

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

光線力学的治療に有効な
多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発
に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 小 野 努

平成 20 (2008) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発に関する研究	----- 1
小野 努	
II. 分担研究報告	
1. PDTによる殺細胞効果を決定付けている因子の解析ならびにその最適化に関する研究	----- 10
大河原賢一	
2. レチノイド化合物の合成とその活性評価に関する研究	----- 16
加来田博貴	
3. 機能性ポルフィリン内封ナノ運搬体の調製プロセスの構築に関する研究	-- 23
小野努, 阪田功	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 32
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 36

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）
「光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発」
総括研究報告書

光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発

主任研究者 小野 努 岡山大学大学院環境学研究科資源循環学専攻 准教授

研究要旨

光線力学的治療（PDT）に必要な光増感剤の多くは疎水性が高く、腫瘍近傍へ送達させるためには、この疎水性の高い光増感剤を安定に内封した 100 nm 程度のドラッグキャリアの開発が強く求められている。また、同様に抗がん剤の多くも疎水性が高く、同じドラッグキャリア内に高効率に内封できれば、それらの協奏的な抗腫瘍効果が期待できる。そこで本研究では、血中滞留性が高く高効率で機能性ポルフィリンやレチノイド化合物を内封した光線力学的治療用ドラッグキャリア（ナノ運搬体）の創製を目的として、ナノ運搬体の調製法に関するアプローチとナノ運搬体への光照射による *in vitro* 系での殺細胞効果の検討および光増感剤とは異なる内封薬剤として殺細胞効果とは異なる作用機序を有するレチノイド誘導体の開発を検討している。

特に本年度は本プロジェクトで達成される多機能型ナノ運搬体を作製するうえで必要な各種要素技術の向上を目指し、次年度以降の検討課題である *in vivo* での評価実験に適した薬剤内封ナノ運搬体の開発を行ってきた。100 nm 以下で機能性をポルフィリン内封ポリ乳酸ナノ粒子の開発に成功し、*in vitro* 実験系において光照射による colon26 細胞に対する優れた殺細胞効果を得ることができた。また、強いレキシノイド作用を有するレチノイド誘導体の設計指針について知見を得ており、殺細胞効果とは異なる抗がん作用によって相乗的な効果が期待できる。

分担研究者

- (1) 大河原賢一・岡山大学大学院医歯薬総合研究科薬学系・助教
- (2) 加来田博貴・岡山大学大学院医歯薬総合研究科薬学系・助教
- (3) 阪田功・(株)光ケミカル研究所・常務取締役

感物質を腫瘍組織内部へ安定に送達する技術基盤の確立である。ナノ粒子は正常組織においては血管外へ漏出しにくい一方で、血管の透過性が亢進している腫瘍組織では血管外へと漏出するため、静脈内投与後の血中滞留性が高いナノ粒子内部に薬物を封入することで、高い腫瘍中薬物濃度を達成できることが知られている。そのため、PDT に必要なポルフィリン類を高効率で封入可能なナノ運搬体の調製技術を構築するとともに、腫瘍組織への移行の駆動力となる、高い血中濃度が維持可能な血中滞留型ナノ運搬体の創製と PDT への適用を目指している。また、疎水性薬物を高効率で内封す

A. 研究目的

光線力学的治療（PDT）は、通常の抗がん剤を用いた化学療法とは異なり、外部から腫瘍組織選択的に印加する光刺激によって局所的な抗がん効果を期待するものであり、治療成績の成否の鍵を握るのが、光増

るといった機能をさらに活用するために、殺細胞効果とは作用機序の異なる抗腫瘍効果をもたらすことの期待されるレチノイド化合物の開発も同時に行っており、複数の薬剤を併用可能な多機能型ナノ運搬体の創製にも挑戦していく。

ポルフィリン類のような光増感物質は、可視光照射により溶存酸素から一重項酸素を生成し、腫瘍細胞へ傷害を与えて死滅させることができる。しかしながら、光増感物質の多くは脂溶性が高く、生体内に投与した際には全身に非特異的に分布するため、それらの殺細胞効果の発現部位である腫瘍組織内に集積しにくいという問題があった。そのため、効果的な治療を行うためには光増感物質を腫瘍組織内へ安定に送達可能なドラッグキャリアの開発が不可欠であり、本治療法の正否の鍵を握っている。光増感物質を高効率で内封し、高い血中滞留性を付与することで腫瘍組織への送達効率を向上させ、光のような外部刺激による副作用の少ない局所的治療としてPDTの利用を考えている。このような目的のために、界面・コロイド化学を駆使した材料開発、薬剤の体内動態の制御および抗腫瘍効果の高い薬剤の合成技術を集結し、ナノスケールの薬物運搬体の設計を化学的、薬学的にアプローチしていく点が本研究の特徴であり、若手研究者の連携を通じて大きなシナジー効果が期待される。

まず本年度は、ポルフィリンの内封が可能で静脈投与が可能な100 nm程度のナノ運搬体を高効率で調製するプロセスの開発とPDTへの有効性の評価を目的として *in vitro* での殺細胞効果について検討を行ってきた。具体的には、ポルフィリンを高効率で内封する100 nm程度のO/Wエマルションや生分解性微粒子を高精度で調製するプロセスを構築し、得られた機能性ポルフィリン内封ナノ運搬体の分散した水溶液中へ外部から光照射することによって、

colon26 細胞の殺細胞効果について検討した。

さらに、作用機序の異なる抗腫瘍効果が期待されるレチノイド化合物の開発も行い、高いレチノイド作用を有するレチノイド誘導体の開発に成功しており、疎水性化合物の高効率な内封が可能なナノキャリアが得られた際に、機能性ポルフィリンと同時に内封して相乗効果を示す潜在能力を評価するため、細胞増殖抑制効果に関する検討を行った。

B. 研究方法

機能性ポルフィリン内封ナノ運搬体の調製

光増感物質のひとつであるポルフィリンは水溶性が非常に低い一方で、油への溶解性は比較的高いことから、水中油滴型(O/W)エマルションの調製をベースにして最終的なナノ運搬体の開発をあらゆる方法でアプローチした。特に、本年度の検討目標として、ポルフィリン含有ナノキャリアを細胞培養培地中に添加したとき、光照射によって培養細胞の死滅を誘導することができるかを検討する *in vitro* 実験系での評価がある。そのため、様々な包括様式、徐放挙動を有するナノ運搬体候補を開発し、実際に *in vitro* 系において殺細胞効果の優れたキャリア構造の設計指針を導くことが重要である。

まず、光増感物質であるポルフィリン誘導体については、光の吸収効率を考慮して600 nm付近で効率的に光を吸収し、一重項酸素を発生させることができるように修飾された機能性ポルフィリンが(株)光ケミカル研究所の阪田によって開発され、その供与を受け、大河原、小野の研究グループでナノ運搬体の開発を行った。

大河原によって、エマルジョンから放出を受けた後、細胞内に取り込まれたポルフィリンによる PDT 作用を検証するため、エマルジョン調製時に、エマルジョンの安定性に関わる因子である界面活性剤の量を少なめに設定し、ポルフィリンの放出性に富むエマルジョンを作製して試みた。油相としては、トリアセチン、トリブチリン、トリカプロイン、トリカプリリンのなかで、最もポルフィリンの溶解性に富むことが明らかとなったトリカプリリンを、界面活性剤としては一般的に汎用されているツイーン80をそれぞれ選択した。ポルフィリン封入エマルジョンは、ポルフィリンを溶解させた油相にツイーン80を添加後、2.25%グリセリン溶液中に滴下し、プローブ型ソニケーターにより超音波照射することにより調製した。

また、小野は種々のナノ粒子調製法の中から、界面張力の温度変化を利用して微細なエマルジョン調製が可能な転相温度乳化法に着目して100 nm程度のポリスチレン粒子調製を試み、さらに血中滞留性に優れた効果を示すPEG鎖と生体内での代謝分解が可能なポリ乳酸鎖を併せ持つジブロックポリマーを用いてポリ乳酸をコアとするナノ粒子の調製も試みた。

粒子径ならびに表面電荷の指標となるゼータ電位の測定は Malvern 社の Zetasizer-Nano を用いて動的光散乱法により行った。また、濃厚系での液滴径・粒子径測定には、濃厚系粒径アナライザー (FPAR) (FPAR-1200H, 大塚電子)により測定を行った。さらに、粒子として得られたものに関しては、走査型電子顕微鏡 (SEM) (S-4700, HITACHI)により粒子形状を観察した。さらに機能性ポルフィリンは所定の波長の光照射により蛍光を発することから、それらの細胞内でのイメージングを、本年度の研究費よりリリースしている蛍光顕微鏡

(BZ-8000, キーエンス)の利用も試みた。

機能性ポルフィリン内封ナノ運搬体への光照射による in vitro 殺細胞効果の評価

ポルフィリン内封エマルジョンの光照射による in vitro 殺細胞効果の評価は MTT assay により行った。実験は接着細胞である colon26 細胞を 96 穴プレートに播種後、24 時間後にポルフィリン内封エマルジョンを一定量添加し、①24 時間後に一度メディウム交換を行うことにより細胞内に取り込まれていないポルフィリンを取り去った群 (Wash 群) と、②そのままメディウム交換を行わず細胞内に取り込まれていないポルフィリンがメディウム中にも残存する群 (No wash 群)、の両群に対し、それぞれ光を5分間照射した。光照射後12時間後における細胞生存率を求めた。一方、小野が調製を行ったポルフィリン内封ナノ粒子の光照射実験は、上述の実験手法と同様の手順で行われ、colon26 細胞を 96 穴プレートに播種後 48 時間の時点でポルフィリン封入ナノ粒子を添加し、5分ほど静置した後、光を照射し、12時間後の細胞生存率を評価した。

レチノイド誘導体の細胞増殖抑制効果の検討

加来田によって、光増感物質による PDT と異なる作用機序を有するレチノイド誘導体として、タキソール耐性肺ガンなどの治療薬候補として注目されているレチノイド X 受容体 (RXR) をターゲットとして効果的な RXR アゴニストを開発しており、PDT との相乗効果をもたらす可能性を模索するために細胞増殖抑制効果について検討した。一般的な RXR アゴニストは、テトラメチルテトラヒドロナフチル環からなる疎水性部位と RXR のアミノ酸との水素結合形成に与るカルボン酸等の極性部位から構成される。そこで、

これまでに既知の RXR に見られる共通構造をもとに、極性基であるスルホンアミド基の導入により RXR α に対し指向性の高い化合物を見出していた。しかしながら RXR 活性は既存の RXR アゴニストに比べると弱いため、さらにテトラメチルヘキセン環を開環し、イソプロピル基と極性のあるアルコキシ基を導入した化合物を用いて、毒性試験および colon26 (C26) 細胞に対する細胞増殖抑制作用について検討した。

毒性試験は、ICR マウス、SD ラットを用いて行った。1 群 $n = 4-5$ 匹に対し、化合物 NEt-3IP もしくは化合物 LGD1069 の 1% ethanol, 0.5% CMC 水溶液を 5 mL/kg で 5 日間経口投与し、体重測定を行った。動物試験の結果は、いずれも平均値 \pm SD で表記した。有意差検定は、Dunnett's multiple comparison test にて行った。

C26 細胞に対する増殖抑制作用については、対数増殖期にある C26 細胞を 0.25×10^5 の細胞数になるように計数し、96 穴マイクロタイタープレートの各ウエルに 100 μ l ずつ播種した後、最終濃度が 0.1, 1, 10, 100 μ M になるように化合物を添加した後、2 日間炭酸ガスインキュベーター内にて培養した。その後、Cell Counting Kit-8 溶液 (Dojin) を各ウエルに 10 μ l ずつ添加し、炭酸ガスインキュベーター内で 4 時間呈色反応を行ったのち、マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の吸光度を測定した。化合物非投与群との増殖能を比較し、化合物の増殖抑制能を評価した。

C. 研究結果

機能性ポルフィリン内封ナノ運搬体の調製

トリカプリリン、ツイーン 80 を用いて調製した機能性ポルフィリン内封エマルションは、平均粒子径として 442 nm でゼ

ータ電位はおよそ -3.2 mV を示した。

また、転相温度乳化法を用いたナノエマルションは、POE(10)NPE とヘキサデカン、スチレンを用いて 100 nm 以下の粒径を有する単分散 O/W エマルションの調製を達成している。しかしながら、細胞毒性の少ない油相では同様の転相温度が得られず、機能性ポルフィリンを内封することは可能であっても、*in vitro* 実験および *in vivo* 実験で実用可能な組成でのナノエマルション化は更なる検討を有する。そこで、ナノエマルション液滴を利用してミニエマルション重合を行い、ナノ粒子化することでポルフィリンの内封を試みたが、ミニエマルション重合時にポリスチレンが溶媒と相分離を起こすため、疎水性化合物の高い内封効率を得るためには両者の溶解度を考慮して組成を操作する必要がある。

一方、PEG-PLA のジブロックコポリマーによって水溶液中で酢酸エチルを油相とした O/W エマルション分散系を構築し、溶媒除去によってポリ乳酸を疎水性コアとしたナノ粒子中へポルフィリンが内封可能なことが明らかとなった。用いるコポリマー組成を制御することで、60 nm 程度の粒径まで小さく調製することが可能であり、ポルフィリンの内封効率も 87% に達することが示された。従来法に比べても大幅に高い内封率であり、安定に水溶液中に分散していることから、粒子表面が親水性高分子である PEG 層で覆われていることが示唆される。

機能性ポルフィリン内封ナノ運搬体への光照射による *in vitro* 殺細胞効果の評価

エマルション添加後メディアウム交換をしない no wash 群、つまり細胞内に移行したポルフィリンのみならず、細胞外に存在するポルフィリンから産生される一重項酸素も殺細胞効果に影響を与えうる

条件にて光照射を行った場合の結果から、ポルフィリン内封エマルジョンに光を照射した場合の生存率が、光を照射していない群と比較して顕著に減少している一方で、その他の群においては光照射の影響は認められなかった。ネガティブコントロールとしては細胞にメディウムのみを添加したものをを用いており、これらの結果より、ポルフィリンの存在しない系での光照射による細胞毒性は認められないこと、さらに光照射により認められた殺細胞効果は、ポルフィリンから産生された一重項酸素に起因するものと推察された。

さらに、エマルジョン添加後 24 時間においてメディウム交換をする Wash 群、つまり細胞内に移行したポルフィリンから産生される一重項酸素のみが殺細胞効果を発現する条件にて光照射を行った場合の結果から、先ほどの結果と概ね同様であったが、ポルフィリン内封エマルジョン添加後に光を照射した場合の細胞生存率の絶対値が前述の実験結果より若干高い傾向が認められた。この結果は、前者で認められた殺細胞効果の少なくとも一部が、細胞外に存在するポルフィリンから産生された一重項酸素に起因することを示唆するものであった。したがって、ポルフィリンが光照射により殺細胞効果を発揮するために、ポルフィリン自身が微粒子の中から放出される必要があるか否かに関しては今後の検討課題となった。本研究結果は、ポルフィリン内封ナノ粒子の開発設計指針に深く関与するものであり、ポルフィリンの存在位置を制御することができれば更なる殺細胞効果の向上も期待できる。

また、小野によって調製されたポルフィリン含有ナノ粒子はポルフィリンの放出が極めて遅いと考えられ、上記の不明点を明らかにするための有効なツールと

してポルフィリン内封ナノ粒子の評価を行った。つまり、ポルフィリン封入ポリマーミセルを細胞に添加後、光照射により殺細胞効果が認められるならば、ポルフィリンはその殺細胞効果を発現するために、光照射前に細胞内に移行する必要があることになる。そこでポルフィリン内封ナノ粒子を用いて同様の実験を行い、前述の実験と同様、少なくとも一部が細胞外に存在するポルフィリンから産生された一重項酸素に起因することが示唆された。

レチノイド誘導体の細胞増殖抑制効果の検討

Net-3IP に対してマウスを用いた急性毒性試験を行ったところ、300 mg/kg の腹腔内投与においても顕著な毒性が認められなかった。また、ラットを用いた経口吸収試験の結果から、NEt-3IP 30 mg/kg 投与群では経口投与 0.5 時間後に最大血中濃度 17 μM (5.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示し、3 mg/kg 投与群では 1 時間後に最大血中濃度 0.8 μM (0.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示した。以上のことから、NEt-3IP は比較的速やかに血中へ移行することが確認され、経口投与においてその薬理効果が期待された。

開発化合物である NEt-3IP によるマウス結腸がん細胞 colon26 に対する増殖抑制作用を調べたところ、100 μM でも顕著な抑制は観察できなかった。今後はさらに低濃度で細胞増殖抑制作用をもたらすことのできる高いレチノイド作用を有する化合物の開発を精力的に進めていく。

D. 考察

以上、本年度の結果より、in vivo 実験に適用可能なポルフィリン内封ナノキャリアの基盤技術が整いつつある。しかし

ながら、ナノ運搬体に内封されたポルフィリンの殺細胞効果における作用機序が未だ解明されておらず、作用機序を明らかにすることによって、さらに高機能なPDT用ナノ運搬体の開発が可能になると期待される。今後は、ナノ運搬体へのポルフィリンの導入方法や分布状態の制御について検討していきたいと考えている。

なかでも特に、ポルフィリンの放出性に極めて乏しいポルフィリン内封ナノ粒子を利用した場合にも、非常に高い殺細胞効果が認められたことから、ナノ粒子中へのポルフィリン必要量を算出し、十分な効果をもたらす導入量の最適化を行うことで、可能な限りポルフィリンを少なくした、光過敏症などの副作用低減が可能なナノ運搬体設計も実現できる。

しかしながら、ポルフィリンに対する光照射により発生する一重項酸素は、非常に半減期が短く、生成後の拡散距離も数ミクロン程度と非常に短いことから、光照射時に少なくとも一部のミセルが細胞近傍に存在していた可能性は排除できない。ナノ粒子は緩衝液中において約200 nmの微細な粒子として存在するのに対し、メディウム中においては約3ミクロンの重合体を形成していることが明らかとなった。そのため、*in vitro* 実験系にて認められた高い殺細胞効果には、重合化により巨大化したポリ乳酸粒子が沈降し、ディッシュ底に存在する細胞の近傍に接近したことが一部関与していた可能性が考えられる。

今後はナノ粒子の調製法を制御することによって、再分散後も水溶液中においてナノレベルで分散可能なナノメディシン創製を実現していきたい。さらに、本ナノ粒子の特徴である疎水性化合物の高い包括率を活かして、高活性なレチノイド誘導体の利用により、さらなる相乗効

果が期待できる。

E. 結論

本年度の研究成果として、機能性ポルフィリンを高効率で含有可能なナノキャリアを約100 nmで調製する手法を複数開発した。また、colon26細胞を用いた*in vitro* 実験系により、ポルフィリン含有ナノキャリアを用いた殺細胞効果も確認された。しかしながら、ナノキャリアからの殺細胞作用機序については未だ不明な点が多い。今後は、ナノキャリア中の光増感物質を効果的に活用できるナノ運搬体の設計指針を明確にする必要がある。このような作用機序まで考慮した光増感物質内封ドラッグキャリアの開発はこれまで国内外において詳細には行われておらず、PDTに有効なナノ運搬体を化学的なアプローチで開発していくことは本研究の特徴と言える。

従って、来年度以降はポルフィリン含有ナノキャリアからの作用機序を解明していくとともに、*in vitro* 系での実験結果をフィードバックしながら、血中滞留性が高く生体への安全性と光による殺細胞効果に優れたナノマテリアルの設計と調製プロセスの最適化を重点的に行っていく。また同時に、良好な殺細胞効果を示したDDSキャリア候補を用いて、*in vivo* での体内動態評価とPDTによる抗腫瘍効果についても検討を行っていく。さらに、本製剤は脂溶性化合物の高効率封入と腫瘍組織への蓄積性の改善を同時に達成するものであり、本年度得られた殺細胞効果とは異なる作用機序を有するレチノイド化合物を利用して、ナノ運搬体内に同時に内封することによって相乗的な抗腫瘍効果が期待できる。それゆえ、相乗的な抗腫瘍効果が期待できる多剤併用についても、*in vivo* および *in vitro* 実験系を通して追求していく。本年度の研究目標は概ねクリアできていると言える。これま

で明らかとなった知見は、今後、PD Tに有効なナノ運搬体を作製していく展開においても大変有益な基礎的知見を与えるものであると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) S. Nagayama, K. Ogawara, K. Minato, Y. Fukuoka, Y. Takakura, M. Hashida, K. Higaki, T. Kimura, Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor. *Int. J. Pharm.*, 329, 192-198 (2007)

2) K. Furumoto, J. Yokoe, K. Ogawara, S. Amano, M. Takaguchi, K. Higaki, T. Kai and T. Kimura, Effect of coupling of albumin onto surface of PEG liposome on its in-vivo disposition. *Int. J. Pharm.*, 329, 110-116 (2007)

3) S. Nagayama, K. Ogawara, Y. Fukuoka, K. Higaki and T. Kimura, Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. *Int. J. Pharm.*, 342, 215-221 (2007)

4) S. Mutsuo, K. Yamamoto, T. Furuzono, T. Kimura, T. Ono, A. Kishida, Pressure-induced molecular assembly of hydrogen-bonded polymers. *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, 49, 743-750 (2008)

5) K. Takamatsu, A. Takano, N. Yakushiji,

K. Morishita, N. Matsuura, M. Makishima, H.I. Ali, E. Akaho, A. Tai, K. Sasaki, H. Kakuta. Reduction of Lipophilicity at the Lipophilic Domain of RXR Agonists Enables Production of Subtype Preference: RXR α -Preferential Agonist Possessing a Sulfonamide Moiety. *ChemMedChem.* 14, 454-460 (2008).

6) E. Kamio, A. Kato, S. Yonemura, T. Ono, H. Yoshizawa, Preparation of monodisperse crosslinked polymelamine microcapsules by phase separation method., *Colloid Polym. Sci.*, DOI 10.1007/s00396-008-1837-7 (2008)

7) K. Takamatsu, A. Takano, N. Yakushiji, K. Morohashi, K. Morishita, N. Matsuura, M. Makishima, A. Tai, K. Sasaki, H. Kakuta. The First Potent Subtype-Selective Retinoid X Receptor (RXR) Agonist Possessing a 3-Isopropoxy-4-isopropylphenylamino Moiety, NEt-3IP (RXR β / β -dual agonist), *ChemMedChem*. In press

2. 学会発表

1) Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, Hepatic disposition characteristics of Liposomes Coated with Mixture of Hydrophilic Polymers. 日本薬剤学会第22年会、埼玉、2007年5月21-23日

2) 運 敬太, 大河原賢一, 西川元也, 高倉喜信, 檜垣和孝, 木村聰城郎、P-糖タンパク質高発現がん細胞に対するドキシルピシン内封 PEG 修飾リポソームの in vivo 抗腫瘍効果に関する検討、第23回日

本 DDS 学会、熊本、2007 年 6 月 14-15 日

3) 渡 亮輔, 寺垣拓哉, 大河原賢一, 横江淳一, 甲斐俊哉, 檜垣和孝, 木村聰城郎、アルブミン修飾 PEG リポソームの体内動態特性とその抗腫瘍効果の評価、第 23 回日本 DDS 学会、熊本、2007 年 6 月 14-15 日

4) 村中誠, 小野努, 水酸基を有する高分子安定剤を用いたアニオン分散重合による単分散ポリ(D, L-乳酸)ミクロスフェアの調製, 第 56 回高分子学会, 名古屋, 2007 年 9 月 19-21 日

5) Ken-ichi Ogawara, Susumu Nagayama, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, Time-Dependent Changes in Opsonin Amount Associated on Nanoparticles Alter Their Hepatic Uptake Characteristics. 8th International ISSX Meeting, Sendai, 2007 年 10 月 9-12 日

6) Keita Un, Takaaki Nakao, Ken-ichi Ogawara, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, In Vivo Anti-Tumor Effects of PEG-Modified Liposomal Doxorubicin on P-Glycoprotein Over-Expressing Tumor-Bearing Mice. 8th International ISSX Meeting, Sendai, 2007 年 10 月 9-12 日

7) J. Kubota, A. Kato, T. Ono, Phase inversion temperature (PIT) method utilized preparation of O/W nano-emulsion by microreactor system, 2007 AIChE annual meeting, Salt Lake City, USA, 2007 年 11 月 4-8 日

8) 富田恵介, 小野努, ポリアスパラギン酸ナトリウムを主鎖に持つマクロモノマーを用いた高分子微粒子の調製, 2007 年日本化学会西日本大会, 岡山, 2007 年 11 月 10-11 日

9) 加来田博貴, 高松佳代, 高野敦史, 薬師寺信匡, 森下健一, 師橋一徳, 大澤史宜, 原田隼, 藤井周司, 鄭曉霞, 松浦信康, 槇島誠, Hamed Ismail Ali, 赤穂榮一, 永澤秀子, 杉本幸雄, 田井章博, 佐々木健二, RXR α / β 選択的アゴニスト NEt-3IP の開発と生理活性
第 18 回日本レチノイド研究会、東京、2007 年 11 月 23-24 日

10) 高松佳代, 高野敦史, 薬師寺信匡, 森下健一, 大澤史宜, 藤井周司, 松浦信康, 槇島誠, Hamed Ismail Ali, 赤穂榮一, 田井章博, 佐々木健二, 加来田博貴, RXR アゴニスト脂溶性部位の脂溶性低減による RXR サブタイプ指向性の創出
—リンカー部位にスルホンアミド基を有する—
第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム、相模原、2007 年 11 月 27-29 日

11) 高松佳代, 高野敦史, 薬師寺信匡, 森下健一, 師橋一徳, 大澤史宜, 藤井周司, 松浦信康, 槇島誠, 田井章博, 佐々木健二, 加来田博貴, 高活性 RXR α / β 選択的アゴニスト NEt-3IP の開発
—脂溶性部位にアルコキシ基を有する—
第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム、相模原、2007 年 11 月 27-29 日

12) 高野敦史, 原田隼, 鄭曉霞, 薬師寺信匡, 森下健一, 大澤史宜, 藤井周司, 杉本幸雄, 田井章博, 槇島誠, 永澤秀子, 佐々木健二, 加来田博貴, RXR α / β デュアルアゴニスト NEt-3IP の抗炎症及び抗が

ん作用の検証、第 26 回メディシナルケミ
ストリーシンポジウム、相模原、2007 年
11 月 27-29 日

13) 富田恵介, 小野努, 末端にビニル基
を導入した縮合系マクロモノマーの合成
と微粒子調製への応用, 高分子材料のため
の俯瞰的シンポジウム, 東京, 2008 年
1 月 10-11 日

14) 村中誠, 小野努, 単分散ポリ乳酸ミ
クロスフェアの調製における高分子分散
剤の分子設計, 高分子材料のための俯瞰
的シンポジウム, 東京, 2008 年 1 月 10-11
日

15) 宇留嶋創, 小野努, 無乳化共重合に
よる単分散機能性微粒子の調製, 第 10 回
化学工学会学生発表会, 大阪, 2008 年 3
月 2 日

16) 大浦浩平, 久保田潤, 小野努, 田中
秀雄, 界面活性能を有する TEMPO 誘導体
の合成及び不均相重合への応用, 化学工
学会第 73 年会, 浜松, 2008 年 3 月 17-19
日

17) 久野優子, 久保田潤, 小野努, 転相
温度乳化法を適用したミニエマルジョン
重合による高分子ナノ粒子の調製, 化学
工学会第 73 年会, 浜松, 2008 年 3 月 17-19
日

18) 杉田直輝, 谷元史明, 小野努, 主鎖
末端に疎水基を導入した温度応答性ポリ
アスパラギン酸誘導体の会合特性, 化学
工学会第 73 年会, 浜松, 2008 年 3 月 17-19
日

19) 高松佳代、高野敦史、薬師寺信匡、
師橋一徳、森下健一、大澤史宜、藤井周

司、松浦信康、榎島 誠、永澤秀子、杉
本幸雄、田井章博、佐々木健二、加来田
博貴、RXR α / β デュアルアゴニスト NEt-3IP
の開発と生理活性評価

第 128 回日本薬学会、横浜、2008 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. 実用新案特許
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・ナノメディシン研究）

「光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発」

分担研究報告書

PDTによる殺細胞効果を決定付けている因子の解析ならびにその最適化

分担研究者：大河原 賢一 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 薬学系

研究要旨

本年度の研究課題として、本格的な *in vivo* 実験に先立ち、PDTによる治療効果の最も重要な部分である、「光照射により発生する一重項酸素による殺細胞効果を決定付けている因子の解析ならびにその最適化」に焦点を絞り、*in vitro* 条件下にて種々の検討を行った。調製したポルフィリン封入エマルジョンを用いた検討により、光照射により認められた殺細胞効果の少なくとも一部に、細胞外に存在するポルフィリンから産生された一重項酸素によるものが含まれていることが示唆された。そこで環境理工学部小野先生の研究室にて別途検討が進められていたポルフィリンの放出性に極めて乏しいポルフィリン封入ポリマーミセルを利用することによって、ポルフィリンが光照射により殺細胞効果を発揮するために、ポルフィリン自身が微粒子の中から放出される必要があるか否かという疑問点に関して検討を加えた。その結果、ポルフィリン封入ポリマーミセルを用いた場合においても、顕著な殺細胞効果が認められ、本薬剤が非常に高い殺細胞作用を有することが示唆された。本結果は、光照射によりポルフィリンが殺細胞効果を示すために、必ずしもポルフィリンが粒子から放出を受ける必要のないことを示唆するものである。

A. 研究目的

悪性腫瘍（がん）に対する従来型治療法では、抗がん剤が全身に分布することによる激しい副作用や、放射線被曝による正常細胞に対するダメージ等が避けられない。これらの問題点を製剤学的に改善し、必要な量の薬物を、必要とする臓器や組織に、必要な時間だけ作用させる薬物送達システム(DDS)の概念が、患者のQOLの向上の観点から注目を集めている。

Photo Dynamic Therapy (PDT)を利用したがん治療は、通常の抗がん剤を用いた化学療法とは異なり、外部から腫瘍組織選択的に印加する光刺激によって局所的な抗がん効果を期待するものであるものの、実際の治療効果は、光刺激を印加す

る段階において標的組織である腫瘍組織に存在する光増感物質の量に依存する。したがって PDT 治療成績の成否の鍵を握るのも、光増感物質を腫瘍組織内部へ安定に送達する DDS 技術基盤の確立であると言える。

ナノ粒子は正常組織においては血管外へ漏出しにくい一方で、血管の透過性が亢進している腫瘍組織では血管外へと漏出するため、静脈内投与後の血中滞留性が高いナノ粒子内部に薬物を封入することで、高い腫瘍中薬物濃度を達成できることが知られている。本研究では、PDTに必要なポルフィリン類を高効率で封入可能なナノ運搬体の調製技術を構築するとともに、腫瘍組織への移行の駆動力と

なる、高い血中濃度が維持可能な血中滞留型ナノ運搬体の創製を目指す。このデリバリー手法の技術革新によって PDT による治療効果が大幅に向上し、患者の QOL の向上が期待される。

我々は本年度の研究課題として、本格的な *in vivo* 実験に先立ち、PDT による治療効果の最も重要な部分である、「光照射により発生する一重項酸素による殺細胞効果を決定付けている因子の解析ならびにその最適化」に焦点を絞り、*in vitro* 条件下にて種々の検討を行うことにした。

B. 研究方法

ポルフィリン封入エマルジョンの調製

今回検討に用いたポルフィリンは水溶性が非常に低い一方で、油への溶解性は比較的高いことから、水中油滴型エマルジョンを調製し実験に用いた。本年度の検討項目においては、エマルジョンから放出を受けた後、細胞内に取り込まれたポルフィリンによる PDT 作用を検証することが重要な目的であるため、エマルジョン調製時に、エマルジョンの安定性に関わる因子である界面活性剤の量を少なめに設定し、ポルフィリンの放出性に富むエマルジョンを得た。油相としては、検討を加えたもの（トリアセチン、トリブチリン、トリカプロイン、トリカプリリン）のなかで、最もポルフィリンの溶解性に富むことが明らかとなったトリカプリリンを、界面活性剤としては一般的に汎用されているツイーン 80 をそれぞれ選択した。ポルフィリン封入エマルジョンは、ポルフィリンを溶解させた油相にツイーン 80 を添加後、2.25%グリセリン溶液中に滴下し、プローブ型ソニケーターにより超音波照射することにより調製した。

ポルフィリン封入ポリマーミセルの調製

ポリマーミセルは環境理工学部小野先生より御供与頂いた。以下に調製方法を簡単に示す。予め調製しておいたポリ乳酸（疎水部）とポリエチレンオキサイド（親水部）からなるブロックポリマー並びにポルフィリンを酢酸エチルに溶解し、それを水中に滴下することにより水中油滴型のエマルジョンを形成した。その後、遠心分離により油滴を分離し、水を交換する作業を数回繰り返すことにより酢酸エチルを完全に除去し、最終的にポルフィリン封入ポリマーミセルを得た。

粒子径・Z 電位の測定

粒子径ならびに表面電荷の指標となるゼータ電位の測定は Malvern 社の Zetasizer-Nano を用いて動的光散乱法により行った。

ポルフィリン封入エマルジョンの光照射による *in vitro* 殺細胞効果の評価

ポルフィリン封入エマルジョンの光照射による *in vitro* 殺細胞効果の評価は MTT assay により行った。実験は接着細胞である colon26 細胞を 96 穴プレートに播種後、24 時間後にポルフィリン封入エマルジョンを一定量添加し、①24 時間後に一度メディウム交換を行うことにより細胞内に取り込まれていないポルフィリンを取り去った群（Wash 群）と、②そのままメディウム交換を行わず細胞内に取り込まれていないポルフィリンがメディウム中にも残存する群（No wash 群）、の両群に対し、それぞれ光を 5 分間照射した。光照射後 12 時間後における細胞生存率を求めた。

ポルフィリン封入ポリマーミセルの光照射による *in vitro* 殺細胞効果の評価

ポルフィリン封入ポリマーミセルの光

照射による in vitro 殺細胞効果の評価は上述した MTT アッセイにより行った。実験は接着細胞である colon26 細胞を 96 穴プレートに播種後 48 時間の時点でポルフィリン封入ポリマーミセルを添加し、5 分ほど静置した後、光を照射し、12 時間後の細胞生存率を評価した。

C. 研究結果

調製したポルフィリン封入エマルシヨンの物性

調製したポルフィリン封入エマルシヨンの調製法法の概略と得られたエマルシヨンの物理化学的特性をまとめて示した。

[調製方法]

Porphyrin	0.266 mg
Tricaprylin	400 mg
Tween 80	20 mg

これら混液をグリセリン溶液中に滴下

↓

プローブ型ソニケーターにより超音波照射 (50W、30分)

[得られたエマルシヨンの物性]

平均粒子径：442 nm
Z 電位：-3.2mV

ポルフィリン封入エマルシヨンの光照射による in vitro 殺細胞効果の評価

まずはエマルシヨン添加後メディウム交換をしない no wash 群、つまり細胞内に移行したポルフィリンのみならず、細胞外に存在するポルフィリンから産生される一重項酸素も殺細胞効果に影響を与える条件にて、光照射を行った場合の結果を図 1 に示した。尚、ネガティブコントロールとしては細胞にメディウムのみを添加したものをを用いた。結果、ポル

フィリン封入エマルシヨンに光を照射した場合の生存率が、光を照射していない群と比較して顕著に減少している一方で、その他の群においては光照射の影響は認められなかった。これらの結果より、ポルフィリンの存在しない系での光照射による細胞毒性は認められないこと、さらに光照射により認められた殺細胞効果は、ポルフィリンから産生された一重項酸素に起因するものと推察された。

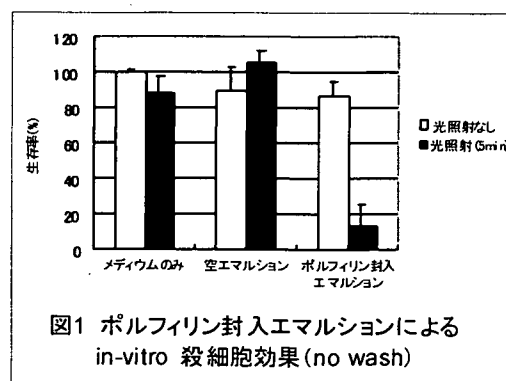


図1 ポルフィリン封入エマルシヨンによる in-vitro 殺細胞効果 (no wash)

次にエマルシヨン添加後 24 時間においてメディウム交換をする Wash 群、つまり細胞内に移行したポルフィリンから産生される一重項酸素のみが殺細胞効果を発現する条件にて光照射を行った場合の結果を図 2 に示した。得られた結果は、先ほどの結果と概ね同様であったが、ポルフィリン封入エマルシヨン添加後に光を照射した場合の細胞生存率の絶対値が、図 1 の結果より若干高い傾向が認められた。この結果は、図 1 にて認められた殺細胞効果の少なくとも一部に、細胞外に存在するポルフィリンから産生された一重項酸素によるものが含まれていることを示唆するものであった。したがって、ポルフィリンが光照射により殺細胞効果を発揮するために、ポルフィリン自身が微粒子の中から放出される必要があるか

否かに関しては、これらの結果からのみでは、明確な結論を見出すには至らなかった。

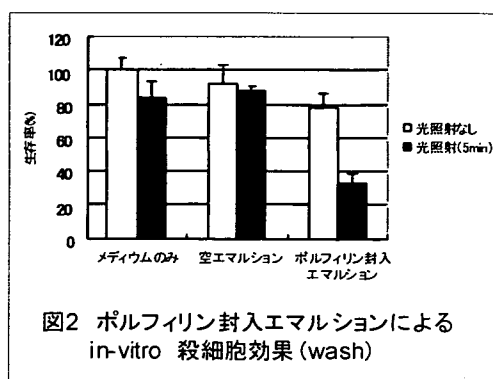


図2 ポルフィリン封入エマルジョンによる in-vitro 殺細胞効果 (wash)

ポルフィリン封入ポリマーミセルの活用

環境理工学部小野先生の研究室にて別途検討が進められていたポルフィリン封入ポリマーミセルの大きな特徴として、ポルフィリンの放出性に極めて乏しいことが挙げられる。そこで我々は、上記の不明点を明らかにするための有効なツールとしてポルフィリン封入ポリマーミセルが活用できると判断した。つまり、ポルフィリン封入ポリマーミセルを細胞に添加後、光照射により殺細胞効果が認められるならば、ポルフィリンはその殺細胞効果を発現するために、光照射前に細胞内に移行する必要がないことになる。そこで次にポルフィリン封入ポリマーミセルを用いて同様の実験を行うことにした。

ポルフィリン封入ポリマーミセルの光照射による in vitro 殺細胞効果の評価

小野先生の研究室より供与頂いたポルフィリン封入ポリマーミセルを細胞に添加後、5分間静置の後、光照射を行った場合における in vitro 殺細胞効果を評価した結果を図3に示した。実験は先述し

た方法同様にMTTアッセイにより行った。

検討の結果、ポルフィリン封入ポリマーミセルを用いた場合においても、顕著な殺細胞効果が認められた。さらに細胞生存率の絶対値においても非常に低い値が得られ、本製剤が非常に高い殺細胞作用を有することが示唆された。本結果は、光照射によりポルフィリンが殺細胞効果を示すために、必ずしもポルフィリンが粒子から放出を受ける必要のないことを示唆するものであり、非常に興味深いものであった。

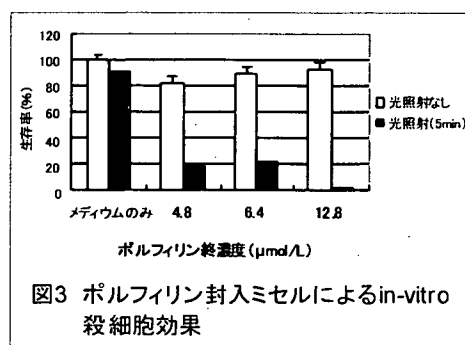


図3 ポルフィリン封入ミセルによる in-vitro 殺細胞効果

D. 考察

図1, 2に示した結果より、図1にて認められた殺細胞効果の少なくとも一部に、細胞外に存在するポルフィリンから産生された一重項酸素によるものが含まれていることが示唆された。

そこで環境理工学部小野先生の研究室にて別途検討が進められていたポルフィリンの放出性に極めて乏しいポルフィリン封入ポリマーミセルを利用することによって、ポルフィリンが光照射により殺細胞効果を発揮するために、ポルフィリン自身が微粒子の中から放出される必要があるか否かという疑問点に関して検討を加えることにした。

その結果、ポルフィリン封入ポリマー

ミセルにより非常に高い殺細胞効果が認められた。しかしながら、ポルフィリンに対する光照射により発生する一重項酸素は、非常に半減期が短く、生成後の拡散距離も数ミクロン程度と非常に短いことから、光照射時に少なくとも一部のミセルが細胞近傍に存在していた可能性が示唆された。そこで検討に用いたポルフィリン封入ポリマーミセルのメディウム中での見かけの粒子径を測定した。結果、ミセルは緩衝液中において約 200 nm の微細な粒子として存在するのに対し、メディウム中においては約 3 ミクロンの重合体を形成していることが明らかとなった。したがって、in vitro にて認められた高い殺細胞効果には、重合化により巨大化したミセルが沈降し、ディッシュ底に存在する細胞の近傍に接近したことが一部関与していた可能性が考えられた。

今後はメディウム中にて重合化を惹起しないミセルの処方方を小野先生のグループにて再検討して頂き、同様の実験を実施する必要があると考えられ、これらは次のステップの検討課題であろう。

E. 結論

本研究の最終到達目標は、脂溶性ポルフィリンを効率的に内封した微粒子製剤を調製すること、さらに粒子表面を適切に表面修飾し、その血中滞留性を改善することにより、ポルフィリンを高濃度に腫瘍組織に蓄積させることである。これらの条件を満たせば、適切な条件で PDT を行うことにより、その治療効果の最適化が達成できると考えられる。したがって、本年度の実施項目により明らかとなった知見は、今後の展開に対して大変有益な基礎的知見を与えるものであると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) S. Nagayama, K. Ogawara, K. Minato, Y. Fukuoka, Y. Takakura, M. Hashida, K. Higaki, T. Kimura, Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor. *Int. J. Pharm.*, 329, 192-198 (2007)

2) K. Furumoto, J. Yokoe, K. Ogawara, S. Amano, M. Takaguchi, K. Higaki, T. Kai and T. Kimura, Effect of coupling of albumin onto surface of PEG liposome on its in-vivo disposition. *Int. J. Pharm.*, 329, 110-116 (2007)

3) S. Nagayama, K. Ogawara, Y. Fukuoka, K. Higaki and T. Kimura, Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. *Int. J. Pharm.*, 342, 215-221 (2007)

2. 学会発表

1) Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, Hepatic disposition characteristics of Liposomes Coated with Mixture of Hydrophilic Polymers. 日本薬剤学会第 22 年会、埼玉、2007 年 5 月 21-23 日

2) 運 敬太, 大河原賢一, 西川元也, 高倉喜信, 檜垣和孝, 木村聰城郎, P-糖タ

ンパク質高発現がん細胞に対するドキソルビシン内封 PEG 修飾リポソームの in vivo 抗腫瘍効果に関する検討、第 23 回日本 DDS 学会、熊本、2007 年 6 月 14-15 日

3) 渡 亮輔, 寺垣拓哉, 大河原賢一, 横江淳一, 甲斐俊哉, 檜垣和孝, 木村聡城郎、アルブミン修飾 PEG リポソームの体内動態特性とその抗腫瘍効果の評価、第 23 回日本 DDS 学会、熊本、2007 年 6 月 14-15 日

4) Ken-ichi Ogawara, Susumu Nagayama, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, Time-Dependent Changes in Opsonin Amount Associated on Nanoparticles Alter Their Hepatic Uptake Characteristics. 8th International ISSX Meeting, Sendai, 2007 年 10 月 9-12 日

5) Keita Un, Takaaki Nakao, Ken-ichi Ogawara, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, In Vivo Anti-Tumor Effects of PEG-Modified Liposomal Doxorubicin on P-Glycoprotein Over-Expressing Tumor-Bearing Mice. 8th International ISSX Meeting, Sendai, 2007 年 10 月 9-12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

レチノイド化合物の合成とその活性評価

分担研究者：加来田 博貴 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 薬学系

研究要旨

本年度の研究課題として、PDTによる治療効果を相乗的に向上させることを目的として、光増感物質とレチノイド誘導体の両者を内封したナノカプセル製剤の創製を行うことにした。レチノイド誘導体は脂溶性の化合物であり、最近ではがん細胞の分化を誘導することにより、その異常な増殖能を抑制するという、これまでの抗がん剤とはまったく異なった作用機序を有する物質であることが明らかになっている。中でもレチノイドX受容体（以降RXRと略す）は、タモキシフェン耐性乳がん、タキソール耐性がんなどにおける治療薬ターゲットとして注目に値する受容体の一つであり、さらに通常の抗がん剤と比べると副作用発現の可能性も低いことが知られる。事実、RXRに対する作動物質（レキシノイド）であるLGD1069は、米国において難治性T細胞リンパ腫の治療薬として認可されている。しかしながら、この化合物を含む既知のレキシノイドは、いずれも分子構造的に類似し、なおかつ脂溶性の高いものであった。そのため、体内蓄積、又は血液胎盤関門通過による催奇形性が不安視された。そのような中、担当者らは既存のレキシノイドに比べ極めて低脂溶性でありながら、強いレキシノイド作用を有する化合物であるNEt-3IPの開発に成功した。本プロジェクトでは、マウス結腸がん細胞C26細胞を用いた、ナノカプセル製剤による薬効評価を予定している。そこで開発化合物であるNEt-3IPが本プロジェクトにおいて有効であるかを調べる目的で、開発化合物のC26細胞に対する細胞増殖抑制作用について調べた。

A. 研究目的

レチノイド誘導体は脂溶性の化合物であり、最近ではがん細胞の分化を誘導することにより、その異常な増殖能を抑制するという、これまでの抗がん剤とはまったく異なった作用機序を有する物質であることが明らかになっている。さらに通常の抗がん剤と比べると副作用発現の可能性も低い。そこでPDTによる治療効果を相乗的に向上させることを目的として、光増感物質とレチノイド誘導体の両者

を内封したナノカプセル製剤の創製を行うことにした。担当者はタモキシフェン耐性乳がん、タキソール耐性肺がんなどの治療薬候補として注目されているレチノイドX受容体（RXR）^{1,2}を分子標的とする化合物創出に興味をもち研究している。RXRとは、核内受容体スーパーファミリー

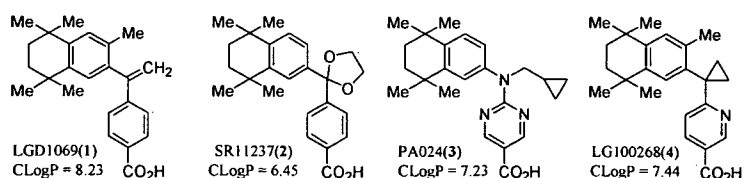


Figure 1. 既知のRXRアゴニストの分子構造。