

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18931

研究課題名(和文)67LRへの標的指向型EGCG-PEG修飾リポソームの抗腫瘍効果と増強機序の検討

研究課題名(英文)Study of antitumor effect and mechanism of EGCG-PEG modified liposome for 67LR targeting

研究代表者

杉山 育美 (Sugiyama, Ikumi)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：80509050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：67 kDaラミニンレセプター(67LR)が高発現するがん細胞に対する抗腫瘍効果の増大を目的にポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソームに(-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)を修飾したEGCG-PEG修飾リポソーム(EPL)の有用性を評価した。B16F10マウスメラノーマ細胞を背部皮下に移植した担癌マウスにEPLを投与した結果、PEG修飾リポソーム(PL)に比べて強い抗腫瘍効果が認められた。EPLは腫瘍中カスパーゼ3を活性化したことよりアポトーシスが誘導されたことが明らかとなった。EPLは副作用が少なく、治療効果に優れた製剤となることが期待された。

研究成果の概要(英文)：We studied usability of (-)-epigallocatechin-3-gallate and polyethyleneglycol modified liposomal doxorubicin (EPL) for increase antitumor effect against high grade tumor cell with 67 kDa laminin receptor (67LR). EGCG-monoamine, novel EGCG-derivative was synthesized, was used as modified molecular on liposomal membrane. When tumor bearing mice which was subcutaneously planted on B16F10 mouse melanoma cells was administered EPL, antitumor effect of EPL was stronger than that of PEG modified liposomal doxorubicin (PL). Moreover, EPL became activated caspase-3 in tumor, namely it induced apoptosis by binding 67LR on tumor cells. In conclusion, it was expected that EPL was superior formulation for cancer treatment.

研究分野：Drug delivery system

キーワード：リポソーム EGCG ラミニンレセプター 抗腫瘍効果

## 1. 研究開始当初の背景

がんは現代病のひとつであり、3人に1人はがんに罹患することが報告されている。そのため、外科的手術や放射線治療のみならず分子標的薬をはじめとする多くの制がん剤が開発され、数か月から数年の延命効果が得られている。その一方で、数年後に再発や転移を発症する患者も多く、根本的な解決に至っていないのが現状である。以上の背景より、腫瘍細胞への標的性の向上や転移する悪性度の高い腫瘍細胞に対する治療効果の増大を可能にする製剤の開発が期待されている。

抗腫瘍効果を増大させるための戦略として、薬物キャリアであるリポソームを用いることとした。また、リポソーム膜表面へのリガンド修飾が有用であると考えた。修飾するリガンドとしては悪性度の高い腫瘍細胞に高発現する受容体を標的とすることが効果の増強と副作用の軽減を実現するために重要なポイントとなると考えられた。

これまでにリポソーム膜表面へのリガンドとして葉酸やラクトフェリンを修飾し受容体を介して標的性の増大に基づく治療効果の増大が認められることが報告されている。

一方、悪性度の高い腫瘍細胞にはラミニンに結合する細胞膜タンパク質として同定されている分子である 67 kDa ラミニンレセプター (67LR) が高発現していることが報告されていることより、リガンドが結合する受容体として利用できる可能性が示唆された。67LR には茶カテキンのひとつである (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) が特異的に結合することが報告されていた。

以上より、申請者はこれまで、EGCG を制がん剤内封リポソーム膜表面に修飾することは、優れた標的性と相乗効果により、少ない副作用で悪性度の高い腫瘍を治療可能であるとの仮説をたて検討を試みてきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、茶カテキンのひとつである EGCG をリポソーム膜表面に修飾することにより、悪性度の高い 67LR 高発現腫瘍細胞を移植した担癌マウスに対する抗腫瘍効果を評価すること、およびその増強メカニズムを解明することである。制がん剤を内封したリポソームに EGCG および PEG を修飾することにより、優れた薬効を発現するための薬物キャリアとして重要な血中滞留性、腫瘍標的性、抗腫瘍効果の3つの要素が増大し、最小限の副作用で最大限の薬効が期待できると考えた。申請者らはこれまでに EGCG と PEG を修飾したドキシソルピシン (DOX) 内封リポソームが殺細胞効果を増大し、血中滞留性に優れていることを明らかにしてきた。本検討では *in vivo* にて DOX 内封 EGCG-PEG 修飾リポソームの抗腫瘍効果を評価した。さらに、これら現象のメカニズムの解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) リポソームの調製方法・物性評価方法

薄膜法にてリポソームを調製した。PEG 脂質としてサクシニル基を有する DSPE-PEG-NHS を用い、EGCG 誘導体 (アミン体) と反応させることによりリポソーム膜表面に PEG と EGCG を修飾した。リポソームには DOX を内封した。

リポソームの粒子径および表面電位はゼータサイザー Nano-ZS (マルバーン) を用いて測定した。DOX の内封量は分光蛍光光度計 (Em: 500 nm, Ex: 550 nm) を用いて検量線より算出した。EGCG の修飾量は DPP assay にて測定した。

### (2) EGCG 誘導体の合成

10% 酢酸、EGCG、2-(Boc-amino) ethanethiol を反応させた後、濃縮した。その後、抽出操作を行い目的とする物質を得た。TLC にて EGCG 誘導体を確認した。

### (3) ウェスタンブロッティング法

B1610 マウスメラノーマ細胞、P388 マウス白血病細胞、M5076 マウス卵巣肉腫細胞、U266 ヒト骨髄腫細胞を細胞溶解液で処理し用いた。ラミニンに対する 1 次抗体は抗 67 kDa LR (1/1000) を、2 次抗体は donkey anti-goat IgG-HRP (1/2000) を用いた。

### (4) 抗腫瘍効果検討・組織分布評価

C57BL/6 マウス (雄性、5 週齢) の背部皮下に B16F10 マウスメラノーマ細胞を移植し、移植 8、11、14 日目にサンプルを尾静脈内投与した。試験期間中は体重および腫瘍体積を測定した。

最終投与から 48 時間後に採血を行い、その後、解剖することにより腫瘍をはじめ各臓器を摘出した。血漿中および組織中 DOX 濃度を分光蛍光光度計 (Em: 500 nm, Ex: 550 nm) を用いて測定した。

### (5) 腫瘍細胞への薬物移行性検討

B16F10 マウスメラノーマ細胞に各サンプルを添加し、37℃ でインキュベーションし、30 分まで経時的にサンプリングした。サンプリングした細胞は洗浄後、細胞内 DOX 濃度を方法(4)と同様に測定した。

### (6) アポトーシス誘導の評価

カスパーゼ 3 を測定するキットである ApoAlert caspase fluorescent assay kits (Clontech 社製) を用い、7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリンを測定することにより算出した。測定サンプルは、抗腫瘍効果の検討で摘出した腫瘍をホモジネートし、測定に用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) EGCG 誘導体の合成

EGCG をリポソーム膜表面に修飾した PEG と結合させるために、新規に EGCG 誘導体を合成した。末端がサクシニル基となっている PEG 分子量 2000 の PEG 脂質が日油より発売されていることより、アミノ基を有する EGCG を合成した。合成した結果、アミノ基を有する EGCG-monoamine および EGCG-diamine を得た(図1)。殺細胞効果、リポソームへの修飾率において、両者に大きな違いは認められなかったことより、検討には合成効率の良い EGCG-monoamine を用いた。

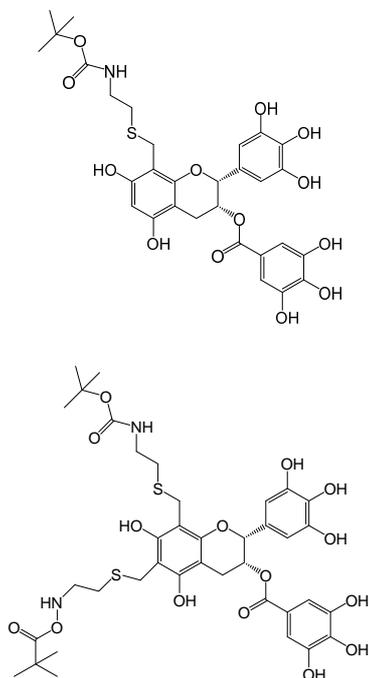


図1 EGCG-monoamine および EGCG-diamine の構造式

##### (2) EGCG-PEG 修飾リポソームの物性

EGCG-PEG 修飾リポソーム (EPL) の粒子径は  $145.9 \pm 0.7$  nm、表面電位は  $-5.2$  mV であった。内封された制がん剤 DOX は  $320 \mu\text{g/mL}$  であった。EGCG を修飾していない PEG 修飾リポソーム (PL) と比較すると、粒子径および DOX 内封量は同程度であったが、表面電位は EGCG の修飾によって絶対値が小さくなった。これは、EGCG がリポソーム膜表面に修飾されていることを示していると考えられた。

##### (3) 67LR の発現

67LR は悪性度の高い腫瘍細胞に高発現していることが報告されているが、本検討に先立ち、使用する細胞の選定およびその発現量を明らかにするために 67LR の発現を確認した。本研究室が保有する細胞のうち、B16F10

マウスメラノーマ細胞、P388 マウス白血病細胞、M5076 マウス卵巣肉腫細胞、U266 ヒト骨髄腫細胞について評価した。その結果、B16F10 マウスメラノーマ細胞および U266 ヒト骨髄腫細胞にて 67LR が発現していることを確認した。また、M5076 卵巣肉腫細胞にもわずかに発現が認められ、P388 白血病細胞には 67LR が発現していないことが明らかとなった。

##### (4) EGCG-PEG 修飾リポソームの抗腫瘍効果

本検討では、B16F10 マウスメラノーマ細胞を使用した。各群の腫瘍体積はサンプル投与 2 回目から差が認められた。Tachibana らの報告と同様に、EGCG 水溶液投与においてもコントロール群に比べて腫瘍増殖抑制効果が認められた。リポソームである PL および EPL 投与群の腫瘍増殖抑制効果は EGCG 水溶液投与群よりも強く認められ、特に EPL 投与群において強い腫瘍増殖抑制効果が得られた。

解剖時の腫瘍重量は  $\text{EPL} < \text{PL} = \text{PL} + \text{EGCG}$  水溶液の併用群 (PL+E)  $<$  DOX 水溶液 (DOX sol)  $<$  EGCG 水溶液 (EGCG sol) の順であり、EPL の腫瘍重量はコントロール群 ( $p < 0.01$ )、DOX sol 群 ( $p < 0.05$ ) に対して有意に減少した(図2)。EGCG を水溶液として併用投与した場合、全身へ分布することが考えられ、標的部位への到達量が不足するために PL+E 群の抗腫瘍効果は PL 群と同程度になったことが考えられた。また、PL に比べて EPL の抗腫瘍効果が増大したことより、リポソーム膜表面への EGCG 修飾により、標的部位への到達後に EGCG による抗腫瘍効果増強作用が発揮されていることが示唆された。

試験期間中の体重変化はいずれの群においても差は認められず、リポソーム投与による副作用はないことが示唆された。

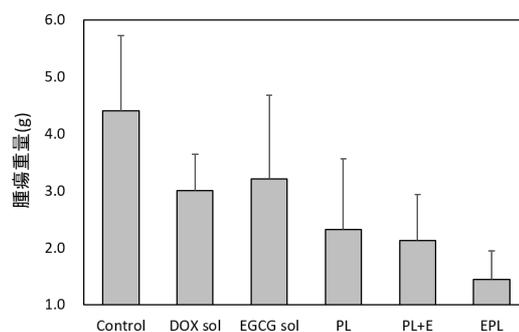


図2 解剖時の腫瘍重量

##### (5) EGCG-PEG 修飾リポソームの組織分布

3 回目のサンプル投与 48 時間後の各組織中 DOX 濃度を測定した。

PL 投与群、PL+E 投与群、EPL 投与群の腫瘍中 DOX 濃度はそれぞれ  $29.9 \pm 7.6$ 、 $30.5 \pm 5.6$ 、 $35.2 \pm 12.1 \mu\text{g/g protein}$  であり、わずかに

EPL 投与により高い傾向であるが有意差は認められなかった。

DOX の副作用として重要な心臓への集積は、PL および PL+E 投与群ではおよそ 7  $\mu\text{g/g}$  protein であったのに対し、EPL 投与群では  $5.7 \pm 1.2 \mu\text{g/g}$  protein であり、むしろ集積量は減少する傾向が認められた。

細網内皮系組織である肝臓ではいずれのリポソーム投与群も同程度の DOX 集積量であった。同様に、細網内皮系組織である脾臓においては、PL+E 投与群で最も高い DOX 濃度であり、EPL 投与群は PL+E 投与群の 2 分の 1 以下の集積量であった。すなわち、EPL は脾臓への集積回避に優れていることが明らかとなった。

解剖時の血中 DOX 濃度は、PL および PL+E 投与群は同程度であり、EGCG 水溶液を併用しても PEG 修飾リポソームの血中滞留性は変化しないことが示された。一方、EPL 投与群の血中 DOX 濃度は PL 投与群の約 4 分の 1 であった。PL は passive targeting リポソームであるのに対し、EPL はリポソーム膜表面に EGCG を修飾した active targeting リポソームであることより、投与 48 時間後にはリガンドを有することによる能動的な集積により血中から検出されなかったことが考えられた。

以上の結果より、EPL による正常組織への集積性の増大は認められず、副作用の発現の可能性は低いことが示唆された。

#### (6) 腫瘍細胞内への薬物移行量

EPL において抗腫瘍効果が増大したメカニズムのひとつとして、腫瘍細胞内への DOX の移行量が増大した可能性が考えられた。そこで、腫瘍細胞への DOX 移行を *in vitro* で検討した。リポソームに内封した DOX の腫瘍細胞への移行量は、EGCG を修飾していない PL と同程度であった。また、経時的に細胞をサンプリングし、時間ごとの腫瘍細胞内 DOX 濃度にも相違はなく、EGCG を修飾することによりリポソームから腫瘍細胞への DOX 移行挙動は変化しないことが明らかとなった。すなわち、EPL の抗腫瘍効果は DOX の集積増大以外のメカニズムがあると考えられた。

#### (7) EGCG-PEG 修飾リポソームの抗腫瘍効果増強におけるアポトーシスの関与

EGCG は腫瘍細胞膜表面に存在する 67LR に結合することによりアポトーシスを誘導することが報告されているため、カスパーゼ 3 活性を測定することによりアポトーシスの誘導を評価した。その結果、PL や P+E においてもカスパーゼ 3 が活性化され、そのレベルは DOX 水溶液投与群と同程度であることが明らかとなった。EPL 投与群は有意ではないものの PL 群の 1.5 倍のカスパーゼ 3 活性が認められた (図 3)。すなわち、EGCG を水溶液として投与した場合は、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するのに十分な EGCG の量が得ら

れないが、リポソーム膜表面に EGCG を修飾することにより、腫瘍細胞でのアポトーシスを誘導することが可能であったことが示唆された。

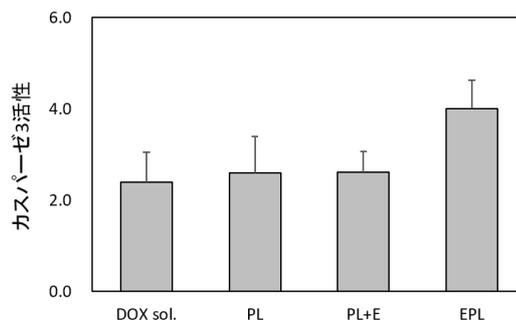


図 3 腫瘍細胞中のアポトーシス誘導

以上の結果より、EGCG と PEG を修飾したリポソームは PEG 修飾リポソームの血中滞留性と腫瘍集積性に加え、腫瘍細胞膜表面に発現した 67LR と EGCG が結合することによるアポトーシス誘導により、相加的もしくは相乗的に抗腫瘍効果を増大させることが明らかとなった。本結果は、抗腫瘍効果の増強のみならず、治療における副作用の発現抑制にも有用であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

杉山育美、開発邦宏、加藤修雄、佐塚泰之、マウスメラノーマ細胞に対する EGCG-PEG 修飾リポソームの有用性、第 32 回日本 DDS 学会学術集会、2016 年 7 月 1 日、静岡

杉山育美、開発邦宏、加藤修雄、佐塚泰之、カテキン受容体介在性リポソームの開発を目的とした EGCG 誘導体の検討、日本薬学会第 31 年会、2016 年 5 月 21 日、岐阜

杉山育美、佐塚泰之、標的指向性の増大を目的とした EGCG のリポソーム化、第 12 回日本カテキン学会年次学術大会、2015 年 12 月 5 日、福岡

杉山育美、佐塚泰之、抗腫瘍効果増強を目的とした EGCG 誘導体の合成とリポソーム修飾、第 54 回日本薬学会東北支部大会、2015 年 9 月 26 日、盛岡

杉山育美、開発邦宏、加藤修雄、佐塚泰之、67kDa ラミニンレセプターを標的とした EGCG 修飾リポソームの体内動態における EGCG 誘導体の検討、第 31 回日本 DDS 学会学術集会、2015 年 7 月 3 日、東京

Ikumi Sugiyama、Yasuyuki Sadzuka、The

Advanced Strategy of Novel EGCG Derivative  
Modified Liposome with High Targeting  
Ability to Tumor, Annual Meeting 2015 of  
the American Association for Cancer  
Research, 2015年4月22日、Philadelphia

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 育美 (SUGIYAMA, Ikumi)  
岩手医科大学・薬学部・助教  
研究者番号：80509050

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )