と結合し、アポトソームを形成する。このアポトソームによってカススペース-9 が活性化され、アポトーシスシグナルが伝達される。

細胞(MCF-7 : 1.2×10^5 cells/ml, MDA-MB-453 : 2.0×10^5 cells/ml)を播種し、24 時間前培養した。その後、各試料を添加してインキュベート(37℃, 5%CO₂, 湿度 95%)し 24 時間後に細胞を回収した。4000 rpm, 3 min で遠心分離して上澄みを除去後、Permeabilization Buffer にて浸透化を行った(10 min, 4℃)。その後 Fixation Buffer Working Solution にて固定した(20 min, 室温)。Blocking buffer にて洗浄(5000 rpm, 3min)し、再度 Blocking buffer にてブロッキングした(30 min, 室温)。その後、Anti-Cytochrome *c* FITC Antibody または Anti IgG-FITC を加え暗所にて 30 min 染色した。染色終了後、Blocking buffer にて洗浄し、PBS にて再懸濁を行いナイロンメッシュを通過させた後、フローサイトメーターにて Cytochrome *c* の蛍光量を測定した。光源には 488 nm の空冷 Ar レーザーを出力 15 mW で使用し、FL1 センサーにて一定波長域

(505 nm ~ 545 nm)で Cytochrome *c* の蛍光量を検出した。

5-2-12. pJNK 活性の測定

JNK は c-Jun の Ser63 と Ser73 をリン酸化する活性を持つキナーゼとして同定された。JNK は放射線やリポ多糖 (LPS)、IL-1、浸透圧及び熱ショックなどのストレスにより活性化し、ストレス応答性 MAPK (SAPK : Stress-activated Protein Kinase) と呼ばれる。JNK 遺伝子には JNK1-3 が存在し、JNK1,2 は全身の細胞に広く分布しているが、JNK3 は主に神経系及び精巣にて多く発現している。JNK アポトーシスや神経変性、細胞の分化・増殖、炎症性サイトカインの産生などの過程に関与している。TRAIL1 受容体や小胞体ストレスにより活性化した JNK は核内に移行し c-Jun をリン酸化させ AP-1 を活性化させる。また、JNK はミトコンドリアに対し MOMP により、ミトコンドリア内膜に係留されていた AIF が放出されアポトーシス誘導する。

細胞(MCF-7 : 1.2×10^5 cells/ml, MDA-MB-453 : 2.0×10^5 cells/ml)を播種し、24 時間前培養した。その後、各試料を添加してインキュベート(37°C, 5%CO₂, 湿度 95%)し 24 時間後に細胞を回収した。4000 rpm, 3 min で遠心分離して上澄みを除去後、PBS(-)で洗浄して中性 10%ホルマリン溶液を添加し固定した(4°C, 10 min)。PBS(-)で洗浄後、冷メタノール/2.5%酢酸 (-20°C)を添加して浸透化处理(4°C, 10 min)をし、5% BSA+0.1% Triton® X-100 でブロッキングした(4°C, 60 min)。洗浄後、PBS(-)で 1 : 50 に希釈した Anti JNK(G-7) Alexa Fluor® 488- conjugated Antibody を 1 ml 添加し、60 分間染色した(暗所, 4°C)。Wash Buffer にて洗浄後 PBS(-)で再懸濁し、ナイロンメッシュを通過させてフローサイトテストチューブにとり、フローサイトメーターにて pJNK の蛍光量を測定した。光源には、488 nm の空冷 Ar レーザーを出力 15 mW で使用し、FL1 センサーにて一定波長域(505 nm ~ 545 nm)で pJNK の蛍光量を検出した。

5-2-13. 蛍光脂質含有リポソームの細胞へ融合・蓄積の測定

蛍光脂質含有トレハロースリポソームの A549 細胞への融合・蓄積を 4-2-10 と同様の方法を用いて測定した。

滅菌済み 35mm Glass Bottom dish に細胞(MCF-7 : 1.2×10^5 cells/ml, MDA-MB-453 : 2.0×10^5 cells/ml)を播種(2 ml/dish)し前培養した。前培養終了後、各試料を添加した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて試料添加後、0, 15, 30, 45, 60, 90 分のタイムラプス観察を行った。励起波長を 488 nm の Ar レーザーを用い、検出蛍光波長 505~555 nm で観察した。

5-2-14. 蛍光偏光解消法を用いた細胞膜流動性の測定

トレハロースリポソームの乳がん細胞膜に与える影響は、3-2-11 と同様の原理を用いて行った。

培養した細胞を遠沈管に回収し、1000 rpm, 5 min の条件で遠心した。アスピレーターにて上澄みを除去し、 1.0×10^6 cells/ml になるように遠沈管に播種し、HBSS で懸濁した。DPH ($[DPH] = 2.5 \times 10^{-3}$ M, 溶媒 : Tetrahydrofuran) を添加し (最終濃度 : 2 μ M)、遮光状態で 37°C にて 7 分ごとにタッピングを行い 35 分間染色した。HBSS で 3 回洗浄後、 2.5×10^5 cells/ml になるように遠沈管に播種した。遠沈管に播種した細胞を 1 cm 角の石英セルに 2.5 ml 分注し、循環恒温槽中で 37°C にした。1 分間 Control を測定後に試料を添加し、がん細胞膜流動性を測定した。DPH の蛍光偏光強度は、励起波長 357 nm で 432 nm の蛍光偏光強度成分を分光蛍光光度計にて測定した。

5-2-15. Scratch assay を用いた転移抑制効果の検討

トレハロースリポソームの転移抑制効果は 4-2-11 と同様に行った。

滅菌済み 6well プレートに細胞 (2.5×10^5 cells/ml) を播種 (2 ml/dish) し、24 時間前培養を行った。前培養終了後、細胞が well 内で monolayer になっているのを確認した後、定規を当て細胞培養面を均一に 200 μ l チップで引っ搔いて十字状に細胞を剥離させた。その後、培地を除去し、PBS(-) で洗浄した。洗浄後、新しく完全培地を満たし、試料を添加し 19 時間培養した。試料を添加した時間を 0 時間とし、0 時間と培養後の 19 時間後に倒立型顕微鏡 (EVOS, Advanced microscopy group) を用いて細胞培養面の顕微鏡写真を撮影した。なお試料濃度は、A549 細胞に対してアポトーシスを誘導しない濃度とした。撮影した顕微鏡写真より、0 時間と 19 時間後の細胞剥離面積をそれぞれ定量化した。

5-2-16. トレハロースリポソームの乳がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験

高度免疫不全マウス (BALB/c-R/J, 7 週齢, 雌) の体重をもとに層別連続無作為化法により群分けを行った。マウス後背部皮下にマトリゲル (50 μ l) に懸濁した細胞 (5.0×10^6 cells/body) を移植した。移植翌日から腫瘍体積を 5-1 式から測定し、試料を 1 日 1 回尾静脈に 14 日間反復投与 (10 ml/kg) した。移植日 15 日に麻酔下にて腫瘍組織の摘出を行った。摘出した腫瘍重量および腫瘍体積にて治療効果の評価を行った。

$$\text{腫瘍体積(mm}^3\text{)} = \text{長径} \times (\text{短径})^2 \times 1/2 \cdots (5-1)$$

Table 5-2-1 Dose of DMTre.

群	Sample	Dose (mg/kg)	
		DMPC	TreC14
1	Control (5% glucose)		
2	DMPC	13.6	
3	DMTre (30mol%DMPC/ 70mol% TreC14)	13.6	26.0

5-2-17. TUNEL 染色によるアポトーシスの検出

TUNEL 法を用いたトレハロースリポソームの *in vivo* でのアポトーシス誘導の評価は 3-2-14 と同様の原理を用いて評価した。

5-3. 結果と考察

5-3-1. トレハロースリポソームの乳がん細胞に対する制がん効果

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト乳がん(MCF-7, NDA-MB-453)細胞に対する制がん効果を酵素活性測定法である WST-8 assay にて測定した。

DMTre の MCF-7 細胞に対する増殖抑制効果の検討結果を Fig.5-3-1, Fig.5-3-2 に示す。DMTre は、MCF-7 細胞の生存率を濃度依存的に減少させた。また、 IC_{50} 値を比べたところ DMPC が $437\ \mu\text{M}$ であるのに対し、DMTre は 1/10 以下である $40.9\ \mu\text{M}$ であることが明らかとなった。

DMTre の MDA-MB-453 細胞に対する増殖抑制効果の結果を Fig.5-3-3, Fig.5-3-4 に示す。DMTre は、MDA-MB-453 細胞の生存率を濃度依存的に減少させた。また、 IC_{50} 値を比べたところ DMPC が $1000\ \mu\text{M}$ 以上であるのに対し、DMTre は $45\ \mu\text{M}$ であることが明らかとなった。

以上の結果から、DMTre はヒト乳がん細胞に対する顕著な制がん効果が明らかとなった。

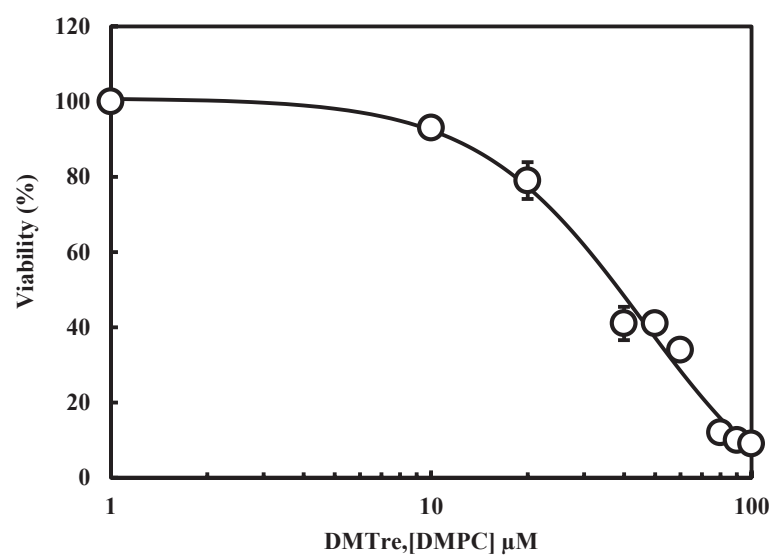


Fig. 5-3-1 Inhibitory effects of DMTre on the growth of MCF-7 cells.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

[DMPC] = 0 ~ $1.0 \times 10^{-4}\text{M}$, [TreC14] = 0 ~ $2.33 \times 10^{-4}\text{M}$

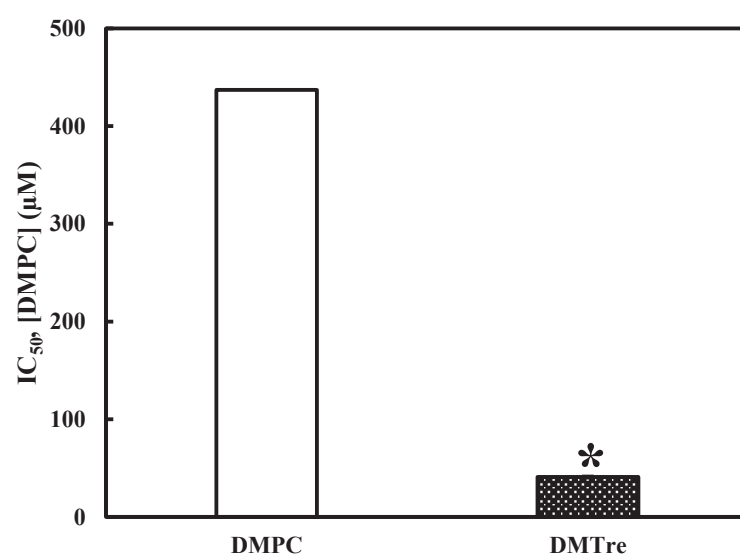


Fig. 5-3-2 Inhibitory concentration (IC₅₀) of DMTre and DMPC on the growth of MCF-7cells.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 48 h.

* $p < 0.05$ (DMPC)

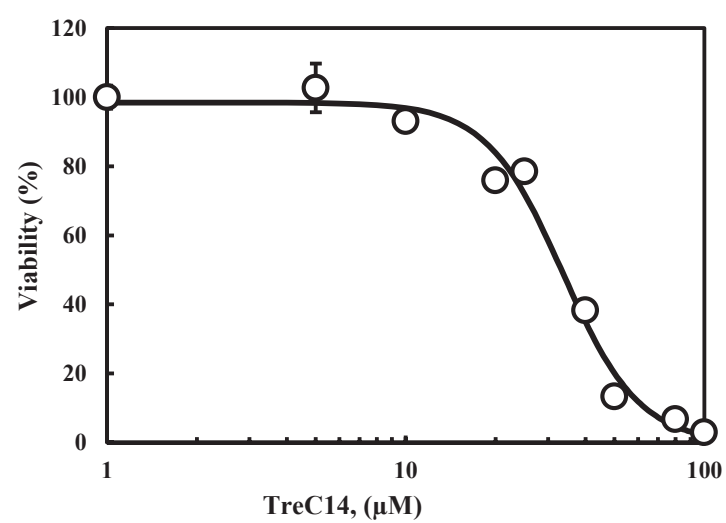


Fig. 5-3-3 Inhibitory effects of DMTre on the growth of MDA-MB-453 cells.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

[DMPC] = 0 ~ 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 0 ~ 2.33×10^{-4} M

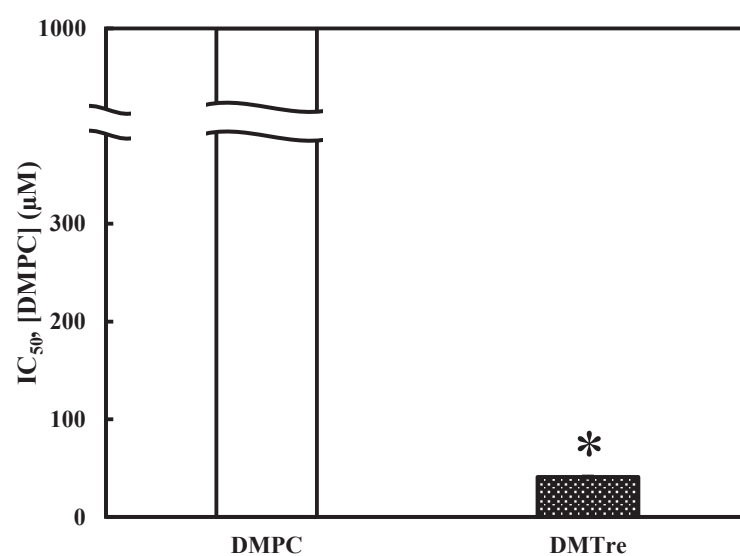


Fig. 5-3-4 Inhibitory concentration (IC₅₀) of DMTre and DMPC on the growth of MDA-MB-453 cells.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 48 h.

* $p < 0.05$ (DMPC)

5-3-2. トレハロースリポソームの乳がん細胞に対するアポトーシス誘導

トレハロースリポソーム (DMTre) のヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞に対するアポトーシス誘導を DNA 断片化率の測定および TUNEL 法を用いた観察にて検討した。

MCF-7 細胞に対する DMTre によるアポトーシス誘導の検討結果を Fig.5-3-5, Fig.5-3-6 に示す。

フローサイトの結果より、DMTre は濃度依存的に MCF-7 細胞の DNA を断片化する事が明らかとなった。100 μ M では約 80%という高い DNA 断片化率が観測された。更に共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察から、Control 及び、DMPC では TUNEL 陽性である緑色蛍光が観察されなかったのに対し、DMTre では緑色蛍光が観察され、アポトーシス誘導が確認された。

MDA-MB-453 細胞に対する DMTre によるアポトーシス誘導の検討結果を Fig.5-3-7, Fig.5-3-8 に示す。DMPC を処理した MDA-MB-453 細胞は DNA 断片化を引き起こさなかった。一方、DMTre 及び TreC14 を処理した MDA-MB-453 細胞の DNA は濃度依存的に断片化率の増加が示された。また、TUNEL 染色から、DMTre 及び TreC14 処理した MDA-MB-453 細胞では緑色蛍光が確認された。

これらの結果から、DMTre 及び TreC14 は乳がん細胞に対し濃度依存的に DNA を断片化させ、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

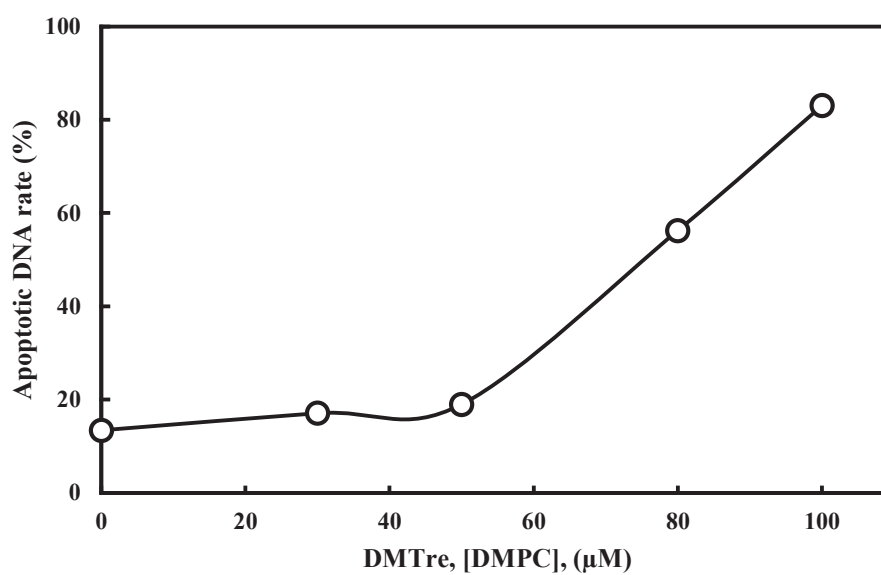


Fig. 5-3-5 Apoptotic DNA rate of MCF-7 cells treated with DMPC.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 48 h.

* $p < 0.05$ (Control)

[DMPC] = 0 ~ 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 0 ~ 2.33×10^{-4} M

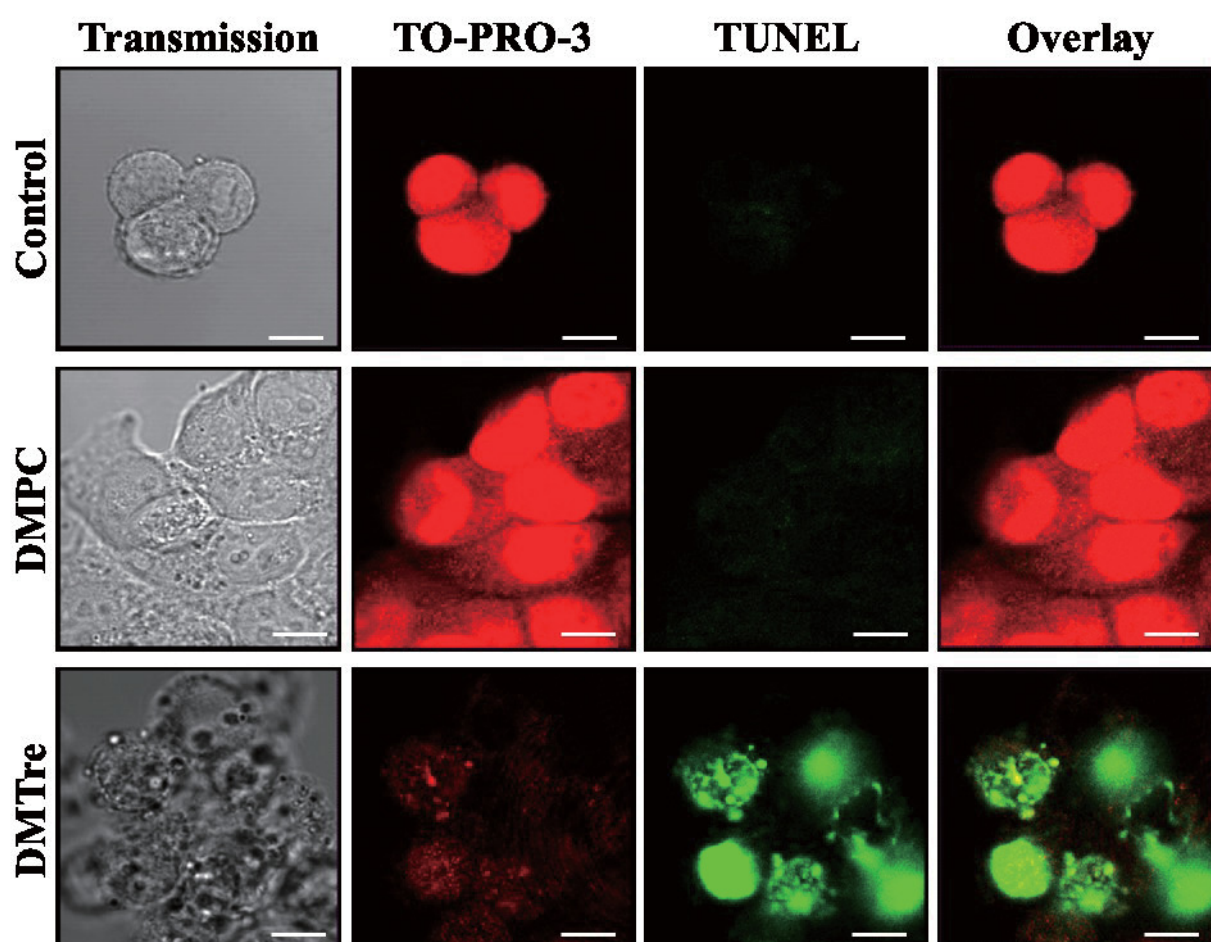


Fig. 5-3-6 Fluorescence micrographs of MCF-7 cells treated with DMTre using confocal laser microscope.

Reaction time : 48h Scale bar : 10 μ m
 [DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

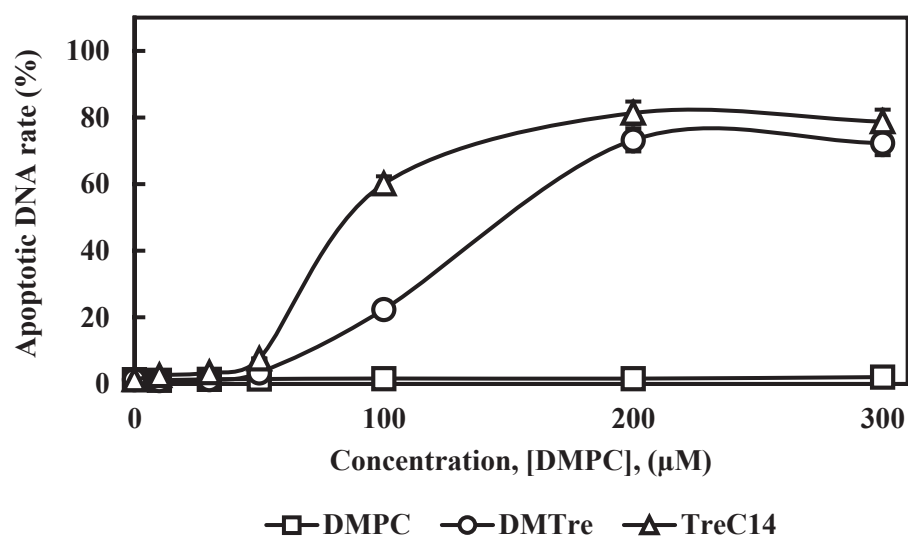


Fig. 5-3-7 Apoptotic DNA rate of MDA-MB-453 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 48 h.

* $p < 0.05$ (Control)

[DMPC] = 0 ~ 3.0×10^{-4} M, [TreC14] = 0 ~ 6.99×10^{-4} M

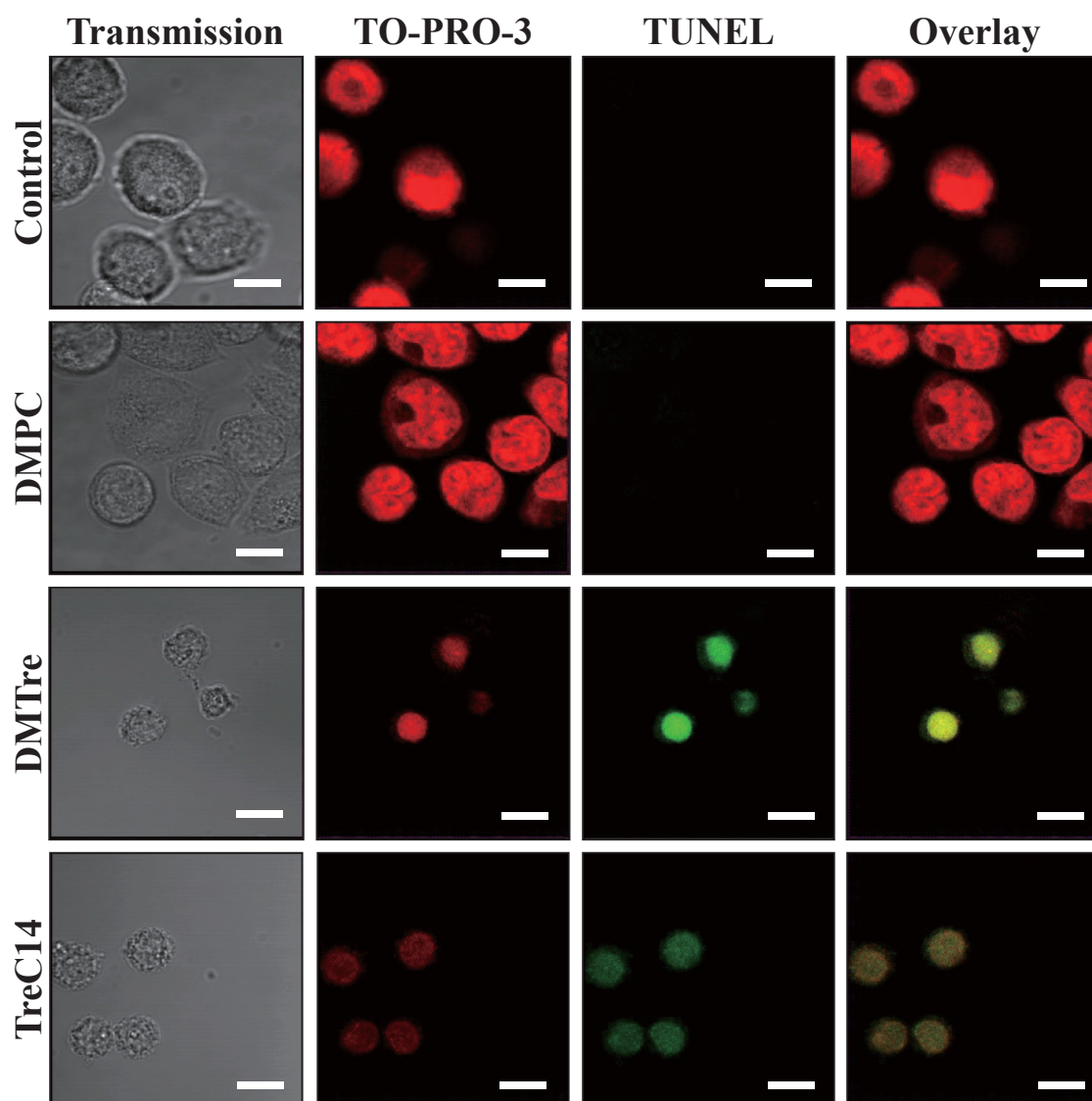


Fig. 5-3-8 Florescence micrographs of MDA-MB-453 cells treated with DMPC and DMTre using confocal laser microscope.

Reaction time : 48h Scale bar : 10 μ m

[DMPC] = 2.0×10^{-4} M, [TreC14] = 4.66×10^{-4} M

5-3-3. アポトーシス誘導におけるシグナル伝達

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト乳がん(MCF-7, NDA-MB-453)細胞に対するアポトーシス誘導経路について、フローサイトメーターにてカスパー活性、ミトコンドリア膜電位、Cytochrome *c* 量の変化および pJNK 量の測定により解明した。

MCF-7 細胞のアポトーシス誘導経路の検討結果を Fig.5-3-9~ Fig.5-3-12 に示す。DMTre 処理した MCF-7 細胞は、Control 及び DMPC 処理した MCF-7 細胞に比べ、カスパー-6, -9 が活性化していることが示された (Fig.5-3-9)。特に、カスパー-6, -9, が約 40 ~ 80 %と非常に高いことが明らかとなった。また、DMTre の MCF-7 細胞ミトコンドリア膜電位に与える影響について測定したところ、DMPC 処理した MCF-7 細胞ミトコンドリア膜電位は Control と同じであった。一方、DMTre 処理した MCF-7 細胞ミトコンドリア膜電位は Control と比べ有意に膜電位の減少が示された (Fig.5-3-10)。更に、ミトコンドリア内の Cytochrome *c* 量を測定したところ、Control 及び DMPC 処理した MCF-7 細胞と比べ、DMTre を処理した MCF-7 細胞においてミトコンドリア内 Cytochrome *c* 量の減少が明らかとなった (Fig.5-3-11)。この結果から、DMTre の MCF-7 細胞におけるアポトーシス誘導では、デスレセプターを経由するカスパー-8 の活性が弱いことから、ミトコンドリアからカスパーを経由する経路が主経路だと考えられる。このことから、ミトコンドリア上流にあるストレス応答シグナルである pJNK 量の変化を測定した。結果を、Fig.5-3-12 に示す。DMPC 処理した MCF-7 細胞の pJNK 量は Control と差はなかった。一方 DMTre は MCF-7 細胞の pJNK 量を Control 及び DMPC 処理した MCF-7 細胞と比べ有意に増加させた。

MDA-MB-453 細胞のアポトーシス誘導経路の検討結果を Fig.5-3-13~ Fig.5-3-16 に示す。DMTre 及び TreC14 で処理した MDA-MB-453 細胞は、Control 及び DMPC 処理した MDA-MB-453 細胞に比べ、カスパー-3,-6, -8, -9 が活性化していることが示された (Fig.5-3-13)。特に、カスパー-3,-6, -9, が約 40 ~ 80 %と非常に高いことが明らかとなった。また、DMTre の MDA-MB-453 細胞ミトコンドリア膜電位に与える影響について測定したところ、DMPC を処理した MDA-MB-453 細胞ミトコンドリア膜電位は Control と同じであった。一方、DMTre 及び TreC14 処理した MDA-MB-453 細胞のミトコンドリア膜電位は Control と比べ有意に膜電位の減少が示された (Fig.5-3-14)。更に、ミトコンドリア内の Cytochrome *c* 量を測定したところ、Control 及び DMPC 処理した MDA-MB-453 細胞と比べ、DMTre 処理した MDA-MB-453 細胞においてミトコンドリア内 Cytochrome *c* 量の減少が明らかとなった (Fig.5-3-15)。このことから、ミトコンドリア上流にあるストレス応答シグナルである pJNK 量の変化を測定した。結果を、Fig.5-3-16 に示す。DMPC 処理した MDA-MB-453 細胞の pJNK 量は Control と差はなか

った。一方 DMTre は MDA-MB-453 細胞の pJNK 量を Control 及び DMPC 処理した MDA-MB-453 細胞と比べ有意に増加させた。

以上の結果から、DMTre のヒト乳腺癌細胞のアポトーシス誘導においてカスパーズとミトコンドリアを介していることが明らかとなった。

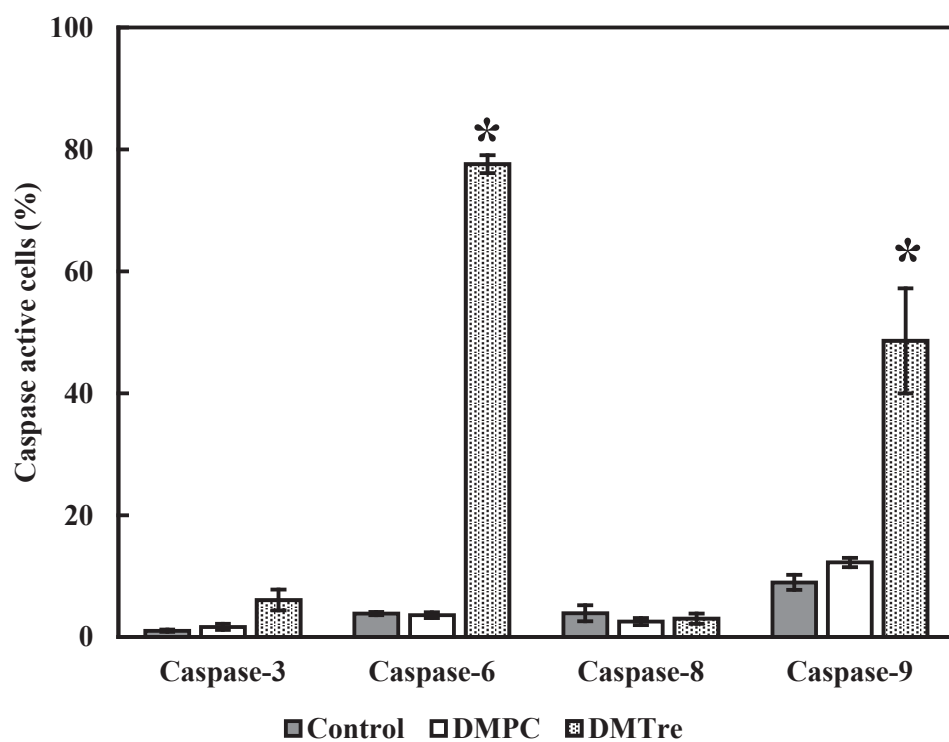


Fig. 5-3-9 Activation of caspase in MCF-7 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

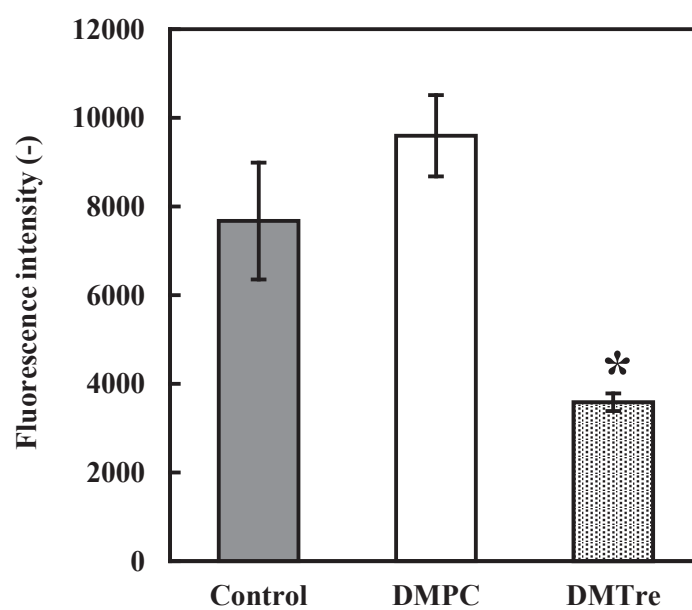


Fig. 5-3-10 Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) disruption of mitochondria membrane for MCF-7 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

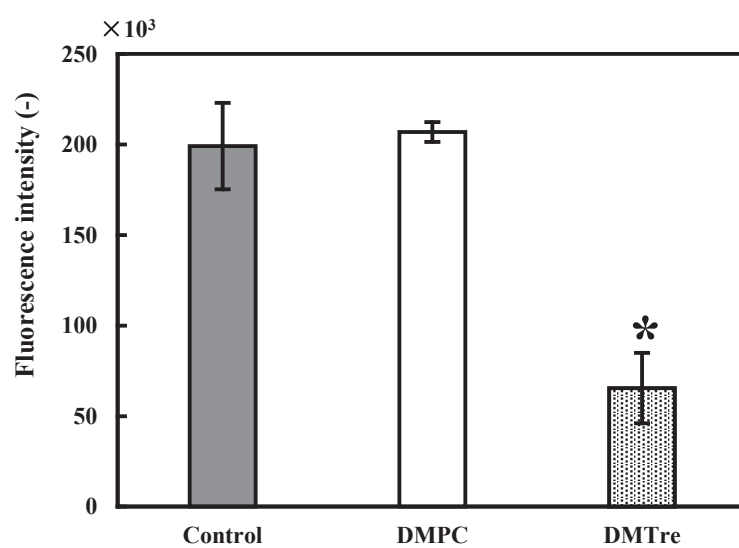


Fig. 5-3-11 Cytochrome *c* release from mitochondria of MCF-7 cells and treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 48 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

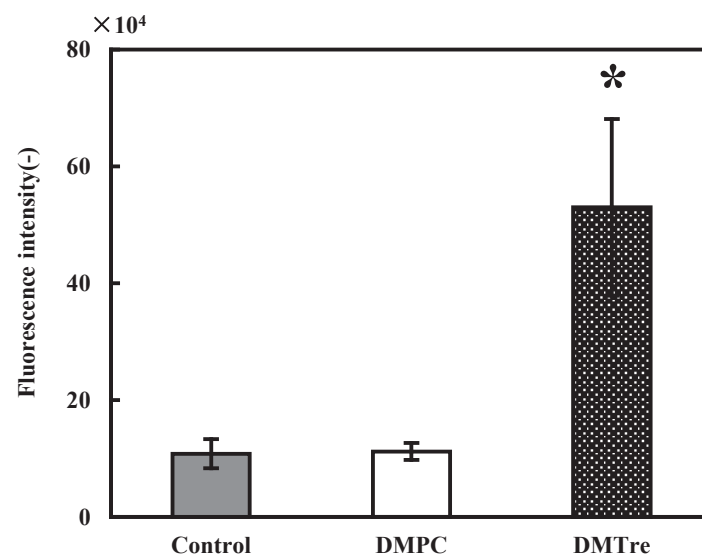


Fig. 5-3-12 Relative expression values of pJNK in MCF-7 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 48 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-4} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M

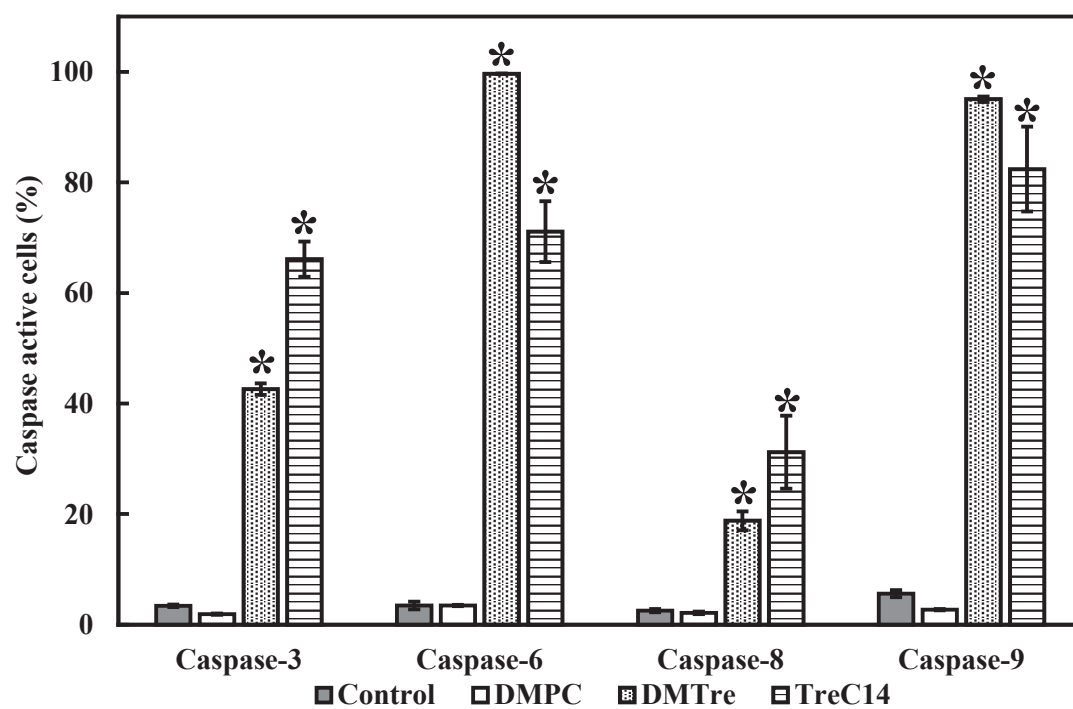


Fig. 5-3-13 Activation of caspase in MDA-MB-453 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 2.0×10^{-4} M, [TreC14] = 4.66×10^{-4} M

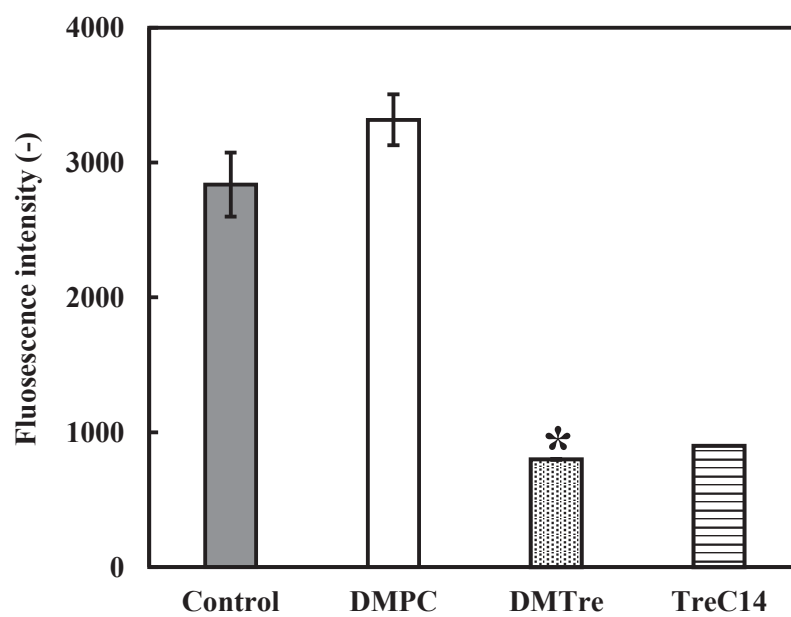


Fig. 5-3-14 Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) disruption of mitochondria membrane for MDA-MB-453 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 2.0×10^{-4} M, [TreC14] = 4.66×10^{-4} M

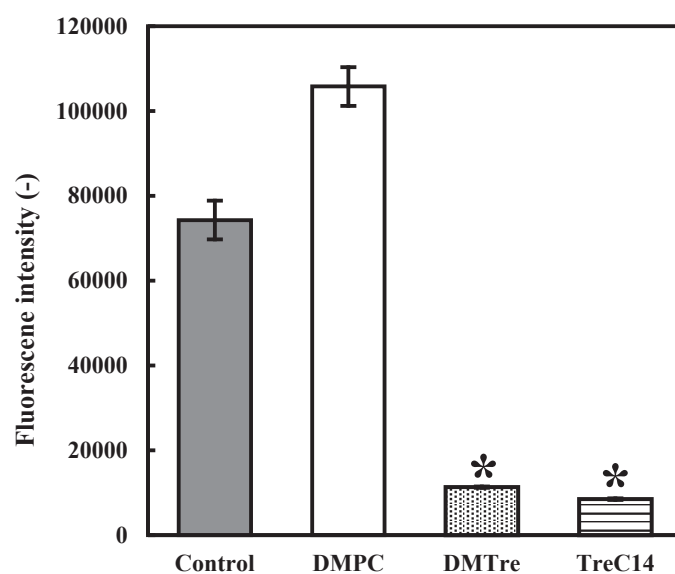


Fig. 5-3-15 Cytochrome *c* release from mitochondria of MDA-MB-453 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 48 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 2.0×10^{-4} M, [TreC14] = 4.66×10^{-4} M

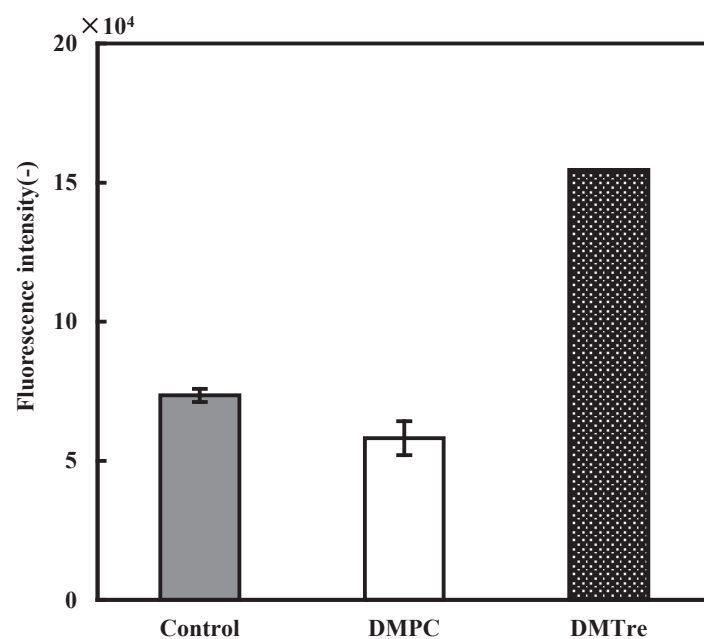


Fig. 5-3-16 Relative expression values of pJNK in MDA-MB-453 cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 1~3)

Incubation time : 48 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 2.0×10^{-4} M, [TreC14] = 4.66×10^{-4} M

5-3-4. トレハロースリポソームの乳がん細胞膜への影響

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト乳がん(MCF-7, MDA-MB-453)細胞の細胞膜に与える影響を蛍光脂質含有トレハロースリポソームの細胞膜への融合・蓄積、細胞膜流動性について検討した。

MCF-7 細胞の細胞膜への影響を検討した結果を Fig.5-3-19, Fig.5-3-20 に示す。DMTre 処理した MCF-7 細胞は、Control 及び DMPC 処理した MCF-7 細胞に比べ、時間経過と共に NBDPC の蛍光が強くなり、MCF-7 細胞膜へ融合・蓄積していることが明らかとなった(Fig.5-3-19)。また、DMTre の MCF-7 細胞膜に与える影響について測定したところ、DMTre 処理した MCF-7 細胞膜は Control と比べ有意に膜流動性の増大が示された(Fig.5-3-20)。

MDA-MB-453 細胞の細胞膜への影響を検討した結果を Fig.5-3-21~ Fig.5-3-22 に示す。DMTre 及び TreC14 で処理した MDA-MB-453 細胞は、Control 及び DMPC を処理した MDA-MB-453 細胞に比べ、時間経過と共に NBDPC の蛍光が強くなり MDA-MB-453 細胞膜へ融合・蓄積していることが明らかとなった(Fig.5-3-21)。また、DMTre の MDA-MB-453 細胞膜に与える影響について測定したところ、DMTre 処理した MDA-MB-453 細胞膜は Control と比べ有意に膜流動性の増大が示された(Fig.5-3-22)。

以上の結果から、DMTre はヒト乳がん細胞の細胞膜に融合・蓄積し、膜流動性を増大させることが明らかとなった。

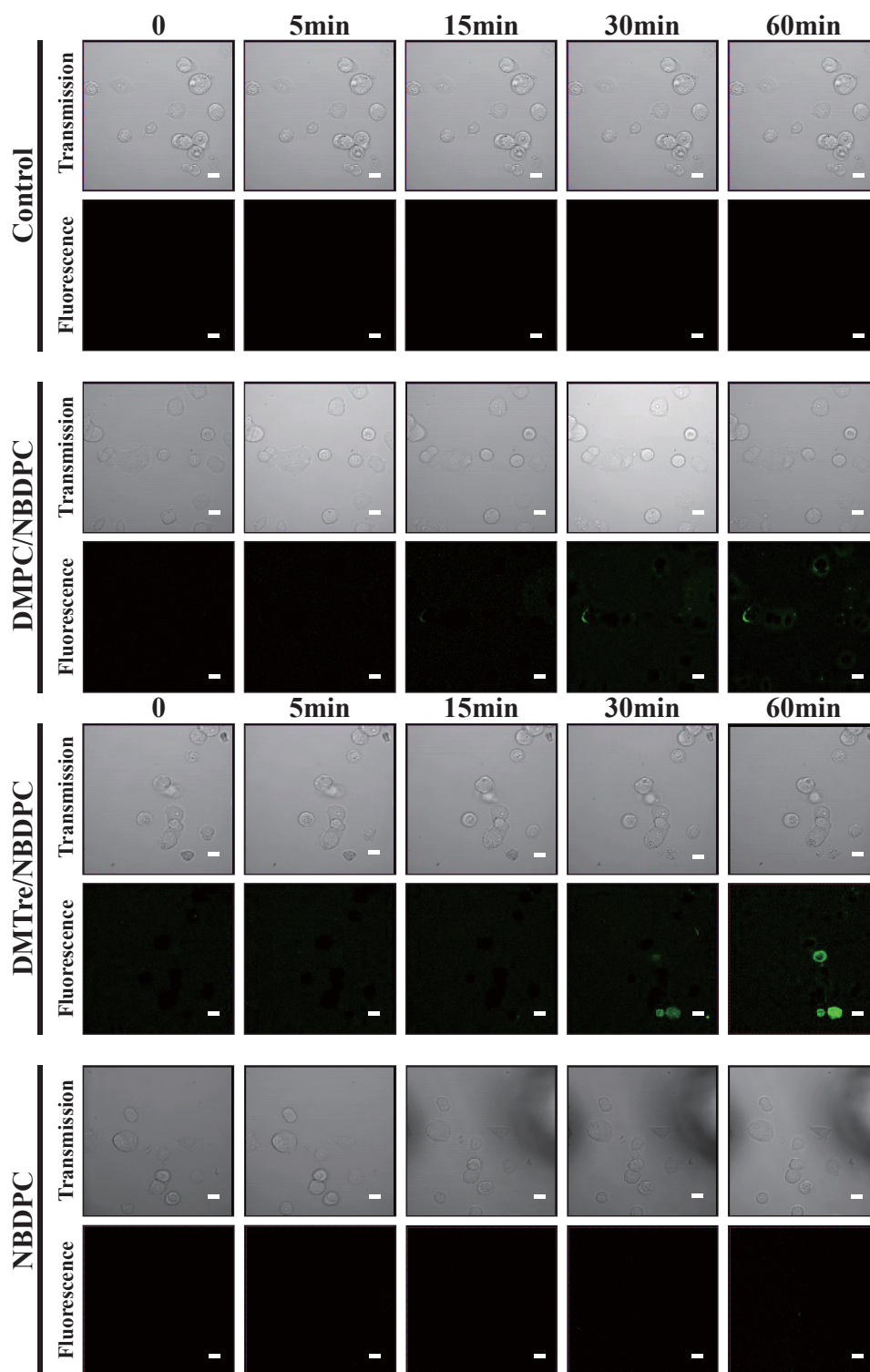


Fig. 5-3-19 Fluorescence micrographs of MCF-7 cells treated with DMPC/NBDPC and DMTre/NBDPC, NBDPC using confocal laser microscope.

Scale bar : 20 μ m Magnification : $\times 40$ Reaction time : 60min
[DMPC] = 8.7×10^{-5} M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M, [NBDPC] = 1.3×10^{-5} M

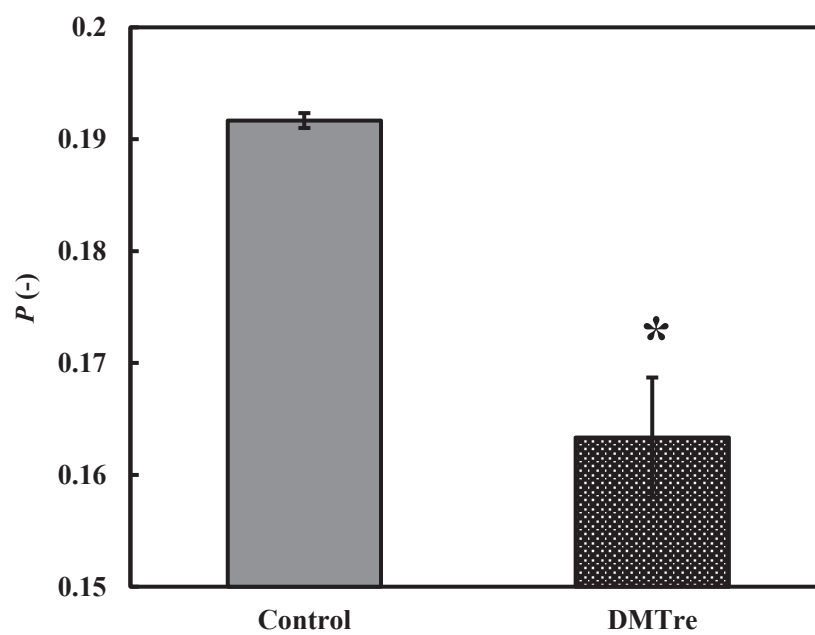


Fig. 5-3-20 Increase in membrane fluidity of MCF-7 cells after the treatment with DMTre.

* $p < 0.05$ (Control) (n = 3)

Incubation time : 10 min.

[DMPC] = 3.0×10^{-5} M, [TreC14] = 6.99×10^{-5} M

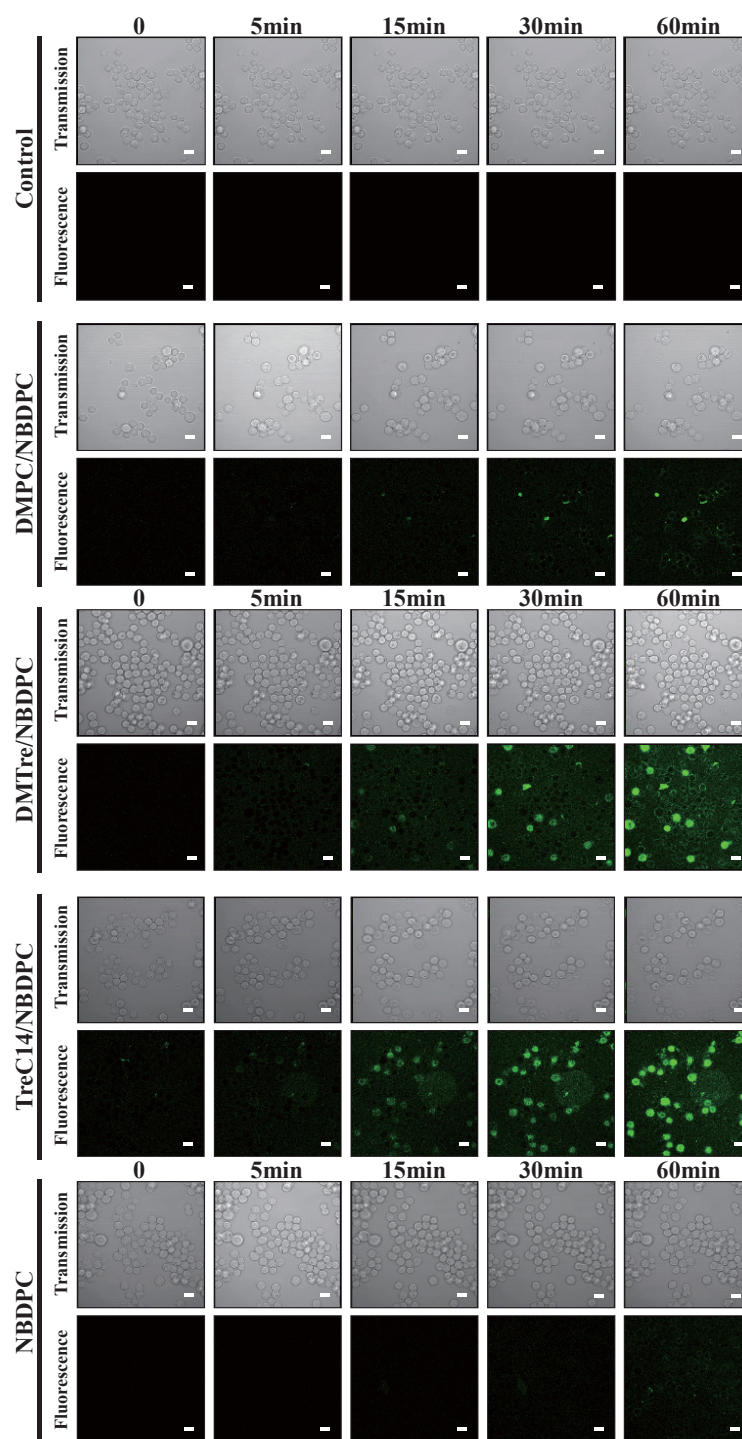


Fig. 5-3-21 Fluorescence micrographs of MDA-MD-453 cells treated with DMPC/ NBDPC and DMTre/NBDPC, TreC14/NBDPC, NBDPC using confocal laser microscope.

Scale bar : 20 μ m Magnification : $\times 40$ Reaction time : 60min
 [DMPC] = $.7 \times 10^{-5}$ M, [TreC14] = 2.33×10^{-4} M, [NBDPC] = 1.3×10^{-5} M

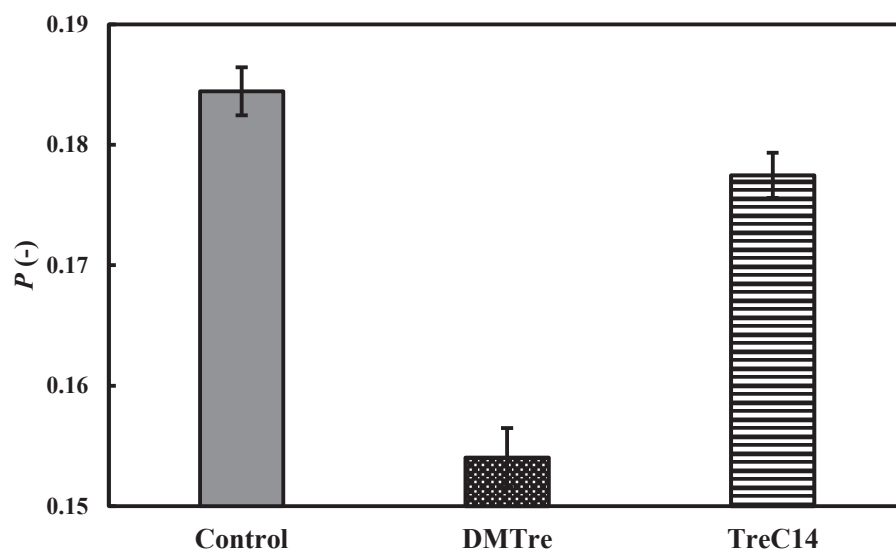


Fig. 5-3-22 Increase in membrane fluidity of MDA-MD-453 cells after the treatment with DMPC.

* $p < 0.05$ (Control) (n = 3)

Incubation time : 10 min.

[DMPC] = 3.0×10^{-5} M, [TreC14] = 6.99×10^{-5} M

5-3-5. トレハロースリポソームの乳がん細胞遊走抑制効果

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト乳がん(MCF-7)細胞に対する遊走抑制効果の検討を細胞の二次元的な動きを観測する Scratch assay を用いて検討した。

DMTre の MCF-7 細胞に対する遊走抑制効果の検討結果を Fig. 5-3- 23 に示す。Control 及び DMPC 処理した MCF-7 細胞では、2 次元的な移動が観察され、剥離面積が狭くなっていた。一方、DMTre 処理した MCF-7 細胞では、Control 及び DMPC 処理した細胞に比べて MCF-7 細胞の移動が抑制され、剥離面積が多く残っていた。顕微鏡写真の細胞移動面積を Image- j にて定量化した結果を Fig. 5-3-24 に示す。Control では 44.0%、DMPC 処理では 44.6%、DMTre で処理した MCF-7 細胞では 29.9%とであることが明らかとなった。

以上の結果から DMTre は、MCF-7 細胞に対して遊走を抑制する事が示された。

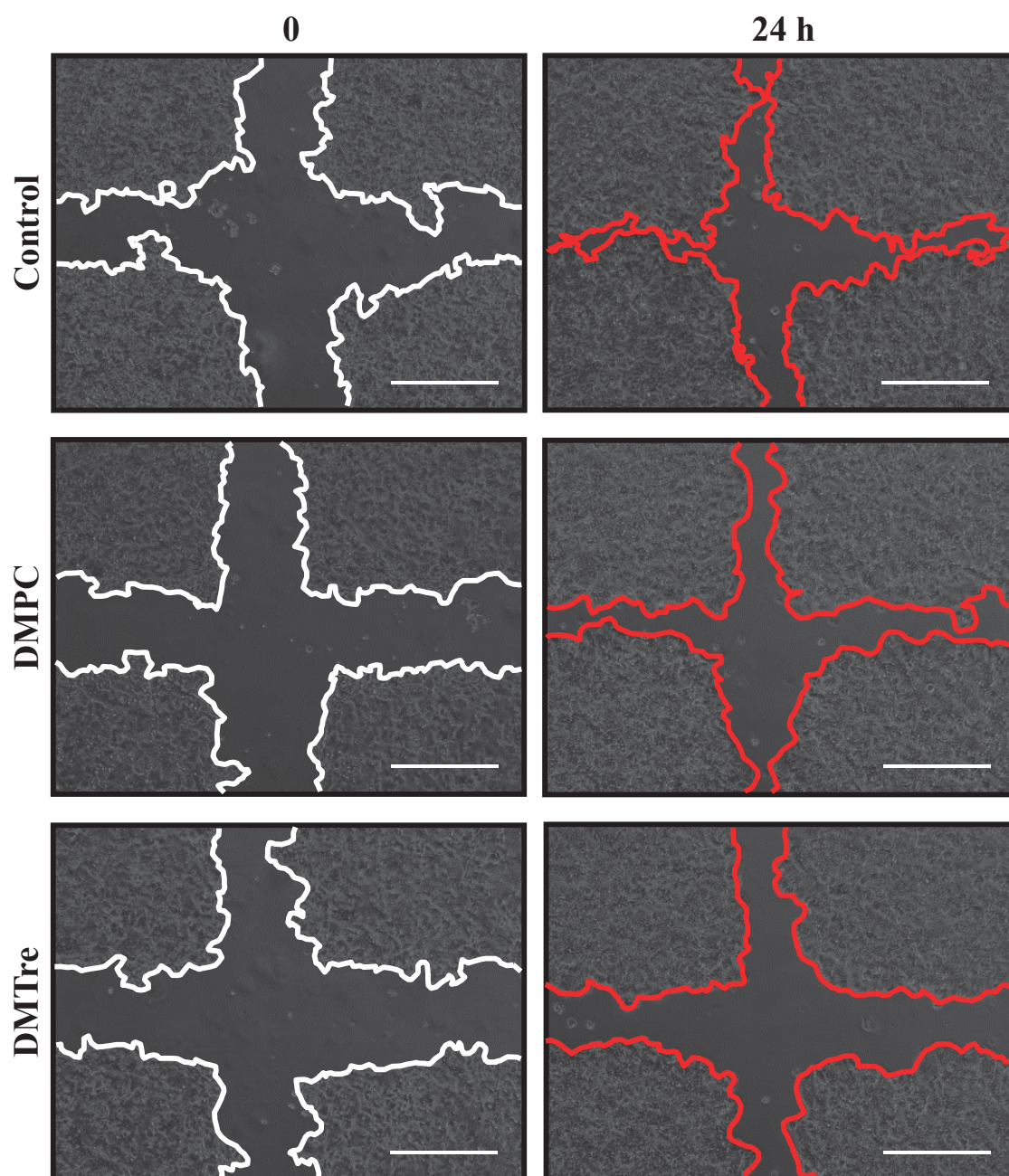


Fig. 5-3-23 Inhibitory effects of DMTre on the migration of MCF-7 cells using wound scratch assay.

Incubation time : 24 h.

[DMPC]= 4.0×10^{-5} M, [TreC14]= 9.32×10^{-5} M

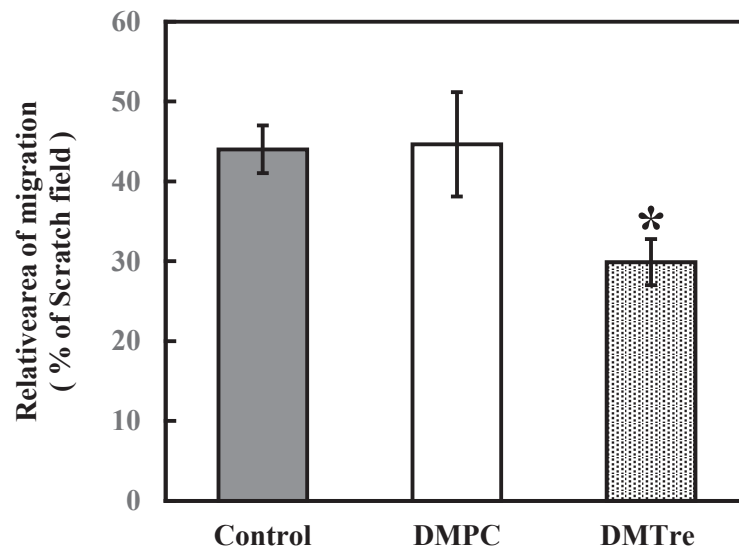


Fig. 5-3-24 Relative scratch area of MCF-7 cells treated with DMTre for 19h.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3)

Incubation time : 24 h.

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 4.0×10^{-5} M, [TreC14] = 9.32×10^{-5} M

5-3-6. トレハロースリポソームの乳がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果

トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト乳がん(MDA-MB-453)細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果について検討した。

Fig. 5-3-25 に投与期間中のマウスの体重変化を示す。いずれの群においても投与期間中の体重の変化は見られず、DMTre の毒性は示されなかった。

投与期間中の腫瘍体積の推移を Fig. 5-3-26 に示す。Control 群では時間経過と共に腫瘍の増大が確認された。一方、DMTre 投与群においては腫瘍体積の増加が抑制された。

投与終了翌日に解剖し、摘出した腫瘍の写真を Fig. 5-3-27、腫瘍重量を Fig. 5-3-28 に示す。Control 群の腫瘍重量が 0.110 g 以上であるのに対し、DMTre 投与群は顕著に腫瘍重量の減少が確認され、DMTre 投与群の腫瘍重量は Control 群の約 1/2 である 0.058 g であり、DMTre の治療効果が示された。

次に、TUNEL 染色した腫瘍切片の画像を Fig. 5-3-29 に示す。Control 群及び DMPC 投与群においてアポトーシス陽性細胞は確認されなかった。一方、DMTre 投与群の腫瘍では褐色のアポトーシス陽性細胞の集団が確認されたことから、DMTre の *in vivo* でのアポトーシス誘導が明らかとなった。

これらの結果から、DMTre のヒト乳がん(MDA-MB-453)細胞皮下移植モデルマウスに対する顕著な治療効果が明らかとなった。

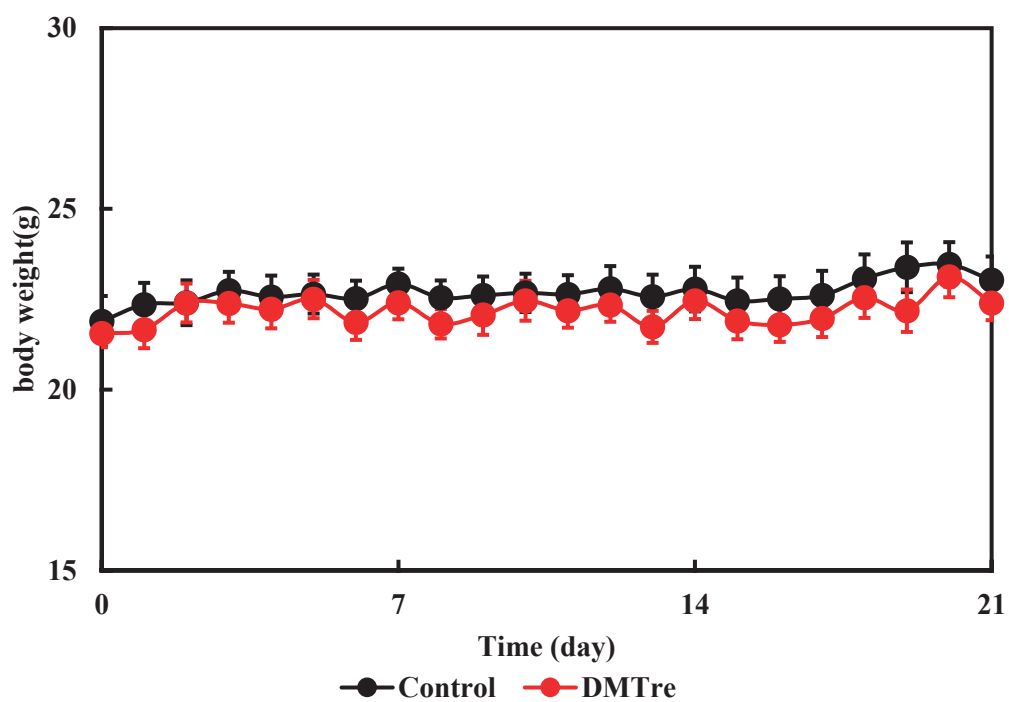


Fig. 5-3-25 Body weight change for xenograft model mice of human breast cancer treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4)

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC14] = 2.33×10^{-3} M

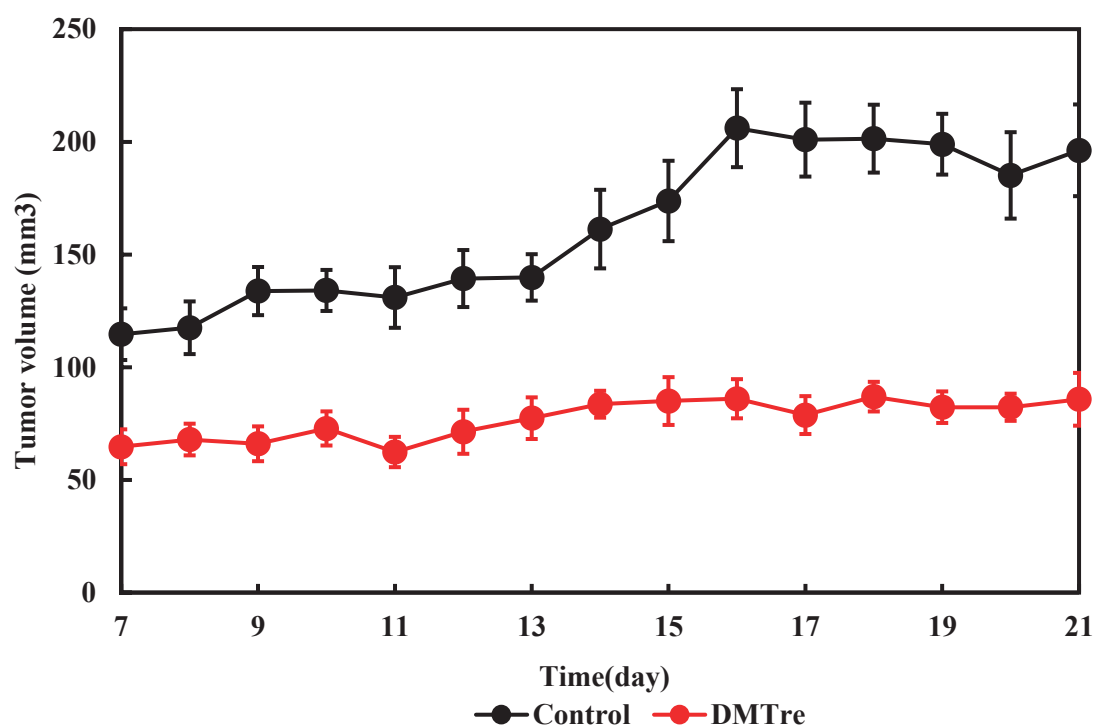


Fig. 5-3-26 Subcutaneous tumor volume xenograft model mice of human breast cancer treated with DMTre

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4)

* $p < 0.05$ (Control)

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC14] = 2.33×10^{-3} M

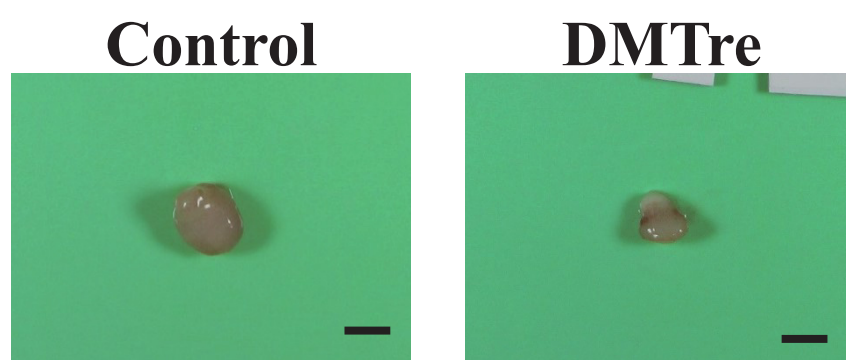


Fig. 5-3-27 Photographs of tumor in xenograft mous models of human breast cancer treated with DMTre after the inoculation MDA-MB-453 cells.

Scale bar : 0.5 mm

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC14] = 2.33×10^{-3} M

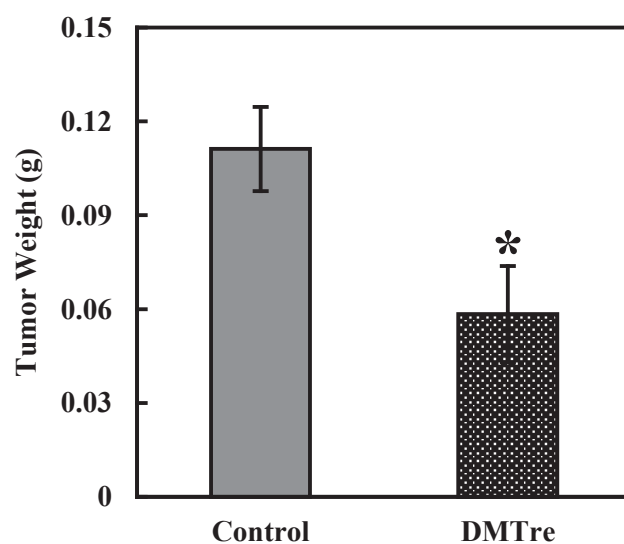


Fig. 5-3-28 Therapeutic effects of DMTre for xenograft mouse models of human breast cancer after the inoculation of MDA-MB-453 cells.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 3 ~ 6)

* $p < 0.05$ (Control, DMPC)

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC14] = 2.33×10^{-3} M

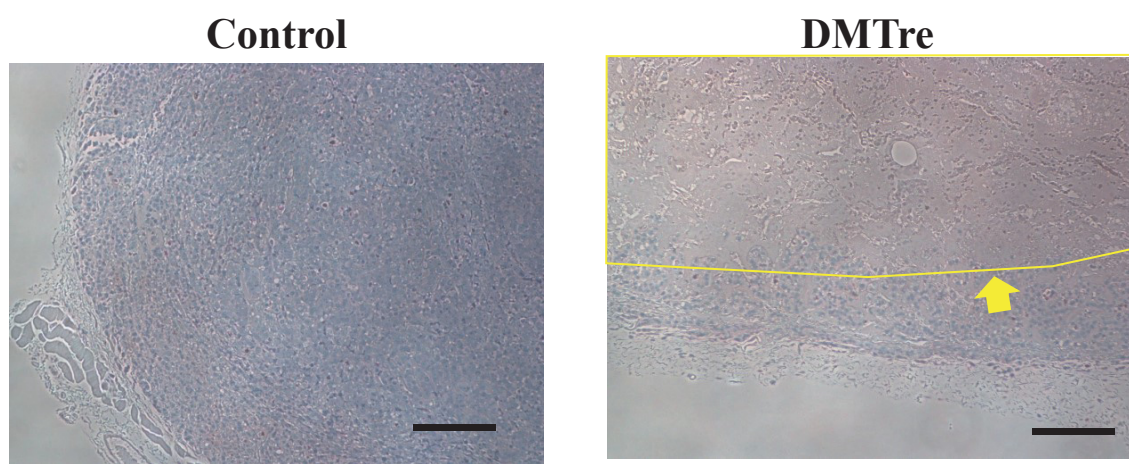


Fig. 5-3-29 Induction of apoptosis for MDA-MB-453 cells for s xenograft mous models of human breast cancer topically administered with DMTre.

Scale bar : 200 μm , yellow : apoptotic cells
 $[\text{DMPC}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{TreC14}] = 2.33 \times 10^{-3} \text{ M}$

5-4. 総括

本章では、糖系界面活性剤含有トレハロースリポソーム (DMTre) のヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞に対する *in vitro* での制がんメカニズムの解明および転移抑制効果について検討した。また、*in vivo* では乳がん細胞皮下移植モデルマウスに対する制がん効果について検討したところ、以下の興味深い知見が得られた。

1. DMTre は、MCF-7 細胞の生存率を濃度依存的に減少させた。また、 IC_{50} 値を比べたところ DMPC が $437\ \mu\text{M}$ であるのに対し、DMTre は $1/10$ 以下である $40.9\ \mu\text{M}$ であることが明らかとなった。また、MDA-MB-453 細胞に対すし DMTre は、MDA-MB-453 細胞の生存率を濃度依存的に減少させた。また、 IC_{50} 値を比べたところ DMPC が $1000\ \mu\text{M}$ 以上であるのに対し、DMTre は $45\ \mu\text{M}$ であることが明らかとなった。
2. MCF-7 細胞に対し、DMTre は濃度依存的に DNA が断片化する事が明らかとなった。また、 $100\ \mu\text{M}$ では約 80% という高い DNA 断片化率が観測された。更に共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察から、Control 及び、DMPC では TUNEL 陽性である緑色蛍光が観察されなかったのに対し、DMTre では緑色蛍光が観察され、アポトーシス誘導が確認された。また、MDA-MB-453 細胞に対し、DMTre を処理した MDA-MB-453 細胞の DNA は濃度依存的に断片化率の増加が示された。また、TUNEL 染色から、DMTre 処理した MDA-MB-453 細胞では緑色蛍光が確認された。
3. アポトーシス誘導経路の検討結果から DMTre 処理した MCF-7 細胞は、Control 及び DMPC 処理した MCF-7 細胞に比べ、カスパーズ-6, -9 が活性化していることが示された。特に、カスパーズ-6, -9 が約 40 ~ 80 % と非常に高いことが明らかとなった。また、DMTre の MCF-7 細胞ミトコンドリア膜電位に与える影響について測定したところ、DMTre 処理した MCF-7 細胞ミトコンドリア膜電位は Control と比べ有意に膜電位の減少が示された。更に、ミトコンドリア内の Cytochrome c 量を測定したところ、Control 及び DMPC 処理した MCF-7 細胞と比べ、DMTre を処理した MCF-7 細胞においてミトコンドリア内 Cytochrome c 量の減少が明らかとなった。この結果から、DMTre の MCF-7 細胞におけるアポトーシス誘導では、デスレセプターを経由するカスパーズ-8 の活性が弱いことから、ミトコンドリアからカスパーズを経由する経路が主経路だと考えられる。このことから、ミトコンドリア上流にあるストレス応答シグナルである pJNK 量の変化を測定した結果、DMTre は

MCF-7 細胞の pJNK 量 Control 及び DMPC 処理した MCF-7 細胞と比べ有意に増加させた。MDA-MB-453 細胞のアポトーシス誘導経路では DMTre 処理した MDA-MB-453 細胞は、Control 及び DMPC 処理した MDA-MB-453 細胞に比べ、カスパーズ-3,-6, -8, -9 が活性化していることが示された。特に、カスパーズ-3,-6, -9 が約 40 ~ 80 % と非常に高いことが明らかとなった。また、DMTre の MDA-MB-453 細胞ミトコンドリア膜電位に与える影響について測定したところ、DMTre 処理した MDA-MB-453 細胞のミトコンドリア膜電位は Control と比べ有意に膜電位の減少が示された。更に、ミトコンドリア内の Cytochrome c 量を測定したところ、Control 及び DMPC 処理した MDA-MB-453 細胞と比べ、DMTre 処理した MDA-MB-453 細胞においてミトコンドリア内 Cytochrome c 量の減少が明らかとなった。このことから、ミトコンドリア上流にあるストレス応答シグナルである pJNK 量の変化を測定した。DMTre は MDA-MB-453 細胞の pJNK 量を、Control 及び DMPC 処理した MDA-MB-453 細胞と比べ有意に増加させた。

4. ヒト乳がん細胞の細胞膜への影響を検討した結果 DMTre 処理した MCF-7 細胞は、Control 及び DMPC 処理した MCF-7 細胞に比べ、時間経過と共に NBDPC の蛍光が強くなり、MCF-7 細胞膜へ融合・蓄積していることが明らかとなった。また、DMTre の MCF-7 細胞膜に与える影響について測定したところ、DMTre 処理した MCF-7 細胞膜は Control と比べ有意に膜流動性の増大が示された。MDA-MB-453 細胞の細胞膜への影響を検討した結果、DMTre 処理した MDA-MB-453 細胞は、Control 及び DMPC を処理した MDA-MB-453 細胞に比べ、時間経過と共に NBDPC の蛍光が強くなり MDA-MB-453 細胞膜へ融合・蓄積していることが明らかとなった。また、DMTre の MDA-MB-453 細胞膜に与える影響について測定したところ、DMTre 処理した MDA-MB-453 細胞膜は Control と比べ有意に膜流動性が増大していることが示された。
5. DMTre 処理した MCF-7 細胞では、Control 及び DMPC 処理した細胞に比べて MCF-7 細胞の移動が抑制され、剥離面積が多く残っていたことから DMTre の遊走抑制効果が示された。
6. DMTre はヒト乳がん (MDA-MB-453) 細胞皮下移植モデルマウスの腫瘍を減少させ、*in vivo* でのアポトーシスによる治療効果が明らかとなった。

以上の知見から、DMTre は、ヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞に対するアポトーシス誘導のシグナル伝達経路を一部解明することができた。トレハロースリポソ

ームは乳がん細胞膜へ融合・蓄積した後、カスパー-8 の活性が弱いことから Fas を経由する経路を主経路として用いていないことが示唆された。また、ストレスシグナルである pJNK の増加から、TNFR1 や小胞体ストレスシグナルの活性化が疑われる。pJNK は、BCL-2 を阻害することで MOMP を引き起こし、実験結果にあるような、ミトコンドリア膜電位の低下やシトクロム *c* の放出を引き起こす。シトクロム *c* はカスパー-9 を活性化しカスパー-3 を活性化させる。しかし、MCF-7 にはカスパー-3 が欠損している¹⁴⁴⁾ため、カスパー-9 からカスパー-6 を経由しアポトーシスを誘導していることが明らかとなった。このアポトーシス誘導経路からもトレハロースリポソームがアポトーシスを誘導することは明白であり副作用のない乳がん治療薬として期待できる

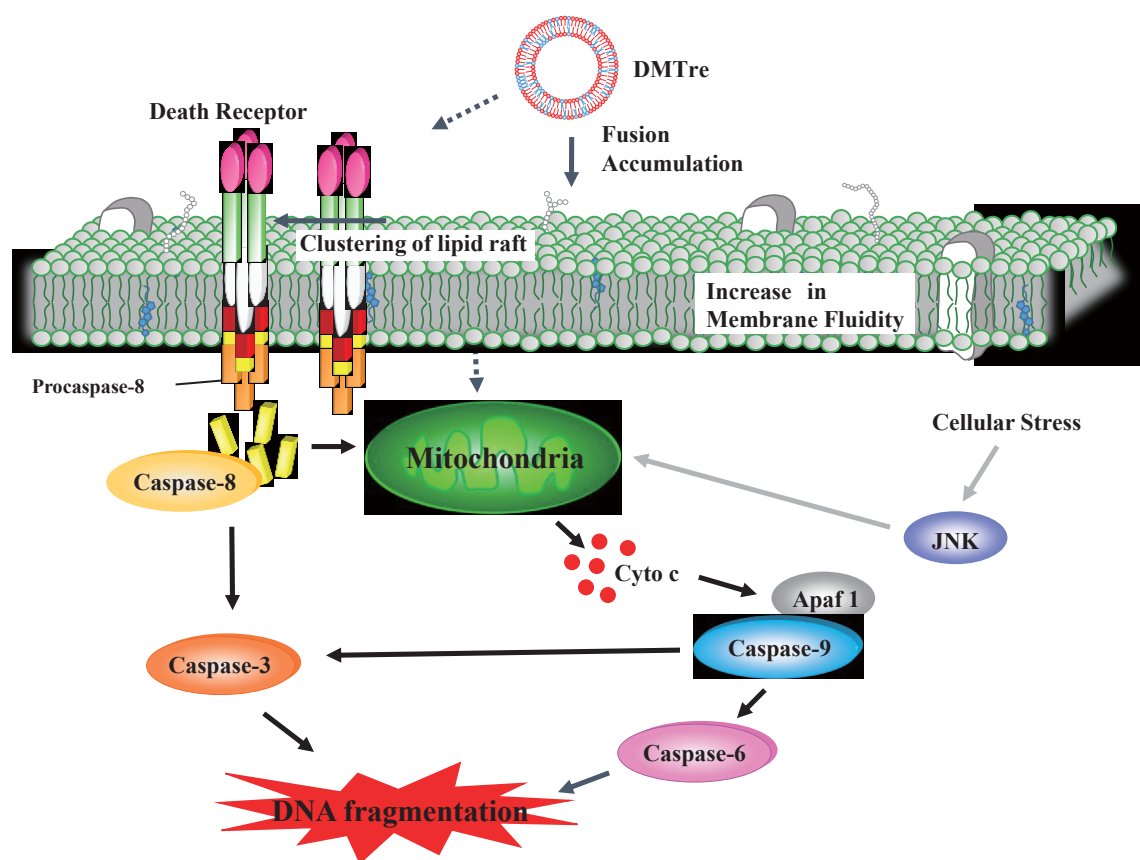


Fig. 5-3-29 Schematic representation of a mechanism for apoptosis of cancer cells induced by DMTr.

第6章 トレハロースリポソームの安全性

6-1. 序

我が国の最初の毒性試験法のガイドラインは、1963年の胎児に及ぼす影響の評価に関するガイドラインである。これは、1961年のサリドマイド事件がきっかけとして制定された。サリドマイド事件は睡眠薬や胃腸薬として販売されていたサリドマイドを妊婦が服用した場合に、サリドマイド胎芽症の新生児が生まれ社会問題となった。日本におけるこの事件の原因には海外で使用されている有名医薬品については簡易な審査にて判断する包括建議と日本での臨床試験の不実施が挙げられる。この事件により、アメリカでは1962年に連邦食品・医薬品・化粧品法が改正され医薬品の承認にランダム化比較試験が必要となり、日本でも同様の法律改正が行われた。また、サリドマイドの安全性試験について捏造や虚偽があったため¹⁴⁵⁾、アメリカで1978年に Good Laboratory Practice (GLP) という、臨床試験における安全性の信頼性を確保するための基準が制定された。GLP 基準は、動物実験を適正に行い、信頼のあるデータを作成させる基準であり、試験の質 (Quality) と安全性 (Integrity) の適正な評価を行うことを目的としている。

医薬品はさまざまな化学物質や天然物の中からランダムにスクリーニングを行い、研究、改良を加えられてきたものである。しかし、薬剤は主作用の他に、生体に有害な反応が生じる副作用を起こすことも多い。そのため、非臨床試験は人体に薬剤を使用する前に実験動物にて安全性を確認する。医薬品の副作用は一般に予測困難で、重大な結果を招くこともある。これらのさまざまな毒性を考慮し、薬剤の安全性に資するために毒性試験が行われる。これらは、低-高容量を短-長期間投与し、検査を行う最も基本的な一般毒性試験と、あらかじめ特定の注目すべき副作用に焦点を絞って行う特殊毒性試験に分けられる。一般毒性試験は単回投与毒性試験と反復投与毒性試験を総括したものであり、すべての医薬品について行わなければならない。特殊毒性試験は生殖・発生毒性試験、変異原性試験、がん原性試験、皮膚感作性試験、皮膚光感作性試験、抗原性試験、依存性試験などが含まれる (Table 6-1-1)¹⁴⁶⁾。

Table 6-1-1 毒性試験法

毒性試験		試験内容
一般毒性試験	単回投与毒性試験 (急性毒性試験)	哺乳動物に大量の薬剤を経口や静脈、皮膚などから単回投与し、生じる毒性について検討する。
	反復投与毒性試験 (亜急性試験、慢性毒性試験)	臨床試験の投与期間を考慮した期間(28日、90日、6ヶ月、1年間)に渡り動物へ反復投与し、その毒性の種類および程度を明らかとするとともに、中毒症状を示す薬物量および、無毒性量を推定する。
特殊毒性試験	生殖発生毒性試験	雌雄の生殖機能への毒性をみる。
	遺伝毒性(変異原性)試験	薬物の遺伝子の構造や機能への毒性をみる。
	癌原性試験	薬物が発がん性物質かどうか確認する。
	抗原性試験	薬物抗原として働き異常な免疫反応を提示するかを確認する
	局所刺激性試験	皮膚や粘膜に対する刺激性を検討する。
	溶血毒性試験	薬物が溶血作用を示さないか、 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で確認する。

本章では、トレハロースリポソームの安全性を検討するためマウス血液を用いた *in vitro* での溶血試験及び *in vivo* での2週間反復投与毒性試験および体内動態試験を行った。

6-2. 実験

6-2-1. 試料

DMPC 及び TreC14 は 2-2-1 と同様のものを使用した。また、NBDPC は 3-2-1 と同様のものを使用した。

6-2-2. トレハロースリポソームの調製

トレハロースリポソームは、2-2-2 と同様の方法にて調製した。

6-2-3. 蛍光脂質含有トレハロースリポソームの調製

蛍光脂質含有トレハロースリポソームは 3-2-3 と同様の方法にて調製した。

6-2-4. 使用動物

動物は 3-2-5 と同様の BALB/c-R/J マウス及び正常マウス(BALB/cAJcl, 日本クレア)を使用した。

マウスは、恒温恒湿環境下(室温 24 ± 2 °C、湿度 55 ± 10 %、照明時間 12 時間)のクリーンルーム内にて飼育した。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。

6-2-5. マウス血液を用いた溶血試験

トレハロースリポソームの安全性を検討するためにマウス血液を用いた溶血試験を行った。マウス(BALB/c-R/J)を麻酔下にて腹部下大静脈から採血し、エチレンジアミン四酢酸(EDTA-2K)にて処理後、生理食塩水にて10%に希釈した。エッペンに10%血液と試料を同量加え 37°Cにて一定時間インキュベートした。3000 rpm にて 15 分間遠心した後、分光光度計を用いて波長 560 nm の吸光度測定を行った。

positive control に溶血剤である 0.4% TritonX-100 / HBSS を処理した血液を溶血率 100 %とし各サンプルの溶血率(%)を求めた。

6-2-6. 正常マウスに対するトレハロースリポソームの急性毒性試験

トレハロースリポソームの *in vivo* における安全性は、正常マウスに対する 2 週間反復投与毒性試験にて検討した。

正常マウス(BALB/cAJcl, 雌, 5 週齢)を体重をもとに層別連続無作為化法により群分けを行った。試料の投与経路は尾静脈投与から、1 日 1 回の計 14 日間反復投与(10 ml/kg)を行った。投与期間中は体重測定及び一般状態観察を行った。

投与終了翌日に麻酔下にて解剖し、下大静脈から採血及び各種臓器の摘出を行った。摘出した臓器は臓器重量を測定後、写真撮影し観察を行った。採血した血液の一部は EDTA-2K にて処理した後自動血球測定器(日本光電)により赤血球(RBC)数、白血球(WBC)数、ヘモグロビン(HGB)、ヘマトクリット(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板(PLT)、赤血球容積粒度分布幅(RDW)、血小板クリット(PCT)、平均血小板容積(MPV)、血小板粒度分布(PDW)を測定した。また、EDTA-2K 未処理の血液は遠心(3000 rpm, 30 min)して得られた血清を生化学自動分析装置(富士ドライケム 3500v, 3500s, 富士フイルムメディカル株式会社)により、アルカリフォスファターゼ(ALP)、アルブミン(ALB)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、総コレステロール(TCHO)、総ビリルビン(TBIL)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、ブドウ糖(GLU)、無機リン(IP)を測定した。酵素類及び一般化学成分は比色法とイオン選択電極法により測定を行った。比色法は、試薬を組み込んだ多層分析フィルムに検体を点着すると、検査対象成分がフィルム内で反転して検査対象成分量と比例して発色し、その発色濃度を測定することにより定量することが可能である。

6-2-7. トレハロースリポソームの体内動態試験

蛍光脂質含有トレハロースリポソームの正常マウスにおける体内動態試験を行った。

BALB/cAJcl マウス(週齢、雌)の尾静脈から試料(10ml/kg)を投与した。一定時間経過後に麻酔下にて下大静脈から採血し採血及び各臓器の摘出を行った。採血した血液は遠心(3000 rpm, 30 min)し血清を分離した。血清は分光蛍光光度計(F-7100, HITACHI)により測定を行った。また、摘出した臓器は O.C.T.コンパウンド包埋し、ドライアイス上にて凍結固定し、-20℃下にて組織切片を作成した。作製した切片は、光学顕微鏡(BZ-X700, KEYENCE)にて観察した。

6-3. 結果と考察

6-3-1. トレハロースリポソームの溶血試験

トレハロースリポソームの血液毒性を検討するためマウス血液に対する溶血試験を行った。結果を Fig. 6-3-1 に示す。DMPC はいずれの濃度においても溶血率の上昇は見られなかった。また DMTre および TreC14 においては 4.0×10^{-5} M にて若干の溶血率の上昇が見られたが、溶血率 20% 以下であることから血液毒性は低いことが示された。

以上の結果から *in vitro* の溶血試験において DMTre、DMPC および TreC14 の安全性が示唆された。

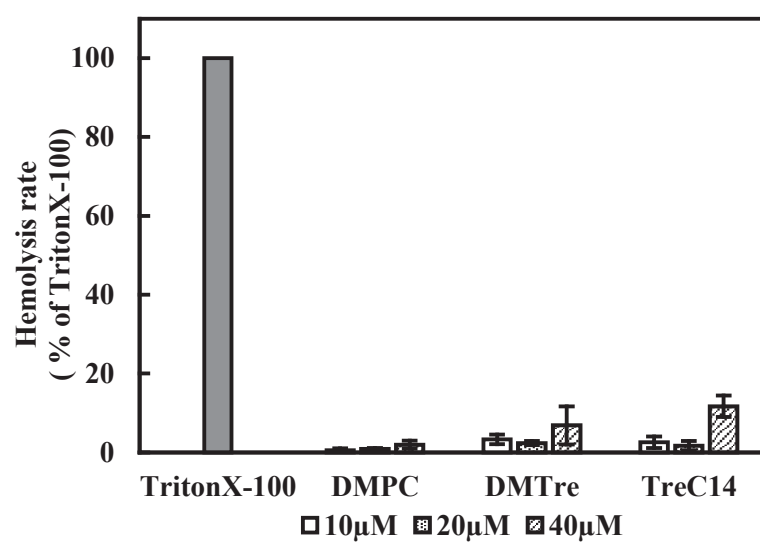


Fig. 6-3-1 Hemolysis rate of red blood cells treated with DMTre.

Data represent the mean \pm S.E. (n =3)

[DMPC] = $1.0 \sim 4.0 \times 10^{-5}$ M, [TreC14] = $2.33 \sim 9.32 \times 10^{-5}$ M

6-3-2. 正常マウスに対するトレハロースリポソームの安全性

臨床応用を目的とし、トレハロースリポソームの *in vivo* での安全性を正常マウスを用いて検討した。

投与期間中、一般状態の観察を行った。TreC14 投与群において投与 3 日目から尻尾の脱落が確認された (Fig. 6-3-2) ことから、TreC14 において重篤な副作用が示された。その為、TreC14 群においては、腹腔投与にて実験を継続した。一方、Control 群、DMPC 及び DMTre 投与群では尻尾は正常であり、死亡例も無いため、50%致死量 (LD₅₀ : 50% Lethal Dose) 以下であることが推測された。投与期間中の体重の変化を Fig. 6-3-3 に示す。Control 群、DMPC 及び DMTre 投与群では、投与終了まで体重の大きな増減はなかった。一方、TreC14 投与群においては、体重の減少がみられた。摘出した臓器の写真を Fig. 6-3-4 ~ Fig. 6-3-8 に示す。写真から明らかのように全ての投与群において異常は見られなかった。次に摘出した臓器の相対臓器重量を Fig. 6-3-9 に示す。DMPC 及び DMTre 投与群では肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓において相対臓器重量は、Control 群と変わらなかった。一方、TreC14 投与群においては心臓、肝臓、腎臓では相対臓器重量は、Control 群と変わらなかったのに対し、脾臓において相対臓器重量の増加が確認された。

Fig. 6-3-10 ~ Fig. 6-3-12 に血液学検査の結果を示す。DMTre 投与群では、赤血球 (RBC) 数、白血球 (WBC) 数、ヘモグロビン (HGB)、ヘマトクリット (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、赤血球容積粒度分布幅 (RDW)、血小板クリット (PCT)、平均血小板容積 (MPV)、血小板粒度分布 (PDW) の項目において Control 群と同様であった。しかし、血小板 (PLT) の減少が確認された。DMPC 投与群では、PLT の減少及び、MPV の増大が見られたがそれ以外の項目では大きな異常は見られなかった。また、TreC14 投与群において PLT の減少及び WBC、HCT、PCT の値の増加が確認された。

次に生化学検査の結果を Fig. 6-3-13, Fig. 6-3-14 に示す。DMTre および DMPC 投与群ではアルカリフォスファターゼ (ALP)、アルブミン (ALB)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、総コレステロール (TCHO)、総ビリルビン (TBIL)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、ブドウ糖 (GLU)、無機リン (IP) の値は Control 群と同様であり大きな異常は見られなかった。一方、TreC14 投与群では GOT、GPT の上昇が見られ肝臓機能への障害が示された。

これらの結果から、DMTre 及び、DMPC 投与群においては重篤な副作用が確認されなかったことから *in vivo* での安全性が確認された。しかし、TreC14 投与群では観察中に尻尾が切れたことや、脾臓重量の増加、血液検査の結果から重篤な副作用があることが示された。

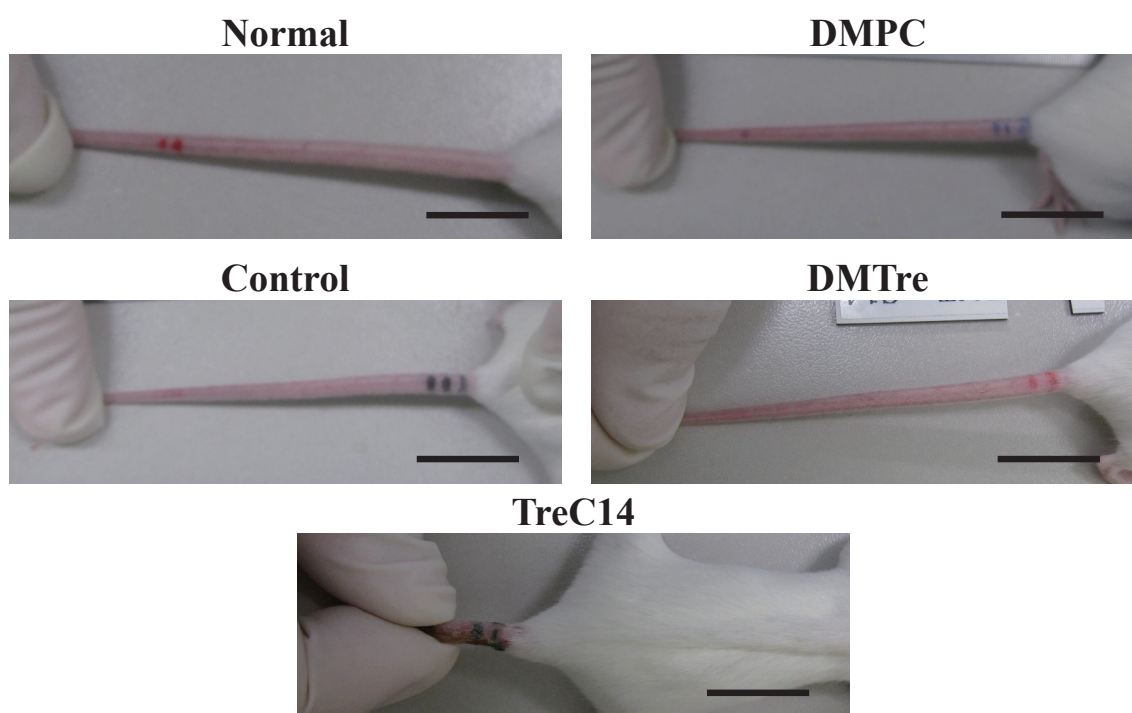


Fig. 6-3-2 Photographs of tail of normal mouse administered with DMTre
 $[DMPC] = 4.0 \times 10^{-3} M$, $[TreC14] = 5.32 \times 10^{-3} M$
 Scale bar: 2cm

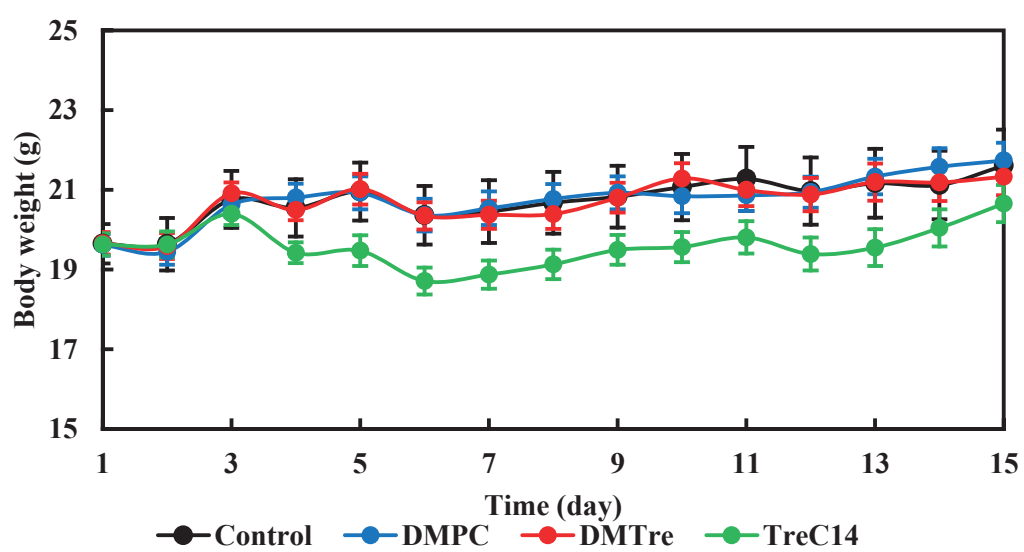


Fig. 6-3-3 Body changes for normal mice intravenously administered with DMTre with two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4 ~ 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

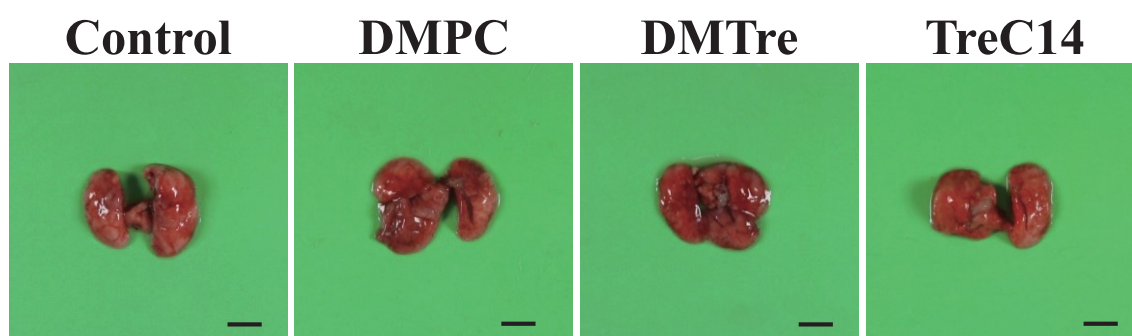


Fig. 6-3-4 Photographs of lung of normal mice intravenously administered with DMTre with two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4 ~ 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

Scale bar : 5 mm

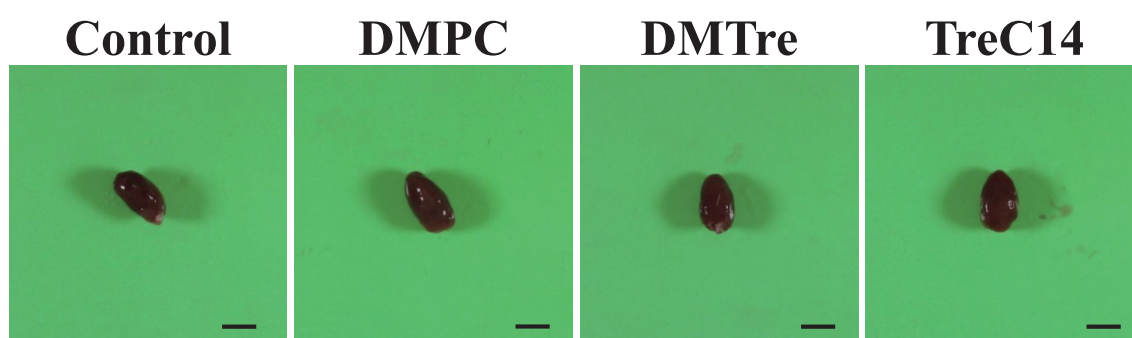


Fig. 6-3-5 Photographs of heart of normal mice intravenously administered with DMTre with two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4 ~ 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

Scale bar : 5 mm

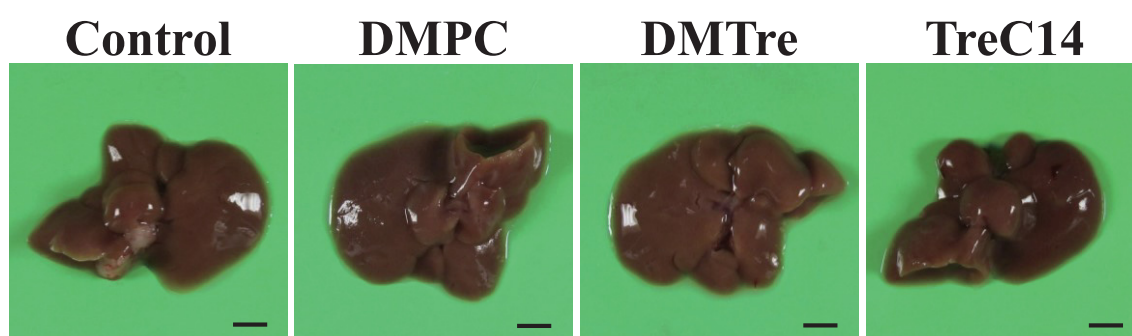


Fig. 6-3-6 Photographs of liver of normal mice intravenously administered with DMTre with two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4 ~ 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

Scale bar : 5 mm

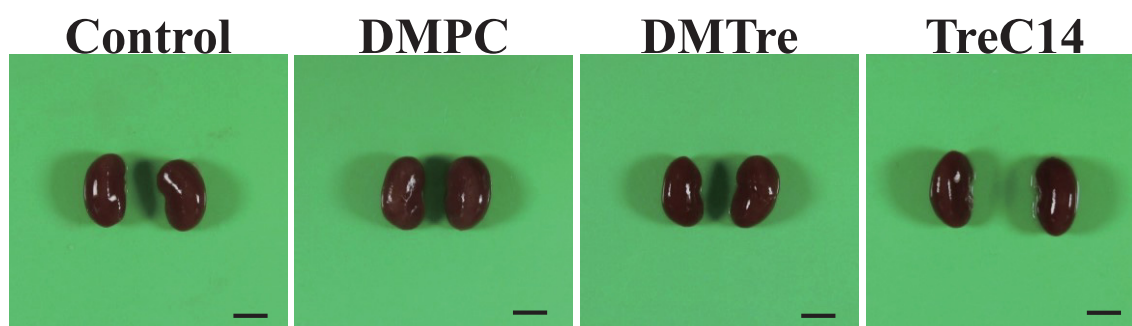


Fig. 6-3-7 Photographs of kidney of normal mice intravenously administered with DMTre with two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4 ~ 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

Scale bar : 5 mm

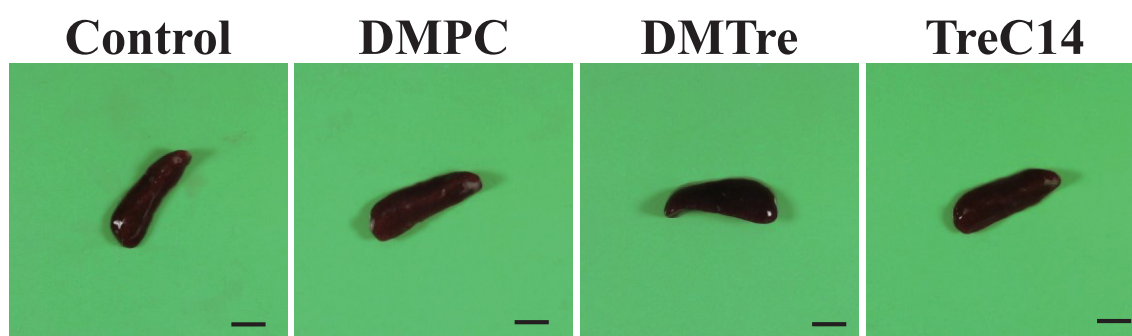


Fig. 6-3-8 Photographs of spleen of normal mice intravenously administered with DMTre with two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 4 ~ 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

Scale bar : 5 mm

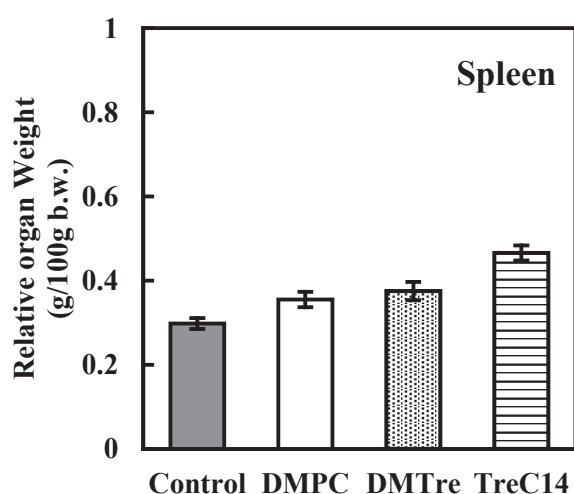
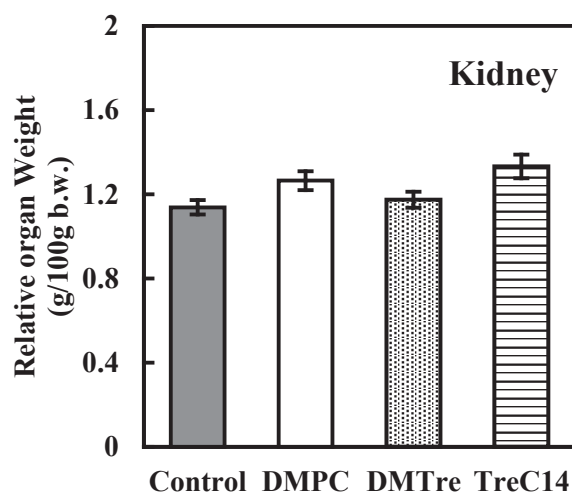
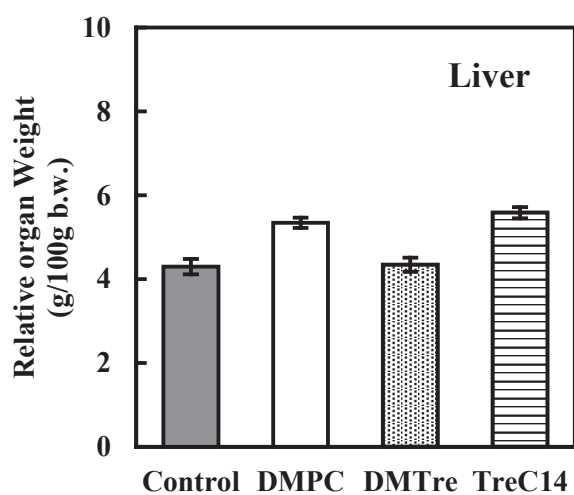
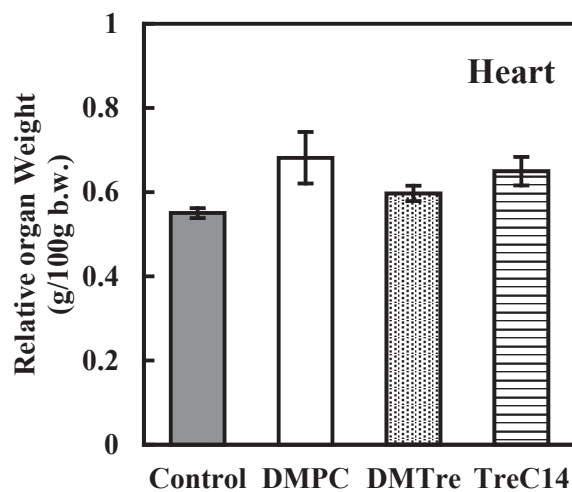
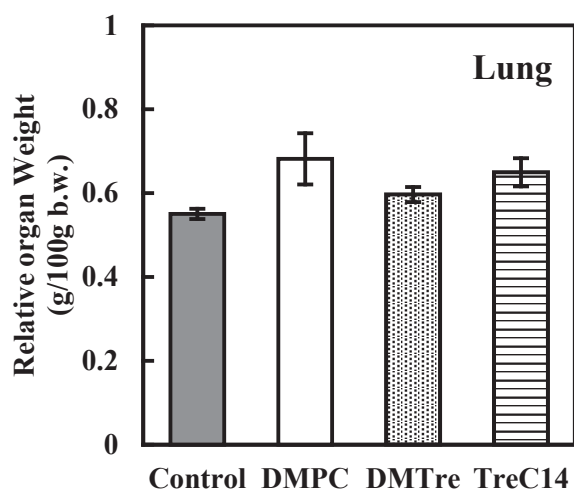


Fig. 6-3-9

Relative organ weight for normal mice intravenously administered with DMTre for two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M

[TreC14] = 5.32×10^{-3} M

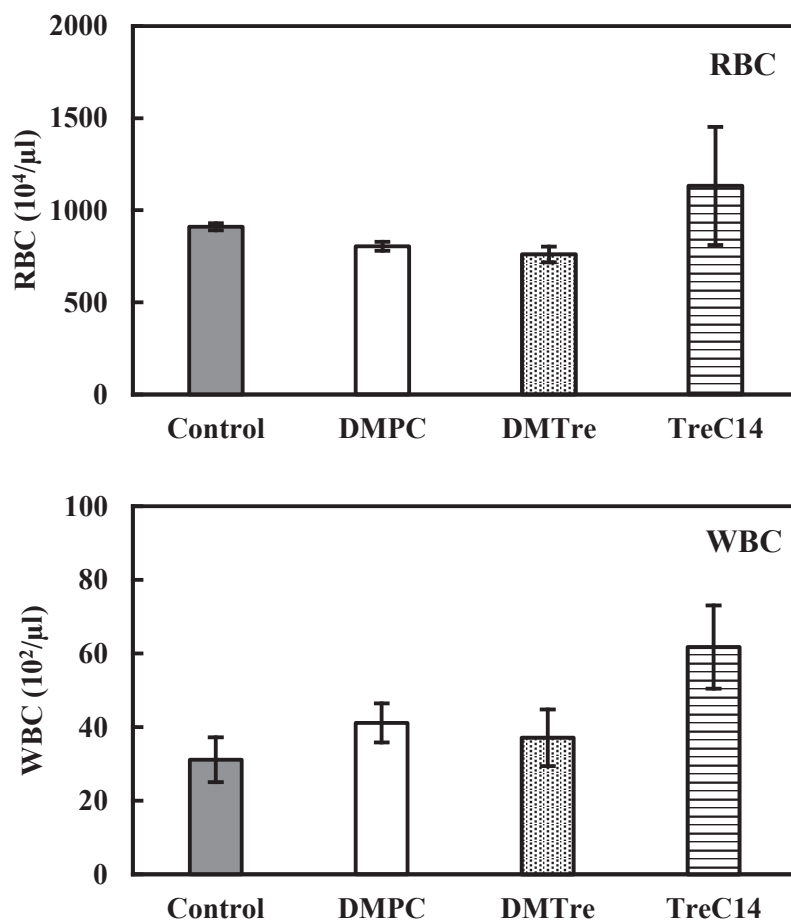


Fig. 6-3-10 Hematological findings for normal mice intravenously administered with DMTPe for two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. ($n = 4 \sim 8$)

[DMPC] = $4.0 \times 10^{-3}\text{M}$, [TreC14] = $5.32 \times 10^{-3}\text{M}$

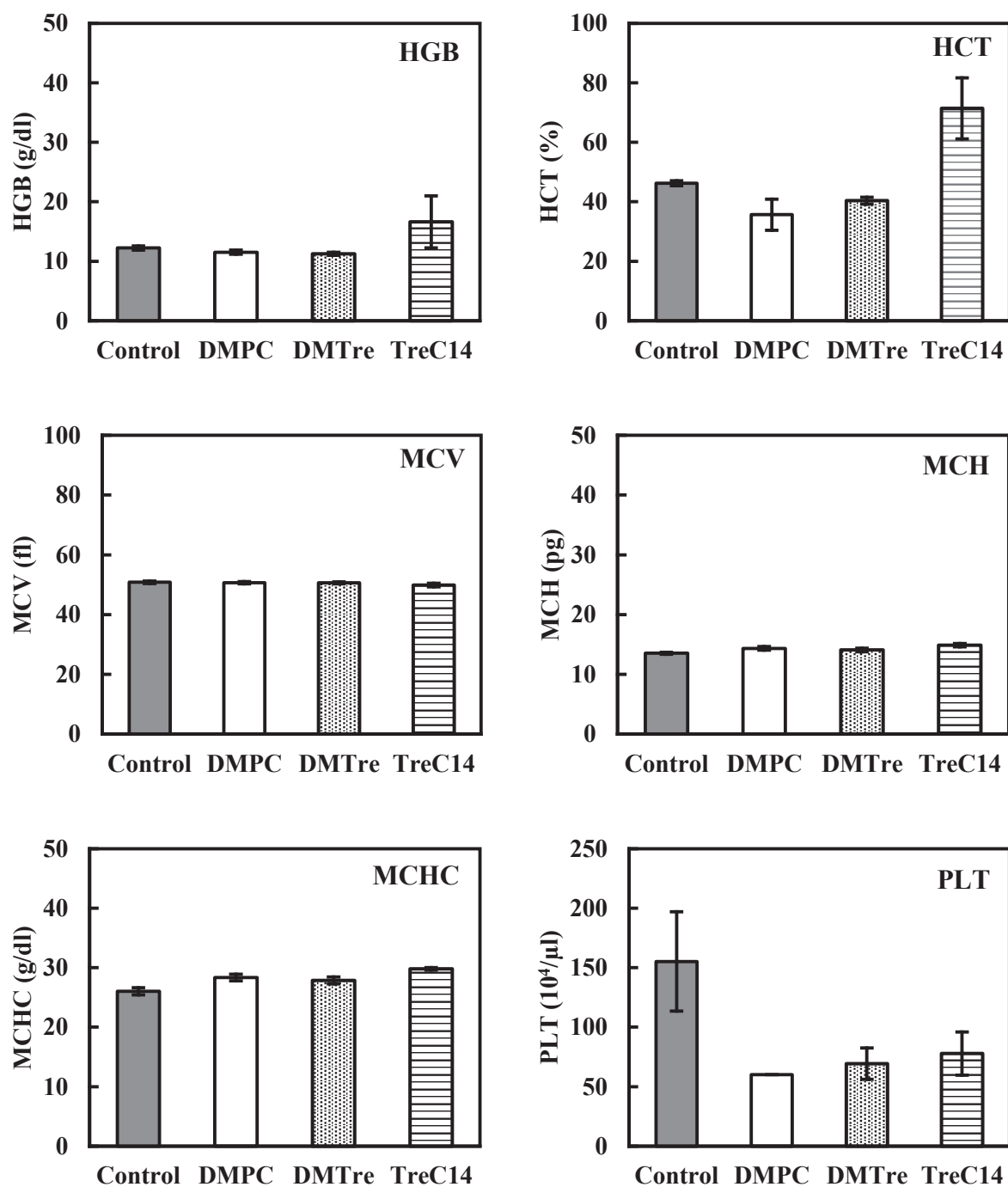


Fig. 6-3-11 Hematological findings for normal mice intravenously administered with DMTre for two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 1 ~ 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

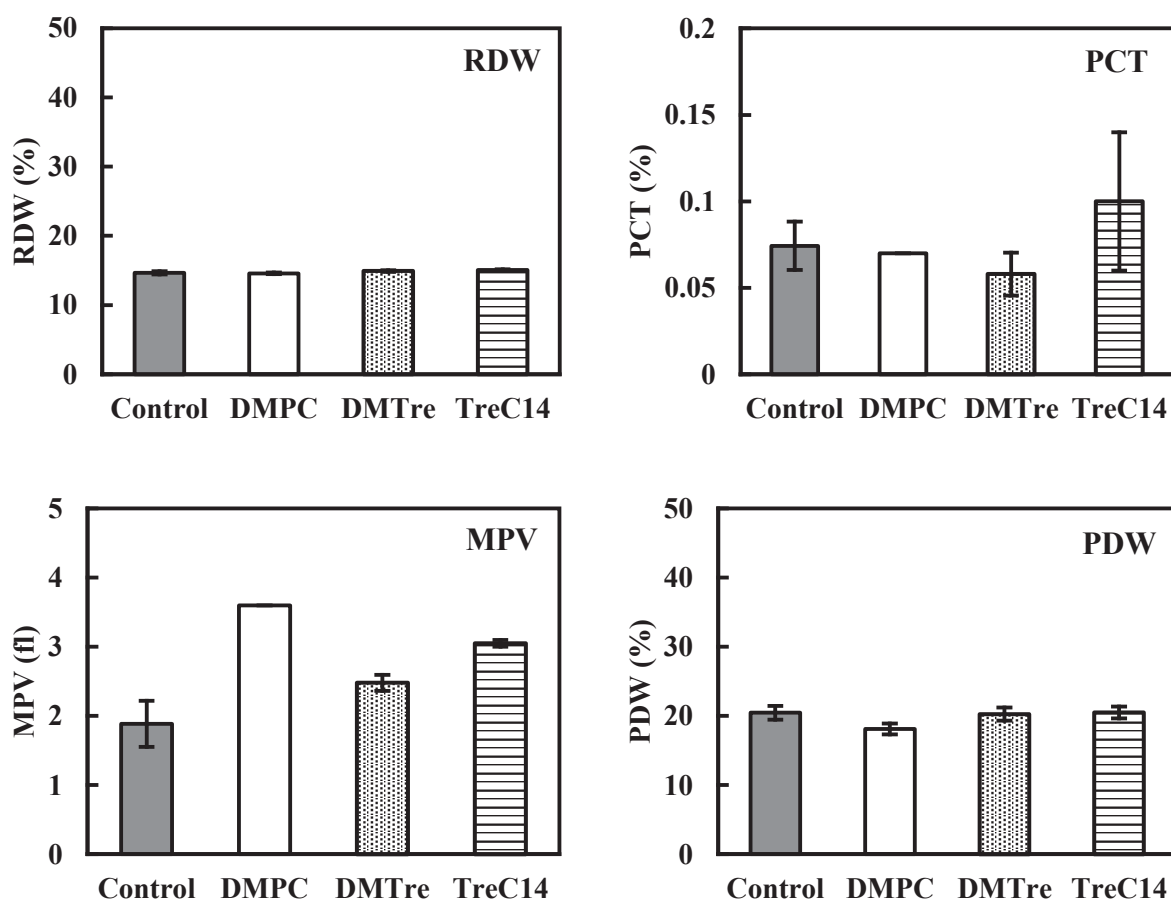


Fig. 6-3-12 Hematological findings for normal mice intravenously administered with DMTPe for two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 1 ~ 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

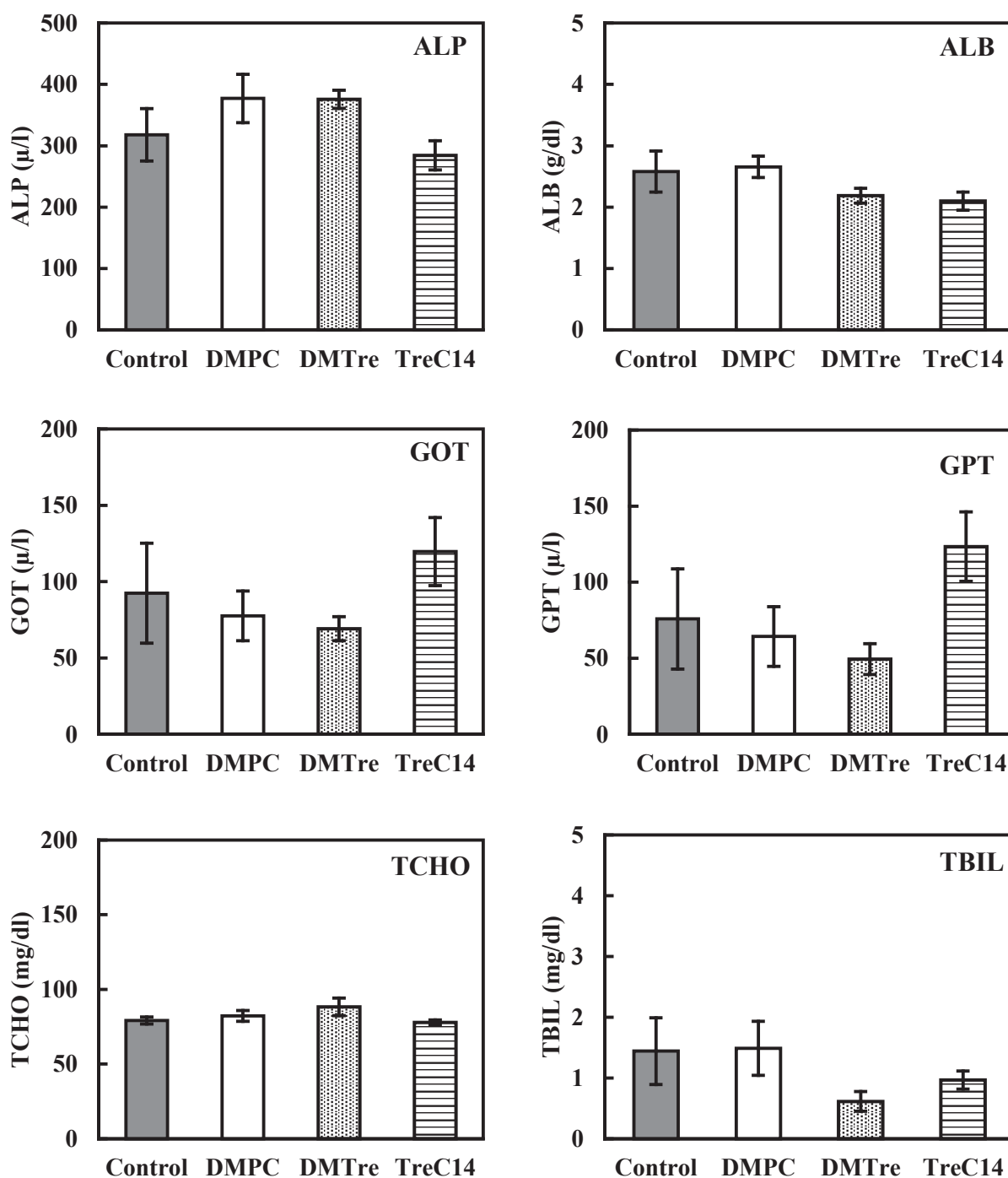


Fig. 6-3-13 Biological findings for normal mice intravenously administered with DMTre for two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 1 ~ 8)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

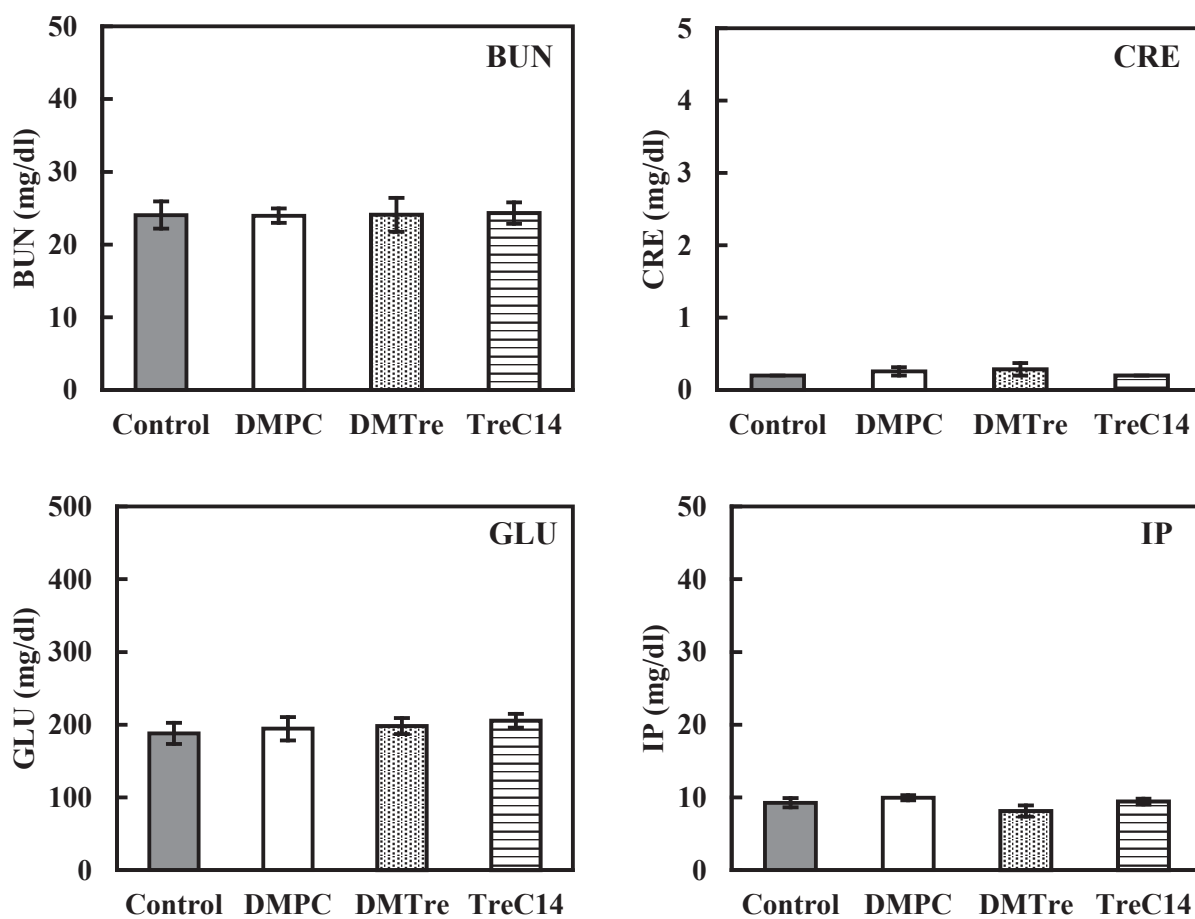


Fig. 6-3-14 Biological findings for normal mice intravenously administered with DMTPe for two weeks.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 1 ~ 8)
 $[DMPC] = 4.0 \times 10^{-3} M$, $[TreC14] = 5.32 \times 10^{-3} M$

6-3-3. トレハロースリポソームの体内動態

トレハロースリポソームの体内動態を検討するために、トレハロースリポソームに蛍光標識脂質を含有させ、正常マウスに対する体内動態試験を行った。

蛍光脂質含有トレハロースリポソーム投与後の血清中の蛍光強度を蛍光分光光度計にて測定した結果を Fig. 6-3-15 に示す。DMTre 及び DMPC 投与群の血清中の NBDPC の蛍光強度は投与直後に最大となり時間経過と共に減少した。

蛍光脂質含有トレハロースリポソーム投与後の各組織の蛍光画像を Fig. 6-3-16 ~ Fig. 6-3-21 に示す。DMTre 及び DMPC において 5 分後の肝臓において緑色蛍光が確認された。しかし、1 時間後以降の肝臓では蛍光は確認されなかった。

以上の結果から、DMTre 及び DMPC は静脈投与直後に血中濃度が最大となり、投与 1 時間後には肝臓から代謝され、長時間の臓器への集積がなく安全であることが示された。

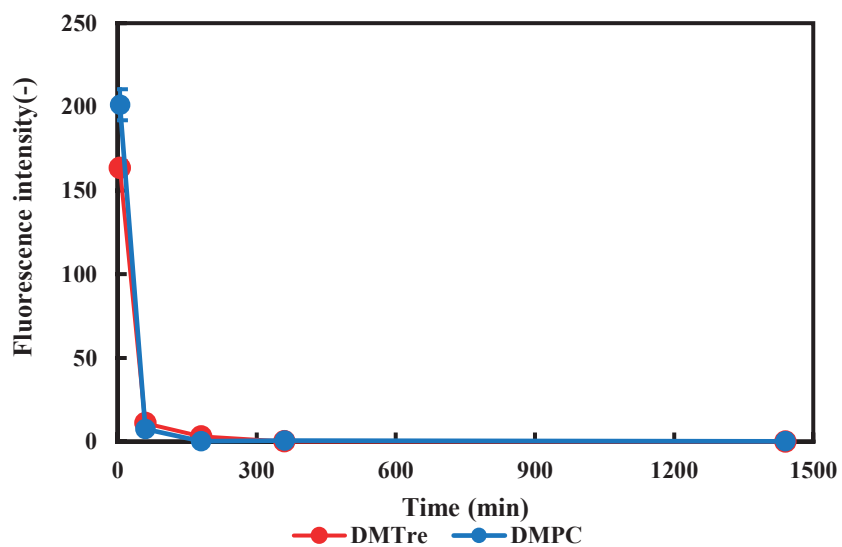


Fig. 6-3-15 Fluorescence intensity of NBDPC in serum of normal mice after the intravenous administration of DMTPe / NBDPC.

Data represent the mean \pm S.E. (n = 2)

[DMPC] = 4.0×10^{-3} M, [TreC14] = 5.32×10^{-3} M

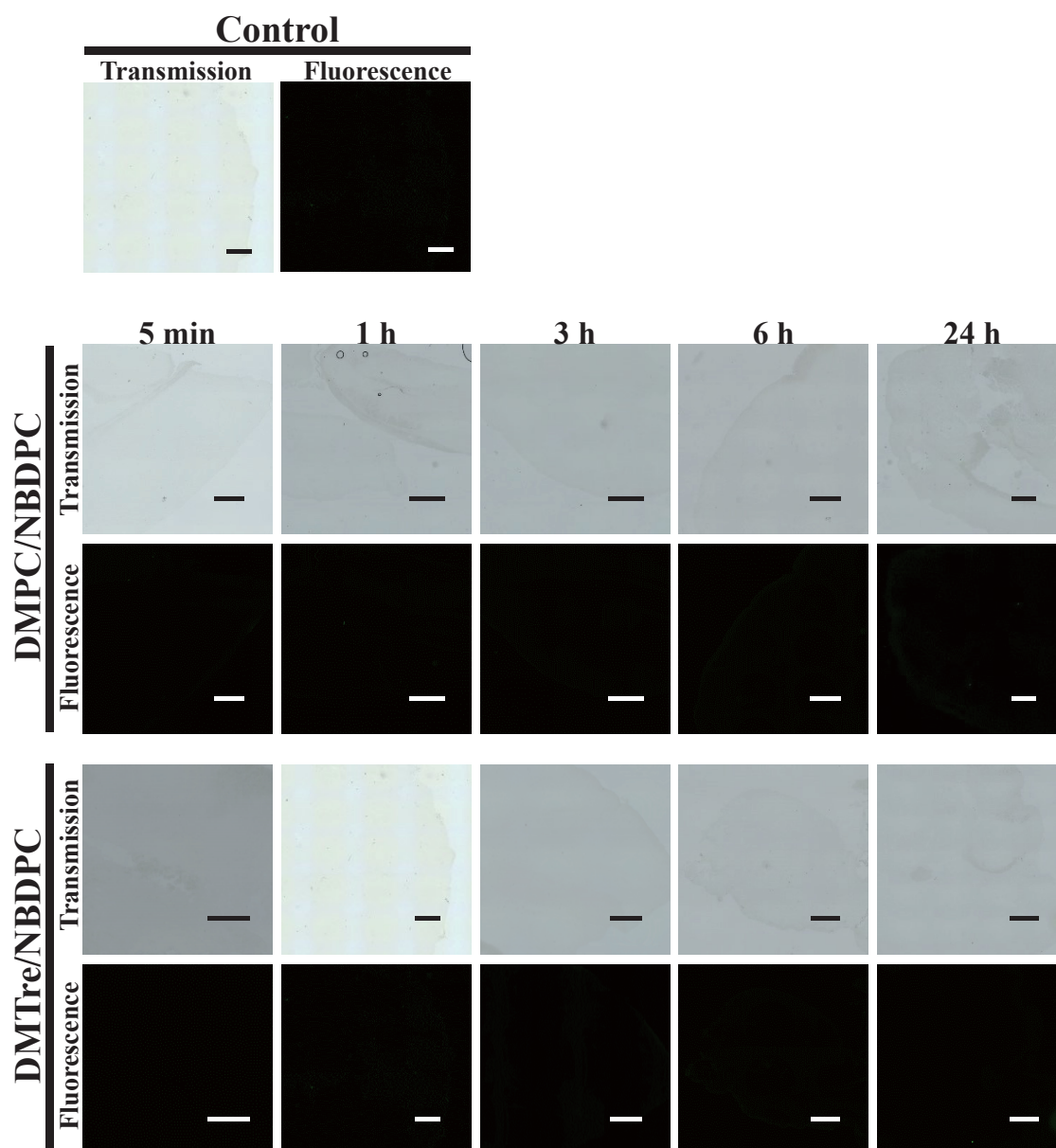


Fig. 6-3-16 Fluorescence micrographs of brain section of normal mice after the intravenous administration of DMTre / NBDPC

Scale bar: 400 μ m

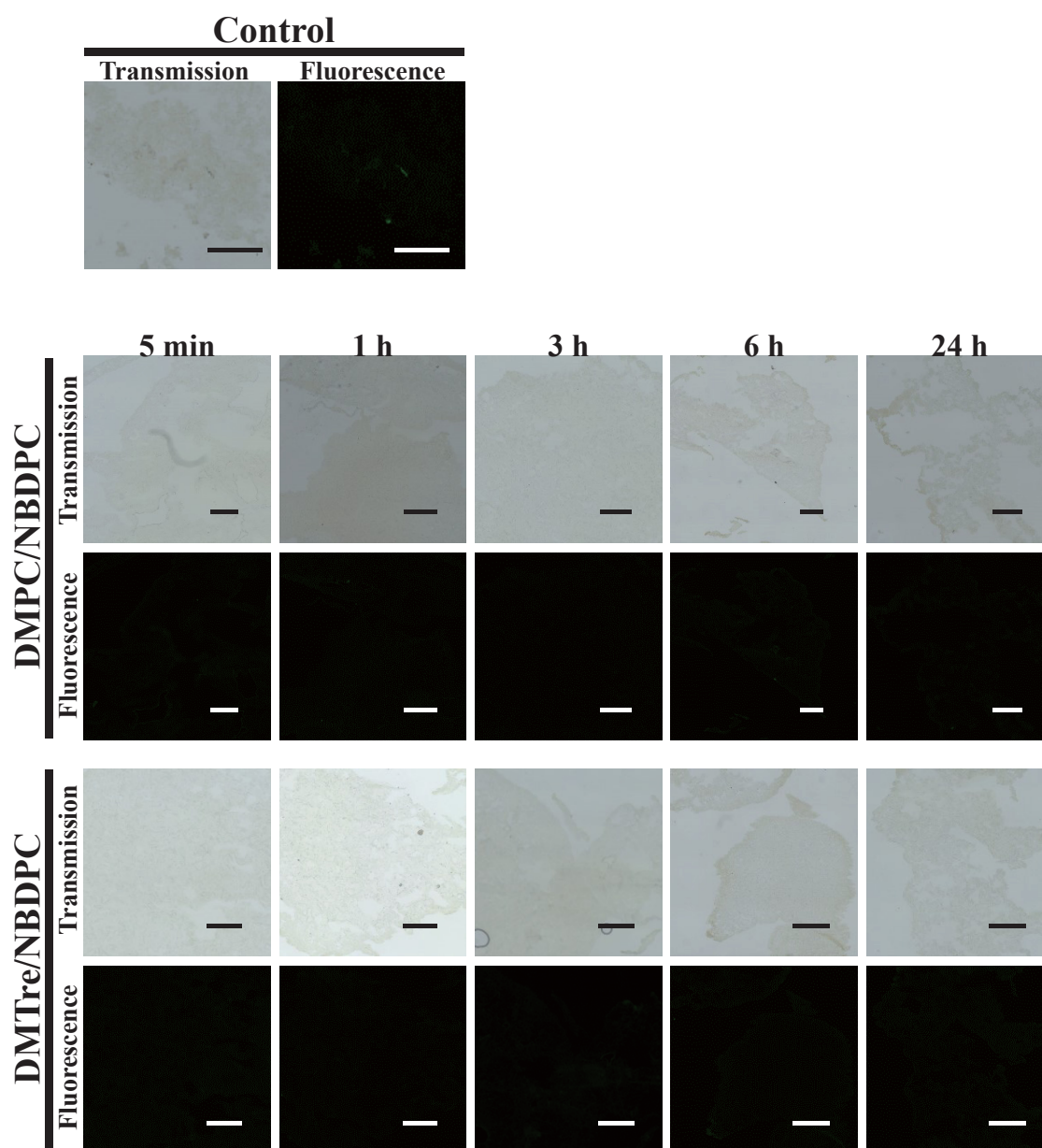


Fig. 6-3-17 Fluorescence micrographs of lung section of normal mice after the intravenous administration of DMTre / NBDPC

$[DMPC] = 4.0 \times 10^{-3} M$, $[TreC14] = 5.32 \times 10^{-3} M$

Scale bar: 400 μm

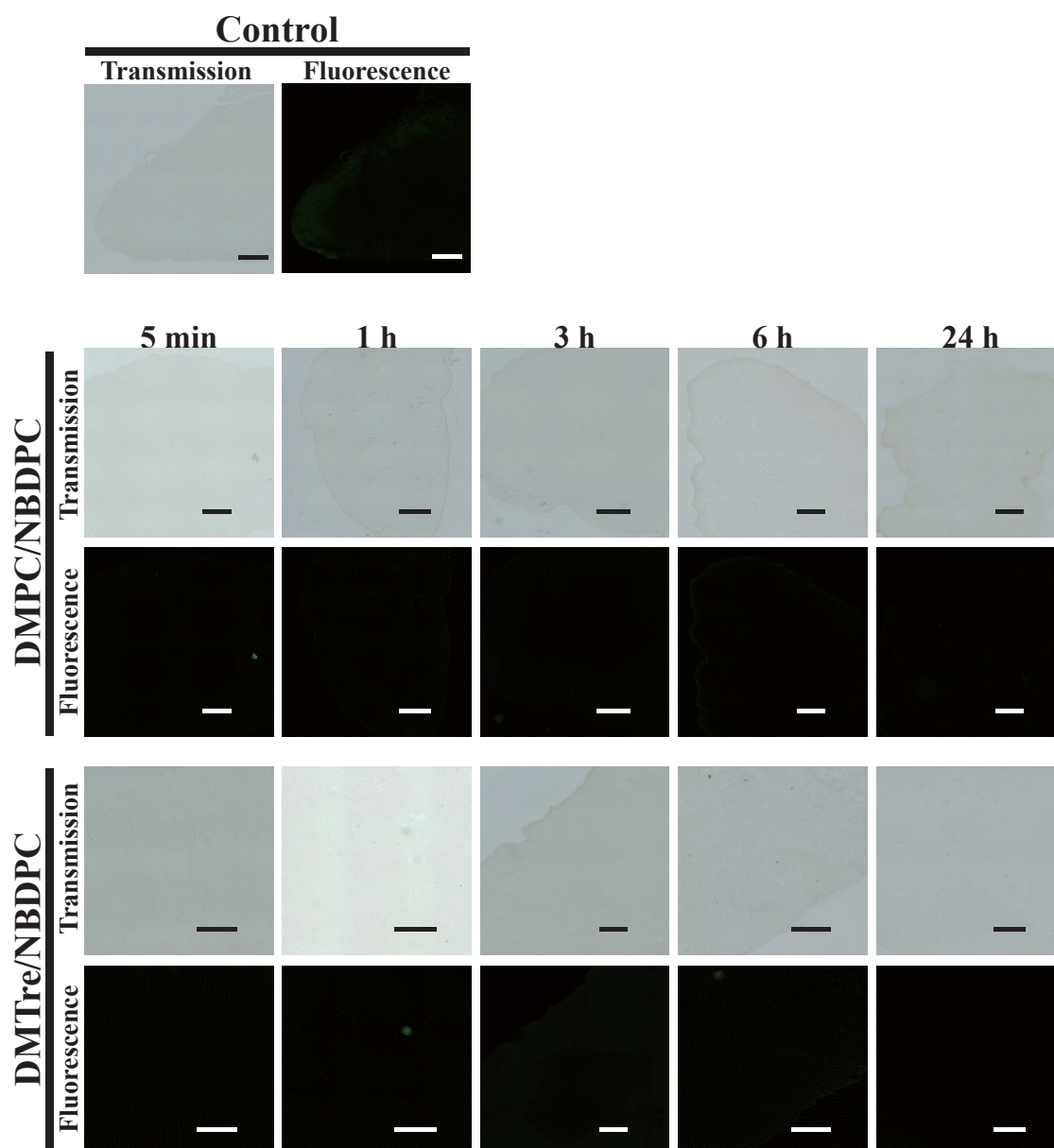


Fig. 6-3-18 Fluorescence micrographs of heart section of normal mice after the intravenous administration of DMTre / NBDPC
Scale bar: 400 μ m

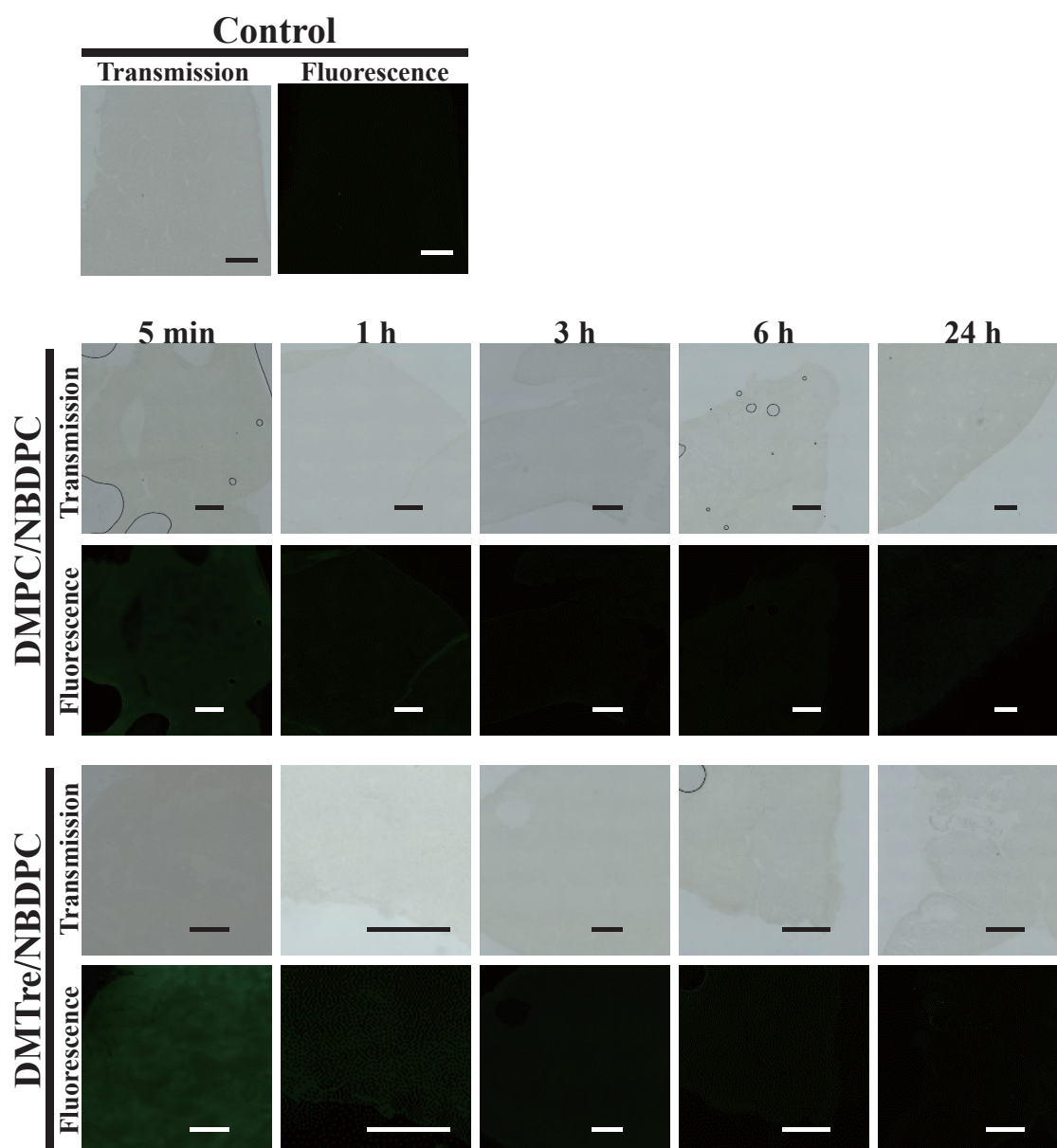


Fig. 6-3-19 Fluorescence micrographs of liver section of normal mice after the intravenous administration of DMTre / NBDPC
Scale bar: 400 μ m

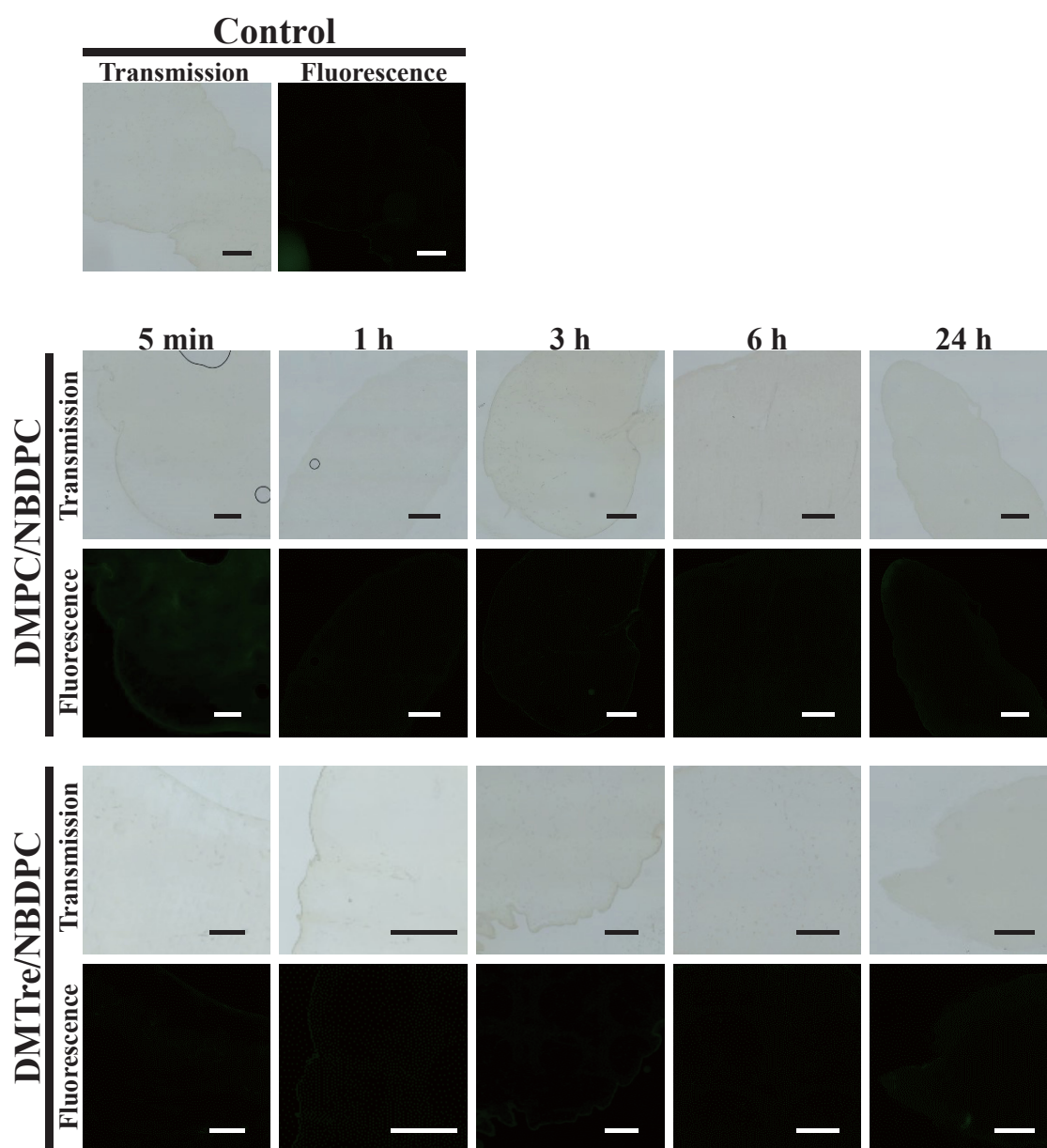


Fig. 6-3-20 Fluorescence micrographs of spleen section of normal mice after the intravenous administration of DMTre / NBDPC
Scale bar: 400 μ m

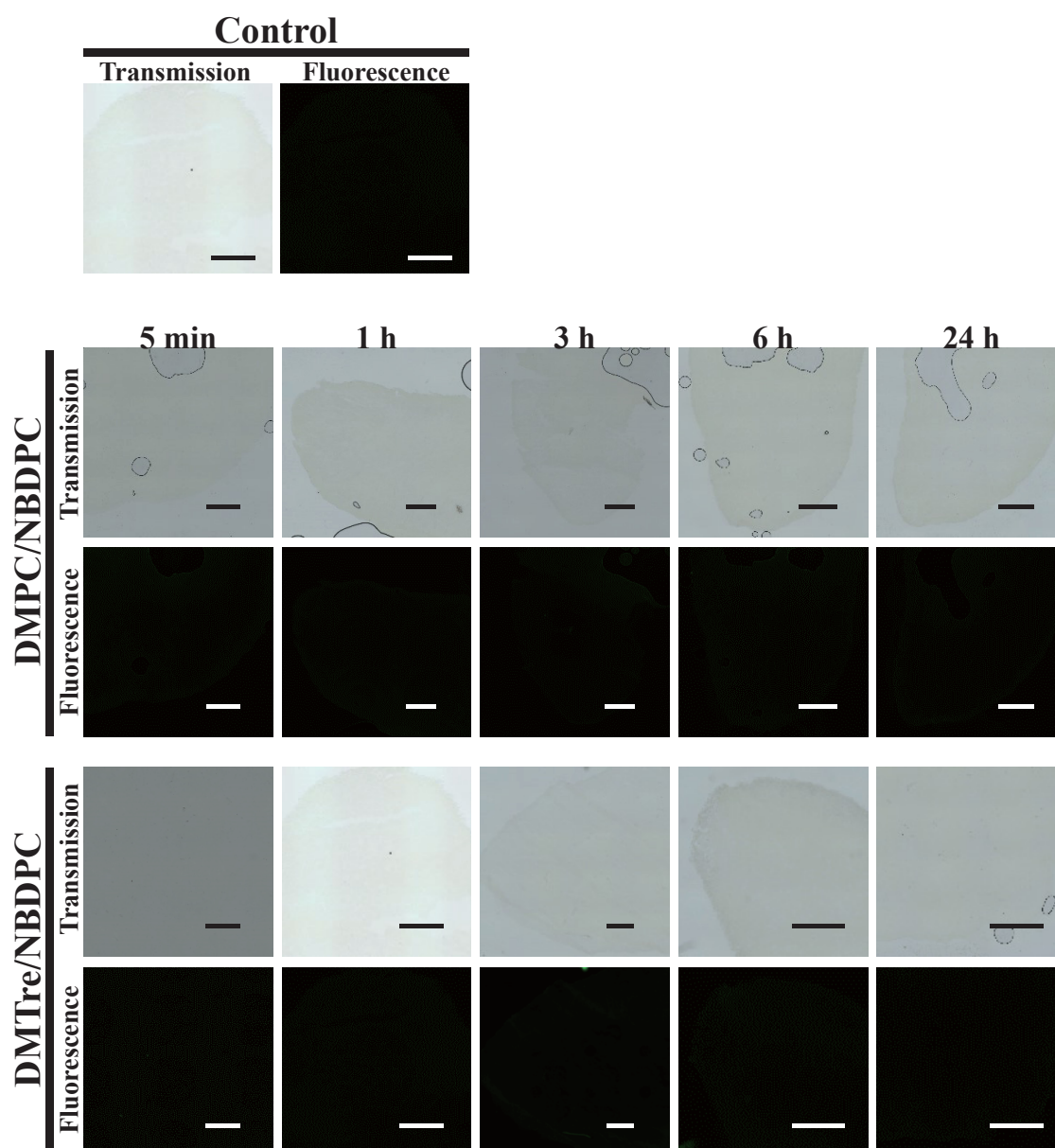


Fig. 6-3-21 Fluorescence micrographs of kidney sectioni of normal mice after the intravenous administration of DMTre / NBDPC
Scale bar : 400 μ m

6-4. 総括

本章では、糖系界面活性剤含有トレハロースリポソーム(DMTre)の安全性について検討したところ、以下の様な興味深い知見が得られた。

1. DMTre、DMPC および TreC14 は *in vitro* の溶血試験において血液の溶血が見られず、DMTre、DMPC および TreC14 の安全性が示唆された。
2. TreC14 投与群では観察中に尻尾が切れたことや、脾臓重量の増加、血液検査の結果から副作用があることが示唆された。
3. DMTre 及び、DMPC 投与群において血液検査や生化学検査において異常が確認されなかったことから *in vivo* での安全性が確認された。
4. DMTre 及び DMPC は静脈投与直後に血中濃度が最大となり、投与 1 時間後には肝臓から代謝され、長時間の臓器への集積がなく安全であることが示された。

以上の知見から、DMTre は、マウス血液および正常マウスに対する安全性が確認され、副作用のない治療薬として期待できる。

第7章 総論

我が国のがん対策は、がん研究をその基本に据え、1984年の対がん10ヵ年総合戦略、1994年のがん克服新10ヵ年戦略、2004年の第3次対がん10ヵ年総合戦略という10年単位で戦略的に進められている。これまでのがん研究の成果による診断・治療法などの進歩とその普及によって、5年生存率も改善が進み、現在ではがん全体で約6割の方が完治できると考えられるようになっている。しかし、今なお我が国の死因の第一位はがんであることから、がんの罹患率と死亡率の激減をめざして2014年度から文部科学省、厚生労働省や経済産業省が一体となり「がん研究10ヵ年戦略」が定められた。この戦略では、がんの本態解明研究とこれに基づく革新的な予防、早期発見、診断、治療に係る技術の実用化をめざした臨床研究や、新たに小児がんや高齢者のがん、難治性がんや希少がん等に関する研究を戦略に位置付けて推進することとした他、充実したサバイバーシップを実現する社会の構築をめざした研究、がん対策の効果的な推進と評価に関する研究等を推進することが示された。

がん治療には主に、外科療法、放射線療法、化学療法が用いられる。しかし、創部の治癒と全身の回復に時間がかかることや、臓器を切除することによって、臓器や体の機能が失われること、放射線の照射により照射部位の炎症や、正常細胞に対して悪影響を与えてしまう。また、化学療法はDNAの合成を直接的または間接的に障害することによって増殖を阻止する。しかし、体内には活発に増殖を繰り返す毛髪、腸細胞、白血球系の細胞等の正常細胞も存在する。これらの細胞は、がん細胞と同様に抗がん剤の影響を強く受けることとなり重篤な副作用を引き起こすこととなる。また、分子標的薬は腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移に関わる分子を標的とし、腫瘍細胞の増殖を抑制するとともに、腫瘍の浸潤を阻害することによって、原発腫瘍の抑制のみならず、腫瘍の転移をも抑制することを目的に開発された薬剤である。しかし、肺がん治療に用いられるイレッサの間質性肺炎のような致死的な副作用が確認されていることが問題となった。

がん治療に於ける重篤な副作用は、細胞死と密接に関係している。現在用いられている抗がん剤のほとんどは、がん細胞のみならず正常な細胞にも影響を与える。抗がん剤は、分裂の早い細胞をターゲットとして攻撃するものが多いため、比較的分裂の早い正常な細胞へとダメージを与え、抗がん剤の影響を受けた細胞はネクロシスを引き起こし、自身のみならず隣り合う細胞、さらには、周辺の正常組織にも悪影響を与え様々な副作用を引き起こす。このため副作用の軽減にはがん細胞の死に方をアポトーシスを選択させることが重要である

本研究は、種々のがんに対する副作用のない新しい抗がん剤の開発を目的としたものである。トレハロースリポソームの安全性・有効性を確認する為に *in vitro* では制がんメカニズムと転移抑制効果について検討した。また、*in vivo* における治療効果およ

び安全性について検討した。

第 2 章では、ベシクル分子として細胞膜の構成成分でもある L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)と、ミセル分子として高い保水性、タンパク・脂質の変性抑制などの性質を持つ α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside onomyristate (TreC14)から成るトレハロースリポソーム (DMTreC14)を調製し、膜物性について検討した。DMTreC14 は、70mol%が最も安定し 100 nm 以下の安定した膜を一か月以上の長期間形成した。一方、30 及び 50mol%では調製直後から膜直径が不安定で 200 nm を超えた膜を形成した。このことから DMTreC14 70mol% (DMTre)は、臨床応用に有用であることが示された。

第 3 章では、前章において直径 100 nm 以下の安定なトレハロースリポソーム (DMTre)を用い、ヒト急性リンパ芽球性白血病 (MOLT-4)細胞に対する *in vitro* および *in vivo* での制がん効果について検討した。DMTre は MOLT-4 細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、DNA を断片化させ、アポトーシスを誘導することが示された。アポトーシス誘導におけるシグナル伝達経路を検討したところ、DMTre はミトコンドリア膜電位を低下させ、カスパーズの活性化によりアポトーシスを誘導することが明らかとなった。さらに、DMTre は MOLT-4 細胞膜に融合・蓄積し、膜流動性を増大させた。DMTre を処理した MOLT-4 細胞では脂質ラフトのクラスター形成が観察された。DMTre の *in vivo* での治療効果及びアポトーシス誘導を白血病細胞皮下移植モデルマウスにて検討したところ、DMTre 投与群において腫瘍重量は顕著に減少し、摘出した腫瘍はアポトーシスを誘導していることが明らかとなった。

第 4 章では、DMTre のヒト肺胞基底上皮腺がん (A549)細胞に対する増殖抑制効果および転移・浸潤抑制効果について検討した。さらに、肺がん細胞皮下移植モデルマウスおよび同所移植モデルマウスに対する治療効果について検討した。DMTre は A549 細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。次に、DMTre は低濃度では G0/1 arrest を引き起こし、高濃度ではアポトーシスを誘導することが明らかとなった。アポトーシス誘導におけるシグナル伝達経路を検討したところ、DMTre はミトコンドリア膜電位を低下させ、カスパーズの活性化によりアポトーシスを誘導することが明らかとなった。さらに DMTre の A549 細胞膜に与える影響について測定した。DMTre の肺がん細胞膜への融合・蓄積を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、添加後 30 分で融合・蓄積を示す緑色蛍光が観察され、その後経時的に蛍光量が増大した。DMTre は、添加後 10 分で肺がん細胞の細胞膜流動性を増加させた。DMTre の肺がん細胞に対する転移・浸潤抑制効果について検討した。Invasion assay、Scratch assay および MMP-14 の発現量を測定結果から、DMTre は肺がん細胞に対し転移・浸潤を抑制することが明らかとなった。DMTre の A549 細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果およびアポトーシス誘導について検討したところ、DMTre 投与群および TreC14 投与群において腫瘍体積の増加は抑制された。また、DMTre 投与群及び TreC14 投与群は顕著に腫瘍

重量の減少が確認され、DMTre の治療効果が示された。摘出した腫瘍を TUNEL 染色し、光学顕微鏡にて観察を行った。DMTre 投与群の腫瘍では褐色のアポトーシス陽性細胞の集団が確認されたことから、DMTre の *in vivo* でのアポトーシス誘導効果が示された。DMTre の A549 細胞同所移植モデルマウスに対する治療効果について検討した。DMTre 投与群では相対臓器重量は顕著に減少しており DMTre の肺がんに対する治療効果が示された。HE 染色した腫瘍切片の画像から、DMTre 投与群では腫瘍の増殖が抑制され、肺胞の空隙も正常な肺と同様であった。

第 5 章では、トレハロースリポソームのヒト乳がん細胞に対する制がんメカニズムの解明及び *in vivo* での乳がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果について検討した。DMTre はヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。DMTre の乳がん細胞に対するアポトーシス誘導を DNA 断片化率の測定および、TUNEL 法を用いた観察にて検討した。ヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞に対し、DMTre 濃度依存的に DNA 断片化が得られた。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察から、DMTre では TUNEL 陽性である緑色蛍光が観察され、アポトーシス小胞が確認された。DMTre のヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞に対するアポトーシス誘導経路の検討を行った。MCF-7 細胞は、Control 及び DMPC を処理した MCF-7 細胞に比べ、カスパーズ-6, -9 の活性化が示された。DMTre を処理した MDA-MB-453 細胞は、カスパーズ-3, -6, -8, -9 の活性化していることが示された。また、DMTre のヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞ミトコンドリア膜電位に与える影響について測定したところ、DMTre を処理したヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞ミトコンドリア膜電位は Control と比べ有意に膜電位の減少が示された。更に、ミトコンドリア内の Cytochrome *c* 量を測定したところ、Control 及び DMPC を処理した MCF-7 細胞と比べ、DMTre を処理したヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞のミトコンドリア内 Cytochrome *c* 量は減少していることが明らかとなった。ヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞におけるアポトーシス誘導では、デスレセプターを経由するカスパーズ-8 の活性が弱いことから、ミトコンドリアからカスパーズを経由する経路が主経路だと考えられる。このことから、ミトコンドリア上流にあるストレス応答シグナルである pJNK 量の変化を測定した。DMTre はヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞の pJNK 量を、Control 及び DMPC 処理したヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞と比べ有意に増加させた。DMTre のヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞細胞膜に与える影響を蛍光脂質含有トレハロースリポソームの細胞膜への融合・蓄積、細胞膜流動性に与える影響について検討した DMTre で処理したヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞は、時間経過と共に NBDPC の蛍光が強くなり、ヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞膜へ融合・蓄積していることが明らかとなった。また、DMTre のヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞膜に与える影響について測定したところ、DMTre を処理したヒト乳がん (MCF-7, MDA-MB-453) 細胞膜は Control と

比べ有意に膜流動性の増大が示された。トレハロースリポソーム(DMTre)のヒト乳がん(MCF-7)細胞に対する遊走抑制効果の検討をした。DMTre を処理した MCF-7 細胞では、移動が抑制され、剥離面積が多く残っていた。DMTre の *in vivo* 治療効果をヒト乳がん細胞皮下移植モデルマウスにて検討したところ、DMTre 投与群において腫瘍重量は顕著に減少していることが明らかとなった。

第 6 章では、トレハロースリポソームの安全性を検討した。マウス血液を用いて *in vitro* において、正常マウスを用いて溶血試験、2 週間反復投与毒性試験および体内動態試験を *in vivo* において行った。DMTre においては 4.0×10^{-5} M にて若干の溶血率の上昇が見られたが、溶血率 20% 以下であることから血液毒性は低いことが示された。臨床応用を目的とし、トレハロースリポソームの *in vivo* での安全性を正常マウスを用いて検討した。Control 群、DMPC 及び DMTre 投与群では尻尾は正常であり、死亡例も無いため、LD₅₀ 以下であることが推測された。また、Control 群、DMPC 及び DMTre 投与群では、投与期間中まで体重の大きな増減はなかった。一方、TreC14 投与群においては、体重の減少がみられた。摘出した臓器の写真観察した結果、全ての投与群において異常は見られなかった。次に摘出した臓器の相対臓器重量を比較した。DMPC 及び DMTre 投与群では肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓において相対臓器重量は、Control 群と同様であった。血液検査の結果、DMTre 投与群では、全ての項目において Control 群と同様であった。しかし、血小板(PLT)の減少が確認された。次に生化学検査の結果から、DMTre および DMPC 投与群では全ての項目において Control 群と同様であり大きな異常は見られなかった。トレハロースリポソームの体内動態を検討するために、トレハロースリポソームに蛍光標識脂質を含有させ、正常マウスに対する体内動態試験を検討した。蛍光脂質含有トレハロースリポソーム投与後の血清中の蛍光強度を蛍光分光光度計にて測定したところ、DMTre 及び DMPC 投与群の血清中の NBDPC の蛍光強度は投与直後に最大となり時間経過と共に減少した。また、各組織を蛍光顕微鏡にて観察した結果、DMTre 及び DMPC において 5 分後の肝臓において緑色蛍光が確認された。しかし、1 時間後以降の肝臓では蛍光は確認されなかった。

以上の結果から、DMTreC14 70 mol%は RES 回避可能な 100 nm 以下の膜直径で一ヶ月以上安定し、臨床応用可能な膜を形成することを明らかとした。また、DMTre は種々のがん(MOLT-4, A549, MCF-7, MDA-MB-453)細胞に対し顕著な増殖抑制を示しアポトーシスを誘導することを明らかにした。また、アポトーシス誘導のシグナル伝達において、カスパーゼおよびミトコンドリアを経由することが示された。また、乳がん細胞ではリン酸化 JNK 量の増加から、ストレスシグナル経路の経路が示唆された(Fig. 7-1)。さらに、肺がん細胞及び乳がん細胞に対し転移浸潤抑制効果を示した。*in vivo* での治療効果の検討では、白血病や肺がん細胞に対し優れた治療効果およびアポトーシス誘導効果が明らかとなった。安全性試験の結果から、トレハロースリポソームは

副作用のないことが明らかとなった。

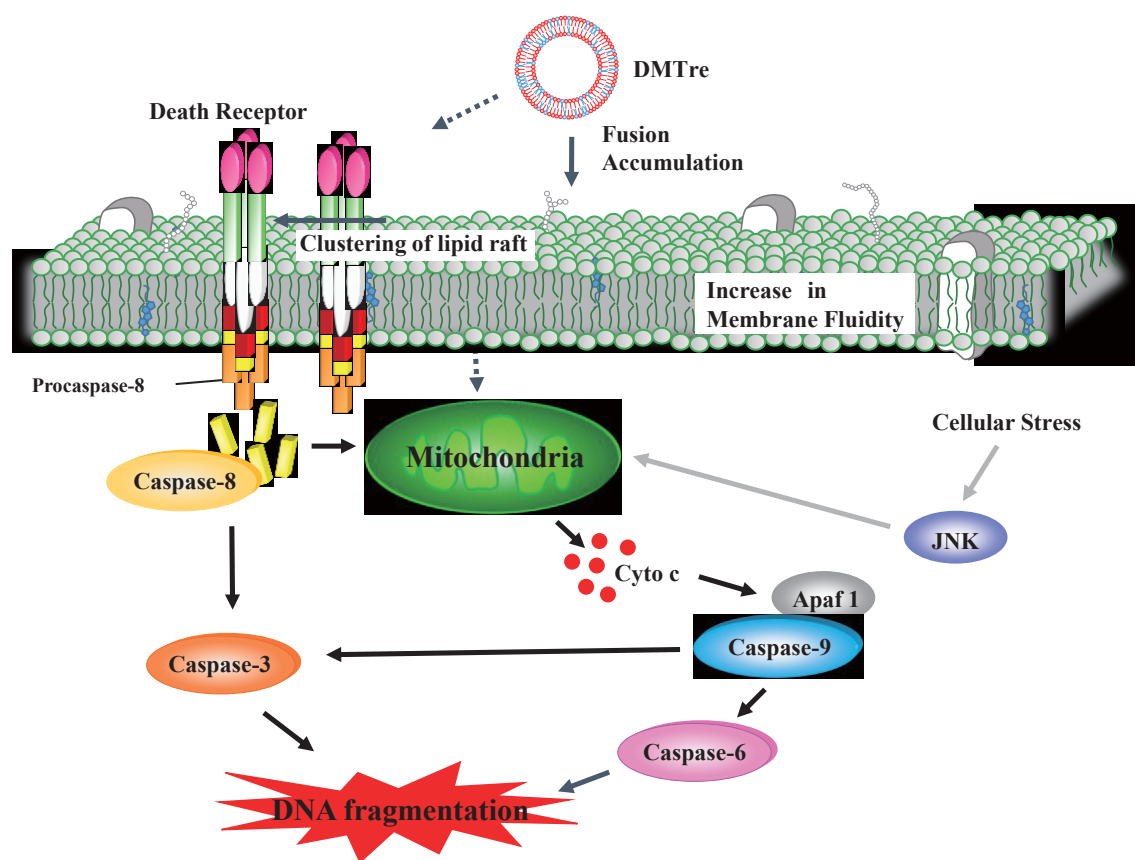


Fig. 7-1 Schematic representation of a mechanism for apoptosis of cancer cells induced by DMTre.

トレハロースリポソームの安全性や *in vivo* での治療効果が示されたことから、今後の臨床応用の可能性が高まったことは有意義な研究成果だと考える。さらに多くの知見を蓄積し、副作用の無い抗がん剤となることを期待したい。

参考文献

- 1) D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt ヴォート基礎生化学, 1-5 (2007).
- 2) 厚生労働省大臣官房統計情報部人口動態・保健社会統計課「人口動態統計」(2017)
- 3) 山口 和克, 病気の地図帳, 講談社 (2003).
- 4) Douglas R. Green, 長田重一、”週末への道筋 アポトーシスと様々な細胞死”, 株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル, p3-44 (2012).
- 5) R. Ueoka, R. A. Moss, S. Swarup, Y. Matsumoto, G. Straus, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185 (1985).
- 6) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R.A. Moss, S. Swarup, A. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988).
- 7) Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **55**, 5797 (1990).
- 8) R. Ueoka, H. Dozono, Y. Matsumoto, H. Cho, K. Kitahara, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 219 (1990)
- 9) R. Ueoka, E. Yamada, O Yamashita, Y. Matsumoto, Y. Kato, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6597(1991).
- 10) K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **60**, 3342 (1995).
- 11) C. Imamra, A. Kanno, C. Mitsuoka, S. Kitajima, H. Inoue, M. Iwahara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Yakugaku Zasshi*, **116**, 942 (1996).
- 12) 松本 陽子, 上岡 龍一, 日化, **1983**, 901 (1983).
- 13) R. Ueoka, Y. Matsumoto, T. Nagamatsu, S. Hirohata, *Chem. Lett.*, **13**, 583 (1984).
- 14) R. Ueoka, Y. Matsumoto, T. Yoshino, N. Watanabe, K. Omura, Y. Murakami, *Chem Lett.*, **15**, 1743 (1986).
- 15) 上岡 龍一, 吉野 公繁, 松本 陽子, 日化, **1987**, 378 (1987).
- 16) R. Ueoka, Y. Matsumoto, N. Takemiya, Y. Ihara, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2263 (1989).
- 17) R. Ueoka, M. Cho, Y. Matsumoto, K. Goto, K. Harada, A. Sugii, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5355 (1990).
- 18) R. Ueoka, S. Mori, R. A. Moss, *Langmuir*, **10**, 2892 (1994).
- 19) K. Goto, C. Imamura, S. Yamamoto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, 2081 (1994).
- 20) O. Tanoue, M. Baba, Y. Tokumura, K. Gotto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2129 (1999).
- 21) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Oyama, H. Takekuma, M. Iio, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4640 (1988).

- 22) Y. Matsumoto, E. Yamada, J. Hirano, M. Oshige, M. Ito, M. Iwahara, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 213 (1993).
- 23) I. Kitahara, M. Kochi, Y. Mtsumoto, R. Ueoka, J. Kuratsu, Y. Ushio, *Cancer Res.*, **56**, 3986 (1996).
- 24) Y. Matsumoto, T. Kato, Y. Kemura, M. Tsuchiya, M. Yamamoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **28**, 53, (1999).
- 25) K. Nakano, Y. Iwamoto, W. Tanaka, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3251 (2002).
- 26) Y. Iwamoto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pham.*, **292**, 231 (2005).
- 27) Y. Matsumoto, Y. Iwamoto, T. Mtsushita, R. Ueoka, *Int. J. Cancer.*, **115** 377, (2005).
- 28) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **29** 380 (2006).
- 29) H. Nagami, K. Nakano, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 782 (2006).
- 30) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **315**, 167 (2006).
- 31) Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131 (2006).
- 32) S. Shimoda, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **372**, 162 (2009).
- 33) S. Shimoda, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **38**, 134 (2009).
- 34) T. Towata, Y. Komizu, S. Suzu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, S. Okada, *Leuk. Res.*, **34**, 906 (2010).
- 35) T. Towata, Y. Komizu, S. Suzu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, S. Okada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 445 (2010).
- 36) T. Towata, Y. Komizu, R. Kariya, S. Suzu, Y. Matsumoto, N. Kobayashi, C. Wongkham, S. Wongkham, R. Ueoka, S. Okada, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 3680 (2010).
- 37) 市原 英明, 永見 英明, 山本 圭一, 松本 陽子, 上岡 龍一, *薬誌*, **122**, 25 (2003).
- 38) A. Kanno, K. Tsuzaki, M. Miyagi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1013 (1999).
- 39) A. Kannno, Y. Terada, K. Tsuzaki, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Drug Deliv. Sys.*, **14**, 37 (1999).
- 40) R. Ueoka, Y. Matsumoto, A. Kanno, K. Tsuzaki, H. Ichihara, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1262 (2000).
- 41) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **315**, 167 (2006).

- 42) 根岸 由香, 吉沢 譲治, 山崎 洋次, 松本 陽子, 上岡 龍一, *日本小児外科学会雑誌*, **41**, 930 (2005).
- 43) Y. Komizu, S. Nakata, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **39**, 1291(2010).
- 44) Y. Komizu, S. Nakata, K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *ACS med.cell. lett.*, **2**, 275 (2011).
- 45) .R Ueoka, Y. Matsumoto, H. Ichihara, T. Kiyokawa, *Am. Chem. Soc. Books*, **177** (2002).
- 46) H. Ichihara, H. Nagami, T. Kiyokawa, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2008).
- 47) 永見 英明, *崇城大学修士論文* (2003).
- 48) Y. Matsumoto, T. Kato, H. Suzuki, S. Hirose, Y. Naiki, M. Hirashima, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2617 (2000).
- 49) R. Ueoka, Y. Matsumoto, S. Hirose, K. Goto, M. Goto, S. Furusaki, *Chem. Pharm.Bull.*, **50**, 563 (2002).
- 50) Y. Matsumoto, Y. Tanaka, K. Goto, R. Ueoka, *Chrm. Lett.*, **37**, 118 (2008)
- 51) 田中 芳浩, 後藤 浩一, 松本 陽子, 上岡 龍一, *高分子論文集*, **65**, 90 (2008).
- 52) H. A. L. Wiggers, *Liebigs Ann.*, **1**, 129 (1832).
- 53) M. Berthelot, *Liebigs Ann.*, 109, **1** (1859).
- 54) G. Pietramaggiore, A. Kaipainen, D.Ho, C. Orser, W. Pebley, A. Rudolph, D. P. Orgill, *Wound Repair Regen.*, **15**, 213 (2007).
- 55) J. H. Crowe, J. F. Carpenter, L. M. Crowe, *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 73 (1998).
- 56) W. F. Wolkers, N. J. Walker, F. Tablin, J. H. Crowe, *Cryobiology*, **42**, 79 (2001).
- 57) J. H. Crowe, F. Tablin, W. F. Wolkers, K. Gousset, N. M. Tsvetkova, J. Ricker, *Chem. Phys. Lipids.*, **122**, 41 (2003).
- 58) S. G. Quaak, J. B. Haanen, J. H. Beijnen, B. Nuijen, *AAPS. PharmSciTech.*, **11**, 344 (2010).
- 59) A. Younis, D. Carnovale, W. Butler, A. Eroglu, *Assist. Reprod. Genet.*, **26**, 341 (2009).
- 60) S. Leekumjorn, Y. Wu, A. K. Sum, C. Chan, *Biophys. J.*, **94**, 2869 (2008).
- 61) B. J. DeBosch, M. R. Heitmeier, A. L. Mayer, C. B. Higgins, J. R. Crowley ,T. E. Kraft, M. Chi, E. P. Newberry, Z. Chen, B. N. Finck, N. O. Davidson, K. E. Yarasheski, P. W. Hruz, K. H. Moley, *Science Signaling*, **9**, 416 (2016).
- 62) H. He, S. Oka, Y. K. Han, Y. Yamamura, E. Kusunose, M. Kusunose, I. Yano, *FEMS. Microbiol. Immunol.*, **3**, 201 (1991).

- 63) D. Nolibe, R. Masse, J. P. Tenu, M. Lepoivre, J. F. Petit, *Cancer Immunol. Immunother.*, **23**, 200 (1986).
- 64) E. Yarkoni, H. J. Rapp, J. Polonsky, E. Lederer, *Int. J. Cancer*, **22**, 564 (1978).
- 65) E. Yarkoni, M. S. Meltzer, H. J. Rapp, *Int. J. Cancer*, **19**, 818 (1977).
- 66) R. Watanabe, Y. C. Yoo, K. Hata, M. Mitobe, Y. Koike, M. Nishizawa, D. M. Garcia, Y. Nobuchi, H. Imagawa, H. Yamada, I. Azuma. *Vacctine*, **17**, 1484 (1999).
- 67) S. Orbach-Arbouys, J. P. Tenu, J. F. Petit, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **71**, 67 (1983).
- 68) D. Reisser, J. F. Jeannin, F. Martin, *C. R. Acad. Sci. III.*, **298**, 181(1984).
- 69) Y. Matsumoto, E. Cao, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 8 (2013).
- 70) Y. Matsumoto, E. Cao, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **33**, 4727 (2013).
- 71) S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science*, **175**, 720 (1972).
- 72) S. Hakomori, *Sci. Am.*, **254**, 44 (1986).
- 73) A. Kusumi, T. K. Fuziwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyaa, Z. Kalay, R. S. Kasai, K. G. Suzuki, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 215 (2012).
- 74) K. Simons, E. Ikonen, *Nature*, **387**, 569 (1997).
- 75) K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **1**, 31 (2000).
- 76) A. D. Bangham, R. W. Horne, *J. Mol. Biol.*, **8**, 660 (1964).
- 77) 人工細胞へのアプローチ 化学(増刊), 化学同人, (1998).
- 78) 秋吉 一成, 辻井 薫, 奥 直人, 久保井 亮一, 宝谷 紘一, 「リポソーム応用の新展開-人工細胞の開発に向けて」, エヌ・ティ・エス, (2005).
- 79) G. Haran, R. Cohen, L. K. Bar, Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1151**, 201 (1993).
- 80) G. Gregoriadis, E. J. Wills, C. P. Swain, A. S. Tavill. *Lancet*, **29**, 1313 (2009).
- 81) R. T. Proffitt, L. E. Williams, C. A. Presant, G. W. Tin, J. A. Uliana, R. C. Gamble, J. D. Baldeschwieler, *Science*, **220**, 502 (1983).
- 82) Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.*, **46**, 6387 (1986).
- 83) Y. Matsumoto, T. Kato, H. Suzuki, S. Hirose, Y. Naiki, M. Hirashima, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2617 (2000).
- 84) R. Ueoka, Y. Matsumoto, S. Hirose, K. Goto, M. Goto, S. Furusaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 563 (2002).
- 85) Y. Matsumoto, Y. Tanaka, K. Goto, R. Ueoka, *Chrm. Lett.*, **37**, 118 (2008)
- 86) 田中 芳浩, 後藤 浩一, 松本 陽子, 上岡 龍一, *高分子論文集*, **65**, 90 (2008).
- 87) 彼末一之, 能勢博, “やさしい生理学”, 株式会社南江堂, p12 (2014)

- 88) 小川聡, 伊藤裕, 三嶋理晃, 三森経世, 山本和利, 塩沢昌英, 井廻道夫, 大田健, 小澤敬也, 後藤元, 祖父江元, 千葉勉, 花房俊昭, 伴信太郎, 藤田敏郎, “内科学書 改訂第8版”, 中山書店, p15 (2013).
- 89) 浅野茂隆, 池田康夫, 内山卓, “三輪血液病学”, 文光堂, p383 (2006).
- 90) A. Ono, S. Hattori, R. Kariya, S. Iwanaga, M. Taura, H. Harada, S. Suzu, S. Okada, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011** (2011).
- 91) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sakamoto, M. Mizoguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 18 (1993).
- 92) Y. Matsuzaki, H. Nakauchi, *細胞工学*, **16**, 1349 (1997).
- 93) K. Sasaki, *細胞工学*, **16**, 1829 (1997).
- 94) M. Yamamoto, K. Senba, シグナル伝達イラストマップ, 羊土社, **1** (2004).
- 95) A. Komoriya, B. Z. Packard, M. J. Brown, M.L. Wu, P. A. Henkart, *J. Exp. Med.*, **191**, 1819 (2000).
- 96) W. G. Telford, A. Komoriya, B. Z. Packard, *Cytometr.*, **47**, 81 (2002).
- 97) B. Z. Packard, A. Komoriya, T. M. Brotz, P. A. Henkart, *J. Immunology*, **167**, 5061 (2001).
- 98) D. Lukovic, A. Komoriya, B. Z. Packard, D. S. Ucker, *Exp. Cell Res.*, **289**, 384 (2003).
- 99) S. S. Metkar, B. Wang, M. L. Ebbs, J. H. Kim, Y. J. Lee, S. M. Raja, C. J. Froelich, *J. Cell Biol.*, **160**, 875 (2003).
- 100) W. G. Telford, A. Komoriya, B. Z. Packard, *Methods Mol. Biol.*, **263**, 141 (2004).
- 101) 田沼 靖一, 「アポトーシスと医学」, 羊土社 (2001).
- 102) 秋山 徹, 「シグナル伝達がわかる」, 羊土社 (2001).
- 103) M. Naitou, R. Katayama, T. Ishioka, T. Tsuruo, *細胞工学*, **63**, 17 (2005).
- 104) R. W. Sabnis, T. G. Deligeorgiev, M. N. Jachak, T. S. Dalvi, *Biotech. Histochem.*, **72**, 253 (1997).
- 105) F. G. Prendergast, R. P. Haugland, P. J. Callahan, *Biochemistry*, **20**, 7333 (1981).
- 106) M. Imber, M. Shinizky, *Proc. Natl. Acad. USA.*, **71**, 2128 (1974).
- 107) P. Fuchs, P. W. Robbins, E. R. Bolut, *Natl. Acad. USA.*, **72**, 33351 (1975).
- 108) M. Imber, *FEBS. Lett.*, **67**, 189 (1976).
- 109) A. Levanon, A. Kohn, M. Imber, *J. Virol.*, **22**, 353 (1977).
- 110) M. Petitou, F. Tuy, C. Rosenfeld, M. Mishal, M. Paintrand, C. Jasnin, G. Mathe, *Proc. Natl. Sci USA.*, **75**, 2306 (1978).
- 111) L. Dimele, A. Bizzi, A. Magiutrelli, E. J. Modest, M. Salmona, A. Nosedà, *Int. J. Cancer*, **46**, 341 (1990).
- 112) 野島 博, 「改訂 顕微鏡の使い方ノート」, 羊土社, 1(2003).

- 113) 高田 邦明, 「初めてでもできる共焦点顕微鏡」, 羊土社, 1(2004)
- 114) O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell Comp. Physiol.*, **59**, 223 (1962).
- 115) D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Gene*, **111**, 229 (1992).
- 116) R. Y. Tsien, *Ann. Rev. Biochem.*, **67**, 509 (1998).
- 117) M. V. Matz, A. F. Fradocov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, *Nature Biotechnol.*, **17**, 969 (1999).
- 118) S. V. Heyningen, *Science*, **183**, 656 (1974).
- 119) C. Gomez-Mouton, J. L. Abad, E. Mira, R. A. Lacalle, E. Gallardo, S. Jimenez-Baranda, I. Illa, A. Bernad, S. Manes, C. Martinez-A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 9642 (2001).
- 120) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sakamoto, M. Mizoguchi, P.-G. He, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118 (1993).
- 121) Y. Gavrieli, Y. Sherman, S. A. Ben-Sasson, *J. Cell Biol.*, **119**, 493 (1992).
- 122) S. Hashimoto, T. Kyoji, J. Niu, T. Kanematsu, P. K. Nakane, *Arch. Histol. Cytol.*, **58**, 161 (1995).
- 123) 佐藤昭夫, 伯由香, “人体の構造と機能 第2版”, 医歯薬出版株式会社 (2003).
- 124) 人口動態統計(厚生労働省大臣官房統計情報部編)(2017)
- 125) 国立研究開発法人 がん研究センター がん対策情報センター(2015)
- 126) 井川洋二, 清水之治, 鶴尾隆, 広橋説雄 “癌 転移の分子機構 と転移の阻止”, 実験医学増刊, **12**, (1994).
- 127) Chaffer C.L, Weinberg R.A., *Science.*, **331**, 1159 (2011).
- 128) Labelle M, Begum S, Hynes RO., *Cancer Cell.* **20**,:576 (2011)
- 129) 石川 春律, 高松 哲郎, 「共焦点レーザー顕微鏡の医学・生物学への応用」, 第2巻, 1,学際企画 (1995).
- 130) A. J. Ridley, *Cell*, **145**, 1012 (2011).
- 131) T.Volk, B. Geiger, A. Raz, *Cancer Res.*, **44**, 811 (1984).
- 132) H. Watanabe, R. I. Nabi, A. Raz, *Cancer Res.*, **51**, 2699 (1991).
- 133) H. Watanabe, T. Shinozaki, A. Raz, *Int. J. Cancer*, **53**, 689 (1993).
- 134) C. C. Liang, A. Y. Park, J. L. Guan, *Nat. Protoc.*, **2**, 329 (2007).
- 135) 多賀谷 光男, 「分子細胞生物学」, 1,朝倉書店(2002).
- 136) S. Mark, J. P. Zimmer, D. G. Duda, T. S. Levchenko, K. S. Cohen, E. B. Brown, D. T. Scadden, V. P. Torcilin, M. G. Bawendi, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nat. Med.*, **11**, 678 (2005).
- 137) L. A. Repesh, *Invasion Metastasis*, **9**, 192 (1996).
- 138) E. W. Thompson, S. Nakamura, T. B. Shima, A. Melchiori, G. R. Martin, S. Z.

- Salahuddin, R. C. Gallo, A. Albini, *Cancer Res.*, **51**, 2670 (1991).
- 139) V. P. Terranova, E. S. Hujanen, D. M. Loeb, G. R. Martin, L. Thornburg, V. Glushko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 465 (1986).
- 140) S. V. Boyden, *J. Exp. Med.*, **115**, 453 (1962).
- 141) A. Albini, Y. Iwamoto, H. K. Kleinman, G.R. Martin, S. A. Aaronson, J. M. Kozlowski, R. N. McEwan, *Cancer Res.*, **47**, 3239 (1987).
- 142) J. F. Woessener Jr., *FASEB. J.*, **5**, 2145 (1991).
- 143) 行原 真美子, 崇城大学博士論文 (2006).
- 144) R. U. Jänicke, M. L. Sprengart, M. R. Wati, A. G. Porter, *J. Biol. Chem.*, **273**, 9357 (1998).
- 145) 藏並潤一, 日本薬理学雑誌, **139**.109 (2012).
- 146) 長尾 拓,「医薬品の安全性」, 南山堂, (2004).

謝辞

本研究を行う上で、また、本論文を作成するにあたり、終始御懇切な御指導ならびに御鞭撻を賜りました松本陽子教授に深く感謝致します。

本論文を作成するにあたり、松下琢教授には貴重な御教示ならびに御助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

本論文執筆にあたり、寺本祐司教授には貴重な御意見を賜りました。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ならびに御助言を頂きました市原英明准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行う上で貴重な御助言を頂きました後藤浩一教授、古水雄志准教授に深く感謝致します。

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。

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、特に実験面で協力して頂いた松本弓美さん、桑野将好君、稲村恒亮君、奥村真樹君、元村宗誠君、山下彩さん、永光理紗さん、波多江悠君に深く御礼申し上げます。