

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究

「オキサリプラチン（L-OHP）のリポソーム製剤化による免疫抑制の回避と
がん免疫療法併用の有用性」

分担研究者 丸山 一雄 帝京大学 教授

研究要旨：オキサリプラチン（L-OHP）を封入したリポソーム製剤（L-OHP TF-PEG リポソーム）による化学療法と、腫瘍組織血管内皮細胞を標的とした DC ワクチンによる免疫療法との併用療法の有用性について検討した。本リポソームは高いがん組織への集積性を示すことから、骨髄などの組織への移行性が減少し、結果、免疫抑制の回避が期待される。

A. 研究目的

現在行われているがん治療法は、外科的療法、化学療法、放射線療法、免疫療法に大別される。これら療法は作用機序が異なることから、複数の療法を組み合わせることによって、効果の増強が期待される。

その中で今回は、化学療法と免疫療法を併用することによって、抗腫瘍効果の相乗作用が認められるか否かを検討することとした。しかし、従来の抗腫瘍薬はその副作用として、免疫抑制作用を有することから、免疫療法との併用を行ってもその抗腫瘍効果が十分に発揮されない可能性がある。

そこで、従来の抗腫瘍薬の免疫抑制作用を回避する方法として、当研究室で開発されたトランスフェリン修飾ポリエチレングリコールリポソーム

（TF-PEG リポソーム）¹⁾⁻³⁾の利用が挙げられる。本リポソームは高いがん組織への集積性を示すことから、骨髄などの組織への移行性が減少し、結果、免疫抑制の回避が期待される。

また当研究室では、腫瘍細胞の馴らし培地（Conditioned Medium : CM）で培養した血管内皮細胞を樹状細胞（dendritic cell: DC）にパルスし、その DC をマウスに免疫することにより、腫瘍組織血管内皮細胞を標的とした免疫を誘導し、腫瘍組織血管を破綻させることで腫瘍組織の退縮を期待した新規がん免疫療法を考案し、その有用性について報告してきた。

そこで今回、本リポソームに抗腫瘍薬であるオキサリプラチン（L-OHP）を封入したリポソーム製剤（L-OHP TF-PEG リポソーム）による化学療法と、腫瘍組織血管内皮細胞を標的とし

た DC ワクチンによる免疫療法との併用療法の有用性について検討した。

B. 研究方法

リポソームの調製

リポソームは Ethanol Injection 法により調製した。基本脂質を POPC: Cholesterol = 2:1 (mol / mol) とし、DSPE-PEG2k-OMe を 5 mol%、DSPE-PEG2k-COONHS を 1 mol% 添加した。L-OHP solution (8 mg/mL、9% sucrose) を混合し、平均粒子径約 150 nm のリポソームを得た。TF[を NHS 活性化エステルに反応させ、L-OHP TF-PEG リポソームを得た。

免疫療法

Colon26 細胞の馴らし培地 (Colon26 CM) で培養した HUVEC からブタノール抽出によって Colon26CM-HUVEC 抗原を調製し、マウス骨髄細胞由来の樹状細胞 (DC) にパルスした。その DC をマウスに免疫することにより、腫瘍組織血管内皮細胞を標的とした免疫を誘導した。

化学療法と免疫療法併用

Colon26 担がんマウスに L-OHP 封入 TF-PEG リポソームを L-OHP 量として 5 mg/kg、L-OHP 溶液は 10 mg/kg を 3 日おきに 2 回、尾静脈投与した。Colon26CM-HUVEC pulsed DC は 2 回目の L-OHP の投与日とその 7 日後に皮内投与した。治療効果は前述と同様に評価した。

C. 研究結果・考察

L-OHP TF-PEG リポソームと腫瘍組織血管内皮細胞に対する免疫療法を併用した群マウスにおいては L-OHP TF-PEG リポソームを単独投与したマウスと比較して、有意な腫瘍増殖抑制効果の増強を示したのに対し、L-OHP 溶液に腫瘍組織血管内皮細胞に対する免疫療法を併用したマウスにおいては L-OHP 溶液を単独投与したマウスとほぼ同じ腫瘍体積の増加傾向を示し、腫瘍組織血管内皮細胞に対する免疫療法を併用した効果は認められなかった (図 1)。

TF-PEG リポソームの投与による免疫担当細胞への影響を検討するため、脾細胞中の CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞数を測定した (図 2 a,b)。コントロールマウスと比較して、L-OHP 溶液投与マウスでは CD8⁺T 細胞は約 1/3、CD4⁺T 細胞は約 1/7 に減少した。このことから、先の検討において L-OHP 投与マウスにおいては免疫抑制が起きており、その結果、免疫を併用しても効果が得られなかったものと考えられる。しかし、L-OHP TF-PEG リポソーム投与マウスにおいては CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞ともに減少は認められなかった。これは、TF-PEG リポソームに封入したことにより L-OHP が腫瘍組織へと集積した結果、正常細胞への集積が減少したためと考えられ

る。

見られるような免疫抑制は観察されなかった。その結果、TF-PEG リポソ

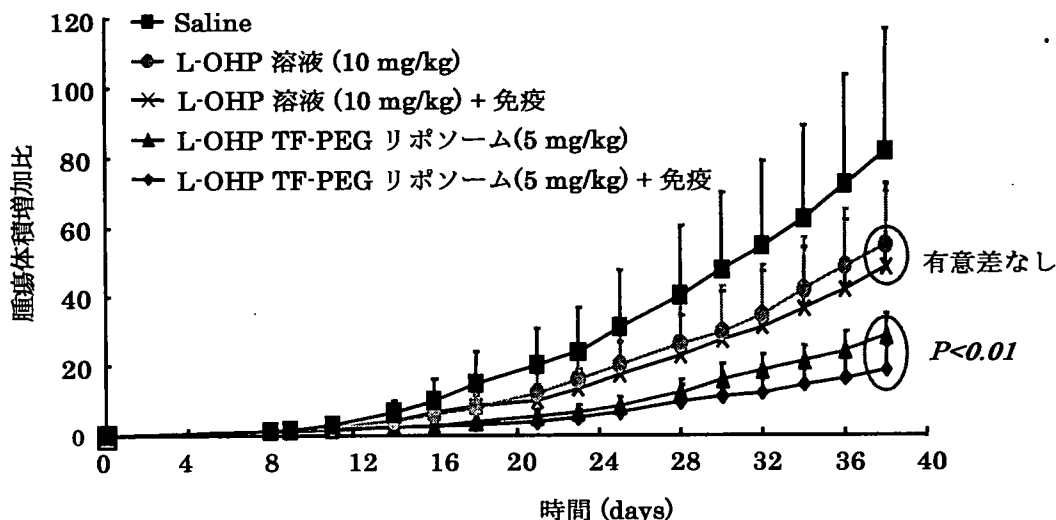


図1 併用療法における抗腫瘍効果

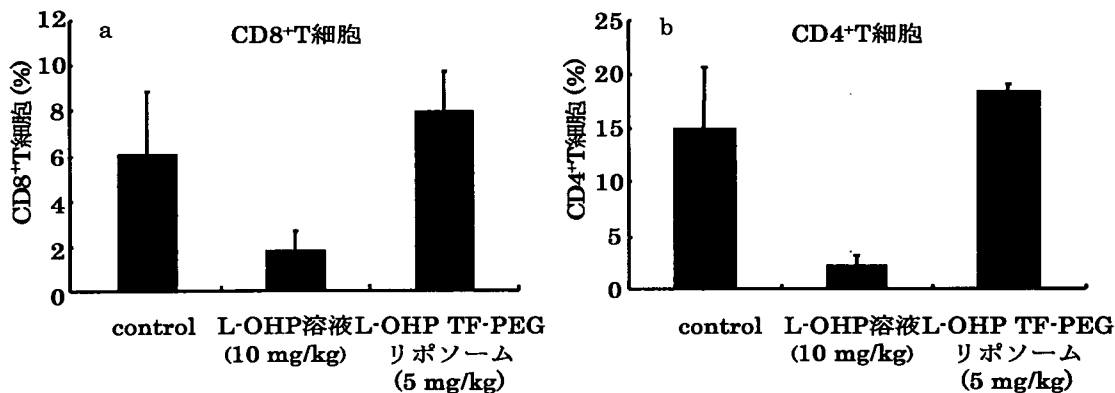


図2 TF-PEG リポソームの投与による CD8+T 細胞への影響 (a) および CD4+T 細胞 (b) への影響

D. 結論

L-OHP を封入した TF-PEG リポソームを投与することで、高い血中滞留性と腫瘍集積性、またそれに伴う高い抗腫瘍効果が認められた。さらに、腫瘍への集積性の高さから正常組織への移行が少なく、L-OHP 溶液の投与で

腫瘍に免疫療法を併用することで抗腫瘍効果が増強したと推察される。以上のことから、リポソーム製剤と免疫療法との併用療法による有効性が示唆された。

E. 健康危険情報

該当無し

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 上野修平、塩野康行、鈴木亮、宇都口直樹、丸山一雄、オキサリプラチン (L-OHP) のリポソーム製剤化による免疫抑制の回避とがん免疫療法併用の有用性、*Progress in Drug Delivery System*, 16, 65-71, 2007.
2. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yasuhiro Kuwata, Mahito Mutoh, Nobuyuki Ishsiguro, Naoki Utoguchi, Atsuko Shinohara, Masazumi Eriguchi, Hirinobu Yanagie, Kazuo Maruyama, Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome; *Int. J. Pharm*, 346, 143-150 (2008)

2. 学会発表

1. 上野修平、塩野康行、鈴木亮、宇都口直樹、丸山一雄、オキサリプラチン (L-OHP) のリポソーム製剤化による免疫抑制の回避とがん免疫療法併用の有用性、第 15 回静岡 DDS カンファレンス、2007 年 5 月 14 日、静岡、口頭発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

栄養飢餓耐性機構の治療応用

分担研究者 土原 一哉 国立がんセンター東病院臨床開発センター がん治療開発部室長

栄養飢餓耐性を示す大腸癌細胞で、オートファジーが活性化し細胞生存に寄与していることを示した。さらに大腸癌の臨床検体において癌細胞特異的にオートファジー関連タンパク質が高発現していることを示し、オートファジーの制御が新たな抗がん療法の標的となる可能性を示唆した。

A. 研究目的

固形腫瘍は正常組織に対して低栄養環境におかれている。がん細胞はそうした環境下でも生存・増殖を続けることができ、この特性を栄養飢餓耐性と呼んでいる。栄養飢餓耐性獲得のメカニズムが明らかとなれば、それを標的とする腫瘍組織特異的な新たな抗がん療法の開発が期待される。本研究では栄養飢餓時に誘導されるオートファジーと栄養飢餓耐性との関連を検討した。

B. 研究方法

1) 栄養飢餓耐性を示す大腸癌細胞株 DLD-1、SW480、WiDr、SW620 および LoVo におけるオートファジー活性化の程度を LC-3 タンパク質のウエスタンブロット および GFP-LC3 タンパク質の細胞内局在の蛍光顕微鏡による観察

により検討した。

- 2) DLD-1、SW480、および SW620 において、オートファジー阻害剤添加およびオートファジー関連遺伝子の RNA 干渉法を行い、オートファジー阻害による細胞死誘導を検討した。
- 3) 大腸癌外科切除標本におけるオートファジー活性化の程度を LC-3 タンパク質の免疫染色により評価した。

C. 研究結果

1) 検討に用いたすべての大腸癌細胞株において、アミノ酸欠乏時にリソソーム酵素阻害剤の添加によりオートファゴソームに局在する LC3-II タンパク質の集積が観察された。このとき、大腸癌細胞に強制発現させた GFP-LC3 融合タンパク質は細胞質に顆粒状に集

積しており、オートリソソームの分解抑制により新規に形成されたオートファゴソームの蓄積、すなわちオートファジーの活性化が生じていることが明らかとなった。

- 2) 複数のオートファジー阻害剤および、オートファジー関連遺伝子 ATG7 の RNA 干渉法によるオートファジー阻害により、いずれもアミノ酸飢餓環境で大腸癌細胞にアポトーシスを主体とする細胞死を誘導できた。またオートファジー阻害による細胞死の誘導は栄養飢餓状態でのみ認められ、通常栄養環境での毒性は認められなかった。
- 3) 大腸癌外科切除標本において、癌細胞内にオートファゴソームに特徴的な超微細構造が電顕像により確認された。また LC3-II タンパク質が癌組織において顕著に増加していることがウエスタンブロット法により確認された。抗 LC3 ポリクローナル抗体を用いた免疫染色による多数例の解析で早期の大腸癌から、癌細胞特異的な LC3 タンパク質の蓄積が認められた。

D. 考察

オートファジーは栄養飢餓時に誘導され、細胞の生存に必要な栄養源を

供給すると考えられているが、がん細胞における役割には不明な点が多かった。今回、栄養飢餓耐性を示す大腸癌細胞が栄養飢餓時にオートファジーを活性化していること、さらに実際の大腸癌組織においても癌細胞特異的にオートファゴソームの形成が亢進していることが明らかとなった。またオートファジーの阻害は大腸癌細胞に対し、栄養飢餓環境に選択的な細胞死を誘導した。以上の所見はオートファジーの活性化が栄養飢餓環境での大腸癌細胞の生存を助長し、それによって大腸癌の発生・進展を促進していることを強く示唆するものである。また栄養飢餓に陥りやすいがん組織・細胞に特異的な治療法として、オートファジー阻害の有用性を示唆するものでもあった。

E. 結論

本研究により、オートファジーの活性化が大腸癌の栄養飢餓耐性の獲得の一因となり、がんの発生・進展に寄与する可能性、およびオートファジーの阻害が栄養飢餓耐性を標的とした治療法のひとつとなる可能性が示唆された。一方でオートファジーの抑制ががんの発症と関連するとする研究も報告されており、今後より生理的な条件で、がん細胞および非がん細胞におけるオートファジーの役割について研究を進める必要があると考えられ

た。

G. 研究発表

論文発表

1. K Sato, K Tsuchihara, et al.
Autophagy is activated in colorectal
cancer cells and contributes to the
tolerance to nutrient deprivation.
Cancer Res. 67:9677-84. 2007.

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

微生物代謝産物からの抗がん剤の開発に関する研究

分担研究者 百瀬 功

財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究センター 沼津創薬医科学研究所

研究要旨 固形がん内部に見られる栄養欠乏状態は、正常組織には見られない固形がんの特徴であることから、栄養欠乏状態の細胞に選択的に細胞毒性を示す化合物を微生物代謝産物より探索した。その結果、カビの培養液より新規ペプチド化合物を見出した。その他、放線菌の培養液より Antimycin A₁₋₄、Dunaimycin D₃S、Piericidin A₁、カビの培養液より Leucinostatin A を見出し、いずれも栄養飢餓選択的細胞毒性を示した。

A. 研究目的

固形がん内部は不十分な血管形成ならびに血流の欠乏により慢性的に栄養が欠乏した栄養飢餓状態にある。このような栄養飢餓状態は正常組織にはないがん微小環境の特徴であることから、栄養飢餓状態の細胞に選択的に細胞毒性を示す物質は、優れた抗がん剤になりうると考えられる。そこで栄養状態の良い細胞には細胞毒性を示さず、栄養飢餓状態の細胞に選択的に細胞毒性を示す化合物を探索することを目的とした。

B. 研究方法

栄養培地として DMEM（10% FBS 含）を、栄養飢餓培地として NDM（DMEM からグルコース、アミノ酸を除いた培地に、透析した FBS を 10%含む）を用いて、ヒト膵臓がん PANC-1 細胞におけ

る栄養飢餓選択的細胞毒性を MTT 法もしくはアラマーブルー法により測定した。栄養飢餓選択的細胞毒性物質は放線菌、カビの培養液および化合物ライブラリーより探索を行なった。固体培養もしくは液体培養を行なった微生物培養液からの栄養飢餓選択的細胞毒性物質の単離精製は、酢酸エチル、ブタノールなどの溶媒抽出法、およびシリカゲル、ゲル濾過、イオン交換樹脂、HPLC などの各種カラムクロマトグラフィー法を適宜組み合わせることにより行なった。単離した化合物は TLC 呈色反応、NMR、MS、IR、UV スペクトルの詳細な解析により、それらの化学構造を決定した。

（倫理面への配慮）

当研究センター内の動物実験指針および環境安全委員会規定に従い実験を行なった。

C. 研究結果

数千の微生物培養液より栄養飢餓選択的細胞毒性物質のスクリーニングを行ったところ、数培養液に強い栄養飢餓選択的細胞毒性が認められた。その中のひとつのカビ培養液の活性成分を単離精製したところ、これまでに知られていない新規なペプチド化合物であった。構造解析により、本化合物は12もしくは13個のアミノ酸より構成されており、完全加水分解実験からグリシン、アラニン、 β -アラニン、ロイシン、アミノイソ酪酸を含有していることがわかった。またアミノ酸分析より標準アミノ酸に帰属されない異常アミノ酸の存在も示唆された。温和な条件下での部分加水分解実験にて、主に3つの断片に切断されることがわかった。いずれも6ないしは7アミノ酸で構成されており、現在これらの詳細な解析から構造決定を試み、特許出願の準備を進めている。本物質は、DMEM(10% FBS)培地に較べて、NDM(10% D-FBS)にて100倍低い濃度で細胞毒性を示し、目的とした栄養飢餓選択的細胞毒性を示した。細胞毒性に影響を与える培地成分を調べたところ、アミノ酸や血清の欠乏では細胞毒性を示さないが、グルコースが欠乏すると強い細胞毒性を示すことがわかった。グルコース濃度は0.5%では細胞毒性を示さないが、0.1%だと強い細胞毒性を示

すことがわかった。

その他、放線菌の培養液より Antimycin A₁₋₄、Dunaimycin D₃S、Piericidin A₁を、カビの培養液より Leucinostatin Aを単離精製した。いずれも既知物であったが、目的とした栄養飢餓選択的細胞毒性を示すことがわかった。

D. 考察

本スクリーニング系にて、目的とした栄養飢餓選択的細胞毒性を示す新規化合物を見出すことができた。作用や構造についての今後の研究の発展が期待される。今回ミトコンドリアの複合体 I 阻害剤である Piericidin A₁、複合体 III 阻害剤である Antimycin A₁₋₄、複合体 V 阻害剤である Dunaimycin D₃S および Leucinostatin A が栄養飢餓選択的細胞毒性を示すこと見出され、栄養飢餓状態での ATP の獲得において電子伝達系が中心的な役割を果たしていることが示唆され、これらエネルギー代謝阻害剤のがん治療への応用において、あらたな可能性が示唆された。

E. 結論

本研究において、栄養培地に較べて栄養飢餓培地にて100倍強い細胞毒性を示す新規化合物を得ることができた。化学構造解析の結果、ペプチド化

合物であり、グリシン、アラニン、 β -アラニン、ロイシン、アミノイソ酪酸および異常アミノ酸により構成されていることがわかった。またエネルギー代謝阻害剤が栄養飢餓選択的細胞毒性を示すことがわかった。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Momose, I., Iijima, M., Kawada, M., Ikeda, D. A new proteasome inhibitor, TP-110, induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. Biosci. Biotechnol. Biochem., 71: 1036-1043, 2007.

2. 学会発表

1) 第 11 回がん分子標的治療研究会総会

プロテアソーム阻害剤耐性前立腺癌細胞株の樹立と耐性機序の解析：百瀬功、飯島正富、池田大四郎

2) 第 11 回がん分子標的治療研究会総会

Rakicidin による低酸素細胞選択毒性：山崎洋子、川田学、百瀬功、池田大四郎

3) 第 66 回日本癌学会学術総会

新規プロテアソーム阻害剤 TP-110 は IAP の発現を抑制し、Fas 誘導ア

ポトーシスを亢進する。：飯島正富、百瀬功、池田大四郎

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

腫瘍特異的微小環境適応シグナル伝達を利用した抗がん剤の開発

分担研究者 順天堂大学医学部生化学第一講座 上野 隆

研究要旨：培養腫がん細胞 PANC-1 を用いて、その長寿命タンパク分解がグルコース欠乏に依存して Kigamicin D により阻害されることを明らかにした。阻害には血清が必要であり、また、その阻害は、リソソーム系タンパク分解阻害とは異なることが明らかになった。これまでに知られていない新奇の阻害剤であることが判明した。

A. 研究目的

これまで腫がんのモデルとして PANC-1 細胞を材料として、低栄養条件下で亢進するタンパク分解であるオートファジーに及ぼす Kigamicin D の影響を検討してきた。予想に反して典型的なアミノ酸飢餓によるオートファジーへの影響はほとんど認められず、また、Tor や S6 キナーゼなどオートファジー誘導に関わるシグナル伝達分子に対する影響についても、Kigamicin D は、ラパマイシンなどとよく似ており、オートファジーをむしろ促進する方向に働いている傾向すら認められた。ところが、培地のグルコースのみを除去したところ、タンパク分解が有意に阻害されることが解った。そこで、グルコース欠乏時のタンパク分解に焦点を絞って Kigamicin D の効果をさらに詳細に検討した。

B. 研究方法

1) 培養腫がん細胞 (PANC-1) および HeLa 細胞を、¹⁴C-leucine を加えた培地で 22 時間培養し、非放射性 leucine を含む培地で 2 時間チェイスを行い、その後さまざまな培地中で 3-4 時間培養。培地に放出される酸可溶性の放射活性と細胞に残存する酸不溶性

の放射活性を定量し、タンパク分解率を求めた。培地として、A. 通常の high glucose を含む DMEM/10% FCS、B. グルコース不含 DMEM/10% FCS、C. アミノ酸と血清を除いた栄養飢餓条件 (Krebs-Ringer bicarbonate buffer, 以下 KRB)、D. KRB からさらにグルコースを除いたもの (KRB(-)) での比較を行った。A-D、4 条件にさらに Kigamicin D を 0.1-0.2 μg/ml 加えてタンパク分解に及ぼす影響を測定した。

2) 1) と関連して、上記 4 条件下で PANC-1 細胞のオートファジー関連シグナル伝達分子が活性化されているか不活性化されているかを検討した。また、この 3 条件にさらに Kigamicin を添加し、その影響を調べた。

(倫理面への配慮) マウス肝細胞単離に際しては、「倫理的基準に基づいたヒト以外の動物種を用いた医学生物学実験の分類」のカテゴリー B に従った。

C. 研究結果

1) 長寿命タンパク分解

グルコースのみを除いた栄養環境下で起こるタンパク分解は Kigamicin D によって効果的に阻害された。これまで知られているオートファジー誘導機構であるアミノ酸飢餓とグルコース飢餓

を比較しながら、さらに Kigamicin D の効果を詳細に検討したところ、上記の 4 条件 (A-D) の中では、B、則ち血清とアミノ酸存在下にグルコースを除去したときのみ阻害が見られた。一方、グルコースとアミノ酸および血清を全て除いた D (KRB(-)) の条件下では阻害が見られなかったことから、KRB(-) に 10% FCS を補充した培養条件下で測定したところ、タンパク分解の阻害が見られた。以上の結果、Kigamicin D によるタンパク分解阻害にはアミノ酸の有無は関係なく、血清が必要であることが判明した。

グルコース飢餓における Kigamicin D 阻害をリソソーム系タンパク分解阻害剤である E64d の阻害と比較したところ、阻害の割合は両者でほぼ同等であったが、両者を共存させたときの阻害は単独でそれぞれの阻害剤を加えたときの総和にほぼ等しくなった。このことは、Kigamicin D によるタンパク分解阻害がリソソーム系タンパク分解阻害とは独立の阻害であることを示唆する。

2) シグナル伝達分子の振る舞い

アミノ酸飢餓で誘導されるオートファジーでは、インスリンやアミノ酸のシグナリングが複雑に絡み合ってこれを制御していると考えられており、中でも Tor を中心とする S6 kinase の経路が有力視されている。ラパマイシンは Tor を阻害して S6 kinase の経路を遮断し、富栄養条件下でオートファジーを誘導する。Kigamicin は富栄養条件下で S6 のリン酸化に影響しないが、グルコース飢餓では脱リン酸化を引き起こす点でラパマイシンと作用が異なる。さらに、グルコース飢餓条件下でラパマイシンはグリコーゲンシンターゼキナーゼ β (GSK-3 β) のリン酸化に影響しないが、Kigamicin D は脱リン酸化を引き起こすことが判明した。

D. 考察

実験方法の項で述べた A-D の 4 条件下でタンパク分解速度を詳細に検討したが、KigamicinD は、アミノ酸の有無に関係なく、血清存在下にグルコース除去に依存してタンパク分解を強く阻害した。阻害の大きさはリソソームプロテアーゼ阻害剤である E64d を加えたときの阻害と同程度であったことから、グルコース飢餓特異的なオートファジー阻害剤という観点からさらに解析を続けた。驚くべきことに、Kigamicin D と E64d を共存させたときの阻害の大きさはそれぞれを単独で加えたときの阻害を合計したものにほぼ見合うことが解った。このことは、Kigamicin D による阻害がリソソームタンパク分解 (= オートファジー) 阻害とは異なることを意味する。Kigamicin D のスクリーニングに当たってプロテアソーム阻害剤ではないことを既に百瀬らは確認している。一方、Kigamicin D による阻害はグルコース除去と同時に血清の存在が必要である。血清中の何らかの因子 (成長因子など) を必要とし、かつグルコースが存在しない条件で起こるタンパク分解系が何なのか、いずれにしてもこれまでに知られていない分解系であることが示唆される。また、グルコース除去によるシグナル伝達に関して、Kigamicin D が GSK-3 β の脱リン酸化を誘起することが解り、この脱リン酸化とタンパク分解阻害との関連を調べることも重要である。

E. 結論

1. PANC-1 細胞のタンパク分解は、グルコース除去条件下で Kigamicin D によって強く阻害され、この阻害にはアミノ酸は全く影響しないが血清が必要である。また、リソソームタンパク分

解阻害とは別の分解系阻害であることが解った。

2. グルコース飢餓条件下で Kigamicin D は GSK-3 β を脱リン酸化させる作用がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (英文)

1. Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T, Atomi Y, Ueno T, Ochiai A, Esumi H.

Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation.

Cancer Res. 2007; 67(20):9677-9684.

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

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

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
T, Hamaguchi, K, Kato, Y, Matsumura, a., et al.,	A Phase I and Pharmacokinetic Study of NK105, a Paclitaxel-incorporating Micellar Nanoparticle Formulation.	Brit J Cancer.	97	170-176	2007
Y, Matsumura.	Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles.	J Drug Targeting.	15	507-517	2007
K, Maekawa, Matsumura, Y., et al.	Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences.	J Hum Genet.	52	804-819	2007
T, Nakajima, Y, Matsumura, et al.	Synergistic antitumor activity of the novel SN-38 incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil.	Int J Cancer	122	2148-2153	2008
S, Yajima, Y Matsumura, et al.	Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer.	Int J Oncol.	31	1029-37	2007

Y, Saito., Y, Matsu <u>mura.</u> , et al.	Enhanced distribution of NK012 and prolonged sustained-release of SN-38 within tumors are the key strategic point for a hypovascular tumor.	Can Science.			in press.2008
M, Sumitomo., Y, <u>Matsumura.</u> , et al.	Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppresses renal cancer progression.	Cancer Res.	68	1631-1635	2008
S. Wu, S. Murai, <u>K. Kataoka</u> , M. Mi yagishi,	Yin Yang 1 induces Transcriptional Activity of p73 through Cooperation with E2F1.	Biochem. Biophys. Res. Co.	365 (1)	75-81	2008
Y. Imai, E. Kaneko, T. Asano, M. Kumagai, M. Ai, A. Kawakami, <u>K. Kataoka</u> , K. Shimokado	A novel contrast medium detects increased permeability of rat injured carotid arteries in magnetic resonance T2 mapping imaging.	J Athero. Thromb.	14 (2)	65-71	2007
S. Hiki, <u>K. Kataoka</u>	A Facile Synthesis of Azido-Terminated Heterobifunctional Poly(ethylene glycol)s for "Click" Conjugation.	Bioconjugate Chem.	18 (6)	2191-2196	2007
K. Masago, K. Itaka, N. Nishiyama, U. Chung, <u>K. Kataoka</u>	Gene delivery with biocompatible cationic polymer: Pharmacogenomic analysis on cell bioactivity.	Biomaterials	28 (34)	5169-5175	2007
A. Kawamura, A. Harada, K. Kono, <u>K. Kataoka</u> ,	Self-Assembled Nano-Bio reactor from Block Ionomers with Elevated and Stabilized Enzymatic Function.	Bioconjugate Chem.	18 (5)	1555-1559	2007
M. Nakanishi, J. -S. Park, W. -D. Jang, M. Oba, <u>K. Kataoka</u>	Study of the quantitative aminolysis reaction of poly(beta-benzyl L-aspartate) (PBLA) as a platform polymer for functionality materials.	React. Funct. Polym.	67 (11)	1361-1372	2007
M. Oishi, Y. Nagasaki, N. Nishiyama, K. Itaka, M. Takagi, A. Shimamoto, Y. Furuichi, <u>K. Kataoka</u>	Enhanced Growth Inhibition of Hepatic Multicellular Tumor Spheroids by Lactosylated Poly(ethylene glycol)-siRNA Conjugate Formulated in PEGylated Polyplexes.	ChemMedChem	2 (9)	1290-1297	2007

K. Miyata, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, <u>K. Kataoka</u>	PEG-based block cationers possessing DNA anchoring and endosomal escaping functions to form polyplex micelles with improved stability and high transfection efficacy.	J. Control. Release	122 (3)	252-260	2007
M. Oba, S. Fukushima, N. Kanayama, K. Aoyagi, N. Nishiyama, H. Koyama, <u>K. Kataoka</u>	Cyclic RGD peptide-conjugated polyplex micelles as a targetable gene delivery system directed to cells possessing $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrins.	Bioconjugate Chem.	18 (5)	1415-1423	2007
H. Cabral, N. Nishiyama, <u>K. Kataoka</u>	Optimization of (1,2-diaminocyclohexane)platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity.	J. Control. Release	121 (3)	146-155	2007
M. Han, Y. Bae, N. Nishiyama, K. Miyata, M. Oba, <u>K. Kataoka</u>	Transfection study using multicellular tumor spheroids for screening non-viral polymeric gene vectors with low cytotoxicity and high transfection efficiencies.	J. Control. Release	121 (1-2)	38-48	2007
Y. Bae, N. Nishiyama, <u>K. Kataoka</u>	In vivo antitumor activity of the folate-conjugated pH-Sensitive polymeric micelle selectively releasing adriamycin in the intracellular acidic compartments.	Bioconjugate Chem.	18(4)	1131-1139	2007
T. Satomi, Y. Nagasaki, H. Kobayashi, H. Otsuka, <u>K. Kataoka</u>	Density Control of Poly(ethylene glycol) Layer To Regulate Cellular Attachment.	Langmuir	23(12)	6698-6703	2007
D. Akagi, M. Oba, H. Koyama, N. Nishiyama, S. Fukushima, T. Miyata, H. Nagawa, <u>K. Kataoka</u>	Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation.	Gene Ther.	14 (13)	1029-1038	2007
Y. Lee, S. Fukushima, Y. Bae, S. Hiki, T. Ishii, <u>K. Kataoka</u>	A protein nanocarrier from charge-conversion polymer in response to endosomal pH.	J. Am. Chem. Soc.	129 (17)	5362-5363	2007

M. R. Kano, Y. Bae, C. Iwata, Y. Morishita, M. Yashiro, M. Oka, T. Fujii, A. Komuro, K. Kiyono, M. Kamiishi, K. Hirakawa, Y. Ouchi, N. Nishiyama, <u>K. Kataoka</u> , K. Miyazono	Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling.	P. Natl. Acad. Sci. USA.	104 (9)	3460-3465	2007
Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yasuhiro Kuwata, Mahito Mutoh, Nobuyuki Ishiguro, Naoki Utoguchi, Atsuko Shinohara, Masazumi Eriguchi, Hirinobu Yanagie, <u>Kazuo Maruyama</u>	Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome; Int.	J. Pharm	346	143-150	2008
K Sato, <u>K Tsuchihara</u> , <u>T Ueno</u> , et al.	Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation.	Cancer Res.	67	9677-9684	2007
<u>Momose</u> , I., Iijima, M., Kawada, M., Ikeda, D.	A new proteasome inhibitor, TP-110, induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells.	Biosci. Biotechnol. Biochem.,	71	1036-1043	2007

A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation

T Hamaguchi^{*1}, K Kato¹, H Yasui¹, C Morizane¹, M Ikeda¹, H Ueno¹, K Muro¹, Y Yamada¹, T Okusaka¹, K Shirao¹, Y Shimada¹, H Nakahama² and Y Matsumura³

¹Department of Medicine National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan; ²Clinical Trial Coordinating Division, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan; ³Investigative Treatment Division, Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, 277-8577, Japan

This phase I study was designed to examine the maximum tolerated dose (MTD), the dose-limiting toxicities (DLTs), the recommended dose (RD) for phase II, and the pharmacokinetics of NK105, a new polymeric micelle carrier system for paclitaxel (PTX). NK105 was administered as a 1-h intravenous infusion every 3 weeks, without antiallergic premedication. The starting dose was 10 mg m⁻², and the dose was escalated according to the accelerated titration method. Nineteen patients were recruited. The tumour types treated included pancreatic (n = 11), bile duct (n = 5), gastric (n = 2), and colonic (n = 1) cancers. Neutropenia was the most common haematological toxicity. A grade 3 fever developed in one patient given 180 mg m⁻². No other grades 3 or 4 nonhaematological toxicities, including neuropathy, was observed during the entire study period. DLTs occurred in two patients given 180 mg m⁻² (grade 4 neutropenia lasting for more than 5 days). Thus, this dose was designated as the MTD. Grade 2 hypersensitivity reactions developed in only one patient given 180 mg m⁻². A partial response was observed in one patient with pancreatic cancer. The maximum concentration (C_{max}) and area under the concentration (AUC) of NK105 were dose dependent. The plasma AUC of NK105 at 150 mg m⁻² was approximately 15-fold higher than that of the conventional PTX formulation. NK105 was well tolerated, and the RD for the phase II study was determined to be 150 mg m⁻² every 3 weeks. The results of this phase I study warrant further clinical evaluation.

British Journal of Cancer (2007) 97, 170–176. doi:10.1038/sj.bjc.6603855 www.bjcancer.com

Published online 26 June 2007

© 2007 Cancer Research UK

Keywords: NK105; paclitaxel; polymer micelles; phase I study; DDS

Paclitaxel (PTX), an antimicrotubule agent, has a wide spectrum of antitumour activity including ovarian, breast, stomach, lung, and head and neck cancers (Rowinsky *et al*, 1990; Carney, 1996; Crown and O'Leary, 2000). The clinically used PTX preparation is a mixture of Cremophor EL and ethanol because of PTX's poor water solubility. However, the use of Cremophor EL is known to be associated with acute hypersensitivity reactions (Weiss *et al*, 1990; Rowinsky and Donehower, 1995; Kloover *et al*, 2004). Other PTX preparations that have been categorised as drug delivery systems (DDS) have also been developed. These preparations include Xyotax (polyglutamate-conjugated PTX; Singer *et al*, 2003; Boddy *et al*, 2005), Abraxane (PTX coated with albumin; Ibrahim *et al*, 2002; Deisai *et al*, 2003; Nyman *et al*, 2005), and Genexol-PM (a PTX micelle in which PTX has been simply solubilised; Kim *et al*, 2004). The common advantage shared by these formulations is that they are injectable intravenously without the mixture of Cremophor EL and ethanol. Among them, Abraxane has been approved for metastatic breast cancer by the Food and Drug Administration in the USA based on the results of a randomised phase 3 trial. In this trial, Abraxane demonstrated significantly higher response

rates, compared with standard PTX, and a significantly longer time to progression (Gradishar *et al*, 2005). In addition, the incidence of grade 4 neutropenia was significantly lower for Abraxane than for PTX. However, peripheral sensory neuropathy was more common in the arm (Gradishar *et al*, 2005).

NK105 is a PTX-incorporating 'core-shell-type' polymeric micellar nanoparticle formulation (Hamaguchi *et al*, 2005). This particle can be injected intravenously without the use of Cremophor EL or ethanol as a vehicle. Therefore, NK105 is expected to possess a clinical advantage similar to that of the above-mentioned PTX formulations. The difference between NK105 and the other PTX dosage forms is that NK105 is expected to yield a markedly higher plasma and tumour area under the concentration (AUC), compared with those for the other PTX formulations. Moreover, regarding the toxic profiles, the repeated administration of NK105 to rats at 7-day intervals produced significantly fewer toxic effects on peripheral nerves than free PTX. Macromolecular drugs, including NK105, have been developed based on the characteristic macroscopic features of solid tumours, such as hypervascularity, the presence of vascular permeability factors stimulating extravasation within cancer, and the suppressed lymphatic clearance of macromolecules. These characteristics, which are unique to solid tumours, constitute the basis of the enhanced permeability and retention (EPR) effect (Matsumura and Maeda, 1986; Maeda *et al*, 2000; Duncan, 2003). The *in vivo*

*Correspondence: Dr T Hamaguchi; E-mail: thamaguc@ncc.go.jp

Received 13 March 2007; revised 23 May 2007; accepted 23 May 2007; published online 26 June 2007

antitumour activity of NK105 was significantly more potent than that of free PTX, probably because of enhanced tumour exposure through the EPR effect (Hamaguchi *et al*, 2005).

We conducted a phase I clinical trial using NK105 in patients with advanced solid tumours. The objectives of this trial were to determine the maximum tolerated dose (MTD), the phase II recommended dose (RD), and the pharmacokinetics of NK105.

PATIENTS AND METHODS

The protocol and all materials were approved by the Institutional Review Board of the National Cancer Center, Tokyo. This study was conducted in compliance with the Good Clinical Practice Guidelines of the International Conference on Harmonization and the Declaration of Helsinki Principles. Written informed consent was obtained from all the patients.

Therapeutic agent

NK105 was supplied by Nippon Kayaku Co. Ltd. (Tokyo, Japan) in 20-ml glass vials containing a dose equivalent to 30 mg of PTX. When reconstituted in 10 ml of 5% glucose solution and diluted with a total volume of 250 ml of 5% glucose, the reconstituted solution was stable for 24 h at room temperature. In our preclinical study, DLS and HPLC analysis showed that less than 2% of PTX incorporated in the micelles was released for 24 h at room temperature (data not shown).

Figure 1 shows the schematic structure of NK105, a PTX-entrapped polymeric micelle formulation. The NK105 polymers were constructed using polyethylene glycol (PEG) as the hydrophilic component and modified polyaspartate as the hydrophobic component. PEG is believed to form the outer shell of the micelle, producing a 'stealth' effect that enables NK105 to avoid being captured by the reticuloendothelial system.

The modified polyaspartate chain is hydrophobic and is believed to form the hydrophobic inner core of the micelles in aqueous media. The hydrophobic inner core enables NK105 to entrap a sufficient amount of PTX. NK105 has a diameter of about 90 nm (Hamaguchi *et al*, 2005).

Patients

Patients with solid tumours refractory to conventional chemotherapy and for whom no effective therapy was available were eligible for enrolment in this study, provided that the following criteria were met: a histologically confirmed malignant tumour; a performance status of ≤ 2 ; an age of ≥ 20 and < 75 years; a normal haematological profile (neutrophil count $\geq 2000 \text{ mm}^{-3}$, platelet count $\geq 100\,000 \text{ mm}^{-3}$, hemoglobin $\geq 9 \text{ g dl}^{-1}$); normal hepatic function (total bilirubin level $\leq 1.5 \text{ mg dl}^{-1}$, AST and ALT ≤ 2.5

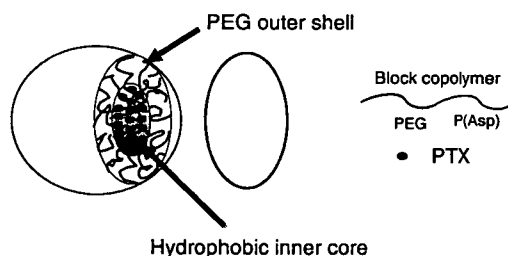


Figure 1 Schematic structure of NK105. A polymeric micelle carrier of NK105 consists of a block copolymer of PEG (molecular weight of about 12 000) and modified polyaspartate. PEG is believed to be the outer shell of the micelle. PEG is believed to form the outer shell of the micelle. NK105 has a highly hydrophobic inner core, and therefore can entrap a sufficient amount of PTX.

times the upper normal limit); normal renal function (serum creatinine $\leq 1.5 \text{ mg dl}^{-1}$); normal cardiac function (New York Heart Association (NYHA) classification of ≤ 1); normal pulmonary function ($\text{PaO}_2 \geq 60 \text{ mm Hg}$); no chemotherapy within 4 weeks (6 weeks for nitrosourea or mitomycin C) of the administration of NK105; and a life expectancy of more than 2 months. Patients with serious infections (including hepatitis B, hepatitis C, or HIV) were ineligible for enrolment in the study. Patients who had been previously treated with a taxane were excluded because of assessing neuropathy. Patients were also excluded if they were pregnant or lactating. Additionally, any patient whom the investigators considered ineligible was excluded.

Drug administration

NK105 was dissolved in 5% glucose solution for injection at room temperature. NK105 was administered intravenously without in-line filtration and without premedication. NK105 solution was infused using an electric pump at a speed of 250 ml h^{-1} .

Dosage and dose escalation

The starting dosage of NK105 was 10 mg m^{-2} , which is one-third of the toxic dose low in dogs. NK105 was administered once every 3 weeks, and the treatment was continued unless a severe adverse event or disease progression was observed. Dose escalation was performed according to the previously described accelerated titration method (Simon *et al*, 1997; Matsumura *et al*, 2004).

Toxicity was graded from 1 to 4 using the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (version 2.0). Inpatient dose escalation was not permitted. The MTD was defined as the level at which two out of six patients experienced dose-limiting toxicities (DLTs). The recommended dosage for a phase II trial was defined by the Efficacy and Safety Assessment Committee based on the safety, pharmacokinetics, and efficacy results of this trial. DLT was defined as grade 4 neutropenia lasting more than 5 days, a platelet count of less than $25\,000 \mu\text{l}^{-1}$, or grade 3 or higher non-haematological toxicity, with the exception of nausea, vomiting, appetite loss, and hypersensitivity.

Pretreatment assessment and follow-up care

A complete medical history and physical examination, performance status evaluation, complete blood cell count (CBC), blood chemistry, urinalysis, electrocardiogram (ECG), and a computed tomography (CT) examination were performed in each patient. Other examinations were performed only in the presence of a specific clinical indication. Patients were physically examined every day until the second administration of NK105; CBC and blood chemistry tests were performed on day 3 and weekly thereafter. An ECG examination was repeated before each administration of NK105. Tumour marker levels were also measured before every administration. Tumour response was evaluated according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumours criteria (Therasse *et al*, 2000).

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of PTX concentrations

The PTX concentrations determined in the present phase I study represented the total drug concentrations (both micelle-entrapped and released). It was difficult to measure released PTX and micelle-entrapped PTX separately, because the equilibrium between both forms could not keep constant during the separating procedure. PTX was extracted from human plasma (0.2 ml) or urine (0.5 ml) by deproteinisation with acetonitrile. The quantifications of PTX in plasma and urine were performed using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Reversed-phase column-switching

chromatography was conducted using an ODS column and detection was enabled by electrospray ionisation of positive mode.

Pharmacokinetic analysis

The following pharmacokinetic parameters were calculated for each patient using a non-compartmental model using the WinNonlin Professional version 4.1 program (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). The maximum concentration (C_{max}) was the maximum observed plasma concentration of PTX, and the time-to-the-maximum concentration (T_{max}) was the time corresponding to C_{max} . The area under the concentration (AUC)-time curve from time zero up to the last quantifiable time point (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal rule, and the area under the concentration-time curve from zero until infinity (AUC_{0-inf}) was calculated as the sum of AUC_{0-t} and the extrapolated area under the zero moment curve from the last quantifiable time point to infinity calculated by dividing the plasma concentration of the last quantifiable time point (observed value) by the elimination rate constant. The half-life of the terminal phase ($t_{1/2Z}$) was calculated as $\log_e 2/\lambda_z$, where λ_z is the elimination rate constant calculated from the terminal linear portion of the log of the concentration in plasma. Total clearance (CL_{tot}), the volume of distribution at steady state (V_{ss}), and renal clearance (CL_r) were calculated using the following equations, where D is the dose and $AUMC_{inf}$ the area under the first moment curve from time zero until infinity:

$$CL_{tot} = D/AUC_{inf}$$

$$V_{ss} = AUMC_{inf}/AUC_{inf} \times CL_{tot}$$

$$CL_r = \text{cumulative urinary excretion}/AUC_{inf} / \text{body surface area}$$

RESULTS

Patient characteristics

Nineteen eligible patients were recruited for the study (Table 1). All the patients had received chemotherapy before enrolment. Prior therapies ranged from 1 to 3 regimens of chemotherapy. None of the patients had received taxane chemotherapy. All the patients were included in the safety and response analyses.

Dosing

Dosage escalation started at 10 mg m^{-2} and was increased up to 180 mg m^{-2} . In total, 73 administrations were performed in 19 patients. Eighteen patients received more than two administra-

Table 1 Patient characteristics

Number of patients	19
Male/female	13/6
Age (years)	
Median	57
Range	43-72
ECOG PS	
Median	0
0	10
1	9
Prior treatment	
Chemotherapy regimens	
Median	1
Range	1-3

tions. The maximum number of treatments was 14 courses at 150 mg m^{-2} ; the average number of administrations at all levels was 3.8 courses. Up until 80 mg m^{-2} , grade 2 toxicity was not observed during the first course.

According to the original protocol, the dosage of NK105 should have been doubled for each escalation until grade 2 toxicity. However, the safety committee recommended that the dosage should be raised by 40% instead of 100% at 110 mg m^{-2} and that a modified Fibonacci escalation method should be implemented. Therefore, we recruited three patients at dosage level 5 (110 mg m^{-2}) and re-started the dose identification study using a modified Fibonacci method.

Haematological toxicity

Significant myelosuppression was not observed up to level 4 (80 mg m^{-2}). At level 7 (180 mg m^{-2}), two out of five patients appeared to have acquired DLTs, namely grade 4 neutropenia lasting for more than 5 days. On the basis of these results, 180 mg m^{-2} was considered to be the MTD, with neutropenia as the DLT. Since a dosage of 150 mg m^{-2} was considered to be the recommended dosage for phase II studies, an additional four patients were enrolled at a dosage of 150 mg m^{-2} ; one patient developed DLT, namely grade 4 neutropenia lasting for more than 5 days (Table 2). During the entire period of this study, G-CSF was never used to rescue patients.

Nonhaematological toxicity

The NK105 injection was generally uneventful and well tolerated in terms of nonhaematological toxicities (Table 2). Most of the toxicities were grade 1; none of the patients manifested grade 4 toxicity. A few patients developed a grade 1 elevation in AST or ALT, but these changes were transient. Pain or local toxicity in the area of the injection was not observed in any of the patients treated with NK105. No infusion-related reactions were observed; such reactions sometimes occur during liposomal drug administration. Patients were not premedicated with steroids or antihistamines. Only one patient at 180 mg m^{-2} developed grade 2 hypersensitivity. After the first course, the patient received premedication of hydrocortisone and did not develop such hypersensitivity after that. The other 18 patients did not experience any hypersensitivity during the study. Neuropathy occurred in a typical stocking/glove distribution and was manifested by numbness. Three patients at level 6 (150 mg m^{-2}) and three patients at level 7 (180 mg m^{-2}) experienced grade 1 neurotoxicity during 1 cycle. Of the four patients who received multicourse treatment more than five times, only three patients developed grade 2 neuropathy and the other patient developed grade 1 neuropathy. Even one patient who received 14 cycles of treatment experienced only grade 2 neuropathy.

Pharmacokinetics

The plasma concentrations of PTX after the intravenous infusion of NK105 were determined in each of the patients enrolled at a dose of 150 mg m^{-2} (Figure 2A). The C_{max} (Figure 2B) and AUC (Figure 2C) increased as the doses were escalated from 10 to 180 mg m^{-2} . The pharmacokinetic parameters are summarised in Table 3. The $t_{1/2Z}$ ranged from 7.0 to 13.2 h, and a slight tendency towards a dose-dependent extension of this parameter was observed. The CL_{tot} ranged from 280.9 to $880.4 \text{ ml h}^{-1} \text{ m}^{-2}$, and the V_{ss} ranged from 3668.9 to $10400.3 \text{ ml m}^{-2}$. Although these parameters were slightly reduced depending on the dose, linear pharmacokinetics was assumed to have been observed in the dose range from 10 to 180 mg m^{-2} . The AUC of NK105 at 150 mg m^{-2} (recommended phase II dose) was about 15-fold larger than that of conventional PTX at dose of 210 mg m^{-2} (conventional dose for a