

Poloxamer 407 のアポトーシス誘導能と DDS としての有用性

田村 倫子^{*1}, 菅谷 麻希^{*2}, 久富 寿^{*3}

Poloxamer 407 induces *p53* related apoptosis in human leukemic cell line

Michiko TAMURA^{*1}, Maki SUGAYA^{*2}, Hisashi HISATOMI^{*3}

ABSTRACT : Poloxamer block copolymers have been studied in multiple applications as drug delivery systems. These A-B-A amphiphilic block copolymers can up-regulate the expression of selected genes in cells and alter genetic responses to antineoplastic agents in cancer. One example is poloxamer 407, also known as pluronic F127, which may be a promising carrier in drug delivery systems (DDS). To clarify the possible mechanistic role of pluronic F127 in leukemia cell lines, we tested whether pluronic F127-inducible factors would cause apoptosis. The influence of pluronic F127 in cell lines was examined using a comprehensive analysis. Based on these studies, it was proposed that treatment of NALM-6 cells with 3% pluronic F127 resulted in an arrested G₂/M phase of the cell cycle, followed by caspase activation and accumulation of apoptotic cells. When used as a carrier in a DDS, pluronic F127 may provide a synergistic effect on the drug of interest. Although the mechanisms of the function of pluronic F127 are not fully understood, our study suggests that pluronic F127 may act as a useful carrier in DDS for purposes of leukemia therapy.

Keywords : pluronic, drug delivery system, *p53*, apoptosis

(Received March 23, 2010)

1. はじめに

薬は治療部位の細胞に到達し、細胞に刺激を与えることで薬効を発揮する。しかし、実際に作用部位へ到達する量はほんの一部であり、ほとんどは代謝・排泄されたり、作用部位以外へ作用することで副作用の原因ともなる。そのため、副作用が誘発されないよう“必要量の薬を、必要な場所に、必要なときに供給する”ドラッグデリバリーシステム (DDS : Drug Delivery System) が理想的な投与方法として提案されている。DDSは、副作用の抑制だけでなく、薬剤の持続的な放出、薬剤の体内半減期の延長、種々の部位での薬剤の吸収促進および薬剤の標的組織への特異的な送達などの効果が期待されている^{1,2)}。DDSの研究には内容物の薬剤だけでなく、封入し

た薬剤を安定して患部へ輸送可能な薬物キャリアーの開発が必要である。現在、薬物キャリアーとして水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG)が臨床応用されている。PEGは細胞やタンパク質などの生体成分との相互作用が小さく、タンパク質への修飾により抗原性の減少および血液循環性の増大などの効果がある。これらの効果より、薬物が標的細胞に到達する量が増大し、標的への暴露時間が延長するため薬剤効果が向上する。実際に、PEGで修飾されたタンパク質がPEG修飾タンパク質医薬品として発売されている。その一例として、アデノシンデアミナーゼとPEGを結合させた重症免疫不全複合疾患治療薬Adagen[®]が挙げられる²⁾。Adagen[®]を服用することにより、アデノシンデアミナーゼの体内濃度が上昇し、体内維持期間が数週間から最長6か月まで向上した。しかし、PEGは疎水性の化学構造を有した薬物を安定して標的部位まで輸送できない、標的細胞への選択性を高めることができないなどの問題点が挙げられる。

*1 : 理工学研究科理工学専攻博士前期課程

*2 : 物質生命理工学科 助教

*3 : 物質生命理工学科 教授 (hisatomi@st.seikei.ac.jp)

PEGに代わる合成高分子として両親媒性高分子であるPoloxamerが挙げられる³⁾。Poloxamerは商品名であるPluronic[®]と呼ばれるのが一般的で、ethylene oxide (EO)とpropylene oxide (PO)から構成され、EOX-POY-EOX (A-B-A)の構造を示すブロック共重合体である。親水性であるEOXと疎水性であるPOYにより、親水親油バランスに影響を与え、ブロック共重合体としての物性変化により、分子量の制御が可能である^{4,5)}。PEGと比較して疎水性の化学構造を有した薬物の封入が可能であり、使用用途に適した分子量の選択も可能である^{4,6)}。また、温度にตอบสนองして形状が変化するため、遺伝子治療に用いるGeneキャリアーや人工皮膚作製用支持体などへの活用が期待されている^{7,8)}。

以前、我々はPluronic[®] F68 (PF68) による慢性骨髄性白血病細胞株K562細胞特異的なアポトーシス誘導能を発見した⁹⁾。このことは慢性骨髄性白血病をターゲットとしたDDSの薬物キャリアーとして、F68の有用性を示唆するものである。本研究では、PF68に比べ分子量が約2倍のPluronic F127 (PF127) に着目し、他疾患におけるDDSとしての可能性を確認するために、PF127投与による生細胞数増加率、細胞周期および遺伝子発現の変化を調査したので報告する。

2. 材料と手順

2. 1 細胞培養

ヒトB細胞白血病由来細胞株NALM-6細胞、ヒト大腸癌由来細胞株DLD-1細胞およびヒト肝癌由来細胞株Huh-7細胞は東北大学加齢医学研究室医用細胞資源センターから入手した。また、ヒト胃癌由来細胞株MKN-45細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。Huh-7細胞では10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U / mL Benzylpenicillin Potassium, 25 µg / mL Streptomycinを添加したD-MEM培地 (Invitrogen), その他の細胞では10% FBS, 100 U / mL Benzylpenicillin Potassium, 25 µg / mL Streptomycinを添加したRPMI1640培地 (Invitrogen)を用い、37°C, 5% CO₂条件下で培養を行った。

2. 2 Flow cytometry を用いた細胞周期測定

ヒト培養細胞に6% PEG, 6% PF68, 3% PF127をそれぞれ投与し、48 h 培養後、培養した細胞から遠心分離を用いて培地を除去し、約3×10⁵個の細胞に300 µLの低張処理液 (0.05% Sodium citrate, 0.1% NP40)を用いて細胞懸濁液を作製した。その後、0.75 mM Propidium

iodide (PI, SIGMA)を30 µL 添加し、Flow cytometry (FCM, Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter)を用い細胞周期を解析した^{9,10)}。

2. 3 Annexin Vを用いたアポトーシス解析及び

正常リンパ球を用いた細胞周期測定

2. 3. 1 Annexin Vを用いたアポトーシス解析

2. 2と同様に任意の濃度でヒト培養細胞に各種化合物を投与し、48 h 培養を行った。培養後遠心分離を用いて培地を除去し、約3×10⁵個の細胞に100 µLのAnnexin V Binding Buffer (Beckman coulter)を用いて細胞懸濁液を作製した。その後1 µLのAnnexin V-FITC solution (Beckman coulter)と0.75 mM PIを5 µL 添加し、氷浴中、暗所下で15 min 静置した。静置後400 µLのAnnexin V Binding Bufferを添加し、FCMを用いてアポトーシス解析を行った⁹⁾。

2. 3. 2 Tリンパ球の幼若化

EDTA・2Na (10.5 mg)入りプラスチック製真空採血管を用いて健常人の上腕肘静脈より約5 mL 採血した。採血した健常人末梢血を1000 ×g, 25 min 遠心分離を行い、有核層を回収した。回収した有核層に等量のPBSを加えて希釈した。3 mLの希釈した有核層を3 mLのリンホセパールII (免疫生物研究所)に重層し、400 ×g, 30 min 遠心分離を行った。密度勾配により分離されたリンパ球層を回収し、112 ×g, 5 min 遠心分離を行った。遠心分離後上清を除去し、PBSで2回洗浄した。洗浄後、単球を除去するためリンパ球をRPMI培地を用いて組織培養用ディッシュで1 h, 37°C, 5% CO₂条件下で培養した。回収したリンパ球をPBSで洗浄し、100 ng / mL anti-CD3 mbs (Beckman coulter)および40 µg / mL PHA/PBSを添加したRPMI培地 (Invitrogen)を用いて24 h, 37°C, 5% CO₂条件下で培養を行い、Tリンパ球を幼若化させた。

2. 3. 3 正常リンパ球を用いた細胞周期測定

採血した健常人末梢血から採取したTリンパ球を幼若化させた後、2. 2と同様に任意の濃度でヒト培養細胞に各種化合物を投与し、48 h 培養を行った。培養後、遠心分離を用いて培地を除去し、約3×10⁵個の細胞に300 µLの低張処理液を用いて細胞懸濁液を作製した。その後0.75 mM PIを30 µL 添加し、FCMを用いた細胞周期を解析した。

2. 4 RT-PCR 法による mRNA 発現量の解析

2. 4. 1 Total RNA 抽出

各種化合物投与を行った細胞から Quick Gene RNA cultured cell HC kit S (富士フィルム)を用いて、Quick Gene mini80 (富士フィルム)により total RNA を抽出した。

2. 4. 2 cDNA 合成

22.5 μ L の Reaction Mixture (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 4 mM DTT, 0.5 mM dNTP, 15 ng / μ L Random Primer, 1.6 U / μ L M-MLV RTase (Invitrogen), 0.96 U / μ L ribonuclease Inhibitor (Takara)に total RNA 2.5 μ L (100 ng / μ L)を添加し、40°C, 1 h cDNA 合成を行った。

2. 4. 3 Primer 設定

NCBI (National Center for Biotechnology Information)を参照し、TP53 mRNA に対応する Forward primer を 5'- TTT CAG ACC TAT GGA AAC TAC TTC-3', Reverse primer を 5'-TGG CAT TCT GGG AGC TTC ATC T-3'と設定した。

2. 4. 4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

10 μ L の PCR Mixture (10 $\times$ Paq5000TM Reaction Buffer (Stratagene), 0.25 mM dNTP, 0.8 U Paq5000TM DNA Polymerase (Stratagene), 100 pM Forward Primer, 100 pM Reverse Primer)に合成した cDNA を 1 μ L 添加し、95°C / 30 sec, 58°C / 30 sec, 72°C / 30 sec を 1 サイクルとした PCR 反応を 35 サイクルで行った (2720 Thermal cycler, Applied Biosystems)。

2. 4. 5 電気泳動

反応終了後、PCR 増幅産物を 2%アガロースゲルに供し、145 V, 35 min の電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色した PCR 増幅産物を UV トランスイルミネーターによって確認した。

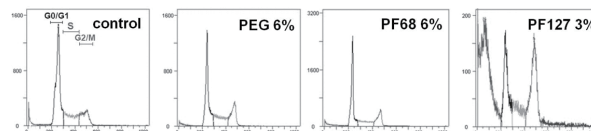
3. 結果

3. 1 Flow cytometry による細胞周期測定

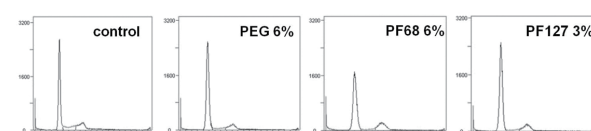
NALM-6 細胞, DLD-1 細胞, Huh-7 細胞および MKN45 細胞における 6% PEG, 6% PF68, 3% PF127 投与による細胞周期への影響を FCM で測定した結果を図 1 に示した。FCM 測定により得られたヒストグラムから、NALM-6 細胞において PF127 投与による G₂/M 期への細胞周期同調が確認された。また、DLD-1 細胞, Huh-7 細胞および MKN-45 細胞において、各種化合物投与による細胞周期に変化は確認されなかった。これら

の結果より、PF127 の細胞周期同調能は白血病由来細胞株に特異的に作用していることが確認され、DNA 合成および細胞分裂の阻害を誘発していると推測された。

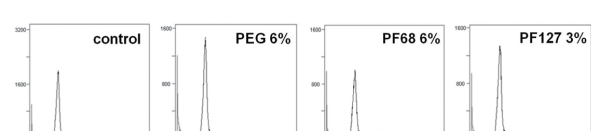
NALM-6 細胞



DLD-1 細胞



Huh-7 細胞



MKN45 細胞

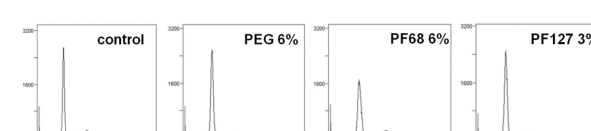


図 1. 各種化合物投与による細胞周期の経時的変化

縦軸:細胞数, 横軸:DNA 量, G₀/G₁期:間期, S 期:DNA 合成期, G₂/M 期:細胞分裂期. NALM-6 細胞において PF127 投与による G₂/M 同調が確認された。

3. 2 Annexin Vを用いたアポトーシス解析および正常リンパ球を用いた細胞周期測定

NALM-6 細胞において PF127 投与によるアポトーシス誘導が確認された(図 2)。また、正常リンパ球において各種化合物投与による細胞周期への影響は確認されなかった(図 3)。

これらの結果より、PF127 は正常リンパ球には細胞周期への影響はなく、白血病由来細胞株のみに特異的な細胞周期同調能およびアポトーシス誘導能を示すことが推測された。

3. 3 RT-PCR 法による mRNA 発現量変化の解析

NALM-6 細胞, DLD-1 細胞, Huh-7 細胞および MKN45 細胞において、各種化合物を投与した細胞から抽出した mRNA を用いた RT-PCR 法による解析結果を図 4 に示した。NALM-6 細胞において、PF127 投与に

より *TP53* 遺伝子に発現量の減少が確認された。なお、その他の細胞では、*TP53* 遺伝子に発現量の変化

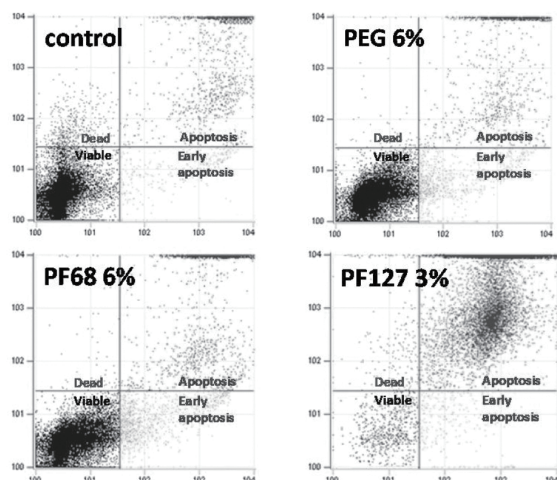


図2. アポトーシス解析 (NALM-6 細胞)

縦軸:PI の蛍光強度, 横軸:Annexin V の蛍光強度, Viable:生細胞, Early apoptosis:早期アポトーシス細胞, Apoptosis:後期アポトーシス細胞, Dead:死細胞. PF127 投与により, NALM-6 細胞株に特異的なアポトーシス誘導が確認された。

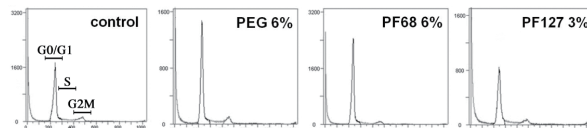


図3. 正常リンパ球への投与による細胞周期変化

縦軸:細胞数, 横軸:DNA 量, G₀/G₁ 期:間期, S 期:DN 合成期, G₂/M 期:細胞分裂期. 正常リンパ球では化合物投与による細胞周期の変化は確認されなかった。

細胞名	control	PF68	PF127
NALM-6			
DLD-1			
Huh-7			
MKN45			

図4. 各細胞における各種化合物による *TP53* mRNA 発現量比較結果

NALM-6 細胞において, PF127 投与により *TP53* mRNA の発現低下が確認された。

に顕著に顕著な差異は認められなかった。よってこれらの結果から, PF127 の白血病由来細胞株に特異的なアポ

トーシス誘導には *TP53* 遺伝子が関与していることが推測された。

4. 考 察

本研究より, PF127 における白血病由来細胞株に特異的な細胞増殖抑制能, 細胞周期同調能およびアポトーシス誘導能を持つことが確認された。このことは, 薬物キャリアーががん細胞に薬剤を介さずに影響を与えた点で DDS の基本概念から逸脱している。しかし, 薬物キャリアーそのものの薬剤としての効果が内包した薬剤の効果と拮抗しなければ, 薬物キャリアーに薬効があっても何ら問題はない。Pluronic[®]の抗腫瘍効果は, むしろ内包する抗がん剤との相乗効果が期待できる。特に G₂/M 期への細胞周期と無関係な抗がん剤との併用が期待される。

Pluronic[®]による白血病細胞株に対する細胞同調能が何に起因するかは, 今のところ不明である。健康人末梢血由来の正常リンパ球や吸着性の固形癌由来細胞などへの細胞同調能が全く確認されないことから, 培養構成成分, 例えば培養液や血清などへの結合により, 成分組成が変化するためとも考えられる。Pluronic[®]の種類によって培養構成成分への結合性が異なり, 組成の変化が原因の異なる細胞同調を誘導しているとすれば, 理解しやすい。しかし, 培養構成成分の変化が, 白血病由来細胞にのみ影響しているとは考えにくい。本報告では白血病細胞株として NALM-6 細胞のみの結果を報告したが, 実際には他の白血病細胞株として, K562 細胞, HL-60 細胞, U937 細胞, Molt-4 細胞, Molt-17 細胞でも同様の実験を行い, 細胞同調に変化がないことを確認している(未発表データ)。したがって, 我々が以前に確認した K562 細胞に対する PF68⁹⁾, 本報告による NALM-6 細胞に対する PF127 の組み合わせ以外は, 例えば K562 細胞に対しての PF127 では細胞同調能は確認されない。K562 細胞は同調させるが NALM-6 細胞は同調させない培養構成成分の変化は, NALM-6 細胞に比べ K562 細胞の細胞増殖能が強いため, 考えにくい。細胞同調能の選択性に関しては, 原因の複雑さが容易に推測可能であり, 多くの検証を要すると推測される。

B 細胞の急性リンパ性白血病(ALL)に由来する NALM-6 細胞に対する PF127 投与は, p53 タンパク質を介したサポトーシスを誘導することが明らかになり, 直接の理由は不明なものの, PF127 の ALL における DDS としての有用性を示唆することとなった。

以上により, Pluronic[®]は白血病由来細胞株に特異的なアポトーシス誘導能を有した物質であり, 白血病をタ

ターゲットとした DDS の薬物キャリアーとして抗がん剤と併用することで、封入した抗がん剤との相乗効果が期待される。

10) Rabinovitch PS. DNA content histogram and cell cycle analysis. *Meth Cell Biol.* 1994; 41:263-96

参考文献

- 1) 田端康彦, ドラッグデリバリーシステム DDS 技術の新たな展開とその活用法, 株式会社 メディカルドゥ, 2003
- 2) Ellis KM, Mazzoni L, Fozard JR. Role of endogenous adenosine in the acute and late response to allergen challenge in actively sensitized Brown Norway rats. *Br J Pharmacol.* 2003; 139: 1212-1218
- 3) Kabanov AV, Bratrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release.* 2002;82:189-212
- 4) Newman MJ, Actor JK, Balusubramanian M, Jagannath C. Use of nonionic block copolymers in vaccines and therapeutics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1998;15:89-142
- 5) Slepnev VI, Kuznetsova LE, Gubin AN, Bratrakova EV, Alakhov VYu, Kabanov AV. Micelles of poly(oxyethylene)-poly (oxypropylene) block copolymer (pluronic) as a tool for low-molecular compound delivery into a cell: phoasphorylation of intracellular proteins with micelle incorporated [γ 32P]ATP. *Biochem Int.* 1992;26:587-595
- 6) Zhang L, Parsons DL, Navarre C, Kompalla UB, Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *J Control Release.* 2002;85:73-81
- 7) Kwon GS, Naito M, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles. *Pharm Res.* 1995;12:192-195
- 8) Kwon GS, Okano T. Soluble self-assembled block copolymers for drug delivery. *Pharm Res.* 1999;16:597-600
- 9) Aoki N, Tamura M, Ohyashiki JH, Sugaya M, Hisatomi H. Poloxamer 188 enhances apoptosis -pathway in human leukemia cell line. *Mol Med Rep.* 2010; in press.