

ヒアルロン酸をナノキャリアとするノシル化ドキシソルビシンのグルタチオン応答活性化と DNA との相互作用の評価

○幸村 友菜¹・関 智宏¹・関 俊暢¹ (1城西大院薬)

Evaluation of Glutathione-Responsive Activation and Interaction with DNA of Nosylated Doxorubicin Using Hyaluronic Acid as a Nanocarrier (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Josai University¹)
YUKIMURA, Tomona¹; SEKI, Tomohiro¹; SEKI, Toshinobu¹

大腸がんなどに過剰発現する表面抗原 CD44 では、そのバリエーションアイソフォーム (CD44v) が生じ、抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) の生合成を促進して還元的な細胞内環境を形成することが最近の研究から明らかとなっている。これらのがんにおいて過剰発現する CD44v による酸化ストレスを免れる機構の獲得が薬物や放射線への治療抵抗性の一因として挙げられる¹⁾。ヒアルロン酸 (HA) は、CD44 のリガンドであり、ターゲティングのためのナノキャリアとして利用できる²⁾。そこで、HA に結合したプロドラッグががん細胞内の高濃度 GSH 環境で抗がん薬を放出して薬効を示すドラッグデリバリーシステムをデザインした (Fig. 1)。本発表では、高濃度 GSH 環境において脱保護される *o*-ニトロベンゼンスルホニル (ノシル基, Ns) をモデル薬物のドキシソルビシン (Dox) のアミノ基に修飾し、得られるプロドラッグ (Ns-Dox) の GSH 応答活性化を非細胞系および細胞系で評価した。

合成により得られた Ns-Dox では、Dox の蛍光性が抑制されており、この性質を利用して活性化の評価を行った (Fig. 2A)。

Dox および Ns-Dox のモデル二本鎖 DNA との分子間相互作用について等温滴定量熱測定 (ITC) を用いて評価した結果、結合定数はそれぞれ $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ と、Ns-Dox で約 1/50 に低下しており、この Ns-Dox の DNA との小さい結合親和性から活性化前の毒性が低いプロドラッグとして機能することが期待された。

Ns-Dox 活性化の非細胞系での評価として、緩衝液中にがん細胞内の GSH 濃度を想定した 1、5 mM、およびがん細胞外を想定した GSH $20 \mu\text{M}$ が共存する条件で、Dox の放出を経時的な蛍光強度測定により追跡した結果、GSH 1、5 mM では 8 h において 11.4、40.7% と GSH 濃度依存的な Dox への放出率を示したのに対し、GSH $20 \mu\text{M}$ では、8 h においても Dox への放出は検出限界以下であり、血液中では安定なプロドラッグであると考察された。In vitro 細胞系での Ns-Dox 活性化の評価として CD44v 発現及び GSH 濃度が高いヒト大腸癌由来 HCT116 細胞を用いて Ns-Dox を添加し変換される Dox を経時的に共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、Ns-Dox の活性化による経時的な Dox の蛍光強度の増加が確認された (Fig. 2B)。

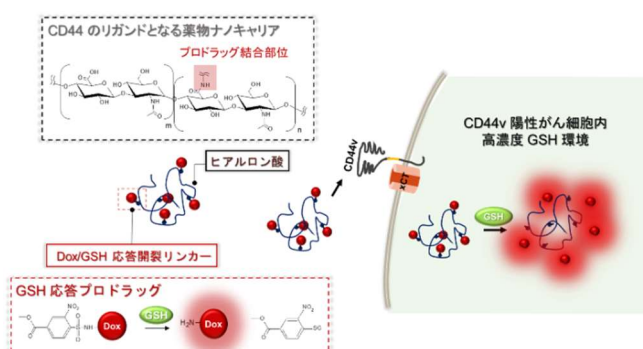


Fig. 1 ヒアルロン酸を用いる CD44 陽性がんターゲットと GSH 応答プロドラッグ放出システム

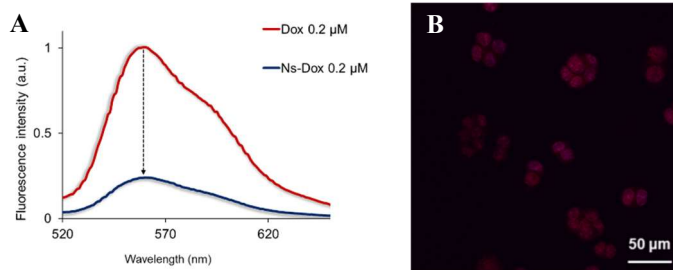


Fig. 2 (A) pH 7.4 緩衝液中 Dox 及び Ns-Dox の蛍光強度比較 $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 557 \text{ nm}$ (B) Ns-Dox 添加後 6 h における HCT116 細胞を用いた共焦点レーザー顕微鏡でのイメージング Merge Alexa Fluor 594 $\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}670 \text{ nm}$, DAPI $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 430\text{-}470 \text{ nm}$

- 1) Ishimoto T., Nagano O., Yae T., Cancer Cell, Mar 8, 19(3), 387-400 (2011).
- 2) Amélie W., Hervé H., Thais N., Journal of Controlled Release, 162(3), 545-552 (2012).