

に属するリガンド依存性の転写調節因子の一つであり、RXR α , β , γ の3つのサブタイプが知られている^{3,4}。RXR アゴニストは、タモキシフェン耐性乳がんやタキソール耐性肺がんに有用で

あるとして注目されている。しかし、代表的な RXR アゴニスト (Figure 1) は、脂溶性が高く蓄積性が問題になりかねないこと、さらには RXR に知られる3つのサブタイプに対し選択性がないことなど、解決すべき課題が多く見られた。そこで担当者らは、サブタイプ選択性のある RXR アゴニストを開発することで、本プロジェクトの要求する新規がん治療候補物質の創出に通ずると考えた。

これまでサブタイプ選択的 RXR アゴニストが見出されていない理由として、RXR サブタイプ間でのリガンド結合部位のアミノ酸配列の相同性が極めて高いことが挙げられる。そのような中、我々は既存の RXR アゴニストの中でも、脂溶性の指標である CLogP の値が他のアゴニストよりも低い PA024 (3)⁵ において各サブタイプ間の EC₅₀ 値に差が見られることに着目し、脂溶性の低減によりサブタイプ選択性が得られるのではないかという仮説を立てたところ、新規な RXR アゴニストの創出に成功した。

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。

B. 研究方法

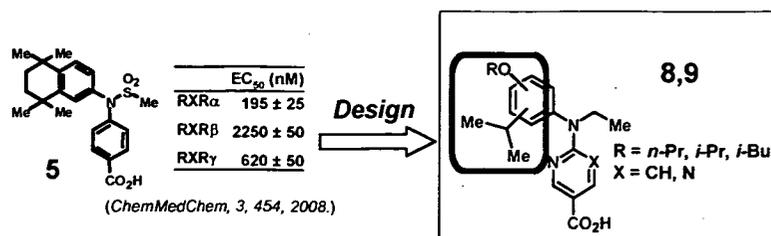


Figure 2. 新規 RXR アゴニストの分子設計戦略。

○化合物開発について 分子設計

一般的な RXR アゴニストは、Figure 1 に示す化合物のような、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。担当者らは、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 5 を見出していた (Figure 2)。しかしながら 5 の RXR 活性は既存の RXR アゴニストに比べると弱い。そこで化合物 1-4 の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 8 および 9 をデザインした (Figure 2)。

化合物合成

各化合物の合成は、scheme1 に従って行った。

CLogP の算出

CLogP の算出は、ChemDrawUltra 7.0 を用いて行った。

レポータージーンアッセイ

開発化合物の活性が RXR を介した作用であるのかを評価し、さらに各 RXR サブタイプごとの EC₅₀ を算出するために、ルシフェラーゼレポータージーンアッセイを行った⁶。

実験動物

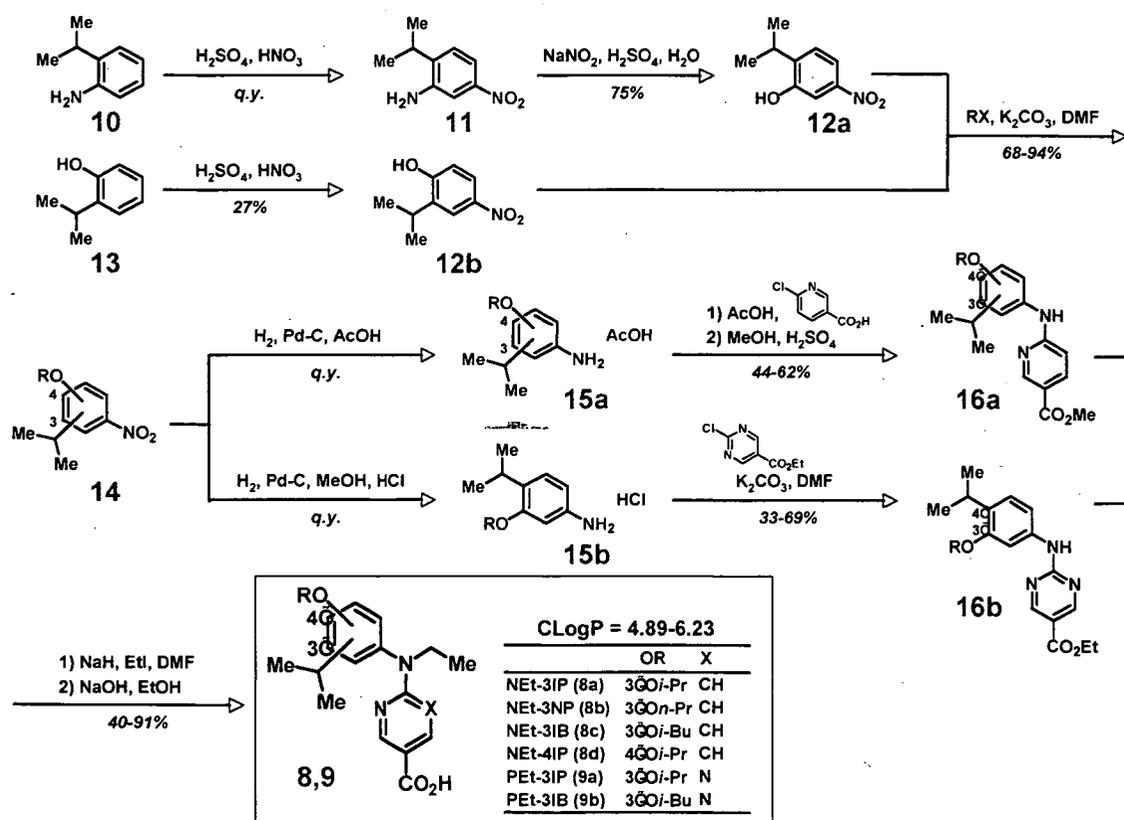
雄性 ICR マウス (体重 15-30 g) および雄性 SD ラット (170-200 g) Charles River より購入し、4-7 日間岡山大学動物実験施設にてならした後、実験前日より絶食し、水飲みを与えた。なお動物実験は、岡山大学動物実験指針に従い行った。

化合物血中濃度測定

1% エタノール・0.5% CMC 水溶液に溶解した 8a (NET-3IP) を、3 mg/kg および 30 mg/kg になるよう、5 mL/kg でラット (1

後、1 mL の氷冷酢酸エチルにより化合物抽出を行った。30 秒間のボルテックス後、10 分間室温にて放置した後、4,400 g にて室温 30 秒間遠心分離した。800 μ L の酢酸エチル層を単離後、窒素ガスにて溶液成分を乾化したのち HPLC 用メタノール 100 μ L に溶解したものを HPLC サンプルとした。

HPLC は、島津クロマトグラフィシステム (SCL-10A system controller, LC-10AD pump, SPD-10AV UV-Vis spectrophotometric detector, SIL-10AD



Scheme 1.

群 n = 6-8) に経口投与した。当該の時刻にて、ラットはエーテル麻酔した後、0.25 mL の血液を心臓より採取した。血液サンプルは、4 $^{\circ}$ C にて 4,400 g 5 分間遠心分離を施し、上清 100 μ L に対し 100 μ L の氷冷した 5 mM 酢酸アンモニウムバッファー (酢酸にて pH5.0 に調整) を加えた

autoinjector, CT0-6A column oven, DGU-14A degasser および C-R7A Chromatopac) を用いて行った。上述した HPLC サンプルを 10 $^{\circ}$ C 下オートサンプラーにて 20 μ L インジェクトした。なおカラムには Inertsil ODS-3 (4.6 i. d. x 250 mm, 5 μ m, GL Sciences, Tokyo,

Japan) をガードカラム (Inertsil ODS-3, 4.0 i.d. × 10 mm, 5 μm, GL Sciences) を 40° C にて用いた。展開溶媒には、メタノール : 5 mM 酢酸アンモニウム (酢酸にて pH 5. に調整) (80:20, v/v) を用い、流速 0.7 mL/min にて展開、UV 吸光度 278 nm にて測定した。なお化合物濃度は、ピーク面積より換算し算出した。

毒性試験

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、8a (NEt-3IP) もしくは LGD1069 (1) 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。

統計処理

動物試験の結果は、いずれも平均値 ± 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

細胞増殖試験

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 μl ずつ播種した後、最終濃度が 0.1、1、10、100 μM 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 μl 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

○ 開発化合物の生理活性について

アルコキシ基を有する化合物の RXR 活性

アルコキシ基を有する化合物を合成し、COS-1 細胞を用いたルシフェラーゼレポータージーンアッセイ⁶を行ったところ、いずれの化合物にも RXR アゴニスト活性があることが示された (Table 1)。中でも 3 位にイソプロキシ基を持つ 8c (NEt-3IB) はそれぞれのサブタイプに対する EC₅₀ が、 0.58 ± 0.02 nM、 23 ± 10 nM、 3 ± 1 nM であり、既存の RXR アゴニストに勝る高活性な RXR アゴニストであった。この化合物は高活性ではあるものの、サブタイプ選択性は低かった。一方、3 位にイソプロキシ基を持つ 8a (NEt-3IP) はそれぞれのサブタイプに対する EC₅₀ が、 32 ± 0 nM、 36 ± 8 nM、 376 ± 13 nM であり、既存の RXR アゴニストに匹敵する活性であると同時に、RXRα/β に対する選択性が見られた。本化合物は初の高活性かつサブタイプ選択性を有する世界初の RXR アゴニストであると言える。

急性毒性および経口吸収試験

NEt-3IP (8a) に対し、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、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 μg/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 μg/mL) を示した (Figure 4)。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。

○ 開発化合物のがん細胞増殖抑制作用について

C26 細胞に対する増殖抑制作用

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 でも顕著な抑制が見られなかった。このことから本プロジェクトにおいて、RXR アゴニストでは、その目的が達成し難いと考えられる。

Table 1. 合成および既知 RXR アゴニストのレポータージーンアッセイ評価および化合物の脂溶性 (CLogP)

	RXR α		RXR β		RXR γ		CLogP
	EC ₅₀ (nM) ^a	E _{max} (%) ^a	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	
8a	32	136	36	115	376	96	5.6 1
(NEt- 3IP)	±	±	±	±	±	±	
8c	0.58	114	23	140	3	103	6.2 3
(NEt- 3IB)	±	±	±	±	±	±	
8d	410	112	1180	80	1430	81	5.6 1
(NEt- 4IP)	±	±	±	±	±	±	
9a	9	113	36	103	55	105	4.8 9
(PEt- 3IP)	±	±	±	±	±	±	
9b	4	106	5	144	4	105	5.5 0
(PEt- 3IB)	±	±	±	±	±	±	
LGD10	3	106	6	114	5	104	8.2 3
69 (1)	± 0	± 12	± 1	± 12	± 2	± 3	
PA024 (3) ^c	3 ± 1	-	24 ± 0	-	8 ± 1	-	7.2 3

a) All values represent the standard error of the mean value of at least two separate experiments with triplicate determinations. b) EC₅₀ values were determined from full dose-response curves ranging from 10⁻⁹ to 10⁻⁵ M in COS-1 cells. c) Luciferase activity of PA024 (3) at 1 μ M was defined as 100 percent.

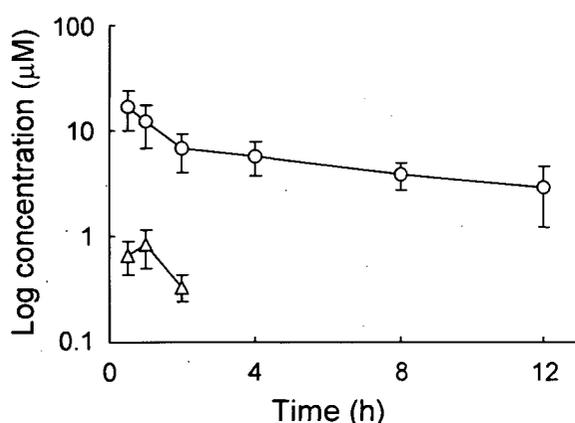


Figure 3. NEt-3IP (8a) ラット経口投与時の血中濃度. ○ : 30 mg/kg, △ : 3 mg/kg. バーは SD.

D. 考察

担当者の開発した新規 RXR アゴニスト

は RXR α / β に対する選択性のある新規化合物である。本化合物について各種がん細胞に対する増殖抑制能を調べたところ、100 μ Mにおいても顕著な抑制が見られなかった。本プロジェクトの要求する化合物としては、RXR アゴニストでは不十分な可能性が高い。

E. 結論

本研究の最終到達目標は、脂溶性ポリフィリンを効率的に内封した微粒子製剤に対し併用することで、その抗腫瘍活性を増強するレチノイド化合物創出することである。上記のように、担当者らの開発した RXR アゴニストが、本プロジェクトにおいて利用するマウス結腸がん細胞 C26 細胞に対しその細胞増殖抑制作用を発揮するかを調べたところ、残念ながらその作用は弱いことが分かった。今後 RXR ではなく RAR に対する作用物質などを検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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).

2) 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) 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

2) 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

ーリンカー部位にスルホンアミド基を有するー

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

3) 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

ー脂溶性部位にアルコキシ基を有するー

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

4) 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

5) 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、槇島 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

<参考文献>

1) C. J. Grubbs, D. L. Hill, K. I. Bland, S. W. Beenken, T. H. Lin, I. Eto, V. R. Atigadda, K. K. Vines, W. J. Brouillette, D. D. Muccio, Cancer Lett. 201, 17-24, (2003).

2) W-C. Yen, M. R. Corpuz, R. Y. Prudente, T. A. Cooke, R. P. Bissonnette, A. Negro-Vilar, W. W. Lamph, Clin. Cancer Res. 10, 8656-8664, (2004).

3) V. Giguère, Endocr. Rev. 20, 689-725, (1999).

4) D. J. Mangelsdorf, C. Thummel, M.

Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, R. M. Evans, *Cell* 83, 835-839, (1995).

5) K. Takamatsu, A. Takano, N. Yakushiji, K. Morishita, N. Matsuura, M. Makishima, H. I. Ali, E. Akaho, A. Tai, K. Sasaki, and H. Kakuta, *ChemMedChem*, 3, 454-460, (2008).

6) K. Ohta, E. Kawachi, N. Inoue, H. fukasawa, Y. Hashimoto, A. Itai, H. Kagechika, *Chem. Pharm. Bull.* 48, 1504-1513, (2000).

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

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

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
分担研究者 阪田 功 (株)光ケミカル研究所 常務取締役

研究要旨

光増感剤の多くは疎水性が高い化合物であり、光線力学的治療（PDT）に不可欠な腫瘍近傍へ送達のためには、静脈注射が可能であり、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。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できる光線力学的治療用ナノ運搬体の創製を目的として、様々なナノサイズの微粒子調製技術を用いて、機能性ポルフィリンの内封について検討を行ってきた。その結果、機能性ポルフィリンやレチノイド化合物のような薬剤を内封できる疎水性ポリマーコアとしてポリ乳酸コアを有し、表面には血中滞留性を高める効果のある PEG 鎖を配置した 100 nm 程度のナノ粒子の調製に成功した。本手法は非常に簡便であり、ワンポッドでポリ乳酸コアに機能性ポルフィリンを 87%内封できる調製プロセスであり、生体適合性にも優れた有望なナノ粒子であると期待される。

A. 研究目的

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光線力学的治療（PDT）は、従来の抗がん剤を用いた化学療法とは異なり、抗がん剤の大量投与による正常細胞への副作用が少なく、局所的な治療が可能な今後有効な抗がん治療法のひとつと期待される。この PDT を実現するためには、光増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が不可欠であり、本研究では PDT に有効な光増感物質の安定なデリバリーを実現できるナノキャリアの創製に取り組む。

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ことに加えて、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を創製することで 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るといっ

た機能は、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同時使用にも展開が可能であり、複数の薬剤を併用可能な多機能型ナノ運搬体としての発展が期待される。

そこで、ポルフィリン類のような疎水性の高い光増感物質を安定に内封可能なナノサイズのキャリアを創製するために、界面化学やコロイド化学を利用して、水中油滴型 (O/W) エマルジョンやナノ粒子など様々なナノスケールの微粒子調製を試み、PDTに有効なナノ運搬体調製プロセスとして適したポルフィリン含有ナノ運搬体の候補を絞っていくこととした。

B. 研究方法

機能性ポルフィリン内封ナノキャリアの創製

本年度は種々のナノスケール微粒子調製法を試みたが、そのなかでもPDTに有効なナノ運搬体としての条件に近い二種類の調製法について以下に記述する。

1) 転相温度乳化法を用いたミニエマルジョン重合

転相温度乳化法とは、ポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤が温度変化によって水への溶解度が変化して転相が生じる現象を利用した乳化法である。常温では十分な親水性を有するためO/Wエマルジョンを形成する系において、加温していくに連れて界面張力が低下し、ある温度において界面張力が最も低下するところを転相温度 (Phase Inversion Temperature, PIT) と呼ぶ。さらに加温を続けると界面活性剤の親水性が低くなりW/Oエマルジョンを形成する。このとき、PIT付近では界面張力の低下と粘度上昇の効果により、穏やかな攪拌かで急激な温度変化によって微細で斉一なエマ

ルジョンを得ることが可能である。

転相温度測定は Figure 1 のような手順で行った。

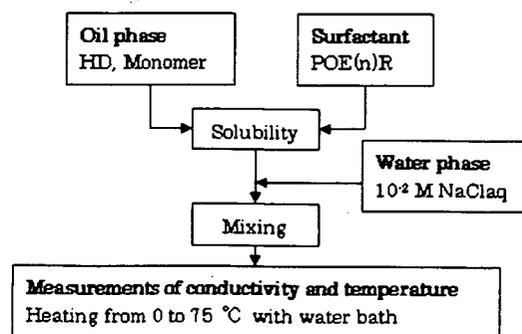


Figure 1. 転相温度測定方法

測定によって求められた電気伝導率と温度の関係をプロットして電気伝導率曲線を得た。その電気伝導率曲線から転相温度を産出し、以下の転相温度乳化法の実験条件とした。本研究では、種々の界面活性剤およびモノマーを用いた系における転相温度を決定した。

次に転相温度乳化法を用いてナノエマルジョンの調製を行った。具体的な手順は以下の通りである。界面活性剤および油相、水相を混合し、昇温して転相させることでW/Oエマルジョンを調製した。その後、氷冷しながら2~3分振とうし、O/Wエマルジョンを調製した。調製したエマルジョンの液滴径は濃厚系粒径アナライザー (FPAR) (FPAR-1200H, 大塚電子)により測定した。

得られたモノマーを含むナノエマルジョンを用いて、ミニエマルジョン重合を以下の手順で行った。重合開始剤として2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル) (ADVN)をあらかじめ油相に加え、上述の手順でO/Wエマルジョンを調製した。その後陰イオン界面活性剤水溶液を合一抑制剤として加え、窒素雰囲気下50°Cで重合した。重合後の粒子径もFPARにより測定し、走

査型電子顕微鏡(SEM) (S-4700, HITACHI) により粒子形状を観察した。

2) 溶媒除去法によるポリ乳酸ナノ粒子

分子量の異なるポリオキシエチレン鎖とポリ乳酸のジブロックコポリマー (PLE, Figure 2) を合成した。

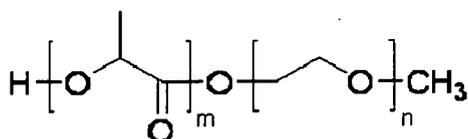


Figure 2. PLE の分子構造

PLE は末端をメトキシ化したポリエチレングリコール (MeOPEG) を開始剤とする D,L-ラクチドの開環重合によって合成した。洗浄後よく乾燥させたアンプル管へ、ラクチドと MeOPEG を入れ、触媒 (2-エチルヘキサン酸スズ(II)/トルエン) を加えた。そして、アンプル管内を 1 時間、減圧した後、封管した。封管後、あらかじめ 130°C にしておいたシリコンオイルバスに入れた。オイルバスに入れて約 10 分後にラクチドや開始剤が熔融するまで、よく振って溶液が均一になるようにした。その後オイルバス内でアンプル管を静置し、24 時間反応させた。反応終了後、オイルバスからアンプル管を取り出し室温で放冷した。

ポリマーをクロロホルムに溶解させ、ろ過を行いながらヘキサンの中に注ぎ、再沈殿を行った。ポリマーは再沈殿剤に溶解しないため、ヘキサン中に析出した。その後、未反応モノマー除去のため、析出したポリマーの 2-プロパノール中で再結晶操作を行った。析出物を 2-プロパノール中へ入れ、加熱し攪拌を行った。溶液が透明になり、ポリマーが完全に溶解したのを確認した後、加熱攪拌をやめ、室温で放置または氷水を用いて冷却を行った。その後析出したポリ

マーを遠心分離または濾過によって回収し乾燥を行った後、GPC (カラム: Super H-H (B0011), Super HM-H (B0026), Super HM-H (B0027), Super H2000 (B0025) 溶離液: Tetra hydro fulane (THF)) 及び ¹H NMR (溶媒: 重クロロホルム) により合成物の確認を行った。

合成した油溶性 PLE を 2 ml 酢酸エチルに溶解させ、これを油相とした。続いて、水溶性 PLE を 4 ml の超純水に溶解させ PLE 水溶液を調製した。そして、この PLE 水溶液又は超純水を水相として使用した。油相に水相を加え、超音波ホモジナイザーを用いて 160 W, 15 sec で O/W エマルションを調製した。調製の際ホモジナイザーの先端は油水界面になるようにした。そして、調製した O/W エマルションの 1 部を使用して、エマルションの液滴径をゼータサイザーにより測定した。なお、エマルションは調製直後及び調製して 10 分後のものについて測定を行った。残りの O/W エマルションは調製直後とエマルションのゼータサイザー測定 (エマルション調製直後、エマルション調製から 10 分後) 終了時に超純水に添加することにより希釈した。そして、これらの粒径をゼータサイザーにより測定した。なお、ゼータサイザーによる測定は 23°C で行った。なお、油溶性 PLE として PLE-2, 水溶性 PLE として Y-PLE-11 を用いた (Table 1)。

Table 1. 使用した PLE の測定結果

RUN No.	MeOPEG <i>M_w</i>	PLE <i>M_w</i>	PLA <i>M_w</i>	PLE (<i>M_w/M_n</i>)
PLE-2	4,352	10,688	6,336	1.139
Y-PLE-11	4,352	5,529	1,100	1.056

なお、機能性ポルフィリンは (株) 光ケミカル研究所において 600 nm 付近の光照射によって高効率で一重項酸素を供給

できるように設計開発されたものを用いている。

C. 研究結果

機能性ポルフィリン内封ナノキャリアの創製

ナノスケールの微粒子調製を種々の手法を用いて行ったが、機能性ポルフィリン含有ナノ運搬体として最も適した二種類の手法で得られた実験結果を以下に示す。

1) 転相温度乳化法を用いたミニエマルション重合

まずは転相温度乳化法を行うために、系の転相温度測定を Figure 1 のような手順で行い、得られた典型的な電気伝導率曲線 Figure 3 に示した。

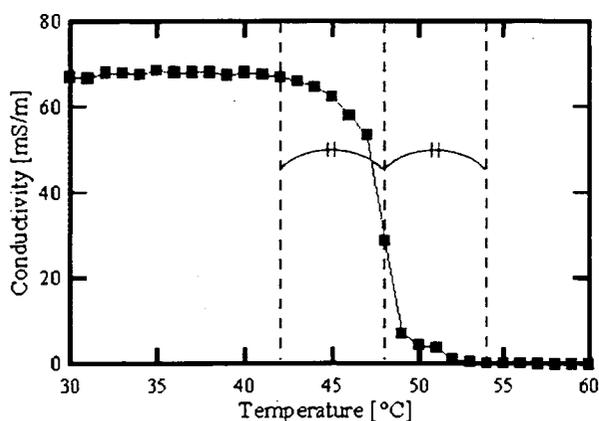


Figure 3. 電気伝導率曲線 (POE(10)NPE = 4 wt%, Hexadecane = 10 wt%, Styrene = 10 wt%, PIT 48°C)

様々な実験条件における転相温度を測定した結果、界面活性剤種、界面活性剤濃度、モノマー構造、組成、濃度などが全て転相温度に何らかの影響を与えることが分かった (Figure 4)。特に、界面活

性剤の濃度が増加するにつれて転相温度も減少し、界面活性剤の疎水性を示すパラメーターである HLB 値は増加するとともに転相温度が高くなっていることが分かる。それ故、適当な温度域で転相を生じる系を選択し、モノマーとしてはスチレンを、界面活性剤としては POE(10)NPE を選択した。

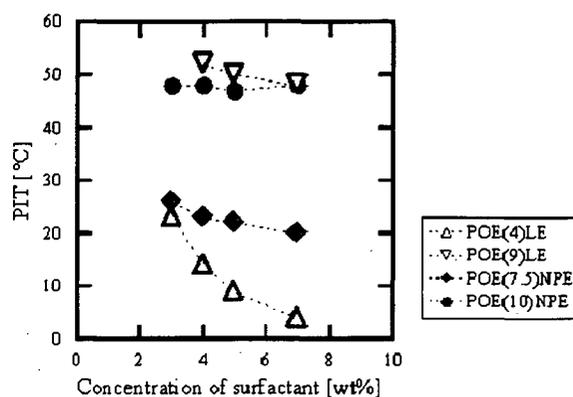


Figure 4. 界面活性剤濃度が転相温度に与える影響

転相温度乳化前後においては、得られた液滴径が小さく揃っていることが Figure 5 および Figure 6 の結果からも明らかである。

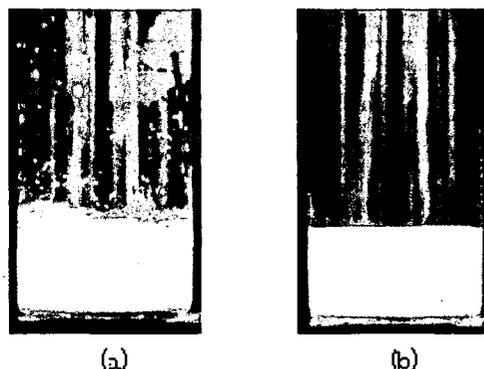


Figure 5. 転相温度乳化前後における目視観察の結果：(a) 転相前、(b) 転相後

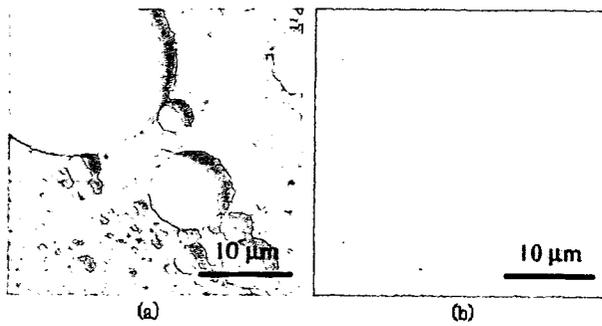


Figure 6. 転相温度乳化前後における光学顕微鏡観察の結果：(a) 転相前，(b) 転相後

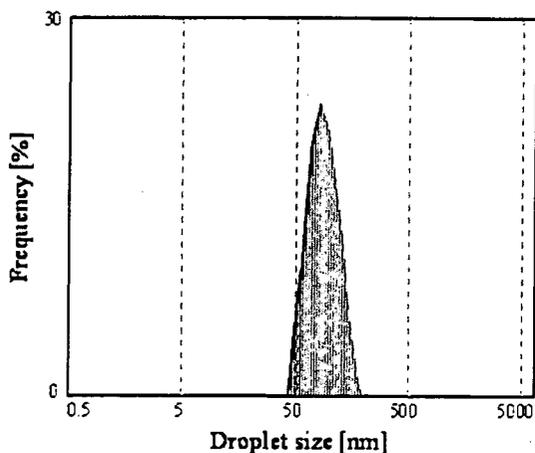


Figure 7. FPAR による液滴径測定結果（散乱強度分布）

転相前は数十 μm ほどの大きな液滴がいくつも観察されたが、転相温度乳化によって光学顕微鏡では観察できないほどの小さな液滴が調製できたことが分かった。FPAR による液滴径測定の結果、87.0 nm (P.D.I. = 6.0%) であり、非常にサイズの揃った微粒子が調製できることが分かる (Figure 7)。

ミニエマルジョン重合が進行した結果、調製されたナノエマルジョン中で重合が行われるため、粒子の合一による粒子径の成長は起こらず、エマルジョン径に近

い粒子が形成される。本実験でも、Figure 8 に示すような約 90 nm の粒径を有するラグビーボール状微粒子が調製できた。

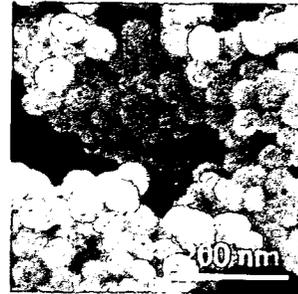


Figure 8. 転相温度乳化により調製したナノエマルジョン中でのミニエマルジョン重合後に得られた微粒子の SEM 写真

粒径の経時変化を測定したところ、粒径変化がないことから、この重合がミニエマルジョン重合で進行していることが確認された。

得られた微粒子は 100 nm の単分散なポリスチレン微粒子であり、ポリマー中に疎水性化合物を溶解させることも検討されたが、実際にはポリスチレン微粒子中へポルフィリンを内封することはできていない。このミニエマルジョン重合においては系に含まれている溶媒であるヘキサデカンと生成したポリスチレン鎖がエマルジョン内部で相分離を起こしていることが明らかとなり、このことは得られた粒子形状がラグビーボール型である理由でも説明できた。それ故、疎水性が高いだけではポリマー中に内封することは難しく、溶媒とポリマーへの溶解度をさらに検討する必要がある。

2) 溶媒除去法によるポリ乳酸ナノ粒子

ポリオキシエチレン鎖とポリ乳酸鎖を繋いだジブロックコポリマーである PLE はポリ乳酸の析出を利用して表面に PEG 鎖を呈示したナノ粒子を作製できること

で知られている。

しかしながら、高い内封効率を保ちながら 100 nm 程度のポリ乳酸ナノ粒子を作製することは容易ではなく、油溶性 PLE のみを用いた従来法では 200 nm 前後の粒子サイズまでしか得られていない。

そこで、本研究では粒子形成初期に界面活性の高い PLE を共存させることで、静脈注射に適用可能なナノ粒子調製の調製に取り組んだ。

水溶性の合成 PLE の添加量を変化させていくと、得られるポリ乳酸ナノ粒子の粒径に極めて顕著に影響が現れることがわかった (Figure 9)。

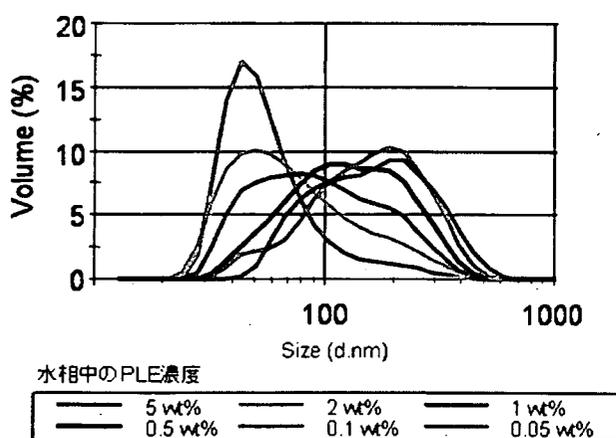
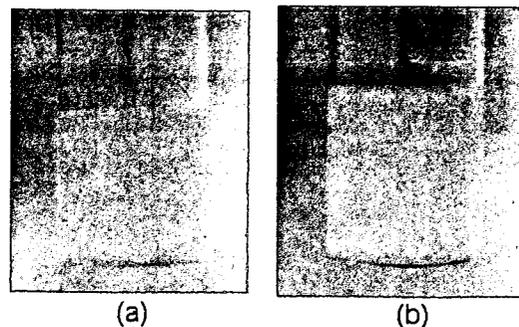


Figure 9. 水溶性 PLE の添加量と得られたポリ乳酸ナノ粒子の粒径分布の関係

結果より、水相中の PLE 濃度の増加とともに平均粒径が小さくなることがわかり、さらに粒径分布も鋭くなっていることから、分散度も小さくなっていることが示唆された。5 wt% 添加時には、約 60 nm 程度のポリ乳酸ナノ粒子が得られ、水溶液中にも非常に良く分散していることが分かる。

このような手法で調製されたポリ乳酸ナノ粒子中に (株) 光ケミカル研究所・

阪田らによって開発された機能性ポルフィリンを内封したところ、非常に効率良くナノ粒子中へ内封され、粒子分散液も均一にポルフィリン由来の緑色を呈して



いた (Figure 10)

Figure 10. ポルフィリン内封ナノ粒子水溶液：(a) ポルフィリン含有ナノ粒子分散液，(b) ポルフィリンを含まないナノ粒子分散液

通常、ポルフィリンは水には全く溶解しないため、水溶液中では凝集物が見られるが、本系において凝集物はほとんど見られず、極めて高い内封効率を示していることを裏付けている。つまり、機能性ポルフィリンはポリ乳酸ナノ粒子中に溶解して分散していると言える。

これらのポルフィリン内封ナノ粒子は凍結乾燥により溶媒を除去して乾燥させた後、300 sec. のイオンスパッタ照射を行ってから SEM による観察を行った。

Figure 11 にはその SEM 写真を示す。

ポリ乳酸部は顕微鏡観察のためのビームによって溶解してしまうことが知られており、独立した微粒子形状を観察することはできなかったが、100 nm 程度の粒子が集合していることが伺い知れる。

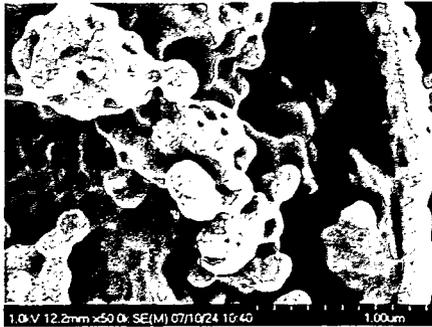


Figure 11. ポリ乳酸ナノ粒子のSEM写真

D. 考察

転相温度乳化法をはじめとする多くの単分散微粒子調製法について、ナノ運搬体としての応用を検討したが、疎水性コアを持ち血中滞留性に優れた PEG 鎖のような親水性高分子が表面を覆っているナノサイズの微粒子としては、本研究の後半で示したポリ乳酸ナノ粒子が最も有効であろうと考えられる。

ポリ乳酸表面はPEG鎖で覆われていることは、Figure 10に見られるように水溶液中で安定に分散が可能になっていることから示唆される。

Figure 9に見られるように、水溶性 PLE の濃度増加とともに得られる粒径が減少していくのは、界面活性の高い水溶性 PLE の添加によって、溶媒を含むポリ乳酸コアが小さい液滴を形成し、その結果、液滴径を反映して小さな粒子が形成できたものと考えられる。

これによって、静脈注射に適用可能な 100 nm 程度の光増感物質内封ナノ粒子が開発できたことで、*in vitro*あるいは*in vivo*での機能評価の知見を得ながら、更なる粒子設計が必要となってくるであろう。また、当初 PDT に有効なナノ運搬体の機能としては、内封した薬物の徐放を考えていたが、分担研究者である大河原らの研究によって、ナノ粒子中に埋没

した機能性ポルフィリンでも光照射による殺細胞効果が確認できたことが報告されており、ナノ運搬体内における機能性ポルフィリンの分布挙動と抗腫瘍効果の関係についても興味深い。

ナノ粒子からの機能性ポルフィリンの徐放を必要としないのであれば、ナノ運搬体に安定に内封することで、PDT における副作用として深刻な光過敏症についても低減が期待される。それ故、本ナノ運搬体からの PDT 作用機序を解明することは、今後の薬剤設計において重要な知見を与えるものと考えられる。

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。これまでに明らかとなった知見は、今後、PDT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. 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)

2) 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)

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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

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

研究成果の刊行に関する一覧表

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
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
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
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
S. Mutsuo, K. Yamamoto, T. Furuzono, T. Kimura, T. Ono, A. Kishida	Pressure-induced molecular assembly of hydrogen-bonded polymers.	J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.	46	743-750	2008
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: RXRalpha-Preference 1 Agonist Possessing a Sulfonamide Moiety.	ChemMedChem.	14	454-460	2008
E. Kamio, A. Kato, S. Yonemura, T. Ono, H. Yoshizawa	Preparation of monodisperse crosslinked polymelamine microcapsules by phase separation method	Colloid Polymer Science		DOI 10.1007/s00396-008-1837-7	2008

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	2008
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年会要旨集			2007
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学会要旨集			2007
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学会要旨集			2007
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回高分子学会要旨集		3Z10	2007
Ken-ichi Ogawara, Susumu Nagayama, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura	Time-Dependent Changes in Opsonin Amount Associated on Nanoparticles Alter Their Hepatic Uptake Characteristics.	Proceedings of 8th International ISSX Meeting			2007
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.	Proceedings of 8th International ISSX Meeting			2007

J. Kubota, A. Kato, T. Ono	Phase inversion temperature (PIT) method utilized preparation of O/W nano-emulsion by microreactor system	Proceedings of 2007 AIChE annual meeting		332p	2007
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予稿集		IPB-75	2007
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要旨集			2007
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要旨集			2007
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要旨集			2007
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要旨集			2007
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要旨集		16	2007

村中誠, 小野努	単分散ポリ乳酸マイクロ 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 要旨集		27	2007
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 会要旨集		L22	2008
大浦浩平, 久保田 潤, 小野努, 田中 秀雄	界面活性能を有するT EMPO誘導体の合成 及び不均相重合への応 用	化学工学会第 73年会講演要 旨集		P108	2008
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年会講演要 旨集		P118	2008
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年会講演要 旨集		P121	2008
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 、槇島 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 薬学会要旨集			2008



Pharmaceutical Nanotechnology

Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor

Susumu Nagayama^a, Ken-ichi Ogawara^a, Keiko Minato^a, Yoshiko Fukuoka^a,
Yoshinobu Takakura^b, Mitsuru Hashida^b, Kazutaka Higaki^a, Toshikiro Kimura^{a,*}

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

^b Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan

Received 11 May 2006; received in revised form 1 August 2006; accepted 23 August 2006

Available online 30 August 2006

Abstract

We tried to evaluate the possible involvement of fetuin in the scavenger receptors (SRs)-mediated hepatic uptake of polystyrene nanospheres with the size of 50 nm (NS-50), which has surface negative charge (zeta potential = -21.8 ± 2.3 mV). The liver perfusion studies in rats revealed that the hepatic uptake of NS-50 pre-coated with fetuin (NS-50-fetuin) was significantly inhibited by poly inosinic acid (poly I), a typical inhibitor of SRs, whereas that of plain NS-50 or NS-50 pre-coated with BSA (NS-50-BSA) was not. The uptake of NS-50-fetuin by cultured Kupffer cells was also significantly inhibited by poly I, and anti-class A scavenger receptors (SR-A) antibody, suggesting that fetuin on NS-50 mediated the recognition and internalization of NS-50 by Kupffer cells and at least SR-A would be responsible for the uptake. Taken that Western blot analysis confirmed that fetuin certainly adsorbed on the surface of NS-50 after the incubation of NS-50 with serum, the results obtained in the present study indicate that fetuin would be one of the serum proteins that were substantially involved in the hepatic uptake of NS-50 via SRs.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Polystyrene nanosphere; Fetuin; Scavenger receptors; Hepatic uptake; Receptor-mediated phagocytosis

1. Introduction

Scavenger receptors (SRs), which were first reported by Brown and Goldstein (Goldstein et al., 1979), are a family of cell surface glycoproteins that are able to bind and internalize modified lipoproteins such as oxidized and acetylated low density lipoproteins (Greaves et al., 1998). In the past 20 years, SRs have been found to be able not only to recognize endogenous molecules such as collagen (McKeown et al., 1994) and altered-self such as apoptotic cells (Peiser and Gordon, 2001), but also to bind, internalize and degrade exogenous pathogen such as bacteria (Peiser et al., 2000). In addition, it was reported that these receptors play an important role to remove a variety of negatively charged substances such as dextran sulfate (Takakura et al., 1994), formaldehyde-treated albumin (Jansen et al., 1991) and liposomes containing negatively charged phospholipids (Rigotti et al., 1995).

Until now, it has been considered that the hepatic uptake of the negatively charged compounds including particles, e.g., phosphatidylserine-containing liposomes, via SRs is through the direct recognition of their negative charge (Kobzik, 1995). However, our previous study indicated that in addition to the surface negative charge, some serum proteins associated on the surface also play an important role in the SRs-mediated hepatic uptake of polystyrene nanospheres with the size of 50 nm (NS-50) which had surface negative charge (Furumoto et al., 2004). Therefore, it is important to identify serum proteins that are involved in the SRs-mediated hepatic uptake of negatively charged particles.

Fetuin and its human homologue (α_2 -HS-glycoprotein) are acidic negative acute-phase glycoproteins (Lebreton et al., 1979; Green et al., 1988; Naseem et al., 2003). The normal serum level in adults is 0.3–0.6 mg/ml and falls significantly (30–50%) during injury and infection (Wang et al., 1998). Hepatocytes are the principal cell source of circulating fetuin (Dziegielewska et al., 1996). Although the biological roles of fetuin are not fully understood, there is accumulating knowledge on the function of this protein and it has been reported that fetuin strongly enhances phagocytosis of bacteria, DNA and apoptotic cells by peripheral

* Corresponding author. Tel.: +81 86 251 7948; fax: +81 86 251 7926.
E-mail address: kimura@pharm.okayama-u.ac.jp (T. Kimura).