

第1章 緒論

がんは、日本において昭和 56 年より日本人の死因の第 1 位で、現在では、年間 35 万人以上の国民が、がんで亡くなっている。また、生涯のうちにかんにかかる可能性は、男性の 2 人に 1 人、女性の 3 人に 1 人と推測されている。加速する高齢化によって、今後ますます増えることが予想されている。

がんは、感染症等とは異なり、本来は自分の細胞であったものが、増殖のコントロールが効かなくなり、自立的にかつ無制限に増殖を始めたものである。がんは造血器由来のもの、非上皮細胞由来のもの、上皮細胞由来のものに大きく分類される。造血器由来のものには、白血病、悪性リンパ腫、骨髄腫等がある。非上皮細胞由来のものには、骨肉腫、繊維肉腫、血管肉腫等があり、一般的に若年者に多く見られる。一方、上皮細胞由来のがんには、大腸がん、胃がん、食道がん、肺がん、乳がん等があり、高齢者に多く見られる¹⁾。

2012 年の部位別のがん死亡者数は、男性では、消化器系のがん (胃、大腸、肝臓) の死亡が多くを占め、女性では、40 歳代では乳がん、子宮がん、卵巣がんの死亡が多くを占めるが、高齢になるほどその割合は減少し、男性と同じく消化器系のがん (胃、大腸、肝臓) と肺がんの割合が増加する (Fig.1-1)。

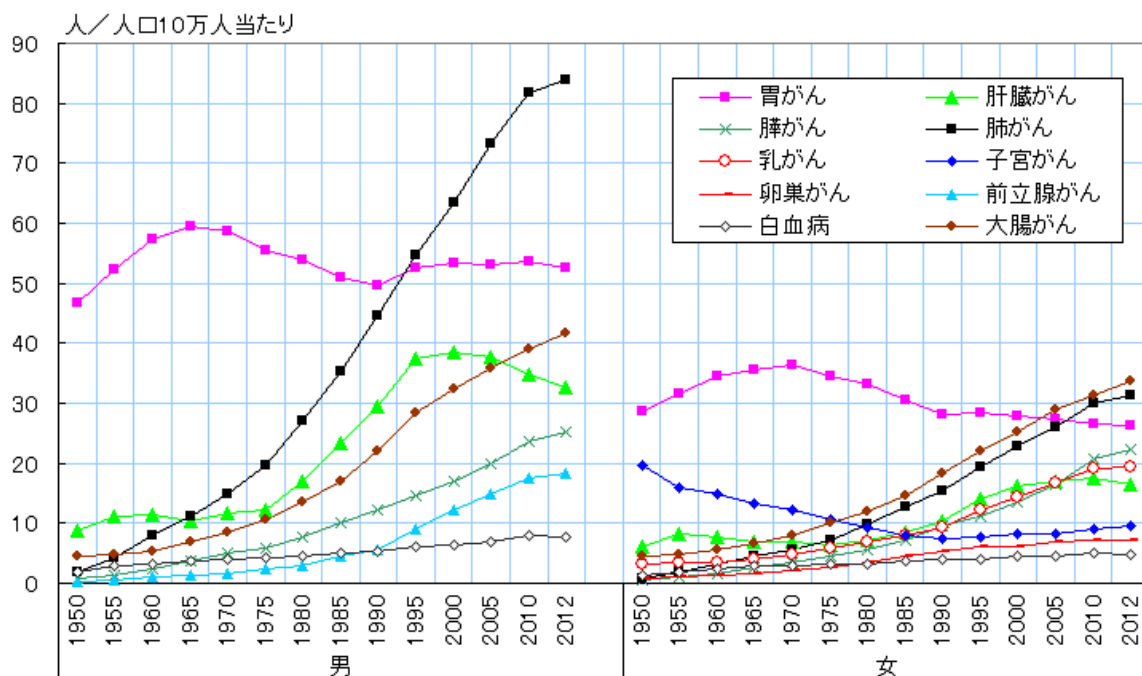


Fig.1-1 部位別がん死亡率の推移²⁾。

発がんの原因としては、喫煙や食事等による生活習慣が多くを占める (Fig.1-2)²⁾。がんで亡くなる人が毎年増加する原因は、急速に進行している高齢化が背景にある。日本では 50 歳頃からがんで死亡する人が増え始め、年齢が進むにつれ加速度的に死亡率が上昇していく¹⁾。

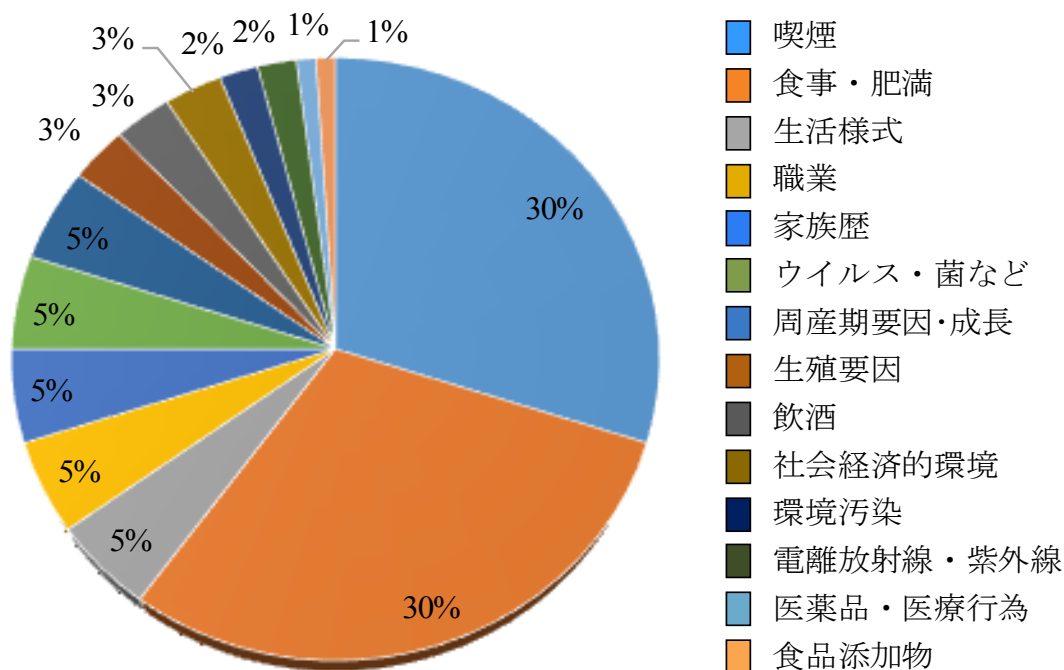


Fig.1-2 発がんの原因²⁾。

大腸粘膜に発生する上皮性悪性腫瘍である大腸がん (Colorectal Cancer) の死亡率は、男性では肺がん、胃がん、肝臓がんについて第 4 位で、女性では第 1 位である。大腸がんは、近年増加しており、年齢調整率では死亡、罹患とも男性が女性の約 2 倍であり、結腸より直腸において男女差が大きい。男女とも罹患数が死亡数の約 2 倍であり、生存率が比較的高いことと関連している。大腸がんのほとんどが腺がんで、その大部分が高分化腺がんである。がんの深達度から粘膜層ないし、粘膜下層にとどまる早期がんと、固有筋層より深部に浸潤した進行がんに分けられる¹⁾。

発がんに関しては、環境的要因と遺伝的要因の両面が重視されている。環境的要因では、タンパク質・高脂肪の摂取等が考えられ、遺伝的要因や年齢等が複雑に関与していると考えられている。大腸がんの発生には2つの経路があると考えられている。1 つは良性のポリープ (腺腫 : Adenoma) ががんになる経路、腺腫-がん連関 (Adenoma-Carcinoma Sequence) と呼ばれ、約 5% ががん化するため綿密な検査や治療が必要となる。もう 1 つは正常粘膜が発がん刺激を受け

で直接がんが発生する経路である。このがんは *de novo* がんと呼ばれる。

がんは、発がん遺伝子の出現や発がんを抑制する遺伝子の異常により発生するものである。がんの発生やがんの進行には多くの遺伝子が関与している。腺腫-がん連関では、APC 遺伝子により腺腫が発生し、K-ras 遺伝子や P53 遺伝子の異常が加わって腺腫ががん化すると考えられている。

大腸がんの治療法は、内視鏡的治療、手術治療、化学療法、放射線療法等があり、がんの進行により選択され、一般的にいくつかの治療方法を組み合わせで行われている (Table. 1-1)⁴⁾。進行大腸がんの化学療法の進歩は近年著しく、欧米では分子標的薬として 2003 年セツキシマブが、2006 年パニツムマブが使用可能となった。再発または手術不可能な大腸がんは、使用できる薬をすべて使うことができれば、平均生存期間 36 カ月を達成することは難しくなく、5 年生存も決して珍しくない¹⁾。現在、大腸がんには、L-OHP、CPT-11、5-FU/LV、カペシタビンに加え、分子標的薬のセツキシマブ、パニツムマブと血管新生阻害剤のベバシズマブの 8 剤が有効である (Table. 1-2)。しかし、それぞれの副作用も大きく、副作用を抑えるために併用剤の投与が必須である⁵⁾。

Table. 1-1 大腸がんの治療方法⁴⁾。

| 治療法 | 特徴 |
|--------|---|
| 内視鏡的治療 | 早期がんに対し、内視鏡的ポリープ切除や内視鏡的粘膜切除にて除去する。 |
| 外科療法 | 直腸がん、結腸がんの原発巣とリンパ節郭清を外科的手術により切除し、根治的治療法を行う。 |
| 放射線療法 | 補助放射線療法：術後の再発抑制や術前の腫瘍量減量、肛門温存を目的として行う。 |
| | 緩和的放射線療法：切除不能進行再発大腸がんの症状緩和や延命を目的として行う。 |
| 化学療法 | 術後再発抑制を目的とした補助化学療法と、切除不能な進行再発大腸がんを対象とした全身化学療法がある。 |

Table. 1-2 大腸がんの抗がん剤⁴⁾.

| 抗がん剤 | | 薬理 | 副作用 |
|-----------|----------|---|--|
| 代謝拮抗薬 | 5-FU | 代謝産物であるFdUMPががん細胞内の核酸構成過程において必須なチミジル酸と拮抗し、DNA, RNAの合成及びそれに続くがん細胞の分裂を阻害する。 | 嘔気・嘔吐(8.2%)、白血球数減少(7.9%)、下痢・軟便(12.3%)、口内炎(6.7%) |
| 白金製剤 | オキサリプラチン | がん細胞内のDNA鎖と共用結合することでDNA鎖内及び鎖間の両者に白金-DNA架橋を形成する。これらの架橋がDNAの複製及び転写を阻害する。 | 末梢神経症状、ショック、アナフィラキシー様症状、骨髄抑制、食欲不振など |
| 植物アルカロイド薬 | イリノテカン | DNAトポイソメラーゼを阻害することにより、DNA合成を阻害する。殺細胞効果は細胞周期のS期に特異的である。 | 骨髄抑制、高度な下痢、腸炎(44.3%)、脱水 |
| 分子標的薬 | ベパシズマブ | ヒトVEGFと特異的に結合することにより、その生物活性を阻害し、腫瘍組織での血管新生を抑制し、腫瘍の増殖を阻害する。 | 好中球減少症(18.8%)、白血球減少症(18.5%)、高血圧(14.6%)、狭心症(0.1%)、脳梗塞(0.2%) |
| | セツキシマブ | キメラ型モノクローナル抗体であり、EGFR発現細胞のEGFRに対し高い親和性で結合する。 | 控創(87.2%)、発疹(61.5%)、食欲不振(56.4%)、下痢(51.3%)、口内炎(51.3%)、疲労(43.6%) |
| | パニツムマブ | 遺伝子組み換え型モノクローナル抗体であり、EGFR発現細胞のEGFRに対し高い親和性で結合し、EGFRに対するリガンドの結合の阻害及びEGFRの内在化を誘導する。 | 控創(65%)、発疹(55%)、口内炎(25%)、疲労(26%) |

胃がん (Stomach Cancer) は、悪性新生物の中で最も罹患率及び発生率が高く、多臓器に転移を起こし、死亡率も肺がんに次いで 2 番目に多い。人口 10 万人当たりの死亡率は男性 53.7 人、女性 26.6 人である。日本や中国等アジア諸国は欧米に比べ多く、日本では東北日本海側で頻度が多い。組織学的には腺がんが 95% と大部分を占める⁴⁾。

胃がんの原因としては、食生活、特に塩漬けの魚や肉、漬物等で塩分を大量に食べると胃がんになりやすいと考えられている。また、魚や肉の焼け焦げにも多くのニトロソアミンを始めとする発がん物質が多数含まれており、胃がんになりやすいとする疫学的調査がある。胃がんにおいては、がん遺伝子の C-K-ras、C-ervB-2、K-sam 等及びがん抑制遺伝子の P53 の異常が知られている。胃の粘膜下層にとどまる早期胃がんは内視鏡的治療法により粘膜ごと腫瘍を切除するが、筋層まで深達している進行胃がんは、外科療法により原発巣及びリンパ節郭清を切除する。手術の前後と同時に、化学療法が用いられる (Table.

1-3)⁴⁾。

Table. 1-3 胃がんの治療方法⁴⁾。

| 治療法 | 特徴 |
|--------|--|
| 内視鏡的治療 | リンパ節転移のない早期胃がんに対し、内視鏡的粘膜切除術 (Endoscopic Mucosal Resection : EMR) を用い粘膜ごと腫瘍と粘膜下層剥離術 (Endoscopic Submucoasal Dissection : ESD) を行い、粘膜ごと腫瘍部を切除する。 |
| 外科療法 | 進行がんに対し、胃がんの原発巣とリンパ節郭清を外科的手術により切除し、根治的治療法を行う。 |
| 化学療法 | 術後再発抑制を目的とした補助化学療法と、切除不能な進行再発胃がんを対象とした全身化学療法がある。 |

胃がんの化学療法に用いる抗がん剤には、TS-1、5-FU、マイトマイシンC、メトトレキサート、シスプラチン、CPT-11、パクリタキセル、ドセタキセル等がある。単独で使用する場合と、複数の抗がん剤を組み合わせる併用療法を行う場合があるが、抗がん剤による骨髄抑制、肝機能障害、消化管障害、色素沈着、食欲不振、間質性肺炎等の副作用が大きな問題になっている⁴⁾。

肝臓がん (Liver Cancer) には、肝臓そのものから発症した原発性肝がん (肝細胞がん(Hepatocellular Carcinoma : HCC)) と、他の臓器のがんが肝臓に転移した転移性肝がん (Metastatic Liver Cancer) がある。原発性肝がんの約 90% を肝細胞がんが占め、約 10% が胆管細胞がんである。肝細胞がんは、欧米に比べアジアやアフリカに多く、日本において、毎年新規の発症者数は 4 万人で、死亡数は 3 万 4 千人である。男性では肺がん、胃がんに次いで第 3 位であり、女性では肺がん、胃がん、大腸がん、膵臓がん、乳がんに次いで第 6 位である。肝細胞がんの発症要因は、80% が C 型肝炎ウイルスの感染で生じる C 型肝炎、15% が B 型肝炎ウイルスの感染で生じる B 型肝炎から発症する。それらの肝炎ウイルスの持続感染により長期間にわたって炎症と再生を繰り返す中で、一部の肝細胞が突然変異を起こし、細胞ががん化すると考えられている⁴⁾。

肝臓がんの治療は、移植療法、手術療法、穿刺療法、肝動脈化学塞栓術等の局所療法が中心に行われ、全身化学治療はほとんど行われていなかった (Table. 1-4)。しかし、2007 年に分子標的薬の一つであるソラフェニブトシル酸塩の延命効果が臨床試験において証明されて以来、全身化学療法が進行肝細胞がんに対する新たな治療法の一つに加わった。

Table. 1-4 肝臓がんの治療方法⁴⁾.

| 治療法 | 特徴 |
|----------|---|
| 手術療法 | 肝臓の再生能力を利用し、がん細胞に侵されている肝臓を部分的に切除する。 |
| 移植療法 | がん細胞に侵されている肝臓すべてを切除し、他人からの肝臓を移植する。 |
| 穿刺療法 | 超音波画像で確認しながら、体外から肝臓のがん細胞へ針を刺し、ラジオ波またはエタノールを注入し、がん細胞を死滅させる。 |
| 肝動脈化学塞栓術 | 血管造影で確認しながら、肝動脈に抗がん剤とゼラチン・スポンジを注入し、動脈を塞ぎがん細胞への血流を止め、がん細胞を死滅させる。 |
| 化学療法 | がん細胞の増殖と血管新生を抑制するためにソラフェニブを投与する。 |

日本では、2009年5月より切除不能な肝細胞がんに対して全身化学療法が用いられているが、重度の肝障害患者には予後の改善が期待できない。また、高血圧、手足症候群、脱毛、下痢等の副作用が高頻度に発生し、さらに肝機能が悪化する場合があるため、使用禁忌である。

2009年に、中国国家食品医薬品监督管理局 (SFDA) は、ドキソルビシンを熱感受性リポソームに封入した ThermoDox を用いた肝細胞がんの Phase III 試験を行うと発表した。温熱療法を併用して局所に 40~42°C の熱を集中させると、リポソーム内のドキソルビシン放出され、ドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System : DDS) により、高濃度のドキソルビシンを標的腫瘍内に選択的に集めることができ、ThermoDox の有効性と安全性が評価されている^{5,6)}。

2010年 American Society of Clinical Oncology (ASCO) で、B. Sangro 氏が切除不能な進行がんに対し、20~30 μ m のビーズにイットリウム-90 (90Y) を結合させたもので β 放射線を放出するラベルマイクロスフェアを用いた放射線塞栓療法が有効であることを発表した。治療開始から1週間以内に見られたグレード3の有害事象は、吐き気 2.7%、腹痛 2.0%、疲労感 0.8% だった。以降三か月までに見られたグレード3/4は、高ビリルビン血症 6.2%、肝機能障害 4.6%、疲労感 2.9% 等で、安全性が高く評価されている^{5,7,8)}。

肝細胞がんに対する肝移植後の肝臓がん再発予防に、免疫細胞療法としてNK細胞療法が期待でき可能性が示されている。一部の腫瘍細胞が TNF 関連アポ

トーチス誘導リガンド (TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand : TRAIL) に対するレセプターを有し、肝臓由来の NK 細胞の一部は TRAIL を発現していることを利用し、肝臓がん患者では肝移植後、免疫抑制剤による再発防止しやすい環境にあることに着目し、NK 細胞投与により肝細胞がんの再発に有効に作用していることが確認された。肝細胞がんの縮小や進行が止まったとの報告がある^{5,9)}。

ハイブリッドリポソーム (HL)^{10, 11)}は、リン脂質等のベシクル分子とミセル系界面活性剤を緩衝溶液中で超音波照射することで容易に得られ、調製時に有機溶媒の混入が全く無い。また、素材、組成比及びイオン強度の選択により、形態、膜直径、相転移温度、膜流動性等のコントロールが可能な生体適合性の高い新しい医療材料である (Fig.1-3)。

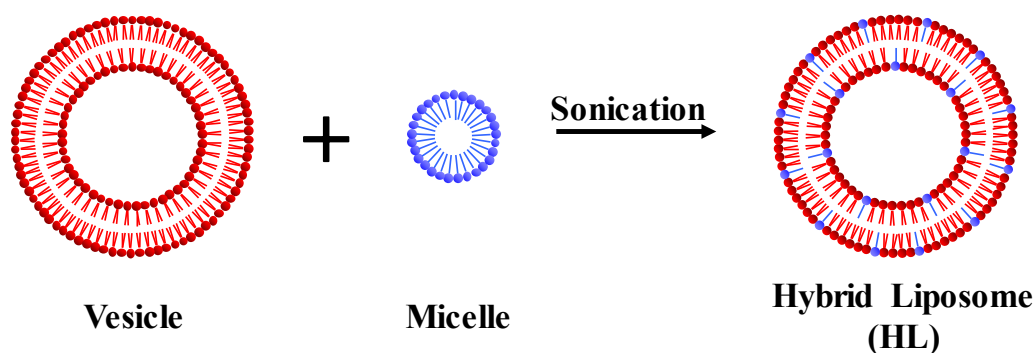


Fig.1-3 Schematic representation of hybrid liposomes.

HL は、動物を用いた安全性試験により、無毒性であることが明らかになっており、また、種々の培養がん細胞に対して、*in vitro* において、高い増殖抑制効果を示している。さらに、*in vivo* における担がんモデルマウスを用いた治療実験で、高い延命効果が報告されており、臨床試験では、生命倫理委員会承認後の治験で高い安全性及び固形リンパ腫瘍の縮小効果が得られている^{12, 13)}。これまでに、HL はヒト肝臓がん細胞¹⁴⁾、ヒト肺がん細胞¹⁵⁾、ヒト乳がん細胞¹⁶⁻¹⁸⁾、ヒト前骨髄性白血病¹⁹⁻²¹⁾、ヒト B リンパ腫、ヒト T リンパ腫²²⁾、ヒト大腸がん細胞²³⁾、マウス大腸がん細胞^{24, 25)}、コトラット胃腫瘍由来腹水性がん細胞^{26, 27)}、エイズ関連リンパ腫^{28, 29)}、ヒト胆管がん細胞³⁰⁾等多くのがん細胞に対して制がん効果を示すことが明らかとなっている。また、ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus : HIV) 感染細胞に対して、増殖抑制効果を示すことも報告されている³¹⁾。

一方、HL はドラッグキャリアーとしても用いられており、フラボノイド³²⁾、アドリアマイシン、アクリラルビシン、ペプロマイシン³³⁾を含有した HL のリン

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。また、ニトロソウレア系の抗がん剤 (BCNU) 含有 HL が脳腫瘍モデルラットの治療実験において、顕著な延命効果を示すことを明らかにしている³⁴⁾。さらに、蛍光脂質で修飾した HL は、肝臓がん細胞¹²⁾及び大腸がん細胞²³⁾にのみ融合蓄積し、正常細胞には蓄積しないことから、新しいがん診断薬としての可能性が期待されている。カチオン性脂質含有 HL は、ヒト腎臓がんに対し、*in vitro* 及び *in vivo* で制がん効果を示している^{35, 36)}。また、糖系界面活性剤³⁷⁻⁴⁰⁾を第三成分として含有させた HL は、*in vitro* において高い制がん効果が確認されており、糖の水和及び糖の認識の関与が示唆されている。

本研究では、がんの治療薬の開発を目指して、リン脂質 (DMPC) 及び糖系界面活性剤であるトレハロース (Trehalose : Tre) から構成されるトレハロース含有リポソーム (DMTreCn (n=12, 14, 16)) を創製して用いた。本論文は以下の 5 章から構成されている。第 2 章では、DMTreCn の膜物性について述べる。第 3 章では、DMTreCn の大腸がん及び胃がん細胞増殖抑制効果及びそのメカニズムについて述べる。第 4 章では、DMTreCn の肝臓がん細胞増殖抑制効果及びそのメカニズムについて述べる。第 5 章は以上の研究結果の総論である。

第2章 トレハロース含有リポソームの膜物性

2-1 序

生体膜研究の歴史は古いが、1960年に DacsonDanielli や Robertson が提唱していた脂質二分子膜の両面をタンパクが覆うものや、球状ミセルの繰り返しのモデル等が発表された。1964年に英国の Bangham や Horne は、レシチン (卵黄ホスファチジルコリン) の懸濁液を電子顕微鏡で観察し、水に分散させると、疎水性相互作用等によって自発的に会合して二分子膜構造、脂質二分子からなる閉鎖小胞体 (Vesicle) (Lipid からなる Soma として Liposome (リポソーム)) が作成され、水溶液環境中で生体膜を熱力学的に安定に存在させる基質となることを見出した^{41,42)}。その後、生体膜は、脂質 (Lipid) とタンパク質 (Protein) をその主な構成成分としていることが報告されている⁴³⁾。最初に形成されたりポソームはラメラ構造をしていることから、後に多重層リポソーム (Multilamellar Vesicles : MLVs) と称されることになった⁴⁴⁾。また、超音波処理によりリポソームのサイズが小さくなることも Bangham らによって見出され、翌年、この小胞がカチオン等を内封すること、カチオンやアニオンの透過性が生体膜で見られる透過性に類似していることから、この小胞が水相を内封した閉鎖小胞であることを示した⁴⁵⁾。

飽和脂肪酸からなるリン脂質は、親水性 (Hydrophilic) の極性頭部と、2本の疎水性 (Hydrophobic) の炭化水素鎖を持ち、両親媒性 (Amphiphilic) の分子である (Fig.2-1)。このうち、炭化水素鎖は炭素数 10 個から 20 数個程度のもがあり、一つまたは複数の二重結合を含む不飽和炭化水素も多く見られる。極性部と炭化水素鎖部の種類とその割合は生物の種や組織・細胞・細胞内小器官の種類によって異なっている⁴⁶⁾。

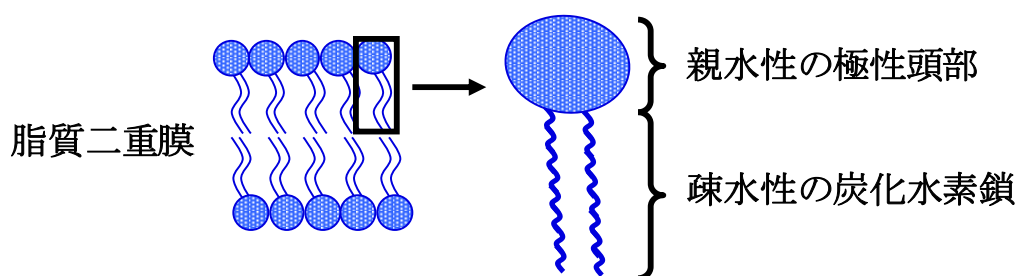


Fig.2-1 脂質二分子膜の模式図.

一方、生体膜上に存在するアミノ酸がペプチド結合によって繋がった生体高分子である膜タンパク質は、生体膜上の化学反応の触媒として、また、タンパク自身の構造 (コンフォメーション) 変化を通じて、細胞膜を貫通し物質の細胞内外の交換の役割を果たすポンプ・キャリア・チャネルと呼ばれている。Papahadjopoulos と Watkins は超音波処理により形成された小さな一枚膜リポソームを用いてイオンの透過性が脂質組成によって変わることを発見した⁴⁷⁾。

複合糖質 (Glycoconjugate) は細胞膜上に単糖あるいは多糖がたんぱく質や脂質に結合するものであり、糖脂質 (Glycolipid) や糖タンパク質 (Glycoprotein) に結合している糖鎖 (Glycan) は、*N*-グリコシド、*O*-グリコシド結合によってタンパク質コアと結合し、細胞間の相互認識、接着・分離、増殖、分化、がん化、免疫機能、ホルモンやフィブロネクチンの受容体として重要な役割を果たしている^{48, 49)}。また、糖鎖は細胞間の情報認識の部位となっている場合以外に、非特異的な機能としてタンパク質分解酵素からの保護及び糖鎖同士が水素結合等を介して相互に絡み合い、細胞の形態を安定化している可能性も考えられている。糖鎖同士の相互作用は糖脂質同士、糖タンパク質-糖脂質間にも及び細胞膜に存在する構成成分同士を結びつける役割もしている (Table. 2-1)^{41, 50)}。

種々の脂質組成のリポソームを用い、溶質の種類や分子量の違いによる透過性変化や脂質の物性が研究されている。一方で、リポソームは薬物送達システム (Drug Delivery System: DDS) への応用が試みられてきた。1970 年には Sessa と Weissmann が高分子のリゾチームをリポソームに内封し、DDS キャリアーとしての高さを示している⁵¹⁾。

Singer と Nicolson はそれまでに蓄積されたデータを総合して、生体膜の流動モザイクモデルを提出した (Fig.2-2)⁵²⁾。このモデルは、脂質で形成された二分子膜中にタンパク質が埋まっているとするもので、水中の脂質-脂質、脂質-タンパク質、タンパク質-タンパク質間の相互作用によって脂質とタンパク質が入り混じり (モザイク性)、個々の分子や分子集団は膜中を自由に動き回ることが出来る (流動性) という膜物性である⁵³⁾。このモデルは、それまでの硬い固定的な生体膜のイメージを柔らかく流動性に富むものに変え、その後の多くの研究でも、この描像は基本的に支持されている^{53, 54)}。

Gregoriadis はペニシリン及び抗がん剤としては初めてアクチノマイシン D をリポソームに内封することで、薬剤の血中濃度が遊離のペニシリン及びアクチノマイシン D より高く保たれること等を発見している^{55, 56)}。彼らは、「増殖の速い正常細胞に対する副作用があるためにアクチノマイシン D を選んだ」と述べている。現在、リポソームの最大のメリットが抗がん剤の毒性軽減であることを考えると、彼の予見は見事に的中していると言える。

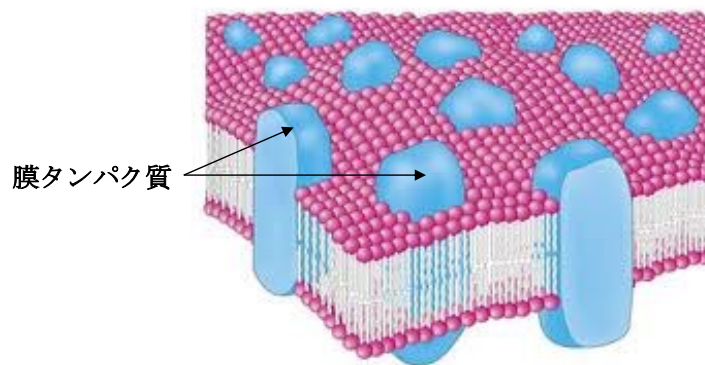


Fig.2-2 生体膜の流動モザイクモデル⁵³⁾.

細胞膜の基本骨格はリン脂質とステロール及び少量の糖脂質からなる二重層で、膜タンパク質が二重層に埋め込まれ、あるいは膜面に結合している。動物細胞のコレステロールの膜物性に及ぼす効果が検討されてきた。不飽和脂質にコレステロールが添加されると、膜流動性が下がり (Condensing 効果)、ゲル相の飽和脂質にコレステロールが添加されると膜流動性が上がり (Fluidizing 効果)、いずれの場合にも相転移が消失する方向に向かうこと等が明らかになった。膜の透過性に関しては、液晶相の飽和脂質 > 不飽和脂質 > 不飽和脂質 + コレステロール > 飽和脂質 + コレステロール > ゲル相の飽和脂質という順番になる。この知見は、DDS へのリポソーム応用の際に、安定な組成としてジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC) : コレステロール = 2 : 1 等が選択される理由の一つとなっている⁵¹⁾。その他に、もう一つの理由がある^{46,57)}。臨界充填パラメータ (CPP) により両親媒性分子の集合体の構造が決定されるが、PC は水溶液中では極性基に約 10 分子の水分子が水和しており、二分子膜を形成しやすい円柱 (Cylindrical) 型分子 (シリンダー型分子) に分類される。PC よりも極性基の小さなホスファチジエタノールアミン (PE) では親水性は疎水性に比べ相対的小さい円錐 (Con) 型となり、同じ脂肪酸鎖を有する場合には、CPP はより大きな値となる。親水基が同じ場合には、疎水基が大きな容積を占めるほど CPP は大きくなるが、リン脂質の場合には二つの脂肪酸鎖が疎水基を形成していることから、脂肪酸鎖の種類や環境により CPP の値が変化する⁴⁶⁾。

リポソームは薬剤キャリアーとして種々の利点を有する。1) 非共有結合の集合体であるため、脂質組成、サイズ、電荷等を容易にコントロールできること。2) 高分子、脂質や抗体等、種々の表面修飾が容易であり、標的化等が比較的簡単に行えること。3) 毒性がほとんどなく、抗原性が低いこと。4) 生体で代謝されうること。5) 膜透過性等をある程度制御できること。6) 脂溶性分子、水溶性分子、両親媒性分子等、異なる性質や分子量を持つ多くの溶質を保持できること。

7) 復水により、乾燥前と同じ薬剤保持やサイズを有するリポソーム乾燥剤が容易に調製できること。8) 大量調製や規格化が比較的容易なこと。薬剤にもよるが、リモートローディング (Remote Loading) 法⁵⁸⁾等によりリポソーム調製後もほぼ 100% の水溶液物質の保持が可能なこと。9) pH 感受性の付与による細胞内トランスポーティングの制御等、種々の調製により生体膜の持つ種々の機能を付与できること、等がある⁴⁶⁾。

Table. 2-1 疾患における糖鎖⁵⁰⁾

| 疾患 | 関連糖鎖 |
|------------|----------------------------------|
| 日本脳炎ウイルス | マンノース含有糖鎖に結合 |
| 大腸菌(腸炎) | O-157 毒素はグロボトリアオシルセラミド(糖脂質)に結合 |
| 大腸菌(尿路感染) | グロボ系糖脂質に結合 |
| コレラ | GM1 ガングリオシドに結合 |
| ピロリ菌 | 糖鎖に結合 |
| エイズ | ウイルスの gp120 が感染に関与 |
| インフルエンザ | シアル酸に結合 |
| ヘルペス単純ウイルス | ヘパリン・ヘパラン硫酸に結合 |
| マラリア原虫 | ダフィー抗原糖鎖に結合 |
| トリパノソーマ原虫 | GPI タンパク質を豊富に持つ |
| グリオーマ | ガングリオシドを腫瘍抗原として持つ |
| 神経芽細胞腫 | ポリシアル酸を発現 |
| メラノーマ | ガングリオシドを腫瘍抗原として持つ |
| 乳がん | シアル酸転移酵素ががんマーカーになる |
| 胃がん | N-アセチルガラクトサミン抗原を発現 |
| 膵臓がん | シアリルLe ^a 抗原を発現 |
| 腎芽細胞腫 | ポリシアル酸を発現 |
| 大腸がん | 転移に関する糖鎖抗原を発現 |
| 卵巣がん | 高分子化ガラクトース転移酵素の出現 |
| 精巣がん | ガングリオシドを腫瘍抗原として持つ |
| ギランバレー症候群 | 抗 GM1 ガングリオシド抗体により発症 |
| フィッシャー病 | 抗 GQ1b ガングリオシド抗体により発症 |
| アルツハイマー病 | 病因であるアミロイド β ペプチドは糖鎖に結合する |
| パーキンソン病 | 糖鎖修飾された α シヌクレインはパーキンの標的タンパク質である |
| 血清病 | N-グリコシル型シアル酸が抗原となる |
| 不適合血液型 | 輸血・臓器移植における ABO 型糖鎖などが抗原になる |
| 異種移植 | α ガラクトース残基がヒトに対して強い抗原性を示す |

Allen と Chonn による血中滞留性リポソームのコンセプトが提出され⁵⁸⁾、リポソームは異物として認識され肝臓等の細網内皮系 (Reticuloendothelial System: RES) に捕獲されることが、RES 以外の標的に不都合であると考え、RES 捕獲を回避するリポソームが考案された^{59,60)}。現在市販されているアントラサイクリ

ン系抗がん剤は、RES の捕獲が回避可能なリポソーム製剤として応用されている⁴⁶⁾。リポソームは薬剤カプセルの他、経皮吸収製剤、経口製剤、免疫アジュバント、人工赤血球、人工血小板、化粧品、育毛・養毛剤、抗菌剤等種々の応用が試みられているが、安全性の高い遺伝子導入ベクターとしても期待されている⁶¹⁾。

生体膜の中の糖脂質自身が生理活性物質であること、腫瘍関連抗原の機能を有することが多くの関心を寄せるようになった。これらの生物活性発現には糖脂質の脂質部分は勿論重要であるが、活性の特異性は糖鎖構造で決定されている⁶¹⁻⁶⁷⁾。固体の起源と言える精子、卵子両細胞にも糖脂質は存在し、受精の後の初期発生の過程で、胚細胞の表面の糖鎖は刻々と変化することが知られている。さらに、発生・分化を経て最終的に形成された臓器では、臓器毎の糖脂質・糖鎖構造の違いが著しい⁴⁸⁾。1970 年代以降、細胞の分化や悪性化に伴う膜表面の糖鎖の構造変化の解明は、がん診断・がん治療法の開発へと繋がっていった^{68,69)}。そのメカニズムを分子レベルで解析するために、生体内に存在する糖転移酵素の精製、クローニングが行われ、約 110 の糖転移酵素の遺伝子がクローニングされた⁷⁰⁾。糖鎖は、タンパク質の表面や脂質の先端につく結果、最終的には膜に取り込まれ、細胞の表面を覆うことになる (Fig.2-3)。細胞ががん化すると、シアル酸を欠く糖鎖が増加し、糖鎖構造が変化することが知られている^{71,72)}。糖鎖認識はまだ未解明であるが、主体はイオンの相互作用と水素結合であると考えられている。特に、豊富なヒドロキシ基の存在は、方向性を持つ水素結合を形成できるので重要である。1) 糖鎖のある部分とタンパク質がイオンの相互作用で互いを特異的に認識する。2) これに水素結合可能な位置にいるヒドロキシ基が参加することで、安定で融通のきく複合体を形成し、特異的認識と動的柔軟性を備えた高次認識が完成する。この特定の生体分子を見分けて結合する性質をアフィニティーと呼ぶ⁷³⁾。これを利用して、最近、糖脂質であるガングリオシドが細胞膜上でマイクロドメインを形成し、このドメインを介して糖鎖間の細胞接着のみならず情報伝達が制御されていることが報告されている⁷⁴⁾。このドメインの細胞質側にシグナル伝

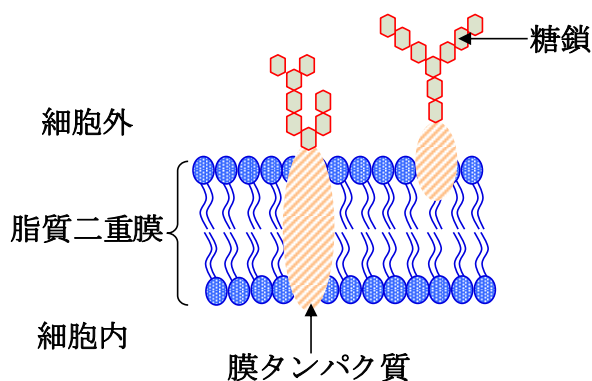


Fig.2-3 細胞膜上の糖鎖.

達に参与するいくつかの情報伝達タンパク質が配置されており、外来からの刺激を細胞内に伝える場を提供している。糖脂質の他にも、コレステロール、タンパク質から形成される細胞膜上の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、この機能ドメインは脂質ラフトと呼ばれる^{75,76)}。細胞膜上に存在している糖鎖は千手観音のような情報分子であり、多くの役割を果たしている (Table. 2-2)⁷³⁾。

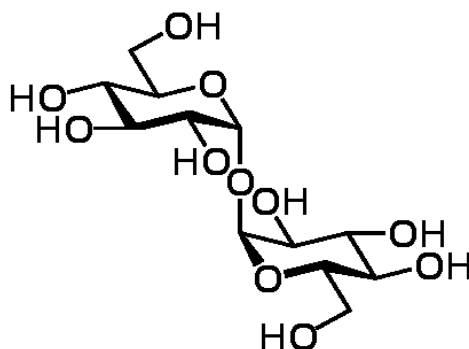
Table. 2-2 糖鎖の機能⁷³⁾。

| 機能 | 特徴 |
|-----------|--|
| 寿命の決定 | 血漿糖タンパク質では、シアル酸が血球細胞や組織のシアリダーゼにより外され、 β ガラクトースが露出すると、肝臓に存在するガラクトース特異的レクチンにより識別され、数分で細胞内に取り込まれて分解除去される。 |
| 安定性・活性の保持 | 糖鎖を化学的または酵素によって除くと、タンパク質分解を受けやすくなったり、水溶性が下がって沈殿したり、コンホメーションが変わって活性を失うものもあり、遺伝的な糖鎖不全による病気 (CDG病) も見つかっている。 |
| ターゲティング | リン酸化、硫酸化、ウロン酸化などの糖鎖修飾は糖タンパク質の細胞内での選別や、細胞を目的の場所に送るために働く。 |
| 活性調節 | 細胞外側にある細胞外マトリクスの情報を細胞に伝えて細胞の接着・移動を仲介する糖タンパク質に結合している糖鎖構造の変化によって、フィブロネクチン基質上での細胞接着性がなくなったり、反対によく接着するようになったりするので、がん転移性と糖鎖の関係が考えられている。 |
| 病原感染 | 気管粘膜や胃粘膜のムチン多糖は粘膜を異物や胃酸から保護すると同時に、糖受容体を持つ病原菌やウイルスの初期接着のレセプターとなる。 |
| 免疫原性 | 異種の動植物由来の細胞や糖タンパク質は、ヒトに強烈な免疫反応を引き起こすこともあるため、遺伝子操作により抗原性のない糖鎖に変える方法が検討されている。 |

また、膜タンパク質可溶化剤としてよく使用されている界面活性剤 (Surfactant) は、分子内に水になじみやすい部分 (親水基) と、油になじみやすい部分 (親油基・疎水基) を持つ物質である。親水性部分がイオン性 (カチオン性・アニオン性・双性) のものと非イオン性 (ノニオン性) のものに大別される。非イオン性 (Non-ionic Surfactant) はポリアルコール系とポリエーテル系がある。トレハロース界面活性剤 (TreCn) は非イオン性の界面活性剤であり、親水基にトレハロース、親油基に炭素の鎖長が 8~16 個の異なる脂肪酸から構成されている。ミセルが形成されるための臨界ミセル濃度 (Critical Micelle Concentration : CMC) は炭素鎖長により大きく異なる。

トレハロースは、グルコースが 1,1-グリコシド結合してできた二糖の一種で

ある。1832年にウィガーズがライ麦の麦角から発見し⁷⁷⁾、1859年、マルセラン・ベルテロが象鼻虫(ゾウムシ)が作るトレハラマンナ(マナ)から分離して、トレハロースと名づけた⁷⁸⁾。トレハロースは常温常圧で白色の粉末状の結晶であり、きのこをはじめ種々の菌、酵母等自然界の多くの動・植物や微生物中に存在する。デンプンの劣化防止や冷凍時のタンパク質の変性防止等の目的で食品に利用されている⁷⁹⁾。



Trehalose

トレハロースは、脱水や凍結等の様々なストレス条件下で、細胞膜を安定化させ、細胞構造を維持させ、細胞へのダメージを抑制し、乾燥している細胞を細胞死から保護し、生存能力を保持することができ、保存剤として知られている⁸⁰⁻⁸⁶⁾。また、トレハロース-6, 6'-ジマイコレート (Trehalose-6,6'-Dimycolate : TDM) は、コードファクタ (Cord Factor) と呼ばれ、結核菌 (*Mycobacterium Tuberculosis*) の細胞壁の糖脂質であり、様々な免疫反応を惹起することが知られている⁸⁷⁻⁹⁰⁾。TDM は半世紀ほど前から研究されている分子であるにも関わらず、直接認識する受容体は未だに明確には特定できていない。TDM は *in vitro* 及び *in vivo* において、抗腫瘍効果があることが報告されており⁹¹⁻⁹³⁾、転写因子 NF- κ B の活性化の阻害を介して腫瘍壊死因子 (TNF- α) の発現、がん細胞の増殖、移動、浸潤やアポトーシスの調節に関与しているプロテインキナーゼ C の活性化、腫瘍細胞の増殖抑制等が明らかになっている⁹⁴⁻⁹⁸⁾。さらに、トレハロースは哺乳細胞間シグナル伝達及び生存率の改善、細胞の成長・分化にも関わっていることが報告されている⁹⁹⁻¹⁰¹⁾。

リポソームに第三成分の糖系界面活性剤であるスクロース (Sucrose)、グルコース (Glucose)、マルトース (Maltose) 等種々の糖を組み込んだ糖含有ハイブリッドリポソームは、脳腫瘍細胞 (U251)、肺がん細胞 (RERF-LC-OK)、肝臓がん細胞 (Hep-G2) に対する増殖抑制効果があることを松本らは報告している^{37, 38)}。また、HL にラクトース系界面活性剤を含有させた HL/LactC10 は HL に比べ、固定水層は約 2 倍増大し、IC₅₀ 値も小さく、がん細胞増殖抑制効果に糖の水和

が関与している可能性が明らかとなり、物理化学的特性 (固定水層) と生物学的特性 (がん細胞増殖抑制効果) の関連性が明らかとなった³⁹⁾。その後、ガラクトース骨格を有する新規糖系界面活性剤 Lac β (1 \rightarrow 4)LacC10 を含有させた HL/Lac β (1 \rightarrow 4)LacC10 に対するがん細胞の増殖抑制効果は、Hep-G2 > HuH-7, MCF7 > HCT-116 の順となったことが明らかとなっている¹⁰²⁾。しかし、トレハロース系界面活性剤の検討はまだなされていない。

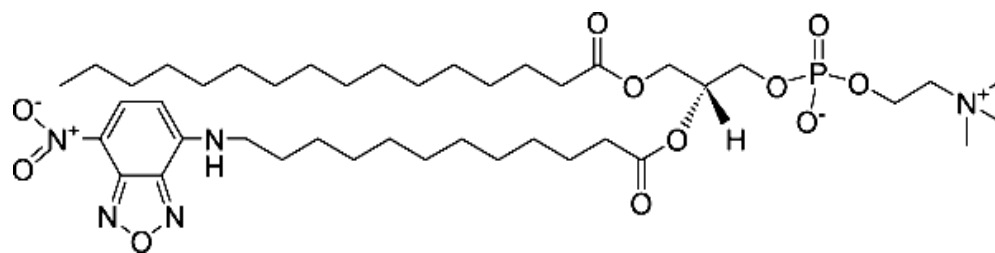
本章では、リン脂質 (DMPC) 及びトレハロース界面活性剤 (TreCn) を用いて創製したトレハロース含有リポソーム (DMTreCn) の膜物性について検討した。即ち、1) 動的散乱法による膜直径の測定。2) 蛍光偏光解消法による膜流動性の測定。3) レーザードップラー法による固定水層の測定について検討した。

2-2 実験

2-2-1 試料

リン脂質

L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) は、市販品 (日油) ($M_w = 677.94$) をそのまま使用した。以下に構造式を示す。

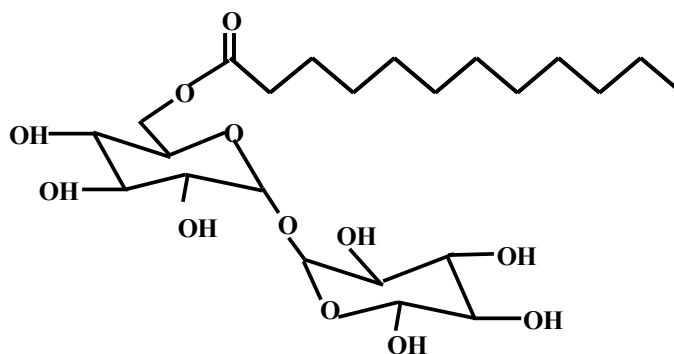


L- α -dimyristoylphosphatidylcholine
DMPC

糖系界面活性剤

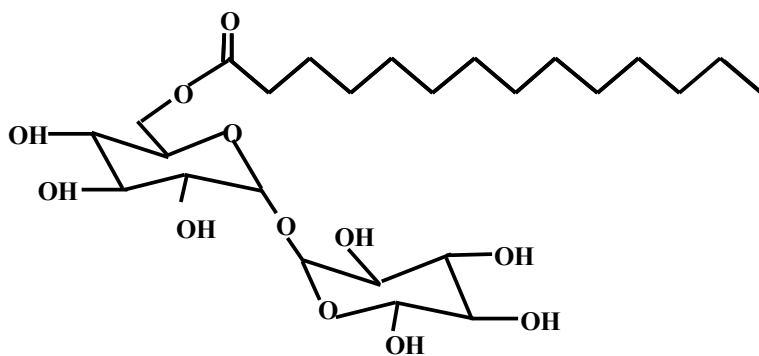
α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monododecanoate (TreC12) は、市販品 (DOJINDO) ($M_w = 524.60$) をそのまま使用した。以下に構造式を示す。

cmc = 0.15 mmol/l



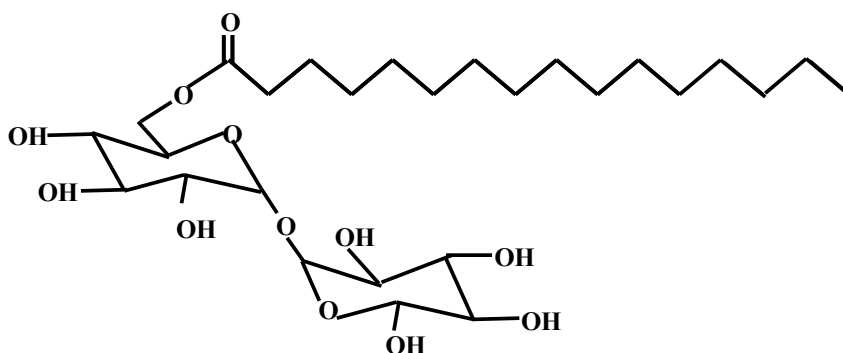
α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monododecanoate
TreC12

α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monomyristate (TreC14) は、市販品 (DOJINDO) ($M_w = 552.65$) をそのまま使用した。以下に構造式を示す。
 $cmc = 0.012 \text{ mmol/l}$



α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monomyristate
TreC14

α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monopalmitate (TreC16) は、市販品 (DOJINDO) ($M_w = 580.71$) をそのまま使用した。以下に構造式を示す。
 $cmc = 0.0061 \text{ mmol/l}$



α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monopalmitate
TreC16

2-2-2 トレハロース含有リポソームの調製

トレハロース含有リポソーム DMTreCn (n=12, 14, 16) は、リン脂質 (DMPC) 及びトレハロース界面活性剤 (TreCn (n=12, 14, 16)) を精秤し、ナス型フラスコに入れた後、5%-glucose 溶液中で超音波照射器 (VELVO-CLEAR, ULTRASON-300S, 300W) を用いて超音波照射処理 (45°C, 1min/ml) を行った。得られた均一溶液を 0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過滅菌したものを試料溶液として使用した (Fig.2-4)。

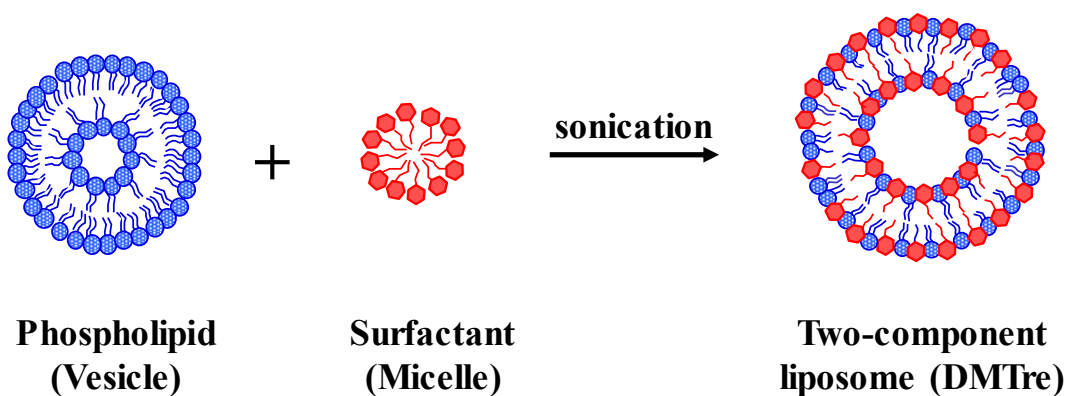


Fig.2-4 Schematic representation of DMTreCn (n=12, 14, 16).

2-2-3 動的光散乱法による膜直径の測定

懸濁溶液や溶液中に分散した微粒子は、通常ブラウン運動をしており、その動きは大きな粒子では遅く、小さな粒子ほど動きが早い。このとき、ブラウン運動を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それぞれのブラウン運動の速度に対応した揺らぎが観測される。

動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering) ¹⁰³⁾では、溶液中に分散している粒子にレーザー光を照射し、その散乱光を光子検出器で観測する。このとき、粒子からの散乱光は Young の光干渉実験モデルのように干渉しあう。さらに粒子はブラウン運動によりその位置を絶えず移動しているため、散乱光の干渉による強度分布も絶えず揺らぐことになる。このため、ピンホールや光ファイバー系の光学系を用いると、このブラウン運動の様子を散乱光強度の揺らぎとして観測できる (Fig.2-5)。

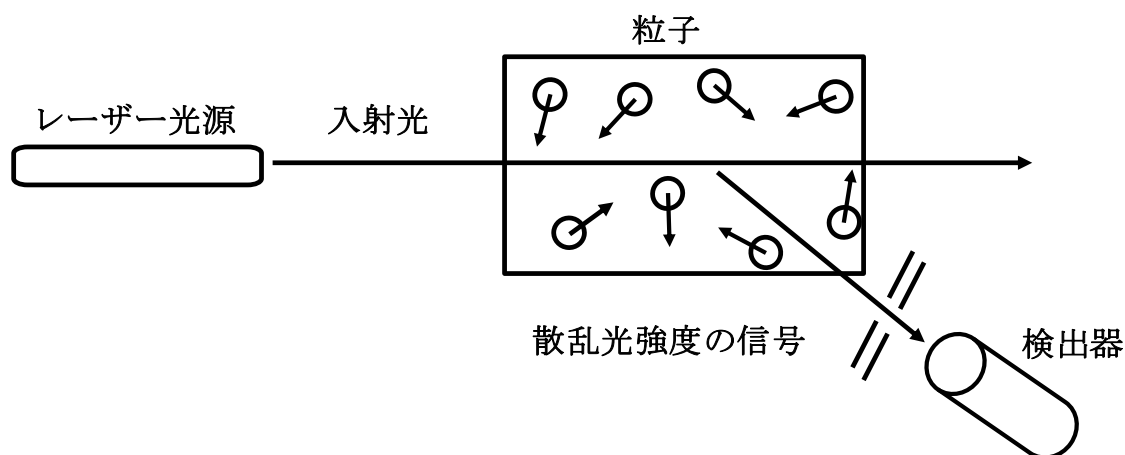


Fig.2-5 動的光散乱法による散乱光検出の概略図.

トレハロース含有リポソームの膜直径 (Hydrodynamic Diameter : d_{hy}) は、粒径分布測定装置 (ELS-Z-0, 大塚電子) を用いて、動的光散乱法にて測定した。光源として、He-Ne レーザーの 632.8nm の発振線を出力 35mW で使用した。散乱角 90° で測定し、得られた拡散係数 (D) を (1) 式 (Stokes-Einstein の式) に代入して膜の直径を求めた。なお、 κ は Boltzmann 定数、T は絶対温度、 η は溶媒の粘度である。試料溶液は 37°C にて保存及び測定した。

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

2-2-4 蛍光偏光解消法による膜流動性の評価

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り、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」という特性に基づいた測定方法である。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及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 (Fig.2-6)。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た。

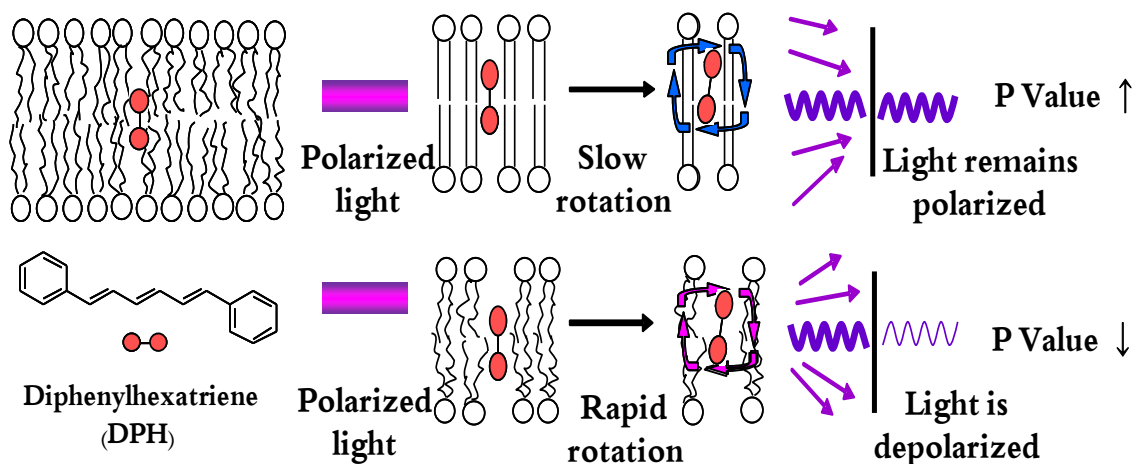


Fig.2-6 Principle of fluorescence depolarization.

脂質二分子膜の膜流動性を蛍光偏光解消法により測定する場合有用であり、膜内部の流動性を反映する 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) (Nacalai Tesque) を蛍光プローブとして用いた。10mm 角の石英セルに試料溶液 2.5ml を分注し、循環恒温槽中で 37°C にした後、DPH はテトラヒドロフラン溶液に溶解し、測定試料溶液中で、[DPH] = 0.10 μ M になるように調製し、約 30 分間染色を行った。励起波長 357nm にて 432nm の蛍光プローブの蛍光偏光強度成分を分光光度計 (F2000, 日立) により測定し、蛍光偏光度 (P : Fluorescence Polarization) の算出を行った。

Perrin-Weber の式で定義される (2) 式に従い蛍光偏光度 (P) を算出した。

$$P = (I_{vv} - C_f I_{vh}) / (I_{vv} + C_f I_{vh}) \cdots (2)$$

$$C_f = I_{hv} / I_{hh} \cdots (3)$$

蛍光の偏光が強ければ P 値も大きくなる。逆に、偏光が弱ければ、 P 値も小さくなる。ここで、 I_{vv} 及び I_{vh} は、それぞれ垂直直線偏光励起光の振動方向と垂直に振動する偏光強度成分及び平行に振動する偏光強度成分である。 C_f は (3) 式により求められる補正係数であり、 I_{hv} 及び I_{hh} は、それぞれ平行直線偏光励起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。各々の偏光強度は、試験試料による励起光の多重散乱による誤差を小さくするため、式 (4) に従い、プローブの入っている試験試料の測定値 (P_{SAMPLE}) から、プローブの入っていない試験試料の測定値 (P_{BLANK}) を差し引き、蛍光偏光度 (P) を算出した¹⁰⁴⁻¹⁰⁷。

$$P = P_{\text{SAMPLE}} - P_{\text{BLANK}} \cdots (4)$$

2-2-5 レーザードップラー法による固定水層の測定

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¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾。

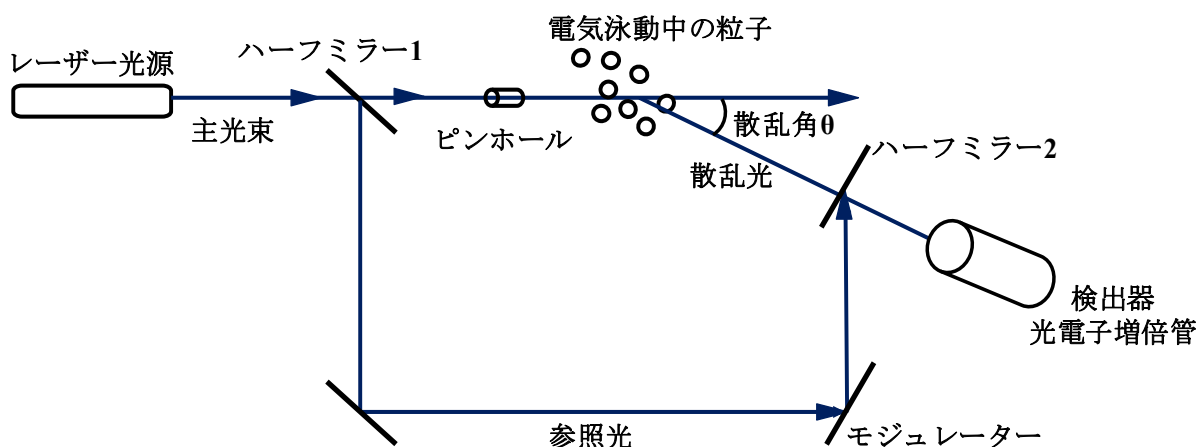


Fig.2-7 ヘテロダイン法による電気泳動光散乱光度計の光学系.

He-Ne 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ゴニオメーター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 $5\sim 22^\circ$ 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.2-7)。

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¹¹¹⁾。これは、ドップラーシフトしている粒子からの散乱光を、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等の統計的なデータが求められる。

液体中に分散している粒子の多くは、プラスまたはマイナスに帯電している。そのため、粒子周囲には界面電荷を中和するために、過剰に存在する異符号を持つイオンと少量の同符号を持つイオンが拡散的に分布しており、電気二重層を形成している。二重層は界面から水和イオン半径にほぼ等しいところに存在する面(シュテルン面)によって二つの部分に分けられる。その面の内部領域は固定層、外部領域はイオン拡散層と呼ばれ、さらに、外側には陽イオンと陰イオンのバランスの取れた溶液が大部分を占めて存在している (Fig.2-8)。

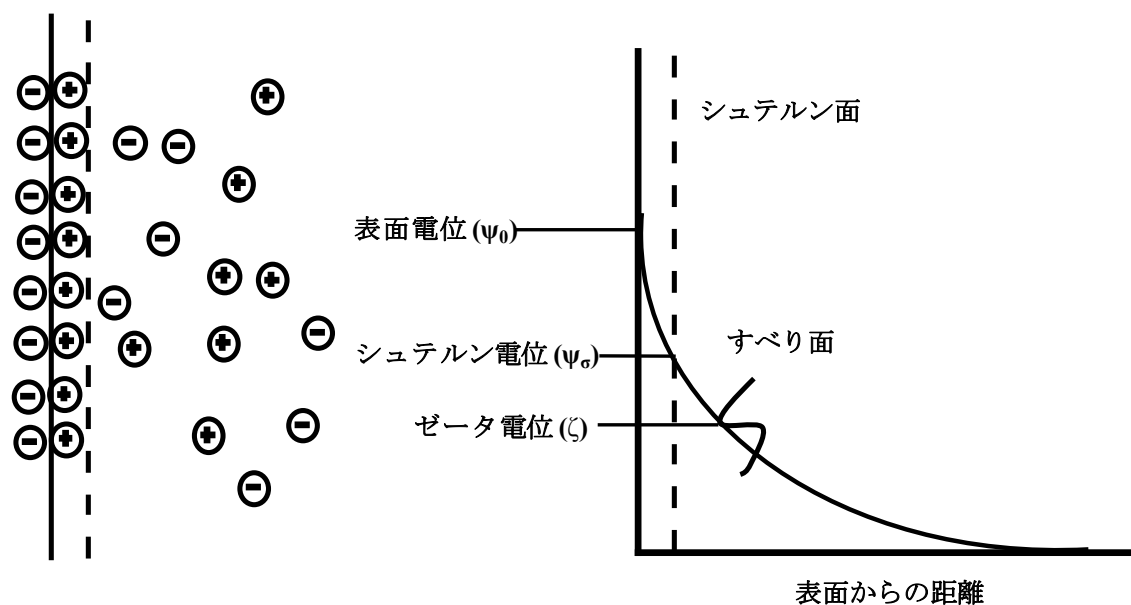


Fig.2-8 電気二重層と電気分布の模式図.

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い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.2-9)。微粒子やコロイド粒子の場合、ゼータ電位の絶対値が増加すれば粒子間の反発力が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 (Fig.2-10)¹¹²⁾。

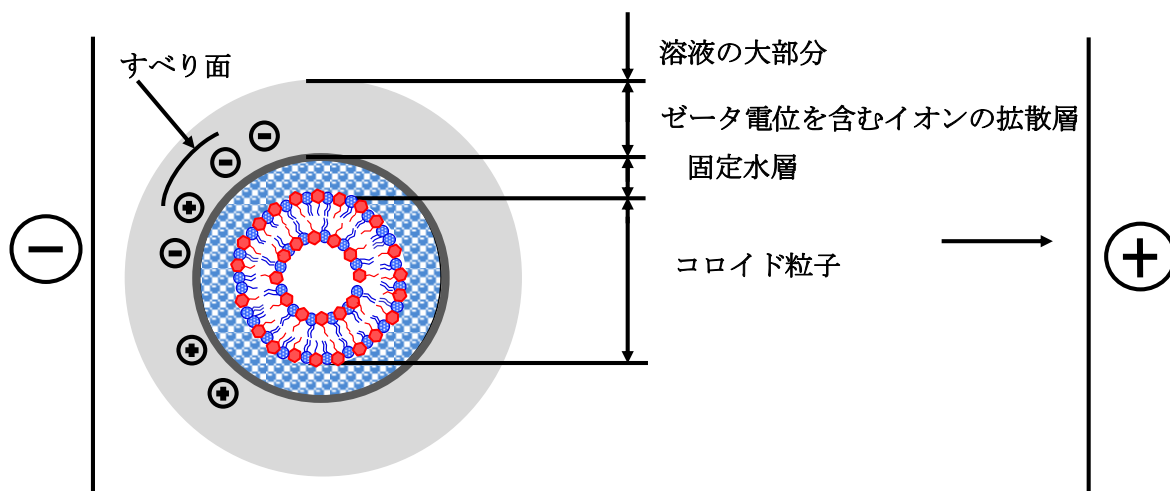


Fig.2-9 粒子周囲の帯電状態.

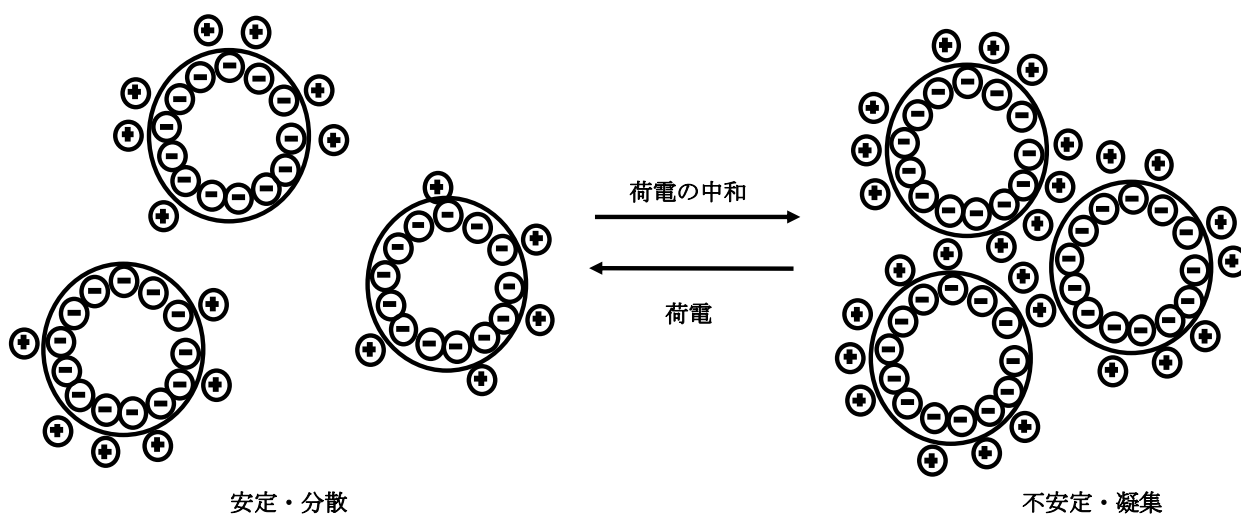


Fig.2-10 粒子の帯電状態.

レーザーゼータ電位計のセル部分を組み立て、洗浄を十分行い、循環恒温槽中で 37°C に調整した標準セルに試験試料を流し、ゼータ電位 (ζ) を測定した。光源として、HE-Ne レーザーの 632.8nm の発振線を出力 10mW で用い、散乱角 20° で測定した。得られた電気移動度 (U) より式 (5) (Smoluchowskiの式) に従い、 ζ を求めた。また、得られた ζ を式 (6) に代入し、最小二乗法による直線の傾きより固定水層を算出した。

$$U = \varepsilon \zeta / 4 \pi \eta \cdots (5)$$

$$\ln(\zeta) = a \kappa + b \cdots (6)$$

$$\kappa = 3.3 \sqrt{c} \cdots (7)$$

ここで、 U は電気移動度、 ε は誘電率、 η は溶媒の粘度、 a はリポソーム表面からすべり面までの距離 (固定水層の厚さ)、 b は定数、 κ は Debye-Huckel parameter 定数、 c は NaCl の濃度 (20, 50, 100, 150, 200mM) である。

2-3 結果と考察

2-3-1 トレハロース含有リポソームの膜直径

DMTreCn (n=12, 14, 16) の膜直径 (d_{hy}) の経時変化は動的光散乱法により測定した。結果を Fig.2-11~2-13 と Table. 2-3~2-5 に示す。

DMTreC12 の膜直径において、10~50mol%DMTreC12 は 100~200nm の膜直径で、約一ヶ月間安定であった。55~60mol% DMTreC12 は 200~600nm の膜直径で、不安定であった。65~70mol%DMTreC12 は 60~70nm であり、細網内皮系 (RES) を回避可能であることが明らかになった。

DMTreC14 の膜直径はすべての濃度において、70~220nm 付近で均一な膜を一ヶ月以上形成していた。特に、40, 50, 70mol%DMTreC14 は膜直径が 100nm 以下であり、RES を回避可能であることが明らかになった。

DMTreC16 に関しては、10~60mol%DMTreC16 は 50~200nm の膜直径で、約一ヶ月間安定であった。特に、30~55mol%DMTreC16 は膜直径が 100nm 以下であり、RES を回避可能であることが明らかになった。65~70mol% DMTreC16 は 200~700nm の膜直径で、不安定であった。

トレハロース含有リポソーム DMTreCn (n=12, 14, 16) は 5%-glucose 溶液において、トレハロースの含有量により、それぞれの膜直径は異なることが明らかとなった。65~70mol%DMTreC12、40~50mol%、70mol%DMTreC14、30~55mol%DMTreC16 の膜直径は、37°C において RES を回避可能な 100nm 以下の膜直径であり、約一ヶ月間安定な膜を形成しており、安定であることが今回初めて明らかとなり、臨床応用に適していることが示された。

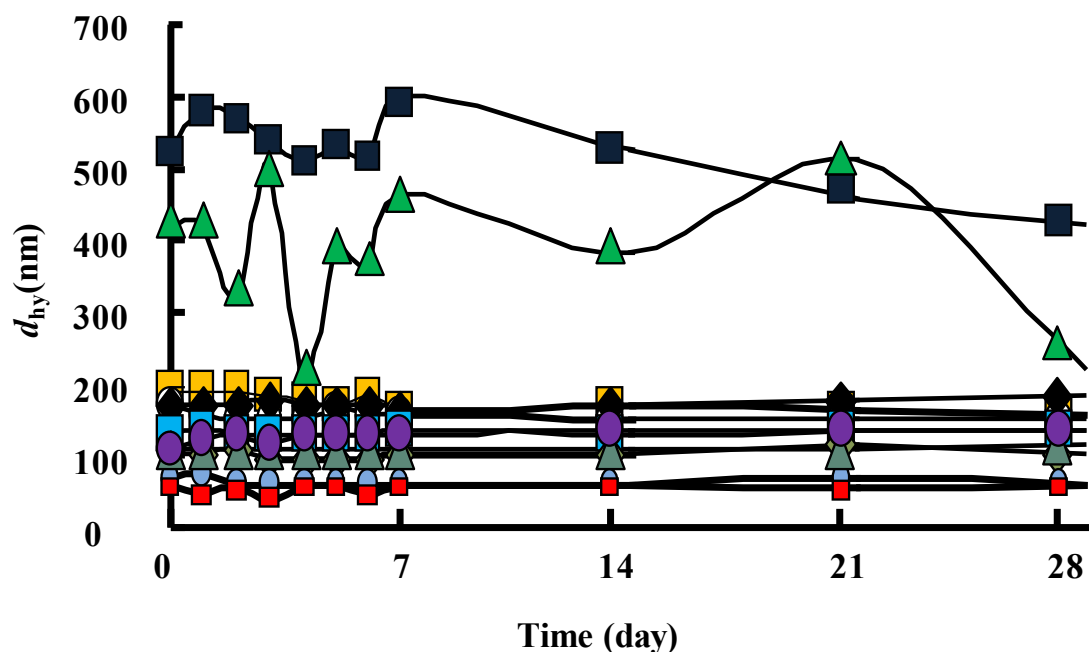


Fig.2-11 Time course of diameter (d_{hy}) change for DMTreC12 in 5%-glucose solution at 37°C.

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC12] = $0.1 \sim 2.3 \times 10^{-3}$ M

—○— 10mol% —△— 40mol% —■— 55mol% —□— 70mol%
 —◇— 20mol% —●— 45mol% —▲— 60mol% —■— DMPC
 —□— 30mol% —◆— 50mol% —●— 65mol%

Table. 2-3 Time course of diameter (d_{hy}) change for DMTreC12 in 5%-glucose solution at 37°C.

| Time(day) | Sample | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 14 | 21 | 28 |
|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| d_{hy} (nm) | DMPC | 187.6 | 188.5 | 188.5 | 185.0 | 177.7 | 169.4 | 186.3 | 165.1 | 172.6 | 166.5 | 159.3 |
| | 10mol% | 167.6 | 154.5 | 150.5 | 149.2 | 149.0 | 164.7 | 158.4 | 157.0 | 147.3 | 149.8 | 147.3 |
| | 20mol% | 111.7 | 98.9 | 106.1 | 95.9 | 97.0 | 96.0 | 92.5 | 101.5 | 103.6 | 117.6 | 102.9 |
| | 30mol% | 131.3 | 134.3 | 132.0 | 130.5 | 132.3 | 131.3 | 130.7 | 134.9 | 130.6 | 136.7 | 139.0 |
| | 40mol% | 107.9 | 107.2 | 106.5 | 109.4 | 108.6 | 107.0 | 107.8 | 105.5 | 109.6 | 111.4 | 114.3 |
| | 45mol% | 108.0 | 122.5 | 128.9 | 113.2 | 129.0 | 128.7 | 126.0 | 128.4 | 134.6 | 137.1 | 137.1 |
| | 50mol% | 170.3 | 172.6 | 169.9 | 173.5 | 172.6 | 170.2 | 170.2 | 165.8 | 172.1 | 176.2 | 184.1 |
| | 55mol% | 513.8 | 584.7 | 574.0 | 538.9 | 506.2 | 528.3 | 512.1 | 596.6 | 520.3 | 455.0 | 419.9 |
| | 60mol% | 423.4 | 424.3 | 314.8 | 502.6 | 205.8 | 383.2 | 359.2 | 462.3 | 379.3 | 507.3 | 219.3 |
| | 65mol% | 67.9 | 76.3 | 60.7 | 61.2 | 63.3 | 62.8 | 59.7 | 58.5 | 59.3 | 66.7 | 61.2 |
| | 70mol% | 59.0 | 46.6 | 52.2 | 43.0 | 60.8 | 60.8 | 47.5 | 60.2 | 62.3 | 54.8 | 61.2 |

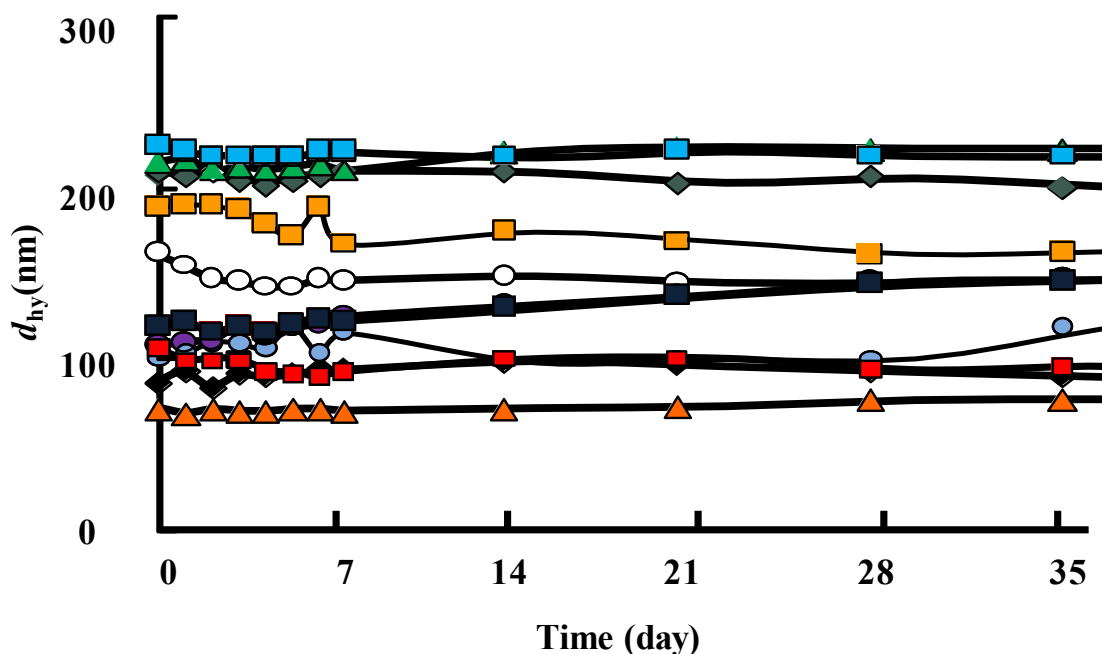


Fig.2-12 Time course of diameter (d_{hy}) change for DMTreC14 in 5%-glucose solution at 37°C.
 $[DMPC] = 1.0 \times 10^{-3}M$, $[TreC14] = 0.1 \sim 2.3 \times 10^{-3}M$

○ 10mol% △ 40mol% ■ 55mol% ■ 70mol%
 ◆ 20mol% ● 45mol% ▲ 60mol% ■ DMPC
 □ 30mol% ◆ 50mol% ● 65mol%

Table. 2-4 Time course of diameter (d_{hy}) change for DMTreC14 in 5%-glucose solution at 37°C.

| Time(day) | Sample | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 14 | 21 | 28 | 35 |
|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| d_{hy} (nm) | DMPC | 187.6 | 188.5 | 188.5 | 185.0 | 177.7 | 169.4 | 186.3 | 165.1 | 172.6 | 166.5 | 159.3 | 160.8 |
| | 10mol% | 160.1 | 153.3 | 145.6 | 143.2 | 140.9 | 140.4 | 144.5 | 144.3 | 146.7 | 142.7 | 142.7 | 144.4 |
| | 20mol% | 207.6 | 206.2 | 207.1 | 203.7 | 202.2 | 204.0 | 207.2 | 208.1 | 207.1 | 201.3 | 203.8 | 199.2 |
| | 30mol% | 222.3 | 219.3 | 217.1 | 217.1 | 215.6 | 216.1 | 219.4 | 219.0 | 215.9 | 219.5 | 216.8 | 216.4 |
| | 40mol% | 69.8 | 66.8 | 69.0 | 68.0 | 67.8 | 69.2 | 69.2 | 68.1 | 69.4 | 70.5 | 74.0 | 74.5 |
| | 45mol% | 105.8 | 108.5 | 109.6 | 117.8 | 111.0 | 116.6 | 119.0 | 123.2 | 129.9 | 136.2 | 143.6 | 144.4 |
| | 50mol% | 84.8 | 91.1 | 82.1 | 88.9 | 88.0 | 89.1 | 91.7 | 92.2 | 97.0 | 93.9 | 90.6 | 87.7 |
| | 55mol% | 117.5 | 120.5 | 113.8 | 116.7 | 114.7 | 118.4 | 122.0 | 120.4 | 127.4 | 135.3 | 141.4 | 144.2 |
| | 60mol% | 213.5 | 215.4 | 208.4 | 210.6 | 208.8 | 210.7 | 212.3 | 208.5 | 220.0 | 222.4 | 221.5 | 221.5 |
| | 65mol% | 98.5 | 101.6 | 108.1 | 108.0 | 104.8 | 117.5 | 101.9 | 113.5 | 96.5 | 98.5 | 116.5 | 116.5 |
| | 70mol% | 99.7 | 83.1 | 93.2 | 85.7 | 83.8 | 86.6 | 84.9 | 84.4 | 90.4 | 86.4 | 90.9 | 91.6 |

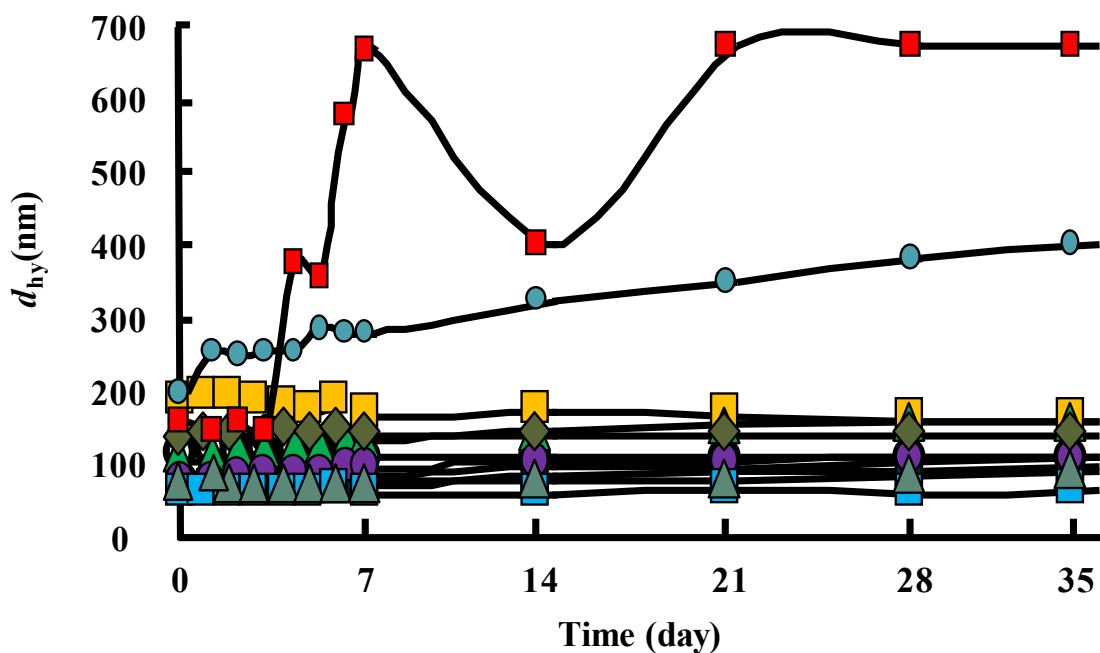


Fig.2-13 Time course of diameter (d_{hy}) change for DMTreC16 in 5%-glucose solution at 37°C.

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreC16] = $0.1 \sim 2.3 \times 10^{-3}$ M

○ 10mol% ▲ 40mol% ■ 55mol% ■ 70mol%
 ◆ 20mol% ● 45mol% ▲ 60mol% ■ DMPC
 ■ 30mol% ◆ 50mol% ● 65mol%

Table. 2-5 Time course of diameter (d_{hy}) change for DMTreC16 in 5%-glucose solution at 37°C.

| Time(day) | Sample | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 14 | 21 | 28 | 35 |
|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| d_{hy} (nm) | DMPC | 187.6 | 188.5 | 188.5 | 185.0 | 177.7 | 169.4 | 186.3 | 165.1 | 172.6 | 166.5 | 159.3 | 160.8 |
| | 10mol% | 116.6 | 118.9 | 114.8 | 118.7 | 119.5 | 114.7 | 113.7 | 108.5 | 108.3 | 108.2 | 110.7 | 110.7 |
| | 20mol% | 134.6 | 137.0 | 137.7 | 139.3 | 144.1 | 142.3 | 144.3 | 140.8 | 139.4 | 141.8 | 140.4 | 140.4 |
| | 30mol% | 59.1 | 58.5 | 59.3 | 58.8 | 57.8 | 57.8 | 60.9 | 57.0 | 60.1 | 63.2 | 59.0 | 60.6 |
| | 40mol% | 79.1 | 91.7 | 71.4 | 68.6 | 69.6 | 71.5 | 70.2 | 72.5 | 75.1 | 79.1 | 82.3 | 86.1 |
| | 45mol% | 74.4 | 79.4 | 83.3 | 87.0 | 90.0 | 90.7 | 93.0 | 93.3 | 98.9 | 104.3 | 105.2 | 109.5 |
| | 50mol% | 76.6 | 78.9 | 80.6 | 107.6 | 84.5 | 84.7 | 86.8 | 85.2 | 92.5 | 98.4 | 102.2 | 105.7 |
| | 55mol% | 67.7 | 71.2 | 73.9 | 75.7 | 77.3 | 77.2 | 79.2 | 79.2 | 85.1 | 88.5 | 91.3 | 96.5 |
| | 60mol% | 113.6 | 116.3 | 120.9 | 122.2 | 129.8 | 126.1 | 130.8 | 132.1 | 146.5 | 153.9 | 159.7 | 159.7 |
| | 65mol% | 196.2 | 256.3 | 250.6 | 251.9 | 252.4 | 288.7 | 280.1 | 281.9 | 322.5 | 352.7 | 383.3 | 403.1 |
| | 70mol% | 162.1 | 147.2 | 162.1 | 147.2 | 377.3 | 355.4 | 579.0 | 665.9 | 400.1 | 675.3 | 675.3 | 675.3 |

2-3-2 トレハロース含有リポソームの膜流動性

DMTreCn (n=12, 14, 16) の膜流動性について、蛍光偏光解消法により測定した。結果を Fig.2-14 に示す。P 値が小さい程膜流動性が高くなることから、DMTreCn (n=12, 14, 16) の P 値は DMPC よりも低く、トレハロース含有することにより DMTre の膜内部に揺らぎを持ち、流動性は DMPC 単一リポソームよりも高いことが明らかとなった。また、DMTreCn の膜流動性は、DMTreC12 \approx DMTreC14 < DMTreC16 であり、用いたトレハロース含有リポソームの中では DMTreC16 が最も大きな流動性を示した。

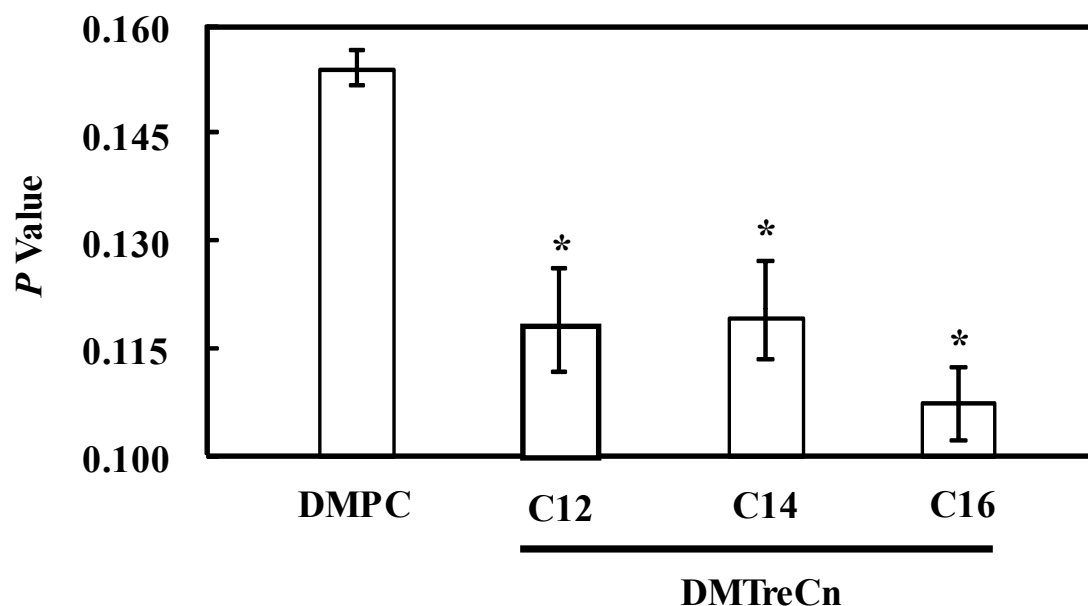


Fig.2-14 Fluorescence polarization (*P*) value of DPH for DMPC and DMTreCn (n=12, 14, 16) in 5%-glucose solution at 37°C. Data represent the mean (n=3) \pm S.D.

* Student's *t* test : compared with DMPC ($p < 0.05$)

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreCn (n=12, 14, 16)] = 1.0×10^{-3} M

2-3-3 トレハロース含有リポソームの固定水層

リポソームを構成するリン脂質はカルボキシル基やリン酸基を持つため、これらの基の解離によってリポソーム膜表面は負電荷を持つ。そのため、周囲を粒子と反対符号のイオンからなる固定水層に取り込まれ、外側にイオン拡散層があり、界面電位二重層を形成している。固定水層は膜粒子表面に形成される構造化された水のことであり、細胞や膜の表面に常に存在するとされている。固定水層と拡散層の境界面に近いすべり面での電位であるゼータ (ζ) 電位は、リポソーム周囲の電位の価であるので、 $\ln(\zeta)$ versus κ のプロットを取るとその勾配はリポソーム表面からすべり面までの距離、すなわち固定水層の厚さを与えることになる⁴⁶⁾。トレハロース含有リポソームの固定水層について、レーザードップラー法により ζ を測定し算出した。

DMTreCn (n=12, 14) の固定水層の結果を Fig.2-15 に示す。DMTreC16 は NaCl 溶液中で沈澱を生じたため、測定できなかった。50~70mol% トレハロース含有 DMTreC14 の固定水層は 2.05~4.24 nm であるのに対し、DMPC 単一リポソームでは 1.09 nm であり、トレハロースを含有することにより、固定水層はトレハロース含有量の増大に伴い 1.3~2.2 倍に増大することが初めて明らかになった。これは、トレハロース界面活性剤の頭部にある糖骨格が有する水酸基 (OH) を多く持つことにより、固定水層が厚くなると考えられる。DMTreC12 はトレハロース含有量の増大に伴い固定水層の変化は見られなかった。

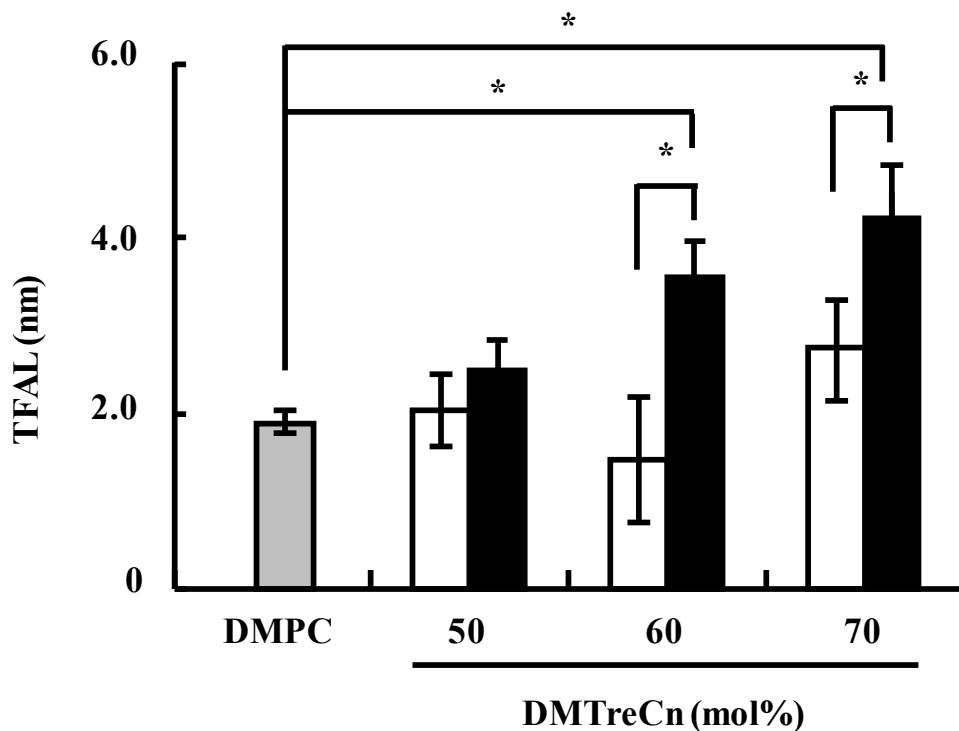


Fig.2-14 Thickness of fixed aqueous layer (TFAL) of DMPC (■) and DMTreCn (n=12(□), 14(■)) in 5%-glucose solution at 25°C. Data represent the mean (n=3) ±S.D.

* Student's *t* test : compared with DMPC ($p < 0.05$)

[DMPC] = 1.0×10^{-3} M, [TreCn (n=12, 14)] = $1.0 \sim 2.3 \times 10^{-3}$ M

Table. 2-6 Thickness of fixed aqueous layer (TFAL) of DMPC and DMTreCn (n=12, 14) in 5%-glucose solution at 25°C.

| Sample | | TFAL | S.D. |
|----------|--------|------|------|
| DMPC | | 1.90 | 0.13 |
| DMTreC12 | 50mol% | 2.04 | 0.41 |
| | 60mol% | 2.09 | 0.72 |
| | 70mol% | 2.40 | 0.10 |
| DMTreC14 | 50mol% | 2.50 | 0.36 |
| | 60mol% | 3.54 | 0.42 |
| | 70mol% | 4.24 | 0.97 |

2-4 総括

本章では、リン脂質 (DMPC) と炭素鎖の異なるトレハロース界面活性剤 (TreCn (n=12, 14, 16)) を構成成分とするトレハロース含有リポソーム DMTreCn (n=12, 14, 16) の膜物性について、1. DMTreCn (n=12, 14, 16) の膜直径、2. DMTreCn (n=12, 14, 16) の膜流動性、3. DMTreCn (n=12, 14, 16) の固定水層、について検討したところ、以下のような興味深い知見が得られた。

- 1 トレハロース含有リポソーム DMTreCn (n=12, 14, 16) は 5%-glucose 溶液において、トレハロースの含有量により、それぞれの膜直径は異なっていたことが明らかとなった。65~70mol%DMTreC12、40~50mol%、70mol%DMTreC14、30~55mol%DMTreC16 の膜直径は、37°C において細網内皮系 (RES) を回避可能な 100nm 以下であり、約一ヶ月間安定な膜を形成していることが今回初めて明らかとなり、臨床応用に適していることが示された。
- 2 DMTreCn (n=12, 14, 16) の膜内部の流動性は DMPC 単一リポソームよりも高いことが明らかとなった。
- 3 DMTreC14 の固定水層は DMPC 単一リポソームよりも大きいことが明らかとなった。また、DMTreC14 は、TreC14 濃度依存的に固定水層が増大した。

以上の結果より、DMTreCn (n=12, 14, 16) は、トレハロースの含有量により、膜直径は異なることが明らかとなった。DMTreCn (n=12, 14, 16) の膜内部の流動性は DMPC 単一リポソームよりも高いことが明らかとなった。DMTreC14 の固定水層は DMPC 単一リポソームよりも高いことが明らかとなった。

第3章 トレハロース含有リポソームの大腸がん及び胃がん細胞に対する増殖抑制効果

3-1 序

近年、食生活の欧米化に伴って、日本においても大腸がんによる死亡者数が急増しており、年間の罹患者数が1990年には6万人、99年には9万人を超え年々増加傾向になり、この30年間で患者数は約6倍になっている。死亡者数は、結腸と直腸を合わせて男性では肺がん、胃がんについて第3位であり、女性では第1位である。大腸がんの主要原因としては、食事やライフスタイル等の環境要因の関わりが大きいと考えられ、具体的には運動不足、肥満、動物性脂肪の摂取過ぎ等が指摘されている。大腸がんでは、がんが大腸の壁の中に浸潤しているかにより、進行度が0期、I期、II期、III期、IV期の5段階に分類され、がんの広がり具合(進行度)を表している(Table. 3-1, Fig.3-1)⁴⁾。

Table. 3-1 大腸がんのステージ.

| ステージ分類 | |
|--------|------------------------------|
| 0期 | がんが粘膜にとどまるもの |
| I期 | がんが大腸壁にとどまるもの |
| II期 | がんが大腸壁を越えているが、隣接臓器におよんでいないもの |
| III期 | がんが隣接臓器に浸潤しているか、リンパ節転移のあるもの |
| IV期 | 腹膜、肝、肺などへの遠隔転移のあるもの |

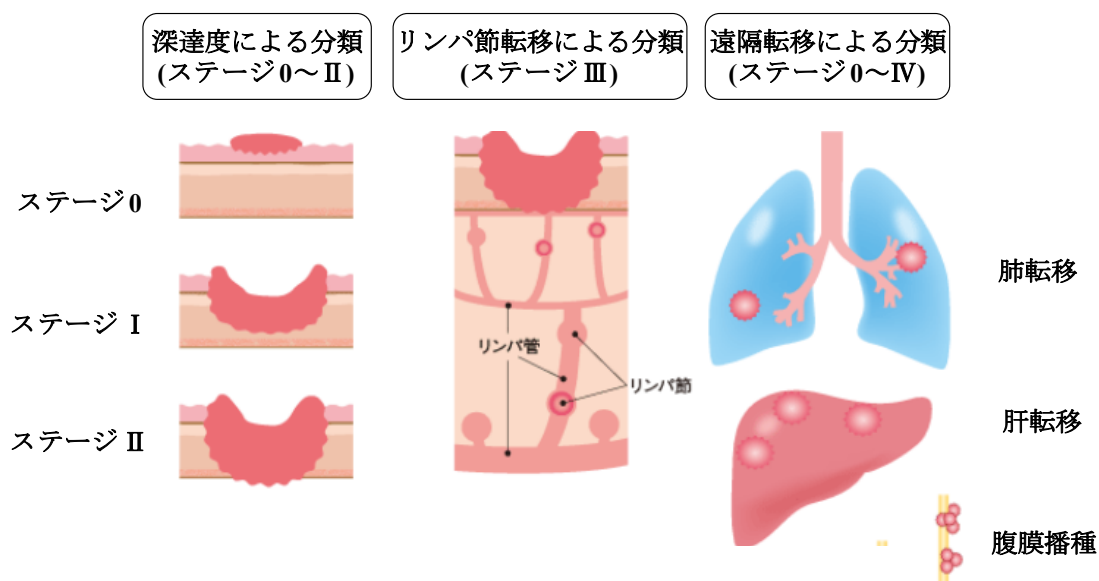


Fig.3-1 大腸がんの深達度.

診断技術や外科療法の進歩により、腫瘍のできている場所や進行具合によって、放射線治療や化学療法が用いられているが、ほとんどの場合、手術が必要となる。現在、約 80% の大腸がんでは治癒切除が行われ、治癒切除例では結腸がんで 80%、直腸がんで 75% に治癒が期待できるようになった。大腸がんは早期に発見し、適切な治療を行うことでほとんどは完治する病気であるが、多発しやすいという課題も残っている。Stage III 結腸がんの 25%、直腸がんで 35% に再発を認めるため、より効果的な補助化学療法の開発が必要である。また、大腸がんの 25% に合併を認める肝転移、15% に見られる肺転移はいずれも、標準的治療の普及が重要である。また肝転移は切除後も再発率が高いことから、補助化学療法が必要である。大腸がん治療後の QOL (Quality of Life) の向上も今後の課題であり、内視鏡治療の適応拡大や腹腔鏡手術の普及等が期待される (Fig.3-2)^{113, 114}。

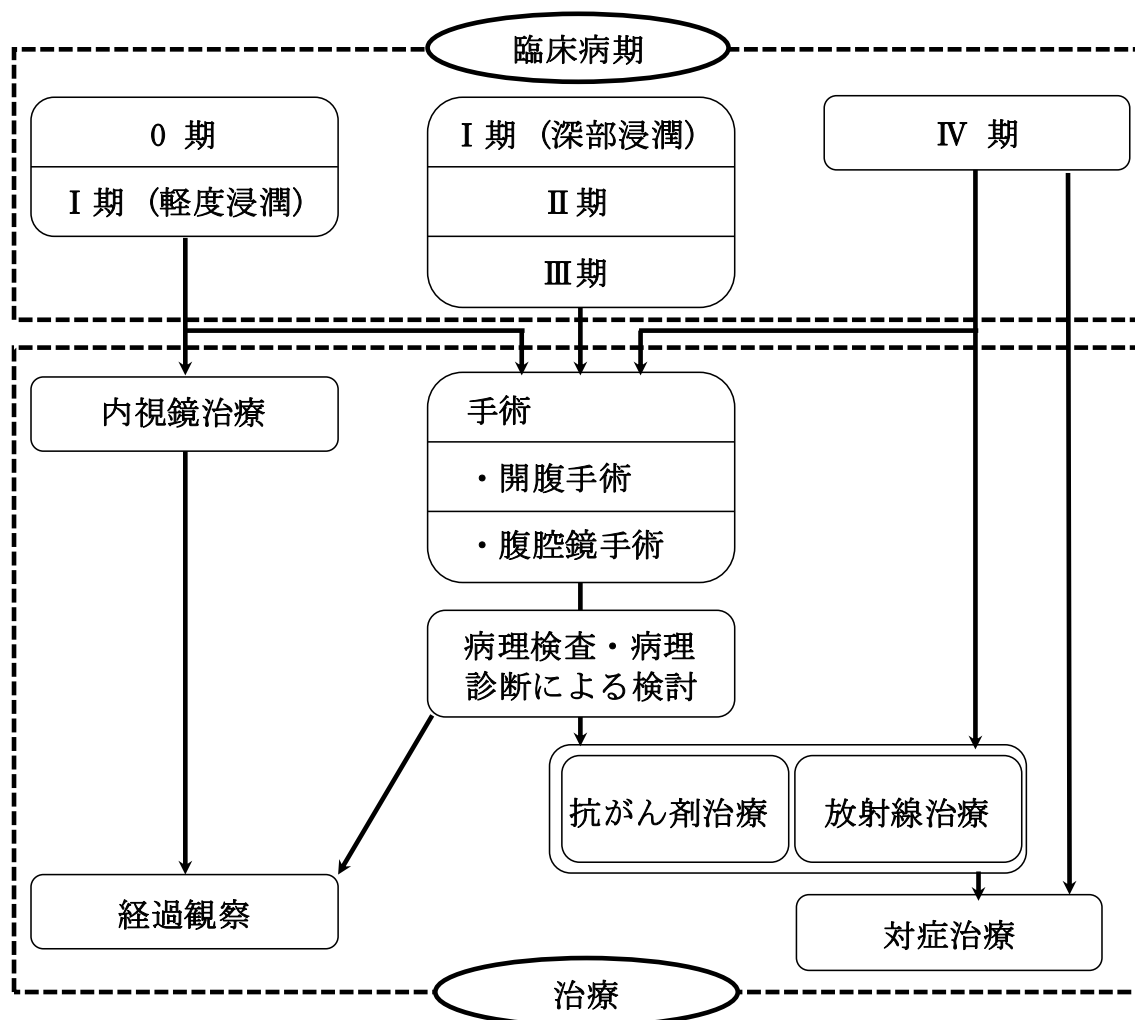


Fig.3-2 大腸がんのステージ別治療方法.

胃がんは、胃の内側の粘膜から発生する悪性腫瘍で、世界的にみて日本人に非常に多いがんである。日本では、男性で 9 人に 1 人、女性で 18 人に 1 人、胃がんで死亡するリスク、男性で 24 人に 1 人、女性で 51 人に 1 人と 2009 年に発表されている。早期診断と治療法の進歩により、胃がんによる死亡数は年々減少しているが、部位別死亡数では男女とも肺がんに次いで第 2 位となっている。

胃がんの危険因子として、塩分の過剰摂取、動物性食品やビタミンの摂取不足、熱い、辛いといった刺激物、胃粘膜を荒らすヘリコバクターピロリ菌の感染等の食生活と胃がんとのかかわりが注目されている。また、喫煙もたばこの中に含まれる有害物質が胃の粘膜を刺激し、胃がんの原因になる。診断の進歩により早期に発見できるようになり早期胃がんは 90% 程度完治できるが、診断・治療の難しい悪性度の高いスキルス胃がん (硬性がん) は、内視鏡検査でも早期発見しにくいがんである。また、胃の表面には腫瘍が出ずに、胃壁の中を広がって大きくなるため、進行が早く、腹膜への転移を起こしやすく、若年層に見られる。胃がんは内視鏡や X 線検査、CT、超音波、MRI 等による肉眼的所見、病理的診断にて治療方針が決まるが、がんの深達度によって早期胃がんと進行胃がんの二つに分けられる (Fig.3-3)。リンパ節、遠隔臓器へ転移がなく、粘膜・粘膜下層にとどまるものが早期胃がんであり、内視鏡的粘膜切除術 (Endoscopic Submucosal Dissection (ESD)) によって粘膜ごと腫瘍を切除して治療する。しかし、粘膜のみならず筋層・漿膜にも深達している進行胃がんは、根本的な治療である原発がんとリンパ節郭清を外科的手術により切除する他に、手術前に抗がん剤によるネオアジュバント (Neo-Adjuvant) 療法を行ったり、手術後に抗がん剤によるアジュバント (Adjuvant) 療法が行われている。また、腫瘍が膵臓や大腸にまで転移している場合に、膵臓や大腸を含めて切除する手術もある。再発を抑制するために、化学療法が必要とされる。

胃がんに対する抗がん剤は、代謝拮抗薬 (5-FU、テガフル、ウラシル、S-1)、白金製剤 (シスプラチン)、タキサン系 (パクリタキセル、ドセタキセル)、トポイソメラーゼ (イリノテカン) 等が用いられる³⁾。切除不能な進行再発の胃がんを対象として、トラスツズマブ (Trastuzumab for Gastric Cancer : ToGA) は 50% 生存期間 (Median Survival Time : MST) が約 1 年と報告されている。分子標的薬としてグラクソ・スミスクラインのチロシンキナーゼ阻害剤 (Lapatinib) が転移性胃がんに対して有効性を確かめる臨床試験が進んでいる。また、38% の胃がん患者にメラノーマ関連抗原-3 (Melanoma-Associated Antigen 3 : MAGE-3) が発現し¹¹⁵⁾、がんワクチンにおいて、MAGE-3 を投与したがん樹状細胞療法は胃がんにも奏効性が得られた¹¹⁶⁾。

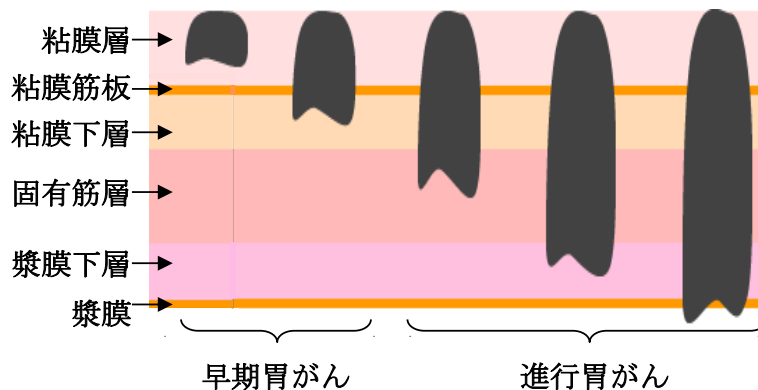


Fig.3-3 胃がんの深達度.

アポトーシスは 1972 年イギリスの病理学者 Wyllie と Kerr らによって見出された¹¹⁷⁾。彼らは、細胞死には 2 種類の形態が存在し、細胞が積極的に死を誘導するアポトーシス (Apoptosis: プログラム死) と、切り傷、火傷等外的因子により細胞機能が阻害され、受動的に死に至るネクロシス (Necrosis: 壊死) に分類されるとした。個体発生は細胞の増殖・分化、あるいは死滅のバランスによって成り立っており、その過程においてアポトーシスは極めて重要な現象であることは良く知られている。また、炎症の惹起とその消退においても免疫担当細胞のアポトーシスが重要な役割を果たしており、細胞のアポトーシスは生体の恒常性維持のために必須の機構である。さらに、異常増殖能を有するがん細胞の発生とその排除という面においても、アポトーシスはその中心的な役割を果たしている。Wyllie と Kerr らはアポトーシスによる細胞死の特徴は、細胞が収縮し、核内部の DNA の断片はヌクレオソームの単位 (180bp) に切断されること、マルチマーから成るラダーが観察されることを見出した¹¹⁸⁾。その後、断片化されたアポトーシス小体が形成され、これをマクロファージが貪食するために周囲の細胞に炎症を起こすことがなく、生体への影響はほとんどない。

線虫 (*C. elegans*) の発生における細胞死の解析より、アポトーシスが遺伝子により支配されていたことが明らかになった。Horvitz らは、変異体の解析からアポトーシスに関わる遺伝子群の存在を明らかにした。その遺伝子群をカスパー (Caspase) ファミリーと呼ぶ^{119, 120)}。ヒトの場合、今までに 10 種類のカスパーファミリー遺伝子が報告されている。Nicholson らは、ペプチドライブラリを用いた解析からカスパーを三つのグループに分類している。グループ I (カスパー-1, 4, 5) は、IL-1、Interferon- γ 誘導因子等のサイトカインの活性化に関与する。グループ II (カスパー-2, 3, 7) の認識配列は DEXD であり、分解される分子の切断部位に存在する。グループ III (カスパー-6, 8, 9) の認識配列は D グループ II の P20 と P10 の間に存在し、その活性化に関与する¹²¹⁾。

Bcl-2 ファミリーはミトコンドリアの透過性をコントロールすることによってアポトーシスを制御する。抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2、Bcl-xl はミトコンドリア外壁に存在し、シトクロム c の放出を抑制する。プロアポトーシスタンパク質である Bcl-2 ファミリーの Bad、Bid、Bax、Bim は細胞質に存在するが、細胞死シグナルに従ってミトコンドリアへと移動し、そこではシトクロム c の放出を促進する。Bax は生存因子からの刺激にตอบสนองしてミトコンドリアへと移動する。ミトコンドリアからの放出に準じて、シトクロム c は Apaf-1 に結合し、カスパーズ-9 との活性化複合体を形成する。アポトーシス時のミトコンドリア透過性とシトクロム c 放出の制御メカニズムは完全には分かっていないが、Bcl-xl、Bcl-2、Bax は電位依存性陰イオンチャネル (VDAC) に影響を与え、シトクロム c の放出制御の一端を担っていると考えられている¹²²⁻¹²⁷⁾。一方、ミトコンドリアの膜電位が低下せず、Bax によりミトコンドリアからシトクロム c が放出されることが明らかとなっている (Fig.3-4)¹²⁸⁾。

RKIP (Raf Kinase Inhibitor Protein) タンパク質は、長年ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 (Phosphatidylethanolamine Binding Protein : PEBP) として認識されていた¹²⁹⁾。最近の研究では、RKIP は重要なシグナル伝達経路、Raf-MEK-ERK キナーゼカスケード、G タンパク質及び NF- κ B シグナル伝達を調節することが明らかとなった¹³⁰⁾。また、RKIP はアポトーシスの誘導及び転移の抑制をし、いくつかの抗がん作用が示されている^{131, 132)}。前立腺がんの進行に伴い、RKIP の発現が消失すると、転移が促進され、アポトーシスが抑制される。さらに、RKIP の発現によってブロックされる Raf の下流経路の阻害効果は抗がん効果を持つことになる¹³³⁾。

現在までに知られているアポトーシス誘導のシグナル伝達経路は、細胞膜に存在するデスレセプター (Fas) 受容体を介するものと、ミトコンドリアを介する二つに大別される。Fas がアポトーシスシグナルを受容すると、カスパーズ-8 が活性化し、ミトコンドリアを介する場合には、ミトコンドリアから遊離したシトクロム c が dATP/ATP と共に Apaf-1 と結合し、カスパーズ-9 を活性化する。活性化したカスパーズ-8,9 が下流のカスパーズ-3 を活性化し、アポトーシスが実行される。

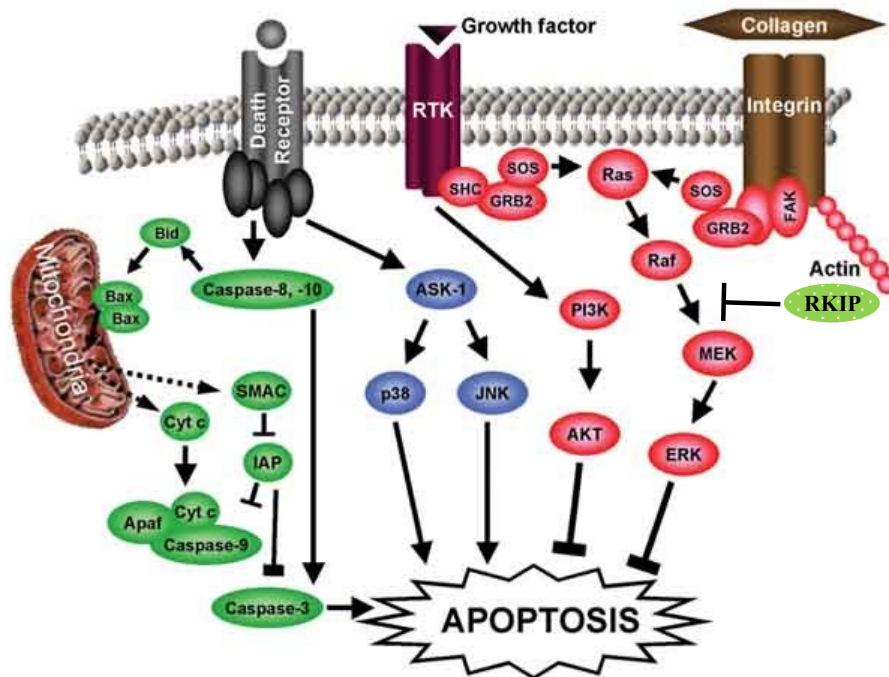


Fig.3-4 Schematic representation of protein kinase signaling pathways involved in apoptosis regulation¹³⁴⁾.

ハイブリッドリポソーム (HL) は、それ自身が *in vitro* 及び *in vivo* において顕著な制がん効果を示し、種々のがん細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなっている。現在までに、HL は、ヒト肝臓がん細胞 (Hep-G2)¹⁴⁾、ヒト肺がん細胞 (RERF-LC-OK, A549)¹⁵⁾、ヒト乳がん細胞 (MDA-MB-453)¹⁷⁾、ヒト B リンパ腫細胞 (RAJI)、ヒト T リンパ腫細胞 (Molt-4)²²⁾、ヒト大腸がん細胞 (WiDr)²³⁾、コトンラット胃腫瘍由来腹水性がん細胞 (CoRa622G6)^{26,27)}等の多くの悪性腫瘍細胞に対して、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

HL のアポトーシスメカニズムについては、ヒト前骨髄性白血病 HL-60 細胞において、Fas が活性化し、カスパーズ-8 の活性化と Bid の切断活性を経てカスパーズ-3 に至る経路と、ミトコンドリアを活性化させ、シトクロム c の放出とカスパーズ-9 の活性化を経てカスパーズ-3 に至る経路との 2 種類の異なるシグナル伝達経路が存在し、最終的に PARP が活性化され、DNA の断片化が起こることが明らかとなっている (Fig.3-5)²⁰⁾。また、肺がん細胞 (A549 及び RERF-LC-OK) においても同様の経路でアポトーシスが示唆されている¹⁵⁾。

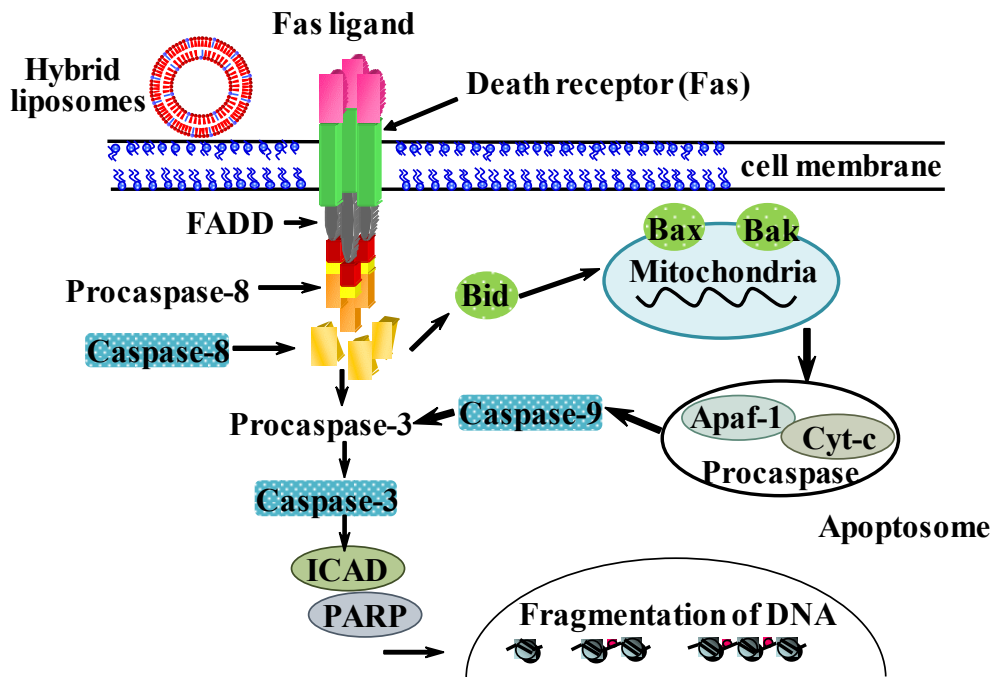


Fig.3-5 A schematic representation of mechanism for apoptosis of HL-60 cells induced by hybrid liposomes.²⁰⁾

さらに、HL や細胞のもつ膜流動性の大きさが HL の制がん効果に深く関与していることが報告されている¹³⁵⁾。蛍光基質 (NBDPC) 含有 HL (HL/NBDPC) はヒト由来肝臓がん細胞 (Hep-G2)¹⁴⁾、ヒト由来肺がん細胞 (A549, RERF-LC-OK)¹⁵⁾、ヒト大腸がん細胞 (WiDr)²³⁾に高い選択性を示し、選択的に膜融合することが明らかにされている。また、*in vivo* において、マウスLewis肺癌及びヒト B リンパ腫の腹腔内移植モデル、神経芽腫の肝転移モデルマウスに対し、顕著な治療効果及び延命効果が得られている^{12, 13, 22, 136)}。

本章では、トレハロース含有リポソームの大腸がん細胞 (HCT-116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対する制がん効果及び制がんメカニズムについて検討した。即ち、1) 酸素活性測定法 (WST-1 assay) を用いて、DMTreCn のがん細胞に対する増殖抑制効果を検討した。2) がん細胞に対する融合・蓄積の観察について検討した。3) フローサイトメーターによる DNA 断片率の測定及び TUNEL assay を用いてアポトーシス誘導について検討した。4) アポトーシス誘導における細胞内カスペース-3, 8, 9 活性化を検討した。5) ミトコンドリア膜電位の測定、シトクロム c 放出の測定、Bax 活性の測定により、アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与について検討した。6) アポトーシス誘導における RKIP 活性化について検討した。

3-2 実験

3-2-1 試料

リン脂質

L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) は、2-2-1 と同様のものを使用した。

糖系界面活性剤

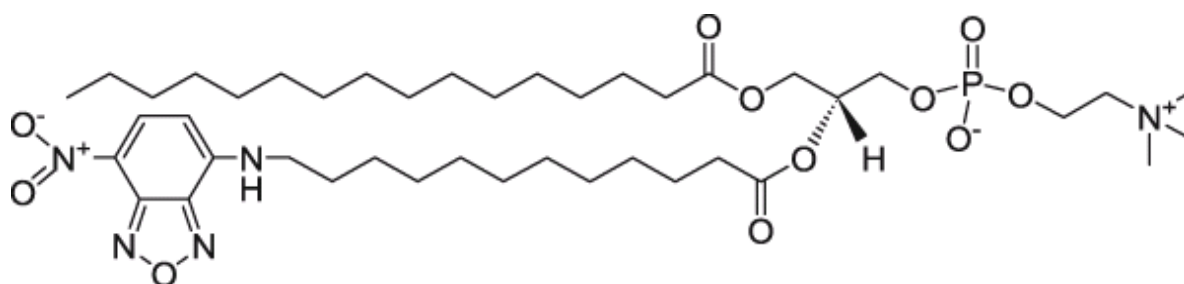
α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monododecanoate (TreC12) は、2-2-1 と同様のものを使用した。

α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monomyristate (TreC14) は、2-2-1 と同様のものを使用した。

α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monopalmitate (TreC16) は、2-2-1 と同様のものを使用した。

蛍光標識リン脂質

Palmitoyl-2 [12-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazoi-4-yl)amino] dodecanoyl -sn-glycero-3-phosphocholine (NBDPC) は、市販品 (Avanti Polar Lipids) のクロロホルム溶液を、ロータリーエバポレーター (IWAKI, REN-1) と減圧乾燥機 (EYELA, VOC-300SD) を用いて、十分に溶媒を除去した後、使用した。以下に構造式を示す。
(Mw = 856.05)



Palmitoyl-2 [12-(7-nitro-2-1, 3-benzoxadiazoi-4-yl) amino] dodecanoyl -snglycero-3- phosphocholine
NBDPC

3-2-2 トレハロース含有リポソームの調製

トレハロース含有リポソームは、2-2-2 と同様の方法で調製した。

3-2-3 トレハロース/蛍光脂質含有リポソームの調製

リン脂質 (DMPC) 、トレハロース界面活性剤 (TreCn (n=14, 16)) 及び蛍光リン脂質 (NBDPC) を秤量し、ナス型フラスコに入れた後、リン酸緩衝液 (PBS(-)) 中で超音波照射器 (VELVO-CLEAR, ULTRASON-300S) を用いて超音波照射処理 (1min/ml) を 45°C, 300W で行った。得られた均一溶液を 0.20 μ m フィルターでろ過滅菌したものを試料溶液として使用した (Fig.3-6)。

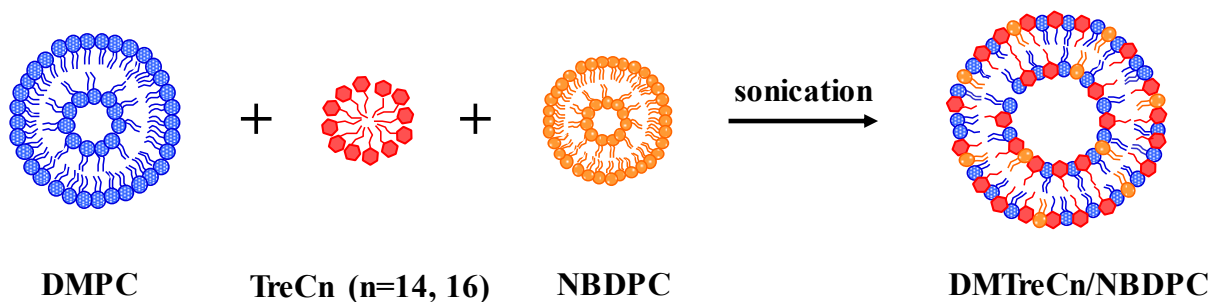


Fig.3-6 Schematic representation of DMPC/70mol%TreCn/5mol%NBDPC (DMTreCn (n=14, 16)).

3-2-4 動的光散乱法による膜直径 (d_{hy}) の測定

蛍光脂質含有リポソームの膜直径は、2-2-3 と同様の方法で測定した。試料溶液の保存及び測定は、膜物性の安定性を考慮し、4°C で行った。

3-2-5 使用細胞

がん細胞には、ヒト大腸がん (HCT-116; Colon Cancer)、ヒト胃がん (MKN-45; Stomach Cancer) を使用し、正常細胞には、ヒト胎児肺二倍体線維芽細胞 (WI-38; Human Diploid Lung) を使用した。なお、HCT-116 細胞及び WI-38 細胞は American Type Culture Collection (ATCC)、MKN-45 細胞は ヒューマンサイエンス研究資源バンク (Health Science Research Resources Bank : HSRRB) より購入した。

HCT-116 細胞及び MKN-45 細胞の培地は、RPMI-1640 (GIBCORL) にウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum (FBS); HyClone Laboratories Inc.) を添加したもの (RPMI-1640/10%FBS) を用い、WI-38 の培地は MEM (Minimum Essential Medium; Invitrogen) に FBS、1.0mM ピルビン酸 (Pyruvic Acid; Invitrogen) 、0.1mM 非必須アミノ酸 (Non Essential Amino Acid (NEAA); Invitrogen) を添加したものをを用いた。以上のすべての細胞は、37°C、5%CO₂、湿度 95% の条件で培養した。

3-2-6 酵素活性測定法 (WST-1 assay) による細胞増殖抑制試験

細胞に対する DMTreCn (n=12, 14, 16) の増殖抑制効果は、酵素活性測定法である WST-1 (2-[4-indophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H-5-tetrazolium, monosodium salt) (同仁化学研究所, Cell Counting Kit) assay により評価した。WST-1 assay は、代謝物の発色によって細胞増殖活性を測定する方法である¹³⁷⁾。電子キャリアーである 1-Methoxy PMS (1-methoxy-5-methylphenazinium methanesulfate) がミトコンドリアの脱水素酵素 (Dehydrogenase) により還元されると、水溶性で黄色い WST-1 Formazan ($\lambda = 438\text{nm}$, $\epsilon = 3.7 \times 10^4$) を生成する。この WST-1 Formazan の生成量は生細胞数と比例関係にあり、その比色値を測定し比較することにより、細胞増殖の指標とすることが出来る (Fig.3-7)。

滅菌済 96 ウェル培養プレート (スミロン) にリファレンス用培地を $100\mu\text{l/well}$ 添加後、HCT-116 細胞及び MKN-45 細胞を 2 万 cells/ml に調整し、細胞懸濁液 $100\mu\text{l/well}$ を播種し、24 時間前培養した。24 時間後、異なるトレハロース含有量の DMTreCn (n=12, 14, 16) の試料を $10\mu\text{l/well}$ 添加し、48 時間処理した。48 時間後 Cell Counting Kit (WST-1、1-Methoxy PMS 混合溶液) を $10\mu\text{l/well}$ 添加し、3 時間置いた後、分光光度計 (Emax, Molecular Devices Co.) を用いて、波長 450nm における吸光度を測定した。

試験試料を添加したものを陽性対象検体とし、5%-glucose 溶液を添加したものを陰性対象検体、細胞懸濁液のみをブランクとして使用した。 A_{Mean} は陽性対象検体の吸光度からブランクを引いたものを、 A_{Control} は陰性対象検体の吸光度からブランクを引いたものとし、細胞生存率はその比である $A_{\text{Mean}}/A_{\text{Control}}$ より (8) 式に従い算出した。

$$\text{Viability (\%)} = (A_{\text{Mean}} / A_{\text{Control}}) \times 100 \cdots (8)$$

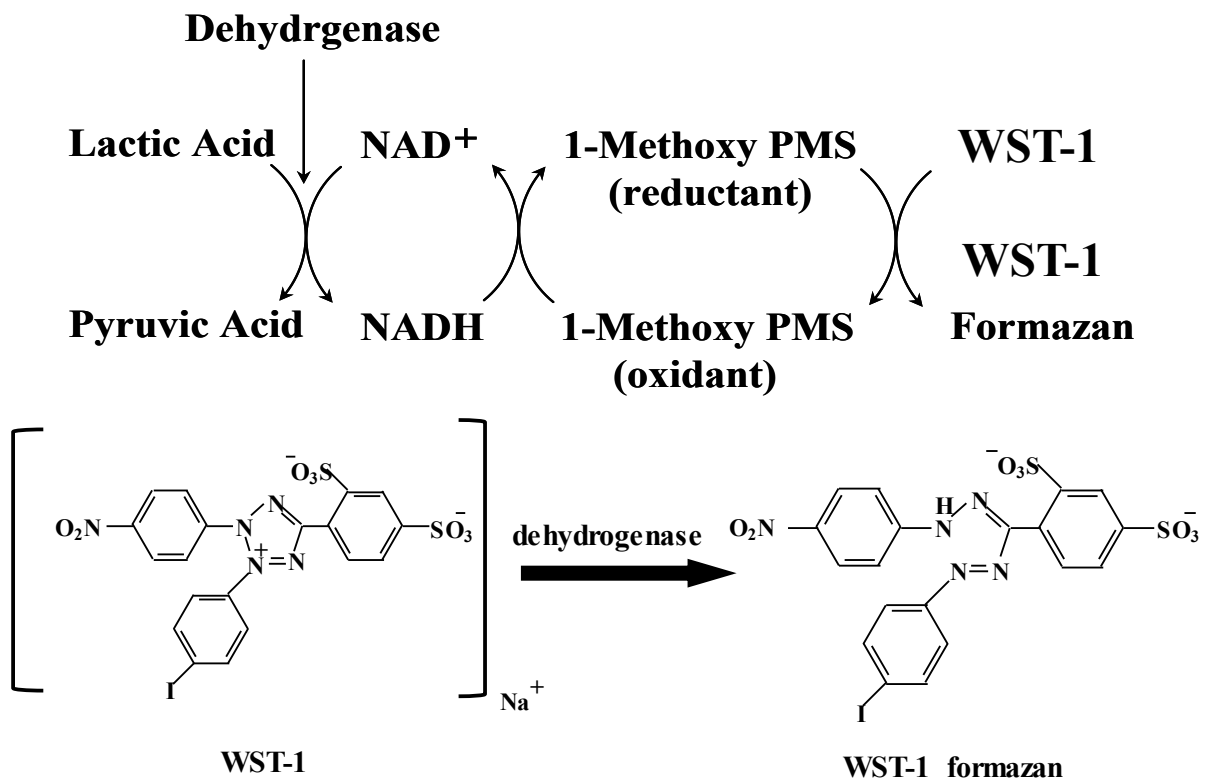


Fig.3-7 Principle of WST-1 assay.

3-2-7 共焦点レーザー顕微鏡による細胞への融合・蓄積の観察

共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy : CLSM) は、試料の厚み及び時間に対する情報の取得に高い威力を発揮し、三次元的な生物試料の表面及び内部の蛍光像を鮮明に観察することが可能であり、生体試料 (細胞等) 及び固定試料 (細胞骨格等) の双方に幅広く用いられている¹³⁸⁾。発せられたレーザー光はスキャナーを介して対物レンズによりフォーカスされ、スポット状のビームで試料上を走査する。レーザー光で励起された蛍光は再び対物レンズに戻り、スキャナーからピンホールを経て受光器に届く。受光器が捉えた蛍光は画像情報に変換され、最終的にモニター上に表示される (Fig.3-8)¹³⁹⁾。

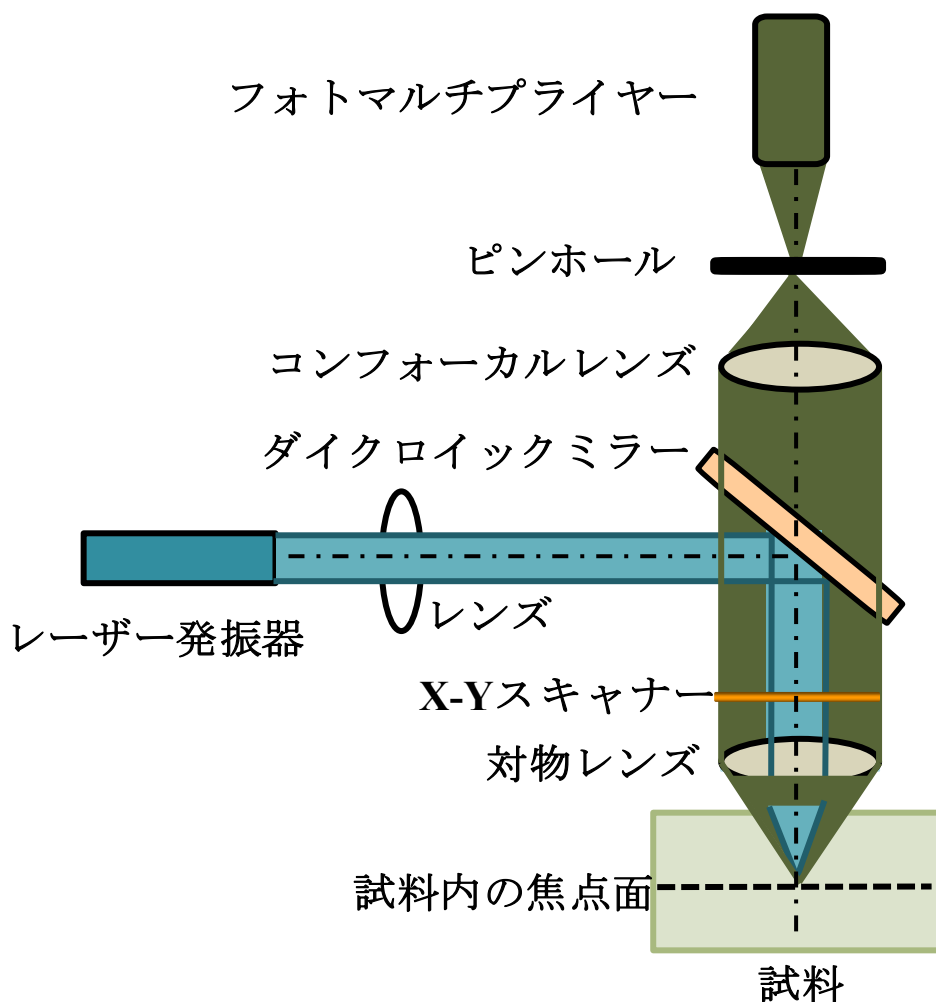


Fig.3-8 共焦点レーザー顕微鏡の模式図.

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、各細胞に対する蛍光脂質含有ハイブリッドリポソームの蛍光蓄積観察を行った。観察方法として、生きた細胞中の特定分子の細胞内局在変化を追跡する方法であるタイムラプス方法を用いた¹⁴⁰⁾。

調製した細胞懸濁液 2ml を滅菌済み Glass Bottom Uncoated Dish に播種し、24 時間前培養後、培地を除去し、蛍光脂質含有リポソーム (DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC) を含む培地 2ml を添加した。その後、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, TCS SP) により光源として励起波長 488nm の Ar レーザーを用い、蛍光波長 505~555nm にて、3 時間の観察を行った。

3-2-8 フローサイトメーターによる DNA 含量の測定

アポトーシスが誘導された細胞の最も特徴的な性質は核の断片化であり、ヌクレオソーム単位の DNA の断片化が見られる。この断片化した DNA を標識とする方法が ヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide : PI, Invitrogen) 染色法である¹⁴¹⁾。PI は、核染色剤として、アポトーシス誘導された細胞膜を不安定化することで、細胞膜を浸透し細胞内の二本鎖 DNA の間に入る。細胞の DNA 含量は、フローサイトメーターにより測定した。PI をレーザー光源により励起すると、DNA 量に比例して赤色蛍光を発する。PI により染色した細胞の DNA の長さから、その細胞が G0/G1 期、S 期、及び G2/M 期のどの周期に相当するかかの判定が可能である。さらに、アポトーシスを誘導した細胞における断片化した短い DNA (Apoptotic DNA : Sub-G1) が判定できる (Fig.3-9)¹⁴²⁾。PI は市販品 (Molecular Probes) を PBS(-) に溶解して使用した。

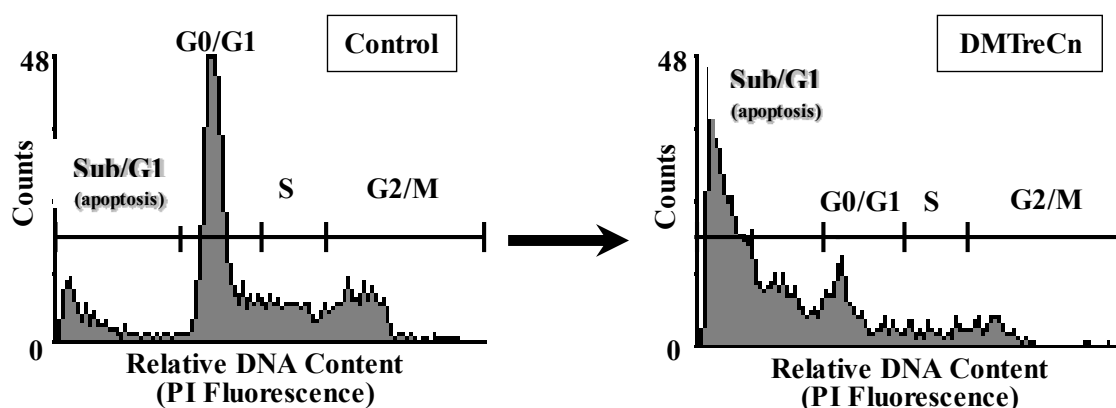
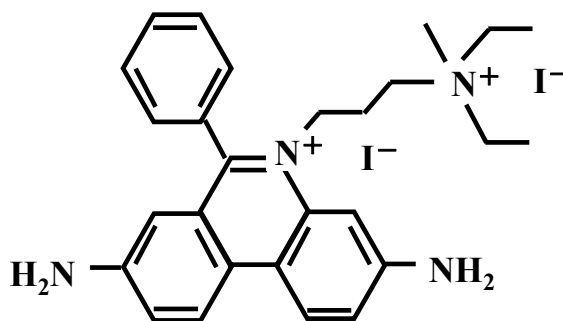


Fig.3-9 Detection of apoptotic DNA using flow cytometer.



Propidium Iodide

滅菌済 6well plate に細胞懸濁液を 2ml 播種し、24 時間培養後、DMTreCn (n=12, 14, 16) を添加し、37°C、5%CO₂ インキュベーターで 48 時間培養した。48 時間後、PBS(-) で洗浄し、0.05% Trypsin/EDTA を加えて細胞を回収し、3000 rpm × 3 分間で遠心分離を行った。上澄みを除去後、0.1% Triton X-100 にて浸透化処理し、Rnase (SIGMA) にて細胞内 RNA を分解除去し、1ml PBS(-) を加えて細胞を再懸濁し、ナイロンメッシュを通過させた。PI を加えて、暗下、氷中で 15 分間 DNA を染色した。その後、フローサイトメーターにより各細胞の DNA 含量を測定した。蛍光量の測定は、光源に 488nm のアルゴンレーザー (Ar laser) を出力 15mW で使用し、波長範囲 605~630nm の FL3 センサーで、PI 蛍光量を検出した。

3-2-9 TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出

アポトーシスが誘導された細胞に特徴的な核の構造変化として、ヌクレオソーム単位の DNA の断片化が見られる。この断片化した DNA を標識とする方法が TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法である¹⁴³⁾。アポトーシスにより、二本鎖 DNA からヌクレオソーム単位の DNA の断片化が生じる。そこに、テンプレートに依存せずに核酸重合を触媒することが可能な Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) を用いて、蛍光標識した 2'-Deoxyuridine-5'-Triphosphate (dUTP) を DNA の 3'-OH 末端へ重合させ、断片化 DNA を標識することで、アポトーシス細胞が観察される (Fig.3-10)。

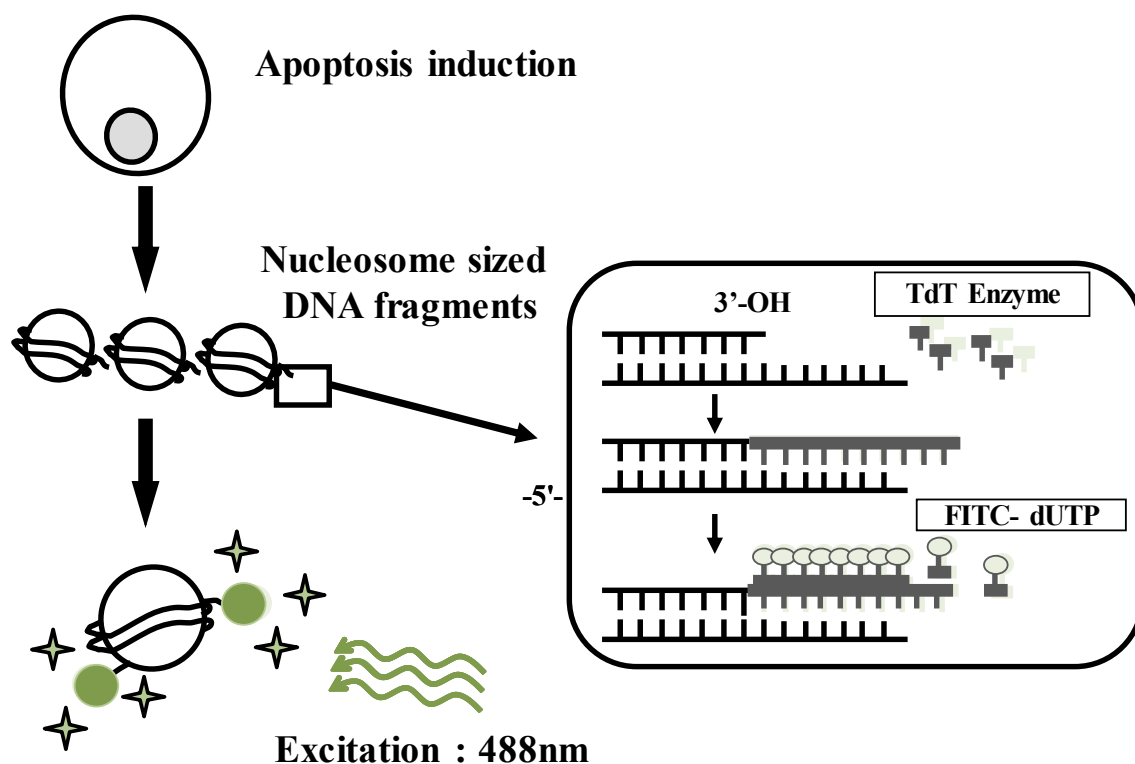
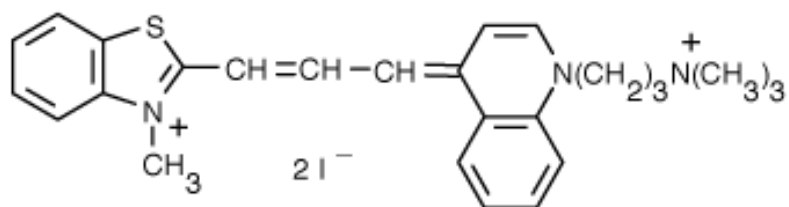


Fig.3-10 Principle of TUNEL assay.

滅菌済 Glass Bottom Uncoated Dish に細胞懸濁液を 2ml 播種し、24 時間前培養後、DMTreCn (n=14, 16) を添加して 48 時間培養した。その後、10% 中性ホルマリン溶液を加えて室温で 30 分間組織固定後、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。PBS(-) で洗浄後、In Situ Cell Death Detection Kit (TdT, fluorescein-dUTP, Roche Diagnostics) を添加して、暗下、37°C で 60 分間反応後、TO-PRO-3 (Invitroge) にて核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。光源として、Ar レーザー (488nm) 及び He-Ne レーザー (633nm) を用い、一定波長域 (Fluorescein-dUTP : 515~565nm, TO-PRO-3 : 640~700nm) の条件下で観察を行った。



TO-PRO-3

3-2-10 カスパー-3, 8, 9 活性の測定

カスパー-3, 8, 9 活性の測定は、カスパー特異的蛍光基質である PhiPhiLux 及び CaspaLux (OncoImmunin) 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.3-11)¹⁴⁴⁻¹⁴⁹。

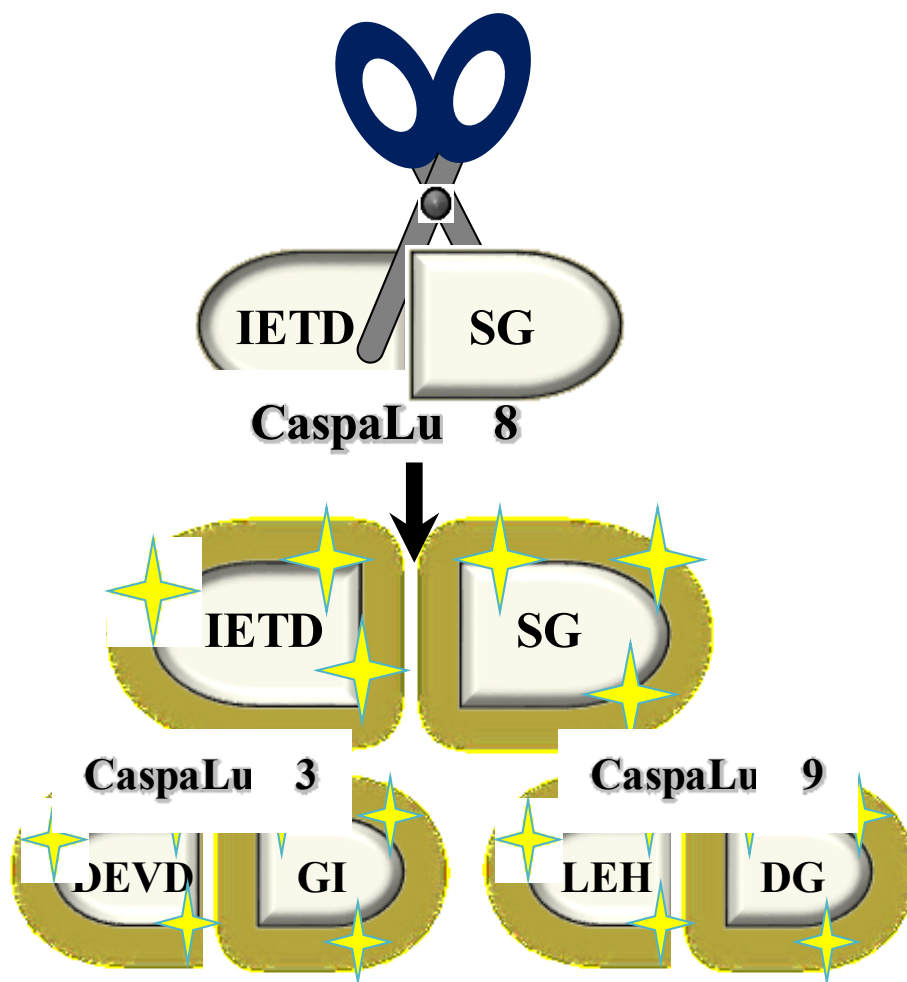


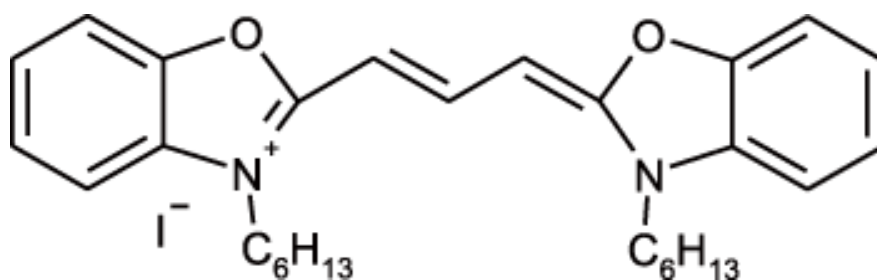
Fig.3-11 Principle of PhiPhiLux and CaspaLux.

滅菌済 Glass Bottom Uncoated Dish に細胞懸濁液を 2ml 播種し、24 時間培養後、DMTreCn (n=14, 16) を添加し、48 時間培養した。48 時間後、PBS(-) で洗浄し、0.05% Trypsin/EDTA を加えて細胞を回収し、3000 rpm × 3 分間で遠心分離を行った。上澄みを除去後、10 μ M PhiPhiLux 溶液を添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ インキュベーターで 30 分培養した。その後、1ml PBS(-) を加えて細胞を再懸濁し、ナイロンメッシュを通過させた。フローサイトメーターにより各細胞のカススペース活性を測定した。蛍光量の測定は、光源に 488nm のアルゴンレーザー (Ar laser) を出力 15mW で使用し、波長範囲 605~630nm の FL3 センサーで、PhiPhiLux 及び CaspaLux 蛍光量を検出した。また、共焦点レーザー顕微鏡により、励起波長 488nm (He-Ne レーザー)、蛍光波長 505~530nm にて観察を行った。

3-2-11 ミトコンドリア膜電位の測定

ミトコンドリアはアポトーシスの制御に重要な細胞内小器官である。通常はミトコンドリア内外の膜電位差を利用してエネルギー産生を行い、細胞「生存」に寄与するが、ミトコンドリア機能傷害が起こると、ミトコンドリア膜上に局在する Bax の活性化によって膜電位が低下し、カススペースを活性化させることでアポトーシスが誘導される¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾。

DMTreCn (n=14, 16) の大腸がん細胞 (HCT116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) 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、シアニン色素である 3,3'-dihexyloxacarbocyanin iodide (DiOC₆(3), Enzo) を用いて、フローサイトメーターにて測定した¹⁵³⁾。DiOC₆(3) 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。膜や細胞内タンパクに結合して、疎水的環境に置かれることにより、蛍光強度が増強する。



DiOC₆(3)

滅菌済 6well plate に細胞懸濁液を 2ml 播種し、24 時間培養後、DMTreCn (n=14, 16) を添加し、37°C、5%CO₂ インキュベーターで 48 時間培養した。さらに、48 時間後、DiOC₆(3) を最終濃度 40nM となるように添加し、37°C、5%CO₂ インキュベーターで 30 分培養した。48 時間後、PBS(-) で洗浄し、0.05% Trypsin/EDTA を加えて細胞を回収し、3000 rpm × 3 分間で遠心分離を行った。上澄みを除去後、細胞を分散させるためにナイロンメッシュを通過させ、フローサイトメーターを用いて DiOC₆(3) を測定した。

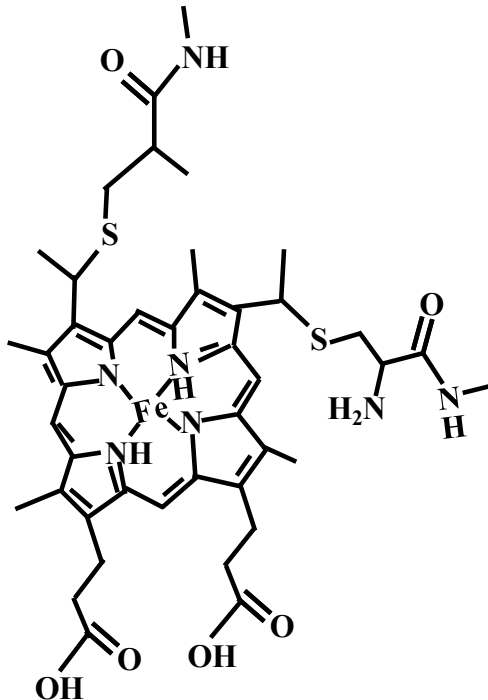
蛍光蓄積量の測定には、光源に 488nm の空冷アルゴンレーザーを出力 15mW で使用し、波長範囲 505~545nm の FL1 センサーで、DiOC₆(3) の発色量を検出した。

3-2-12 蛍光標識抗体染色によるシトクロム c 放出の測定

シトクロム c (Cytochrome c) は、ミトコンドリアの内膜に弱く結合しているヘムタンパク質の一種である。シトクロム c は、アポトーシスにおいてシグナル仲介の役割を担っていることが知られている^{154,155}。

細胞がアポトーシス誘導刺激を受けると、ミトコンドリアからシトクロム c が放出される。これは、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇することで、ミトコンドリア PTP (Permeability Transition Pore) の開口が促されることによる。少量放出されたシトクロム c は小胞体膜上にある IP3 受容体と相互作用し、小胞体からカルシウムが放出される。このプロセスにより、濃度が上がったカルシウムはシトクロム c の大量放出を引き起こす。細胞質中に放出されたシトクロム c は、今度はカスパーズ-9 と呼ばれるシステインプロテアーゼを活性化させる。カスパーズ-9 はカスパーズ-3 とカスパーズ-7 を活性化し (カスパーズカスケード)、最終的にアポトーシスを引き起こす¹²⁸。

DMTreCn (n=14, 16) の大腸がん細胞 (HCT116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対するアポトーシス誘導において、ミトコンドリアからのシトクロム c の放出を検討するために、Cytochrome c Release Kit (Calbiochem) を用いて、フローサイトメーターにて測定した。



シトクロム c

滅菌済 6well plate に細胞懸濁液を 2ml 播種し、24 時間培養後 DMTreCn (n=14, 16) を添加した。48 時間後、1X Wash Buffer で洗浄し、0.05% Trypsin/EDTA を加えて細胞を回収し、3000 rpm × 3 分間で遠心分離を行った。上澄みを除去後、氷上で 300 μ l の Permeabilization Buffer にて 10 分間浸透化処理し、室温で 8% Paraformaldehyde にて 20 分間細胞を固定した。その後、1ml の 1X Wash Buffer で洗浄し、室温で 250 μ l の Blocking Buffer にて 1 時間細胞をブロックし、室温で 250 μ l の一次抗体 Anti-Cytochrome c WS にて 1 時間細胞を染色し、500 μ l 二次抗体 Anti-IgG FITC WS にて 1 時間室温、暗下で細胞を培養した。1 時間後、細胞を洗浄し、1X Wash Buffer で細胞を再懸濁し、ナイロンメッシュを通過させた。フローサイトメーターの測定は、光源に 488nm の空冷アルゴンレーザーを出力 15mW で使用し、波長範囲 505~545nm の FL1 センサーで、シトクロム c の発色量を検出した。

3-2-13 細胞内 Bax 活性の測定

Bcl-2 ファミリーはミトコンドリアの透過性をコントロールすることによってアポトーシスを制御する。抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2, Bcl-xl はミトコンドリア外壁に存在し、シトクロム c の放出を抑制する。プロアポトーシスタンパク質である Bax, Bad, Bid, Bim は細胞質に存在するが、細胞死シグナルに従ってミトコンドリアへと移動し、シトクロム c の放出を促進する (Fig.3-12)。

Bax と Bim は生存因子の除去等の細胞死刺激に応答してミトコンドリアへと移動する。DNA 損傷によって活性化されると、p53 は Bax, Noxa, PUMA の転写を亢進する。ミトコンドリアからの放出に準じて、シトクロム c は Apaf-1 に結合し、カスパーズ-9 との活性化複合体を形成する。アポトーシス時のミトコンドリア透過性とシトクロム c 放出の制御メカニズムは完全には分かっていないが、Bcl-xl, Bcl-2, Bax は電位依存性陰イオンチャネル (VDAC) に影響を与え、それがシトクロム c の放出制御の一端を担っていると考えられている (116-122)。

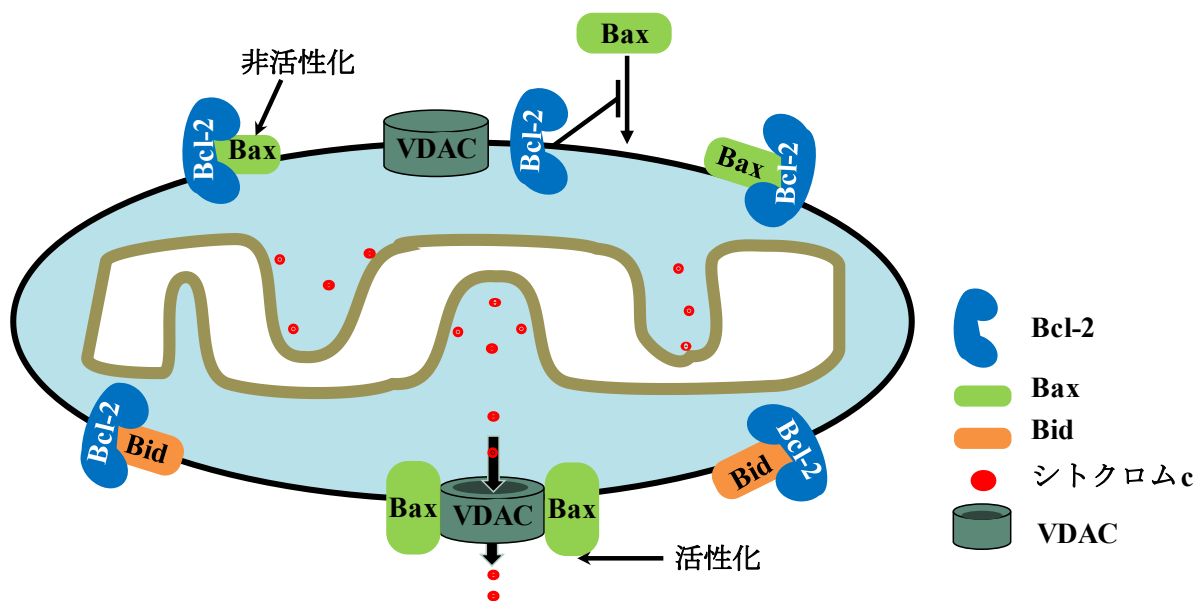


Fig.3-12 Bax によるシトクロム c の放出.

DMTreCn (n=14, 16) の大腸がん細胞 (HCT116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対するアポトーシス誘導において、Bax の活性化が関与しているかについて Anti-Bax (MBL) を用いて、フローサイトメーターにて測定した。

滅菌済 6well plate に細胞懸濁液を 2ml 播種し、24 時間培養後 DMTreCn (n=14, 16) を添加した。48 時間後、Wash Buffer で洗浄し、0.05% Trypsin/EDTA を加えて細胞を回収し、3000 rpm × 3 分間で遠心分離を行った。上澄みを除去後、200 μ l の 4% Paraformaldehyde にて細胞を固定し、20 分間 70% Ethanol にて細胞を浸透化処理した。その後、Wash Buffer で洗浄し、10 μ l の clear back にて 1 時間室温で細胞をインキュベートし、40 μ l の一次抗体 Anti-Bax にて 30 分間室温で細胞を染色し、40 μ l 二次抗体 Anti-IgG FITC WS にて 30 分間室温で細胞を培養した。その後、細胞を洗浄し、1X Wash Buffer で細胞を再懸濁し、ナイロンメッシュを通過させた。フローサイトメーターの測定は、光源に 488nm の空冷アルゴンレーザーを出力 15mW で使用し、波長範囲 505~545nm の FL1 センサーで、Bax の発色量を検出した。

3-2-14 蛍光標識抗体染色による RKIP 活性の測定

Raf-1 は細胞の分化増殖や細胞周期等を調節し、がん遺伝子として発見されている。Raf-1 キナーゼ阻害タンパク質 (Raf-1 Kinase Inhibitor Protein : RKIP) は、膜リン脂質と結合するタンパク質として同定され、ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 (PEBP) と命名されたが、Raf-1 と結合し、MEK のリン酸化する能力をブロックするため、現在、Raf-1 キナーゼ阻害タンパク質として知られている¹²⁹⁾。RKIP は、MEK 経路、G タンパク質シグナル経路及び NF- κ B シグナル経路を含む三つのシグナル伝達経路を調節する。MEK 経路は細胞のがん化と最も密接に関連している。細胞膜表面に存在する G タンパク質共役受容体 (G Protein-Coupled Receptor : GPCR) は G タンパク質と結合し、G タンパク質の α と $\beta\gamma$ が切断され、活性化されると細胞内へ情報伝達し、細胞運動、分化、増殖、発がんに関わっている。RKIP は GRK と結合することにより G タンパク質とレセプターが離れ、不活性化になる。NF- κ B 転写因子は細胞増殖、アポトーシス等に関与している。悪性腫瘍では NF- κ B の恒常的活性化が認められ、がん細胞で NF- κ B の活性が高まると、腫瘍血管の新生に関与するタンパク質の産生が増加し、増殖や転移が起こり、がん細胞が死ななくなる (Fig.3-13)。

RKIP は、膜の生合成、精子形成、神経発生、及びアポトーシスを含むいくつかの生理学的プロセスに寄与している。また、脳、肺、肝臓等を含む多くの組織で発現されているため、RKIP の発現または機能の調節不全は、これらの組織における病態生理に与える可能性がある。前立腺がん細胞における RKIP 発現の損失はそれらの転移性表現型を与える。さらに、転移性の前立腺がん細胞株における RKIP の発現の回復は、原発腫瘍の成長に影響を与えないが、確かに前立腺がんの転移を抑制する。RKIP はアポトーシスの誘導及び転移を抑制し、いくつかの抗がん作用が示されている (Fig.3-8)¹²⁹⁻¹³³⁾。

DMTreCn (n=14, 16) の大腸がん細胞 (HCT116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対するアポトーシスシグナルに RKIP の活性化が関与しているかについて検討するために、Anti-RKIP (Santa Cruz Biotechnology) を用いて、フローサイトメーターにて測定した。

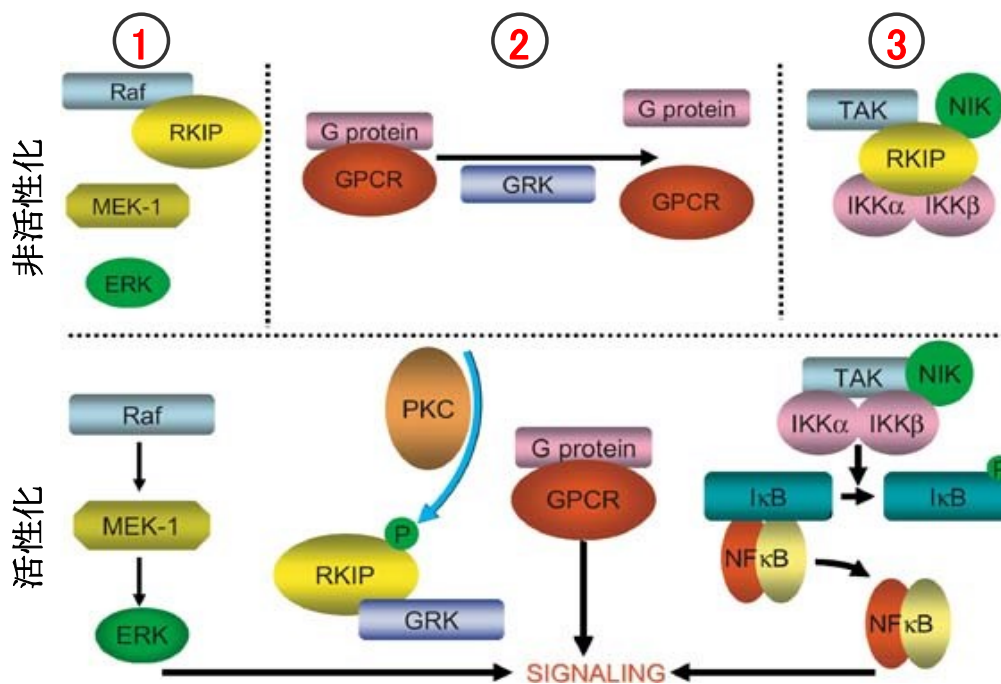


Fig.3-13 Role of RKIP in intracellular signaling¹²⁶⁾.

滅菌済 6well plate に細胞懸濁液を 2ml 播種し、24 時間培養後 DMTCn (n=14, 16) を添加した。48 時間後、Wash Buffer で洗浄し、0.05% Trypsin/EDTA を加えて細胞を回収し、3000 rpm × 3 分間で遠心分離を行った。上澄みを除去後、200μl の 4% Paraformaldehyde にて細胞を固定し、20 分間 70% Ethanol にて細胞を浸透化処理した。その後、Wash Buffer で洗浄し、50μl の一次抗体 Anti-RKIP にて 30 分間室温で細胞を染色し、40μl 二次抗体 Anti-IgG FITC WS にて 30 分間室温で細胞を培養した。その後、細胞を洗浄し、1X Wash Buffer で細胞を再懸濁し、ナイロンメッシュを通過させた。フローサイトメーターの測定は、光源に 488nm の空冷アルゴンレーザーを出力 15mW で使用し、波長範囲 505~545nm の FL1 センサーで、RKIP の発色量を検出した。

3-3 結果と考察

3-3-1 トレハロース含有リポソームのがん細胞に対する増殖抑制効果

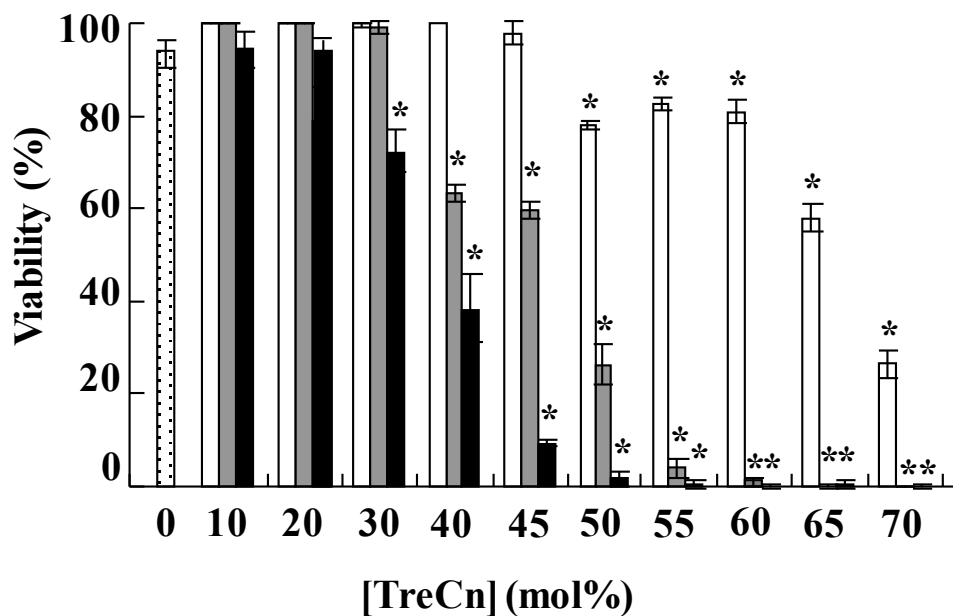
トレハロース含有リポソーム (DMTreCn (n=12, 14, 16)) の大腸がん細胞 (HCT-116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対する増殖抑制効果及び正常肺細胞 (WI-38 細胞) に与える影響について検討した。結果を Fig.3-14~3-15 に示す。

DMPC 単一リポソームは HCT-116 細胞及び MKN-45 細胞に対し、生存率に影響を与えなかった。DMTreC12 は HCT-116 細胞に対し、10~60mol%DMTreC12 において、ほとんど増殖抑制しなかったが、65~70mol%DMTreC12 は、40%~70% の抑制効果が得られた。MKN-45 細胞では、70mol%DMTreC12 においてのみ 30% の抑制効果を示した。

DMTreCn (n=14, 16) は HCT-116 細胞及び MKN-45 細胞いずれの場合もトレハロース濃度依存的にがん細胞に対する生存率が減少した。特に、TreCn 55mol% 以上では、90% 以上の顕著な抑制効果を示した。30~50mol%TreCn では、抑制効果は DMTreC14 < DMTreC16 であった。また、DMPC 及び DMTreCn (n=14, 16) は正常細胞に影響を与えないことが明らかとなった。

以上のことから、DMTreCn (n=14, 16) はがん細胞に対し特異的に増殖抑制することが今回初めて明らかとなった。

(A)



(B)

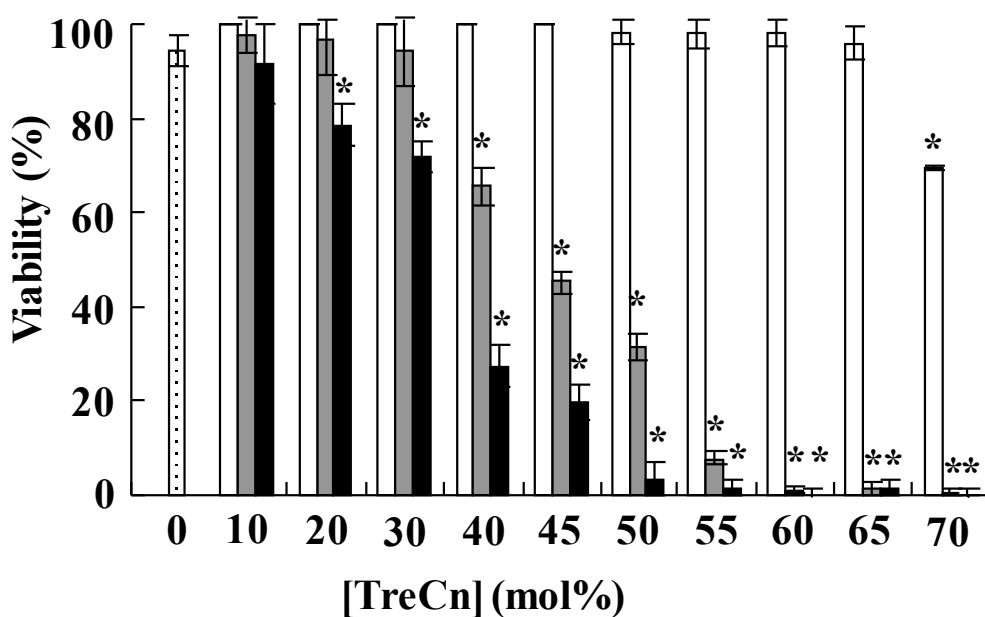


Fig.3-14 DMTreCn (n=12, 14, 16) inhibited the growth of HCT-116 (A) and MKN-45 (B) cancer cells. Data represent the mean (n=3~6) \pm S.D.

* Student's *t* test : compared with DMPC ($p < 0.05$)

□ DMPC □ C12 □ C14 ■ C16

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=12, 14, 16)]= $0.1 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M

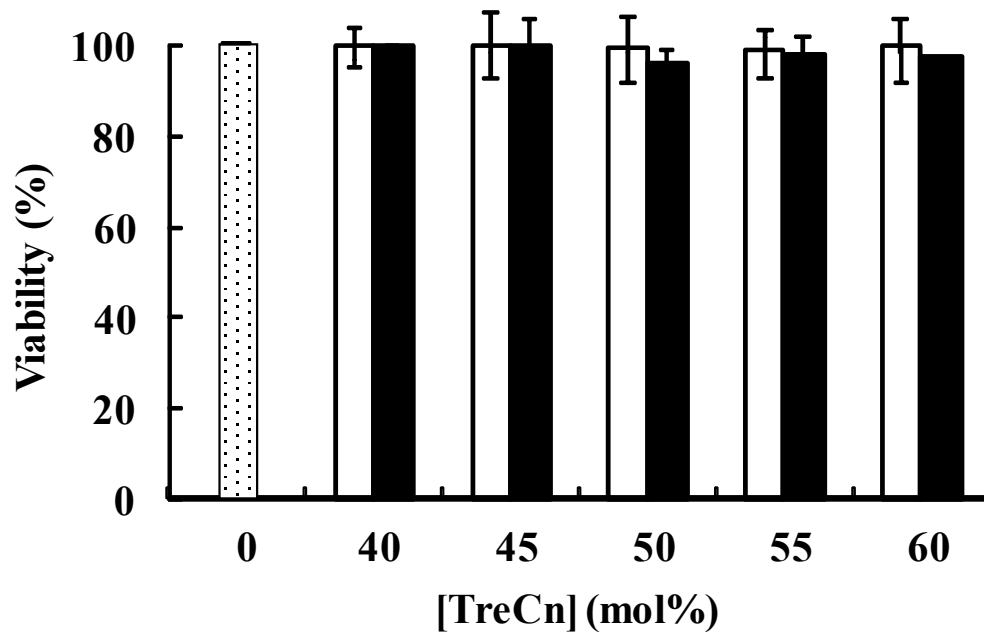


Fig.3-15 DMTreCn (n=14, 16) showed no toxicity for WI-38 normal cells.

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

□ **DMPC** □ **C14** ■ **C16**

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= $0.7 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M

3-3-2 蛍光脂質含有リポソームのがん細胞への融合・蓄積

大腸がん細胞 (HCT-116)、胃がん細胞 (MKN-45)、及び正常肺細胞 (WI-38) を用いて、トレハロース含有リポソームの細胞への融合・蓄積について検討するために、トレハロース/蛍光脂質含有リポソーム DMPC/70mol%TreCn/5mol% NBDPC (DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC) を調製した。

DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC の膜直径 (d_{hy}) は動的光散乱法により測定した。結果を Fig.3-16 と Table. 3-2 に示す。DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC の膜直径は 4°C において 100nm 付近で約一ヶ月間安定な膜を形成しており、細網内皮系 (RES) を回避可能な 100nm 付近で、長期間にわたって安定であることが今回初めて明らかとなった。一方、DMPC/NBDPC の膜直径は 100~200nm で不安定であり、1 週間後沈殿が見られた。

以上の結果から、DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は RES を回避可能な長期間安定な膜を形成することが明らかとなり、臨床応用に適していることが示された。

次に、共焦点レーザー顕微鏡により DMTreCn/NBDPC の細胞への融合・蓄積の観察を行った。画像を Fig.3-17~3-19 に示す。DMPC/NBDPC は HCT-116 細胞及び MKN-45 細胞に対しては、蛍光蓄積が見られなかった。DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は各がん細胞に対し経時的な緑色の蛍光蓄積の増大が観察された。また、DMTreC14 と比べ、DMTreC16 は早く蛍光蓄積され、細胞膜表面だけではなく、細胞内への蓄積も観察された。それは、炭素鎖の違うトレハロース界面活性剤である DMTreC14 より DMTreC16 は細胞へ融合・蓄積しやすいことと関与していると考えられる。一方、正常肺細胞である WI-38 細胞には蛍光蓄積は観察されなかった。DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC はがん細胞のみに高い選択性を示し、特異的に融合・蓄積していることが考えられる。

以上のことから、DMPC より DMTreCn (n=14, 16) の膜流動性が高いことから、特異的にがん細胞膜へ融合・蓄積しやすいことが考えられる。また、DMTreC14 より DMTreC16 はがん細胞へ融合・蓄積しやすいことが今回初めて明らかとなった。

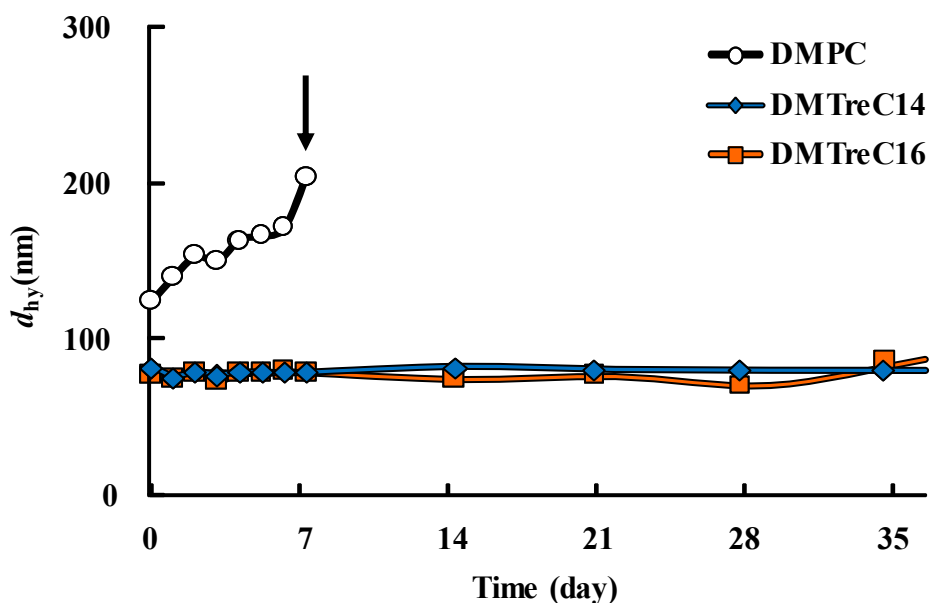


Fig.3-16 Time course of d_{hy} change for DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC at 4°C.

↓ : Precipitation

Table. 3-2 Time course of d_{hy} change for DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC at 4°C.

| Time(day) | Sample | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| d_{hy} (nm) | DMPC | 125.0 | 140.9 | 154.4 | 151.3 | 167.1 | 172.5 |
| | DMTreC14 | 83.1 | 76.6 | 79.3 | 77.7 | 79.0 | 79.0 |
| | DMTreC16 | 77.7 | 76.5 | 78.4 | 73.7 | 79.1 | 78.4 |
| <hr/> | | | | | | | |
| Time(day) | Sample | 6 | 7 | 14 | 21 | 28 | 35 |
| d_{hy} (nm) | DMPC | 205.1 | | | | | |
| | DMTreC14 | 78.4 | 78.8 | 82.5 | 80.6 | 80.1 | 80.0 |
| | DMTreC16 | 80.4 | 79.5 | 75.1 | 77.0 | 71.3 | 88.1 |

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [NBDPC]= 5.0×10^{-6} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

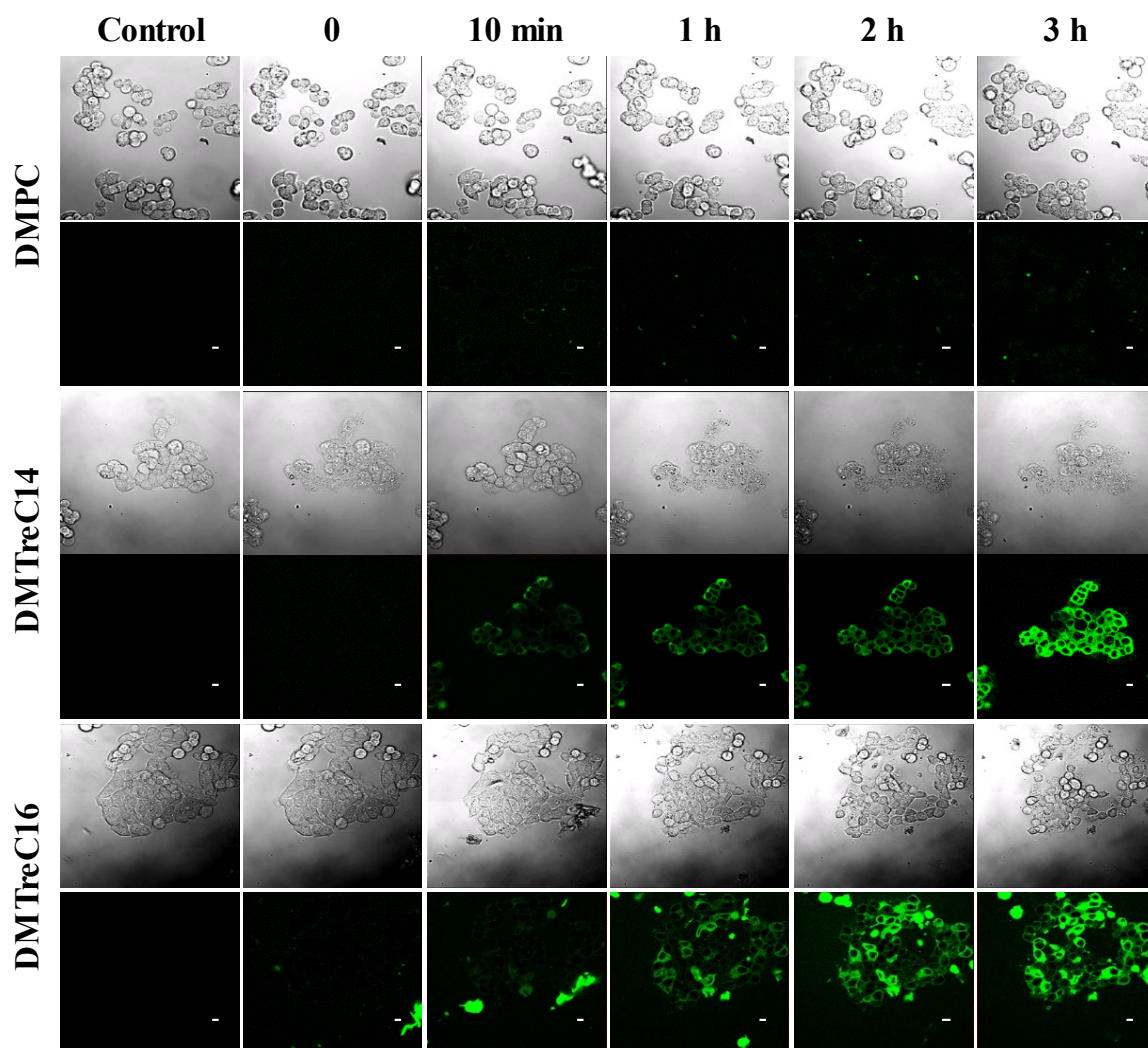


Fig.3-17 Fluorescence micrographs of HCT-116 cancer cell treated with DMPC and DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC using confocal laser microscope at 37°C.
 Scale bar : 10 μ m, Magnification : \times 40
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [NBDPC]= 5.0×10^{-6} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

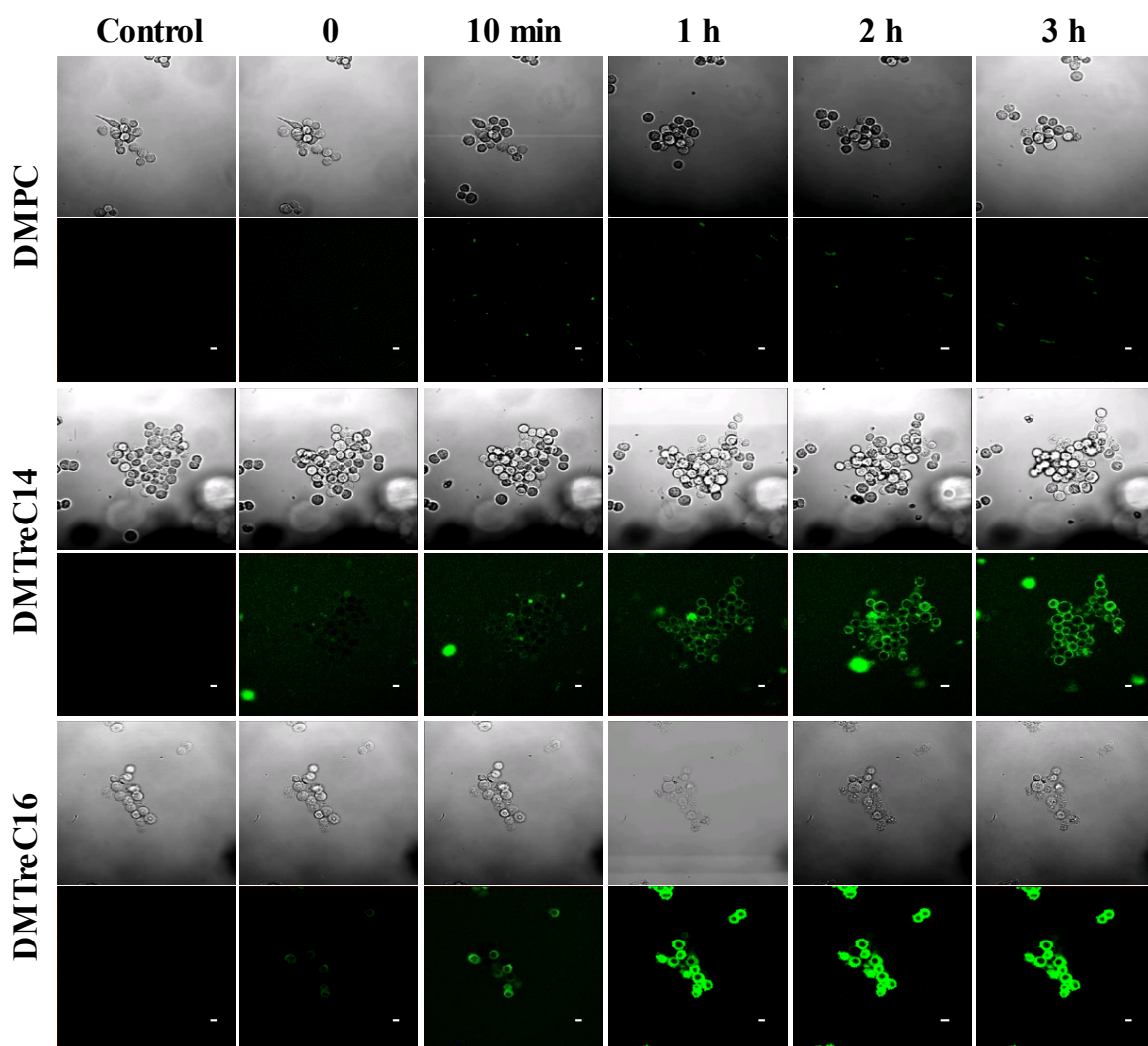


Fig.3-18 Fluorescence micrographs of MKN-45 cancer cell treated with DMPC and DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC using confocal laser microscope at 37°C.
Scale bar : 10 μ m, Magnification : \times 40
[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [NBDPC]= 5.0×10^{-6} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

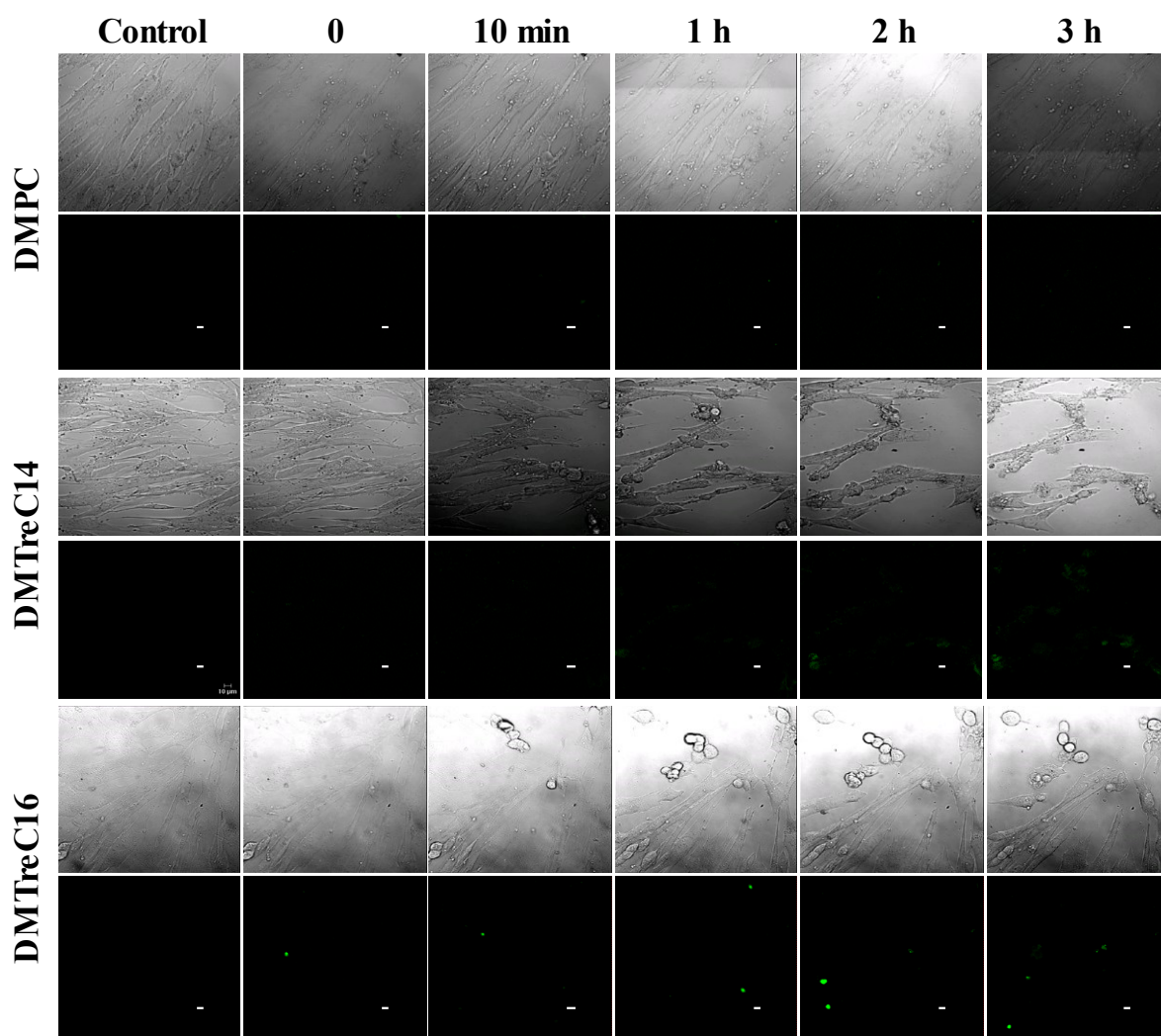


Fig.3-19 Fluorescence micrographs of WI-38 normal cell treated with DMPC and DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC using confocal laser microscope at 37°C.
Scale bar : 10µm, Magnification : ×40
[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [NBDPC]= 5.0×10^{-6} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

3-3-3 トレハロース含有リポソームのがん細胞に対するアポトーシス誘導

DMTreCn (n=12, 14, 16) の大腸がん細胞 (HCT-116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対するアポトーシス誘導について、PI 染色による DNA 断片化率の測定を行った。結果を Fig.3-20~3-21 に示す。DMTreC12 は各がん細胞に対し、DNA 断片化率の増大が見られなかったが、DMTreCn (n=14, 16) は HCT-116 細胞及び MKN-45 細胞いずれの場合もトレハロース濃度依存的に DNA 断片化率が増大した。特に、70mol%TreCn では、85% 以上の断片化率が得られた。

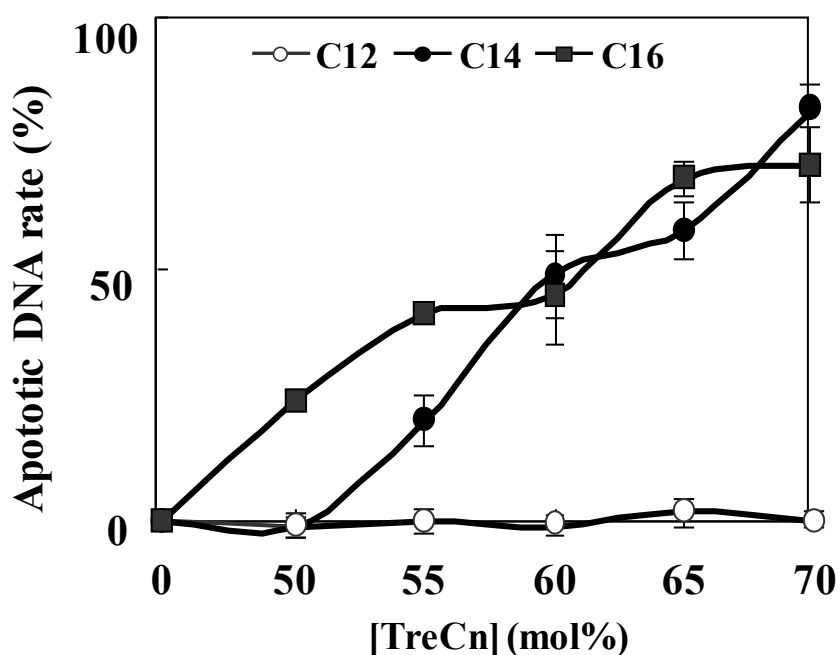


Fig.3-20 The effects of DMTreCn (n=12, 14, 16) for apoptotic DNA rate of HCT-116 cancer cells. Data represent the mean (n=3~4) \pm S.D. [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=12, 14, 16)]= $1.0 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M

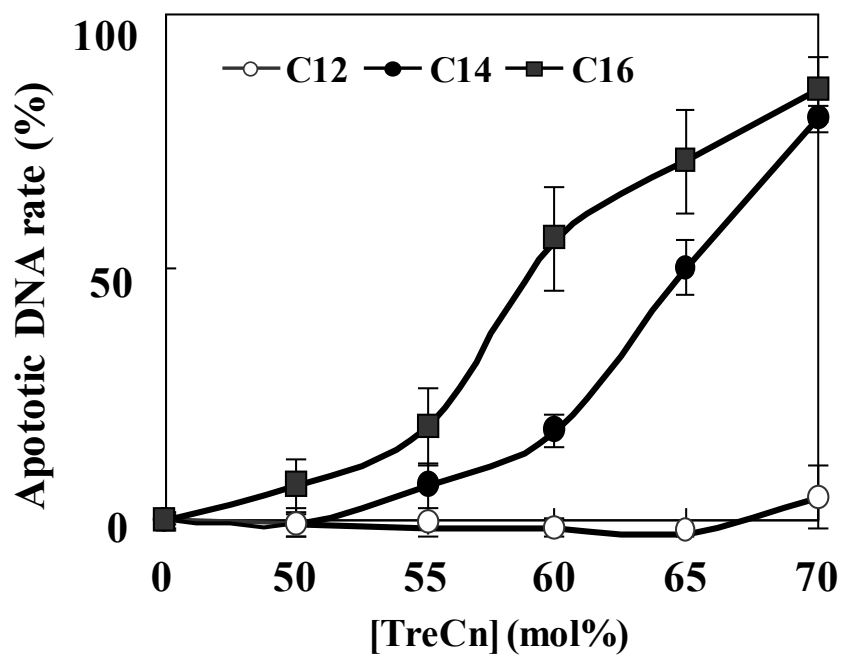


Fig.3-21 The effects of DMTreCn (n=12, 14, 16) for apoptotic DNA rate of HCT-116 cancer cells. Data represent the mean (n=3~4) \pm S.D. [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=12, 14, 16)]= $1.0 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M

TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察を行った。結果を Fig.3-22 に示す。各サンプル処理 48 時間後において、DMPC 単一リポソームでは TUNEL 陽性を示す緑色蛍光が全く見られなかった。一方、DMTreCn (n=14, 16) で処理した各がん細胞において、TO-PRO-3 により赤色に染色された核に、TUNEL 陽性を示す緑色蛍光が観察され、DNA の断片化が認められた。

以上の結果より、DMTreCn (n=14, 16) は大腸がん細胞 (HCT-116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対しアポトーシスを誘導することが今回初めて明らかとなった。

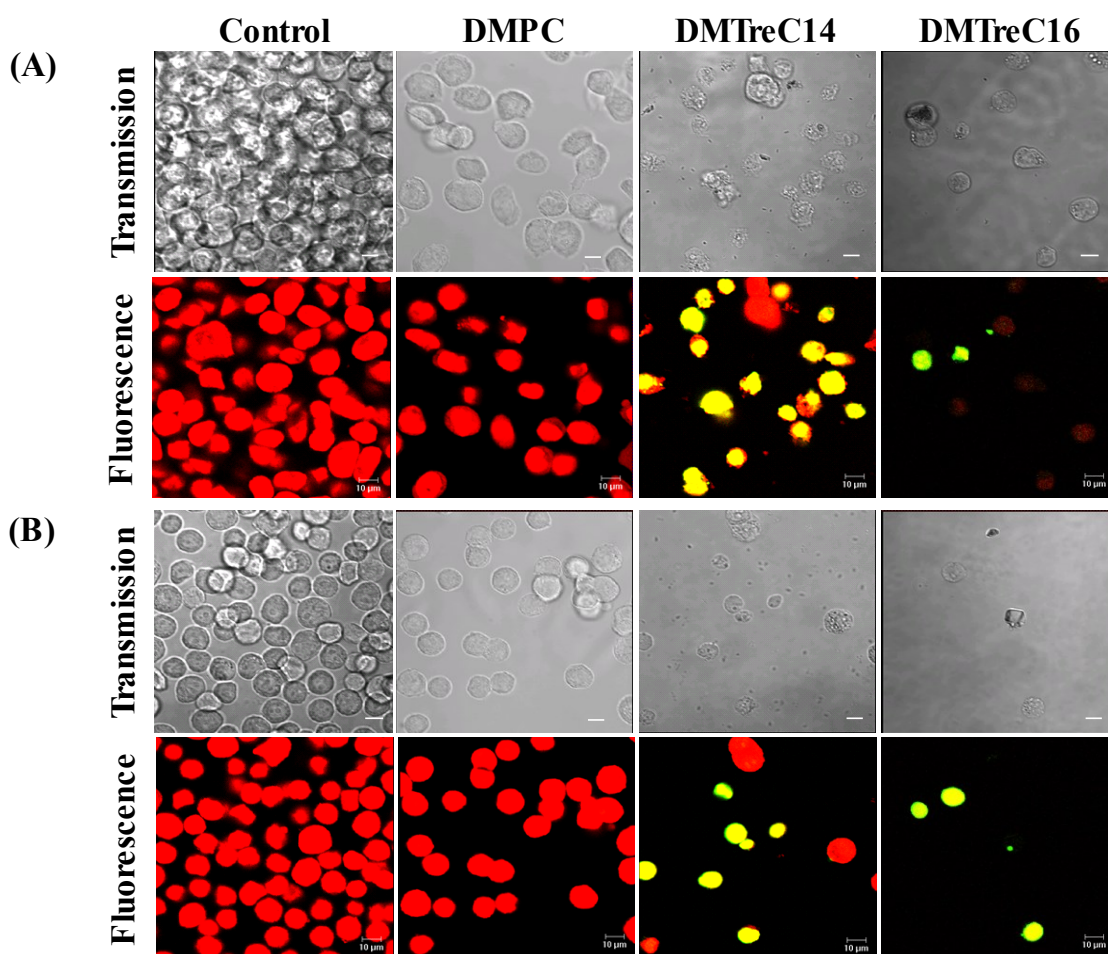


Fig.3-22 Fluorescence micrographs of cancer cells (HCT-116 (A) and MKN-45 (B)) after the treatment with DMPC and DMTreCn (n=14, 16) using TUNEL assay for 48h.

Scale bar : 10 μ m, Magnification : \times 80

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 1.5×10^{-4} M

3-3-4 アポトーシス誘導における細胞内カスパー-3, 8, 9 の活性化

DMTreCn (n=14, 16) 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 活性をフローサイトメーターにて検討した。結果を Fig.3-23~3-25 に示す。Fig.3-18~3-20 から、Control と比べ DMTreCn (n=14, 16) で処理した場合のピークは右側にシフトし、カスパー-3, 8, 9 は活性化していることが明らかとなった。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果から、Control ではカスパー-3, 8, 9 を示す緑色蛍光が観察されず、DMTreCn (n=14, 16) で処理した細胞において、PhiphiLux 及び CaspaLux の緑色蛍光が観察された。

以上の結果から、DMTreCn (n=14, 16) の大腸がん細胞 (HCT-116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対するアポトーシス誘導にカスパー-3, 8, 9 が関与していることが明らかとなった。

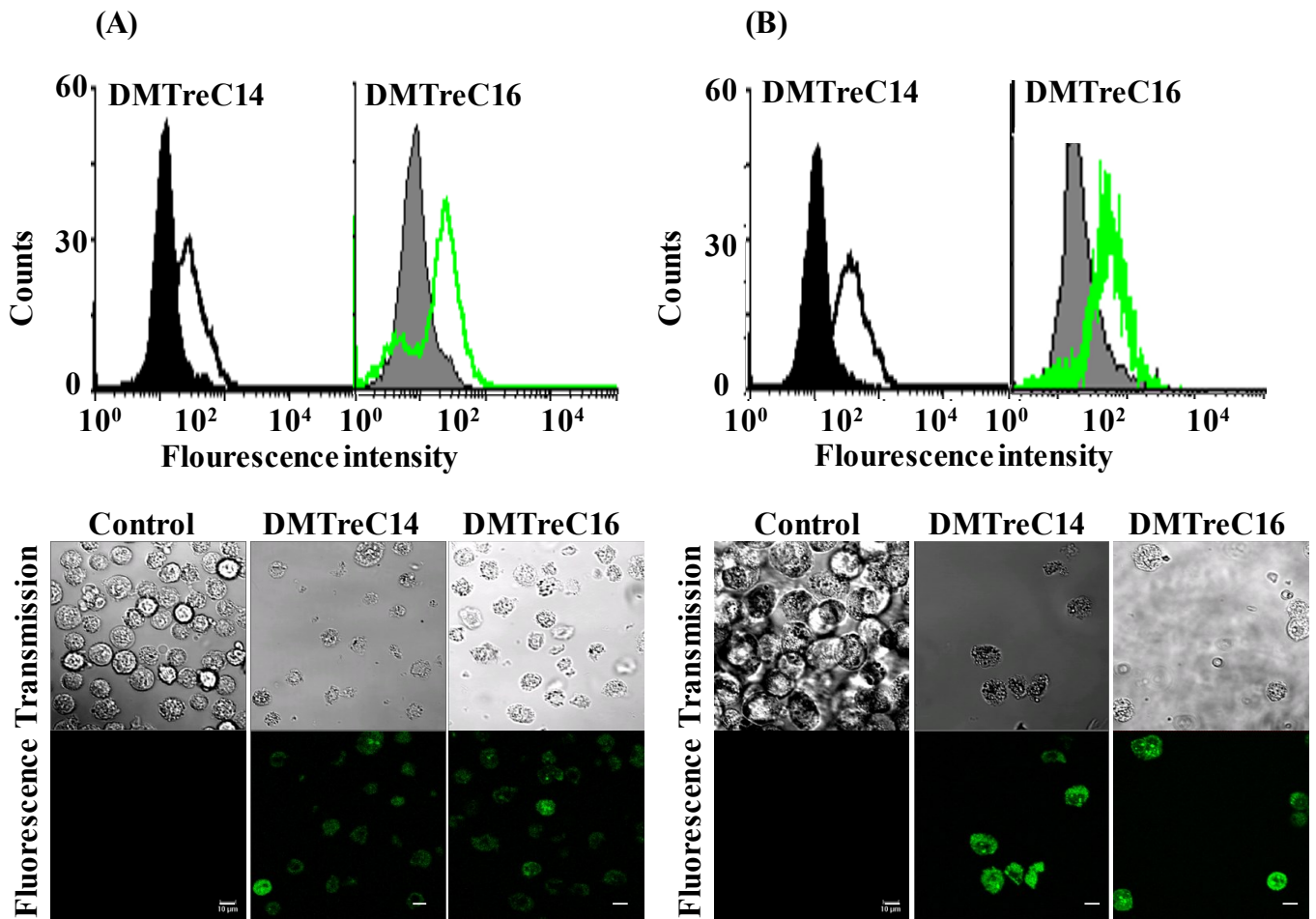


Fig.3-23 Activation of caspase-3 in apoptotic cancer cells (HCT-116 (A) and MKN-45 (B)) after the treatment with DMTreCn (n=14, 16) for 48h.

Control

DMTreC14

DMTreC16
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

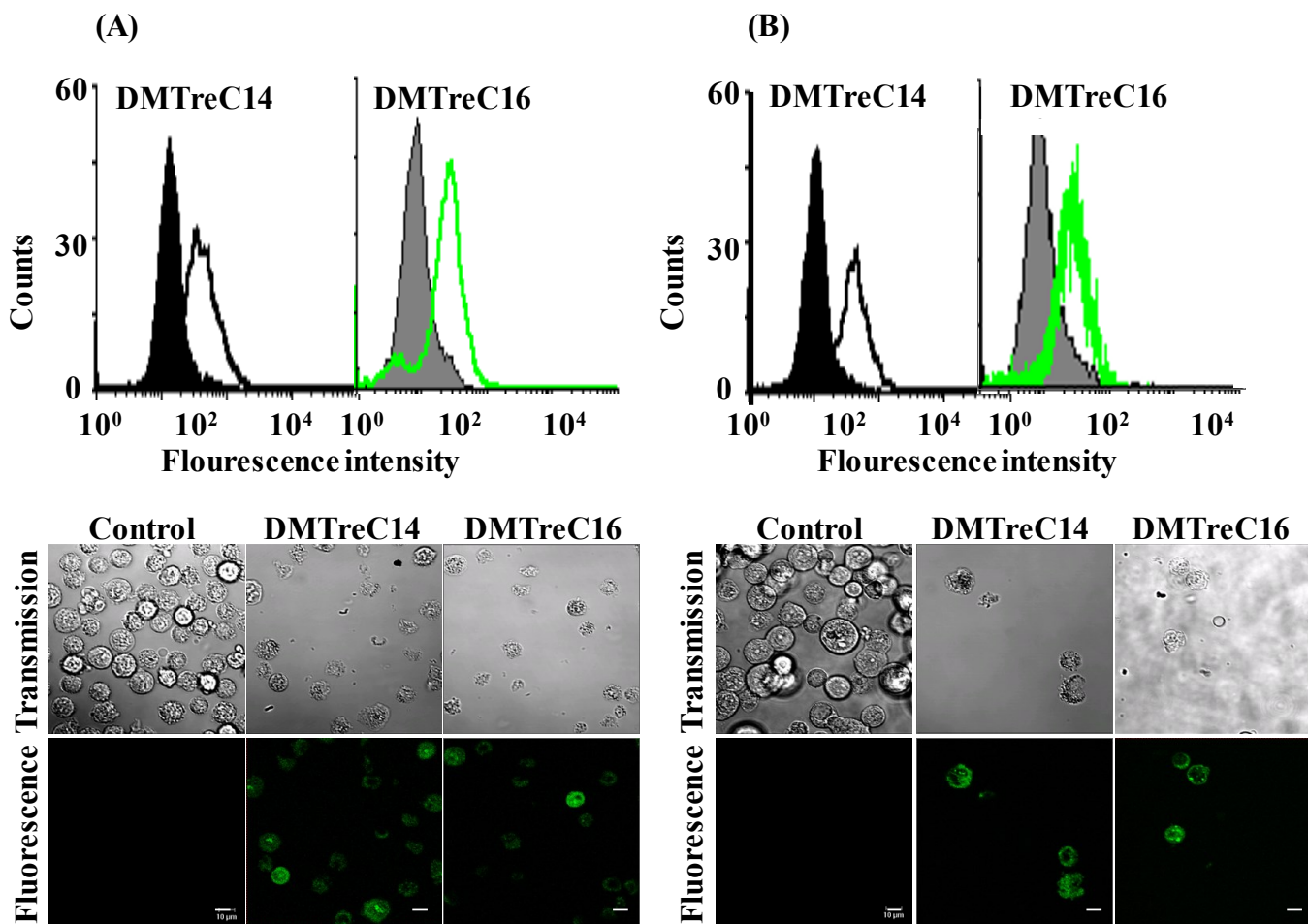


Fig.3-24 Activation of caspase-8 in apoptotic cancer cells (HCT-116 (A) and MKN-45 (B)) after the treatment with DMTreCn (n=14, 16) for 48h.

■ Control □ DMTreC14 □ DMTreC16

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

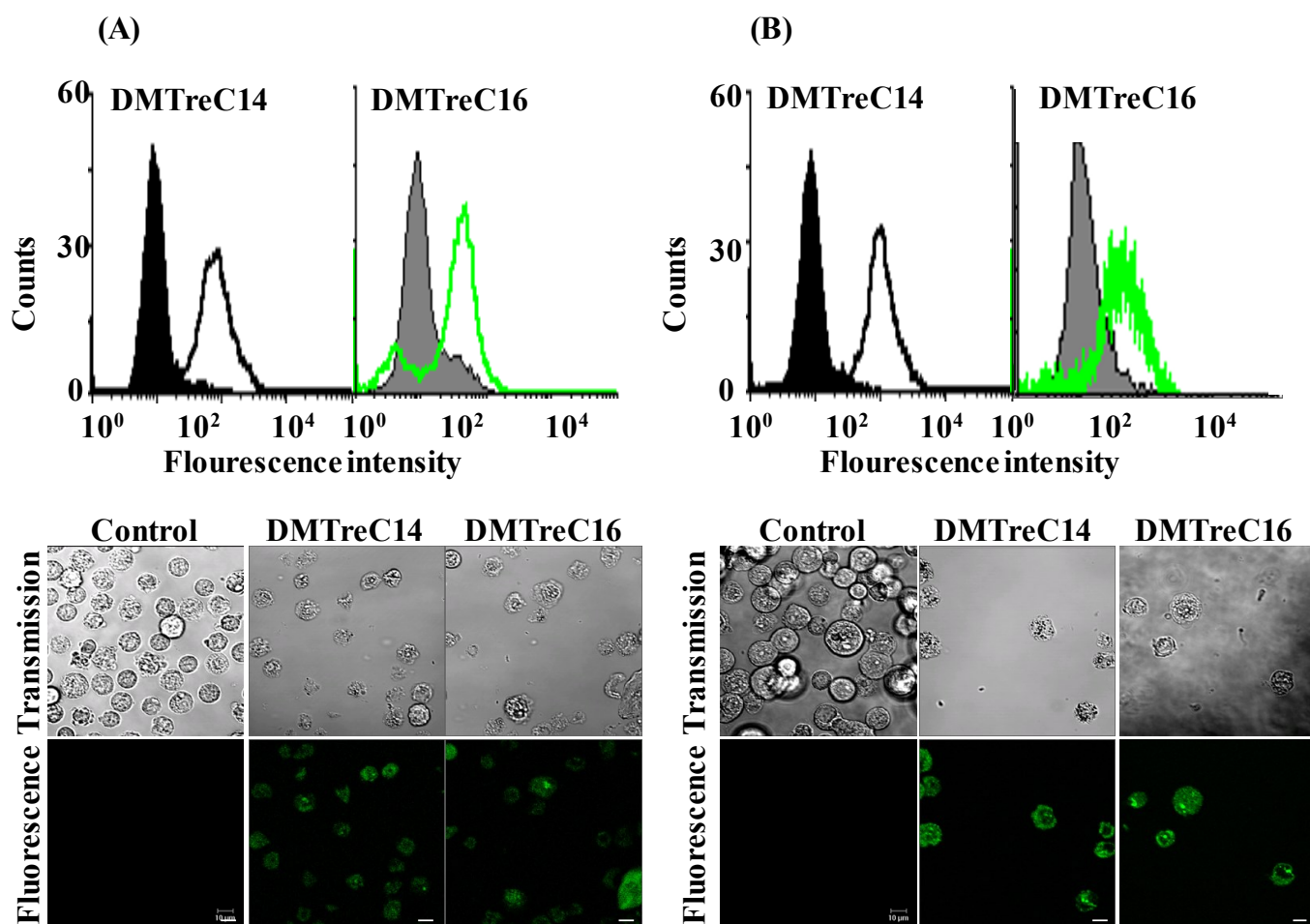


Fig.3-25 Activation of caspase-9 in apoptotic cancer cells (HCT-116 (A) and MKN-45 (B)) after the treatment with DMTreCn (n=14, 16) for 48h.

Control

DMTreC14

DMTreC16
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

3-3-5 アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与

DMTreCn (n=14, 16) のがん細胞におけるアポトーシス誘導メカニズムを検討するために、DiOC₆(3) によるミトコンドリア膜電位をフローサイトメーターにて測定した。結果を Fig.3-26 に示す。HCT-116 細胞においては、Fig.3-21(A) から明らかなように、Control と比べ DMTreC14 で処理した細胞では、ミトコンドリア膜電位の低下が見られなかったが、DMTreC16 で処理した細胞では、ピークが右側にシフトしており、ミトコンドリア膜電位の上昇が示された。MKN-45 細胞においては、Fig.3-21(B) から明らかなように、DMTreCn (n=14, 16) 処理した細胞では、ミトコンドリア膜電位の低下が見られなかった。

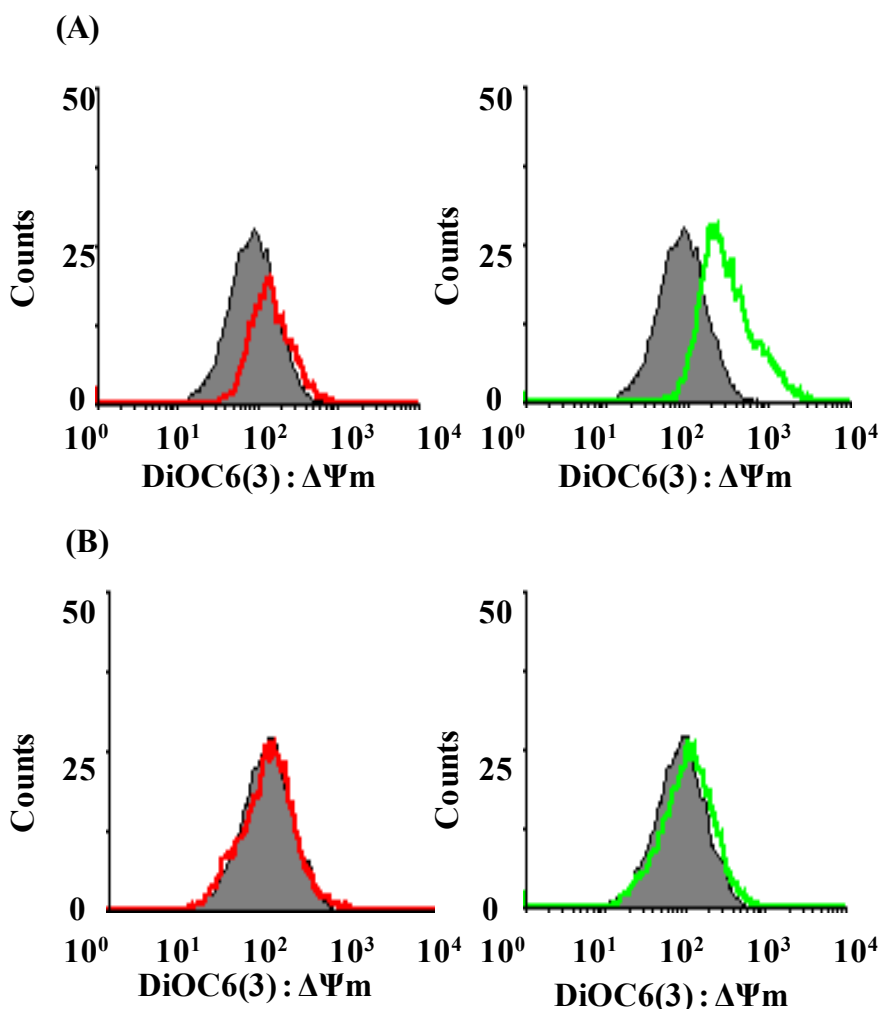


Fig.3-26 $\Delta\Psi_m$ disruption of mitochondria membrane for cancer cells (HCT-116 (A) and MKN-45 (B)) treated with DMTreCn (n=14, 16) for 48h.

■ Control □ DMTreC14 □ DMTreC16
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

次に、ミトコンドリアからのシトクロム c 放出をフローサイトメーターにて観察した。結果を Fig.3-27 に示す。Control と比べ DMTreCn (n=14, 16) で処理した場合はピークが左側にシフトし、ミトコンドリアからシトクロム c を放出していることが明らかとなった。

この結果から、DMTreCn (n=14, 16) の大腸がん細胞 (HCT-116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対するアポトーシス誘導におけるシグナル伝達は、ミトコンドリアを経由していることが示唆された。

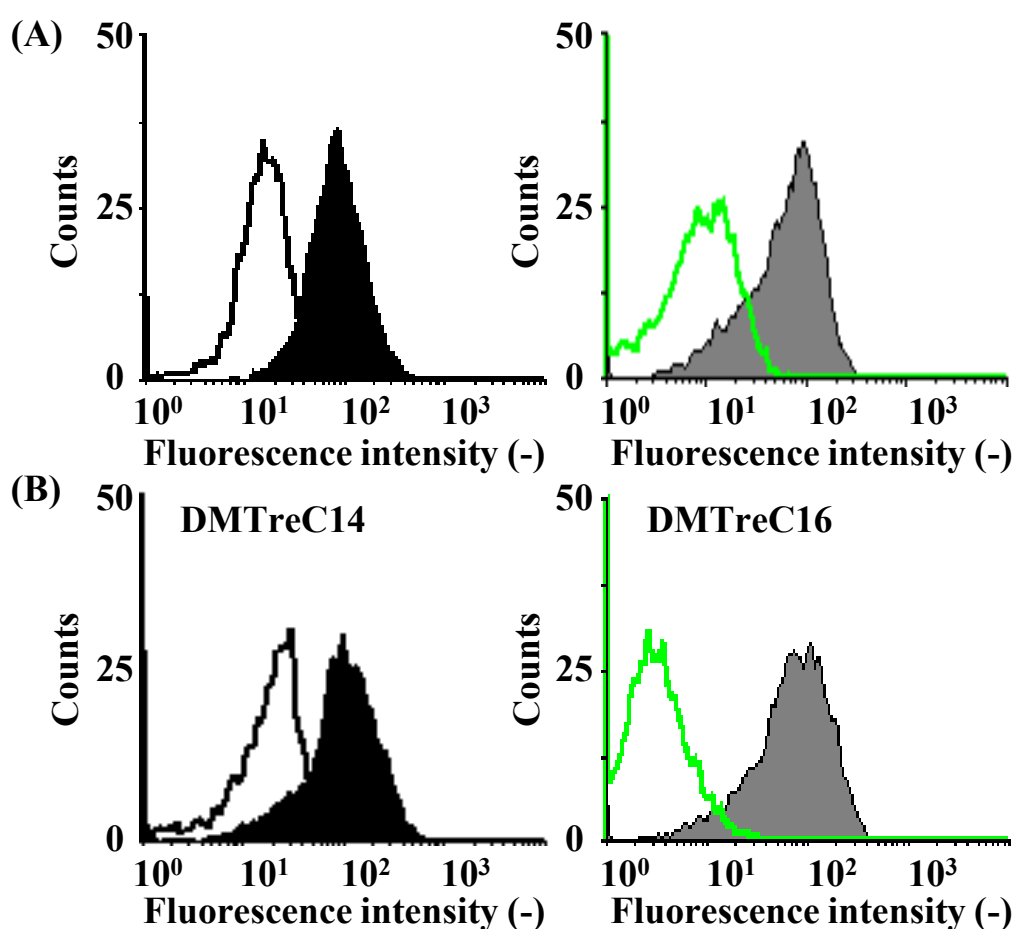


Fig.3-27 Cytochrome c release from mitochondria of cancer cells (HCT-116 (A) and MKN-45 (B)) treated with DMTreCn (n=14, 16) for 48h.

■ Control □ DMTreC14 □ DMTreC16
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

DMTreCn (n=14, 16) のアポトーシス誘導メカニズムについて、ミトコンドリアからシトクロム c の放出が確認されたが、ミトコンドリア膜電位の低下が見られなかった。そのため、ミトコンドリアからシトクロム c の放出を促進するプロアポトーシスタンパク質である Bax の活性をフローサイトメーターにて観察した。結果を Fig.3-28~3-29 に示す。Control と比べ DMTreCn (n=14, 16) で処理した各がん細胞では、Bax を示す緑色が観察され、Bax が活性化していることが明らかとなった。

以上のことから、DMTreCn (n=14, 16) の大腸がん細胞 (HCT-116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対するアポトーシス誘導において、Bax の活性化によりシトクロム c が放出していると考えられる。

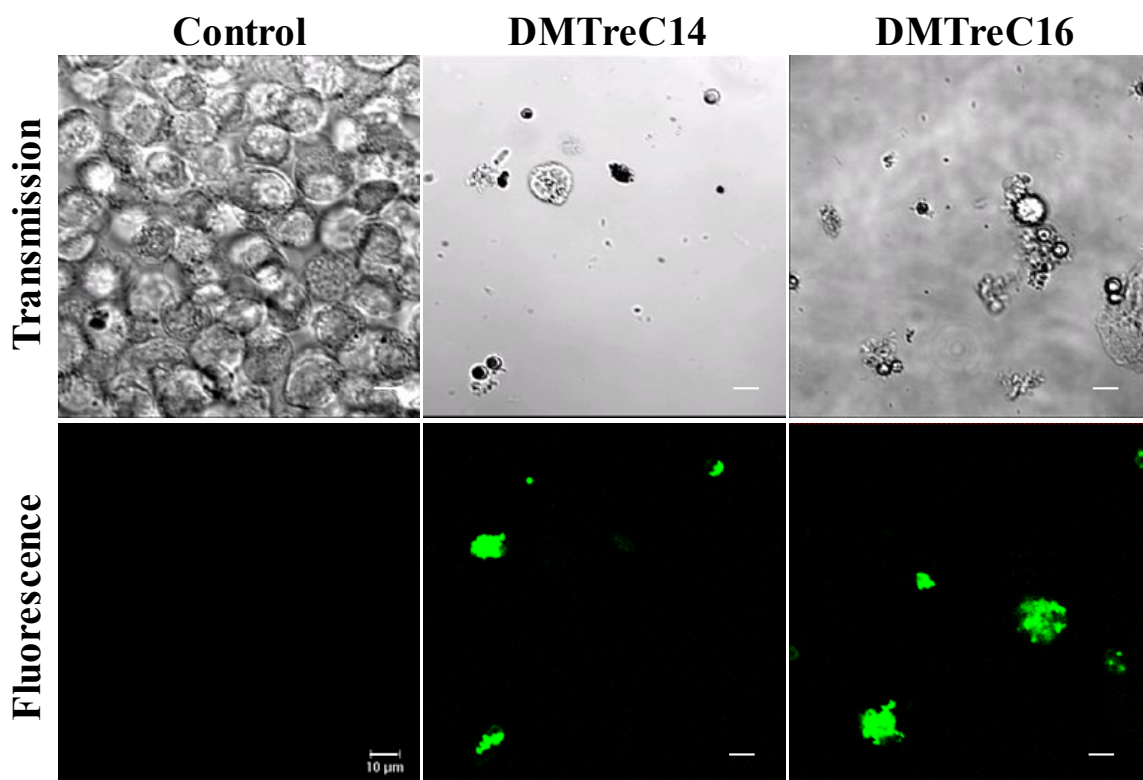


Fig.3-28 Activation of Bax in apoptotic HCT-116 cancer cells after the treatment of DMTreCn (n=14, 16) for 24h. Scale bar : 10 μ m, Magnification : $\times 80$
[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

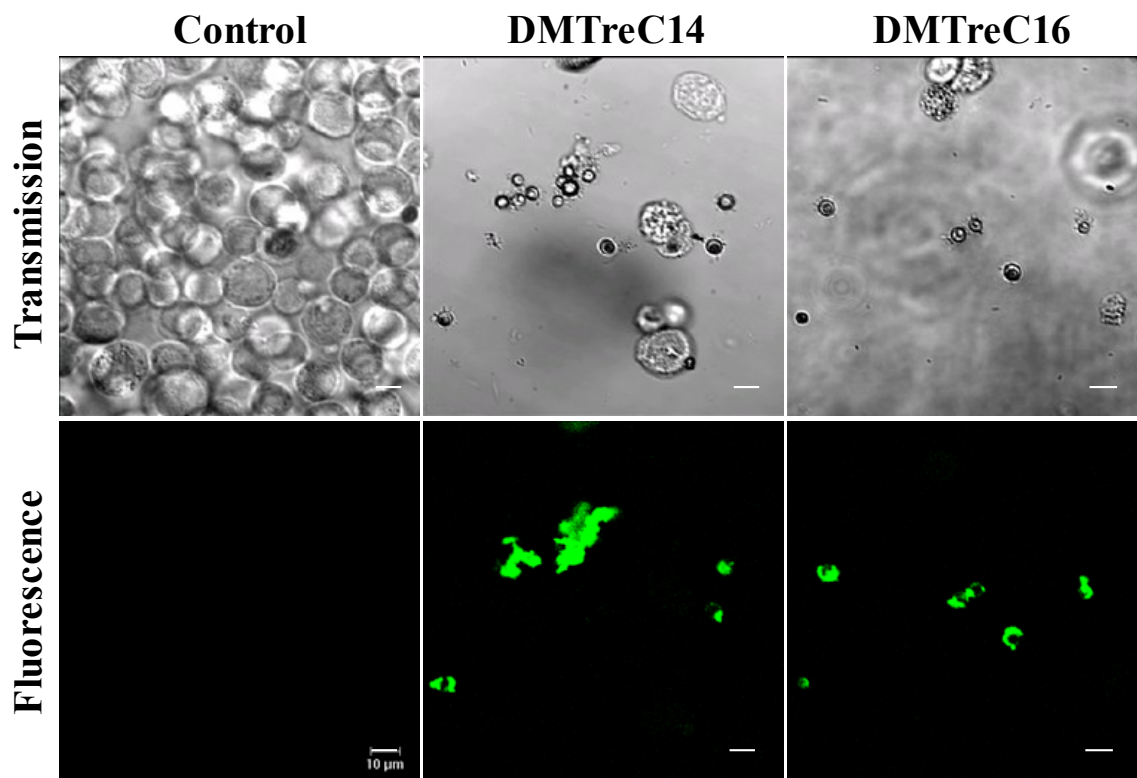


Fig.3-29 Activation of Bax in apoptotic MKN-45 cancer cells after the treatment of DMTreCn (n=14, 16) for 24h. Scale bar : 10 μ m, Magnification : \times 80
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

3-3-6 アポトーシス誘導における RKIP の活性化

DMTreC16 のがん細胞におけるアポトーシス誘導メカニズムを検討するために、蛍光標識抗体染色による RKIP 活性をフローサイトメーターにて測定した。結果を Fig.3-30 に示す。Control と比べ DMPC 処理細胞では、RKIP 活性の増大が見られず、DMTreC16 で処理した細胞では、ピークが右側にシフトし、RKIP が活性化されていることが明らかとなった。

この結果から、DMTreC16 の大腸がん細胞 (HCT-116) 及び胃がん細胞 (MKN-45) に対するアポトーシス誘導に RKIP の活性が関与していると考えられる。

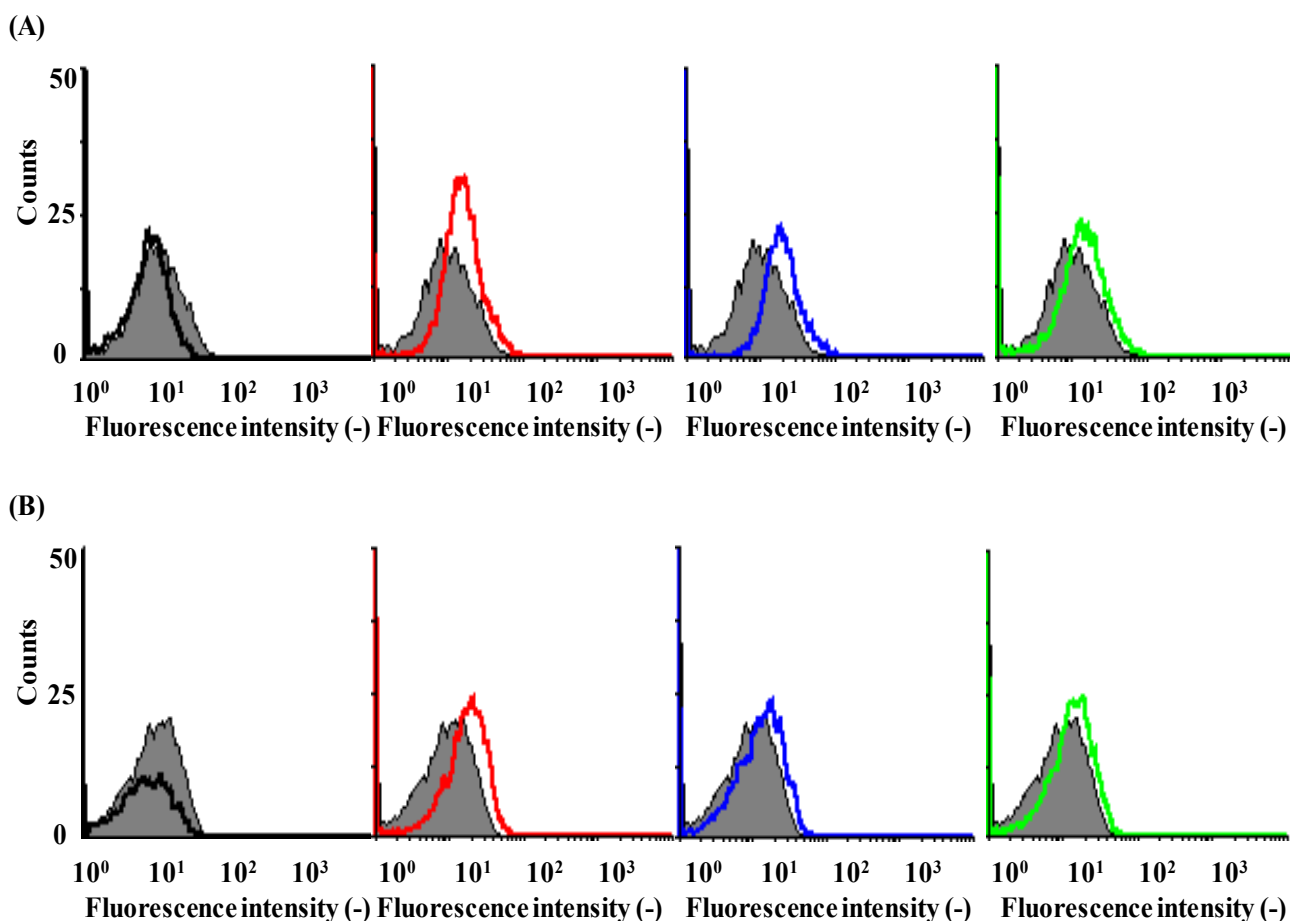


Fig.3-30 Activation of RKIP in apoptotic HCT-116 (A) and MKN-45 (B)

cancer cells after the treatment of DMTreC16 for 24h.

■ Control □ DMPC ■ 50mol% ■ 60mol% ■ 70mol%

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreC16]= $1.0 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M

3-4 総括

本章では、リン脂質 (DMPC) とトレハロース界面活性剤 (TreCn (n=12, 14, 16)) から成るトレハロース含有リポソーム (DMTreCn (n=12, 14, 16)) のヒト大腸がん (HCT-116) 細胞、ヒト胃がん (MKN-45) 細胞に対する増殖抑制効果について検討した。次に、DMTreCn のヒト大腸がん及び胃がん細胞に対するアポトーシス誘導及びアポトーシスシグナル伝達について検討した。その結果、以下のような興味深い知見が得られた。

- 1 DMTreCn (n=12, 14, 16) のがん細胞増殖抑制効果の結果より、DMPC 単一リポソームは HCT-116 細胞及び MKN-45 細胞に対し、生存率に影響を与えなかった。DMTreC12 は HCT-116 細胞に対し、10~60mol%DMTreC12 において、ほとんど増殖抑制しなかったが、65~70mol%DMTreC12 は、40%~70% の抑制効果が得られた。MKN-45 細胞では、70mol%DMTreC12 においてのみ 30% の抑制効果を示した。DMTreCn (n=14, 16) は HCT-116 細胞及び MKN-45 細胞いずれの場合もトレハロース濃度依存的にがん細胞に対する生存率が減少した。特に、55mol%TreCn 以上では、90% 以上の顕著な抑制効果を示した。30~50mol%TreCn では、抑制効果は DMTreC14 < DMTreC16 であった。また、DMTreCn (n=14, 16) は正常細胞に影響を与えないことが確認出来た。
- 2 リン脂質 (DMPC) とトレハロース界面活性剤 (TreCn (n=14, 16)) に蛍光脂質 (NBDPC) を加えて調製した蛍光脂質含有リポソーム (DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC) の膜直径は細網内皮系 (RES) を回避できる 100nm 以下であり、4°C において1ヶ月以上安定した膜を形成することが今回初めて明らかとなった。
- 3 蛍光脂質含有リポソーム (DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC) を用いてがん細胞 (HCT-116, MKN-45) 及び正常肺細胞 (WI-38) への融合・蓄積を検討したところ、DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は、正常肺細胞へ融合・蓄積せず、がん細胞膜及び細胞内に、特異的に経時的に蓄積することを初めて明らかにした。また、DMTreC14 より DMTreC16 の方ががん細胞膜へ融合・蓄積しやすいことが示された。
- 4 DNA 断片化率の測定及び TUNEL assay の結果より、DMTreC12 はがん細胞に対して DNA 断片化率の増大が見られなかった。DMTreCn (n=14, 16) はト

レハロース濃度依存的に DNA 断片化率の増大が見られ、各がん細胞に対してアポトーシスを誘導することが今回初めて明確になった。

- 5 カスパーズ-3, 8, 9 活性の測定結果より、DMTreCn (n=14, 16) のがん細胞におけるアポトーシス誘導にカスパーズ-3, 8, 9 が関与することを明らかにした。
- 6 シトクロム c の放出、ミトコンドリア膜電位の測定及び Bax 活性の測定結果より、ミトコンドリア膜電位低下せずに、Bax の活性化によりミトコンドリアからシトクロム c が放出されることが初めて明らかとなった。
- 7 RKIP 活性の測定結果より、DMTreC16 のがん細胞に対するアポトーシス誘導に RKIP の活性が関与していることを初めて明らかにした。

以上の結果より、DMTreCn (n=14, 16) が正常細胞に影響を与えず、がん細胞 (HCT-116, MKN-45) に対して高い増殖抑制効果が明確となった。また、DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は、臨床応用に適している膜を形成し、正常肺細胞へ融合・蓄積せず、がん細胞膜及び細胞内に、特異的に経時的に蓄積することが初めて示された。さらに、DNA 断片化によりアポトーシスを誘導していることが確認出来た。アポトーシス誘導シグナル伝達については、カスパーズ-3, 8, 9、シトクロム c の放出、Bax 活性及び RKIP 活性の関与が初めて明らかとなった。

第4章 トレハロース含有リポソームの肝臓がん細胞に対する増殖抑制効果

4-1 序

日本では、年間約4万人が肝臓がん (Hepatocellular Carcinoma : HCC) と診断され、約3.1万人がHCCにより死亡しており、男性では肺がん・胃がんに次いでがん死の第3位を占め、女性では、第6位を占めている。10年前より、HCCの年間発症率は横ばいになりつつ、肝臓で死亡する人はわずかに減少傾向にあるが、2008年に、世界では70万人の死亡者を出しており、140万人死亡の肺がん、74万人死亡の胃がんが続いて3番目のがん死の原因となっている¹⁵⁶⁾。

HCCは他臓器のがんと異なり、基礎疾患として慢性の肝臓病、例えば慢性肝炎または肝硬変のあることが多く、長期に“肝細胞の破壊・再生を繰り返すこと”が肝臓がん発がんの大きな原因と推定されている。世界中のHCCの約75%は、B型肝炎ウイルス (HBV) 及びC型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染による慢性肝炎や肝硬変が背景にあり、B型肝炎ウイルスの保菌者では、ウイルスそのものが発がんを起こしうると考えられている¹⁵⁷⁾。また、アルコール性肝障害 (Alcoholic Liver Disease)、非アルコール性脂肪性肝炎 (Non Alcoholic Steato-Hepatitis : NASH)、血色素沈着症 (Hemochromatosis)、アフラトキシンの暴露により肝細胞がんの発生も多く報告されている。

C型肝炎ウイルスの持続感染により引き起こされる肝臓の慢性炎症により、肝細胞の破壊と再生が繰り返されるうちに、肝臓内には線維が増加して硬くなっていき、最終的に肝硬変に至る。肝臓の線維化が進むにつれて、肝臓がんの発症リスクが高くなっていく。HCCの患者は、元々慢性肝炎や肝硬変等の疾患を持っている場合が多く、しかも肝臓は生命維持のための多くの機能を持っているため、安易に拡大切除はできない。HCCの診断は、AFPやPIVKA-II等の腫瘍マーカーと超音波、CT、MRI等の画像検査により、総合的に行われているが、診断がつかない場合は、肝臓の腫瘍部分に刺して行う組織検査 (経皮的針生検査) により診断される⁴⁾。HCCは、がんの大きさや個数、血管浸襲の有無により、I~IV期までの進行度 (Stage) に分類される。しかし、HCCの治療法の選択は、進行度と共に、残された肝臓の機能 (肝障害度) にも大きく影響される。

抗がん剤だけでなく、ほとんどの薬剤は肝臓で代謝されるため、肝臓の代謝能力以上の抗がん剤が肝臓に到達すると、肝臓もダメージを受け障害を引き起こすことになる。肝障害の症状としては、黄疸、食欲不振、吐き気、嘔吐、下痢、倦怠感、むくみ等が見られる。肝臓障害は組織が壊死を起こす場合と肝静

脈が血流障害を起こす場合、肝臓の組織が繊維化する場合等がある。肝障害はどのような抗がん剤でも起こるが、特に肝障害を起こしやすい薬剤として、エトポシド、メトトレキサート、L-アスパラキナーゼ等が挙げられる。肝臓の障害度は、腹水等の臨床所見や、血清アルブミン値等の血清生化学所見により A～C の三つに分類される(Table. 4-1)。がんの進行度や肝臓の障害度により治療目標は異なり、肝障害度 A, B では、0～Ⅲ 期は治療、Ⅳ 期は延命と症状緩和を目標とするが、肝障害度 C では、肝移植による機能回復を目指す (Fig.4-1)¹⁵⁸⁾。

Table. 4-1 肝細胞がんの障害度¹⁵⁸⁾。

| 項目 | A | B | C |
|------------------|--------|---------|---------|
| 腹水 | ない | 治療効果あり | 治療効果少ない |
| 血清ビリルビン値 (mg/dl) | 2.0 未満 | 2.0～3.0 | 3.0 超 |
| 血清アルブミン値 (g/dl) | 3.5 超 | 3.0～3.5 | 3.0 未満 |
| プロトロンビン活性値 (%) | 80 超 | 50～80 | 50 未満 |

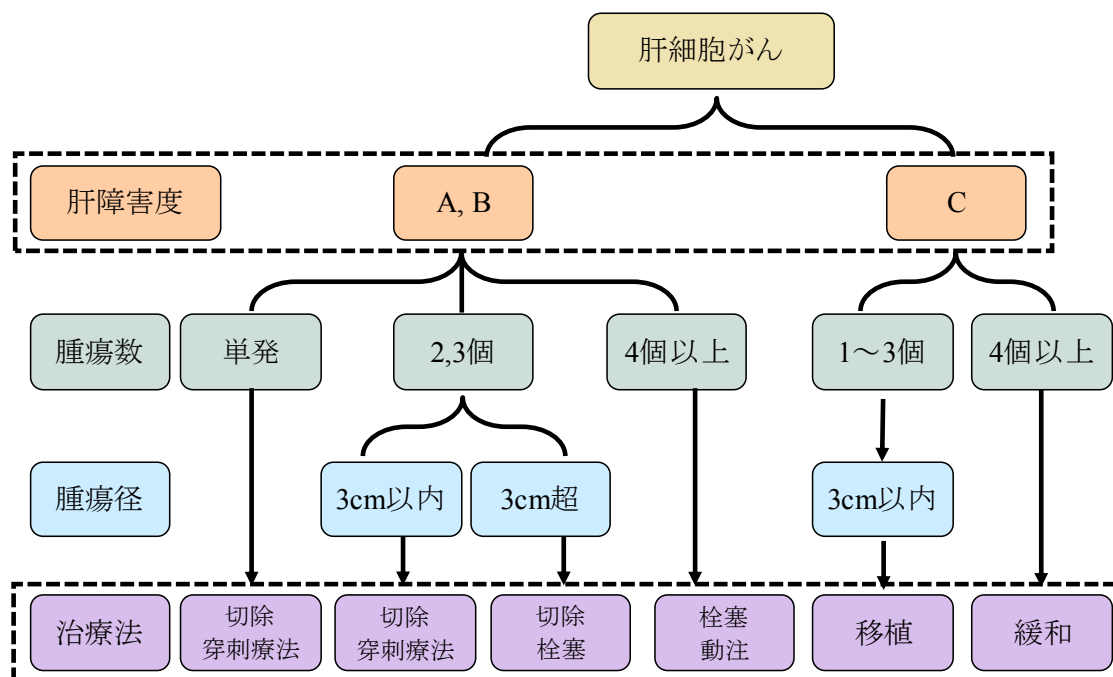


Fig.4-1 肝細胞がんのステージ別治療方法¹⁵⁸⁾。

肝細胞の増殖が早く、副作用の症状が現れても多くは一時的なもので、多くは薬剤投与を停止後 2 週間ほどで回復するが、中には致命的な障害が引き起こされる。抗がん剤で引き起こされる肝機能障害を根本から予防することはできず、対症療法が中心となるが、グリチルリチン製剤等の肝庇護剤が投与され、また抗炎症作用と免疫抑制作用のあるステロイド剤が投与される。しかし、抗がん剤はすべてのがんの有効ではなく、抗がん剤のがん細胞を死滅させる効果である薬剤感受性はがんの種類によって大きく異なり¹⁵⁹⁾、最も効果のあるものからほとんど効果が期待できないものまで、4 段階に分けることができる。HCC 細胞に対し、抗がん剤がほとんど効かないことが問題となっている (Table. 4-2)。

Table. 4-2 抗がん剤の薬剤感受性分類¹⁵⁹⁾。

| 薬剤感受性ランク | | 治癒・臨床効果 | がんの種類 |
|----------|-----------------|----------------------------------|------------------|
| A | 抗がん剤がよく効くがん | 治癒率25%~90% | 慢性・急性骨髄性白血病 |
| | | 一時的症状改善など臨床効果は80%以上 | 悪性リンパ腫 精巣腫瘍 |
| | | 延命，治癒共に期待できる | 子宮絨毛腫瘍 |
| | | | 小児がん |
| B | 抗がん剤が比較的良好に効くがん | 治癒率25%以下 | 小細胞肺癌 |
| | | 一時的症状改善など臨床効果は80%以上 | 乳がん |
| | | | 卵巣がん |
| | | 治癒はあまり期待できないが延命は期待できる。 | 膀胱がん |
| 骨肉腫 など | | | |
| C | 抗がん剤があまり効かないがん | 治癒はほとんど期待できないが，延命効果は無治療よりは期待できる。 | 胃がん |
| | | | 大腸がん |
| | | 臨床効果は40%程度 | 非小細胞肺癌 |
| | | | 子宮がん |
| | | | 食道がん 前立腺がん など |
| D | 抗がん剤がほとんど効かないがん | 治癒も延命効果もほとんど期待できない。 | 肝臓がん |
| | | | 膵臓がん |
| | | | 腎臓がん |
| | | | 胆嚢がん 甲状腺がん など |

糖鎖が炎症やがん化によって変化することは古くから知られてきた。その一部は腫瘍マーカーとして実用臨床に用いられている。中でも HCC の腫瘍マーカーとして知られる α フェトタンパク (AFP) のフコシル化は、HCC 診断において大変特異性が高い。また、肝炎ウイルスの感染に糖鎖・レクチンを介する経路が重要であることが明らかとなった。その後、ブタ脳及びヒト胃がん細胞からコアフコスの合成に関わる糖転移酵素 α 1-6 フコース転移酵素 (Fut8) の遺伝子クローニングに成功した^{160, 161)}。しかし、Fut8 遺伝子はヒト正常肝臓組織ではほとんど発現されていないものの、HCC のみならず周囲の肝硬変組織でも高発現されていた¹⁶²⁾。新しい HCC 腫瘍マーカーとしてプロテオグリカンの一つである グリピカン-3 が同定された¹⁶³⁾。グリピカン-3 は HCC 特異的に発現することが DNA アレイの検討でも報告されていた。ガレクチンは、細胞増殖や細胞周期停止、アポトーシス等に関わっており、がん細胞においては、大腸がん、乳がん、肝臓がん等に発現し¹⁶⁴⁻¹⁶⁶⁾、腫瘍形成や転移にも関与している。しかし、HCC の細胞膜に存在する グリピカン-3 が、なぜ血液中に分泌されるかの機構は不明である。近年、肝細胞をがん化させるがん遺伝子 (ZNFN3A19) が発見され、この遺伝子により細胞の異常増殖が起こると考えられている。最近、Dennis らは、細胞表面受容体に付加される糖鎖による受容体 turn over の制御機構を突き止めた。 β 1,6 GlcNAc 分枝型糖鎖のポリラクタミンがガレクチン-3 と結合することによって、EGF、PDGF、IGF、TGF- β 1 等の受容体のエンドサイトーシス (Endocytosis) が抑制され、細胞表面にリテンション時間が長くなるため、がん細胞増殖・転移にポジティブに働くと考えられた¹⁶⁷⁾。インテグリン β 1 に Sialy-Tn を発現すると、細胞形態だけではなく、細胞増殖・転移が著しく抑制される¹⁶⁸⁾。

細胞の増殖に深く関わっている JAK/STAT 経路、PI3K/Akt 経路及び Ras/ERKS 経路の関連タンパク質の発現または活性化は、多数の HCC において増強されることが報告され、アポトーシスの刺激に耐性を与えることが明らかになっている^{169, 170)}。最近の実験により、炎症進行及び蔓延を促進するために、HCC に発生する上皮間葉転換は、細胞の生存に関連していることが示され¹⁷¹⁾、HCC 細胞において選択的に抗アポトーシスシグナルを阻害する治療戦略は、HCC を治療するための強力なツールを提供する可能性がある。

ヒト HCC 形成における前駆腫瘍形成性には、HCC 細胞の増殖と細胞死のバランスの調節不良が関わっている。アポトーシスの調節のアンバランスを誘導する HCC の分子レベルでの変化が報告されている (Fig.4-2)¹⁷²⁾。p53 の発現または活性化の変化は、HCC において頻繁にあり¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾、また、化学療法薬に対する耐性を与える。多くの HCC 細胞は、Fas リガンドや TNF 関連アポトーシス誘導リガンド受容体 (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand : TRAIL) 等の

デスレセプターリガンド、または TGF- β によってアポトーシスを誘導されない¹⁷⁶⁻¹⁷⁹)。HCC 細胞におけるいくつかのプロアポトーシス遺伝子の発現が減少するが、死と生存との間のバランスは、主に抗アポトーシス経路の過剰活性化によって調節不良となっている¹⁷⁹)。いくつかの抗アポトーシスに参与している分子である Bcl-xl、Mcl-1、c-IAP1、XIAP、Survivin は、HCC で過剰発現されている。また、細胞生存を仲介するいくつかの増殖因子 (TGF- β 、VEGF、IGF、c-Met) は、前駆体を切断して活性ペプチドにする分子と同様に、HCC においてアップレギュレートされている¹⁸⁰⁻¹⁸⁵)。

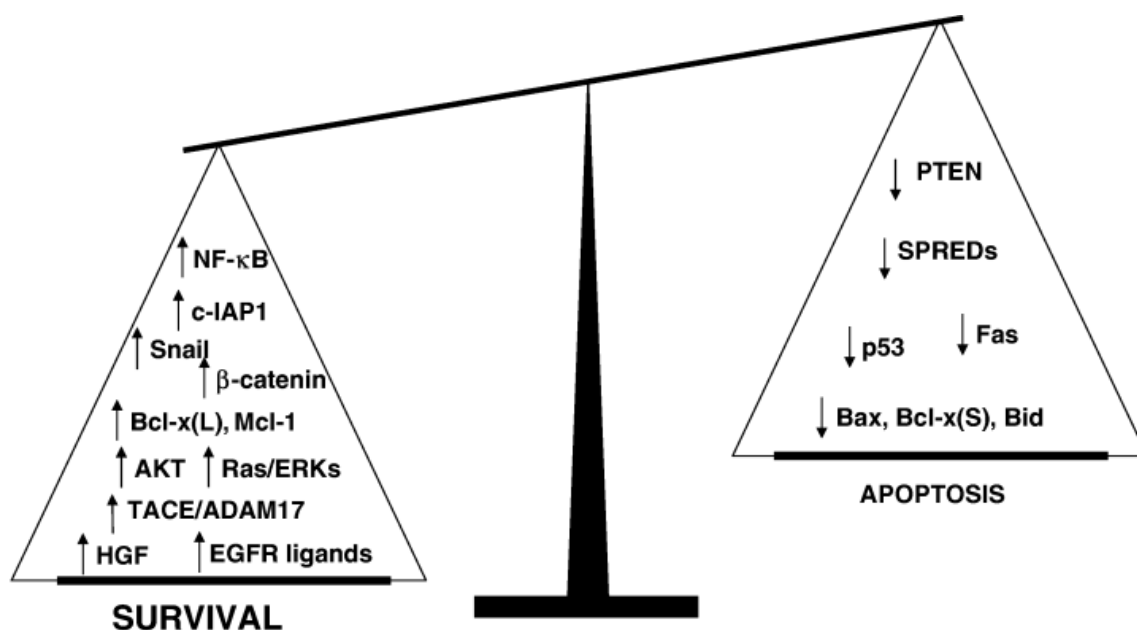


Fig.4-2 HCC 細胞における抗アポトーシスシグナルのバランス¹⁷⁹)。

肝臓がんの抗がん剤であるジノスタチンスチマラー (Zinosutain Stimalamer) は、がん細胞の DNA を切断することにより、DNA の合成を阻止し、がん細胞を殺傷する¹⁸⁶)。しかし、肝膿瘍等の肝機能障害や血圧低下や呼吸困難等を伴うアナフィラキシーショック、間質性肺炎、急性腎不全等の重篤な副作用がある。特に肝動注療法では、抗がん剤が肝臓以外の部位に流入してしまった場合に起こる副作用があり、消化管出血や胃・十二指腸潰瘍、脳梗塞、肺梗塞、肺塞栓等が報告されている¹⁸⁷)。

分子標的薬は、がん細胞に特異的に発現・機能する分子をターゲットとすることで有効性が得られると考えられている。増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、血管新生阻害剤、抗体医薬等が研究・開発されており、一部は臨床で使用されている。延命効果が臨床試験において証明されていたマルチキナーゼ阻害薬ソ

ラフェニブトシル酸塩 (イレッサ) は、HCC 治療の承認に向けて進んでいる。上皮増殖因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害剤エルロチニブは、カスパーゼのようなアポトーシス因子の過剰発現、並びに Bcl-xl のような抗アポトーシス因子のダウンレギュレーションにより、がん細胞の増殖を抑制する。チロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブ (スーテント) は、異なるがん細胞において強くアポトーシス誘導し、PI3-K/Akt/mTOR 経路の阻害剤の存在下で増強される効果がある。最近、抗血管内皮増殖因子 (VEGF) モノクローナル抗体であるベバシズマブは、非転移性 HCC の増殖阻害に有効であることが証明されている。しかし、全身化学療法剤であるため、肝障害も伴い、消化管出血、咯血等の出血、脳卒中、一過性脳虚血発作、心筋梗塞等の動脈血栓が起るような副作用や薬剤耐性が報告された例^{188,189)}もあり、分子標的薬にも多くの課題が残されている。

ハリブリッドリポソーム (HL)^{10,11)}は、それ自身が *in vitro* 及び *in vivo* において顕著な制がん効果を示し、種々のがん細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなっている。現在までに、HL は、ヒト肝臓がん細胞 (Hep-G2)¹⁴⁾、ヒト肺がん細胞 (RERF-LC-OK, A549)¹⁵⁾、ヒト乳がん細胞 (MDA-MB-453)¹⁷⁾、ヒト B リンパ腫細胞 (RAJI)、ヒト T リンパ腫細胞 (Molt-4)²²⁾、ヒト大腸がん細胞 (WiDr)²³⁾、コトンラット胃腫瘍由来腹水性がん細胞 (CoRa622G6)^{26,27)}等の多くの悪性腫瘍細胞に対して、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、糖系界面活性剤スクロース (SucC12)³⁷⁾、ラクトース (LacCn³⁸⁾、LacC10)^{39,40)}を第三成分として含有させた HL は、*in vitro* において高い制がん効果が確認されており、糖の水和及び糖の認識の関与が示唆されている。HL は、*in vivo* において担がんモデル動物を用いた治療実験から延命効果が得られている^{12,13)}。

本章では、トレハロース含有リポソームの肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対する制がん効果及び制がんメカニズムについて検討した。即ち、1) 酸素活性測定法 (WST-1 assay) を用いて、DMTreCn (n=14, 16) のがん細胞に対する増殖抑制効果を検討した。2) がん細胞に対する融合・蓄積の観察について検討した。3) フローサイトメーターによる DNA 断片率の測定及び TUNEL assay を用いてアポトーシス細胞について検討した。4) アポトーシス誘導における細胞内カスパーゼ-3, 8, 9 活性化を検討した。5) ミトコンドリア膜電位の測定、シトクロム c 放出の測定、Bax 活性の測定により、アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与について検討した。6) アポトーシス誘導における RKIP 活性化について検討した。

4-2 実験

4-2-1 試料

リン脂質

L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) は、2-2-1と同様のものを使用した。

界面活性剤

α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monododecanoate (TreC12) は、2-2-1と同様のものを使用した。

α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monomyristate (TreC14) は、2-2-1と同様のものを使用した。

α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monopalmitate (TreC16) は、2-2-1と同様のものを使用した。

蛍光標識リン脂質

Palmitoyl-2 [12-(7-nitro-2-1, 3-benzoxadiazoi-4-yl)amino] dodecanoyl -sn-glycero-3-phosphocholine (NBDPC) は、3-2-1と同様のものを使用した。

4-2-2 トレハロース含有リポソームの調製

トレハロース含有リポソームは、2-2-2と同様の方法で調製した。

4-2-3 トレハロース/蛍光脂質含有リポソームの調製

トレハロース/蛍光脂質含有リポソームは、3-2-3と同様の方法で調製した。

4-2-4 動的光散乱法による膜直径 (d_{hy}) の測定

蛍光脂質含有リポソームの膜直径は、2-2-3と同様の方法で測定した。また、試料溶液の保存及び測定は、膜物性の安定性を考慮し、4°Cで行った。

4-2-5 使用細胞

がん細胞には、ヒト肝臓がん (Hep-G2, HuH-7; Hepatocellular Carcinoma, Human) を使用し、正常細胞には、ヒト胎児肺二倍体線維芽細胞 (WI-38; Human Diploid Lung) を使用した。なお、Hep-G2 細胞及び HuH-7 細胞は理研細胞バンク (RIKEN Cell Bank) より、WI-38 細胞は ATCC より購入した。

Hep-G2 細胞及び WI-38 の培地は MEM に 10%FBS、1.0mM ピルビン酸、0.1mM 非必須アミノ酸を添加したものをを用い、HuH-7 細胞の培地は D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Invitrogen) に 10% FBS を添加したものをを用いた。以上のすべての細胞は、37°C、5%CO₂、湿度 95% の条件で培養した。

4-2-6 酵素活性測定法 (WST-1 assay) による細胞増殖抑制試験

酵素活性測定法 (WST-1 assay) による細胞増殖抑制試験は、3-2-6 と同様の原理及び方法で測定した。

4-2-7 共焦点レーザー顕微鏡による細胞への融合・蓄積の観察

共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光蓄積の観察は、3-2-7 と同様の原理及び方法で測定した。

4-2-8 フローサイトメーターによる DNA 含量の測定

フローサイトメーターによる DNA 含量の測定は、3-2-8 と同様の原理及び方法で測定した。

4-2-9 TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出

TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察は、3-2-9 と同様の原理及び方法で測定した。

4-2-10 カスパーズ-3, 8, 9 活性の測定

蛍光基質によるカスパーズ-3, 8, 9 活性の測定は、3-2-10 と同様の原理及び方法で測定した。

4-2-11 ミトコンドリア膜電位の測定

フローサイトメーターによるミトコンドリア膜電位の測定は、3-2-11 と同様の原理及び方法で測定した。

4-2-12 蛍光標識抗体染色によるシトクロム c 放出の測定

フローサイトメーターによるミトコンドリア膜電位の測定は、3-2-12 と同様の原理及び方法で測定した。

4-2-13 細胞内 Bax 活性の測定

細胞内 Bax 活性の測定は、3-2-13 と同様の原理及び方法で測定した。

4-2-14 蛍光標識抗体染色による RKIP 活性の測定

フローサイトメーターによる RKIP 活性の測定は、3-2-14 と同様の原理及び方法で測定した。

4-3 結果と考察

4-3-1 トレハロース含有リポソームのがん細胞に対する増殖抑制効果

3-3-1 において、トレハロース含有リポソーム (DMTreCn (n=12, 14, 16)) は正常細胞に影響を与えずに、大腸がん及び胃がん細胞に対して増殖抑制効果を示した。本節では、肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対する DMTreCn (n=12, 14, 16) の増殖抑制効果について検討した。結果を Fig.4-3 に示す。

DMPC 単一リポソームは Hep-G2 細胞及び HuH-7 細胞に対し、生存率に影響を与えなかった。DMTreC12 は Hep-G2 細胞に対し、10~60mol%DMTreC12 において、ほとんど増殖抑制しなかったが、65~70mol%DMTreC12 において、30%~85% の抑制効果が得られた。HuH-7 細胞では、45~70mol%DMTreC12 では、トレハロース濃度依存的にがん細胞に対する生存率が減少した。

DMTreCn (n=14, 16) は Hep-G2 細胞及び HuH-7 細胞いずれの場合もトレハロース濃度依存的にがん細胞に対する増殖抑制効果を示した。特に、55mol%TreCn 以上では、90% 以上の顕著な抑制効果を示した。30~50mol% TreCn では、抑制効果は DMTreC14 < DMTreC16 であった。

この結果から、DMTreCn (n=14, 16) は肝臓がん細胞に対し特異的に増殖抑制することが今回初めて明らかとなった。

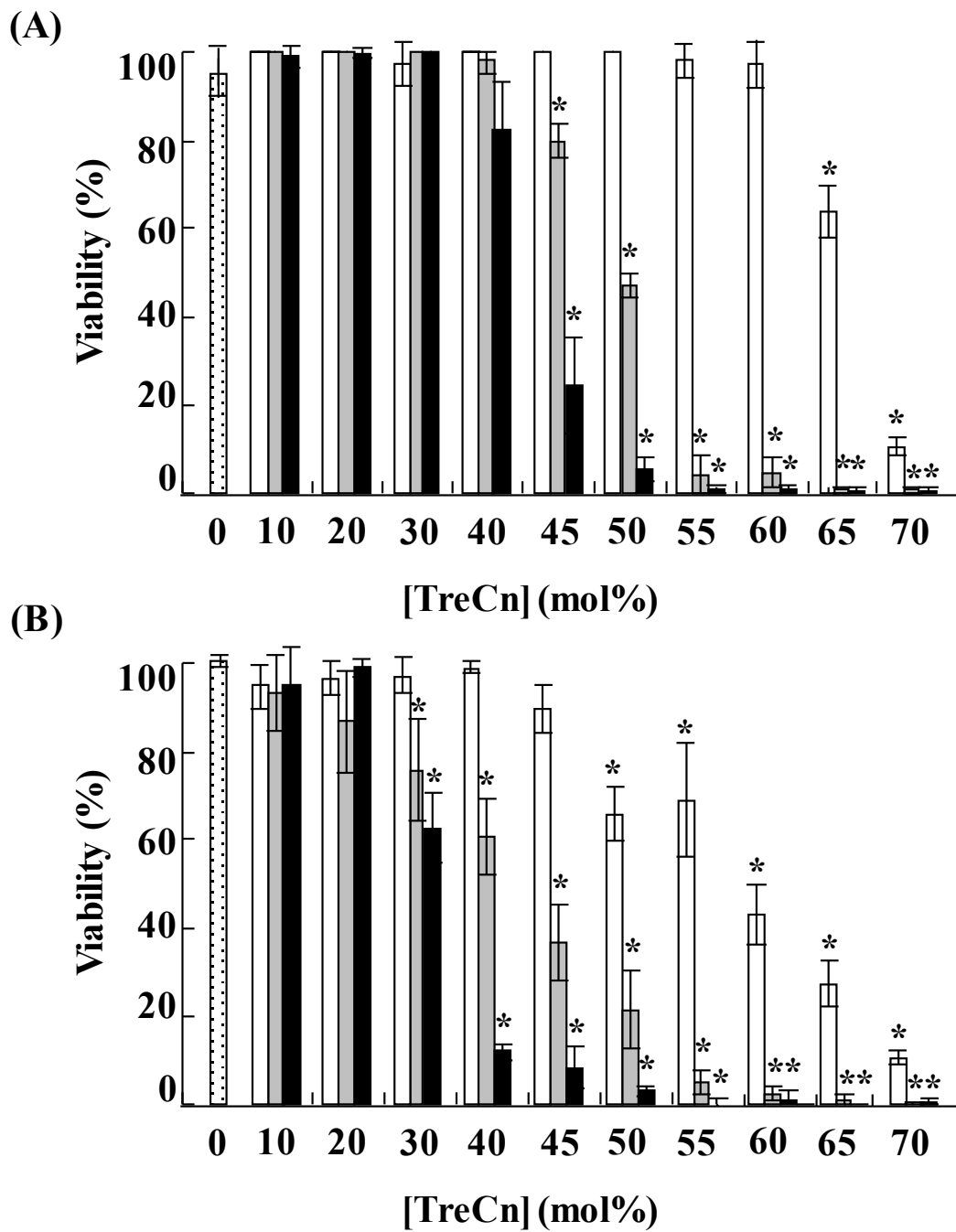


Fig.4-3 DMTreCn (n=12, 14, 16) inhibited the growth of Hep-G2 (A) and HuH-7 (B) cancer cells. Data represent the mean (n=3~6) \pm S.D.

* Student's *t* test : compared with DMPC ($p < 0.05$)

□ DMPC □ C12 □ C14 ■ C16

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=12, 14, 16)]= $0.1 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M

4-3-2 トレハロース含有リポソームのがん細胞への融合・蓄積

3-3-2 において、トレハロース含有リポソーム (DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC) は正常肺細胞である WI-38 細胞には蛍光蓄積は観察されず、HCT-116 細胞及び MKN-45 細胞のみに高い選択性を示し、特異的に融合・蓄積していることが明らかとなっていた。本節では、肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) を用いて、DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC のがん細胞への融合・蓄積について、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。画像を Fig.4-4~4-5 に示す。

DMPC/NBDPC は Hep-G2 細胞及び HuH-7 細胞に対しては、蛍光蓄積が見られなかった。DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は各がん細胞に対し経時的な緑色の蛍光蓄積の増大が観察された。また、DMTreC14 と比べ、DMTreC16 は早く蛍光蓄積され、細胞膜表面だけではなく、細胞内への蓄積も観察された。DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC はがん細胞のみに高い選択性を示し、特異的に融合・蓄積していることが考えられる。

以上のことから、DMPC より DMTreCn (n=14, 16) の膜流動性が高いことから、特異的にがん細胞膜へ融合・蓄積しやすいことが考えられる。また、炭素鎖の違うトレハロース界面活性剤である DMTreC14 より DMTreC16 はがん細胞へ融合・蓄積しやすいことが今回初めて明らかとなった。

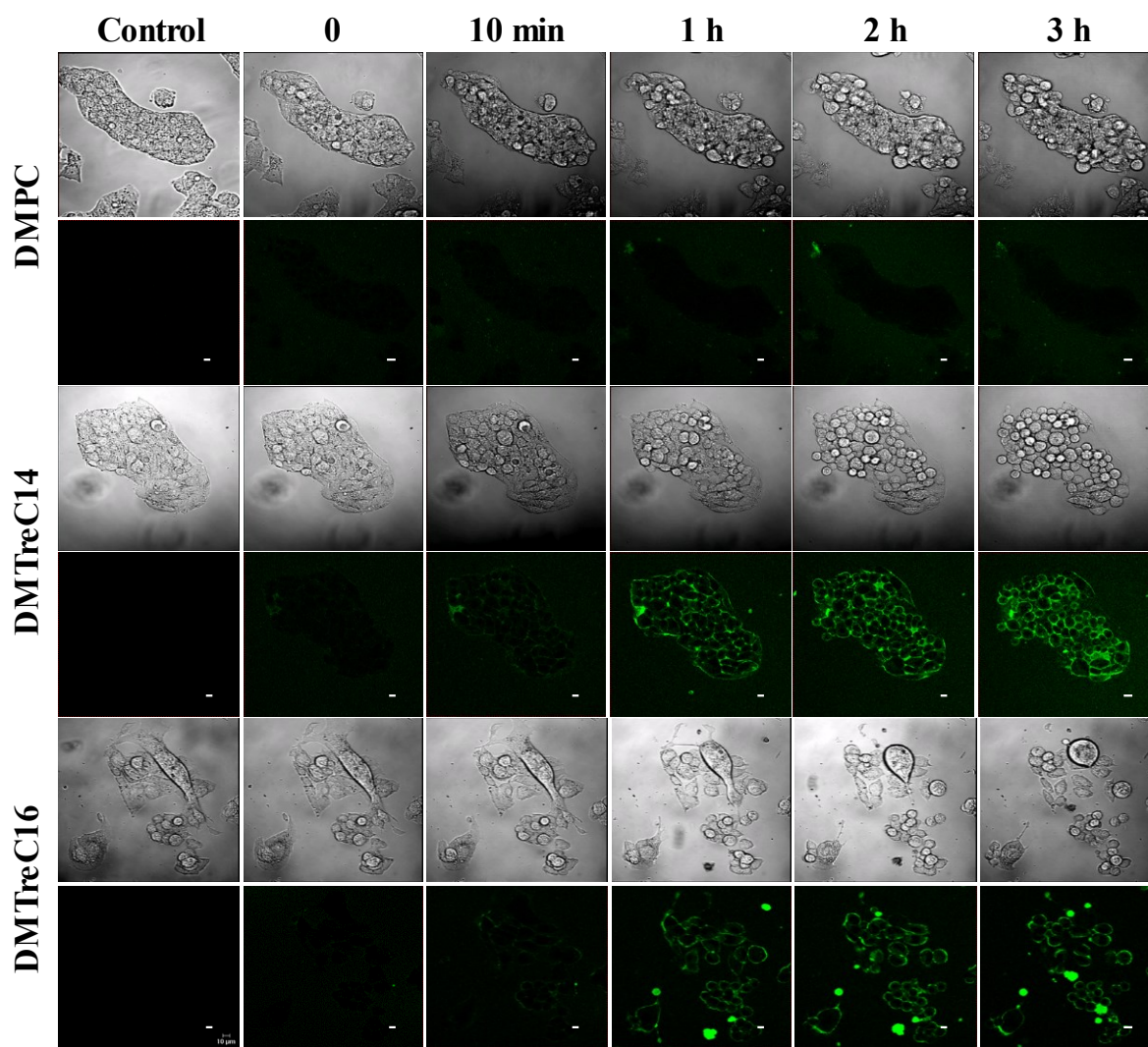


Fig.4-4 Fluorescence micrographs of Hep-G2 cancer cell treated with DMPC and DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC using confocal laser microscope at 37°C.
 Scale bar : 10 μ m, Magnification : \times 40
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [NBDPC]= 5.0×10^{-6} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

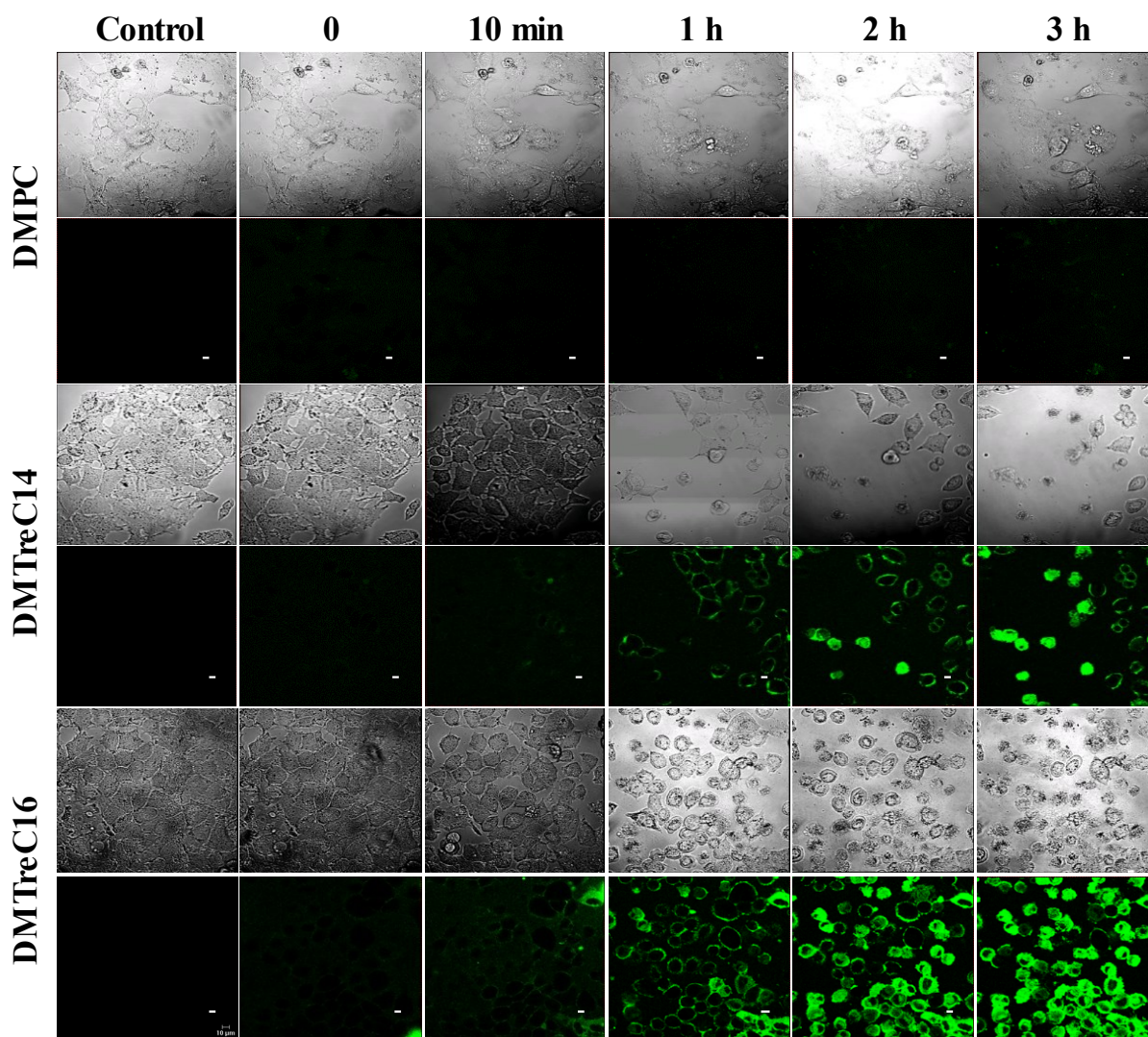


Fig.4-5 Fluorescence micrographs of HuH-7 cancer cell treated with DMPC and DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC using confocal laser microscope at 37°C.

Scale bar : 10µm, Magnification : ×40

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [NBDPC]= 5.0×10^{-6} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

4-3-3 トレハロース含有リポソームのがん細胞に対するアポトーシス誘導

DMTreCn (n=12, 14, 16) の肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対するアポトーシス誘導について、PI 染色による DNA 断片化率の測定を行った。結果を Fig.4-6~4-7 に示す。DMTreC12 は各がん細胞に対し、DNA 断片化率の増大が見られなかったが、DMTreCn (n=14, 16) は Hep-G2 細胞及び HuH-7 細胞いずれの場合もトレハロース濃度依存的に DNA 断片化率が増大した。特に、70mol%TreCn では 80% 以上の断片化率が得られた。

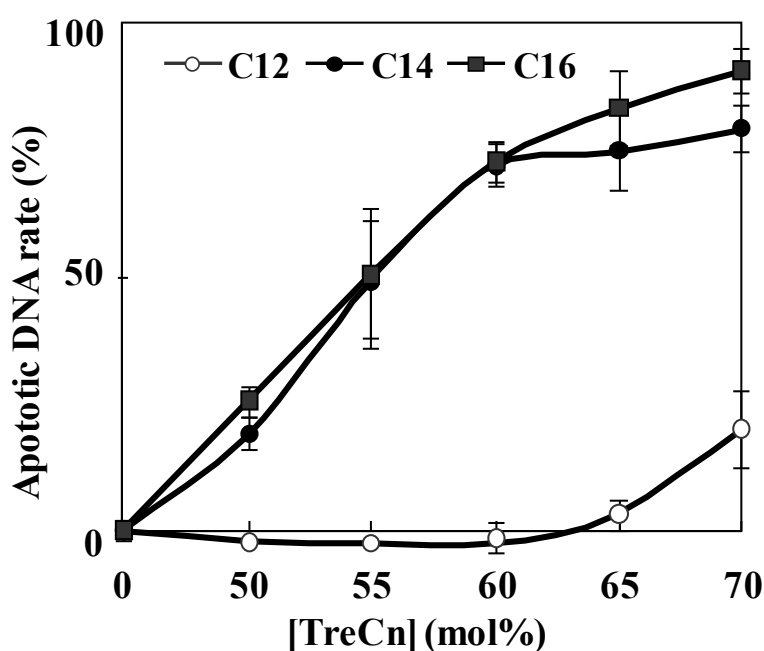


Fig.4-6 The effects of DMTreCn (n=12, 14, 16) for apoptotic DNA rate of Hep-G2 cancer cells. Data represent the mean (n=3~4) \pm S.D. [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=12, 14, 16)]= $1.0 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M

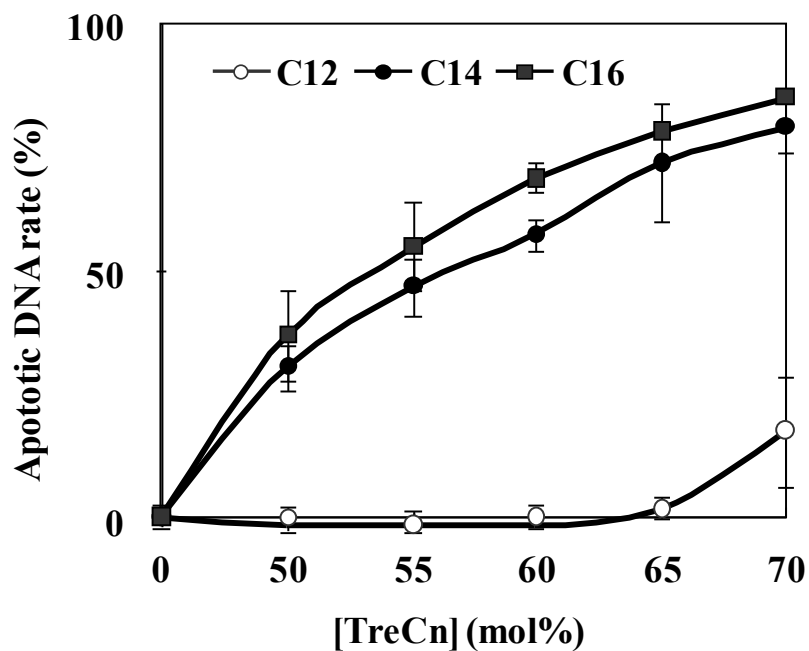


Fig.4-7 The effects of DMTreCn (n=12, 14, 16) for apoptotic DNA rate of HuH-7 cancer cells. Data represent the mean (n=3~4) \pm S.D. [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=12, 14, 16)]= $1.0 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M

TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察を行った。結果を Fig.4-8 に示す。試料添加 48 時間後において、DMPC 単一リポソームでは TUNEL 陽性を示す緑色蛍光が全く見られなかった。一方、DMTreCn (n=14, 16) で処理した各がん細胞において、TO-PRO-3 により赤色に染色された核に、TUNEL 陽性を示す緑色蛍光が観察され、DNA の断片化が認められた。

以上の結果より、DMTreCn (n=14, 16) は肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対しアポトーシスを誘導することが今回初めて明らかとなった。

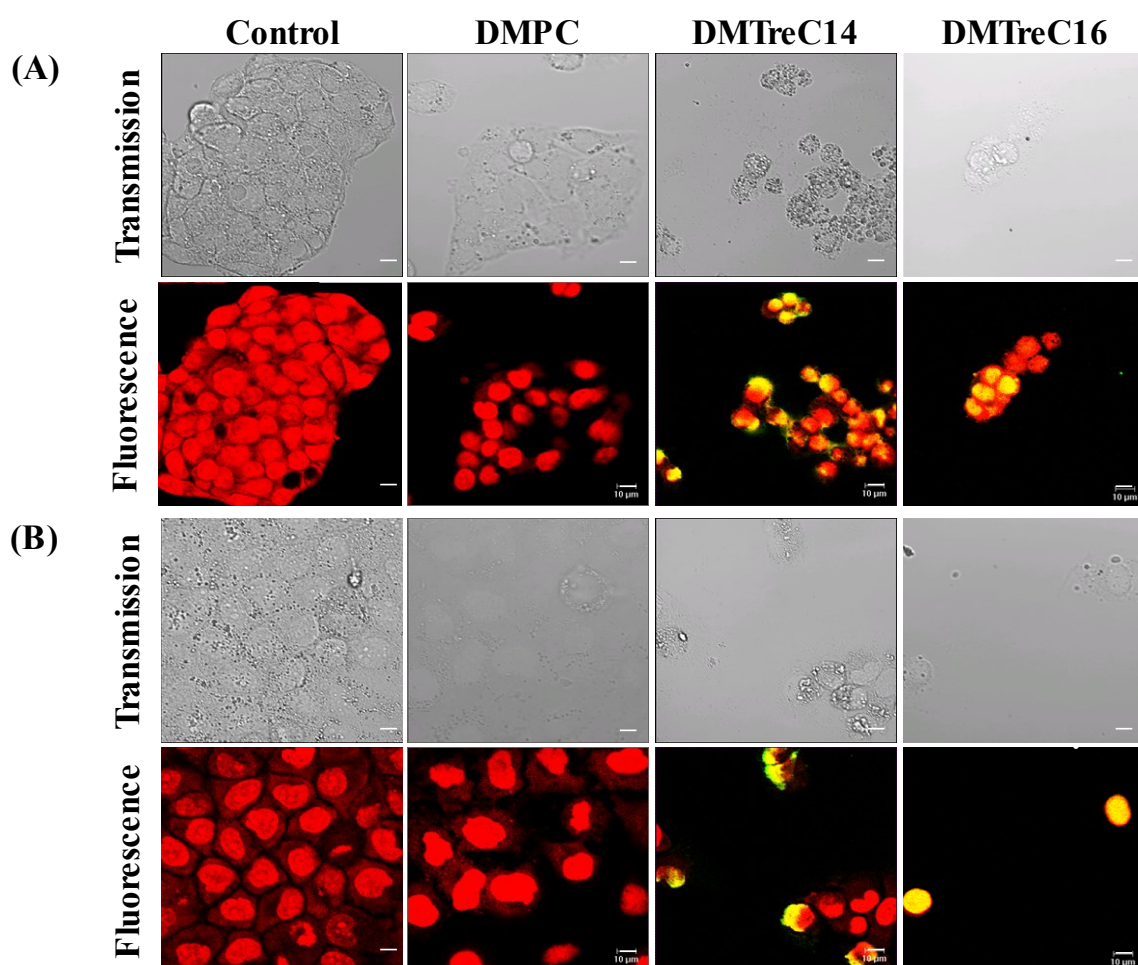


Fig.4-8 Fluorescence micrographs of cancer cells (Hep-G2 (A) and HuH-7 (B)) after the treatment with DMPC and DMTreCn (n=14, 16) using TUNEL assay for 48h.
Scale bar : 10μm, Magnification : ×80
[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 1.5×10^{-4} M

4-3-4 アポトーシス誘導におけるカスパーズ-3, 8, 9 の活性化

DMTreCn (n=14, 16) 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ズ-3, 8, 9 活性をフローサイトメーター及び共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。結果を Fig.4-9~4-11 に示す。フローサイトメーターの結果から、Control と比べ DMTreCn で処理した場合のピークは右側にシフトし、カスパーズ-3, 8, 9 は活性化していることが明らかとなった。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果から、Control ではカスパーズ-3, 8, 9 を示す緑色蛍光が観察されず、DMTreCn (n=14, 16) で処理した細胞において、PhiPhiLux 及び CaspaLux の緑色蛍光が観察された。

この結果から、DMTreCn (n=14, 16) の肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対するアポトーシス誘導にカスパーズ-3, 8, 9 が関与していると考えられる。

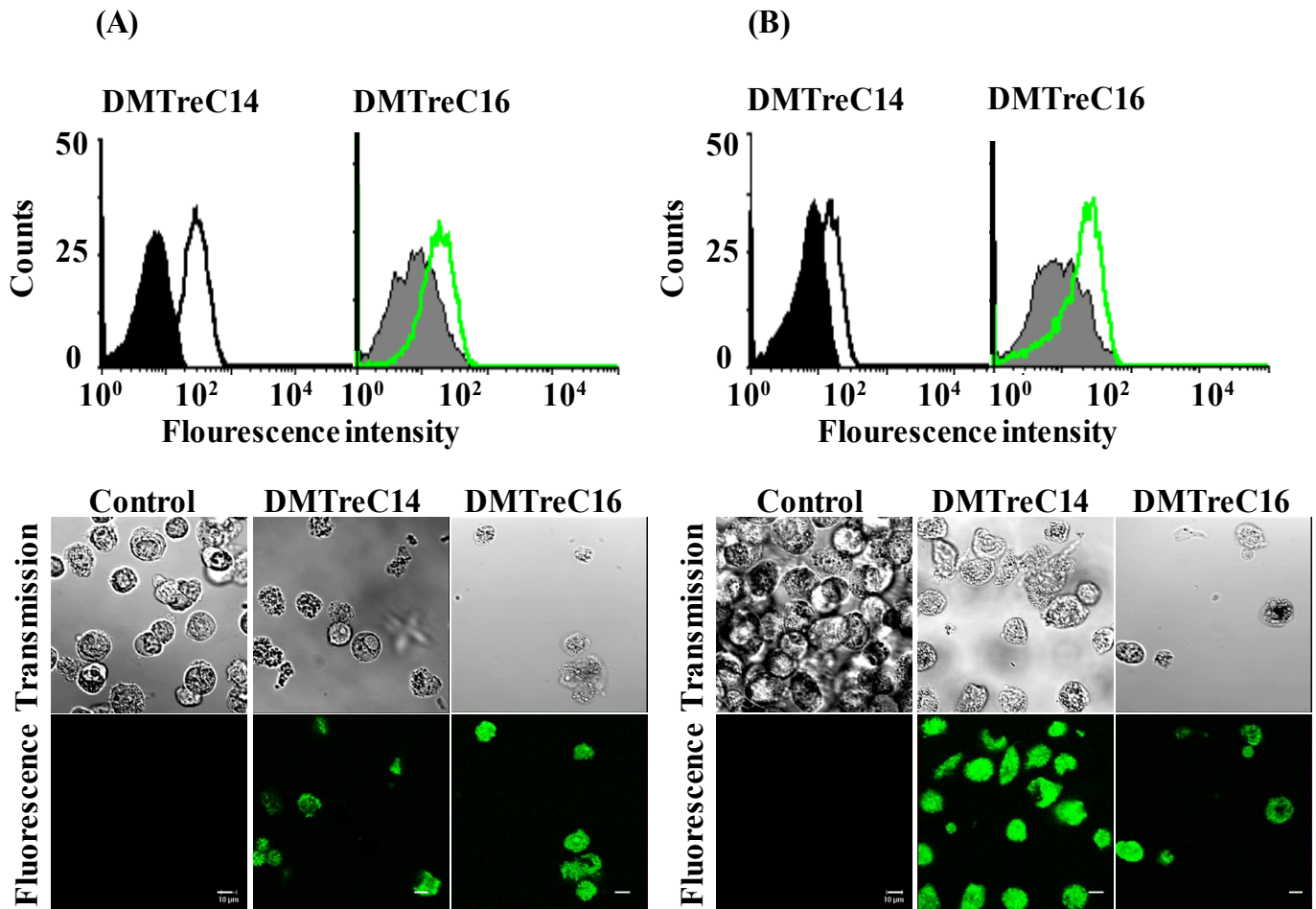


Fig.4-9 Activation of caspase-3 in apoptotic cancer cells (Hep-G2 (A) and HuH-7 (B)) after the treatment with DMTreCn (n=14, 16) for 48h.

■ Control □ DMTreC14 □ DMTreC16
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

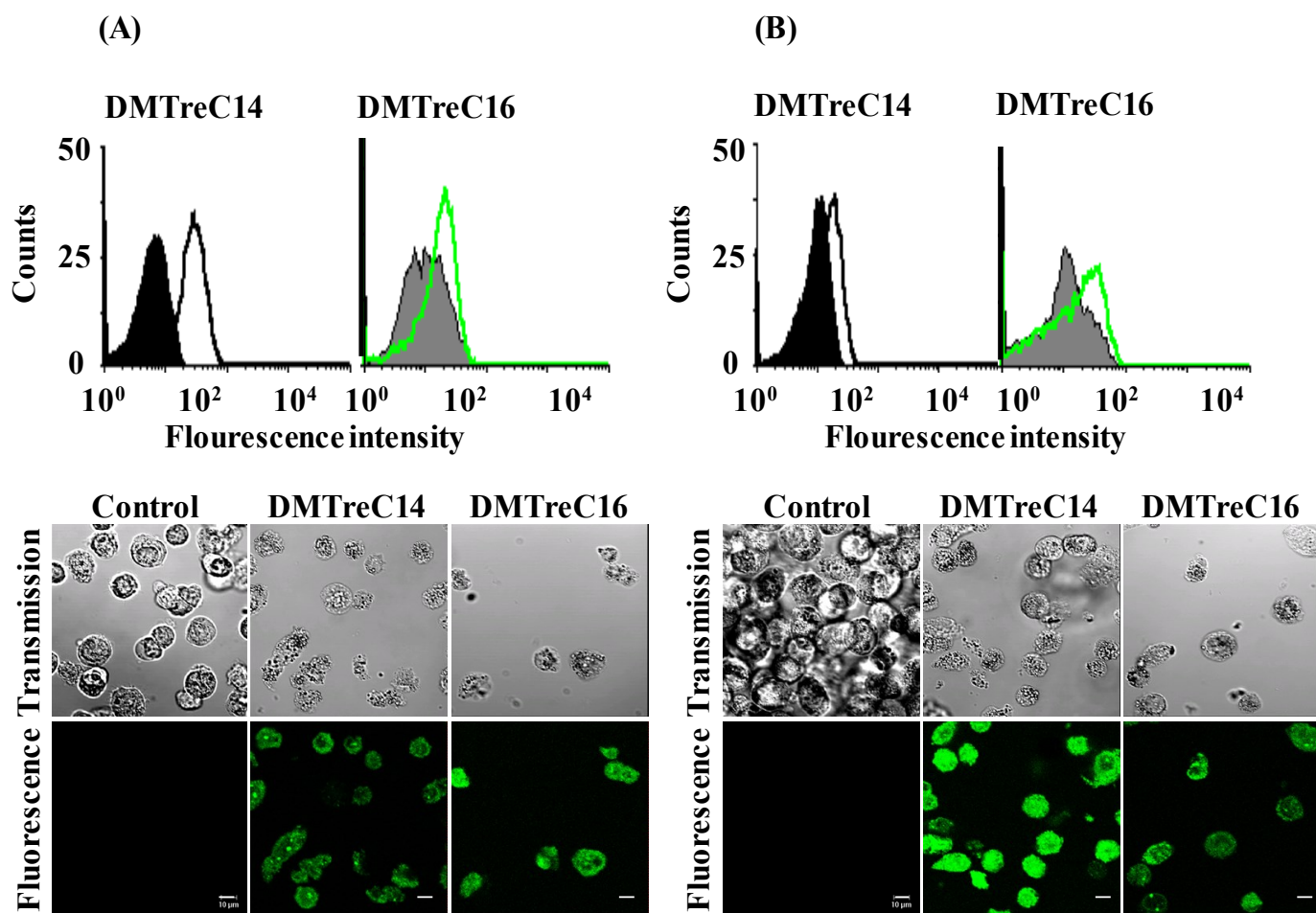


Fig.4-10 Activation of caspase-8 in apoptotic cancer cells (Hep-G2 (A) and HuH-7 (B)) after the treatment with DMTreCn (n=14, 16) for 48h.

Control

DMTreC14

DMTreC16
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

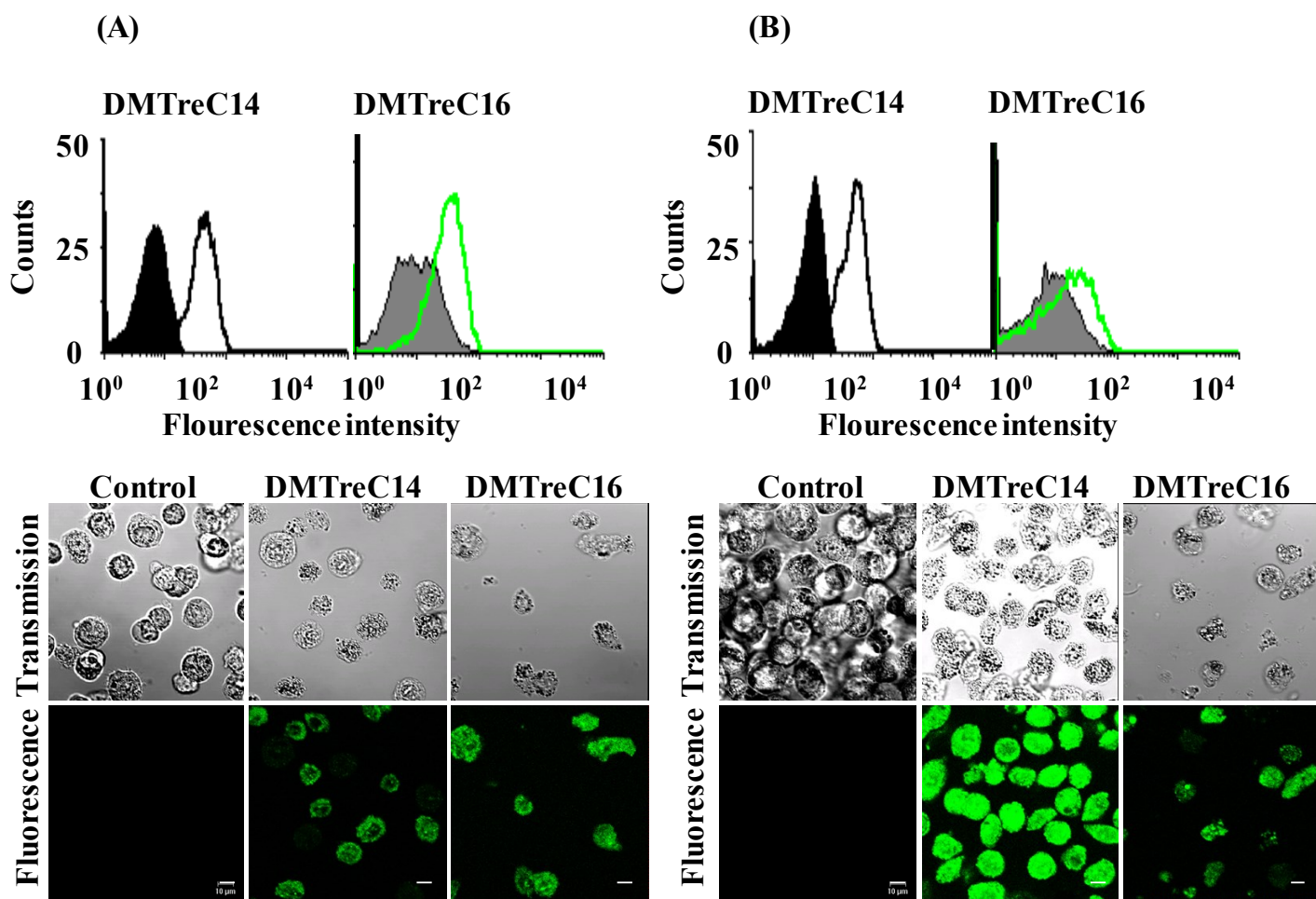


Fig.4-11 Activation of caspase-9 in apoptotic cancer cells (Hep-G2 (A) and HuH-7 (B)) after the treatment with DMTreCn (n=14, 16) for 48h.

Control

DMTreC14

DMTreC16
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

4-3-5 アポトーシス誘導におけるミトコンドリアの関与

DMTreCn (n=14, 16) のがん細胞におけるポトーシス誘導メカニズムを検討するために、DiOC₆(3) によるミトコンドリア膜電位をフローサイトメーターにて測定した。結果を Fig.4-12~4-13 に示す。Hep-G2 細胞においては、Fig.4-12 から明らかなように、Control と比べ DMTreCn (n=14, 16) で処理した細胞では、ミトコンドリア膜電位の低下が見られなかった。一方、HuH-7 細胞においては、Fig.4-12 から明らかなように、DMTreCn (n=14, 16) 処理後にピークが左側にシフトしており、ミトコンドリア膜電位の低下が示された。

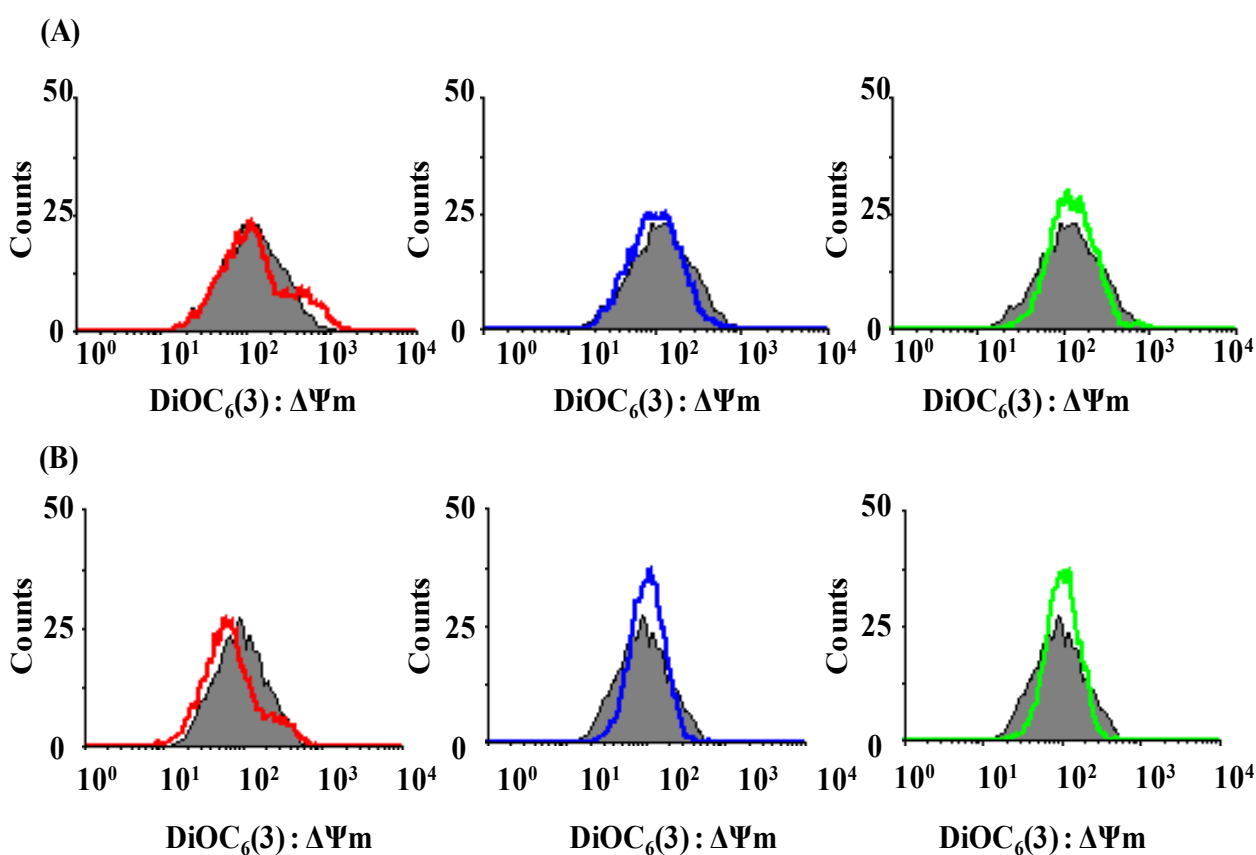


Fig.4-12 $\Delta\Psi_m$ disruption of mitochondria membrane for Hep-G2 cancer cells treated with DMTreCn (n=14 (A), 16 (B)) for 48h.

Control
 50mol%
 60mol%
 70mol%
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

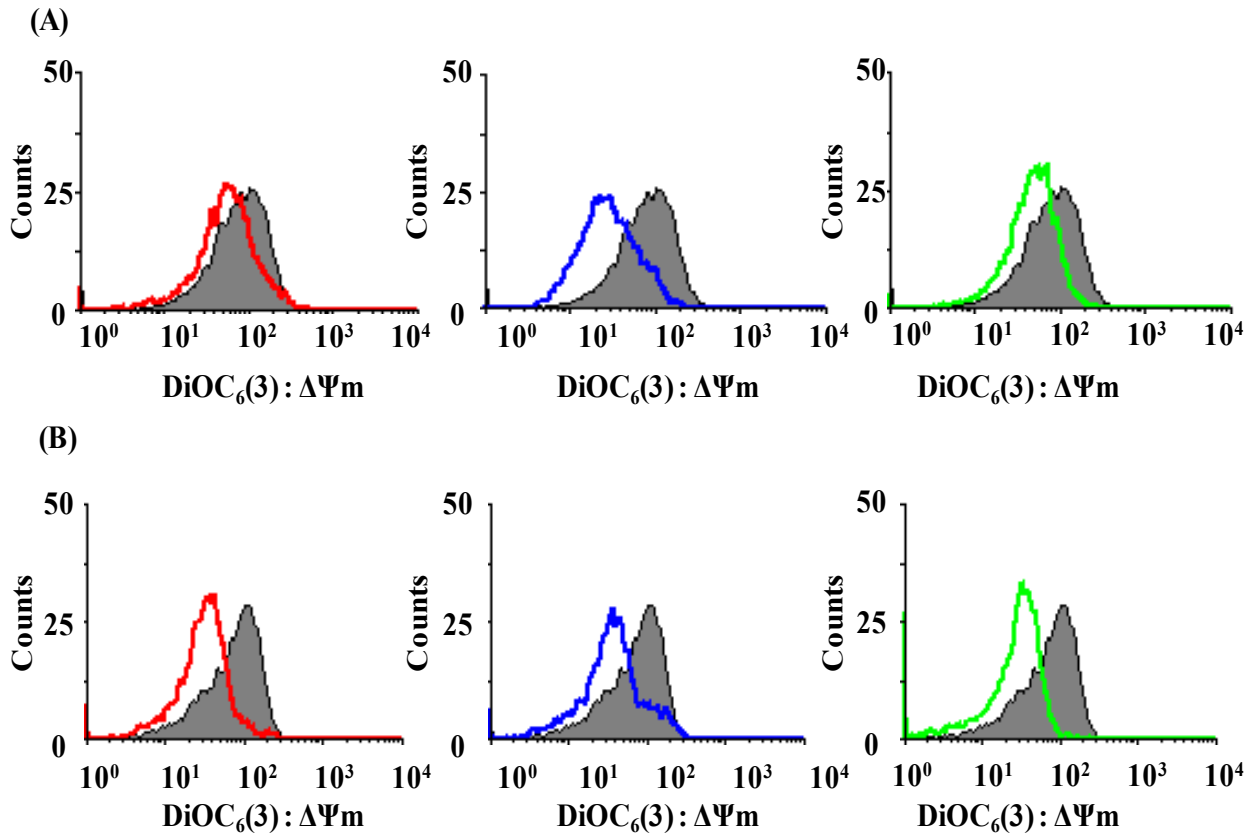


Fig.4-13 $\Delta\Psi_m$ disruption of mitochondria membrane for HuH-7 cancer cells treated with DMPC and TreCn (n=14 (A), 16 (B)) for 48h.

Control
 50mol%
 60mol%
 70mol%
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

ミトコンドリアからのシトクロム c 放出をフローサイトメーターにて観察した。結果を Fig.4-14~4-15 に示す。Control と比べ DMTreCn (n=14, 16) で処理した場合はピークが左側にシフトし、ミトコンドリアからシトクロム c を放出していることが明らかとなった。

この結果から、DMTreCn (n=14, 16) の肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対するアポトーシス誘導におけるシグナル伝達はミトコンドリアを経由していることが示唆された¹⁹⁰⁻¹⁹²⁾。

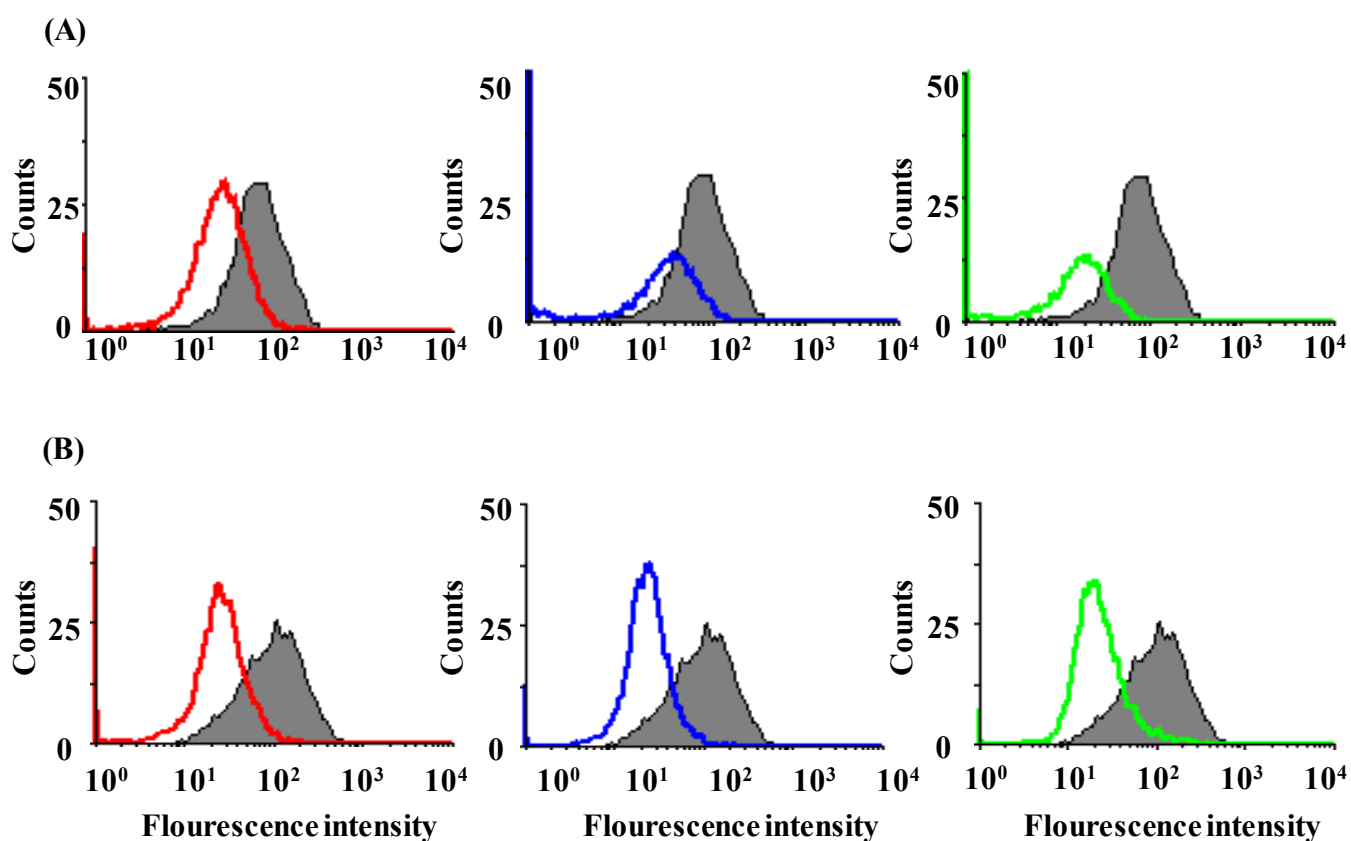


Fig.4-14 Cytochrome c release from mitochondria of Hep-G2 cancer cells treated with DMTreCn (n=14 (A), 16 (B)) for 48h.

■ Control ■ 50mol% ■ 60mol% ■ 70mol%
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

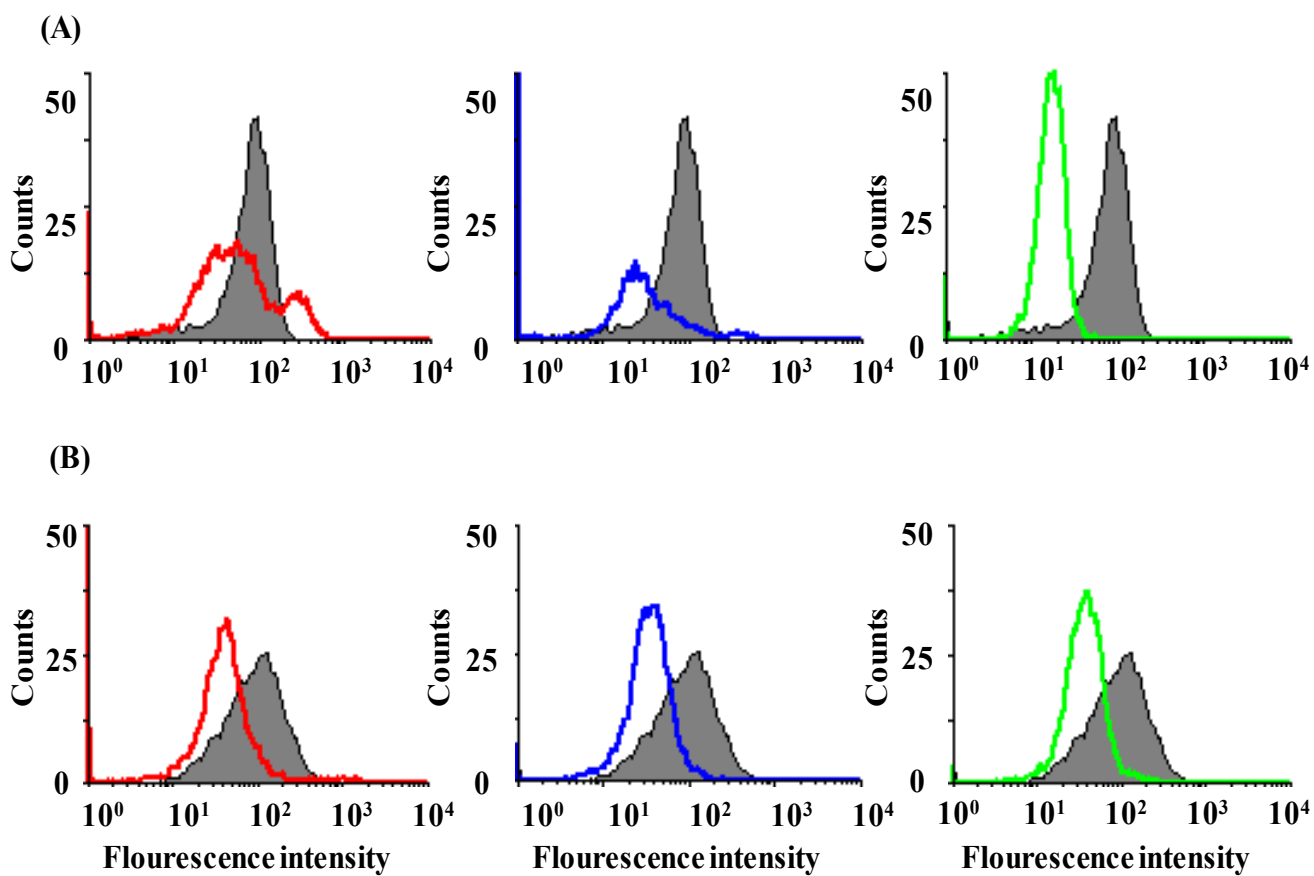


Fig.4-15 Cytochrome c release from mitochondria of HuH-7 cancer cells treated with DMPC (n=14 (A), 16 (B)) for 48h.

Control
 50mol%
 60mol%
 70mol%
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreCn (n=14, 16)]= 2.3×10^{-4} M

DMTreCn (n=14, 16) のアポトーシス誘導メカニズムについて、ミトコンドリアからシトクロム c の放出が確認された。そのため、ミトコンドリアからシトクロム c の放出を促進するプロアポトーシスタンパク質である Bax の活性をフローサイトメーターにて観察した。結果を Fig.4-16 に示す。Control と比べ DMTreCn (n=14, 16) で処理した各がん細胞では、Bax を示す緑色が観察され、Bax が活性化していることが明らかとなった。

以上のことから、DMTreCn (n=14, 16) の肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対するアポトーシス誘導において、Bax の活性化によりシトクロム c が放出していると考えられる¹⁹³⁾。

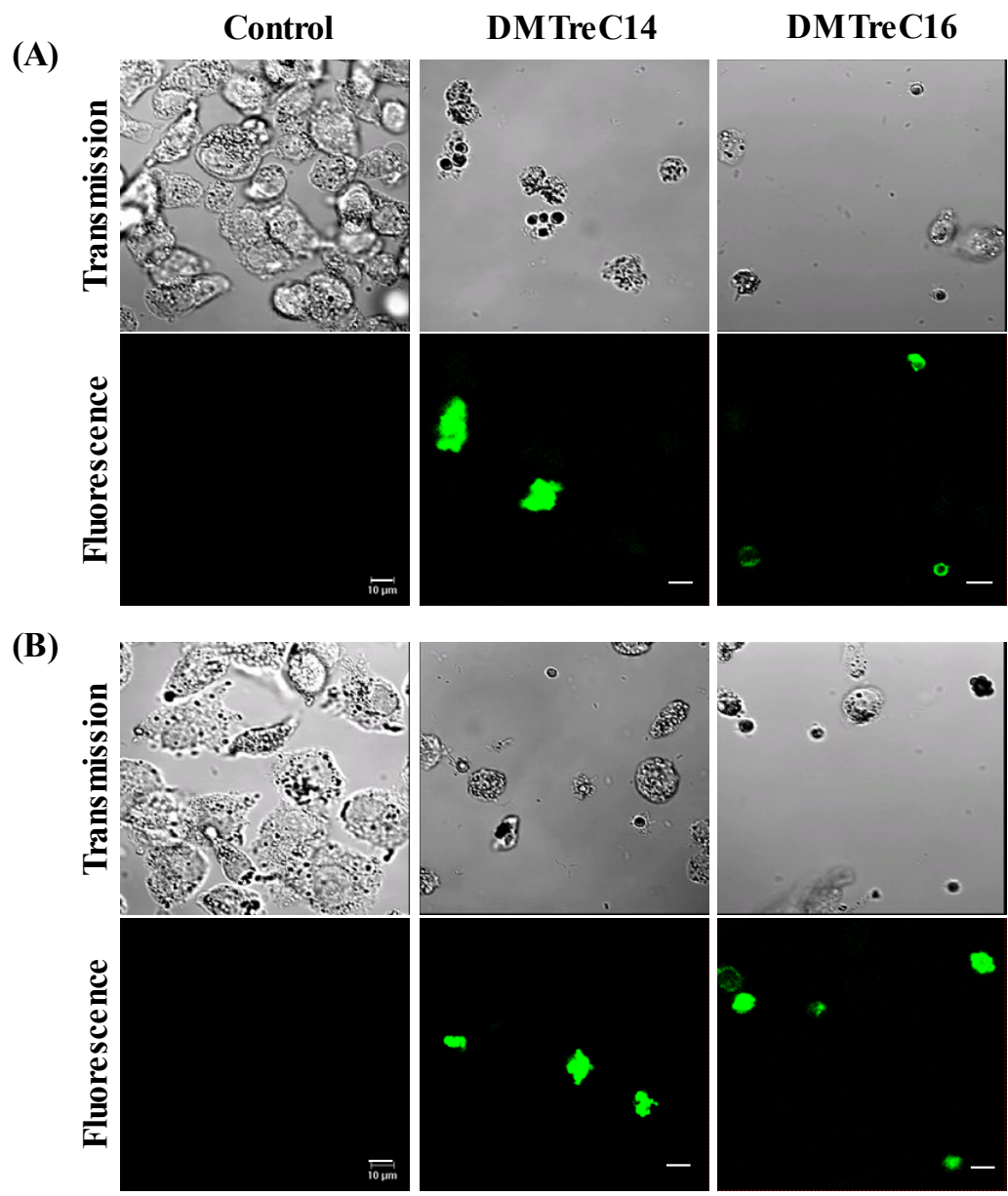


Fig.4-16 Activation of Bax in apoptotic cancer cells (Hep-G2 (A) and HuH-7 (B)) after the treatment with DMTreCn (n=14, 16) for 24h.
 Scale bar : 10 μ m, Magnification : $\times 80$
 $[DMPC]=1.0 \times 10^{-4}M$, $[TreCn (n=14, 16)]=2.3 \times 10^{-4}M$

4-3-6 アポトーシス誘導における RKIP の活性化

DMTreCn (n=14, 16) の肝臓がん細胞におけるアポトーシスシグナル伝達における RKIP の関与について検討した。結果を Fig.4-17~4-18 に示す。Control と比べ DMPC で処理した各がん細胞では、RKIP 活性の増大が見られなかった。DMTreC14 で処理した Hep-G2 細胞では、70mol% のみにおいて RKIP 活性の増大が見られ、DMTreC16 で処理したいずれの場合のピークも右側にシフトし、RKIP は活性化していることが明らかとなった。

この結果から、DMTreCn (n=14, 16) の肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対するアポトーシス誘導シグナル伝達において、RKIP が関与していると考えられる。

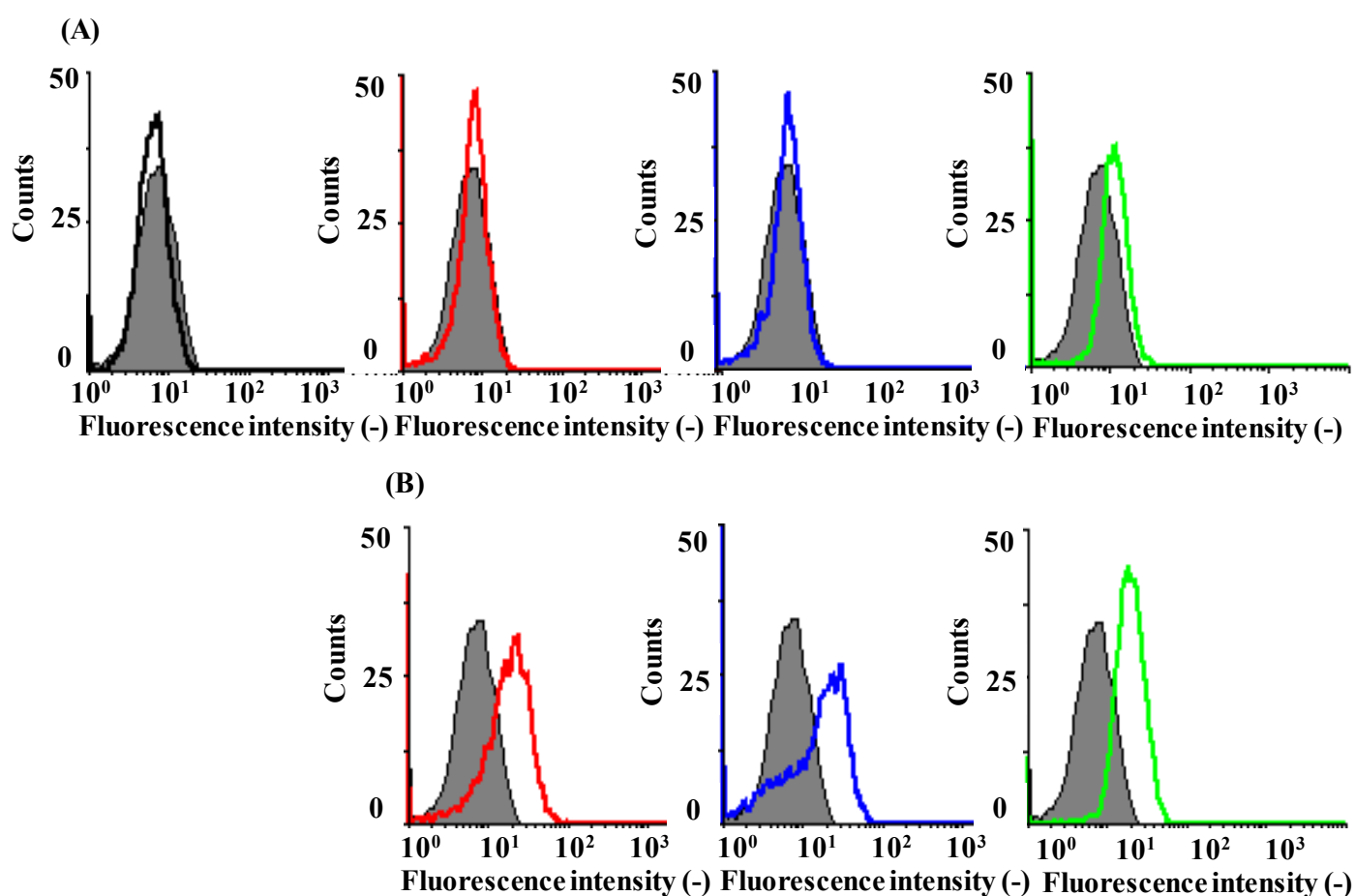


Fig.4-17 Activation of RKIP in apoptotic Hep-G2 cancer cells after the treatment of DMTreCn (n=14 (A), 16 (B)) for 24h.

■ Control □ DMPC ■ 50mol% ■ 60mol% ■ 70mol%
 [DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreC16]= $1.0 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M

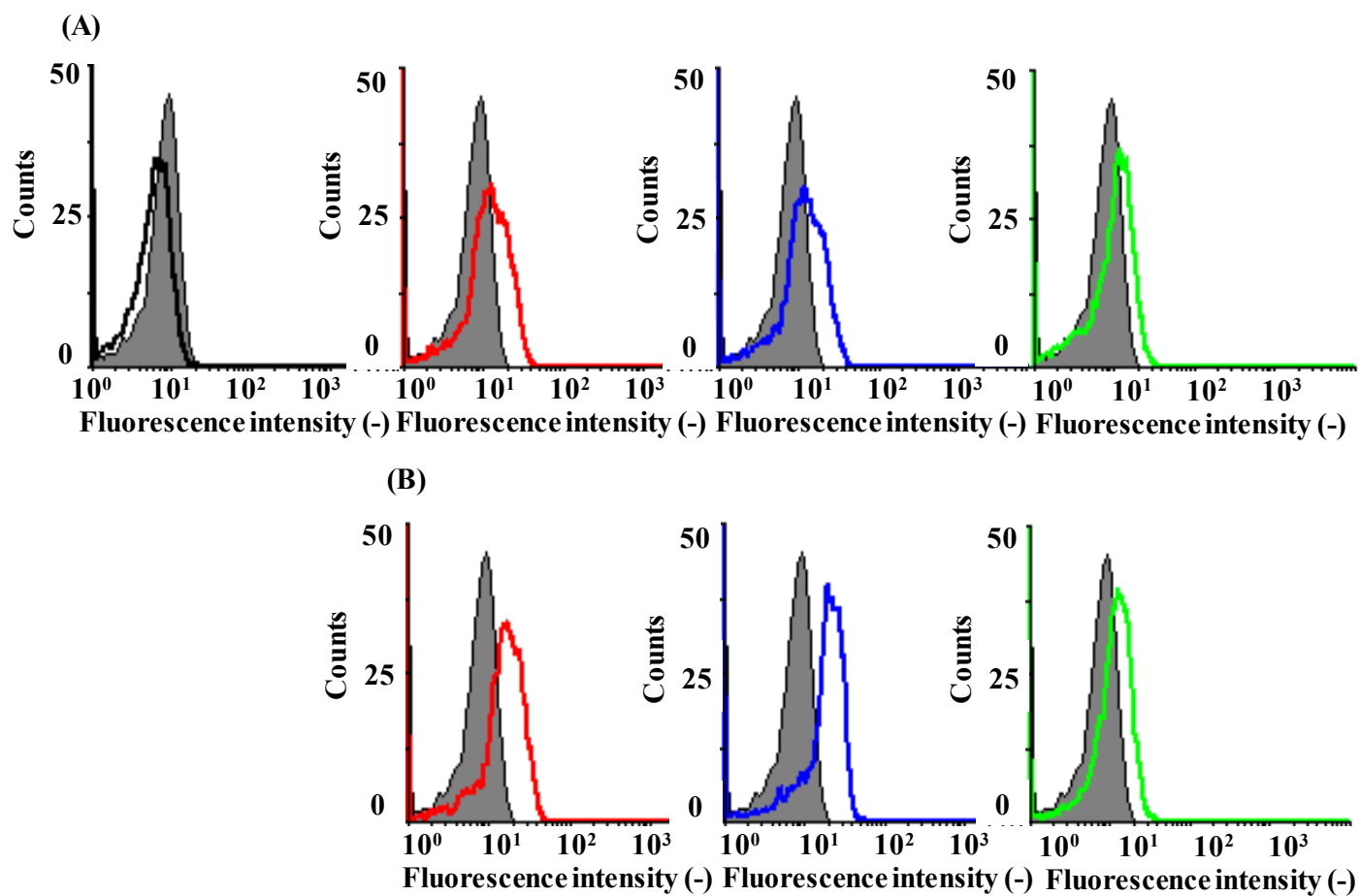


Fig.4-18 Activation of RKIP in apoptotic HuH-7 cancer cells after the treatment of DMTreCn (n=14 (A), 16 (B)) for 24h.

Control
 DMPC
 50mol%
 60mol%
 70mol%

[DMPC]= 1.0×10^{-4} M, [TreC16]= $1.0 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M

4-4 総括

本章では、リン脂質 (DMPC) とトレハロース界面活性剤 (TreCn (n=12, 14, 16)) から成るトレハロース含有リポソーム (DMTreCn (n=12, 14, 16)) のヒト肝臓がん (Hep-G2, HuH-7) 細胞に対する増殖抑制効果について検討した。次に、DMTreCn のヒト肝臓がん細胞に対するアポトーシス誘導及びアポトーシスシグナル伝達経路について検討した。その結果、以下のような興味深い知見が得られた。

- 1 DMTreCn (n=12, 14, 16) のがん細胞増殖抑制効果の結果より、DMPC 単一リポソームは 各肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対し、生存率に影響を与えなかった。DMTreC12 は Hep-G2 細胞に対し、10~60mol%DMTreC12 において、ほとんど増殖抑制されなかったが、65~70mol%DMTreC12 では、30%~85% の抑制効果が得られた。HuH-7 細胞では、45~70mol%DMTreC12 において、トレハロース濃度依存的にがん細胞に対する生存率が減少した。DMTreCn (n=14, 16) は Hep-G2 細胞及び HuH-7 細胞いずれの場合もトレハロース濃度依存的にがん細胞に対する増殖抑制効果を示した。特に、50mol%TreCn 以上では、90% 以上の顕著な抑制効果を示した。30~50mol%TreCn では、抑制効果は DMTreC14 < DMTreC16 であった。
- 2 蛍光脂質含有リポソーム (DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC) を用いてがん細胞 (Hep-G2, HuH-7) への融合・蓄積を検討したところ、DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は、肝臓がん細胞膜及び細胞内に、特異的に経時的に蓄積することが示された。また、DMTreC14 より DMTreC16 の方ががん細胞膜へ融合・蓄積しやすいことを初めて明らかにした。
- 3 DNA 断片化率の測定及び TUNEL assay の結果より、DMTreC12 はがん細胞に対して DNA 断片化率の増大が見られなかった。DMTreCn (n=14, 16) はトレハロース濃度依存的に DNA 断片化率の増大が見られ、各がん細胞に対してアポトーシスを誘導することが今回初めて確認出来た。
- 4 カスパー-3, 8, 9 活性の測定結果より、DMTreCn (n=14, 16) のがん細胞におけるアポトーシス誘導にカスパー-3, 8, 9 が関与することが初めて明らかとなった。
- 5 シトクロム c の放出、ミトコンドリア膜電位の測定及び Bax 活性の測定結

果より、ミトコンドリアを經由し、ミトコンドリア膜電位が低下する (HuH-7) 及び低下しない (Hep-G2) 二つの経路があることが明らかとなった。Bax の活性化によりミトコンドリアからシトクロム c が放出されることが初めて明確となった。

- 6 RKIP 活性の測定結果より、DMTreCn (n=14, 16) は肝臓がん細胞に対するアポトーシス誘導に RKIP の活性が関与していることを初めて明らかにした。

以上の結果より、DMTreCn (n=14, 16) が正常細胞に影響を与えず、肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対して高い増殖抑制効果が明確となった。また、DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は、臨床応用に適している膜を形成し、正常肺細胞へ融合・蓄積せず、がん細胞膜及び細胞内に、特異的に経時的に蓄積することが初めて示された。さらに、DNA 断片化によりアポトーシスを誘導していることが確認出来た。アポトーシス誘導シグナル伝達において、カスパーズ-3, 8, 9、シトクロム c の放出、Bax 活性及び RKIP 活性の関与が初めて明らかとなった。

第5章 総論

がんは人類にとって最も致命的な病気である。手術によって腫瘍を除去しても、がん細胞が単細胞となって体内をめぐり新しい組織に再び腫瘍を作る。これは、がんの転移と言い、転移がんは原発がんと比較して悪性で患者は死に至る。現在、医療の発達によってがん患者の約半数は回復しているが、残りの半数は転移によって死亡している。

正常細胞の増殖は、細胞同士の接触に依存しており、極めて厳密な制御機構が働いている。しかし、がん細胞は正常細胞が変化して生まれ、正常細胞同士のもつ協調性を失い、制御機構(身体からの命令)を無視して、異常に増え続ける性質を獲得した細胞である。細胞外に位置する形質膜は、当然正常細胞ががん細胞になる過程で一番大きな要因となり、がん化に伴う膜構成成分の質的及び量的変化に由来する膜構造の変化が、がん細胞の異常な性質と密接に結びついている。特に糖鎖に関しては、これまでの研究から様々な認識・識別現象においてシグナルとして働く直接的役割と、膜タンパク質の立体構造の維持、安定化に寄与するという間接的役割が指摘されている。従って、糖鎖の構造変化に基づく細胞間相互の異常が、細胞のがん化に伴う無秩序に増え続ける現象の背景にある。Warrenらは、細胞膜表面糖鎖の構造変化は、化学発がん及び自然発ガンの肝臓がん細胞、白血病細胞、リンパ腫細胞、神経芽細胞等で解析により明らかにしている¹⁹⁴⁻¹⁹⁶。糖鎖のがん性変化を化学的に明らかにすることは、がんの本質を理解し、がんの発生を防ぐことができると考えられる。また、臨床的には腫瘍マーカーとしてがんの診断、予後の追跡、治療への応用を図っていく上でも重要である⁴⁸。

細胞のがん化の一つの要因となっているのは遺伝子変異である。細胞増殖を引き起こすがん遺伝子、無制限の細胞増殖にストップをかけ、アポトーシス誘導するがん抑制遺伝子、及びそれらの遺伝子変異を修復するDNA修復遺伝子がある。そのため、現在最も注目されている分子標的治療の中で、がん細胞にがん抑制機能を復活させる遺伝子治療が有力になっている⁶³。このように、医学の発展によって、がんは次第に以前ほど恐れるべき病気ではなくなっている。早期に発見できれば死に至ることも無く、体への悪影響を抑える治療法も見つかってきた¹⁹⁷。

現在用いられているがんの治療は 1. 外科療法、2. 放射線療法、3. 化学療法、4. 免疫療法等に分けることができる。外科療法 (Surgical treatment) は、がん組織を取り去る治療法である。外科手術によりがんを含めて正常細胞の一部を切り取る。しかし、外科療法は、がんの種類、進行状況により、外科手術ができない箇所があるため、すべてのがんに適応しない。さらに、術後の痛み等の副

作用が見られる。放射線療法 (Irradiation therapy) は、がんのあるところへ X 線、 γ 線、電子線、陽子線、重粒子線等の粒子で高エネルギーの放射線を照射したり、あるいは小さな放射線源をがんの近くの体内に埋め込んで、がんをなくす方法である。放射線は、細胞の DNA に直接作用して、細胞の分裂能力をなくしたり、細胞のアポトーシスを増強して細胞を死に至らしめる。そのため、がん細胞だけでなく正常細胞にも同じ作用をしてしまうため、食道炎、皮膚炎等が生じる場合がある。基本的に、外科療法も放射線療法も治療目的で行う場合は、がんが局所 (原発巣) にとどまっている場合に適応となる²⁾。

近年、分子標的治療薬であるゲフィチニブ (上皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤) ががんによる痛みや呼吸困難等の症状を緩和するために用いられていたが、間質性肺炎 (肺線維症) や急性肺障害という薬剤性肺炎が多発する事態になった。一方、小細胞がんの治療は抗がん剤による化学療法が第一選択であるが、小細胞がんは急速に進行し、致命的になるので、治療は強力に行う必要がある、そのため副作用も強く現れる。例えば、シスプラチンとイリノテカンによる 2 剤併用療法では、シスプラチン (CDDP) の強い腎毒性、イリノテカン (CPT-11) の下痢が見られる^{2,8)}。副作用は個々の患者において、または、状態や合併症によって異なるため、副作用を軽減するように、抗がん剤をコントロールすることは難しい。

ハイブリッドリポソーム (HL)^{10, 11)}は、*in vitro* において薬物を含有せずに種々のがん細胞に対して顕著な増殖抑制効果を示し、正常細胞に対して毒性を示さないことが確認されている。がん細胞膜に特異的に融合・蓄積し、カスペーシスの活性化を経てアポトーシスを誘導することが明らかとなっている^{15-17, 20)}。 *in vivo* においては、担がんモデル動物を用いた治療実験から延命効果が確認されている^{12, 13)}。また、HL に蛍光脂質を含有させた HL/NBDPC はヒト肝臓がん細胞に高い選択性を示し、選択的に膜融合したことが明らかになっている¹⁴⁾。また、ヒト肺がん細胞に対しても顕著な蛍光蓄積が観察され、正常肺細胞には蓄積が認められていない¹⁹⁸⁾。さらに、糖系界面活性剤及び脂肪酸を含有したハイブリッドリポソームは、糖及び脂肪酸との相乗効果により、顕著ながん細胞増殖抑制効果を示している^{37-40, 199, 200)}。臨床試験においては、生命倫理委員会承認後の再発悪性リンパ腫に対するパイロットスタディを実施したところ、副作用がなく、固形リンパ腫の縮小効果、及び延命効果が明らかとなった^{12, 13)}。また、肝臓がん患者に対しても、腫瘍マーカー (PIVKA-II) の値が減少し、顕著な治療効果を示しており、従来の制がん剤と異なり、副作用のない新しい化学治療薬として期待されている。

本研究では、トレハロース含有リポソーム (DMTreCn (n=12, 14, 16)) を新規に創製し、副作用のない新しいがん治療薬の開発を目指して、種々のヒトがん

細胞を用いて検討した。以下に各章で得られた知見を示す。

第 2 章では、トレハロース含有リポソーム DMTreCn (n=12, 14, 16) は、トレハロースの含有量により、膜直径が異なることが明らかとなった。65~70mol% DMTreC12、40~50mol%、70mol%DMTreC14、30~55mol%DMTreC16 の膜直径は、37°C において細網内皮系 (RES) を回避可能な 100nm 付近で、約一ヶ月間安定な膜を形成していることが今回初めて明らかとなり、臨床応用に適していることが示された。また、DMTreCn (n=12, 14, 16) の膜内部の流動性は DMPC 単一リポソームよりも高いことが示された。DMTreC14 の固定水層は DMPC 単一リポソームよりも高いことが明らかとなった。

第 3 章では、DMTreCn (n=12, 14, 16) の大腸がん (HCT-116) 及び胃がん (MKN-45) 細胞に対する増殖抑制効果を検討した。DMTreCn (n=14, 16) はトレハロース濃度依存的にがん細胞の増殖抑制効果を示した。また、DMTreC14 より DMTreC16 の方が高い増殖抑制効果を示した。正常細胞に対しては影響を与えないことを確認した。トレハロース含有リポソーム (DMTreCn) に蛍光脂質 (NBDPC) を加えて調製した蛍光脂質含有リポソーム (DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC) の膜直径は細網内皮系 (RES) を回避できる 100nm 以下であり、4°C において 1 ヶ月以上安定した膜を形成することが明確となった。蛍光脂質含有リポソーム (DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC) を用いてがん細胞 (HCT-116, MKN-45) 及び正常肺細胞 (WI-38) への融合・蓄積を検討したところ、DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は、正常肺細胞へ融合・蓄積せず、がん細胞膜及び細胞内に、特異的に経時的に蓄積することを初めて明らかにした。また、DMTreC14 より DMTreC16 の方ががん細胞膜へ融合・蓄積しやすいことが示された。DNA 断片化率の測定及び TUNEL assay の結果より、DMTreC12 はがん細胞に対して DNA 断片化率の増大が見られなかった。DMTreCn (n=14, 16) はトレハロース濃度依存的に DNA 断片化率の増大が見られ、各がん細胞に対してアポトーシスを誘導することが確認出来た。カスパーズ-3, 8, 9 活性の測定結果より、DMTreCn (n=14, 16) のがん細胞におけるアポトーシス誘導にカスパーズ-3, 8, 9 が関与することが明確となった。ミトコンドリア経路については、ミトコンドリア膜電位は低下せず、Bax の活性化によりミトコンドリアからシトクロム c が放出されることが確認出来た。RKIP 活性の測定結果より、DMTreC16 はがん細胞に対するアポトーシス誘導に RKIP の活性化が関与していることを明らかにした。

第 4 章では、DMTreCn (n=12, 14, 16) の肝臓がん細胞 (Hep-G2, HuH-7) に対する増殖抑制効果を検討した。DMTreCn (n=14, 16) はトレハロース濃度依存的にがん細胞の生存率の減少が得られた。また、DMTreC14 より DMTreC16 の方が高い増殖抑制効果を示した。蛍光脂質含有リポソーム (DMTreCn (n=14, 16)/

NBDPC) を用いてがん細胞 (Hep-G2, HuH-7) への融合・蓄積を検討したところ、DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は、肝臓がん細胞膜及び細胞内に、特異的に経時的に蓄積することを確認出来た。また、DMTreC14 より DMTreC16 の方ががん細胞膜へ融合・蓄積しやすいことが示された。DNA 断片化率の測定及び TUNEL assay の結果より、DMTreC12 はがん細胞に対して DNA 断片化率の増大が見られなかった、DMTreCn (n=14, 16) はトレハロース濃度依存的に DNA 断片化率の増大が見られ、肝臓がん細胞に対してアポトーシスを誘導することが明確となった。カスパーズ-3, 8, 9 活性の測定結果より、DMTreCn (n=14, 16) の肝臓がん細胞におけるアポトーシス誘導にカスパーズ-3, 8, 9 が関与することを初めて明らかにした。ミトコンドリア経路に関しては、HuH-7 細胞の場合は、ミトコンドリア膜電位が低下したが、一方、Hep-G2 細胞では低下しなかった。また、Hep-G2 細胞及び HuH-7 細胞いずれの場合も Bax の活性化によりミトコンドリアからシトクロム c が放出されることを初めて明らかにした。RKIP 活性の測定結果より、DMTreCn (n=14, 16) によるアポトーシス誘導には RKIP の活性化が関与していることが明らかとなった。

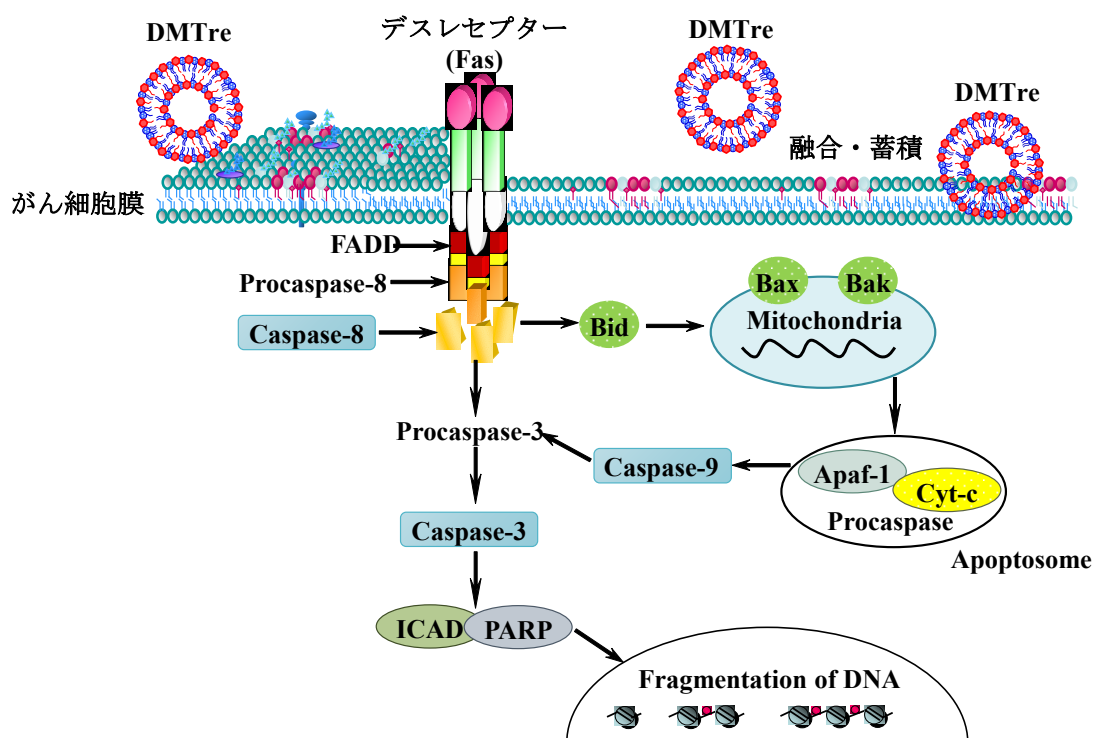


Fig.5-1 Schematic representation of a mechanism for apoptosis of cancer cells induced by DMTreCn.

以上述べたように、65～70mol% DMTreC12、40～50mol%、70mol%DMTreC14、30～55mol%DMTreC16 の膜直径は、37℃ において RES を回避可能な 100nm

付近で、約一ヶ月間安定であり、臨床応用に適している膜を形成することを明らかにした。また、DMTreCn (n=14, 16) が各がん細胞 (HCT-116, MKN-45, Hep-G2, HuH-7) に対し、高い増殖抑制効果を示し、トレハロース濃度依存的な抑制効果が得られ、糖の水和効果が関与していることを明らかにした。さらに、DMTreCn/NBDPC はがん細胞に選択的に融合・蓄積することが示された。がん細胞増殖抑制メカニズムについては、TUNEL 法及びフローサイトメーターによる DNA 断片化率測定によりアポトーシスを誘導することが明確となった。DMTreCn (n=14, 16) のがん細胞におけるアポトーシス誘導にはミトコンドリアからシトクロム c の放出、カスパーズ-3, 8, 9 の活性化、Bax の活性化及び RKIP の活性化が関与することが明らかとなった (Fig.5-1)。

以上より、DMTreCn (n=14, 16) のがん治療薬としての可能性が示唆された。今後、*in vivo* において担がんモデルマウスに対する治療効果及び安全性が確認できれば、がんに対して副作用の少ない、新しい薬剤となることが期待できる。

参考文献

- 1) 百瀬弥寿得, 橋本敬太郎, 「疾病薬学」, 医学評論社 (2007).
- 2) 厚生労働省「人口動態統計」 (<http://www2.ttcn.ne.jp/honkawa/2158.html>)
- 3) Harvard Center for Cancer Prevention: Harvard Report on Cancer Prevention, Volume 1: Causes of Human Cancer, *Cancer Causes Control*, **7**, S3 (1996).
- 4) 吉尾隆, 「薬物治療学」, 南山堂 (2013).
- 5) 秋山真一郎, 阿部博幸, 「最新のがん免疫細胞療法—リンパ球療法から樹状細胞がんワクチンまで」, 永井書店 (2011).
- 6) J. P. May, S. D. Li, *Expert. Opin. Drug Deliv.*, **10**, 511 (2013).
- 7) M. Peck-Radosavljevic, T. F. Greten, J. Lammer, O. Rosmorduc, B. Sangro, A. Santoro, L. Bolondi, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **22**, 391 (2010).
- 8) J. L. Raoul, B. Sangro, A. Forner, V. Mazzaferro, F. Piscaglia, L. Bolondi, R. Lencioni, *Cancer Treat. Rev.*, **37**, 212 (2011).
- 9) N. Beraza, L. Ofner-Ziegenfuss, H. Ehedego, M. Boekschoten, S. C. Bischoff, M. Mueller, M. Trauner, C. Trautwein, *Gut.*, **60**, 387 (2011).
- 10) R. Ueoka, R. A. Moss, S. Swarup, Y. Matsumoto, G. Straus, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185 (1985).
- 11) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R. A. Moss, S. Swarup, A. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988).
- 12) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Ichihara, T. Kiyokawa, *Am. Chem. Soc. Books*, **177** (2002).
- 13) H. Ichihara, H. Nagami, T. Kiyokawa, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2008).
- 14) K. Nakano, Y. Iwamoto, W. Takata, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3251 (2002).
- 15) Y. Iwamoto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **292**, 231 (2005).
- 16) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 380 (2006).
- 17) S. Shimoda, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **372**, 162 (2009).
- 18) S. Shimoda, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **38**, 134 (2009).
- 19) Y. Matsumoto, T. Kato, Y. Kemura, M. Tsuchiya, M. Yamamoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **53**, (1999).
- 20) Y. Matsumoto, Y. Iwamoto, T. Matsushita, R. Ueoka, *Int. J. Cancer*, **115**, 377 (2005).
- 21) H. Nagami, K. Nakano, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 782 (2006).

- 22) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **315**, 167 (2006).
- 23) Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131 (2006).
- 24) 船本幸太, 市原英明, 松下琢, 松本陽子, 上岡龍一, 薬学雑誌, **129**, 465 (2009).
- 25) H. Ichihara, K. Funamoto, T. Matsushita, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **394**, 174 (2010).
- 26) 松岡裕介, 永田未歩, 古水雄志, 市原英明, 川瀬史郎, 澤田幸治, 松本陽子, 上岡龍一, 薬学雑誌, **128**, 1485 (2008).
- 27) H. Ichihara, Y. Matsuoka, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **30**, 2011 (2010).
- 28) T. Towata, Y. Komizu, S. Suzu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, S. Okada, *Leuk. Res.*, **34**, 906 (2010).
- 29) T. Towata, Y. Komizu, S. Suzu, R. Ueoka, S. Okada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 445 (2010).
- 30) 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).
- 31) R. Ueoka, Y. Komizu, Y. Matsumoto, Y. Zhong, R. Tanaka, N. Yamamoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 4578 (2008).
- 32) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Oyama, H. Takekuma, M. Iio, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4640 (1988).
- 33) Y. Matsumoto, E. Yamada, J. Hirano, M. Oshige, M. Iio, M. Iwahara, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 213 (1993).
- 34) I. Kitamura, M. Kochi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, J. Kuratsu, Y. Ushio, *Cancer Res.*, **56**, 3986 (1996).
- 35) M. Umebayashi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1816 (2008).
- 36) M. Umebayashi, T. Makizono, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **30**, 327 (2010).
- 37) Y. Matsumoto, T. Kato, H. Suzuki, S. Hirose, Y. Naiki, M. Hirashima, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2617 (2000).
- 38) R. Ueoka, Y. Matsumoto, S. Hirose, K. Goto, M. Goto, S. Furusaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 563 (2002).
- 39) Y. Matsumoto, Y. Tanaka, K. Goto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **37**, 118 (2008).
- 40) 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).
- 41) 人工細胞へのアプローチ 化学(増刊), 化学同人 (1998).
- 42) A. D. Bangham, R. W. Horne, *J. Mol. Biol.*, **8**, 660 (1964).

- 43) A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965).
- 44) S. Yokoyama, A. Inagaki, T. Imura, T. Ohkubo, N. Tsubaki, H. Sakai, M. Abe, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **44**, 204 (2005).
- 45) A. D. Bangham, M. W. Hill, *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 189 (1986).
- 46) 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).
- 47) D. Papahadjopoulos, J. C. Watkins, *Biochem. Biophys. Acta*, **135**, 639 (1967).
- 48) 小倉治夫, 「複合糖脂質の化学」, シーエムシー (2000).
- 49) 永井克孝, 細胞工学, **5**, 7 (1986).
- 50) 谷口直之, 川寄敏祐, 古川鋼一, 木全弘治, 鈴木明身, 「蛋白質核酸酵素増刊糖鎖機能・第三の鎖」, **48**, 8 (2003).
- 51) G. Sessa, G. Weissmann, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3295 (1970).
- 52) S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science*, **175**, 720 (1972).
- 53) A. Kusumi, T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyama, Z. Kalay, R. S. Kasai, K. G. Suzuki, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 215 (2012).
- 54) G. Vereb, J. Szölloosi, J. Matkó, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Mátyus, T. A. Waldmann, S. Damjanovich, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 8053 (2003).
- 55) G. Gregoriadis, *FEBS Lett.*, **36**, 292 (1973).
- 56) F. Andrade, D. Rafael, M. Videira, D. Ferreira, A. Sosnik, B. Sarmento, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 1816 (2013).
- 57) W. J. Van Blitterswijk, R. P. Van Hoeven, B. W. Van der Meer, *Biochim. Biophys. Acta*, **644**, 323 (1981).
- 58) G. Haran, R. Cohen, L. K. Bar, Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, **1151**, 201 (1993).
- 59) G. Gregoriadis, E. J. Wills, C. P. Swain, *A. S. Tavill. Lancet*, **29**, 1313 (1974).
- 60) 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).
- 61) P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringgold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 7413 (1987).
- 62) 山川民夫, 「糖脂質物語」, 講談社学術文庫 (1981).
- 63) 永井克孝, 細胞工学, **5**, 7 (1986).
- 64) 永井克孝, 実験医学, **5**, 11 (1988).
- 65) S. Hakomori, *Sci. Am.*, **254**, 44 (1986).
- 66) Y. Ohashi, M. Iwamori, T. Ogawa, Y. Nagai, *Biochemistry*, **26**, 3990 (1987).
- 67) S. Hakomori, R. Kannagi, *J. Natl. Cancer Inst.*, **71**, 231 (1983).
- 68) K. Inai, E. Kou, S. Nambu, S. Tokuoka, *Acta. Pathol. Jpn.*, **37**, 537 (1987).

- 69) C. B. Hirschberg, M. D. Snider, *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 63 (1987).
- 70) 川喜田正夫, 石田信宏, 吉岡草美, 細胞工学, **9**, 49 (1997).
- 71) 木幡陽, 薬学雑誌, **104**, 823 (1984).
- 72) 木幡陽, 第 28 回日本薬学大会関東支部大会 要旨集, 39 (1984).
- 73) 日本化学会, 「糖鎖/バイオマテリアル/分子認識/バイオインフォマティクス」, 丸善 (2005).
- 74) S. Hakomori, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **845**, 1 (1998).
- 75) K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **1**, 31 (2000).
- 76) K. Simons, E. Ikonen, *Nature*, **387**, 569 (1997).
- 77) H. A. L. Wiggers, *Annalen der Pharmacie*, **1**, 129 (1832).
- 78) M. Berthelot, *Liebigs Ann.*, **109**, 1 (1859).
- 79) K. Maruta, T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto, Y. Tsujisaka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1829 (1995).
- 80) G. Pietramaggiore, A. Kaipainen, D. Ho, C. Orser, W. Pebley, A. Rudolph, D. P. Orgill, *Wound Repair Regen.*, **15**, 213 (2007).
- 81) J. H. Crowe, J. F. Carpenter, L. M. Crowe. *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 73 (1998).
- 82) W. F. Wolkers, N. J. Walker, F. Tablin, J. H. Crowe. *Cryobiology*, **42**, 79 (2001).
- 83) J. H. Crowe, F. Tablin, W. F. Wolkers, K. Gousset, N. M. Tsvetkova, J. Ricker. *Chem. Phys. Lipids*, **122**, 41 (2003).
- 84) S. G. Quaak, J. B. Haanen, J. H. Beijnen, B. Nuijen, *AAPS PharmSciTech*, **11**, 344 (2010).
- 85) A. Younis, D. Carnovale, W. Butler, A. Eroglu, *J. Assist. Reprod. Genet.*, **26**, 341 (2009).
- 86) S. Leekumjorn, Y. Wu, A. K. Sum, C. Chan, *Biophys. J.*, **94**, 2869 (2008).
- 87) H. He, S. Oka, Y. K. Han, Y. Yamamura, E. Kusunose, M. Kusunose, I. Yano, *FEMS Microbiol. Immunol.*, **3**, 201 (1991).
- 88) D. Nolibe, R. Masse, J. P. Tenu, M. Lepoivre, J. F. Petit, *Cancer Immunol. Immunother.*, **23**, 200 (1986).
- 89) E. Yarkoni, H. J. Rapp, J. Polonsky, E. Lederer, *Int. J. Cancer*, **22**, 564 (1978).
- 90) E. Yarkoni, M. S. Meltzer, H. J. Rapp, *Int. J. Cancer*, **19**, 818 (1977).
- 91) R. Watanabe, Y. C. Yoo, K. Hata, M. Mitobe, Y. Koike, M. Nishizawa, D. M. Garcia, Y. Nobuchi, H. Imagawa, H. Yamada, I. Azuma. *Vaccine*, **17**, 1484 (1999).
- 92) S. Orbach-Arbouys, J. P. Tenu, J. F. Petit, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **71**, 67 (1983).
- 93) D. Reisser, J. F. Jeannin, F. Martin, *C. R. Acad. Sci. III.*, **298**, 181 (1984).
- 94) E. Sueoka, S. Nishiwaki, S. Okabe, N. Iida, M. Suganuma, I. Yano, K. Aoki,

- H. Fujiki. *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 749 (1995).
- 95) S. Okabe, M. Suganuma, Y. Tada, Y. Ochiai, E. Sueoka, H. Kohya, A. Shibata, M. Takahashi, M. Mizutani, T. Matsuzaki, H. Fujiki. *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**, 669 (1999).
- 96) Y. Ohtsubo, M. Furukawa, T. Imagawa, N. Sugimoto, M. Ikutoh, S. Nakatsugi, Y. Katoh, S. Shinka, Y. Dohi, *Immunology*, **74**, 497 (1991).
- 97) H. Kohya, F. Ishii, S. Takano, T. Katori, T. Ebina, N. Ishida. *Jpn. J. Cancer Res.*, **77**, 602 (1986).
- 98) Y. Ozeki, K. Kaneda, N. Fujiwara, M. Morimoto, S. Oka, I. Yano. *Infect. Immun.*, **65**, 1793 (1997).
- 99) R. Shirakashi, C. M. Köstner, K. J. Müller, M. Kürschner, U. Zimmermann, V. L. Sukhorukov, *J. Membr. Biol.*, **189**, 45 (2002).
- 100) H. Mussauer, V. L. Sukhorukov, U. Zimmermann, *Cytometry*, **45**, 161 (2001).
- 101) G. M. Beattie, G. Leibowitz, A. D. Lopez, F. Levine, A. Hayek, *Cell Transplant.*, **9**, 431 (2000).
- 102) 行原真美子, 崇城大学大学院 博士論文 (2011).
- 103) B. J. Berne, R. Pecora, *John. Wiley.*, **376**, (1976).
- 104) M. Shinitzky, Y. Barenholz, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2652 (1974).
- 105) G. A. Truskey, J. S. Burmeister, E. Grapa, W. M. Reichert, *J. Cell Sci.*, **103**, 491 (1992).
- 106) M. Shinitzky, Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 367 (1978).
- 107) J. Sunamoto, K. Iwamoto, K. Inoue, T. Endo, S. Nojima, *Biochim. Biophys. Acta*, **586**, 283 (1982).
- 108) K. Shiimada, A. Miyagishima, Y. Sadzuka, Y. Nozawa, Y. Mochizuki, H. Oshima, S. Hirota, *J. Drug Target.*, **3**, 283 (1995).
- 109) 関口有信, 荻野圭三, 山内仁史, 阿部正彦, 油化学, **44**, 184 (1995).
- 110) 広田貞雄, 佐塚泰之, 日本油化学会誌, **45**, 1125 (1996).
- 111) 高木俊夫, 電気泳動学会総会, **36**, 21 (1992).
- 112) 大島広行, 尾崎正孝, 北原文雄, 古澤邦夫, 「ゼータ電位—微粒子界面の物理化学—」, サイエンス社, (1995).
- 113) 小川一誠, 「実践がん化学療法」, 篠原出版新社 (2001).
- 114) J. Marx, *Science*, **301**, 452 (2003).
- 115) H. Inoue, M. Mori, M. Honda, J. Li, K. Shibuta, K. Mimori, H. Ueo, T. Akiyoshi, *Gastroenterology*, **109**, 1522 (1995).
- 116) 秋山真一郎, 阿部博幸, 「最新のがん免疫細胞療法」, 永井書店 (2011).
- 117) J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, *Br. J. Cancer*, **26**, 239 (1972).

- 118) A. H. Wyllie, *Nature*, **284**, 555 (1980).
- 119) D. Xue, H. R. Horvitz, *Nature*, **290**, 305 (1997).
- 120) B. Conradt, H. R. Horvitz, *Cell*, **93**, 519 (1998).
- 121) J. Suzuki, D. P. Denning, E. Imanishi, H. R. Horvitz, S. Nagata, *Science*, **341**, 403 (2013).
- 122) D. Brenner, T. W. Mak, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 871 (2009).
- 123) A. Chalah, R. Khosravi-Far, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **651**, 25 (2008).
- 124) L. A. Pradelli, M. Bénéteau, J. E. Ricci, *Cell. Mol. Life Sci.*, **67**, 1589 (2010).
- 125) Y. Rong, C. W. Distelhorst, *Annu. Rev. Physiol.*, **70**, 73 (2008).
- 126) D. Speidel, *Trends Cell Biol.*, **20**, 14 (2010).
- 127) D. F. Suen, K. L. Norris, R. J. Youle, *Genes Dev.*, **22**, 1577 (2008).
- 128) D. R. Hunter, R. A. Haworth, J. H. Southard, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5069 (1976).
- 129) K. Yeung, T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy, W. Kolch, *Nature*, **401**, 173 (1999).
- 130) K. Lorenz, M. J. Lohse, U. Qwitterer, *Nature*, **426**, 574 (2003).
- 131) G. Odabaei, D. Chatterjee, A. R. Jazirehi, L. Goodglick, K. Yeung, B. Bonavida, *Adv. Cancer Res.*, **91**, 169 (2004).
- 132) E. T. Keller, Z. Fu, M. Brennan, *J. Cell Biochem.*, **94**, 273 (2005).
- 133) A. R. Jazirehi, M. I. Vega, D. Chatterjee, L. Goodglick, B. Bonavida, *Cancer Res.*, **64**, 7117 (2004).
- 134) M. D. Gober, S. Q. Wales, L. Aurelian, *Front. Biosci.*, **1**, 2788 (2005).
- 135) R. Ueoka, Y. Matsumoto, K. Goto, H. Ichihara, Y. Komizu, *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 1709 (2011).
- 136) 金納明宏, 寺田安隆, 津崎健二, 松本陽子, 上岡龍一, *Drug Delivery System*, **14**, 37 (1999).
- 137) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sakamoto, M. Mizoguchi, H. PinGang, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118 (1993).
- 138) 野島博, 「改訂 顕微鏡の使い方ノート」, 羊土社 (2003).
- 139) 高田邦明, 「初めてでもできる共焦点顕微鏡」, 羊土社 (2004).
- 140) 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, (1995).
- 141) 中内啓光, 「フローサイトメトリー自由自在」, 秀潤社 (1999).
- 142) R. S. Douglas, A. D. Tarshis, C. H. Jr. Pletcher, P. C. Nowell, J. S. Moore, *J. Immunol. Methods*, **188**, 219 (1995).
- 143) Y. Gavrieli, Y. Sherman, S. A. Ben-Sasson, *J. Cell Biol.*, **119**, 493 (1992).

- 144) A. Komoriya, B. Z. Packard, M. J. Brown, M. L. Wu, P. A. Henkart, *J. Exp. Med.*, **191**, 1819 (2000).
- 145) W. G. Telford, A. Komoriya, B. Z. Packard, *Cytometry*, **47**, 81 (2002).
- 146) B. Z. Packard, A. Komoriya, T. M. Brotz, P. A. Henkart, *J. Immunology.*, **167**, 5061 (2001).
- 147) D. Lukovic, A. Komoriya, B. Z. Packard, D. S. Ucker, *Exp. Cell Res.*, **289**, 384 (2003).
- 148) 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).
- 149) W. G. Telford, A. Komoriya, B. Z. Packard, *Methods Mol. Biol.*, **263**, 141 (2004).
- 150) 田沼 靖一, 「アポトーシスと医学」, 羊土社 (2001).
- 151) 秋山 徹, 「シグナル伝達がわかる」, 羊土社 (2001).
- 152) 内藤幹彦, 片山量平, 石岡利康, 鶴尾隆, *細胞工学*, **63**, 17 (2005).
- 153) R. W. Sabnis, T. G. Deligeorgiev, M. N. Jachak, T. S. Dalvi, *Biotech. Histochem.*, **72**, 253 (1997).
- 154) M. Tafani, N. O. Karpnich, K. A. Hurster, J. G. Pastorino, T. Schneider, M. A. Russo, J. L. Farber, *J. Biol. Chem.*, **277**, 10073 (2002).
- 155) X. Liu, C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, X. Wang, *Cell*, **86**, 147 (1996).
- 156) C. J. Chen, H. I. Yang, J. Su, C. L. Jen, S. L. You, S. N. Lu, G. T. Huang, U. H. Iloeje, *JAMA.*, **4**, 295 (2006).
- 157) K. Kashiwagi, N. Furusyo, N. Kubo, H. Nakashima, H. Nomura, S. Kashiwagi, J. Hayashi, *J. Infect. Chemother*, **9**, 333 (2003).
- 158) 日本肝がん研究会, 「原発性肝がん取扱規約」, (第5版), 金原出版 (2009).
- 159) 高橋秀和, 水谷伸, 西田俊朗, *日本消化器外科学会雑誌*, **40**, 1485 (2007).
- 160) N. Uozumi, S. Yanagidani, E. Miyoshi, Y. Ihara, T. Sakuma, C. X. Gao, T. Teshima, S. Fujii, T. Shiba, N. Taniguchi, *J. Biol. Chem.*, **271**, 27810 (1996).
- 161) S. Yanagidani, N. Uozumi, Y. Ihara, E. Miyoshi, N. Yamaguchi, N. Taniguchi, *J. Biochem.*, **121**, 626 (1997).
- 162) K. Noda, E. Miyoshi, N. Uozumi, S. Yanagidani, Y. Ikeda, C. Gao, K. Suzuki, H. Yoshihara, K. Yoshikawa, K. Kawano, N. Hayashi, M. Hori, N. Taniguchi, *Hepatology*, **28**, 944 (1998).
- 163) M. Capurro, I. R. Wanless, M. Sherman, G. Deboer, W. Shi, E. Miyoshi, J. Filmus, *Gastroenterology*, **125**, 89 (2003).
- 164) H. Lahm, S. André, A. Hoefflich, J. R. Fischer, B. Sordat, H. Kaltner, E. Wolf, H.-J. Gabius, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **127**, 375 (2001).
- 165) D. K. Hsu, C. A. Dowling, K. C. G. Jeng, J.-T. Chen, R.Y. Yang, F.T. Liu, *Int. J.*

- Cancer*, **81**, 519 (1999).
- 166) A. Satelli, P. S. Rao, P. K. Gupta, P. R. Lockman, K. S. Srivenugopal, U. S. Rao, *Oncol. Rep.*, **19**, 587 (2008).
- 167) C. Longman, M. Brockington, S. Torelli, C. Jimenez-Mallebrera, C. Kennedy, N. Khalil, L. Feng, R. K. Saran, T. Voit, L. Merlini, C. A. Sewry, S. C. Brown, F. Muntoni, *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2853 (2003).
- 168) T. Endo, *glycoconj. J.*, **21**, 3 (2004).
- 169) A. Suzuki, M. Hayashida, H. Kawano, K. Sugimoto, T. Nakano, K. Shiraki, *Hepatology*, **32**, 796 (2000).
- 170) D. F. Calvisi, S. Ladu, A. Gorden, M. Farina, E. A. Conner, J. S. Lee, V. M. Factor, S. S. Thorgeirsson, *Gastroenterology*, **130**, 1117 (2006).
- 171) E. A. Turley, M. Veiseh, D. C. Radisky, M. J. Bissell, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **5**, 280 (2008).
- 172) I. Fabregat, *World J. Gastroenterol*, **15**, 513 (2009).
- 173) S. P. Hussain, J. Schwank, F. Staib, X. W. Wang, C. C. Harris, *Oncogene*, **26**, 2166 (2007).
- 174) J. J. Bao, W. W. Zhang, M. T. Kuo, *Hum. Gene Ther.*, **7**, 355 (1996).
- 175) P. A. Farazi, J. Glickman, J. Horner, R. A. Depinho, *Cancer Res.*, **66**, 4766 (2006).
- 176) S. H. Lee, M. S. Shin, H. S. Lee, J. H. Bae, H. K. Lee, H. S. Kim, S. Y. Kim, J. J. Jang, M. Joo, Y. K. Kang, W. S. Park, J. Y. Park, R. R. Oh, S. Y. Han, J. H. Lee, S. H. Kim, J. Y. Lee, J. J. Yoo, *Hum. Pathol.*, **32**, 250 (2001).
- 177) X. P. Chen, S. Q. He, H. P. Wang, Y. Z. Zhao, W. G. Zhang, *World J. Gastroenterol*, **9**, 2433 (2003).
- 178) I. Herr, P. Schemmer, M. W. Büchler, *Hepatology*, **46**, 266 (2007).
- 179) I. Fabregat, C. Roncero, M. Fernández, *Liver Int.*, **27**, 155 (2007).
- 180) J. L. Mott, G. J. Gores, *Hepatology*, **46**, 906 (2007).
- 181) T. Takehara, X. Liu, J. Fujimoto, S. L. Friedman, H. Takahashi, *Hepatology*, **34**, 55 (2001).
- 182) W. Sieghart, D. Losert, S. Strommer, D. Cejka, K. Schmid, S. Rasoul-Rockenschaub, M. Bodingbauer, R. Crevenna, B. P. Monia, M. Peck-Radosavljevic, V. Wacheck, *J. Hepatol.*, **44**, 151 (2006).
- 183) W. Beerheide, Y. J. Tan, E. Teng, A. E. Ting, A. Jedpiyawongse, P. Srivatanakul, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 54 (2000).
- 184) G. G. Chen, P. B. Lai, P. K. Chan, E. C. Chak, J. H. Yip, R. L. Ho, B. C. Leung, W. Y. Lau, *Eur. J. Cancer*, **37**, 1695 (2001).
- 185) Y. H. Shi, W. X. Ding, J. Zhou, J. Y. He, Y. Xu, A. A. Gambotto, H. Rabinowich,

- J. Fan, X. M. Yin, *Hepatology*, **48**, 497 (2008).
- 186) S. Tanaka, Y. Numasaki, H. Maeda, *Gan To Kagaku Ryoho*, **18**, 2295 (1991).
- 187) H. Maeda, T. Konno, K. Iwai, S. Maki, S. Tashiro. *Gan To Kagaku Ryoho*, **11**, 814 (1984).
- 188) サンペトラ・オルテア, 佐谷秀行, 実験医学, **27**, 642 (2009).
- 189) 臼田篤伸, 「抗がん剤は転移促進剤」, 農山漁村文化協会 (2005).
- 190) S. Desagher, A. Osen-Sand, A. Nichols, R. Eskes, S. Montessuit, S. Lauper, K. Maundrell, B. Antonsson, J. C. Martinou, *J. Cell Biol.*, **144**, 891 (1999).
- 191) R. Eskes, B. Antonsson, A. Osen-Sand, S. Montessuit, C. Richter, R. Sadoul, G. Mazzei, A. Nichols, J. C. Martinou, *J. Cell Biol.*, **143**, 217 (1998).
- 192) D. M. Finucane, E. Bossy-Wetzel, N. J. Waterhouse, T. G. Cotter, D. R. Green, *J. Biol. Chem.*, **274**, 2225 (1999).
- 193) Q. Sun, J. Hua, Q. Wang, W. Xu, J. Zhang, J. Zhang, J. Kang, M. Li, *Mol. Biol. Rep.*, **39**, 6753 (2012).
- 194) W. P. van Beek, L. A. Smets, P. Emmelot, *Cancer Res.*, **33**, 2913 (1973).
- 195) W. P. van Beek, L. A. Smets, P. Emmelot, *Nature*, **6**, 457 (1975).
- 196) M. C. Glick, H. Schlesinger, K. Hummeler, *Cancer Res.*, **36**, 4520 (1976).
- 197) 岡博, 石井威望, 「がん」, 第5巻, 中山書店 (1984).
- 198) 行原真美子, 古水雄志, 田上修, 松下琢, 松本陽子, 上岡龍一, 薬学雑誌, **130**, 1581 (2010).
- 199) Y. Tanaka, K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **359**, 264 (2008).
- 200) K. Goto, Y. Tanaka, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 1880 (2008).

謝辞

本研究を行う上で、終始御懇切な御指導並びに御鞭撻を受け賜り、また本論文を作成するにあたり御指導下さいました松本陽子教授に謹んで深く感謝を申し上げます。

本研究を進めるにあたり、貴重な御教示並びに御助言を頂きました上岡龍一名誉教授に心より深く感謝致します。

本論文を作成するにあたり、貴重な御教示並びに御助言を頂きました後藤浩一教授、寺本祐司教授に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、貴重な御教示並びに御助言を頂きました松下琢教授、市原英明准教授、古水雄志博士研究員に心より深く感謝致します。

講義または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並びに御助言を頂きましたことを謹んで感謝を申し上げます。

本研究を進めるにあたり、実験面で御協力して頂きました片平あみさん、瀨雪未さん、本田祥大君に深く感謝致します。

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日野元貴君ならびに、同研究室の学生諸君の皆様に深く感謝致します。

さらに、日本で留学中に御支援を頂きました公益財団法人平和中島財団、公益財団法人ロータリー米山記念奨学会、熊本グリーンロータリークラブ等の方々に謹んで感謝を申し上げます。

最後に、日本への留学の機会を頂き、永年にわたり愛情深く育ててくれた両親に感謝の意を表します。