

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍名 (編集者名)	出版社	頁 (出版年)
川西 徹	バイオ医薬品における規格接点・試験法の考え方	分析法バリデーション実例集	情報機構	409-418 (2008)
川西 徹	ICH ガイドライン	医薬品のグローバル化とGMP (浅越正監修)	シーエムシー出版	292-302 (2008)

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号、頁	出版年
Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Masashi Hyuga	Current Status of Therapeutic Angiogenesis with Protein Gene and Cell Therapy.	Current Drug Therapy		印刷中
Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, T.	The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals.	Biol. Pharm. Bull.		印刷中
Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Harazono, A., Takakura, D., Yamaguchi, T.	Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products.	Trends in Glycosci. Glycotech.	20, 97-116.	2008
山口照英、石井明子	早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保	臨床評価		印刷中
川崎ナナ、石井明子、山口照英	糖鎖と生物薬品	Journal Applied Glycoscience		印刷中
新見伸吾、原島 瑞、日向昌司、山口照英、早川堯夫	癌に対する抗血管新生療法の現状と展望(その2)	医薬品研究	39(6), 359-387	2008
原園 景、川崎ナナ、伊藤さつき、小林 哲、石川リカ、高井俊紀、古賀明子、岡本寿美子、山口秀人、濱詰康樹、佐藤貴之、窪田雅之、掛樋一見、木下充弘、島 圭介、山田真希、山口照英	質量分析法を用いたペプチド及びタンパク質性医薬品の確認試験法に関する研究	医薬品研究	39(10), 627-646	2008

橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 靄島由二, 品川麻衣, 榛葉信久, 宮田一義, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田 光, 木下充弘, 掛樋一晃, 合田幸広, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英	ヘパリン純度試験に関する研究(第 1報) 1H-NMRによるヘパリンナト リウム純度試験に関する研究.	医薬品研究	39, 651-659	2008
橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 福原 潔, 品川麻衣, 榛葉信久, 有村雅敏, 辰巳昌史, 奥田晴宏, 山口照英	ヘパリン純度試験に関する研究(第 2報) 1H-NMRによるヘパリンカル シウム純度試験に関する研究	医薬品研究	39, 660-664	2008
掛樋一晃, 木下充弘, 橋井則貴, 川崎ナナ, 寺尾敏光, 河合健蔵, 余田 光, 山口照英	ヘパリンナトリウム純度試験に関 する研究(第3報) キャピラリー電 気泳動法によるヘパリンナトリウ ム不純物の分析.	医薬品研究	39(11) 713-720	2008
川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 秦 艶, 細山沙織, 戸 井田敏彦, 山口照英	ヘパリン純度試験に関する研究(4) 合成過硫酸化コンドロイチン硫酸 の日局標準品としての適用性の評 価.	医薬品研究	39(11) 721-729	2008
川西 徹	抗体医薬の現状と展望	日薬理誌	131, 102-108	2008
川西 徹	小児における抗サイトカイン薬の 功罪	Progress in Medicine	28, 1709-171 3	2008
川崎ナナ	ヘパリン問題と日局一部改正	ファルマシア	44, 1167- 1171	2008
川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英	糖鎖異常の網羅的解析	蛋白質核酸酵 素増刊号「糖 鎖情報の独自 性と普遍性.	53, 1690-169 6	2008
山口照英, 石井明子	細胞・組織加工医薬品の品質と安全 性確保への提言	PHARMAST AGE	7, 1-6,	2008
川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹	薬の名前 ステムを知らば薬がわ かる 第21回	Pharm Tech Japan	24(4), 101-106	2008
内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹	薬の名前 ステムを知らば薬がわ かる 第24回	Pharm Tech Japan	24(8), 103-109	2008
蜂須賀暁子, 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹	薬の名前 ステムを知らば薬がわ かる 第28回	Pharm Tech Japan	24(12), 105-113	2008

## Glass-State Amorphous Salt Solids Formed by Freeze-Drying of Amines and Hydroxy Carboxylic Acids: Effect of Hydrogen-Bonding and Electrostatic Interactions

Saori KADOYA,<sup>a</sup> Ken-ichi IZUTSU,\*<sup>b</sup> Etsuo YONEMOCHI,<sup>a</sup> Katsuhide TERADA,<sup>a</sup> Chikako YOMOTA,<sup>b</sup> and Toru KAWANISHI<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University; 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan; and

<sup>b</sup> National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan.

Received February 6, 2008; accepted April 4, 2008; published online April 7, 2008

We studied effect of molecular interactions on the physical properties of binary freeze-dried solids and frozen aqueous solutions using model chemicals containing various functional groups (amino, carboxyl, hydroxyl). Thermal analysis of frozen solutions containing alkyl diamines and hydroxy di- or tricarboxylic acids showed thermal transitions ( $T_g'$ : glass transition of maximally freeze-concentrated phase) at temperatures higher than those of the individual solutes. A binary frozen solution containing 80 mM 1,3-diamino-2-hydroxypropane (single-solute  $T_g' < -60^\circ\text{C}$ ) and 120 mM citric acid (single-solute  $T_g' : -55.0^\circ\text{C}$ ) made the transition at  $-30.8^\circ\text{C}$ . The molecular weight of the solutes had smaller effects on the transition temperatures of the frozen mixture component solutions. Lyophilization of some high  $T_g'$  mixture frozen solutions (e.g., 1,3-diamino-2-hydroxypropane and citric acid) resulted in cake-structure amorphous solids with glass transition temperatures ( $T_g$ ) higher than those of the individual components. Networking of intense hydrogen-bondings and electrostatic interactions between the heterogeneous molecules through the multiple functional groups was suggested to reduce the component mobility in the amorphous freeze-concentrated phase and the freeze-dried solids. Controlling the interactions should be a key to optimizing the physical properties of multi-component amorphous freeze-dried pharmaceutical formulations.

**Key words** freeze-drying; glass solid; thermal analysis; molecular interaction; salt

Glass-state amorphous solids are applied to pharmaceutical formulations as a way to improve dissolution of hydrophobic active ingredients (APIs) or to ensure stability of embedded biomacromolecules (e.g., recombinant proteins) and drug delivery system (DDS) carriers (e.g., liposome).<sup>1–3</sup> Freeze-drying is often a preferable method over other procedures (e.g., quench-cooling of heat-melt solids) for the large-scale production of glass-state solid formulations containing thermally unstable ingredients. Dispersion of drug molecules into nonionic excipient matrices (e.g., trehalose, polyvinylpyrrolidone (PVP)) is a popular way to make the non-crystalline formulations of many APIs that have intrinsic propensity for crystallization or low glass transition temperatures ( $T_g$ ).<sup>1</sup> Insufficient miscibility with certain drug molecules and poor storage stability, however, often hinders the development of solid dispersion formulations using the non-ionic matrices.

The application of salts or binary complexes is another approach to obtain stable amorphous solids.<sup>4</sup> For example, freeze-drying of sodium indomethacin results in an amorphous solid that has a glass transition temperature ( $120^\circ\text{C}$ ) significantly higher than that of the free acid molecules ( $45^\circ\text{C}$ ).<sup>4,5</sup> Recent studies indicated that the glass-state solids composed of excipient salts or salt-forming excipient combinations are promising as dispersion matrices.<sup>6,7</sup> Some pH-adjusting buffer salts (e.g., monosodium citrate) form high  $T_g$  amorphous solids applicable to protein formulations.<sup>7</sup> Co-lyophilization of some basic amino acids (e.g., L-arginine, L-lysine, L-histidine) with multivalent inorganic acids (e.g., phosphoric acid) also results in the formation of protein-stabilizing glass-state solids.<sup>6</sup> High transition temperatures of the mixture freeze-dried solids suggest the contribution of

strong intermolecular or inter-ion interactions to reducing the heterogeneous component mobility.

In contrast to the extensive studies on the physical properties and local structure of amorphous glass- or rubber-state solids composed of nonionic small molecules (e.g., sucrose, sorbitol) or polymers (e.g., PVP),<sup>3</sup> mechanisms that determine character of organic salts and/or heterogeneous components have not been well elucidated.<sup>1,3</sup> Recent intensive studies on ionic liquids (RTMS: room temperature molten salts) provided valuable information regarding the component ion structures, participating interactions, and the physical properties of the microscopically unordered non-crystalline salt systems.<sup>8</sup> Some earlier studies indicated feasibility to control the physical property of the amorphous salt solids by optimizing the component structure (e.g., ion radius in indomethacin alkali metal salts)<sup>4</sup> and their compositions that determine the intermolecular and/or inter-ion interactions.

The purpose of this study was to elucidate the contribution of functional groups and the size of consisting molecules to the physical properties of multi-component frozen aqueous solutions and their freeze-dried solids. Thermal analysis of various combinations of model chemicals containing amino, carboxyl, and/or hydroxyl groups was performed to obtain the thermal transition temperatures ( $T_g$ ,  $T_g'$ : glass transition temperature of maximally freeze-concentrated phase) and propensity for crystallization in the frozen solutions and freeze-dried solids. Mid- and near-infrared analysis was performed to elucidate the molecular interaction in the freeze-dried solids. We also discuss the application of the amorphous mixture solids to pharmaceutical formulations.

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: izutsu@nihs.go.jp

### Experimental

**Materials** 1,3-Diaminopropane was purchased from Kanto Kagaku Kogyo Co. (Tokyo, Japan). 1,3-Diamino-2-hydroxypropane was the product of Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, U.S.A.). Tricarballic acid was obtained from Alfa Aesar GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany). DL-Malic acid, D-(+)-malic acid, glycolic acid, L-(+)-tartaric acid, glutaric acid, adipic acid, DL-lactic acid (2-hydroxypropanoic acid), 1-aminopropane (propylamine), 1,4-diaminobutane, 1,6-diaminohexane, 1,8-diaminooctane, and other reagents were of analytical grade obtained from Wako Pure Chemical Industries Co. (Osaka, Japan).

**Thermal Analysis** Thermal analysis of frozen solutions and freeze-dried solids was conducted with a differential scanning calorimeter (DSC Q-10, TA Instruments, New Castle, DE, U.S.A.) with Universal Analysis 2000 software (TA Instruments). An aliquot (10  $\mu$ l) of aqueous solution in an aluminum cell was cooled to  $-70^\circ\text{C}$  at  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  and then scanned at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . Freeze-dried solids (1–2 mg) in hermetic aluminum cells were scanned from  $-30^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  under nitrogen flow. Physical mixtures containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane and citric acid (1.5–2.5 mg) in aluminum cells were melted at  $165^\circ\text{C}$  for 3 min and then cooled rapidly by immersion in liquid nitrogen to prepare quench-cooled melt solids. The cells were transferred to the furnace of the calorimeter at  $15^\circ\text{C}$  and then scanned from  $-50^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  to obtain the glass transition temperatures. Glass transition temperatures were determined as the maximum inflection point of the discontinuities in the heat flow curves.

**Freeze-Drying** A freeze-drier (Freezone-6, Labconco, Kansas City, MO, U.S.A.) equipped with temperature-controlling trays was used for lyophilization. Aqueous solutions containing the solutes (total 200 mM, 300  $\mu$ l) in flat-bottom glass vials (13 mm diameter) were placed on the shelf of the freeze-drier at room temperature. The shelf was cooled to  $-40^\circ\text{C}$  at  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  and then maintained at that temperature for 2 h before drying. The frozen solutions were dried under vacuum (21 mTorr) maintaining the shelf temperature at  $-40^\circ\text{C}$  for 15 h,  $-30^\circ\text{C}$  for 6 h, and  $35^\circ\text{C}$  for 6 h. The shelf was heated at  $0.2^\circ\text{C}/\text{min}$  between the drying steps. The vials were closed with rubber stoppers under the vacuum. Solids for near-infrared analysis were prepared by freeze-drying the aqueous solutions (1 ml) in larger vials (18 mm diameter).

**Mid- and Near-Infrared Spectroscopy (IR, NIR)** An FT-IR spectrophotometer (MB104, ABB Bomen, Quebec, Canada) and GRAMS/32 software (Galactic Ind. Co., Salem, NH, U.S.A.) were used to obtain mid-infrared spectra of the solids (approx. 1 mg sample solid) in a pressed potassium bromide disk (approx. 250 mg). Transition spectra of the sample disks were obtained at  $4\text{ cm}^{-1}$  resolution in 128 scans. Near-infrared spectroscopy was performed by using a Bruker MPA system with a diffuse-reflectance integrating-sphere probe (PbS detector) and OPUS software (Erlangen, Germany). Near-infrared light was directed upward from the bottom of the glass vials containing freeze-dried solids to obtain the reflected signal over a range of  $4000\text{--}12000\text{ cm}^{-1}$  with a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  in 128 scans.

**Powder X-Ray Diffraction (XRD) and Residual Water Content Measurement** The powder X-ray diffraction patterns were measured at room temperature with a Rint-Altima diffractometer (Rigaku, Tokyo, Japan) with  $\text{CuK}\alpha$  radiation at  $40\text{ kV}/40\text{ mA}$ . The samples were scanned in the area of  $5^\circ < 2\theta < 35^\circ$  at an angle speed of  $5^\circ/\text{min}$ . An Aqv-6 volumetric titrator (Hiranuma Sangyo, Ibaraki, Japan) was used to determine the amount of water in the freeze-dried solids suspended in dehydrated methanol by the Karl-Fischer method.

### Results

Figure 1 shows thermograms of frozen aqueous solutions containing a carboxylic acid and an amide (200 mM). The structure of the chemicals used in this study and their physical properties in the frozen solutions obtained by thermal analysis are summarized in Table 1. Some solutes showed intrinsic propensities to crystallize in the freeze-concentrated phases. An endotherm ( $-15.8^\circ\text{C}$ ) in a frozen malonic acid solution suggested melting of the eutectic crystal. The exotherm ( $-53.1^\circ\text{C}$ ) and endotherm ( $-19.3^\circ\text{C}$ ) peaks

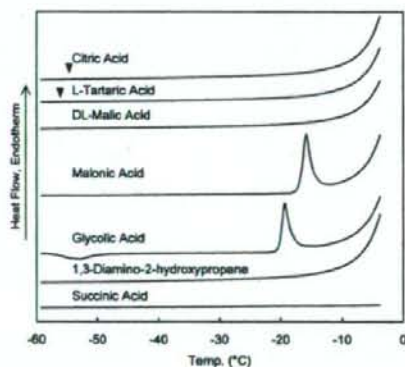


Fig. 1. Thermograms of Frozen Solutions Containing a Carboxylic Acid or an Amine (200 mM)

Aliquots (10  $\mu$ l) of solutions in hermetic aluminum cells were scanned from  $-70^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . Arrowheads denote the glass transition of maximally freeze-concentrated solutes ( $T_g'$ ).

Table 1. Structure and Thermal Property of Carboxylic Acids and Amines in Frozen Aqueous Solutions Obtained by Thermal Analysis

MW	Functional groups			Property in frozen solutions	
	COOH	OH	NH <sub>2</sub>	Crystallinity	Thermogram
Acetic acid	60.1	1	0	Crystallized	Endotherm
Glycolic acid	76.1	1	0	Crystallized	Exotherm/endotherm
DL-Lactic acid	90.1	1	0	Amorphous	$T_g' < -60^\circ\text{C}$
Malonic acid	104.1	2	0	Crystallized	Endotherm
Succinic acid	118.1	2	0	Crystallized	Flat
Glutaric acid	132.1	2	0	Crystallized	Flat
Adipic acid	146.1	2	0	Crystallized	Exotherm
FimERIC acid	160.2	2	0	Crystallized	Flat
L-Malic acid	134.1	2	1	Amorphous	$T_g' < -60^\circ\text{C}$
L-Tartaric acid	150.1	2	2	Amorphous	$T_g': -57.1^\circ\text{C}$
Tricarballic acid	176.1	3	0	Amorphous	$T_g': -52.1^\circ\text{C}$
Citric acid	192.1	3	1	Amorphous	$T_g': -55.1^\circ\text{C}$
1-Aminopropane	59.1	0	1	Crystallized	Endotherm
3-Amino-1-propanol	75.1	0	1	Amorphous	$T_g' < -60^\circ\text{C}$
1,3-Diaminopropane	74.1	0	2	Amorphous	$T_g' < -60^\circ\text{C}$
1,4-Diaminobutane	88.2	0	2	Crystallized	Endotherm
1,6-Diaminohexane	116.2	0	2	Crystallized	Endotherm
1,8-Diaminooctane	144.3	0	2	Crystallized	Flat
1,3-Diamino-2-hydroxypropane	90.1	0	2	Amorphous	$T_g' < -60^\circ\text{C}$

observed in a heating scan of a frozen glycolic acid solution indicated eutectic crystallization and subsequent melting, respectively. The flat thermogram of a frozen succinic acid solution up to the ice-melting temperature suggested crystallized solutes. Some of these frozen solutions showed an exotherm that indicated eutectic crystallization in the cooling process before the thermal scan (data not shown). L-Tartaric acid and citric acid remained amorphous in the freeze-concentrated phase, presenting glass transition of the maximally freeze-concentrated solute phase ( $T_g'$ ) at  $-55.1^\circ\text{C}$  and  $-57.1^\circ\text{C}$ , respectively.<sup>7)</sup> The absence of particular thermal transitions and the gradual shift of the thermogram in some other single-solute frozen solutions (e.g., DL-malic acid, 1,3-diamino-2-hydroxypropane) suggested that  $T_g'$  transition of the amorphous concentrated phase occurred at temperatures below the measurement temperature range ( $< -60^\circ\text{C}$ ).

Figures 2 and 3 show  $T_g'$  of frozen binary solutions containing various diamines and L-tartaric acid or citric acid. Most of the solute combinations showed a bell-shaped profile of  $T_g'$  that depended largely on the number of functional groups in the amines. Frozen mixture solutions containing amines and citric acid showed the  $T_g'$  peaks at lower acid molar ratios than in the combination with L-tartaric acid. Transition temperatures ( $T_g'$ ) of frozen solutions containing the acids and various diamines were significantly higher than those of the mixtures with monoamines (e.g., 1-amino-propane). Slightly higher transition temperatures of the frozen solutions containing citric acid and 1,8-diaminooctane compared to those with smaller alkyldiamines (e.g., 1,3-diaminopropane) indicated a relatively small effect of the component molecular size on the  $T_g'$  of the mixture phases. Introduction of hydroxyl groups to a diamine (e.g., 1,3-diamino-2-hydroxypropane to 1,3-diamino-2-hydroxypropane) raised the  $T_g'$  of the frozen mixture solutions to some extent. Mixing with L-tartaric acid or citric acid prevented crystallization of some amines (e.g., 1,4-diaminobutane) in the frozen solutions. In contrast, some frozen mixture solutions showed thermal peaks that suggested crystallization of the salts. For example, a frozen solution containing 60 mM diaminooctane and 140 mM L-tartaric acid showed a  $T_g'$  ( $-32.7^\circ\text{C}$ ) and a eutectic crystallization exotherm peak ( $-19.9^\circ\text{C}$ ) in a thermal scan (data not shown).

Mixing of 1,3-diamino-2-hydroxypropane and some carboxylic acids (e.g., succinic acid) also induced a significant upward shift of the  $T_g'$  (Fig. 4). The transition temperatures depended largely on the compositions of the carboxyl and hydroxyl groups in the acids. Most of the frozen mixture solutions showed the highest  $T_g'$  at the solute concentration ratios relatively rich in carboxylic acid. Alkyl chain length of the dicarboxylic acids gave limited effects on the  $T_g'$  of the mixture frozen solutions. DL-Malic acid and D-malic acid presented virtually identical  $T_g'$  profiles of the mixture frozen solutions. Mixing with 1,3-diamino-2-hydroxypropane prevented crystallization of some dicarboxylic acids (e.g., malonic acid, pimeric acid) in the frozen solutions (data not shown). High  $T_g'$  of the frozen solutions containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane and the hydroxy carboxylic acids (DL-malic acid, L-tartaric acid, citric acid) indicated a large effect of the hydroxyl group in reducing the component mobility in the freeze-concentrated phase. Frozen solutions containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane and acetic acid or

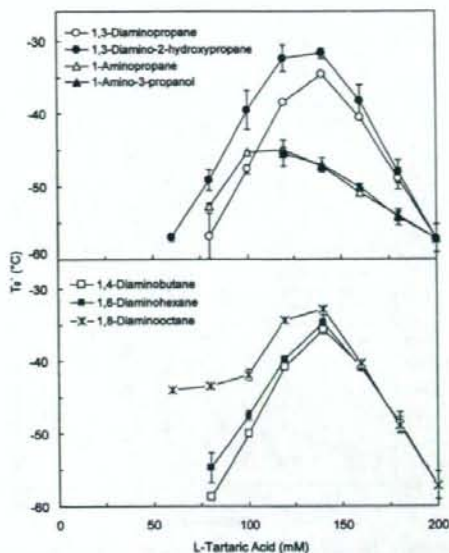


Fig. 2. Glass Transition Temperatures of the Maximally Freeze-Concentrated Phase ( $T_g'$ ) of Frozen Aqueous Solutions Containing L-Tartaric Acid and Various Amines

Frozen solutions (10  $\mu\text{l}$ , 200 mM total) were scanned from  $-70^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  ( $n=3$ ).

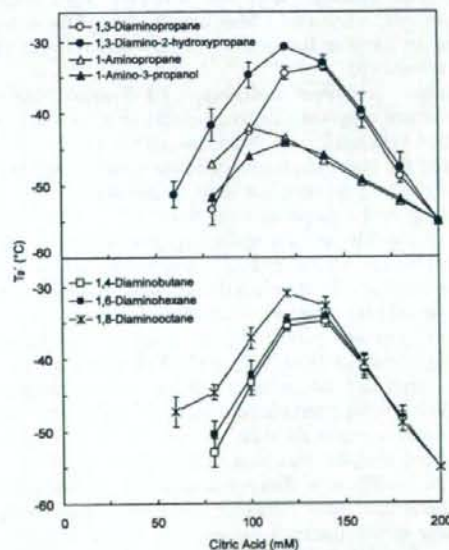


Fig. 3. Glass Transition Temperatures of the Maximally Freeze-Concentrated Phase ( $T_g'$ ) of Frozen Aqueous Solutions Containing Citric Acid and Various Amines

Frozen solutions (10  $\mu\text{l}$ , 200 mM total) were scanned from  $-70^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  (average  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ).

glycolic acid showed a gradual shift of the thermograms that suggested an amorphous mixture freeze-concentrated phase with  $T_g'$  below the measurement temperature range ( $< -60^\circ\text{C}$ ) (data not shown). The absence of apparent thermal transitions in frozen solutions containing some dicarboxylic

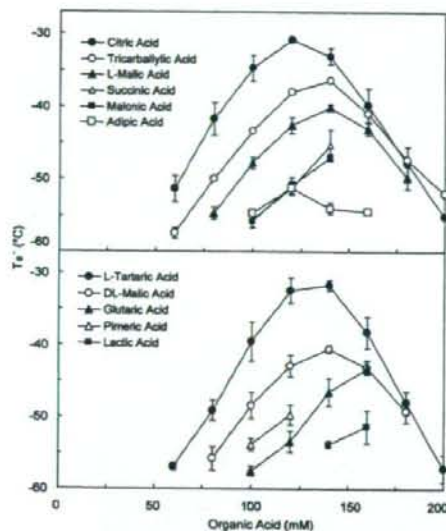


Fig. 4. Glass Transition Temperatures of the Maximally Freeze-Concentrated Phase ( $T_g$ ) of Frozen Aqueous Solutions Containing 1,3-Diamino-2-hydroxypropane and Various Carboxylic Acids

Frozen solutions (10  $\mu$ l, 200 mM total) were scanned from  $-70^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  (average  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ).

acids (e.g., succinic acid) and diamines (e.g., diamino-propane) also suggested a large contribution of the hydroxyl groups to forming the high  $T_g$  freeze-concentrated phase (data not shown).

Aqueous solutions containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane and a hydroxy carboxylic acid (e.g., DL-malic acid, L-tartaric acid, citric acid, 200 mM total) were freeze-dried to examine the physical properties of the resulting solids. The primary drying process at a shelf temperature ( $-40^\circ\text{C}$ ) induced physical collapse in some lower  $T_g$  ( $<-40^\circ\text{C}$ ) samples, presumably because of the large molecular mobility of the freeze-concentrated phase.<sup>9</sup> Other frozen solutions were freeze-dried as cake-structure solids. Thermal analysis of the freeze-dried cake-structure mixture solids showed glass transitions ( $T_g$ ) as high as  $60.2^\circ\text{C}$  (Fig. 5, 120 mM 1,3-diamino-2-hydroxypropane, 80 mM citric acid). The solids freeze-dried from solutions containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane and citric acid or L-tartaric acid at a 1:1 molar ratio showed amorphous components (halo patterns in the powder X-ray diffraction analysis) that have relatively high residual water (approx. 7–9%, w/w, data not shown). Amorphous solids of pure citric acid and 1,3-diamino-2-hydroxypropane were not available in the freeze-drying because of the physical collapse and crystallization that occurred during the process.

Quench-cooled heat-melt mixture solids containing 1,3-diamino-2-hydroxypropane and citric acid also showed a mixing-induced upward shift of the glass transition temperatures (Fig. 6). The highest transition temperature ( $54.5^\circ\text{C}$ ) of the 0.4 citric acid molar fraction was slightly lower than that of the freeze-dried solid. Citric acid showed the glass transition of the quench-cooled solid at  $9.5^\circ\text{C}$ .<sup>10–12</sup> The  $T_g$  of amorphous 1,3-diamino-2-hydroxypropane was not available using this method, and its low melting temperature (approx.  $40$ – $44^\circ\text{C}$ ) strongly suggested a  $T_g$  below  $0^\circ\text{C}$  (data not

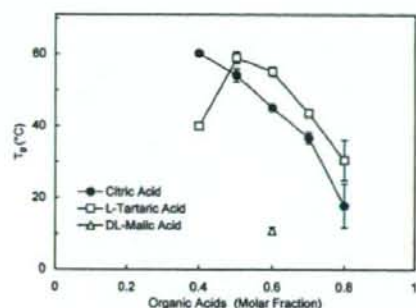


Fig. 5. Glass Transition Temperatures ( $T_g$ ) of Freeze-Dried Solids Containing 1,3-Diamino-2-hydroxypropane and Organic Acids

The solids (1–2 mg) obtained by freeze-drying of aqueous solutions (200 mM total) were scanned from  $-30^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  (average  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ).

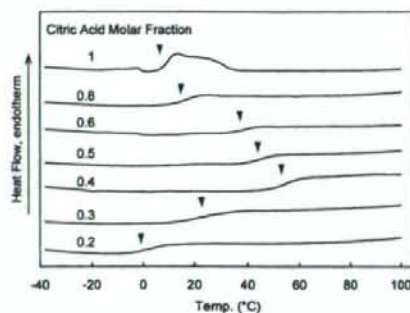


Fig. 6. Thermograms of Quench-Cooled Melt Mixture Solids Containing 1,3-Diamino-2-hydroxypropane and Citric Acid

The solids (1.5–2.5 mg) obtained by immersion of the heat-melt into liquid nitrogen were scanned from  $-30^\circ\text{C}$  at  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ .

shown).

Mid-infrared analysis (FT-IR, KBr tablet transmission) of the amorphous mixture solids (0.5 citric acid molar fraction) prepared by freeze-drying and quench-cooling showed broad absorption bands (Fig. 7). Some relatively weak bands (e.g.,  $1568\text{ cm}^{-1}$ ) in the quench-cooled solid suggested evaporation of 1,3-diamino-2-hydroxypropane in the heating process. Non-destructive diffuse-reflection near-infrared (NIR) analysis of the freeze-dried mixture solids also showed broad bands typical for the amorphous solids (Fig. 8). Absence of some bands (e.g. N–H stretch 1st overtone of amino group at  $6519\text{ cm}^{-1}$ )<sup>13</sup> in the co-lyophilized solid (0.5 citric acid molar fraction) strongly suggested the interaction between the heterogeneous components that altered environment around the functional groups.

## Discussion

Mixing of the alkyl diamines and hydroxy di- or tri-carboxylic acids induced high transition temperature amorphous concentrated phases in frozen aqueous solutions.<sup>14</sup> Some of the solute combinations formed cake-structure glass-state amorphous solids during freeze-drying. The high transition temperatures ( $T_g'$  and  $T_g$ ) should allow faster drying processes at higher product temperature without physical collapse or shrinking of the solids.<sup>9,15–17</sup> Primary drying should

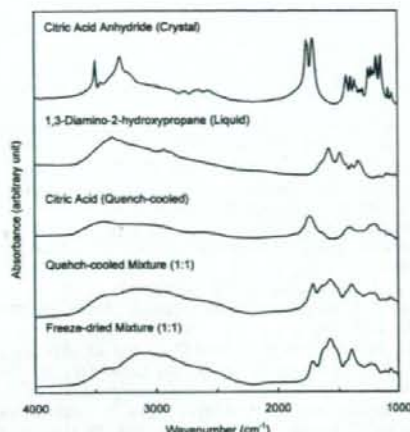


Fig. 7. FT-IR Spectra of Solids Containing 1,3-Diamino-2-hydroxypropane and Citric Acid

The mixture solids were obtained by quench-cooling of a melt (1:1 molar ratio, 165 °C, 3 min) or by freeze-drying of a solution (100 mM each).

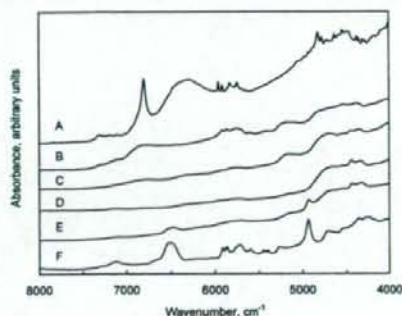


Fig. 8. Diffuse-Reflection Near-Infrared Spectra of Samples Containing 1,3-Diamino-2-hydroxypropane and Citric Acid

Each line denotes spectrum of anhydrous citric acid crystal powder (A), quench-cooled anhydrous citric acid melt (B), 1,3-diamino-2-hydroxypropane liquid (F), and solid lyophilized at the citric acid molar fraction of 0.3 (C), 0.5 (D), 0.7 (E).

be conducted below the collapse temperature of the system ( $T_c$ ), usually adjacent to and/or several degrees higher than the  $T_g'$ , to obtain the pharmaceutically acceptable cake-structure solids. The primary drying is usually conducted at above  $-40^\circ\text{C}$  to accomplish ice sublimation on a practical timescale. Exposure of the partially dried solids above their glass transition temperature in the secondary drying process may shrink the cakes.

The bell-shaped profiles of the transition temperatures ( $T_g'$ ,  $T_g$ ) depending on the component concentration ratio suggested strong attractive interaction between the components in the amorphous freeze-concentrated phase and the freeze-dried solids. Ideal mixing of nonionic molecules without particular attractive or repulsive interactions resulted in their glass transition at temperatures between those of the individual components, following the Gordon-Taylor equation.<sup>11,18–20</sup> It is also empirically known that frozen solutions containing the nonionic solute combinations have their thermal transition at temperatures ( $T_g'$ ) between those of individ-

ual solutes.<sup>21,22</sup> Significant upward deviation of the transition temperatures from those in the equation indicated the strong attractive interaction between the heterogeneous components. The mixing-induced transition temperature shift is also described as increasing "effective molecular weights" because many nonionic molecules (e.g., polyols, saccharides) have the thermal transitions of the amorphous solids ( $T_g$ ) or frozen solutions ( $T_g'$ ) at higher temperatures upon increasing the molecular weights.<sup>23,24</sup>

Networking of intense electrostatic interactions and hydrogen-bondings between the multiple functional groups should be a primary mechanism that raises the transition temperatures of the freeze-concentrated solute mixture phase and the freeze-dried solids.<sup>4,6,25</sup> The alkyl diamines and hydroxy di- or tri-carboxylic acids form ion pairs in aqueous solutions, and possibly in the freeze-concentrated phase. Some protonated polyamines selectively and strongly interact with particular dicarboxylates in aqueous solutions.<sup>26</sup> The ammonium carbohydrate ion pairs form multiple hydrogen-bonding in some non-polar solvents.<sup>27,28</sup> Continuous network of electrostatic interactions and hydrogen-bonding make the salt crystals popular supermolecular building blocks.<sup>29</sup> The differently protonated carboxyl and carboxylate groups also form an intermolecular hydrogen-bonding anion network.<sup>30</sup> It is plausible that the multi-component interactions contribute to the high transition temperature of the amorphous freeze-concentrated phase ( $T_g'$ ) and the freeze-dried solids ( $T_g$ ). The eutectic crystallization observed in some high  $T_g'$  frozen solutions (e.g., 60 mM diaminoethane and 140 mM L-tartaric acid) suggested effective interactions that induce the spatial ordering of the salt components above the transition temperature. Introduction of the hydroxyl groups to the components should provide additional hydrogen bonding in the amorphous phases. The limited effect of the component size on the transition temperatures also supported the significance of the interaction networks in determining physical properties.<sup>23</sup> Various factors, including the component structures, molar ratios, and water contents should alter the contribution of hydrogen-bonding and electrostatic (e.g., ion-ion, ion-dipole, dipole-dipole) interactions in the amorphous phases. Further information on the interactions remains to be elucidated by other analytical methods (e.g., solid-state NMR).

Recent studies on ionic liquids (RTMS: room temperature molten salt) also indicated the significant contribution of intermolecular (inter-ion) interactions to determining the physical properties of the locally disordered liquid or amorphous solid systems.<sup>31,32</sup> Factors that provide weak interaction between the molecules and/or ions (e.g., size, charge distribution, functional groups) should induce low glass transition temperatures and low viscosities relevant to ionic liquids.<sup>8</sup> In contrast, glass-state solids would be designed by introducing strong interactions between the heterogeneous components.

The glass-state multi-component amorphous solids should be applicable in pharmaceutical formulations in several ways. Certain excipient mixture glass solids would become molecular dispersion matrices that enable rapid dissolution of active ingredients or stabilization of biomacromolecules.<sup>6</sup> Some basic amino acids (e.g., L-arginine) would be practical choices to form the glass-state mixture solids applicable in pharmaceutical formulations. The weakly acidic to alkaline pH of the high  $T_g$  mixtures and their re-hydrated solutions

would be preferable to ensure the storage stability of embedded molecules, as well as to reduce local stimulation in the site of parenteral application. Some pharmaceutically active ingredients (APIs) that have multiple amino or carboxyl groups may also form glass-state solids by direct interactions in mixing with some excipients.

#### References

- Hancock B. C., Zografi G., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1—12 (1997).
- Yu L., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **48**, 27—42 (2001).
- Hilden L. R., Morris K. R., *J. Pharm. Sci.*, **93**, 3—12 (2004).
- Tong P., Taylor L. S., Zografi G., *Pharm. Res.*, **19**, 649—654 (2002).
- Tong P., Zografi G., *Pharm. Res.*, **16**, 1186—1192 (1999).
- Izutsu K., Fujimaki Y., Kuwabara A., Aoyagi N., *Int. J. Pharm.*, **301**, 161—169 (2005).
- Shalaev E. Y., Johnson-Elton T. D., Chang L., Pikal M. J., *Pharm. Res.*, **19**, 195—201 (2002).
- Ohno H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **79**, 1665—1680 (2006).
- Nail S. L., Jiang S., Chongprasert S., Knopp S. A., *Pharm. Biotechnol.*, **14**, 281—360 (2002).
- Lu Q., Zografi G., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1374—1378 (1997).
- Summers M. P., *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1606—1610 (1978).
- Timko R. J., Lordi N. G., *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1185—1186 (1982).
- Shenk J. S., Workman J. J., Jr., Westerhaus M. O., "Handbook of Near-Infrared Analysis," ed. by Burns D. A., Ciurczak E. W., Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 419—474.
- Akers M. J., Milton N., Byrn S. R., Nail S. L., *Pharm. Res.*, **12**, 1457—1461 (1995).
- MacKenzie A. P., *Bull. Parenter. Drug Assoc.*, **20**, 101—130 (1966).
- Tang X., Pikal M. J., *Pharm. Res.*, **21**, 191—200 (2004).
- Akers M. J., Vasudevan V., Stickelmeyer M., *Pharm. Biotechnol.*, **14**, 47—127 (2002).
- Gordon M., Taylor J. S., *J. Appl. Chem.*, **2**, 493—500 (1952).
- Shamblin S. L., Taylor L. S., Zografi G., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 694—701 (1998).
- Hoppu P., Jouppila K., Rantanen J., Schantz S., Juppo A. M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2007**, 373—381 (2007).
- Chang B. S., Randall C., *Cryobiology*, **29**, 632—656 (1992).
- "Heat and Mass Transfer Issues in Freeze-Drying Process Development," ed. by Rambhatla S., Pikal M. J., American Association of Pharmaceutical Scientists, Arlington, 2004, pp. 75—109.
- Levine H., Slade L., *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **84**, 2619—2633 (1988).
- Franks F., *Dev. Biol. Stand.*, **74**, 9—18 (1992).
- Mattern M., Winter G., Kohnert U., Lee G., *Pharm. Dev. Technol.*, **4**, 199—208 (1999).
- Hosseini M. W., Lehn J.-M., *Helv. Chim. Acta*, **69**, 587—603 (1986).
- Yerger E. A., Barrow G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6206—6207 (1955).
- Sada K., Watanabe T., Miyamoto J., Fukuda T., Tohnai N., Miyata M., Kitayama T., Machara K., Ute K., *Chem. Lett.*, **33**, 160—161 (2004).
- Sada K., Tani T., Shinkai S., *Synlett*, **2006**, 2364—2374 (2006).
- Kobayashi N., Naito T., Inabe T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **76**, 1351—1362 (2003).
- Fukumoto K., Yoshizawa M., Ohno H., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2398—2399 (2005).
- Yamamuro O., Minamimoto Y., Inamura Y., Hayashi S., Hamaguchi H., *Chem. Phys. Lett.*, **423**, 371—375 (2006).



〔ノ ー ト〕

ラクトース修飾絹フィブロイン基材上における初代培養ラット肝細胞の  
スフェロイド形成と維持

後藤 洋子\*1・新見 伸吾\*2

(受付 2007年8月16日・審査終了 2007年11月19日)

## 1 緒 言

カイコが生産する繭糸の主成分が構造タンパク質の絹フィブロイン(SF)であり、繭糸を熱水処理(精練)することでSFが得られる。SFは古くから衣料素材として用いられてきたが、その一方で優れた強度と生体適合性を有することから外科用縫合糸としても用いられてきた<sup>1)</sup>。近年SFを溶解したSF水溶液から、フィルム・ゲル・スポンジ・不織布などに加工する技術が開発されている<sup>1),2)</sup>。この成形性の良さと生体適合性に加え、昆虫生産物ゆえにBSEなどのヒト感染病原体の混入の危険性が極めて低いことから、SFを医療用材料特に組織再生用足場材料として利用する研究が進められている<sup>1)-3)</sup>。

肝臓は生体内においてアルコール・薬・毒物などの外来性異物の解毒、アンモニア処理のための尿素合成、アルブミンを初めとする血漿タンパク質の合成と分泌などさまざまな機能を有しており、これらの機能を担っているのが肝実質細胞(肝細胞)である。筆者らは肝細胞培養用足場基材としてのSFの新しい利用を目的に、肝細胞の認識糖鎖である $\beta$ -ガラクトース残基を有するラクトースによるSFの化学修飾を行った<sup>4)</sup>。この新規に作り出したラクトース修飾SF(Lac-CY-SF)を足場基材に用いて初代ラット肝細胞の培養を行ったところ、対照区の未修飾SFでは肝細胞の接着がほとんど観察されなかったのに対し、Lac-CY-SFではコラーゲン基材に匹敵する高い細胞接着性を示した<sup>4)</sup>。そしてLac-CY-SF基材上に接着した初代ラット肝細胞の培養をさらに続けると、ラット肝細胞は軽度伸展形態で単層の島状集合体を形成した<sup>4),5)</sup>。しかし、Lac-CY-SF基材上においては、ホルモン因子であるインスリンとデキサメサゾンの培地への添加濃度が低い場合、培養3日目に基材から脱離した死細胞の増加が観察されている<sup>5)</sup>。

一般に単層状態の肝細胞では短期間に肝機能発現が低下し、細胞自身の生存率も低下することが知られている<sup>6)-8)</sup>。それに対し、三次元的な形状を有する多層の球状細胞凝集体(スフェロイド)となった肝細胞は、高い肝機能を発現したまま長期間生存し基材上に維持されることが報告されている<sup>6)-10)</sup>。なお、基材上における初代ラット肝細胞のスフェロイドの形成には、上皮細胞増殖因子(EGF)とインスリンを培地中に加えることが必要である<sup>6)-10)</sup>。これまでにプロテオグリカンでコートした基材上や親水性陽性荷電ポリスチレン基材上で、肝細胞スフェロイドが形成されることが報告されている<sup>6),7)</sup>。また、赤池らによって開発されたラクトース置換ポリスチレン誘導体(PVLA)のコート基材上でも肝スフェロイドが形成されることが知られている<sup>9)-10)</sup>。しかしそれ以外の平面基材を用いてのスフェロイド形成の報告は少ない。

本報では、 $\beta$ -ガラクトース残基を導入したLac-CY-SFの平面基材を用いてEGFとインスリンを添加した条件下でラット肝細胞を初代培養し、スフェロイドの形成を検討するとともに、基材上におけるスフェロイドの維持についても調べたので、その結果について報告する。

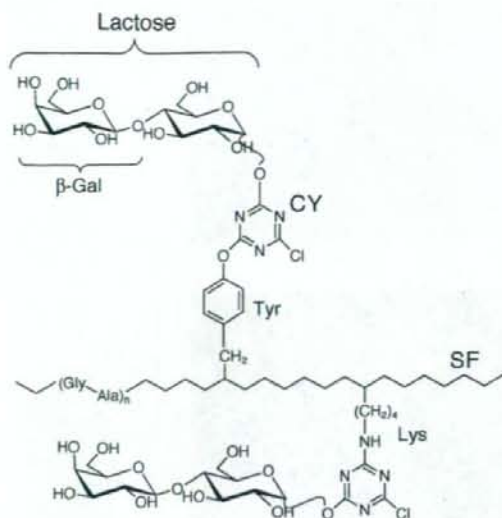
## 2 実 験

## 2.1 試薬

試薬は、市販品をそのまま使用した。Lac-CY-SFの作製に使用したラクトース-水和物と塩化シアヌル(CY)は、和光純薬工業(株)から購入したものをを用いた。肝細胞培養用のウィリアムスのE培地は、ICN Biomedicals Inc.製の市販品から調製した。アプロチニン(タカラバイオ(株)から購入したものをそのまま用いた。EGFは東洋紡績(株)から購入し、インスリンはSigma Aldrich Co.から購入した。肝細胞培養実験に必要なそのほかの試薬については、田中らの報告<sup>11)</sup>に従って入手した市販品を使用した。

\*1 農業生物資源研究所(〒305-8634 つくば市大わし1-2)

\*2 国立医薬品食品衛生研究所(〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)



Scheme 1. Chemical structure of lactose-silk fibroin conjugates (Lac-CY-SF) prepared using cyanuric chloride (CY) as a coupling reagent.

## 2.2 Lac-CY-SF 培養基材の作製

原料の SF 水溶液は、家蚕の繭を精練して得た SF の繊維を、9 M 臭化リチウム水溶液に溶解し透析による脱塩を行って調製した<sup>4)</sup>。Lac-CY-SF の作製は、既報の方法に従って CY をカップリング試薬に用いて行った<sup>4),5)</sup>。アルカリ条件下ジオキサン-水の溶媒系でラクトースと CY を 4°C で反応させて、修飾剤となる CY 活性化ラクトースを作製した。この修飾剤溶液に SF 水溶液を加えて、修飾剤と SF のアミノ酸残基(チロシン・リジン残基)との反応を 37°C で行うことにより、目的の Lac-CY-SF を作製した(Scheme 1)<sup>4),5)</sup>。反応液の中和による反応停止後、蒸留水を用いた透析と限外ろ過で Lac-CY-SF 水溶液の精製と濃縮を行った。得られた Lac-CY-SF におけるラクトース含有量は 17 wt% である<sup>4),5)</sup>。

0.1% (w/v) 濃度に調製した Lac-CY-SF 水溶液をシリジフィルター(日本ミリポア(株)製、孔径 0.45 μm)を用いてろ過滅菌した。ろ液各 0.5 mL を細胞培養用のポリスチレンディッシュ(イワキ硝子(株)製、6 ウェル平底プレート、直径 35 mm)の各ウェルに注入し 1 時間静置することで、ディッシュ表面への試料の吸着コートを行った。ディッシュから試料水溶液を除いた後、Dulbecco's PBS(-)緩衝液にて洗浄を行い、試料コートディッシュを使用直前まで D-PBS(-)緩衝液で満たして保存した。

## 2.3 肝細胞培養実験

ラット肝細胞は、体重 180~200 g のウィスター系ラッ

トから Seglen のコラゲナーゼ灌流法<sup>12)</sup>により調製した。この肝細胞を 1 nM インスリンと 1 μg/mL アプロチニンを添加したウィリアムスの E 培地に懸濁し、播種細胞懸濁液とした。なお、トリパンブルーによる染色で 85% 以上の生存率を有する肝細胞を培養に供した。Lac-CY-SF コートディッシュ上に 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度になるように肝細胞懸濁液 2 mL を加え、培養を行った。培養は 5% CO<sub>2</sub>-30% O<sub>2</sub>-65% 空気を気相として、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で行った。2.5 時間培養後基材に接着しなかった細胞を回収し、培地を 20 ng/mL EGF, 100 nM インスリン, 1 μg/mL アプロチニンを含むウィリアムスの E 基本培地と交換してさらに 10 日間培養を行った。2 日ごとに培地交換を行い、その直後細胞の形態を位相差顕微鏡((株)ニコン製 DIAPHOT TMD)で観察した。

## 3 結果と考察

Lac-CY-SF 基材上における接着時のラット肝細胞の形態と、接着後 EGF とインスリンを添加した培地条件下でさらに培養した肝細胞の形態変化を Figure 1 に示す。培養 2.5 時間後基材に接着した細胞は、これまでの接着実験で示した形態と同様の小さな丸い形態を示した(Figure 1(a))<sup>4)</sup>。EGF とインスリンを含む培地に交換して接着細胞の培養を続けたところ、細胞は伸展を始め、培養 2 日目には軽度伸展形態で単層を形成した(Figure 1(b))。培養 3 日目から細胞の移動と集合が始まり、培養 4 日目にはスフェロイドが形成された(Figure 1(c))。形成されたスフェロイドは基材接着部の下層細胞において伸展形態が観察され、直径 100 μm 前後の比較的小さいスフェロイドの他に、全長 200~300 μm の細長く大きなスフェロイドも観察された。培養 4 日目以降はスフェロイドの大きさの増加は見られず、6 日目においても 4 日目とほぼ同じ大きさで形状で基材上に維持されていた(Figure 1(d))。しかし、8 日目からは死細胞の基材からの脱離とスフェロイドの縮小が観察され始め(Figure 1(e))、10 日目にはスフェロイドの縮小が顕著になった(Figure 1(f))。

これまでに赤池らは PVLA を足場材料として用いた場合、ラット肝細胞は基材接着後 EGF とインスリンの添加条件下における培養 2 日目(48 時間)で直径 80~100 μm のスフェロイドを形成することを確認し、PVLA 基材上で 3 週間以上にわたるスフェロイドの生存を報告している<sup>9),10)</sup>。一方、Lac-CY-SF 基材ではスフェロイドの形成に時間がかかり、形成されたスフェロイドも短期間しか基材上に維持されない。

スフェロイドの形成には細胞と基材の間の相互作用の強さが深く関係し、細胞と基材が非常に強く接着しているコラーゲンのような基材表面では、細胞どうしが動き

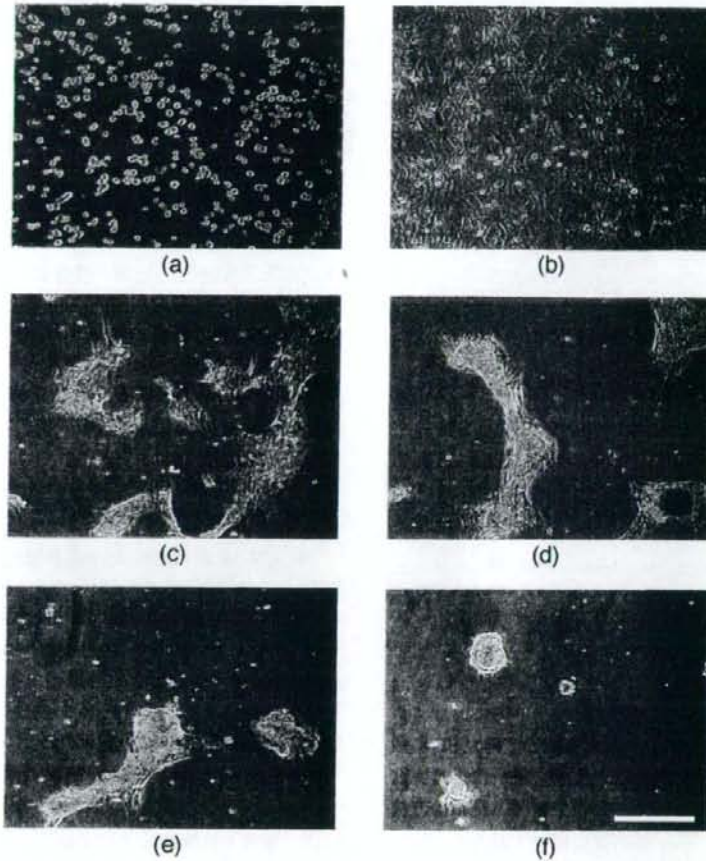


Figure 1. Phase-contrast micrographs of rat hepatocytes cultured on dishes coated with Lac-CY-SF. The cells were cultured in Williams' E medium containing 1 nM insulin for 2.5 h (a) and subsequently in the medium containing 20 ng/mL EGF and 100 nM insulin for 2 days (b), 4 days (c), 6 days (d), 8 days (e), and 10 days (f). Scale bar indicates 100  $\mu$ m.

あって接触・接着することができず細胞の集合化が困難であることが知られている<sup>8),9)</sup>。したがってLac-CY-SF基材上でのスフェロイド形成に時間を要するのは、肝細胞とLac-CY-SFとの間の相互作用がPVLAとの間の相互作用に比べ強いためと推定される。またLac-CY-SF基材上のスフェロイドがきれいな球状の形態を示さず、スフェロイドの基材接着部の下層細胞が伸展形態を示すのも、細胞とLac-CY-SFとの間の相互作用の強さによると考えられる。

Lac-CY-SFにおいて肝細胞のアシアロ糖タンパク質レセプターが認識する $\beta$ -ガラクトース残基を有するラクトース分子は、CY由来のトリアジン環を介して、SFのチロシン残基(含有量5 mol%)のフェノール性ヒドロキシル基およびリジン残基(含有量0.3 mol%)の $\epsilon$ -アミ

ノ基と結合している(Scheme 1)<sup>4),5)</sup>。そのためLac-CY-SFではPVLAに比べラクトース糖鎖密度は低い、ポリスチレンディッシュ表面に吸着していると考えられるSFのポリペプチド主鎖からラクトースは離れて水層側に存在し、末端のガラクトース残基の立体障害は少ないと推定される。そして肝細胞のレセプターは立体障害の少ないガラクトース残基に容易に接近し強く結合できるので、肝細胞はLac-CY-SFと強く相互作用するものと推定される。

この肝細胞とLac-CY-SFとの強い相互作用による肝細胞の移動速度の低下が、スフェロイド形成に時間を要する原因になっていると考えられるが、それに加えてスフェロイド巨大化の原因にもなっているかもしれない。すなわち基材上の細胞の移動速度が遅ければスフェロイ

ド形成に必要な細胞どうしの接触までに時間を要するが、その反面いったん細胞間の接触が起こると、移動速度の遅さゆえに接触時間が長くなると考えられる。そして接触時間が長くなれば、集合化が容易になるとともに、細胞どうしが強く結合した安定な集合体が形成されるので、スフェロイドが大きくなると思われる。

一方、基材のスフェロイド維持能の違いの一因として、形成されるスフェロイドの大きさの違いが影響している可能性がある。一般にスフェロイドの直径が大きくなるにつれ、スフェロイドの中心部への酸素や栄養分の供給不足となりネクロシス(壊死)が起こることがよく知られている<sup>13),14)</sup>。Törökらはスフェロイドの直径が200  $\mu\text{m}$ より小さいとネクロシスは見られないが、200  $\mu\text{m}$ 以上になるとネクロシスが発生することを報告している<sup>14)</sup>。また Glicklisらは、スフェロイドの直径が100  $\mu\text{m}$ より大きくなるとスフェロイド中心部は酸素濃度が低い状態になり、細胞の生存率が低下することを示している<sup>15)</sup>。Lac-CY-SF 基材においては最初から200  $\mu\text{m}$ 以上の大きなスフェロイドが数多く形成されることから、スフェロイド形成から比較的短期間にネクロシスが発生している可能性がある。

以上の結果から、Lac-CY-SF コートディッシュを基材に用いたラット肝細胞の初代培養において、EGF とインスリンの添加によってスフェロイドが形成されることを確認した。しかしながら、形成されたスフェロイドを Lac-CY-SF 基材上に5日以上維持するのは困難であることが示された。

今後 Lac-CY-SF 基材上で長期間維持される良好なスフェロイドを形成させるためには、誘導因子である EGF とインスリンの添加条件の検討が必要と考えられるが、一方で足場基材の形状を変えることはより有効な手段と考えられる。近年の組織工学において、足場材料を基板全面にコートしたこれまでの平面基材に加え、微細加工技術を用いて細胞非接着性の基板表面に数十～数百ミクロン単位の大きさの細胞接着空間を規則的に配したマイクロパターン基材の作製が行われている<sup>16)~18)</sup>。この細胞接着領域が制限されたマイクロパターン基材を用いることにより、肝細胞では形成されるスフェロイドの大きさや機能の制御が可能になっている<sup>16),17)</sup>。繊維タンパク質由来の Lac-CY-SF は耐熱性・耐溶媒性に優れ、フォトソングラフィー技術を用いる微細加工工程にも耐えられる材料である。それゆえ今後 Lac-CY-SF を細胞接着領域としたマイクロパターン基材を作製することができれば、細胞接着領域の制限により基材と肝細胞との相互作用が弱められて短期間でスフェロイド形成が期待されるとともに、形成されるスフェロイドの大きさも制御され、ネクロシスの発生の抑制と基材上での長期間細胞維持が期待される。

また最近の肝細胞を対象とした組織工学研究では、マイクロパターン基材だけでなく、生体内の細胞外マトリックスに類似した三次元構造を持つポリウレタンフォームやアルギン酸スポンジなどの多孔質体を用いて肝スフェロイドを形成させ、長期間高い肝機能を発現した状態で基材に細胞を維持させる試みが行われている<sup>15),19)~22)</sup>。こうした多孔質体ではスフェロイドは空孔内に形成され、酸素や栄養分の供給、老廃物の除去に有利であるとともに、試料コート平面基材を用いた場合に比べて細胞の基材接着は抑えられている<sup>15),22)</sup>。それゆえ、マイクロパターン基材と同様に多孔質体も、細胞接着の制限で基材と細胞との相互作用が弱められ、細胞どうしの相互作用によってスフェロイド形成が促進される足場基材と考えられる。SF 水溶液と同様に Lac-CY-SF 水溶液から、凍結乾燥法を用いてスポンジの作製が可能である。したがって、足場となる Lac-CY-SF を三次元構造体のスポンジに成形することで、肝スフェロイド形成と維持がより効果的に行われると期待される。

## 文 献

- 1) G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 401 (2003).
- 2) Y. Wang, H.-J. Kim, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **27**, 6064 (2006).
- 3) 富田正浩, 吉里勝利, 再生医療, **2**, 98 (2003).
- 4) Y. Gotoh, S. Niimi, T. Hayakawa, and T. Miyashita, *Biomaterials*, **25**, 1131 (2004).
- 5) 後藤洋子, 新見伸吾, 高分子論文集, **62**, 326 (2005).
- 6) N. Koide, T. Shinji, T. Tanabe, K. Asano, M. Kawaguchi, K. Sakaguchi, Y. Koide, M. Mori, and T. Tsuji, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 385 (1989).
- 7) N. Koide, K. Sakaguchi, Y. Koide, K. Asano, M. Kawaguchi, H. Matsushima, T. Takenami, T. Shinji, M. Mori, and T. Tsuji, *Exp. Cell Res.*, **186**, 227 (1990).
- 8) 伊勢裕彦, 高島誠司, 赤池敏宏, 外科, **63**, 528 (2001).
- 9) 戸辺成四郎, 武井由香, 貞栄田 篤, 赤池敏宏, 小林一清, 人工臓器, **19**, 1156 (1990).
- 10) S. Tobe, Y. Takei, K. Kobayashi, and T. Akaike, *Artif. Organs*, **16**, 562 (1992).
- 11) K. Tanaka, M. Sato, Y. Tomita, and A. Ichihara, *J. Biochem.*, **84**, 937 (1978).
- 12) P. O. Seglen, *Methods Cell Biol.*, **13**, 29 (1976).
- 13) S. Higashiyama, M. Noda, M. Kawase, and K. Yagi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **64A**, 475 (2003).
- 14) E. Török, J.-M. Pollok, P. X. Ma, P. M. Kaufmann, M. Dandri, J. Petersen, M.-R. Burda, D. Kluth, F. Perner, and X. Rogiers, *Cells Tissues Organs*, **169**, 34 (2001).
- 15) R. Glicklis, J. C. Merchuk, and C. Cohen, *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 672 (2004).
- 16) R. Singhvi, A. Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. C. Wang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber, *Science*, **264**, 696 (1994).
- 17) H. Otsuka, A. Hirano, Y. Nagasaki, T. Okano, Y. Horiike, and K. Kataoka, *ChemBioChem*, **5**, 850 (2004).
- 18) D. M. Thompson and H. M. Buettner, *Tissue Eng.*, **7**, 247 (2001).

- 19) T. Matsushita, H. Ijima, N. Koide, and K. Funatsu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 324 (1991).  
 20) K. Funatsu, H. Ijima, K. Nakazawa, Y. Yamashita, M. Shimada, and K. Sugimachi, *Artif. Organs*, **25**, 194 (2001).  
 21) S. R. Hong, Y. M. Lee, and T. Akaike, *J. Biomed. Mater. Res.*, **67A**, 733 (2003).  
 22) C. S. Ranucci and P. V. Moghe, *Tissue Eng.*, **5**, 407 (1999).

## [Notes]

**Formation and Maintenance of Rat Hepatocyte Spheroids on Lactose-Silk Fibroin Conjugates in Primary Cultures**Yohko GOTOH<sup>\*1</sup> and Shingo NIIMI<sup>\*2</sup><sup>\*1</sup>National Institute of Agrobiological Sciences (1-2 Ohwashi, Tsukuba 305-8634, Japan)<sup>\*2</sup>National Institute of Health Sciences (1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

We examined the formation and maintenance of spherical multicellular aggregates (spheroids) of rat primary hepatocytes on dishes coated with lactose-silk fibroin conjugates bearing galactose residues (Lac-CY-SF) as substrate materials. Rat hepatocytes that had attached onto the conjugate-coated dishes were subsequently cultured in a medium supplemented with epidermal growth factor (EGF) and insulin. After the rat hepatocytes extended flat on the conjugate-coated dishes in 2 days of culture, these hepatocytes formed spheroids about 100 to 300  $\mu\text{m}$  in diameter at day 4. After 6 days of culture the spheroids were maintained without any obvious change in size on the conjugate-coated dishes. However, the detachment of the spheroids from the conjugate-coated dishes began from day 8, and the spheroids clearly shrank at day 10. These results suggested that hepatocyte spheroid formation was induced on the Lac-CY-SF conjugate-coated dishes in the presence of EGF and insulin, but the conjugate-coated dishes were not capable of keeping the spheroids for more than 5 days.

**KEY WORDS** Lactose-Silk Fibroin Conjugates / Rat Hepatocytes / Epidermal Growth Factor / Insulin / Spheroids /

(Received August 16, 2007; Accepted November 19, 2007)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **65**, 312–316 (2008)]

©2008. The Society of Polymer Science, Japan

## 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望 (その2)

新見 伸吾\*, 原島 瑞\*, 日向 昌司\*, 山口 照英\*, 早川 堯夫\*\*

(受付:平成20年1月23日, 受理:平成20年5月12日)

## State and Perspective of Anti-Angiogenic Therapy to Cancer 2

Shingo NIIMI\*, Mizuho HARASHIMA\*, Masashi HYUGA\*,  
Teruhide YAMAGUCHI\* and Takao HAYAKAWA\*\*

## はじめに

血管新生は腫瘍の成長と進行において重要な役割を果たしていることが明らかになり<sup>1)</sup>, ヒト癌治療の新しい治療法として抗血管新生治療が注目されている。これまで多くの非臨床及び臨床研究が行われているが、最適な治療法は確立されていない。現在、Bebacizumabに代表される血管新生促進因子に対する抗体による治療とともに注目されているのは遺伝子治療である。遺伝子治療はこれら各種抗体を含めたタンパク質による治療に比べて以下の点で優れた特徴を有することから将来の治療法として期待されている。

- (1) 遺伝子の安定性-内皮細胞は腫瘍細胞よりもはるかに遺伝的に安定であるため、治療薬に対して抵抗性を与えるような変異の蓄積が起りにくい<sup>2)</sup>。したがって、遺伝的に安定な内皮細胞をターゲティングして抗血管新生タンパク質を持続的に発現する遺伝子治療の戦略は効果的であると考えられる。
- (2) 選択的な低レベルの持続的な投与-病理的な血管新生を効果的に抑制するには最終的に長期

間にわたる治療が必要となる。抗血管新生タンパク質を投与した場合よりも遺伝子治療による抗血管新生タンパク質の発現レベルが低い場合もありうるがその発現は恒常的である。したがって、遺伝子治療のほうがタンパク質よりも治療効果が高い可能性がある<sup>3)</sup>。また、遺伝子治療は治療が必要とされる組織に対して選択的にデリバーできるという点でも有用である<sup>4)</sup>。特にこの点は小型非開裂細胞リンパ腫及び卵巣癌のような局所的な治療に効果的であり、抗血管新生効果を限定させることにより生体において必須の生理的な機能の望ましくない抑制を回避し有害効果を減少できる<sup>5)</sup>。

- (3) 血管新生のスイッチ-正常細胞が癌細胞に形質転換するには遺伝的及びエピジェネティックな要因が関与する。しかし、これら以外に血管新生のスイッチと呼ばれる腫瘍血管のスイッチが腫瘍の伝搬と進行における重要なステップである<sup>6)</sup>。この観点において、腫瘍が致命的なレベルまで発達するには生体における血管新生の助けが必要となる<sup>7)</sup>。したがって、遺伝子治療は内在性の血管新生防御能を持続的に高めるこ

\* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-8501)  
Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1  
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

\*\* 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞ヶ関3-3-2 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)  
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shinkasumigaseki Bldg., 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-  
ku Tokyo 100-0013, Japan

とにより腫瘍の発達を抑制することができる。

- (4) 生産コスト-機能を有するタンパク質を組換えにより産生するには多額の費用がかかるため使用に十分な量が供給できない場合がありうる。例えば、非臨床研究において最も広く研究されその有用性が指摘されている血管新生阻害剤である Angiostatin 及び Endostatin はそのため生産が最近中止されている<sup>9)</sup>。一方、遺伝子治療では患者自身が抗血管新生タンパク質生産の工場となるためこのような危惧は回避される。
- (5) 正確なフォールディングと安定性-投与された遺伝子治療薬は生理的な条件でタンパク質を発現するため、発現タンパク質は正確なフォールディングを受け *in vivo* において安定であることが期待できる<sup>9,10)</sup>。

本稿では癌に対する抗血管新生療法としての遺伝子治療の動物モデル及び臨床試験における現状及び今後克服すべき課題について概説する。なお、本総説では遺伝子治療ばかりではなく“small interfering RNA” (siRNA) 及びアンチセンスなどの核酸医薬を用いた治療も含む。本稿ではふれないが、血管新生の詳細及びそれに関与する促進因子、タンパク質及びペプチド単独あるいは化学療法剤との併用を用いた抗血管新生療法の非臨床及び臨床研究の現状及び展望、腫瘍における血管新生の詳細については著者の総説を参考にされたい<sup>11,12)</sup>。なお、本稿は成書を参考にした<sup>13-21)</sup>。

## 1. 癌に対する抗血管新生療法としての 遺伝子治療の非臨床研究

本稿では“RNA interference” (RNAi) などによる血管新生促進因子の発現及び機能抑制、抗血管新生タンパク質の遺伝子治療及び自殺遺伝子療法などの癌に対する抗血管新生療法の非臨床研究の結果について述べる。以下に示すように各種担癌モデル動物などを用いた試験では多くの場合で有効性を示す結果が得られている。

### 1.1 VEGF 及び VEGF 受容体を標的とする

RNAi は二本鎖 RNA により誘導される配列特異的な遺伝子のサイレンシングである。21-23 mer の siRNA のヌクレオチドを導入することにより特定の遺伝子の発現をノックダウンできる。VEGF 受容体に対する siRNA は血管新生をブロックするこ

とにより腫瘍の容積を減少できる<sup>22)</sup>。転写抑制に作用する zinc finger タンパク質の発現と VEGF-A に対する siRNA を組み合わせることにより VEGF-A が転写及び翻訳レベルで抑制される<sup>23)</sup>。ユーイング肉腫に VEGF “short hairpin RNA” (shRNA) 発現ベクターを導入し、無胸腺マウスに投与すると血管密度が低下する<sup>24)</sup>。腫瘍内にポリエチレンイミン/VEGF siRNA を投与すると腫瘍の成長が抑制される。VEGF siRNA 発現ベクター系の導入によりヒト白血病皮下異種移植モデルマウスにおける腫瘍の血管新生及び腫瘍の成長が劇的に抑制される<sup>25)</sup>。マウスの皮下で生着した腫瘍に対する VEGF siRNA の治療効果が2つのグループにより同じヒト前立腺癌モデルで評価されている。アテアロコラーゲンと複合体を形成させた siRNA を40日にわたり10日ごとに腫瘍内に投与すると、腫瘍の血管新生及び成長が劇的に抑制される<sup>26)</sup>。ヒト線維肉腫細胞を VEGF-A に対する siRNA とともに無胸腺マウスに投与すると、腫瘍の成長が遅くなり、血管密度が減少し、アポトーシスが増加する<sup>27)</sup>。悪性黒色腫細胞に VEGF siRNA 発現プラスミドを導入し、マウスに移植すると、腫瘍の成長が阻害され、微小血管密度が減少し、腫瘍のアポトーシスが増加する<sup>28)</sup>。VEGF-A siRNA を発現する裸のプラスミドを難治性前立腺癌モデルマウスに投与すると、微小血管密度が減少し、腫瘍の成長が長期間にわたり遅くなる<sup>29)</sup>。VEGF siRNA と cholesteryl oligo-d-arginine の非共有結合複合体を皮下腫瘍マウスモデルに投与すると、腫瘍が退行する<sup>30)</sup>。VEGF siRNA を網膜芽腫マウスモデルに投与すると、腫瘍の成長及び血管新生が抑制される<sup>31)</sup>。

“Antisense oligodeoxynucleotide” (ASO) は mRNA の翻訳をブロックする合成分子である。VEGF に対する ASO を頭頸部扁平上皮癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が抑制される<sup>32)</sup>。肝癌の治療薬である lipiodol と VEGF に対する ASO を混合して投与すると、肝癌の成長の抑制、微小血管密度の阻害がそれぞれ単独に比べてより効果的に起きる<sup>33)</sup>。VEGF に対する ASO をリンパ腫モデルマウスに投与すると、微小血管密度が低下する<sup>34)</sup>。膵臓癌ドナー腫瘍の断片をヌードマウスの膵臓に投与後 VEGF に対する ASO を投与すると、腫瘍の容積及び転移の速度が低下するとともに微小血管密度が低

下する<sup>35)</sup>。カチオニックリポソームで処方した VEGF に対する ASO をルイス肺腫瘍モデルマウスに投与すると、血管新生が阻害され腫瘍の血流が損傷される<sup>36)</sup>。VEGF-C に対する ASO を肺腫瘍モデルマウスに投与すると、微小血管密度は低下しないがリンパ管の密度は低下する<sup>37)</sup>。VEGF に対する ASO と低分子ヘパリンを肺腫瘍モデルマウスに投与すると、それぞれ単独に比べて腫瘍の成長速度が遅くなり、微小血管密度が減少する<sup>38)</sup>。VEGF 受容体に対する ASO を docetaxol と共に頭頸部扁平上皮癌モデルマウスに投与すると、それぞれ単独に比べ腫瘍の容積がより抑制される<sup>39)</sup>。VEGF 受容体に対する ASO を腎細胞癌細胞である Caki-1 細胞に導入しヌードマウスに投与すると腫瘍血管の数が半分に低下する<sup>40)</sup>。同細胞を用いた腎細胞癌モデルマウスに VEGF 受容体に対する ASO を投与すると、腫瘍の大きさが低下し腫瘍の成長速度が低下する。VEGF の受容体である KDR/Flk-1 に対する ASO を胃癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の腹膜への播種が減少すると共にアポトーシス細胞が増加し微小血管密度が低下する<sup>41)</sup>。

“Soluble FMS-like tyrosine kinase receptor 1” (sFlt-1) は VEGF の受容体であり、*in vitro* 及び *in vivo* で VEGF を遮蔽し、他の膜貫通 VEGF 受容体と不活性のヘテロダイマーを形成する<sup>42)</sup>。“Adeno-associated virus vector” (AAV) を介して sFlt-1 遺伝子を導入したヒト卵巣癌細胞をヌードマウスの腹腔に投与すると、癌細胞の数が減少し、生存期間も延長する<sup>43)</sup>。“Adenovirus vector” (AV) を介して sFlt-1 遺伝子を導入したヒト卵巣癌細胞を無胸腺マウスの皮下に投与すると、腫瘍小結節が小さくなり、生存期間も延長する<sup>44)</sup>。AV を介して sFlt-1 あるいは Flk-1 遺伝子をルイス肺癌、繊維肉腫、肺癌モデルマウスに静脈投与すると、腫瘍の成長が 80% 阻害される<sup>45)</sup>。AAV を介して sFlt-1 遺伝子をマウスの骨格筋に投与後卵巣癌細胞を皮下及び腹腔に投与すると、腫瘍の成長が抑制される<sup>46)</sup>。sFlt-1 遺伝子を AAV を介してヌードマウスの筋肉内に投与すると、ヒト卵巣癌細胞に対して防御反応を示し、無病生存率を増加させる<sup>47)</sup>。pCMV ベクターに組み込んだ sFlt-1 遺伝子と PEI-g-PEG-RGD の複合体を皮下腫瘍モデルに尾静脈投与すると、腫瘍の成長が抑制される<sup>48)</sup>。一方、RGD を除いた同様

の複合体ではこの効果は観察されない。多発性骨髄腫モデルマウスに AV を介して sFlt-1 遺伝子を静脈投与すると、骨髄腫の容積及び微小血管密度が低下する<sup>49)</sup>。

FLK は VEGF 受容体である。“Retrovirus vector” (RV) を介してドミナントネガティブの FLK 遺伝子をグリア芽腫モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が阻害される<sup>50)</sup>。RV を介して可溶性 FLK 遺伝子を S180 及び B16 細胞に導入しマウスに投与すると、腫瘍の重さ及び大きさが小さくなり微小血管密度も低下する<sup>51)</sup>。RV を介して可溶性 FLK 遺伝子を S180, MCF-7, B16 細胞担癌マウスに局所的に投与すると、腫瘍の大きさ、転移病巣の数、微小血管密度が低下する<sup>52)</sup>。AV を介して可溶性 FLK 遺伝子を卵巣癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長及び微小血管密度が低下する<sup>53)</sup>。この効果は cis-diamminedichloroplatinum の共投与により増強される。

## 1.2 FGF-4 を標的とする

アテアロコラーゲンと FGF-4 siRNA 複合体を腫瘍内に投与すると、ヒト胚細胞腫瘍の異種移植モデルにおいて腫瘍の成長が効果的に抑制される<sup>54)</sup>。

## 1.3 CD31/Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 を標的とする

CD31/“Platelet endothelial cell adhesion molecule-1” (PECAM-1) は血液循環血漿、単球、好中球、T 細胞の一部の表面に発現する 130-kDa のタンパク質であり、内皮細胞間の接合の主要な構成要素である<sup>55)</sup>。二つの異なる異種移植モデルマウスにおいて、生着した腫瘍を有するマウスの皮下に抗 CD31 siRNA lipoplex を投与すると、血管の長さが減少し、リンパ節転移の容積及び腫瘍の成長が抑制される<sup>56)</sup>。

## 1.4 Thrombospondin 1 及び 2

“Thrombospondin 1” (TSP-1) 及び TSP-2 は内在性の血管新生阻害剤である。TSP-1 のフラグメントの遺伝子及び p53 遺伝子をリポソームと複合体を形成させ、大腸癌モデルマウスに投与すると、それぞれ単独に比べて腫瘍の成長が阻害され微小血管密度が低下する<sup>57)</sup>。TSP-1 を過剰発現させたヒト扁平上皮癌細胞である A431 及び SCC-13 細胞をマウスに移植し、血管新生の抑制効果が検討されている<sup>58)</sup>。その結果、コントロールの細胞と比べ A431



異種移植の腫瘍の成長は阻害され、腫瘍血管の数及び大きさが減少する。SCC-13細胞の腫瘍形成は完全に消失する。TSP-1遺伝子発現ベクターをトランスフェクション試薬であるSOSPERTと混合しヒト膀胱癌異種移植モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の成長の抑制及びアポトーシスの促進が起り、微小血管密度が低下する<sup>69</sup>。RVを介してTSP-2を繊維芽細胞に導入後細胞を生分解性の高分子足場に播種しヒト扁平上皮癌、悪性黒色腫、Lewis肺腫瘍モデルマウスの腹腔内に投与すると、腫瘍の成長及び血管新生が阻害される<sup>60</sup>。TSP-1遺伝子をLN-229ヒト神経グリオーマ細胞に導入し免疫不全マウスに投与すると、コントロールの細胞と比べ腫瘍の成長が抑制され血管の容積及び血管の数が低下するが、腫瘍へのかん流は変化しない<sup>61</sup>。AVを介してTSP-1の抗血管新生フラグメント遺伝子を白血病モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の容積及び微小血管密度が低下する<sup>62,63</sup>。RVを介してTSP-2 N末端領域の遺伝子をマウス不死化細胞に導入し腫瘍担癌マウスに投与すると、腫瘍の容積が低下し、腫瘍が40%まで根絶する。AVを介してTSP-2 N末端領域の遺伝子を扁平上皮癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると腫瘍の成長及び容積、腫瘍血管の面積及び大きさが低下する<sup>64</sup>。Salmonella choleraesuisベクターを介してTSP-1遺伝子を原発性黒色腫及び実験的肺転移モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が阻害され腫瘍内微小血管密度が低下し生存期間が延長する<sup>65</sup>。

### 1.5 Mapsin

Mapsин 遺伝子は p35 及び DNA methyltransferase により転写調節される腫瘍抑制遺伝子である。その発現レベルは悪性腫瘍で減少し、転移性の細胞では消失する<sup>66,67</sup>。Mapsин 遺伝子を導入した乳癌細胞をヌードマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍誘導能及び転移能が低下する<sup>68</sup>。また、AAV-2を介してヒト Mapsин 遺伝子を発現すると、前立腺癌における血管新生を阻害され腫瘍の成長が効果的に抑制される<sup>67</sup>。乳癌細胞を乳腺に同種移植して乳腺の中で腫瘍を成長させるとともに他の器官に転移させる同系転移モデルマウスにおいて、非ウイルスリポソームをキャリアとして用いた Mapsин 遺伝子デリバリーの効果が検討されている<sup>69</sup>。その結果、コントロールの細胞に比べて原発

性腫瘍の成長と転移が抑制され、腫瘍のアポトーシスが増加する。AAVを介して Mapsин 遺伝子を前立腺癌モデルマウスの腫瘍内にデリバリーすると、腫瘍の成長が抑制され、生存期間が延長する<sup>67</sup>。

### 1.6 ヒト ribonuclease inhibitor

ヒト "ribonuclease inhibitor" (RI) は分子量 50-kDa の酸性タンパク質であり、膵臓の RNase 活性を阻害する<sup>70</sup>。ヒト RI は血管新生促進因子である Angiostatin と強い複合体を形成し血管新生を阻害すると考えられている<sup>71</sup>。RI 遺伝子を造血細胞に導入しマウスに移植すると、腫瘍の成長が 47%まで阻害され、微小血管密度が低下する<sup>70</sup>。RVを介して RI 遺伝子を導入した黒色腫細胞をマウスに投与すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍重量の低下を伴う腫瘍成長の阻害、微小血管密度の低下、潜伏期間の延長、生存期間の延長が観察される<sup>72</sup>。RVを介して RI 遺伝子を黒色腫モデルマウスに投与すると、コントロールの細胞に比べ血管の低下を伴い腫瘍の成長が低下する<sup>73</sup>。RI 遺伝子を pcDNA 発現ベクターに組み込み黒色腫細胞に導入しマウスに静脈投与すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の転移性進行が抑制され血管の数が低下し、生存期間が延長する<sup>74</sup>。

### 1.7 Survivin を標的とする

Survivin は癌及びリンパ種で過剰発現する抗アポトーシス遺伝子である<sup>75</sup>。Survivin は正常皮膚の非増殖性毛細血管の内皮ではほとんど発現しないが、*in vivo* の肉芽組織において新しく形成された血管で高発現している。したがって、内皮に Survivin を発現させると腫瘍の血管新生が促進される可能性がある<sup>76</sup>。AAVを介して Survivin Cys84Ala 変異体を発現させると結腸癌における血管新生が抑制される<sup>77</sup>。"Lentivirus vector" (LV) を介して Survivin shRNA を口腔扁平上皮癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が抑制される<sup>78</sup>。膀胱癌モデルマウスの腫瘍内に Survivin siRNA を投与すると、腫瘍の成長が抑制される<sup>79</sup>。Survivin に対する ASO を肝臓癌モデルマウスに静脈内投与すると、腫瘍の成長が抑制される<sup>80</sup>。AVを介してドミナントネガティブ Survivin 遺伝子を肝臓癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が阻害され生存期間が延長される<sup>81</sup>。プラスミドを介して Survivin shRNA を横紋筋肉腫モデルマウスに皮下投与する

と、腫瘍の成長が70%低下する<sup>82)</sup>。

### 1.8 Interferon

“Interferon” (IFN) が血管新生の阻害剤として作用することが明らかになったきっかけは1980年にIFN- $\alpha$ と内皮細胞の傷害の関連が発見されたことであり、その後血管新生の阻害剤としての特性解析がなされた<sup>83)</sup>。

#### 1.8.1 IFN- $\alpha$

IFN- $\alpha$  遺伝子をRVの1つであるLXNベクターに挿入し、GP+envAml2パッケージング細胞に導入し、その細胞を高い血管新生能を有するカポジ肉腫細胞と同時にヌードマウスに投与すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が強く抑制される<sup>84)</sup>。その効果はIFN- $\alpha$ cDNAを発現させるレトロウイルスを直接投与した場合と同じである。RVを介してIFN- $\alpha$  遺伝子を発現させたヒト乳癌細胞をヌードマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍の血管新生が低下し腫瘍の成長が長期間阻害される<sup>85)</sup>。LVを介してIFN- $\alpha$  遺伝子を卵巣癌モデルマウスに投与すると、生存が延長される<sup>86)</sup>。RVを介してIFN- $\alpha$  遺伝子を導入した結腸直腸癌細胞を免疫不全マウスに移植すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍原性が低下する<sup>87)</sup>。同じ結腸直腸癌細胞を用いて作成された結腸直腸癌モデルマウスに先のIFN- $\alpha$  遺伝子を導入した細胞を投与すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が抑制される。RVを介してIFN- $\alpha$ を導入した繊維芽細胞あるいはRapamycin類似体であるAP 21967により誘導されるプロモーターでIFN- $\alpha$  遺伝子を産生する繊維芽細胞を卵巣癌モデルマウスの腫瘍内に投与し、抗腫瘍効果が比較検討されている<sup>88)</sup>。IFN- $\alpha$  遺伝子を恒常的に発現する繊維芽細胞を用いた場合は、腫瘍の血管新生が阻害され生存期間が延長される。一方、誘導性プロモーターでIFN- $\alpha$ を発現する繊維芽細胞ではこれらの効果は弱い。AVを介してIFN- $\alpha$  遺伝子を膵臓癌モデルハムスターの皮下腫瘍に投与すると、投与部位の腫瘍だけでなく腹膜及び離れた領域における腫瘍も成長が抑制される<sup>89)</sup>。

#### 1.8.2 IFN- $\beta$

AVを介してIFN- $\beta$  遺伝子を乳癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が阻害され多くの場合で腫瘍が完全に退行する<sup>90)</sup>。RVを介してIFN- $\beta$  遺

伝子を前立腺癌細胞に導入し、ヌードマウスの前立腺あるいは皮下組織に移植すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長及び局所的なリンパ節転移が抑制される<sup>91)</sup>。また、同細胞によるバイスタンダー効果で、非導入前立腺癌細胞の腫瘍形成も抑制される。AVを介してIFN- $\beta$  遺伝子を前立腺癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長及び転移の広がりが抑制され微小血管の数が低下する<sup>92)</sup>。AVを介してIFN- $\beta$  遺伝子を結腸直腸癌肝臓転移モデルマウスに投与すると、肝臓の腫瘍のアポトーシスが促進され腫瘍が退行し生存が延長する<sup>93)</sup>。AVを介してIFN- $\beta$  遺伝子を膀胱移行上皮癌細胞に導入しヌードマウスの膀胱に移植すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の形成及び突発性リンパ節転移が阻害される<sup>94)</sup>。同遺伝子を膀胱移行上皮癌モデルマウスに投与すると、腫瘍のネクロシスが起き微小血管密度が低下する。皮下及び後腹膜神経芽腫癌細胞をマウスに移植し、5日後にAAVを介してIFN- $\beta$  遺伝子を投与すると、腫瘍の発達はみられない<sup>95)</sup>。AVを介してIFN- $\beta$  遺伝子を5-Fluorouracilとともに結腸直腸癌肝臓転移モデルマウスに投与すると、腫瘍の退行及びアポトーシスが起き生存期間が延長する<sup>96)</sup>。この場合、治療効果に必要なベクター量はベクターのみを投与する場合に比べて少ない。AAVを介してIFN- $\beta$  遺伝子を神経芽細胞腫の同所局在後腹膜及び播種モデルマウスに投与し肝臓でIFN- $\beta$ を持続的に発現させると、腫瘍の成長が抑制され微小血管密度が低下し生存期間が延長される<sup>97)</sup>。これと併用して低濃度でCyclophosphamideを投与すると腫瘍が退行する。AVを介してIFN- $\beta$  遺伝子を前立腺癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の成長が阻害され生存期間が延長する<sup>98)</sup>。

#### 1.8.3 IFN- $\gamma$

パッケージング細胞を用いてIFN- $\gamma$  遺伝子を発現させるレトロウイルスを産生させ、その細胞を頭蓋内神経腫モデルマウスに投与すると腫瘍の根絶がみられ生存期間が延長する<sup>99)</sup>。

#### 1.9 TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$ は抗血管新生因子であり抗腫瘍効果を有する<sup>100)</sup>。AVを介してTNF- $\alpha$  遺伝子をDoxorubicinとともにDoxorubicinに抵抗性前立腺癌及び結腸癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の微小血管密度が低下して血管新生が阻害され抗腫瘍効果を

示す<sup>101)</sup>。

### 1.10 Interleukin-12

“Interleukin-12” (IL-12) は強力な抗血管新生及び抗腫瘍活性を有する<sup>102,103)</sup>。

セムリキ森林熱ウイルスベクターを介して IL-12 遺伝子を黒色腫モデルマウスに投与すると、腫瘍のネクロシスが起きるとともに血管新生が抑制され腫瘍の成長が阻害される<sup>104)</sup>。AV を介して IL-12 遺伝子を乳癌モデルマウスの腫瘍に投与すると、微小血管密度が減少し腫瘍の退行が起きる<sup>105)</sup>。この効果は AV を介して Angiostatin 遺伝子を共投与することにより増強される。AV を介して IL-12 遺伝子を肝癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の成長が阻害され腫瘍の 50% で完全な退行が起き生存期間が延長される<sup>106)</sup>。裸の DNA を介して IL-12 遺伝子をカボジ肉腫及び乳癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の血管新生及び成長が阻害される<sup>107)</sup>。発現ベクターを介して IL-12 遺伝子を Polyvinylpyrrolidone とともに肝癌モデルマウスに投与すると、腫瘍血管の数が少なくなりアポトーシスが增加し腫瘍の成長が阻害される<sup>108)</sup>。この効果は発現ベクターを介して Endostatin 遺伝子を Polyvinylpyrrolidone とともに共投与することにより増強される。エレクトロポレーション法を用いて IL-12 遺伝子を免疫不全肝癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、微小血管の数が低下し腫瘍の成長が抑制される<sup>109)</sup>。この効果は免疫応答性を有するモデルマウスでも同じようにみられる。RV を介して IL-12 遺伝子を頭頸部扁平上皮癌モデルマウスに投与すると、血管密度の低下及びアポトーシスの増加を伴い腫瘍が退行し腫瘍の成長が阻害される<sup>110)</sup>。非ウイルスベクターを介して IL-12 遺伝子を頭頸部癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、血管密度が減少し腫瘍細胞の増殖が抑制されアポトーシスが增加する<sup>111)</sup>。この効果は Flk-1 をコードする *Salmonella typhimurium* DNA ワクチンを経口で共投与することにより増強される。エレクトロポレーション法を用いて IL-12 遺伝子を転移性乳癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の容積及び微小血管密度が低下しリンパ管及び肺への転移が阻害される<sup>112)</sup>。

### 1.11 Tissue inhibitors of metalloproteinase

“Matrix metalloproteinase” (MMP) は細胞外

マトリックスの再構成に重要な役割を果たしており、生理的及び病理的な血管新生、病理的な腫瘍の成長及び転移に必須の成分である<sup>113)</sup>。“Tissue inhibitors of metalloproteinase” (TIMP) はこれら MMP の作用を阻害する<sup>114-116)</sup>。

パッケージング細胞を用いて TIMP-2 遺伝子を発現させるレトロウイルスを産生させ、その細胞と腫瘍原性を有する Ha-ras 導入ラット胎児繊維芽細胞をともにヌードマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が遅れる<sup>117)</sup>。また、その腫瘍の結合組織皮膜は厚く局所的な浸潤は見られない。AV を介して TIMP-1 あるいは TIMP-2 遺伝子を腹腔内臓癌モデルマウスに投与すると、浸潤が低下し生存期間が延長される<sup>118)</sup>。TIMP-1 遺伝子を膵臓癌細胞に導入しその細胞をマウスの皮下あるいは膵臓に投与し抗腫瘍効果が検討されている<sup>119)</sup>。膵臓に投与した場合、コントロールの細胞に比べ移植の効率は低く成長した腫瘍及び転移の数は少ない。また、アポトーシスが增加し、血管新生が減少する。皮下投与した場合は、腫瘍の発現が遅れる。RV を介して TIMP-2 遺伝子を乳癌細胞に導入しその細胞をヌードマウスに投与すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が遅れる<sup>120)</sup>。TIMP-2 RV 産生細胞を乳癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、肺転移腫瘍の大きさ及び数が劇的に減少する。AV を介して TIMP-3 遺伝子を肺癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が阻害される<sup>121)</sup>。またその治療効果は TIMP-1 あるいは TIMP-2 遺伝子を用いた場合よりも高い。ヒトカボジ肉腫細胞に AAV を介して TIMP-1 遺伝子を導入し、ヌードマウスに移植するとコントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が顕著に抑制される<sup>122)</sup>。同様に、腫瘍担癌モデルにおいて直接腫瘍に投与すると腫瘍容積の拡大が顕著に抑制される。

### 1.12 Platelet factor 4

“Platelet factor 4” (PF4) は *in vitro* で内皮細胞の増殖を阻害し *in vivo* の実験モデルで血管新生及び腫瘍の成長を阻害する<sup>123-125)</sup>。AV を介して可溶性 PF4 遺伝子を大脳内神経腫モデルマウスに投与すると、腫瘍内の血管が低下し成長が遅くなるとともに血管新生が阻害され生存期間が延長する<sup>126)</sup>。RV を介して PF-4 遺伝子あるいは PF-4 遺伝子の 17-70 番目までの遺伝子を扁平上皮癌細胞

あるいは頭頸部扁平上皮癌細胞に導入しそれらの細胞をヌードマウスに投与すると、コントロールの細胞に比べて血管の数及び腫瘍の容積が低下するとともに腫瘍の成長が阻害され生存期間が延長する<sup>127-129</sup>。

### 1.13 Interferon-inducible protein 10

“Interferon-inducible protein 10” (IP-10) は *in vivo* において強力な抗血管新生活性を有することが明らかになった免疫調節ケモカインである<sup>130</sup>。

RV を介して IP-10 遺伝子を皮下腫瘍モデルマウスに投与すると、腫瘍の血管形成及び増殖能が低下し皮下腫瘍及び転移領域における腫瘍の成長が阻害される<sup>131</sup>。RV を介して IP-10 遺伝子を黒色腫モデルマウスの静脈及び腫瘍内に投与すると腫瘍の拒絶が起き生存期間が延長する<sup>132</sup>。この効果は Endostatin 遺伝子よりも高い。RV を介して IP-10 遺伝子を黒色腫細胞に導入しその細胞をヌードマウスの皮下に投与すると、コントロールの細胞に比べて微小血管密度が低下し腫瘍の成長が阻害される<sup>133</sup>。

### 1.14 16-kDa Prolactin fragment

“16-kDa Prolactin fragment” (16-kDa PRL) は野生型である 23-kDa prolactin のタンパク質の分解的切断により生じたものであり、抗血管新生活性を有する<sup>134</sup>。

AV を介して 16-kDa PRL 遺伝子を膀胱癌細胞に導入しその細胞をマウスに投与すると、腫瘍の形成能が減少する<sup>135</sup>。

### 1.15 Tumstatin

Tumstatin は 4 型コラーゲン  $\alpha 3$  鎖の非コラーゲン領域である。Tumstatin は血管新生を抑制し<sup>136</sup>、いくつかの異なるモデルマウスにおいて腫瘍の成長を抑制する<sup>137-139</sup>。

Tumstatin 遺伝子の全長 (1-232) あるいは C 末端領域 (183-203) の遺伝子を黒色腫細胞に導入しその細胞を皮下に投与すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍の成長が減少する<sup>140</sup>。プラスミドを介して Tumstatin 遺伝子を Gemcitabine とともに結腸癌及びルイス肺腫瘍モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の血管新生が阻害されアポトーシスが促進され腫瘍の成長が阻害される。その抑制効果はそれぞれ単独で投与した場合に比べて強い<sup>141</sup>。ヒトテロメラーゼ遺伝子のプロモーターを有する AV を介して RGD-tumstatin 遺伝子を皮下腫瘍の

モデルマウスに投与すると、腫瘍の血管密度が低下し腫瘍の成長が阻害される<sup>142</sup>。

### 1.16 Canstain

Canstain は 4 型コラーゲンの  $\alpha 2$  鎖の非コラーゲン領域である。Canstain は担癌モデルマウスにおいて腫瘍の成長を抑制する抗血管新生因子である<sup>143</sup>。9 コピーの低酸素応答配列を有する発現ベクターを介して Canstain 遺伝子を導入した肺癌細胞をヌードマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍は小さく微小血管は少ない<sup>144</sup>。Canstain 遺伝子発現ベクターをヒト血清アルブミンとカップリングさせ眼癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の転移が少なく転移した腫瘍の成長が阻害され平均生存期間が延長される<sup>145</sup>。

### 1.17 Vasostatin

Vasostatin は Calreticulin の N 末端領域 (1-180) であり担癌マウスにおいて腫瘍の成長を抑制する抗血管新生因子である<sup>146</sup>。プラスミドを介して Vasostatin 遺伝子を繊維肉腫あるいはルイス肺癌モデルマウスの筋肉内に投与すると、腫瘍の血管新生及び成長が阻害されアポトーシスが增加し生存期間が延長する<sup>147</sup>。エレクトロポレーション法を用いて Vasostatin 遺伝子を黒色腫モデルマウスの筋肉内に Cyclophosphamide と共投与すると、腫瘍の成長が阻害され生存期間が延長する<sup>148</sup>。AV を介して Vasostatin 遺伝子を脾臓癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の容積が小さく微小血管密度が低下する<sup>149</sup>。プラスミドを介して B7H3 及び Vasostatin 遺伝子を皮下肝臓癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍は根絶されて複数の異なる領域における腫瘍結節が完全に退行する<sup>150</sup>。なおこの効果は単独ではみられない。

### 1.18 Angiostatin

Angiostatin は Plasminogen の 38-kDa の断片でありマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍の成長及び転移を抑制する抗血管新生因子である<sup>151-153</sup>。

AV を介して Angiostatin 遺伝子を導入したグリオーマ細胞をヌードマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍の成長及び血管新生が抑制され、腫瘍細胞のアポトーシスが促進され、その結果腫瘍の成長が抑制される<sup>150</sup>。マウスにおいて生着したグリオーマあるいは乳癌の腫瘍内に AV を介して Angiostatin 遺伝子を導入すると腫瘍の中