

がん細胞内への還元型ビタミンK₂の送達法とその効果に関する研究

瀬戸口 修一

福岡大学薬学部 創剤学教室, 814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Novel Approach for Intracellular Delivery and Enhanced Antitumor Effects of Vitamin K₂ Hydroquinone into Cancer Cells

Shuichi Setoguchi

Department of Drug Design and Drug Delivery, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,
8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the poor prognosis disease because of its very frequent recurrence even after the “curative” treatment. Thus, the effective and safe long-term anti-tumor agent is required. Reduced cellular uptake of menaquinone-4 (MK-4), a vitamin K₂ homolog, in HCC limits its usefulness as a safe long-term anti-tumor agent for recurrent HCC and produces des- γ -carboxy prothrombin (DCP). We hypothesized that effective delivery of menahydroquinone-4 (MKH), the active form of MK-4 for γ -glutamyl carboxylation, into HCC cells is critical for regulating HCC growth, and may enable it to be applied as a safe anti-tumor agent. In this study, we verified this hypothesis using menahydroquinone-4 1,4-bis-*N,N*-dimethylglycinate hydrochloride (MKH-DMG), a pro-drug of MKH, and demonstrated its effectiveness. Intracellular delivery of MKH and subsequent growth inhibition of PLC/PRF/5 and Hep3B (DCP-positive) and SK-Hep-1 (DCP-negative) cells after MKH-DMG administration was determined and compared with MK-4. The activity of MKH-DMG against tumor progression in the liver alongside DCP formation was determined in a spleen-liver metastasis mouse model. MKH-DMG exhibited greater intracellular delivery of MKH *in vitro* (AUC_{0-72h} of MKH) and increased growth inhibitory activity against both DCP-positive and DCP-negative HCC cell lines. The phenomena of MKH delivery into cells in parallel with simultaneous growth inhibition suggested that MKH is the active form for growth inhibition of HCC cells. Cell cycle arrest and apoptosis were determined to be involved in the growth inhibition mechanisms of MKH prodrug. In the spleen-liver metastasis mouse model, MKH-DMG showed significant inhibition of tumor progression in the liver, and a substantial decrease in plasma DCP levels. Our results suggest that an MKH prodrug is a promising new candidate anti-tumor agent for safe long-term treatment of HCC. Furthermore, we prepared anionic MKH hemi-succinate prodrug (MKH-SUC) and neutral MKH acetate prodrug (MKH-ACT), besides cationic MKH-DMG, and evaluated MKH delivery and growth inhibitory activity *in vitro*. MKH-SUC showed high cell-permeability and effective release of MKH in HCC cells, and also exhibited strong growth inhibitory action, compared with MKH-ACT and MK-4 in PLC/PRF/5 cells. These results indicate that MKH-SUC has a good potential as the MKH delivery system for HCC and might overcome the limitation of pharmacological effect of MKH with the clinical use of MK-4.

Keywords: hepatocellular carcinoma, menahydroquinone-4, vitamin K, prodrug, drug delivery system

【緒言】

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) は肝切除やラジオ波焼灼などの治療後においても、肝内転移や多中心性発癌によって術後5年までにその約70%が再発し、長期予後は極めて悪い¹。現在化学療法に用いられている薬物を再発予防剤として適用することは副作用の面から困難である。それ故に、安全性が高く長期投与可能な再発予防剤の開発が強く望まれてきた。

Vitamin K₂の一種である menaquinone-4 (MK-4, vitamin K₂₍₂₀₎) において、HCCの再発予防効果が *in vitro* と *in vivo* の実験で報告された²⁻⁶。MK-4は骨粗鬆症治療薬として長期投与の安全性が確立していたため大きな期待を受け⁷⁻¹⁰、小規模の臨床試験においても、MK-4が肝硬変患者における *de novo* 発癌と外科的手術後のHCC再発を抑制した^{11, 12}。しかし、最近の大規模なプラセボ対照の無作為化二重盲検比較試験では一転して失敗の結果に終わった¹³。

HCC患者において、正常肝組織に比べHCC組織での vitamin K レベルが低下していることが報告され¹⁴、また別の報告では正常肝細胞に比べHCC細胞においてMK-4の取り込み速度が低下していることが報告された¹⁵。これらのことから、HCC組織におけるMK-4の availability の低さが臨床試験失敗を招いた可能性が考えられた。一方、des- γ -carboxy prothrombin (DCP) はよく知られたHCCの腫瘍マーカーであり、vitamin K 依存性カルボキシ化反応が不完全な異常プロトロンビンである^{16, 17, 22, 23}。このカルボキシ化反応は vitamin K hydroquinone (KH₂) (vitamin K の二電子還元体) が律速因子であり²⁶、HCCにおけるDCPの過剰産生はHCC中の vitamin K 欠乏に依るものと考えられている^{14, 22-24}。さらに最近では、DCPがHCCの増殖因子であることが明らかにされている¹⁸⁻²¹。

以上の知見から、HCC細胞中にMK-4の二電子還元体 (活性体) である menahydroquinone-4 (MKH) を効率よく送達することで、MK-4の低い availability と DCP生成が同時に克服でき、効率的なHCCの増殖抑制が可能になると仮説を立てた。活性体MKHは極めて酸化され易い化合物であるため、直接治療に用いることは不可能である。本研究では、先にMKHの ester type prodrug 化によって、MK-4 からMKHへの還元的活性化過程を回避して効率的にMKHを正常肝臓に送達することを可能にし、クマリン系抗凝血剤で vitamin K cycle が強く阻害された出血毒性状態を効率的に克服できることを明らかにしている^{27, 28}。

本研究では、第一にMKHの ester type prodrug によるDCP陽性HCC細胞 (PLC/PRF/5, Hep3B) 内へのMKHの送達性を評価し、MK-4に比較して高いレベルでMKHをHCC細胞内に送達できることを明らかにした。すなわち、HCC細胞においても正常肝臓と同様にMKHを効率よく送達できることを明らかにした。第二に、MKH ester type prodrug のDCP陽性HCC細胞株に対する増殖抑制効果を *in vitro* で評価し、MK-4に比較して優れた増殖抑制効果を有することを明らかにした。また第三に、その機構検討から増殖抑制効果がMKHに由来することが強く示唆された。さらにDCP陽性HCC細胞株を脾-肝転移モデルマウスに移植し *in vivo* におけるMKH ester type prodrug の効果を評価し、肝臓における腫瘍の発生と増殖ならびにDCPの産生を有意に抑制することを明らかにした。最後に、MKH prodrugの promoiety がカチオン性、中性、アニオン性の3種類のMKHエステル誘導体を用いて、HCC細胞内へのMKHの送達性と増殖抑制効果の比較検討から、HCC細胞に対する高い取込みとMKHへの再変換性 (加水分解) に優れた誘導体が、効率的なMKHの送達性ならびに増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

本研究は、世界で初めてHCC細胞内へのMKHの効率的な送達を可能にし、その結果優れた増殖抑制効果を発揮させることを可能にしたものであり、本研究の仮説を強く支持するものであった。

【結果と考察】

(1) MKH 1,4-bis *N,N*-dimethylglycinate HCl (MKH-DMG) による HCC細胞内への MKHの効率的な送達

MKHは極めて不安定であるため正確な濃度を直接測定することは不可能である。MK-4はVKORC1L1によって二電子還元体MKHとなり γ -glutamyl carboxylase (GGCX)の補因子として機能すると化学量論的にMK-4 epoxide (MKO)へと代謝され、MKOはVKORC1によってMK-4に還元されVitamin K cycleを形成している (Fig. 1)。すなわち、HCC細胞内MKO量は、少なくとも細胞内に送達されたMKH量を反映することになる。そこで、MKH-DMG投与後のHCC細胞中のMKH-DMG, MKO, MK-4濃度をLC-MS/MSで測定し、その薬物濃度変化からMKH送達性を評価した。

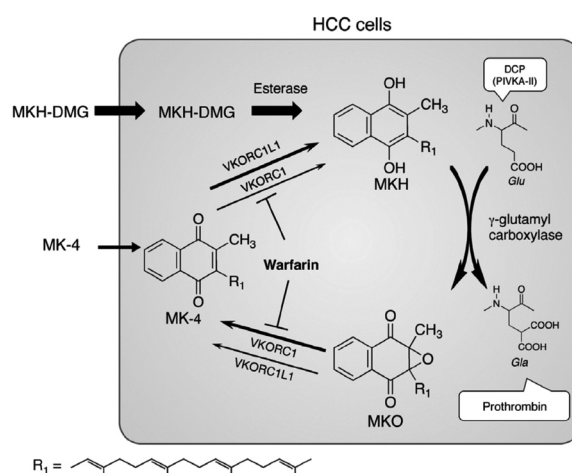


Fig. 1. Schematic illustration of vitamin K cycle and concept for MKH delivery

DCP陽性HCC株 (PLC/PRF/5, Hep3B) およびDCP陰性HCC株 (SK-Hep-1) に対して、のちに示す増殖抑制効果の IC_{50} に近似した $25 \mu\text{M}$ のMKH-DMGまたはMK-4を曝露させ、その細胞中のMK-4, MKO濃度の経時変化をFigure 2に示した。MKH-DMG投与後、3種の細胞中のMKH-DMG濃度は速やかに上昇し、投与後24時間までに培地中のMKH-DMGとの平衡に達した (data not shown)。細胞内MKOとMK-4濃度は、観察した72時間後まで経時的に上昇し (Fig. 2A, C, E), MKOとMK-4の和はMK-4投与 (Fig. 2B, D, F) に比べて高くなった。ここで、Hep3Bに着目すると (Fig. 2C), MKH-DMG投与後ではMK-4に比べMKOが高く推移しており、GGCXが飽和していないためにMKOの生成が効率的となり、かつMKOからMK-4の還元過程が飽和であるためと考えられた。加えてPLC/PRF/5細胞を用いたMKO投与における検討 (data not shown) から、MKH-DMG投与における高い細胞内MK-4濃度 (Fig. 2A) は、HCC細胞内でMKH-DMGが加水分解して生成したMKHの内、GGCXの補因子として使われなかったMKHが抽出過程でMK-4に酸化されたものであることが強く示唆された。したがって、MKH-DMG投与後のHCC細胞中のMK-4とMKOの和を、細胞内に送達されたMKHとみなすことができ、またMK-4投与ではMKHからMKOへの変換に飽和は観察されないことから、細胞中のMKO量を送達されたMKH量とみなし、MKHの濃度時間曲線下面積 (AUC) を用いてHCC細胞内への送達性の強度を比較した。MK-4投与に比較してのMKH-DMG投与はMKHの AUC_{0-72h} が約3.5-15倍大きくMKHの送達性が3.5-15倍高いことが明らかとなった。

(2) MKH-DMGによる HCC細胞の増殖抑制効果

DCP陽性であるPLC/PRF/5, Hep3B細胞とDCP陰性のSK-Hep-1の細胞培養液に薬物 (MK-4またはMKH-DMG) を投与し、経時的に生存細胞数をCell Titer-Glo Viability Assay試薬 (Promega) を用いて測定した。PLC/PRF/5細胞に対するMKH-DMGの増殖抑制効果をMK-4と比較した (Table 1)。MKH-DMGは速やかに低投与量で増殖抑制効果を発揮し、MKH-DMG投与72時間後の IC_{50} はMK-4投与の約1/18-1/4であった。MKH-DMGはMK-4の約4-18倍の強い増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。MKH-DMG投与による細胞内MKH送達性がMK-4投与の約3.5-15倍高いことからMKH-DMGによるHCC細胞の増殖抑制は細胞中MKHによることが強く示唆された。

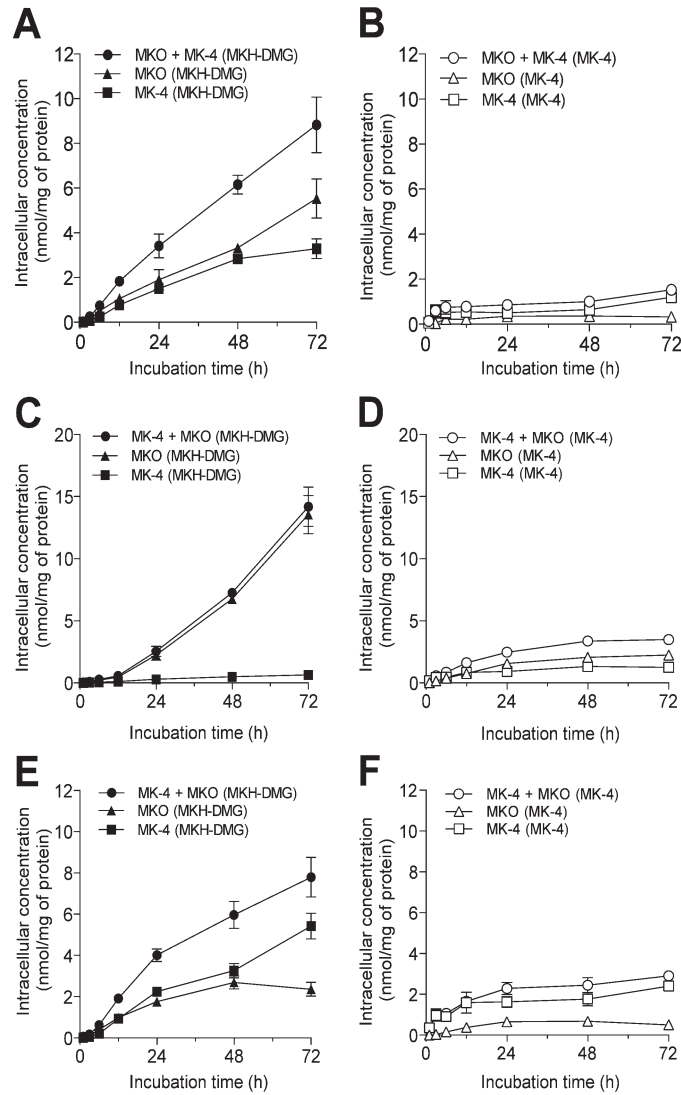


Fig. 2. MKH delivery via MKH-DMG into HCC cell lines. Intracellular MK-4 and MKO concentration-time profiles following 25 μ M MKH-DMG treatment of PLC/PRF/5 (A), Hep3B (C), and SK-Hep-1 (E) cells. Intracellular MK-4 and MKO concentration-time profiles following 25 μ M MK-4 treatment of PLC/PRF/5 (B), Hep3B (D), and SK-Hep-1 (F) cell lines. Symbols: \blacksquare , MK-4; \blacktriangle , MKO; \bullet , MK-4+MKO after MKH-DMG treatment. \square , MK-4; \triangle , MKO; \circ , MK-4+MKO after MK-4 treatment. Error bars indicate mean \pm SD ($n = 3$).

Table 1. Growth inhibition IC_{50} values of MK-4 and MKH-DMG against HCC cell lines after treatment with MK-4 or MKH-DMG.

Time (h)	IC_{50} value (μ M) ^a					
	PLC/PRF/5		Hep3B		SK-Hep-1	
	MK-4	MKH-DMG	MK-4	MKH-DMG	MK-4	MKH-DMG
48	–	52 (48–56)	1203 (587–2465)	39 (35–43)	141 (128–156)	59 (56–63)
72	295 (187–465)	24 (22–27)	667 (225–1974)	37 (36–38)	111 (101–122)	31 (30–33)
96	98 (88–109)	14 (12–16)	140 (101–194)	26 (24–27)	84 (76–92)	31 (29–33)

PLC/PRF/5 and Hep3B, DCP-positive cells; SK-Hep-1, DCP-negative cells.

^a IC_{50} values are presented as mean and 95% confidence interval (in parentheses).

(3) MKH-DMGが細胞周期に及ぼす影響

細胞増殖抑制機構を明らかにする目的で、細胞周期に及ぼす薬物 (MK-4またはMKH-DMG) の影響を検討した。薬物投与後のPLC/PRF/5細胞を propidium iodide (PI) 核染色しフローサイトメトリー解析した。MKH-DMGはG1期の増加、S期の減少およびSub G1期を増加させた。MKH-DMGはCyclin D1とCDK4の強い抑制と大きなG1期の増加からG1 arrestによる増殖抑制効果が明らかになった (Fig. 3A)。次に、PLC/PRF/5, Hep3BおよびSK-Hep-1細胞にMK-4またはMKH-DMGを投与し、細胞周期関連タンパク (CDK4, Cyclin D1, Cyclin D3) および上流でCyclin D1活性化に寄与するNF- κ Bの発現をWestern blot法で検出した。MKH-DMGはCDK4, Cyclin D1, Cyclin D3およびNF- κ Bのすべてを時間依存的に減少させ、MK-4よりも強く抑制した (Fig. 3B)。

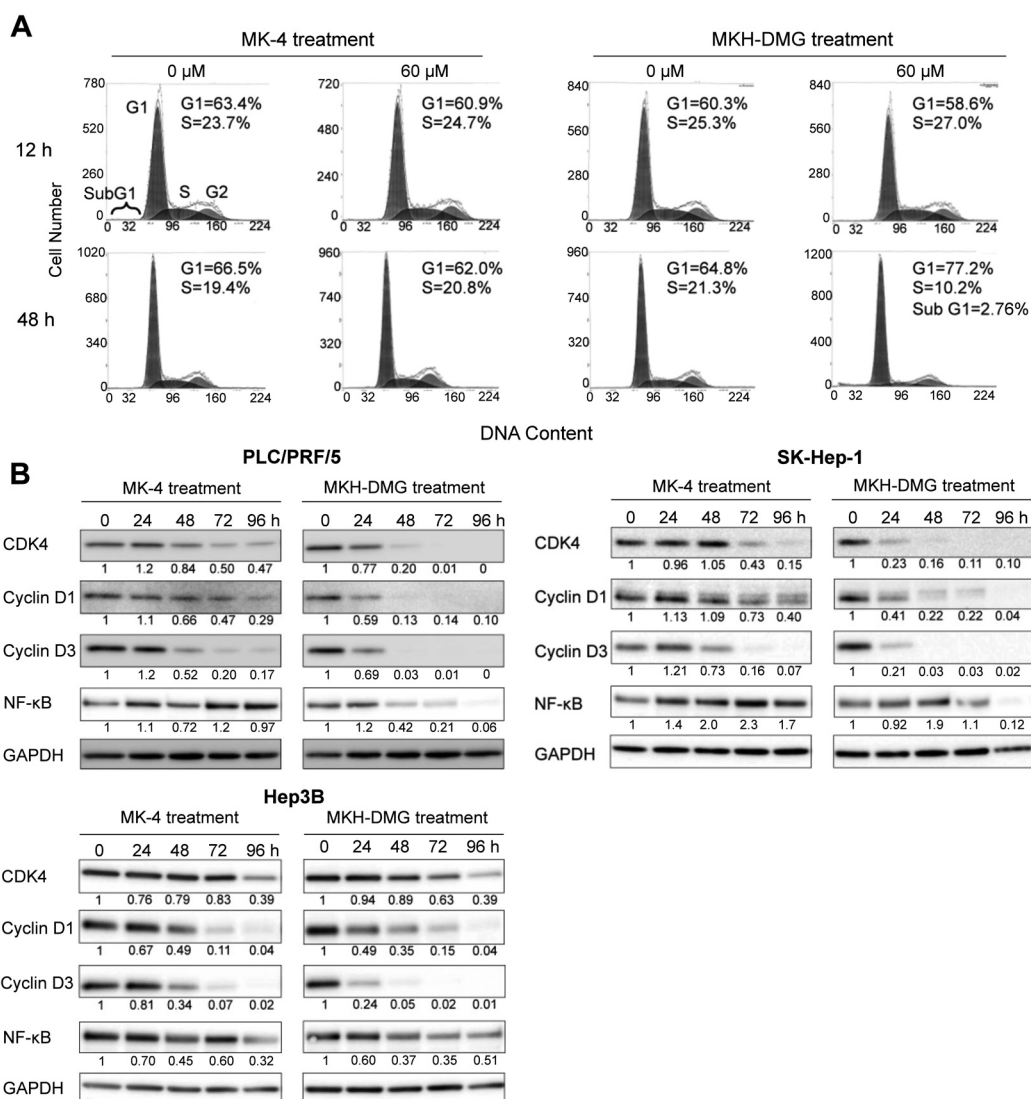


Fig. 3. Effect of MKH-DMG on cell cycle and expression of cell cycle-related protein in HCC cells. (A) Flow cytograms of MKH-DMG-treated cells. Indicated percentage values represent DNA content in G1- and S-phase per number of whole DNA. (B) Effects of MKH prodrug on expression of cell cycle regulatory proteins and NF- κ B.

(4) MKH-DMGによるHCC細胞のapoptosis誘導

PLC/PRF/5細胞培養液にMK-4またはMKH-DMGを投与し、72時間後のCaspase3/7活性を検出した。MKH-DMGはMK-4と比して低濃度でカスパーゼ3/7活性を亢進し (Fig. 4), またSubG1画分が増加したこと (Fig. 3A), さらにHep3B細胞に対し100 μ MのMKH-DMG投与後72時間において、DNAの断片化が観察された (data not shown) ことからMKH-DMGがHCC細胞に対してapoptosisを誘導することが明らかとなった。

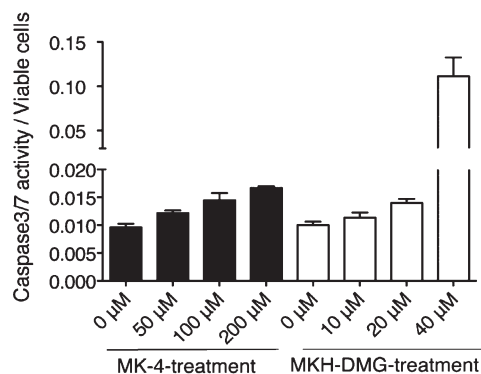


Fig. 4. Effects of MKH prodrug on cell apoptosis of PLC/PRF/5 cells. Cells were treated with various concentrations of MK-4 or MKH-DMG for 72 h. Values on the left are ratios of caspase activity (Caspase Glo 3/7 Assay) and viable cells (Cell Titer-Glo assay), as determined by coupled analysis.

(5) MKH prodrugの脾-肝転移モデルマウスを用いたHCCに対するin vivo効果評価

Balb/c *nu/nu* マウスをVehicle群 (n=15), MKH-DMG群 (n=15), Sham群 (n=8)に群分けし、Vehicle群とMKH-DMG群の脾臓にPLC/PRF/5細胞を移植した。Vehicle群、Sham群は水のみを投与した。MKH-DMG群はHCC細胞の脾臓移植6日前からMKH-DMGを飲水投与し、HCC細胞投与後50日の肝重量、癌の面積、血漿中のDCP濃度を測定した。Figure 5Aに試験エンドポイントにおける典型的なマウス肝臓の外観を示した。MKH-DMG投与によってマウスの肝重量および肝癌化面積はどちらもVehicle群に対して有意に低値となり肝臓における癌の増悪度は低くなった ($p < 0.05$) (Fig. 5B, C), また、血漿中でのDCP

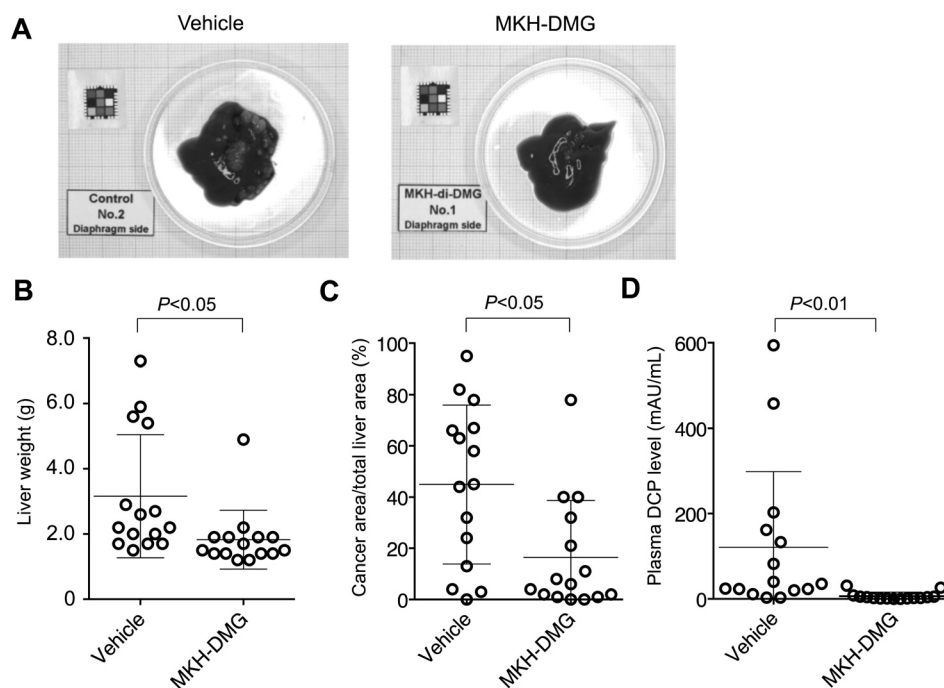


Fig. 5. HCC growth inhibitory effects of MKH-DMG in a splenic-liver metastasis mouse model. (A) Macroscopic appearance of mouse liver. (B) Total liver weight. (C) Percentage of cancer surface area/total liver surface area. (D) DCP levels in plasma. Central horizontal line, mean; error bar, SD.

レベルは、ほぼ完全に抑制した ($p < 0.01$) (Fig. 5D)。この結果、MKH-DMGは優れた増殖抑制効果を *in vivo* で発揮することが明らかになった。

但し、マウスのHCCの増殖抑制とDCPの抑制に程度の違いがあること、*in vitro* の検討においてMK-4投与で増殖抑制効果を発揮する投与量よりも低い投与量でPLC/PRF/5およびHep3BのDCP産生を抑制すること (data not shown) を併せて考慮すると、DCPを抑制することはHCCの増殖抑制の直接的な効果とは考えにくく、DCPの抑制は副次的にHCCの予後改善に寄与するものと予想される。

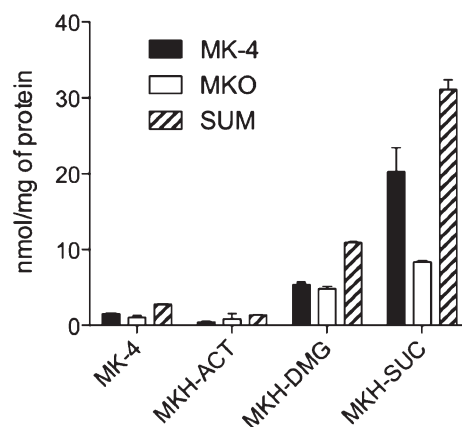


Fig. 6. MKH delivery with MKH prodrug to PLC/PRF/5 cells. Intracellular concentrations of MK-4, MKO and the sum of these following 50 μ M MK-4, MKH-ACT, MKH-DMG or MKH-SUC treatment for 24 h.

(6) MKH送達性と増殖抑制効果に及ぼすMKHエステル型 prodrugの promoietyの影響

MKHエステル型 prodrugのHCC細胞に対するMKH送達には、1) prodrug自身のHCC細胞への取込み過程と2) HCC細胞内での加水分解過程がMKHの細胞内送達性の律速過程であることが考えられる。MKH送達における各過程の寄与を明らかにし、更に優れたMKH送達性を有するMKHエステル誘導体の探索を行った。

MKH prodrugの promoietyがカチオン性のMKH-DMG、中性のMKH acetate (MKH-ACT)、アニオン性のMKH succinate (MKH-SUC)について、PLC/PRF/5細胞への取込みを検討した。MKH prodrug自身の取込みはMKH-SUC>MKH-DMG>MKH-ACTの順となり (data not shown)、細胞内MKOとMK-4の和によるMKH送達量はMKH-SUC>MKH-DMG>MK-4>MKH-ACTの順に多くなり (Fig. 6)、HCC細胞内への優れたMKHの送達性は、MKH prodrug自身の高い細胞内への取込みと、細胞内での速やかなMKHへの再変換性に起因していることが明らかとなった。

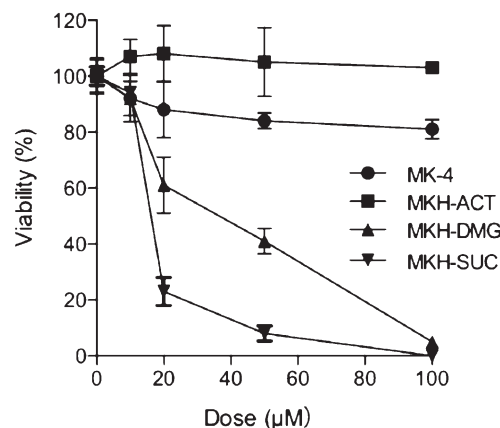


Fig. 7. Inhibitory effects of MKH prodrug on PLC/PRF/5 cell proliferation. Cells were treated with various concentrations of MKH prodrugs for 72 h. Symbols: ●, MK-4; ■, MKH-ACT; ▲, MKH-DMG; ▼, MKH-SUC treatment. Error bars indicate mean \pm SD (n = 3).

PLC/PRF/5細胞に対する増殖抑制の IC_{50} 値はMKH-DMGで32 μ M、MKH-SUCで16 μ MでありMKH-SUCは優れた増殖抑制効果を有することが明らかになった (Fig. 7)。この増殖抑制効果はMKH-DMGと同様にMKHを効率よくHCC細胞内に送達することで増殖抑制効果を発揮したと考えられた。

【結論】

MKHの prodrugである MKH-DMGは HCC細胞に対して効率的な MKH送達を可能にし、DCP陽性、陰性にかかわらず HCCに対して優れた増殖抑制効果を発揮し、その効果は *in vivo*においても確認された。MKH-DMGは MK-4の約 1/10低用量で効果を発揮できることから、MK-4の当量の投与量において長期投与における高い安全性が期待できると同時に高い効果が期待でき再発予防剤として有望である。*In vitro*の検討において、MKH-SUCがMKH prodrugとして効率よく機能し、更に有望である。*In vivo*での投与形態における availabilityおよび増殖抑制効果の評価が必要であり、これからの課題である。

【謝辞】

本稿を終えるにあたり、本研究の機会をいただき、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部創剤学教室 高田 二郎 教授に衷心より感謝の意を表します。併せて、本論文を査読して頂き、貴重な御意見、御校閲を賜りました福岡大学薬学部免疫学教室 中島 学 教授ならびに同大学薬学部創剤学教室 加留部 善晴 教授、松永 和久 准教授に深謝致します。本研究に際し多大なる御助言、御協力を賜りました福岡大学医学部病理学教室 竹下 盛重 教授ならびに福岡大学薬学部臨床薬物治療学教室 遠城寺 宗近 教授に厚く御礼申し上げます。また種々の形で本研究に御協力頂いた福岡大学薬学部創剤学教室の諸氏に深く感謝申し上げます。

【引用文献】

1. Llovet JM, Bruix J. J Hepatol. 2008;48 Suppl 1:S20-37.
2. Bouzazhah B, Nishikawa Y, Simon D, Carr BI. J Cell Physiol. 1995;165:459-67.
3. Wang Z, Wang M, Finn F, Carr BI. Hepatology. 1995;22:876-82.
4. Otsuka M, Kato N, Shao RX, Hoshida Y, Ijichi H, Koike Y, et al. Hepatology. 2004;40:243-51.
5. Ozaki I, Zhang H, Mizuta T, Ide Y, Eguchi Y, Yasutake T, et al. Clin Cancer Res. 2007;13:2236-45.
6. Hitomi M, Yokoyama F, Kita Y, Nonomura T, Masaki T, Yoshiji H, et al. Int J Oncol. 2005;26:713-20.
7. Orimo H, Shiraki M, Tomita A, Morii H, Fujita T, Ohata M. J Bone Miner Metab. 1998;16:106-12.
8. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. J Bone Miner Res. 2000;15:515-21.
9. Knapen MH, Schurgers LJ, Vermeer C. Osteoporos Int. 2007;18:963-72.
10. Inoue T, Fujita T, Kishimoto H, Makino T, Nakamura T, Nakamura T, et al. J Bone Miner Metab. 2009;27:66-75.
11. Habu D, Shiomi S, Tamori A, Takeda T, Tanaka T, Kubo S, et al. JAMA. 2004;292:358-61.
12. Mizuta T, Ozaki I, Eguchi Y, Yasutake T, Kawazoe S, Fujimoto K, et al. Cancer. 2006;106:867-72.
13. Yoshida H, Shiratori Y, Kudo M, Shiina S, Mizuta T, Kojiro M, et al. Hepatology. 2011;54:532-40.
14. Huisse MG, Leclercq M, Belghiti J, Flejou JF, Suttie JW, Bezeaud A, et al. Cancer. 1994;74:1533-41.
15. Li ZQ, He FY, Stehle CJ, Wang Z, Kar S, Finn FM, et al. Life Sci. 2002;70:2085-100.
16. Weitz IC, Liebman HA. Hepatology. 1993;18:990-7.
17. Inagaki Y, Tang W, Makuuchi M, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N. Liver int. 2011;31:22-35.
18. Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, et al. J Biol Chem. 2005;280:6409-15.
19. Yue P, Gao ZH, Xue X, Cui SX, Zhao CR, Yuan Y, et al. Eur J Cancer. 2011;47:1115-24.
20. Matsubara M, Shiraha H, Kataoka J, Iwamuro M, Horiguchi S, Nishina S, et al. J Gastroenterol Hepatol. 2012;27:1602-8.

21. Gao J, Feng X, Inagaki Y, Song P, Kokudo N, Hasegawa K, et al. *Biosci Trends*. 2012;6:153-9.
22. Okuda H, Obata H, Nakanishi T, Furukawa R, Hashimoto E. *J Hepatol*. 1987;4:357-63.
23. Furukawa M, Nakanishi T, Okuda H, Ishida S, Obata H. *Cancer*. 1992;69:31-8.
24. Murata K, Suzuki H, Okano H, Oyamada T, Yasuda Y, Sakamoto A. *Int J Oncol*. 2009;35:1005-14.
25. Westhofen P WM, Marinova M, Hass M, Kirfel G, Müller J, Bevans CG, et al. *J Biol Chem*. 2011;286:15085-94.
26. Hallgren KW, Qian W, Yakubenko AV, Runge KW, Berkner KL. *Biochemistry*. 2006;45:5587-98.
27. Takata J, Karube Y, Hanada M, Matsunaga K, Matsushima Y, Sendo T, et al. *Pharm Res*. 1995;12:18-23.
28. Takata J, Karube Y, Hanada M, Matsunaga K, Matsushima Y, Sendo T, et al. *Pharm Res*. 1995;12:1973-9.