

られている。これに対して、本実験で得られた事実は、高分子ミセルの場合に、外殻を形成する親水性鎖の流動性を余り高くしない方がよいことを示唆する。外殻構成高分子鎖として専らポリエチレングリコール (PEG) 鎖を用いている本研究では、PEG鎖の鎖長に最適値があり得ることに相当する。(PEG鎖長が長いとリガンドの自由度は高まる)

一方、リガンドの表面密度についても高ければ高いほどよいわけではなく、効率的な細胞認識・取り込みの為に最適値が存在することを示した。

## E. 結論

リポソームをモデルとして用いた葉酸認識・取り込み実験から、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の方針を得た。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 【原著】

- 1) A. Hayama, T. Yamamoto, M. Yokoyama, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani. Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 8:1-6 (2007)
- 2) M. Furuhashi, R. Danev, K. Nagayama, Y. Yamada, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani. Decaarginine-PEG-artificial lipid/DNA complex for gene delivery: nanostructure and transfection efficiency, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 8:1-8 (2008)
- 3) N. Takahashi, Y. Watanabe, Y. Maitani, T. Yamauchi, K. Higashiyama, T. Ohba. p-Dodecylaminophenol derived from the synthetic retinoid, fenretinide: Antitumor efficacy in vitro and in vivo against human prostate cancer and mechanism of action. *Int. J. Cancer*, 122: 689-698 (2008)
- 4) H.L. Ma, X.R. Qi, W.X. Ding, Y. Maitani, T. Nagai. Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 84:598-606 (2008)
- 5) W. Ding, Y. Hattori, Y. Maitani. Hydroxyethylated cationic cholesterol derivatives in liposome vectors promote gene

expression in the lung. *Int. J. Pharm.*, in press.

- 6) M. Fukushima, Y. Hattori, H. Tsukada, K. Koga, E. Kajiwara, K. Kawano, T. Kobayashi, K. Kamata, Y. Maitani. Adiponectin gene therapy of streptozotocin-induced diabetic mice using hydrodynamic injection. *J. Gene Med.*, 9: 976-985 (2007)
- 7) Y. Hattori, Y. Maitani. Low-molecular-weight polyethylenimine enhanced gene transfer by cationic cholesterol-based nanoparticle vector, *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 1773-1778 (2007)
- 8) Y. Maitani, S. Igarashi, M. Sato, Y. Hattori. Cationic liposome (DC-Chol/DOPE = 1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression, *Int. J. Pharm.*, 342: 33-39 (2007)
- 9) Y. Hattori, W. Ding, Y. Maitani. Highly efficient cationic hydroxyethylated cholesterol-based nanoparticle-mediated gene transfer in vivo and in vitro in prostate carcinoma PC-3 cells, *J. Control. Release*, 120: 122-130 (2007)
- 10) E. Kajiwara, K. Kawano, Y. Hattori, M. Fukushima, K. Hayashi, Y. Maitani. Long-circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy, *J. Control. Release*, 120: 104-110 (2007)
- 11) Y. Hattori, M. Fukushima and Y. Maitani. Non-viral delivery of connexin 43 gene with histone deacetylase inhibitor to human nasopharyngeal tumor cells enhances gene expression and inhibits in vivo tumor growth, *Int. J. Oncol.*, 30: 1427- 1439 (2007)
- 12) Y. Zhang, X.R. Qi, Y. Gao, L. Wei. Y. Maitani, T. Nagai. Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect. *J. Control. Release*, 117: 281-290 (2007)
- 13) Y. Hattori and Y. Maitani, DNA/lipid complex incorporated with fibronectin to cell adhesion enhances transfection efficiency in prostate cancer cells and xenografts. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 603-607 (2007)
- 14) M. Fukushima, Y. Hattori, T. Yoshizawa, Y. Maitani. Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate

cancer in mice. *International Journal of Oncology*. 30:225-231 (2007)

## 2. 学会発表

- 1) 羽山明宏、山本竜広、横山昌幸、川野久美、米谷芳枝、カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾法の検討と in vivo 評価、日本薬学会第 127 年会、2007.3.28-30
- 2) 山田敦史、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、ドキソルビシン封入葉酸修飾リボソームの抗腫瘍効果における PEG 脂質の影響、日本薬学会第 127 年会、2007.3.28-30
- 3) 吉澤隆、服部喜之、米谷芳枝、葉酸受容体選択性 siRNA 遺伝子ベクターの開発、日本薬学会第 127 年会、2007.3.28-30
- 4) 藤田堯志、古幡昌彦、服部喜之、川上宏子、戸澗一孔、米谷芳枝、In vivo 用オリゴアルギニン脂質ベクターの開発、日本薬学会第 127 年会、2007.3.28-30
- 5) 服部喜之、丁武孝、米谷芳枝、正電荷コレステロールナノ粒子を用いた前立腺癌への遺伝子導入、日本薬剤学会第 22 年会、2007.5.21-23
- 6) 古幡昌彦、川上宏子、戸澗一孔、服部喜之、米谷芳枝、オリゴアルギニンミセル/DNA 複合体の構造と遺伝子導入効率、日本薬剤学会第 22 年会、2007.5.21-23
- 7) 丁武孝、服部喜之、東山公男、米谷芳枝、Cationic Cholesterol Derivatives for Gene Delivery into the Lung、日本薬剤学会第 22 年会、2007.5.21-23
- 8) 施力、服部喜之、川野久美、米谷芳枝、CPT-11 封入 PEG 修飾リボソームとカルボキシエステラーゼの腫瘍内補充による SN38 濃度の変化、日本薬剤学会第 22 年会、2007.5.21-23
- 9) 小野瀬絵里、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、ミトキサントロン封入葉酸修飾リボソームの膜流動性と抗腫瘍効果、日本薬剤学会第 22 年会、2007.5.21-23

- 10) 服部喜之、米谷芳枝、正電荷コレステロールナノ粒子による plasmidDNA と短鎖 2 本鎖 RNA の前立腺癌への遺伝子導入、第 23 回日本 DDS 学会、2007.6.14-15
- 11) 山田敦史、阿曾幸雄、吉岡澄江、米谷芳枝凍結乾燥再水和調製法による遺伝子封入リボソーム製剤の安定性に対する糖の影響、第 23 回日本 DDS 学会、2007.6.14-15
- 12) 日置敦子、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、血中滞留性リボソームの in vitro 放出性評価、第 51 回日本薬学会関東支部大会、2007.10.6
- 13) 勢子祐貴、羽山明宏、山本竜広、横山昌幸、小野瀬絵里、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、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、第 51 回日本薬学会関東支部大会、2007.10.6
- 14) 古賀公子、服部喜之、米谷芳枝、悪性内分泌腫瘍の RET を標的とした siRNA による遺伝子治療、第 51 回日本薬学会関東支部大会、2007.10.6
- 15) 萩原彩子、服部喜之、米谷芳枝、癌細胞への siRNA 送達用脂質ナノ粒子の開発、第 51 回日本薬学会関東支部大会、2007.10.6

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

レチノイド封入高分子ミセルの評価解析

分担研究者 川上 茂 京都大学大学院薬学研究科

研究要旨 合成レチノイド封入高分子ミセル製剤による難治性がんの一つである腹膜播種治療法確立を目的に、がん細胞増殖抑制効果および腹腔内投与後の分布評価を行った。

A. 研究目的

がん細胞は正常細胞と異なりアポトーシスが起こりにくく細胞周期の回転が亢進しているため無限に増殖する。All trans retinoic acid (ATRA)を初めとするレチノイドは、これらのがん細胞特有の性質に作用し、アポトーシス誘導や細胞周期停止などの分化誘導によりがん細胞増殖を抑制可能であるため、がん細胞選択的に作用し正常細胞への影響が少なく副作用が起こりにくい事が期待される。しかしながらレチノイドは疎水性が高く、現在経口投与での検討が行われているが、消化管膜透過性の悪さからバイオアベイラビリティが低い事が問題となっている。これらの課題を克服しより広範ながん治療へと応用展開していくためにはレチノイドを安定に封入し、がん組織へと送達しうるドラッグデリバリーシステム製剤の開発が必須である。我々は、昨年度までの結果においてベンゼン環を有するレチノイド4HPRがアスパラギン酸残基にベンジル基修飾を導入したポリマーミセル(PEG-P(Asp(Bzl)))に安定に封入され静脈内投与によりEPR効果により固形がんモデルにおいてがん組織へのデリバリーが可能である事を報告した。本年度は、PEG-P(Asp(Bzl))を用いて、より強い分化誘導、細胞死誘導能を有するCD437およびATRA耐性克服が報告されているAm80(図1)などの新規合成レチノイドへの適用を試みる。また、難知性のがんである腹膜播種治療への応用についての基礎的検討を行う。

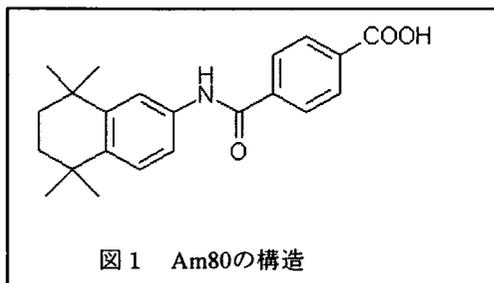


図1 Am80の構造

の適用を試みる。また、難知性のがんである腹膜播種治療への応用についての基礎的検討を行う。

B. 研究方法

ポリマーの合成: poly(ethyleneglycol)-poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate)(PBLA)を出発物質とし、アルカリ化水分解後、アスパラギン酸残基にベンジル基を導入した。レチノイドによる細胞死誘導効果の評価: 各種がん細胞株 (colon26, CT26, B16BL6, HepG2, Hep3B) および正常ヒト細胞にレチノイドを投与し一定時間後にMTT assay法により評価した。粒子径およびゼータ電位の測定: Zeta saizer Nano ZSをもちいて測定した。腹膜播種モデルの作製: BALB/c雄性マウス(6週齢)にルシフェラーゼ安定発現がん細胞株 (colon26-Luc)をHANKS液に分散させ、 $1.0 \times 10^5$  個/匹を腹腔内投与した。腹腔内投与後の血中への移行評価: Am80封入ポリマーミセルをマウスの腹腔内へ投与し一定時間後採血し、血漿を回収する。アセトニトリルにより抽出後、HPLCを用いて395nmの吸光度により測定した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は京都大学の規定に基づき行った。

C. 研究結果

(1) レチノイドによる正常細胞への影響: まず各種レチノイド(ATRA, 4HPR, CD437)によるレチノイドの正常細胞への影響の評価を目的に、レチノイドの主な代謝組織であるヒト正常肝細胞に対する細胞死誘導の影響をヒト由来肝癌細胞株と比較して評価した。各薬物を0.01 ~ 100 $\mu$ Mの各濃度で72時間処理を行ったところ、CD437のみ1 $\mu$ Mで有意な増殖抑制効果が認められたが、ATRAおよび4-HPRは10 $\mu$ Mでもほとんど増殖抑制効果が認めら

れなかった。次に、薬物濃度を $1\mu\text{M}$ に固定して24~72時間において経時的に細胞増殖抑制効果を評価したところ、ATRAや4-HPRでは72時間でもほとんど増殖抑制効果を示さないのに対し、CD437では24時間で細胞生存率が25%であった。さらに、正常細胞への影響を評価するためにATRA、4-HPR、およびCD437を $1\mu\text{M}$ で72時間処理したところ、いずれの薬物についてもCD437はATRAや4-HPRと同様にほとんど細胞死は認められなかった(図2)。従って、CD437は、正常細胞への細胞死をほとんど誘導することなく、ATRAおよび4-HPRに比べて有意に肝癌に対する細胞死を誘導することが明らかとなった。

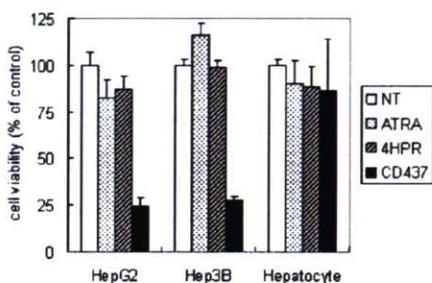


図2 各種レチノイドによるヒト正常肝細胞(Hepatocyte)およびヒト由来がん細胞株(HepG2およびHep3B)に対する細胞死誘導効果

(2) 合成レチノイドAm80によるがん増殖抑制効果: ATRA耐性を克服した新規合成レチノイドAm80の腹膜播種治療への応用を目的にマウス由来結腸がん細胞株colon26細胞、CT26細胞株に対する増殖抑制効果をMTT assay法により評価した。100 mM、48時間処理により細胞生存率はほぼ0%であり、colon 26細胞株に対してATRAと同程度に高い細胞増殖抑制効果を示した(図3)。

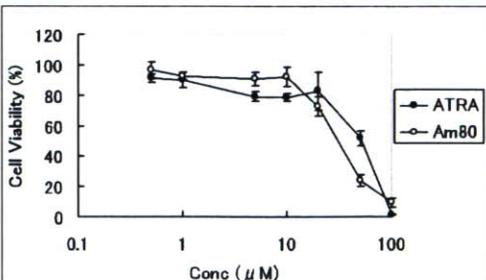


図3 Am80およびATRAによるcolon26に対する細胞死誘導効果

(3) 腹膜播種モデルの作製: in vivoでのがん細胞増殖の定量的およびイメージングによる視覚的評価可能な腹膜播種モデルの確立を目的に、ルシフェラーゼ安定発現細胞株を作製し、マウスの腹腔内に投与した。腹膜投与一定日数後、腹膜播種におけるがんの転移組織である大網および腸間膜を採取しホモジナイズ後のルシフェラーゼ活性を測定したところ、従来の肉眼による結節数による評価の約6倍の感度で評価可能であった。また、一定日数後の腹膜播種モデルマウスを高感度イメージングによる評価が可能であった(図4)。

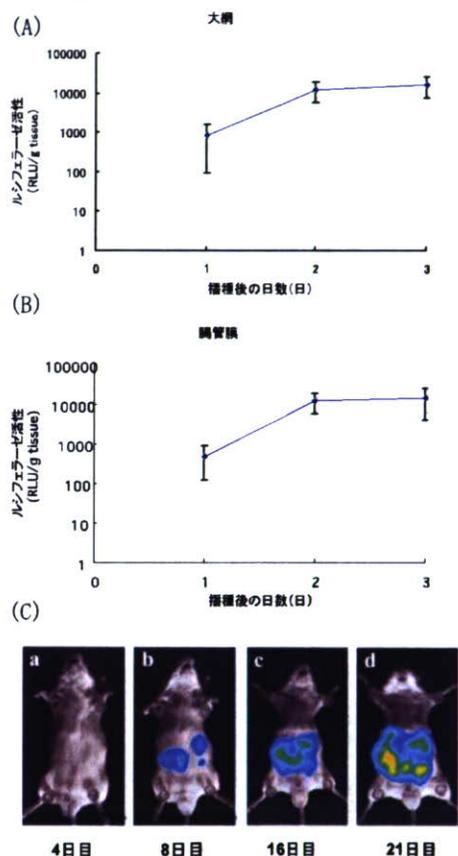


図4 腹膜播種モデルにおける大網(A)および腸間膜(B)のがん細胞増殖の定量的評価およびイメージングによる評価(C)

(4) レチノイド封入高分子ミセルの投与後の腹腔内滞留性の評価: 腹腔内投与後の血中への移行は分子量により決定され、分子量の小さい分子は速やかに血中へ移行するが、分子量の大きな分子は血中への移行が抑制されリンパ節への移行することが知られている。そこでAm80単体を5%DMSO-生理

食塩水に分散させた場合と高分子ミセルに封入した場合の腹腔内投与後の血中濃度を測定したところ、Am80単体の場合と比較し高分子ミセルに封入した場合は有意な血中への移行抑制が認められた(図5)。

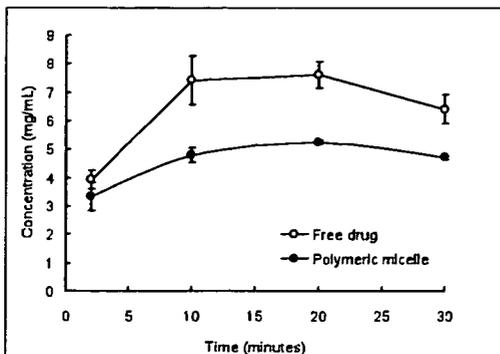


図5 Am80内封高分子ミセルおよびAm80単独を腹腔内投与後の血漿中のAm80濃度

#### D. 考察

レチノイド処理によりがん細胞に対して細胞死誘導可能な濃度・時間で正常細胞にレチノイド処理を行っても正常細胞にはほとんど細胞死を誘導せず、レチノイドによる細胞死誘導はがん細胞選択的でありレチノイドによるがん分化誘導療法は比較的副作用の少ない治療法になりえると考えられる。またAm80は、ATRAと同程度のがん増殖抑制効果を有し、高分子ミセルに封入する事により腹腔内から血中への移行が抑制され、腹腔内への滞留またはリンパ節への移行の可能性が示唆された。

#### E. 結論

レチノイドによる細胞死誘導は正常細胞への影響は少なくがん細胞選択的であり、レチノイドによるがん分化誘導療法は副作用の少ない治療法になりえることが示唆された。Am80封入高分子ミセル製剤により、腹膜播種治療を目的とした腹腔内投与後の体内動態を改善する事ができ、腹膜播種治療への可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 【総説】

1. S. Kawakami, Y. Higuchi, M. Hashida: No n-viral approaches for targeted delivery of plasmid DNA and oligonucleotide Journal of Pharmaceutical Sciences, 97(2),726-745 (2008)

#### 【原著】

1. T. Okuda, S. Kawakami, M. Yokoyama, T. Yamamoto, F. Yamashita, M. Hashida: Block copolymer design for stable encapsulation of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide into polymeric micelles in mice, International Journal of Pharmaceutics, in press (2008)
2. Y. Kuramoto, S. Kawakami, S. Zou, K. Fukuda, F. Yamashita, M. Hashida: Efficient peritoneal dissemination treatment by immunostimulatory phosphorothioate-type CpG DNA/cationic liposome complex in mice, Journal of Controlled Release, 126(3), 274-280 (2008)
3. W. Wijagkanalan, S. Kawakami, M. Takemura, R. Igarashi, F. Yamashita, M. Hashida: Efficient targeting to alveolar macrophages by intratracheal administration of mannoseylated liposomes in rats, Journal of Controlled Release, 125(2), 121-130 (2008)
4. T. Terada, M. Mizobata, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida: Optimization of tumor-selective targeting by basic fibroblast growth factor-binding peptide grafted PEGylated liposomes, Journal of Controlled Release, 119(3) 262-270 (2007)
5. Y. Lu, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida: Development of antigen presenting cell s-targeted DNA vaccine against melanoma by mannoseylated liposomes, Biomaterials, 28(21) 3255-3262 (2007)

#### 2. 学会発表

- 1) 奥田知将、川上 茂、山本竜広、横山昌幸、山下富義、橋田 充、4-HPR封入ポリマーミセル製剤による新規癌治療法への応用展開、日本薬学会第22年会、大宮、2007年5月21-23日
- 2) 奥田知将、川上 茂、樋口ゆり子、山本竜広、横山昌幸、橋田 充、高分子ミセルによるN-(4-hydroxyphenyl)retinamide(4-HPR)の癌ターゲティング、日本レチノイド研究会第18回学術集会、東京、2007年11月23-24日
- 3) S. Kawakami, M. Hashida, Evaluation and development of nano-carriers using imaging technology, 1st Asian Biomaterials Conference, Tsukuba, 2007.12.8
- 4) 奥田知将、川上 茂、樋口ゆり子、岡 芳美、佐藤 琢、横山昌幸、橋田 充、癌治療効果向上を目的としたN-(4-hydroxyphenyl)retinamide(4-HPR)封入高分子ミセル製剤の開発、日本薬学会第128年会、横浜、2008年3月26-28日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

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（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

高分子ミセルの生体有害性と腫瘍標的化の検証

分担研究者 川口隆憲 福島県立医科大学

研究要旨 biotinを標識した高分子ミセルを用いてラット腫瘍での集積を病理学的に解析した。また、高分子ミセルキャリアーの毒性を詳細に解析した。

A. 研究目的

高分子ミセルは抗がん剤のcarrierとしての期待がたかまっている。その理由は、非水溶性抗がん剤のcarrierとして利用可能であること、血中濃度を高く維持できること、腫瘍targetingが期待できること、などである。すでに臨床治験が開始されているものもあるが、なお早急に検討しなければならない事柄もある。その一つは高分子ミセルの生体有害性である。この点については前年度の報告書にも書いたが、重要な問題であるので今年度も引き続き検討した。もう一つは高分子ミセルの腫瘍targetingの検証である。特にその機序の解明は重要である。現在高分子ミセルの腫瘍選択性についてはpassive targeting が考えられ Enhanced Permeability and Retention (EPR) 現象がその機序と考えられているが、実際に高分子ミセルが腫瘍選択的に集積し腫瘍血管外にでて腫瘍細胞に到達するという証拠は提示されていない。今回以上の2点を明らかにするために高分子ミセルに高に濃度でbiotinを標識し免疫組織学的に高分子ミセルの生体内挙動を検討した。

B. 研究方法

1. 毒性評価

神奈川科学技術アカデミー横山「高分子ナノメデカル」で作成された10 mol% Biotin-PEG5-P(Asp(Bzl))25:PEG-P(Asp(Bzl))24:10:90(mol)%ビオチン化ポリマーミセルを用いた。これを10mg/rat (120-200g) 静脈内に注射し、24時間後に生理食塩水100~150ml 還流後試料を採取した。試料は10%ホルマリン固定か亜鉛固定を施した。薄切標本は型どおりABC法で免疫染色しペルオキシダーゼで発色した。

2. ビオチン標識高分子ミセルの腫瘍targetingの検証

先に記載したビオチン標識ミセルを、2週間前にAH109Aラット肝がん細胞を移植したラットの静脈内に注射し1時間後に生理食塩水100~150ml 還流して試料を採取し、ホルマリン固定または亜鉛固定して免疫組織学的にビオチンミセルの局在を検討した。

### C. 研究結果

下図は脾臓を示している。赤脾髄内に抗ビオチン免疫染色陽性の泡沫細胞が多数認められた。

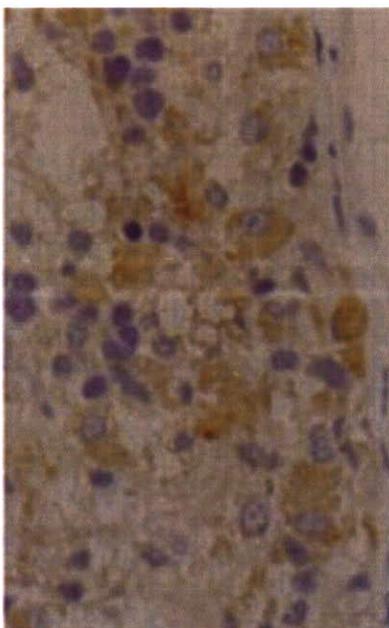
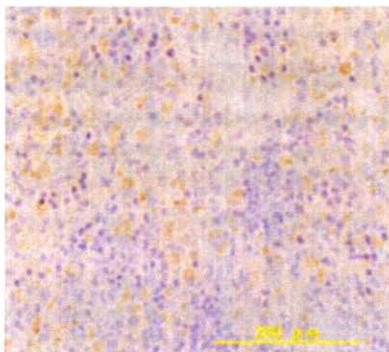
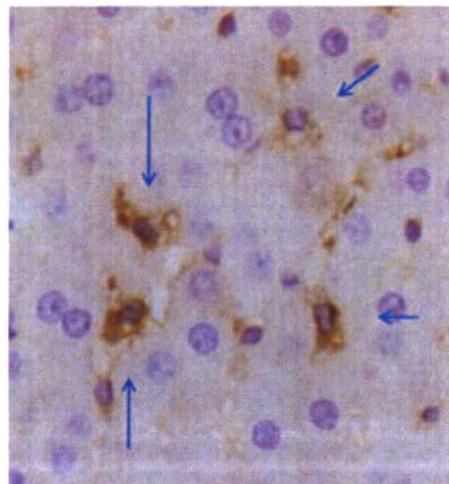
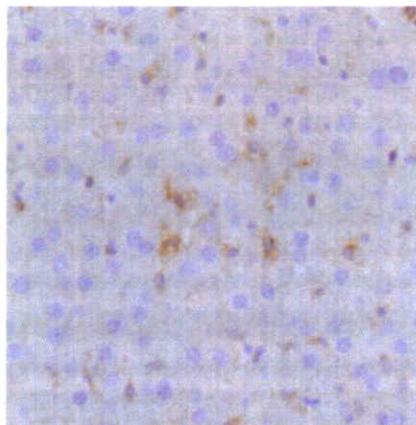


図1 脾臓での高分子ミセルの集積

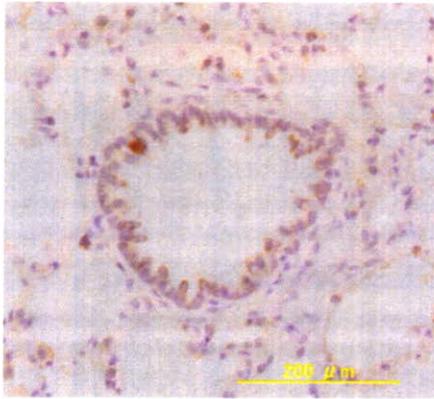
図2は肝臓である。Kupffer細胞特異的にビオチン陽性像が確認できた。



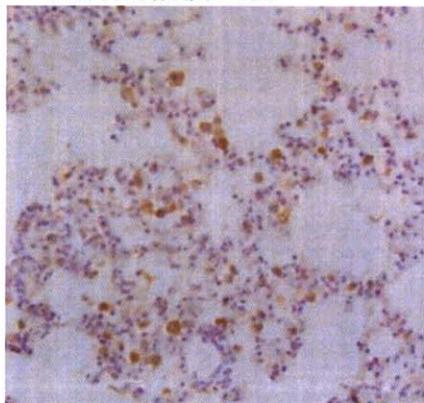
### Kupffer細胞

図2 肝臓での高分子ミセルの集積

次頁図3は肺である。肺胞内マクロファージが高範囲に陽性である。このほか気管支粘膜上皮の一部が陽性であった。



気管支粘膜上皮



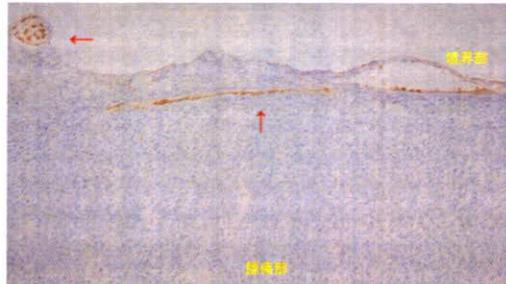
肺泡マクロファージ

図3 肺での高分子ミセルの集積

2. ビオチン標識高分子ミセルの腫瘍targetingの検証

腫瘍は長径約2cmであった。右の図4に示す。その結果高分子ミセルは腫瘍被膜血管内に選択的に存在することが明らかとなった。特に動脈性血管に明瞭で、血栓様物質や血管壁に陽性像を認めた。ビオチン標識ミセルを投与後24時間でも同様であったが、腫瘍隔壁内血管やごく一部では腫瘍血管内にも陽性像を認めた。また腫瘍周囲のマクロファージ内にも陽性像を認めた。

Biotin化高分子ミセルの腫瘍特異的集積

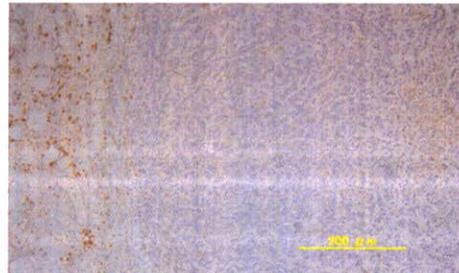


2 week-old SC tumor 1 hour after i.v. injection of micelle

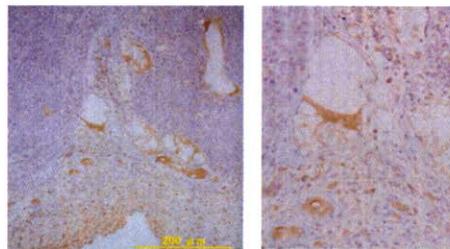
ビオチン化ミセルの集積1  
動脈内血栓?



Micelleの腫瘍被膜集積: 2 week tumor 24 hours after i.v.



高分子ミセルの腫瘍集積現象  
2-week-old tumor 24 hours after i.v.



腫瘍被膜から隔壁血管へ

#### D. 考察

腫瘍被膜血管内集積と活性化したmononuclear phagocyte system (MPS)内取り込みが同一機構なのか興味あるところで、MPS活性化で論じられている「オプソニン-補体-MPS」に高分子ミセルの組織選択性の本体があるのか否か早急に検討しなければならないと考える。

#### E. 結論

ビオチン標識高分子ミセルは静脈内注射後1時間では腫瘍周囲血管内に選択性が高い結果であったが、24時間後では脾臓、肺、骨髄、腫瘍周囲マクロファージにも集積すると考えられる結果であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawaguchi et al., Demonstration and identification of aberrant MUC1 bearing Tn antigen in rat ascites hepatoma AH109A cells with strong lymph node metastasis propensity, Cancer Metastases Research, F. Columbus ed., Nova Science Publisher, NY, 2008, in press
- 2) Shio Y., Kawaguchi, T., et al., Carbohydrate status detecting by PNA is changeable through cancer prognosis from primary to metastatic nodal site: A possible prognostic factor in patient with node-positive lung adenocarcinoma, Lung Cancer, 57, 187-192 (2007)

##### 2. 口頭発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

高分子ミセルの組織移行と腫瘍内分布の解析

分担研究者 堀 勝義 東北大学加齢医学研究所

研究要旨 新規高分子ミセルは、循環状態が低下した腫瘍変性領域に集まる。腫瘍血管破断剤を用いて腫瘍組織の一部を変性させることにより、微小増殖巣にも高分子ミセルを集積させることができる。

A. 研究目的

正常血管と腫瘍血管の構造上の違いにより、高分子化された抗癌剤は、腫瘍血管から選択的に漏れる。また、腫瘍組織はリンパ管システムが未発達で高分子の回収機能が弱いため、腫瘍組織に移行した高分子抗癌剤は比較的長くそこに停留する。このEPR (Enhanced permeability and retention) 効果を基本原理の一つとして、抗癌剤を高分子化する研究が進められている。

高分子化の一つとして、ミセル内に抗癌剤を封入する方法がある。近年、横山らは新しい高分子ミセルを合成し、その内部にアドリアマイシンを封入することに成功した。この高分子ミセルは、アドリアマイシンのみならず、他の抗癌剤も封入でき、それらの薬剤を腫瘍組織に効率よく運ぶキャリアとして期待されている。臨床応用を実施するためには、このミセルの腫瘍内での振る舞いと分布を解析することが重要である。

分担者の今年度の研究目的は、この高分子ミセルをFITCでラベルしたトレーサーを用い、ミセルの腫瘍組織への移行性と腫瘍内分布の特性を明らかにすることであった。

B. 研究方法

(1)ラット透明窓を用いたミセル移行の生体観測法

高分子ミセルの腫瘍内動態解析のために、FITCで蛍光標識をした平均分子量15,259のPEG<sub>12</sub>-PBLA<sub>14</sub>-FITC (FITミセル)をトレーサーとして用いた。腫瘍には吉田腹水肉腫の変異株LY80を用いた。また、FITCミセルの腫瘍内移行を経時的に解析するために、同一部位で長時間の計測が可能なラット透明窓生体観測システムを開発した。このシステムで、生育する腫瘍と腫瘍血管を直接観察した。また、光源を切替え、FITCミセルの腫瘍内での動きを落射蛍光で捉えることにより、腫瘍循環の機能をリアルタイムで把握することができた。本実験では、静脈内投与したFITCミセルが腫瘍内を循環する様子を、通常、投与1分、5分、10分、15分、30分、1時間後、そして以後、1時間ごとに12時間、高感度カメラで撮影し、S-VHSに記録した(1時間あたり10秒間)。ビデオのアナログ画像をビデオキャプチャでデジタル画像に変換し、必要な場合には、組織における蛍光強度の推移をコンピュータで画像解析した。

(2)腫瘍血管破断薬AC7700による腫瘍変性領域の作成

昨年度の研究の予備実験で、高分子ミセルは、壊死近傍の腫瘍血管から漏れや

すいことが示唆された。そこで、腫瘍血管を人為的に傷害し、そこから高分子ミセルが漏れやすくなるか、また、そこに蓄積しやすくなるかどうかについての実験を行った。腫瘍血管に傷害を与える薬剤として、腫瘍血管破断剤の一つであるAC7700を用いた。この薬剤には強力な腫瘍血流遮断作用があり、それによって腫瘍血管の破断、および壊死の誘導が起こることを、分担者らが明らかにした。本実験では、透明窓内に微小増殖巣を持つラットにAC7700を静脈内投与した後、24時間後にFITCミセルを静脈内投与し、ミセルの腫瘍内分布を経時的に観測した。

### (3) 倫理面への配慮

全ての実験は、東北大学加齢医学研究所動物実験委員会に計画書を提出し、審査、承認された。実験は東北大学のガイドラインに従い、特に苦痛軽減には注意深い配慮をした。実験は全て全身麻酔下で行った。

## C. 研究結果

### (1) 壊死近傍領域における高分子ミセルの移行性

高分子ミセルの壊死近傍領域と壊死巣への移行性の典型例を図1に、その蛍光強度の経時変化の定量を図2に示す。投与直後、ミセルは腫瘍血管から漏れ、

腫瘍内のviableな領域 [各写真の右側の領域(v)]に移行する。壊死領域 [各写真の左側の領域(n)]には血管がないため、最初は移行しないが、時間経過と共に、この領域にもミセルが徐々に浸透し、蓄積されることが注目された。血流はないが、ゆっくりした間質液の流れがあることが示唆された。

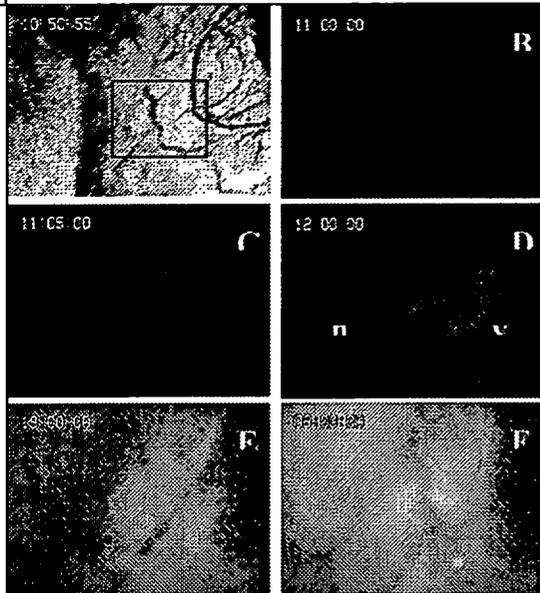


図1. 壊死近傍領域における高分子ミセルの移行性

BからFまでの落射蛍光の所見は、Aの黒四角の枠内で得られた。B, 投与前; C, 投与5分後; D, 投与1時間後; E, 8時間後; F, 投与16時間後。

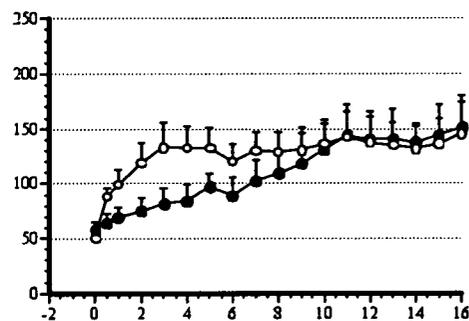


図2. 蛍光強度の時間推移. ○, viable領域 (n=5); ●, 壊死領域 (n=5). Viable領域では投与3時間後、壊死領域では11時間後に蛍光強度はプラトーに達した。

### (2) 微小増殖巣での高分子ミセルの移行性

高分子ミセルの腫瘍微小増殖巣とその周辺領域への移行性の典型例を図3に示す。

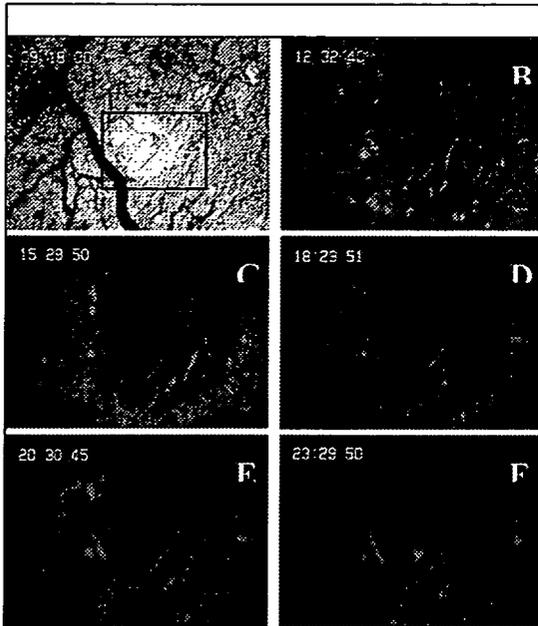


図3. 微小増殖巣における高分子ミセルの移行性

BからFまでの落射蛍光の所見は、Aの黒四角の枠内で得られた。B, 投与170秒後; C, 投与3時間後; D, 投与6時間後; E, 8時間後; F, 投与11時間後。B~Fの中心の黒く抜けた部分が微小増殖巣である。

図3の腫瘍は径約300  $\mu$ mの大きさの微小増殖腫瘍である。FITCミセルを静脈内投与すると、腫瘍外周の正常組織とのインターフェイス領域で、ミセルの著明な漏れが見られた。腫瘍内部の血管からはほとんど漏れはなく、したがってミセルの腫瘍内蓄積は観察されなかった。

### (3) AC7700で誘導した腫瘍変性領域への高分子ミセルの移行

腫瘍血管破断剤AC7700で腫瘍の一部に変性領域を作り、FITCミセルを静脈内投与した時の所見を図4に示す。

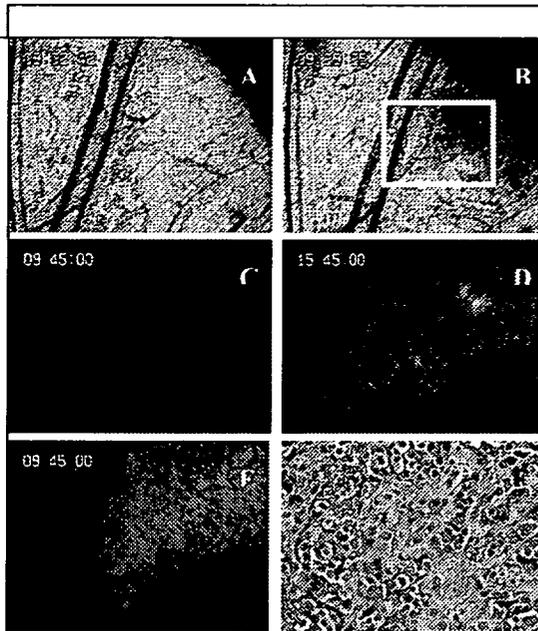


図4. 腫瘍変性領域へのミセルの移行と蓄積。

A, AC7700投与前(右上に腫瘍がある); B, AC7700投与24時間後。白四角枠内の黒くなった楔形の領域が変性領域。CからEまでの落射蛍光の所見は、Bの白枠内の領域で得られた。C, FITCミセル投与前; D, ミセル投与6時間後; E, ミセル投与48時間後; F, ミセルが蓄積した領域の組織像であり、肉芽組織となっている。

血管破断剤AC7700によって変性した領域に一致してミセルの蓄積が起こり、48時間後には分布が均質になっていることが注目された。

### D. 考察

本研究で開発した新しい実験システムを用いて、新規高分子ミセルの組織への移行性と組織内分布の観察と計測を行った。高分子ミセルは正常血管、および初期増殖巣における新生したばかりの腫瘍血管からは漏れにくく、結果として、ミセルはそれらの血管が支配する組織にはほとんど蓄積しなかった。高分子ミセルの血管外移行は、正常と腫瘍間のインターフェイス、および腫瘍組織と壊死との間のインターフェイスで顕著であった。

このように異質の組織のつなぎ目で高分子が漏れ易い問題については、そこにある血管の形態と機能をさらに詳細に研究する必要がある。

高分子ミセルが初期の腫瘍血管から漏れにくいという所見は、全身に撒布された微小増殖巣をも治療の対象とする時に隘路となる。全身療法を成立させるためには、この微小増殖巣にも高分子ミセルを多量に送達させ、そこに長時間停留させる必要がある。

この問題を解決するために、腫瘍血管破断剤の使用が有効であると考えられた。本研究で、AC7700を用いて腫瘍の一部を変性させると、そこに高分子ミセルが蓄積してくることを明らかにした。最初は腫瘍内の分布に偏りが見られるが、時間の経過と共に腫瘍内の組織内濃度が均質になってきた。これは、変性領域に蓄積した高分子ミセルが、間質液流に乗って、徐放性に viable な組織に移行することによると考えられた。

次年度は腫瘍血管破断剤AC7700と高分子ミセル抗癌剤との併用治療実験を行い、いかなる量をいかなるタイミングで投与するのが最も効果的であるかを明らかにしたい。

#### E. 結論

高分子ミセルは進展した腫瘍血管から選択的に漏れ、主に腫瘍内の変性領域に蓄積した。腫瘍血管破断剤で部分的に変性領域を作ることにより、微小増殖巣にも高分子ミセルを集めることができた。腫瘍血管破断剤と抗癌剤封入高分子ミセル併用による治療効果増強を期待することができる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hori K, Furumoto S, Kubota K, Tumor blood flow interruption after radiotherapy strongly inhibits tumor regrowth, Cancer Science, 2008 (in press)

##### 2. 学会発表

1) Furumoto S, Hori K, Honda Y, Yoshioka T, Yamaura G, Ishikawa Y, Kubota K, Fukuda H, Kudo Y, Iwata R, Assessment of tumor hypoxia induced by vascular targeting therapy, SNM' 54<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington DC, USA, 2007年6月

2) 堀 勝義, DDS における腫瘍血流制御の意義, 第23回日本DDS学会, 熊本, 2007年6月

3) Hori K, Furumoto S: Augmentation of radiation therapy efficacy using tumor blood flow interception: an experimental study, 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年9月

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

胃癌同所移植腹膜播種マウスモデルにおけるSN-38内包高分子ミセル(NK012)の抗腫瘍効果に関する  
研究

分担研究者: 濱口 哲弥 国立がんセンター中央病院 総合病棟部17B病棟医長

研究要旨 難治性癌の一つである胃癌腹膜播種の動物モデルを用いて、CPT-11の活性代謝物であるSN-38を封入した高分子ミセル製剤の抗腫瘍効果および静脈投与後の薬剤分布の評価を行った。

A. 研究目的

CPT-11は抗腫瘍活性を有するSN-38に水溶性を向上させる官能基を結合したプロドラッグであり、肝のcarboxylesteraseにより加水分解されて活性代謝物であるSN-38を放出する。その代謝効率は10%未満である。SN-38の殺細胞効果はCPT-11に比し約1000倍優れている。また、carboxylesterase活性は薬理遺伝学的な個人差もあるため、SN-38そのものを生体投与できれば良いが、水難溶のため不可能である。

NK012は、SN-38がポリエチレングリコール(PEG)とポリグルタミン酸の両親媒性のブロックコポリマーのポリグルタミン酸鎖にエステル結合され、その後ミセル可溶化した製剤で平均粒径は20nmである(図1)。SN-38とブロックコポリマーの結合は酵素非依存的に加水分解される。よってNK012は、患者間の酵素活性の差に影響されことなく安定した薬効を示すことが期待できる。



図1: SN-38内包高分子ミセルの構造

我々は肺小細胞癌SBC-3と、これにVEGF発現ベクターをtransfectしたSBC-3/VEGFの皮下移植マウスモデルを用いてNK012とCPT-11との抗腫瘍効果を検討したところ、NK012はCPT-11に比し抗腫瘍効果が優れており、とくにSBC-3/VEGFにおいてその抗腫瘍効果の差は顕著であることを見いだした。また膀胱がん株

Capan-1は間質に富み、腫瘍血管が少なく、ヒトの膀胱がんに近いモデルであるが、著明な抗腫瘍効果をもたらすことを認めた。このことはNK012の選択的腫瘍集積性と、効率のよいSN-38のリリースにより、SN-38が固形腫瘍全体に分布し、長時間作用することによるものと結論づけた。今回、VEGF高発現であり難治性である胃癌同所移植腹膜播種マウスモデルを用いて、胃および腹膜播種巣に各薬剤がデリバリーされ抗腫瘍効果を表すことができるかどうかを確認する。

B. 研究方法

胃癌同所移植腹膜播種マウスモデルの作成: スキルス胃癌のcell-lineである44As3Luc、58As1Lucをヌードマウスの胃壁に同所移植することにより腹膜播種モデルを確立した。静脈投与後のSN-38およびCPT-11の腫瘍集積性の比較: NK012もしくはCPT-11を胃癌同所移植腹膜播種マウスに静脈投与し、1・24・96時間後の胃原発巣・腹膜転移巣を摘出し、それぞれの自家蛍光を観察することにより腫瘍集積性を比較した。また、同様に胃原発巣・腹膜播種巣を摘出し、HPLCにてfree SN-38、polymer結合型SN-38およびCPT-11の組織内同度を測定した。静脈投与後のNK012およびCPT-11の抗腫瘍効果の比較: 同所移植20日目からマウス尾静脈よりSN-38内包ミセルおよびCPT-11の投与を開始した。NK012投与群、CPT-11投与群、コントロール群(各n=5)における抗腫瘍効果をルシフェラーゼアッセイにて比較した。(倫理面への配慮)

全ての動物実験は国立がんセンターの規定に基づき行った。

### C. 研究結果

(1) NK012投与後の腫瘍集積性の評価: NK012もしくはCPT-11の静脈投与1・24・96時間後の胃原発巣・腹膜転移巣を摘出し、それぞれの自家蛍光を観察したところ、CPT-11投与群では投与1時間後に腫瘍に集積するものの、24・96時間後にはほぼ消失していたが、NK012投与群では72時間後でも腫瘍集積が確認された(図2、3)。

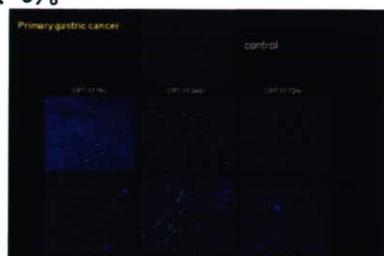


図2: NK012とCPT-11投与後の胃原発巣における腫瘍集積性の比較

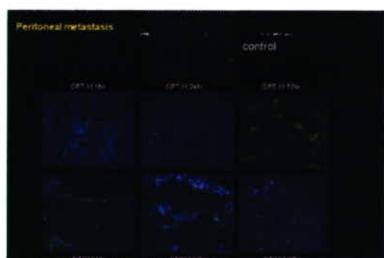


図3: NK012とCPT-11投与後の腹膜播種巣における腫瘍集積性の比較

次にNK012とCPT-11を胃癌同所移植腹膜播種マウスに静脈投与し、1・24・96時間後の胃原発巣・腹膜転移巣を摘出し、HPLCにてfree SN-38、polymer結合型SN-38とCPT-11の組織内同度を測定したところ、投与1時間後の胃原発巣・腹膜播種巣のNK012濃度はCPT-11濃度のそれぞれ約1/100、約1/30であるが、24時間後には胃原発巣および腹膜播種巣のいずれでもSN-38高分子ミセルはCPT-11の約100倍の濃度であった。NK012、CPT-11それぞれにおいて胃原発巣と腹膜転移巣への集積性を比較するとほぼ同程度の腫瘍AUCであった。また胃原発巣および腹膜転移巣におけるfree SN-38濃度は、NK012投与群においては72時間後まで高濃度を保っていたのに対し、CPT-11投与群では24時間後にはNK012投与群を著明に下回り、72時間

間後には測定不能であった(図4)。

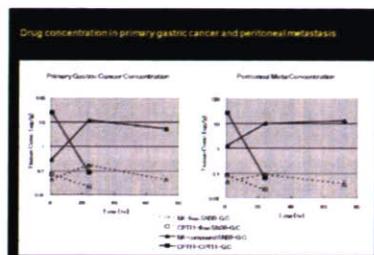


図4: NK012とCPT-11投与後の胃原発巣・腹膜播種巣での薬物濃度の比較

(2) NK012投与後の抗腫瘍効果の比較: SN-38高分子ミセル投与群はCPT-11投与群に比して著明な抗腫瘍効果が得られた(図5)。

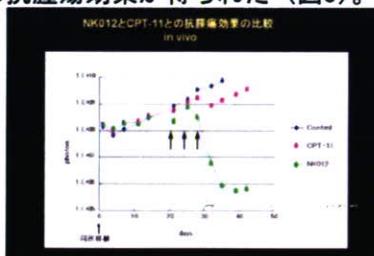


図5: NK012とCPT-11投与後の抗腫瘍効果の比較

### D. 考察

胃癌同所移植腹膜播種マウスモデルにおいて、NK012はCPT-11に比し、胃原発巣および腹膜播種巣において長時間腫瘍内に集積し、より高濃度のSN-38を放出することが確認された。また薬剤集積性の向上に伴ってSN-38高分子ミセル投与群の方がCPT-11投与群に比し抗腫瘍効果もすぐれていた。SN-38は時間依存型の抗腫瘍活性を有することから、高分子ミセル化することによりSN-38を直接体内に投与できるメリットのみならず、腫瘍における薬剤の集積性が向上し曝露時間が延長することで、優れた抗腫瘍効果を示すことができたものと考えられる。

### E. 結論

NK012は胃癌腹膜播種が進行した状態においても、腹膜播種巣に十分デリバリーされ、優れた抗腫瘍効果をあらわすことが確認された。

F. 健康危険情報  
なし

## G.研究発表

### 1.論文発表

#### 【総説】

1) 瀧口哲弥: ポリマーミセル抗がん剤の作用機序と臨床導入. 血液・腫瘍科.54, 702-709, 2007

2) 瀧口哲弥: 臨床試験に入ったミセル体(タキソール内包ミセルNK105), *Mebio Oncology*, 4, 58-67, 2007

#### 【原著】

1) Hamaguchi T, Kato K, Yasui H, Morizane C, Ikeda M, Ueno H, Muro K, Yamada Y, Okusaka T, Shirao K, Shimada Y, Nakahama H, Matsumura Y.; A Phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation. *Br J Cancer*. 97, 170-176, 2007

2) Minami H, Sai K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Suzuki K, Kaniwa N, Sawada J, Hamaguchi T, Yamamoto N, Shirao K, Yamada Y, Ohmatsu H, Kubota K, Yoshida T, Ohtsu A, Saijo N.; Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: role of UGT1A1\*6 and \*28. 17. 497-504, 2007

3) Sai K, Saito Y, Fukushima-Uesaka H, Kurose K, Kaniwa N, Kamatani N, Shirao K, Yamamoto N, Hamaguchi T, Kunitoh H, Ohe Y, Tamura T, Yamada Y, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Sawada J.; Impact of CYP3A4 haplotypes on irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer Patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, in press

### 2.学会発表

1) 瀧口哲弥. Clinical evaluations of cancer nanotherapeutics JCA (the Japanese Cancer Association) 66th Annual Meeting.(EW19-2). 2007.10 Yokohama.

2) T. Nakajima, Y. Matsumura, M. Yasunaga, F. Koizumi, K. Kato, T. Hamaguchi, Y. Yamada, K. Shirao, Y. Shimada. Synergistic antitumor activity of novel polymeric micelles incorporationg SN-38(N012) combined with 5FU in colon cancer. JCA (the Japanese Cancer Association) 66th Annual Meeting.(EW19-2). 2007.10 Yokohama.

3) K. Kato, T. Hamaguchi, K. Shirao, Y. Shimada, T. Doi, A. Ohtsu, Y. Matsumura, Y. Yamada; Interim analysis of phase I study of NK012, polymer micelle SN-38, in patients with advanced cancer. 2008 Gastrointestinal Cancers Symposium. 2008. 01 Orland, USA.

## H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1.特許取得 なし

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

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Masayuki Yokoyama	Polymeric Micelles as Nanosized Drug Carrier Systems	A. J. Domb, Y. Tabata, M. N. V. Ravi Kumar, and S. Farber	Nanoparticles for Pharmaceutical Applications	American Scientific Publishers	Stevenson Ranch	2007	63-72
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	ナノメディスン：ナノテクの医療応用	オーム社	東京	2008	102-118

## 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
Tatsuhiko Yamamoto, Masayuki Yokoyama, et al.	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
M. Nakayama, M. Yokoyama, et al.	Thermal modulation of intracellular drug distribution using thermoresponsive polymeric micelles	Reactive & Functional Polymers	67	1398- 1407	2007
Y. Murakami, M. Yokoyama, T. et al.	A novel synthetic tissue-adhesive hydrogel using a crosslinkable polymeric micelle,	Journal of Biomedical Materials Research	80 A	421- 427	2007
A. Hayama, M. Yokoyama, Y. Maitani, et al.	Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro	J. Nanoscience and Nanotechnology	8	1- 6	2007
横山昌幸	薬物ターゲティングとMRI造影剤	映像情報 Medical	39	398-404	2007

横山昌幸	DDS (ドラッグデリバリーシステム)	マテリアルインテグレーション	20	38-43	2007
横山昌幸	高分子ミセルターゲティング	炎症と免疫	16	21-26	2008
白石貢一、横山昌幸	ターゲティングを用いたMRI造影剤	Drug Delivery System	23	33-39	2008
H. L. Ma, Y. Maitani, et al.	Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles	J. Biomed. Mater. Res. A.	84	598-606	2008
H. L. Ma, Y. Maitani, et al.	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate; Pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers.	International Journal of Pharmaceutics	354	217-226	2008
T. Okuda, S. Kawakami, M. Yokoyama, et al.	Block copolymer design for stable encapsulation of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide into polymeric micelles in mice	International Journal of Pharmaceutics	in press		2008
T. Terada, S. Kawakami, et al.	Optimization of tumor-selective targeting by basic fibroblast growth factor-binding peptide grafted PEGylated liposomes	Journal of Controlled Release	119	262-270	2007
W. Wijagkanalan, S. Kawakami, et al.	Efficient targeting to alveolar macrophages by intratracheal administration of mannosylated liposomes in rats, Journal of Controlled Release	Journal of Controlled Release	125	121-130	2008

Shio Y., Kawaguchi, T., et al.	Cabohydrate status detecting by PNA is changeable through cancer prognosis from primary to metastatic nodal site: A possible prognostic factor in patient with node- positive lung adenocarcinoma	Lung Cancer	57	187-192	2007
Hamaguchi T, et al.	A Phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel- incorporating micellar nanoparticle formulation.	Br J Cancer	97	170-176	2007
Minami H, Hamaguchi T, et al.	Irinotecan pharmacokinetics/pha rmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: role of UGT1A1*6 and *28. . , 20	Pharmacogene tics and Genomics	17	497-504	2007
Sai K, Hamaguchi T, et al.	Impact of CYP3A4 haplotypes on irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer Patients. Cancer Chemother Pharmacol	Cancer Chemother Pharmacol	in press		2008
濱口哲弥	臨床試験に入ったミセル体 (タキソール内包ミセルNK105)	Mebio Oncology	4	58-67	2007
濱口哲弥	ポリマーミセル抗がん剤の作用機序と臨床導入	血液・腫瘍科	54	702-709	2007