

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

新しい肝がん発症予防法および治療法の開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 橋田 充

平成15(2003)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
新しい肝がん発症予防法および治療法の開発に関する研究	
橋田 充	1
II. 分担研究報告	
1. 抗癌剤の高分子ミセル型受動的ターゲティング製剤開発とその評価に関する研究	
岡野光夫	5
2. 葉酸修飾マイクロエマルション担体制剤を用いた肝癌の化学療法に関する研究	
米谷芳枝	7
(資料) Fig	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	15

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策 研究事業）

総括研究報告書

新しい肝がん発症予防法および治療法の開発に関する研究

主任研究者 橋田 充 京都大学大学院薬学研究科教授

研究要旨 現在開発されている抗癌剤には、肝細胞癌に対し極めて有効で腫瘍の縮退延いでは延命効果を示すような薬剤はほとんどなく、肝臓癌に対する標準的な化学療法は未だ確立されていない。その理由として、わが国では、多くの肝癌がウイルス性肝炎、肝硬変を経て多段階的に発症することや、大腸や直腸癌からの転移性癌が多いことが挙げられる。申請者らのこれまでの検討では、ナノ技術を用いて種々の微粒子を調製し、さらに薬物の肝ターゲティング能を付与した製剤を開発することによって、肝癌の予防と治療に対して適切な化学療法あるいは遺伝子治療を実現する新しい治療戦略の一端を見出した。本研究では、肝癌の病態に応じて最適化された化学療法を実現するために、幅広い特性を有する抗癌剤肝ターゲティング・ナノ粒子製剤を開発し、その動態制御と治療効果をモデル動物で評価して、肝細胞癌に対する化学療法・抗癌剤併用療法、遺伝子治療法の確立を試みた。本年度は、種々の肝臓や癌細胞へのターゲティングシステム（橋田は選択的遺伝子導入法と癌の肝転移抑制を目的とした活性酸素消去酵素誘導体、米谷は癌細胞指向性脂質エマルジョン）を評価するとともに、キャリアへの抗癌剤封入率の向上（岡野）を検討し、治療応用への可能性を検証した。

岡野 光夫・東京女子医科大学先端生命医
科学研究所・教授

米谷 芳枝・星薬科大学医薬品化学研究所
創剤構築研究室・教授

A. 研究目的

(1) 薬物封入肝能動的ターゲティング・ナノ粒子製剤：抗癌剤は副作用が高く、至適投与量まで投与できない場合が多い。従って、抗癌剤を癌細胞にターゲティングし正常細胞への暴露を防ぐことのできるナノ粒子担体の開発は、臨床上極めて有用性が高い。そこで、癌細胞への抗体や特異的受容体などで修飾した薬物含有微粒子製剤が癌の治療に有効と考えられている。肝癌は、大腸や直腸からの転移癌によることが多いことが知られており、主な原発部位となる小腸上皮の癌細胞において、葉酸受容体（FR）の過剰発現が報告されている。そこで、今回、さらに癌ターゲティング性を高めるために、アクラシノマイシン(ACM)を封入した葉酸修飾マイクロエマルジョン(FM-ACM)の構築を試みた。PEG 化マイクロエマルジョンのPEGの先端に葉酸を結合させた葉酸修飾血中滞留性マイクロエマルジョン(FM) は、PEG によって血中に長期

に滞留し、さらに、葉酸によって癌組織部位に抗癌剤を特異的に送達することが期待される。FM-ACM の最適処方、粒子サイズ、薬物封入率、製剤の安定性、培養細胞の取り込み率と毒性の観点から検討した。

(2) 疎水性の高い抗癌剤の高分子ミセル型受動的ターゲティング製剤：抗癌剤のナノ粒子製剤は、ターゲティング機能の付加が可能な製剤として注目されている。従って、薬物特性にあったナノ粒子担体の選択、すなわち抗癌作用機構や副作用スペクトルの異なる種々の薬物のナノ粒子製剤開発が必要である。特に、トポイソメラーゼ阻害剤であるカンプトテシンは非常に高い抗癌活性を示すものの水溶性が低く投与が困難なため *in vivo* では十分な効果が期待できない。本研究では、カンプトテシンなどの抗癌剤を安定・高収率で内包する方法論を開発し、固形ガン、特に肝臓ガンに効率よく運ぶ高分子ミセルターゲティングシステムを設計・作成する。これによって、従来にはない飛躍的な抗癌活性を有する肝癌化学療法の構築を目指す。(3) 肝臓選択的遺伝子導入法の開発：これまでにカチオン性高分子やカチオン性リポソームに認識素子である糖を導入し、肝臓への選択的遺伝子導入を行

うベクター開発を進めてきたが、さらに細胞内への取込み後の動態制御を目的として機能性高分子であるポリエチレンミンに着目し、新しい遺伝子導入ベクターの開発を試みた。(4)活性酸素消去酵素誘導体による肝癌転移抑制：活性酸素が癌細胞の接着・浸潤など各転移過程において重要な役割を演じていることが明らかにされつつあり、また活性酸素消去酵素の一つであるカタラーゼが癌転移に対して抑制的に働くことが見出されている。そこで、癌の肝転移に対する治療法の開発を目的として、活性酸素消去酵素の肝臓選択的デリバリーの有効性について検討するとともに、その抑制メカニズムの機構としてマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の発現について解析を行った。

B. 研究方法

(1) 高分子ミセルナノ粒子の設計：高分子ミセルを形成するブロックコポリマーとしてポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル L-アスパルテート) ブロックコポリマーをもととし、さらにベンジルエステルを部分的に加水分解した。(2) 高分子ミセルへの薬物封入法の検討：抗癌剤のカンプトテシンを用いて、3種類の異なった封入方法(透析法、エマルション法、エバポレーション法)を適用し、高分子ミセルへの封入効率を評価した。(3) 葉酸結合脂質の合成およびマイクロエマルションの調製：葉酸を P E G 脂質 (distearoylphosphatidylethanolamine)の先端に N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide によって結合して、葉酸-PEG 脂質を合成した。マイクロエマルションの組成は葉酸-PEG 脂質、コレステロール、ビタミン E とし、アクラシノマイシン(ACM)を加えて修正エタノール注入法で調製した(FM-ACM)。対照としては、葉酸非修飾マイクロエマルション(M-ACM)を用いた。(4) 葉酸修飾マイクロエマルションの癌細胞ターゲティング能の評価：蛍光ラベル物質である Dil でラベルした葉酸修飾マイクロエマルション(FM-Dil)と葉酸非修飾マイクロエマルション(M-Dil)を調製した。また、葉酸修飾非 PEG 化マイクロエマ

ルシオンと、PEG 脂質として PEG の分子量が 2000 と 5000 の 2 種類を用いた葉酸修飾 PEG 化マイクロエマルションも調製した。FM-ACM の培養細胞への取り込みは、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。in vitro での評価には、葉酸受容体の存在が確認されているヒト咽頭上皮癌細胞 KB 細胞を用いた。(5) ガラクトース修飾ポリエチレンイミンによる肝細胞選択的遺伝子導入：遺伝子分子量の異なるポリエチレンイミン(PEI₁₈₀₀、PEI₁₀₀₀₀、PEI₇₀₀₀₀)と 2-imino-2-methoxyethyl-1-thio-galactoside を反応させ、Gal-PEI を合成した。さらに、ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA(pCMV-Luc)と複合体を形成させ、in vitro 遺伝子発現および細胞取り込みを検討した。なお、細胞にはシアロ糖タンパク質レセプターを発現することが知られている HepG2 細胞を用いた。また、in vivo における遺伝子導入効率を検討するために、マウス門脈内に投与し、肝臓での遺伝子発現を調べた。(6) カタラーゼ誘導体による癌転移抑制実験：活性酸素消去酵素の一つであるカタラーゼのガラクトース誘導体を合成した。Colon26 癌細胞を門脈内投与し、3日後にカタラーゼ誘導体を静脈内に投与して一定期間後に肝臓における癌の結節を計数した。また、結腸癌肝転移モデルマウスにおいて肝臓中のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)活性を測定した。

C. 研究結果

(1) 高分子ミセルの調製：ポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル L-アスパルテート) ブロックコポリマーおよび加水分解率が 25%、50%、65%のものはすべて直径 70 nm 程度の高分子ミセルを形成した。カンプトテシンの高分子ミセルへ導入は、透析法、エマルション法では封入効率が最大でも 20%程度と低く、ミセルにも凝集が多かった。これに対し、エバポレーション法ではほぼ 100%の効率で封入でき、凝集も少ないという結果が得られた。さらに、ブロックコポリマーの疎水性置換基は、ベンジル基とメチルナフチル基を 40-6

0%程度置換したときが、ミセルへの封入の安定性が高いことが水系のGPC測定の結果より明らかとなった。(2)葉酸修飾による細胞へのターゲティング：マイクロエマルジョンの細胞取り込み量を測定したところ、葉酸修飾したFM-DiiはM-Diiに比べて高い細胞取り込みを示した。また、2mMの葉酸共存下、取り込みが有意に阻害され、細胞内への取り込みは葉酸受容体を介していることが確認された。ACMが赤い蛍光を発することを利用し、細胞内での薬物の局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、FM-ACMの場合にのみACMの核への集積が認められた。

さらに、FM-ACMはM-ACMに比べ、高い癌細胞に対してより顕著な細胞毒性を示す傾向が認められ、M-ACMの細胞内取り込み量と細胞毒性作用はよく相関することが示された。また、葉酸修飾非PEG化マイクロエマルジョンと、葉酸修飾PEG化(分子量2000、5000)マイクロエマルジョンを用いて、PEGの有無と長さによる葉酸受容体の認識能への影響も調べた結果、葉酸修飾PEGがPEG鎖5000(FM5000/2000-ACM)のときPEG2000(FM2000/2000-ACM)よりも細胞内へのACMの取り込みが高いことから、受容体に認識されやすいが推察された。(3)ガラクトース修飾ポリエチレンジアミン(Gal-PEI)による肝細胞選択的遺伝子導入：分子量の異なる3種類のPEI(MW 1800、10000、70000)のガラクトース誘導体を合成した。ガラクトース修飾の有無に関わらず、すべてのPEI誘導体においてpDNAと複合体を形成し、分子量が大きなPEIほどより小さな複合体を形成した。未修飾PEIでは分子量の最も小さいPEI₁₈₀₀が最も高い遺伝子導入効率を示したのに対し、Gal-PEIでは中間の分子量であるPEI₁₀₀₀₀が高い遺伝子導入効率を示した。ガラクトースを認識するレクチン(Ricinus communis agglutinin-120)との反応性はGal-PEI₁₀₀₀₀とGal-PEI₇₀₀₀₀のpDNA複合体で同程度であったのに対し、Gal-PEI₁₈₀₀では顕著に低かった。Gal-PEI₁₀₀₀₀あるいはGal-PEI₇₀₀₀₀のpDNA複合体の遺伝子発現は、高濃度のガラクトース共存下で顕著に小さくなり、ア

シアロ糖タンパク質レセプターの関与が示された。PEI/pDNAの細胞毒性はPEIの分子量が大きくなるほど増大する傾向が認められた。門脈内投与後のGal-PEI/pDNA複合体による遺伝子発現は、in vitroとは異なってGal-PEI₇₀₀₀₀で最も大きく、複合体の大きさなど、細胞毒性以外の因子も重要であることが示唆された。(4)カタラーゼ誘導体による肝癌転移抑制：マウス結腸癌細胞colon26細胞を門脈から投与して作成した肝転移モデルマウスに対し、3日後に各種カタラーゼ誘導体を尾静脈内投与した。2週間後に肝臓を摘出し、癌結節数を計数したところ、いずれのカタラーゼ誘導体でも有意に結節数を減少させた。とりわけ、肝実質細胞指向性を示すガラクトース修飾カタラーゼ(Gal-CAT)の効果が高かった。転移癌組織を含む肝臓をホモジネートしたところ顕著なMMP活性が認められ、カタラーゼおよびGal-CAT投与群では有意なMMP活性の低下が認められた。さらに、マウスマクロファージとcolon26細胞を共培養したところ癌細胞によるMMP-9の分泌が顕著に増大し、カタラーゼ処理によってそれが抑制された。

D. 考察

ほぼ同じ直径のミセルが形成されたことは、35%のベンジルエステルでミセル形成に十分な疎水性があるためと考えられる。また、ブチル基やラウリル基のような疎水基に比べ、芳香族環を有するベンジル基とメチルナフチル基を導入することによりカンプトテシンが安定に封入されたことから、この薬物分子とポリマー間の π - π 相互作用が重要な役割を果たしていると考えられる。また、ベンジルエステル100%のブロックコポリマーよりも50%程度のベンジルエステル化率のものが高い封入安定性を示し、封入部位であるミセル内核での立体的な要因も重要であることが示唆された。

葉酸修飾マイクロエマルジョンの癌細胞への取り込みがフリーの葉酸により阻害されていることから、その細胞取り込みは葉酸受容体を介していることが確認された。FM-ACMの癌細胞に対する毒性は、細胞内

取り込みとよく相関することが示され、葉酸修飾を利用した癌細胞ターゲティングが抗癌剤の効果を高める上で非常に有用なアプローチとなり得ることが明らかとなった。

PEI をガラクトース修飾した場合、レセプターを介して肝細胞に取込まれることが明らかとなったが、その際高分子のほうに小さな複合体を形成して局所的な糖残基密度が増大するため、より効率的な細胞取込みを示すことが明らかとなった。しかしながら、高分子量 PEI ほど細胞毒性が強いため、遺伝子発現は取込みと毒性のバランスにより最適な分子量域(MW. 10000 程度)が存在することが示された。

活性酸素を消去するカタラーゼは結腸癌の肝臓転移を抑制し、癌転移抑制薬として有望であることが示された。特に、肝臓指向性を示す Gal-CAT でその効果が顕著であり、肝臓ターゲティングの重要性が示された。そのメカニズムの一つとして、転移巣で産生される MMP 活性の低下が考えられた。しかしながら、カタラーゼ自身は癌細胞に対して直接作用するのではなく、転移部位に浸潤してくる単球やマクロファージによって産生される活性酸素を消去することがより重要であることが *in vitro* の実験により示唆された。

E. 結論

新しく開発したエバポレーション法を利用することによって薬剤をほぼ 100% 高分子ミセルに封入できることが明らかとなった。葉酸修飾マイクロエマルションは、抗癌剤を癌細胞に選択的にデリバリーするために有効な方法であることが示された。Gal-PEI は高い肝細胞に対して高い遺伝子導入能を有しており、抗腫瘍活性を有する IFN- β や IFN- α 遺伝子の導入に有効なキャリアとなり得ることが示された。さらに、活性酸素消去酵素であるカタラーゼ特に肝臓選択性を有する Gal-CAT が癌の肝転移を抑制する有効な治療薬となることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) K. Morimoto, M. Nishikawa, S. Kawakami, T. Nakano, Y. Hattori, S. Fumoto, F. Yamashita, M. Hashida. Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver. *Molecular Therapy*. 7(2): 254-261 (2003).

(2) A. Murao, M. Nishikawa, C. Managit, J. Wong, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida. Targeting efficiency of galactosylated liposomes to hepatocytes in vivo: effect of lipid composition. *Pharmaceutical Research*. 19(12): 1804-1814 (2002).

(3) Y. Yabe, N. Kobayashi, M. Nishikawa, K. Mihara, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida. Pharmacokinetics and preventive effects of targeted catalase derivatives on hydrogen peroxide-induced injury in perfused rat liver. *Pharmaceutical Research*. 19(12): 1815-1821 (2002).

2. 学会発表

(1) 熊井仁美、兵頭健治、西川元也、山下富義、橋田 充、癌転移におけるマトリックス分解酵素の関与と活性酸素消去酵素デリバリーによる制御、第 17 回日本薬物動態学会年会、2002 年 11 月 20-22 日

(2) 兵頭健治、西川元也、山下富義、橋田 充、レポーター遺伝子導入癌細胞を用いた癌細胞内動態の定量的解析法の開発と転移抑制研究への応用、日本薬学会第 123 年会、2003 年 3 月 27-29 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書

抗癌剤の高分子ミセル型受動的ターゲティング製剤開発とその評価

分担研究者 岡野光夫 東京女子医科大学教授

研究要旨 難水性の抗ガン剤を安定・高収率で内包し、肝臓ガンへのターゲティングを達成する高分子ミセルキャリアシステムの構築。

A. 研究目的

水に難溶性の各種抗ガン剤、特にカンプトテシンを安定・高収率で内包し、固形ガン、特に肝臓ガンに効率よく運ぶ高分子ミセルターゲティングシステムを設計・作成する。

B. 研究方法

高分子ミセルを形成するブロックコポリマーとしてエステル部分に各種の疎水基を導入したポリエチレングリコールポリ（アスパラギン酸エステル）を用い、カンプトテシンを透析法、エマルション法、エバポレーション法での高分子ミセル封入を行った。

C. 研究結果

高分子ミセルへ導入は、透析法、エマルション法では封入効率が最大でも20%程度と低く、ミセルにも凝集が多かった。これに対し、エバポレーション法ではほぼ100%の効率で封入でき、凝集も少ない。疎水性置換基は、ベンジル基とメチルナフチル基を40-60%置換したときが、ミセルへの封入の安定性が高いことが水系のGPC測定からわかった。なお、化学合成実験のみであり、倫理面での問題はない。

D. 考察

ブチル基やラウリル基といった直鎖状の疎水基に比べて、芳香族環を有するベンジ

ル基とメチルナフチル基の導入が安定なカンプトテシン封入に有効であったことは、この薬物分子とポリマー間の $\pi-\pi$ 相互作用が重要な役割を果たしていると言える。また、ベンジルエステル100%のブロックコポリマーよりも50%程度のベンジルエステル化率のものが高い封入安定性を示したことは、封入部位であるミセル内核での立体的な要因も重要であることを示した。

E. 結論

カンプトテシンを高い効率で、安定性よく高分子ミセルに封入することができ、*in vitro* や *in vivo* 評価への準備が整った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) F. Kohori, M. Yokoyama, K. Sakai, and T. Okano, *J. Controlled Release*, 78, 155-163 (2002)
- 2) Y. Mizumura, M. Yokoyama, T. Okano, et al., *Japanese J. Cancer Research*, 93, 1237-1243 (2002)
- 3) 横山昌幸、「高分子医薬の最新技術」、高分子、51(8)、624-628
- 4) M. Yokoyama, *Supramolecular design for biological applications*, CRC Press, 2002, pp.245-267

2. 学会発表

- 1) 横山昌幸、岡野光夫、高分子ミセルによる固形ガンへのターゲティング戦略、第18回日本DDS学会、2002.6.21
- 2) T. Okano and M. Yokoyama, Polymeric micelles for multi-targeting therapeutic system, The 29th International Symposium

on Controlled Release of Bioactive Materials、2002.7.24

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書

葉酸修飾マイクロエマルション担体制剤を用いた肝癌の化学療法に関する研究

分担研究者 米谷芳枝 星薬科大学医薬品化学研究所

これまでは、肝癌の化学療法において、副作用を軽減し治療効果を高めるために、長期滞留性製剤による受動的ターゲティングと、糖残基による肝細胞への能動的ターゲティングが行われてきた。しかし、癌の治療には癌細胞へのターゲティングが不可欠である。癌細胞には葉酸受容体が過剰発現していることが知られており、葉酸修飾リポソームや高分子が腫瘍へのターゲティング担体として用いられている。抗癌剤アクラシノマイシン(ACM)は癌化学療法に広く用いられているが、油性であるのでエマルションが担体として望ましい。そこで、ACM 葉酸修飾マイクロエマルション(FM-ACR)の構築を目指した。FM-ACRの最適処方、粒子サイズ、薬物封入率、製剤の安定性、培養細胞の取り込み率と毒性、から決定した。

A. 研究目的

これまでは、肝癌の化学療法において、副作用を軽減し治療効果を高めるための薬物送達システム(DDS)として、長期滞留性製剤による受動的ターゲティングと、糖残基による肝細胞への能動的ターゲティングが研究されてきた。しかし、血中滞留性や組織へのターゲティングのみでは薬物の体内分布を変えることが十分できず、腫瘍の進行状態によって抗癌剤の集積性が影響されやすい。そこで、癌の治療には癌細胞へのターゲティングが不可欠である。このためには、癌細胞への抗体や特異的受容体などで修飾した薬物含有微粒子製剤が考えられている。

肝癌は、大腸や直腸からの転移癌によることが多いことが知られており、主な原発部位となる小腸上皮の癌細胞において、葉酸受容体 (FR) の過剰発現が報告されてい

る。

また、近年では、葉酸と結合した薬物・高分子・リポソームなどが、FR を介して葉酸と共に取り込まれることが実証されている。すなわち、リポソームの表面を葉酸で修飾することにより、腫瘍へのターゲティングが可能である。しかしながら、リポソームに封入できる薬物は限られており、その点、内相に油相を持つマイクロエマルションは封入薬物の多様化に寄与することが期待される。

これまでに、PEG 化した静脈内注射可能な ACM 封入血中滞留性マイクロエマルション製剤は安定性に優れ、抗腫瘍効果も高いことを報告した。そこで、今回、さらに癌ターゲティング性を高めるために、ACM 葉酸修飾マイクロエマルション(FM-ACR)の構築を試みた。PEG 化マイクロエマルションの PEG の先端に葉酸を結合させた葉

酸修飾血中滞留性マイクロエマルジョン (FM) は、PEG によって血中に長期に滞留し、さらに、葉酸によって癌組織部位に抗癌剤を特異的に送達することが期待される。FM-ACM の最適処方、粒子サイズ、薬物封入率、製剤の安定性、培養細胞の取り込み率と毒性から決定する。

B. 研究方法

まず、葉酸を PEG 脂質 (distearoylphosphatidylethanolamine) の先端に *N,N'*-dicyclohexyl carbodiimide によって結合して、葉酸-PEG 脂質を合成した。

マイクロエマルジョンの組成は葉酸-PEG 脂質、コレステロール、ビタミン E とし、アクラシノマイシンを加えて修正エタノール注入法で調製した (FM-ACM)。対照としては、葉酸非修飾マイクロエマルジョン (M-ACM) を用いた。

葉酸修飾による細胞内へのターゲティング能を評価するため、蛍光ラベル物質である DiI でラベルした葉酸修飾マイクロエマルジョン (FM-DiI) と葉酸非修飾マイクロエマルジョン (M-DiI) を調製した。また、葉酸修飾非 PEG 化マイクロエマルジョンと、PEG 脂質として PEG の分子量が 2000 と 5000 の 2 種類を用いた葉酸修飾 PEG 化マイクロエマルジョンも調製した。

マイクロエマルジョンへの ACM への封入率は Sephadex G 50 カラムクロマトグラフィーを用いて測定した。

FM-ACM の培養細胞への取り込みは、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

in vitro での評価には、葉酸受容体の存在が確認されているヒト咽頭上皮癌細胞 KB

細胞を用いた。

C. 研究結果・考察

葉酸修飾による細胞へのターゲティング能を評価するため、FM-DiI を細胞に添加して 1 時間インキュベーションし、取り込み量を測定した (Fig. 1)。また、2mM の葉酸を添加した培地中で FM-DiI をインキュベーションした。この結果から、FM-DiI は M-DiI に比べて高い細胞取り込みを示し、葉酸修飾により取り込みが促進されることが明らかになった。また、フリーの葉酸により取り込みが阻害されていることから、競合阻害が起きていると考えられ、細胞内への取り込みは葉酸受容体を介していることが確認された。

Fig.2 に、FM-ACM 及び M-ACM を培養細胞と共にインキュベーションし、共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果を示す。ACM を低濃度で用いた場合では ACM は赤い蛍光を発することから、ACM は細胞の核に集積することが明らかになった。一方、M-ACM では ACM は観察されなかった。これは、ACM が DNA 阻害により薬効を発揮する抗癌剤であるためと推察した。

細胞への取り込みが促進されることで、実際に抗癌作用が増強されるか否かを確認するため、MTT アッセイによる細胞毒性の評価を行なった。Fig.3 の横軸は ACM とした添加量を縦軸は細胞生存率を表しており、カラムが短いほど、強い細胞毒性が現れていることを示す。この結果から、FM-ACM は M-ACM に比べ、高い細胞毒性を示す傾向が認められた。

また、FM-ACM の細胞内取り込み量と細胞毒性作用はほぼ比例するということが示

された。

また、葉酸修飾非 PEG 化マイクロエマルジョンと、葉酸修飾 PEG 化(分子量 2000、5000) マイクロエマルジョンを用いて、PEG の有無と長さによる葉酸受容体の認識能への影響も調べた結果、葉酸修飾 PEG が PEG 鎖 5000(FM_{5000/2000}-ACM)のとき PEG2000(FM_{2000/2000}-ACM)よりも細胞内への ACM の取り込みが高いことから、受容体に認識されやすいと推察した(Fig.4)。

D. 結論

これらの結果より、脂質微粒子製剤を葉酸で修飾することにより、高い抗癌作用が得られることが示唆された。特に PEG 鎖長が 5000 のときターゲティング能が高くなることが明らかになった。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang J., Y. Maitani and K. Takayama, Antitumor effects and pharmacokinetics of aclacinomycin A carried by injectable emulsions composed of vitamin E, cholesterol and PEG-lipid: *J. Pharm. Sci.*, 91(4):1128-34(2002).
2. K. Kawano, K. Nakamura, K. Hayashi, T. Nagai, K. Takayama and Y. Maitani Liver targeting liposomes containing β -sitosterol glucoside with regard to penetration-enhancing effect on HepG2 cells: *Bio. Pharm. Bull.*, 25(6):766-770(2002).

3. Wang J., K. Takayama, T. Nagai and Y. Maitani, Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of and PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol: *Int. J. Pharm.*, 251, 30(1-2) 13-21(2003).
4. K. Kawano, K. Takayama, T. Nagai and Y. Maitani, Preparation and pharmacokinetics of pirarubicin loaded: dehydration-rehydration vesicles, *Int. J. Pharm.*, 252(1-2) 73-9 (2003).

2. 学会発表

Wang Junping, Yoshie Maitani, Kozo Takayama, Preparation and Antitumor Effects of Trypsin-modified PEGlated Microemulsions as Carrier of Suicide Gene Controlled by Tumor-targeting Promoter、日本薬学会 122 年会 2002 年 3 月 26 日～28 日

川野久美、高山幸三、永井恒司、米谷芳枝、ピラルビシン封入肝ターゲティングリポソーム製剤の調製と評価、日本薬剤学会第 17 年会 2002 年 3 月 29 日～31 日

川野久美、高山幸三、永井恒司、米谷芳枝、DRV 法によるピラルビシン封入リポソームの調製と抗腫瘍効果の検討、第 18 回日本 DDS 学会 2002 年 6 月 21 日、22 日

Kumi Kawano, Kozo Takayama, Tsuneji Nagai,
Gregory Gregoriadis, Yoshie Maitani

Preparation and antitumor effects of
pirarubicin-encapsulating liposomes for liver
cancer treatment 29th Annual Meeting of the
Controlled Release Society (South Korea)
2002年7月20日～25日

Yoshie Maitani, Wang Junping, Tsuneji
Nagai, Kozo Takayama, Preparation and
antitumor effects of trypsin-modified peglated
microemulsions as carriers of suicide gene
controlled by tumor-targeting promotor 29th
Annual Meeting of the, Controlled Release
Society (South Korea) 2002年7月20日～
25日

塩川智規、米谷芳枝、葉酸修飾マイクロエ
マルションによる癌ターゲティング化学療
法、日本薬剤学会第18年会 2003年4月4
日～6日

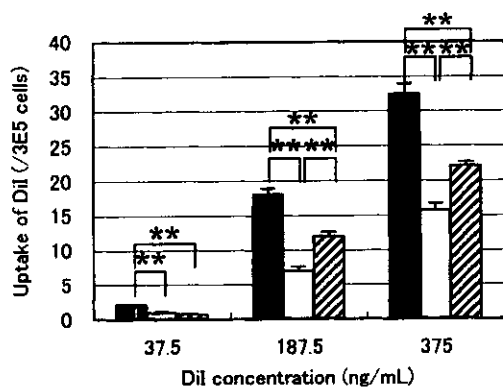


Figure 1. Cellular uptake of DiI microemulsions by cells incubated with FM-DiI (closed column) or M-DiI (open column) for 1 hour in folate-depleted medium. Separately, cells were incubated for 1 hour with FM-DiI in medium supplemented 2mM folic acid (hatched column). Each data represents mean \pm SD (n=3), ** : $p < 0.01$.

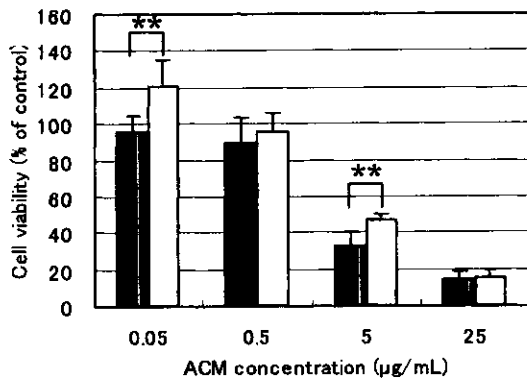


Figure 2. MTT assay result of ACM microemulsions. Cells were incubated with FM-ACM (closed column) or M-ACM (open column) for 1 hour in serum-free medium. Then incubated for 24 hours in serum-containing medium, and MTT assay was done. Each data represents mean \pm SD (n=6), ** : $p < 0.01$.

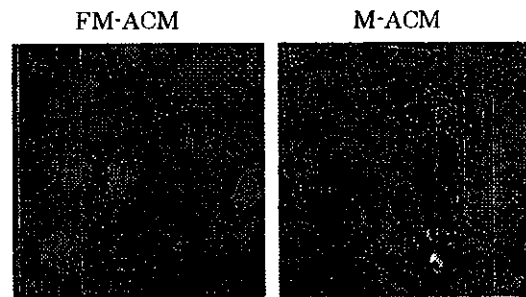


Figure 3. Observation cells by confocal laser scanning microscopy incubated with FM-ACM (left) or M-ACM (right) for 1 hour. Both ACM concentration was 0.5µg/mL.

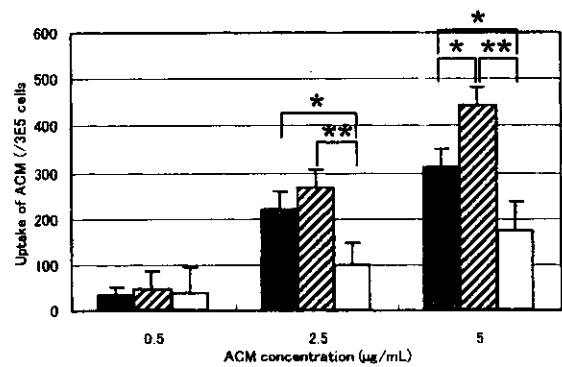


Figure 4. Comparison of cellular uptake of ACM microemulsion by PEG chain length of folate-PEG-DSPE. Cells were incubated with FM₂₀₀₀/2000-ACM (hatched column), FM₅₀₀₀/2000-ACM or M₂₀₀₀-ACM (closed column) for 1 hour. Each data represents mean \pm SD (n=3), ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$.

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
P. Opanasopit, M. Sakai, M. Nishikawa, S. Kawakami, F. Yamashita M. Hashida	Inhibitin of liver metastasis by targeting of immunomodulators using mannosylated liposome carriers	Journal of Controlled Release	80	283-294	2002
Y. Yamasaki, K. Sumimoto, M. Nishikawa, F. Yamashita, K. Yamaoka, M. Hashida Y. Takakura	Pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger receptors: importance of molecular size and negative charge density for in vivo recognition by receptors	The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	301(2)	467-477	2002
P. Opanasopit, K. Hyoudou, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida	Serum mannan binding protein inhibits mannosylated liposome-mediated transfection to macrophages	Biochimica et Biophysica Acta	1570(3)	203-209	2002
K. Yasuda, Y. Ogawa, M. Kishimoto, T. Takagi, M. Hashida, Y. Takakura	Plasmid DNA activates murine macrophages to induce inflammatory cytokines in a CpG motif-independent manner by complex formation with cationic liposomes	Biochemical and Biophysical Research Communications	293	344-348	2002
A. Murao, M. Nishikawa, C. Managit, J. Wong, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida	Targeting efficiency of galactosylated liposomes to hepatocytes in vivo: effect of lipid composition	Pharmaceutical Research	19(12)	1808-1814	2002
Y. Yabe, N. Kobayashi, M. Nishikawa, K. Mihara, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida	Pharmacokinetics and preventive effects of targeted catalase derivatives on hydrogen peroxide-induced injury in perfused rat liver	Pharmaceutical Research	19(12)	1815-1821	2002
K. Furumoto, K. Ogawara, S. Nagayama, Y. Takakura, M. Hashida, K. Higaki, T. Kimura	Important role serum proteins associated on the surface of particles in their hepatic disposition	Journal of Controlled Release	83	89-96	2002
K. Morimoto, M. Nishikawa, S. Kawakami, T. Nakano, Y. Hattori, S. Fumoto, F. Yamashita, M. Hashida	Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver	Molecular Therapy	7(2)	254-261	2003
P. Opanasopit, M. Nishikawa, C. Managit,	Control of hepatic disposition of mannosylated liposomes by PEGylation: effect of the molecular	S.T.P. Pharma Sciences	13(1)	57-62	2003

F. Yamashita, M. Hashida	weight of PEG and the density of PEG and mannose				
A. Kawase, T. Nomura, K. Yasuda, N. Kobayashi, M. Hashida, Y. Takakura	Disposition and gene expression characteristics in solid tumors and skeletal muscle after direct injection of naked plasmid DNA in mice	Journal of Pharmaceutical Sciences	92	1295-1304	2003
M. Nishikawa, M. Hashida	Nonviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy	Biological and Pharmaceutical Bulletin	25(3)	275-283	2002
Y. Takakura, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida	Influence of physicochemical properties on pharmacokinetics of non-viral vectors for gene delivery	Journal of Drug Targeting	10(2)	99-104	2002
S. Kawakami, F. Yamashita, K. Nishida, J. Nakamura, M. Hashida	Glycosylated cationic liposomes for cell-selective gene delivery	Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems	19(2)	171-190	2002
P. Opanasopit, M. Nishikawa, M. Hashida	Factors affecting drug and gene delivery: effects of interaction with blood components	Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems	19(3)	191-234	2002
F. Kohori, M. Yokoyama, K. Sakai, T. Okano	Process design for efficient and controlled drug incorporation into polymeric micelle carrier systems	Journal of Controlled Release	78	155-163	2002
Y. Mizumura, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano, T. Kawaguchi, F. Moriyasu, T. Kakizoe	Incorporation of the anticancer agent KRN5500 into polymeric micelles diminishes the pulmonary toxicity	Japanese Journal of Cancer Research	93	1237-1243	2002
横山 昌幸	連載・高分子科学最近の進歩 高分子医薬の最新技術	高分子	51(8)	624-628	2002
M. Yokoyama	Drug targeting with polymeric micelle drug carriers	Supramolecular Design for Biological Applications		245-267	2002
J. Wang, Y. Maitani, K. Takayama	Antitumor effects and pharmacokinetics of aclacinomycin A carried by injectable emulsions composed of vitamin E, cholesterol and PEG-lipid	Journal of Pharmaceutical Sciences	91(4)	1128-1134	2002
K. Kawano, K. Nakamura, K. Hayashi, T. Nagai, K. Takayama, Y. Maitani	Liver targeting liposomes containing β -sitosterol glucoside with regard to penetration-enhancing effect on HepG2 cells	Biological and Pharmaceutical Bulletin	25(6)	766-770	2002
K. Nakamura, Y. Maitani, K. Takayama	The enhancing effect of nasal absorption of FITC-dextran 4,400 by β -sitosterol β -D- glucoside in rabbits	Journal of Controlled Release	79	147-155	2002
K. Nakamura, Y. Maitani, K. Takayama	Enhancement of FITC-dextran absorption via nasal mucosa by nanoparticles based on β -sitosterol β -D- glucoside and its aglycon	S.T.P. Pharma Sciences	12(1)	63-68	2002
W. Junping	Pharmacokinetics and antitumor	International Journal of	251	13-21	2003

K. Takayama, T. Nagai Y. Maitani	effects of vincristine carried by microemulsions composed of and PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol	Pharmaceutics			
K. Kawano, K. Takayama, T. Nagai, Y. Maitani	Preparation and pharmacokinetics of pirarubicin loaded	International Journal of Pharmaceutics	252	73-79	2003
K. Nakamura, K. Takayama, T. Nagai, Y. Maitani	Regional intestinal absorption of FITC-dextran 4,400 with nanoparticles based on β -sitosterol β -D- glucoside in Rats	Journal of Pharmaceutical Sciences	92(2)	311-318	2003
米谷 芳枝 永井 恒司	脂質パーティクル製剤 特集 パーティクルと DDS	Drug Delivery System	17(4)	314-320	2003

20021394

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.12-P.14の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。