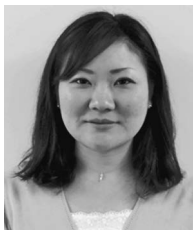


《若手研究者紹介》



医薬品としての葉酸修飾メチル-β-シクロデキストリンの有効利用

小野寺 理沙子* Risako Onodera

岐阜薬科大学薬物送達学大講座製剤学研究室

1. はじめに

今回このような寄稿の機会を与えていただき、改めてこれまでの研究生活を振り返りつつ、本稿では、筆者がこれまで主に研究対象としてきたシクロデキストリン (CyD) を用いた薬物送達システム (DDS) の構築ならびに医薬品としての CyD の応用について紹介する次第である。

2. 薬物キャリアとしてのシクロデキストリンの応用

筆者が初めて研究に携わることとなったのは、東京工芸大学工学部 4 年生の時であり、東京工芸大学工学部教授 服部憲治郎先生 (現・東京工芸大学工学部名誉教授) が主宰されていた生体機能システム研究室に配属された時である。服部先生は、環状のオリゴ糖であるシクロデキストリンを用いた研究をライフワークとされており、筆者の卒業研究のテーマも「葉酸多置換 β-シクロデキストリンの新規合成」であった。

シクロデキストリン (CyD) は、デンプンに CyD

生成酵素を作用させることで得られ、種々の薬物をその疎水空洞内に取り込み包接複合体を形成する単分子的ホスト分子に分類される。CyDs の超分子的な包接特性は、食品、化粧品、臨床検査薬、膜学、高分子化学など多方面で利用されている。薬剤学・製剤学領域では、CyDs の機能性や生体適合性を利用して、複合体形成による医薬品の安定化、溶解性の調節、バイオアベイラビリティの向上、油状あるいは低融点物質の粉体化、揮散性の防止、苦味・悪臭および局所刺激性の軽減などへの応用が試みられ、国内外で実際製剤に使用されている。一方、葉酸レセプター (FR-α) は、卵巣・肺・乳房・子宮内膜・腎臓・結腸など、各種上皮がん細胞で高発現しており、葉酸 (FA) と極めて高い親和性 (解離定数: $K_d = \sim 1$ nM) を有する。そのため、腫瘍選択的抗がん剤デリバリーを企図して、キャリアへ FA を修飾した DDS 研究が盛んに行われている。筆者の研究テーマは、CyD を疎水性抗がん剤の薬物キャリアとして用い、腫瘍細胞選択性を持たせるために FA を修飾した FA 修飾 β-CyD の新規合成経路の構築であった。まず実験を始めるにあたり、過去の先輩方が構築された合成経路をすべて勉強した。そして、CyD と FA との間にスペーサーを導入することを決定し、さらにそのフレキシビリティを向上させるためにチオール基を導入することにした。また土台となる CyD は、まずグルコースの水酸基をクロロ化、ヨード化しヨウ素修飾 CyD を合成した後、スペーサーを導入する反応経路に決定した。過去の先輩のデータを基に考えた経路ではあったが、自分なりの考察を加え、考え出した反応経路を先生に認めていた

*2010 年、熊本大学大学院薬学教育部博士前期課程修了。2013 年、熊本大学大学院薬学教育部博士後期課程修了、博士号 (薬学) 取得 (「新規抗がん剤キャリアおよび抗がん剤としての葉酸修飾メチル-β-シクロデキストリンの有用性評価」)。同年、岐阜薬科大学薬物送達学大講座製剤学研究室助教に就任し、現在に至る。現在、「人に優しい製剤設計」を目標として研究を進めている。2012 年、日本薬剤学会第 27 年會にて最優秀発表者賞を受賞。2014 年、日本薬剤学会第 39 回製剤・創剤セミナーにて Postdoctoral Presentation Award を受賞。連絡先: 〒501-1196 岐阜県岐阜市大学西 1-25-4
E-mail: onodera@gifu-pu.ac.jp

だいた時には、何とも言えない嬉しさがあつたことを覚えている。しかし、実際に合成に取り掛かってみると、机上で描いたようにはスムーズに反応は進行せず、クロロ化は上手くいくものの、ヨード化で手間取ってしまった。CyDは、グルコースが環状に連なった構造を有しており6, 7, 8個結合したものをそれぞれ α -、 β -、 γ -CyDと呼んでいる。筆者が実験に用いていたものは β -CyDであったため、すべての水酸基がヨウ素に置換されると7置換される。しかし、試薬の添加量や温度、反応時間を細かく変え何十回と同じ実験を繰り返したが、どうしても綺麗に7置換体を合成することができずにいた。この結果を受け、自分自身が考えた反応経路がベストではなかったのだと少々落胆したが、卒業が迫っていたこともあり、兎に角前に進まなければ、という一心で服部先生のもとへご相談に伺うことにした。この時筆者は、先生ならばきっと画期的なアドバイスを下さり一気に問題は解決するはずだ、と心のどこかで思っていた。しかし、何十回トライしても上手く行かないことを切に訴えた筆者に対する先生のご返答は予想を遥かに超えるものであった。「じゃあ100回やったらもう一度来なさい」筆者はこの先生のお言葉を伺った時、研究者として歩んで行くためには“タフさ”と“諦めない心”が大事なのだと肝に銘じたことを今でも覚えている。そして、そのお言葉を信じ、100回を目標に条件検討を進めていく中で何とか最適条件を見つけることができ、卒業論文発表会2~3日前にやっと最終生成物を合成することができたのだが、実は、この結果を当日まで服部先生には知らせていなかった。先生を驚かせようと当時同期であった村木邦成氏(現・武州製薬株式会社)と示し合わせて当日まで隠していた。今考えるとよくもまあそんなことを思いついたものだといながら呆れてしまうが、その当時は先生を驚かせたいという一心しかなかった。発表会当日は、他の教授陣の先生からのご質問を差し置いて座長であった服部先生から合成条件についてご質問をいただくという何とも不思議な事態となってしまったが、こんなやんちゃな学生を広い心で最後まで温かく見守って下さった服部先生には深く感謝している。

卒業研究を通してモノ作りの楽しさを知る一方で、次第に自分の合成したものが薬として本当に効果を示すのか否かが知りたくなった。正確には、筆

者が合成していたものはキャリアであるため、それ自身は効果を示さないのだが、当時の筆者はその違いが理解できていなかった。当時、研究室で合成した化合物を用いた動物実験は、共同研究先や外部機関にお願いしていた。ある日、先輩が合成した化合物であったと思うが、動物実験の結果が送付されてきた。結果はネガティブであった…と思う。というのも、当時の筆者には、その結果を解釈する以前に実験内容が理解できなかった。そのため、実験が正しく行われているのか、何をもって結果がネガティブと結論づけられているのかが理解できず、データに記載されている文字をそのまま受け入れることしかできなかった。その時何とも言えない悔しさが込み上げてきたことを覚えている。そして、これをきっかけに、いつか自分自身で合成した化合物を自分の手で評価したい、という気持ちが強くなり、共同研究先であった熊本大学大学院薬学教育部博士前期課程への進学を決意した。

3. 医薬品としてのシクロデキストリンの応用^{1~5)}

こうして、生まれて初めて九州の地を踏み、熊本大学大学院薬学教育部製剤設計学分野にて大学院生活が始まった。当時の製剤設計学分野は、有馬英俊教授、本山敬一助教(現・准教授)に加え、博士後期課程の先輩も在籍されており、筆者にとっては学部時代とは違った環境すべてが新鮮であり、嬉しかった。服部先生のご指導のもと、伸び伸びと楽しい研究生活を謳歌していた筆者にとって学部が変わる、ということの大変さをこの時点では微塵も感じてはいなかった。むしろ、動物実験など、これまで知らなかった世界を学ぶことができる期待感に胸を高鳴らせていたことを懐かしく思う。

大学院に進学して、いくつかテーマをいただいたが、最終的には「新規抗がん剤キャリアおよび抗がん剤としての葉酸修飾メチル- β -シクロデキストリンの有用性評価」というテーマのもと、研究を進めていくこととなった。CyDは先述のとおり、難水溶性薬物の可溶化や安定化、バイオアベイラビリティの改善に広く応用されている。一方、近年では、CyDを製剤素材として利用する以外にも、CyD自身が薬物として効果を発揮することが報告されている。例えば、 γ -CyDの全ての一級水酸基をカルボキシチオエーテル化したSugammadexは、アミノステロイ

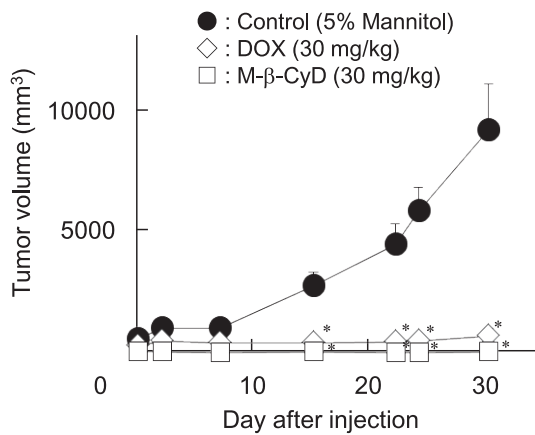


図1 腫瘍内投与後の M-β-CyD の腫瘍成長抑制効果

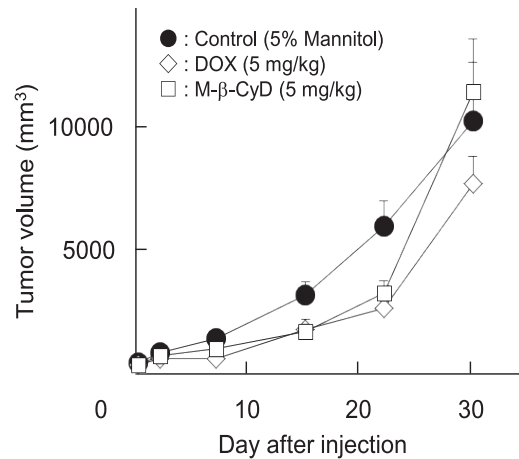


図2 静脈内投与後の M-β-CyD の腫瘍成長抑制効果

ト性筋弛緩薬であるロクロニウムやベクロニウムと極めて強固な包接複合体を形成し ($K_c = 10^7 \text{ M}^{-1}$), それら薬物の筋弛緩作用を抑制する筋弛緩回復剤として市販されている。また, ヒドロキシプロピル-β-CyD は難治性小児脂質蓄積病であるニーマンピックタイプ C 病に対して, 神経症状の悪化を抑制することから, 医師主導の臨床試験が行われている。このように, CyDs は製剤素材に留まらず, 自身が医薬品候補になり得る知見が蓄積されている。筆者の研究テーマは, 天然の CyD よりも溶解性や包接能に優れ, 過去に Grosse らによって腹腔内投与により, 担がんマウスの腫瘍成長が抑制されることが報告されていたメチル-β-CyD をリード化合物とし, CyD 自身に活性を持たせ抗がん剤として応用することである。まず, マウス結腸がん細胞由来である Colon-26 細胞を皮下に同種移植した担がんマウスを作製し, M-β-CyD 溶液を腫瘍内および尾静脈内に単回投与後の腫瘍体積, 体重変化および生存率について検討した。その結果, M-β-CyD は腫瘍内投与では優れた抗腫瘍活性を示したものの (図 1), 静脈内投与では十分な抗腫瘍効果を示さないことが示唆された (図 2)。この結果を基に M-β-CyD による細胞死誘導機構の解明を企図し, 各種検討を行った。M-β-CyD により誘導される抗腫瘍活性は, 細胞死の一種であるミトコンドリア依存的アポトーシスであり, その抗腫瘍活性誘導に M-β-CyD による細胞形質膜のリピッドラフトからのコレステロール漏出作用が関与することを明らかにした。このことから M-β-CyD は細胞膜を標的とした新規抗がん剤としての応用が期待された。しかし, M-β-CyD は腫瘍選択性を持たないことから正常細胞への障害性が懸念さ

れる。そこで, FA を修飾することで, 腫瘍選択性を具備した新規抗がん剤である FA-M-β-CyD の調製を試みることにした。一般に CyD は, 分子量が約 1,000 と大きいことから膜透過性が低く, 細胞内に取り込まれにくいことが知られている。一方, FA-M-β-CyD は FR-α を介して細胞内に取り込まれることを明らかにした。さらに FA-M-β-CyD は, FR-α 高発現細胞選択的に顕著な抗腫瘍活性を示し, FR-α 低発現細胞ならびにノックダウン細胞では抗腫瘍活性を示さなかった。また, FA-M-β-CyD による抗腫瘍活性誘導機構の解明を企図し, 各種検討を行った結果, FA-M-β-CyD は M-β-CyD とは異なり, アポトーシスは誘導せず, オートファジーを誘導することで抗腫瘍活性を示すことを明らかとした。In vivo での FA-M-β-CyD の抗腫瘍活性を検討するため, Colon-26 細胞 (FR-α(+)) および M213 細胞 (FR-α(+)) を用いて作成した同種および異種移植担がんマウスに FA-M-β-CyD を尾静脈内に単回投与し, 腫瘍体積, 体重および生存率について検討した。その結果, 同担がんマウス尾静脈内に単回投与後, コントロール群と比較して FA-M-β-CyD 投与群では顕著に腫瘍の成長を抑制した。さらに, 投与時には約 8 mm あった腫瘍は, FA-M-β-CyD 処理後 7 日目には完全に消失した (図 3)。また, コントロール群では腫瘍体積の増加に伴い, 体重の顕著な増加が認められたが, FA-M-β-CyD 投与群では, 体重の増加は緩やかであった。さらに, コントロール群では, Colon-26 細胞を移植後 70 日目までに全例死亡したのに対して, FA-M-β-CyD 投与群では, 140 日目においても 100% の生存率を示した。M213 細胞を皮

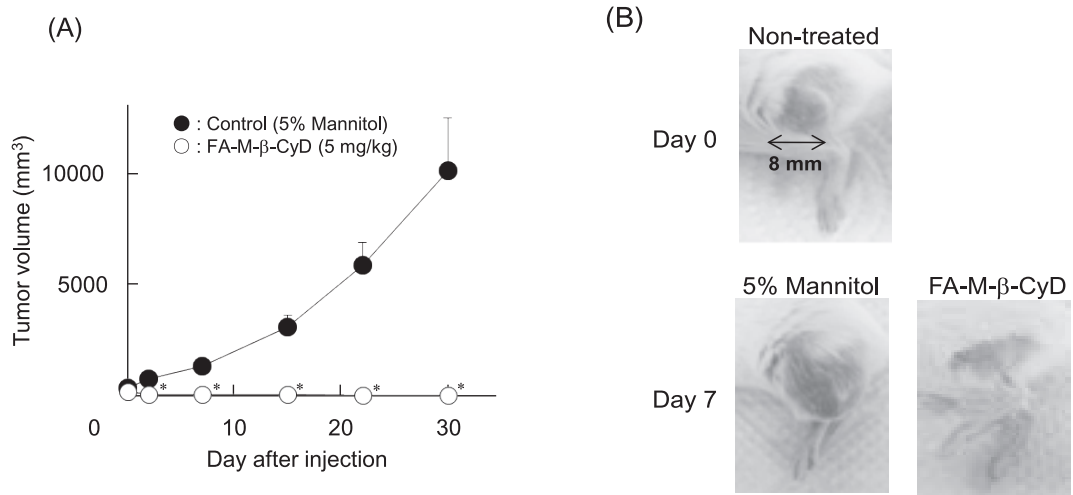


図3 静脈内投与後のFA-M-β-CyDの腫瘍成長抑制効果

下に異種移植した担がんマウスに静脈内単回投与後、コントロール群と比較して、FA-M-β-CyD投与群では有意に腫瘍の成長を抑制した。また、コントロール群では体重の顕著な低下が認められたが、FA-M-β-CyD投与群では、体重の減少は緩やかであった。さらに、コントロール群では、サンプル投与後9日で67%の生存率であったのに対し、FA-M-β-CyD投与群では100%の生存率を示した。これらの結果より、FA-M-β-CyDは*in vivo*においても優れた抗腫瘍活性を有することが示唆された。

博士後期課程の後半では、熊本大学エイズ学研究中心との共同研究にも参加させていただいた。岡田誠治教授をはじめとする医学部の方々と共に研究を進めることで、医学部目線でのアドバイスや研究の進め方など学ぶことが多く、とても貴重な経験をさせていただいた。

今回の寄稿にあたり、改めて5年間の大学院生活を振り返ってみると、当初思い描いたものとは遠くかけ離れたものであった。進学当時は、研究はもとより、セミナーの勉強さえ追いつかず、質問に対する答え以前に質問内容が理解できなかった。さらに薬学の専門用語も何一つ分からず、まるで外国語を聞いているかのような状態であった。周囲との知識の差に愕然としたことを今でも鮮明に覚えている。修士論文をまとめる時期になってもキーとなるデータは一向に出ず、時間ばかりが過ぎて行くような状況の中で、元来プラス思考である筆者も自分は研究には向いていないのではないか、と自己嫌悪に陥り葛藤する日々であった。ただ、今改めて振り返ると、研究

の世界に足を踏み入れて僅か1~2年の人間が研究に向いている、向いていないと悩むなど何とも生意気な学生だったと反省しているが、当時の筆者は真剣に悩んでいた。しかし、その様な状況の中で、今日まで諦めず研究を続けてこられたのは、先生方をはじめ先輩、同期、そして後輩の励ましや支えがあったからに他ならない。特に、同期には本当に支えてもらった。筆者の学年は、3/4が外部進学者と何とも珍しい学年であったが、本当に仲が良く、多くのことを語り合う仲であった。修士論文の作成にあたっては、セミナー室を占領して資料を広げ、夜遅くまで励まし合いながら論文作成に精を出していたことを懐かしく思う。同期が居なければ修士論文はまとめることができなかつたと思っている。また、博士後期課程に進学してからはデータをなかなか形にすることができず、学位を取得する日は自分には来ないのではないかと何十回、何百回と思った。先生方にもご心配とご迷惑をお掛けしてしまったと深く反省している。しかし、多くの方々に支えていただき、最後まで諦めず自分の研究と向き合い続け、最後に自分自身が納得できる結果を残すことができたことで、「何事も継続は力なり」と改めて感じている。自分自身が調製した薬物を動物に投与した時の感動は今でも忘れることができない。もう一度、大学院生活を送りたいか、と聞かれれば答えは「ノー」であるが、もう一度生まれ変わっても大学院に進学するか、と問われれば答えは「イエス」である。大学院時代の経験が今の私の研究の糧になっていると思う。

4. お わ り に

2013年5月より竹内洋文教授が主宰する岐阜薬科大学・薬物送達学大講座・製剤学研究室の助教として着任した。現在は、竹内洋文教授、田原耕平講師と共に研究室の統一テーマである「人に優しい製剤設計」をコンセプトに研究を進めている。筆者は研究の道に進んでからまだ8年、学位を取得してからはまだ2年という研究者としてはまだまだ新たな一歩を踏み出したばかりである。しかし、今日に至るまで工学、薬学といくつかの研究室で研究に取り組む機会に恵まれたことは、今後の糧になるものと考えている。これからも柔軟性と好奇心、探究心を忘れずに岐阜薬科大学製剤学研究室で粒子設計をはじめとする様々な研究に挑戦して行きたいと思う。また、教育を通して、研究の素晴らしさ、楽しさを少しでも学生たちに伝えて行ければと思う。そしてなにより、社会に貢献できる研究者として努力し続けていきたいと思っている。

最後に、これまでの筆者の研究生活において、ご指導いただきました先生方、支え励まして下さった

先輩、同期、後輩の皆様に、この場を借りて深く感謝致します。

引 用 文 献

- 1) R. Onodera, K. Motoyama, H. Arima, Design and evaluation of folate-appended methyl- β -cyclodextrin as a new antitumor agent, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **70**, 321–326 (2011).
- 2) R. Onodera, K. Motoyama, A. Okamatsu, T. Higashi, H. Arima, Potential Use of folate-appended methyl- β -cyclodextrin as an anticancer agent, *Sci. Rep.*, **3** (1104), 1–9 (2013).
- 3) R. Onodera, K. Motoyama, A. Okamatsu, T. Higashi, R. Kariya, S. Okada, H. Arima, Involvement of cholesterol depletion from lipid rafts in apoptosis induced by methyl- β -cyclodextrin, *Int. J. Pharm.*, **452** (1–2), 116–123 (2013).
- 4) R. Onodera, K. Motoyama, A. Okamatsu, T. Higashi, R. Kariya, S. Okada, H. Arima, Involvement of autophagy in antitumor activity of folate-appended methyl- β -cyclodextrin, *Sci. Rep.*, **4** (4417), 1–8 (2014).
- 5) K. Motoyama, R. Onodera, A. Okamatsu, T. Higashi, R. Kariya, S. Okada, H. Arima, Potential use of the complex of doxorubicin with folate-conjugated methyl- β -cyclodextrin for tumor-selective cancer chemotherapy, *J. Drug Target.*, **22** (3), 211–219 (2014).