

200812029A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

がん微小環境制御を併用したナノドラッグによる難治性固形がん治療の実現

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 狩野 光伸

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告 がん微小環境制御を併用したナノドラッグによる難治性固形がん治療の実現	1
狩野 光伸	
II. 分担研究報告 がん微小環境制御を併用したナノドラッグによる難治性固形がん治療の実現 (白金錯体制がん剤DACHPtを内包した高分子ミセルの構築)	6
西山 伸宏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	11

研究要旨

ナノ粒子内包薬剤は副作用が少ない一方で、治療効果は高いことが期待されてきた。しかし現実には、難治性固形癌の治療ではあまり効果を示せていない。その原因として、腫瘍微小環境の性質も重要な一因を構成していると予想される。本研究は、この腫瘍微小環境制御の併用により、副作用の増悪を最小限にしながらナノDDSの薬効を増強することを目指している。結果として、難治性固形癌に対して治療が可能となれば、その社会的、医療的效果は計り知れない。

我々は、既に膵癌・胃癌の動物モデルにおいて、TGF- β 阻害剤を用いた血管新生制御の併用によってナノDDSの効果増大が見られることを証明してきた。本研究では続いて、漏出性腫瘍血管を持つC26大腸癌モデルとそうでないBxPC3膵癌モデルを用いて、各種阻害剤の効果を比較した。この結果、C26腫瘍に対してはVEGF阻害が、BxPC3腫瘍ではTGF- β 阻害剤がナノ粒子蓄積増強効果を示すことが明らかにされた。関連して組織学的には、血管の壁細胞による被覆が強いほど元来の漏出性が低く、TGF- β 阻害剤を併用した効果が発揮されることが判明した。この結果から、壁細胞被覆の強い血管を持つ腫瘍においては、本研究の戦略がふさわしいことが示唆された。またBxPC3モデルにおいて、分担研究者により開発された遺伝子発現ベクター内包およびMRI造影剤内包ナノ粒子に対して、TGF- β 阻害併用時のみ腫瘍内への有意な蓄積が起り、効果が観察されることを示した。さらに、ヒト由来腫瘍細胞株を免疫不全動物に移植するBxPC3モデルに加えて、マウス自発発癌膵癌モデル由来の癌細胞株および線維芽細胞株を、FGF2を混じた状態で正常免疫であるC57BL6マウスに皮下移植することによって、間質豊富かつ血管密度および漏出性の低いモデルが成立することを見出した。

A. 研究目的

ナノ粒子の腫瘍内蓄積については、現在一般的に用いられている腫瘍動物モデルでの血管おける知見をもとに、全ての腫瘍血管が数百nmの物質に対して漏出性であるという前提で開発されている。このような動物モデルでは、ナノ粒子単独でも治療効果が見られる。また、同じ前提にしたがって、VEG

F阻害剤を用いることにより薬剤の腫瘍内移行を増加させる方法が提唱され、血管正常化説として知られている(Jain et al, Science, 2005 他)。しかし実際には、ナノ粒子単独による治療効果は、多くのヒト腫瘍において証明されておらず、ことさら難治性固形癌では証明されていない。したがって、難治性固形癌をはじめ、ヒト腫瘍の血管構築は、一般的に動物モデルでは見られる血管構築を持たない可能性

が考えられる。ここで我々の研究 (Kano et al. PNAS, 2007) は、一般的な動物モデルよりも腫瘍間質が豊富な、膵がんおよび胃がんのモデルを用いて、これらモデルにおいては腫瘍血管の漏出性は実は高くなく、逆にTGF- β 阻害剤を用いて漏出性を増加させた方が、ナノ粒子の腫瘍蓄積が増強される可能性を示した。当論文発表後には、米国国立がん研究所(NCI)のニュースや、Nat Rev Drug Disc誌などでハイライトされ、国際的注目を浴びた。

これらに基づき、当研究では、次のことを明らかにしながら、ナノ粒子による難治癌治療を実現するための十分な前臨床的知見を得ることを目的としている。すなわち、ナノ粒子-TGF β 阻害剤併用について、1. 適応癌種は、2. ナノ粒子単独でも蓄積する癌での効果は、3. 他シグナル阻害に比べたメリットは、4. 長期毒性は、そして、5. 腫瘍リンパ管制御の影響は、6. 難治癌微小環境の動物モデル構築、である。

B. 研究方法

項目1、2、3に対して、漏出性の腫瘍血管を持つC26マウス大腸癌モデルと漏出性の低い血管を持つヒト膵癌BxPC3モデルを用い、TGF- β 阻害剤、PDGF阻害剤(グリベック)、VEGF他の阻害剤(ソラフェニブ)、可溶性Tie-2受容体の効果を比較した。

項目6に対しては、各種条件の検討の結果、マウス自発癌膵癌モデル (Ijichi et al, Genes Dev 2006. 20:3147) 由来の癌細胞株および線維芽細胞株を、FGF2を混じた状態でC57BL6マウスに皮下移植することを方法とした。

項目4のリンパ管制御に関しては、BxPC3腫瘍細

胞株に、リンパ管新生を司るVEGF-Cシグナルの抑制因子となる可溶性VEGFR3分子を強制発現させることにより、ナノ粒子の分布効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究計画ではヒトES細胞を用いる予定はない。この研究で行なう予定の遺伝子組換え実験は平成20年10月21日の東京大学医学部組み換えDNA実験安全委員会において承認を受けた医学部分子病理学教室の「TGF- β シグナルの機能解析などを目的としたプラスミド・アデノウィルス・レトロウィルス・レンチウィルスの培養細胞および遺伝子改変マウス等への導入実験」に含まれており、適切な拡散防止措置がとられる。また、動物実験は東京大学動物実験実施規則に則って動物愛護の観点から適切に行った。

C. 研究結果

本研究の課題は、ナノ粒子-TGF β 阻害剤併用について、1. 適応癌種は、2. ナノ粒子単独でも蓄積する癌での効果は、3. 他シグナル阻害に比べたメリットは、4. 毒性は、そして、5. 腫瘍リンパ管制御の影響は、6. 難治癌微小環境の動物モデル構築、である。

本年度は項目2、3を終了した。すなわち、漏出性腫瘍血管を持つC26大腸癌モデルと低漏出性血管を持つBxPC3膵癌モデルを用いて、TGF β 、PDGF、VEGF、Tie-2の阻害効果をそれぞれ比較した結果、漏出性血管を持つC26腫瘍に対してはVEGF阻害が、そうでないBxPC3腫瘍ではTGF β 阻害がナノ粒子蓄積増強効果を持つことが示された。その他の組合せは増強を示さなかった。血管の壁細胞による被覆程

度がこれらの差の組織学的指標として明らかにされ、被覆が強いほど漏出性が低く、TGFβ阻害併用の効果が発揮されることが判明した。(Kano et al., *Cancer Sci*, 2008)。この結果から、壁細胞による被覆の強い血管を持つ腫瘍においては、血管正常化説よりも本研究の戦略がふさわしいことが示唆された。

さらにこの知見を裏付ける結果として、BxPC3モデルにおいて、共同研究者により開発された各種ナノ粒子に対してTGF-β阻害剤併用が効果を示すことが明らかにされた。すなわち、MRI造影剤となる鉄微粒子を内包したミセル(粒径約100nm)ではTGF-β阻害剤との併用時にのみ、膵癌モデルの造影を可能とした(投稿中)。またGFP遺伝子発現ベクターを内包したミセル(粒径約100nm)も併用により腫瘍間質への遺伝子発現を実現した(Miyata et al., *Pharm Res*, 2008)。

1、6に関して、複数のヒト難治癌由来細胞株をヌードマウスに皮下移植しモデル樹立を試みたが、乏血管性や線維化は十分再現されなかった。このため、マウス膵癌細胞株および線維芽細胞株を用い、FGF2を混じてC57BL6マウスに皮下移植する方法を開発した。これにより、間質豊富で血管漏出性の低いモデルが正常免疫動物で成立することを見出した。

項目5については、検討したどの方法も、リンパ管新生を抑制するだけでなく血管新生も抑制してしまったが、なお若干のナノ粒子蓄積増強傾向は観察された。

4 毒性評価に関しては、現在のところ、投与後24時間の時点で、肝脾腎脳におけるナノ粒子の蓄積量

はTGF-β阻害剤の有無によって有意な差がないことが示された。

D. 考察

本研究の結果、壁細胞によって被覆された血管が腫瘍血管の大部分を占めることが原因で薬剤到達が難しく、難治となっている腫瘍に関しては、腫瘍血管を漏出性にさせるTGF-β阻害剤を併用しながらナノ粒子内包薬剤を用いることで、治療が可能になるものと考えられる。なお、TGF-β阻害剤併用の効果に関してはナノ粒子のサイズ依存的に得られるので、内包する薬剤に関しては、一般的な抗腫瘍剤に限らず、タンパク質、核酸、あるいは造影剤でも用いることができると考えられる。

ここで問題となるのは、他臓器への余分な薬剤蓄積が生じないかどうかである。この点に関して、次年度に、単一臓器レベルにとどまらないナノ粒子貯留の全身スクリーニングの方法について引き続き探索し、毒性解析を行う予定である。またその結果、副作用の可能性が判明してきた場合には、問題が発生した臓器の組織学的解析を通じて、内包する成分の変更で克服可能な副作用であるのかを検討し、臨床応用の可否を検討することを考えている。

また毒性の問題に加えて、さらに有効な臨床応用に近づくために、適応できる病態を明らかにするべく、ヒト腫瘍病理標本に対する解析を行うことを予定している。

E. 結論

本研究により、現在難治とされる固形腫瘍に対して、薬物による有効な治療法が提供されることが期

待される。なかでも、膵癌やスキルス胃癌はわが国でも多く見られる難治性固形癌であり、効果のかつ副作用の強くない化学療法で奏効率が上がれば福音となる。その方法論として、本研究により、わが国が得意とするナノテクノロジーを用いた製剤を利用し、その特徴である低副作用を保ったまま治療を行う方法を確立できることが現実味を帯びてきたと考える。また本研究による新規治療法の適応可能範囲を、がん組織型からより正確に判断する方法についても、確立が期待される。

本研究を通じて、難治性固形癌に対してナノDDSの効果を発揮させられるようになれば、その社会的、医療的効果は計り知れない。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべき情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Oka, C. Iwata, H. I. Suzuki, K. Kiyono, Y. Morishita, T. Watabe, A. Komuro, M. R. Kano, and K. Miyazono. Inhibition of endogenous TGF- β signaling enhances lymphangiogenesis. *Blood*. 111(9):4571-9 (2008)

Ota H, Eto M, Kano MR, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Sep;28(9):1634-9.

Wu S, Nishiyama N, Kano MR, Morishita Y, Miyazono K, Itaka K, Chung UI, Kataoka K. Enhancement of Angiogenesis Through Stabilization of Hypoxia-inducible Factor-1 by Silencing Prolyl Hydroxylase Domain-2 Gene. *Mol Ther*. 16(7):1227-34 (2008)

Miyata K, Oba M, Kano MR, Fukushima S, Vachutinsky Y, Han M, Koyama H, Miyazono K, Nishiyama N, Kataoka K. Polyplex Micelles from Triblock Copolymers Composed of Tandemly Aligned

Segments with Biocompatible, Endosomal Escaping, and DNA-Condensing Functions for Systemic Gene Delivery to Pancreatic Tumor Tissue. *Pharm Res*. 25(12):2924-36 (2008)

Kano MR, Komuta Y, Iwata C, Oka M, Shirai Y, Morishita Y, Ouchi Y, Kataoka K, Miyazono K. Comparison of the effects of the kinase inhibitors, Imatinib, Sorafenib, and TGF- β receptor inhibitor, on extravasation of nanoparticles from neovasculature. *Cancer Sci*. 100(1):173-80 (2009)

Komuro A, Yashiro M, Iwata C, Morishita Y, Johansson E, Matsumoto Y, Watanabe A, Aburatani H, Miyoshi H, Kiyono K, Shirai YT, Suzuki HI, Hirakawa K, Kano MR, Miyazono K. Diffuse-type Gastric Carcinoma: Progression, Angiogenesis, and Transforming Growth Factor- β Signaling. *J Natl Cancer Inst*. 108(8):592-604 (2009)

狩野光伸・宮園浩平 血管における TGF- β ファミリーシグナル 医学のあゆみ 2008;223(12); 1037-1042

狩野光伸 腫瘍発育、血管新生、治療反応性への動脈硬化と血管老化の影響 分子細胞治療 2008;7(1)79-80

狩野光伸・宮園浩平 EMT 制御と分子標的薬 実験医学 2009;27(5)653-660

2. 学会発表

狩野光伸、西原広史、岩田要、片岡一則、宮園浩平、「腫瘍血管新生制御が薬剤送達に影響を与える際の組織学的要因の解明」、日本病理学会、金沢、2008年5月16日

古室暁義、岩田要、岡雅子、森下保幸、八代正和、平川弘聖、狩野光伸、宮園浩平、「スキルス胃癌の増殖・進展における TGF- β の役割」、日本病理学会、金沢、2008年5月16日

狩野光伸、「ナノ粒子を使って難治がんを治すには？—医学研究との接点」、ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム、三島、2008年6月12～13日

Kano, MR. Manipulation of TGF- β signaling for cancer treatment. 28th Sapporo Cancer Seminar International Symposium. 2008年6月26-27日

狩野光伸、西原広史、西山伸宏、片岡一則、宮園浩平、「難治性固形腫瘍に対するナノ DDS 治療の実現化」、日本 DDS 学会、東京、2008年6月30日

狩野光伸、「難治性固形癌における腫瘍血管構築と治療応用」、Vascular Biology Innovation Conference、東京、2008年8月23～24日

狩野光伸、「「難治」癌を治すにはどうしたらよいか」、聖路加国際病院内科フォーラム、東京、2008年8月29日

Kano, MR., Optimal manipulation of tumor vasculature for treatment of intractable solid tumors using nanoparticles. 日本癌学会総会、名古屋、2008年10月28～30日

狩野光伸「固形癌の血管構築と薬剤送達」、放射線医学総合研究所分子病態イメージング研究グループ講演会、千葉、2008年12月10日

狩野光伸「難治性固形癌の血管構築解析と治療法の開拓」、北海道大学 探索病理学講座セミナー

(第1回)・腫瘍病理学分野セミナー(第3回)・口腔病態学講座・病理病態学分野セミナー・大学院歯学研究科セミナー、札幌、2009年2月2日

狩野光伸「脈管制御を応用した難治がん治療法の開拓」第7回次世代バイオマテリアル研究会、東京、2009年3月9日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

宮園浩平、片岡一則、狩野光伸、ペーユンスー、西山伸宏、平川弘聖、八代正和、野出學、TGF- β シグナル阻害剤と抗腫瘍剤の組合せ使用、科学技術振興機構(PCT/JP2006/317593)

片岡一則、熊谷康顕、狩野光伸、関野正樹、松浦哲也、宮園浩平、西山伸宏、腫瘍撮像用MRI造影剤、特開2008-28027

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

がん微小環境制御を併用したナノドラッグによる難治性固形がん治療の実現
（白金錯体制ガン剤DACHPtを内包した高分子ミセルの構築）

分担研究者 西山伸宏 東京大学大学院医学系研究科臨床医工学部門 講師

研究要旨

本研究では、難治ガンの標的治療を目的として、高分子ミセル型ナノキャリアの最適化と高機能化を目指している。本年度は、白金錯体制ガン剤であるDACHPtを内包した高分子ミセルの生体内における崩壊挙動を明らかにするために、ミセルを構成するブロック共重合体を二種類の蛍光色素で標識し、二重蛍光標識ミセルを調製した。この二重蛍光標識ミセルを利用して、その細胞内取り込みをTime-lapse蛍光顕微鏡観察によって評価したところ、DACHPt内包ミセルは会合状態で細胞内に取り込まれ、約55時間後に後期エンドソーム/リソソームで崩壊することが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究では、上記の高分子ミセル型ナノドラッグを研究代表者である狩野に供給し、新しい治療戦略に基づいて難治性固形ガンの標的治療を実現することを目指している。この目的において、前年度までに白金錯体制ガン剤であるdichloro (1,2-diamino cyclohexane) platinum(II)(DACHPt)(オキサリプラチンの中間活性体)を内包した高分子ミセルの調製を行い、本システムがin vivo実験において高いがん集積性と優れた制がん活性を示すことを確認してきたが、本年度はミセルを構成するブロック共重合体を二種類の蛍光色素で標識し、二重蛍光標識ミセルを調製することによって、DACHPt内包ミセルの生体内における崩壊挙動を明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

1. 二重蛍光標識PEG-P(Glu)の合成

Acetal-benzyl-PEG-P(Glu)を1H NCIで処理することによってacetal基を脱保護し、ヒドラジド基を有する蛍光色素Bodipy FLと室温で一晩反応させ、最後にNaBH₄によって還元することにより、Bodipy FLをPEG末端に安定に結合させた。未反応のBodipy FLはポリマーをDMSOに対して24時間透析することによって除去した。次に、Bodipy FL-PEG-P(Glu)と活性エステルを有する蛍光色素Bodipy TRを室温DMSO中で24時間反応させた。未反応のBodipy TRはポリマーをDMSOに対して24時間透析することによって除去し、その後、水に対して透析、凍結乾燥を行うことによって二重蛍光標識Bodipy FL-PEG-P(Glu)-Bodipy TRを得た。

2. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの調製

DACHPt内包ミセルの調製は、DACHPt nitrate錯

体と Bodipy FL-PEG-P(Glu)- Bodipy TR を [DACHPt]/[Glu]=1, [Glu]=5mMになるように水中で混合し、120時間反応させ、最後に限外ろ過 (MWCO: 30,000)によって精製することによって調製した。得られたミセルの粒径はZetasizer Nano ZS90によって評価した。

3. DACHPt内包ミセルからのPtリリース量の評価

二重蛍光標識DACHPt内包ミセルを150mM NaClを含有する10mM PBS(7.4)に対して透析し (MWCO: 2,000)、外液中のPt量をICP-MSによって定量した。

3. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの蛍光観察

150mM NaClを含有する10mM PBS(7.4)における二重蛍光標識DACHPt内包ミセルのBodipy FLおよびBodipy TRの蛍光を蛍光分光光度計によって評価した。

4. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの細胞内取り込みの評価

ヒト大腸がんHT29細胞と二重蛍光標識DACHPt内包ミセルを培養し、細胞内におけるBodipy FLおよびBodipy TRの蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM)(Zeiss confocal LSM510 microscope)観察によって観察した。

C. 研究結果

1. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの調製

Bodipy FL-PEG-P(Glu)- Bodipy TRを用いてDACHPt内包ミセルを調製したところ、蛍光標識を行っていないPEG-P(Glu)から形成されたDACHPt内包ミセルと同等の32nmの会合体の形成が確認された。

2. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの特性解析

生理的條件[150mM NaClを含有する10mM PBS(7.4)]における蛍光標識DACHPt内包ミセルからのPtリリースは、蛍光非標識ミセルのそれと一致することが確認され、初期バーストを示すことなく、持続的なPtリリースが確認された(40時間後のPtリリース量は約25%)。次に、DACHPt内包ミセルの外殻および内核にそれぞれ導入したBodipy FLおよびBodipy TRの蛍光強度の変化を測定したところ、Bodipy FLは時間に関係なく一定の蛍光強度を示したが、Bodipy TRは最初は全く蛍光を示さないが、時間の経過と共に蛍光強度の上昇を示すことが確認された。ここで、Bodipy TRの蛍光強度変化のprofileは、上記のDACHPt内包ミセルからのPtリリースのそれと一致していることが確認された。この結果は、ミセルの外殻(PEGの末端)に結合されたBodipy FLの蛍光は、ミセルの崩壊に影響を受けないが、ミセルの内核(P(Glu)の末端)に結合されたBodipy TRの蛍光は、ミセル状態においてはquenchされているが、ミセルの崩壊に伴いquenchが解消されることを示唆しているものと考えられる。すなわち、二重蛍光標識DACHPt内包ミセルでは、Bodipy FLの蛍光によってミセルの局在を評価することができ、Bodipy FLの蛍光によってミセルの会合状態を評価することが可能となる。

3. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの細胞内取り込みの評価

HT29細胞による二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの取り込みをCLSM観察によって評価した。その結果、24時間後にBodipy FLの顆粒状の蛍光が観察され、後期エンドソーム/リソソームのマーカー

であるLysoTracker Blueの局在と一致した。一方、24時間後においては、Bodipy TRの蛍光は観察されなかった。この結果より、DACHPt内包ミセルはミセル形態を維持した状態でエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれるものと考えられる。一方、培養55時間後において、Bodipy TRの蛍光も観察されたことから、DACHPt内包ミセルは後期エンドソーム/リソソームでDACHPtを放出し、最終的に崩壊することが示唆された。

D. 考察

本研究では、高分子ミセルの生体内における崩壊挙動を明らかにするために、ミセルを構成するブロック共重合体を二種類の蛍光色素で標識し、二重蛍光標識ミセルを調製した。この二重蛍光標識ミセルを利用して、その細胞による取り込みをCLSM観察によって評価したところ、DACHPt内包ミセルはミセル形態を維持した状態でエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれ、後期エンドソーム/リソソームでDACHPtを放出し、最終的に崩壊することが示唆された。高分子ミセルは、これまでに動物実験において固形がんの効果的に集積し、優れた制がん活性を示すことが明らかにされており、いくつかの製剤が既に臨床治験に進んでいるが、生体内においてミセル形態を維持しているか否かについては明らかにされていなかった。高分子ミセルの細胞内取り込み過程においてもミセル形態を維持しているか否かについては未だ未解明であったが、本研究では、二重蛍光標識ミセルを利用することによって、高分子ミセルがミセル形態を維持した状態で細胞内に取り込まれることを初めて明らかにした。

これまでの研究において、DACHPt内包ミセルは、H T29細胞に対してオキサリプラチンよりも高い細胞毒性を示し、オキサリプラチン耐性を克服できることが明らかになっているが、この結果は、DACHPt内包ミセルがエンドサイトーシス経路によって取り込まれ、後期エンドソーム/リソソームでDACHPtを放出することに起因するものと考えられる。すなわち、オキサリプラチンは細胞質内でmetallothionein等によって不活性化を受けるが、DACHPt内包ミセルはエンドサイトーシス経路で核近傍まで移行し、細胞質内での不活性化を受けない為に、オキサリプラチンよりも優れた薬理効果を示したものと考えている。このように、二重蛍光標識法は、高分子ミセルの生体内における崩壊挙動を明らかにする上で強力なツールとなるものと考えられる。今後は、狩野との連携により、二重蛍光標識ミセルのin vivo機能評価を行うことを計画している。

E. 結論

本年度は、高分子ミセルの生体内における崩壊挙動を明らかにするために、ミセルを構成するブロック共重合体を二種類の蛍光色素で標識し、二重蛍光標識ミセルを調製した。この二重蛍光標識法を利用することによって、DACHPt内包ミセルがミセル形態を維持した状態でエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれ、後期エンドソーム/リソソームでDACHPtを放出し、最終的に崩壊することが示唆された。今後は、研究代表者である狩野との連携により、本システムを難治性がんに対する新しい治療戦略を開発するためのツールとして使用する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

S. Matsumoto, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Miyata, A. Ishii, M. Oba, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery. *Biomacromolecules*, in press

M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide crosslinks directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking. *Mol. Pharm.* 5 (6) 1080-1092 (2008)

K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (48) 16287-16294 (2008)

K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor tissue. *Pharm. Res.* 25 (12) 2924-2936 (2008)

S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive non-viral gene vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (18) 6001-6009 (2008)

Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, N. Nishiyama, K. Kataoka, Charge-conversional ternary polyplex with endosome disruption moiety: a new paradigm for the efficient and safe gene delivery. *Angew. Chem., Int. Ed.* 47 (28) 5163-5166 (2008)

S. Wu, N. Nishiyama, M. R. Kano, Y. Morishita, K. Miyazono, K. Itaka, U. Chung, K. Kataoka, Enhancement of angiogenesis through stabilization of hypoxia inducible factor-1 by silencing prolyl hydroxylase domain 2 gene. *Mol. Ther.*, 16 (7) 1227-1234 (2008)

2. 総説

西山伸宏, 片岡一則 シスプラチン内包高分子ミセル *MebioOncology*, 5(1): 49-57 (2008)

西山伸宏, 片岡一則 II 章 5. ナノテクノロジーを利用した DDS 癌の分子標的治療(編集 鶴尾隆), 南山堂, 28-34 (2008)

西山伸宏, 片岡一則 Key words: Drug Delivery System カ

レントセラピー, 26(5): 80-81 (2008)

西山伸宏, 片岡一則 人工ウイルスの実現に向けた高分子ミセル型ベクターの設計 *細胞工学*, 27(1): 56-61 (2008)

3. 学会発表

西山伸宏, 松本悟, 宮田完二郎, 武元宏泰, クリステイージェームス, 大庭誠, 山崎裕一, 片岡一則, "PEG-ポリカチオンブロック共重合体と siRNA による超分子組織体形成とその機能特性", 第 57 回高分子討論会, 大阪市立大学, 大阪 2008 年 9 月 25 日(口頭)

西山伸宏, "ナノテクノロジーを利用した DDS の開発", バイオメディカルカリキュラム講義, 東京女子医科大学, 東京 2008 年 9 月 18 日(特別講義)

N. Nishiyama, "Development of smart nanocarriers based on block copolymer assemblies", CNSI-CNBI Symposium on NanoBiotechnology, Iron Gate Memorial Hall, The University of Tokyo, September 9, 2008 (Invited Lecture)

西山伸宏, "高分子ナノテクノロジーを利用した DDS の開発", DDS 講座, 星薬科大学, 東京 2008 年 7 月 17 日(特別講義)

西山伸宏, 片岡一則, "高分子集合体を基盤とした遺伝子・siRNA デリバリーシステムの創製", 第 24 回日本 DDS 学会学術総会, 六本木アカデミーヒルズ, 東京 2008 年 6 月 29 日(招待講演)

西山伸宏, "医工連携による革新的ナノ DDS の創出", バイオ・ナノテクフォーラム イブニングセミナー 第一回テーマ「ナノテクノロジーを活用する薬物・遺伝子送達技術の最前線」, 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, 東京 2008 年 4 月 17 日(招待講演)

N. Nishiyama, K. Kataoka, "Design of functional drug delivery system based on polymer assemblies", 10th European Symposium on Controlled Drug Delivery (ESCDD), Noordwijk an Zee, The Netherlands, April 2, 2008 (Invited Lecture)

H. 知的財産権の出願・登録状況

西山伸宏, 片岡一則, 石井篤史, 加藤泰己, 宮田完二郎, キム ヒョンジン, 武元宏泰, 非荷電性親水性ブロック及び側鎖の一部に疎水性基が導入されたカチオン性のポリアミノ酸ブロックを含んでなる共重合体、その使用、特願 2008-059886

西山伸宏, 片岡一則, ジャン ミンゼン, 石井篤史, 松本悟, ポリエチレングリコールの結合した核酸のコンジュゲートとリン酸カルシウムの有機-無機ハイブリッド型ナノ粒子, PCT/JP2008/070154

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
Kano MR, Komuta Y, Iwata C, Okada M, Shirai Y, Morishita Y, Ouchi Y, Kataoka K, Miyazono K.	Comparison of the effects of the kinase inhibitors, Imatinib, Sorafenib, and TGF- β receptor inhibitor, on extravasation of nanoparticles from neovasculature.	<i>Cancer Sci.</i>	100(1)	173-180	2009
M. Oka, C. Iwata, H. I. Suzuki, K. Kiyono, Y. Morishita, T. Watabe, A. Komuro, M. R. Kano, and K. Miyazono.	Inhibition of endogenous TGF- β signaling enhances lymphangiogenesis.	<i>Blood.</i>	111(9)	4571-4579	2008

Comparison of the effects of the kinase inhibitors imatinib, sorafenib, and transforming growth factor- β receptor inhibitor on extravasation of nanoparticles from neovasculature

Mitsunobu R. Kano,^{1,2,3,4} Yukari Komuta,^{1,5} Caname Iwata,¹ Masako Oka,¹ Yo-taro Shirai,¹ Yasuyuki Morishita,¹ Yasuyoshi Ouchi,⁴ Kazunori Kataoka² and Kohei Miyazono^{1,2,6}

¹Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033; ²Center for Nano-Bio Integration, University of Tokyo, Tokyo, 113-8656; ³Medical Scientist Training Program, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, 113-0033; ⁴Department of Geriatrics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033; ⁵Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, 3-42-6 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

(Received May 20, 2008/Revised September 11, 2008/Accepted September 14, 2008)

There are a number of kinase inhibitors that regulate components of the neovasculature. We previously reported the use of transforming growth factor (TGF)- β inhibitor on neovasculature in stroma-rich tumor models to increase the intratumoral distribution of nanoparticles. Here, we compared the effects of two other kinase inhibitors, imatinib and sorafenib, with TGF- β inhibitor (LY364947) on extravasation of a modeled nanoparticle, 2 MDA dextran. We first used a mouse model of neoangiogenesis, the Matrigel plug assay, to compare neovasculature formed inside of and around Matrigel plugs (intraplug and periplug regions, respectively). Intraplug vasculature was more strongly pericyte covered, whereas periplug vasculature was less covered. In this model, TGF- β inhibitor exhibited the most potent effect on intraplug vasculature in increasing the extravasation of dextran, whereas sorafenib had the strongest effect on periplug vasculature. Although imatinib and TGF- β inhibitor each reduced pericyte coverage, imatinib also reduced the density of endothelium, resulting in a decrease in overall delivery of nanoparticles. These findings were confirmed in two tumor models, the CT26 colon cancer model and the BxPC3 pancreatic cancer model. The vasculature phenotype in the CT26 model resembled that in the periplug region, whereas the latter resembled that in the intraplug region. Consistent with this, sorafenib most potently enhanced the accumulation of nanoparticles in the CT26 model, whereas TGF- β inhibitor did in the BxPC3 model. In conclusion, the appropriate strategy for optimization of tumor vasculature for nanoparticles may differ depending on tumor type, and in particular on the degree of pericyte coverage around the vasculature. (*Cancer Sci* 2008)

The effectiveness of drug delivery into tumor tissues is an important issue in the treatment of solid tumors, in addition to the efficacy of drugs in treating tumor cells. For example, gemcitabine, a first-line anticancer agent for pancreatic adenocarcinoma, exhibited potent *in vitro* growth-inhibitory effects on a cultured cell line derived from the human pancreatic adenocarcinoma line BxPC3.⁽¹⁾ However, it exhibited only slight inhibitory effects on xenografted BxPC3 tumors in mice⁽²⁾ and slight elongation of survival time in tumor-bearing patients, with significant effects only in the improvement of quality of life index in clinical trials.⁽³⁾

Many factors might potentially explain this discrepancy, particularly those related to tumor stroma.⁽⁴⁾ Among them, tumor vasculature plays an important role in the delivery of anticancer agents. Extravasation of drugs to tumor tissue constitutes an essential part of drug delivery to tumor tissues,⁽⁵⁾

whereas the molecular size of compounds is another important determinant of accumulation.⁽⁶⁾ We have recently shown that increased leakiness in tumor neovasculature improves the accumulation of nanoparticles in tumor tissues in animal models of pancreatic adenocarcinoma and diffuse-type advanced gastric cancer.⁽⁷⁾ In that study, inhibition of transforming growth factor (TGF)- β signaling reduced pericyte coverage and slightly increased endothelial area, resulting in an increase in vascular leakiness without loss of blood flow. However, numerous studies of tumor neovasculature have shown that it is leaky by nature, and that manipulation of vessels to make them less leaky, or induction of vascular normalization, may therefore benefit drug delivery to tumor tissues.⁽⁸⁾ This theory has been supported with the use of vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitors. There are a number of VEGF inhibitors available, including neutralizing anti-VEGF antibodies such as bevacizumab (Avastin) and sorafenib (Nexavar). Sorafenib is a small molecular-weight (SMW) compound inhibiting multiple tyrosine kinases, including VEGF receptor (VEGFR) 2.⁽⁹⁾

The roles of pericytes in neoangiogenesis have also been well investigated.⁽¹⁰⁾ Coverage of the neovasculature by pericytes stabilizes vascular structure.⁽¹¹⁾ Genetic ablation of platelet-derived growth factor (PDGF)-B signaling, one of the major signaling pathways in induction of pericyte maturation and recruitment to the endothelium, results in a bleeding tendency of the neovasculature.⁽¹¹⁻¹³⁾ PDGF-B signaling can be inhibited by the SMW inhibitor (SMWI) imatinib (Gleevec or Glivec), which inhibits the receptor for PDGF-B signaling, PDGF receptor (PDGFR) β , as well as PDGFR α and c-kit.⁽¹⁴⁾ The use of imatinib along with VEGF inhibitors was shown to be effective in inhibiting tumor neovascularization in an animal model of spontaneous pancreatic islet tumor, the RIP-Tag model, through disruption of both pericytes and endothelium.⁽¹⁵⁾

Here we investigated the changes in vascular leakiness induced by three of the SMWI mentioned above, TGF- β inhibitor (LY364947), sorafenib, and imatinib, in the Matrigel plug assay as well as two animal cancer models. The Matrigel plug assay was carried out by mixing BD Matrigel Basement Membrane Matrix with VEGF-A, fibroblast growth factor (FGF)-2, and

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: miyazono-ind@umin.ac.jp

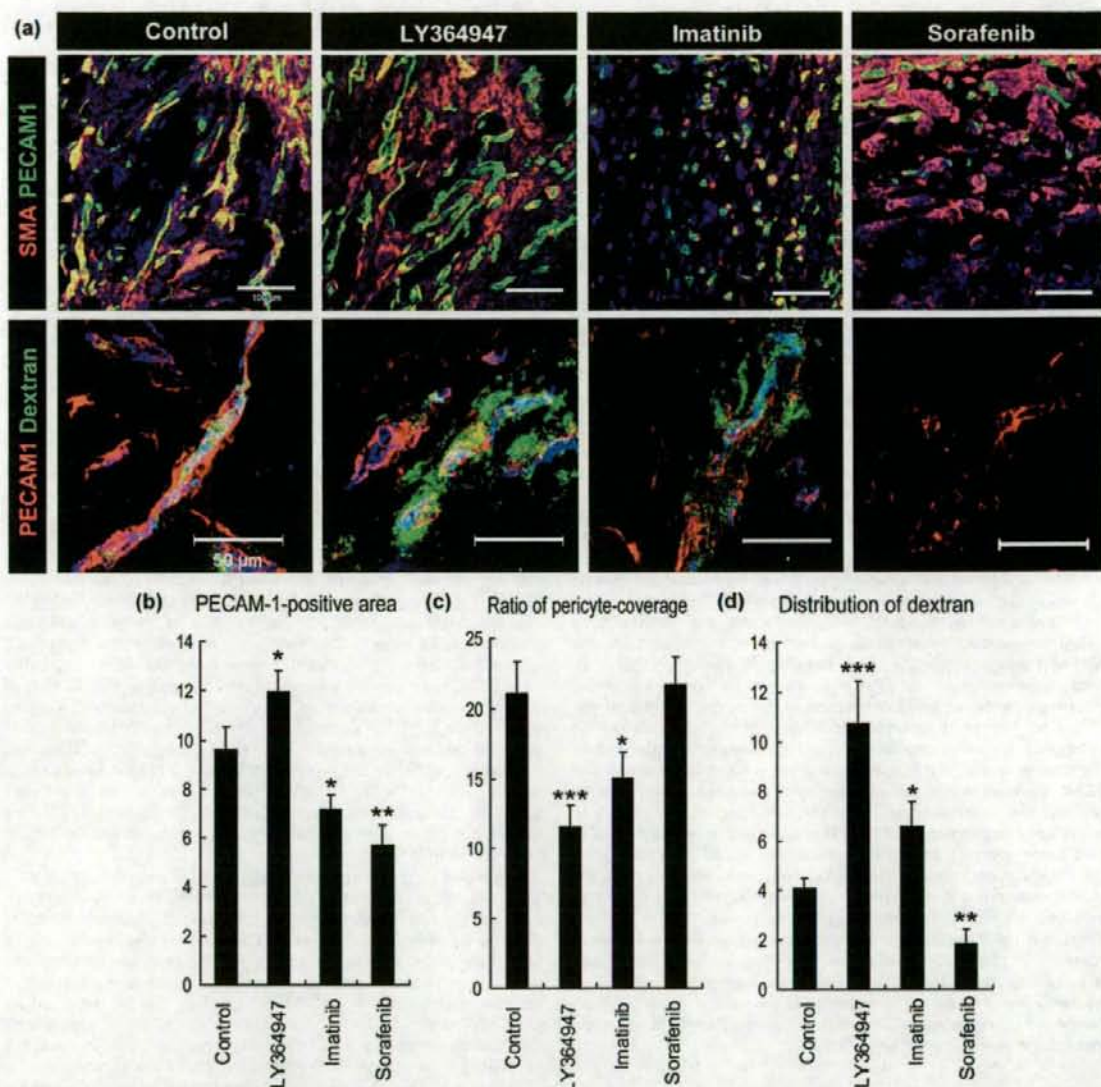


Fig. 1. The effects of three types of kinase inhibitors on extravasation of dextran in the Matrigel plug assay. (a) Confocal microscopy analyses. Upper row: staining of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1-positive endothelium in green and smooth muscle α -actin (SMA)-positive pericytes in red. Scale bars = 100 μ m. Lower row: distribution of 2 MDa dextran in green and PECAM-1-positive endothelium in red. Scale bars = 50 μ m. (b-d) Results of quantification ($n = 15$) of areas of endothelium (b, in percentage in one microscopic view), ratio of pericyte-covered endothelium (c, in percentage), and dextran distribution (d, in percentage in one microscopic view). Bars in the graphs represent standard errors. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; and *** $P < 0.001$.

heparin as angiogenic molecules to form mature neovasculature inside the gel plug, according to our previous report.⁽¹⁶⁾ Of the two cancer models used in the present study, one was a well-established hypervascular cancer model using the murine colon cancer cell line CT26, whereas the other was an interstitium-rich cancer model using the human pancreatic cancer cell line BxPC3. With the latter model, we previously demonstrated therapeutic effects of combined use of TGF- β inhibitor on nan-

oparticles.⁽⁷⁾ Using these models, we investigated the effects of SMWI on the distribution of 2 MDa dextran, a model of nanoparticles with an estimated hydrodynamic diameter of 50 nm.⁽⁶⁾ The Matrigel plug assay and tumor model experiments revealed that TGF- β inhibitor increased extravasation of 2 MDa dextran in pericyte-covered neovasculature, whereas sorafenib increased that in vasculature with less pericyte coverage. These findings are important for determination of the optimal choice of angiogenic

regulators in combination with nanoparticles for chemotherapy of cancer in general.

Materials and Methods

Reagents and antibodies. TGF- β inhibitor was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA; LY364947, catalog no. 616451), imatinib was from Novartis Pharma (Tokyo, Japan), and sorafenib was from Bayer Healthcare (West Haven, CT, USA). These compounds were diluted in dimethyl sulfoxide to 5, 25, and 10 mg/mL, respectively, as stock solutions. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated dextran of 2 000 000 Da (2 MDa) was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The antibody to platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1 was from BD PharMingen (San Diego, CA, USA), that to NG2 was from Chemicon (Temecula, CA, USA), and that to smooth muscle α -actin (SMA) (Cy3-conjugated) was from Sigma-Aldrich. AlexaFluor-conjugated secondary antibodies were purchased from Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Cancer cell lines and animals. The BxPC3 human pancreatic adenocarcinoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), and was grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The murine colon adenocarcinoma CT26 cell line was from the National Cancer Center Research Institute, Japan, and was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) containing 10% fetal bovine serum. BALB/c mice and BALB/c nude mice, 5–6 weeks of age, were obtained from Sankyo Laboratory (Tokyo, Japan) and Charles River Laboratories (Tokyo, Japan), respectively.

In vivo Matrigel plug assay and cancer models. Matrigel plugs were created by mixing 0.2 mg/mL recombinant human VEGF-A (VEGF165; R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), 1 mg/mL FGF-2 (R & D Systems), and 0.1 mg/mL heparin (Aventis Pharma, Tokyo, Japan) by pipetting, in combination with regular Matrigel (catalogue no. 354234; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Matrigel (400 μ L per plug; one plug per mouse) was injected subcutaneously into the abdominal region of BALB/c mice. Each Matrigel plug was harvested on day 7 and frozen directly in dry-iced acetone for immunohistochemistry. As cancer models, 5×10^6 BxPC3 cells or 1×10^6 CT26 cells were implanted by subcutaneous injection into the abdominal region of BALB/c nude and normal BALB/c mice and allowed to grow for 3 weeks and 1 week, respectively, until reaching the proliferative phase. For the *in vivo* permeability assay, TGF- β inhibitor at 1 mg/kg, imatinib at 50 mg/kg, or sorafenib at 40 mg/kg was administered as one shot intraperitoneally 18 h before injection of dextran. Dextran was administered intravenously via lateral tail veins 6 h before harvesting of samples. For perfusion study in the tumor tissues, dextran of 2 MDa was administered intravenously, at 24 h after SMWI-administration and 10 min before harvesting, and the excised samples were directly fixed in formalin. All experimental protocols were carried out in accordance with the policies of the Animal Ethics Committee at the University of Tokyo.

Histology and immunohistochemistry. The excised samples were either directly frozen in dry-iced acetone for immunohistochemistry, or fixed overnight in 4% paraformaldehyde and then paraffin embedded to prepare them for hematoxylin-eosin (HE) staining or perfusion study in the tumor tissues. Frozen samples were further sectioned at 10 μ m thickness in a cryostat, briefly fixed with 10% formalin, and then incubated with primary and fluorescent secondary antibodies. Samples were observed with a LSM510 Meta confocal microscope (Zeiss, Thornwood, NY, USA) for immunohistochemistry, and with an AX80 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) for HE staining.

Quantification. Areas in Matrigel plugs that were PECAM-1-positive, double-positive for PECAM-1 and SMA, and FITC-

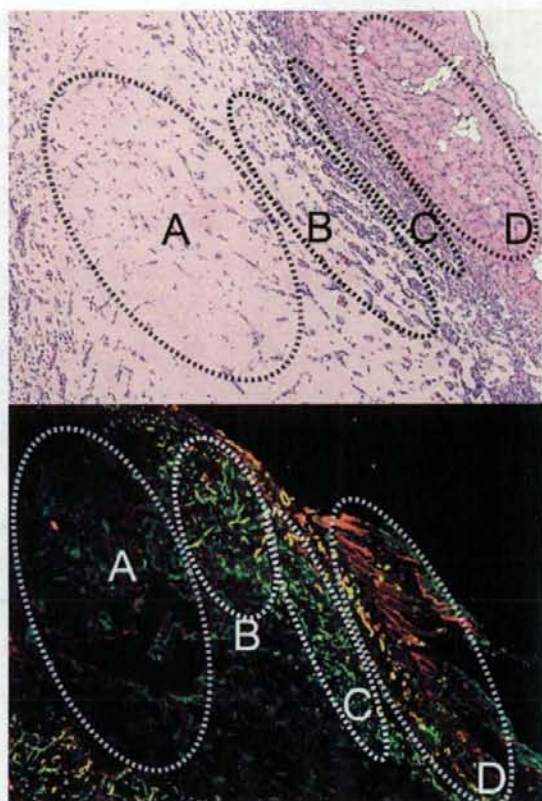


Fig. 2. Low-magnification view of the Matrigel plug and surrounding regions in sections with hematoxyline-eosin (HE) staining (upper) and with immunohistochemistry (lower). (a) Avascular area, (b) vascularized intraplug region, (c) periplug region, and (d) normal tissue. Green, platelet endothelial cell adhesion molecule-1; red, smooth muscle α -actin.

dextran-positive in confocal micrographs ($n = 15$), or lengths of FITC-dextran-positive structure in the tumor tissues ($n = 12$) were measured using Adobe Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) and ImageJ software (freeware distributed by the National Institutes of Health, USA). Pericyte coverage was quantified as the ratio of PECAM-1/SMA-double-positive areas to PECAM-1-positive areas, as described previously.⁽⁷⁾ Results were further analyzed statistically by Student's *t*-test using Microsoft Excel software (Microsoft, Redmond WA, USA).

Results

We initially carried out the Matrigel plug assay *in vivo*, in which regular Matrigel was mixed with VEGF-A, FGF-2, and heparin⁽¹⁶⁾ to investigate the effects of three SMWI on the extravasation of 2 MDa dextran (Fig. 1). Marked induction of pericyte-covered mature neovasculature was observed in the gel plug after a 7-day incubation in mice, as we reported previously.⁽¹⁶⁾ Pericytes were determined to be SMA-positive cells in a Matrigel plug assay. In this model, administration of TGF- β inhibitor decreased pericyte coverage of the neovasculature and significantly enhanced the distribution of 2 MDa dextran. This observation was consistent

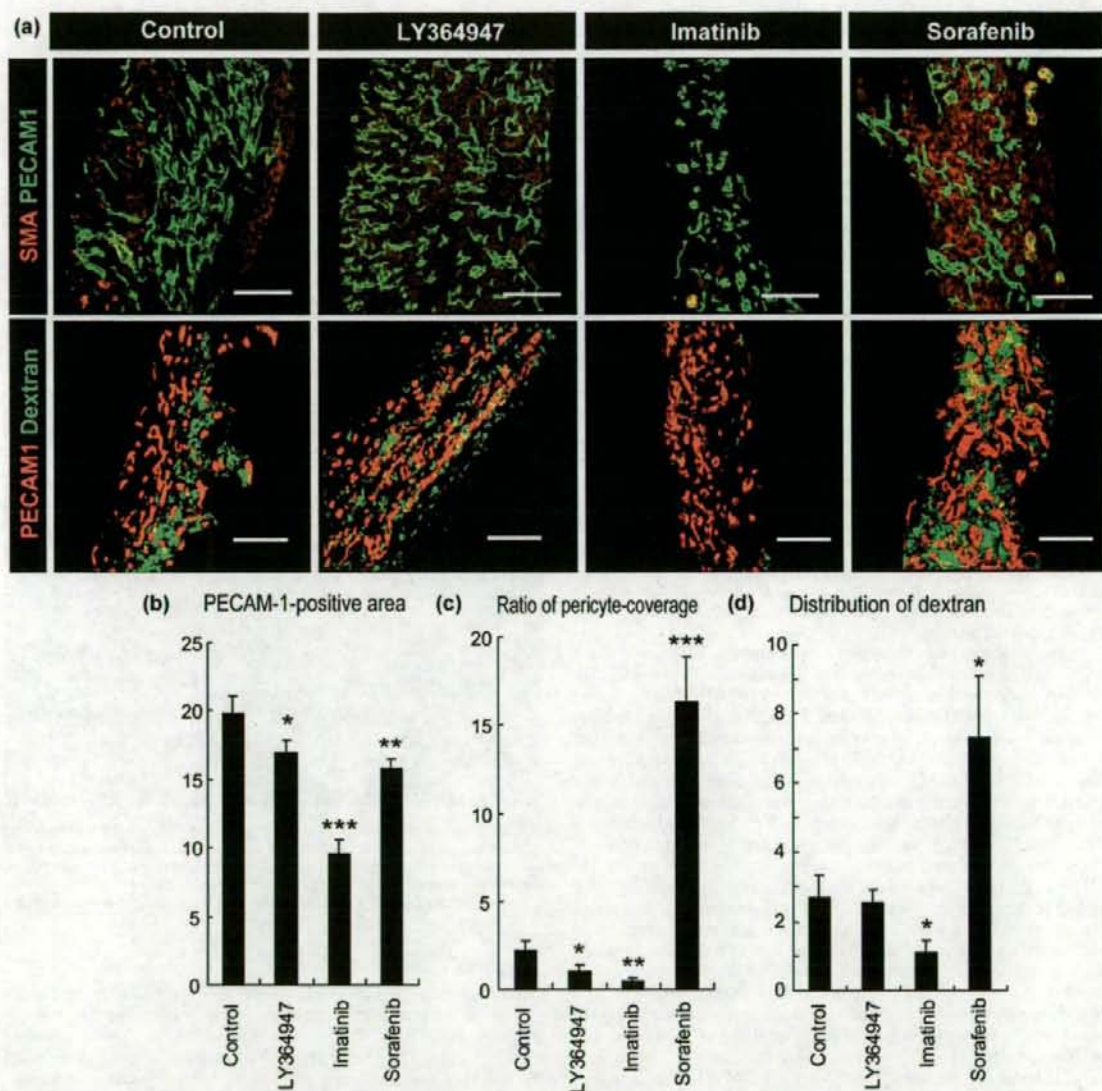


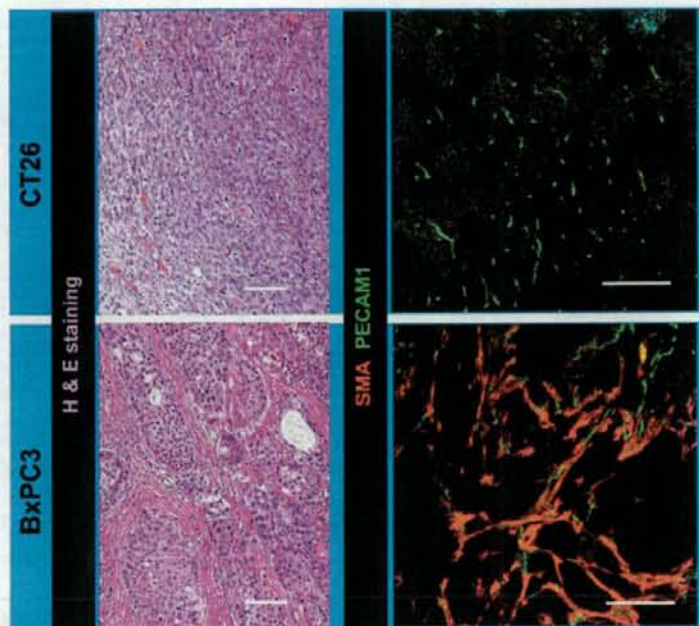
Fig. 3. Effects of three types of kinase inhibitors on extravasation of dextran from vasculature in the periplug region. (a) Confocal microscopy analyses. Upper row: staining of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1-positive endothelium in green and smooth muscle α -actin (SMA)-positive pericytes in red. Lower row: distribution of 2 MDa dextran in green and PECAM-1-positive endothelium in red. Scale bars = 100 μ m. (b-d) Results of quantification ($n = 15$) of areas of endothelium (b, in percentage in one microscopic view), ratio of pericyte-covered endothelium (c, in percentage), and dextran distribution (d, in percentage in one microscopic view). Bars in the graphs represent standard errors. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; and *** $P < 0.001$.

with our previous study, in which we used animal models of pancreatic adenocarcinoma and diffuse-type gastric cancer.⁽⁷⁾ Based on this result, we expected that a decrease in pericytes might induce more extravasation of 2 MDa dextran.

To confirm this, we compared the effects of imatinib administration, which inhibits PDGF signaling and may therefore decrease pericyte coverage. However, administration of imatinib decreased the total accumulation of 2 MDa dextran compared

with TGF- β inhibitor (Fig. 1). Although imatinib actually decreased pericyte coverage to the same level of TGF- β inhibitor, it also decreased PECAM-1-positive endothelium together with pericyte coverage. These findings of morphological analysis were consistent with those noted in a previous report.⁽¹⁷⁾ TGF- β inhibitor maintained the area of PECAM-1-positive endothelium and may therefore be superior to imatinib. In addition, although VEGF inhibition was expected to increase drug delivery, based on the

Fig. 4. Two animal tumor models using CT26 and BxPC3 cell lines. Histological examination of tumor models by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry with platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1 in green and smooth muscle α -actin (SMA) in red. Scale bars = 100 μ m.



results of previous studies,⁽⁸⁾ sorafenib nearly eliminated the influx of 2 MDa dextran and resulted in far less accumulation of it. This result can be explained by the potent reduction of PECAM-1-positive endothelium and increase in pericytes as sleeves. These morphological changes induced by VEGF inhibition were also consistent with previous reports.⁽¹⁶⁾

Although the neovasculature inside the gel plugs was as described above, the vasculature in the regions surrounding the gel plugs, or sites of acute inflammation in reaction to the plugs as foreign bodies (Fig. 2), exhibited different patterns. Compared to the vasculature inside the gel plug, that in regions around the plugs was denser and more tortuous, and was accompanied by pericytes to a smaller extent. These phenotypes resembled those of the vasculature in conventional animal models of tumors, such as the CT26 model, as we describe later in this report. We termed these two regions the 'intraplug' and 'periplug' regions, respectively, after the established terminology in oncology, 'intratumoral' and 'peritumoral'.

Functionally, the vasculature in periplug regions was leaky to 2 MDa dextran in the control condition, that is, without any modulation by SMWI (Fig. 3). Surprisingly, the effects of SMWI on neovasculature in the periplug regions were quite different from those in the intraplug regions. In the periplug regions, pericyte coverage of the neovasculature was far less than in the intraplug region, even in the control condition. In this periplug region, neither TGF- β inhibitor nor imatinib significantly altered pericyte coverage. Consequently, these compounds did not alter the accumulation of 2 MDa dextran. Sorafenib, on the other hand, did increase pericyte coverage, and increased the accumulation of 2 MDa dextran. This increase in extravasation was consistent with previous reports on the effects of VEGF inhibition.⁽⁸⁾

We subsequently compared these findings in the Matrigel plug assay with those in two subcutaneous tumor xenograft models. We used the CT26 cell line derived from murine colon cancer and the BxPC3 cell line derived from human pancreatic adenocarcinoma (Fig. 4). HE staining of CT26 xenografts

revealed a well-vascularized medullary histological pattern with little tumor stroma, whereas that of BxPC3 xenografts revealed a stroma-rich histology. Immunostaining of PECAM-1 and SMA confirmed this stroma-rich characteristic of the BxPC3 model. Although the BxPC3 model grew more slowly than the CT26 model, the BxPC3 model also reached the proliferative phase. Compared to the BxPC3 model, the CT26 model required one-fifth of the number of inoculating cells and one-third of the duration to reach the proliferative phase, which was 1 week for the CT26 model and 3 weeks for the BxPC3 model (data not shown). These differences may well be due to the differences in requirements for induction of stromal components from host animals, as well as rates of proliferation of tumor cell lines.

We then tested the alterations in vascular phenotypes as well as accumulation of 2 MDa dextran with or without SMWI in these tumor models (Fig. 5). We here used NG2 as the pericyte marker (Fig. 5a), because SMA-positive cells (i.e. myofibroblasts) are abundant especially in the stroma of BxPC3 tumor (Fig. 4). In the CT26 model, sorafenib did increase the pericyte-covered vasculature, whereas other SMWI did not increase the pericytes. Imatinib decreased endothelial cells. These observations in the CT26 tumor model were consistent with those in the periplug region of the Matrigel plug. In the BxPC3 model, pericyte coverage was less with LY364947 and imatinib, and endothelial cells were decreased with imatinib and sorafenib. These findings in the BxPC3 tumor model were consistent with those in the intraplug region. Accordingly, 2 MDa dextran was diffusely distributed in tumor tissue without any treatment in the CT26 model, whereas almost no leakage of dextran was observed in the BxPC3 model (Fig. 5b). Sorafenib exhibited the best effect in the CT26 model, whereas TGF- β inhibitor did in the BxPC3 model. The latter result was consistent with the findings of our previous work using nanoparticles including PEGylated liposomes incorporating doxorubicin (Doxil) of approximately 100 nm in diameter, which exhibited antitumor effects in the BxPC3 model

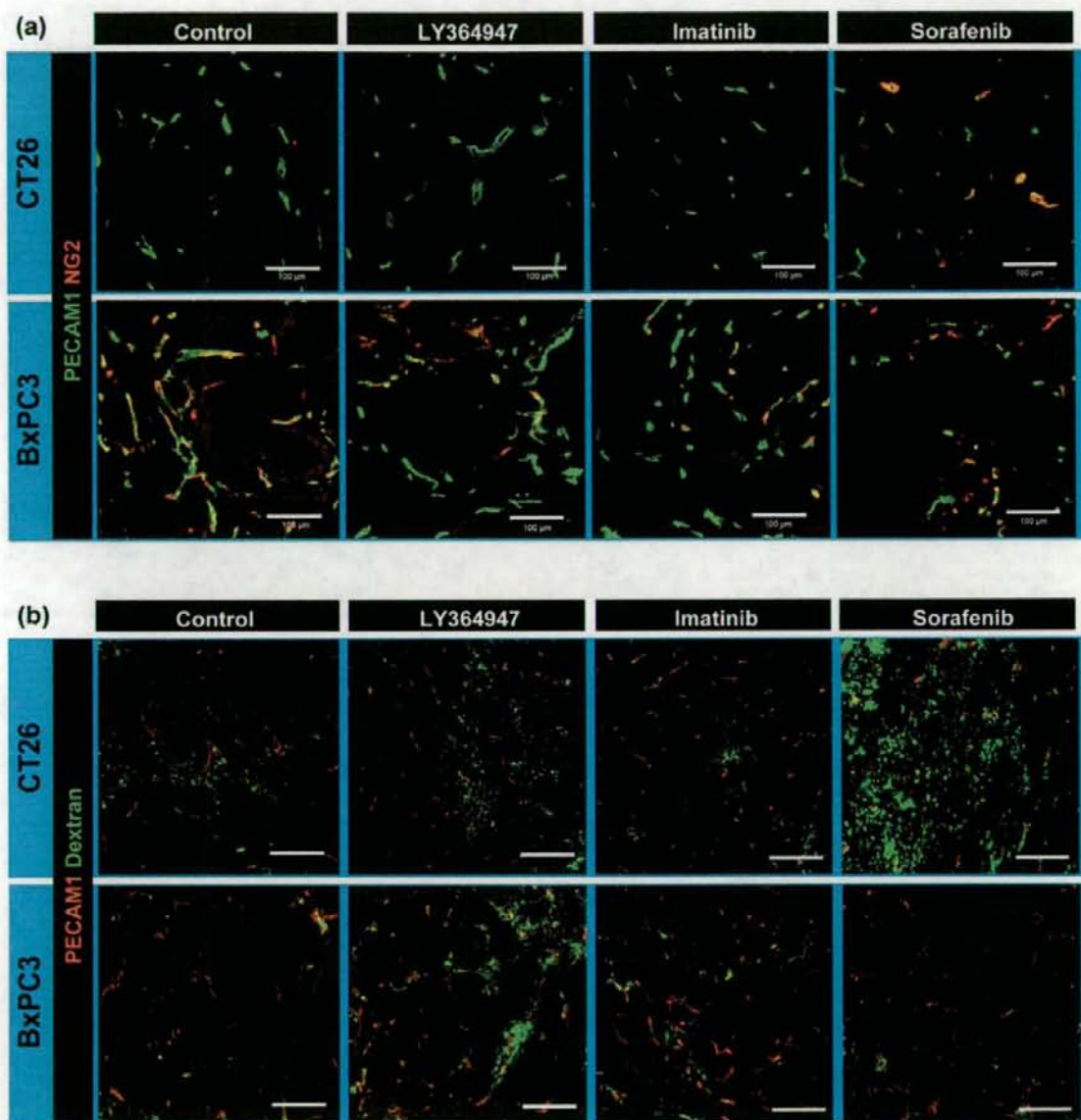


Fig. 5. Effects of three kinase inhibitors in the tumor models. (a) Vascular phenotypes revealed by immunohistochemistry. Green, platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1; red, NG2. (b) Extravasation of 2 MDa dextran from vasculature. Dextran in green and PECAM-1 in red. Scale bars = 100 μ m.

only when combined with TGF- β inhibitor.⁽⁷⁾ We also tested the effects of Doxil with or without TGF- β inhibitor in the CT26 model. Monotherapy with Doxil at 8 mg/kg almost completely inhibited tumor growth, and combined administration of TGF- β inhibitor did not yield any significant additional effects (data not shown). These findings were consistent with those observed in the Matrigel plug assay. The effects of combined use of imatinib were also consistent with those in the Matrigel plug assay.

Increased accumulation of dextran in these tumor models at 7 h after injection, by sorafenib in the CT26 tumor and by LY364947 in the BxPC3 tumor, can also be explained by an increase in the amount of vasculature with perfusion, not only by an increase in leakage. To test this possibility, we examined changes in perfusion by intravascular existence of dextran at only 10 min after administration, because dextran of 2 MDa should basically remain inside vasculature at that time after

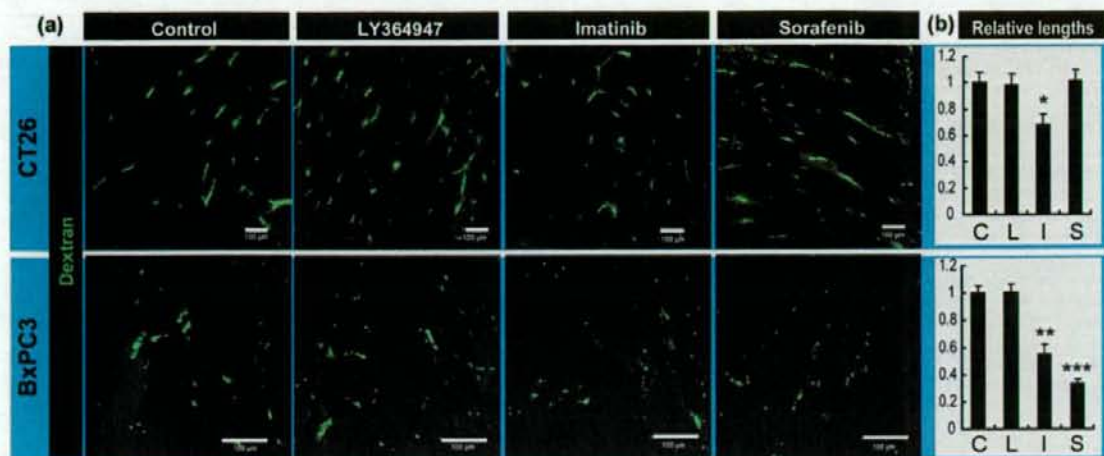


Fig. 6. Perfusion study in the tumor models. (a) Tumor vessels with perfusion were determined by the existence of dextran in green, administered at 10 min before harvesting. Scale bars = 100 μ m. (b) Relative lengths of vessels with perfusion. C, control; I, imatinib; L, LY364947; S, sorafenib. Bars represent standard errors. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; and *** $P < 0.001$.

injection.⁶⁰ As shown in Figure 6, the lengths of vasculature with blood flow were not altered in the conditions exhibiting increased accumulation of dextran, that is, by sorafenib treatment in the CT26 tumor and by LY364947 treatment in the BxPC3 tumor. Therefore, the increased accumulation of dextran in these conditions may largely be due to an increase in vascular leakiness.

Discussion

We have previously shown that use of short-acting SMW TGF- β inhibitor can increase the distribution of nanoparticles in stroma-rich tumors by increasing the leakiness of the tumor neovasculature.⁷ By virtue of the brief duration of SMWI effects, potential side effects can be decreased due to long-term suppression of essential signaling pathways. There are still a number of SMWI that can be used for manipulation of tumor neovasculature via their effects on pericytes or endothelium. We therefore compared the effects of two of these SMWI, imatinib and sorafenib.

Combined use of VEGF inhibition has been reported to have potent effects on drug delivery into tumor tissues.¹⁹ The underlying mechanism for this has been explained by the vascular 'normalization' theory,⁶¹ or decreased interstitial fluid pressure by decreased leakiness of tumor vasculature, via a decrease in endothelial cells and increase in pericyte coverage. Consistent with this, VEGF inhibition by sorafenib had significant effects on the retention of 2 MDa dextran in the periplug regions and in CT26 tumor, where vasculature showed less pericyte coverage and denser endothelium than in normal tissues. However, VEGF inhibition significantly decreased retention of the same dextran in adjacent areas, the intraplug region, and in BxPC3 tumor. Vascular phenotypes in these regions were characterized by more pericyte coverage and sparser endothelium, that is, they were more 'normal' than those in the periplug region and in CT26 tumor.

One of the differences between these two kinds of vasculature was the blood flow in the vasculature after sorafenib treatment. In CT26 tumor after sorafenib treatment, blood flow was maintained, whereas the flow ceased in sorafenib-treated BxPC3 tumor. These differences may partially be because of differences in sensitivity of the endothelium to the change in VEGF signaling,

known to be at least due to differences in expression levels of VEGFR2.¹⁸

Another apparent difference in these tumor models was pericyte coverage before drug administration. Less pericyte coverage has been reported to result in more leakiness.^{11–13} The degrees of dextran accumulation in all control conditions (i.e. without modification by SMWI) are consistent with the degrees of pericyte coverage. Increased dextran accumulation in LY364947-treated BxPC3 tumors can also be explained by decreased pericyte coverage, not by normalization. Both blood perfusion (Fig. 6) and interstitial fluid pressure, which we previously reported,⁷ did not differ with or without LY364947 treatment in BxPC3 tumor. These findings suggest that we may need different approaches, such as the use of TGF- β inhibitor to increase drug delivery (at least for nanoparticles), to develop effective treatment for tumors with originally 'more normal' tumor vasculature. Note, however, that these more normal vessels in tumors might not be completely normal, because TGF- β inhibitor did not alter the accumulation of nanoparticles in true normal tissues, as we previously reported.⁷

Regarding the degree of original pericyte coverage in tumor vasculature, an increase in the amount of stromal components in tumor tissue may result in an increase in pericyte coverage. In a previous study, we found that the presence of FGF-2 together with VEGF-A enhances mature neovascularization compared with VEGF-A alone.¹⁶ In addition to FGF-2, a set of signaling molecules is needed to recruit and to induce proliferation of pericytes. These include PDGF-BB^{12,13} (homodimer of PDGF-B chain) and TGF- β .^{11,20} These signaling molecules are reported to be secreted from components of the tumor stroma and, above all, cancer-associated fibro-blasts^{21–23} and macrophages.²⁴ Tumors with more stroma, including fibroblasts and immune cells, have more pericyte coverage of the vasculature with greater maturity and less leakiness. Although chemoresistance of tumors has been largely investigated from the aspect of drug sensitivity of tumor cells per se, it is possible that the histological pattern of the tumor tissues may also constitute a reason for chemoresistance, because of insufficient drug delivery to the tumor cells.

The Tie2-angiopoietin signaling pathway is also known to be involved in vessel maturation and to affect pericytes.²⁵ Because there are no SMW compounds available to inhibit this signaling pathway, we tested the effects of one-shot Tie2-Fc chimeric

protein at 50 mg/kg bodyweight with 2 MDa dextran in the Matrigel plug assay, but no significant effects on accumulation of 2 MDa dextran were observed (M.R. Kano, unpublished data, 2008). There are two possible explanations for this observation: spatial and temporal. According to the spatial explanation, because Tie2-angiopoietin signaling occurs between the endothelium and pericytes and thus outside the vessel lumen, the Fe chimera, which is of fairly large molecular size and may therefore be retained inside vessel lumens, is not able to affect signaling. The other drugs used in the present study were all SMWI, which may easily exit the vessel lumen and penetrate the perivascular tissues. The second explanation is temporal. Although this signaling pathway is known to be deeply involved in development, whether it is also involved in the maintenance of endothelial-mural structure is not known. Because we observed the effects of drugs only at 24 h after administration, it is possible that other inhibitors inhibited only the maintenance functions of the signaling pathways, and not functions related to development.

Administration of TGF- β inhibitor did not significantly affect the vasculature in normal organs,⁽⁷⁾ so it is possible that the neo-vasculature requires larger amounts of signaling molecules to maintain structure than do established vessels.

In conclusion, the appropriate strategy for optimization of tumor vasculature for drug delivery system using nanoparticles may not be uniform, and may depend on tumor type, including differences in the degree of pericyte coverage of tumor vasculature.

Acknowledgments

We thank Dr Peter Baluk, Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco (UCSF), for advice about perfusion. This work was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI 19790282 and 17016011) from the Ministry of Education, Culture, Sports, and Technology of Japan (MEXT), and a Health Labor Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

References

- Giroux V, Malicet C, Barthet M *et al*. p8 is a new target of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 235–41.
- Merriman RL, Hertel LW, Schultz RM *et al*. Comparison of the antitumor activity of gemcitabine and ara-C in a panel of human breast, colon, lung and pancreatic xenograft models. *Invest New Drugs* 1996; **14**: 243–7.
- Rothenberg ML, Moore MJ, Cripps MC *et al*. A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. *Ann Oncol* 1996; **7**: 347–53.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57–70.
- Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res* 1990; **50**: 814S–19S.
- Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chilkoti A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**: 335–44.
- Kano MR, Bae Y, Iwata C *et al*. Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF- β signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 3460–5.
- Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; **307**: 58–62.
- Wilhelm S, Carter C, Lynch M *et al*. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 835–44.
- Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 2005; **7**: 452–64.
- von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 2006; **312**: 623–9.
- Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1142–51.
- Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S *et al*. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev* 2003; **17**: 1835–40.
- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H *et al*. Inhibition of the Abl protein-

tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo* by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996; **56**: 100–4.

- Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003; **111**: 1287–95.
- Kano MR, Morishita Y, Iwata C *et al*. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFR β signaling. *J Cell Sci* 2005; **118**: 3759–68.
- Vlahovic G, Rabhani ZN, Herndon JE, Dewhirst MW, Vujaskovic Z. Treatment with imatinib in NSCLC is associated with decrease of phosphorylated PDGFR- β and VEGF expression, decrease in interstitial fluid pressure and improvement of oxygenation. *Br J Cancer* 2006; **95**: 1013–19.
- Mancuso MR, Davis R, Norberg SM *et al*. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* 2006; **116**: 2610–21.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W *et al*. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; **350**: 2335–42.
- Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA. PDGF, TGF- β , and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 1998; **141**: 805–14.
- Pietras K, Pahlter J, Bergers G, Hanahan D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med* 2008; **5**: e19.
- Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004; **45**: S163–75.
- Bhowmick NA, Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 2005; **15**: 97–101.
- Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; **66**: 605–12.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005; **97**: 512–23.