

2008(2004B)

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

: ナノメディシン研究

研究課題: がん診断・治療両用高分子
ミセルターゲティングシステム

平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 横山 昌幸

平成21(2009)年4月

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

がん診断・治療両用高分子
ミセルターゲティングシステム

平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 横山 昌幸

平成21（2009）年4月

目 次

I. 総合研究報告

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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 6 6

III. 研究成果の刊行物・別刷----- 7 6

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総合研究報告書

がん診断・治療両用高分子ミセルターゲティングシステム

主任研究者 横山昌幸（財）神奈川科学技術アカデミー・プロジェクトリーダー

研究要旨 疎水性の抗がん剤を安定・高収率で内包する高分子の設計法を構築し、がんへのターゲティングを達成する。さらに、レチノイドを封入した高分子ミセルによって、分化誘導という新しい機構で固形がんに対する活性を得た。また、同じキャリアを用いたMRI造影剤システムによって微小がんの検出を実現し、診断と治療が一体化したがん医療システムの実現可能性を提示した。

分担研究者

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

A. 研究目的

高分子ミセルドラッグキャリアシステムは図1に示すように、合成高分子が数百分子会合しその内核に疎水性薬物を保持し、標的部位に選択性高く運搬することで、飛躍的に薬効を高め、副作用を減少させることができる。特に10～100nmの直径の極めて小さなナノサイズでありながら、多量の疎水性薬物を安定に封入できることで、EPR効果（固形がん組織血管の透過性が亢進している性質）を利用して固形がんターゲットングできることが大きな特長である。

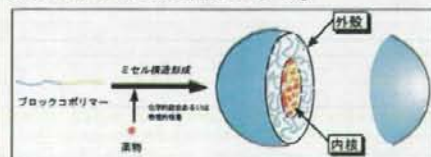


図1 高分子ミセル薬物キャリアシステム

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

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

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

特に、診断（MRI）と治療（化学療法）を同一のキャリアシステムで行うことが可能となるために、さらに、高分子ミセル造影剤MRI画像から、高分子ミセル化学療法の有効性が予測され得る。これは患者個々へのオーダーメイド治療の実現につながる。

（高分子ミセルMRI造影剤で明確に固形がん画像が得られた患者は、高分子ミセル抗がん剤での治療効果が高いと予想され得る。）

3年計画の前半では、以下の点に重点を行って研究を推進した。

- ・ 薬物封入用及び、ビオチンや蛍光物質を結合したブロックコポリマー合成

ウインドウチャンパー法を用いたがん組織での高分子ミセル集積部位と集積機構の解析

- ・カンプトテシンやレチノイド類を安定に封入するための高分子構造最適化
- ・ポリアスパラギン酸あるいはポリリシンをベースとした新たな系統のブロックコポリマーによるMRI造影剤の作製と、ミセル構造の形成・解離に基づくT1緩和能変化の解析

一方、3年計画の後半には、以下の事柄に重点を置いた。

- ・腫瘍血管破断薬AC7700による高分子ミセルターゲティングの増強
- ・血中半減期の長い高分子ミセルMRI造影剤によるがんターゲティング挙動及びマウス固形がんMRI画像解析

3年間の研究を通して得られた主な成果は以下の通りである。

- (1) 高分子ミセルを形成する高分子合成法が確立した。
- (2) レチノイドを高分子ミセルに安定に封入する新規方法を見いだした。
- (3) カンプトテシンと各種レチノイド封入ミセルでマウス固形がんへのターゲティングが実証された。
- (4) 葉酸修飾によるアクティブターゲティング型高分子ミセルが作製された
- (5) 高分子ミセルの大量投与によっても、正常組織に病理的変化が認められないことが確認された。
- (6) ウインドウチャンパー法によるがんへのミセル集積挙動の解析によって、がん組織への高い集積を観察した。また、がん組織と

正常組織の境界に存在する変性領域での特に高いミセル集積現象を発見した

- (7) ウインドウチャンパー法による3mm以下の微小がんへのミセル集積挙動を解析した。そして放射線照射あるいは腫瘍血管破断薬AC7700投与によって、この微小がんへの集積が高まることを見いだした。
- (8) 現在進行中の高分子ミセル抗がん剤の臨床結果と動物でのデータの比較を行い、高分子ミセルのがんターゲティング研究の方向性を規定した。
- (9) MRI造影剤で高分子構造解離に伴ってT1緩和能を増加させることに成功した。
- (10) 高分子ミセル造影剤がマウス固形がんを選択的に送達されることを観察した。また、3mm程度の微小がんにもターゲティングされること、AC7700の前投与によって送達量が高まることを見いだした。
- (11) DCE-MRI法によるナノサイズキャリアーの腫瘍血管透過挙動解析法を確立した。

B. 研究方法

(1) ブロックコポリマーの合成
および薬物の封入

高分子ミセルを形成するブロックコポリマーとしてポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル L-アスパルテート)ブロックコポリマーを基とし、それを加水分解してポリエチレングリコール-ポリ(アスパラギン酸)とし、それにエステル形成にて疎水基をアスパラギン酸残基に導入したものである。

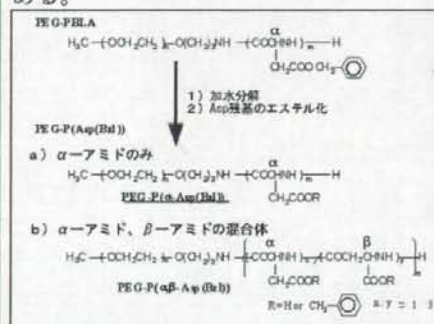


図2 ブロックコポリマーの構造

通常は加水分解をアルカリで行うために、生成したアスパラギン酸残基はその70%程度がβ-アミドとなっている。今回はこれとは別に酸加水分解によってα-アミドが100%保たれたブロックコポリマーを得た。それらに対して主にベンジルエステルをハライド化合物の求核置換反応によって40-80mol%導入したブロックコポリマーを得た。コポリマーの呼び方は、例えばベンジルエステルを70%導入したものをPEG-P(Asp(bzl 70))と表す。アスパラギン酸残基のアミドのタイプを区別するときにはPEG-P(α-Asp(bzl 70))やPEG-P(α, β-Asp(bzl 70))等と表す。今回用いたものはいずれも、PEGの分子量が5,000、アスパラギン酸のユニット数が23-27のものを用いた。

高分子ミセルの形成及び薬物のミセルへの封入はエバポレーション法によって行った。すなわち、このブロックコポリマー5 mgに有機溶媒に溶解した、カンプトテシン溶液(1 mg/mL)を加え攪拌し、溶媒を窒素気流下で蒸発させることによりフィルムを作製した。このフィルムに蒸留水4.0 mLを加えて超音波照射を行い、遠心分離により沈殿物を取り除いた。

上清をフィルターで精製し、血中濃度測定の場合は0.9 wt%になるようNaClを加えた。有機溶媒としては従来用いていたクロロホルムに加えて、新たにトリフルオロエタノール(TFE)を用いた。

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

(2) ビオチン修飾ブロックコポリマーの合成

成果項目の(6)の高分子ミセルキャリアーによる病理解析のため、親水部の末端にビオチン基を導入したビオチン-ポリエチレングリコール-ポリ(ベンジル L-アスパルテート)を作製した。このビオチン修飾ブロックコポリマーをミセル化することで、高分子ミセルの腫瘍組織内での局在部位や集積挙動をビオチン-アビジン相互作用を用いた抗体染色法により評価することが可能となる。本研究では、図3に示すように鎖長の長いポリエチレングリコール(PEG)にビオチンを導入したブロックコポリマーと、鎖長の短いPEGを持つ未修飾のブロックコポリマーを混合することで、ビオチン修飾高分子ミセルを作製する。

このPEG鎖長の違いを利用することで、高分子ミセル表面にビオチンをアンテナのように露出させることで、

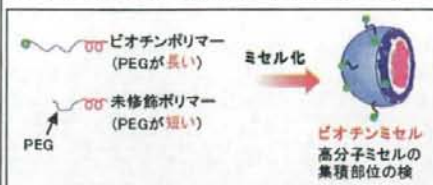


図3 ビオチンミセルの設計

ビオチンの検出感度の向上を目指した研究を行った。

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

ビオチンの修飾に使用するPEGは、ビオチン検出に関する鎖長の影響を調査するため、分子量5,000 (PEG₅)と12,000 (PEG₁₂)の2種を使用した。合成スキームを図4に示す。N末端を保護したCHO-PEG-Fmocに、biotin hydrazideを加えることで、シッフ塩基を形成した。そのシッフ塩基の還元によりPEG末端にビオチン基を導入した。ビオチン導入量は¹H-NMRおよびビオチン-アビジン相互作用を利用したUV

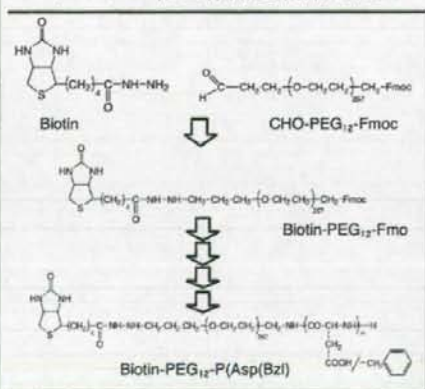


図4 ビオチン修飾ブロックコポリマーの合成スキーム

測定法により評価した。

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

(3) レチノイドの高分子ミセルへの封入

封入するレチノイドとしてはレチノイン酸(ATRA)、その疎水性誘導である4-HPR、および合成レチノイドである、Am80とLE540である。Am80とLE540の化学構造を図5に示す。

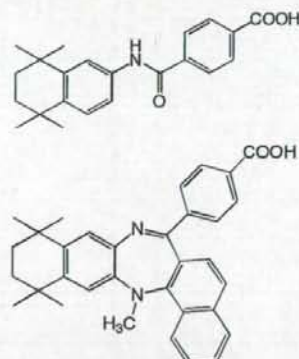


図5 レチノイドの化学構造

Am80(上)とLE540(下)。

Am80はATRAと同様に急性全骨髄球性白血病(APL)の治療に有効であり、再発および難治性APL治療薬として認可されている。ヒト骨髄性白血病細胞HL-60に対する分化誘導能はATRAよりも強く、ATRAより化学的に安定であり、さらにATRA耐性の機構の一つと考えられる細胞内ATRA結合タンパク質との相互作用が小さいなどの性質をもつ。また、腫瘍形成や血管新生を促進するIL-6の発現を抑制することから、固形腫瘍に対する抗腫瘍効果が期待される。

レチノイドのミセル封入は下記の2方法により行った。

1) エバポレーション法：レチノイドとブロックコポリマーを揮発性有機溶媒に溶解し、溶媒を蒸発させてフィルムを調製した後、蒸留水を加えて超音波照射することにより高分子ミセルを得た。

2) 透析法：レチノイドとブロックコポリマーを水溶性有機溶媒に溶解し、水に対して透析処理することにより高分子ミセルを得た。これらのミセル化処理の後、遠心分離および濾過により不溶成分を除去した溶液を評価試験で使用した。

ミセルに封入されたレチノイドは

2) GPC法：TSK-gel G4000PWLカラムを使用し、示差屈折 (RI) によりミセル成分を、紫外吸光 (UV) によりレチノイド成分を検出した。また、カラムを取り外して測定を行うことにより、カラム内でのミセルならびにレチノイドの損失量を評価した。

このAm80を封入するために用いたブロックコポリマーは前項と同じ系統のPEG-PBLAおよびPEG-P(Asp(Bzl))である。今回用いたものはいずれも、PEGの分子量が5,000、アスパラギン酸のユニット数が24のものを用いた。PEG-P(Asp(Bzl))のベンジルエステル化率は、33、53、および80%を用いた。Am80の高分子ミセルへの封入は前項と同じく、エバポレーション法によって行った。ただし、用いた有機溶媒はテトラヒドロフラン (THF) である。

Am80のミセルからの徐放を達成するために、疎水性のアミンとAm80をイオンコンプレックスとしてミセルに封入する場合は、Am80と疎水性のアミン、ブロックコポリマーを共にTHFに溶かしてから上記と同様にエバポレーション法によって封入した。n vitroでの薬物放出速度の測定は、薬物を封入した高分子ミセル溶液を透析チューブ

(1-kDa cut-off) 中にいれて、外部透析液 (PBS, pH 7.4) に放出されたAm80量を逆相HPLCによって測定した。

4-HPR封入ミセル

ポリマーの合成：

poly(ethyleneglycol)-poly(β -benzyl-L-aspartate) (PBLA) を出発物質とし、アルカリ加水分解後、アスパラギン酸残基に種々の官能基を導入した。導入率はNMR解析を基に算出した。

4-HPR封入ポリマーミセルの調製：4-HPR封入ポリマーミセルは4-HPR:ポリマー=1:2.5 (重量比) の組成でクロロホルムに溶解後、エバポレーション法により調製した。4-HPRの回収率は吸光度から算出した。

粒子径・Z電位の測定：Zetasizer Nano ZSを用いてそれぞれ測定した。

4-HPRの体内動態評価：マウスに4-HPR 5 mg/kgで尾静脈内投与し、所定の時間に下大静脈より血液を採取および各臓器を摘出し、アセトニトリルで抽出後、HPLCを用いて4-HPR量を測定した。対照として4-HPRをHCO-60に溶解したものをを用いた。

in vivo抗腫瘍効果：B16BL6細胞をマウスに皮下移植後、腫瘍径が約5mmに達した地点で投与を開始し、2日間隔で計3回投与した。投与開始後、2日間隔で腫瘍径を計測することで腫瘍体積を算出した。同時にマウスの体重を計測することで毒性についても評価した。

Am80封入ミセルの生物評価

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：Zetasizer 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、 1.0×10^5 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。

治療効果の評価: 腹膜播種モデルマウスに合成レチノイド/ポリマーミセル誘導体を腹腔内投与後、腹膜および大網を摘出し、ホモジネートの後、組織中のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性よりがん細胞数を算出した。また、生存期間の延長により治療効果を評価する。

(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。

(4) MRI造影剤用高分子の合成とT1緩和能測定

MRI造影能を有するGd (ガドリニウム) イオンを結合したブロックコポリマーを2種類合成した。アスパラギン酸をベースとしたものと、リシンをベースとしたものの2種類である。

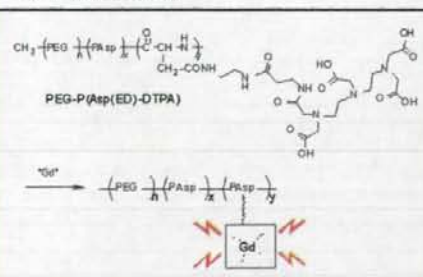


図6 アスパラギン酸系のMRI造影剤用ブロックコポリマー

アスパラギン酸をベースとしたものはポリエチレングリコール-ポリ(β-ペンジル L-アスパルテート) ブロックコポリマー (PEG-PBLA) をアルカリ加水分解し、ポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸 (PEG-P(Asp)) へと変換させた。アスパラギン酸残基に1級アミノ基をエチレン鎖を介して導入し、続いて活性エステル化されたDTPA誘導体を反応させ、キレート基であるDTPA基を導入した。最後に塩化ガドリニウムを反応させ造影機能を有するポリマーを得た。

もう一つのリシンを用いたものは、図4に示すように、Z保護基をつけたアミノ酸無水物を片末端アミノ基のポリエチレングリコールから重合させた後、Z基を脱保護してポリエチレングリコール-ポリ(L-リシン) ブロックコポリマー (PEG-P(L-Lys)) を得た。これに、キレート基であるDOTAの活性エステルを反応させることによりPEG-P(L-Lys(DOTA))を得た。これに塩化ガドリニウムを反応させ造影機能を有するポリマーを得た。

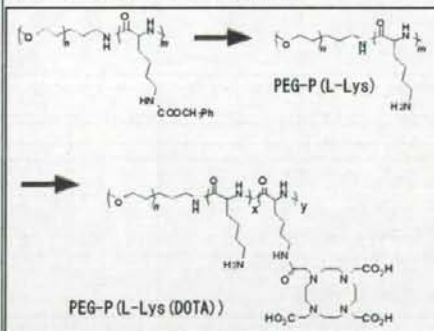


図7 リシン系のMRI造影剤用ブロックコポリマー
ブロックコポリマーの組成は400MHzの¹H-NMR装置によって求めた。結合したGd量はICP (Induced Coupled Plasma) 測定装置によって定量した。

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

R1が大きい程、T1緩和能が高いこととなる。測定は400MHzVarian Inova400測定装置で行った。

高分子ミセルを作製するときは、NaCl存在下、(PEG-P(Asp-(Gd-DTPA))中の負電荷に対し、ポリアリルアミンまたはプロタミンのポリカチオンを混合し、蒸留水に対して透析して高分子ミセルを得た。

MRI画像取得

MRIの画像評価はマウスへMRI造影剤を0.05mmol Gd/kg静脈内投与し、その後、時間ごとのMRIを取得して評価を行った。MRIの測定は9.4Tの磁場のもと、グラディエントエコー法を用いてT1強調画像を取得した。

体内動態・分布の測定

0.05 mmol Gd/kgの投与量でマウス尾静脈より投与し、一定時間後に血液、主要臓器、腫瘍を採取し、熱した濃硝酸による可溶化処理の後、含まれるGd³⁺イオン量はICPで測定することにより血中動態・体内分布、腫瘍集積性の評価を行った。

DCE-MRIの実験

動物：マウス結腸癌由来であるcolon26細胞(1.0×10⁶ cells)を5週齢の雌性CDF1マウスの側腹部皮下に移植した。腫瘍サイズ約100mm³でA-83-01を1回当たり1mg/kgの投与量で腹腔内投与した。繰り返し投与では、初回投与21時間後に追加投与を行った。

Gd封入リポソーム：Gd封入リポソーム(Gd-L)の組成は、卵黄レシチン、コレステロール、PEG₂₀₀₀-DSPEを10:4:0.7(モル比)からなり、Gd-DTPA(Magnevist®)を内封して調製し、粒子径を約120nmにした。

DCE-MRI：イソフルラン麻酔下のマウスを、9.4T 垂直型MRIに挿入した。腫瘍と左心室を含むスライスを1枚/1秒で連続撮像しながら造影剤を投与し、360枚の画像を得た。腫瘍と左心室の画像強度をGd濃度(Ct(t)、Cp(t))に変換し、以下の式から腫瘍内血漿容積(v_p)と容積輸送定数(K^{trans})を求めた。

拡散強調画像：マウス腫瘍において異なる4つの運動傾斜磁場(b値; 0, 200, 400, 800)を負荷してMR画像を取得し、見かけの拡散定数(ADC)を求めた。

腫瘍組織観察：繰り返しA-83-01処置後及び未処置の腫瘍の切片を作成し、hematoxylin eosin染色、抗smooth muscle actin抗体によるペリサイト染色、抗Ki67抗体による増殖期細胞の染色を行った。また、Hoechst 33342を静脈内投与後に腫瘍切片を作成し、腫瘍中の血流状態を評価した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は星薬科大学の規定に基づき行った。

(5) 葉酸結合高分子ミセル

葉酸結合高分子ミセルの調製

葉酸結合脂質Folate-PEG₅₀₀₀-DSPEは、folateとamino-PEG₅₀₀₀-DSPEから合成した。CPT封入高分子ミセル(plain micelle)はPEG₂₀₀₀-poly(aspartic acid)を基本骨格としたブロックコポリマーと難溶性の抗癌活性物質CPTを用い、溶媒除去法にて調製した。葉酸修飾CPT封入高分子ミセル(F-micelle)は、plain micelleの組成に、封入に用いたCPT量: folate-PEG₅₀₀₀-DSPE=10:0.03、0.1、0.2mol)となるようにfolate-PEG-DSPEを加え、溶媒除去法にて調製し、それぞれ、0.03F-micelle、

0.1F-micelle、0.2F-micelleとした。
薬物放出性の評価

透析膜内にplain micelle、0.03F-micelle、0.2F-micelleを加え、37℃のリン酸緩衝液(pH 7.4)中へのCPT放出量を蛍光で測定することにより評価した。

葉酸修飾高分子ミセルの細胞内取り込みの評価

葉酸受容体が過剰発現しているKB細胞(ヒト咽頭癌上皮細胞株)に、各高分子ミセル製剤を加え2時間インキュベートした。細胞表面に結合した高分子ミセル製剤を取り除くため、PBS(pH 7.4)とacidic saline(pH 3.0)で洗浄を行った。高分子ミセルは、蛍光標識物質DiIで標識し、フローサイトメトリ、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡による細胞内への取り込みを測定、観察を行った。

細胞毒性による抗腫瘍効果の評価

葉酸受容体が過剰発現しているKB細胞と、発現していないHepG2細胞(ヒト肝臓癌細胞株)に、各高分子ミセル製剤を加え2時間インキュベートした後、培地を交換後、48時間の追加培養を行い、WST-8 assay法を用い細胞生存率を比較・評価した。

担癌マウスによる抗腫瘍効果の評価

評価に用いた高分子ミセルは、PEG₅₀₀₀-poly(aspartic acid)を基本骨格としたブロックコポリマーを用い、Folate-PEG₁₀₀₀₀-DSPEにより0.2F-micelleを溶媒除去法により調製した。その後、限外濾過により濃縮して用いた。担癌マウスは、雌性CDF₁マウスにM109細胞(マウス肺癌細胞)を皮下移植して作成した。その後、各高分子ミセル製剤を5mg CPT/kgとなるように静脈内投与し、腫瘍サイズを比較することにより抗腫瘍効果の評価した。

(6) 腫瘍血管破断薬AC7700と高分子ミセルの併用効果

AC7700毒性評価

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

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

表1 アドリアマイシン高分子ミセルの組成

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

1) Asp残基に対して

In vivo抗がん活性評価

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

(7) ラットによる生体毒性評価

ドンリュウ系ラットのみス (140-160 g) を用いた。ミセル群 (6 匹) には 20 mg/kg/rat, 0.5ml を隔日毎に 5 回 (D-0, D-2, D4, D-6, D-8) 尾静脈内に注入した。対照群 (6 匹) には生理食塩水 (大塚製薬) を 0.5ml 尾静脈内に注射した。投与開始後 30 日まで経過観察し、隔日に体重を測定した。投与開始後 30 日目にエーテル麻酔下に動物を屠殺、大脳、心臓、肺、肝臓、脾臓の重量を測定、また主要な組織を病理組織学的に検討した。ミセルは 10 mol% Biotin-PEG 5-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。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。

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 ~ 150 ml 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。

(8) ラット腫瘍のウインドウチャンパーモデルによる解析

高分子ミセルの腫瘍血流と全身血圧に及ぼす影響

高分子ミセルが微小循環動態にどのような影響を与えるかを調べるためのポリマーミセルとして、poly(ethylene glycol) と poly(β -benzyl L-aspartate) で構成される PEG₁₂-PBLA₁₄ (平均分子量 14,870、PEG の平均分子量が 12,000 で β -benzyl L-aspartate の平均重合ユニット数が 14 のもの) と、これにアドリアマイシンを封入したミセル PEG12-P (Asp (ADR)) 22 を用いた。これは PEG の平均分子量が 12,000 でアスパラギン酸平均重合ユニット数が 22 で、そのアスパラギン酸の 59% にアドリアマイシンの結合している。このブロックコポリマーから成る高分子ミセルにアドリアマイシンを物理的に封入したものである。

測定に用いる固形腫瘍は、吉田腹水肉腫 LY80 細胞を Donryu ラットの背部に移植して作成した。腫瘍血流量は水素クリアランス法で測定し、全身血圧の測定は大腿動脈にカテーテルを挿入することにより行った。

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 PEG₁₂-PBLA₁₄-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。

腫瘍血管破断薬AC7700による腫瘍変性領域の作成

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。

倫理面への配慮

全ての実験は、東北大学のガイドラインに従い、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。

(9) 臨床に近い動物モデルによる解析

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) ブロックコポリマーの合成
および薬物の封入

従来は、DBUによってアスパラギン酸残基のカルボキシル基を活性化し、ハライド化合物への求核置換反応によって、疎水性基をエステルとしてアスパラギン酸側鎖に導入する反応では、ベンジル基の場合は70%位が最大値として得られるが、ブチル基やノニル基などの単純なアシル鎖の場合には高い置換率のものが得られない欠点があった。この点の改良を試みたところ、1) 反応性の高いヨウ化物を用いること、2) 触媒として用いるDBU試薬の量を厳密に制御し、アスパラギン酸残基を超えないようにする。の2点の工夫を加えることで任意のアシル基でも70%程度の置換率を得ることが可能となった。表2に示すように、ベンジル基の場合には臭化物でDBUを1等量より多くても高いエステル化率を与えるが、run 2、3に示すようなヘプチル基の場合には30%程度と低エステル化率にとどまる。しかし上記の2項目を満たしたrun 4では63%と高いエステル化率を得ることができた。他のペンチルやノニルの場合にも高いエステル化率が得られることがわかった。

表2 アスパラギン酸側鎖へのエステル導入

run	疎水基	ハロゲン種	ハロゲン種の等量 ¹⁾	DBUの等量	エステル化率
1	ベンジル	Br	2.0	2.0	74%
2	ヘプチル	Br	2.0	2.0	29%
3	ヘプチル	I	2.0	2.0	33%
4	ヘプチル	I	1.0	1.0	63%
5	ペンチル	I	1.5	1.0	75%
6	ノニル	I	1.5	1.0	84%

1) アスパラギン酸残基に対して

今回の成果によって、合成できる疎水性高分子鎖構造の範囲が大きく拡大したことになり、今後この研究班において薬物等の封入を最適化することが容易になったことを意味する。

図8にCPT封入高分子ミセルのCPT封入安定性の結果を示す。

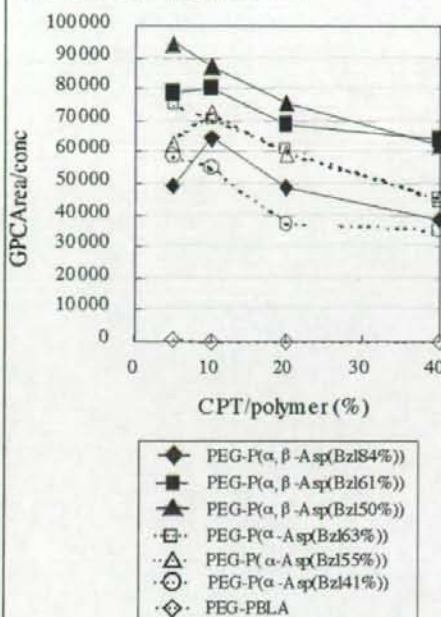


図8 カンプトテシン封入安定性及び疎水性鎖構造の影響

GPCのミセル分画に出る封入CPTの面積をCPT濃度で割った比が大きいほど封入安定性が高いとした。アスパラギン酸残基のアミドが α 体だけのPEG-P(α -Asp(bzl))と α 体と β 体の混合物であるPEG-P(α, β -Asp(bzl))の両系列のブロックコポリマーにおいてベンジル化率60~70%で封入安定性は最大になる。特に α 体だけのPEG-P(α -Asp(bzl))ではベンジル化率が100%のPEG-PBLAとなると封入安定性が急激に失われる。ベンジル化率は疎水性高分子鎖の疎水性の強さと関連する。ベンジル化率が高いほど疎水性が強くなる。また、 α 体だけのPEG-P(α -Asp(bzl))と α 体と β 体の混合物であるPEG-P(α, β -Asp(bzl))を比較すると、

混合物のコポリマーの場合の方が封入安定性が高いことがわかる。混合物の50%と61%ベンジル化のものは、 α 体の55%と63%の両者よりも安定性が高い。ポリマーに対するカプトテシンの割合を10%に固定して比較したものが図9である。

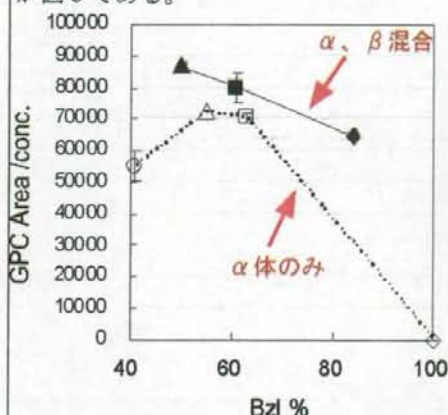


図9 CPT/ポリマー重量比を10%に固定した場合のCPT封入安定性

実線で結んだ α -アミド+ β -アミド混合ブロックコポリマーの場合の方が封入安定性が高いことが明確にわかる。異性体は疎水性などの物性が同一であるので、この現象は興味深く、また薬物封入を最適化するための高分子設計にとって重要な事柄である。また、一般に高分子マトリクスの疎水性は薬物封入安定性を決める重要な因子であるので、この結果で薬物封入安定性が疎水性のみでは決定されなかったことは大変興味深い。

以上の結果から、疎水性以外の要因が安定なCPT封入安定化に寄与していることが明らかになったので、その要因が何であるかを求めるための実験を行った。

表3に蛍光プローブのピレンとジピレンによるミセル内核の疎水性の高さと流動性評価の結果をまとめる。ピレンのI339/I334比が大きいほど内核の疎水性が高く、ジピレンのI480/I398比

が大きいほど内核流動性が高いことを示す。

表3 ミセル内核物性の比較

ポリマー	ピレンの I339/I334	ジピレンの I480/I398
PEG-P(α, β -Asp(Bzl84%))	1.7	0.10
PEG-P(α, β -Asp(Bzl61%))	1.6	0.11
PEG-P(α, β -Asp(Bzl50%))	1.7	0.10
PEG-PBLA (=PEG-P(α -Asp(Bzl100%)))	2.0	0.04
PEG-P(α -Asp(Bzl63%))	1.7	0.41
PEG-P(α -Asp(Bzl55%))	1.6	0.23
PEG-P(α -Asp(Bzl41%))	1.6	0.22

まず、内核の疎水性度ではPEG-P(α -Asp(Bzl100%))に対応するPEG-PBLAのみ他より高い値を示したが、その他のポリマーはいずれも1.6~1.7の同様の値を示した。これは、少量の蛍光プローブが疎水性のベンジル基が会合して集中している局所環境を検出して、内核全体を検出していないためと考えられる。これに対して、ジピレンを用いた流動性評価では、PEG-PBLAが0.04と最も低い値を示し、流動性の低い内核環境を示した。次に低い値は α -アミド+ β -アミド混合ブロックコポリマーで0.10~0.11が観察された。これに対し、PEG-PBLA以外の α 体ポリマーでは0.22~0.41という値で流動性の高い内核を有することがわかった。以上からCPTの安定封入性の高かったPEG-P(α, β -Asp(bzl50%))やPEG-P(α, β -Asp(bzl61%))は疎水性の高さと流動性のバランスが良かったためと考えられることができる。また、 β -アミドは α -アミドに比べて1原子分だけ主鎖部分が長い。よって、疎水性ベンジル基で疎水性のCPT分子を挟み込むのに立体的に好適であることが封入安定性に寄与している可能性もある。

蛍光プローブの解析では、CPT封入安定化に寄与している要因を明らかにできなかったが、疎水性の強さのみでは封入安定性が規定されて

いないことは確認され、疎水性高分子構造の精密な設計がターゲティングを成功させるには重要な事柄であることが再確認された。

CPT内包ミセル作製時に、CPTの2,2,2-trifluoroethanol (TFE) 溶液を添加することにより、クロロフォルムを溶媒として封入した従来法に比べて、粒径の小さな粒子を得ることができた。図9に結果を示す。

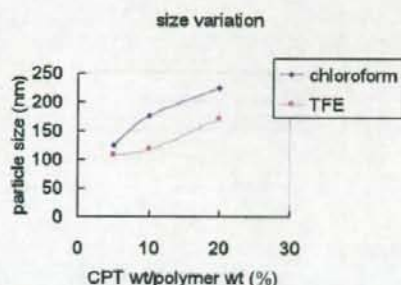


図9 封入溶媒による平均粒径の違い (Cumulant平均にて示す)

封入時における薬物/高分子の重量比 (CPT/polymer) が5-20%の間で、TFEを使用した場合のミセルの粒径が100-170 nmであるのに対し、chloroform使用の場合は120-220 nmとなっている。前年度までの検討により、クロロフォルムを溶媒として封入した場合には、CPT/polymer比が5%~40%の間で血液循環性が変化しないことをがわかっている。図10には静脈内投与後4時間での血液中循環量を比したものである。クロロフォルム用いて作製したCPT内包ミセルでは、4時間後の血中循環量は投与量の約10%であったが、TFEを用いて封入したものは27%と高い循環量を示した。EPR効果による固形がんへのパッシブターゲティングでは高い血液循環性が必要条件である。

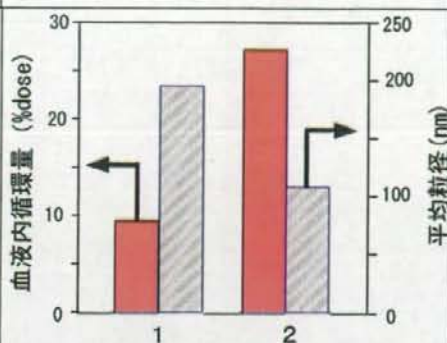


図10 静脈等予後の血中濃度測定
1: クロロフォルムの場合 (40% CPT)
2: TFEの場合 (10% CPT)

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

溶媒を2種類 (CHCl₃とTFE)、CPT/ブロックコポリマーの重量比を様々に変えた場合の、封入後のCPTミセル溶液中のCPT濃度を図11に示す。例えば、TFE溶液から作製した高分子ミセル溶液に含まれるCPTの濃度は、10% CPTミセルでは約40 µg/mL、100% CPTミセルでは約190 µg/mLであった。仕込み比に対して、最終的に回収されるCPTの量はそれぞれのミセル溶液で34%、15%であり、CPT仕込み比が高い場合、得られるCPTの量は多くなるものの回収効率は低くなることが分かった。図5からTFE使用の場合とCHCl₃使用の場合で、CPT/polymer仕込み比に対するミセル溶液中のCPTの濃度の変化が異なることが分かる。このことから、TFE溶液から作製したミセルとCHCl₃で作製したミセルでは、粒子の成長過程が違ふと考えられる。

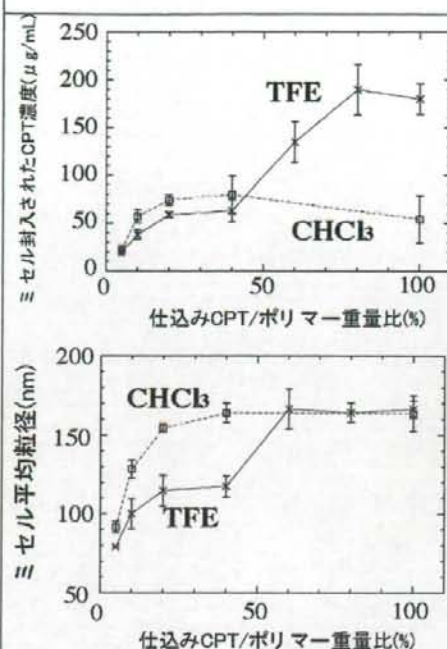


図1 1 CPTミセル溶液中のCPTの濃度とミセルの粒径

CPTを含まない、「空ミセル」の状態ではキュムラント粒径は50 nm程度であり、CPTを加えることにより粒径が大きくなるのが分かる。この粒径増加挙動は、TFEとCHCl₃の場合で異なり、両溶媒間で粒子の成長過程が異なることが示唆された。

図1 2に10% CPTミセルと100% CPTミセルから作製したフィルム（いずれもTFE使用）のAFM観察の結果を示す。図1 2 Aは10% CPTミセルのheight画像である。この画像ではポリマーと思われる糸状の構造が目立つ。この構造は高分子ミセルを形成していない、フリーの高分子鎖、及び高分子ミセルの集合体だと思われる。周辺の領域に対し、このような構造物は数nmから数十nmの高さである。また、ところどころに1 μm四方程度の、コントラストが明るい部分がある。

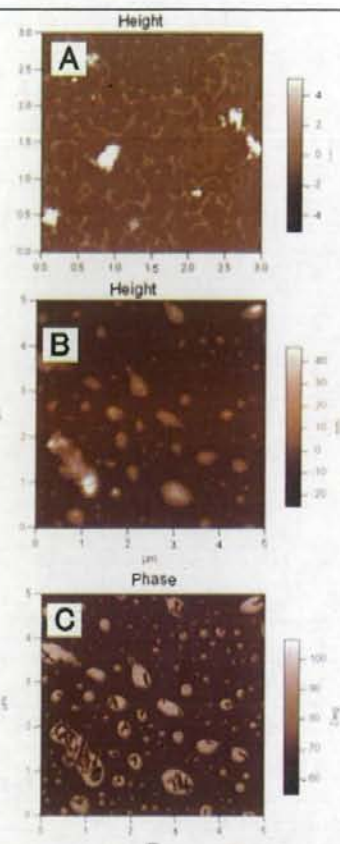


図1 2 : CPTミセルのAFM画像。(A) 10% CPT/polymerの3 μm × 3 μm height画像、(B) 100% CPT/polymerの5 μm × 5 μm height画像、(C) 100% CPT/polymerの5 μm × 5 μm phase画像。いずれもTFE使用。

これらはおそらく高分子ミセルの大きな凝集だと思われる。図1 2 Bは100% CPTミセルのheight画像である。10% CPTミセルと比べ、1 μm程度の大きなかたまりが目立つ。一方で、10% CPT/polymerサンプルに多く含まれる糸状の構造は、図1 2 Bでは観察されなかった。そのほかに、ミセルの凝集であろう数十nmから数百nmの円形のislandも観察された。数百nm程度の小さなislandは、周辺との高さの差が数nmであるが、1 μm程度

の大きなかたまりは周囲と比べ30 nm程高い。図1 2 Cは1 2 Bのphase画像である。この画像では、height画像で見られた大きなかたまりの上に、短冊状の、コントラストが暗い部分が存在する。この結晶のような構造はCPTが結晶化したものと考えられる。同様の構造はSEMでも確認された。また同じサンプル内の別の箇所では、CPTの結晶がポリマーで覆われたような、数十nm x 1 μ mの長方形の構造が観察された。これらの結晶構造は10% CPTミセルでは観察されなかったことから、100% CPT/polymerサンプルでは過剰なCPTが溶液中で結晶化し、ミセル水溶液に混在していると考えられる。

AFM、SEM測定で得られた画像から、CPTの結晶がミセルサンプルに混入していると考えられたため、CPTの各種溶媒への溶解度を調査することにした。CPTの溶解性は、濁度によって評価した。CHCl₃、TFE、DMSOを溶媒とした結果が図1 3である。このグラフからCPTは5 mg/mL以下ではDMSOに比較的好く溶けることが分かる。これに比べるとCHCl₃への溶解性は低く、CPTは1 mg/mL以下ではCHCl₃によく溶けるが、それ以上高濃度にすると溶解性が極端に下がる。同様の現象はTHF、1, 4-dioxaneでも認められた。溶解性を重視すると、CPTのDMSO溶液を使用するのが好ましいが、先に述べたように、evaporation法でCPTミセルを作製する際に溶媒を蒸発させる必要があるため、DMSOのような沸点の高い(189 °C)溶媒は扱いにくい。その点TFEの沸点は74 °Cで、我々の作業に適している。CPTの溶解性も実験に必要な約1~5 mg/mLの範囲で比較的良好。そのほか一般的に使用される溶媒への溶解性も調査したが、CPTの溶解性と溶媒の沸点を検討したところ最も優れている溶媒はTFEであった。

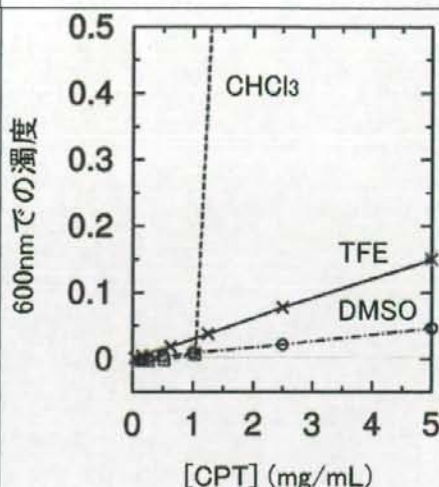


図1 3 CPT溶液の濁度測定 (600 nmで測定)

CPT内包高分子ミセルを作製する際には、高分子とCPTの混合フィルムを作製する。そのためCPTが高分子に分配されれば、CPTの結晶化は起こりにくいだろう。しかしCHCl₃溶液などでは、ある一定の濃度以上では溶液中で既に結晶化が起きており、ポリマーと混合する時点ではポリマーとCPTの相互作用で薬がミセル内に保持されるのではなく、CPTの結晶をポリマーが覆う状態であることが推察される。ポリマーコートされたCPTの結晶は、安定に水溶液中に存在する可能性があるが、過剰なCPTのほとんどは、遠心分離とフィルター除去する際に取り除かれる。

ここでは、CPTミセルの作製にはCPTの結晶化が問題になることを示した。溶液に溶けない過剰なCPTが存在する条件下で作製したミセルには、CPTの大きな結晶を高分子が覆った粒子が、ミセル溶液中に混在すると思われる。

前述したように、CPTの溶解性が高い条件(TFEを溶媒として用いた)で作製したミセルは比較的粒径も小さく、薬剤の血中滞留性も高かった。

以上のように、薬物封入過程で用いる溶媒への薬物の溶解性が高分子ミセル製剤の粒径と薬物封入安定性に大きな影響を与えていることが判明した。

(2) ビオチン修飾ブロックコポリマーの合成

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

ビオチン基のPEGへの導入量は、¹H-NMRよりPEG₅で91%、PEG₁₂で75%であった。このビオチン修飾PEGにアスパラギン酸ベンジルを開環重合により重合した。このときアスパラギン酸の導入量は、PEG₅で27残基、PEG₁₂で24残基であった。得られたブロックコポリマーを加水分解後、ベンジルアルコールをアスパラギン酸にEDC、NH₄Sを用いて導入した。ベンジル化率は、PEG₅で97%、PEG₁₂で88%であった。効率の良いビオチン基の検出は、病理的な観察を行う上で、重要なファクターとなる。そこで、ビオチン基を鎖長の長いPEGに修飾し、高分子ミセル表面にビオチンを露出させることで、ビオチン基を効率良く検出させることが可能となると考えられた。そこで、本研究では図に示した4種類のポリマーを組み合わせることによって、PEGの鎖長とビオチン検出量及び検出効率に関して調査した。

図13に示すブロックコポリマーを用いた。

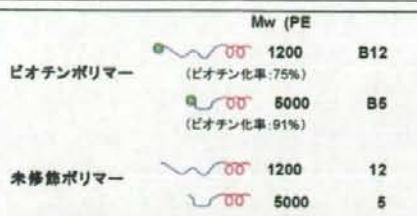


図13 ビオチンミセル作製に使用したブロックポリマー

長いPEG鎖にビオチン基を導入したB12とPEG鎖長の短い未修飾ポリマー5を、B12の割合が100mol%から0mol%になるまで濃度を変え、ミセルを作製した。このミセル中のビオチン基の量をビオチン検出キットを用いてUVにより検討した。一つのミセルあたりで検出されるビオチン基の割合と、実際にミセルに含まれるビオチン基のうち、どの程度検出に関わっているかを示す指標として、ビオチン基の検出効率を図に示した。ビオチンの検出効率は、PEG₁₂の場合、ビオチン化率が75%であるため、100mol%のビオチンポリマーで形成されるミセルの中には、75%ビオチン基が存在するとして、検出効率を算出した。その結果を図14に示す。

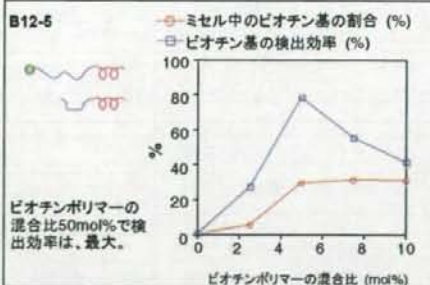


図14 一つのミセルあたりのビオチン基の検出量と、その検出効率

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

対して、混合比が50%の場合、検出効率は約80%まで向上する。これはビオチン基の検出原理を考慮すると、理解できる。ビオチン基の検出には、サイズが8 nm程度のタンパク質であるアビジンが用いられるが、ビオチンとの相互作用はアビジン1分子当たり4点しかない。このため、ミセル表面に過剰にビオチンが存在しても、アビジンに検出されないビオチンも多く存在することになる。このため、ビオチンの検出量は一つのミセル当たり30%程度で飽和状態になると考えられる。

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

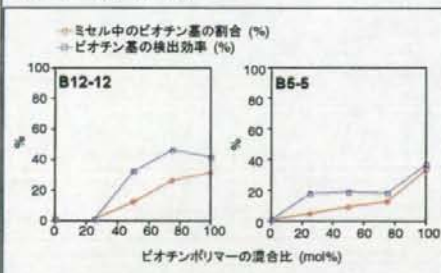


図 14 同じ長さのPEGにより形成されたビオチンミセルのビオチン基の検出量と、その検出効率

ビオチン基を親水部末端に導入した biotin-PEG-P(Asp(Bzl)) を合成した。PEGの鎖長が異なるビオチンポリマーを2種類合成 (PEG₅、PEG₁₂) し、これらをビオチン未修飾のPEG-P(Asp(Bzl)) と混合し、高分子ミセルを作製した。

ビオチンがアンテナのように高分子ミセル表面に露出しているB12-5ミセルでは、効率良くビオチンを検出することができた。

(3) レチノイドの高分子ミセルへの封入

合成レチノイドAm80封入に用いたブロックコポリマー組成を表4にまとめる。

表4 ミセル封入に使用したポリマー

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

Am80の回収率 (Am80の仕込量に対するミセル溶液中の比率) を表5に示した。このとき、Am80の仕込量は一部の系を除きポリマーに対して10 wt%である。

表5 Am80封入におけるAm80回収率およびミセル粒子径

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

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