

201313063B

別紙1

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

腫瘍細胞選択的新規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
細胞死誘導機構の解明

平成24年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 本山 敬一

平成26(2014)年 4月

目 次

| | |
|---|---------|
| I. 総合研究報告 | |
| 腫瘍細胞選択的新規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 細胞死誘導機構の解明 | ----- 1 |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- 8 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- 9 |

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総合研究報告書

研究課題：腫瘍細胞選択的新規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細胞死誘導機構の解明

研究代表者：本山敬一 熊本大学大学院生命科学研究部 製剤設計学分野

研究要旨

本研究の目的は、腫瘍細胞選択的新規抗がん剤として期待される葉酸修飾メチル-β-シクロデキストリン (FA-M-β-CyD) の抗腫瘍活性および細胞死誘導機構を明らかにすることである。種々検討した結果、FA-M-β-CyD は葉酸レセプター (FR-α) を介して細胞会合し、抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。さらに、誘導される細胞死について検討を行ったところ、FA-M-β-CyD は、アポトーシスではなく、オートファジーを誘導することが示唆された。また、FA-M-β-CyD はミトコンドリア膜電位を著しく上昇させたことから、ミトコンドリアにストレスを与え、マイトファジーを誘導した可能性が考えられる。次に、FA-M-β-CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性を検討するため、担がんマウスに FA-M-β-CyD を尾静脈内に単回投与し、腫瘍体積および生存率について検討した。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、コントロール群では、担がんマウスは癌細胞を移植後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。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。以上の知見より、FA-M-β-CyD は、細胞形質膜上の FR-α を介して細胞内に取り込まれた後、ミトコンドリアの膜電位を上昇させることでストレスを誘導し、オートファゴソームの形成およびマイトファジーを介して抗腫瘍活性を示したものと考えられる。

A. 研究目的

本研究の目的は、腫瘍細胞選択的新規抗がん剤として期待される葉酸修飾メチル-β-シクロデキストリン (FA-M-β-CyD) の抗腫瘍活性および細胞死誘導機構を明らかにすることである。

メチル-β-シクロデキストリン (M-β-CyD) は、腫瘍細胞で発現が上昇する脂質ラフトからコレステロールを遊離させることにより、その構造や機能に影響を与えるラフト阻害剤である。我々は、M-β-CyDは形質膜上の脂質ラフトからコレステロールを遊離させることにより、PI3K-Akt-Bad経路を介した細胞生存シグナルを阻害し、アポトーシスを誘導することを明らかにした (*Eur. J. Pharm. Sci.*, 2009)。一方、葉酸レセプター (FR-α) は各種上皮がんで過剰発現しているため、葉酸 (FA) はがん標的リガンドとして汎用されている。これまで我々は、M-β-CyDのがん細胞選択性および抗腫瘍効果の増大を企図して、M-β-CyD に FA を導入したFA-M-β-CyDを新規に調製し、FA-M-β-CyDが FR-α 高発現細胞に対して殺細胞効果を示すことを明らかにした。そこで本研究では、FA-M-β-CyD の抗腫瘍活性および細胞死誘導機構について検討した。

B. 研究方法

FA-M-β-CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性は、FR-α 高発現細胞であるヒト口腔がん細胞由来 KB 細胞を用いてWST-1 法により評価した。FA-M-β-CyD の細胞会合は、TRITC を付加したTRITC-FA-M-β-CyD を用いて、フローサイトメトリーにて検討した。FA-M-β-CyD により誘導される細胞死がアポトーシスであるか否かを DNA 含量およびミトコンドリア膜電位を指標に検討した。オートファゴソーム形成に及ぼす FA-M-β-CyD の影響は、オートファゴソームマーカー分子である LC3-II を Cyto-ID® を用いて染色し、蛍光顕微鏡により観察した。FA-M-β-CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性は、FR-α高発現がん細胞を用いて作成した担がんマウスに FA-M-β-CyDを尾静脈内に単回投与し、腫瘍体積および生存率について検討した。

なお、本研究では、組換えDNA実験、遺伝子治療臨床研究、特定胚を取り扱う研究、ヒトES細胞の研究、ヒトゲノム・遺伝子解析研究、疫学研究、臨床研究に該当する研究を計画しておらず、倫理面・安全面において問題はない。また、動物実験は、熊本大学動物実験等に関する規則に則り、

動物実験計画書の作成・提出、実験動物実験安全管理委員会での審議を経て、学長からの許可のもと実験を行った。なお、本研究を推進する上で、動物を用いた前臨床試験の実施例は必要であるが、必要最低限の動物を用いて、動物に可能な限り苦痛を与えないように研究を実施した。

C. 研究結果

C-1. FA-M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性

FA-M- β -CyD が FR- α 高発現細胞選択的な抗腫瘍活性を有するか否かを検討するため、FR- α 高発現細胞である KB 細胞 (FR- α (+))、Ihara 細胞 (FR- α (+))、M213 細胞 (FR- α (+)) および FR- α 低発現細胞である A549 細胞 (FR- α (-)) を用いて FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性を WST-1 法により評価した。なお、ここでは FA-M- β -CyD の比較対照として、 β -CyD、DM- β -CyD および M- β -CyD の 3 種の β -CyDs を用いた。

FA-M- β -CyD は、KB 細胞において濃度依存的かつ、DM- β -CyD には劣るものの、 β -CyD および M- β -CyD と比較して有意に高い抗腫瘍活性を示した。一方、A549 細胞において DM- β -CyD は KB 細胞と同様に強い細胞障害性を示したが、FA-M- β -CyD は 10 mM まで抗腫瘍活性を示さなかった。さらに、FA-M- β -CyD は Ihara 細胞および M213 細胞においても有意に高い抗腫瘍活性を示した。これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的な抗腫瘍活性を有することが示唆された。

C-2. FA-M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性誘導機構

C-2-1. コレステロール漏出に及ぼす各種 β -CyDs の影響

これまで我々は、M- β -CyD は細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させることにより、KB 細胞にアポトーシスを誘導するを明らかにした。そこで本項では、KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) における FA-M- β -CyD のコレステロール漏出能について検討した。実験は、KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) を各種 β -CyDs 含有無血清培地で 1 時間処理し、上清中のコレステロールをコレステロールオキシダーゼ・DAOS

法 (コレステロール E テストワコー®) を用いて測定した。FA-M- β -CyD は、KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) において、M- β -CyD および DM- β -CyD よりもコレステロールを強く漏出させた。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 発現の有無に関わらず、細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを強く漏出させることが示唆された。先の検討より、A549 細胞 (FR- α (-)) における抗腫瘍活性は、FA-M- β -CyD よりも M- β -CyD の方が有意に高かったことから、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性誘導には細胞形質膜との相互作用の寄与は低いことが示唆された。

C-2-2. FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼす葉酸レセプター (FR) の影響

FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性が FR- α を介するか否かを FR 競合阻害剤を用いて検討した。 β -CyD、DM- β -CyD および M- β -CyD の抗腫瘍活性は、FR 競合阻害剤である FA 添加の影響を受けなかった。一方、FA 添加系における FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、FA 非添加系と比較して有意に低下した。次に、FR- α ノックダウン KB 細胞における FA-M- β -CyD (5 mM) の抗腫瘍活性を検討した。FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、コントロール siRNA (siControl) をトランスフェクションした KB 細胞と比較して、FR- α ノックダウン KB 細胞において有意に低下した。これらの結果より、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は FR- α を介することが強く示唆された。

C-2-3. FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼすエンドサイトーシス阻害の影響

一般に、リガンド修飾された分子は受容体を介したエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。このエンドサイトーシスは、駆動力となるエネルギーを必要とするが、これは低温処理により顕著に阻害される。そこで本項では、KB 細胞 (FR- α (+)) における FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼすエンドサイトーシスの関与を検討した。実験は、KB 細胞 (FR- α (+)) に FA-M- β -CyD を添加した後、4°C でインキュベーションすることによりエンドサイトーシスを阻害し、細胞生存率を算出した。その結果、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は低温処理により有意に抑制された。これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α を介したエンドサイトーシス

ーシスにより細胞内に取り込まれ、抗腫瘍活性を示すことが示唆された。

C-2-4. FA-M- β -CyD の細胞会合および細胞内取り込み

一般に、CyD は親水性かつ分子量が約 1000 と大きいことから細胞内に取り込まれにくいことが知られている。実際、M- β -CyD は細胞内にほとんど取り込まれないことを我々は明らかにしている。しかし、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的に優れた抗腫瘍活性を有すること、さらに、その抗腫瘍活性誘導に FR- α を介した細胞内取り込みが関与することが示唆された。そこで本項では、TRITC を付加した TRITC-FA-M- β -CyD を用いて、各種 FR- α 高発現細胞との細胞会合に及ぼす FR 競合阻害剤の影響を検討した。また、FR- α ノックダウン KB 細胞を用いて、TRITC-FA-M- β -CyD の細胞会合に及ぼす FR- α の影響も検討した。実験は 4 mM FA 存在下、10 μ M TRITC-FA-M- β -CyD 添加後 1 時間における TRITC の蛍光強度をフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡により評価した。また、細胞内分布を蛍光顕微鏡にて観察した。さらに、KB 細胞 (FR- α (+)) および A549 細胞 (FR- α (-)) を 1 mM FA-M- β -CyD 含有無血清培地で 1 時間処理した後、1 M 水酸化ナトリウムで細胞を可溶化し、細胞内に取り込まれた FA の蛍光強度を蛍光分光光度計にて評価した。

TRITC-FA-M- β -CyD は KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞と会合することが示唆された。また、TRITC-FA-M- β -CyD のヒストグラムのピークは、FA 添加により左側にシフトした。また、FR- α ノックダウン細胞においても TRITC-FA-M- β -CyD の細胞会合は抑制されることが示唆された。また、蛍光顕微鏡による観察から、TRITC-FA-M- β -CyD は KB 細胞内に取り込まれることが確認された。

さらに、FA の蛍光強度を指標に、FA-M- β -CyD の細胞会合量を調べたところ、KB 細胞に対する FA-M- β -CyD の会合量は、A549 細胞の系よりも有意に高いことが示唆された。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞と FR- α を介して細胞会合することが強く示唆された。さらに、TRITC-FA-M- β -CyD は添加 1 時間後において細胞質に TRITC 由来の蛍光が観察されたことから、M- β -CyD とは対照的に細胞内に取り込まれることが確認された。

C-2-5. DNA 含量およびミトコンドリア膜電位変化に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

これまで我々は、KB 細胞において M- β -CyD はアポトーシスを誘導することを明らかにしている。そこで本項では、FA-M- β -CyD により誘導される細胞死がアポトーシスであるか否かを DNA 含量およびミトコンドリア膜電位変化を指標に検討した。KB 細胞に M- β -CyDs (10 mM) を 2 時間適用後の DNA 含量を調べたところ、DM- β -CyD 処理では、DNA 含量の有意な低下が認められた。一方、M- β -CyD および FA-M- β -CyD 処理では、コントロールとほぼ同程度の DNA 含量を示した。

各種 M- β -CyDs (10 mM) を 2 時間適用後のミトコンドリア膜電位および FA 添加の影響を調べたところ、DM- β -CyD および M- β -CyD の添加により、KB 細胞のミトコンドリア膜電位が有意に低下した。一方、FA-M- β -CyD 処理ではミトコンドリア膜電位は顕著に上昇した。また、FA の添加により、FA-M- β -CyD により惹起されたミトコンドリア膜電位の上昇はコントロールレベルまで低下した。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は KB 細胞に対して、アポトーシスを誘導しない可能性が示唆された。

C-2-6. カスパーゼ-3/7 の活性化に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前項での検討に引き続き、本項ではアポトーシス実行因子であるカスパーゼ-3/7 活性に及ぼす M- β -CyDs の影響を調べた。なお、本項ではカスパーゼ-3/7 の活性化により生じるアミノルシフェリンの蛍光を指標に、アポトーシス誘導能を蛍光顕微鏡にて観察した。DM- β -CyD 添加によりカスパーゼ-3/7 活性に由来する蛍光強度の増加が観察された。一方、M- β -CyD および FA-M- β -CyD 添加による蛍光強度の増加は認められなかった。これらの結果より、DM- β -CyD はアポトーシスを惹起するのに対し、FA-M- β -CyD はアポトーシス非依存的経路を介して細胞死を誘導することが示唆された。また、本実験条件下、M- β -CyD は細胞死を誘導しないことが示唆された。

C-2-7. オートファゴソーム形成に及ぼす FA-M- β -CyD の影響

前項での検討より、FA-M- β -CyD はアポトーシス非依存的経路により抗腫瘍活性を誘導する

ことが明らかとなった。そこで本項では、オートファゴソーム形成に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を検討した。なお、オートファゴソームは、マーカー分子である LC3-II を Cyto-ID® を用いて染色し、蛍光顕微鏡により観察した。M- β -CyD は適用後 2 時間で LC3-II 由来の蛍光は観察されなかった。一方、FA-M- β -CyD では、LC3-II 由来の蛍光が顕著に増大した。さらに、オートファジー阻害剤である LY294002 の添加により、LC3-II 由来の蛍光は著しく減弱した。これらの結果より、FA-M- β -CyD は、オートファジーを誘導することが示唆された。

C-2-8. FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に及ぼすオートファジー阻害剤添加の影響

前項において、FA-M- β -CyD はオートファゴソームの形成を誘導することが示唆された。そこで本項では、FA-M- β -CyD により誘導される抗腫瘍活性がオートファジーであるか否かを検討した。今回、オートファジー阻害剤には、バフィロマイシン A₁ およびクロロキンをを用いた。バフィロマイシン A₁ は、マクロライド系抗生物質の一つであり、V-ATPase を持つリソソームやエンドソームの内部酸性化を阻害する。その結果、オートファゴソームとリソソーム/エンドソームとの融合が阻害され、細胞質にオートファゴソームが蓄積し、オートリソソームが減少する。一方、クロロキンは、V-ATPase 活性非依存的にリソソームの pH を上昇させ、オートファゴソームとの融合を阻害する。

オートファジー阻害剤を前処理後、FA-M- β -CyD (5 mM) を 2 時間処理後の抗腫瘍活性を評価した。その結果、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、バフィロマイシン A₁ およびクロロキン添加により低下した。これらの結果より、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性はオートファジーを介することが示唆された。

C-2-9. FA-M- β -CyD 処理後のオートファゴソームとミトコンドリアとの共局在

前項までの検討において、FA-M- β -CyD は、オートファジーを介した抗腫瘍活性を誘導することが示唆された。さらに、FA-M- β -CyD はミトコンドリア膜電位を著しく上昇させたことから、ミトコンドリアにストレスを与え、マイトファジーを誘導した可能性が考えられる。そこで本項では、各種 FR- α 高発現細胞を用いて、FA-M- β -CyD のマイトファジー誘導能について検討した。実験は、LC3-II を蛍光ラベル化し、

さらにローダミン 123 にてミトコンドリア膜を染色後、蛍光顕微鏡にてオートファゴソームとミトコンドリアとの共局在を観察した。

KB 細胞を DM- β -CyD および M- β -CyD (5 mM) で 2 時間処理したところ、LC3-II の蛍光強度の増大は観察されなかった。一方、FA-M- β -CyD 処理では、LC3-II の蛍光強度の有意な上昇が観察された。さらに、LC3-II とローダミン 123 の蛍光が一部共局在したことから、オートファゴソーム内にミトコンドリアが取り込まれている可能性が示唆された。同様な結果が、Ihara 細胞および M213 細胞においても確認された。

これらの結果より、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞においてマイトファジーを誘導することが示唆された。

C-3. FA-M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性

前節までの検討において、FA-M- β -CyD は FR- α 高発現細胞選択的にオートファジーを介した抗腫瘍活性を誘導することが示唆された。そこで本節では、FA-M- β -CyD の *in vivo* 抗腫瘍活性を検討するため、Colon-26 細胞 (FR- α (+))、M213 細胞 (FR- α (+)) および Ihara 細胞 (FR- α (+)) を用いて作成した担がんマウスに FA-M- β -CyD を腫瘍内および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。なお、M213 細胞および Ihara 細胞を皮下移植した BALB/c Rag-2/Jak3 ノックアウトマウスは、B 細胞、T 細胞、NK 細胞が完全に欠損した高度免疫不全マウスである。

Colon-26 細胞を皮下に同種移植した担がんマウス腫瘍内投与後の腫瘍体積および体重変化を調べたところ、コントロール群と比較して、FA-M- β -CyD 投与群は顕著に腫瘍の成長を抑制した。また、コントロール群の体重は、腫瘍体積の増大に伴い顕著に増加した。一方、FA-M- β -CyD 投与群では、腫瘍体積の有意な減少により体重増加は緩やかであった。同担がんマウス尾静脈内に単回投与後の腫瘍体積変化を調べたところ、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。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 細胞を皮下に異種移植した担がんマウス尾静脈内に単回投与後の腫瘍体積変化を調べたところ、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。

ヒトメラノーマ Ihara 細胞を皮下に異種移植した担がんマウス尾静脈内に単回投与後の腫瘍体積変化を調べたところ、コントロール群と比較して、FA-M- β -CyD 投与群では腫瘍の成長を抑制する傾向が確認された。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。

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。

C-4. FA-M- β -CyD 投与後の血液生化学的パラメータ

前節において、FA-M- β -CyD は *in vivo* においても優れた抗腫瘍活性を誘導することが明らかとなった。一方、抗がん剤の臨床応用を考えた場合、*in vivo* における安全性を明らかにすることは重要である。そこで次に、FA-M- β -CyD の *in vivo* における安全性を検討するために、FA-M- β -CyD を Colon-26 細胞を皮下に同種移植した担がんマウスの尾静脈内に単回投与 24 時間後の血液生化学的パラメータを測定した。その結果、FA-M- β -CyD 投与群では、いずれの生化学的パラメータにおいてもコントロール群と差異は認められなかった。これらの結果より、FA-M- β -CyD は、*in vivo* において安全性に優れることが示唆された。

D. 考察

本章では、FA-M- β -CyD の腫瘍選択的抗がん剤としての有用性を *in vitro* および *in vivo* にて評価した。

FR- α 高発現細胞である KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞において、FA-M- β -CyD は

優れた抗腫瘍活性を示したが、FR- α 低発現細胞である A549 細胞では活性を示さなかった。さらに、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性は、FR 競合阻害剤である FA 添加および FR- α ノックダウン KB 細胞において有意に抑制された。一方、M- β -CyD は KB 細胞に対する抗腫瘍活性は低かったものの、A549 細胞に対して FA-M- β -CyD よりも有意に高い抗腫瘍活性を示した。これらの結果より、FA-M- β -CyD の *in vitro* 抗腫瘍活性は、FR- α 高発現細胞選択的であることが示唆された。実際、KB 細胞、Ihara 細胞および M213 細胞において、FA-M- β -CyD は細胞内に取り込まれたが、A549 細胞にはほとんど取り込まれなかった。さらに、FR- α ノックダウン KB 細胞においても FA-M- β -CyD の取り込みが抑制された。これらの結果より、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に、FR- α を介した細胞選択的な取り込みの関与が強く示唆された。

これまで我々は、M- β -CyD は細胞形質膜上のリピッドラフトからコレステロールを漏出させることにより、DNA 含量およびミトコンドリア膜電位を低下させ、アポトーシスを誘導することを明らかにした。一方、FA-M- β -CyD は FR- α の発現の有無に関わらず、DM- β -CyD および M- β -CyD よりも高いコレステロール漏出作用を示した。しかし、興味深いことに KB 細胞において FA-M- β -CyD は DNA 含量を低下させず、ミトコンドリア膜電位の顕著な上昇を誘導した。さらに、FA-M- β -CyD はカスパーゼ-3/7 の活性化も誘導しなかったことから、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性はアポトーシス非依存的経路を介することが強く示唆された。また、前述したように、FA-M- β -CyD は FR- α 低発現細胞である A549 細胞においても優れたコレステロール漏出効果を示したが、抗腫瘍活性はほとんど認められなかった。これらの結果より、FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性に対する細胞形質膜との相互作用の寄与は低いものと考えられる。

オートファジーとは、細胞内成分が二重膜によって周囲から隔離され、リソソームと融合することによって消化される細胞内浄化機構である。オートファジーは、定常状態の細胞では軽度活性化されており、細胞構成成分を少しずつ分解することにより細胞の新陳代謝に貢献している。一方、細胞に何らかの刺激が加わると、これに対応するために大規模なオートファジーが誘導される。本研究において、FA-M- β -CyD は KB 細胞においてオートファゴソームを形成すること、また、オートファジー阻害剤であるクロロキンやバフィロマイシン A₁ の前処理によって、その抗腫瘍活性が著しく減弱したことが

ら、FA-M- β -CyD はオートファジーを誘導することが強く示唆された。FA-M- β -CyD によるオートファジーの誘導は、前述したように、ミトコンドリア膜電位の上昇に示されるストレスに起因するものと推察される。近年、ミトコンドリア膜にもリピッドラフトが存在しており、ミトコンドリアの機能や細胞死を制御していることが報告された。また、Ziolkowski らはラット肝臓から回収したミトコンドリアを M- β -CyD で処理すると、リピッドラフトからコレステロールが漏出され、ミトコンドリアのエネルギー代謝や膨潤などの形態学的変化が抑制されることを明らかにした。さらに、ミトコンドリア外膜のリピッドラフトには、膜電位を調節する VDAC が局在しており、pore の開閉を調節してミトコンドリアと細胞質間の ATP や呼吸基質などの物質輸送を行っている。これらの報告より、細胞膜上の FR- α を介して細胞内に取り込まれた FA-M- β -CyD は、何らかの方法でエンドソームを脱出した後、ミトコンドリアのリピッドラフトからコレステロールを漏出させることにより、そのエネルギー代謝や膜電位調節機能を破綻させ、オートファジーを誘導した可能性が考えられる。一方、M- β -CyD は細胞内にほとんど取り込まれないために、細胞形質膜からのコレステロールの漏出を介してアポトーシス誘導へと向かうが、ミトコンドリア膜とは相互作用できず、オートファジーを誘導しなかったものと推察される。

近年、ミトコンドリアはアポトーシスの制御のみならずオートファジー様細胞死誘導にも関わるということが明らかとなっている。ミトコンドリアの品質管理としては、1) プロテアーゼによるミトコンドリア内タンパク質の分解、2) ミトコンドリアそのものの分解、3) ミトコンドリアのダイナミックな分裂と融合による不良なミトコンドリアの隔離、などが知られている。なかでも、ミトコンドリアそのものを分解する経路として、ミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーが報告されている。今回、FA-M- β -CyD 処理により形成されたオートファゴソームとミトコンドリアは一部共局在したことから、マイトファジーの関与が示唆された。近年、Narendra らは、Parkin および PTEN-induced putative kinase protein 1 (PINK-1) が異常なミトコンドリア外膜に結合し、マイトファジーを誘導することを報告している。また、神吉らはミトコンドリア外膜タンパク質である Atg32 が、マイトファジーの基質として必須であることを明らかにしている。今後、Parkin や PINK-1、Atg32 の発現や機能

に及ぼす FA-M- β -CyD の影響を詳細に検討する必要がある。

Colon-26 細胞 (FR- α (+)) を同種移植した BALB/c マウスおよび M213 細胞 (FR- α (+)) または Ihara 細胞 (FR- α (+)) を異種移植した BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスに FA-M- β -CyD を静脈内に単回投与したところ、腫瘍の成長を有意に抑制し、マウスの生存率を著しく改善することが明らかとなった。本実験で使用した BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスは、岡田らによって開発された、成熟 T 細胞、B リンパ球のみならず NK 細胞も欠失した高度免疫不全マウスであり、異種移植モデルマウスとして有用である。今回、FA-M- β -CyD は同種移植した担がんマウスのみならず、ヒト由来 M213 細胞 (FR- α (+)) または Ihara 細胞 (FR- α (+)) を異種移植した BALB/c Rag-2/Jak3 KO マウスに対しても、優れた抗腫瘍効果を示したことから、今後、臨床試験への応用が期待される。また、*in vitro* における結果より、FA-M- β -CyD による *in vivo* 抗腫瘍活性は、FR- α を介してがん細胞に効率良く取り込まれ、細胞死を誘導したものと推察される。近年、Chauhan らは粒子径 12 nm のナノメディスンが、粒子径 125 nm のナノ粒子と比較してより腫瘍深部まで到達可能であり、がん治療において有用であることを報告している。今回、データとして示さなかったが、FA-M- β -CyD の粒子径は 10 nm 以下であることを確認していることから、FA-M- β -CyD は優れた腫瘍集積性を有するものと考えられる。安全性に関することとして、FA-M- β -CyD は静脈内投与後の血液生化学的パラメータにほとんど影響を与えず、溶血活性が低いこと、局所刺激性は認められなかった。一方、M- β -CyD は担がんマウスに静脈内投与後、障害性を惹起することが示唆された。これらの結果から、FA-M- β -CyD は FA を修飾したことにより、腫瘍細胞選択性が上昇し、副作用の発現が抑制されたものと推察される。また、FA-M- β -CyD は FR- α を介して細胞内に取り込まれ細胞障害活性を示すが、血球細胞では FR- α よりも FR- β が高発現しているため、副作用をほとんど示さなかったものと考えられる。今後、*in vivo* での FA-M- β -CyD によるオートファジーおよび様々ながん腫に対する FA-M- β -CyD の抗腫瘍活性や安全性試験に関する検討を行う必要がある。

以上、本研究で得られた知見より、FA-M- β -CyD は、1) 細胞形質膜上の FR- α を介して CLIC/GEEC 経路により細胞内に取り込まれた後、エンドソーム (GEEC) から脱出し、

2) ミトコンドリア膜のリピッドラフトに作用し、その膜電位を上昇させることでストレスを誘導し、3) オートファゴソームの形成およびマイトファジーを介した優れた抗腫瘍活性を示したものと考えられる。

E. 結論

FA-M- β -CyD は、*in vitro* および *in vivo* において FR- α 高発現細胞選択的抗がん剤として有用であり、その抗腫瘍効果に FR- α を介したがん細胞選択的な取り込みおよびオートファジーの関与が示唆された。

F. 健康危険情報

本研究を通じて、健康危険に関する情報は特に得られていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Potential Use of Folate-appended Methyl- β -Cyclodextrin as an Anticancer Agent, R. Onodera, K. Motoyama, A. Okamatsu, T. Higashi, H. Arima, *Sci. Rep.*, 3, 1104, 1-9 (2013).

Involvement of Cholesterol Depletion from Lipid Rafts in Apoptosis Induced by Methyl- β -cyclodextrin., R. Onodera, K. Motoyama, A. Okamatsu, T. Higashi, R. Kariya, S. Okada, H. Arima., *Int. J. Pharm.*, 452, 116-123 (2013).

Involvement of Autophagy in Antitumor Activity of Folate-appended Methyl- β -cyclodextrin., R. Onodera, K. Motoyama, N. Tanaka, A. Ohyama, A. Okamatsu, T. Higashi, R. Kariya, S. Okada, H. Arima., *Sci. Rep.*, 4, 4417, 1-8 (2014).

2. 学会発表

- 1) 小野寺理沙子, 岡松文香, 本山敬一, 東大志, 有馬英俊, 葉酸修飾メチル化 β -シクロデキストリンの抗腫瘍活性および細胞死誘導機構, 日本薬剤学会第 27 年会 (神戸, 5/24-26, 2012)
- 2) 本山敬一, 小野寺理沙子, 岡松文香, 東大志, 有馬英俊, 腫瘍細胞選択的新規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細胞死誘導機構, 第 28 回日本 DDS 学会 (札幌, 7/4-5, 2012)

- 3) 本山敬一, 小野寺理沙子, 岡松文香, 谷吉雅俊, 東大志, 有馬英俊, 葉酸修飾メチル β -シクロデキストリンの高い抗腫瘍効果におけるオートファジーの関与, 第 29 回シクロデキストリンシンポジウム (東京, 9/6-7, 2012)
- 4) 小野寺理沙子, 岡松文香, 本山敬一, 東大志, 有馬英俊, 葉酸修飾メチル化シクロデキストリンの抗腫瘍活性に及ぼすオートファジーの関与, 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (京都, 11/14-15, 2012)
- 5) 小野寺理沙子, 岡松文香, 本山敬一, 東大志, 有馬英俊, オートファジー細胞死を誘導する新規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, 日本薬学会第 133 年会, パシフィコ横浜 (横浜, 3/27-30, 2013)
- 6) 有馬英俊, 小野寺理沙子, 岡松文香, 本山敬一, 東大志, 刈谷龍昇, 岡田誠治, 葉酸受容体指向性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, 日本応用糖質科学会平成 25 年度大会, (鹿児島, 9/25-27, 2013)
- 7) 本山敬一, 小野寺理沙子, 岡松文香, 谷吉雅俊, 東大志, 有馬英俊, 腫瘍細胞選択的抗がん剤としての葉酸修飾シクロデキストリンの有用性評価, 第 30 回シクロデキストリンシンポジウム (熊本, 9/12-9-13, 2013)
- 8) 本山敬一, 小野寺理沙子, 岡松文香, 東大志, 有馬英俊, 新規抗がん剤としての葉酸修飾メチル化シクロデキストリンの細胞死誘導機構の解明, 第 29 回日本 DDS 学会学術集会 (京都, 7/4-7/5, 2013)
- 9) 本山敬一, 小野寺理沙子, 岡松文香, 東大志, 有馬英俊, オートファジー細胞死を誘導する葉酸修飾メチル- β -シクロデキストリンの抗腫瘍活性評価, 日本薬剤学会第 28 年会 (愛知, 5/23-5/25, 2013)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

名称: 腫瘍細胞選択的抗がん剤
発明者: 有馬英俊, 本山敬一, 東大志
種類: 発明特許
番号: 特願 2012-117205
出願年月日: 平成 24 年 5 月 23 日
国内外の別: 国内

2. 実用新案登録

なし

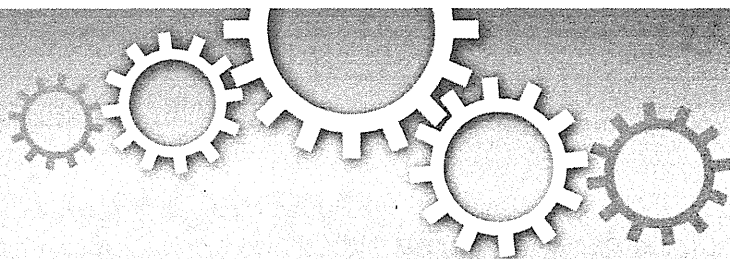
3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--|-----|---------|------|
| R. Onodera, K. Motoyama, A. Okamatsu, T. Higashi, H. Arima | Potential Use of Folate-Appended Methyl- β -Cyclodextrin as an Anticancer Agent | Scientific Reports | 3 | 1-9 | 2013 |
| 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 | International Journal of Pharmaceutics | 452 | 116-123 | 2013 |
| R. Onodera, K. Motoyama, N. Tanaka, A. Ohyama, A. Okamatsu, T. Higashi, R. Kariya, S. Okada, H. Arima | Involvement of Autophagy in Antitumor Activity of Folate-Appended Methyl- β -cyclodextrin | Scientific Reports | 4 | 1-8 | 2014 |



Potential use of Folate-appended Methyl- β -Cyclodextrin as an Anticancer Agent

Risako Onodera, Keiichi Motoyama, Ayaka Okamatsu, Taishi Higashi & Hidetoshi Arima

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan.

SUBJECT AREAS:
DRUG DEVELOPMENT
TARGETED THERAPIES
CHEMOTHERAPY
CANCER IMMUNOTHERAPY

Received
27 September 2012

Accepted
10 December 2012

Published
22 January 2013

Correspondence and
requests for materials
should be addressed to
H.A. (arimah@gpo.
kumamoto-u.ac.jp)

To obtain a tumor cell-selectivity of methyl- β -cyclodextrin (M- β -CyD), we newly synthesized folate-appended M- β -CyD (FA-M- β -CyD), and evaluated the potential of FA-M- β -CyD as a novel anticancer agent *in vitro* and *in vivo*. Potent antitumor activity and cellular association of FA-M- β -CyD were higher than those of M- β -CyD in KB cells, folate receptor (FR)-positive cells. FA-M- β -CyD drastically inhibited the tumor growth after intratumoral or intravenous injection to FR-positive Colon-26 cells-bearing mice. The antitumor activity of FA-M- β -CyD was comparable and superior to that of doxorubicin after both intratumoral and intravenous administrations, respectively, at the same dose, in the tumor-bearing mice. All of the tumor-bearing mice after an intravenous injection of FA-M- β -CyD survived for at least more than 140 days. Importantly, an intravenous administration of FA-M- β -CyD to tumor-bearing mice did not show any significant change in blood chemistry values. These results strongly suggest that FA-M- β -CyD has the potential as a novel anticancer agent.

Chemotherapy is often used to treat cancer, and it is expected to destroy the tumor cells for maximum treatment efficacy, while minimizing side effects to other organs¹. However, conventional anticancer agents often have some unexpected limitations such as poor distribution, tissue damage, and lack of target specificity. In order to overcome these problems, the drug delivery technique to tumor cells has attracted considerable attention. To give an active targeting-ability to a drug carrier, chemical modification by tumor targeting ligands is known, e.g. antibody²⁻⁵, sugar⁶, folic acid (FA)⁷⁻¹¹, transferrin¹²⁻¹⁴, epidermal growth factor^{15,16}, and Arg-Gly-Asp-Ala-Pro-Arg-Pro-Gly peptide¹⁷.

Recently, FA has emerged as a prominent targeting moiety capable of specific interaction with cells expressing the folate receptor (FR)¹⁸. FR consists of a high affinity folate binding protein (FBP) (K_d : 10^{-9} – 10^{-10} M) and is attached to the plasma membrane through a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor¹⁹. FR is overexpressed in many human tumor cells, including malignancies of the ovary, brain, kidney, breast, myeloid cells and lung, and has little expression in normal tissues^{9,20-22}. This overexpression of FR provides tumor cells with increased amounts of the FA essential for DNA synthesis, and seems to aid in aggressive tumor growth. In patients diagnosed with cancer, the overexpression of FR isoform α (FR- α) correlates with a higher histological grade and more advanced stage of the disease²³. Therefore, FR is one of the strongest candidates, both as an attractive marker and a target molecule for diagnosis and therapy of cancer²⁴.

Cyclodextrins (CyDs) and their hydrophilic derivatives form inclusion complexes with hydrophobic molecules. CyDs can improve the solubility, dissolution rate and bioavailability of the drugs, and so the widespread use of CyDs is well known within the pharmaceutical field^{25,26}. CyDs have been reported to interact with cell membrane constituents such as cholesterol and phospholipids, resulting in the induction of hemolysis of human and rabbit red blood cells at high concentrations of CyDs²⁷⁻²⁹. Additionally, methyl- β -cyclodextrin (M- β -CyD) is acknowledged to disrupt the structures of lipid rafts and caveolae^{30,31}, which are lipid microdomains formed by lateral assemblies of cholesterol and sphingolipids in the cell membrane, through the extraction of cholesterol from the microdomains³². Furthermore, we demonstrated that 2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin (DM- β -CyD) induced apoptosis through the inhibition of PI3K-Akt-Bad pathway, leading to cholesterol depletion from lipid rafts in NR8383 cells, a rat alveolar macrophage cell line³³. Notably, Grosse *et al.* reported that intraperitoneal administration of M- β -CyD showed signs of antitumor activity in human tumor xenografted athymic nude mice³⁴. However, parenteral use of M- β -CyD is not allowed in humans³⁵, because the antitumor activity of M- β -CyD lacks tumor cell-selectivity.

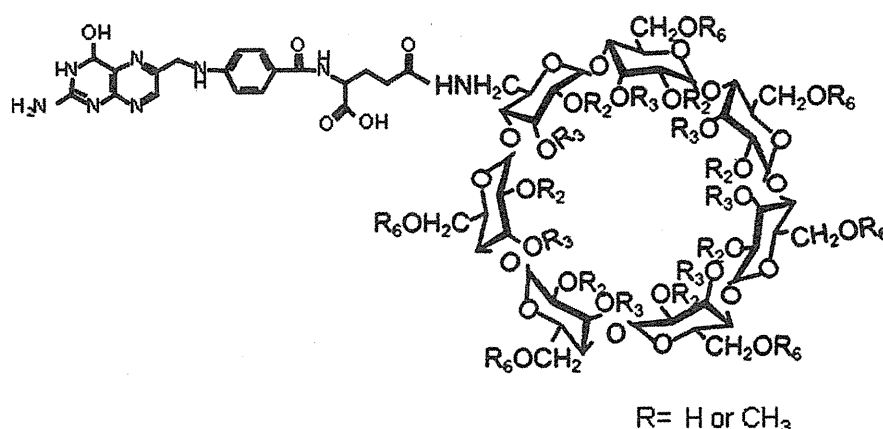


Figure 1 | Chemical structure of FA-M-β-CyD.

Most recently, in an attempt to confer a tumor-selective cytotoxic activity to M-β-CyD, we newly synthesized folate-appended M-β-CyD (FA-M-β-CyD, Fig. 1) having an average degree of substitution of FA (DSF) of 1.0³⁶. FA-M-β-CyD possesses several advantages as

an antitumor agent compared to antibody drugs: 1) the physico-chemical stability is high, 2) the pharmacokinetics after intravenous administration is rarely affected by serum proteins due to its low molecular weight compound, 3) the batch difference in bioactivity

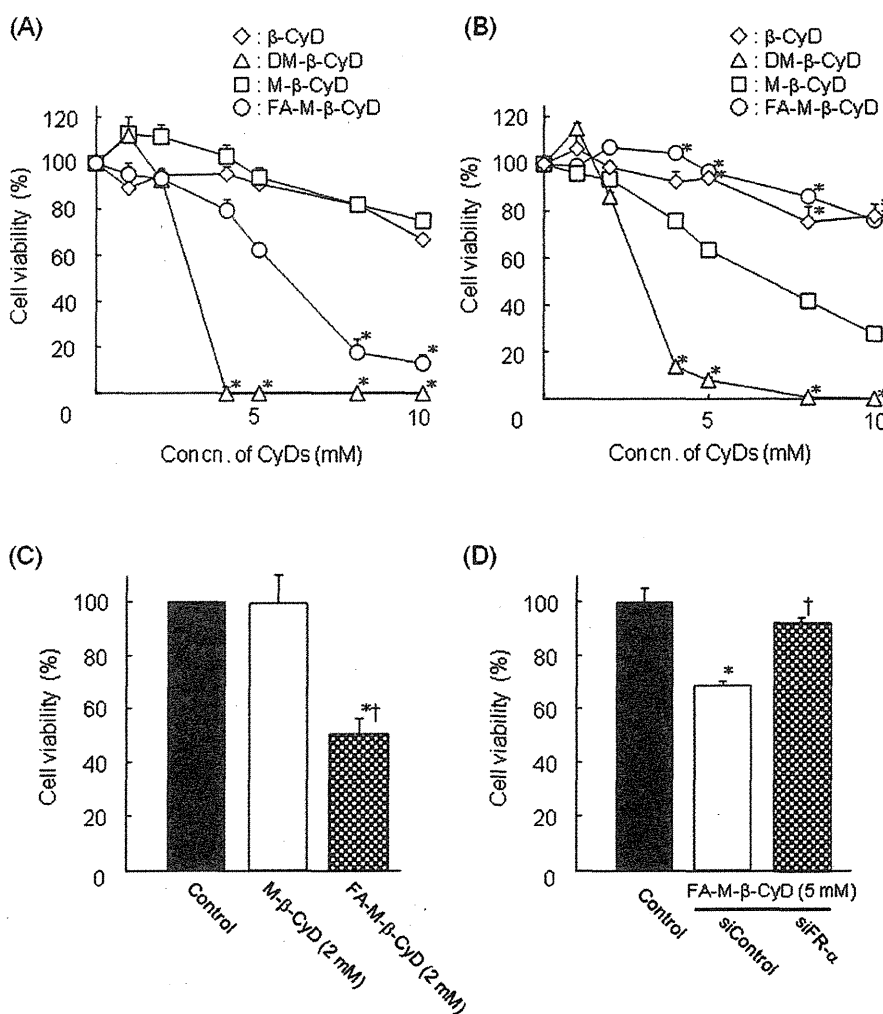


Figure 2 | Antitumor activity of β-CyDs. (A) KB cells, (B) A549 cells, (C) Colon-26 cells, (D) FR-knockdown KB cells. Each point and values represents the mean ± S.E.M. of 3 experiments. **p* < 0.05, compared with Control.

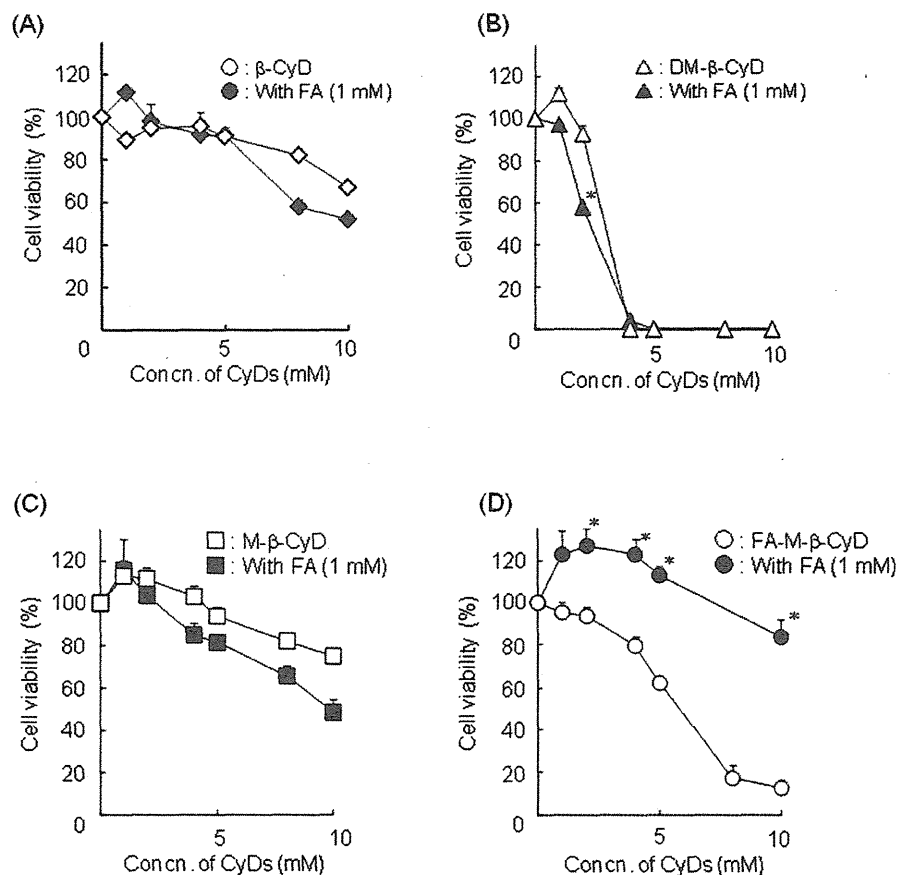


Figure 3 | Effect of FA on antitumor activity of β -CyDs for KB cells (FR (+)). KB cells were pretreated with 1 mM of FA for 1 h, and then incubated with β -CyDs (0–10 mM) and FA (1 mM) for 2 h. Each point represents the mean \pm S.E.M. of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared with β -CyDs.

does not occur as it is a chemically synthesized product, and 4) the cost performance is superior to that of biosynthesis products. However, the tumor cell-specific cytotoxic activity of FA-M- β -CyD *in vitro* and *in vivo* still remains unclear. Therefore, in the present study, we investigated whether FA-M- β -CyD provides the FR-expressing cell-selective antitumor activity and its safe profile *in vitro* and *in vivo* or not.

Results

Antitumor activity of FA-M- β -CyD. To clarify the FR-selective antitumor activity of FA-M- β -CyD (Fig. 1), we evaluated antitumor activity of FA-M- β -CyD in KB cells, FR-positive cells, and A549 cells, FR-negative cells. FA-M- β -CyD displayed potent antitumor activity, compared to M- β -CyD in KB cells (Fig. 2A), but not in A549 cells (Fig. 2B). In contrast, DM- β -CyD showed significant antitumor activity in both KB cells and A549 cells (Fig. 2). Additionally, in Colon-26 cells (FR-positive), FA-M- β -CyD showed potent antitumor activity, compared to M- β -CyD (Fig. 2C). Meanwhile, the antitumor activity of FA-M- β -CyD was significantly attenuated in FR knockdown-KB cells produced by treatment with FR- α siRNA (Fig. 2D). These results suggest that FA-M- β -CyD has FR-expressing cell-selective antitumor activity.

Next, we investigated the effect of FA, as a competitor of FR, on antitumor activity of β -CyDs in KB cells. The antitumor activity of FA-M- β -CyD, but not β -CyD, M- β -CyD or DM- β -CyD, was significantly inhibited by the addition of FA (Fig. 3). These results suggest the occurrence of FR-mediated antitumor activity of FA-M- β -CyD.

Effects of M- β -CyDs on caspase 3/7 activity. Activation of caspase 3/7 is considered an essential event during apoptosis. To investigate whether FA-M- β -CyD-induced cell death is accompanied by apoptotic feature, we next examined the caspase 3/7 activity in KB cells after treatment with CyDs using the CellEvent[®] Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Fig. 4). This caspase 3/7 detection reagent is intrinsically non-fluorescent as the DEVD peptide inhibits the ability of the dye to bind to DNA. However, after activation of caspase 3/7 in apoptotic cells, the DEVD peptide is cleaved and enabled the dye to bind to DNA and produce a bright, fluorogenic response. Treatment of KB cells with DM- β -CyD, but not M- β -CyD or FA-M- β -CyD, for 2 h, caused caspase-3/7 activation (Fig. 4). These results suggest that FA-M- β -CyD caused cell death in KB cells in an apoptosis-independent pathway.

Cellular association of FA-M- β -CyD. To gain insight into the mechanism for the FR-mediated antitumor activity of FA-M- β -CyD, we examined the cellular association of FA-M- β -CyD after treatment for 1 h with KB cells and A549 cells (Fig. 5). In contrast to the general belief that CyDs are unable to enter cells, the cellular association of FA-M- β -CyD with KB cells was significantly higher than that with A549 cells (Fig. 5A). As expected, M- β -CyD was only very slightly associated with KB cells (Fig. 5B). These results suggest that cellular association of FA-M- β -CyD could be mediated by FR on KB cells.

Effects of β -CyDs on cholesterol efflux from tumor cells. Lipid rafts are mainly composed of cholesterol and sphingolipids in the cell membranes, and contain various signal transduction molecules

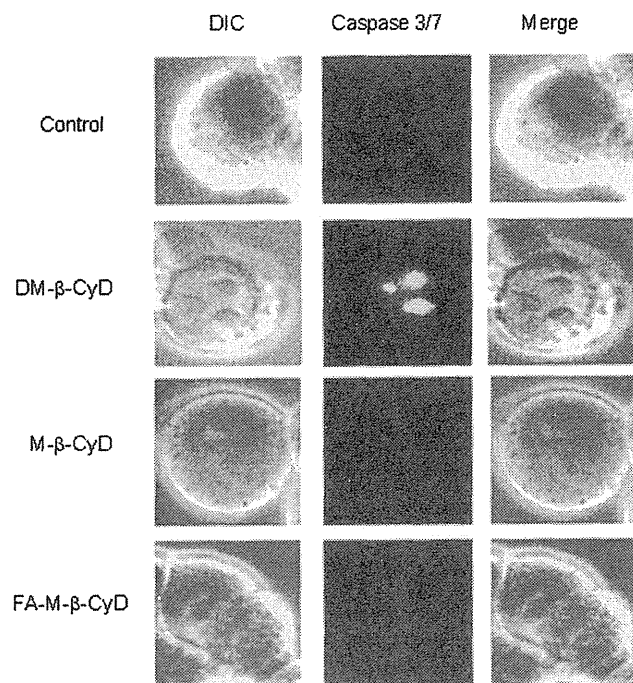


Figure 4 | Effects of M- β -CyDs on the caspase 3/7 activity in KB Cells (FR (+)). KB cells were treated with M- β -CyDs (5 mM) for 2 h, and then the cells were treated with caspase 3/7 detection kit. The experiments were performed independently three times, and representative images are shown.

including growth factor receptors³⁷. We previously reported that CyDs showed hemolytic activity at high concentration through the extraction of cell membrane components such as cholesterol and phospholipids from lipid rafts^{27,29}. Furthermore, we demonstrated that DM- β -CyD induces apoptosis through cholesterol depletion in NR8383 cells, a rat alveolar macrophage cell line³³. Therefore, to reveal whether cell death induced by FA-M- β -CyD is apoptosis through cholesterol depletion in FR-positive cells, we investigated the effects of CyDs on the release of cholesterol from KB cells and A549 cells. The amount of cholesterol released in the culture medium after incubation with 5 mM CyDs for 1 h was determined by Cholesterol-test Wako[®] (Fig. 6). The extent of cholesterol extracted by treatment with FA-M- β -CyD was significantly higher than that with β -CyD, M- β -CyD and DM- β -CyD in KB cells (Fig. 6A). Similar results were observed in A549 cells (Fig. 6B), although FA-M- β -CyD did not display antitumor activity under the same conditions. Furthermore, we confirmed that FA-M- β -CyD reduced in neither DNA content nor mitochondrial transmembrane potential in KB cells (manuscript in preparation). Taken together, these results suggest that the extraction ability of FA-M- β -CyD on cholesterol from plasma membranes is not associated with antitumor activity, and the mechanism of antitumor activity of FA-M- β -CyD is not apoptosis in KB cells.

Hemolytic activity. As described above, FA-M- β -CyD extracted cholesterol from plasma membranes of KB cells, which suggests high hemolytic activity. One of the most substantial requirements for drugs is that they have either no or acceptably low levels of local irritancy. The studies with isolated rabbit red blood cells (RRBC), which have no nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum or other organelles, may provide a simple and reliable measure to determine the local irritancy induced by CyDs. Therefore, we investigated hemolytic activity of FA-M- β -CyD in order to estimate its local irritation. Herein, RRBC do not express FR on

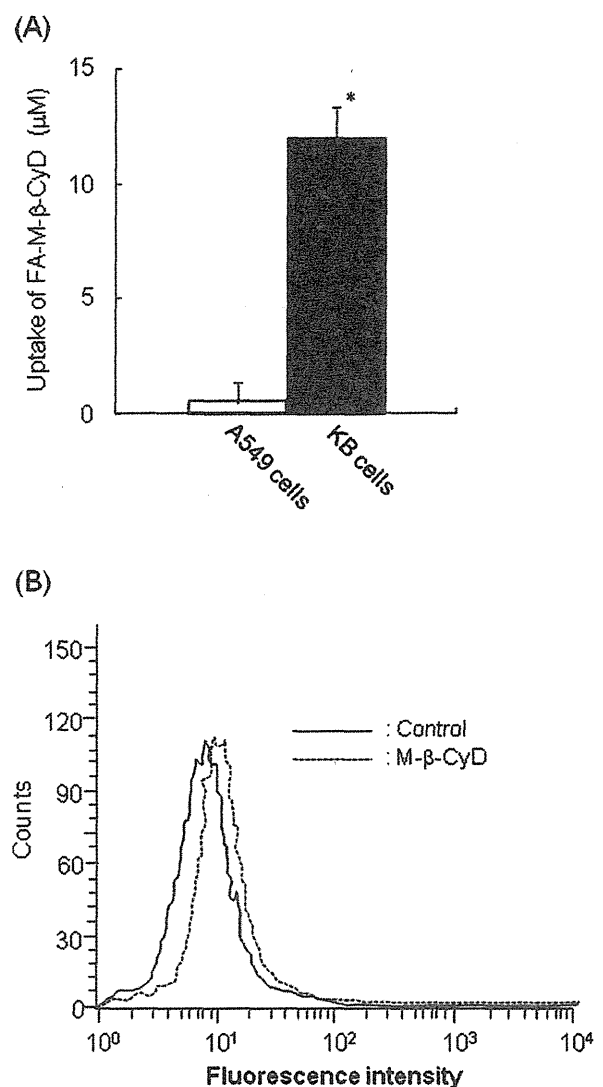


Figure 5 | Cellular association of FA-M- β -CyD and TRITC-M- β -CyD. (A) Cells were incubated with FA-M- β -CyD for 1 h. The concentration of FA-M- β -CyD associated with cells was determined by a fluorescence spectrophotometer. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 3–4 experiments. * p < 0.05, compared with A549 cells. (B) KB cells were incubated with TRITC-M- β -CyD for 1 h. The fluorescence intensity of TRITC associated with KB cells was determined by a flow cytometer.

plasma cell membranes. Figure 7 shows hemolytic profiles of β -CyD, M- β -CyD, DM- β -CyD and FA-M- β -CyD. It is apparent that the hemolytic activity of FA-M- β -CyD was weaker than those of β -CyD, M- β -CyD and DM- β -CyD. For example, the hemolysis onset at about 0.5 mM, 1 mM, 3 mM and 8 mM, and the concentrations to induce 50% hemolysis were about 1.3 mM, 3.5 mM, 5.7 mM and 10.9 mM for DM- β -CyD, M- β -CyD, β -CyD and FA-M- β -CyD, respectively. These results suggest that local irritancy of FA-M- β -CyD is quite low.

Antitumor Activity of FA-M- β -CyD in tumor-bearing mice. To investigate antitumor activity of FA-M- β -CyD *in vivo*, we injected FA-M- β -CyD solution intratumorally or intravenously to tumor-bearing mice. Herein, we confirmed that Colon-26 cells express FR using a RT-PCR method. As shown in Fig. 8A, an intratumoral injection of the FA-M- β -CyD at a dose of 30 mg/kg significantly inhibited the tumor growth, compared to that of control (5%

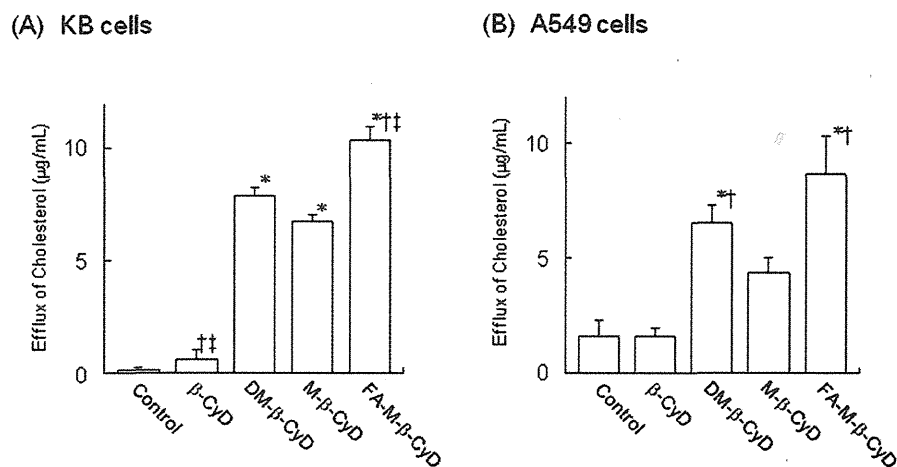


Figure 6 | Effects of β -CyDs on efflux of cholesterol from KB cells (FR (+)) and A549 Cells (FR (-)). (A) KB cells and (B) A549 cells were incubated with β -CyDs (5 mM) for 1 h. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 4–5 experiments. * $p < 0.05$, compared with control. † $p < 0.05$, compared with M- β -CyD. ‡ $p < 0.05$, compared with DM- β -CyD.

mannitol solution). The similar results of the inhibitory effects on tumor growth were observed in both the doxorubicin and the M- β -CyD systems. To make sure there were no side effects, the body weight of mice after an intratumoral injection of FA-M- β -CyD or M- β -CyD was slightly increased as the time passed (Fig. 8B). However, in the doxorubicin system, the body weight of mice did not increase up to 30 days after intratumoral injection, probably due to the side effects of doxorubicin (Fig. 8B). These results suggest that FA-M- β -CyD has the potent antitumor activity after intratumoral injection to tumor-bearing mice with less systemic side effect.

Next, we investigated the effects of an intravenous injection of FA-M- β -CyD (5 mg/kg) to tumor-bearing mice on tumor growth, body weight change and survival rate (Fig. 9). As shown in Figure 9A, an intravenous injection of doxorubicin or M- β -CyD slightly suppressed the tumor growth. Remarkably, FA-M- β -CyD drastically inhibited the tumor growth after an intravenous injection (Fig. 9A). Furthermore, the tumor inoculated subcutaneously completely disappeared after treatment with FA-M- β -CyD (Fig. 9B). Surprisingly, all of the tumor-bearing mice after intravenous injection of FA-M- β -CyD survived for at least 140 days without any relapse,

while the mice treated with doxorubicin and M- β -CyD died of sickness within 70 days (Fig. 9C). Additionally, the body weight of mice after an intravenous injection of FA-M- β -CyD was increased slightly as the time passed, suggesting that FA-M- β -CyD does not have any significant side effect (Fig. 9D). In terms of blood chemistry data, doxorubicin tended to elevate the alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) values, and M- β -CyD significantly increased blood urea nitrogen (BUN), aspartate aminotransferase (AST) and LDH levels, compared to control, suggesting induction of systemic side effects of doxorubicin and M- β -CyD. Strikingly, no significant changes in the blood chemistry values such as creatinine (CRE), BUN, AST, ALT and LDH were observed 24 h after an intravenous injection of FA-M- β -CyD, compared to control (5% mannitol solution) at the same dose as doxorubicin and M- β -CyD (Table 1). These results strongly suggest that FA-M- β -CyD has the potential as a novel antitumor agent with negligible systemic side effects even after intravenous injection.

Discussion

In the present study, we revealed that FA-M- β -CyD showed a FR-expressing cell-selective *in vitro* antitumor activity through FR-mediated endocytosis. In addition, FA-M- β -CyD had great inhibitory effects on tumor growth after both intratumoral and intravenous injections to FR-positive tumor cells-bearing mice, without any significant change in blood chemistry values.

Having targeting ability is one of the most important factors for antitumor agents to provide not only potent antitumor activity but also to reduce side effects for cancer treatment. FA-M- β -CyD showed FR-expressing cell-selective antitumor activity. In fact, FA-M- β -CyD elicited cytotoxic activity to KB cells rather than A549 cells (Fig. 2). In addition, the antitumor activity of FA-M- β -CyD was significantly inhibited by the addition of FA, suggesting that FR-mediated endocytosis is important for the induction of antitumor activity by FA-M- β -CyD (Fig. 3). GPI-anchored proteins including FR were acknowledged to be endocytosed through clathrin-independent carrier/GPI-anchored proteins enriched early endosomal compartment (CLIC/GEEC)³⁸. Therefore, FA-M- β -CyD may be endocytosed through CLIC/GEEC after the recognition by FR on KB cells. Three isoforms of the FR, FR- α , FR- β and FR- γ , have been identified and cloned to date. The FR- α levels are high in specific malignant tumors of epithelial origin, compared to normal cells, and are positively associated with tumor stage and grade^{23,39}. Generally, FR- α recognizes the α -carboxy group of folate and internalizes folate

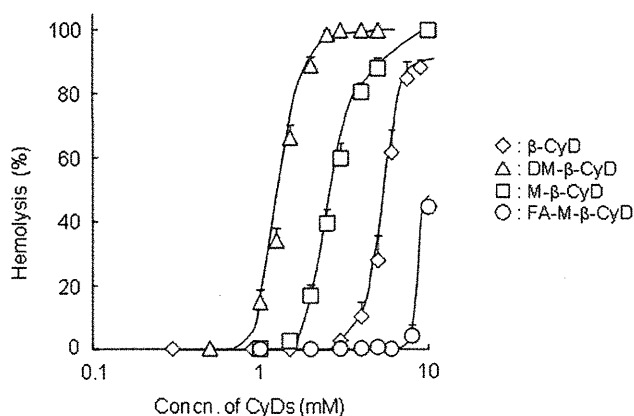


Figure 7 | Hemolytic activity of β -CyDs on RRBC. The RRBC suspension (0.1 mL) was added to the PBS (pH 7.4, 1 mL) containing β -CyDs at various concentrations. The mixture was incubated for 30 min at 37°C. The release of hemoglobin from the RRBC was determined by a UV spectrophotometer at 543 nm. Each point represents the mean \pm S.E.M. of 3 experiments.

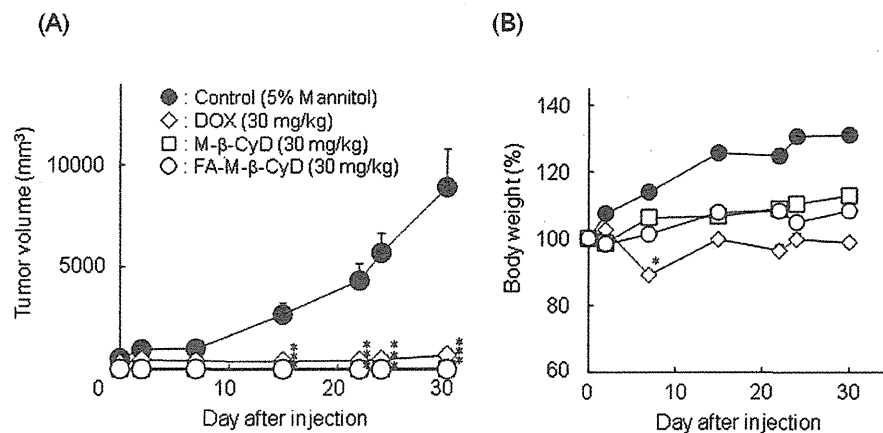


Figure 8 | Effects of intratumoral administration of FA-M-β-CyD on tumor growth (A) and body weight (B) in tumor-bearing mice. Each point represents the mean \pm S.E.M. of 3–14 experiments. * $p < 0.05$, compared with control (5% mannitol solution).

to confer a growth advantage to the tumor⁴⁰. Recently, Guaragna *et al.* demonstrated that the conjugation of anticancer agent chlorambucil to γ -carboxy group of FA via suitable linkers enhanced the selective drug delivery to the FR-expressing tumor cells⁴¹. Furthermore, we previously reported that FA-M-β-CyD was synthesized by a condensation reaction between γ -carboxy group of FA and amino group of NH₂-M-β-CyD³⁶. Therefore, it is suggested that the α -carboxy group of FA in FA-M-β-CyD is recognized by FR- α in KB cells (FR-positive) and internalized by CLIC/GEEC endocytosis. In

fact, the cellular association of FA-M-β-CyD with KB cells was significantly higher than that with A549 cells (FR-negative) (Fig. 5A), strongly suggesting the potential of FA-M-β-CyD as a FR-expressing cell-selective anticancer agent. However, further elaborate studies on cellular uptake of FA-M-β-CyD are required using FR- α -deficient KB cells.

In spite of the impressive treatment developed, few options for cancer cells are available. A number of promising agents with multiple mechanisms of action are under investigation. Recent

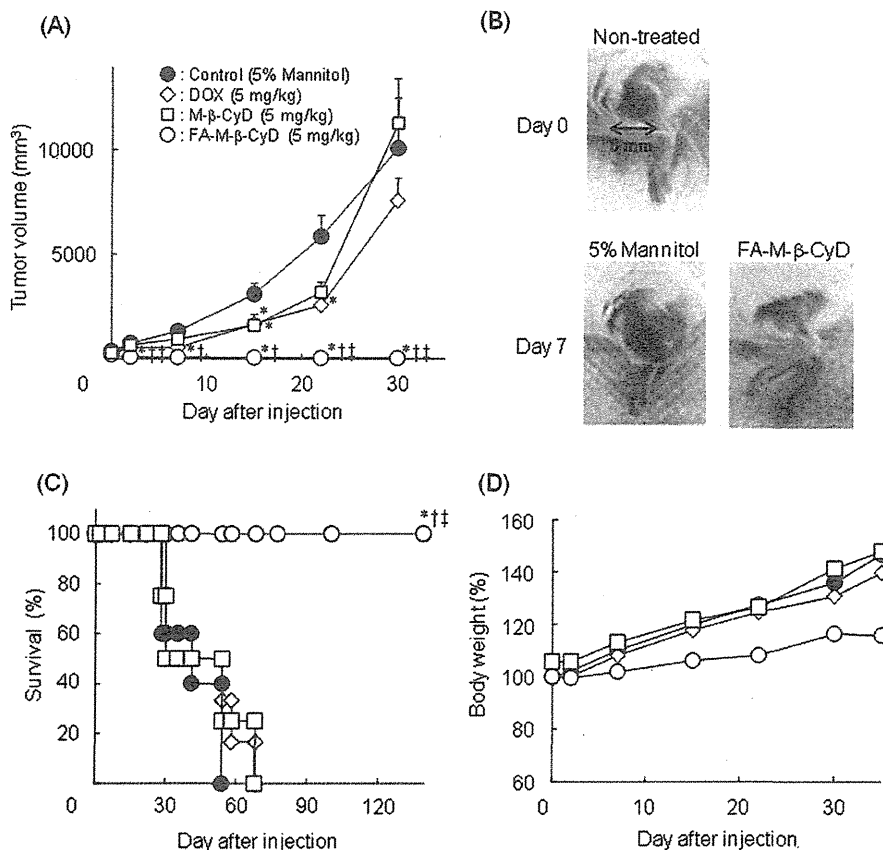


Figure 9 | Effects of intravenous administration of FA-M-β-CyD on tumor growth (A, B), survival rate (C) and body weight (D) in tumor-bearing mice. Each point represents the mean \pm S.E.M. of 5 experiments. Each line represents the survival of 5–7 experiments. * $p < 0.05$, compared with control (5% mannitol solution). † $p < 0.05$, compared with doxorubicin. ‡ $p < 0.05$, compared with M-β-CyD.



Table 1 | Blood chemistry data after intravenous administration of doxorubicin and FA-M-β-CyD in BALB/c mice bearing tumor cells

| Formulation | CRE ^{a)} (mg/dL) | BUN ^{b)} (mg/dL) | AST ^{c)} (U/L) | ALT ^{d)} (U/L) | LDH ^{e)} (U/L) |
|-------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control | 0.1±0.00 | 18.5±2.23 | 51.6±4.78 | 17.4±1.33 | 488±25.03 |
| Doxorubicin | 0.1±0.02 | 19.9±1.00 [†] | 144.0±23.72 | 46.1±18.17 | 1120±206.43 |
| M-β-CyD | 0.1±0.00 | 26.2±1.71* | 189.6±36.07* | 28.0±6.13 | 1562±203.77* |
| FA-M-β-CyD | 0.1±0.02 | 17.0±2.70 [†] | 42.7±7.51 | 22.0±5.77 | 371±32.99 [†] |

a) Creatinine.

b) Blood urea nitrogen.

c) Aspartate aminotransferase.

d) Alanine aminotransferase.

e) Lactate dehydrogenase. Each value represents the mean±S.E.M. of 3–10 mice.

*p < 0.05, compared with control (5% mannitol solution).

†p < 0.05, compared with M-β-CyD.

studies exploring the cell death machinery have led to the discovery of alternative pathways for modulating cell death and also novel compounds inducing cancer cell demise⁴². Among cell death mechanisms, apoptosis plays essential roles in cell survival, growth and tumorigenesis⁴³. M-β-CyD is often used to disrupt lipid rafts because of its ability to deplete cholesterol stores on cell membranes^{30,31}. A number of studies have also demonstrated that the disruption of lipid rafts by M-β-CyD can harm cancer cells and cause cell death. In human epidermoid carcinoma cells, for example, cholesterol depletion by M-β-CyD induced apoptosis and caveolae internalization⁴⁴. Furthermore, we previously demonstrated that DM-β-CyD induced apoptosis through the inhibition of the PI3K-Akt-Bad pathway, leading to cholesterol depletion from lipid rafts in NR8383 cells³³. We also confirmed that DM-β-CyD induced apoptosis in KB cells (Fig. 4), probably due to the cholesterol depletion, leading to a decrease in not only DNA content but also mitochondrial transmembrane potential. In the present study, 5 mM FA-M-β-CyD released significant amount of cholesterol from KB cells and A549 cells to culture medium, compared to that of DM-β-CyD (Fig. 6). However, FA-M-β-CyD caused cell death without lowering the DNA content and mitochondrial transmembrane potential (manuscript in preparation) and also activation of caspase 3/7 (Fig. 4), indicating that cell death induced by FA-M-β-CyD in KB cells is not involved in apoptosis. Additionally, FA-M-β-CyD did not induce cell death in A549 cells even through its potent cholesterol depletion ability, compared to the other β-CyDs, under the present experimental conditions (Fig. 2B and Fig. 6). Meanwhile, M-β-CyD elicited apoptosis in A549 cells through not only lowering DNA content but also reducing mitochondrial transmembrane potential (Supplementary Fig. 1). Collectively, these results suggest that the extraction of cholesterol from plasma membranes by FA-M-β-CyD is not associated with the induction of cell death.

Most importantly, our most recent study demonstrated that FA-M-β-CyD induces autophagy, not apoptosis, in KB cells. That is, FA-M-β-CyD was found to elevate the expression of LC3-II, an autophagosome marker, in autophagic membranes in KB cells, through its FR-mediated cellular uptake (manuscript in preparation). An implication of this finding is that FA-M-β-CyD may be an antitumor drug with a curious mechanism. However, it still remains unclear whether FA-M-β-CyD affects the dephosphorylation and inactivation of mammalian target of rapamycin (mTOR), which induces autophagy, and the activation of class III PI3K, which is involved in autophagosome formation. Clearly, the present study needs to be followed by further studies on the mechanism of autophagy induced by FA-M-β-CyD.

It should be noted that the *in vivo* antitumor activity of FA-M-β-CyD was superior to that of M-β-CyD and doxorubicin after an intravenous injection to FR-positive Colon-26 cells-bearing mice (Fig. 9). Generally, the blood vessels of cancerous tumors are leaky^{45,46} and poorly organized^{47,48}. This can increase the interstitial fluid pressure inside tumors and reduce blood supply to them, which

impairs drug delivery^{49,50}. Most recently, Chauhan *et al.* reported that the nanomedicines (diameter, 12 nm) are ideal in cancer therapy due to their superior tumor penetration, rather than those with a larger size of nanoparticles (diameter, 125 nm)⁵¹. Herein, the particle size of FA-M-β-CyD was less than 10 nm, suggesting that FA-M-β-CyD could penetrate into interstitial space of tumor tissues via blood vessels of cancerous tumors after an intravenous injection. Following that, FA-M-β-CyD may actively enter tumor cells through FR-mediated endocytosis to exert potent antitumor effects. To validate the *in vitro* findings that FA-M-β-CyD can induce autophagy rather than apoptosis in FR-expressing tumor cells, further elaborate studies such as histological analysis such as TUNEL assay with immunohistochemistry and *in vivo* antitumor activity against FR-negative tumor cells-bearing mice are in progress.

Intriguingly, an intravenous administration of FA-M-β-CyD to Colon-26 cells-bearing mice did not show any significant change in blood chemistry values (Table 1). Grosse *et al.* reported that the intraperitoneal injections of M-β-CyD (800 mg/kg) once a week significantly suppressed tumor growth of MCF7 cells xenograft in nude mice, compared to those of doxorubicin (2 mg/kg)³⁴. However, due to the lack of target specificity, M-β-CyD may have the possibility to cause cytotoxicity not only to tumor cells but also to normal cells. Actually, the LDH value of M-β-CyD was significantly higher than that of control, suggesting the induction of the systemic side effects (Table 1). Furthermore, M-β-CyD was reported to be accumulated in the kidney³⁴, through glomerular filtration after intraperitoneal injection to tumor-bearing mice, resulting in risk of renal disorder. Actually, in the present study, M-β-CyD elevated the value of BUN 24 h after an intravenous injection, compared to control (Table 1). In sharp contrast, FA-M-β-CyD did not change the values of BUN and CRE, suggesting that pharmacokinetic profile of FA-M-β-CyD may differ somewhat from that of M-β-CyD. So, further elaborate study on pharmacokinetics of FA-M-β-CyD following intravenous administration is in progress. Besides, the hematological toxicity caused by FA-M-β-CyD after an intravenous administration is assumed to be low, because FA-M-β-CyD, which is recognized by FR-α through α-carboxy moiety of FA, does not appear to associate with hematopoietic cells expressing FR-β. Therefore, these lines of evidence make it tempting to speculate that FA-M-β-CyD provides the drastic antitumor activity *in vivo* with its high safety profiles.

In conclusion, in the present study, we evaluated the potential of FA-M-β-CyD as a novel anticancer agent *in vitro* and *in vivo*. FA-M-β-CyD displayed potent antitumor activity *in vitro*, compared to M-β-CyD in KB cells, FR-positive cells, but not in A549 cells, FR-negative cells. The cellular association of FA-M-β-CyD with KB cells was much higher than that with A549 cells. Furthermore, FA-M-β-CyD drastically inhibited tumor growth after an intratumoral or intravenous injection to tumor-bearing mice, compared to doxorubicin and M-β-CyD, without any significant change in blood chemistry values after an intravenous administration. These results strongly suggest that FA-M-β-CyD has the potential as a novel antitumor agent.



Methods

Materials. β -CyD was donated by Nihon Shokuhin Kako (Tokyo, Japan). M- β -CyD with an average degree of substitution (DS) of methyl group of 12.2 was obtained from Junsei Chemical (Tokyo, Japan). DM- β -CyD was purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). FA was purchased from Nakalai Tesque (Kyoto, Japan). RPMI-1640 culture medium (FA-free) was purchased from GIBCO (Tokyo, Japan). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Nissui Pharmaceuticals (Tokyo, Japan) and Nichirei (Tokyo, Japan), respectively. Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) was obtained from Funakoshi (Tokyo, Japan). FR- α siRNA (sc-39969) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). LipofectamineTM2000 reagent was obtained from Invitrogen (Tokyo, Japan). Doxorubicin was donated by Daiichi Sankyo (Tokyo, Japan). All other chemicals and solvents were of analytical reagent grade, and deionized double-distilled water was used throughout the study.

Cell culture. A549 cells, a human lung epithelium cell line, and colon-26 cells, a mouse colon carcinoma cell line, were cultured as reported previously³⁶. KB cells, a human oral squamous carcinoma cell line, were grown in a RPMI-1640 culture medium (FA-free) containing penicillin (1×10^5 mU/mL) and streptomycin (0.1 mg/mL) supplemented with 10% FBS at 37°C in a humidified 5% CO₂ and 95% air atmosphere. FR knockdown KB cells were prepared by the transfection with the FR- α siRNA complex with LipofectamineTM2000.

In vitro antitumor activity. *In vitro* antitumor activity was assayed by the WST-1 method (a Cell Counting Kit, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), as reported previously^{52,53}. Briefly, KB, A549 and Colon-26 cells were seeded at 2×10^4 cells onto 96-well microplate (Iwaki, Tokyo, Japan), and FR knockdown KB cells were seeded at 1×10^5 cells onto 24-well microplate (Iwaki, Tokyo, Japan), and then incubated for 24 h in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C. Cells were washed twice with RPMI-1640 culture medium (FA-free), and then incubated with 150 μ L of RPMI-1640 culture medium (FA-free) containing 0–10 mM β -CyDs or Tween 20 for 2 h at 37°C. For the competition study, cells were pretreated with RPMI-1640 culture medium containing 1 mM FA for 1 h, and then incubated with RPMI-1640 culture medium containing 1 mM FA and 0–10 mM β -CyDs for 2 h. After washing twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) to remove β -CyDs, 100 μ L of fresh Hanks' balanced salt solution (HBSS, pH 7.4) and 10 μ L of WST-1 reagent were added to the plates and incubated for 30 min at 37°C. The absorbance at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm was measured with a microplate reader (Bio-Rad Model 550, Tokyo, Japan).

Activation of caspase 3/7. KB cells ($1 \times 10^5/35$ mm dish) were incubated with 5 mM M- β -CyDs for 2 h. After washing twice with 1 mL of RPMI-1640 (folic acid-free) medium to remove the samples, cells were added to 10 μ M CellEventTM Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen, Tokyo, Japan) and incubated at 37°C for 30 min. The cells were washed with RPMI-1640 (folic acid-free) medium twice, and added 1 mL of RPMI-1640 (folic acid-free) medium. The cells were observed by a fluorescence microscope (KEYENCE Biozero BZ-8000, Tokyo, Japan).

Cellular association of M- β -CyD. KB cells and A549 cells ($1 \times 10^5/35$ mm dish) were incubated with 1 mL of RPMI-1640 culture medium (FA-free) and DMEM, respectively, containing 10 μ M of TRITC-labeled M- β -CyD at 37°C for 1 h. After washing twice with 1 mL of PBS (pH 7.4) to remove the sample, and immediately scraped with 1 mL of PBS (pH 7.4). The cells were collected and filtered through nylon mesh. Data were collected for 1×10^4 cells on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (Becton-Dickinson, Mountain View, CA).

Cellular association of FA-M- β -CyD. KB cells ($1 \times 10^5/35$ mm dish) were incubated with 1 mL of RPMI-1640 culture medium (FA-free) containing 1 mM FA-M- β -CyD at 37°C for 1 h. After washing twice with 1 mL of PBS to remove the sample, cells were lysed by the addition of 1 mL of 1 N NaOH. The cellular association of FA-M- β -CyD was determined by a fluorescence spectrometry (Ex : 286 nm, Em : 350 nm, Hitachi F-4500, Tokyo, Japan).

Determination of cholesterol in the culture medium. KB cells or A549 cells ($1 \times 10^5/35$ mm dish) were incubated with 5 mM β -CyDs in RPMI-1640 culture medium (FA-free) or DMEM, respectively, at 37°C for 1 h. After centrifugation (10,000 rpm, 5 min) of the culture medium, the supernatant was recovered. Total cholesterol in the culture medium was determined using a Cholesterol-test Wako[®] (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan).

Hemolytic activity. RRBC were isolated from Japanese white male rabbits (Kyudo, Tosu, Japan) as described previously^{27,29}. Isolated RRBC were centrifuged at 3,000 rpm for 5 min, and washed three times with PBS (pH 7.4). Five percents of RRBC suspension in PBS were incubated with 2 mL of PBS (pH 7.4) containing β -CyDs at 37°C for 30 min. After centrifugation at 3,000 rpm for 10 min, the optical density of the supernatant was measured at 543 nm. The results were expressed as a percent of total hemolysis, which was obtained when RRBC were incubated in water only. All hemolytic assays were carried out on the same day of blood collection.

Evaluation of antitumor effect of FA-M- β -CyD. Four-weeks-old BALB/c male mice (ca. 20 g) were subcutaneously injected the suspension containing Colon-26 cells (5×10^5 cells/100 μ L), FR-expressing cells. About 10 days later, the mannitol solution

(5%) dissolved with doxorubicin, M- β -CyD or FA-M- β -CyD was administered by the single intratumoral or intravenous injection to tumor bearing mice. The concentrations of doxorubicin, M- β -CyD and FA-M- β -CyD were 30 mg/kg for intratumoral injection and 5 mg/kg for intravenous injection. The tumor volumes were determined by the equation (Volume = $LW^2/2$), where L is the longest dimension parallel to the skin surface and W is the dimension perpendicular to L and parallel to the surface. The body weight changes and survival rates of tumor-bearing mice were monitored for 30 days and 140 days, respectively. Animal experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Care and Use of Kumamoto University (Approval ID: 24-286).

Determination of blood chemistry values. Blood samples were taken from the vital artery 24 h after an intravenous injection of the mannitol solution (5%) dissolved with doxorubicin (5 mg/kg), M- β -CyD (5 mg/kg) or FA-M- β -CyD (5 mg/kg) to tumor-bearing mice. After centrifugation, serum was collected, and the blood chemistry values of CRE, BUN, AST, ALT and LDH were determined by a clinical chemistry analyzer, JCA-BM2250 (JEOL, Tokyo, Japan).

Data analysis. Data are given as the mean \pm S.E.M. Statistical significance of mean coefficients for the studies was performed by analysis of variance followed by Scheffe's test. *p*-Values for significance were set at 0.05.

1. Wong, H. L., Bendayan, R., Rauth, A. M., Li, Y. & Wu, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 491–504 (2007).
2. Harata, M. *et al.* CD19-targeting liposomes containing imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **104**, 1442–1449 (2004).
3. Lukyanov, A. N., Elbayoumi, T. A., Chakilam, A. R. & Torchilin, V. P. Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody. *J. Control. Release* **100**, 135–144 (2004).
4. Park, J. W. *et al.* Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *J. Control. Release* **74**, 95–113 (2001).
5. Pastorino, F. *et al.* Doxorubicin-loaded Fab' fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Res.* **63**, 86–92 (2003).
6. Roche, A. C. *et al.* Glycofection: facilitated gene transfer by cationic glycopolymers. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 288–297 (2003).
7. Chen, H., Ahn, R., Van den Bossche, J., Thompson, D. H. & O'Halloran, T. V. Folate-mediated intracellular drug delivery increases the anticancer efficacy of nanoparticulate formulation of arsenic trioxide. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 1955–1963 (2009).
8. Gabizon, A. *et al.* Improved therapeutic activity of folate-targeted liposomal doxorubicin in folate receptor-expressing tumor models. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **66**, 43–52 (2010).
9. Lu, Y. & Low, P. S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 675–693 (2002).
10. Mi, Y., Liu, Y. & Feng, S. S. Formulation of Docetaxel by folic acid-conjugated d- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate 2000 (Vitamin E TPGS(2k)) micelles for targeted and synergistic chemotherapy. *Biomaterials* **32**, 4058–4066 (2011).
11. Nukolova, N. V., Oberoi, H. S., Cohen, S. M., Kabanov, A. V. & Bronich, T. K. Folate-decorated nanogels for targeted therapy of ovarian cancer. *Biomaterials* **32**, 5417–5426 (2011).
12. Hayakawa, K. *et al.* Sensitivity to apoptosis signal, clearance rate, and ultrastructure of fas ligand-induced apoptosis in vivo adult cardiac cells. *Circulation* **105**, 3039–3045 (2002).
13. Kobayashi, T. *et al.* Effect of transferrin receptor-targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistant tumor cells. *Int. J. Pharm.* **329**, 94–102 (2007).
14. Miyajima, Y. *et al.* Transferrin-loaded nido-carborane liposomes: tumor-targeting boron delivery system for neutron capture therapy. *Bioconjug. Chem.* **17**, 1314–1320 (2006).
15. Kim, I. Y. *et al.* Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice. *J. Control. Release* **140**, 55–60 (2009).
16. Mamot, C. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* **63**, 3154–3161 (2003).
17. Schiffelers, R. M. *et al.* Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J. Control. Release* **91**, 115–122 (2003).
18. Low, P. S. & Kularatne, S. A. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 256–262 (2009).
19. Antony, A. C. The biological chemistry of folate receptors. *Blood* **79**, 2807–2820 (1992).
20. Limmon, G. V. *et al.* Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA. *FASEB J.* **22**, 159–167 (2008).
21. Parker, N. *et al.* Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal. Biochem.* **338**, 284–293 (2005).



22. Ross, J. F., Chaudhuri, P. K. & Ratnam, M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* **73**, 2432–2443 (1994).
23. Toffoli, G. *et al.* Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *Int. J. Cancer* **74**, 193–198 (1997).
24. Low, P. S., Henne, W. A. & Doornweerd, D. D. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Acc. Chem. Res.* **41**, 120–129 (2008).
25. Szente, L. & Szejtli, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**, 17–28 (1999).
26. Uekama, K. & Otagiri, M. Cyclodextrins in drug carrier systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **3**, 1–40 (1987).
27. Motoyama, K. *et al.* Effect of 2,6-di-O-methyl- α -cyclodextrin on hemolysis and morphological change in rabbit's red blood cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **29**, 111–119 (2006).
28. Motoyama, K. *et al.* Involvement of lipid rafts of rabbit red blood cells in morphological changes induced by methylated β -cyclodextrins. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 700–705 (2009).
29. Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K. & Pitha, J. Differential effects of α -, β - and γ -cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **186**, 17–22 (1989).
30. Galbiati, F., Razani, B. & Lisanti, M. P. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* **106**, 403–411 (2001).
31. Simons, K. & Ehehalt, R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* **110**, 597–603 (2002).
32. Anderson, R. G. & Jacobson, K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **296**, 1821–1825 (2002).
33. Motoyama, K. *et al.* Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin, not 2,6-di-O-methyl- α -cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **38**, 249–261 (2009).
34. Grosse, P. Y., Bressolle, F. & Pinguet, F. Antiproliferative effect of methyl- β -cyclodextrin *in vitro* and in human tumour xenografted athymic nude mice. *Br. J. Cancer* **78**, 1165–1169 (1998).
35. Loftsson, T. & Brewster, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J. Pharm. Pharmacol.* **62**, 1607–1621 (2010).
36. Onodera, R., Motoyama, K. & Arima, H. Design and Evaluation of Folate-appended Methyl- β -cyclodextrin as a New Antitumor Agent. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **70**, 321–326 (2011).
37. Le Roy, C. & Wrana, J. L. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 112–126 (2005).
38. Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857–902 (2009).
39. Kelemen, L. E. The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int. J. Cancer* **119**, 243–250 (2006).
40. Dhar, S., Liu, Z., Thomale, J., Dai, H. & Lippard, S. J. Targeted single-wall carbon nanotube-mediated Pt(IV) prodrug delivery using folate as a homing device. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11467–11476 (2008).
41. Guaragna, A. *et al.* Synthesis and evaluation of folate-based chlorambucil delivery systems for tumor-targeted chemotherapy. *Bioconjug. Chem.* **23**, 84–96 (2012).
42. Long, J. S. & Ryan, K. M. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* (2012).
43. Tan, M. L., Ooi, J. P., Ismail, N., Moad, A. I. & Muhammad, T. S. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharm. Res.* **26**, 1547–1560 (2009).
44. Park, E. K. *et al.* Cholesterol depletion induces anoikis-like apoptosis via FAK down-regulation and caveolae internalization. *J. Pathol.* **218**, 337–349 (2009).
45. Hobbs, S. K. *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 4607–4612 (1998).
46. Nagy, J. A., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* **2**, 251–275 (2007).
47. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).
48. Nagy, J. A., Chang, S. H., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br. J. Cancer* **100**, 865–869 (2009).
49. Chauhan, V. P., Stylianopoulos, T., Boucher, Y. & Jain, R. K. Delivery of molecular and nanoscale medicine to tumors: transport barriers and strategies. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2**, 281–298 (2011).
50. Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307**, 58–62 (2005).
51. Chauhan, V. P. *et al.* Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 383–388 (2012).
52. Hamasaki, K., Kogure, K. & Ohwada, K. A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin (TTX): tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt. *Toxicol.* **34**, 490–495 (1996).
53. Ono, N., Arima, H., Hirayama, F. & Uekama, K. A moderate interaction of maltosyl- α -cyclodextrin with Caco-2 cells in comparison with the parent cyclodextrin. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 395–402 (2001).

Acknowledgements

This work was partially supported by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) from Japan Society for the Promotion of Science (22790040) and by a Grant-in-Aid for Third Term Comprehensive Control Research for Cancer from Ministry of Health Labour and Welfare (24100701).

Author contributions

R.O., K.M., A.O. and T.H. performed the experiments. R.O., K.M., T.H. and H.A. analysed and interpreted the data. R.O., K.M., T.H. and H.A. planned the research. K.M., R.O. and H.A. wrote the manuscript. H.A. supervised the work. All authors discussed the results.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

License: This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

How to cite this article: Onodera, R., Motoyama, K., Okamatsu, A., Higashi, T. & Arima, H. Potential use of Folate-appended Methyl- β -Cyclodextrin as an Anticancer Agent. *Sci. Rep.* **3**, 1104; DOI:10.1038/srep01104 (2013).



Involvement of cholesterol depletion from lipid rafts in apoptosis induced by methyl- β -cyclodextrin



Risako Onodera^a, Keiichi Motoyama^a, Ayaka Okamatsu^a, Taishi Higashi^a,
Ryusho Kariya^b, Seiji Okada^b, Hidetoshi Arima^{a,*}

^a Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan

^b Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, 2-2-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-0811, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2013

Received in revised form 23 March 2013

Accepted 22 April 2013

Available online 14 May 2013

Keywords:

Apoptosis

Methyl- β -cyclodextrin

Cholesterol

Antitumor agent

ABSTRACT

Methyl- β -cyclodextrin (M- β -CyD), which is widely used as a lipid rafts disrupting agent, is known to induce cytotoxicity at high concentration. In the present study, we investigated the potential of M- β -CyD as an antitumor drug. M- β -CyD markedly caused apoptotic cell-death in KB cells, a human oral squamous carcinoma cell line, Ihara cells, a highly pigmented human melanoma cell line, and M213 cells, a human cholangiocarcinoma cell line, through cholesterol depletion in cell membranes. The DNA content and mitochondrial transmembrane potential in KB cells were significantly decreased after treatment with M- β -CyD. Additionally, M- β -CyD elevated the caspase-3/7 activity in KB cells. Meanwhile, M- β -CyD did not induce the formation of autophagic vacuoles in KB cells. M- β -CyD drastically inhibited the tumor growth after intratumoral injection to Colon-26 cells-bearing mice. These results strongly suggest that M- β -CyD induced apoptosis in tumor cells and had the potential a novel antitumor agent and/or its lead compound.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

There are four forms of cell death: apoptosis, autophagic cell-death, necrosis and programmed necrosis. Among the four distinct forms of cell death, apoptosis is best studied. Apoptosis is roughly defined by biochemical and morphological changes of the cells (Taatjes et al., 2008). Two distinct apoptotic signaling pathways, *i.e.* mitochondrial-dependent and -independent pathways regulate apoptosis activation. Intracellular cues, such as damage to the cell's DNA, drive apoptosis primarily through the mitochondrial-dependent pathway, while extracellular signals; usually generated by cytotoxic cells of immune system, trigger apoptosis mainly through the mitochondrial-independent pathway (Ashkenazi, 2008). Both pathways stimulate pro-apoptotic caspase and are activated through a process called 'the caspase cascade' (Lavrik et al., 2005). Acceleration of these apoptotic signals in cancer cells is one of strategy for anti-cancer therapy.

Membrane lipids are known to be associated with cell-death. Cholesterol is an abundant component of the plasma membrane of eukaryotic cells, which plays a pivotal role in the regulation of

membrane fluidity, permeability, receptor function and ion channel activity (Burger et al., 2000). The lateral distribution of cholesterol in the membrane is not uniform and its content is particularly high in lipid rafts. These microdomains have been reported to act as molecular platforms that spatially organize membrane receptor molecules such as epidermal growth factor (EGF) receptor and CD95 (Fas) (Simons and Toomre, 2000). This reorganization is of crucial importance in the initiation and regulation of inflammatory processes and apoptosis. For example, redistribution of death receptors such as Fas to cholesterol-enriched lipid domains has been proposed to be an important regulatory step during the activation of the apoptotic death program (Lacour et al., 2004). Meanwhile, phosphoinositides such as phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate promote cell survival and protect against apoptosis by activating Akt/PKB, which phosphorylates components of the apoptotic machinery (Mejillano et al., 2001). Therefore, the regulation of membrane lipids levels in lipid rafts is one of the key factors of apoptotic signal in cells.

Cyclodextrins (CyDs) and their hydrophilic derivatives form inclusion complexes with hydrophobic molecules. CyDs can improve the solubility, dissolution rate and bioavailability of the drugs, and so the widespread use of CyDs is well known in the pharmaceutical field (Uekama et al., 1998). CyDs have been reported to interact with cell membrane constituents such as cholesterol and phospholipids (Motoyama et al., 2009b).

* Corresponding author at: Department of Physical Pharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan, Tel.: +81 96 371 4160; fax: +81 96 371 4420.

E-mail address: arimah@gpo.kumamoto-u.ac.jp (H. Arima).