

博士論文

難治性がんに対するカチオンリポソームの
治療効果に関する研究

平成 30 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

1619D03

元村 宗誠

目次

第1章 緒論	1
第2章 カチオンリポソームの膜物性	
2-1 序	5
2-2 実験	7
2-2-1 試料	7
2-2-2 ハイブリッドリポソームの調製	8
2-2-3 カチオンリポソームの調製	8
2-2-4 動的光散乱法による膜直径の測定	9
2-3 結果と考察	10
2-3-1 カチオンリポソームの安定性	10
2-4 総括	12
第3章 カチオンリポソームのヒト大腸がん細胞に対する制がん効果	
3-1 序	13
3-2 実験	14
3-2-1 試料	14
3-2-2 カチオンリポソームの調製	14
3-2-3 動的光散乱法による膜直径の測定	14
3-2-4 使用細胞	14
3-2-5 細胞膜のガングリオシド量測定	15
3-2-6 細胞膜のホスファチジルセリン量測定	15
3-2-7 レーザードップラー法を用いた細胞膜表面電荷の測定	16
3-2-8 酵素活性測定法による50%増殖抑制濃度の決定	18
3-2-9 カスパーズ-3, 8, 9の活性測定	19
3-2-10 細胞膜脂質ラフトのクラスター形成観察	20
3-2-11 皮下移植モデルマウスの作製	20
3-2-12 皮下移植モデルマウスに対する治療実験	20
3-2-13 TUNEL法によるアポトーシスの検出	20
3-3 結果と考察	22
3-3-1 ヒト大腸がん細胞の膜物性	22
3-3-2 ヒト正常大腸細胞の増殖に及ぼす影響	26
3-3-3 ヒト大腸がん細胞に対するアポトーシス誘導	30
3-3-4 細胞膜脂質ラフトに対するクラスター形成	32

3-3-5	皮下移植モデルマウスに対する治療効果	34
3-3-6	ヒト大腸がん細胞皮下移植モデルマウスに対する アポトーシス誘導	39
3-4	総括	41
第4章 カチオンリポソームのヒト膵臓がん細胞に対する制がん効果		
4-1	序	43
4-2	実験	44
4-2-1	試料	44
4-2-2	カチオンリポソームの調製	44
4-2-3	蛍光色素含有カチオンリポソームの調製	44
4-2-4	使用細胞	45
4-2-5	ラット由来正常膵臓細胞の採取	45
4-2-6	細胞膜のガングリオシド量測定	45
4-2-7	細胞膜のホスファチジルセリン量測定	46
4-2-8	レーザードップラー法を用いた細胞膜表面電荷の測定	46
4-2-9	酵素活性測定法による50%増殖抑制濃度の測定	46
4-2-10	膵臓がん細胞に対する融合・蓄積	47
4-2-11	TUNEL法によるアポトーシスの検出	47
4-2-12	フローサイトメーターによるDNA含量測定	47
4-2-13	カスパーズ-3, 8, 9の活性の観察	48
4-2-14	ミトコンドリア膜電位の測定	48
4-2-15	細胞膜流動性測定	49
4-3	結果と考察	51
4-3-1	ヒト膵臓がん細胞の膜物性	51
4-3-2	ヒト膵臓がん細胞に対するカチオンリポソームの増殖抑制効果	56
4-3-3	カチオンリポソームのヒト膵臓がん細胞への融合・蓄積	59
4-3-4	カチオンリポソームのヒト膵臓がん細胞に対する アポトーシス誘導	63
4-3-5	ヒト膵臓がん細胞膜の膜流動性	68
4-4	総括	70
第5章 カチオンリポソームのヒト膵臓がん細胞に対する転移浸潤抑制効果		
5-1	序	72
5-2	実験	73
5-2-1	試料	73

5-2-2	カチオンリポソームの調製	73
5-2-3	scratch assay による遊走抑制試験	73
5-2-4	共焦点レーザー顕微鏡による仮足の観察	73
5-2-5	Invasion assay を用いたがん細胞の浸潤抑制試験	74
5-2-6	フローサイトメトリーによる MT1-MMP(MMP14)の測定	75
5-2-7	ELISA 法を用いた分泌型 MMP (MMP2) の測定	76
5-2-8	ELISA 法を用いた分泌型 MMP (MMP9) の測定	77
5-3	結果と考察	79
5-3-1	ヒト膵臓がん細胞に対する転移抑制効果	79
5-3-2	ヒト膵臓がん細胞に対する浸潤抑制効果	83
5-4	総括	89
第 6 章	カチオンリポソームのヒト膵臓がん移植モデルマウスに対する治療効果	
6-1	序	90
6-2	実験	92
6-2-1	試料	92
6-2-2	カチオンリポソームの調製	92
6-2-3	動的光散乱法による膜直径の測定	92
6-2-4	使用細胞	92
6-2-5	皮下移植モデルマウスの作製	92
6-2-6	皮下移植モデルマウスに対する治療実験	93
6-2-7	TUNEL 法によるアポトーシスの検出方法	93
6-2-8	腹膜播種モデルマウスの作製	93
6-2-9	腹膜播種モデルマウスに対する治療実験	93
6-3	結果と考察	95
6-3-1	皮下移植モデルマウスに対する治療効果	95
6-3-2	皮下移植モデルマウスに対するアポトーシス誘導	100
6-3-3	腹膜播種モデルマウスに対する治療効果	102
6-4	総括	107
第 7 章	総論	108
	参考文献	112
	謝辞	117

第1章 緒言

人間の身体は受精卵というたった一つの細胞が、母親の子宮内で決まった分裂と分化を繰り返すことで出来上がる。生まれた後は約20年という年月をかけて成長し、約60兆～100兆個の細胞からなる成人に成長する¹⁾。

細胞は永遠に増殖できるわけではなく、体外で行われる培養実験を行うと約50回分裂したところで分裂限界となり、アポトーシスを起こして自ら死んでいく、このプログラムのような死のことをプログラム細胞死という。また、怪我や火傷、病原体への感染などから、細胞が炎症を起こし、死んでいくことをネクローシスという。プログラム細胞死はあるタイミングで細胞を老化させる老化遺伝子が細胞を老化させ死に向かわせることにより、細胞のがん化を防いでいると考えられている¹⁾。

腫瘍は元々正常な細胞が性質を変え、増殖を制御する機能が欠損し、自律的に増殖するようになった集団のことである。腫瘍細胞は自律的に増殖できるが、増殖に必要な酸素や栄養素などは宿主に依存し、正常細胞から栄養素などを奪い取るため、宿主の健康を悪化させていく。さらに、宿主の栄養状態が悪化したとしても増殖をし続け、最終的に宿主である人の命を脅してしまう。

腫瘍は臨床上の特徴により良性腫瘍と悪性腫瘍に分けられる。良性腫瘍は正常組織と近い性質を持ち、細胞の異型性が乏しい。増殖は比較的ゆっくり行われ局所で大きくなり、腫瘍と隣接する組織との境界が明瞭に分かれる膨張性発育を行う。転移や浸潤を行わないため、良性腫瘍を切除すれば治癒が可能である。一方、悪性腫瘍は異型性が強く、隣接している組織を破壊しながら周囲へ浸潤する浸潤性発育を行う。さらには遠隔の臓器へ転移してしまうため、原発巣を切除しても再発の可能性が高く、死亡の原因となることが多く、この悪性腫瘍ががんと呼ばれるものである²⁾。

多くの腫瘍は時間経過により悪性度が増す傾向にある。メラノーマや大腸がんなどでは両性の病変から非浸潤性の前がん状態を経て、悪性腫瘍へと進行することが明らかとなっている。しかし、腫瘍の中にはこのようにはっきりとした進行をしないものも存在する。これには、がんが発見される前の悪性度の低い時期を過ぎていることや、悪性度の高い腫瘍が悪性度の低い状態を介せず生じる場合である。がんの悪性性質はがん細胞を散布し離れた場所で新たな増殖巣を形成することである。がん細胞は組織表面を沿って移動し、種々の組織や体腔内へ広がっていく。転移の主な経路は2つあり、リンパ管と血管を介して行われる。臨床的な病気を決定する際に、リンパを通るリンパ節転移および血管を介して遠隔臓器への転移する血行性転移の2つに分けられる。さらに、がんの転移には特定のがんが特定の臓器に転移する傾向があることが臨床的に確認されて

Table1 がんの主な転移先

原発腫瘍	好発転移部位
腎細胞がん	肺、骨、副腎
消化器がん	肝臓
肺がん	脳、肝臓、骨髄
乳がん	骨、脳、副腎、肺、肝臓
膵臓がん	肝臓、腹膜、骨

いる。例えば、腎細胞がんでは肺や骨、副腎に消化器がんでは肝臓に転移しやすいとされている(Table 1)。

がんが特定の臓器への転移しやすいことを Paget は“土と種仮説(soil and seed theory)”と提唱した。腫瘍や宿主臓器の組み合わせにより、それぞれの相互作用が異なり、転移を起こしやすさが変わるというものである。これ以外にも血行性転移がある。これは最初に転移が起こる臓器から遊離したがん細胞が血管に乗り、最初に到達する毛細管床の臓器で多い傾向にある。大循環系の静脈を通る臓器のがんは肺に起こりやすく、門脈系の静脈を通る臓器のがんでは肝臓に起こりやすい。この門脈を経由するのは消化器がんが多い³⁾。

上岡らが開発したハイブリッドリポソーム(HL: Hybrid Liposome)^{4,5)}は、リン脂質と界面活性剤を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで容易に得られ、従来のリポソーム調製法のように有機溶媒を用いないことから有機溶媒の混入がなく、素材および組成比の選択により、形態やサイズ、相転移温度、疎水性および膜流動性のコントロールが可能な生体適合性指向の医用素材である⁶⁻⁹⁾。HLに制がん剤を含有させて薬物伝導システム(DDS: Drug Delivery System)として用いられている¹⁰⁻¹²⁾。HLのみでのがん細胞に対する抗腫瘍効果が報告されている¹³⁻¹⁹⁾。HLは、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が明らかとなっている^{20,21)}。さらにHLのヒト前骨髄性白血病(HL-60)細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムの全容が明らかになっている²²⁾。担がんモデル動物に対するHLのみによる治療効果²³⁻²⁵⁾や肝転移抑制効果が得られている²⁶⁾。正常動物に対する長期間反復投与毒性試験²⁷⁾および体内動態試験²⁸⁾において安全性が確認されている。さらに、生命倫理委員会承認後の臨床試験から副作用がなく、延命効果および腫瘍の縮小効果が明らかとなっている²⁹⁾。

本研究は、重篤な副作用の問題で低下する患者のQuality of Life (QOL)の向上を目指し、新規治療薬の開発を目的としたものである。既にアポトーシスを誘導し臨床応用されているHLに、PEG系界面活性剤に日本薬局方に定められて

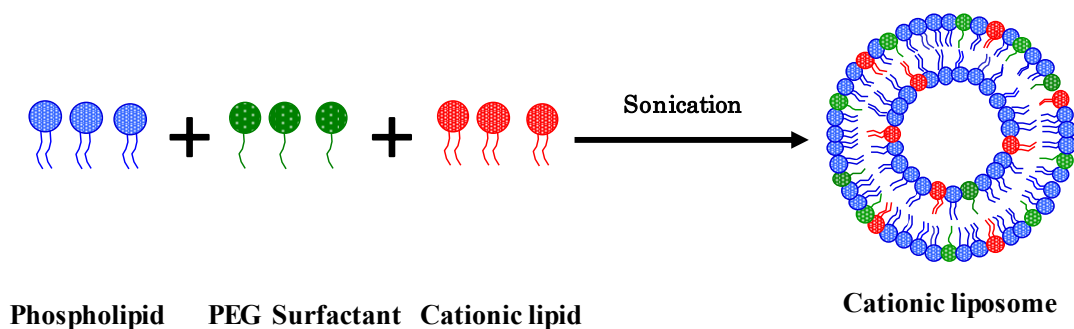


Fig. 1-1 Schematic representation of cationic liposomes.

いる $C_{12}(EO)_{21}$ 、さらに、カチオン性脂質として $2C_{14}ECl$ を加えたカチオンリポソーム(DMPC/ $C_{12}(EO)_{21}/2C_{14}ECl$)を研究素材として用いた(Fig. 1-1)。

がん細胞は正常細胞と異なる性質を持つ。例えば種々のがん細胞膜表面には、正常細胞と比べ、フォスファチジルセリン(PS)が 3~7 倍多く存在する³⁰⁾。さらに腫瘍マーカー(CA19-9)として用いられるように、がん細胞膜にはシアル酸の構造を持つ糖鎖が正常細胞より多く発現している。そのため、一般にがん細胞は陰性電荷を持つことが知られている。このような静電相互作用を利用した抗がん剤の報告はカチオンリポソーム以外ほとんど報告されていない(Fig. 1-3)。松本らによって開発されたカチオンリポソームは、*in vitro* 及び *in vivo* においてヒト腎臓がん細胞に対する、高い増殖抑制効果およびアポトーシスを誘導することが明らかとなっている^{31,32)}。また、ヒト大腸がん細胞に選択的に融合・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³³⁾。*in vivo* においては、担がんモデルマウスを用いた治療実験から延命効果³⁴⁾が明らかとなっている。また、正常動物に対する 2 週間反復投与毒性試験および体内動態試験において安全性が確認されている³⁵⁾。CL はマイナス荷電の脂質含量の多いがん細胞膜に静電的相互作用で融合蓄積しやすく、その後アポトーシスを誘導すると考えられている(Fig. 1-2)。

本研究では、ヒト大腸がん細胞およびヒト膵臓がん細胞に対するカチオンリポソームの制がん効果および治療効果について検討した。本論文は、以下の 7 章より成り立っている。第 2 章では、カチオンリポソームの膜物性について述べる。第 3 章では、カチオンリポソームのヒト大腸がん細胞に対する制がん効果について述べる。第 4 章では、カチオンリポソームのヒト膵臓がん細胞に対する制がん効果について述べる。第 5 章では、カチオンリポソームのヒト膵臓が

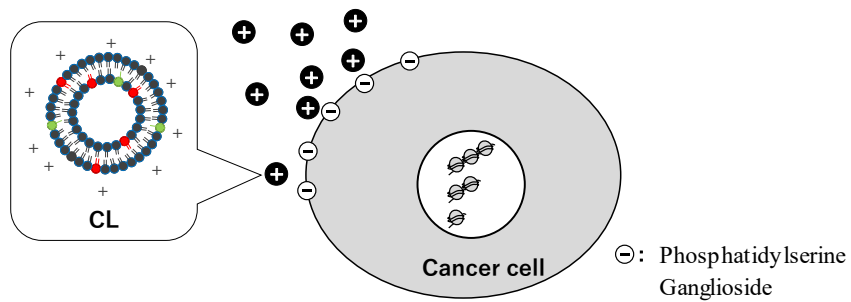


Fig. 1-2 Representation for antitumor mechanism for cationic liposome (CL).

ん細胞に対する転移浸潤抑制効果について述べる。第 6 章では、ヒト膵臓がん細胞移植モデルマウスに対するカチオンリポソームの治療効果について述べる。第 7 章は、以上の研究成果の総論である。

第2章 カチオンリポソームの膜物性

2-1 序

生体膜はリン脂質の二重膜から出来ている。この二重膜に種々の機能を持っている膜タンパクが存在している流動モザイクモデルが基本概念として受け入れられている。流動モザイクモデルは Singer と Nicolson によって提唱された³⁶⁾。このモデルでは脂質で構成される二層膜にタンパク質がはめ込まれていると仮定し、脂質とタンパク質が入り交じり、分子または分子集団が自由に膜中を移動することが出来るという特徴を持ち、現在の基本概念として支持されている³⁷⁾(Fig. 2-1)。

薬剤が生体膜を通過するためには脂質二重膜を通らねばならず、その通過機構は脂溶性の高い薬剤の受動拡散や輸送単体による輸送促進、受容体などによるエンドサイトーシスなどがある。しかし、これらには欠点がある。脂溶性の高い薬剤の受動拡散には薬剤の脂溶性が要求され、極性の薬剤は通過できない。受容体などのエンドサイトーシスには低分子の薬剤やタンパク質は輸送されるが、量が多くない³⁶⁾。

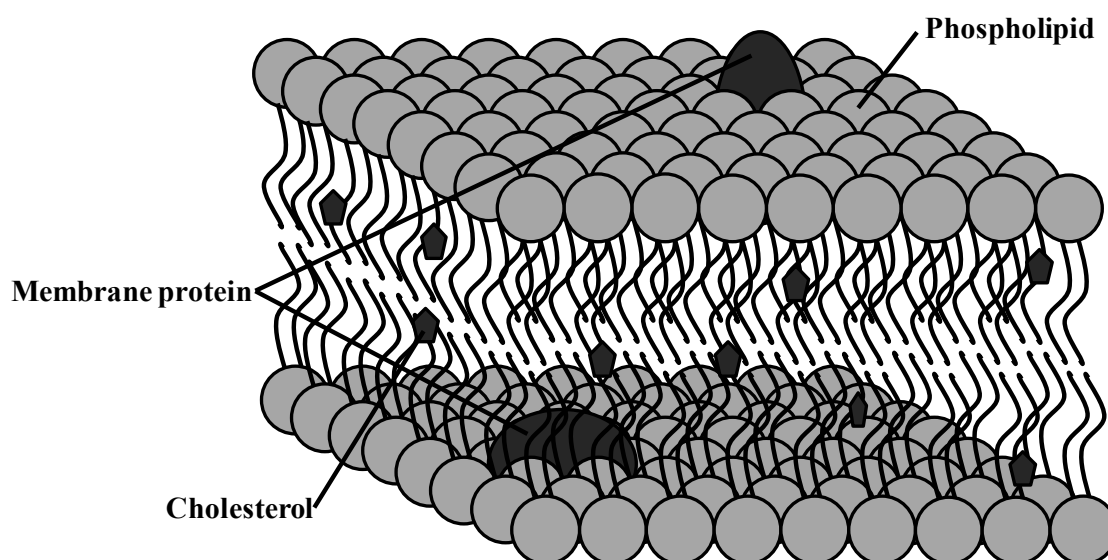


Fig. 2-1 Fluid mosaic model of cell membranes.

1964年に Bangham がレシチンの懸濁液より、ラメラ構造の二分子膜からなる小胞の形成を電子顕微鏡で見つけた。この小胞はのちにリポソームと呼ばれるようになる。脂質分子は両親媒性の物質で水中において安定な二重膜構造をとることでリポソームを形成する。調製法によって粒子径、表面電荷および硬さな

どを調節することが出来る。リポソームは、薬剤を二重膜内に内包することができるため薬物送達システム (drug delivery system : DDS)のキャリアーとして期待されている。リポソームは主に生体構成成分であるリン脂質からできているため、他の DDS 製剤と比べると毒性や抗原性が低く、安全性が高い。しかし、静脈注射による投与では肝臓や脾臓などの細網内皮系組織 (Reiculoendothelial System : RES)に高い割合で取り込まれ排出されてしまう。この欠点を解決するためにポリエチレングリコール(PEG)を用いることで RES を回避し、長時間血中滞留が可能となる³⁸⁾。また、PEG は生体内において不活性である特徴を持つ。このことから末端構造制御が容易であり、薬物キャリアの研究に数多く用いられている³⁹⁾。さらに、PEG 系リポソームは血中滞留性が高いことから、粒径を 200nm 以下にすることで EPR(enhanced permeability)効果により血管新生した腫瘍組織や炎症部位などの組織に集積しやすい³⁸⁾。このようにリポソームを薬剤として用いる際には、リポソームの安定性および物性は薬剤の保存や体内動態において重要になる。

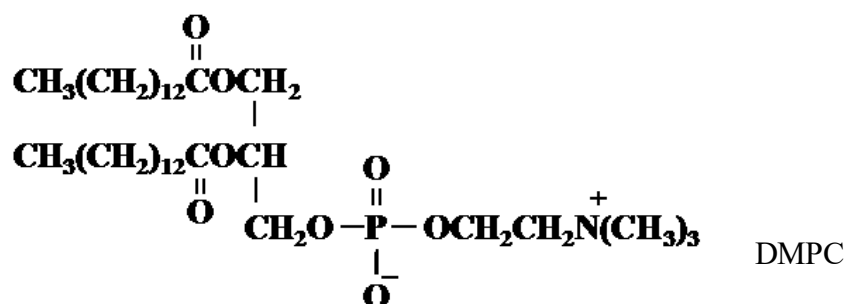
本章では、双生リン脂質である DMPC、PEG 系界面活性剤 C₁₂(EO)₂₁ 及びカチオン性脂質である 2C₁₄ECI を用いて創製したカチオンリポソームの膜物性について検討した。

2-2 実験

2-2-1 試料

<リン脂質>

L- α -ジミリストイルホスファチジルコリン(L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC))は、市販品(COATSOME MC-400、Mw-677.9、相転移温度 : 23°C、purity>99%、日本油脂(株)をそのまま使用した。以下に構造式を示す。



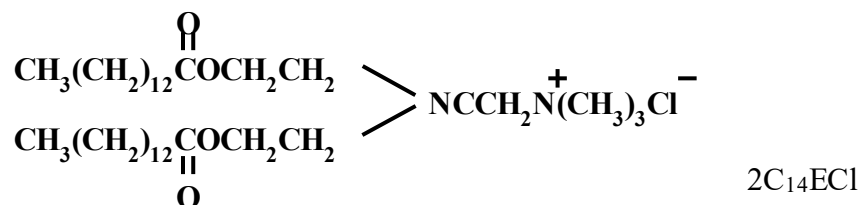
<界面活性剤>

ポロオキシエチレン(21)ラウリルエーテル(Polyoxyethylene (21) lauryl ether (C₁₂(EO)₂₁))は市販品(Mw=1110、日光ケミカルズ)をそのまま使用した。以下に構造を示す。



<カチオン性脂質>

O,O'-ジテトラデカノイル-N-(α -トリメチルランモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロライド(O,O'-ditetradecanoyl-N-(α -trimethylammonio-acetyl)-diethanolamine chloride (2C₁₄ECl))は市販品(DC-6-14、Mw=661.4、相転移温度 : 34°C、相互薬工株式会社)をそのまま使用した。以下に構造式を示す。



2-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

リン脂質(DMPC)、界面活性剤($C_{12}(EO)_{21}$)を精秤し、5%ブドウ糖溶液(大塚製薬)中でバス型超音波照射器(WT-200-M、本多電子株式会社)を用いて、窒素雰囲気下で超音波照射($45^{\circ}C, 1ml/min$)を行い、得られた均一な溶液を孔径 $0.20\mu m$ メンブレンフィルター(ADVANTEC)で濾過滅菌して試料溶液とした(Fig. 2-1)。

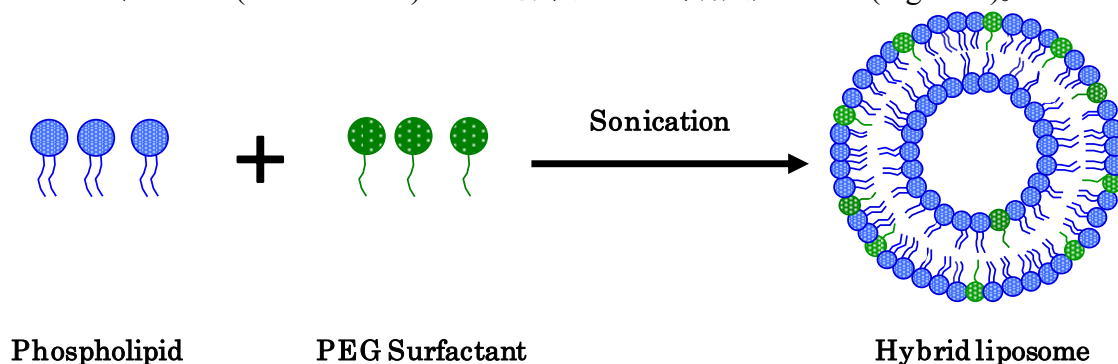


Fig. 2-1 Schematic representation of hybrid liposomes.

2-2-3 カチオンリポソームの調製

リン脂質(DMPC)、界面活性剤($C_{12}(EO)_{21}$)およびカチオン性脂質($2C_{14}ECI$)を精秤し、5%ブドウ糖溶液(大塚製薬)中でバス型超音波照射器(WT-200-M、本多電子株式会社)を用いて、窒素雰囲気下で超音波照射($45^{\circ}C, 1ml/min$)を行い、得られた均一な溶液を孔径 $0.20\mu m$ メンブレンフィルター(ADVANTEC)で濾過滅菌して試料溶液とした(Fig. 2-2)。

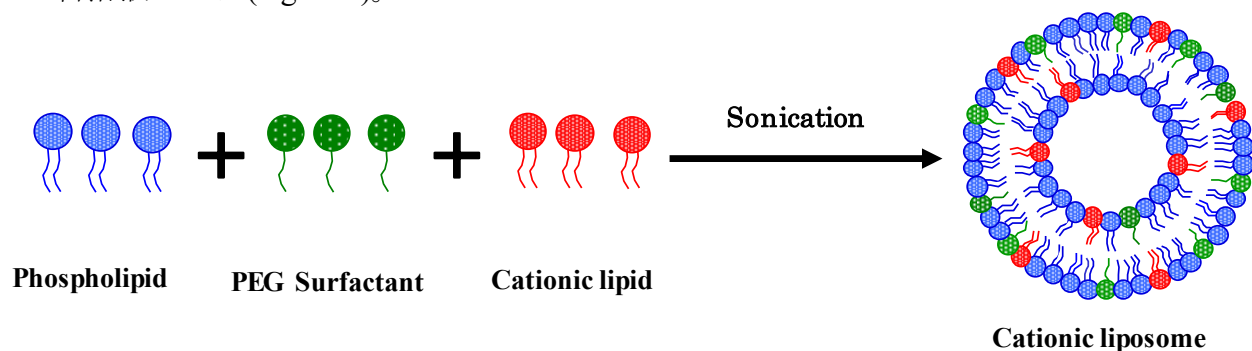


Fig. 2-2 Schematic representation of cationic liposomes.

2-2-4 動的光散乱法による膜直径の測定

膜直径(d_{hy} : hydrodynamic diameter)は光散乱光度計(ELS-Z, 大塚電気)を用い、動的光散乱法によって測定した。光源として He-Ne レーザーの 633nm を出力 10mV で用い、得られた散乱係数(D)を(1)式 Stokes-Einstein 式に従って膜直径を求めた。

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

ここで κ は Boltzmann 定数、 T は絶対温度、 η は溶媒の粘度である。

2-3 結果と考察

2-3-1 カチオンリポソームの安定性

新規抗がん剤の開発を目的として、リン脂質に DMPC、界面活性剤に $C_{12}(EO)_{21}$ 、カチオン性脂質に $2C_{14}ECI$ を用いて調製した DMPC 単一リポソーム、ハイブリッドリポソーム(95mol%DMPC/ 5mol% $C_{12}(EO)_{21}$: HL21)、カチオンリポソーム(87mol%DMPC/ 5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ / 8mol% $2C_{14}ECI$: CL)の 37°C 保存における膜直径の経時変化について動的光散乱法により検討した。また、臨床応用を視野に入れ、調製溶媒に 5%ブドウ糖溶液を用いた。

CL の膜直径(d_{hy})の経時変化を動的光散乱法により測定した結果を Fig.2-3 に示す。DMPC は不安定で、100nm~300nm 前後の膜直径であった。HL-21 は非常に不安定で調製後 7 日以降より 800nm 付近の膜直径となり経時的な膜直径の増大が確認された。CL は調製直後から安定で 100nm の膜直径で 1 ヶ月以上安定した。

以上のことから、CL は約 100nm で長期間安定な膜を形成することが明らかとなった。このことから、静脈投与の際に細網内皮系(Reticuloendothelial System : RES)回避が可能であり、臨床応用に適していることが明らかとなった。

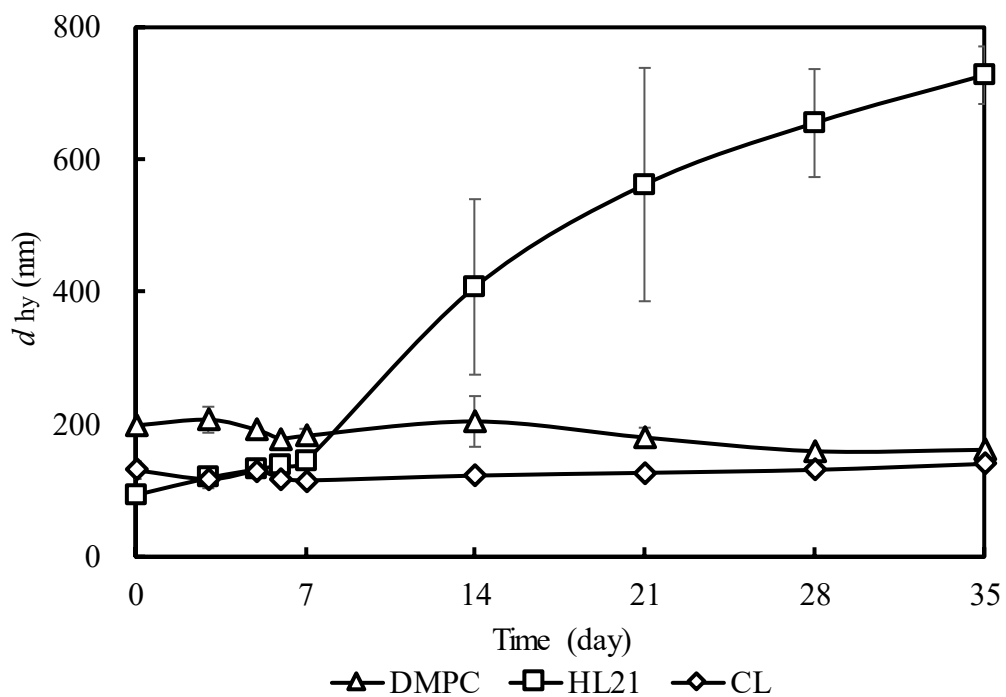


Fig.2-3 Time course of d_{hy} change for cationic liposomes composed of 87mol%DMPC, 5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ and 8mol% $2C_{14}EC1$ in 5% glucose solution at 37°C.

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

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

CL : $[DMPC]=1.0 \times 10^{-2}M$, $[C_{12}(EO)_{21}]=5.7 \times 10^{-4}M$, $[2C_{14}EC1]=9.2 \times 10^{-4}M$

2-4 総括

本章では、新規がん治療薬の創成を目的とし、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}EC1$ カチオンリポソーム(CL)の膜物性について検討し、以下のような興味深い知見が得られた。

1. 動的光散乱法による膜直径の測定から、DMPC は不安定で、100nm~300nm 前後の膜直径であった。HL-21 は非常に不安定で調製後 7 日以降より 800nm 付近の膜直径となり経時的な膜直径の増大が確認された。CL は調製直後から安定で 100nm の膜直径で 1 ヶ月以上安定した。

以上の結果から、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}EC1$ カチオンリポソーム(CL)は 37°C 保存において長期間安定な膜を形成し、生体への静脈注射の際に、細網内皮系(RES)への取り込みを回避できることが示唆され、長期保存が可能であり、臨床応用に有用できることが明らかとなった。

第3章 カチオンリポソームのヒト大腸がん細胞に対する制がん効果

3-1 序

日本の原因疾患死亡者数の割合において 1980 年から 2014 年まで悪性腫瘍による死亡者数が 1 位を占めている⁴⁰⁾。死因となる悪性腫瘍は、男性では肺がん、胃がん、大腸がんであり、女性は肺がん、大腸がん、胃がんが主に多く、罹患数および死亡数は年々増加する傾向にある。また、大腸がんの罹患率は 50 歳代から増加していき、高齢になるほど高くなる。

大腸とは小腸より太い腸という意味であり、長さは 1.5m と小腸よりも短く、盲腸、結腸および直腸から出来ている。しかし、人間の盲腸には特に役割はない。結腸は腹腔の右端を上行する上行結腸があり、次に胃の大弯に沿って上腹部を右から左に横切る横行結腸および脾臓の下端を腹腔の左端に向かう下行結腸からなる。横行結腸は間膜を持つため移動するが、上行結腸および下行結腸は後腹壁に半分埋まっているため間膜を持たない。下行結腸はさらに下部で間膜を持つ、これが S 状結腸と言われる。直腸は大腸最後の約 20cm の部分のことを指す⁴¹⁾。この結腸および S 状結腸、直腸から出来たがんを大腸がんと呼ぶ。

大腸がんは大腸粘膜の細胞から発生し、線種と呼ばれる良性な腫瘍の一部ががん化して発生するものと正常な粘膜から直接発生するものがある。大腸粘膜の表面から生じたがんは、大腸の壁を次第に浸潤し、粘膜内または粘膜下層まで進行したものを早期大腸がん、筋層よりも先まで進行したものを進行大腸がんと呼ばれている。浸潤が進行すると腹膜や肝臓、肺、リンパ節などの別の臓器へと転移する⁴²⁾。大腸がんの原因としては喫煙や運動不足、過度のアルコールの摂取によるものが多い。

大腸がんは早期に発見することにより、内視鏡的切除や手術療法により完全に治すことができる。肝臓や肺へ転移していた場合でも、早期であれば手術療法により完全な治癒を望むことができる。しかし、早期での自覚症状がないため発見が難しいと言われている。また、大腸がんの治療には多くの問題点があり、手術療法では、術後に縫合不全、創感染等の合併症が生じることがある。手術療法と並行して行われる放射線療法には、疲労感やだるさ、食欲不振などが起こりやすく、化学療法には抗がん剤による吐き気、皮膚炎、白血球の減少などの副作用があるため、副作用のない安全で効果的な抗がん剤の開発が望まれている。

本章では、カチオンリポソームの大腸がん治療への応用を目的とし、リン脂質 (DMPC)、PEG 系界面活性剤(C₁₂(EO)₂₁)及びカチオン性脂質(2C₁₄ECI)からなる 87mol%DMPC/ 5mol%C₁₂(EO)₂₁/ 8mol%2C₁₄ECIカチオンリポソーム(CL)のヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する制がんメカニズムについての検討を行った。

3-2 実験

3-2-1 試料

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

3-2-2 カチオンリポソームの調製

カチオンリポソーム(CL)は 2-2-2 と同様の方法で調整を行った。

3-2-3 動的光散乱法による膜直径の測定

動的光散乱法による測定は 2-2-3 と同様の方法で測定を行った。

3-2-4 使用細胞

ヒト大腸がん(HCT116 : CRL-247)細胞は American Type Culture Collection (ATCC)より購入したものを使用した。RPMI1640(Gibco BRL)+10% fetal bovine serum(FBS ; HyClone Laboratories Inc.)を培養培地として用い、37°C、湿度 95%、CO₂ 濃度 5%の条件で培養を行った。

ヒト正常大腸(CCD-33Co : CRL-1539)細胞は、ATCC より購入したものを使用した。EMEM(ATCC)+FBS(ATCC)を培養培地として用い、37°C、湿度 95%、CO₂ 濃度 5%の条件で培養を行った。

3-2-5 細胞膜のガングリオシド量測定

ヒト大腸がん(HCT116)細胞膜及びヒト正常大腸(CCD-33Co)細胞膜のガングリオシド(GM1)量の測定は共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ラフトマーカによる脂質染色により測定した。

情報伝達がダイナミックに制御された細胞において、細胞膜の形態変化や細胞骨格の変化、転写亢進、エンドサイトーシス、アポトーシス誘導などの動態を観察することが可能である。1960年代、下村によって *Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein(GFP)*が発見され^{43,44)}、そのペプチド鎖が自己完結的に蛍光発色することが分かって以来、次々と蛍光タンパク質が単離され、増加の一途を辿っている^{45,46)}

コレラ毒素 B サブユニット(CT-B)はそれ自体に毒性がなく、無糖質の一種である GM1 に特異的に結合することから、GM1 の細胞内分布や動態を観察する蛍光プローブとして用いられている^{47,48)}。

<CT-B ラベル法>

ヒト大腸がん(HCT116)細胞(5.0×10^4 cells/ml)及びヒト正常大腸(CCD-33Co)細胞(5.0×10^4 cells/ml)をガラスボトムディッシュで24時間培養を行った。培養後、PBS(-)で洗浄し、CT-B($10 \mu\text{g/ml}$, life technologies)を $50 \mu\text{l/dish}$ で添加後、氷中で30分染色を行った。染色後、PBS(-)で洗浄を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察後に、得られた画像から蛍光強度の定量化を行った。

3-2-6 細胞膜のホスファチジルセリン量測定

ヒト大腸がん(HCT116)細胞及びヒト正常大腸(CCD-33Co)細胞のホスファチジルセリン(PS)量の検出は、PS に選択的に結合する Annexin-V を用いてフローサイトメーターにより測定した(Fig.3-1)。

培養フラスコ(培養面積 25cm^2)に細胞を 5ml 播種し 24 時間培養後、Accutase(Innovative Cell Technologies inc.)で処理し培養フラスコから剥離を行い採取し遠心分離($3000\text{rpm}/5\text{min}$, 4°C)を行い、洗浄(2ml の PBS(-)で懸濁)し上澄みを除去した。上澄み除去後、Incubation buffer(Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche Diagnostics K.K)で希釈した Annexin-V(Incubation buffer: Annexin-V=50:1)を $100 \mu\text{l}$ 添加し、暗所・冷所にて 10~15 分染色を行った。上澄みを除去後、 $500 \mu\text{l}$ の Incubation buffer を加え、懸濁し測定試料とした。測定試料はフローサイトメーター(Epics XL system II, Beckman Coulter K.K.)を用いて PS 量の測定を行った。光源には 488nm の Ar レーザーを出力 15mW で使用し、Annexin-V の蛍光波長は FL1($500\text{-}562\text{nm}$)センターを用いて行った。相対的な PS 量は、未染色細胞の蛍光

量と染色細胞の蛍光量の比から算出した。

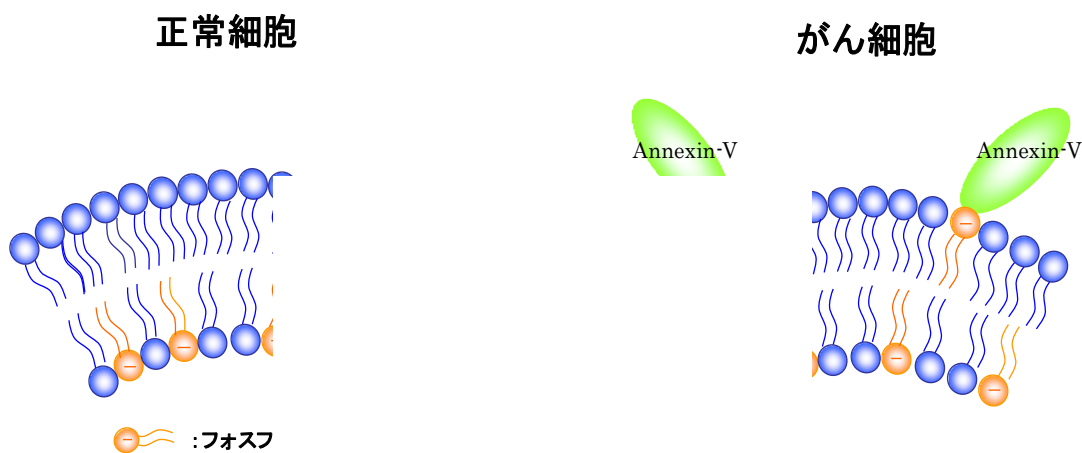


Fig.3-1 Schematic representation of Annexin-V staining assay.

3-2-7 レーザードップラー法を用いた細胞膜表面電荷の測定

レーザードップラー法はドップラー効果(光や音波が動いている物体に当たり反射あるいは散乱すると、光や音波の周波数が物体の速度に比例して変化する)を利用して粒子の泳動速度を求める方法である⁴⁹⁻⁵¹。

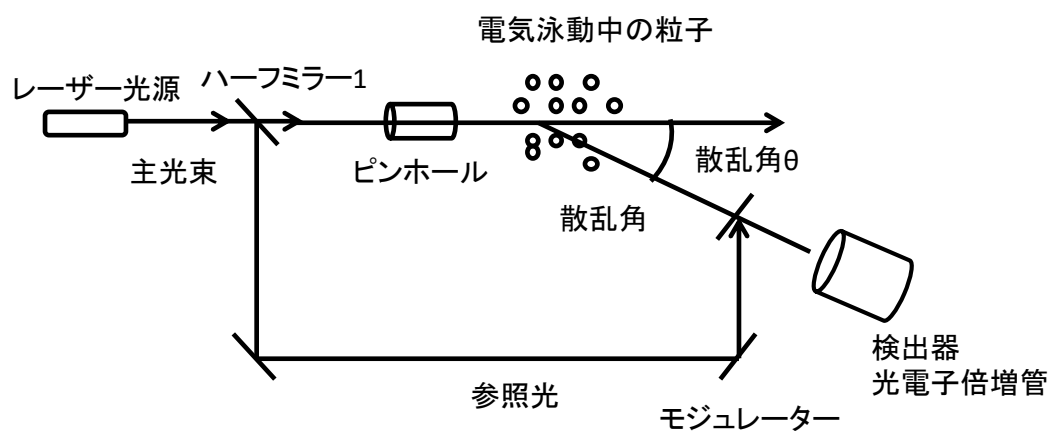


Fig. 3-2 ヘテロダイン法による電気泳動光散乱光度計の光学系.

He-レーザーを光源として、ミラー(M1, M2)、ピンホール(P1, P2)は電気泳動セル(C)と中心として回転する後にゴニオメータ上に乗せられており、散乱角(θ)は、ステップモーターにより 5~22°の範囲でスキャンできる。参照光はハーフミラー

(HM1)で主光束より取出しモジュレーター上のミラー(MD)で反射し回転可能なミラー(M3)、ハーフミラー(HM2)で散乱光と混合され、光電子増倍管(PM)によって検出される(Fig. 3-2)。

電気泳動している粒子にレーザー光を照射すると粒子からの散乱光はドップラー効果により周波数がシフトする。シフト量は粒子の泳動速度に比例することから、このシフト量を測定することにより粒子の泳動速度がわかる。シフト量を求めるためにレーザーゼータ電位計(ELS-8000, 大塚電子)ではヘテロダイン光学系を用いている⁵²⁾。これは、ドップラーシフトしている粒子から散乱光を、試料セルを通過していないレーザー光(参照光)と混合する方法である。このように異なる周波数の光を混合すると、結果として得られる光の強度はちょうどそれらの差の周波数、つまり、シフト分の周波数で変化する。これをPMで検出し、信号の周波数解析を行うことによりシフト量が求められる。なお、測定されている散乱光は散乱体積中にある無数の粒子からのものなので、この方法により短時間でゼータ電位の分布などの統計的なデータが求められる。

帯電した粒子が分散している系に外部から電場をかけると、粒子はその表面電位の符号と反対方向に泳動するが、その速度は粒子の荷電に比例するため、その粒子の泳動速度を測定し、荷電場の強さと溶媒の粘度や誘電率等の流体力学的な効果を考慮に入れて計算することでゼータ電位が求められる。ゼータ電位は固定層と拡散層の境界面に近いすべり面の電位と定義されている(Fig.3-3)。微粒子やコロイド粒子の場合、ゼータ電位の絶対値が減少すれば、粒子間の反発力は強くなり粒子の安定性は高くなる。逆に絶対値が減少すれば、粒子間の反発力は弱くなり粒子位は凝集しやすくなる。そこでゼータ電位は粒子の分散安定性の指標として用いられる⁵³⁾。

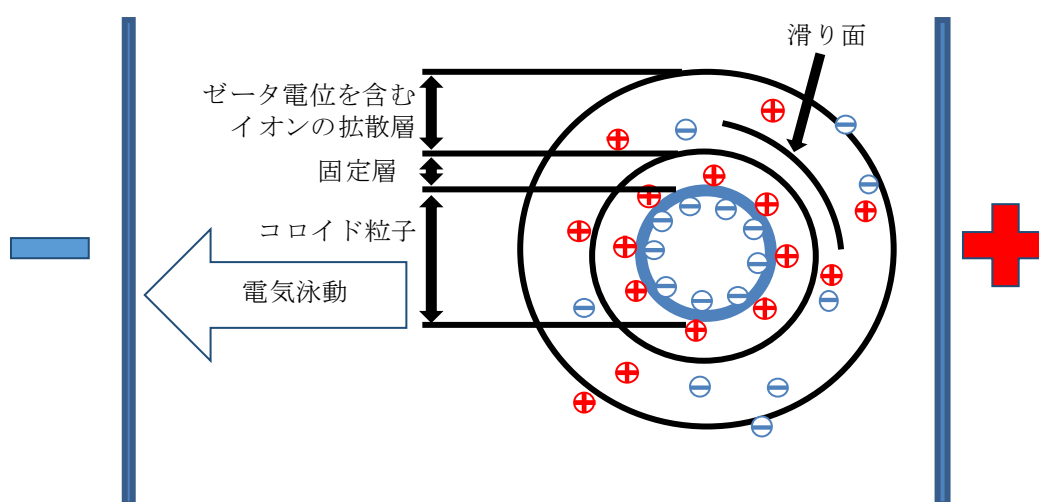


Fig. 3-3 粒子周囲の帯電状態.

レーザーデータ電位計(ELS-8000,大塚電子)を用いレーザードップラー法によりゼータ電位の測定を行った。光源として He-Ne レーザーの 632.8nm の発信線を出力 10mW で用い、散乱角 20°で測定を行った。ゼータ電位は Smoluchowski の関係式($U = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\eta}$)によって求めた。U は電気移動度、 ϵ は誘電率、 ζ はゼータ電位、 η は粘度である。

3-2-8 酵素活性測定法による 50%増殖抑制の決定

カチオンリポソーム(CL)のヒト大腸がん(HCT116)細胞及びヒト正常大腸(CCD-33Co)細胞に対する増殖抑制効果は、酵素活性測定法である WST-1 assay 法⁵⁴⁾(Fig. 3-4)より評価した。

脱水素反応において、細胞内のミトコンドリアの脱水素酵素が基質から 2 つの水素原子を引き抜くことで、1 つは水素イオンとして遊離し、1 つは酸化型である NAD⁺の 4 位のピリジン環に移され、還元体の NADH となる。この NADH は人工的電子キャリアーである 1-Methoxy PMS(1-Methoxy-5-methyl phenazinium methsulfate)によって酸化型の NAD⁺に戻され、代わりに WST-1 を還元することにより黄色の WST-1 formazan を生成する。この formazan が水に難溶な結晶として細胞表面に析出するために、吸光度測定の前に有機溶媒による formazan の溶解操作が必要である。そのため、formazan の不均一な溶解による測定誤差や溶解剤の種類による測定波長および感度の変動の問題を生じる。しかしながら、WST-1 assay 法において WST-1 formazan は、水溶性であり溶解操作が必要ないため簡便で測定誤差が少ない等の特徴を持っている。

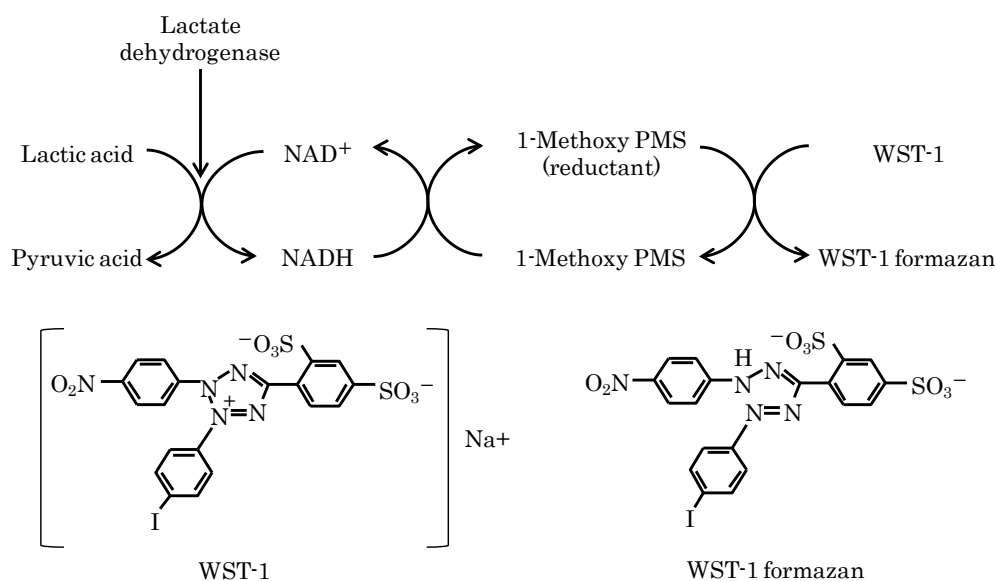


Fig. 3-4 Reaction scheme of WST-1 with NADH in the presence of 1-methoxy PMS

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

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

3-2-9 カスパー 3, -8, -9 活性測定

カスパー 3, -8, -9 活性の測定は、カスパー特異的蛍光基質 PhiPhiLux 及び CaspaLux(OncoImmunitin)を用いて検討した。PhiPhiLux はカスパー 3(Green Fluorescence, PhiPhiLux-G₁D₂)に特異的な認識配列(DEVDGI)を蛍光色素で標識した蛍光基質である。蛍光色素は二量体を形成しており、カスパー 3 により基質配列中の GI が切断されると、蛍光を発する。CaspaLux シリーズはカスパー 8 (Green Fluorescence, CaspaLux 8-L₁D₂)及びカスパー 9 (Green Fluorescence, CaspaLux 9-M₁D₂)に特異的な認識配列(IETDSG 及び LEHDG)を蛍光色素で標識した蛍光基質である。カスパー 8, -9 により基質配列中の SG 及び DG が切断されると、蛍光を発する(Fig.3-5)⁵⁵⁻⁶⁰。

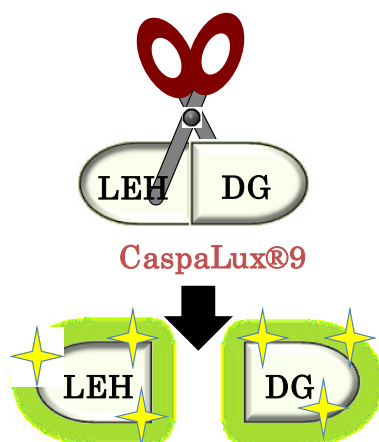


Fig. 3-5 Principle of CaspaLux

3-2-10 細胞膜脂質ラフトのクラスター形成観察

<CT-B ラベル法>

ヒト大腸がん(HCT116)細胞(5.0×10^4 cells/ml)及びヒト正常大腸(CCD-33Co)細胞(5.0×10^4 cells/ml)をガラスボトムディッシュで24時間培養を行った。培養後、PBS(-)で洗浄し、CT-B($10 \mu\text{g/ml}$)を $50 \mu\text{l/dish}$ で添加後、氷中で30分間染色を行った。染色後、PBS(-)で洗浄を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3-2-11 皮下移植モデルマウスの作製

動物は、マウス(Balb/c AJcl-nu/nu, 雌, 5週齢, 日本クレア)を使用した。室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、水及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。

動物実験は崇城大学における動物実験に関する指針及び関連法令等を遵守し崇城大学動物実験倫理委員会の承認を受けた後に実施した。

nude マウスを細胞移植翌日の腫瘍サイズをもとに層別連続無作為法により1群5匹で行った。HCT116細胞(3.0×10^6 cells/body)をマウス後背部に皮下移植(0.05ml)し、皮下移植モデルマウスを作製した。移植後は体重測定及び一般状態観察を行い、(4-1)式により皮下腫瘍の腫瘍体積を算出し評価した。

$$\text{腫瘍体積}(\text{mm}^3) = \text{長径}(\text{mm}) \times \text{短径}(\text{mm}) \times \text{短径}(\text{mm}) \times 0.5 \quad (4-1)$$

3-2-12 皮下移植モデルマウスに対する治療実験

HCT116細胞は生理食塩水に懸濁し、懸濁液 0.05ml を 3.0×10^6 cells/bodyとなるようにマウス後背部皮下に接種した。移植翌日の腫瘍サイズをもとに層別連続無作為法により、Control群、DMPC投与群、HL投与群、CL投与群の4群に分けた。群分け当日より試料を尾静脈から 10ml/kg 投与し、1日1回、14日間投与を行った。投与終了翌日に麻酔下で解剖し、腫瘍の観察及び腫瘍重量の測定を行った。なお、投与期間中の腫瘍体積は(4-1)式に基づき算出した。

3-2-13 TUNEL法によるアポトーシスの検出

CLの*in vivo*におけるアポトーシス誘導の観察は、TUNEL法を用い組織切片観察により行った⁶¹⁾。

アポトーシスが誘導されるとヌクレオソーム単位での DNA の断片化が起こり、3'-OH DNA 末端が生成される。この 3'-OH DNA 末端をテンプレートに依存せずに二本鎖 DNA 分解物の平滑末端を標識可能な TdT(Terminal deoxynucleotidyl Transferase)を酵素として用いて、ジコキシゲニン標識ヌクレオチドを結合させた。結合したジコキシゲニンを免疫組織化学的に発色させることで、アポトーシス誘導した細胞を検出することができる。

実験方法は、マウス(nude マウス, 雌, 5 週齢) のマウス後背部に HCT116 細胞を皮下移植し、移植翌日より 14 日間投与した。投与終了翌日に麻酔下で皮下腫瘍を採取し、中性ホルマリン溶液を用いて組織固定し、パラフィン切片を作成した。その後、蒸留水及び PBS(-)で洗浄し、プロテアーゼ処理及び過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを除去した。標本を PBS(-)で洗浄し、3-3'-diaminobenzine(DAB)溶液を加え染色し、さらにメチルグリーンを用いて核を染色した。組織切片の観察は Nikon DS カメラコントロールユニットで行った。

3-3 結果と考察

3-3-1 ヒト大腸がん細胞の膜物性

細胞膜の GM1 量測定の結果を Fig. 3-6 に示す。正常大腸細胞である CCD-33Co 細胞と比較して HCT116 細胞は CT-B の高い蛍光強度が測定され、GM1 量が多いことが確認された。

細胞膜のホスファチジルセリン量測定の結果を Fig. 3-7 に示す。CCD-33Co 細胞と比較して HCT116 細胞は Annexin-V の高い蛍光強度が測定され、細胞外膜のホスファチジルセリン量が多いことが明らかとなった。

レーザードップラー法を用いた細胞膜表面電荷の測定の結果を Fig. 3-8 に示す。CCD-33Co 細胞と比較して HCT116 細胞は表面電荷が低く、アニオン性に荷電していることが示唆された。

以上の結果から、CL はよりアニオン性に富んでいる HCT116 細胞に対し特異的に集積することが示唆された。

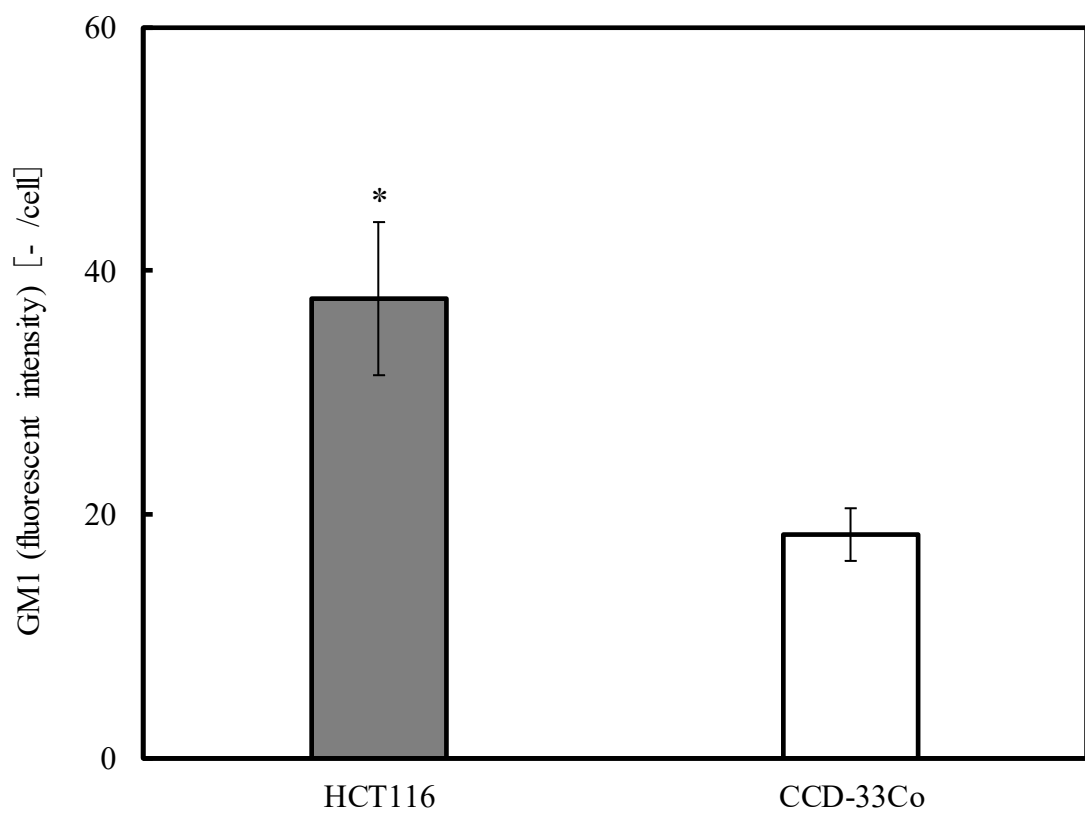


Fig. 3-6 Fluorescent intensity of GM1 for CCD-33Co and HCT116 cells.
*: $p < 0.05$ (vs. CCD-33Co cells).

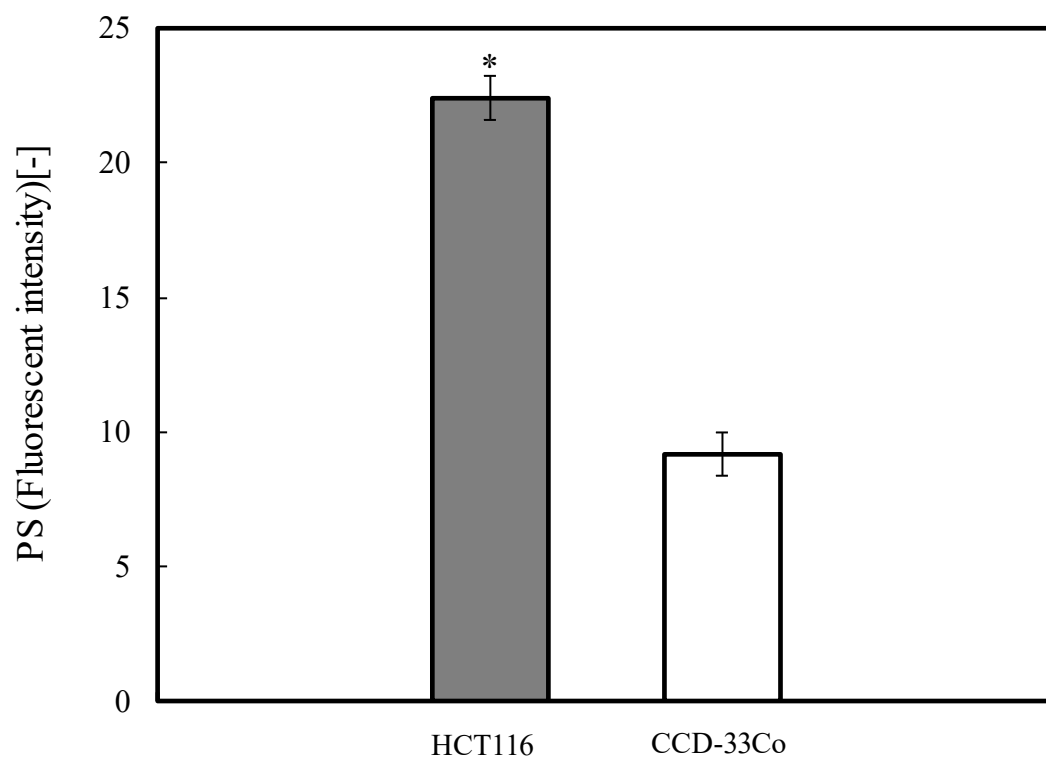


Fig. 3-7 Fluorescent intensity of PS for CCD-33Co and HCT116 cells.
* $p < 0.05$ (vs. CCD-33Co cells).

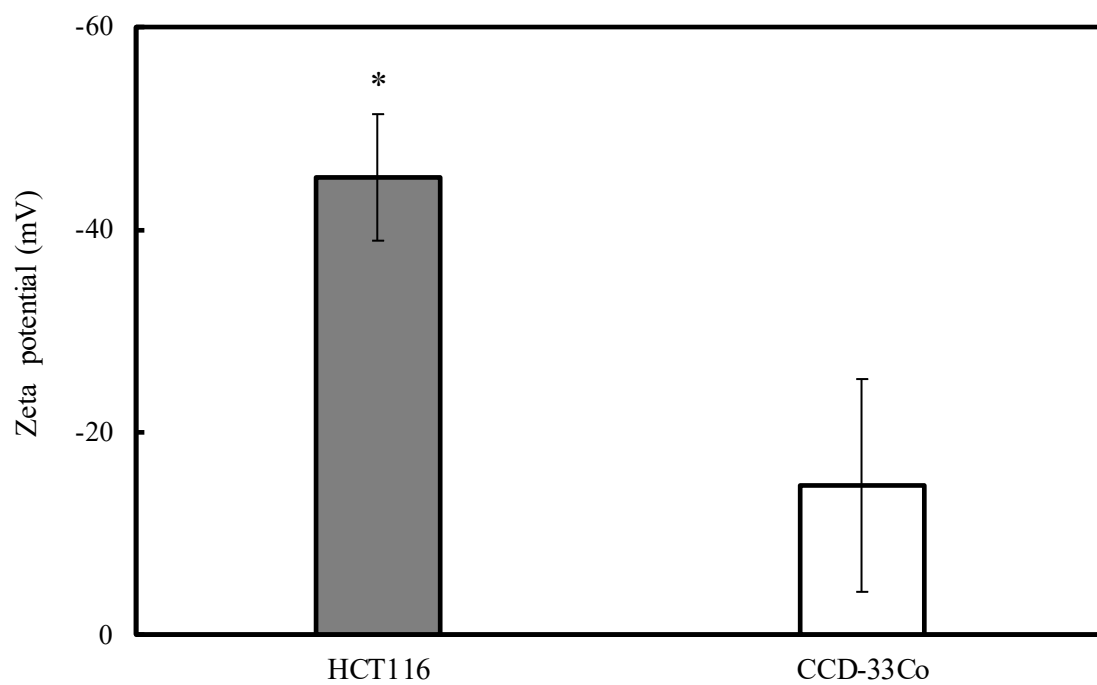


Fig. 3-8 Zeta potential of HCT116 and CCD-33Co cells.

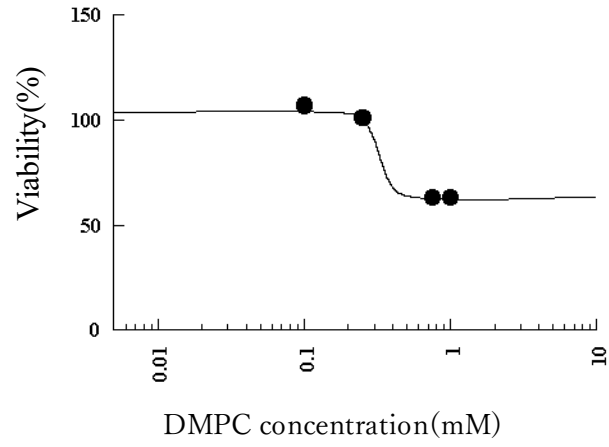
* $p < 0.05$ (vs. CCD-33Co cells).

3-3-2 ヒト正常大腸細胞の増殖に及ぼす影響

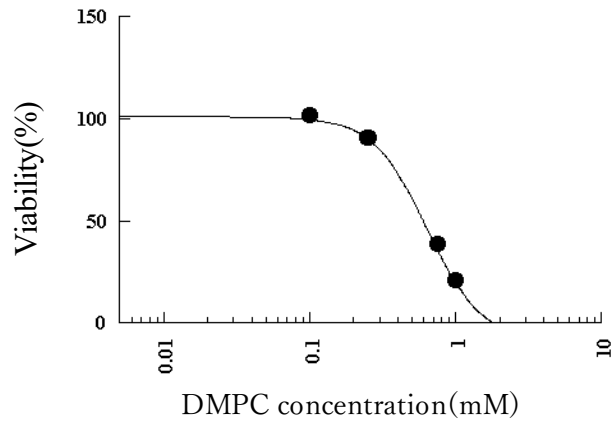
HL21 及び CL のヒト大腸(CCD-33Co)細胞に対する 50%増殖抑制濃度(IC₅₀ : 50% Inhibitory Concentration) について検討した。結果を Fig.3-9 ~Fig.3-10、Table3- に示す。CCD-33Co 細胞に対する DMPC、HL21 及び CL の IC₅₀ 値は、HCT116 細胞の IC₅₀ 値³³⁾と比較して高い値を示した。特に CL の IC₅₀ 値は HCT116 細胞と比較して3倍以上の高い値を示した。

前節において、HCT116 細胞は CCD-33Co 細胞と比較し、細胞膜表面及び細胞外膜はアニオン性に富んでいることが明らかとなった。また CL は CCD-33Co 細胞に対する毒性が低く、アニオン性に富んだ HCT116 細胞に対し選択的に顕著な増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

DMPC



HL21



CL

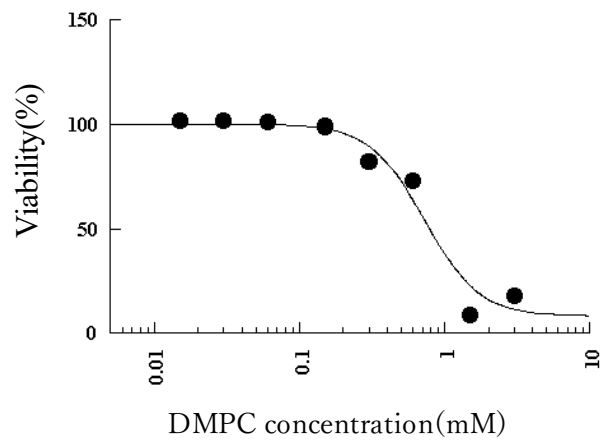


Fig. 3-9 Viability of DMPC, HL21 and CL on the growth of CCD-33Co cells

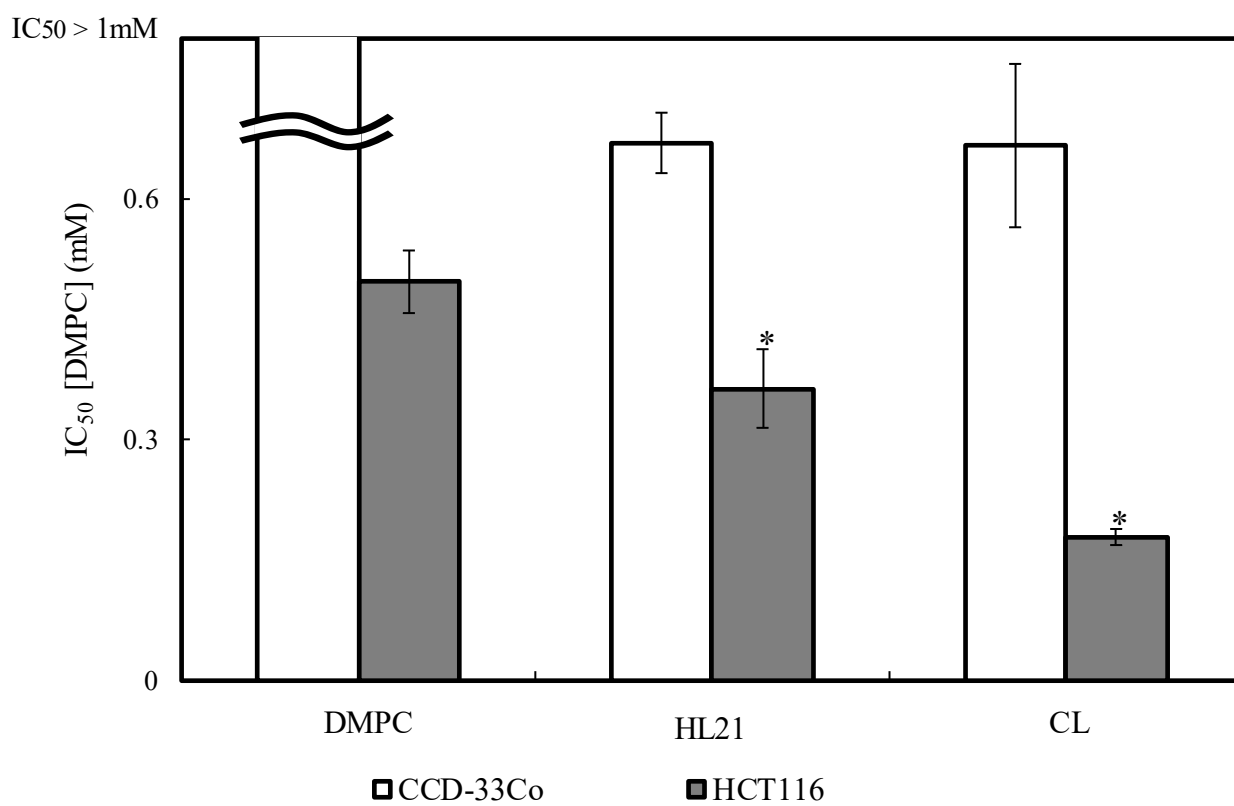


Fig. 3-10 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of DMPC, HL21 and CL on the growth of HCT116 and CCD-33Co cells. Data represent the mean ± S.D.
 * $p < 0.05$ (vs. CCD-33Co cells.)

Table 3-1 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of DMPC, HL and CL on the growth of HCT116 and CCD-33Co cells.

Sample	50% inhibitory concentration (mM)	
	HCT116 ³³)	CCD-33Co
DMPC	[DMPC]=0.497±0.039	[DMPC]=N.D.
HL21	[DMPC]=0.364±0.049 [C ₁₂ (EO) ₂₁]=0.0191±0.0026	[DMPC]=0.670±0.3763 [C ₁₂ (EO) ₂₁]=0.035±0.020
CL	[DMPC]=0.179±0.01 [C ₁₂ (EO) ₂₁]=0.010±0.0003 [2C ₁₄ ECI]=0.016±0.0005	[DMPC]=0.667±0.1017 [C ₁₂ (EO) ₂₁]=0.038±0.0058 [2C ₁₄ ECI]=0.0613±0.0094

Data represent the mean ± S.D.

3-3-3 ヒト大腸がん細胞に対するアポトーシス誘導

CL は大腸がん(HCT116)細胞に対してアポトーシスを誘導することが既に明らかとなっている³⁴⁾。

CL のアポトーシス誘導メカニズムについて PhiPhiLux 及び CaspaLux による細胞内カスパー-3, 8, 9 活性のを共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果を Fig. 3-10 に示す。写真から明らかなように、HL21 及び CL で処理した細胞では、PhiPhiLux 及び CaspaLux の緑色蛍光が観察され、カスパー-3,-8,-9 の活性が示された。

以上の結果から CL の HCT116 細胞に対するアポトーシス誘導においてカスパー-3, 8, 9 の活性化が関与していることが明らかとなった。

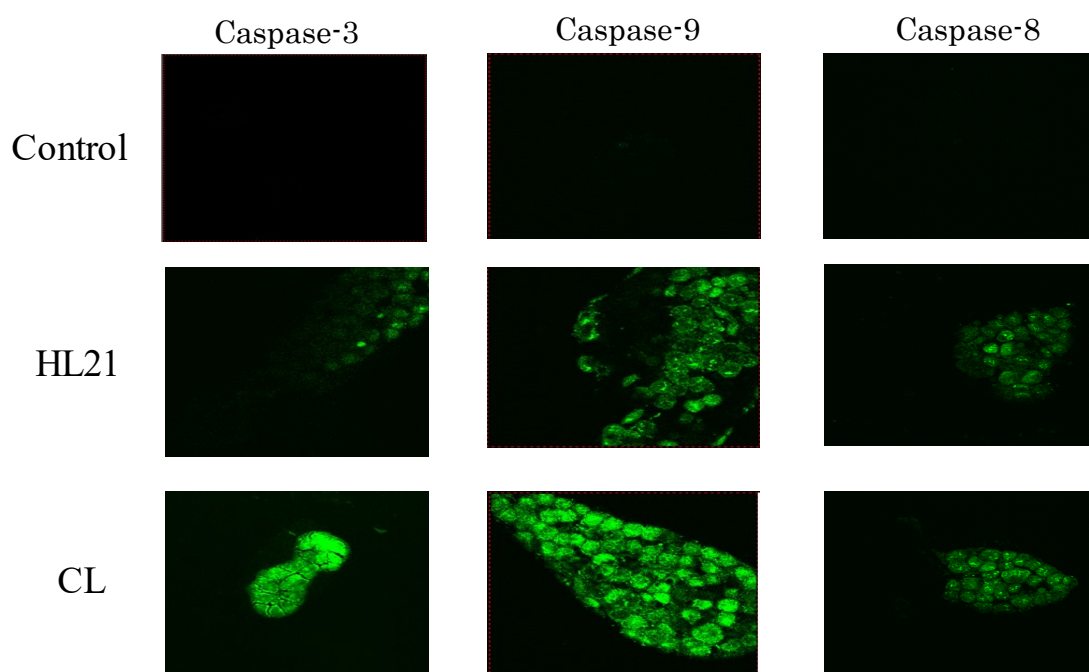


Fig. 3-10 Activation of caspase-3, 8, 9 in HCT116 cells after the treatment with CL.

HL : [DMPC]=11.4mM, [C₁₂(EO)₂₁]=0.60mM.

CL:[DMPC]=11.4mM,[C₁₂(EO)₂₁]=0.67mM, [2C₁₄EC]=1.06mM.

3-3-4 細胞膜脂質ラフトに対するクラスター形成

CLのHCT116細胞に対する細胞膜脂質ラフトのクラスター形成について検討した。結果をFig. 3-11に示す。

Controlでは、細胞膜は均一で安定した膜構造を保っていた。一方、HL21及びCLでは細胞膜の不均一化がみられ、特にCL下は著しい不均一化が確認された。

以上の結果より、CLはHCT116細胞膜脂質ラフトのクラスターを形成することが明らかとなった。

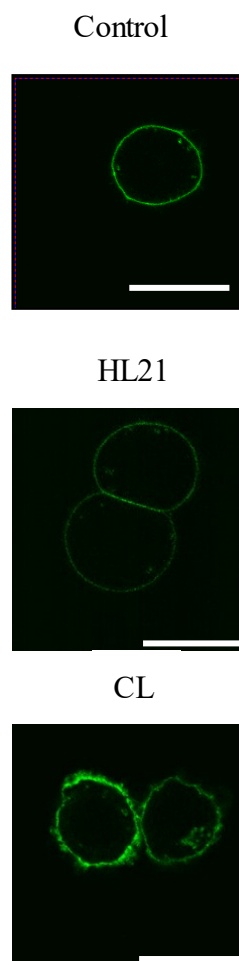


Fig. 3-11 Fluorescence micrographs of CT-B-labeled HCT116 cells treated with CL for 10 min.

HL : [DMPC]=11.4mM, [C₁₂(EO)₂₁]=0.60mM.

CL : [DMPC]=11.4mM,[C₁₂(EO)₂₁]=0.67mM, [2C₁₄ECI]=1.06mM.

3-3-5 皮下移植モデルマウスに対する治療効果

CLの *in vivo* における治療効果を検討するため、*nude* マウスを用いて HCT116 細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験を行った。投与期間中の体重測定の結果を Fig. 3-12 に示す。DMPC 投与群及び HL21 投与群、CL 投与群で異常な体重変化は見られず、Control 群と同様の体重推移で経時的に増加し、各試料の毒性はみられなかった。

投与期間中の腫瘍体積測定の結果を Fig. 3-13, に示す。投与終了翌日の平均腫瘍体積は、Control 群 1097mm³、DMPC 投与群 672mm³、HL21 投与群 638mm³、CL 投与群 263mm³ となり、Control 群と比較して、CL 投与群で腫瘍増大に対する有意な抑制効果が確認された。

投与終了翌日に麻酔下で解剖して腫瘍観察を行った結果を Fig. 3-14 に示す。肉眼的観察から、Control 群に比べ、CL 投与群では腫瘍が約 1/2 の大きさとなっており、顕著な治療効果が明らかとなった。

腫瘍重量の測定結果を Fig. 3-15 に示す。腫瘍の平均重量は、Control 群 0.3g、DMPC 投与群 0.34g、HL 投与群 0.27g、CL 投与群 0.1g ($p < 0.05$) であり、Control 群と比較して CL 投与群では 1/3 となる顕著な治療効果が明らかとなった。

以上のことから CL の HCT116 細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果が明らかとなった。

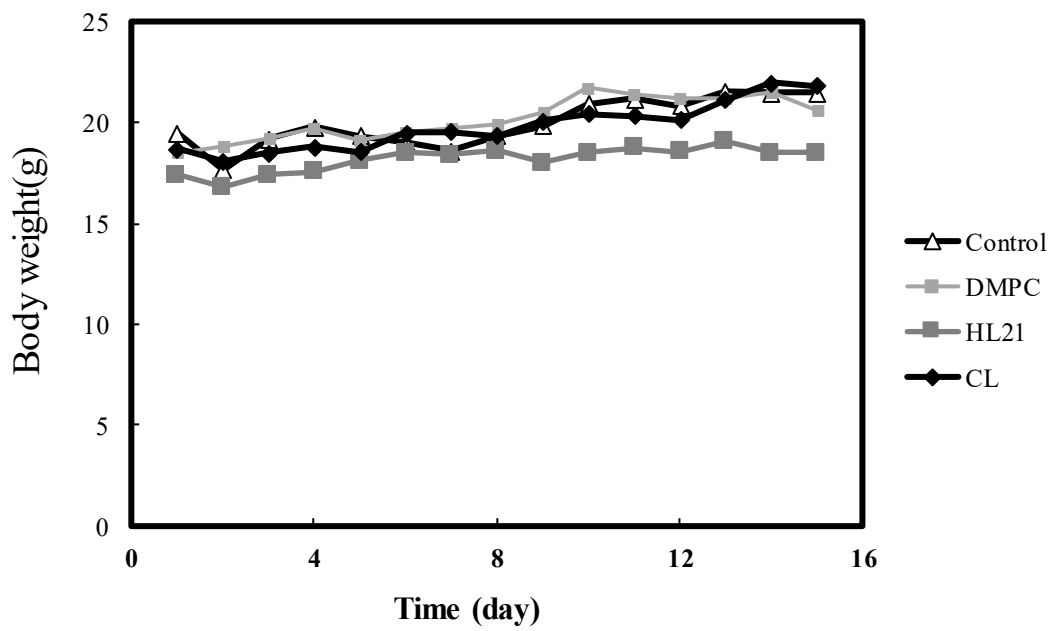


Fig. 3-12 Body weight change in xenograft model mice treated with CL after subcutaneous inoculation of HCT116 cells.

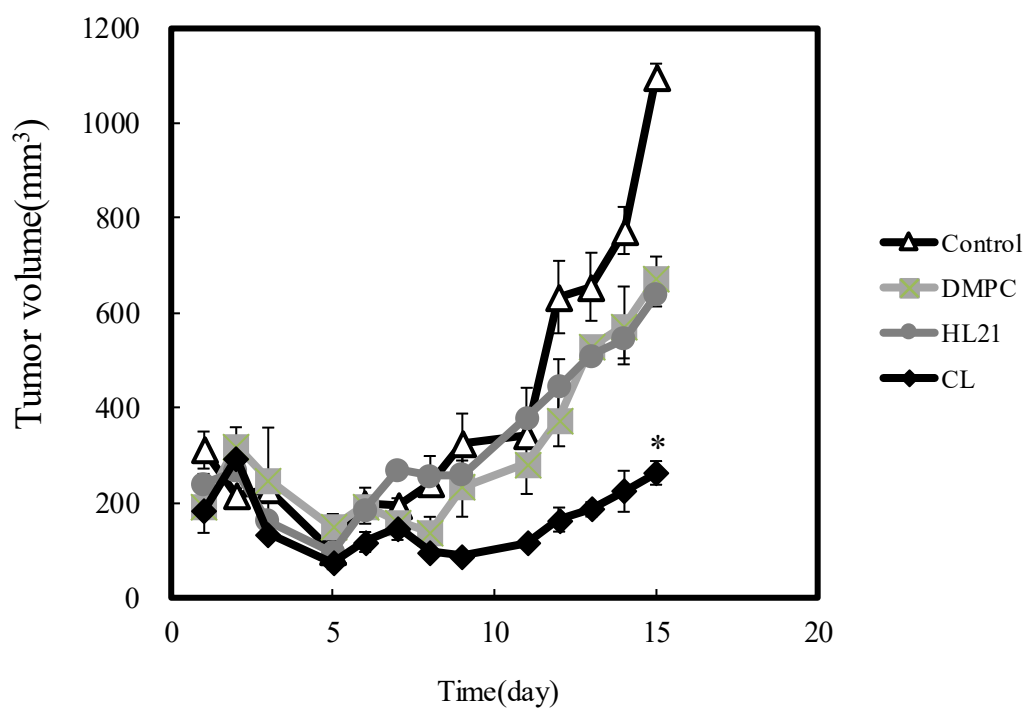


Fig. 3-13 Suppression of tumor growth in xenograft model mice treated with CL after the inoculation of HCT116 cells.

* $p < 0.05$ (vs. CCD-33Co cells.)

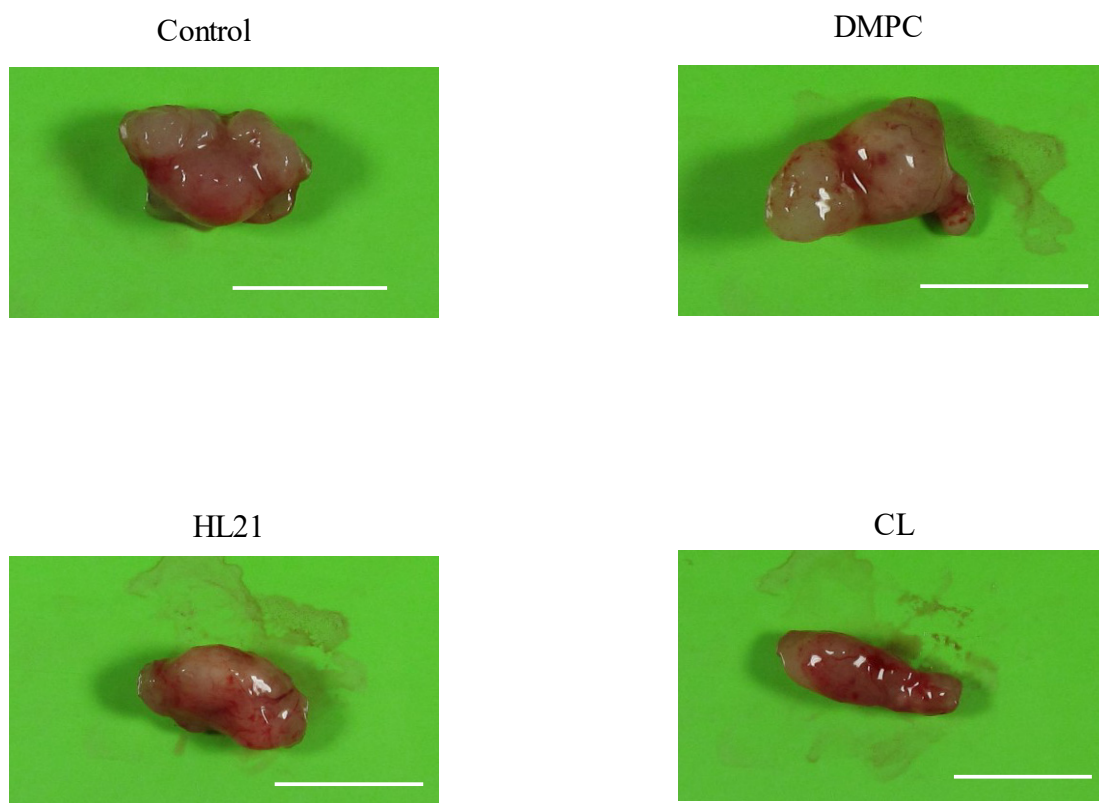


Fig. 3-14 Photographs of tumor in xenograft model mice treated with CL after the inoculation of HCT116 cells. Scale bar : 1.0 cm

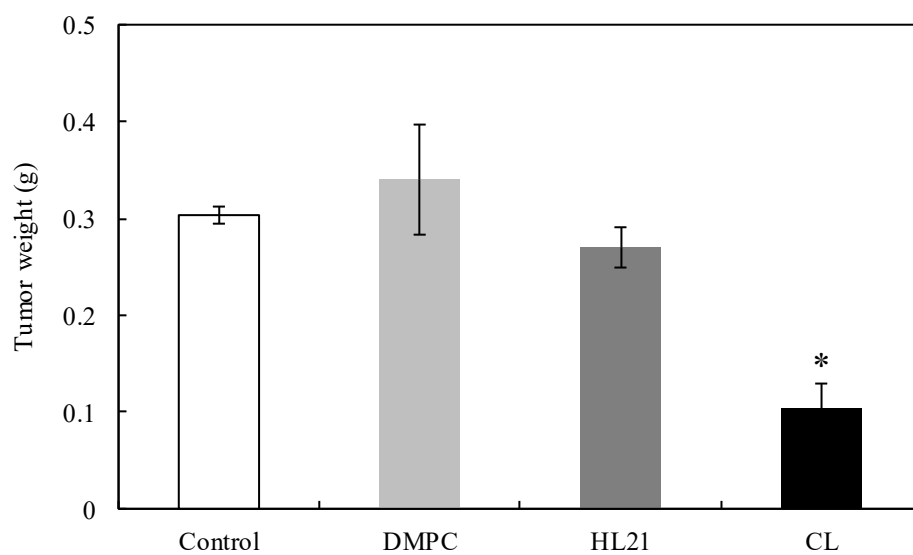


Fig.3-15 Tumor weight of xenograft model mice treated with CL after the inoculation of HCT116 cells.

* $p < 0.05$ (vs. Control.)

3-3-6 ヒト大腸がん細胞皮下移植モデルマウスに対するアポトーシス誘導

CL の *in vivo* における皮下腫瘍モデルマウスに対する腫瘍組織の細胞死メカニズムについて検討した。投与終了翌日に解剖により皮下腫瘍を採取後、パラフィン切片を作製し、TUNEL 法により顕微鏡観察を行った。結果を Fig. 3-16 に示す。

HL21 投与群および CL 投与群においてアポトーシスを誘導した細胞が見られ、特に CL では多くのアポトーシス細胞が観察され、*in vivo* におけるアポトーシス誘導が明らかとなった。

以上の結果から、担がんモデルマウスに対する HL21 および CL の治療効果は、アポトーシス誘導を伴うことが明らかとなった。

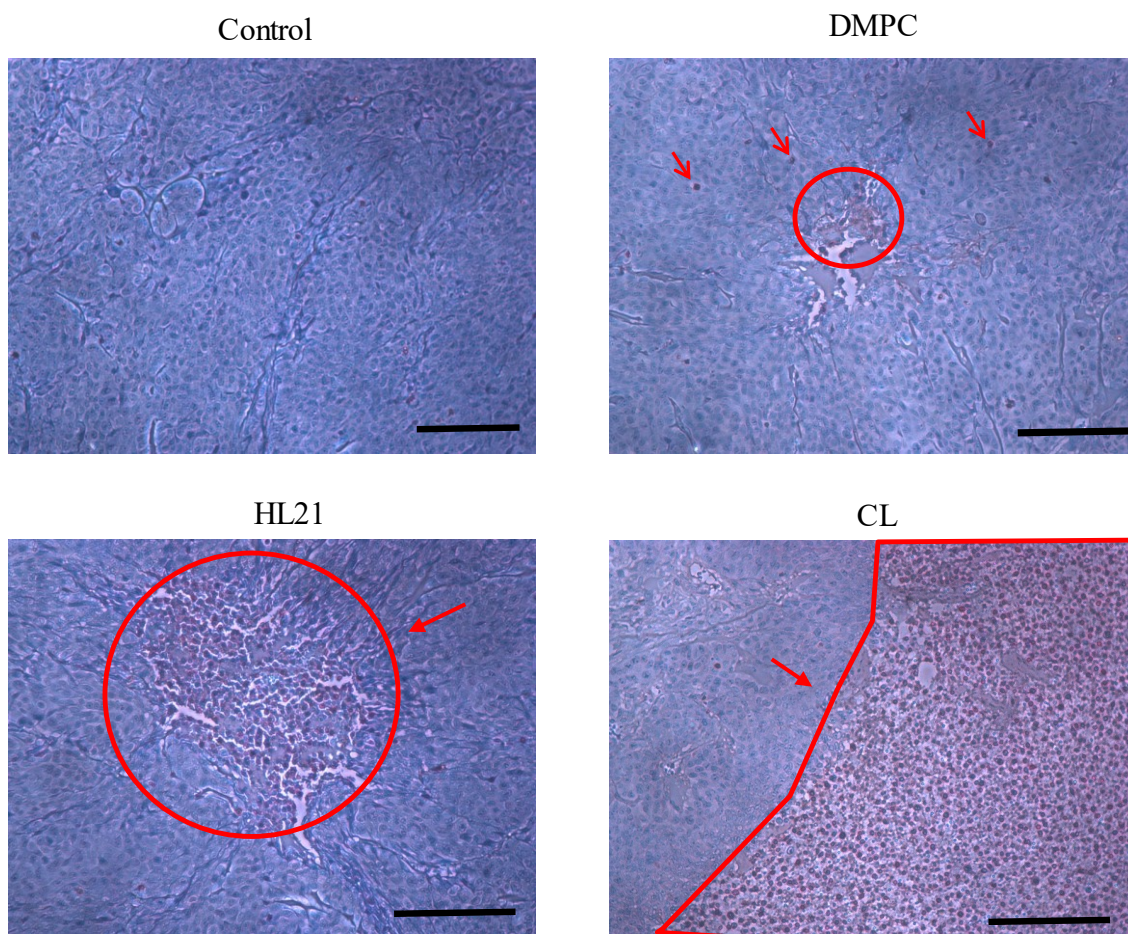


Fig. 3-16 Micrographs of subcutaneous tumor in xenograft model mice treated with CL using TUNEL method.

Arrow: apoptotic cells. Scale bar : 0.5cm, $\times 200$.

3-4 総括

本章では 87mol%DMPC/5mol%C₁₂(EO)₂₁/8mol%2C₁₄ECl カチオンリポソーム(CL)のヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する制がん効果を検討し、以下のような興味深い知見が得られた。

1. HCT116 細胞は CCD-33Co 細胞と比較し、GM1 量及び PS 量が多いことが明らかとなり、細胞膜表面はアニオン性に富んでいることが明らかとなった。また CL は CCD-33Co 細胞に対する毒性が低く、アニオン性に富んだ HCT116 細胞対し選択的に顕著な増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。
2. Control ではカスペース-3, 8, 9 の活性化を示す PhiPhiLux 及び CaspaLux の緑色蛍光が観察されず、CL で処理した細胞では、緑色蛍光が観察され、CL の HCT116 細胞に対するアポトーシス誘導においてカスペース-3, 8, 9 の活性化が関与していることが明らかとなった。
3. Control では、細胞膜は均一で安定した膜構造を保っていた。一方、HL 及びカチオン HL では細胞膜の不均一化が確認され、特に CL では著しい不均一化がみられ、CL は HCT116 細胞膜脂質ラフトのクラスターを形成することが示唆された。
4. 皮下移植モデルマウスに対する治療実験において、マウスの重量変化では、DMPC 投与群及び HL 投与群、CL 投与群で異常な体重変化は見られず、Control 群と同様の体重推移で経時的に増加した。また、皮下腫瘍体積では Control 群と比較して、CL 投与群で有意な腫瘍増大の抑制効果が確認された。肉眼的観察から Control 群に比べ、CL 投与群では腫瘍の大きさが約 1/2 となり、また、腫瘍重量では Control 群と比較して CL 投与群では 1/3 となる顕著な治療効果が明らかとなった。
5. 皮下移植モデルマウスに対する治療実験において、TUNEL 染色による皮下腫瘍組織切片の画像解析から、CL 投与群において多くのアポトーシス誘導細胞が多く観察され、*in vivo* におけるアポトーシス誘導が明らかとなった。

以上の結果から 87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECI$ カチオンリポソームはヒト正常大腸(CCD-33Co)細胞に対し低毒性で、ヒト大腸がん(HCT116)細胞に対し高い増殖抑制効果を示した。大腸がん細胞に対する CL のアポトーシス経路は、ミトコンドリアを介してカスパーズ-9, 3 を活性化する経路、カスパーズ-8, 9, 3,を活性化する経路を明らかにした。正常大腸細胞と比較して、大腸がんは細胞表面及び細胞外膜がアニオン性に富んでることが明らかとなり、CLは大腸がん細胞に選択的に融合・蓄積しアポトーシスを誘導したと考えられる。また、*in vivo*においてヒト大腸がん(HCT116)細胞皮下移植モデルマウスに対してアポトーシスを誘導し、治療効果を示していることが明らかとなった。

第4章 カチオンリポソームのヒト膵臓がん細胞に対する制がん効果

4-1 序

膵臓がんの罹患率は60歳頃から増加していき、高齢になるにつれて高くなる。さらに、膵臓がんの死亡率は1980年代後半まで増加し、1990年以降は緩やかに増加する傾向にあり、男女別でみた死亡率は、男性の方が高く、女性の約1.6倍となっている。罹患数と死亡数はほぼ等しく、罹患者は生存率の低さと関連している。膵臓がんを起こす危険因子としては糖尿病、慢性膵炎、肥満、喫煙が挙げられている。この中でも喫煙は確立した危険因子である。

膵臓は体の深部に位置し、胃や肝臓、胆のう、脾臓に囲まれているため、がんが発生しても見つけるのが非常に難しく、早い段階での自覚症状もないため、大腸がんや胃がんのように早期のうちに発見が難しいとされている。膵臓がんが発見された時にはすでに進行していることが多い。

膵臓がんは発見された段階での進行具合によってステージが分けられる。先ほど述べたように初期症状に乏しいためほとんどの場合、他の臓器への転移しており、ステージⅡ以降で発見される。

膵臓がんの治療は手術による切除が可能なステージ1,2では手術を行う⁶²⁾が、肝臓や肺などへの転移や血管へがんが広がっていることが多いため、すでに手術不可能である。そのため、放射線療法と薬物療法を併用する療法が標準治療の1つとされている。薬物療法では、5-フルオロウラシル(5-FU)を用いたFOLFRINOX療法やゲムシタビン塩酸塩単剤治療などが挙げられる。ゲムシタビン塩酸塩は、進行および再発した膵臓がんに対し、初めて延命効果が証明された抗がん剤で、5-FUを用いた結果よりゲムシタビン塩酸塩を用いた療法では生存率が高いことが報告されている⁶³⁻⁶⁵⁾。さらに、エルロチニブとゲムシタビン塩酸塩を併用して行う治療も生存期間の延長が得られている⁶⁶⁾。しかし、化学療法には重篤な副作用⁶⁷⁾があり、併用する組み合わせによっては、単独で使用する場合よりも強い副作用⁶⁸⁾がでることが問題となっているため、副作用のない抗がん剤が求められている。

本章では、カチオンリポソームのCA19-9を腫瘍マーカーとする膵臓がん治療への応用を目的とし、リン脂質(DMPC)、PEG系界面活性剤(C₁₂(EO)₂₁)およびカチオン性脂質(2C₁₄ECl)からなる87mol%DMPC/5mol%C₁₂(EO)₂₁/8mol%2C₁₄EClから成るカチオンリポソームのヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞に対する制がんメカニズムおよび転移・浸潤抑制効果について検討した。

4-2 実験

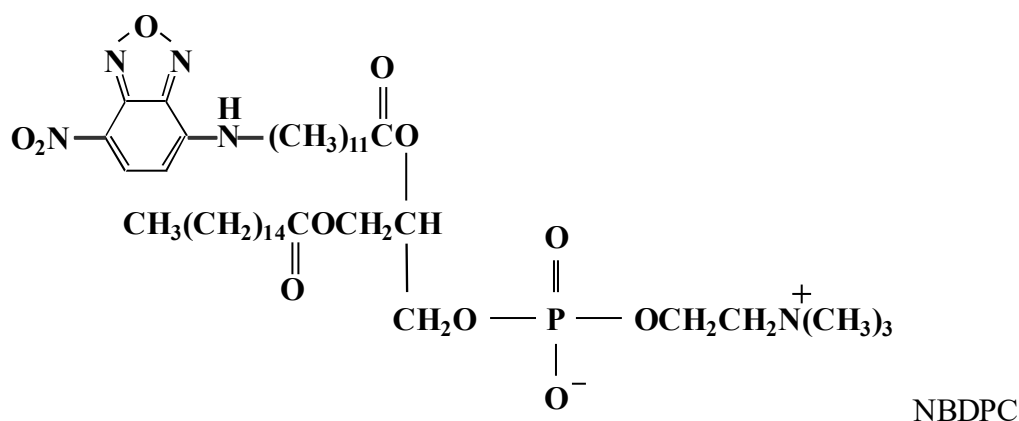
4-2-1 試料

リン脂質(DMPC)、界面活性剤(C₁₂(EO)₂₁)およびカチオン性脂質(2C₁₄ECI)は 2-2-1 と同様のものを使用した。

<蛍光標識脂質>

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

以下に構造式を示す



4-2-2 カチオンリポソームの調製

カチオンリポソームの調製は 2-2-3 と同様の方法で行った。

4-2-3 蛍光脂質含有カチオンリポソームの調製

蛍光脂質含有カチオンリポソームは、リン脂質(DMPC)、界面活性剤(C₁₂(EO)₂₁)、カチオン性脂質(2C₁₄ECI)および蛍光標識脂質(NBDPC)を 83 : 5 : 8 : 4 の割合で精秤し、5%ブドウ糖溶液(大塚製薬)中でバス型超音波照射器(WT-200-M、本多電子株式会社)を用いて、窒素雰囲気下で超音波照射(45°C, 1ml/min)を行い、得られた

均一な溶液をメンブレンフィルター(孔径 0.20 μm , セルロースアセテート材質:13CP020AS, ADVANTEC)で濾過滅菌して試料溶液とした。

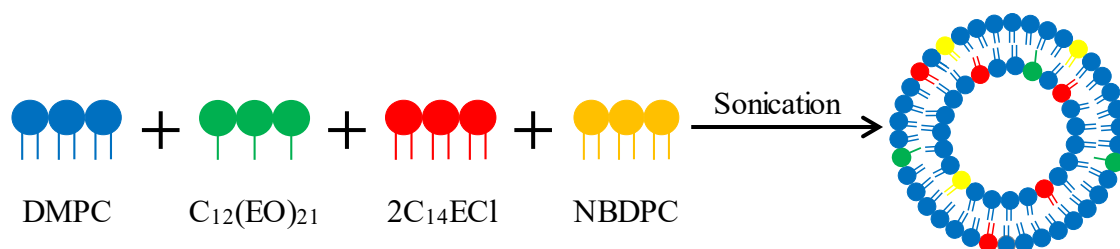


Fig. 4-1 Schematic representation of cationic liposomes including NBDPC.

4-2-4 使用細胞

ヒト膵臓がん(BxPC-3 : CRL1687)細胞は行商ファーマインターナショナル株式会社(ATCC)より購入したものを使用した。RPMI1640(Gibco BRL)+10% fetal bovine serum(FBS : HyClone Laboratories Inc.)を培養培地として用い、37°C、湿度 95%、CO₂ 濃度 5%の条件で培養を行った。

4-2-5 ラット由来正常膵臓細胞の採取

ラット由来正常膵臓細胞は、ラット(Jcl : Wistar、雄、日本クレア)の総胆管よりコラゲナーゼを注入した後に、膵臓を摘出し、コラゲナーゼ溶液中で振盪培養を行った後はさみを用いて細かくした。その後、70 μm ナイロンセルストレイナー(BD Falcon™)を通し、10%FBS 含有 RPMI 培地で培養した⁶⁹⁾。

4-2-6 細胞膜のガングリオシド量測定

ヒト膵臓細胞のガングリオシ(GM1)量を 3-2-5 と同様の方法で測定した。

ヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞及びラット由来正常膵臓細胞(5.0×10^4 cells/ ml)を播種後 24 時間培養した。その後、Cell Scraper で回収し PBS(-)で洗浄、Cholera toxin-B subunit(10 μg / ml, life technologies)を 50 μl 添加後、氷中で 30 分染色を行った。染色後、PBS(-)で洗浄したのち、フローサイトメーターを用いて測定した。

4-2-7 細胞膜のホスファチジルセリン量の測定

ヒト膵臓細胞の PS 量を 3-2-6 と同様の方法で測定した。

ヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞及びラット由来正常膵臓細胞を播種(5.0×10^4 cells/ml)後、24 時間前培養を行った。培養後、細胞を Accutase(Innovative Cell Technologies inc.)を用いて細胞を剥離させ遠心分離(3000 rpm/ 5min, 4 °C)を行い洗浄(PBS(-) 2 ml)した。その後 Incubation buffer(Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche Diagnostics K.K.)で希釈した Annexin- V(Incubation buffer : Annexin- V = 50 : 1)を 100 μ l 添加し、暗所・冷所で 30 分間染色を行った。上澄みを除去したのち、500 μ l の Incubation buffer を加えて懸濁し、フローサイトメーターを用いて蛍光強度の測定を行った。蛍光強度からホスファチジルセリン(PS)量を算出した。

4-2-8 レーザードップラー法による細胞膜表面電荷の測定

細胞膜表面電荷として細胞のゼータ電位の検討を 3-2-7 と同様の方法で測定した。

ヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞及びラット由来正常膵臓細胞を播種(5.0×10^4 cells/ml)後、24 時間前培養を行った。培養後、細胞を回収、レーザーゼータ電位計を用いてゼータ電位を測定した。また、CL が細胞膜へと与える影響を調べるために、膵臓がん細胞に CL を添加し、1,3 時間後のゼータ電位の測定を行った。

4-2-9 酵素活性測定法による 50%増殖抑制濃度の測定

カチオンリポソームの膵臓がん細胞に対する増殖抑制効果は、3-2-8 と同様の WST-1 assay により評価した。

96well マルチプレートに膵臓がん細胞および正常膵臓細胞を播種(5.0×10^3 cells/well)し、24 時間前培養を行った。その後、試料を 10 μ L 添加し、48 時間培養。培養後 WST-1 を 10 μ l/well 添加し、3 時間呈色反応を行った。呈色反応後、マイクロプレートリーダー(Emax, Molecular Devices Co.)を用いて 450nm の吸光度を測定した。細胞増殖抑制効果は試料を添加した場合の吸光度(A_{Mean})とコントロールの吸光度(A_{Control})の比($A_{\text{Mean}}/A_{\text{Control}}$)より評価した。50%増殖抑制濃度(IC₅₀ : 50% Inhibitory Concentration)は得られた増殖抑制率を縦軸に、試料溶液の濃度を横軸にプロットし、細胞増殖を 50%抑制した濃度を求めた。

4-2-10 膵臓がん細胞に対する融合・蓄積

膵臓がん細胞に対するカチオンリポソームの融合・蓄積を、蛍光標識脂質(NBDPC)含有カチオンリポソームを用いて倒立型蛍光顕微鏡(EVOS、Advanced microscopy group)および共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。

BxPC-3 細胞を播種(5.0×10^4 cells/ml)し、24 時間前培養した。試料を添加し、1、2、3 時間後の蛍光を観察した。共焦点レーザー顕微鏡では試料添加後から 30 分おきに観察した。正常膵臓細胞に関しても同様の実験を実施した。

4-2-11 TUNEL 法によるアポトーシスの検出

膵臓がん細胞に対するカチオンリポソームのアポトーシス誘導を TUNEL assay^{70,71)}によって評価した。

TUNEL assay は、細胞がアポトーシスする際に生じる断片化 DNA を検出する方法である。アポトーシスが誘導されるとエンドヌクレアーゼ活性によってヌクレオソーム単位で DNA 断片化が起こる。そこで生じた double-stranded-break の 3'-OH DNA 末端に TdT を用いて dUTP を付加する。dUTP を付加させてできたビオチン化 DNA 伸長鎖にペルオキシダーゼ標識ストレプトマイシンを結合させ過酸化水素とジアミノベンチジンで発色させたものを共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

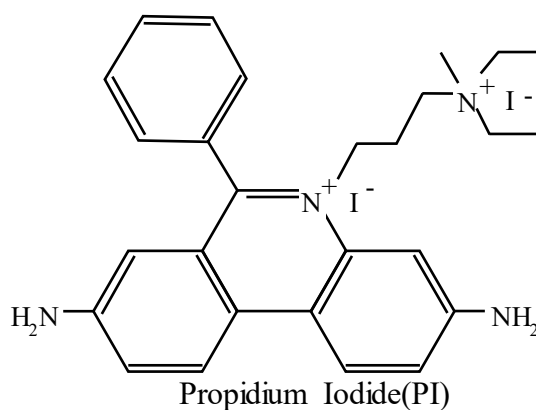
膵臓がん(BxPC-3)細胞を glass bottom dish に播種(5.0×10^4 cells/ml)し 24 時間前培養した。その後、各試料を添加し、さらに 48 時間培養した。培養終了後、ホルマリンを 1ml 添加し、室温で 30 分固定。その後、ホルマリンを除去し PBS(-) 1 ml で洗浄した。洗浄後、浸透化溶液(0.1%クエン酸浸透化溶液(0.1%Triton-X)) 1 ml を添加、遮光し 4°C で 2 分間処理した。処理後、PBS(-)で洗浄、Positive Control には DNaseI 溶液 50 μ l を加え、室温で 10 分間処理。PBS(-)で洗浄し、Negative 以外に TUNEL 反応混合液 50 μ l、Negative には酵素を含まない TUNEL 反応液を加え 60 分間 37°C で培養した。その後洗浄、TO-PRO-3 100 μ l を添加、遮光し 20 分処理した。洗浄して PBS(-)を 1ml 加え共焦点レーザー顕微鏡で観察した。光源には Ar レーザー(488nm)と He-Ne レーザー(633nm)を使用し、一定波長領域(FITC : 500~550nm, TO-PRO-3 : 640~700nm)の範囲で蛍光観察を行った。

4-2-12 フローサイトメーターによる DNA 含量測定

Propidium Iodide(PI)は、DNA の二本鎖に架橋的に結合することにより蛍光強度がおよそ 10 倍に増強する。よって DNA 量に比例して結合することから、蛍

光量をフローサイトメーターで測定することで、細胞周期の解析を行うことができる。アポトーシスによって DNA の断片化が起こると、DNA 量が低下するため G1 期の細胞よりも低い蛍光強度を示すため、アポトーシス細胞を測定することができる。PI assay は TUNEL assay と同様に断片化した DNA を検出する方法である⁷²⁾。

BxPC-3 細胞を 35mm 培養フラスコに播種(5.0×10^4 cells/ml)し、24 時間前培養した。培養後、各試料を添加し、さらに 48 時間培養した。48 時間後 Triton X-100、RNase、PBS(-)を添加し、あらかじめ PI を分注しておいたテストチューブにナイロンメッシュを通した細胞懸濁液をいれ、試料とした。



4-2-13 カスペース活性の観察

カスペース-3, -8, -9 の活性の観察は、3-2-9 と同様の原理で行った。

BxPC-3 細胞を grass bottom dish に播種(5.0×10^4 cells/ml)し、24 時間前培養した。培養後、各試料を添加し、さらに 48 時間培養した。培養終了後 10%FBS 含有 PhiPhiLux 及び CaspaLux を添加し、1 時間インキュベート後、PBS(-)で洗浄したものを共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

4-2-14 ミトコンドリア膜電位の測定

CLの膵臓がん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、3,3'-Dihexyloxycarbocyanine Iodide(DiOC₆ (3))を用いたミトコンドリア膜電位を測定した。

DiOC₆(3)は陽電化を有していて、電位変化により蛍光強度が変化する膜電位感受性色素で、ミトコンドリア膜に結合することで、その電位により蛍光強度が 10 倍前後増強する。この蛍光を測定することでミトコンドリアの膜電位の変化を計測することができる⁷³⁾。細胞に紫外線や放射線といったストレスが与えられるとアポトーシス促進因子タンパク質により、ミトコンドリアからシトクロム c

が放出される。放出されたシトクロム c はカススペースを活性化し、アポトーシスに特異な核変化を誘導することが明らかとなっている。電子伝達系にかかわるシトクロム c が放出されることによって、電子伝達系が大きく変化し、通常負に電荷している膜電位が失われる。DiOC₆(3)の蛍光強度を測定することで、間接的にミトコンドリアが活性化を知ることができる。

BxPC-3 細胞を 100mm dish に播種(5.0×10⁴cells/ ml)し、24 時間前培養した。培養後、各試料を添加し、さらに 48 時間培養した。培養終了 30 分前に PBS(-)で 9:1 に希釈した DiOC₆(3)を添加、48 時間経過した時点で培地を除去し細胞を回収した。回収した細胞をナイロンメッシュに通しフローサイトメーターを用いて測定した。

4-2-15 細胞膜流動性の測定

蛍光偏光解消法は、細胞膜の疎水部に蛍光プローブ(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene : DPH)を導入し、DPH に偏光を当てて P 値を測定する方法である。DPH の揺動が小さく膜流動性も小さい時は多くの偏光が偏光板を通るため、 P 値は大きくなる。DPH の揺動が大きく膜流動性が大きい時は偏光が乱反射するため、 P 値は小さくなる。蛍光偏光度(P)は(1)式より算出する。 I_{vv} 、 I_{hv} は垂直直線偏光起光の振動方向と、垂直に振動する偏光強度成分及び平行に振動する偏光強度成分である。 G_f は(2)式で求められる補正係数である。 P 値が小さいほど膜流動性が大きいと言われている。(Fig. 4-2)

$$P = (I_{vv} - G_f I_{vh}) / (I_{vv} + G_f I_{vh}) \dots (1)$$

$$G_f = I_{vh} / I_{hh} \dots (2)$$

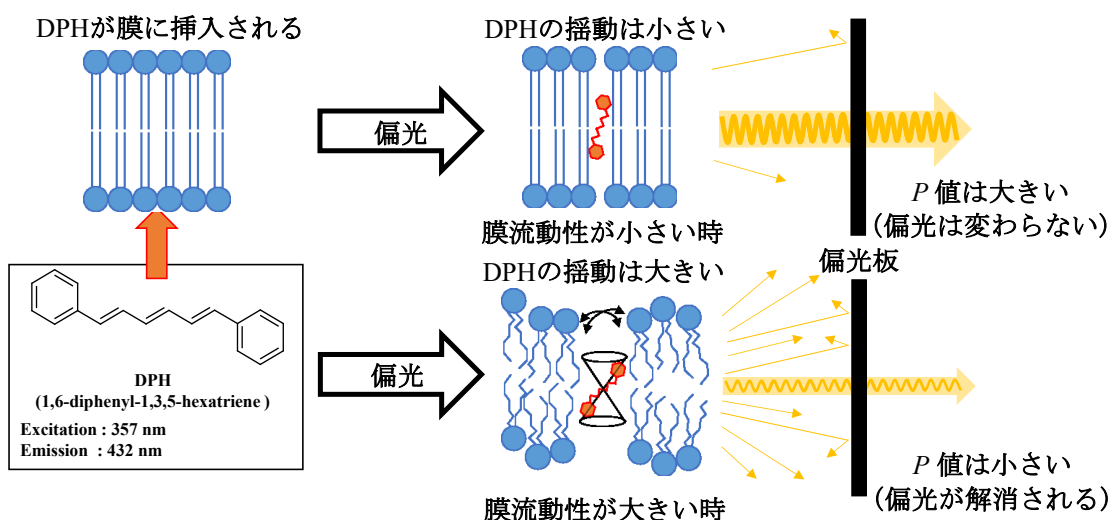


Fig. 4-2 Principle of fluorescence depolarization method.

所定の細胞数（初期細胞数 5.0×10^4 cells / ml）で BxPC-3 細胞を大ディッシュに播種し、24 時間培養した。さらに、試料溶液を添加後 37°C、5%CO₂ 条件下で 24 時間培養した。培養終了後、DPH の秤量を行った。その後、細胞を回収し、1000rpm, 5min で遠心し、細胞数をカウントした。50 万 cells/ml となるように、HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) で懸濁した。その後、各試料に DPH を添加し、分光蛍光光度計 (F7100) を用いて、細胞膜の流動性を測定した。

4-3 結果と考察

4-3-1 ヒト膵臓がん細胞の膜物性

ヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞および正常膵臓細胞の膜物性を検討するために、細胞膜表面のガングリオシド(GM1)量およびホスファチジルセリン(PS)量の測定を行った。

BxPC-3 細胞の GM1 量の測定結果を Fig.4-6 に示す。正常膵臓細胞と比較して BxPC-3 細胞では、CT-B の蛍光強度が約 3 倍高いことが明らかとなり、BxPC-3 細胞の細胞膜に GM1 が多いことが確認された。

BxPC-3 細胞のホスファチジルセリン(PS)量の測定結果を Fig.4-7 に示す。正常膵臓細胞と比較して BxPC-3 細胞では、Annexin-V の蛍光強度が約 3 倍高いことが明らかとなり、BxPC-3 の細胞外膜に PS 量が多いことが確認された。

さらに、BxPC-3 細胞および正常膵臓細胞の膜物性をさらに詳細に検討するために、細胞膜表面電荷の測定を行った。

レーザードップラー法による細胞膜表面電荷位の測定結果を Fig.4-8 に示す。正常膵臓細胞と比較して BxPC-3 細胞は細胞膜表面電荷が約 2 倍低く、細胞膜表面がアニオン性に荷電していることが明らかとなった。

また、膵臓がん細胞に CL を添加した際の細胞膜表面電荷の測定結果を Fig.4-9 に示す。CL 添加後、BxPC-3 細胞の表面電荷がプラス側へ 20mV 程シフトすることが明らかとなった。

以上のことから、BxPC-3 細胞膜には GM1 および PS 量が正常膵臓細胞と比較して顕著に多く、BxPC-3 細胞膜がアニオン性に富んでいることが示唆された。さらに、BxPC-3 細胞は正常膵臓細胞と比較して、細胞膜表面電荷がアニオン性に荷電しており、CL が特異的に融合し、膜表面を覆うことで表面電荷をプラス側へシフトすることが示唆された。

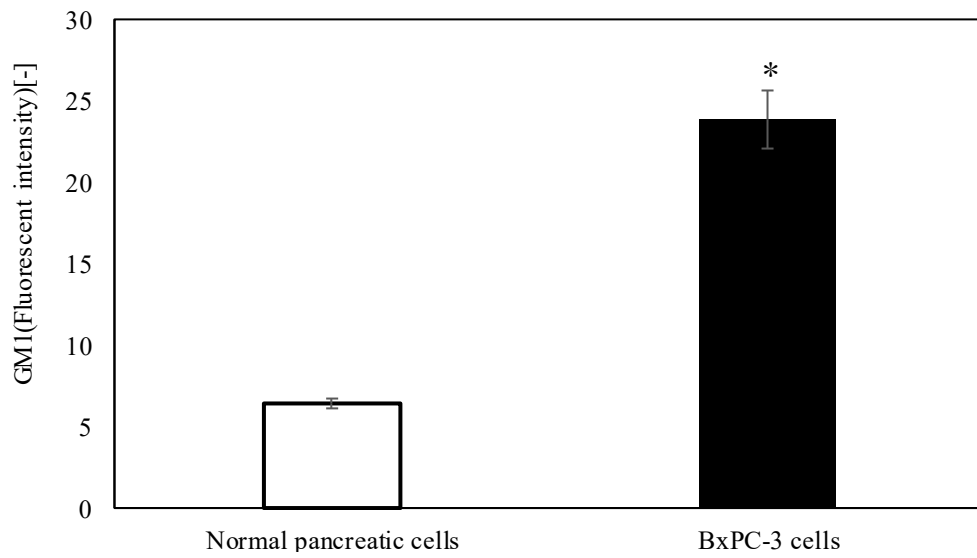


Fig.4-6 Fluorescent intensity of GM1 for BxPC-3 and normal pancreatic cells.

* $p < 0.05$ (vs. normal pancreatic cells).

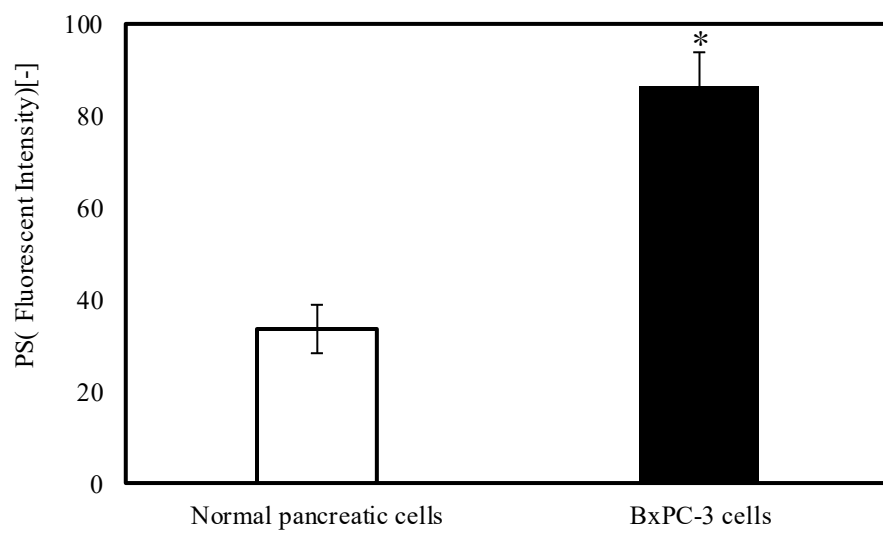


Fig.4-7 Fluorescent intensity of PS for BxPC-3 and normal pancreatic cells.
* $p < 0.05$ (vs. normal pancreatic cells).

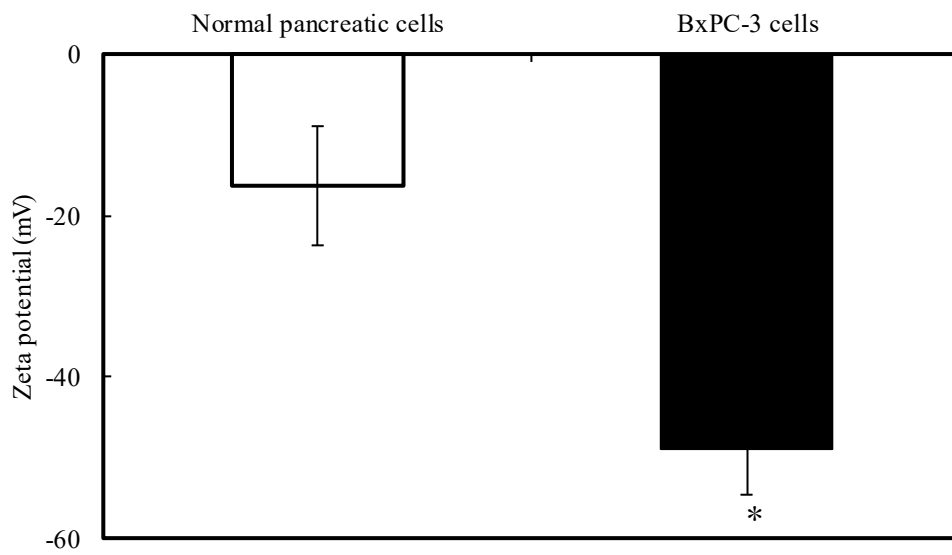


Fig.4-8 Zeta potential of BxPC-3 and normal pancreatic cells.
* $p < 0.05$ (vs. normal pancreatic cells).

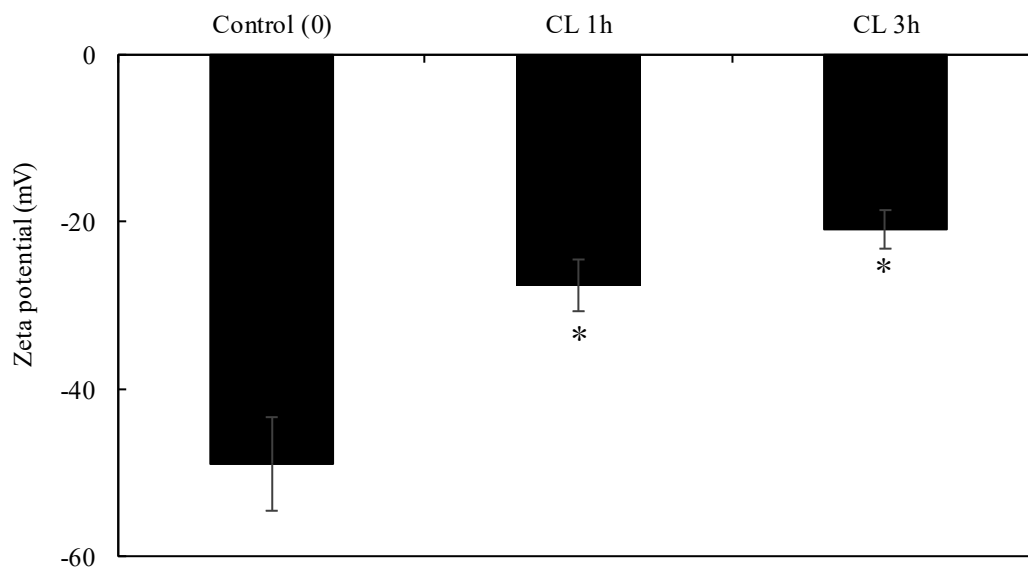


Fig. 4-9 Zeta potential of BxPC-3 at 1 and 3 hour after addition of CL.
* $p < 0.05$ (vs. Control(0)).

4-3-2 ヒト膵臓がん細胞に対するカチオンリポソームの増殖抑制効果

カチオンリポソームの膵臓がん(BxPC-3)細胞および正常膵臓細胞に対する増殖抑制効果の検討として 50%増殖抑制濃度(IC₅₀ : 50% Inhibitory Concentration)の測定を行った。結果を Fig.4-10 ,Table 4-1 に示す。DMPC 単一リポソーム、HL および CL を添加した正常膵臓細胞に対して、全ての試料において IC₅₀<1000mM の値を示し、毒性が低いことが明らかとなった。一方で、CL を添加した BxPC-3 細胞では DMPC 単一リポソームおよび HL21 を添加した細胞と比較して IC₅₀ 値が低く、顕著な増殖抑制効果を示した。

以上のことから、CL は BxPC-3 細胞に対し高い増殖抑制効果を示し、正常膵臓細胞に対して、低毒性であることが明らかとなった。

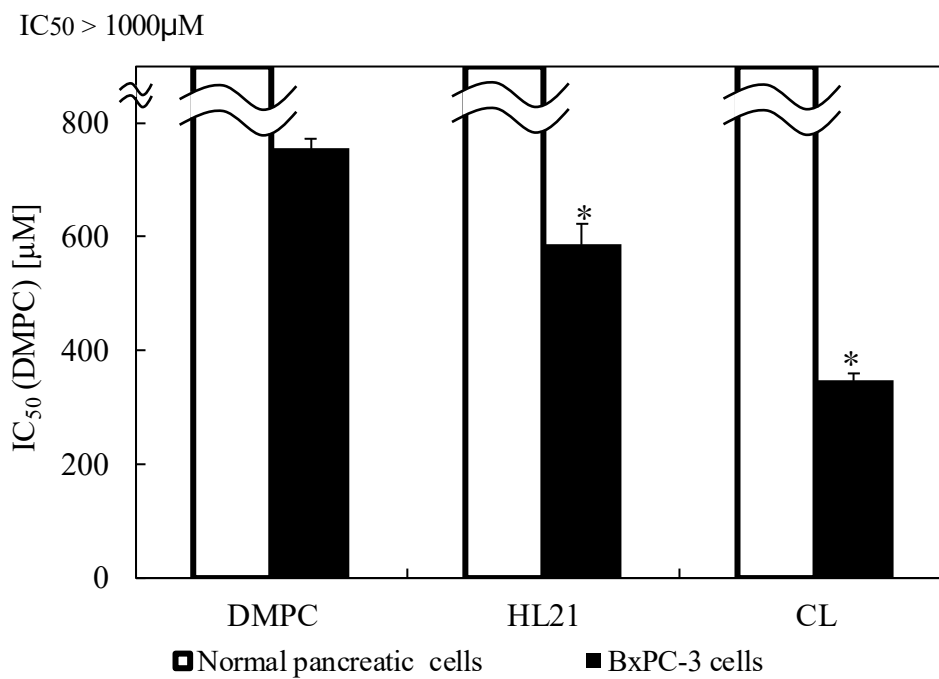


Fig. 4-10 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of CL on the growth for BxPC-3 and normal pancreatic cells.
 * $p < 0.05$ (vs. DMPC).

Table 4-1 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of DMPC, HL and CL on the growth of BxPC-3 and normal pancreatic cancer cells.

Sample	50% inhibitory concentration (μM)	
	BxPC-3	Normal pancreatic cancer
DMPC	[DMPC]=756±17	[DMPC]> 1000
HL21	[DMPC]=587±35 [C ₁₂ (EO) ₂₁]=30±1.8	[DMPC] > 1000. [C ₁₂ (EO) ₂₁] > 1000.
CL	[DMPC]=348±11 [C ₁₂ (EO) ₂₁]=20±0.63 [2C ₁₄ ECI]=32±1	[DMPC] > 1000 [C ₁₂ (EO) ₂₁] > 1000 [2C ₁₄ ECI] > 1000

Data represent the mean ± S.D.

4-3-3 カチオンリポソームのヒト膵臓がん細胞への融合・蓄積

カチオンリポソームの膵臓がん(BxPC-3)細胞および正常膵臓細胞に対する融合・蓄積を検討するため、蛍光標識脂質(NBDPC)を含有した CL/NBDPC を用いて蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。蛍光顕微鏡による観察結果を Fig.4-11 に示す。CL /NBDPC を添加した細胞では添加後 1 時間から BxPC-3 細胞への蓄積が確認され、DMPC 単一リポソーム/NBDPC、HL /NBDPC を添加した細胞と比較して短時間で BxPC-3 細胞に融合・蓄積することが明らかとなった。

次に、共焦点レーザー顕微鏡による結果では、いずれの試料を添加した正常細胞に対しては融合・蓄積が確認されなかった(Fig. 4-13)。一方、BxPC-3 細胞に対し CL/NBDPC では添加後 5 分より融合・蓄積することが明らかとなった(Fig. 4-12,)。

以上の結果から、CL は正常細胞には融合・蓄積せず、BxPC-3 細胞に対し特異的に融合・蓄積することが明らかとなった。

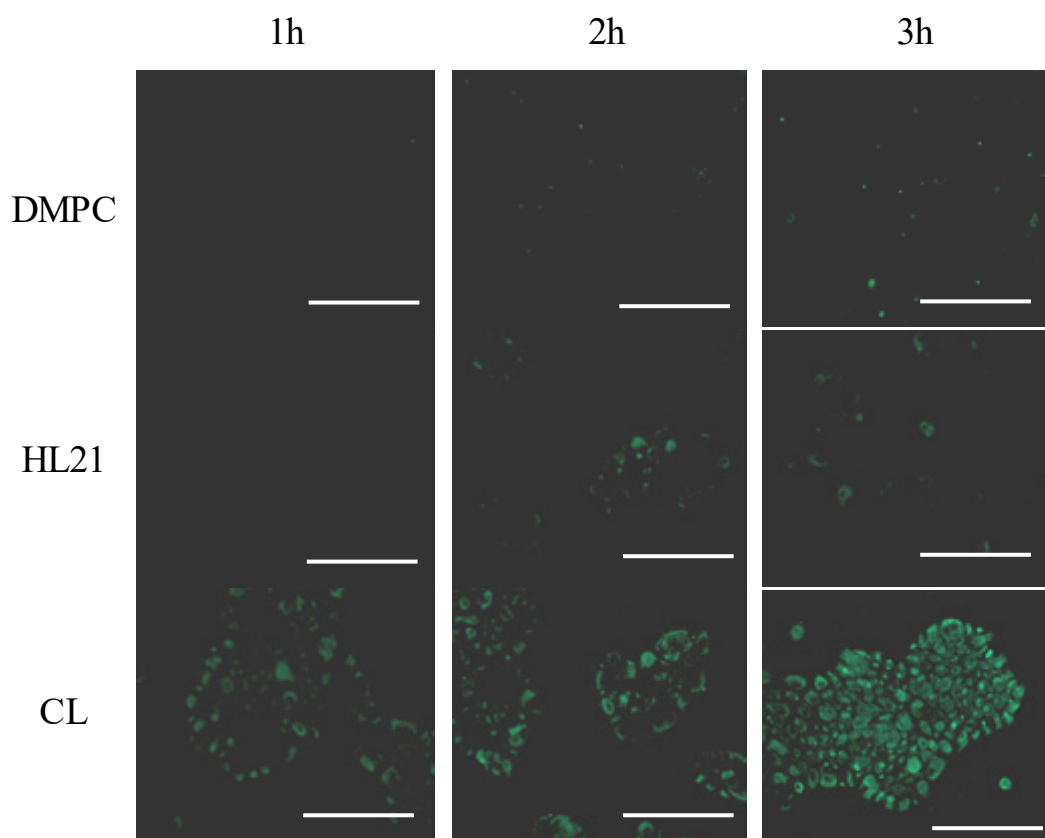


Fig. 4-11 Fluorescence micrographs of BxPC-3 cells treated with DMPC, HL21 and CL for 1, 2, 3 h.

Scale bar : 200 μ m.

CL: [DMPC]= 0.67mM, [C₁₂(EO)₂₁]= 0.004mM, [2C₁₄ECI]= 0.0064M,
[NBDPC]= 0.034mM.

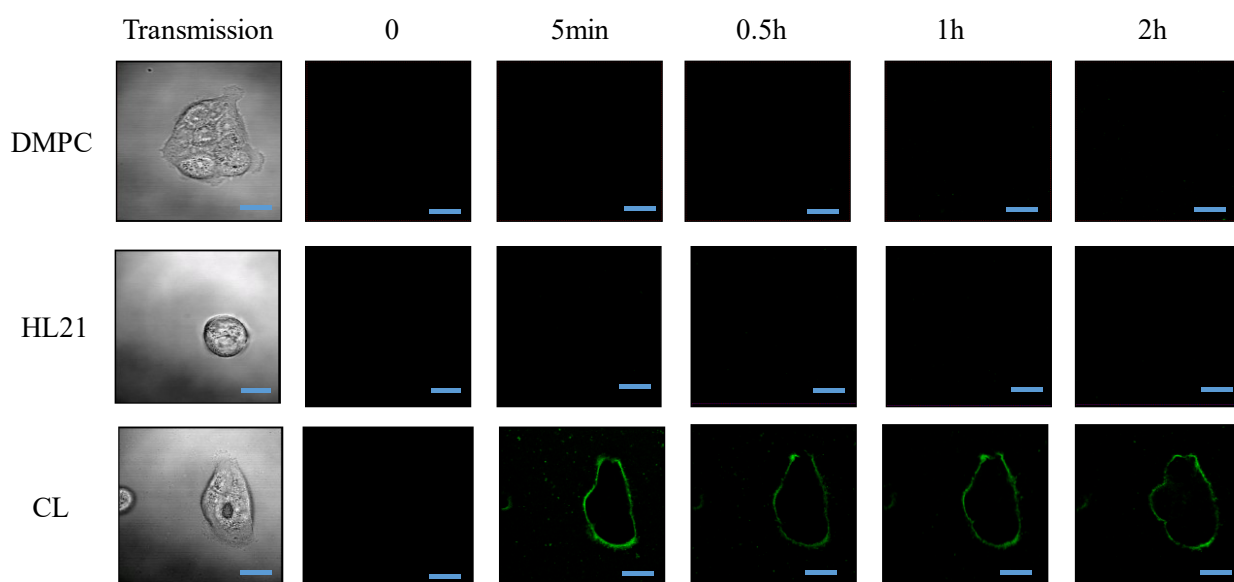


Fig. 4-12 Fluorescence micrographs of BxPC-3 cells treated with DMPC, HL21 and CL.

Scale bar : 50 μ m.

CL: [DMPC]= 0.67mM, [C₁₂(EO)₂₁]= 0.004mM, [2C₁₄ECl]= 0.0064M,
[NBDPC]= 0.034mM.

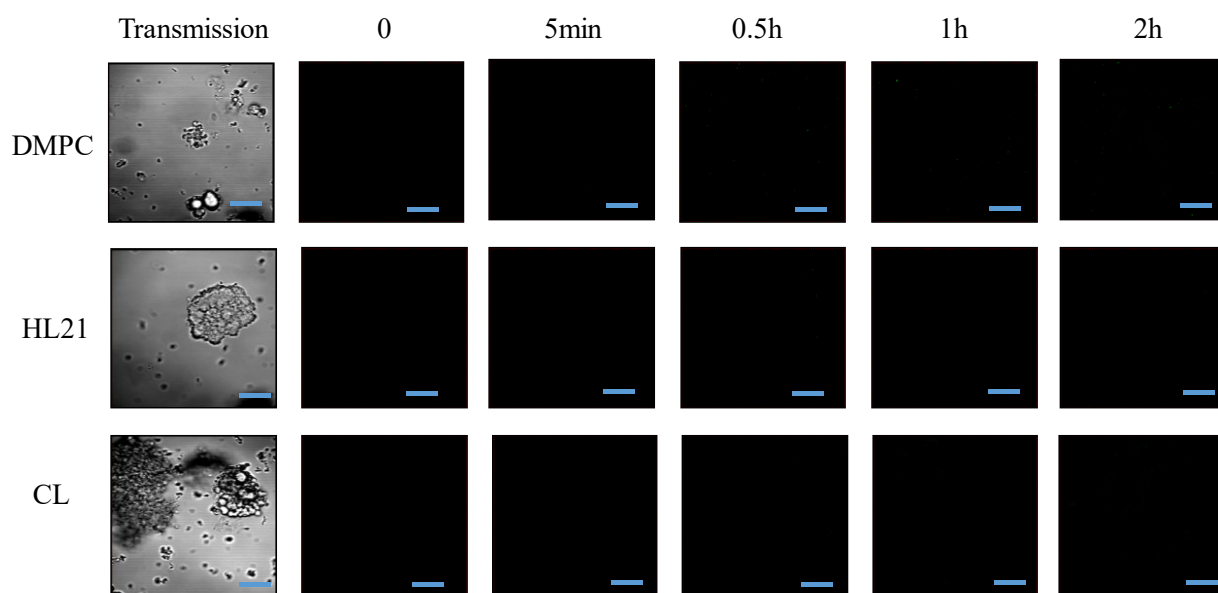


Fig. 4-13 Fluorescence micrographs of normal pancreatic cells treated with DMPC, HL21 and CL .

Scale bar : 50 μ m.

CL: [DMPC]= 0.67mM, [C₁₂(EO)₂₁]= 0.004mM, [2C₁₄ECI]= 0.0064M,
[NBDPC]= 0.034mM.

4-3-4 カチオンリポソームのヒト膵臓がん細胞に対するアポトーシス誘導

CL の膵臓がん(BxPC-3)細胞に対するアポトーシス誘導を TUNEL assay および PI assay によって検討した。

TUNEL assay を用いた共焦点レーザー顕微鏡による観察結果を Fig. 4-14 に示す。DMPC 単一リポソームおよび HL21 を添加した細胞ではアポトーシス陽性を示す緑色蛍光を確認できなかったが、CL を添加した細胞ではアポトーシス陽性を示す緑色の細胞が多数観察された。

PI assay を用いたフローサイトメーターによる測定結果を Fig. 4-15 に示す。DMPC 単一リポソームおよび HL21 を添加した細胞と比較して、CL を添加した細胞では約 80% と高い断片化率を示した。

CL のアポトーシス誘導メカニズムについて、DiOC₆(3)によって染色し、フローサイトメーターを用いてミトコンドリア膜電位の測定を行った。

結果を Fig. 4-16 に示す。DMPC 単一リポソームを添加した細胞では Control と同様の膜電位を有していたが、HL21 および CL を添加した細胞ではミトコンドリア膜電位の低下が顕著に確認された。

CL のアポトーシス誘導メカニズムについて PhiPhiLux および CaspaLux により細胞内カスパーゼ 3, 8, 9 の活性を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果を Fig. 4-17 に示す。

Control および DMPC 単一リポソームを添加した細胞ではカスパーゼの活性を示す緑色蛍光が確認されなかったが、CL を添加した細胞では強い緑色蛍光がカスパーゼ-3,-8,-9 すべてにおいて観察され、カスパーゼの活性が確認された。

以上の結果から、CL は膵臓がん細胞に対して、ミトコンドリアおよびカスパーゼの活性化を経由して、アポトーシスを誘導していることが明らかとなった。

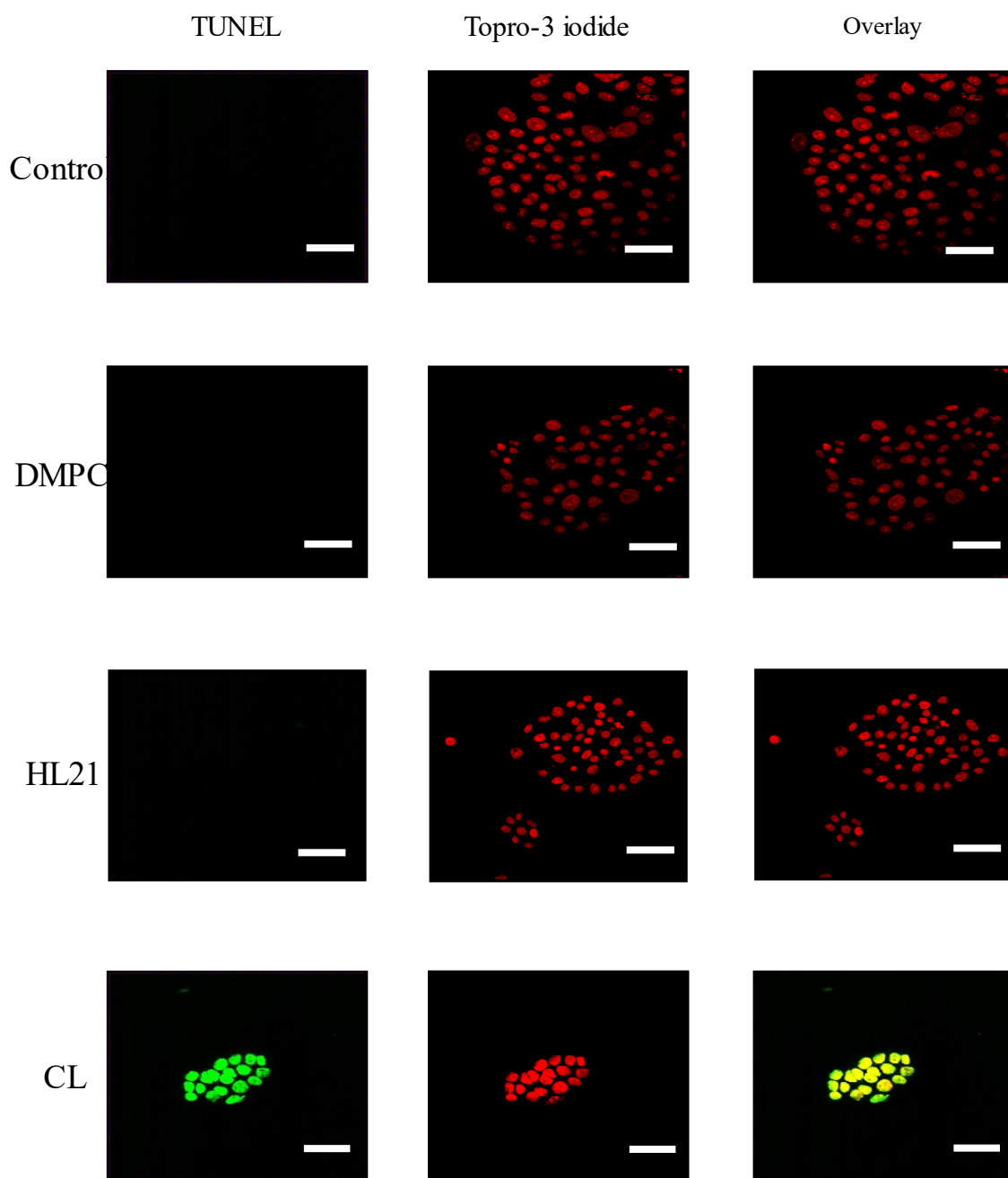


Fig. 4-14 Fluorescence micrograph of BxPC-3 cells treated with CL for 24h using TUNEL assay.
 Scale bar : 50 μ m.
 Magnification: $\times 40$
 CL: [DMPC]= 0.7mM, [C₁₂(EO)₂₁]= 0.004mM, [2C₁₄ECI]= 0.0064M.

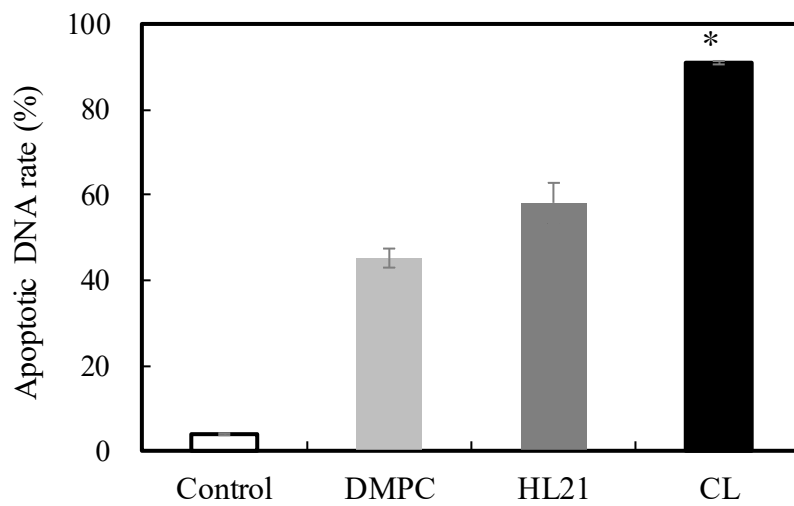


Fig. 4-15 Apoptotic DNA rate for BxPC-3 cells treated with DMPC, HL and CL for 48h.

* $p < 0.05$ (vs. Control, DMPC).

CL: [DMPC]=0.7mM, [C₁₂(EO)₂₁]=0.04mM, [2C₁₄ECI]= 0.064mM.

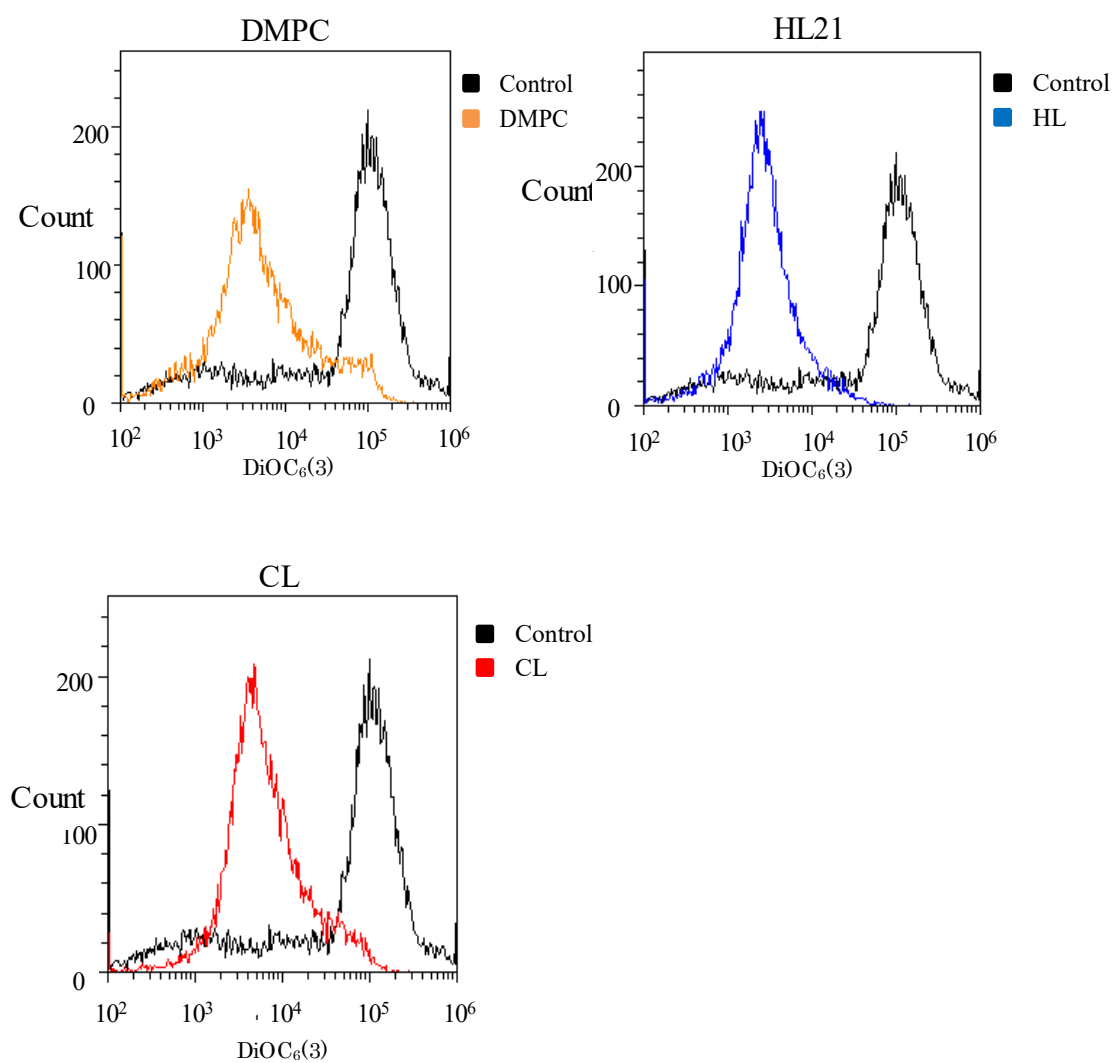


Fig. 4-16 Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) disruption of mitochondria in BxPC-3 cell treated with CL for 48 hours.

[DMPC]=0.7mM, [C₁₂(EO)₂₁]=0.04mM, [2C₁₄ECI]=0.064mM.

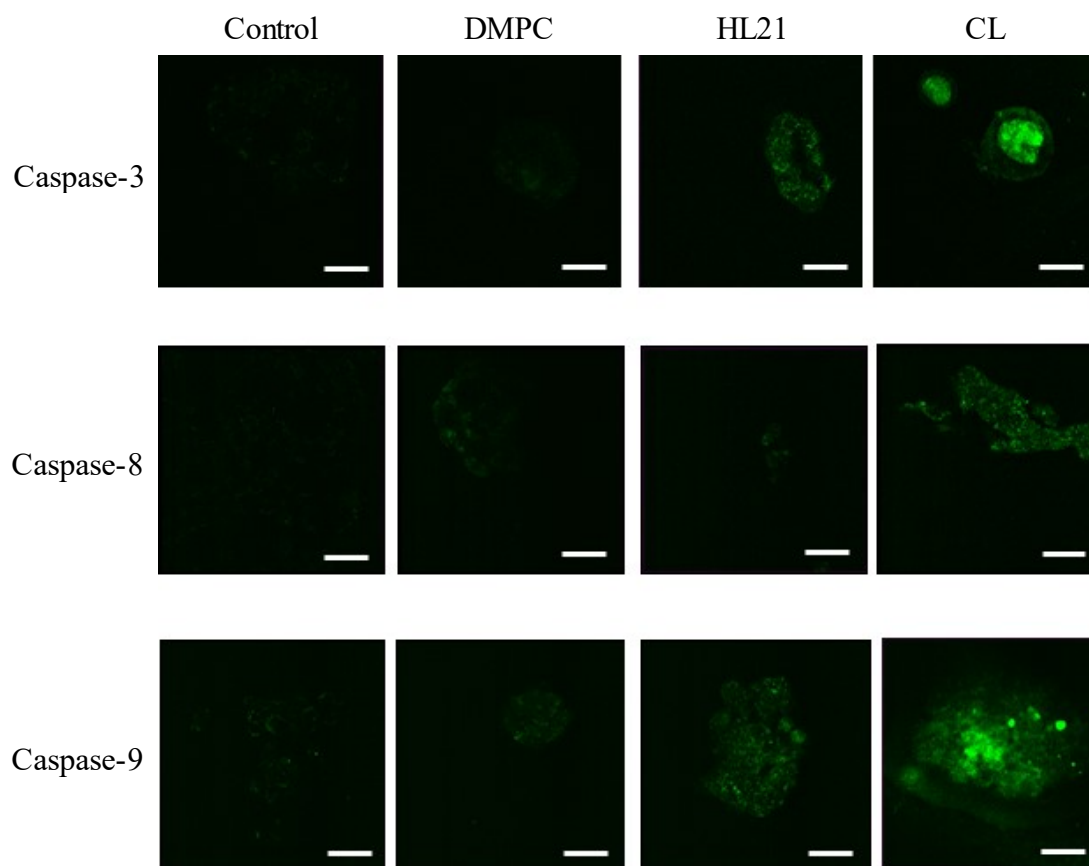


Fig. 4-17 Activation of caspase-3, -8, -9 in BxPC-3 cells treated with CL for 48h.

Scale bar: 50 μ m.

[DMPC]=0.7mM, [C₁₂(EO)₂₁]=0.04mM, [2C₁₄ECI]=0.064mM.

4-3-5 ヒト膵臓がん細胞膜の膜流動性

CLの膵臓がん(BxPC-3)細胞膜流動性への影響を検討するために、蛍光偏光解消法により分光蛍光光度計を用いて測定した。

結果を Fig.4-18 に示す。DMPC 単一リポソームを添加した細胞では P 値の減少は少なかった。一方、HL21 を添加した細胞では、CL を添加した細胞と比較して、 P 値は低い値 ($P_{HL21} > P_{CL}$) を示した。 P 値が小さいほど、膜流動性が大きいことを示す。CL はリポソーム自体の膜流動性が HL21 と比較して低いことから、BxPC-3 細胞に融合・蓄積後に膜の流動性に影響を及ぼしているのではないかと考える。

以上の結果より、CL は膵臓がん(BxPC-3)細胞に融合・蓄積後に、細胞膜の膜環境を変化させることが示唆された。

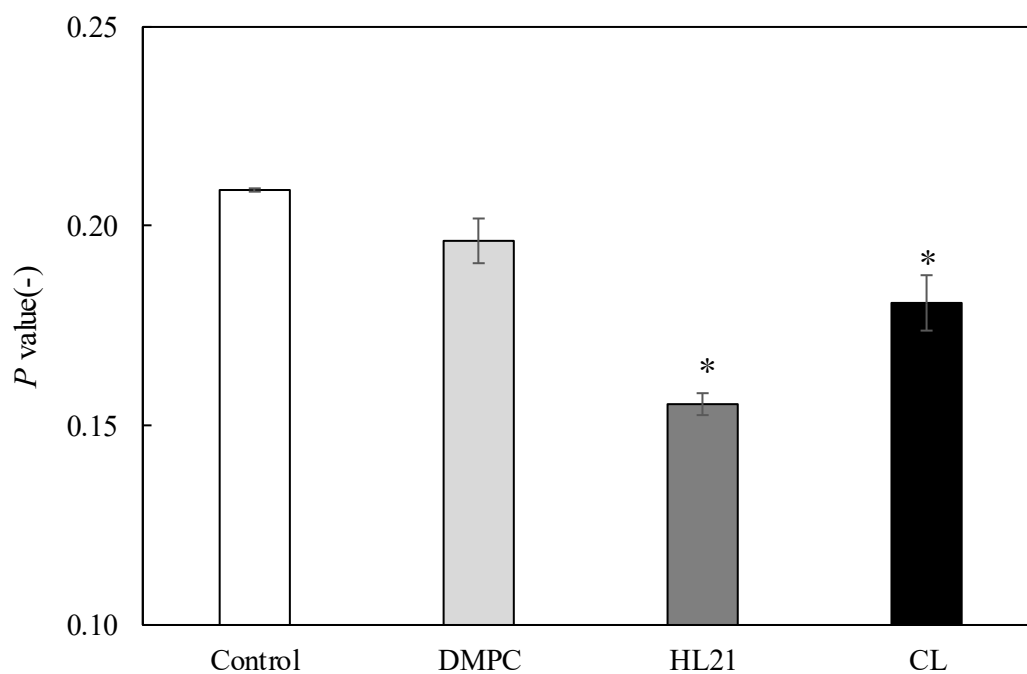


Fig.4-18 Change in membrane fluidity for BxPC-3 cells treated with CL for 24h.
Data represent the mean \pm S.E.

* $p < 0.05$ (vs. Control).

[DMPC]= 2.0×10^{-2} M, [C₁₂(EO)₂₁]= 1.05×10^{-3} M, [2C₁₄ECI]= 1.15×10^{-3} M.

4-4 総括

本章では 87mol%DMPC/ 5mol%C₁₂(EO)₂₁/ 8mol%2C₁₄EC1 カチオンリポソーム (CL)のヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞に対する *in vitro* での制がん効果を検討し、以下のような知見が得られた。

1. BxPC-3 細胞は正常膵臓細胞と比較して、GM1 量および PS 量が顕著に多いことが確認され、細胞膜がアニオン性に富んでいることが明らかとなった。また、CL を添加した膵臓がん細胞では細胞膜表面電荷のプラス側へのシフトが見られたことから、CL が膵臓がん細胞に融合し、細胞が持つ負電荷と打ち消したことが示唆された。
2. CL は正常膵臓細胞に対しては融合蓄積せず毒性が低く、アニオン性に富んでいる BxPC-3 細胞に対して特異的に融合蓄積し、高い増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。
3. CL を添加した細胞では TUNEL 陽性細胞が確認された。また高い DNA 断片化率が測定されたことから、CL が BxPC-3 細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。
4. Control ではカスパー活性化を示す緑色蛍光が観察されなかったのに対し、CL を添加した細胞では緑色蛍光が強く見られたことから、BxPC-3 細胞に対するアポトーシス誘導においてカスパー-3, -8, -9 の活性化が関与していることが明らかとなった。
5. CL を添加した BxPC-3 細胞では Control と比較して、DiOC₆(3)の蛍光が低下していることから、ミトコンドリア膜電位の消失が明らかとなり CL の BxPC-3 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が関与していることが明らかとなった。
6. CL で処理した BxPC-3 細胞の *P* 値は小さく、BxPC-3 細胞の膜流動性を増大させることが明らかとなった。

以上の結果から 87mol%DMPC/5mol%C₁₂(EO)₂₁/8mol%2C₁₄EC1 カチオンリポソームは正常膵臓細胞に対し低毒性で、ヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞に対し高い増殖抑制効果を示した。BxPC-3 細胞に対する CL のアポトーシス経路は、ミ

トコンドリアを介してカスパーズ-9, 3 を活性化する経路およびカスパーズ-8, 9, 3, を活性化する経路が明らかとなった。正常膵臓細胞と比較して、BxPC-3 は細胞膜がアニオン性に富んでいることが明らかとなり、CL は静電的に BxPC-3 細胞に選択的に融合・蓄積しアポトーシスを誘導したと考えられる。また、CL は BxPC-3 細胞に融合・蓄積後に、細胞膜の膜環境を変化することが示唆された。

第5章 カチオンリポソームのヒト膵臓がんに対する転移浸潤抑制効果

5-1 序

がんがもたらす脅威は細胞分裂時の制御ネットワークの統率から外れ、組織中における方向性を失った増殖だけでは終わらない。がん細胞の遺伝子レベルの変異から死ぬべき時に死なず、連続的に周囲の組織へ浸潤 (invasion) や原発巣から離れた場所に転移 (metastasis) する。浸潤および転移はがんの特徴的な能力で、転移はがんによる死因の主な原因である。

転移は原発腫瘍を形成し、周囲の組織への浸潤および血管内へ侵入していく。血流やリンパ節の循環を介して輸送され、多様な器官の微小血管で繁留後に管外遊出、微小転移巣を形成し、転移増殖の段階を経て初めて転移する⁷⁴⁾。

がんが転移するためには、まず、細胞外基質(extracellular matrix : ECM)を分解しなければならない。ECMの構成単位は組織によって異なり、主にコラーゲンやラミニン、エラスチン、プロテオグリカンなどがある。このECMの分解には Zn^{2+} を活性部位に持つ基底膜分解酵素(matrix metalloproteinase : MMP)と呼ばれるプロテアーゼが重要な役割を果たしている。MMPは現在までに20種類が同定されており、そのうちヒトMMPは16種類存在している。それぞれのMMPは特徴的な基質特異性を持ち、各種コラーゲンや糖タンパク質、プロテオグリカンを分解する。一方、MMP11のようにECMに強い活性を示さないものもある。通常MMP活性は潜在型酵素(pro-MMP)の生産、この潜在型酵素の活性化および活性型酵素のインヒビターによる阻害という3つのステップによって緻密に調節され、排卵や創傷治癒など様々な生理現象にも関与している。MMP活性において、潜在型酵素の活性化は細胞外もしくは細胞内、細胞膜上で行われる。しかし、活性化されたMMPはECMを分解し続けるわけではなく、内因性特異的インヒビターのTIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase)や血清由来の α_2M (α_2 Macrogloblin : α_2M)によって阻害される。

がん細胞が組織中を移動する際にはこのように様々なプロテアーゼが利用されるが、これはがん細胞に限られた話ではない。例えば、マクロファージやリンパ球も血管から離れて組織中を浸潤するが、この一連の過程はすべて調節されている。がん細胞においてはこのような調節ができなくなっていると考えられる⁷⁵⁾。

本章では、カチオンリポソームの膵臓がん治療への応用を目的とし、リン脂質(DMPC)、PEG系界面活性剤($C_{12}(EO)_{21}$)およびカチオン性脂質($2C_{14}ECl$)からなる87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECl$ から成るカチオンリポソームのヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞に対する転移・浸潤抑制効果について検討した。

5-2 実験

5-2-1 試料

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

5-2-2 カチオンリポソームの調製

カチオンリポソームの調製は 2-2-3 と同様の方法で行った。

5-2-3 Scratch assay による遊走抑制試験

細胞の遊走能抑制効果を検討するために Scratch assay を用いて細胞の遊走を観察した。

細胞が水平移動する際、細胞内で極性が形成される。続いて細胞突起が形成され、細胞突起の先端部では葉状仮足と呼ばれる仮足が発生する。さらにその葉状仮足から小さな糸状仮足が形成される。これらの仮足は ECM を分解しながら次々と接着を繰り返し、細胞を遊走させる⁷⁶⁾。Scratch assay は、コンフルエント状態で接着阻害が発生しているときに、細胞表面に傷をつけ、空間を作り出すことで、その空間に遊走してくる細胞を観察する方法である。

膵臓がん細胞を 6well plate に播種(4.0×10^5 cells/ml)し、48 時間前培養した。培養後、well 底面を 200 μ l チップでひっかき、洗浄した。その後、培地と試料を添加し、さらに 24 時間培養した。24 時間後、倒立型蛍光顕微鏡(EVOS®FL, Thermo Fisher Scientific)を用いて観察した。

5-2-4 共焦点レーザー顕微鏡による仮足の観察

仮足形成の観察は、細胞骨格である F アクチンを Acti-stain 488 Fluorescent Phalloidin を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

膵臓がん細胞を glass bottom dish に播種(5.0×10^4 cells/ml)し、24 時間前培養した。培養後、試料を添加し更に 24 時間培養した。培養終了後、4%ホルマリンで固定し、0.1%Titon-X(和光純役工業(株))で浸透化処理、Acti-stain™ 488 Fluorescent Phalloidin によって染色した後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。なお、各試料濃度は細胞の増殖に影響を与えない濃度とした。また、観察には、光源に He-Ne レーザー(Ex : 633 nm, Em : 649 - 740 nm)、Ar レーザー(Ex : 488 nm, Em :

505 – 555 nm)を用いた

5-2-5 Invasion assay を用いたがん細胞の浸潤抑制試験

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次元に動いている。基底膜の分解は細胞運動の先進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されている⁷⁷⁾。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* において測定するモデルとして用いられているのが *Invasion assay*⁷⁸⁻⁸⁰⁾で、*Boyden Chamber assay*⁸¹⁾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 Matrigel⁸²⁾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 8 μ m 孔を通過して下層まで移動する(Fig. 5-1)。

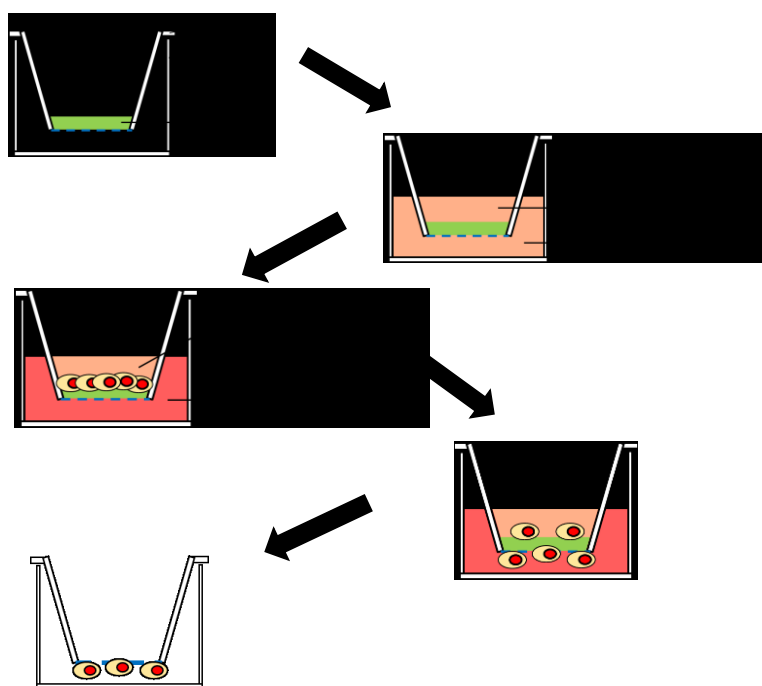


Fig. 5-1 Schematic representation of invasion assay.

Matrigel を被覆した Corning®Matrigel® Invasion Chamber 24-Well Plate 8.0 Micron (CORNING)の各 Insert と各 Chamber を無血清培地により、37°C、5%CO₂ インキュベーターで2時間水和処理を行った後、無血清培地を除去した。BxPC-3 細胞を 5.0×10⁴ cells /ml となるように細胞懸濁液（無血清培地）を調製し、insert に播種した。同時にグルコースあるいは各濃度の試料溶液(0.1、0.2mM)を添加し、

下部の Chamber には、10%FBS 含有培地を気泡が入らないように加え、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 72 時間培養した。Control には、Matrigel insert を使用した。培養後、insert 内の非浸潤細胞と Matrigel を PBS をつけた綿棒で除去後、100%エタノールで 30 分間固定し、0.1%Crystal violet / 100% エタノールを用いて 30 分間室温で染色し、CCD カメラ (DS-Fil, Nikon) をつけた位相差顕微鏡 (ECLIPSE TS100, Nikon) を用いて、顕微鏡写真を撮影した。

5-2-6 フローサイトメトリーによる MT1-MMP(MMP14)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 MT1-MMP の活性化が必要である事から MT1-MMP の活性化こそががん細胞の浸潤の始まりとされる。MT1-MMP 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せる。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⁸³⁾ (Fig. 5-2)。

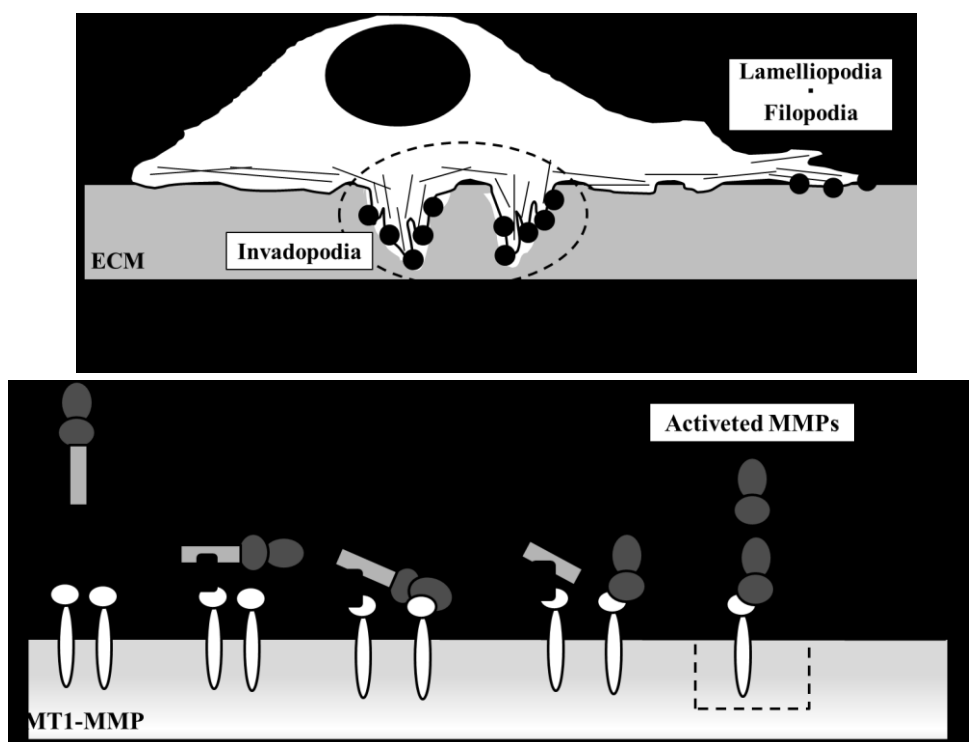


Fig. 5-2 Schematic representation of MT1-MMP (MMP14).

所定の細胞数（初期細胞数 5.0×10^4 cells / ml）で BxPC-3 細胞を 24 時間前培養

した。前培養後、試料を添加し、さらに24時間培養を行った。培養終了後、細胞を回収し、4000rpm,5minで遠心し、カウントする。100万 cells/mlとなるように、PBSで懸濁し4%ホルマリンで10分間固定を行った。その後、遠心した。遠心後0.1%Triton-Xで5分間浸透化を行い、遠心を行った。PBSで洗浄し、上澄み除去後に80 μ lのPBSに20 μ lのFcR抗体でブロッキングを行い、冷暗所(4°C)で15分間処理した。その後、Human MMP-14/MT1-MMP Alexa Fluor® 488-conjugated Antibodyを5 μ l入れ、ピペティングし、暗所室温で30分間染色した。染色後、細胞を遠心し、PBS(-)で洗浄を2回行った。その後500 μ lのPBS(-)を加え、フローサイトチューブに移し測定した。

フローサイトメーターによる解析は光源に488nmの空冷Arレーザーを出力15mWで使用しFL1センサー(505-545nm)での条件で蛍光を検出した。

5-2-7 ELISA法を用いた分泌型MMP (MMP2) の測定

MMP2はMT1-MMPによって活性化されると言われている。そのメカニズムは、まず、細胞表面にあるMT1-MMPにTissue inhibitor of metalloproteinases 2(TIMP2)のアミノ末端が結合する。次に、MMP2はTIMP2のカルボキシ末端と結合することでMT1-MMP/TIMP2/MMP2の3分子複合体を形成する。複合体中のMMP2は近くのMT1-MMPによってアミノ末端が切断されて活性化される。活性化されたMMP2は細胞の表面で機能する。この活性化型MMP2は周辺の細胞外マトリックスを分解する(Fig.5-3)。また、MT1-MMPもコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの成分を分解することが明らかとなっている⁸⁴⁾。以上のことから、MMP2とMT1-MMPは細胞の浸潤に深く関与していると考えられている。

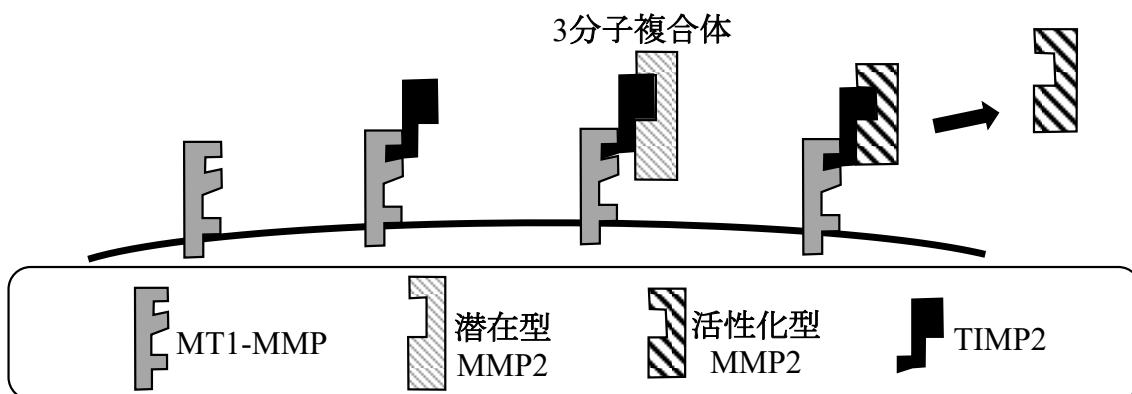


Fig.5-3 MMP2 activation mechanism by MT1-MMP

所定の細胞数(初期細胞数 5.0×10^4 cells / ml)でBxPC-3細胞を大ディッシュに播種し、24時間培養した。さらに、試料溶液を添加後37°C、5%CO₂条件下

で24時間培養した。24時間後、ディッシュ内の培地をディスポの遠心管に回収し、溶液中の細胞を除くため、1000rpmで5分間遠心し細胞培養上澄みを作った（これをELISAに使用した）。そして、trypsin/EDTAで細胞を回収しカウントした。ELISA kit 付属の96wellプレートの各wellに Assay diluents RD1-116を50 μ lずつ添加した。各wellに50 μ lずつ、Standard, Control および試料を加え付属のプレートシーラーを貼り、室温で2時間インキュベートした。2時間後、各well内の溶液を除去し、洗浄を4回行った（最後の洗浄後はキムタオルに軽く叩きつけ液体を完全に取除いた）。各wellに Total MMP2-Conjugate を200 μ l 添加しプレートシーラーをつけ室温で2時間培養した。2時間後、4回洗浄を行った。各wellに基質溶液を200 μ l ずつ添加し、30分室温で培養した。この時遮光して行った。30分後に各wellに50 μ lの停止溶液を添加した。この時に色が青から黄色に変わらない場合は軽くタッピングし混和させた。30分以内にマイクロプレートリーダーで測定した。

5-2-8 ELISA法を用いた分泌型MMP（MMP9）の測定

所定の細胞数（初期細胞数 5.0×10^4 cells / ml）でBxPC-3細胞を大ディッシュに播種し、24時間培養した。さらに、試料溶液を添加後37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で24時間培養した。24時間後、ディッシュ内の培地をディスポの遠心管に回収し、溶液中の細胞を除くため、1000rpmで5分間遠心し細胞培養上澄みを作った（これをELISAに使用した）。そして、trypsin/EDTAで細胞を回収しカウントした。ELISA kit 付属の96wellプレートの各wellに Assay diluents RD1-34を50 μ lずつ添加した。各wellに50 μ lずつ、Standard, Control および試料を加え付属のプレートシーラーを貼り、室温で2時間インキュベートした。2時間後、各well内の溶液を除去し、洗浄を4回行った（最後の洗浄後はキムタオルに軽く叩きつけ液体を完全に取除いた）。各wellに Human MMP9-Conjugate を200 μ l 添加しプレートシーラーをつけ室温で2時間培養した。2時間後、4回洗浄を行った。各wellに基質溶液を200 μ l ずつ添加し、30分室温で培養した。この時遮光して行った。30分後に各wellに50 μ lの停止溶液を添加した。この時に色が青から黄色に変わらない場合は軽くタッピングし混和させた。30分以内にマイクロプレートリーダーで測定した。（Fig. 5-4）

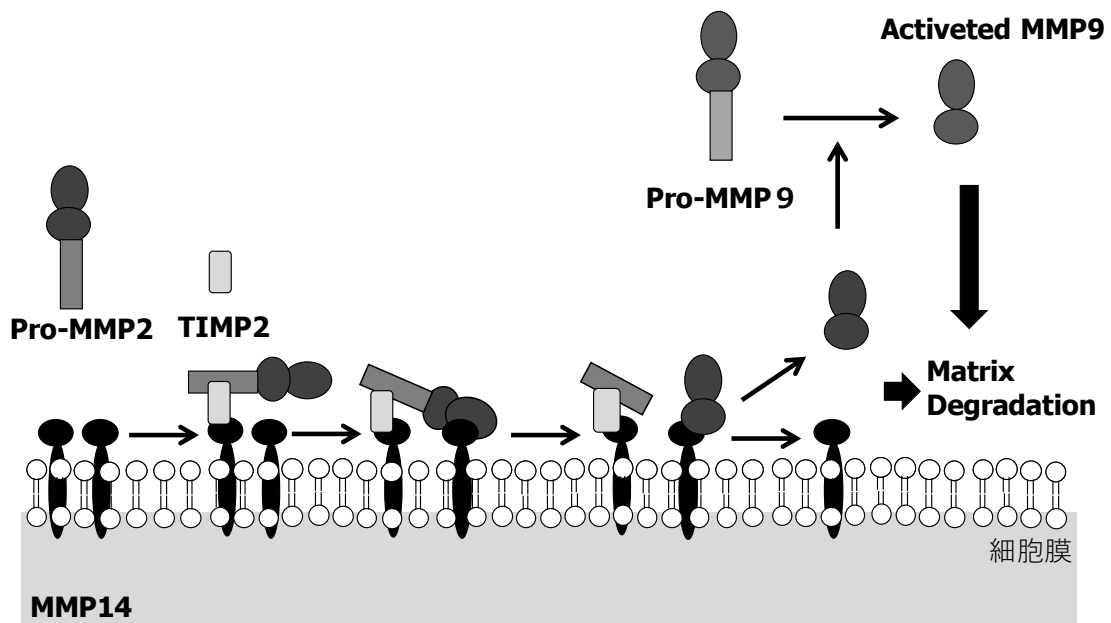


Fig. 5-4 Schematic representation of MMP.

5-3 結果と考察

5-3-1 ヒト膵臓がん細胞に対する転移抑制効果

細胞骨格である F アクチンを Acti-stain 488 Fluorescent Phalloidin によって染色し、CL の膵臓がん(BxPC-3)細胞に対する仮足形成抑制効果を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。結果を Fig. 5-5 に示す。Control、DMPC 単一リポソームおよび HL を添加した細胞では葉状および糸状仮足が多数観察されたのに対し、CL を添加した細胞では、仮足が少なかった。

CL の BxPC-3 細胞に対する移動能抑制効果を Scratch assay により、倒立型蛍光顕微鏡を用いて観察し検討した。また、ImageJ を使用して、剥離面へ移動した細胞の面積を定量化した。

倒立型蛍光顕微鏡を用いて撮影した観察結果を Fig. 5-6 に示す。青のラインが細胞剥離直後を示し、黄色のラインは試料を添加後 24 時間の細胞剥離面を示している。CL を添加した細胞では Control と比較して、細胞剥離面に差が見られず移動した細胞が少なかったことが確認された。また、細胞剥離面を定量化したグラフを Fig. 5-7 に示す。CL を添加した細胞では他の試料と比較して細胞の移動面積が少なく、カチオンリポソームの BxPC-3 細胞に対する遊走抑制効果が明らかとなった。

以上より、カチオンリポソームの BxPC-3 細胞に対する仮足形成および遊走を抑制したことから、転移抑制効果が明らかとなった。

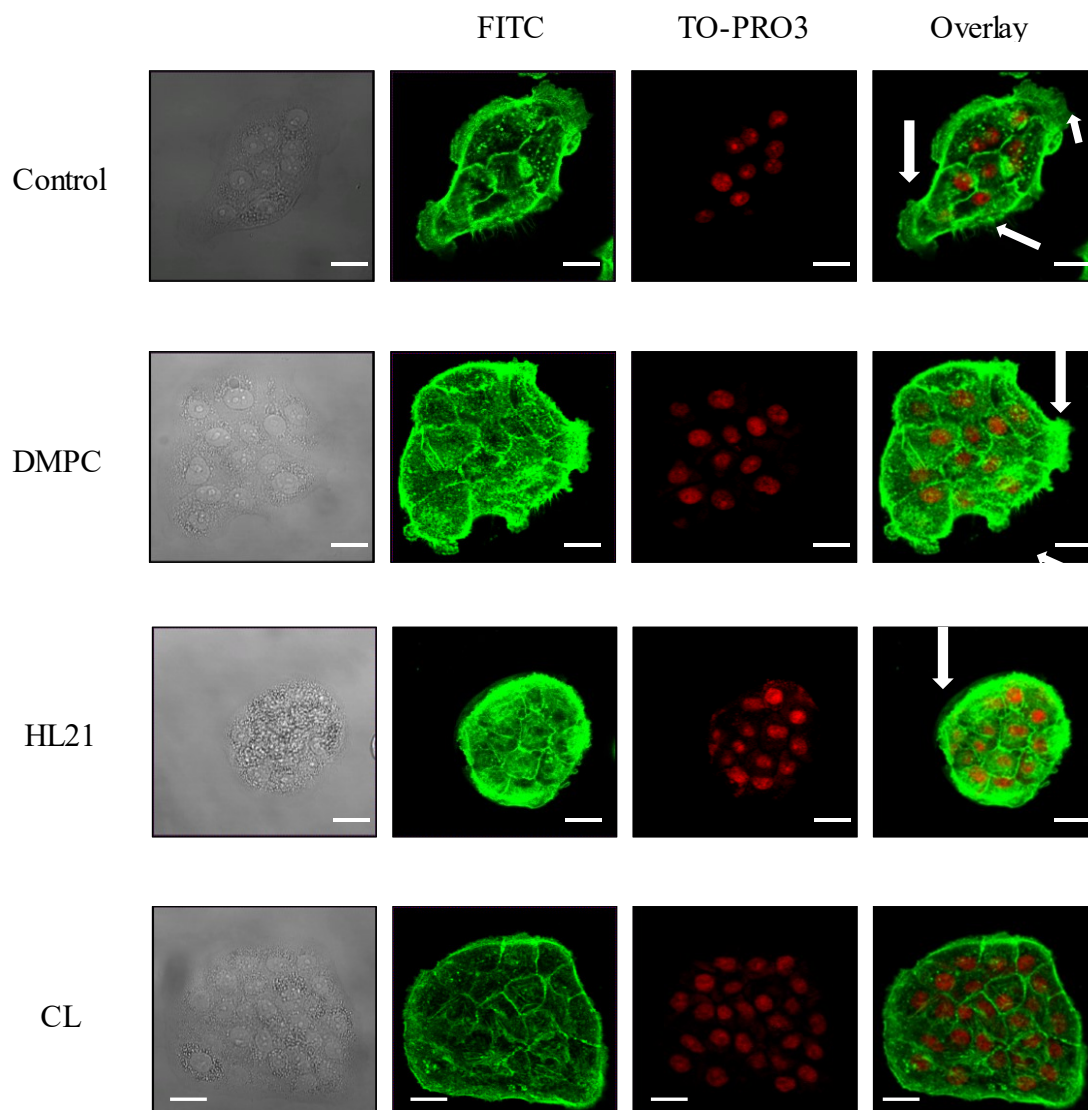


Fig. 5-5 Micrographs of BxPC-3 cells treated with CL for 24h using confocal laser microscope.

Scale bar: 20 μm .

CL: $[\text{DMPC}] = 0.2\text{mM}$, $[\text{C}_{12}(\text{EO})_{21}] = 0.012\text{mM}$, $[\text{2C}_{14}\text{ECI}] = 0.018\text{mM}$.

Arrow: pseudopodium.

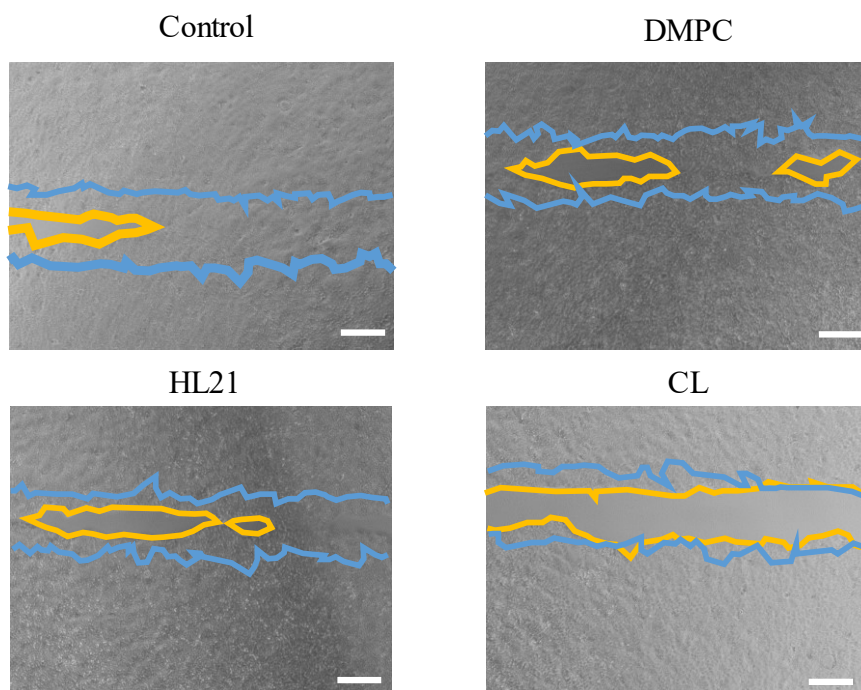


Fig. 5-6 Inhibitory effects of CL on the migration of BxPC-3 cells using wound scratch assay. Blue line indicate initial wound area ; orange line demarcate migrating cells after incubation for 24h.

Scale bar: 250 μm .

CL: [DMPC] = 0.2mM, [C₁₂(EO)₂₁] = 0.012mM, [2C₁₄ECI] = 0.018 mM.

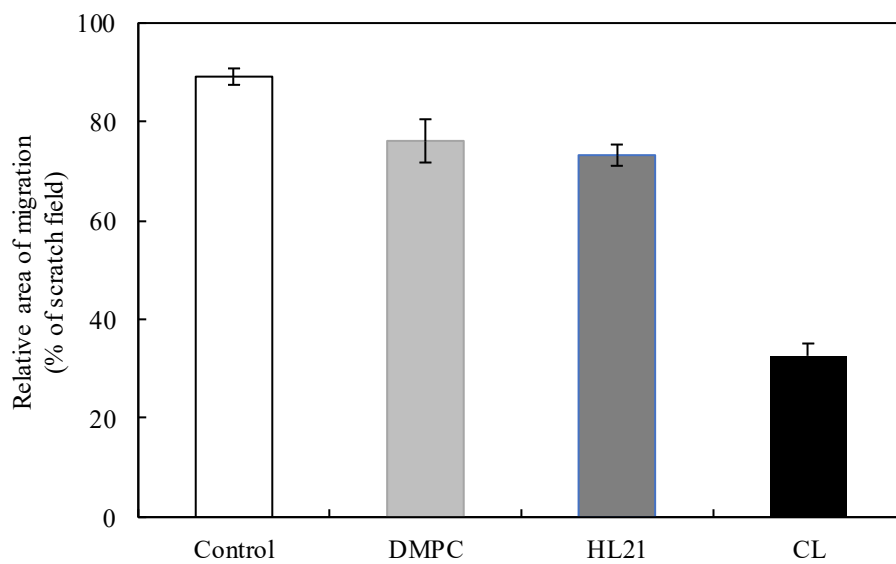


Fig. 5-7 Relative scratch area of BxPC-3 cells treated with CL for 24h.

* $p < 0.05$ (vs. Control, DMPC, HL).

CL: [DMPC] = 0.2mM, [C₁₂(EO)₂₁] = 0.012mM, [2C₁₄EC] = 0.018 mM.

5-3-2 ヒト膵臓がん細胞に対する浸潤抑制効果

CL の膵臓がん(BxPC-3)細胞に対する浸潤抑制効果の検討を Invasion assay を用いて行った。また、浸潤細胞数の観察は位相差顕微鏡を用いて行った。結果を Fig. 5-8 および Fig. 5-9 に示す。濃度 0.1mM で処理した場合、Control、DMPC、HL21 を添加した細胞では浸潤細胞が多数確認されたのに対し、CL を添加した細胞では浸潤細胞が少なく、浸潤を顕著に抑制することが確認された。また、濃度 0.2mM で処理した時の結果においても同様の結果が得られ、濃度依存的に浸潤を抑制していることが明らかとなった。

次に、BxPC-3 細胞の MMP14 発現量の変化について検討を行った。ヒストグラムの蛍光量を数値化し、Controlの蛍光量を 100 とした時の相対蛍光量を示す。CL を添加した細胞では Control と比較して蛍光量が減少し、MMP14 の発現を抑制していることが明らかとなった(Fig. 5-10)。

BxPC-3 細胞の分泌型 MMP である、MMP2 および MMP9 発現量の変化について、ELISA 法を用いて検討した。MMP2 および MMP9 量の測定の結果を Fig. 5-11, Fig. 5-12 に示す。CL を添加した細胞では、Control および DMPC 単一リポソームと比較して、MMP2 および MMP9 量が有位に減少した。

以上の結果から、浸潤において、CL は BxPC-3 細胞の浸潤を抑制する過程で、MMP14、MMP2 および MMP9 の活性を抑制していることが示唆された。

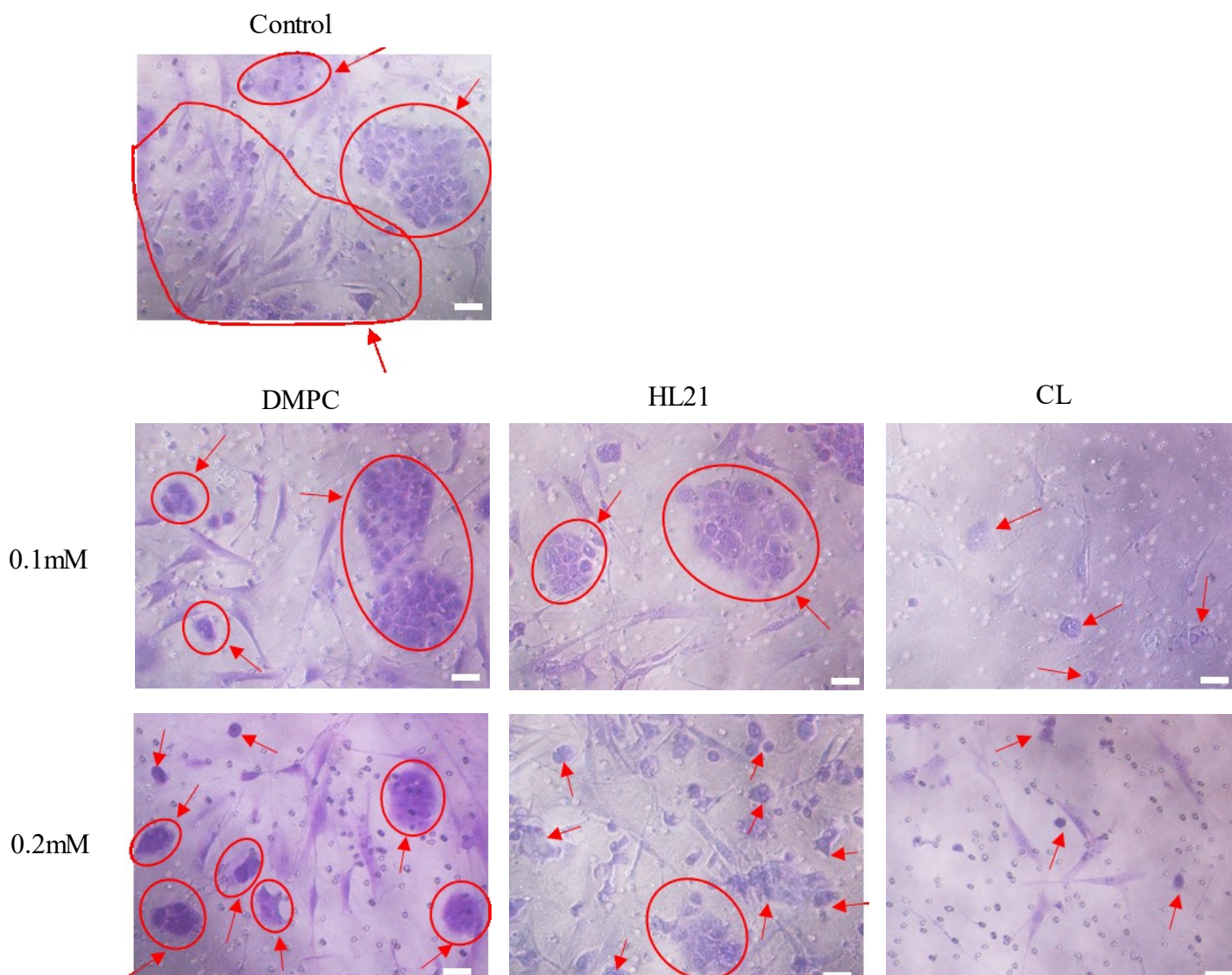


Fig. 5-8 Inhibitory effects of CL on the invasion of BxPC-3 cells.

Magnification : $\times 20$.

[DMPC]= 0.1m M, 0.2m M, $[C_{12}(EO)_{21}]$ = 0.0057m M, 0.011mM,

$[2C_{14}EC]$ = 0.009m M, 0.018 M.

Scale bar : 50 μ m.

Arrows : invasive cells.

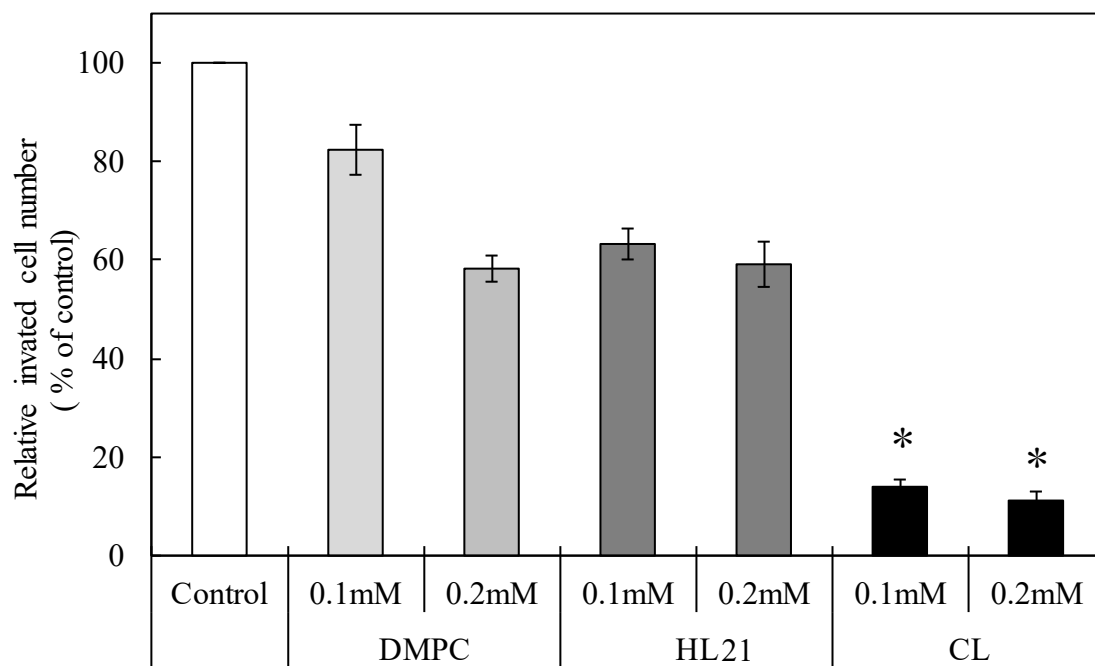


Fig. 5-9 Relative invaded cell number of BxPC-3 cells treated with CL for 72h.

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

* $p < 0.05$ (vs. Control, DMPC).

[DMPC]= 0.1m M, 0.2m M, [C₁₂(EO)₂₁]= 0.0057m M, 0.011mM,

[2C₁₄ECI]= 0.009m M, 0.018 M.

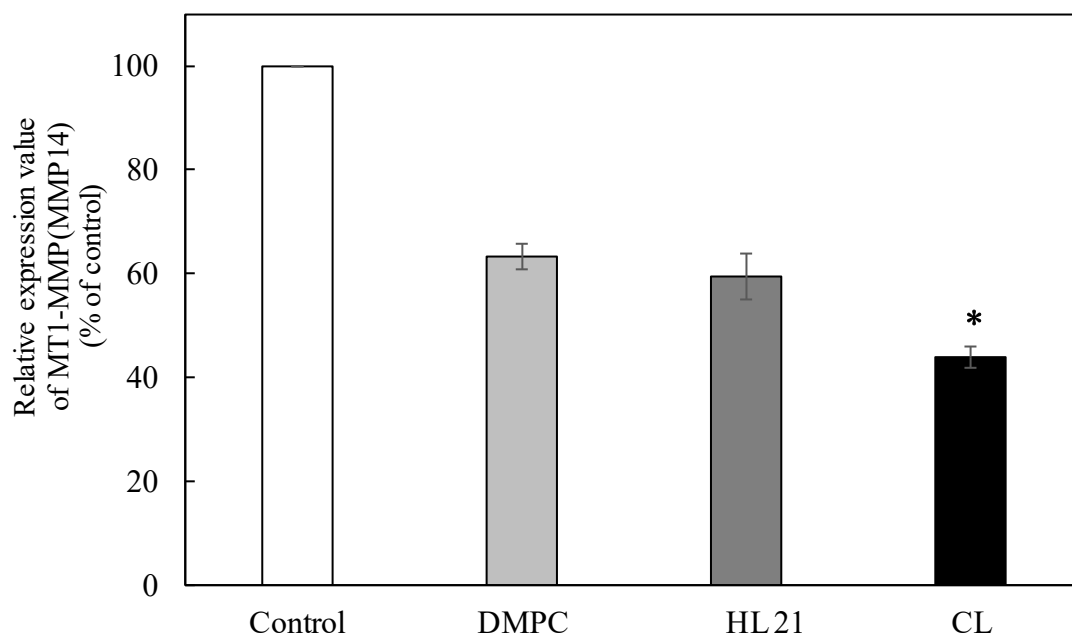


Fig. 5-10 Relative expression values of MT1-MMP(MMP14) in BxPC-3 cells treated with CL for 24h.

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

* $p < 0.05$ (vs. Control, DMPC).

[DMPC]= 0.1m M, [C₁₂(EO)₂₁]= 0.0057mM, [2C₁₄ECI]= 0.009m M.

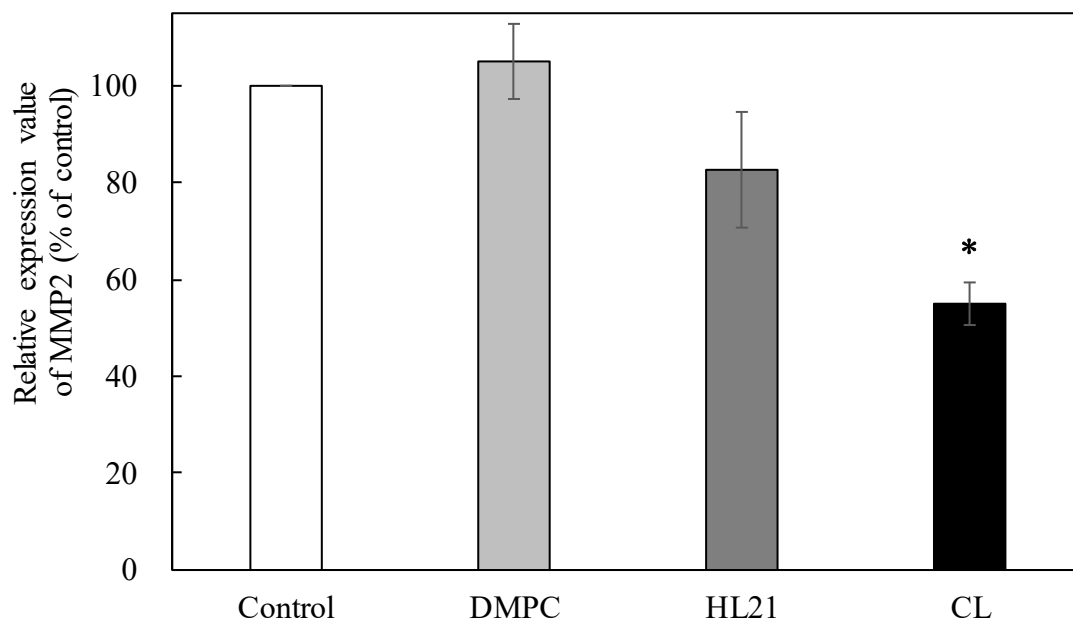


Fig. 5-11 Relative expression values of MMP2 in BxPC-3 cells treated with CL for 24h

Data represent the mean \pm S.E.

* $p < 0.05$ (vs. Control).

[DMPC]= 0.1m M, [C₁₂(EO)₂₁]= 0.0057mM, [2C₁₄ECI]= 0.009m M.

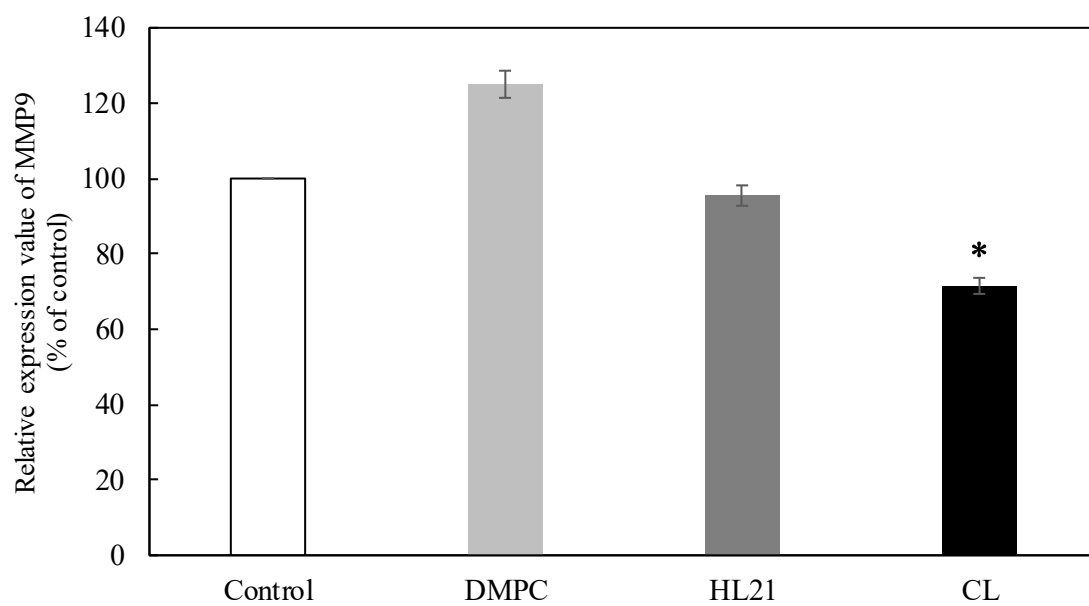


Fig. 5-12 Relative expression values of MMP9 in BxPC-3 cells treated with CL for 24h

Data represent the mean \pm S.E.

* $p < 0.05$ (vs. Control)

[DMPC]= 0.1m M, [C₁₂(EO)₂₁]= 0.0057mM, [2C₁₄ECI]= 0.009m M

5-4 総括

1. CL で処理した細胞では他の試料と比較して、細胞の仮足の形成が少なかったことから、CL が BxPC-3 細胞に対して、仮足の形成を抑制することが明らかとなった。
2. CL で処理した細胞では他の試料と比較して、細胞の遊走面積が顕著に小さかったことから、CL が細胞の遊走能を抑制することが明らかとなった。
3. Invasion assay において、Control、DMPC、HL21 では浸潤細胞が多数確認されたが、CL では浸潤細胞が顕著に少なく、濃度依存的に浸潤を抑制することが確認された。
4. CL で処理した BxPC-3 細胞は MMP14 量が減少し、CL は BxPC-3 細胞に対し、MT1-MMP を抑制した。
5. CL で処理した BxPC-3 細胞では、MMP2 および MMP9 が有位に減少し、CL は BxPC-3 細胞に対して、MMP2 および MMP9 を抑制することが確認された。

以上の結果から 87mol%DMPC/5mol%C₁₂(EO)₂₁/8mol%2C₁₄ECI カチオンリポソームは BxPC-3 細胞の仮足形成および遊走を抑制することから転移抑制効果が明らかとなった。浸潤において invasion assay から浸潤を抑制することが明らかとなった。CL は BxPC-3 細胞の浸潤を抑制する過程で、MMP14、MMP2 および MMP9 の活性を抑制していることが示唆された。

第6章 カチオンリポソームのヒト膵臓がん皮下移植モデルマウスに対する治療効果

6-1 序

実験動物は[教育、試験研究、生物学的製剤の製造、その他の科学上の利用に供するため、合目的に繁殖した動物]と定義されており、動物実験は[動物に何らかの実験処置を加えて、動物の反応を観察すること]と定義されている。試験研究とは、大学や研究所などで行われている学術研究や企業などで行われている医薬品などの安全性試験などに分けられる。学術研究では多くの動物種を少数用いて実験を行い、企業などで行われる安全性試験では少数の動物を多く用いて行う傾向にある⁸⁵⁾。

実験動物を用いる学術領域は広範囲で、特に医学や生命科学領域の医薬品などの開発、生命現象や疾患に関する基礎研究、さらには医薬品や化学物質の安全性試験の研究に利用される。

実験動物の多くは医薬品の安全性試験に利用され、実験動物の使用数の過半数は医薬品関連企業で用いられていると考えられる。安全性試験は毒性試験とも呼ばれており、実験動物や試験管上での細胞実験を用いて医薬品や化学物質が持つ毒性を明らかとするために行われる。医薬品の開発工程を例に挙げる。まず薬剤の基本性質が調べられた後に動物を用いた前臨床試験が行われる。次に、人を対象とする臨床試験に移る。

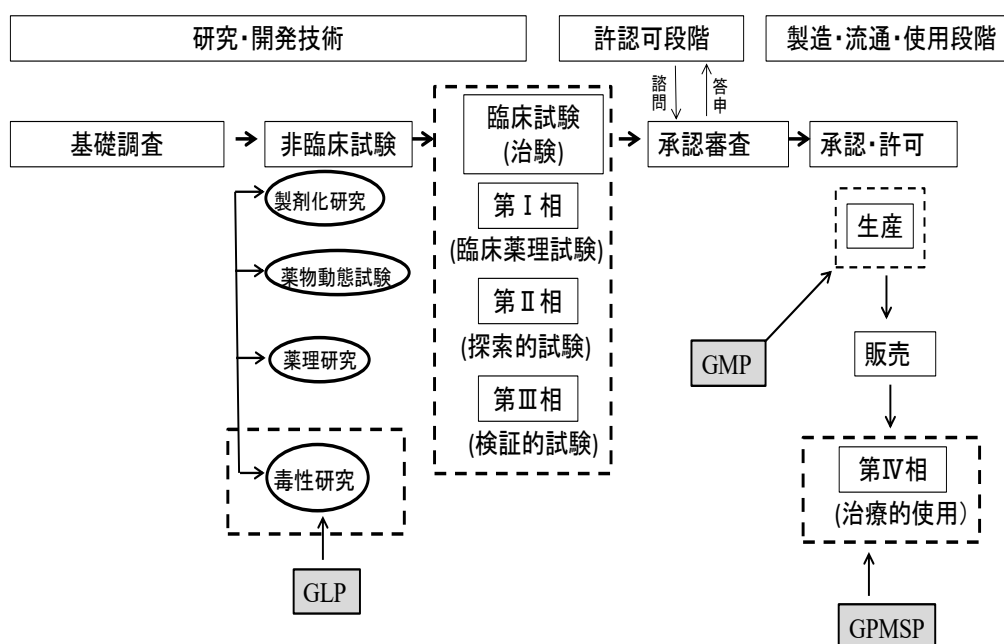


Fig. 6-1 新薬の研究開発フローチャート

ここまでの工程を通ることで新薬としての承認申請が可能となる(Fig. 5-1)。

前臨床試験では動物実験によって薬剤の体内動態や薬理・薬効と同時に急性毒性や発癌性などを調べることが出来る。また、安全性試験はデータの信頼を確保するために Good Laboratory Practice(GLP)基準に従い、慎重に行われる⁸⁶⁾

本章では、第4章においてヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞に対する抗腫瘍効果及びアポトーシス誘導が明らかになっている 87mol%DMPC/ 5mol%C₁₂(EO)₂₁/ 8mol%2C₁₄EC1カチオンリポソーム(CL)の膵臓がんの皮下移植および腹膜播種モデルマウスに対する治療効果を検討した。また、皮下腫瘍切片を作製し、TUNEL法によるアポトーシス誘導の観察を行った。

6-2 実験

6-2-1 試料

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

6-2-2 カチオンリポソームの調製

カチオンリポソームの調製は 2-2-3 と同様の方法で行った。

6-2-3 動的光散乱法による膜直径の測定

動的光散乱法による測定は 2-2-3 と同様の方法で測定を行った。

6-2-4 使用細胞

ヒト膵臓がん(BxPC-3 : CRL1687)細胞は American Type Culture Collection (ATCC) より購入したものを使用した。RPMI1640(Gibco BRL)+10% fetal bovine serum(FBS : HyClone Laboratories Inc.)を培養培地として用い、37°C、湿度 95%、CO₂ 濃度 5%の条件で培養を行った。

6-2-5 皮下移植モデルマウスの作製

動物実験は、”崇城大学における動物実験に関する指針”および関連法案を順守し、崇城大学動物実験倫理委員会の承認後に実施した。

動物は、熊本大学の岡田誠治先生から恵贈いただいた高度免疫不全マウス(Balb/c-R/J⁸⁷), 雄, 9~13 週令)を使用した。室温 24±2°C、湿度 55±10%、水および餌はオートクレーブで滅菌したものを自由に摂取させた。

マウス後背部皮下に膵臓がん細胞を移植(5.0×10^6 cells/body)し、皮下移植モデルマウスを作製した。移植後は体重測定および腫瘍体積の測定を行った。また、腫瘍体積は 5-1 式により算出した。

$$\text{腫瘍体積(mm}^3\text{)} = \text{長径(mm)} \times \text{短径(mm)} \times \text{短径(mm)} \times 0.5 \quad (6-1)$$

6-2-6 皮下移植モデルマウスに対する治療実験

マウスに膵臓がん細胞を移植(5.0×10^6 cells/body)し、移植後 7 日目の腫瘍体積をもとに、層別無作為化法によって群分けを行った。群分け当日より、試料を腫瘍近接に 50 μ l(Dose for DMPC = 33.9mg/kg)、1 日 1 回、28 日間反復投与を行った。また、移植当日より体重および腫瘍体積を測定した。腫瘍体積は 5-1 式に基づき算出した。

投与終了翌日に、麻酔下で解剖し、腫瘍の観察および腫瘍重量の測定を行った。

6-2-7 TUNEL 法によるアポトーシスの検出

CL の *in vivo* におけるアポトーシス誘導の観察は、TUNEL 法を用い組織切片観察により行った。

マウス後背部皮下に膵臓がん細胞を皮下移植し、移植後 7 日目より 28 日間反復投与を行った。投与終了翌日に麻酔下で解剖し腫瘍を摘出した。摘出後、中世ホルマリン溶液を用いて組織固定し、パラフィン切片を作成した。その後、蒸留水および PBS(-)で洗浄し、プロテアーゼ処理および過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを除去した。標本を PBS(-)で洗浄し、3-3'-diaminobenzine(DAB)溶液によって染色し、さらにメチルグリーンを用いて核を染色した。組織切片の観察は Nikon DS カメラコントロールユニットで行った。

6-2-8 腹膜播種モデルマウスの作製

動物は、高度免疫不全マウス(Balb/c-R/J, 雄, 9~13 週令)を使用した。室温 24 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 55 \pm 10%、水および餌はオートクレーブで滅菌したものを自由に摂取させた。

マウス腹膜に膵臓がん細胞を移植(5.0×10^6 cells/body)し、腹膜播種モデルマウスを作製した。移植後は体重測定の測定を行った。

6-2-9 腹膜播種モデルマウスに対する治療実験

マウスに膵臓がん細胞を移植(5.0×10^6 cells/body)し、移植直前に体重をもとに、層別無作為化法によって群分けを行った。群分け当日より、試料を腹腔に 10mg/kg(Dose for DMPC = 203mg/kg)で 1 日 1 回、28 日間反復投与を行った。また、移植当日より体重を測定した。

投与終了翌日に、麻酔下で解剖し、腸間膜結節数のカウントおよび腸間膜の腫

瘍重量の測定を行った

6-3 結果と考察

6-3-1 皮下移植モデルマウスに対するカチオンリポソームの治療効果

CLの *in vivo*における膵臓がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果を検討した。

投与期間中の体重測定の結果を Fig. 6-2 に示す。マウスの体重は全ての群において異常な変化は見られず、Control 群と同様です全ての試料に毒性はみられなかった。

投与期間中の腫瘍体積の測定結果を Fig.6-3 に示す。投与終了翌日の平均腫瘍体積は Control 群で 448mm³、DMPC 投与群で 454mm³、HL21 投与群で 396mm³、CL 投与群で 125mm³であり、Control 群および他の試料投与群と比較して CL 投与群において顕著な腫瘍増大に対する抑制効果が得られた。

投与終了翌日に解剖し、摘出した腫瘍の観察結果を Fig. 6-4 に示す。肉眼的観察から Control 群、DMPC および HL21 投与群と比較し、CL 投与群では腫瘍の大きさが有意に小さくなっており、治療効果が明らかとなった。

摘出した腫瘍重量の測定結果を Fig. 6-5 に示す。腫瘍の平均重量は Control 群で 0.125g、DMPC 投与群で 0.13g、HL21 投与群で 0.131g、CL 投与群で 0.083g であり、CL 投与群では腫瘍重量が顕著に減少し、治療効果が明らかとなった。

以上の結果から、カチオンリポソームの膵臓がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果が明らかとなった。

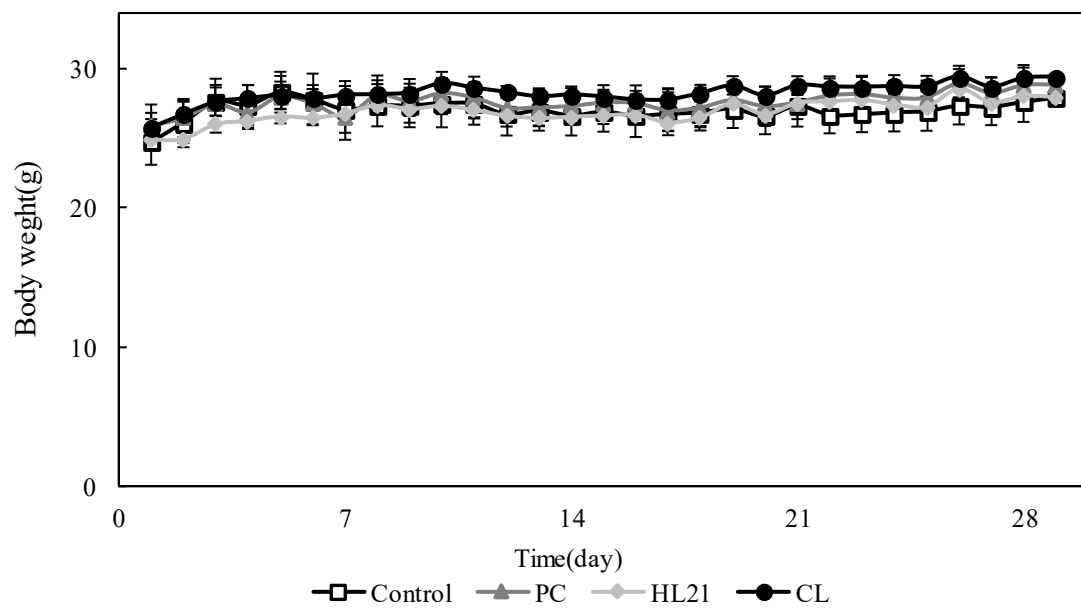


Fig. 6-2 Body weight change in xenograft mouse model of pancreatic cancer treated with CL after the inoculation of BxPC-3 cells. Data represent the mean (n=5) ± S.E.

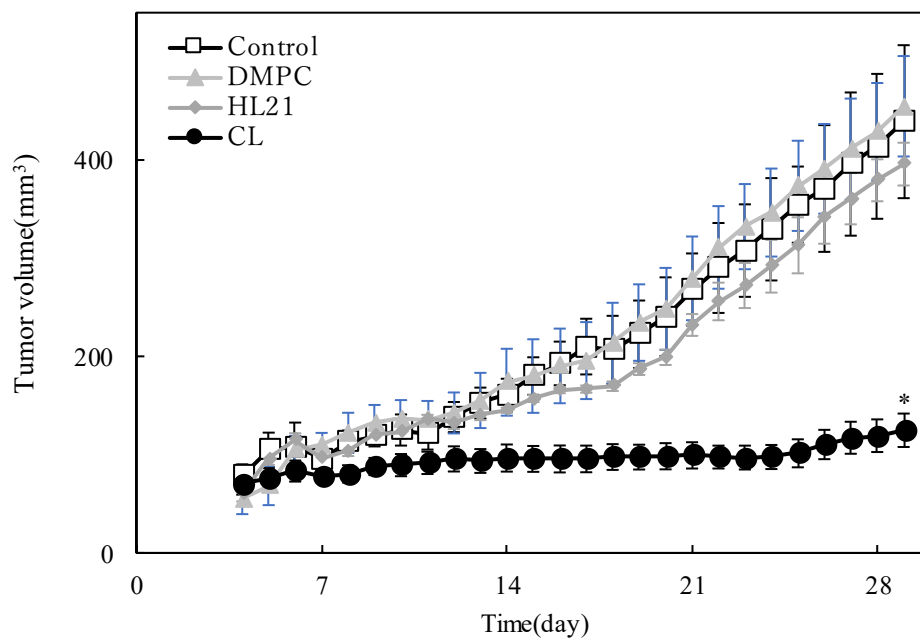


Fig. 6-3 Tumor volume change in xenograft mouse models of pancreatic cancer treated with CL after the inoculation of BxPC-3 cells.
 * $p < 0.05$ (vs. Control).
 Data represent the mean ($n=5$) \pm S.E.

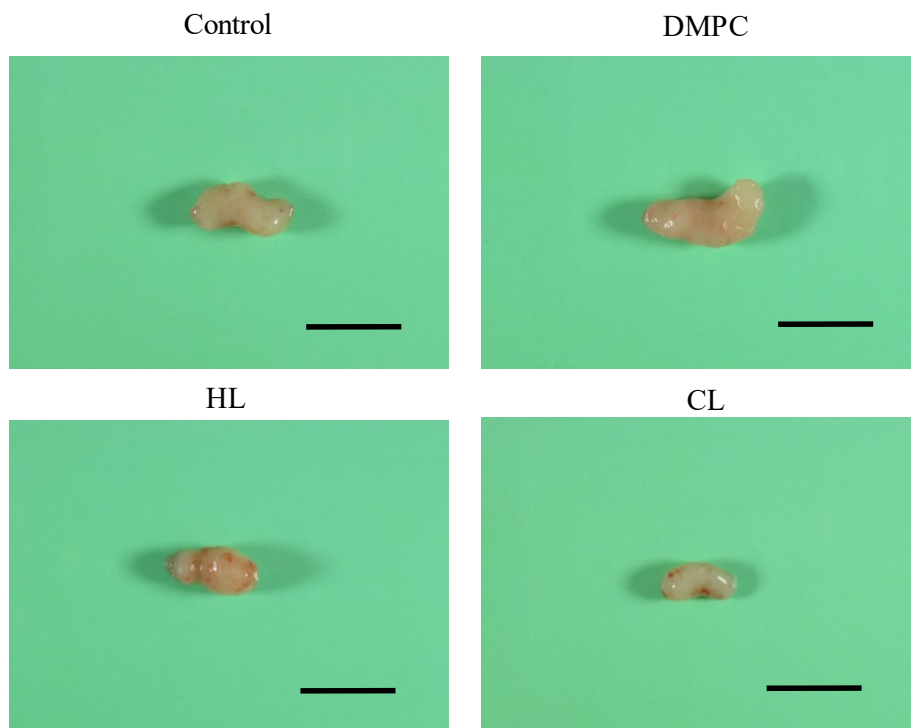


Fig. 6-4 Photographs of tumor in mouse models of pancreatic cancer treated with CL after the inoculation of BxPC-3 cells. Scale bar: 1cm.

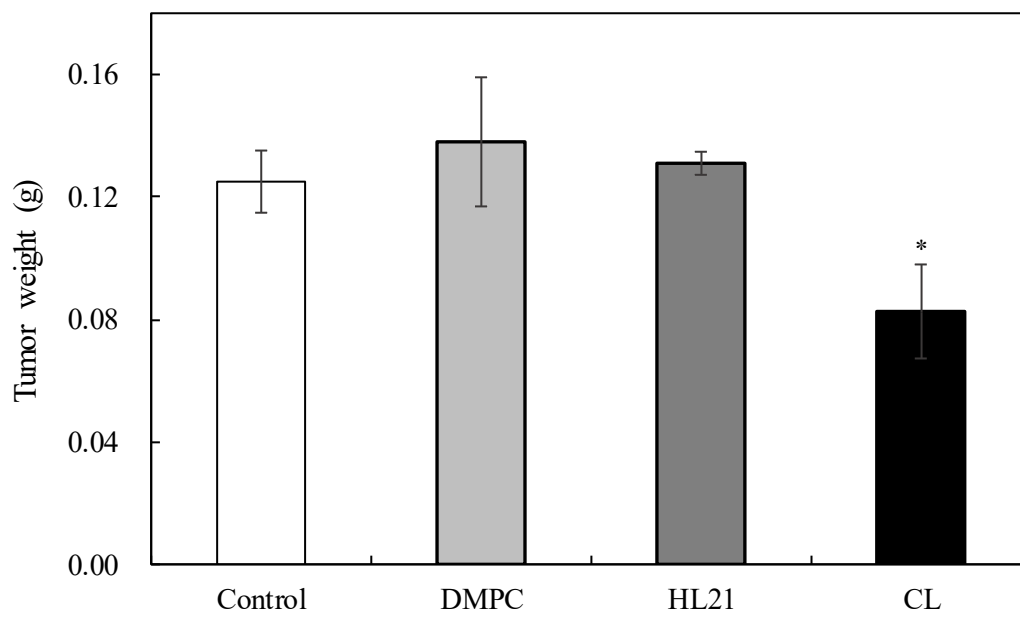


Fig. 6-5 Tumor weight of xenograft mouse models of pancreatic cancer treated with CL after the inoculation of BxPC-3 cells.

* $p < 0.05$ (vs. Control).

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

6-3-2 皮下移植モデルマウスに対するアポトーシス誘導

CLの *in vivo*における皮下腫瘍モデルマウス腫瘍組織に対するアポトーシス誘導について検討した。投与終了翌日に解剖し摘出した腫瘍からパラフィン切片を作製し、TUNEL法により染色した後に顕微鏡観察を行った。結果を Fig.6-6に示す。Control群、DMPC投与群、HL投与群ではTUNEL陽性細胞が観察されなかったのに対し、CL投与群ではアポトーシス細胞が観察され、*in vivo*におけるアポトーシス誘導が明らかとなった。

以上の結果から、カチオンリポソームは皮下移植モデルマウスの腫瘍に対して、アポトーシスを誘導していることが明らかとなった。

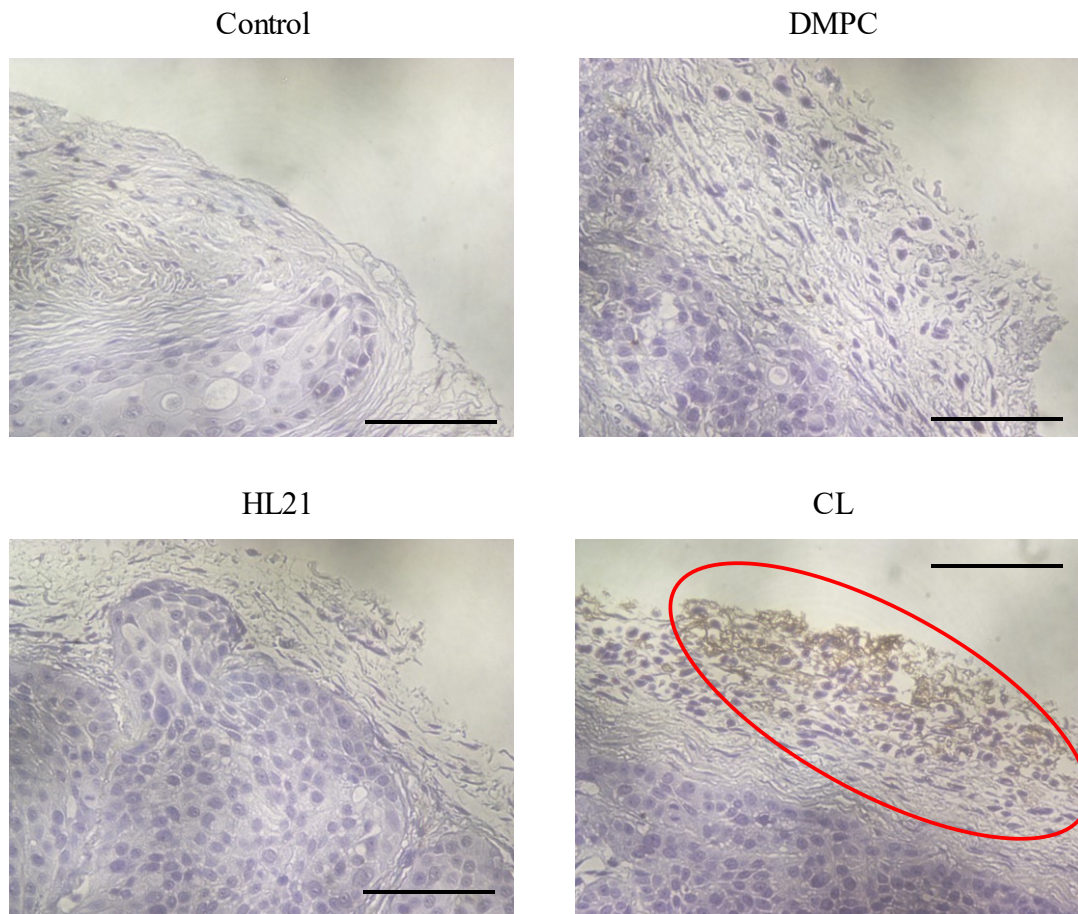


Fig. 6-6 Micrographs of subcutaneous tumor section in xenograft mouse models of pancreatic cancer treated with CL using TUNEL method.
Circle: apoptotic cells.
Scale bar: 0.1cm.
Magnification: $\times 40$.

6-3-3 腹膜播種モデルマウスに対する治療効果

CL の *in vivo* における膵臓がん細胞腹膜播種モデルマウスに対する治療実験を行った。マウス体重の測定結果を Fig. 6-7 に示す。CL 投与群で異常な体重変化は見られなかった。一方、Control 群では、21 日目以降に腫瘍の増大した悪液質による食欲低下と思われる経時的な体重の減少が見られた。

投与終了 1 日後に解剖したところ、腸間膜の平均重量は、Control 群で 0.219g、CL 投与群で 0.162g となり、Control 群と比較して CL 投与群では抗腫瘍効果が確認された(Fig.6-8)。腸間膜上の腫瘍結節数をカウントしたところ、Control 群と比較して CL 投与群では腫瘍結節数が少なかった(Fig. 6-9)。また、肉眼的観察から Control 群に比べ、CL 投与群では腫瘍結節の減少が確認された(Fig. 6-10)。

以上の結果から BxPC-3 細胞腹膜播種モデルマウスに対する CL の治療効果が明らかとなった。

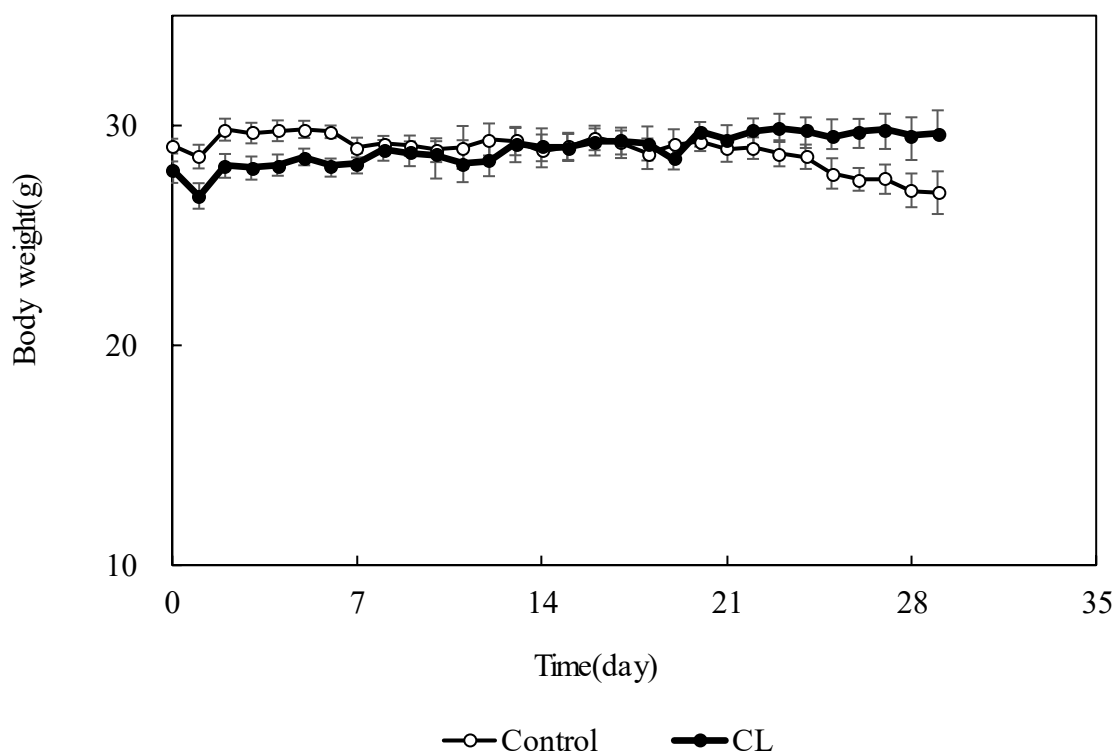


Fig. 6-7 Body weight change in peritoneal dissemination model mice of pancreatic cancer treated with CL after the inoculation of BxPC-3 cells.

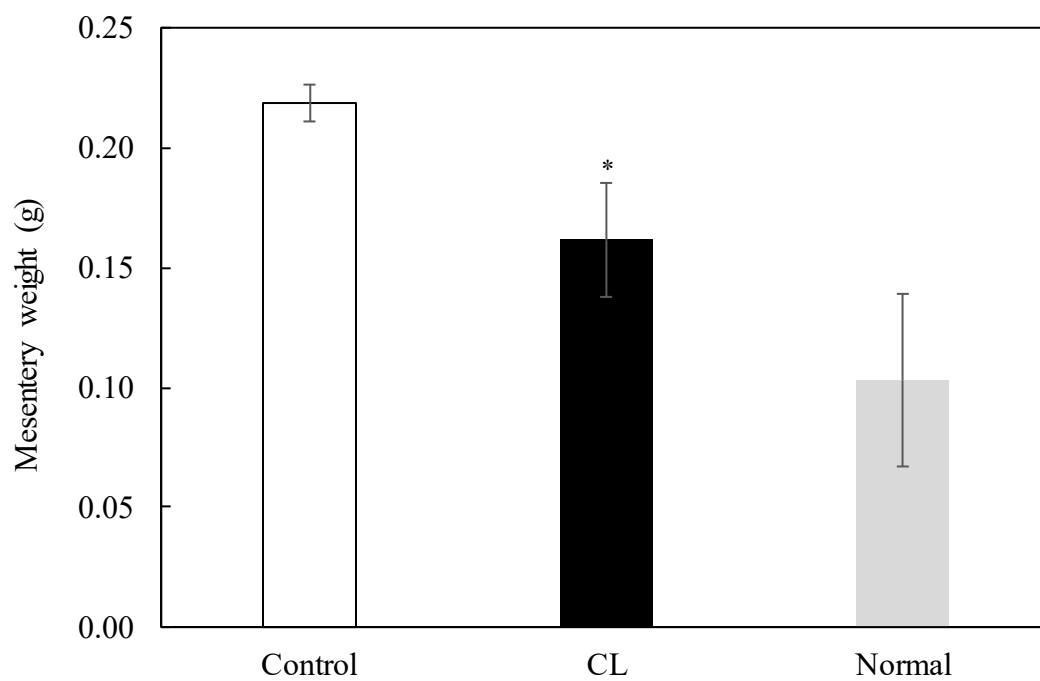


Fig. 6-8 Mesentery weight in peritoneal dissemination model mice of pancreatic cancer treated with CL after the inoculation of BxPC-3 cells.
* $p < 0.05$ (vs. Control).

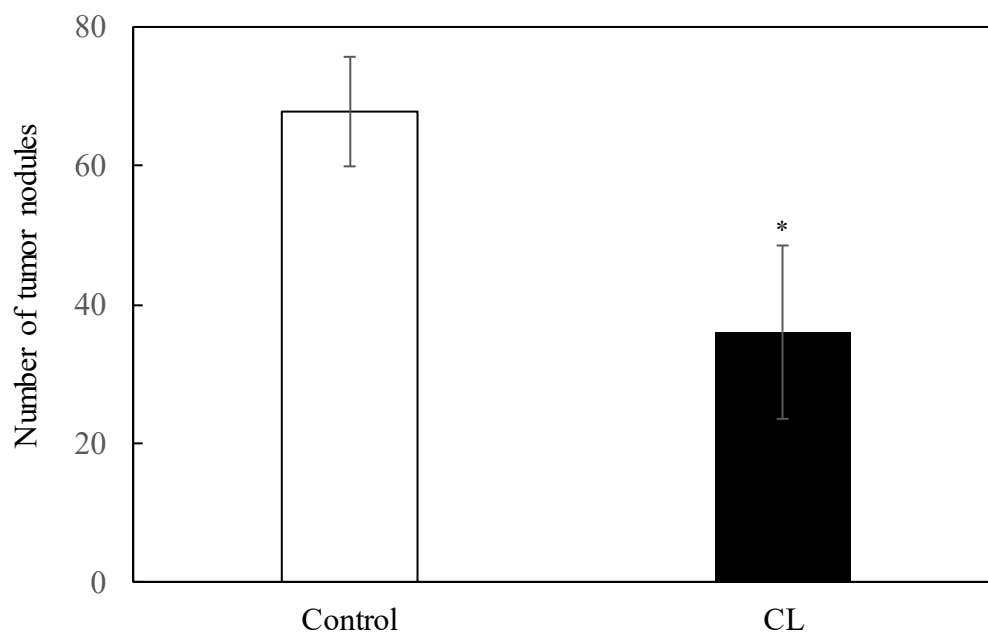


Fig. 6-9 Number of tumor nodules on mesentery in mice treated CL after the inoculation of BxPC-3 cells.
* $p < 0.05$ (vs. Control).

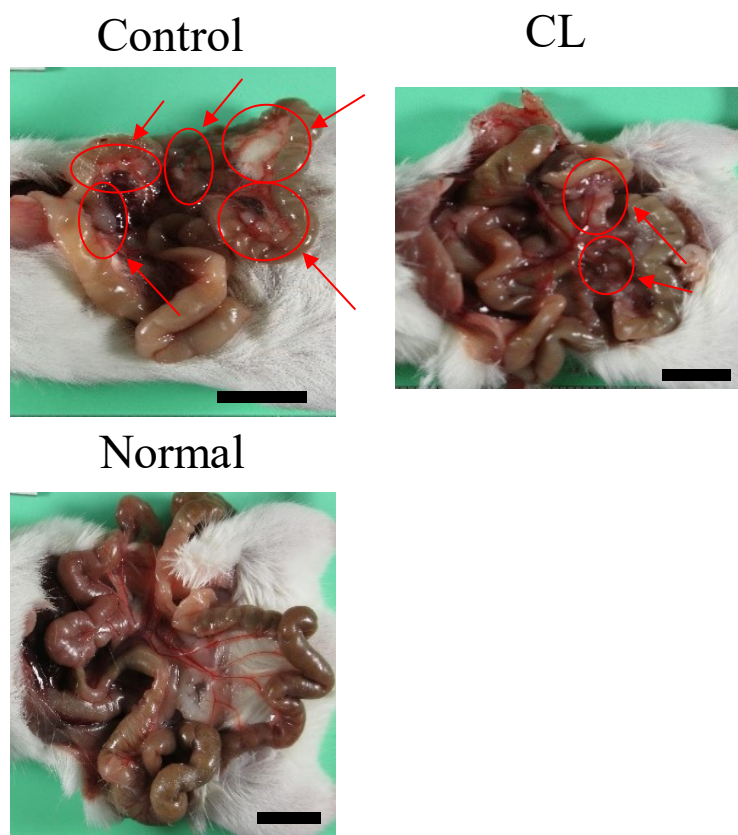


Fig.6-10 Photographs of mesentery in mice treated CL after the inoculation of BxPC-3 cells. Scale bar : 1cm.

6-4 総括

本章では 87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECl$ カチオンリポソーム(CL)のヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞の皮下移植および腹膜播種モデルマウスに対する治療効果を検討し、以下のような興味深い知見が得られた。

1. 皮下移植モデルマウスに対する治療実験において、マウスの重量変化では、DMPC 投与群及び HL 投与群、CL 投与群で異常な体重変化は見られず、Control 群と同様の体重推移で経時的に増加し、全ての試料で毒性は見られなかった。皮下腫瘍体積では Control 群、DMPC 投与群および HL21 投与群と比較して、CL 投与群で有意な腫瘍増大抑制効果が確認された。肉眼的観察から Control 群に比べ、CL 投与群では腫瘍の大きさが約 1/2 となり、腫瘍重量では Control 群と比較して CL 投与群では 2/3 となり CL の膵臓がん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。
2. TUNEL 染色による皮下腫瘍組織切片の画像解析から、CL 投与群においてアポトーシス誘導細胞が多く観察され、*in vivo* におけるアポトーシス誘導が明らかとなった。
3. 腹膜播種モデルマウスに対する治療実験において、マウスの重量変化では、CL 投与群で異常な体重変化は見られず、毒性は見られなかった。一方、Control 群では、21 日目以降に腫瘍が増大した悪液質による食欲低下と思われる経時的な体重の減少が見られた。また、腸間膜の平均重量は、Control 群と比較して、CL 投与群で有意に減少し、抗腫瘍効果が確認された。腸間膜上の腫瘍結節数をカウントしたところ、Control 群と比較して CL 投与群では腫瘍結節数が少なく、また肉眼的観察から Control 群に比べ、CL 投与群では腫瘍結節数の減少が確認され、CL の膵臓がん腹膜播種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。

以上の結果から、87mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{21}$ /8mol% $2C_{14}ECl$ カチオンリポソームは *in vivo* においてヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞皮下移植モデルマウスに対してアポトーシスを誘導し、治療効果を示していることが明らかとなった。また、ヒト膵臓がん(BxPC-3)細胞腹膜播種モデルマウスに対する顕著な治療効果が確認された。

第7章 総論

現在、我が国における死因の一位を占めているのはがんである。がんの罹患率は男女ともに50歳から急速に増加し、大腸がん、胃がんおよび肺がんによる死亡率が高い。がんの治療法にはいくつか選択肢があるが、主に手術療法、放射線療法および化学療法と呼ばれる三大療法が挙げられる。しかし、いずれの治療法でも副作用が伴うため患者のQOLの問題があり、その軽減が課題とされる。

大腸がんは結腸および直腸に発生するがんの総称である。日本人はS状結腸および直腸にがんが出来やすいと言われており、大腸がんは早期に発見することにより、内視鏡的切除や手術療法により完治することができる。しかし、早期の段階では自覚症状がほとんどなく進行していくにつれて症状が出ることが多い。症状としては血便や長期の下痢が挙げられる。大腸がんの治療には多くの問題点があり、手術療法では、術後に、縫合不全、創感染等の合併症が生じることがある。手術療法と並行して行われる放射線療法には、疲労感やだるさ、食欲不振などが起こりやすく、化学療法には抗がん剤による諸局低下や吐き気、皮膚炎、白血球の減少などの副作用がある。

膵臓がんの罹患率は60歳頃から増加していき、高齢になるにつれて高くなる。さらに、膵臓がんの死亡率は1980年代後半まで増加し、1990年以降は緩やかに増加する傾向にある。膵臓がんは見つかる時には進行していることが多く、5年生存率が低い。そのため、難治性がんと呼ばれている。膵臓がんの治療は手術による切除が可能な場合は手術を行うことで治すことが出来る。しかし、見つかった時点で肝臓や肺などへの転移や血管へがんが広がっていることが多く、すでに手術不可能であるため、放射線療法と薬物療法を併用する療法が標準治療とされている。しかし、化学療法には重篤な副作用がでることが問題となっているため、副作用のない抗がん剤が求められている。

松本らによって開発されたハイブリッドリポソームにカチオン性脂質を含有したカチオンリポソームは、*in vitro* 及び *in vivo* においてヒト腎臓がん(OS-RC-2)細胞に対する、高い増殖抑制効果およびアポトーシスを誘導することが明らかとなっている^{31,32}。また、ヒト大腸がん(HCT116)細胞に選択的に融合・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³³。CLはマイナス荷電の脂質含量の多いがん細胞膜に静電的相互作用で融合蓄積しやすく、その後アポトーシスを誘導すると考えられている。本研究は、ハイブリッドリポソームにカチオン性脂質を含有した、カチオンリポソームの *in vitro* におけるヒト大腸がん(HCT116)および膵臓がん(BxPC-3)細胞に対する制がん効果及び制がんメカニズムの解明、*in vivo* におけるカチオンリポソームの治療効果について検討した。以下、各章ごとに得られた興味ある知見に述べる。

第2章では、リン脂質(DMPC)、PEG系界面活性剤(C₁₂(EO)₂₁)及びカチオン性脂質(2C₁₄EC1)を用いて87mol%DMPC/5mol%C₁₂(EO)₂₁/8mol%2C₁₄EC1カチオンリポソーム(CL)を新しく調製し、リポソームの形態及び37°C保存における膜物性について検討した。なお、臨床応用を考慮し、調製溶媒に5%ブドウ糖溶液を用い調製した。動的光散乱法による膜直径の測定から、CLは37°C保存で直径が約100nmで安定し、長期間37°Cでの保存が可能であることが明らかとなった。

第3章では、CLのヒト大腸がん(HCT116)細胞に対する制がん効果について検討した。ヒト正常大腸(CCD-33Co)及びHCT116細胞膜のGM1及びPS量測定より、CCD-33Co細胞と比較してHCT116細胞はCT-B及びAnnexin-Vの強い蛍光強度が測定され、GM1及びPS量が多いことが確認された。レーザードップラー法を用いた細胞膜表面電荷の測定より、CCD-33Co細胞と比較してHCT116細胞は細胞膜表面電荷がマイナス側で、HCT116細胞の細胞膜表面がアニオン性に富んでいることが明らかとなった。CCD-33Co細胞に対する増殖抑制試験より、CCD-33Co細胞に対するCLのIC₅₀値はHCT116細胞と比較して3倍以上高く、正常細胞に対する毒性が低いことから、HCT116細胞に対する選択的な増殖抑制効果が明らかとなった。アポトーシス誘導メカニズムについて細胞内カスパーゼ-3,8,9活性を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察から、CLで処理した細胞では、緑色蛍光が観察され、HCT116細胞に対するアポトーシス誘導におけるカスパーゼ-3,8,9の活性化が明らかとなった。HCT116細胞膜脂質ラフトに対するクラスター形成の検討から、CLでは細胞膜の不均一化が確認され、CLはHCT116細胞膜脂質ラフトのクラスターを形成することが示唆された。CLのHCT116細胞移植モデルマウスに対する治療効果を検討した。HCT116細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験において、体重測定から、CL投与群で異常な体重変化は見られず、マウスに対する毒性がないことが明らかとなった。腫瘍体積測定及び肉眼的観察から、CLは顕著な治療効果を示した。TUNEL法による皮下腫瘍切片の画像解析からCL投与群ではアポトーシス陽性細胞が多く観察され、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、CLのBxPC-3細胞に対する制がん効果について検討した。正常膵臓細胞およびBxPC-3細胞における細胞膜のGM1及びPS量測定により、正常膵臓細胞と比較してBxPC-3細胞ではCT-B及びAnnexin-Vの強い蛍光が確認され、細胞膜表面にGM1及びPSが多いことが明らかとなった。レーザードップラー法を用いた細胞膜表面電荷の測定により正常膵臓細胞と比較してBxPC-3細胞は、細胞膜表面電荷がマイナス側で、BxPC-3細胞の細胞膜表面がアニオン性に富んでいることが明らかとなった。CLの正常膵臓細胞に対するIC₅₀は1000μM以上であり、非常に低毒性であった。一方、CLのBxPC-3細胞に対する

IC₅₀ は約 400 μ M と高い増殖抑制効果を示した。TUNEL assay および PI assay を用いて CL の BxPC-3 細胞に対するアポトーシス誘導を検討した。CL で処理した細胞では TUNEL 陽性を示す緑色蛍光が多く観察された。また、PI assay より、CL で処理した細胞では 80% の DNA が断片化していた。以上のことから CL は BxPC-3 細胞に対してアポトーシスを誘導していることが明らかとなった。CL の BxPC-3 細胞に対するアポトーシス誘導機構についてカスパーズ及びミトコンドリアの関与を検討した。CL で処理した細胞ではカスパーズ-3, -8, -9 の活性を示す緑色蛍光が観察された。ミトコンドリア膜電位の測定により、CL で処理した BxPC-3 細胞では、ミトコンドリア膜電位の消失が明らかとなり、CL の BxPC-3 細胞に対するアポトーシス誘導においてカスパーズ及びミトコンドリアが関与していることが明らかとなった。

第 5 章では、CL の BxPC-3 細胞に対する転移抑制効果について検討した。CL で処理した BxPC-3 細胞では Control と比較して仮足の形成が見られず、CL の BxPC-3 細胞に対する仮足阻害効果が明らかとなった。また、Scratch assay により CL の BxPC-3 細胞に対する遊走抑制効果について検討を行った。CL で処理した BxPC-3 細胞では、細胞剥離直後と 24 時間後において細胞剥離面に大きな差が見られず、細胞の遊走が顕著に抑制されており、CL の BxPC-3 細胞に対する遊走抑制効果が明らかとなった。さらに、CL の BxPC-3 細胞に対する浸潤抑制効果について検討した。Invasion assay において、CL で処理した細胞では Control と比較して濃度依存的に浸潤を抑制することが確認された。また、MMP14 量は CL で処理した細胞では減少することが得られた。さらに、ELISA による MMP2 および MMP9 量において CL で処理した細胞では MMP2 および MMP9 量が減少していることが明らかとなった。

第 6 章では、BxPC-3 細胞移植モデルマウスに対する CL の治療効果を検討した。BxPC-3 細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験において、すべての群においてマウスの体重に異常な変化は見られず、毒性は見られなかった。また、腫瘍体積測定及び肉眼的観察から、CL は顕著な治療効果を示した。TUNEL 法による皮下腫瘍切片の画像解析から CL 投与群ではアポトーシス陽性細胞が多く観察され、アポトーシスを誘導していることが明らかとなった。さらに、BxPC-3 細胞腹膜播種モデルマウスに対する治療効果において CL 投与群では異常な体重変化は見られなかった。一方、Control 群では、21 日目以降に腫瘍増大による食欲低下と思われる経時的な体重の減少が見られた。腸間膜の平均重量は Control 群と比較して、CL 投与群では低く抗腫瘍効果が得られた。腸間膜上の腫瘍結節数及び肉眼的観察から Control 群に比べ、CL 投与群では腫瘍結節の減少が確認された。

以上述べたように、リン脂質である DMPC、PEG 系界面活性剤である C₁₂(EO)₂₁、

さらにカチオン性脂質である 2C₁₄EC1 を加えた CL は大腸がん(HCT116)細胞に対して *in vitro* 及び *in vivo* での治療効果が明らかとなった。また、膵臓がん(BxPC-3)細胞に対して *in vitro* においてアニオン性に荷電している細胞膜に特異的に融合・蓄積し、アポトーシスを誘導することが確認された。BxPC-3 に細胞に対し、遊走および仮足の形成を阻害し、転移を抑制ことが明らかとなった。*invasion assay* から浸潤を抑制することが明らかとなった。CL は BxPC-3 細胞の浸潤を抑制する過程で、MMP14、MMP2 および MMP9 の活性を抑制していた。*in vivo* において BxPC-3 細胞の皮下移植モデルマウスおよび腹膜播種モデルマウスに対する治療効果が明らかとなった。以上のことから、今後臨床応用の可能性が示された。さらに、多くのがんに対する、臓器・組織への選択性の向上による副作用のない治療薬になることが期待される。

参考文献

- 1) 西村尚子, ヒトの遺伝子と細胞, 技術評論社 (2014).
- 2) 宮沢恵二、伊藤進, がん増殖と悪性化の分子機構, 化学同人 (2012).
- 3) 谷口直之, 鈴木敬一郎, 松浦成昭, 手島昭樹, がんのベーシックサイエンス, メディカル・サイエンス・インターナショナル (1993).
- 4) R. Ueoka, R. A. Moss, S. Swarup, Y. Matsumoto, G. Strauss, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185 (1985).
- 5) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R. A. Moss, S. Swarup, A. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988).
- 6) Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **55**, 5797 (1990).
- 7) R. Ueoka, H. Dozono, Y. Matsumoto, H. Cho, K. Kitahara, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 219 (1990).
- 8) R. Ueoka, E. Yamada, O. Yamashita, Y. Matsumoto, Y. Kato, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6597 (1991).
- 9) K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **60**, 3342 (1995).
- 10) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Oyama, H. Takekura, M. Iio, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4640 (1988).
- 11) Y. Matsumoto, E. Yamada, J. Hitano, M. Iwahara, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 213 (1993).
- 12) I. Kitamura, M. Kochi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, J. Kuratsu, Y. Ushio, *Cancer Res.*, **56**, 3986 (1996).
- 13) R. Ueoka, Y. Matsumoto, *Bio Industry*, **10**, 221 (1993).
- 14) Y. Matsumoto, C. Imamura, T. Ito, C. Taniguchi, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1456 (1995).
- 15) Y. Matsumoto, T. Kato, S. Iseki, H. Suzuki, K. Nakano, M. Iwahara, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1937 (1999).
- 16) Y. Matsumoto, T. Kato, S. Iseki, H. Suzuki, K. Nakano, R. Ueoka, *YAKUGAKU ZASSHI*, **119**, 280 (1999).
- 17) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 380 (2006).
- 18) R. Ueoka, Y. Komizu, Y. Matsumoto, Yu Zhong, R. Tanaka, N. Yamamoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 4578 (2008).
- 19) Y. Matsuoka, M. Nagata, Y. Komizu, H. Ichihara, S. Kawase, Y. Sawada, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2010).
- 20) Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131 (2008).
- 21) M. Yukihara, Y. Komizu, O. Tanoue, T. Matsushita, Y. Matsumoto, R. Ueoka,

- YAKUGAKU ZASSHI*, **130**, 1583 (2010).
- 22) Y. Matsumoto, Y. Iwamoto, T. Matsushita, R. Ueoka, *Int. J. Cancer*, **115**, 337 (2005).
- 23) A. Kanno, K. Tsuzaki, M. Miyagi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1013 (1999).
- 24) R. Ueoka, Y. Matsumoto, A. Kanno, K. Tsuzaki, H. Ichihara, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1262 (2000).
- 25) H. Ichihara, K. Funamoto, T. Matsushita, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **394**, 174 (2010).
- 26) 根岸由香, 吉沢譲治, 山崎洋次, 松本陽子, 上岡龍一, *日本小児科外科学会雑誌*, **41**, 930 (2005).
- 27) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **315**, 167 (2006).
- 28) H. Ichihara, H. Nagami, K. Yamamoto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *YAKUGAKU ZASSHI*, **123**, 25 (2003).
- 29) H. Ichihara, H. Nagami, T. Kiyokawa, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2008).
- 30) T. Utsugi, A. J. Schroit, J. Connor, C. D. Bacana, I. Fidler, *Cancer Res.*, **51**, 3062 (1991).
- 31) M. Umebayashi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1816 (2008).
- 32) M. Umebayashi, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **30**, 327 (2010)
- 33) M. Hino, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 2097 (2012).
- 34) H. Ichihara, M. Hino, R. Ueoka, Y. Matsumoto, *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 498 (2014).
- 35) 梅林雅代, 崇城大学博士論文(2009)
- 36) 加藤隆一, 臨床薬物動態学, 南江堂(1992).
- 37) 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).
- 38) 橋田充, 高倉善信, 図解で学ぶ DDS, じほう (2015).
- 39) M. Yokoyama, *Drug Delivery System*, **23**, 611 (2008).
- 40) 厚生労働省, 人口動態統計, (<http://www.mhlw.go.jp/>).
- 41) 藤田恒夫, 入門人体解剖学, 南江堂 (2012)
- 42) 山口和克, 病気の地図, 講談社(2000).
- 43) O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. cell Comp. Physiol.*, **59**, 223 (1962).
- 44) D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Gene*, **111**, 229 (1992).
- 45) R. Y. Tsien, *Ann. Rev. Biochem.*, **67**, 509 (1998).
- 46) M. V. Matz, A. F. Fradocov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zاراisky, M. L.

- Markelov, S. A. Lukyanov, *Nature Biotechnol.*, **17**, 969 (1999).
- 47) S. V. Heyningen, *Science*, **183**, 656 (1974).
- 48) C. Gomez-Mouton, J. L. Abad, E. Mira, R. A. Lacalle, E. Gallardo, S. Jiménez-Baranda, I. Illa, A. Bernad, S. Mañes, C. Martinez-A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9642 (2001).
- 49) K. Shimada, A. Miyagishima, Y. Sadzuka, Y. Nozawa, Y. Mochizuki, H. Oshima, S. Hirota, *J. Drug Target.*, **3**, 238 (1995).
- 50) 関口有信, 荻野圭三, 山内仁史, 阿部正彦, *日本油化学会誌*, **44**, 184 (1995).
- 51) 広田貞雄, 佐塚泰之, *日本油化学会誌*, **45**, 1125 (1996).
- 52) 高木俊夫, *電気泳動学会総会*, **36**, 21 (1992).
- 53) 大島広行, 尾崎正孝, 北原文雄, 古澤邦夫, 「ゼータ電位-微粒子界面の物理学」, サイエンス社 (1995).
- 54) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sakamoto, M. Mizoguchi, P-G He, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118 (1993).
- 55) A. Komoriya, B. Z. Packard, M. J. Brown, M. L. Wu, P. A. Henkart, *J. Exp. Med.*, **191**, 1819 (2000).
- 56) W. G. Telford, A. Komoriya, B. Z. Packard, *Cytometry*, **47**, 81 (2002).
- 57) B. Z. Packard, A. Komoriya, T. M. Brotz, P. A. Henkart, *J. Immunology.*, **167**, 5061 (2001).
- 58) D. Lukovic, A. Komoriya, B. Z. Packard, D. S. Ucker, *Exp. Cell Res.*, **289**, 384 (2003).
- 59) 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).
- 60) W. G. Telford, A. Komoriya, B. Z. Packard, *Methods Mol. Biol.*, **263**, 141 (2004).
- 61) S. Juntrakul, P. Ruangvejvorachai, S. Shuangshoti, S. Wacharapluesadee, T. Hemachudha, *BMC Infect. Dis.*, **5**, 104 (2005).
- 62) 渋谷正史, 湯浅保仁, *がん生物学イラストレイテッド*, 羊土社 (2011).
- 63) H. A. Burris, M. J. Moore, J. Andersen, M. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Elson, F. A. Dorr, CD. Stephens, DD. Von Hoff, *J. Clin. Oncol.*, **15**, 2403 (1997).
- 64) S. R. Bramhall, A. Rosemurgy, P. D. Brown, C. Bowry, J. A. Buckels, *J. Clin. Oncol.*, **19**, 3447 (2001).
- 65) P. Cheverton, H. Friess, C. Andras, T. Salek, C. Geddes, G. Bodoky, J. Valle, Y. Humblet, *J. Clin. Oncol.*, **22**, 4005 (2004).
- 66) M. J. Moore, D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J. R. Hecht, S. Gallinger, H. J. Au, P. Murawa, D. Walde, R. A. Wolff, D. Campos, R. Lim, K. Ding, G. Clark, T.

- Voskoglou-Nomikos, M. Ptasynski, W. Parulekar, *J. Clin. Oncol.*, **25**, 1960 (2007).
- 67) A. W. Robert, B. E. Douglas, M. G. Diane, L. Renato, W. T. P. Peter, E. L. Jeffrey, A. J. Nora, C. Chusilp, L. A. James, *Clin. Cancer Res.*, **7**, 2246 (2001).
- 68) D. D. Von Hoff, T. Ervin, F. P. Arena, E. G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S. A. Tjulandin, W. W. Ma, M. N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N. Bahary, R. K. Ramanathan, J. Tabernero, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias, M. F. Renschler, *N. Engl. J. Med.*, **369**, 1691 (2013).
- 69) P. E. Lacy, M. Kostianovsky, *Diabetes*, **16**, 35 (1967).
- 70) Y. Gavrieli, Y. Sherman, S. A. Ben-Sasson, *J. Cell Biol.*, **119**, 493 (1992).
- 71) R. S. Douglas, A. D. Tarshis, C. H. Jr. Pletcher, P. C. Nowell, J. S. Moore, *J. Immunol. Methods*, **188**, 219 (2000).
- 72) 山口武, 大山ハルミ, 刀弥重信, 木崎治俊, 田沼靖一, アポトーシス-細胞死の機能と機構-, 日経サイエンス社 (2001).
- 73) 川口隆憲, “癌転移論”, 金原出版 (2002).
- 74) G. Poste, J. I. Fidler, *Nature.*, **283**, 139 (1980).
- 75) 伊藤義文, 「細胞工学」, 秀潤社, **17**, 4 (1998).
- 76) 安生紗子, 齋藤彌, 佐藤光利, 寺田勝英, 渡辺宰男, 新薬創薬への招待—開発から市販後の監視まで— (2003).
- 77) S. Mark, J. P. Zimmer, D. G. Duda, T. S. Levchenko, K. S. Cohen, E. B. Brown, D. T. Scadden, V. P. Torcillin, M. G. Bawendi, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nat. Med.*, **11**, 678 (2005).
- 78) L. A. Repesh, *Invasion Metastasis*, **9**, 192 (1996).
- 79) E. W. Thompson, S. Nakamura, T. B. Shima, A. Melchiori, G. R. Martin, S. Z. Shalahuddin, R. C. Gallo, A. Albini, *Cancer Res.*, **51**, 2670 (1991).
- 80) V. P. Terranova, E. S. Hujanen, D. M. Loeb, G. R. Martin, L. Thornburg, V. Glushko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 465 (1986).
- 81) S. V. Boyden, *J. Exp. Med.*, **115**, 453 (1962).
- 82) A. Albini, Y. Iwamoto, H. K. Kleinman, G. R. Martin, S. A. Aaronson, J. M. Kozlowski, R. N. McEwan, *Cancer Res.*, **47**, 3239 (1987).
- 83) J. F. Woessener Jr., *FASEB. J.*, **5**, 2145 (1991).
- 84) 佐藤博, 癌転移と膜型マトリックスメタロプロテアーゼ, *日本血栓止血学会誌*, **9**, 91 (1998).
- 85) 社団法人日本実験動物協会, 実験動物の技術と応用 入門編, (株)丸善 (2004).
- 86) 社団法人日本実験動物協会, 実験動物の技術と応用 実践編, (株)丸善 (2004).

87) A. Ono, S. Hattori, R. Kariya, S. Iwanaga, M. Taura, H. Harada, S. Suzu, S. Okada,
J. Biomed. Biotechnol., **26**. 539748 (2011).

謝辞

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

本研究を進めるにあたり、貴重な御教示並びにご助言を賜りました市原英明教授に厚く御礼申し上げます

本研究を進めるにあたり、貴重な御教示並びにご意見を賜りました松下琢教授に厚く御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、貴重なご意見を賜りました寺本祐司教授に深く感謝の意を表します。

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

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、特に実験面に協力して頂いた日野元貴氏、山之内萌氏、桑原啓司氏、奥村真樹君、菊本ありささん、桑野将好君、中島裕美さん、栗山公佑君に深く御礼申し上げます。