

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

： ナノメディシン研究

研究課題：がん診断・治療両用高分子
ミセルターゲティングシステム

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横山 昌幸

平成20（2008）年4月

目 次

I. 総括研究報告

がん診断・治療両用高分子ミセルターゲティングシステム-----	1
横山昌幸	

II. 分担研究報告

1, 腫瘍選択的薬物送達を目指した葉酸修飾微粒子製剤の開発-----	1 7
米谷芳枝	
2, レチノイド封入高分子ミセルの評価解析-----	2 1
川上茂	
3, 高分子ミセルの生体有害性と腫瘍標的化の検証-----	2 4
川口隆憲	
4, 高分子ミセルの組織移行と腫瘍内分布の解析-----	2 8
堀勝義	
5, 高分子ミセル抗がん剤のトランスレーショナルリサーチ-----	3 2
濱口哲弥	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 3 5

*研究成果の刊行物・別刷は別紙として添付した

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総括研究報告書

がん診断・治療両用高分子ミセルターゲティングシステム

主任研究者 横山昌幸（財）神奈川科学技術アカデミー・プロジェクトリーダー

研究要旨 疎水性の抗がん剤を安定・高収率で内包する高分子の設計法を構築し、がんへのターゲティングを達成する。今年度は、高分子ミセルのがん組織への集積機構についての新知見が得られ、その知見をより効果的な抗がん剤ターゲティングに活用する為の検討を行った。また、レチノイド封入高分子ミセルによる解析を進めた。MRI造影剤システムでは、新たな系統のブロックコポリマーで血中循環性の高い組成が得られ、固形がんへのターゲティングも確認された。

分担研究者

- ・米谷芳枝
星薬科大学 医薬品化学研究所
- ・川上茂
京都大学大学院 薬学研究科
- ・川口隆憲
福島県立医科大学病理学第2講座
- ・堀勝義
東北大学 加齢医学研究所
- ・濱口哲弥
国立がんセンター中央病院

A. 研究目的

高分子ミセルドラッグキャリアシステムは図1に示すように、合成高分子が数百万分子会合しその内核に疎水性薬物を保持し、標的部位に選択性高く運搬することで、飛躍的に薬効を高め、副作用を減少させることができる。特に10～100nmの直径の極めて小さなナノサイズでありながら、多量の疎水性薬物を安定に封入できることで、EPR効果（固形がん組織血管の透過性が亢進している性質）を利用して固形がんターゲットングできることが大きな特長である。

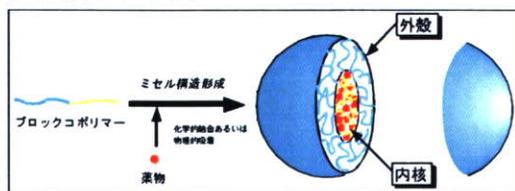


図1 高分子ミセル薬物キャリアシステム

既に、抗がん剤アドリアマイシン、タキソール内包高分子ミセルで、がん組織への選択性高い集積が得られ、ヒトでの臨床試験が進行中である。

本研究の目的は、薬物ターゲティングによりがん化学療法の有効性を飛躍的に高めるとともに、微小がんを検出できるMRIシステム開発にある。具体的な目標は、

- (1) 高分子ミセルによる非水溶性抗がん剤の固形がんターゲットングシステム確立
- (2) 分子標的薬と分化誘導剤封入高分子ミセルによる新規化学療法創出
- (3) 微小がんを検出する高分子ミセルMRI造影剤の開発 である。

特に、診断（MRI）と治療（化学療法）を同一のキャリアーシステムで行うことが可能となるために、さらに、高分子ミセル造影剤MRI画像から、高分子ミセル化学療法の有効性が予測され得る。これは患者個々へのオーダーメイド治療の実現につながる。（高分子ミセルMRI造影剤で明確に固形がん画像が得られた患者は、高分子ミセル抗がん剤での治療効果が高いと予想され得る。）

3年計画の2年目である平成19年度は、以下の点に重点を行って研究を推進した。

- ・ウィンドウチャンバー法を用いたがん組織での高分子ミセル集積部位と集積機構の解析
- ・上記の解析の知見に基づいて、腫瘍血管破断薬AC7700と高分子ミセルの組み合わせによる、新規薬物ターゲティング戦略の構築
- ・レチノイド封入高分子ミセルによるin vivo抗がん活性評価
- ・ポリリシンをベースとした新たな系統のブロックコポリマーによるMRI造影剤の作製と、がん選択的MRI造影挙動の解析

本年度に得られた具体的成果は以下の通りである。

- (1) カンプトテシンを封入し、凝集が少なく平均粒径の小さな高分子ミセルを得る方法の開発。
- (2) リポソームをモデルとして用い、葉酸修飾高分子ミセルアクティブターゲティングのための分子設計法の構築。
- (3) 難治性癌の一つである胃癌腹膜播種の動物モデルでのカンプトテシン系抗がん剤を結合した高分子ミセルシステムの高い集積挙動を観察した。
- (4) ウインドウチャンバー法によるがんへのミセル集積挙動の解析によって、がん組織への高い集積を観察した。また、がん組織と正常組織の境界に存在する変性領域での特に高いミセル集積現象を発見した。
- (5) 腫瘍血管破断薬AC7700と高分子ミセルの組み合わせによる、新規薬物ターゲティング戦略構築のためのin vivoデータを得た。
- (6) 高分子ミセルキャリアーによる病理的解析を行い、脾臓における高分子ミセルの比較的高い取り込み挙動を見いだした。
- (7) 分化誘導剤レチノイドであるAm80等の封入ミセルを作製した。Am80封入ミセルでは、マウス腹膜播種モデルにおいてin vivo抗がん活性を得た。
- (8) ポリリシンをベースとした新たな系統のブロックコポリマーによるMRI造影剤を作製した。そのうちの1つの組成で高い血中循環性と高いがん集積性が得られた。そのターゲティングに従って、がん選択的MRI画像を得た。

以上のうち、(2)、(3)、(4)、と(5)、(6)の一部の結果は分担研究報告書にその結果を記す。
本総括研究書では下線の(1)、(7)、(8)の内容と、(5)、(6)の一部の内容を記す。

B. 研究方法

(1) カンプトテシン封入し高分子ミセルの作製

高分子ミセルを形成するブロックコポリマーとして用いたものは、前年度を同じ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) (PEG-PBLA) ブロックコポリマーを基とし、それを加水分解してポリエチレングリコール-ポリ(アスパラギン酸) とし、それにエステル形成にて疎水基をアスパラギン酸

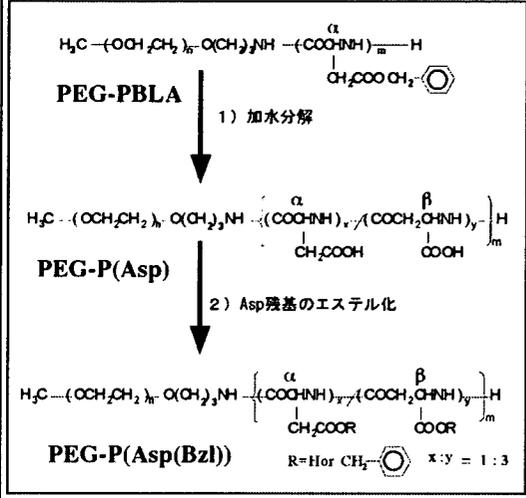


図2 ブロックコポリマーの構造残基に導入したものである。その合成経路を図2に示す。

PEG-PBLAを加水分解したものがポリエチレングリコール-ポリ(アスパラギン酸) (PEG-P(Asp)) ブロックコポリマーであり、アルカリ加水分解のために、生成したアスパラギン酸残基はその70%程度がβ-アミドとなっている。それらに対してハライド化合物の求核置換反応によって70%程度ベンジルエステルを導入したPEG-P(Asp(Bzl))を得た。今回用いたものはいずれも、PEGの分子量が5,000、アスパラギン酸のユニット数が23~27のものを用いた。コポリマーの名称は、例えばベンジルエステルを70%導入したものをPEG-P(Asp(Bzl 70))と表す。
用いたブロックコポリマーは、アスパラギン酸のユニット数が27で、ベンジルエステル化率が74%のPEG-P(Asp(Bzl 74))である。

このブロックコポリマー5 mgに有機溶媒に溶解した、カンプトテシン溶液 (1 mg/mL) を加え攪拌し、溶媒を窒素気流下で蒸発させることによりフィルムを作製した。このフィルムに蒸留水4.0 mLを加えて超音波照射を行い、遠心分離により沈殿物を取り除いた。上清をフィルターで精製し、血中濃度測定の場合は0.9 wt%になるようNaClを加えた。有機溶媒としては従来用いていたクロロフォルムに加えて、新たにトリフルオロエタノール (TFE) を用いた。

ミセルの粒径はdynamic light scattering (DLS) で、水溶液中で行った。グラフにはcumulantの値を示した。血中濃度測定には、ddYマウス (雄性、4-5週齢) にCPTミセル (2.5 mg/kg) を尾静脈内投与後、4時間における血漿中濃度をHPLCにより測定した。

(2) ビオチン修飾ブロックコポリマーの合成

成果項目の (6) の高分子ミセルキャリアーによる病理解析のため、親水部の末端にビオチン基を導入したビオチン-ポリエチレングリコール-ポリ (ベンジル L-アスパルテート) を作製した。このビオチン修飾ブロックコポリマーをミセル化することで、高分子ミセルの腫瘍組織内での局在部位や集積挙動をビオチン-アビジン相互作用を用いた抗体染色法により評価することが可能となる。

本研究では、図3に示すように鎖長の長いポリエチレングリコール (PEG) にビオチンを導入したブロックコポリマーと、鎖長の短いPEGを持つ未修飾のブロックコポリマーを混合することで、ビオチン修飾高分子ミセルを作製する。このPEG鎖長の違いを利用することで、高分子ミセル表面にビオチンをアンテナのように

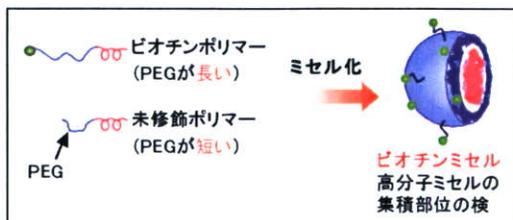


図3 ビオチンミセルの設計

露出させることで、ビオチンの検出感度の向上を目指した研究を行った。

本研究では、ビオチン基をブロックコポリマーに導入するため、PEGにビオチン基を結合し、アスパラギン酸ベンジルを導入する合成経路を取った。

ビオチンの修飾に使用するPEGは、ビオチン検出に関する鎖長の影響を調査するため、分子量5,000 (PEG₅) と12,000

(PEG₁₂) の2種を使用した。合成スキームを図4に示す。N末端を保護したCHO-PEG-Fmocに、biotin hydrazideを加えることで、シッフ塩基を形成した。そのシッフ塩基の還元によりPEG末端にビオチン基を導入した。ビオチン導入量は¹H-NMRおよびビオチン-アビジン相互作用を利用したUV測定法により評価した。

Fmocの脱保護後、β-benzyl L-aspartate N-carboxy anhydride の開環重合によりBiotin-PEG-poly(β-benzyl L-aspartate)を得た。この後は、図2に示したものと同一合成経路によって、ベンジル基の加水分解をした後に、ベンジル基を90%程度導入し、Biotin-PEG-P(Asp(Bzl))を合成した。

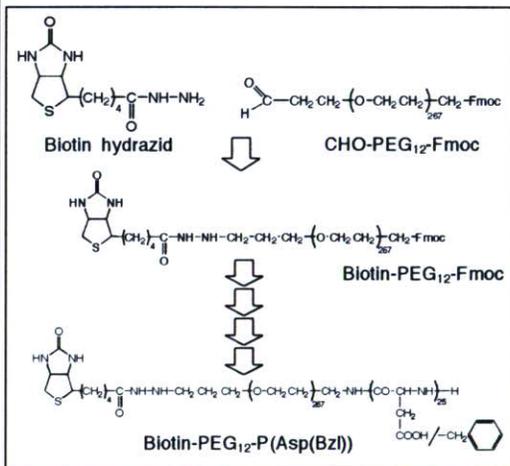


図4 ビオチン修飾ブロックコポリマーの合成スキーム

(3) 腫瘍血管破断薬AC7700と高分子ミセルの併用効果

AC7700毒性評価

Balb/c ノードマウス（雌性）に対し腫瘍血管破断薬AC7700の生理食塩水溶液を尾静脈内に5 mg/kg（一匹）、10 mg/kg（二匹）、20 mg/kg（二匹）、40 mg/kg（二匹）、もしくは80 mg/kg（三匹）、一回投与し、体重変化と生死を投与1週間程度測定した。

（アドリアマイシン封入高分子ミセル）作製は既報に従って行った。M. Yokoyama, et al., J. Drug Targeting, 7, 171-186 (1999) 前項に記述したPEG-P(Asp)ブロックコポリマーのアスパラギン酸残基に抗がん剤アドリアマイシン(ADR)を化学結合させ、ポリアスパラギン酸鎖が疎水的になることによって高分子ミセル構造を形成する。このミセル内核に同じくアドリアマイシンを物理的に封入したものである。ミセルの組成はポリエチレングリコールの分子量が12,000、その他の組成は表1にまとめた通りである。

表1 アドリアマイシン高分子ミセルの組成

Run	Asp ユニット数	ADR結合率 ¹⁾	ADRの割合 物理吸着ADR 化学結合ADR
1	22	68%	28 mol%
2	19	63%	39 mol%

1) Asp残基に対して

In vivo抗がん活性評価

Balb/c ノードマウス（雌性、7週齢）の腹側部左右に44As3（ヒトスキルス胃がん）を皮下移植し、腫瘍径が約5mmになるまで成長させた。このマウスにAC7700 and/or アドリアマイシン封入高分子ミセルを静脈注射した。その後の、マウスの体重と腫瘍体積を測定した。腫瘍体積(V)は $V=a \times b^2/2$ 、a=長径、b=短径で求めた。

(4) レチノイド封入高分子ミセルの作製

ブロックコポリマー

ミセル化に使用したブロックコポリマーは前項のカンプトテシン封入ミセルに用いたものと同系列のものである。但し、疎水性のエステルをベンジル基のみではなく、脂肪族エステルも用いた。詳しい組成は結果の項に記す。

レチノイド

今回の封入試験で検討対象としたレチノイドはAm80ならびにLE540である。その化学構造を図5に示す。

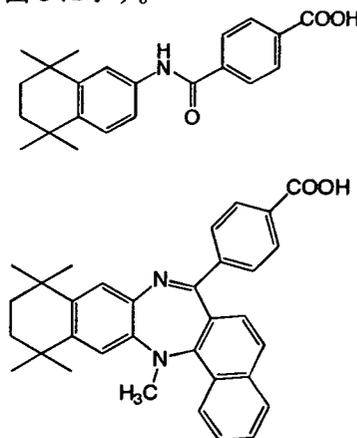


図5 レチノイドの化学構造
Am80(上)とLE540(下)。

高分子ミセルへの封入

レチノイドのミセル封入は下記の2方法により行った。

- 1) エバポレーション法：レチノイドとブロックコポリマーを揮発性有機溶媒に溶解し、溶媒を蒸発させてフィルムを調製した後、蒸留水を加えて超音波照射することにより高分子ミセルを得た。
- 2) 透析法：レチノイドとブロックコポリマーを水溶性有機溶媒に溶解し、水に対して透析処理することにより高分子ミセルを得た。これらのミセル化処理の後、遠心分離および濾過により不溶成分を除去した溶液を評価試験で使用した。

ミセルに封入されたレチノイドは紫外可視吸光法または逆相HPLC法で定量した（吸収波長はAm80；290 nm、LE540；356 nm）。ミセル粒子径は動的光散乱法により測定した。また、レチノイドの封入安定性は透析法またはGPC法により評価した。下記に方法の概略を述べる。

- 1) 透析法：レチノイド封入ミセル溶液を透析チューブ中に入れ、水に対して透析処理を行った。外部透析液中のレチノイド濃度を逆相HPLC法により定量し、ミセルからのレチノイドの放出挙動を評価した。

2) GPC法：TSK-gel G4000PWXLカラムを使用し、示差屈折 (RI) によりミセル成分を、紫外吸光 (UV) によりレチノイド成分を検出した。また、カラムを取り外して測定を行うことにより、カラム内でのミセルならびにレチノイドの損失量を評価した。

(5) 高分子ミセルMRI造影剤

MRI造影剤用高分子の合成

MRI造影剤(Gd-DOTA)を有するブロックコポリマーを合成した。その構造はポリエチレングリコール-ポリリシン(PEG-P(Lys))からなるブロックコポリマーであり、Gdイオンのキレート化剤であるDOTA基をリシン側鎖に直接結合することによって効率的にキレート基を導入することができる。合成されたMRI造影用的高分子は図6に示すように、DOTA基の導入率によってブロックコポリマーの荷電を正電荷(図6(A))と負電荷(図6(B))に制御することができる。

高分子ミセルの作製

高分子ミセルの作製は、ブロックコポリマー中の荷電に対し、対となるポリイオンを混合して調整した。すなわち、カチオン性ブロックコポリマーにはポリアニオンを、アニオン性ブロックコポリマーにはポリカチオンをそれぞれ加え、互いの静電相互作用を利用して高分子ミセルを作製した。

ポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸(PEG-P(Asp))に疎水性基であるベンジル基(Bzl)を種々の割合で導入したPEG-P(Asp-Bzl)をポリアニオンとして用いた。カチオン性ブロックコポリマーとこの合成したPEG-P(Asp-Bzl)を有機溶媒中に溶解させ、水に対して透析を行うことによって高分子ミセルを作製した。作製した高分子ミセルは、*in vitro*において高分子ミセル作製前の緩和能測定の結果とその差を比較した。

また作製した高分子ミセルの粒径を動的散乱測定によって行った。

一方で、アニオン性ブロックコポリマーはそれ自身単独で高分子ミセルを形成することを見だし、その*in vivo*における投与後の血中濃度、MRIにおける画像強度を測った。

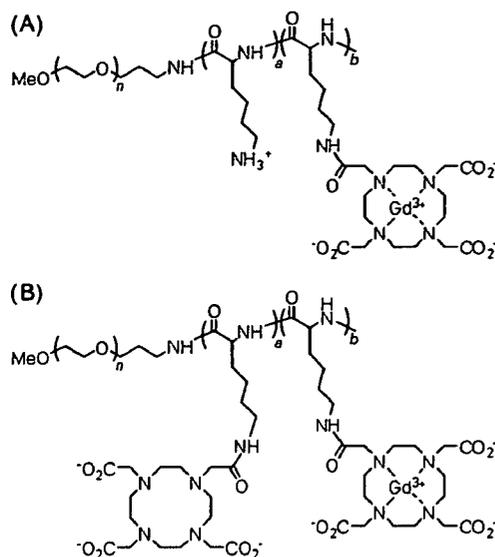


図6 MRI造影剤用高分子の構造
(A)カチオン性ブロックコポリマー、
(B)アニオン性ブロックコポリマー

T1緩和能測定

MRIの画像強調能(T_1 短縮能= R_1)を表すパラメーターとして以下の式に示される R_1 を9.4T (Varian Inova400)の磁場のもと求めた。

$$(1/T_1)_{obs} = (1/T_1)_t + R_1 \cdot [Gd]$$

R_1 が大きいく程、 T_1 強調能力が高いこととなる。本研究ではブロックコポリマーの際にこの緩和能が高く、高分子ミセルの形成によって低くなることによってがん選択的に造影効果を有するMRI造影剤となる。

MRI画像取得

MRIの画像評価はマウスへMRI造影剤を0.05mmol Gd/kg静脈内投与し、その後、時間ごとのMRIを取得して評価を行った。MRIの測定は9.4Tの磁場のもと、グラディエントエコー法を用いて T_1 強調画像を取得した。

C. 研究結果

(1) カンプトテシン封入し高分子ミセルの作製

CPT内包ミセル作製時に、CPTの2,2,2-trifluoroethanol (TFE)溶液を添加することにより、クロロフォルムを溶媒として封入した従来法に比べて、粒径の小さな粒子を得ることができた。図7に結果を示す。

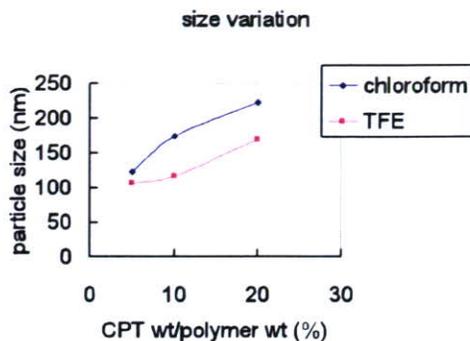


図7 封入溶媒による平均粒径の違い (Cumulant平均にて示す)

封入時における薬物/高分子の重量比 (CPT/polymer) が5-20%の間で、TFEを使用した場合のミセルの粒径が100-170 nmであるのに対し、chloroform使用の場合は120-220 nmとなっている。前年度までの検討により、クロロフォルムを溶媒として封入した場合には、CPT/polymer比が5%~40%の間で血液循環性が変化しないことがわかってきている。図8には静脈内投与後4時間での血液中循環量を比べたものである。

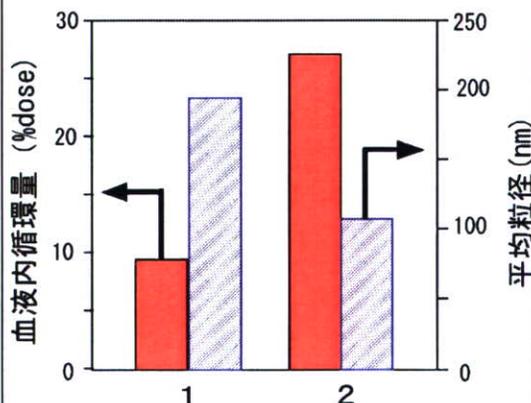


図8 静脈等予後の血中濃度測定
1: クロロフォルムの場合 (40% CPT)
2: TFEの場合 (10% CPT)

クロロフォルム用いて作製したCPT内包ミセルでは、4時間後の血中循環量は投与量の約10%であったが、TFEを用いて封入したものは27%と高い循環量を示した。EPR効果による固形がんへのパッシブターゲティングでは高い血液循環性が必要条件である。

以上の結果は、高分子ミセルの組成 (ブロックコポリマーの構造および薬物/ポリマーの比) が同一でも封入条件によって、ミセル粒径及び血液循環性を制御できることを示したものである。今回は特に、封入時に用いる有機溶媒の種類という単純な因子が大きく影響することがわかったのは基礎応用両面への意義は大きい。

(2) ビオチン修飾ブロックコポリマーの合成

従来の合成法は、CHO-PEG-P(Asp)へbiotin hydrazideを導入する方法をとった。この手法は、合成ステップが少なく済む一方、ビオチン基の導入の際、アスパラギン酸のカルボン酸がPEG末端のアルデヒドと競争してしまう。そのため、反応効率も低く、大量のbiotin hydrazideを必要とした。このため、反応効率の向上と導入部位の明確化を目指し、ビオチン基をPEGに導入後、アスパラギン酸ベンジルを重合する経路を選択した。

ビオチン基のPEGへの導入量は、¹H-NMRよりPEG₅で91%、PEG₁₂で75%であった。このビオチン修飾PEGにアスパラギン酸ベンジルを開環重合により重合した。このときアスパラギン酸の導入量は、PEG₅で27残基、PEG₁₂で24残基であった。得られたブロックコポリマーを加水分解後、ベンジルアルコールをアスパラギン酸にEDC, NHSを用いて導入した。ベンジル化率は、PEG₅で97%、PEG₁₂で88%であった。

効率の良いビオチン基の検出は、病理学的な観察を行う上で、重要なファクターとなる。そこで、ビオチン基を鎖長の長いPEGに修飾し、高分子ミセル表面にビオチンを露出させることで、ビオチン基を効率良く検出させることが可能となると考えられた。そこで、本研究では図に示した4種類のポリマーを組み合わせることによって、PEGの鎖長とビオチン検出量及び検出効率に関して調査した。

図9に示すブロックコポリマーを用いた。

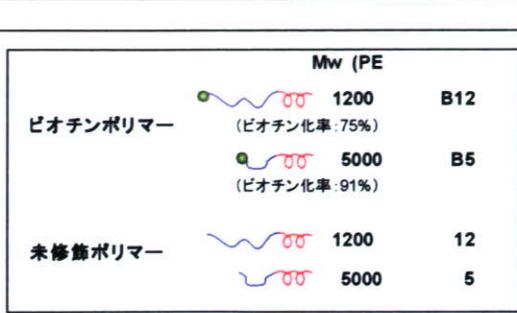


図9 ビオチンミセル作製に使用したブロックポリマー

長いPEG鎖にビオチン基を導入したB12とPEG鎖長の短い未修飾ポリマー5を、B12の割合が100mol%から0mol%になるまで濃度を変え、ミセルを作製した。このミセル中のビオチン基の量をビオチン検出キットを用いてUVにより検討した。一つのミセルあたりで検出されるビオチン基の割合と、実際にミセルに含まれるビオチン基のうち、どの程度検出に関わっているかを示す指標として、ビオチン基の検出効率を図に示した。ビオチンの検出効率は、PEG₁₂の場合、ビオチン化率が75%であるため、100mol%のビオチンポリマーで形成されるミセルの中には、75%ビオチン基が存在するとして、検出効率を算出した。その結果を図10に示す。

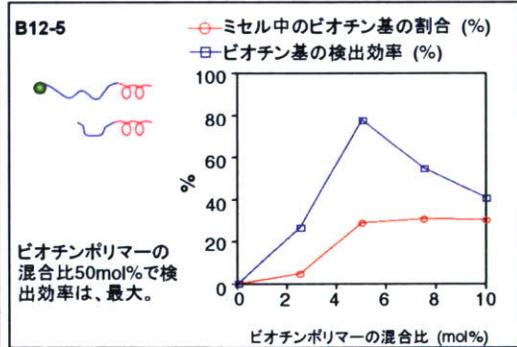


図10 一つのミセルあたりのビオチン基の検出量と、その検出効率

一つのミセルあたりのビオチン基の割合はビオチンポリマーの混合比が100%から50%までまでは、約30%程度であった。一方、検出効率で見ると、ビオチンポリマーが100%の場合で検出効率が40%であるのに対して、混合比が50%の場合、検出

効率は約80%まで向上する。これはビオチン基の検出原理を考慮すると、理解できる。ビオチン基の検出には、サイズが8nm程度のタンパク質であるアビジンが用いられるが、ビオチンとの相互作用はアビジン1分子当たり4点しかない。このため、ミセル表面に過剰にビオチンが存在しても、アビジンに検出されないビオチンも多く存在することになる。このため、ビオチンの検出量は一つのミセル当たり30%程度で飽和状態になると考えられる。

一方、同じ長さのPEGにより形成されたビオチンミセルの場合 (B12-12、B5-5)、混合比が100%の時は、B12-5同様、1ミセル当たり約30%検出されるものの、混合比が低下するにつれて、検出量も低下する。これはB12-5と異なり、一部のビオチン基が同じ長さの未修飾のPEGにより、PEG層に覆い隠されることによって検出障害が起こっていると示唆される。

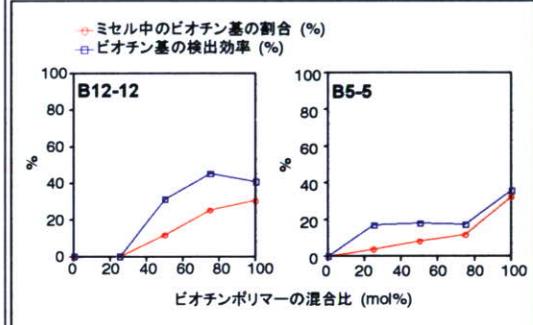


図11 同じ長さのPEGにより形成されたビオチンミセルのビオチン基の検出量と、その検出効率

ビオチン基を親水部末端に導入したbiotin-PEG-P(Asp(Bzl))を合成した。PEGの鎖長が異なるビオチンポリマーを2種類合成 (PEG₅、PEG₁₂) し、これらをビオチン未修飾のPEG-P(Asp(Bzl))と混合し、高分子ミセルを作製した。ビオチンがアンテナのように高分子ミセル表面に露出しているB12-5ミセルでは、効率良くビオチンを検出することができた。

(3) 腫瘍血管破断薬AC7700と高分子ミセルの併用効果

高分子ミセルと腫瘍血管破断薬AC7700との併用効果の解析は、今年度に新たに加わった実験項目である。追加された理由は、後述の分担研究報告の項に述べられているように、ウインドウチャンパー法によるがんへのミセル集積挙動の解析でがんの周辺の変性領域に特に高い濃度で高分子ミセルが集積していることが観察されたことである。

高分子ミセルのがんへの集積機構であるEPR効果では、がんが大きくなるに従って、がんの中心部分よりもがん周辺部に濃度高く集積するようになることは知られていた。これに対して、変性領域は正常部位の一部であり、変性部位に特に高い濃度が集積することは新たな発見である。(もちろん、正常部位に比べてがん部位で高い濃度が集積することは今回のウインドウチャンパー法の実験によっても確かめられている。)一方、腫瘍血管破断薬AC7700は腫瘍選択的に血流を遮断することで抗がん活性を示す薬物であるが、低投与量で用いた場合、可逆的に(時間経過により正常に戻るという意味)がんが接した正常部位に変性領域を生ずる。以上の二つの事柄を結びつけると、「AC7700によって変性部位を形成させて、そこに高分子ミセルを選択的に送達させる」という新しいターゲティング手法が考えられる。

この新しい手法による、送達量の増加及び抗がん活性の増大が得られるかについての、in vivo検討を行った。

AC7700毒性評価

Ac7700を80 mg/kg投与したマウスは3匹中3匹、48時間以内に死亡した。投与の翌日の体重は、80 mg/kgと40 mg/kgの場合が最も減少が激しいが、80 mg/kgが死亡するのに比べ、40 mg/kgでは生存している。その他の投与群(5 mg/kg、10mg/kg、20mg/kg)では図12に示すように、顕著な体重減少は認められなかった。体重の最低値は投与後約24時間後で、体重は2、3日で回復し始める。

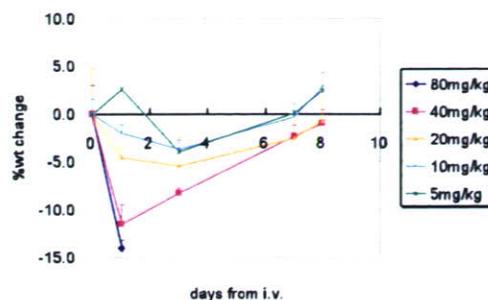


図12 AC7700投与に伴う体重変化(投与日の体重に対して%で示した)

以上の結果から、ADRミセルとAC7700の併用実験においては、AC7700の投与量を40 mg/kg以下にする必要があることが判明した。さらに、併用実験ではAC7700単独投与実験で観察された結果より体重減少などの副作用がより厳しくなる可能性を考え、20 mg/kgを投与することにした。

ADR封入ミセル単独抗がん活性

図13に示すように、ADR封入ミセル投与による体重減少は20 mg/kgの群で、ADRミセル投与5日後あたりで最も顕著(投与日の体重に対して約18%の減少)であったが、数日後には回復した。その他の群では目立った体重減少は認められなかった。

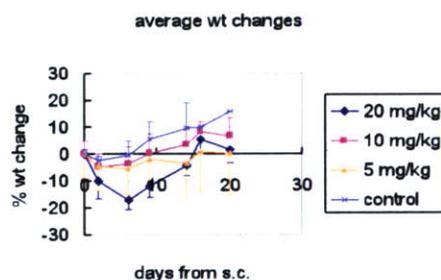


図13 ADRミセル投与に伴う体重変化(投与日の体重に対して%で示した)

腫瘍体積の変化を次頁の図14に示す。腫瘍量の減少は20 mg/kgの群が他の群よりも顕著であったが、ADRミセルを投与した全ての群で、コントロール群よりも腫瘍のサイズが小さかった。

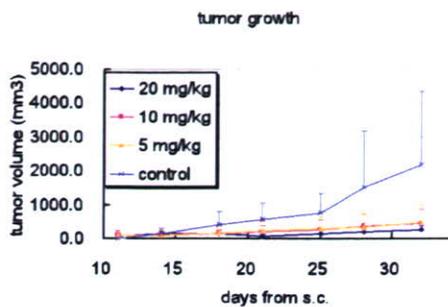


図 1 4 ADRミセル単独での抗がん活性

コントロール群では皮下移植後26日目に1匹死亡したが、ADRミセル投与群では死亡はなかった。

これらの結果より、AC7700/ADRミセル併用実験では、体重減少が少なく、かつ抗がん活性がある程度期待できる10 mg/kgを投与することにした。20 mg/kgでは体重が薬剤投与時と比べ20%近く減少する上、ADRミセル単独での抗がん活性が強いため、AC7700/ADRミセル併用時との比較が難しくなると判断した。

AC7700/ADRミセル併用

以上の検討の結果から、投与量をAC7700を20mg/kg, ADR高分子ミセルを10mg/kg（それぞれ1回投与）に設定した。また、併用による効果を高めるためにはAC7700を投与してから高分子ミセルを投与するまでの間隔は重要な因子であるが、今回は1日のみを検討した。

まず、懸念されたのはAC7700/ADRミセル併用によって、副作用が重篤になることである。AC7700/ADRミセル併用群における体重減少は、図15に示すように、薬剤投与初日の体重と比較しても5%以内に留まった。また他群と比較してもマウスの挙動に、特に目立った点はなかった。体重変化からみた副作用評価では、今回の実験で使用したAC7700 20 mg/kg、ADRミセル 10 mg/kgが安全に実験を行える範囲内であることが分かった。

がん体積の変化の様子を示したのが図16である。また、図17にはday28の実験終了時での、マウスの写真を示す。皮下移植から19日目の腫瘍体積について各種薬物投与群を未処置のコントロールとダネット法で比較したところ、AC7700は $p < 0.05$ 、

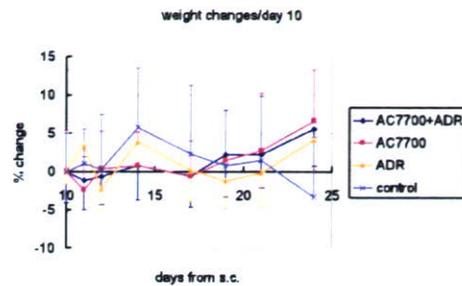


図 1 5 AC7700/ADRミセル投与に伴う体重変化。(AC7700をday 10、ADRミセルをday 11に投与した。)

ADRミセルは $p < 0.01$ 、AC7700/ADRミセル併用群 $p < 0.01$ 、といずれも有意な腫瘍成長抑制効果が得られた。しかし、多重比較によるこれらの治療群間の有意差は見いだされなかったが、併用群の平均体積が最も小さかった。今後は項目(5)のMRIによる解析等を参考にし、両薬剤の投与間隔等の最適化によって併用効果を得ることが課題となる。

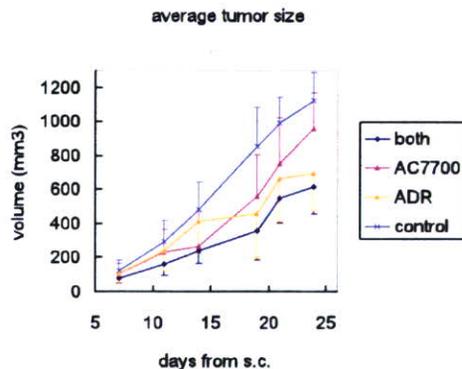


図 1 6 腫瘍体積変化

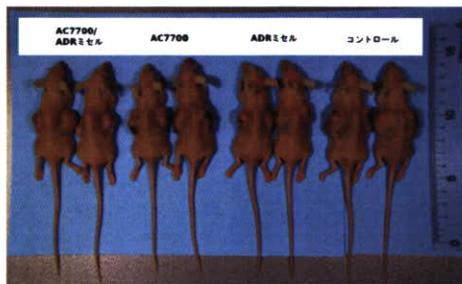


図 1 7 Day 28のマウスの全身像

今回用いたがんモデルは、HSC-44PEヒトスキルス胃がん症例(linitis plastica-type)における、胸水から採取した細胞から樹立された株である。44As3はこのHSC-44PEをparentとする細胞株で、マウスで同所移植を行うと高頻度で腹水を形成し、ヒトスキルス胃がんに似た特徴を示す。

(Cancer Sci 2005, 96, 323-332. Cancer Sci 2004, 95, 575-582.) 今回使用した細胞は、ルシフェラーゼを発現しているため、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光で腫瘍量を測定することが可能である。ただし今回の実験では腫瘍の外径を計測しており、発光による腫瘍量測定は今後の課題となる。

(4) レチノイド封入し高分子ミセルの作製

今回用いたブロックコポリマー組成を表2にまとめる。

表2 ミセル封入に使用したポリマー

Run	構造
1	5-24 PEG-P(Asp(Bzl 80%))
2	5-24 PEG-P(Asp(Bzl 53%))
3	5-52 PEG-P(Asp(Bzl 70%))
4	12-23 PEG-P(Asp(Bzl 61%))
5	5-22 PEG-P(Asp(C11 68%))
6	5-23 PEG-P(Asp(C4 67%))
7	5-21 PEG-P(Glu(Bzl 74%))
8	PEG-PLA (5.3/3.1-kDa)

Am80の回収率 (Am80の仕込量に対するミセル溶液中の比率) を表3に示した。このとき、Am80の仕込量は一部の系を除きポリマーに対して10 wt%である。表3から透析法の方がエバポレーション法よりも多種類のポリマーで良好な封入率が得られていることがわかる。しかし、50%以上の封入率が得られた、系については、封入方法による粒子径への影響は認められなかった。Am80封入ミセルを5-24PEG-P(Asp(Bzl)) 2種のポリマーで調製した場合、室温静置数日以内に白色の沈降物が観察された。Am80封入ミセル溶液を長期保管する場合は凍結することが望ましい。なお、この沈降現象はAm80仕込量が10%を超えたとき、ならびにベンジル修飾率が高い場合に生じやすい傾向が確認された。

表3 Am80封入におけるAm80回収率およびミセル粒子径

ポリマ ー	エバポレーション法		透析法	
	Am80 回収率 (%)	粒子径 (nm) *	Am80 回収率 (%)	粒子径 (nm) *
1**	67	21	85	21
2**	50	17	78	23
3	9	148	55	154
4	1	34	82	44
5	105	121	86	142
6	100	29	93	25
7	-***	148	25	201
8	19	-***	18	34

* Cumulant diameter. ** エバポレーション法のとときAm80仕込量は5 wt%. *** 測定していない。

透析法によるAm80のミセルからの放出試験の結果を図18に示した。ミセル化に使用したポリマーは5-24PEG-P(Asp(Bzl 76%))、ミセル溶液中のポリマーとAm80の濃度はそれぞれ1.0および0.83 mg/mLである。透析1週間後の放出率は約30%であり、Am80は水中では緩やかに放出される。

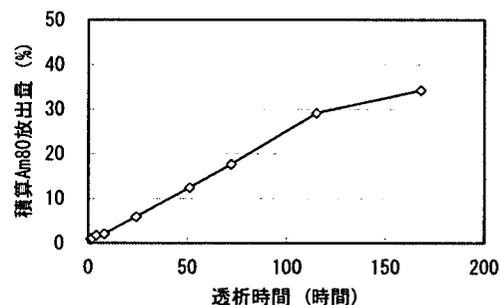
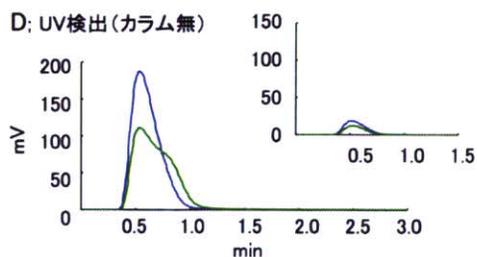
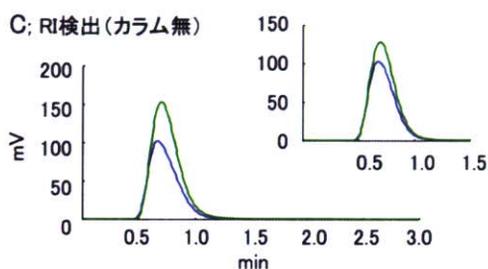
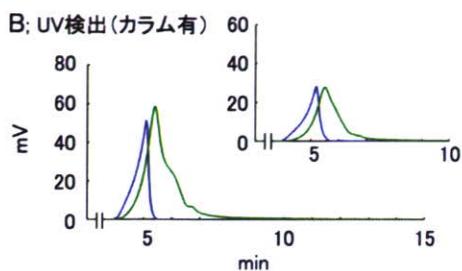
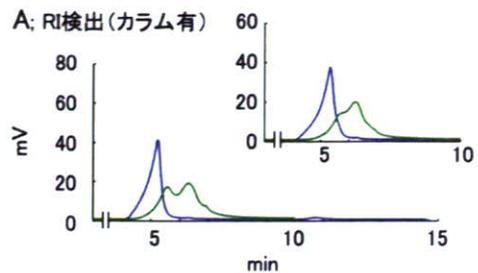


図18 透析法によるAm80放出性評価

この試験中にミセル溶液の凝集は観察されていない。一方、京都大学におけるin vivo試験では、上記と同様の組成からなるミセルではAm80の血中滞留性の向上を確認できなかった。In vitroとin vivoにおける放出条件の差異を埋める評価系が求められる。

GPC法によるAm80封入ミセルの測定結果を図19に示した。挿入図はAm80未封入のミセルの測定結果である。ここではポリマー1および2のミセルについて評価を行っている。



— ポリマー1 — ポリマー2

図19 ポリマー1および2のAm80封入ミセルのGPCクロマトグラム。A-B;カラム装着、C-D;カラム未装着。挿入図は薬剤未封入のミセル未封入のミセル

カラム装着系で5分前後に現れるRIピークがミセル成分である(図19-A)。UV検出ピークが同時間帯で認められるとAm80がミセルに封入された状態にあるといえるが、Am80未封入のミセルでもUV吸収が無視できない強度で観察された(図19-B挿入図)。この吸収はミセルによるものであり、バックグラウンド吸収と見なされるべきものである。

Am80未封入ミセルのクロマトグラム(図19-A, B挿入図)のUVとRIのピーク面積比(UV/RI)を取ると、これが単位ミセル濃度あたりのバックグラウンド吸収として扱うことができる(表4)。Am80封入ミセルのクロマトグラム(図19-A, B)のUV/RIはポリマー1と2のいずれについても未封入ミセルよりも高い数値を示しており、Am80がミセルに封入されていることが示された。

表4 Am80封入ミセルのGPC分析結果。

ポリマー	カラム	Am80	UV面積*	RI面積*	UV/RI
1	+	+	1.6	1.3	1.2
2	+	+	3.5	1.6	2.2
1	+	-	1.0	1.3	0.8
2	+	-	1.6	1.3	1.2
1	-	+	6.6	1.7	3.8
2	-	+	5.3	2.6	2.1
1	-	-	5.4	1.6	0.3
2	-	-	3.5	2.0	0.2

* 単位はmV·sec (10³)。

表5 カラム内でのミセルおよび薬剤の損失率。

ポリマー	薬剤	UV面積減少率 (%)	RI面積減少率 (%)
1	Am80	75	24
2	Am80	34	38
1	LE540	91	38
2	LE540	63	29

一方、カラムを装着していない系の測定結果(図19-C, D)と比較することでカラム内吸着によるミセルの損失量を評価できる(表5)。興味深いことにポリマー1のAm80封入ミセルは、RIピーク面積の減少率、すなわちカラム内でのミセルの損失が24%であるのに対し、UVピーク面積の減少率、すなわちAm80の損失は75%に上った。詳細な機構は不明であるが、カラム内でAm80がミセルから放出されていると推察される。ポリマー2についてはRIとUVのピーク面積減少率はそれぞれ62および66%であり、ポリマー1よりも良好なAm80の保持性能を示した。

この薬剤とミセルの損失率が一致しない現象はLE540封入ミセルについても示された。また、LE540の保持に対してもポリマー2がポリマー1よりも優れていた(表5)。

以上の結果は、GPC解析を詳細に行うことでポリマー種による薬剤保持性能の評価が可能であることを示唆している。

(5) 高分子ミセルMRI造影剤

MRI造影剤用高分子の合成

分子量5000のポリエチレングリコールを用いて、以下に示すPEG-ポリリシン(PEG-P(Lys))ブロックコポリマーを得た。リシンのユニット数は20前後の短いユニット数から65と長いリシンユニットを有するPEG-P(Lys)を合成した。またDOTA基は安定な錯形成能を有しており、ポリマーに結合したDOTA基に配位したGdイオンは安定な錯体構造を有している。本研究ではGdイオンがDOTA基のみに配位され、それ単独では毒性を示すGdイオンが漏れることのない安定なGd錯体を有する構造の明確なMRI造影剤用高分子の合成に成功した。

このPEG-P(Lys)システムでは任意の割合でDOTA基、Gd数を導入することが可能である特長を有する。

表6 合成したポリマーの種類

Run	リシン /ユニット 数	DOTA /導入数	Gdイオン /導入数
1	23	9	7
2	72	12	12
3	17	17	7

高分子ミセルの作製と緩和能

合成したカチオン性ブロックコポリマー(表7 run2)とポリアニオンとして種々のベンジル導入率を有するPEG-P(Asp-Bzl)を透析法によって高分子ミセルを作製したところ、アスパラギン酸鎖のユニット数が22及び44のどちらの場合を用いても表7に示したように、疎水性基であるベンジル基の導入率が低い場合と、逆に高導入率の場合に高分子ミセルの緩和能が下がる傾向が得られた。ベンジル基の導入率が高くポリアニオンの疎水性が高い場合はポリアニオンの疎水性が高分子ミセルの形成に大きく寄与していると考えられる。MRI造影剤となるGdイオンがポリアニオンの疎水性相互作用によって形成される高分子ミセル内殻に同時に内包され、その内殻にあるGdイオンが周囲の水との相互作用を妨げられたためと考えられる。

表7 高分子ミセルの作製と緩和能

Run	アスパラギン 酸 /ユニット数	ベンジル化 率 /%	緩和能 /mM ⁻¹ s ⁻¹
1	22	26	4.8
2	22	41	5.4
3	22	79	4.6
4	44	28	5.1
5	44	45	5.4
6	44	83	4.8

ブロックコポリマーの緩和能 $R_1=5.5\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$

一方で、低いベンジル化率のポリアニオンを用いたときに緩和能が下がったことは、高分子ミセルを形成する際の対イオン同士の強いイオン相互作用の影響が大きい。このイオン相互作用によって2つの高分子鎖がイオン結合で凝集し、かつ疎水性基であるベンジル基があることにより高分子ミセル内殻が形成しやすくなったためと考えられる。

これら2つの事柄から、緩和能の減少にはイオン相互作用と疎水性相互作用がともに必要であることが分かり、この指針に基づくことによりさらなる緩和能の減少が見込まれる。

アニオン性ブロックコポリマー(表6 run3)は、ポリアリルアミン(分子量15,000)を対となるポリカチオンとして用いて高分子ミセルを形成した。作製した高分子ミセルの緩和能は図20に示すように、ブロックコポリマーの緩和能が6.2であったのに

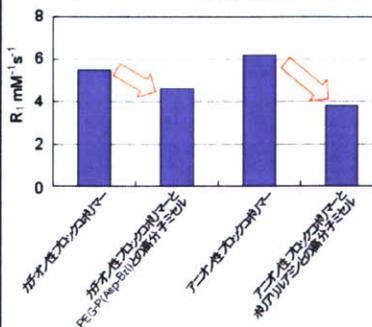


図20 高分子ミセル形成前後の緩和能の変化

対して、その高分子ミセルの形成に伴い3.8まで減少した。このことは、ポリアリルアミンのようなカチオン密度が高くイオン

相互作用によって疎水的環境をつくることのできる高分子を用いたため、前述した場合と同様にGdイオンが疎水的環境に置かれ、水との相互作用をとれなくなったためと考えられる。この調整した高分子ミセル溶液のMRIファントム画像は、図21に示すように、Gdイオン濃度0.25mMにおいて、ブロックコポリマーが強い（白い）画像強度を示すのに対して、高分子ミセルにすることでGd-DTPAと同程度の弱い（灰色～黒）画像強度になっていることが確認された。



図21 MRI ファントム画像 (左)Gd-DTPA, (中央) ブロックコポリマー, (右)高分子ミセル(ブロックコポリマー+ポリアリルアミン). Gdイオン濃度=0.25mM.

これらのイオン相互作用を用いた高分子ミセルの形成とその緩和能減少の結果は、本研究の目的である微小ながん組織を検出するMRI造影剤となることを*in vitro*において示すものである。すなわち、血液循環中の高分子ミセル形成時には緩和能が低く、MRIにおける造影効果が抑えられ、固形がん組織にMRI造影剤が集積した後にブロックコポリマーへと解離することによって固形がんにおいて造影効果を発揮する新しい形のMRI造影剤となる。

以上のようにカチオン性、アニオン性ブロックコポリマーともに*in vitro*において緩和能変化を得た。その変化は疎水性の効果とイオン相互作用を制御することによって緩和能の変化を大きくすることができると思われ、今後さらなる緩和能変化が見込まれる。

高分子ミセル型MRI造影剤の*in vivo*評価

作製した高分子ミセル型MRI造影剤の*in vivo*における挙動を検討した。カチオン性ブロックコポリマーとポリアニオンとしてデキストラン硫酸を用いた高分子ミセルをマウス尾静脈より0.05mmol Gd/kg投与し、その血中濃度変化を追った。

その結果、低分子化合物であるGd-DTPAよりも血中滞留性の延長が認められた。また、このカチオン性ポリマー単独においてマウスへの急性毒性が観察されたが、高分子ミセル化することで、急性毒性は観察されず、毒性が軽減されることも確認された(図22)。

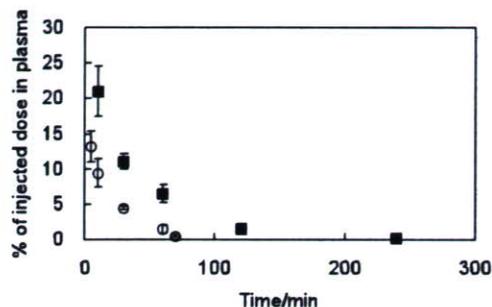


図22 MRI造影剤の血中濃度変化 (■)高分子ミセル(カチオン性ブロックコポリマー+デキストラン硫酸)、(○)Gd-DTPA

一方、アニオン性ブロックコポリマーがポリマー単独で高分子ミセルを形成することを本研究では見だし、その血中滞留性は24時間後において20%以上残存する高い血中安定性を示した(図23)。

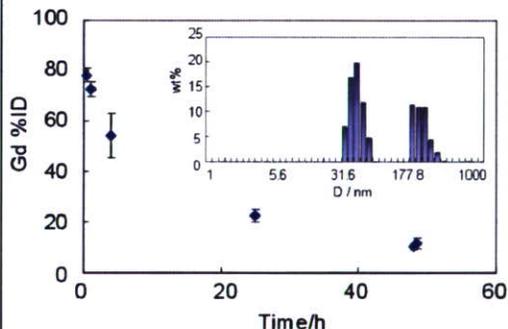


図23 アニオン型高分子ミセルMRI造影剤の血中濃度変化と粒子サイズ

この挙動はポリリシン側鎖のアミノ基を完全にDOTA基で置換したポリマーから作製される高分子ミセルにより起こり、PEG-P(Lys)の効率的な合成スキームによって得られた結果であるといえる。

アニオン性ブロックコポリマーから得られた血中滞留性のよい高分子ミセル型MRI造影剤を用いて固形がん(C26)への集積性をみると、24時間後において~8%IDの高分子ミセルの集積が確認され、それと同時に腫瘍部位で取得されたMRIも24時間後に画像強度が最大になることを確認した(図24)。

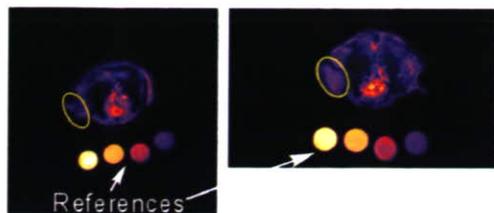


図24 アニオン型高分子ミセルMRI造影剤投与24時間後の腫瘍の画像強度の変化

高分子ミセルをキャリアとしてMRI造影剤を運ぶこの高分子ミセル型MRI造影剤の場合は、治療薬（抗がん剤）の挙動を種々の分析装置で観察する（抗がん剤＋高分子ミセル）のシステムとは異なり、キャリアとしての高分子ミセルの挙動を観察していることになる。よって、本研究で得られる高分子ミセル型MRI造影剤の挙動をMRIで観察することは（抗がん剤＋高分子ミセル）の挙動を生々の状態で観察できることになる。このことは、治療薬（抗がん剤）を高分子ミセルによってデリバリーする本研究において、抗がん剤到達量の予測や、高分子ミセルの位置情報など極めて重要な情報を与えることになる。

D. 考察

(1) カンプトテシン封入し高分子ミセルの作製

得られた結果からは、高分子ミセルへの薬物封入の溶媒の効果が極めて大きいことがわかった。一つの仮定として、溶媒蒸発時の薬物分子の結晶化の大小が封入の正否に関連していると予想される。次年度は、封入されたカンプトテシン分子の結晶化をAFMや蛍光変更解消などの方法により、比較することが有力な方法と考えられる。

(2) ビオチン修飾ブロックコポリマーの合成

従来の合成法に比べてアビジンに認識されやすい設計の高分子ミセルを作製した。これを利用して、がん組織内、血管内の高分子ミセルの分布をさらに精密に追跡することが可能となると考えられる。

(3) 腫瘍血管破断薬AC7700と高分子ミセルの併用効果

両者の併用によって、格段に副作用が増強することはない事がわかったので、

投与スケジュールの最適化によって、平ターゲティング効果及び抗がん活性の増強が期待される。また、MRI実験とオーバーラップさせることによって、現象の解析の精度を高めることが可能になると予想される。

(4) レチノイド封入し高分子ミセルの作製

Am80およびLE540のミセルへの封入挙動はともに良好であった。長期安定性および血中安定性の向上については特にAm80について検討する必要がある。ポリマー種と薬剤保持性能の関係についてはGPC解析が有力な方法になり得ると期待される。

(5) 高分子ミセルMRI造影剤

平成19年度はブロックコポリマーの組成と対となるポリマーの組成を変化させることで、その緩和能と高分子ミセル形成について系統的に理解することができた。中でも、イオン相互作用と疎水性の関係性を新たに見だし、これらの性質を十分に活かすことが緩和能の変化を大きくするために必要であり、この点に重点を絞って行うことで更なる変化が見込まれる。

またアニオン性ブロックコポリマーから作製した高分子ミセル型MRI造影剤はよい血中滞留性を示し、24時間後において腫瘍への高分子ミセルの集積性とMRIの腫瘍における画像強度がそれぞれ最大となることが確認された。この高分子ミセル型MRI造影剤の挙動は合成高分子の精密な組成の制御に基づいて得られた結果である。このことは合成高分子の組成を変化させることによって、高分子ミセルの集積性、血中半減期を制御できる技術となることを示している。

F. 結論

薬物やMRI造影剤成分を封入した高分子ミセルの作製が滞りなく進展した。また、新しいがんへのターゲティング方法が提起され、この点についても次年度にMRI、体内分布解析、抗がん活性評価の多様な方法を組み合わせて解明を進めてゆく。

G. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Murakami, M. Yokoyama, T. Okano, H. Nishida, Y. Tomizawa, M. Endo and H. Kurosawa, A novel synthetic tissue-adhesive hydrogel using a crosslinkable polymeric micelle, *Journal of Biomedical Materials Research*: 80 A, 421- 427 (2007)
- 2) Narin Chansri, Shigeru Kawakami, Masayuki Yokoyama, Tatsuhiro Yamamoto, Pensri Charoensit, and Mitsuru Hashida, Anti-tumor Effect of All-*Trans* Retinoic Acid Loaded Polymeric Micelles in Solid Tumor Bearing Mice, *Pharmaceutical Research*, **Accepted**
- 3) Tatsuhiro Yamamoto, Masayuki Yokoyama, Praneet Opanasopit, Akihiro Hayama, Kumi Kawano, Yoshie Maitani, What are determining factors for stable drug incorporation into polymeric micelle carriers? Consideration on physical and chemical characters of the micelle inner core, *J. Controlled Release*, 123, 11- 18 (2007)
- 4) Akihiro Hayama, Tatsuhiro Yamamoto, Masayuki Yokoyama, Kumi Kawano, Yoshiyuki Hattori, Yoshie Maitani, Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro, *J. Nanoscience and Nanotechnology*, **Accepted**
- 5) M. Nakayama, J.E. Chung, T. Miyazaki, M. Yokoyama, K. Sakai, and T. Okano, Thermal modulation of intracellular drug distribution using thermoresponsive polymeric micelles, *Reactive & Functional Polymers*, 67, 1398- 1407 (2007)
- 6) Tomoyuki Okuda, Shigeru kawakami, Masayuki Yokoyama, Tatsuhiro Yamamoto, Fumiyoshi Yamashita, and Mitsuru Hashida, Block copolymer design for stable encapsulation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide into polymeric micelles in mice, *International J. of Pharmaceutics (Note)*, **Accepted**,

- 7) Tomoyuki Okuda, Shigeru kawakami, Yuriko Higuchi, Taku Satoh, Yoshimi Oka, Masayuki Yokoyama, and Mitsuru Hashida, Enhanced antitumor activity of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide by polymeric micelles following intravenous injection into tumor-bearing mice, *Cancer Science*, **Accepted**,

<総説・解説>

- 1) 横山昌幸 映像情報Medical 39 (4)、398-404 (2007) 特集1 分子イメージング: MRIからのアプローチ「薬物ターゲティングとMRI造影剤」
- 2) Masayuki Yokoyama, *American Scientific Publishers*, 63-72(2007) *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*, Chapter 2 "Polymeric Micelles as Nanosized Drug Carrier Systems"
- 3) 横山昌幸 月刊 マテリアルインテグレーション 20 (9) 38-43 TIC欄、特集 バイオ関連材料と技術の最近の話題、DDS (ドラッグデリバリーシステム)
- 4) 横山昌幸 製剤と機械 第332号 製剤技術 2-4 (2007. 4. 15) 高分子ミセルの薬物キャリアーシステムとしての可能性 (1)
- 5) 横山昌幸 製剤と機械 第333号 製剤技術 2-4 (2007. 5. 15) 高分子ミセルの薬物キャリアーシステムとしての可能性 (2)
- 6) 横山昌幸 炎症と免疫 16 (1) 21-26、高分子ミセルターゲティング、特集 I 先端医療を切り拓くナノメディン株式会社 先端医学社
- 7) 白石貢一、横山昌幸 *Drug Delivery System* 23(1) 33-39 2008 ターゲティングを用いたMRI造影剤
- 8) 横山昌幸、高分子ミセルを用いたナノメディン、宇理須恒雄編「ナノメディン: ナノテクの医療応用」オーム社、102-118、2008

2. 学会発表

- 1) 横山昌幸第46回日本生体医工学大会 2007. 4. 27、高分子会合体を利用したがん診断と治療

- 2) 奥田知将、川上茂、山本竜広、横山昌幸、山下富義、橋田充、日本薬剤学会第22年会、2007.54-HPR封入ポリマーミセル製剤による新規癌治療への応用展開
- 3) 山本竜広、横山昌幸、羽山明宏、川野久美、米谷芳枝、第56回高分子学会年次大会、2007.5.29、薬物封入状態に対する高分子ミセル内核主鎖構造の影響
- 4) 白石貢一、横山昌幸、第23回日本DDS学会、2007.6.15、PEG-PLLからなるMRI造影剤の高分子ミセル形成
- 5) Masayuki Yokoyama, 2007 Asian-Pacific Advanced Drug Delivery Symposium, 2007.6.29, Polymeric micelles as drug targeting vehicles
- 6) 白石貢一、横山昌幸、第2回日本分子イメージング学会総会、2007.6.28-29、Gd-DOTAを内核に有する高分子ミセルの作製と緩和能
- 7) Masamichi Nishihara, Yoshihiko Mukrakami, Masayuki Yokoyama, The 34th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2007.7.10~11, Synthesis of novel liquid crystalline block copolymer for effective encapsulation of drugs
- 8) Koichi Shiraishi, Masayuki Yokoyama, The 34th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2007.7.10~11, PEG Based Block Copolymers as MRI Contrast Agent, their longitudinal Relaxivity and Micelle Formation
- 9) Tatsuhiro Yamamoto, Masayuki Yokoyama, Akihiro Hayama, Kumi Kawano, and Yoshie Maitani The 34th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2007.7.10, Incorporation Behavior of Camptothecin into Polymeric Micelles in Various Isomerization Ratios and Hydrophobic Group Contents of Inner Block
- 10) 西原正通、村上義彦、横山昌幸、第36回医用高分子シンポジウム、2007.7.31、薬物封入向上を志向した新規液晶性ブロックコポリマーの合成
- 11) 山本竜広、横山昌幸、羽山明宏、川野久美、米谷芳枝、第3回日本医科大学・題目：カンプトテシン封入高分子ミセルにおける疎水性内核構造の最適化

- 12) Koichi Shiraishi, Masayuki Yokoyama, Joint Molecular Imaging Conference, 2007.9.8~11, PEG-PLL Based MRI Contrast Agent Preparation of Polymeric Micelles, and Relaxivity
- 13) 勢子祐貴、羽山明宏、山本竜広、横山昌幸、小野瀬絵理、川野久美、服部善之、米谷芳枝、第51回日本薬学会関東支部大会、2007.10.6、新規葉酸修飾カンプトテシン封入高分子ミセルの体内分布と抗腫瘍効果
- 14) 西原正通、村上義彦、横山昌幸、山本潤、神奈川県ものづくり技術交流会、2007.10.26、薬物封入効率の向上を目指した新規液晶性ブロックコポリマーの合成と薬物封入効率の評価

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

平成19年3月10日に特願2007-61134「高分子ミセル型MRI造影剤」を特許出願。発明者は白石貢一、横山昌幸

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（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

腫瘍選択的薬物送達を目指した葉酸修飾微粒子製剤の開発

分担研究者 米谷芳枝 星薬科大学教授

研究要旨 抗癌剤カンプトテシン封入高分子ミセルの腫瘍選択的な薬物送達を目的として、葉酸修飾リポソームを用いた培養細胞での取り込み解析を行った。この解析により、アクティブターゲティング用高分子ミセルでの望ましい分子設計を明らかにする。

分担研究の一つである高分子ミセルMRI造影剤の研究の結果は、神奈川科学技術アカデミー横山の代表研究報告の項にまとめて記述するので、本項ではもう一つの分担課題であるカンプトテシン封入高分子ミセルのターゲティングについてのみ記す。

A. 研究目的

前年度までに抗がん活性物質カンプトテシン封入高分子ミセルをマウス固形がんにはパッシブターゲティングしてin vivo抗がん活性を高める一方、アクティブターゲティングのために高分子ミセル表面に葉酸を結合させてin vitroにおける葉酸受容体を有する細胞への取り込み促進効果を得た。しかし、ミセル表面の葉酸濃度、葉酸を結合させる高分子鎖の流動性をいかに設計すべきかは不明である。今年度は、表面葉酸密度とその結合部位の流動性が容易に変えられるリポソームを用いた解析を行い高分子ミセルでの葉酸アクティブターゲティングの最適設計方針を得ることを目指した。

葉酸受容体は、卵巣をはじめとする各種上皮癌に過剰発現している膜タンパク質であるが、正常組織での発現は低く限られていることから、癌標的リガンドとして葉酸が利用されている。葉酸をリガンドとして用いる利点は、分子量が小さく、安価であり、化学修飾が容易であることと、葉酸と葉酸受容体の複合体がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることなどがあげられる。

抗癌剤を封入した微粒子製剤は、抗癌剤の非特異的な分布を抑制して副作用

を軽減するとともに、腫瘍血管の特性により微粒子が腫瘍に集積する、いわゆるEPR効果が得られることから、パッシブターゲティングによって、癌化学療法の治療効果を改善することが可能である。さらに、抗癌剤封入微粒子に葉酸のようなリガンド分子を修飾することによって、アクティブターゲティングによる腫瘍選択的な薬物送達を期待される。

これまでに葉酸修飾微粒子による効率的な薬物送達のために、葉酸分子の表面修飾量や、微粒子と葉酸を結合するスペーサーの長さなどが検討され、葉酸受容体による認識性が改善されてきた。しかし、リポソームの脂質組成を検討した報告はほとんどない。そこで本研究では、リン脂質組成の異なる葉酸修飾リポソームによる葉酸ターゲティングについて、細胞内取り込みと抗腫瘍効果の評価から検討を行った。また、表面の葉酸密度を変える検討を行った。以上により、高分子ミセル葉酸アクティブターゲティングシステムでの、望ましい、葉酸密度と結合する高分子鎖の設計法を得ることを目的とした。

B. 研究方法

<リポソームの調製>

リポソームの組成は、リン脂質/コレステロール=55/45(モル比)とし、リン脂質として相転移温度の異なる水素添加大豆由来フォスファチジルコリン(HSPC-L)あるいはジミリスチルフォスファチジルコリン(DMPC-L)を用いた。

リポソームに内包するモデル薬物として、水溶性高分子であるFITC標識デキストラン(FITC-Dex)と、抗癌剤塩酸ミトキサントロン(MITO)を用い、リポソームの粒子径は約130nmに調整した。リポソームへの葉酸修飾は、folate-poly(ethylene glycol) (MW:5000)-distearoylphosphatidylethanolamine (F-PEG-DSPE)を用いた。

<葉酸修飾リポソームの細胞内取り込みの評価>

葉酸受容体が過剰発現しているKB細胞(ヒト咽頭上皮癌細胞株)に、各リポソームを加え2時間インキュベートした。内封したFITC-Dexについて、取り込まれた蛍光量を蛍光光度計やフローサイトメータを用いて測定し、共焦点レーザー顕微鏡によって細胞内取り込みを観察した。

<薬物放出性の評価>

透析膜内にMITO封入リポソームとウシ胎児血清(FBS)を加え、37°Cのリン酸緩衝液(pH 7.4, PBS)に対するMITO放出量を測定した。

<細胞毒性による抗腫瘍効果の評価>

KB細胞に、MITO封入リポソームを加え2時間インキュベートした後、薬物を取り除き、48時間の追加培養を行い、WST-8 assay法を用い細胞生存率を比較・評価した。

C. 研究結果

相転移温度の異なるリン脂質を用いることで、膜流動性の異なるリポソームを得た。HSPC、DMPCのゲル-液晶相転移温度はそれぞれ50-60°C、23°Cであり、ジフェニルヘキサトリエンを蛍光プローブとして用いた蛍光異方性の測定から、DMPC-Lの方が膜流動性が高いことが確認された。

これらのリポソームにF-PEG-DSPEを用いて葉酸修飾し(F/HSPC-L、F/DMPC-L)、KB細胞による取り込みを内封したFITC-Dex量から測定した。その結果、HSPC-Lの方がDMPC-Lに比べて高い取り込みを示し、葉酸修飾量は0.3mol%修飾よりも0.03mol%修飾リポソームで最も高い取り込みを示した。リポソーム化していないFITC-DexはKB細胞にほとんど取り込まれなかったことから、リポソームに内封されたFITC-Dexが細胞内に取り込まれたことが考えられた。また、フローサイトメータによる結果からも、0.03mol%葉酸修飾リポソームではHSPC-Lの方がDMPC-Lに比べて高い取り込み

を示した(図1)。

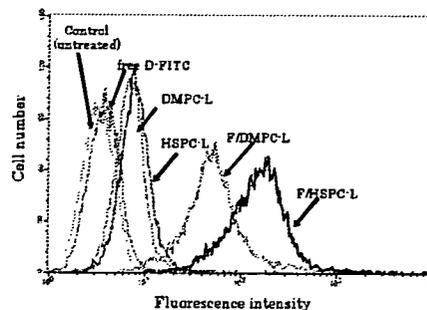


図1 フローサイトメータによるD-FITC封入葉酸修飾リポソームのKB細胞への取り込み

共焦点レーザー顕微鏡によるKB細胞内観察においては、F/HSPC-Lでは細胞内にFITC-Dexの強い緑色蛍光を認めましたが、F/DMPC-Lでは弱く、葉酸非修飾リポソームではほとんど観察されなかった。

また、葉酸修飾リポソームのKB細胞による取り込みは、1mMの葉酸を加えることで抑制されたことから、葉酸受容体を介したエンドサイトーシスにより取り込まれることが明らかとなった。MITO封入リポソームの放出性はいずれのリポソームも48時間後で約30%であり、細胞とのインキュベーション条件下では安定であることが確認された。KB細胞に対する細胞毒性は、細胞生存率がHSPC-L>F/HSPC-L>DMPC-L>F/DMPC-Lの順に低くなり、膜流動性の高い葉酸修飾リポソームにおいて強い抗腫瘍効果を示した。MITO封入リポソームのPBSに対する放出性は脂質膜組成によらず一定であったことから、インキュベーション中でなく、リポソームが細胞内に取り込まれた後、膜流動性が高い方が薬物を放出しやすく、薬物の活性が得られやすかったためと考えられた。

D. 考察

本研究では、葉酸修飾リポソームにおける脂質膜組成が抗腫瘍効果に与える影響を検討した。

水溶性高分子であるFITC-Dexの取り込みは、膜流動性の低いF/HSPC-Lに内封することによって細胞内に効率よく送達できることが明らかとなった。

一般に、水溶性高分子をキャリアに用いたアクティブターゲティングシステムでは、葉酸などのリガンドを固定する高分子の流動性は高い方がリガンドの認識性は高いと信じ