

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究

光線力学的治療に有効な
多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発
に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 小野 努

平成21（2009）年3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

光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発
に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 小野 努

平成21（2009）年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発に関する研究	-----	1
小野 努		
II. 分担研究報告		
1. PDTによる殺細胞効果を決定付けている因子の解析ならびにその最適化 ～in vivo実験に利用可能な製剤処方模索～に関する研究	-----	9
大河原賢一		
2. レチノイド化合物の合成とその活性評価に関する研究	-----	15
加来田博貴		
3. 光増感剤を高効率に内封する生体適合性ナノ粒子調製プロセスの構築に関する研 究	-----	18
小野努, 阪田功		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	33

光線力学的治療に有効な多機能型薬剤内封ナノ運搬体の開発

主任研究者 小野 努 岡山大学大学院環境学研究科資源循環学専攻 准教授

研究要旨

光線力学的治療（PDT）の鍵を握る光増感剤は、その多くが高い疎水性を持ち、腫瘍近傍へ十分量を送達させるためには過剰の投与が必要となる。そのため、この疎水性の高い光増感剤を安定に内封した 100 nm 程度のドラッグキャリアが開発できれば、光過敏症などの副作用や薬物投与量の抑制など患者のクオリティ・オブ・ライフ（QOL）向上へと繋がる。また、その他の多くの抗がん剤もまた疎水性が高く、同時に内封することが可能で、それらの協奏的な抗腫瘍効果が期待できる。そこで本研究では、疎水性の高い光増感剤を高効率で内封可能な光線力学的治療用ドラッグキャリア（ナノ運搬体）の創製を目的として、簡便なナノ運搬体の調製手法の構築とナノ運搬体への光照射による *in vitro* 系での殺細胞効果を検討して、臨床応用へ向けた *in vivo* における体内動態評価および光照射による抗腫瘍効果に有効なナノ運搬体プロトタイプの前製を目的としている。

特に本年度は、昨年度までに検討してきた様々なナノキャリア候補群の中から PDT に有効なポリ乳酸（PLA）-ポリエチレングリコール（PEG）共重合体（PLE）を用いた PLE ナノ粒子に着目し、機能性ポルフィリンの高効率内封技術の確立と最適化された PLE ナノ粒子を用いた *in vitro* 実験による colon26 細胞に対する殺細胞効果について検証する。また、強いレキシノイド作用を有するレチノイド誘導体の分子設計についても知見を深め、異なる作用機序に基づく併剤作用によって相乗的な効果が可能なナノキャリア開発を行う。

分担研究者

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

A. 研究目的

光線力学的治療（PDT）は、通常の抗がん剤を用いた化学療法とは異なり、外部から腫瘍組織選択的に印加する光刺激によ

て局所的な抗がん効果を期待する低侵襲性治療のひとつである。早期がんに対して高い割合で完治が可能な治療法として既に臨床応用が行われ、フォトフィリン、レザフィリン、ビスダインが厚生労働省から認可を受けている。しかしながら、2 cm 以上の腫瘍に対しての完全治癒率が低下することや深部がんへの対応の課題もあり、なかでも、光過敏症などの副作用を避けるために術後数週間の暗室生活を余儀なくされている。このような問題を解決するためには、光増感物質を腫瘍組織内部へ安定に送達す

る技術基盤の確立が強く求められている。ナノ粒子は正常組織においては血管外へ漏出しにくい一方で、血管の透過性が亢進している腫瘍組織では血管外へと漏出し、未発達のリンパ管組織下では局所的な滞留性の大幅な向上が期待される（EPR 効果）。そのため、血中滞留性が高いナノ粒子内部に薬物を封入することができれば、静脈内投与後に高い腫瘍中薬物濃度を達成できる。そのため、PDTに必要なポルフィリン類などの光増感剤を高効率で封入可能なナノ運搬体の設計とともに、腫瘍組織への移行の駆動力となる、高い血中濃度が維持可能な血中滞留型ナノ運搬体の創製を行ってPDTへの適用を目指している。また、疎水性薬物を高効率で内封する機能を活用して、殺細胞効果とは作用機序の異なる抗腫瘍効果をもたらすことが期待されるレチノイド化合物の開発も同時に行っており、複数の薬剤を併用可能な多機能型ナノ運搬体の創製にも挑んでいる。

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

の薬物運搬体の設計を化学的、薬学的にアプローチしていく点が本研究の特徴であり、若手研究者の連携を通じて大きなシナジー効果が期待される。

本年度は、昨年度までに得られた様々なナノキャリア候補群から、ポルフィリンを最も高効率で安定に内封可能なポリ乳酸-ポリエチレングリコール系（PLE）ナノ粒子に焦点を絞り、静脈投与が可能な100 nm程度のナノ運搬体を高効率で調製するプロセスの最適化とナノ粒子内部に包括されたポルフィリンからの一重項酸素放出挙動の確認、および *in vitro* での光照射による殺細胞効果について検討を行ってきた。

さらに、作用機序の異なる抗腫瘍効果が期待されるレチノイド化合物の開発も進め、高いレチノイド作用を有するレチノイド誘導体の設計指針を確立してきており、より低濃度で抗腫瘍効果をもたらすレチノイド化合物合成を進める。十分な抗腫瘍効果を持つ化合物が合成されれば、今後は機能性ポルフィリンと同時に内封した相乗効果を示す多剤併用型ナノキャリアの開発に繋がる技術であるといえる。

B. 研究方法

光増感剤を高効率に内封する生体適合性ナノ粒子調製プロセスの構築

PDTに有効な光増感物質は、600 nm以上の波長域の光を吸収して一重項酸素を産生するのが望ましい。光波長側に吸収帯がシフトするほど、生体成分による光の減衰がなく、効率的なPDTが期待できる。そこで、(株)光ケミカル研究所では、光波長域に吸収帯を有するポルフィリン開発を行った。

光増感剤などの疎水性の高い化合物を高効率に内封するナノキャリアとして、リポソームやナノエマルジョンやナノ粒子について昨年度まで比較しながら研究

を進めてきたが、本年度は、そのなかでも最も高効率で安定に薬物を内封できるナノ粒子に焦点を絞り、少ない投与量で効果を発揮できるようなポルフィリン含有ナノ粒子の設計指針について確立すべく、ナノ粒子調製時の様々な操作因子について検討を行った。

特に、血中滞留性に優れた効果を示す PEG 鎖と生体内での代謝分解が可能なポリ乳酸 (PLA) 鎖を併せ持つジブロックポリマー (PLE) を用いて、100 nm 程度にサイズ制御されたポリ乳酸をコアとするナノ粒子の調製手法を詳細に検討した。

粒子径ならびに表面電荷の指標となるゼータ電位の測定は Malvern 社の Zetasizer-Nano を用いて動的光散乱法により行った。また、濃厚系での液滴径・粒子径測定には、濃厚系粒径アナライザー (FPAR) (FPAR-1200H, 大塚電子) により測定を行った。さらに、粒子として得られたものに関しては、走査型電子顕微鏡 (SEM) (S-4700, HITACHI) により粒子形状を観察した。さらに機能性ポルフィリンは所定の波長の光照射により蛍光を発することから、それらの細胞内でのイメージングを、本研究費でリースしている蛍光顕微鏡 (BZ-8000, キーエンス) を用いた。

PDT による殺細胞効果を決定付けている因子の解析ならびにその最適化～in vivo 実験に利用可能な製剤処方 の模索～

小野によって確立された最適なポルフィリン含有 PLE ナノ粒子調製手法に基づいて、ポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を調製し、光照射による in vitro 殺細胞効果の評価を MTT assay を用いて行った。

実験は接着細胞である colon26 細胞を 96 穴プレートに播種後、24 時間後にポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を一定量添加し、12 時間後に光を 1 分間照射した。光照射 24 時間後における細胞生存率を求め

た。

また、ポルフィリン含有 PLE ナノ粒子が in vitro 条件下において殺細胞効果を示すためのポルフィリン放出の必要性と、その放出挙動を、上述の MTT assay により検討した。ポルフィリン放出の必要性については、光照射を行う前段階において培地交換を行う群と行わない群を評価し、殺細胞効果への影響を比較することで検討を行った。ポルフィリン放出特性については、MTT assay ポルフィリン封入ポリマーミセル添加後、光照射を行うまでの時間を変化させることで、ポルフィリン放出に伴う殺細胞効果の変化を観察し、間接的にポルフィリンの放出性を評価した。

レチノイド化合物の合成とその活性評価

加来田によって、光増感物質による PDT と異なる作用機序を有するレチノイド誘導体として、タモキシフェン耐性乳がんやタキソール耐性肺がんなどの治療薬候補として注目されているレチノイド X 受容体 (RXR) を分子標的として、NEt-3IP と称するサブタイプ選択性のある新規な RXR アゴニストを開発している。

本年度は、本化合物の単独でのがん細胞増殖抑制効果および抗炎症効果について検討した。

開発化合物の RXR-PPAR α および RXR-PPAR γ などのヘテロダイマーに対する活性化能を評価するために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを行った。活性化能は、PPAR バンアゴニストである TIPP-703 1 μ M での活性化能を 1 とした。実験動物は、雄性 ICR マウス (体重 15-30 g) および雄性 SD ラット (170-200 g) Charles River より購入し、4-7 日間岡山大学動物実験施設にてならした後、実験前日より絶食し、水飲みを与えた。

なお動物実験は、岡山大学動物実験指針に従って行った。

抗炎症試験法には、マウスを用いたカラゲニン浮腫試験を用いた。マウス一群7-8匹に対し、1, 3, 10 mg/kgのNEt-3IP (1%エタノール, 0.5% CMC水溶液)を10 mL/kgで経口投与し、その3時間後に浮腫を発生させる物質であるカラゲニンの1%水溶液をマウス後肢足蹠に皮下注射した(0.1 mL/匹)。その後、1, 2, 3, 4時間後ごとに後肢足蹠の体積を測定した。

C. 研究結果

光増感剤を高効率に内封する生体適合性ナノ粒子調製プロセスの構築

水溶性 PLE と油溶性 PLE を組み合わせてナノ粒子を調製することで、ポリ乳酸をコアとして PEG 鎖を表面に有する 100 nm 以下のナノ粒子調製が可能であることを明らかにした。ポルフィリンは酢酸エチルに溶解させておき、溶媒拡散法によって酢酸エチルを除去することで、ナノ粒子内に内封することが可能である。この際、用いる水溶性 PLE 量、油溶性 PLE 量、超音波照射強度、ポルフィリン添加量を制御することによって、PLE ナノ粒子の粒径制御や含有率制御および内封率の制御までも可能となった。

これは、ナノ粒子の前駆体となる微小液滴サイズによるもので、水溶性 PLE は界面活性剤として働き、より小さな酢酸エチル液滴を安定化させることができ、そのため得られる PLE ナノ粒子も 100 nm 以下まで微細化が可能となる。一方、油溶性 PLE はナノ粒子マトリクス本体を形成するものであるため、油溶性 PLE 量は液滴サイズには影響をほとんどおよぼさず、ナノ粒子化する際に粒子を大きくする効果がある。このことを利用して、使用する PLE 量を低下させることによって、

PLE ナノ粒子中のポルフィリン含有量を 10%以上まで向上させることに成功した。

ポルフィリンの内封率に関しては、用いた酢酸エチルへの溶解度が大きく影響していることが明らかとなり、酢酸エチルへの飽和溶解量以上の添加は、ポルフィリン同士の凝集を引き起こすことになると考えられる。

また、ナノ粒子内に内封されたポルフィリンに対する光照射の結果、溶液中のダンシル-L-メチオニンの酸化作用が観察され、PLE ナノ粒子中に存在しているポルフィリンから一重項酸素が産生していることが示唆された。

PDT による殺細胞効果を決定付けている因子の解析ならびにその最適化～in vivo 実験に利用可能な製剤処方模索～

今回は特に、2種類のポリ乳酸-ポリエチレングリコール共重合体 (PLE-3 と PLE-2) を用いて、それぞれポルフィリン内封ナノ粒子を調製し、培養中のがん細胞に一定時間曝露した後、光照射に伴い、ナノ粒子中あるいは放出されたポルフィリンから産生される一重項酸素に起因する殺細胞効果を検討した (MTT assay)。尚、ネガティブコントロールとしては細胞にメディウムのみを添加したものをを用いた。結果として、PLE-3 ナノ粒子、PLE-2 ナノ粒子共に、光を照射した場合の生存率が、光を照射していない群と比較して顕著に減少していた。また予備実験により、ポルフィリン非存在下の光照射による毒性は、極めて低いことも明らかとなっていることから、ポルフィリン封入ポリマーナノ粒子が安全な製剤として利用可能であることが示唆された。

次にポルフィリン含有 PLE ナノ粒子からのポルフィリン放出と、その殺細胞効果への影響を調べた。前年度の検討においては、ポルフィリン含有 PLE ナノ粒子

はポルフィリンをほぼ放出しないモデルとして検討したものの、高い殺細胞効果が得られた為、ナノ粒子内に封入されたポルフィリンが、一重項酸素を産生して殺細胞効果を示す為には、ミセルから放出される必要があるのか、ミセル中においても作用するのかも改めて検討する必要があった。

レチノイド化合物の合成とその活性評価

NEI-3IP のヘテロダイマーに対する活性化能を見たところ、高脂血症治療薬の分子標的として知られる PPAR α に対する活性化能はなかったものの、抗炎症作用の期待できる PPAR γ に対する活性可能が認められた。

また、カラゲニン足浮腫試験より、顕著な抗炎症剤であるステロイド剤のプレドニゾロンの抗炎症作用が 10 mg/kg では見られないことから、本化合物の抗炎症作用は極めて強力と思われる。

D. 考察

以上、本年度の結果より、PDT に有効なドラッグキャリアの設計指針が明確になり、高い血中滞留性を有する PEG 鎖と生体内での代謝能を有し、水溶液中で強固な粒子マトリクスを構成するポリ乳酸部位を併せ持つ PLE によって、疎水性薬物を高効率で内封できるナノ粒子調製プロセスが構築できた。

また、ナノ粒子に内封されたままでも光照射によって産生した一重項酸素はその短い寿命にもかかわらず、溶液中の基質と反応することが分かった。

本ナノ粒子を用いた *in vitro* でも、光照射による殺細胞効果実験から、極めて低濃度のポルフィリン投与によって、明確な殺細胞効果を示すことが明らかとな

った。ただ、培地交換後の光照射においても十分な殺細胞効果が確認できたことから、ポルフィリンが僅かながら水中を拡散して細胞表面付近に取り込まれていることが示唆されるものである。このようなナノ粒子からの PDT 作用機序を明らかにすることによって、さらに高機能な PDT 用ナノ運搬体の開発が可能になると期待される。

現時点ではポルフィリンの含有量は酢酸エチルへの溶解量によって制限を受けているが、今後は用いる有機溶媒やジブロックコポリマー組成を変更することによって、より低侵襲で副作用の少ないナノメディシン創製を実現していきたい。さらに、本ナノ粒子の特徴である疎水性化合物の高い包括率を活かして、高活性なレチノイド誘導体などの多剤併用ドラッグキャリアの創出も期待できる。

E. 結論

本年度の研究成果として、ポリ乳酸-ポリエチレングリコールジブロック共重合体を用いることで、機能性ポルフィリンを高効率で安定に含有可能なナノキャリアを約 100 nm で調製する手法を確立した。その粒子サイズや内封量および含有量まで調整操作因子によって、任意で調整することが可能となり、また、colon26 細胞を用いた *in vitro* 実験系により、ポルフィリン含有ナノキャリアを用いた極めて低濃度での殺細胞効果も確認された。

最終年度は、これらの PLE ナノ粒子を用いた *in vivo* での PDT 効果を得ることに焦点を当て、臨床応用を視野にいたした薬学的アプローチに力を入れることとする。また、異なる作用機序を有する抗がん剤を併用することで、更なる抗腫瘍効果の構築も目指して、従来通り化学的アプローチと薬学的アプローチの連携を図って研究を推進して

いきたいと考えている。

これまで市販の PDT では為し得ない副作用のほとんどない低侵襲医療の実現へ向けて、分子設計と界面設計に基づくナノキャリア開発プロセスを通して、PDT を大きく加速する研究成果を導くと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) J. Yokoe, S. Sakuragi, K. Yamamoto, T. Teragaki, K. Ogawara, K. Higaki, N. Katayama, T. Kai, M. Sato and T. Kimura, Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats. *Int. J. Pharm.*, 353, 28-34 (2008)

2) K. Ogawara, K. Un, K. Minato, K. Tanaka, K. Higaki and T. Kimura, Determinants for in-vivo anti-tumor effects of PEG liposomal doxorubicin: Importance of vascular permeability within tumors. *Int. J. Pharm.*, 359, 234-240 (2008)

3) T. Shehata, K. Ogawara, K. Higaki and T. Kimura, Prolongation of residence time of liposome by surface modification with mixture of hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.*, 359, 272-279 (2008)

4) H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto, S. Nakajima, I. Sakata, H. Iizuka, ATX-S10(Na)-photodynamic therapy inhibits cytokine secretion and

proliferation of lymphocytes, *J. Dermatological Sci.*, 49, 174-177 (2008)

5) K. Takeda, T. Kunisada, S. Miyazawa, Y. Nakae, T. Ozaki, Photodynamic therapy with ATX-S10-Na(II) Inhibits synovial sarcoma cell growth, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 466, 1726-1733 (2008)

6) E. Kamio, S. Yonemura, T. Ono, and H. Yoshizawa "Microcapsules with Macroholes Prepared by the Competitive Adsorption of Surfactants on Emulsion Droplet Surfaces" *Langmuir*, 24(23), 13287-13298 (2008)

7) T. Nakashima, T. Ono "Effects of Dispersion Stabilizer and Reaction Solvent on Forming Monodisperse Polystyrene Microspheres by Dispersion Polymerization" *Colloid Polym. Sci.*, 286, 1587-1592 (2008)

8) K. Tomita, T. Ono "Synthesis of polyaspartate macromonomer having a vinyl end group and application to dispersion copolymerization of styrene" *Colloid Polym. Sci.*, 287, 109-113 (2009)

9) M. Muranaka, T. Ono "Preparation of Monodisperse Polylactide Microspheres by Dispersion Polymerization Using a Polymeric Stabilizer with Hydroxyl Groups" *Macromol. Rapid Commun.*, 30, 152-156 (2009)

10) S. Mutsuo, K. Yamamoto, T. Furuzono, T. Kimura, T. Ono, A. Kishida, Release behavior from hydrogen-bonded polymer

gel prepared by pressurization, J. Applied Polym. Sci., in press

2. 学会発表

1) 大河原賢一, 運 敬太, 檜垣和孝, 木村聰城郎, P-糖タンパク質高発現がん細胞に対するドキシソルピシン内封 PEG 修飾リポソームの in vivo 抗腫瘍効果とその機構解析, 第 23 回日本薬剤学会, 札幌, 2008 年 5 月 20-22 日

2) 大河原賢一, 運 敬太, 中尾隆明, 檜垣和孝, 木村聰城郎, 血管新生阻害薬のエマルジョン製剤化とその抗腫瘍効果の評価, 第 24 回日本 DDS 学会, 東京, 2008 年 6 月 29-30 日

3) Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, Formulation and evaluation of PEGylated niosomes for targeted drug delivery. 第 24 回日本 DDS 学会, 東京, 2008 年 6 月 29-30 日

4) Yuta Yoshizawa, Yusuke Kono, Yoshiko Fukuoka, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, Development and evaluation of novel nanoparticle formulation of paclitaxel. 第 23 回日本薬物動態学会, 熊本, 2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日

5) Ryosuke Watari, Shuhei Nishiguchi, Ken-ichi Ogawara, Jun-ichi Yokoe, Kazutaka Higaki, Toshiya Kai, Makoto Sato and Toshikiro Kimura, Improvement of in-vivo disposition characteristics and anti-tumor activity of PEG liposomal doxorubicin by rHSA conjugation onto surface of liposome. 第 23 回日本薬物動態学会, 熊本, 2008

年 10 月 30 日-11 月 1 日

6) 岡本芳晴, 田邊茂之, 柄武志, 南三郎, 中島進, 仲江良則, 阪田功, 早期照射による光増感物質 PAD-S31 の低用量化の検討, 第 18 回日本光線力学学会学術講演会, 名古屋, 2008 年 6 月 14-15 日

7) K. Tomita, T. Ono, Preparation of polymeric particles with poly(aspartic acid) hairy chains, 48th Microsymposium of Prague Meetings on macromolecules, Prague, Czech Republic, 2008 年 7 月 20-24 日

8) M. Muranaka, T. Ono, Design of polymeric dispersion stabilizer for preparation of monodisperse polylactide microspheres, 48th Microsymposium of Prague Meetings on macromolecules, Prague, Czech Republic, 2008 年 7 月 20-24 日

9) 富田恵介, 小野努, マクロモノマー分散共重合による単分散ヘア粒子の調製, 第 61 回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008 年 9 月 7-9 日

10) 村中誠, 小野努, 分散重合における単分散ポリラクチドミクロスフェアの粒径制御, 第 61 回コロイドおよび界面化学討論会, 福岡, 2008 年 9 月 7-9 日

11) 安川政宏, 神尾英治, 小野努, 水性二相系を利用した W/W/O エマルジョンの調製, 化学工学会第 40 回秋季大会講演要旨集, 仙台, 2008 年 9 月 24-26 日

12) 廣田健, 村中誠, 小野努, 阪田功, 光線力学的治療に有効なポルフィリン内

封ナノ粒子の開発，化学工学会第40回秋季大会講演要旨集，仙台，2008年9月24-26日

13) 安川政宏，神尾英治，小野努，水性二相系を利用した W/W/O エマルションの調製，第15回高分子ミクロスフェア討論会講演要旨集，神戸，2008年11月12-14日

14) 大浦浩平，久保田潤，小野努，界面活性 TEMPO 誘導体を利用した不均一系重合，第15回高分子ミクロスフェア討論会講演要旨集，神戸，2008年11月12-14日

15) 安川政宏，小野努，木村幸敬，神尾英治，水溶性高分子による相分離を利用した複合エマルションの調製，高分子材料のための俯瞰的シンポジウム，京都，2009年1月13-14日

16) 廣田健，村中誠，小野努，木村幸敬，白石太郎，大河原賢一，檜垣和孝，木村聰城郎，ポルフィリン内封ナノ粒子の開発と光線力学的治療への応用，高分子材料のための俯瞰的シンポジウム，京都，2009年1月13-14日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) PCT/JP2008/53240，加来田他，Rexinoid compound having alkoxy group，2008年9月4日

2) 特願 2008-118187，阪田功他，「皮膚疾患治療剤」2008年4月30日

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

PDTによる殺細胞効果を決定付けている因子の解析ならびにその最適化 ～in vivo 実験に利用可能な製剤処方の方策～

分担研究者：大河原 賢一 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 薬学系

研究要旨

本年度の研究課題として、昨年度に引き続き in vitro 条件下にて種々の検討を行うことにより、将来的に in vivo 動物実験に使用可能なポルフィリン内封微粒子製剤の調製、ならびにその最適化を目指した。光を照射しない条件において、前年度検討を行ったポルフィリン内封エマルジョンよりも、がん細胞に対する毒性が低く、安全に使用できることが確認されたポルフィリン封入ポリマーミセルについて、その内封効率ならびに調製後の粒子サイズの最適化を試みた。昨年度の検討で、光照射により発生する一重項酸素による殺細胞効果を決定付けている因子の解析を行い、光照射により認められた殺細胞効果の少なくとも一部に、細胞内に存在するポルフィリンから産生された一重項酸素によるものが含まれていることが示唆された。一方で、環境理工学部小野先生の研究室に提供いただいたポルフィリンの放出性に極めて乏しいポルフィリン封入ポリマーミセルを利用した実験においても、顕著な殺細胞効果が認められ、必ずしもポルフィリンが粒子から放出を受ける必要のないことを示唆する結果が得られていた。そこで本年度は、昨年度の検討において高い有効性・安全性を担保したポルフィリン封入ポリマーミセルについて、その有効性とポルフィリン放出性との関係を中心に in vitro での評価を行うことで、昨年度の検討により生まれていた疑問点に関しても併せて検討を加えることにした。種々検討の結果、光を照射しない条件において、安全に使用でき、適切な光照射により高い殺細胞効果を有し、かつ DDS 製剤として望ましい粒子径を有するポルフィリン封入ポリマーミセルの処方を見出すことに成功し、さらに放出性と有効性に関しても非常に興味のある知見を得るに至った。

A. 研究目的

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

Photo Dynamic Therapy (PDT) を利用したがん治療は、通常の抗がん剤を用いた化学療法とは異なり、外部から腫瘍組織選択的に印加する光刺激によって局所的な抗がん効果を期待するものであるものの、実際の治療効果は、光刺激を印加する段階において標的組織である腫瘍組織に存在する光増感物質の量に依存する。したがって PDT 治療成績の成否の鍵を握るのは、光増感物質を腫瘍組織内部へ安

定に送達する DDS 技術基盤の確立であると言える。

ナノ粒子は正常組織においては血管外へ漏出しにくい一方で、血管の透過性が亢進している腫瘍組織では血管外へと漏出するため、静脈内投与後の血中滞留性が高いナノ粒子内部に薬物を封入することで、高い腫瘍中薬物濃度を達成できることが知られている。本研究では、PDTに必要なポルフィリン類を高効率で封入可能なナノ運搬体の調製技術を構築するとともに、腫瘍組織への移行の駆動力となる、高い血中濃度が維持可能な血中滞留型ナノ運搬体の創製を目指す。このデリバリー手法の技術革新によって PDT による治療効果が大幅に向上し、患者の QOL の向上が期待される。

我々は昨年度に、光照射により発生する一重項酸素による殺細胞効果を決定付けている因子の解析に焦点を絞り、*in vitro* 条件下においてポルフィリン封入エマルジョン添加後のポルフィリン放出に伴う殺細胞効果を検討した。細胞内に取り込まれたポルフィリンによる殺細胞作用に加え、細胞近辺に存在するポルフィリンによる作用も確認された。

一方で、エマルジョン調製時に用いる界面活性剤に起因すると推察される非特異的な細胞毒性が認められたため、本年度は有効性・安全性の面で高い評価が得られたポルフィリン封入ポリマーミセルを用いて *in vitro* 条件下におけるこれらの再検討に加え、将来的な *in vivo* 条件で使用を標榜するための製剤処方最適化を行った。

B. 研究方法

ポルフィリン封入ポリマーミセルの調製

今回検討に用いたポルフィリンは難溶解性であることから、ブロックポリマー (PLE) を用いてミセル化する事で、実験

に用いた。ポリ乳酸 (疎水部) とポリエチレンオキサイド (親水部) からなるブロックポリマーは、環境理工学部小野先生より御供与頂いた。ブロックポリマーは以下の分子量 (Mw) と HLB 値を有するものを使用した。

今回使用した PLE の分子量並びに HLB 値

	PLE-3	PLE-2	PLE-6
PLE	14,005	3,2872	5234
ポリ乳酸部	9653	28520	882
ポリエチレンオキサイド部	4352	4352	4352
HLB 値	6.21	2.65	16.63

以下に調製方法を簡単に示す。ブロックポリマー (PLE-3, PLE-2) 並びにポルフィリンを酢酸エチルに溶解し、水溶性ブロックポリマー (PLE-6) を溶解した水と共に超音波条件下で水中油滴型エマルジョンを形成した。これを十分量の水に添加する事で、酢酸エチルを水中に溶解させ、遠心分離を数回行うことで酢酸エチルを完全に除去し、最終的にポルフィリン封入ポリマーミセルを得た。

粒子径の測定

粒子径の測定は Malvern 社の Zetasizer-Nano を用いて動的光散乱法により行った。

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

ポルフィリン封入ポリマーミセルの光照射による *in vitro* 殺細胞効果の評価は MTT assay により行った。実験は接着細胞である colon26 細胞を 96 穴プレートに播種後、24 時間後にポルフィリン封入ポリマーミセルを一定量添加し、12 時間後に光を 1 分間照射した。光照射 24 時間後における細胞生存率を求めた。

ポルフィリン封入ポリマーミセルの in vitro ポルフィリン放出特性の評価

ポルフィリン封入ポリマーミセルが in vitro 条件下において殺細胞効果を示すためのポルフィリン放出の必要性和、その放出挙動を、上述の MTT assay により検討した。ポルフィリン放出の必要性については、光照射を行う前段階において培地交換を行う群と行わない群を評価し、殺細胞効果への影響を比較することで検討を行った。ポルフィリン放出特性については、MTT assay ポルフィリン封入ポリマーミセル添加後、光照射を行うまでの時間を変化させることで、ポルフィリン放出に伴う殺細胞効果の変化を観察し、間接的にポルフィリンの放出性を評価した。

C. 研究結果

調製したポルフィリン封入エマルジョンの物性

調製したポルフィリン封入エマルジョン (PLE-3 ミセル・PLE-2 ミセル) の調製方法の概略と得られたポリマーミセルの平均粒子径を示した。

[調製方法]

PLE-3 ミセル

Porphyrin	10 mg
PLE-3	100 mg
酢酸エチル	2 ml

これら混液を

PLE-6	60 mg
精製水	4 ml

と混合し、プローブ型ソニケーターにより超音波照射 (160W、15 秒)

PLE-2 ミセル

Porphyrin	0.6 mg
PLE-2	60 mg
酢酸エチル	2 ml

これら混液を

PLE-6	200 mg
精製水	4 ml

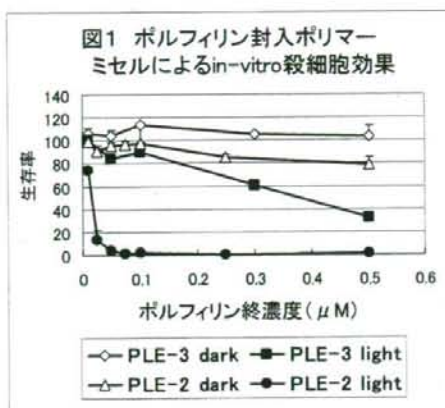
と混合し、プローブ型ソニケーターにより超音波照射 (50W、5 分)

[得られた平均粒子径]

PLE-3 : 179 nm ならびに 878 nm 付近に極大を有する多分散な粒子
PLE-2 : 83.3 nm に極大を有する単分散の粒子

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

2 種類のポリ乳酸 (PLE-3 と PLE-2) を用いて、それぞれポルフィリン封入ポリマーミセルを調製し、培養中のがん細胞に一定時間曝露した後、光照射に伴い、ミセル中あるいは放出されたポルフィリンから産生される一重項酸素に起因する殺細胞効果の検討結果 (MTT assay) を図 1 に示した。尚、ネガティブコントロールとしては細胞にメディウムのみを添加したものをを用いた。結果として、PLE-3 ミセル、PLE-2 ミセル共に、光を照射した場合の生存率が、光を照射していない群と比較して顕著に減少していた。また予備実験により、ポルフィリン非存在下の光照射による毒性は、極めて低いことも明らかとなっていることから、ポルフィリン封入ポリマーミセルが安全な製剤として利用可能であることが示唆された。



ポルフィリン封入ポリマーミセルのポルフィリン放出特性の評価

次にポルフィリン封入ポリマーミセルのポルフィリン放出と、その殺細胞効果への影響を調べた。前年度の検討においては、ポルフィリン封入ポリマーミセルはポルフィリンをほぼ放出しないモデルとして検討したものの、高い殺細胞効果が得られた為、ポリマーミセルに封入されたポルフィリンが、一重項酸素を産生して殺細胞効果を示す為には、ミセルから放出される必要があるのか、ミセル中においても作用するのかも改めて検討する必要があった。



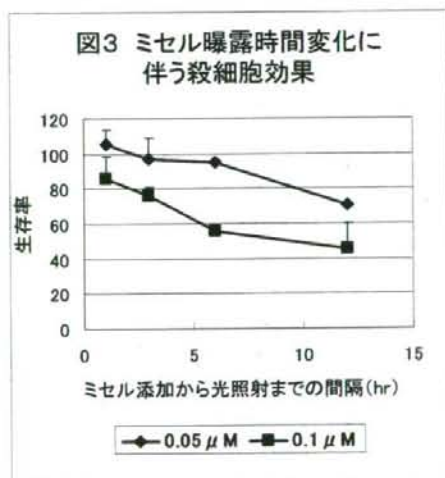
そこで、上記の MTT assay において、ポルフィリン封入ポリマーミセル (PLE-3

ミセル) を細胞に曝露後、光を照射する前の段階において、細胞培養液を交換する wash 群と、そのままの状態でも光を照射する no wash 群に分け、最終的な細胞生存率を評価した (図2)。

図2より、光照射に伴い一定の殺細胞効果を示すポルフィリン濃度範囲 (0.05-0.1 μM) において、光照射の前に細胞培養液を交換する操作 (wash) の有無は、最終的な細胞生存率に大きな影響を与えないことがわかった。

このことから、MTT assay において評価される殺細胞効果は、ポリマーミセルから放出され、細胞内に取り込まれたポルフィリンの作用によるものが主であると考えられ、MTT assay におけるポルフィリン封入ポリマーミセル添加後の細胞生存率は、その時点までのポルフィリンの放出挙動を間接的に反映しているものと考えられた。

そこで次に、ポルフィリン封入ポリマーミセルからのポルフィリン放出特性を間接的に評価する目的で、MTT assay においてポルフィリン封入ポリマーミセルの添加から光を照射するまでの時間間隔を変化させ、同様の検討を行った (図3)。



得られた結果より、ポルフィリン封入

ポリマーミセル添加から照射までの時間が長くなるにつれ、高い殺細胞効果が得られた。図1よりポリマーミセル自体の細胞への曝露は細胞生存率に大きな影響は与えられないと考えられる為、曝露時間依存的なこの殺細胞作用の増強は、ポルフィリンが経時的に放出され、細胞内へと移行したことによるものと考えられた。この事は図2において推察された、細胞内に取り込まれたポルフィリンを中心に活性を示すという考察とも合致しており、PDTでは腫瘍組織間質中において、ポルフィリンがDDS製剤から放出され、がん細胞内に取り込みを受ける必要があることが示唆された。

D. 考察

図1に示した結果より、ポリマーとして PLE-2 及び PLE-3 を用いたポルフィリン内封ポリマーミセルそれぞれについて、*in vitro* 実験において高い殺細胞効果が得られた。しかしながら、高い HLB 値を示す PLE-3 ミセルではポリマーに対して高容量のポルフィリンを内封できた一方で、照射時の殺細胞効果にロット間の大きなばらつきが認められた。この原因として、ポリマーミセル中のポルフィリンの凝集が考えられ、過剰に存在するポルフィリンが自己凝集を起こし結晶化した結果、照射に伴う一重項酸素の産生へと繋がらなかった可能性が考えられた。一方で低い HLB 値を示す PLE-2 ミセルは、ポリマーに対するポルフィリン封入量は少ないものの、より低いポルフィリン終濃度で高い殺細胞効果が得られ、かつデータにも再現性が見られた為、ポルフィリンが安定的に封入・放出されたものと考えられた。

図2の検討よりポリマーミセルから放出されたポルフィリンの内、主として作用しているのは細胞に取り込まれたポルフィリンであることが示唆された。さら

に図3に示したポルフィリン封入ポリマーミセルの細胞への曝露時間を変化させた実験では、曝露時間の延長と共に殺細胞作用が強くなることが示された。図1より、ポルフィリン封入ポリマーミセル自体の暗条件下における細胞への毒性は、図3で検討した濃度範囲において極めて小さいことが明らかとなっていることから、図3に示した結果は、ポリマーミセルから放出されたポルフィリンが経時的にがん細胞に取り込まれ、照射時点におけるポルフィリンの細胞内取り込み量に対応した一重項酸素が産生されたことを反映したものと推察された。

現在、共同研究者の小野先生のグループでは、今回我々が検討に用いた PLE-2 ミセルの処方若くは若干変更することにより、EPR 効果を介したミセルの腫瘍組織への送達効率の改善が可能となると考えられるポルフィリン封入ポリマーミセルの設計に成功している。今後はこれらの製剤を用いて *in vivo* 実験へと移行し、その体内動態特性の解析ならびに PDT による治療効果の評価へと展開する予定である。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) J. Yokoe, S. Sakuragi, K. Yamamoto, T. Teragaki, K. Ogawara, K. Higaki, N. Katayama, T. Kai, M. Sato and T. Kimura, Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats. *Int. J. Pharm.*, 353, 28-34 (2008)

2) K. Ogawara, K. Un, K. Minato, K. Tanaka, K. Higaki and T. Kimura, Determinants for in-vivo anti-tumor effects of PEG liposomal doxorubicin: Importance of vascular permeability within tumors. *Int. J. Pharm.*, 359, 234-240 (2008)

3) T. Shehata, K. Ogawara, K. Higaki and T. Kimura, Prolongation of residence time of liposome by surface modification with mixture of hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.*, 359, 272-279 (2008)

2. 学会発表

1) 大河原賢一, 運 敬太, 檜垣和孝, 木村聰城郎、P-糖タンパク質高発現がん細胞に対するドキソルビシン内封 PEG 修飾リポソームの in vivo 抗腫瘍効果とその機構解析、第 23 回日本薬剤学会、札幌、2008 年 5 月 20-22 日

2) 大河原賢一、運 敬太、中尾隆明、檜垣和孝、木村聰城郎、血管新生阻害薬のエマルジョン製剤化とその抗腫瘍効果の評価、第 24 回日本 DDS 学会、東京、2008

年 6 月 29-30 日

3) Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, Formulation and evaluation of PEGylated niosomes for targeted drug delivery. 第 24 回日本 DDS 学会、東京、2008 年 6 月 29-30 日

4) Yuta Yoshizawa, Yusuke Kono, Yoshiko Fukuoka, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, Development and evaluation of novel nanoparticle formulation of paclitaxel. 第 23 回日本薬物動態学会、熊本、2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日

5) Ryosuke Watari, Shuhei Nishiguchi, Ken-ichi Ogawara, Jun-ichi Yokoe, Kazutaka Higaki, Toshiya Kai, Makoto Sato and Toshikiro Kimura, Improvement of in-vivo disposition characteristics and anti-tumor activity of PEG liposomal doxorubicin by rHSA conjugation onto surface of liposome. 第 23 回日本薬物動態学会、熊本、2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

レチノイド化合物の合成とその活性評価

分担研究者：加来田 博貴 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 薬学系

研究要旨

本研究課題では、がん細胞の消滅を目的とする PDT 治療薬の封入を可能とするナノカプセル製剤の開発に取り組んでいる。本分担者は昨年度、PDT 治療薬に対し相乗的な薬効が期待出来る薬物創出を目的に、タモキシフェン耐性乳がん、タキソール耐性がんなどにおける治療薬ターゲットとして注目に値するレチノイド X 受容体(以降 RXR と略す)はを標的とする薬物開発を行った。その結果、新規な RXR アゴニストである NEt-3IP の開発に成功している。本年度は、本化合物の薬効について評価を行い、単独でのがん細胞増殖抑制能は弱いものの、抗炎症効果を見出した。PDT 治療薬そのものでは抗炎症効果が期待出来ないことから、NEt-3IP のこれらの薬効は、がん増殖抑制とは異なる一面で PDT 治療に資するものであると考えられる。

A. 研究目的

本分担者は、タモキシフェン耐性乳がん、タキソール耐性肺がんなどの治療薬候補として注目されているレチノイド X 受容体 (RXR)^{1,2} を分子標的とする化合物創出に興味をもち研究を進めている。RXR とは、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性の転写調節因子の一つであり、RXR α , β , γ の 3 つのサブタイプが知られている^{3,4}。RXR アゴニストは、タモキシフェン耐性乳がんやタキソール耐性肺がんに有用であるとして注目されている。しかし、代表的な RXR アゴニストである LGD1069 (1)などは、脂溶性が高く蓄積性が問題になりかねないこと、さらには RXR に知られる 3 つのサブタイプに対し選択性がないことなど、解決すべき課題が多く見られた。そのような中、本分担者は、NEt-3IP (2) と称するサブタイプ選択性のある新規な RXR アゴニスト

の創出に成功している⁵。

本プロジェクトでは、マウス結腸がん細胞 C26 細胞を用いた、ナノカプセル製剤による薬効評価を予定していることから、NEt-3IP (2) の C26 細胞に対する細胞増殖抑制作用について調べたものの、その作用は弱いものであった。しかし本化合物は、興味深いことに抗炎症作用が知られる PPAR γ 活性化能が期待出来た。PPAR γ の機能発現は RXR-PPAR γ を介するものであり、RXR アゴニスト単独で活性化されることが知られる⁶。PDT 治療薬そのものには抗炎症作用などが見られないことから、光照射治療時に生じうる炎症をすみやかに抑えられる抗炎症剤は、本プロジェクトに資する薬物になり得るのではないかと考えられた。そこで、本研究では NEt-3IP (2) の抗炎症作用について評価した。

B. 研究方法

化合物合成

各化合物の合成は、文献 5 に従い行った。

レポーター遺伝子アッセイ

開発化合物の RXR-PPAR α および RXR-PPAR γ などのヘテロダイマーに対する活性化能を評価するために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを行った^{5,6}。活性化能は、PPAR パンアゴニストである TIPP-703⁷ 1 μ M での活性化能を 1 とした。

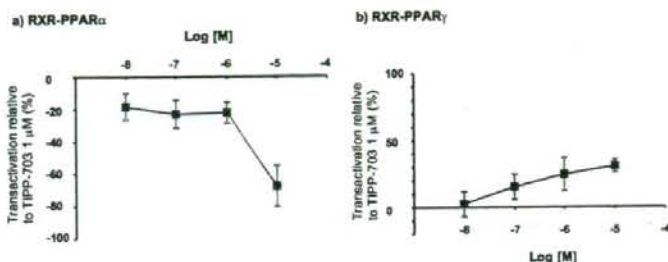


Figure 2. NEt-3IP (2) のヘテロダイマーに対する活性化能。

実験動物

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

抗炎症試験

抗炎症試験法には、マウスを用いたカラゲニン浮腫試験を用いた、マウス一群 7-8 匹に対し、1, 3, 10 mg/kg の NEt-3IP (1% エタノール, 0.5% CMC 水溶液) を 10 mL/kg で経口投与し、その 3 時間後に浮腫を発生させる物質であるカラゲニンの 1% 水溶液をマウス後肢足趾に皮下注射した (0.1 mL/匹)。その後、1, 2, 3, 4 時間後ごとに後肢足趾の体積を測定した。

C. 研究結果

RXR-PPAR ヘテロダイマーに対する活性化能

Figure 2 に、PPAR パンアゴニストである TIPP-703 1 μ M での活性化能を 1 とした結果を示す。興味深いことに、本化合物は、

高脂血症治療薬の分子標的として知られる PPAR α に対する活性化能はなかったものの、抗炎症作用の期待できる PPAR γ に対する活性能が認められた。

カラゲニン足浮腫試験

結果を Figure 3 に示す。顕著な抗炎症剤であるステロイド剤のプレドニゾロンの抗炎症作用が 10 mg/kg では見られないことから、本化合物の抗炎症作用は極めて強力と思われる。

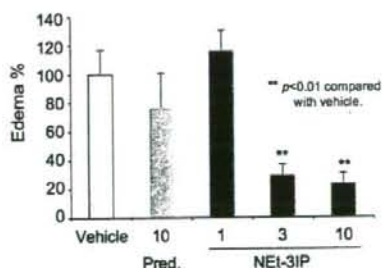


Figure 3. NEt-3IP (2) のカラゲニン足浮腫抑制作用。Pred. = prednisolone

D. 考察

本分担者の開発した新規 RXR アゴニストは RXR α/β に対する選択性のある新規化合物である。本化合物についてヘテロダイマーアッセイにより抗炎症効果の期待出来る PPAR γ 活性化能が確認された。さら

に顕著な抗炎症効果が認められた。本プロジェクトで用いる PDT 治療薬そのものには抗炎症作用がないことから、本化合物は、PDT 治療を炎症抑制と言う観点で資する薬物として興味が持たれる。

E. 結論

本研究では、脂溶性ポルフィリンを効率的に内封した微粒子製剤に対し併用することで、その抗腫瘍活性の増強しうる薬物創出を考え、レチノイド化合物の創出をすすめていた。しかし開発したレチノイドである RXR アゴニスト NEt-3IP のマウス結腸がん細胞 C26 細胞に対するその細胞増殖抑制作用は弱かった。ところが、本研究により顕著な抗炎症作用が認められた。PDT 治療薬そのものは抗炎症作用がないこと、また PDT 治療薬による殺細胞作用に伴う炎症の可能性などを鑑みると、本化合物の抗炎症作用は、PDT 治療に資する薬物として興味が持たれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

PCT/JP2008/53240

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

<参考文献>

- 1) C. J. Grubbs, D. L. Hill, K. I. Bland, S. W. Beenken, T. H. Lin, I. Eto, V. R. Atigadda, K. K. Vines, W. J. Brouillette, D. D. Muccio, *Cancer Lett.* 201, 17-24, (2003).
- 2) W-C. Yen, M. R. Corpuz, R. Y. Prudente, T. A. Cooke, R. P. Bissonnette, A. Negro-Vilar, W. W. Lamph, *Clin. Cancer Res.* 10, 8656-8664, (2004).
- 3) V. Giguere, *Endocr. Rev.* 20, 689-725, (1999).
- 4) D. J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, R. M. Evans, *Cell* 83, 835-839, (1995).
- 5) K. Takamatsu, A. Takano, N. Yakushiji, K. Morishita, N. Matsuura, M. Makishima, A. Tai, K. Sasaki, and H. Kakuta, *ChemMedChem*, 3, 780-787, (2008).
- 6) T. Nishimaki-Mogami, N. Tamehiro, Y. Sato, K. Okuhira, K. Sai, H. Kagechika, K. Shudo, S. Abe-Dohmae, S. Yokoyama, Y. Ohno, K. Inoue, and J. Sawada, *Biochem. Pharm.* 76, 1006-1013, (2008).
- 7) Kasuga J, Oyama T, Hirakawa Y, Makishima M, Morikawa K, Hashimoto Y, Miyachi H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 4525-8, (2008).