抗がん剤の物性に着目したがん治療用新規ナノキャリアーの創製
—多面的な抗がん作用を有するビタミン E 誘導体を用いた抗がんナノ粒子の構築—

濱 進

Development of a Novel Nanocarrier Focusing on the Physicochemical Properties of an
Anti-cancer Therapy Drug

—Development of Anti-cancer Nanoparticles Containing Vitamin E Derivative with
Multifaceted Anti-cancer Effect—

Susumu Hama

Department of Biophysical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University; 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku,
Kyoto 607-8414, Japan.

(Received June 10, 2014)

Successful cancer gene therapy is dependent upon the development of nanocarriers that exhibit anti-cancer effects *via* delivery of nucleic acids to the target site in tumor tissue. The effectiveness of such systems has typically relied on the potency of the anti-cancer nucleic acids, as conventional carriers do not exhibit inherent anti-cancer activity, serving only as vehicles for delivery. Ideal nanocarriers for effective cancer gene therapy should not only serve as delivery systems for transporting anti-cancer nucleic acids to the target tumor tissue, but should also exhibit their own inherent anti-cancer activity. α -tocopheryl succinate (TS) has attracted attention as a unique anti-cancer agent for its ability to induce apoptosis in various cancer cells; moreover, TS readily forms nanovesicles (TS-NVs). Thus, vesicles comprised of TS represent prospective tools for use as drug delivery systems (DDS) for cancer therapy. Owing to the low vesicle stability in the presence of divalent cations or serum, however, TS-NVs are not suitable for encapsulating nucleic acids, and require passive targeting delivery to tumor tissue *via* an enhanced permeability and retention effect. To improve the stability of TS-NVs, we developed novel nanovesicles comprised of TS and egg phosphatidylcholine (EPC), which can form a stable lamellar structure (TS-EPC-NVs). In this review, we introduce the development of nanovesicles comprised of TS as a novel DDS carrier and demonstrate the anti-cancer activity of both the encapsulated nucleic acids and the carrier itself.

Key words—drug delivery system; tocopheryl succinate; nanovesicle; cancer

1. はじめに

核酸医薬を用いたがん治療は、がんの根治につながることから期待されている。1991年に、初めて Rosenberg らにより、メラノーマ患者に対して tumor necrosis factor- α (TNF- α) 遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入した臨床試験が行われて以来、¹⁾ 核酸を用いた効率的ながん治療法の開発が盛んに行われている。核酸医薬を用いたがん治療

において、治療核酸を標的部位の細胞内にいかに効率的に送達するのが重要であり、そのためには核酸の体内動態及び細胞内動態を制御することが必要である。これまでに裸の核酸を効率的に送達することが可能な物理的手法が多数報告されている。^{2,3)} Kigasawa らは、マウスメラノーマ細胞 B16-F1 の担がんマウスに対して、CpG オリゴ DNA をイオントフォoresisを用いて導入することにより、腫瘍成長が抑制されることを報告している。⁴⁾ また筆者らもヒト肺がん細胞 EBC-1 の担がんマウスに対して、抗腫瘍活性のある anti-C7orf24 siRNA をジェットインジェクション法により導入することで腫瘍成長が抑制されることを報告している。⁵⁾ しかし、裸の核酸はヌクレアーゼによる分解を回避できない

The author declares no conflict of interest.

京都薬科大学薬品物理化学分野 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5)

e-mail: hama@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、平成 25 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (物理系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

ため、リポソームなどのキャリアーによる保護が必要である。ところが、これまでの核酸キャリアーは、送達のみを目的としたデバイスであり、抗腫瘍活性は核酸の機能性のみに依存し、抗腫瘍効果はかならずしも十分ではない場合もある。そのため、効率的ながん治療を達成するためには、核酸だけでなく多面的ながん細胞を死滅させる戦略が必要である。すなわち、核酸のみならず多種類の薬物を1粒子に封入できれば、高い抗腫瘍効果が期待できると考えられる。他方、筆者は難水溶性の生理活性物質アスタキサンチンはリポソーム製剤化により、溶液状態に比べて高い生理作用が得られることを報告している。^{6,7)} すなわち、脂溶性の生理活性物質のリポソーム製剤化は、単に水への分散性を改善するだけでなく、その生理活性を増幅させることが可能であり、ドラッグデリバリーシステム (drug delivery system; DDS) 製剤化技術として興味深い。そこで筆者は、核酸医薬と抗がん活性を有する脂溶性薬物のリポソーム製剤との統合による新しいタイプの抗がん製剤の開発を試みた。これまでに脂溶性抗がん剤のリポソーム製剤化が行われてきたが、これらは血清タンパク質に対して親和性が高く、粒子安定性が低いために、enhanced permeation and retention (EPR) 効果による腫瘍への送達量が低下する傾向があることが報告されている。^{8,9)} 一般的に、生体成分との相互作用を回避し、ナノ粒子の血中滞留性を改善するために、ナノ粒子表面をポリエチレングリコール (polyethylene glycol; PEG) で修飾する戦略がとられる。確かに血中滞留性の高いPEG修飾ナノ粒子はEPR効果により効率的に腫瘍へ送達されるが、細胞へ取り込まれ難いことや、accelerated blood clearance (ABC) 現象などの課題がある。^{10,11)} そのために、PEGを用いずに、生体成分との相互作用が低く、高い血中滞留性が期待できるだけでなく、細胞内へ効率的に取り込まれることが可能なナノ粒子の開発が望まれている。そこで筆者は、アニオン性ナノ粒子が生体成分と相互作用し難いことに着目し、¹²⁾ 本研究では、生理的条件下では負電荷を有し、多面的な抗がん活性を示すビタミンE誘導体であるトコフェロールコハク酸エステル (α -tocopheryl succinate; TS) のナノ粒子化を試みた。TSは α -トコフェロール (α -T) の抗酸化活性部位であるフェノール性水酸基にコハク酸がエステ

ル結合した構造を持ち、抗酸化活性が欠失しているにもかかわらず、様々な生理作用を有することが報告されている。^{13,14)} 特に、がん細胞特異的にアポトーシスを誘導することや、腫瘍血管新生を阻害することから新規の抗がん剤になり得る化合物として着目されている。^{15,16)} さらに興味深いことに、TSの分子会合状態は特殊であり、その独特の分子形状によってTS単独で二分子膜構造を形成し、ベシクル化 (TS-NVs) することから、がん治療用DDSキャリアーとしても期待される。¹⁷⁾ しかし、TS-NVsの二分子膜構造は不安定であり、生理的条件下において、ヘキサゴナルII構造に会合状態が転換するために、粒子としての安定性が低く、DDSキャリアーとして不適である。そこで筆者は、TSの分子会合状態を安定化させることで、核酸医薬などを封入可能な新しいタイプの抗がん製剤の開発を試みた。すなわち、TS単独では、脂溶性領域が平板構造を有する分子形状により、分子会合状態は柔軟性に乏しいことが推察されたため、不飽和側鎖を有し柔軟な二分子膜構造を容易に形成するリン脂質である卵黄ホスファチジルコリン (egg phosphatidylcholine; EPC) を共存させることで、¹⁸⁾ 柔軟で安定な分子会合状態を構築できると予想した。すなわち、本研究では、TSの分子会合状態の安定化によるがん治療用の新規ナノキャリアー (TS-EPC-NVs) を構築し (Fig. 1),¹⁹⁾ その物性と機能性及び核酸医薬キャリアーとしての有用性を評価した。

2. TS-EPC-NVsの構築及び*in vivo*環境における粒子安定性

TSとEPC (1.7 : 1 mol/mol) を混合することにより、粒子径約100 nmの負電荷リポソーム (TS-EPC-NVs) を調製することに成功した。さらに、TS-EPC-NVsはTS-NVsに比べて負電荷量が減少しており、膜流動性の向上も認められたことから、TSとEPCが混在するナノ粒子であることが確認された (Table 1).¹⁹⁾ またTS-NVsは、2価カチオン及び血清存在下において凝集することにより、その粒子径が著しく増大したが、TS-EPC-NVsはこのような条件下においても、粒子径はほぼ一定であった (Fig. 2).¹⁹⁾ これらの結果より、TS-EPC-NVsは生理的環境において安定なナノキャリアーであることが示唆された。

Fig. 1. Improvement of Nanovesicles Comprised of an Antitumor Agent, α -Tocopheryl Succinate (TS)¹⁹⁾

Charge neutralization of negatively charged TS by divalent cations causes a structural change of the membrane from lamellar to hexagonal II. TS-EPC-NVs constructed by mixing TS and EPC exhibit higher stability in the presence of divalent cations and serum compared with TS-NVs. The copresence of EPC and TS in the membrane stabilizes the vesicle structure, even in the presence of divalent cations.

Table 1. Physiochemical Characteristics of TS-NVs and TS-EPC-NVs¹⁹⁾

	Size (nm)	ζ -Potential (mV)	Fluorescence polarization degree
TS-NVs	94.5 $\pm$ 10.3	-49.0 $\pm$ 3.6	207.2 $\pm$ 28.7
TS-EPC-NVs	88.1 $\pm$ 7.7	-37.6 $\pm$ 4.6	174.4 $\pm$ 17.9

The data are expressed as the mean $\pm$ S.D. values from at least three different preparations.

3. TS-EPC-NVsの細胞死誘導活性 (*in vitro*)

TS-EPC-NVsの抗がんナノ粒子としての機能性を評価するために、そのアポトーシス誘導活性について検討した。マウスメラノーマ細胞をTS溶液、TS-NVs、TS-EPC-NVsで処理し、24時間後のカスパーゼ3/7活性を比較した。その結果、TS-EPC-NVs処理細胞では、TS-NVsに比べて約3倍、TS溶液に比べて約9倍高いカスパーゼ3/7活性の増大が認められた (Fig. 3)。¹⁹⁾ これらの結果より、TSをリボソーム製剤化することにより、アポトーシス誘導活性が増強されることが明らかになった。このTS-EPC-NVsの細胞死増強メカニズムを解析するために、フローサイトメトリーにより細胞内取り込み量を定量した。その結果、安定な粒子であるTS-EPC-NVsはTS-NVsに比べ均一に細胞に取り込まれることが明らかになった。¹⁹⁾ さらにTS-EPC-NVsの細胞内動態解析により、TS-EPC-NVsはエンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれた後、エンドソームを脱出し、細胞質へ送達されることが明らかとなった。¹⁹⁾ これまでに、TSがミトコンド

リアタンパク質あるいは細胞質タンパク質と相互作用することがアポトーシス誘導の引き金であることが報告されている。^{20,21)} すなわち、TS-EPC-NVsにより、細胞質内の標的タンパク質へTS分子が効率的に送達されることで、高いアポトーシス誘導能を示すことが示唆された。これらの結果より、TS-EPC-NVsは細胞質への送達能に優れた抗がんナノキャリアーであると言える。

4. TS-EPC-NVsの抗腫瘍効果 (*in vivo*) 及び腫瘍内動態

TS-EPC-NVsの*in vivo*抗腫瘍効果を評価するために、TS-EPC-NVsあるいはTS-NVsを担がんマウスへ尾静脈投与し、腫瘍体積変化を検討した。その結果、TS-EPC-NVsはTS-NVsに比べて強力な腫瘍成長抑制効果を示したことから (Fig. 4),¹⁹⁾ TS-EPC-NVsは*in vivo*において高い抗がん活性を有するナノキャリアーであることが示唆された。またTS-EPC-NVs投与マウスでは腫瘍内にTS-EPC-NVsが均一に分布していることが観察されたことから、¹⁹⁾ TS-EPC-NVsは*in vivo*環境下でも安定な物性を保持できることで効率的な腫瘍内動態を示すことが、TS-EPC-NVsの高い抗腫瘍効果の原因であることが示唆された。

5. TS-EPC-NVsの核酸キャリアーへの展開

腫瘍及び細胞質への送達能の高いTS-EPC-NVsの核酸キャリアーとしての有用性を評価した。TS-EPC-NVsへのsiRNAの封入は、Harashimaらによって開発された多機能性エンベロープ型ナノ構造体の調製方法を一部改変することにより行った。²²⁾

Fig. 2. Variation of Particles Size of TS-NVs and TS-EPC-NVs in the Presence of Divalent Cations or Serum¹⁹⁾

TS-NVs and TS-EPC-NVs were incubated in PBS (—) containing divalent cations (A) or FBS (B) at 37°C for 24 h. Particle diameters were measured using Zeta Sizer Nano. White and black columns indicate TS-NVs and TS-EPC-NVs, respectively. Values represent the means of three individual experiments. Bars represent S.D. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Fig. 3. Apoptosis-inducing Activity of TS-NVs and TS-EPC-NVs in B16-F1 Cells¹⁹⁾

Cells were treated with TS-solution, TS-NVs, or TS-EPC-NVs for 24 h and apoptotic cells were assessed by the Caspase-Glo 3/7 assay. Values represent the means of three individual experiments. Bars represent S.D. ** $p < 0.01$.

Fig. 4. Suppression of Tumor Growth by TS-NVs and TS-EPC-NVs in B16-F1 Cell-bearing Mice¹⁹⁾

TS-NVs and TS-EPC-NVs were injected into melanoma-bearing mice *via* the tail vein root five times every three days. Typical images were captured 20 d after tumor inoculation.

すなわち、siRNA をポリカチオンと混合することにより凝縮化したナノ粒子を TS-EPC-NVs へ封入した。その結果、粒子径約 200 nm の負電荷ナノキャリアーの構築に成功した。¹⁹⁾ 培養細胞における機能性を評価した結果、著しく高い遺伝子導入及び遺伝子抑制効果が認められたことから (Fig. 5),¹⁹⁾ TS-EPC-NVs は核酸キャリアーとして高い機能性を有することが確認された。

6. おわりに

本研究において筆者らは、抗がん活性物質 TS の分子会合状態の安定化を発想し、核酸医薬の新しい

キャリアーとして TS-EPC-NVs を開発した。¹⁹⁾ 弱酸性化合物の TS は、中性では末端のカルボキシル基が解離しているために、TS を組み込んだナノキャリアーは負電荷を有することから高い血中滞留性を示し、EPR 効果により効率的に腫瘍へ集積する。一方、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた後、エンドソーム内の低 pH 下で TS の末端カルボキシル基がプロトン化されることにより分子型に転換し、エンドソーム膜との膜融合を誘起するとともに、TS 膜が不安定化することで内封薬物の放出が可能でありキャリアー基材として理想的である。しかし、TS-NVs のような TS 単独の分子会

Fig. 5. Knockdown Efficiency of siRNA-encapsulated TS-EPC-NVs¹⁹⁾

Specific knockdown efficiency was evaluated using anti-luciferase siRNA-encapsulated TS-EPC-NVs (20 pmol/40000 cells) in stable luciferase-expressing B16-F1 cells. Positive controls for transfection utilized Lipofectamine 2000 (LFN2000). Luciferase activities were measured 48 h after transfection in the lysates of transfected cells. Data are shown as relative light units (RLU)/mg protein in these cells. Values and bars represent the means and S.D., respectively. $^{**}p<0.01$.

合状態は、2価カチオン等とTSのカルボキシル基が相互作用することで、TS分子の物理化学的性質が変化するため、二分子膜構造が崩壊し凝集体（逆ヘキサゴナル構造）を形成してしまうことで、キャリアーとして不適であるだけでなく、EPR効果による腫瘍集積性や腫瘍内分散性、また細胞侵入能が低下してしまう。この問題を解決するために、本研究では柔軟な二分子膜構造を形成するEPCを共存させたTS-EPC-NVsを構築した。EPCの共存により、TSは柔軟な分子会合状態をとることが可能となり、生体条件においても小胞として安定であった。この高い安定性のために、腫瘍内及び細胞内へTS-EPC-NVsが効率的に到達し、抗腫瘍効果が増強したと考えられる。さらにキャリアーとしての安定性が向上したことにより、核酸医薬を封入可能となったことから、TS-EPC-NVsはTSと核酸医薬の相乗的な作用を有することで高い抗腫瘍効果が期待できる新規のがん治療DDSであると言えるだろう。

今後、抗腫瘍核酸医薬及び低分子抗がん物質を封入したTS-EPC-NVsを基盤とした多剤併用がん治療システムを確立したい。

謝辞 本研究の遂行にあたり、多大なる御指導を賜りました京都薬科大学・小暮健太郎 教授、安

田女子大学薬学部・福澤健治 教授、北海道大学薬学部・原島秀吉 教授に心より感謝申し上げます。本研究は、京都薬科大学薬品物理化学分野で行われたものであり、ともに研究に取り組んできた学生諸氏に深く感謝申し上げます。また、本研究は科学研究費若手研究（B）及び京都薬科大学科学振興基金の助成の下実施したものであり、ここに感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Rosenberg S. A., Anderson W. F., Blaese M., Hwu P., Yannelli J. R., Yang J. C., Topalian S. L., Schwartzentruber D. J., Weber J. S., Ettinghausen S. E., *Ann. Surg.*, **218**, 455–463 (1993).
- 2) Liu F., Huang L., *Gene Ther.*, **9**, 1116–1119 (2002).
- 3) Zhang G., Budker V., Wolff J. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 1735–1737 (1999).
- 4) Kigasawa K., Kajimoto K., Nakamura T., Hama S., Kanamura K., Harashima H., Kogure K., *J. Control. Release*, **150**, 256–265 (2011).
- 5) Hama S., Arata M., Nakamura I., Kasetani T., Itakura S., Tsuchiya H., Yoshiki T., Kogure K., *Cancer Gene Ther.*, **19**, 553–557 (2012).
- 6) Hama S., Takahashi K., Inai Y., Shiota K., Sakamoto R., Yamada A., Tsuchiya H., Kanamura K., Yamashita E., Kogure K., *J. Pharm. Sci.*, **101**, 2909–2916 (2012).
- 7) Hama S., Uenishi S., Yamada A., Ohgita T., Tsuchiya H., Yamashita E., Kogure K., *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 2238–2242 (2012).
- 8) Bertucci C., Cimitan S., Riva A., Morazzoni P., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **42**, 81–87 (2006).
- 9) Sharma A., Straubinger R. M., *Pharm. Res.*, **11**, 889–896 (1994).
- 10) Hatakeyama H., Akita H., Kogure K., Oishi M., Nagasaki Y., Kihira Y., Ueno M., Kobayashi H., Kikuchi H., Harashima H., *Gene Ther.*, **14**, 68–77 (2007).
- 11) Ishida T., Kiwada H., *Int. J. Pharm.*, **354**, 56–62 (2008).
- 12) Kimelberg H. K., Papahadjopoulos D., *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 805–809 (1971).

- 13) Kogure K., Morita M., Hama S., Nakashima S., Tokumura A., Fukuzawa K., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2367–2372 (2002).
- 14) Crispen P. L., Uzzo R. G., Golovine K., Makhov P., Pollack A., Horwitz E. M., Greenberg R. E., Kolenko V. M., *Prostate*, **67**, 582–590 (2007).
- 15) Kogure K., Hama S., Manabe S., Tokumura A., Fukuzawa K., *Cancer Lett.*, **186**, 151–156 (2002).
- 16) Neuzil J., Swettenham E., Wang X. F., Dong L. F., Stapelberg M., *FEBS Lett.*, **581**, 4611–4615 (2007).
- 17) Kogure K., Manabe S., Hama S., Tokumura A., Fukuzawa K., *Cancer Lett.*, **192**, 19–24 (2003).
- 18) Hauser H., *Chem. Phys. Lipids*, **43**, 283–299 (1987).
- 19) Hama S., Utsumi S., Fukuda Y., Nakayama K., Okamura Y., Tsuchiya H., Fukuzawa K., Harashima H., Kogure K., *J. Control. Release*, **161**, 843–851 (2012).
- 20) Dong L. F., Low P., Dyason J. C., Wang X. F., Prochazka L., Witting P. K., Freeman R., Swettenham E., Valis K., Liu J., Zabalova R., Turanek J., Spitz D. R., Domann F. E., Scheffler I. E., Ralph S. J., Neuzil J., *Oncogene*, **27**, 4324–4335 (2008).
- 21) Kogure K., Hama S., Goto S., Munakata T., Tokumura A., Fukuzawa K., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **49**, 310–314 (2003).
- 22) Nakamura Y., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **119**, 360–367 (2007).