

「抗がん剤から成る超分子ナノ組織体の創製と抗がん活性増強効果に関する研究」
 甲南大学フロンティアサイエンス学部 長濱 宏治

1 研究の背景と目的

抗がん剤の多くは疎水性のため難水溶性を示し、また血中半減期が短い。さらに、全身に拡散するため、がん組織で有効濃度を得るには大量投与が必要となる。大量投与により、ある程度の治療効果は見込めるが、一方で重篤な副作用が問題となる。抗がん剤をがん部位へ効果的に運搬するため、両親媒性分子の集合体であるリポソームや高分子ミ

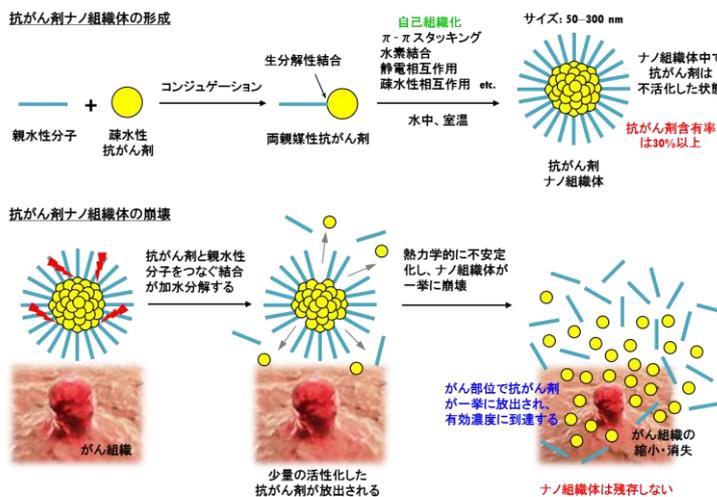


図1. 疎水性抗がん剤の自己組織化により得られる抗がん剤ナノ組織体の特徴に関する模式図

セルなどのナノキャリアの疎水性部位に抗がん剤（カンプトテシン，ドキソルビシン，クルクミンなど）を担持させる手法であるナノメディシンが、現在の抗がん剤送達研究の主流である。それら先行研究の一部では、抗がん剤を担持したナノキャリアは血流路でがん部位に運搬され、EPR 効果（enhanced permeation and retention effect）によりナノキャリアごとがん部位で一定期間蓄積することが報告され、さらに治験に進んだ成功例も数例存在する。しかし、これまでに開発されたほとんどのナノキャリアでは抗がん剤の担持量（内包率） $[\text{内包率}(\%) = \text{内包抗がん剤重量} / (\text{ナノキャリア重量} + \text{内包抗がん剤重量}) \times 100]$ が10%未満と低く、がん部位で抗がん剤の有効濃度を得るために、結局は多くの投与量が必要となる。そこで、十分な抗がん活性を得るために、高い投与量で抗がん剤担持ナノキャリアを頻回投与すると、抗がん剤の放出後も崩壊せずに残存する大量のナノキャリアが体内に蓄積することになる。実際に、残存ナノキャリアに起因する短期から長期的な毒性（副作用）が報告されている。したがって、既存のナノキャリアシステムの問題（抗がん活性増強と副作用軽減を独立して達成することが困難）を解決し、ナノメディシン実用化への道を拓くには、①抗がん剤の担持量が高く、②抗がん剤の放出と呼応して崩壊する、という2つの性質を併せ持つ新規なナノキャリアシステムが必要となる。

このような背景に基づき、申請者は『抗がん剤の分子間相互作用を利用したボトムアップ的手法により、抗がん剤自体を構成要素とする超分子ナノ組織体を構築する』という新規アイデア（図1）を着想した。得られるナノ組織体の主な構成要素は抗がん剤であるため上記①を満たし、さらに、ナノ組織体の形成には抗がん剤分子間で働く相互作用が必要なため、抗がん剤の放出と呼応してナノ組織体は崩壊すると考えられる（上記②を満たす）。申請者は、抗がん作用を示すクルクミンと親水性分子（ポリエチレングリコールや多糖）を共有結合にて連結した複数種の両親媒性クルクミンを合成し、クルクミン分子間で働く π - π スタッキング、水素結合、疎水性相互作用により、クルクミン含有率が30%以上の水溶性超分子クルクミンナノ組織体の作製に成功している。そこで本研究課題では、これらクルクミンナノ組織体を用いて、抗がん活性の増強と毒性（副作用）の軽減が独立して達成可能かを実験により検証することを目的とする。

2 研究方法・研究内容

①クルクミンナノ組織体の作製および諸物性解析

本研究では、クルクミンとポリエチレングリコール (PEG) を共有結合でつないだ 3 種類の両親媒性クルクミン (サンプルコード: PC, PCP, CPC), およびデキストラン (Dex) の側鎖に複数個のクルクミンを結合した両親媒性クルクミン (サンプルコード: DCCM x ; x は Dex 一分子当たり結合したクルクミンの分子数を表す) を合成した (図 2, 図中ではクルクミンを CCM と表記する)。形状やサイズが異なるクルクミンナノ組織

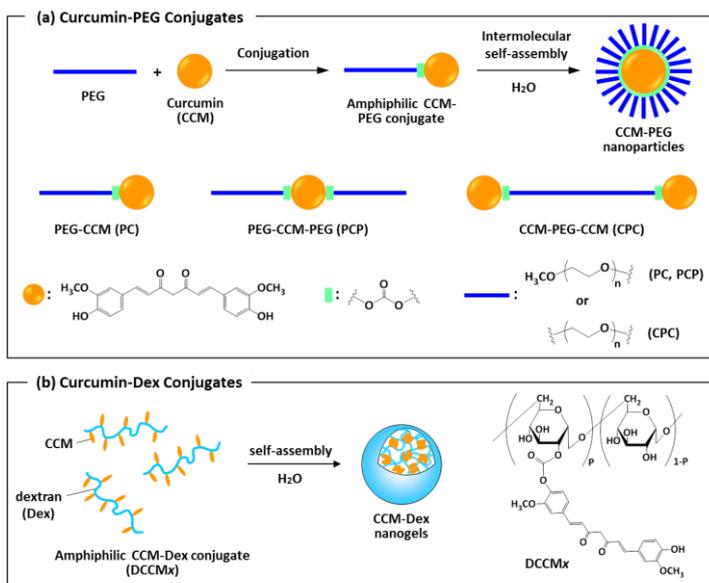


図2. 本研究で合成した両親媒性クルクミンの構造と超分子ナノ組織体

体の物理化学的特性は、血中半減期、体内動態、がん組織への蓄積性、細胞内導入効率、細胞内動態などクルクミンナノ組織体の抗がん活性や細胞毒性 (副作用) を左右しうる。そこで、上記のクルクミンナノ組織体の物理化学的特性 (サイズ、形状、臨界面形成濃度、安定性など) や形状の解析を行った。一方、クルクミンは難水溶性であるためほとんど水に溶けず、抗がん活性を得るため (50% 阻害濃度はがん細胞種によって異なるが、10~100 μM 程度) には有機溶媒などで可溶化してから細胞や生体に与える必要があるが、このような製剤化手法は好ましくなく、水溶性の向上が切望されている。また、クルクミンは中性から弱アルカリ性の水中で速やかに加水分解し (pH 7.2 のリン酸緩衝溶液中の半減期は 10 分程度)、抗がん活性は著しく低下するため、加水分解耐性を向上させることも重要である。そこで、本研究ではクルクミンナノ組織体の水溶性および加水分解耐性も定量評価した。

②クルクミンナノ組織体の抗がん活性および毒性の定量解析

クルクミンナノ組織体のヒトがん細胞株 (HeLa: ヒト子宮頸部がん細胞, PC-3: ヒト前立腺がん細胞, HepG2: ヒト肝がん, HL-60: ヒト白血病細胞) およびヒト正常細胞株 (HDF: ヒト繊維芽細胞, HEK293: ヒト胎児腎細胞, HUVEC: ヒト血管内皮細胞) への細胞取り込みについて、フローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡解析により調べた。細胞小器官染色剤を用いてクルクミンナノ組織体の細胞内動態を調べた。各クルクミンナノ組織体の細胞死誘導効果を MMT アッセイにより調べ、 IC_{50} を求めた。また、クルクミンナノ組織体の細胞死誘導について、各種アポトーシス解析を行った。また、PC-3 細胞をヌードマウスに移植し成長させることで担がんマウスを作製し、その尾静脈から各クルクミンナノ組織体を注射投与し、血中半減期、体内動態、がん組織への蓄積量、がん体積変化、がん組織での血管新生、マウスの体重変化について調べた。以上の実験により、クルクミンナノ組織体の抗がん活性および毒性 (副作用) を評価した。また、クルクミンナノ組織体の物理化学的特性と抗がん活性および副作用発現との相関性を調べ、抗がん活性および副作用発現を決定する因子の同定を試みた。

3 研究成果

①クルクミンナノ組織体の作製および諸物性解析

両親媒性クルクミンを水に溶解することで自己組織化させ、その自己組織体の DLS 測定および TEM 観察を行ったところ、3 種類の CCM-PEG コンジュゲートの場合 PC で 228 nm, PCP で 180 nm, CPC で 155 nm, 3 種類の CCM-Dex コンジュゲートの場合, DCCM3 で 33 nm, DCCM16 で 43 nm, DCCM30 で 122 nm の直径をもつ均一な球状ナノ組織体の形成が観察された。いずれのナノ組織体も表面は大きく負に帯電していた。ナノ組織体の分子レベルの情報を得るため、ナノ組織体水溶液の ¹H-NMR 測定を行った。通常、CCM-PEG コンジュゲートはナノ組織体を形成しないクロロホルム中では PEG およびクルクミン由来の強いピークが見られ、CCM-Dex コンジュゲートの場合はナノ組織体を形成しない DMSO 中では Dex およびクルクミンの強いシグナルが得られるが、ナノ組織体を形成する水中では、PEG および Dex のピーク強度は変化しないが、クルクミン由来のピークは完全に消失したことより、PEG 鎖および Dex 鎖は水和した状態で水中に鎖を伸ばしており、クルクミンは水和できない組織体内部で会合していることが分かった。つまり、これらのナノ組織体は疎水性クルクミンから成るコアを内部にもち、その外側を親水性 PEG もしくは Dex が覆う形態をもつことが示された。ナノ組織体の水への溶解性を調べたところ、クルクミン単独では約 30 nM までしか溶解しなかったが、いずれのナノ組織体の場合も CCM 単独よりも数十万倍高い数 mM まで溶解した。クルクミンのがん細胞死誘導に関する有効濃度はがん細胞種によっても異なるが、10~100 μM 程度であるため、ナノ組織体の溶解度は十分に高いと判断できる。ナノ組織体の加水分解における半減期はクルクミン単独よりも数十倍長く、数十~数百時間であった(図3)。一般に、クルクミンをがん細胞に加えてから細胞死誘導が起こるまで 10~20 時間が必要であるため、ナノ組織体の加水分解耐性は十分に高いものであると判断できる。これらクルクミンナノ組織体中のクルクミン含有率は 19~32% であり、従来のナノキャリアの含有率よりも 2~3 倍高い。以上より、両親媒性クルクミンのナノ組織化は、クルクミンの問題点である難水溶性および加水分解性を解決する有効な手段であると判断できる。

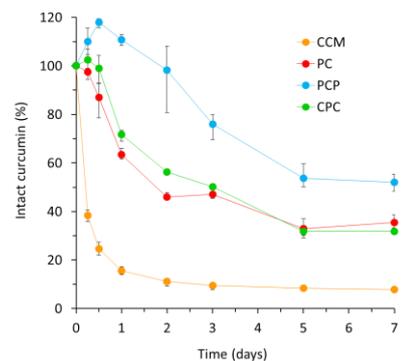


図3. CCM-PEGナノ組織体のpH7.0の水中における加水分解挙動

②クルクミンナノ組織体の抗がん活性および毒性の定量解析

クルクミンは強い緑色蛍光を示すため、クルクミンナノ組織体はナノ蛍光プローブとしても利用可能である。ナノ組織体の細胞取り込み特性を調べたところ、クルクミン単独では 5% 程度の細胞にしか取り込まれなかったのに対して、ナノ組織体はほぼすべての細胞に取り込まれ、その量はクルクミン単独よりも約 10 倍高かった。ナノ組織体は PC-3 や HepG2 など接着系がん細胞にも速やかに取り込まれた。蛍光顕微鏡観察によりナノ組織体の細胞内動態を調べたところ(図4; 青色は核、赤色はエンドソーム、緑色は CPC ナノ組織体を表す)、初期

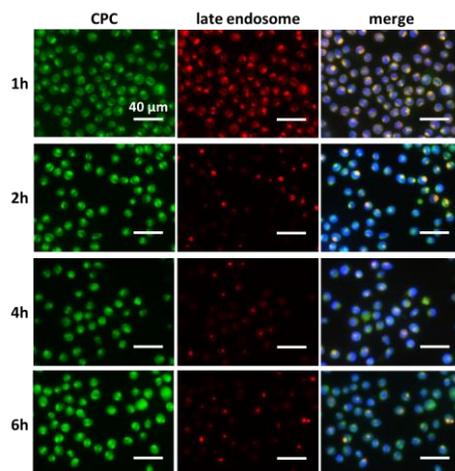


図4. CPCナノ組織体を自発的に取り込むHL-60細胞の蛍光顕微鏡画像

段階で黄色蛍光の輝点が見られることから、ナノ組織体はエンドソームに入った状態であると判断され、ナノ組織体はエンドサイトーシスによりがん細胞に取り込まれることが分かった。時間経過とともに黄色蛍光は消え、ナノ組織体由来の緑色蛍光が細胞質に広く分散したことから、ナノ組織体はエンドソームから脱出し細胞質に移行したと考えられる。抗がん活性に関するクルクミンの作用部位は細胞質であるため、ナノ組織体の細胞質移行性は非常に有益である。それに対して、正常細胞のクルクミンナノ組織体取り込み効率はがん細胞よりも低く、取込み量はがん細胞の 1/10 程度であった。特に、Dex-CCM コンジュゲートから作製したナノ組織体は正常細胞にはほとんど取り込まれず、クルクミンをがん細胞に選択的に導入することに成功した。その選択性発現の理由は現時点で分かっていない。

培養細胞を用いて、ナノ組織体の抗がん活性を調べたところ、すべてのナノ組織体は HL-60, PC-3, HepG2 細胞に細胞死を誘導し、その IC₅₀ はクルクミン単独を DMSO に溶解して細胞に与えた場合と同等以下であった。以上の結果より、クルクミンナノ組織体は様々ながん細胞に対してクルクミン単独と同等以上の有効な抗がん活性を示すと判断される (図 5)。次に、担がんマウスを作製し、クルクミンナノ組織体を尾静脈に投与後の体内動態を調べたところ、クルクミン単独では投与 12 時間後には血中濃度はもとの 1/5 程度に低下したが、ナノ組織体では 1/2 程度は血中に存在していた。また、特定臓器への蓄積は見られず、投与 24 時間後でも血中滞留量は十分に高かった。がん組織への蓄積量は肝臓・腎臓・脳・腸・脾臓などの主要臓器と同程度であったが、いずれのナノ組織体でも時間経過に伴う蓄積量の増大が見られた。そこで、CCM-PEG ナノ組織体を用いて、担がんマウスに 3 日間尾静脈投与した後 4 日間休薬し、抗がん活性を調べたところ、PC と PCP の場合、投薬中はがん組織体積の増殖抑制が見られたものの、休薬するとがん組織は増大した。それに対して、CPC は休薬中も数日間は抑制効果を示した。次に連日投与を行ったところ、PC と PCP ではがん組織の体積増加速度は低下したものの、徐々にがん組織は増大した。一方、CPC では一か月間がん組織の増大は完全に停止した。以上より、CPC は現実的な投与ドーズおよび期間で有効な抗がん活性を示すことが明らかになった。一方、クルクミン単独ではがん組織の増大を抑制する効果はほとんど見られなかった。クルクミンナノ組織体の投薬期間でマウスの体重変化はほとんど見られないことから、長期的な副作用はないと考えられる。今回の実験では、すべてのクルクミンナノ組織体およびクルクミン単独でも目立った副作用は見られなかったため、副作用に関する本手法の有効性は評価できていない。

以上をまとめると、本研究課題のアイデアである化学的にクルクミンナノ組織体を形成させることは、クルクミンの問題解決ならびに抗がん活性を増強させるために有効な手法であり、抗がん剤のナノ組織化による抗がん活性増強効果は本研究課題の遂行により初めて示されたことである。つまり、本研究により著者は抗がん剤に関する新しい概念“ナノ抗がん剤”を提唱する。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究課題の遂行により、抗がん剤に“ナノ抗がん剤”という新概念を提案することができた。本研究課題では、抗がん作用を有する疎水性分子としてクルクミンを用いた

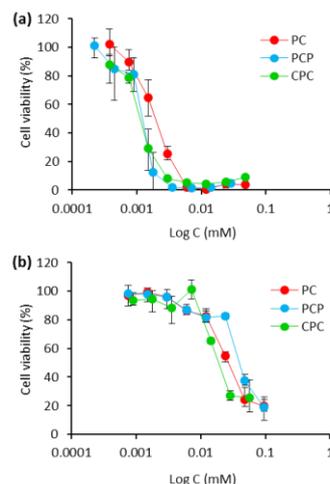


図5. CCM-PEGナノ組織体のがん細胞に与えて24時間後の細胞死誘導効果。(a) HL-60細胞, (b) HepG2細胞。

が、本概念はカンプトテシン、ドキソルビシン、パクリタキセルなど他の抗がん剤にも適用可能である。申請者はミセル、ナノゲル、ナノチューブなど内部に親水的ナノ空間を有するクルクミンナノ組織体をすでに得ている。この内部空間は量子ドットや磁性ナノ粒子などのバイオイメーキング用プローブや MRI 用造影剤などの担持内包空間として利用可能である。つまり、本研究の成果はがん治療における近年の成長分野の中核であるセラノスティクス [theranostics; therapy (治療) と diagnostics (診断) から成る造語で治療と診断を同時に行うがん化学療法における新しい治療概念] に有用な基盤材料を提供するものである。したがって、本研究の成果はがん研究の広域を刺激し、我が国のがん治療水準向上に大きく貢献できる。一方、近年では、クルクミンはテレビや新聞などのメディアを通じていわゆる“体に良い”ものとして一般社会にも浸透しており、清涼飲料水やサプリメントとして市販されるなど産業化にも至っているため、市民の認知度は非常に高い。さらに、クルクミンはアルツハイマー病の原因物質として知られるアミロイド線維の形成抑制・溶解作用をもつことが知られている。したがって、私たちが開発したクルクミンナノ組織体はガンの治療のみならず、アルツハイマー病の治療薬や効果が高いサプリメントなどとして一般市民の健康・生活、そして産業に大きく貢献するものである。