

# 日高 匡章 論文内容の要旨

## 主 論 文

Selective and Effective Cytotoxicity of Folic Acid-conjugated Cholesteryl Pullulan Hydrogel Nanoparticles Complexed with Doxorubicin in *In Vitro* and *In Vivo* Studies

抗癌剤（ドキソルビシン）と葉酸修飾多糖集合体の複合体による選択的抗腫瘍効果

日高匡章 兼松隆之 牛尾一利 砂本順三

Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 21 巻 6 号 591-602. 2006 年.

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学 専攻  
(主任指導教員： 兼松 隆之 教授)

## 緒 言

近年、薬物の効果を最大限発揮させる選択的送達システム (DDS; Drug Delivery System ドラッグデリバリーシステム) は、様々な形で開発、臨床研究が進み、徐々に臨床応用され、その効果を発揮してきている。DDS とは、医薬品の生物活性、副作用、病巣へのターゲティング、化学的安定性、代謝活性などを調整して、必要な場所に必要な量を必要な時間だけ作用させ、医薬品の効果をより高めるシステムである。DDS に使用される担体には、ポリエチレングリコール (PEG)、リポソームなどがあげられ、インターフェロン、分子標的治療などの治療薬に応用されている。これまで、我々は京都大学工学部砂本研究室にて開発された多糖集合体 (CHP; Cholesteryl Pullulan コレステロールプルラン) を用いて、細胞実験、動物実験における抗腫瘍効果の増強を報告してきた (一瀬ら、Anticancer Res. 1998 年)。今回、癌細胞膜表面における葉酸レセプターの過剰発現に注目し、葉酸修飾多糖集合体 (FA-CHP; Folic acid-conjugated cholesteryl pullulan) を開発した。今回、この葉酸修飾多糖集合体によって抗癌剤 (ドキソルビシン, DOX) が癌細胞の増殖を選択的に抑える効果を発揮するか否かについて検討した。

## 対象と方法

### 細胞障害実験

- (1) 細胞株：ヒト口腔癌細胞株 (KB 細胞：葉酸レセプター陽性)
- (2) 薬剤：DOX
- (3) 実験群：CHP 単独、FA-CHP 単独、DOX 単独、CHP/DOX 複合体、FA-CHP/DOX 複合体

(4) 培養条件：葉酸枯渇培地にて上記実験群を投与し、1、3、5日後細胞障害効果を解析。(5) 評価：MTT assay

#### 薬剤取込み実験

- (1) 細胞株：ヒト口腔癌細胞株 (KB 細胞：葉酸レセプター発現) (2) 薬剤：DOX
- (3) 実験群：DOX 単独、CHP/DOX 複合体、FA-CHP/DOX 複合体
- (4) 培養条件：葉酸枯渇培地、葉酸過剰培地にて実験群を1時間培養し、評価。
- (5) 評価：共焦点レーザー顕微鏡にて DOX 細胞内移行を確認。

#### 動物実験

- (1) 動物：ヌードマウス (BALB/c) (2) 腫瘍：KB 細胞を皮下移植し腫瘍モデルを作成。
- (3) 実験群：FA-CHP 単独、DOX 単独、CHP/DOX 複合体、FA-CHP/DOX 複合体 (n=5)
- (4) 投与方法：腫瘍径 50mm<sup>3</sup> 時点から 3 日おき 6 回経静脈投与、投与後 29 日目犠牲死。
- (5) 評価：経時的腫瘍体積、犠牲死後の腫瘍重量。

## 結 果

#### 細胞実験

(1) FA-CHP 単独群は細胞障害性を認めず、FA-CHP/DOX 複合体群は DOX 単独群、CHP/DOX 複合体群と比べて約 30% 抗腫瘍効果を増強した。

(2) DOX 単独群、CHP/DOX 複合体群と比べて FA-CHP/DOX 群では、抗癌剤 (DOX) が細胞内に多く取り込まれた。その効果は、葉酸過剰培地では減弱した。

#### 動物実験

薬剤投与後徐々に FA-CHP/DOX 群は抗腫瘍効果を示し始め、投与後 29 日目では有意に腫瘍体積を減少させ、CHP/DOX 群と比べて約 40% 抗腫瘍効果を増強した。また、腫瘍重量も同様に FA-CHP/DOX 群で約 40% 減少していた。

## 考 察

細胞実験では、葉酸修飾多糖集合体 (FA-CHP) と抗癌剤 (DOX) の複合体を形成することで、葉酸レセプターを発現している癌細胞の増殖を抗癌剤単独 (DOX) と比べて有意に抑制した。この要因として、葉酸レセプターを介した抗癌剤の選択的細胞内移行が考えられ、共焦点レーザー顕微鏡にて、選択的に抗癌剤が細胞内に取り込まれることを確認できた。また、癌細胞周囲の葉酸濃度を上昇させることで細胞内移行が減弱したことは、レセプターを介した細胞内移行であることを間接的に証明していると思われる。動物実験でも、葉酸修飾により抗癌剤の抗腫瘍効果は増強し、腫瘍増殖を抑制した。

CHP の癌細胞に対する効果は、癌表面のレセプターを標的に働くことは知られているが、今回 CHP の葉酸修飾によって、よりレセプター選択性が増強し抗腫瘍効果を発揮したと考えられる。

葉酸多糖集合体は、従来の化学療法に比べて選択的かつ効率的であり、癌治療の DDS における新規のキャリアーとして有望であることが示唆された。