

feedback loop for activation of TP53 by a potential tumor suppressor microRNA, MIR-34a. Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms & Model of Cancer meeting. Long Island, NY, USA, August, 2008.

7. Ogata-Kawata H, Tsuchiya N, Sugimura T, Nakagama H. MicroRNA profiling in human fetal normal colonic mucosa and colon cancer cell lines. 第31回日本分子生物学会年会、第31回日本生化学会大会合同大会、神戸、December 9 □ 12, 2008.
8. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 斎：化学物質で誘発される細胞障害性ストレスによるmicroRNAの発現プロファイルの変化とその大腸発がんにおける意義、第24回発癌病理研究会 2009.8.25-8.27
9. Fukuda H, Takamura T, Masuda Y, Kamiyama K, Ochiai M, Nakagama H：発がん物質 PhIP に対する細胞応答及同付加体部位での損傷乗越え DNA 修復の解析 DNA-damage checkpoint response to PhIP-exposure and translesion DNA synthesis at PhIP-dG、第68回日本癌学会学術総会 2009.10.1-10.3
10. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 斎：Changes of microRNA expression by chemically-induced cellular stress and its significance in colon、第68回日本癌学会学術総会 2009.10.1-10.3
11. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 斎：化学物質で誘発される細胞障害性ストレスによるmicroRNAの発現変動とその大腸発がんへの関与 Changes of microRNA expression by chemically-induced cellular stress and their relation to colon carcinogenesis、第38回日本環境変異原学会 2009.11.26-11.27

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. 出願 無

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

「GLP-1 受容体単クローン抗体の作成」に関する研究

分担研究者 山下克美 金沢大学医薬保健研究域 薬学系 准教授

研究要旨 本研究は、膵臓癌をはじめとする膵臓の初期病変を画像化する目的で、膵臓に主として発現するグルカゴン様ペプチド受容体 (GLP-1R) を標的とする単クローン抗体を用いたイメージングを計画した。2007 年度は、GLP-1R に FLAG タグを付した遺伝子を細胞へ導入し、ヌードマウスで移植腫瘍を形成させ、蛍光付加-抗 FLAG 抗体で画像化を試みた。しかしながら、GLP-1R タンパク質の細胞表面への移行効率が悪く、モデルシステムの検証には至らなかった。そこで、2008 年度は、GLP-1R の細胞外ドメインに対する単クローン抗体の作成を試みた。GLP-1R を昆虫細胞で発現させるべく、バキュロウイルスベクターへ遺伝子を導入し、受託によりタンパク質産生から単クローン抗体作製までを行った。しかしながら、研究期間終了までに単クローン抗体の作成には至っていない。今後、タンパク質産生を我々が行い、作成されたタンパク質を抗原にした、単クローン抗体作製を受託で行うことを計画している。一方、2008 年度より、初期病変中で生じる細胞ストレスをイメージングで検出することに着手した。細胞ストレスにより引き起こされる生化学反応のうち、ストレス応答性 MAP キナーゼである JNK により Cdc25B タンパク質の分解が誘発される現象の解析から、リン酸化された Cdc25B はユビキチン化に関わる β TrCP と結合することが判明したため、この結合をバイオイメージングにより検出する系の構築を行った。その結果、2009 年度には二分子蛍光相補 (BiFC) と呼ばれる方法で、効率よく細胞へのストレスを検出することが可能となった。実用化のためには検出感度を向上させることが必要であるが、初期病変から採取した細胞を用いて診断が可能となるよう、蛍光発生の特異性等を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

本研究では、膵臓の初期病変を検出するために、膵臓の島細胞で発現するグルカゴン様ペプチド 1 の受容体 (以下、GLP-1R) を標識単クローン抗体の標的とした画像化を試みることに主目的である。本プロジェクトを開始するまでに行われた研究では、GLP-1R を細胞へ発現させ、その細胞を用いて GLP-1R に対して親和性の高いペプチドや低分子化合物をスクリーニングすることで目的を達成しようと試みた。不成功に終わっていた。そこで代替法として単クローン抗体を用いた画像化を検討した。モデルシステムとして、GLP-1R に既存のタグ配列を付した遺伝子を細胞で発現させ、蛍光標識した市販の抗体を用いること、次に、細胞膜表面で発現する GLP-1R に対する単クローン抗体を作成し、これを用いて標的化することとした。GLP-1R に対する単クローン抗体の作製においては、細胞膜貫通タンパク質の発現が比較的容易な、バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いることとした。

また、初期病変細胞生じる細胞ストレスをバイオイメージングにより検出し診断に応用することを考え、検出法の構築に着手した。細胞にストレスが起きることにより進行する生化学反応を surrogate marker とし、これをバイ

オイメージングで検出する。本研究では、細胞へのストレスにより分解が促進される Cdc25B との分解に伴うユビキチン化を応用し、Cdc25B とユビキチン化タンパク質 β TrCP の相互作用を蛍光イメージングで検出することを行った。

B. 研究方法

【2007 年度】

GLP-1R-FLAG タンパク質発現細胞の画像化のために、市販の GLP-1R 遺伝子を購入し発現プラスミドを作成した。作成したプラスミドを、H-Ras 発現 NIH3T3 細胞 (a1-1 細胞) へ導入し、タンパク質の発現を FLAG 抗体によるウエスタンブロッティングにより確認したのち、安定発現細胞を分離した。分離した細胞を、一次抗体として抗 FLAG モノクローナル M2 抗体で処理し、さらに二次抗体として、AlexaFluor488 標識抗マウス IgG 抗体で処理し、FACS 解析により発現を確認した。FACS 解析にて、GLP-1R の細胞表面への発現が陽性と判断された細胞株について、細胞をヌードマウスへ移植し、腫瘍を形成させたのち、尾静脈より Cy5.5 標識 M2 抗体を投与し、投与後 2 時間および 5 時間の時点で蛍光標識 M2 抗体の腫瘍部位への集積を解析した

【2008 年度】

昆虫細胞（ヨトウガ細胞）の細胞中で GLP-1R を発現させるべく、バキュロウイルス発現系でベクターを構築し、昆虫細胞でのタンパク質発現を、C-末端に付加した FLAG ペプチドを用いて行確認した。

一方、細胞ストレスの検出系構築においては、Cdc25B の N-末端 175 アミノ酸を含む断片がストレスによる β TrCP との結合にまた、 β TrCP の C-末端側が Cdc25B との結合に必要な十分であることを利用し、GFP の N-末端断片に Cdc25B を、GFP の C-末端断片に β TrCP を融合させ、さらにこれらを一つのペプチドとして細胞内で発現させるために、GFP/N-Cdc25 : β TrCP-GFP/C 断片を発現するプラスミドを作成した。このプラスミドを、ストレス応答性 MAP キナーゼである p38 や JNK と共に細胞中で発現させ、蛍光の出現を観察した。

【2009 年度】

（抗 GLP-1R 単クローン抗体作製に関する研究）

前年度作成した GLP-1R 発現バキュロウイルスを用いて、タンパク質産生と抗体作成を受託に出したが、結果はまだ得られていない。

（細胞ストレスの蛍光イメージによる検出系構築に関する研究）

細胞ストレス検出系は、HeLa 細胞を用いてプローブ発現細胞を作成し、種々の薬剤を処理することによりストレス応答の蛍光イメージングによる検出を行った。

一方、PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路において mTOR の下流に位置する、CAP 依存性 mRNA の翻訳系制御因子間の相互作用を利用した、がん細胞で発現が亢進する PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路の活性化を検出する系の構築に着手した。即ち、非増殖状態では翻訳制御タンパク質である eIF4A と結合し、翻訳抑制活性を有する Pdc4 タンパク質が、増殖状態では、PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路の活性化により、mTORC1 によりリン酸化を受け活性化された、リボソーム S6 キナーゼ (p70^{S6K}) によりリン酸化され、ユビキチン化酵素 SCF ^{β TrCP} によりユビキチン化され分解される反応を適用した。また、相互作用の検出は、蛍光タンパク質（本研究では緑色蛍光タンパク質 GFP）を二分割した断片をこれらのタンパク質の相互作用を介して近接させる BiFC 法を応用した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組み換え実験計画は、金沢大学薬学系研究科のバイオセーフティー委員会から承認を受けて行った。

C. 研究成果

【2007 年度】

1) 50 クローンの薬剤耐性株から、ウエスタン解析により 25 クローンの陽性株を得た。さらにそれらの中からタンパク質の発現レベルの高いクローン 10 個を選択し、間接蛍光抗体法にて細胞膜表面における発現が高いクローンを 6 株得たこれらについて FACS 解析を行い、6 株中 3 株について有意に発現が検出された。このうち、特に高い発現が検出された 1 株について、ヌードマウスへ移植後の腫瘍における画像解析実験を行った。

2) 動物実験（投与後の短時間集積観察）：GLP-1R 発現 NIH3T3a1-1 細胞をヌードマウスの大腿部に接種した。コントロールとして、ベクター導入 NIH3T3a1-1 細胞を反対側に同様に接種した。7 日後に、Cy5.5 標識 M2 抗体を尾静脈より接種し増殖した腫瘍の画像解析を行った。Cy5.5 標識 M2 抗体投与後 5 時間において、GLP-1R 発現細胞により形成された腫瘍部位への抗体の集積は見られず、非特異的なコントロール腫瘍部位への抗体の集積のほうが高いという結果となった。抗体投与後 2 時間での測定結果も基本的に同様であった。さらに念のために行った他の二つの細胞表面発現陽性クローンについても、抗体の特異的な集積は見られないという結果となった。

【2008 年度】

1) 抗 GLP-1R 単クローン抗体作製：GLP-1R バキュロウイルスを作成し、ヨトウガの細胞中へ感染させ、GLP-1R の発現を確認した。これらの細胞をマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作成中である。現在まで、細胞培養液を用いてスクリーニング中であるが目的とするクローンは得られていない。

2) 細胞ストレスの蛍光イメージ検出系：GFP/N-Cdc25B- β TrCP-GFP/C を JNK とともに HeLa 細胞中で発現させると緑色蛍光が観察された。さらに、p38 についても同様に蛍光の出現を認めた。

また、GFP/N-Cdc25B- β TrCP-GFP/C を一過的に発現させた HeLa 細胞を NaCl やエトポシドで

処理すると蛍光が出現した。これらの薬剤は、このプローブで検出可能なストレスを細胞へ与えるものと思われる。

【2009 年度】

1) 細胞ストレスの蛍光イメージ検出系：細胞ストレス検出プローブである GFP/N-Cdc25B- β TrCP-GFP/C を、HeLa 細胞を用いて安定発現する細胞を分離した。恒常発現細胞においては、プローブタンパク質の発現レベルが低く、使用には適さなかったため、誘導発現細胞を Tet-ON 系を用いて作成したところ、蛍光顕微鏡での観察や FACS を用いた解析に耐えうる細胞株を分離した。種々の薬剤を用いた解析の結果、①薬剤投与後 24 時間で有意な蛍光が観察されること、②非遺伝毒性化学物質については細胞死即ち、細胞毒性の出現に伴って蛍光が観察されるものの、発がん性を有する化学物質においては細胞死を伴わないレベルで蛍光が出現することなどが判明した。

2) PI3 キナーゼ-Akt-mTOR パスウェイの活性化検出系：細胞ストレス検出系を応用し、GFP/N-Cdc25B- β TrCP-GFP/C の Cdc25B の断片を Pdc4 で置き換えたプローブを作成した。このプローブの有効性を検定するために、発がんプロモーターの TPA に応答して Protein kinase C 依存的に PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路の活性化が起きることが報告されている、HEK293 細胞にプローブ遺伝子を導入し、TPA 処理により蛍光が観察されるか否かを検討した。その結果、TPA 添加 24 時間後に蛍光顕微鏡下で細胞を観察したところ、プローブ導入細胞特異的に緑色蛍光が観察された。この緑色蛍光は、Protein kinase C 阻害剤の添加により阻害されたことから、TPA 依存的な PI3K-Akt-mTORC1-p70^{RGK} の活性化が抑制されたことが強く示唆された。

D. 考察

【2007 年度】

哺乳動物細胞において GLP-1R を細胞膜で発現させることは、通常の方法では困難であることが判明した。GLP-1R は、遺伝子導入細胞中では小胞体やゴルジ体と思われる部分に強く発現していたことから、発現に問題はなく、細胞膜への輸送過程に問題があると思われる。細胞膜で発現するタンパク質の、膜輸送配列等を利用して、細胞膜への標的化を検討する必要がある。

【2008 年度】

バキュロウイルス系を用いて昆虫細胞で GLP-1R を発現する試みは、まだ成否の結論が出ていない。市販の抗 GLP-1R 抗体は哺乳動物細胞で発現した GLP-1R を効果的には認識しないため、昆虫細胞においてどのような量の GLP-1R タンパク質が発現されているのかについて検討ができない。本研究では、それを克服するために FLAG タグを GLP-1R に付加してあるが、認識の程度が弱いようである。このプロジェクトの成否は、昆虫細胞の膜表面に GLP-1R が大量に発現することにかかっているため、この点を何らかの方法で検定する必要がある。

細胞ストレス検出系については、JNK や p38 などのストレス応答性 MAP キナーゼに対して効果的に応答することが確認されたことから、原理的には利用可能と思われる。今後は感度等を実用的なレベルに高める必要がある。

【2009 年度】

細胞ストレス検出プローブを恒常的に高発現する細胞が分離できなかったことから、このプローブは細胞毒性があると思われる。これは、誘導発現系を用いることにより克服できたが、感度的に満足できるものではない。今後は、高発現が見込めるアデノウイルス系等を用いる必要があるかもしれない。

PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 系は多くのがん細胞で発現亢進が認められることから、本パスウェイが活性化されているか否かを検定できれば、診断への応用が可能となる。本研究では、このパスウェイ上にあり、mTOR の下流に位置する p70^{RGK} の基質となり、 β TrCP によりユビキチン化される Pdc4 をプローブに用いることで本パスウェイの活性化を、蛍光イメージングにより検出することを試みた。現在は、TPA に応答して蛍光が観察されることを確認した。今後は、パスウェイ上の遺伝子の活性化により蛍光が検出されるか否かについて検討し、診断ツールとしての有用性を検討する必要がある。

E. 結論

本研究は、膵臓癌をはじめとする膵臓の初期病変を、イメージングにより検出するためのツールを探索することを目的として行われたものである。膵臓の島細胞に多く発現する GLP-1R を標的とする単クローン抗体を作成することを試みたが、現在まで目的とする抗体は

得られていない。GLP-1R に対する有効な抗体が市販されておらず、抗原に用いる GLP-1R 発現昆虫細胞の検定が困難であることが原因の一つであるが、逆にいえば、抗体が得られれば広い用途に応用できる可能性がある。GLP-1R を発現する昆虫細胞の作製を継続する必要がある。

一方、蛍光タンパク質を用いて膵臓細胞のストレスやPI3キナーゼ-Akt-mTOR系の活性化を検出する系の構築が進展した。これらの成果は、初期病変の画像化とは直接的には結び付かないが、蛍光イメージングを用いて細胞診断を行い有効なツールとなりうる。感度上昇や使いやすさ等、実用化へ向けた研究が望まれる。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Isoda M, Kanemori Y, Nakajo N, Uchida S, Yamashita K, Ueno H, and Sagata N.: The extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase pathway phosphorylates and targets Cdc25A for SCF^{β-TrCP}-dependent degradation for cell cycle arrest. *Mol Biol Cell* 20: 2186-2195, 2009.
 2. Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Poon RYC, and Yamashita K.: Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res* 69: 6438-6444 2009.
 3. Yamashita Y, Kasugai I, Sato, M Tanuma N, Yamashita K, Nomura M, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T, Katakura R, and Shima H.: CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. *J Neuro-oncol*: in press.
 4. Matsuura, K., Wakasugi, M., Yamashita, K., and Matsunaga, T.: Cleavage-mediated activation of CHK1 during apoptosis. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 25485-25491.
2. 学会発表
 1. 内田早苗、渡辺信元、松永司、中釜斉、山下克美：Degradation of Cdc25B induced by cellular stresses. 第 82 回日本生化学会大会 10.21-24, 2009. 神戸.
 2. 山下克美、内田早苗、松永司、落合雅子、中釜斉：遺伝毒性・非遺伝毒性化学発がん物質のバイオイメージングによる検出. 第 68 回日本癌学会学術総会 10.1-3, 2009. 横浜.
 3. 松永司、山下克美、若杉光生：癌細胞における DNA 損傷/複製ストレス後の Chk1 リン酸化の異常亢進. 第 68 回日本癌学会学術総会 10.1-3, 2009. 横浜
 4. 内田早苗、渡辺信元、工藤保誠、善岡克次、松永司、中釜斉、山下克美：JNK 誘発性 SCF^{β-TrCP} 依存的 Cdc25B ユビキチン化の分子機構. 第 68 回日本癌学会学術総会 10.1-3, 2009. 横浜.
 5. 内田早苗、渡辺信元、工藤保誠、松永司、中釜斉、山下克美：Sequence requirement for degradation of Cdc25B by SCF^{β-TrCP} in response to cellular stress. 第 32 回日本分子生物学会年会 12.9-12, 2009. 横浜.
 6. 内田早苗、松永司、渡辺信元、中釜斉、山下克美：Cdc25B の分解制御機構：上流 PEST 配列の寄与. 第 4 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 11.13-14, 2009. 熊本
 7. SCF^{β-TrCP} による Cdc25B の制御：内田早苗、善岡克次、工藤保誠、渡辺信元、松永司、山下克美；第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会；神戸・2008 年 12 月
 8. CDK 活性化フォスファターゼ Cdc25 の機能制御機構：山下克美、内田早苗、松永司、中釜斉；第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会；神戸・2008 年 12 月
 9. JNK-and SCF^{β-TrCP}-mediated destruction of Cdc25B controls cell cycle arrest by non-genotoxic stress : K. Yamashita, S. Uchida, and H. Nakagama; 8th International Conference on Protein Phosphatase, Maebashi, 2008, 11.
 10. Cdc25B の JNK および SCF^{β-TrCP} 依存的分解：内田早苗、工藤保誠、善岡克次、松永司、山下克美；第 67 回日本癌学会学術総会・名古屋・2008 年 10 月
 11. Degradation of Cdc25B by JNK-initiated and SCF^{β-TrCP}-mediated Ubiquitination; S. Uchida, Y. Kudo, K. Yoshioka, T. Matsunaga, K. Yamashita；第 60 回日本細胞生物学会大会・横浜・2008 年 6 月
 12. Uchida, S., Yoshioka, K., Matsunaga, T., Yamashita, K. Degradation of Cdc25A and Cdc25B by non-genotoxic stress. Joint Meeting

of the Japanese Society of Developmental Biology & the Japan Society for Cell Biology. Fukuoka, Japan. May, 2007.

13. Yamashita, K., Yoshioka, K., Matsunaga T., Nakagama, H., Ishizaka, Y. JNK targets Cdc25B for Degradation. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, Japan. October, 2007.
14. 内田早苗、善岡克次、松永司、山下克美. JNK phosphorylates Cdc25B and induces its degradation. 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会、合同大会、横浜、2007年12月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. 出願

発明の名称：Cdc25B と β -TrCP との特異的結合を利用した検出系

出願番号 特願 2008-306804

出願人：国立大学法人 金沢大学、

発明人：山下克美、内田早苗

出願日：2008, 12, 1

膵管がんモデル動物による早期診断法の開発

分担研究者 津田洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野

研究要旨 膵管がんの臨床症状の発現より早期に診断できるシステムを確立し、ヒトの膵がんの「早期診断モデル」として応用を試みる。Cre/loxP システムを用いた活性型 Hras^{V12} または Kras^{V12} コンディショナルトランスジェニックラット（Hras250 または Kras301/327）において、Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス（AxCANCre）を膵管内に注入することによって、不活性化状態で導入した変異 ras 遺伝子の発現を誘導し膵管がんを発生させた。発生した腫瘍より膵がん細胞株を樹立し、発光イメージングが可能ないように Luciferase 遺伝子を導入した。Luciferase 発現膵がん細胞を移植したヌードマウスで発光イメージングに成功した。今後、担がん状態の Hras250 または Kras301/327 ラットにおいて、*in vivo* の早期病変を検出する画像診断が可能となれば、本モデル動物は膵がんの早期診断・治療モデルとして有用であると考えられる。

A. 研究目的

膵がんは早期発見が最も難しいがんのひとつであり、大部分の患者は症状を来してから受診するために進行がんの状態での診断され、すでに切除できない場合が多く、予後不良の難治がんである。外科的に切除できたとしても、がんが小さなうちから他の臓器に浸潤・転移している例が多いため、膵がんの克服には早期発見と早期治療が重要である。

本研究においては、膵管がんの臨床症状の発現より早期に診断できるシステムを確立し、ヒトの膵がんの「早期診断モデル」として応用を試みる。これまでにラットに化学物質によって膵管がんを発生させたモデルは確立されていなかった。我々は、Cre/loxP システムを用いた活性型 Hras^{V12} または Kras^{V12} コンディショナルトランスジェニックラット（Hras250 または Kras301/327）において、Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス（AdeX/Cre）を膵管内に注入することによって変異 ras 遺伝子を活性化させて膵管がんを高率に発生させる方法をラットで初めて確立した（図1）。このモデルを用いて、治療後の5年生存率は5%という最も予後の悪い膵管がんを、臨床症状の発現より早期に診断できるシステムを確立し、ヒトの膵がんの「早期あるいは前臨床診断モデル」として応用を試みる。動物に変異 ras 遺伝子を膵管内で発現させて成熟動物に任意の時にがんを発生させ、早期膵がんのモデルとして血清、画像診断に用いる。まずは、Luciferase 遺伝子を導入したラット膵がん細胞株をヌードマウスに移植し、*in vivo* における発光イメージングを行い、*in vivo* での画像診断の可能性につい

て検討する。この膵がんモデルにおいて我々は既に別の研究において血清診断マーカーを同定している。本研究において、*in vivo* で膵がんの画像診断が可能となれば、血清診断と併せて精度の高い早期診断法を確立できる。

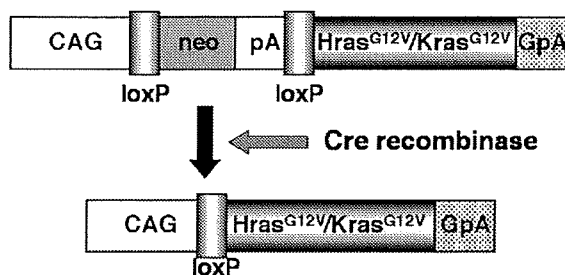


図1 活性型 Ras トランスジェニックラットの導入遺伝子

B. 研究方法

a. ラット膵癌の発生

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス（AdeX/Cre）を HEK293 細胞に感染させて、AdeX/Cre を増幅し精製した。精製した AdeX/Cre を、Hras250 または Kras327 トランスジェニックラットの総胆管から膵管内に注入（ 4×10^9 ifu/ml, 150 μ l）することによって膵管がんを発生させた。超音波診断装置は日立 EUB-8500 を用いた。

b. ラット膵癌細胞株（634NOD）の樹立

Hras250 ラットに発生した膵癌の腫瘍塊を 1-2 mm³ 角に細切り、NOD-SCID に移植した。腫瘍形成が認められた腫瘍結節を摘出し、組織片培養法により *in vitro* での培養を行った。初代培養後、ゆっくりと増殖する細胞集団が認められ、継代後も安定して増殖することから細胞株の樹立が確認された。さらに、この細胞株を NOD-SCID に移植したところ腫瘍原性が認められた。

c. Luciferase 発現細胞の樹立

ホタル Luciferase 発現ベクターである pGL4 (Promega) をラット膵がん細胞株 (634NOD) に Fugene 6 (Roche) を用いて導入した。pGL4 にはあらかじめ Hygromycin 耐性遺伝子を挿入したので、Hygromycin を加えベクターが導入された細胞を選別した後、細胞のクローニングを行った。各クローンにおける Luciferase の活性を Luciferase assay system (Promega) を用いて測定し、Luciferase 安定発現株を樹立した。

d. In vivo イメージング

樹立した Luciferase 発現ラット膵がん細胞株をヌードマウス (BALB/c nu/nu) の皮下に移植した。移植後、Luciferin を腹腔内投与 (150 mg/kg) し、超微弱発光・蛍光イメージングシステムである Night Owl (Berthold) を用いて移植腫瘍の可視化を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子組み換え実験においては「名古屋市立大学大学院医学研究科遺伝子組み換え実験等安全委員会」、動物実験においては「名古屋市立大学大学院医学研究科動物実験に関する指針」に基づく「動物委員会」の承認を経て実施された。

C. 研究成果

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AdeX/Cre) を Hras250 または Kras327 の膵管に注入することにより、種々の段階の膵管がんが、2~4 週間程度の短期間に発生した。このモデルにおける膵管がんは、病理学的解析により膵管、介在管および腺房中心細胞に由来し、腺房細胞からは腫瘍性病変は発生しないことが示唆された。発生した膵がんは超音波診断装置を用いて診断・画像化することが可能となっ

た。しかし、膵全体に広がった膵がんは検出できるが、小さな病変を診断することは困難であった。したがって、早期膵がんを検出するにはより鋭敏な方法を開発する必要があると考えられた。

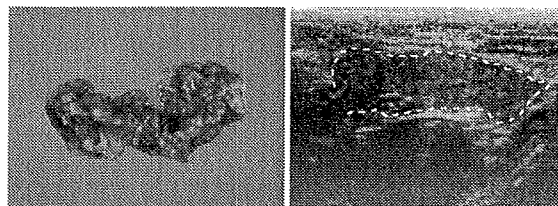


図 2 トランスジェニックラットに発生した膵癌 (左) とその超音波診断画像 (右)

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AdeX/Cre) を Hras250 または Kras301/327 ラットの膵管に注入することにより、種々の段階の膵管がんが、2~4 週間程度の短期間に発生した。このモデルにおける膵管がんは、病理学的解析により膵管、介在管および腺房中心細胞に由来することが示唆された。また、その組織像はヒト膵管がん極めて類似していた。

Hras250 ラットに発生した膵がんより樹立した膵がん細胞株 (634NOD) を NOD/SCID マウスに移植してできた腫瘍の組織像は、膵管細胞のマーカーである Cytokeratin19、Cytokeratin7 陽性であり、Hras250 ラットに発生した膵管がんとは形態学的に非常に類似しており膵管がん由来であると考えられた (図 3)。

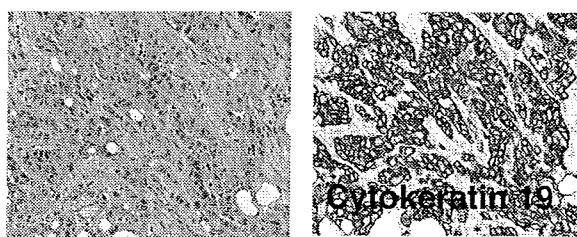


図 3 NOD/SCID マウスに移植された膵がん細胞株 (634NOD)

ラット膵がん細胞株 (634NOD) に Luciferase 発現ベクターを導入し、26 クローンを単離した。このうち、7 クローンで Luciferase 活性が認められた。Luciferase 活性がみられたク

ローンのうち最も高い Luciferase 活性を示すクローン (#4-21) を *in vivo* イメージングに用いた (図 4)。

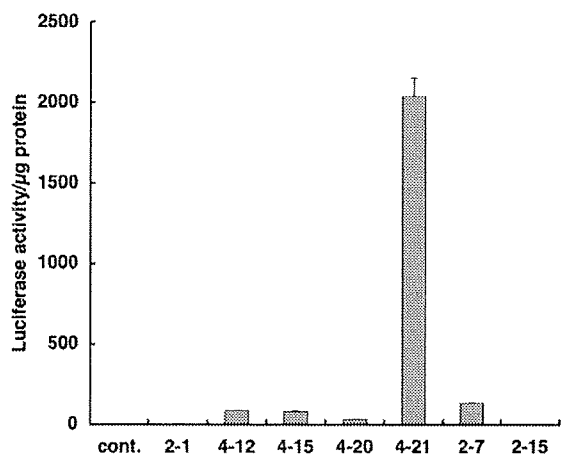


図 4 Luciferase 発現ラット膵がん細胞における Luciferase 活性

樹立した Luciferase 発現ラット膵がん細胞をヌードマウスに移植した。移植後、Luciferin を投与し腫瘍の発光イメージングを行った。その結果、Luciferase 発現膵がん細胞を移植したヌードマウスでは、移植直後からイメージングが可能となり、高感度に腫瘍細胞を検出可能となった (図 5)。

しかしながら、移植 1 週間における腫瘍重量と発光量との明らかな相関はなく、定量性はみいだせなかった。また、我々の同定したラット膵がん血清診断マーカーである N-ERC は、移植ヌードマウスでは血清中に微量に検出されるのみで、腫瘍重量または発光量との相関はみられなかった。

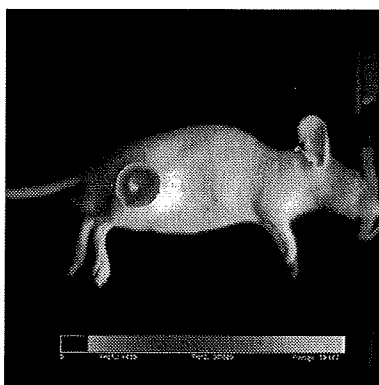


図 5. Luciferase 発現ラット膵がん細胞を移植したヌードマウスにおける腫瘍細胞のイメージング

D. 考察

我々の確立したラット膵がんモデルは、膵管由来の膵管がんを発生させることが可能である。ヒトの膵がんはほとんどが膵管由来の膵管がんであり、このモデルを用いればヒトに類似した膵管がんを 4 週間以内の短期間に発生させることが可能である。また、Luciferase 発現ラット膵がん細胞株を皮下に移植したヌードマウスにおいて、発光イメージングにより腫瘍細胞を可視化することが可能となった。しかし、今回の条件では腫瘍重量と発光量との相関はなく、定量性を上げる工夫が必要である。また、移植モデルだけでなく、ラットに発生した腫瘍でのイメージングが可能か検討することが必要である。膵臓は腹腔内の検出し難い場所に位置するため、光または蛍光の透過度の問題があり、さらなる検出感度を上げる検討が必要である。この膵がんモデル動物を血清診断マーカーの解析と、初期病変の画像解析の開発研究に供し、新たな膵がんの早期診断法を確立することが、今後の課題である。また、このラット膵管がんモデルにおいて我々が同定した血清診断マーカーと画像診断とを併せて、早期膵がん病変を検出することが可能となることが期待される。

E. 結論

活性型 Hras^{V12} または Kras^{V12} コンディショナルトランスジェニックラット (Hras250 または Kras327) は膵管がんモデルとして有用である。また、膵がん細胞のヌードマウスへの皮下移植モデルにおいて腫瘍の発光イメージングが可能であることが示された。活性型 Hras^{V12} または Kras^{V12} コンディショナルトランスジェニックラット (Hras250 または Kras327) においても画像診断が可能となれば、膵がんの早期診断・治療モデルとなり得る。また、Hras250 または Kras301/327 ラットは膵がんの画像診断の開発に有用なモデルである。

F. 研究発表

- 論文発表
- Tanaka, H., Tsuda, H., et al., Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. *Cancer Sci.*, 101: 341-346, 2010.
- Fukamachi, K, Tsuda, H., et al., An animal

model of preclinical diagnosis of
pancreatic ductal adenocarcinomas.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 390:
636-641, 2009.

2. 学会発表

1. 峯本譲, 深町勝巳, 津田洋幸, 濱田洋文, 石坂幸人. Detection of pancreatic cancers by an in vivo imaging system. 68回日本癌学会総会 2009年10月.
2. 田中創始, 大嶋浩, 深町勝巳, アレキサンダー・デビッド, 二口充, 城卓志, 津田洋幸. Possible identification of cytogenesis of pancreas cancer and lung cancer in the rat. 68回日本癌学会総会 2009年10月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. 出願
発明の名称: ヒト変異型 K-ras (K-rasV12)
遺伝子をコンディショナルに発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物及びその用途
出願番号 特願 2007-243313
出願人: 名古屋市立大学
発明人: 津田洋幸、深町勝巳、デイビッド・ビー・アレキサンダー
出願日: 2007. 9. 20

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

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
K. Kono, C. Kojima, N. Hayashi, E. Nishisaka, K. Kiura, S. Watarai, A. Harada	Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin.	Biomaterials	29	1664-1675	2008
Chie Kojima, Kouhei Yoshimura, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Kenji Kono	Synthesis and characterization of hyperbranched poly(glycidol) modified with pH- and temperature-sensitive groups.	Bioconjugate Chem.	20	1054-1057	2009
Eiji Yuba, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Kenji Kono	Carboxylated hyperbranched poly(glycidol)s for preparation of pH-sensitive liposomes.	J. Control. Release	-	-	in press
Tanaka, H., Tsuda, H., et al.	Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats	Cancer Sci.	101	341-346	2010
Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I, Masamoto K, Mileva M, Obata T, Higuchi M, Gadjeva V, Kanno I.	Multimodal silica-shelled quantum dots: direct intracellular delivery, photosensitization, toxic, and microcirculation effects.	Bioconjug Chem.	19	1135-42	2008

Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto K, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I.	Nitroxyl radicals as low toxic spin-labels for non-invasive magnetic resonance imaging of blood-brain barrier permeability for conventional therapeutics.	Chem Commun	53	53-55	2009
Aung W, Hasegawa S, Koshikawa M, Obata T, Ikehira, Furukawa T, Aoki I, Saga T.	Visualization of in vivo electroporation-mediated transgene expression in experimental tumors by optical and magnetic resonance imaging.	Gene Ther.	16	830-839	2009
Suzuki K, et al.	Exploration of target molecules for prostate cancer gene therapy.	The Prostate	67	1163-1173	2007
Ishii K, et al.	Selective gene transfer into neurons via Na,K-ATPase beta1. Targeting gene transfer with monoclonal antibody and adenovirus vector.	J. Gene Med.	10	597-609	2008
Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, Kamiya K, Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F, Nakagama H	Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine (PhIP) <i>in vitro</i> : Rev1 inserts dC opposite the lesion and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3' dC terminus.	J Biol Chem	284	25585-25592	2009
Okamoto K, Taya Y, Nakagama H	Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase.	FEBS Lett	583	2710-2714	2009
Fukamachi, K, Tsuda, H., et al.	An animal model of preclinical diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinomas	Biochem. Biophys. Res. Commun.	390	636-641	2009
Isoda M, Kanemori Y, Nakajo N, Uchida S, Yamashita K, Ueno H, and Sagata N	The extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase pathway phosphorylates and targets Cdc25A for SCF ^{b-TrCP} -dependent degradation for cell cycle arrest.	Mol Biol Cell	20	2186-2195	2009

Yamashita Y, Kasugai I, Sato, M Tanuma N, Yamashita K, Nomura M, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T, Katakura R, and Shima H	CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples	<i>J Neuro-oncol</i>	-	-	in press
Fukuda K, Abei M, Ugai H, Kawashima R, seo E, Eakayama M, Murata T, Endo S, Hamada H, Hyodo H, and Yokoyama KK..	E1A, E1B double-restricted replicative adenovirus at low dose greatly augments tumor-specific suicide gene therapy for gallbladder cancer.	Cancer Gene Ther.	16	126-136	2009
Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, Kamiya K, Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F, Nakagama H	Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine (PhIP) <i>in vitro</i> : Rev1 inserts dC opposite the lesion and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3' dC terminus.	J Biol Chem	284	25585-25592	2009
Okamoto K, Taya Y, Nakagama H	Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase	FEBS Lett	583	2710-2714	2009
Fukamachi, K, Tsuda, H., et al.	An animal model of preclinical diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinomas	Biochem. Biophys. Res. Commun.	390	636-641	2009
Tanaka, H., Tsuda, H., et al.	Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats.	Cancer Sci.	101	341-346	2010



Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin

Kenji Kono ^{a,*}, Chie Kojima ^a, Nobuyuki Hayashi ^b, Eiko Nishisaka ^a,
Katsuyuki Kiura ^c, Shinobu Watarai ^d, Atsushi Harada ^a

^a Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University,
1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

^b Department of Applied Materials Science, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University,
1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

^c Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan

^d Department of Veterinary Sciences, Graduate School of Life and Environmental Science, Osaka Prefecture University,
1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

Received 18 September 2007; accepted 11 December 2007

Available online 14 January 2008

Abstract

We have developed poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers that have poly(ethylene glycol) (PEG) grafts at all dendrimer chain ends. To obtain PEG-modified dendrimers with sites for conjugation of anticancer drugs for this study, we prepared PAMAM G4 dendrimers that have a glutamic acid (Glu) residue at every chain end of dendrimer; PEG chains were attached to amino groups of Glu residues. We then combined the anticancer drug adriamycin to side chains of the Glu residues using an amide bond, [PEG–Glu(ADR)-G4], or hydrazone bond, [PEG–Glu(NHN–ADR)-G4]. For the dendrimers bearing adriamycin through amide linkage, adriamycin was released only slightly at pH 7.4 and 5.5. Although a negligible level of release occurred at pH 7.4 for dendrimers with adriamycin via hydrazone linkage, a remarkable extent of adriamycin release was induced at pH 5.5, which corresponds to the pH of late endosome. These adriamycin-bearing dendrimers showed much lower toxicity to HeLa cells than did free adriamycin. However, compared to PEG–Glu(ADR)-G4, PEG–Glu(NHN–ADR)-G4 exhibited 7 times higher cytotoxicity, suggesting the importance of pH-sensitive hydrazone linkage for high cytotoxicity. Furthermore, the PEG-modified dendrimers exhibited an equivalent level of toxicity to that of adriamycin-resistant SBC-3/ADR100 cells and their parent adriamycin-sensitive SBC-3 cells.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Poly(amidoamine); Dendrimer; Drug delivery; Adriamycin; Poly(ethylene glycol); Chemotherapy

1. Introduction

Water-soluble polymer–drug conjugates prolong the half-life of drugs and potential drug accumulation in tumor tissues because of their enhanced permeability and retention (EPR) effect, which derives from the permeable blood vessel endothelium and the lack of lymphatics of tumor tissues [1–5]. Consequently, macromolecular drugs of appropriate size can

be targeted passively to tumor tissues without diffusing throughout the body. Reportedly, some polymers bearing adriamycin, such as poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide], are useful as polymeric prodrugs for chemotherapy [1–3].

In general, the molecular weight and polydispersity of polymeric prodrugs are known to affect their intravascular half-life and biodistribution [6–11]. Polymers with equal average molecular weights but having different molecular weight distributions can result in different tissue distribution [9,11]. In addition, conformational freedom of polymer chains can affect the polymers' biodistribution. The glomerular filtration rate of

* Corresponding author. Tel./fax: +81 72 254 9330.

E-mail address: kono@chem.osakafu-u.ac.jp (K. Kono).

polymers reportedly depends on the deformability of polymer chains: loosely coiled, more deformable linear polymers are eliminated at a greater rate than less deformable dendrimer-based polymers, probably because the deformability of the polymer backbone affects their permeation through pores in the renal filtration membrane [6,12].

Dendrimers are unique synthetic macromolecules which are globular with a highly branched structure. Their well-defined structure with a monodispersed molecular weight and low conformational freedom is considered important for precise targeting to cancer tissues through the EPR effect because these situations might decrease uncertainty related to the molecules' shape and size and also increase the accuracy of drug delivery using large vascular permeability and increased interstitial diffusion at the tumor tissues. Furthermore, high structural and chemical homogeneity of dendrimers might facilitate quality control of their drug conjugates in production, which is another advantage of using dendrimers.

Two strategies are used for application of dendrimers to drug delivery: *drug encapsulation* by dendrimers and *drug conjugation* to dendrimers. Although various anticancer drug molecules have been encapsulated in dendrimers, it is generally difficult to control retention and subsequent release of drug molecules in the dendrimers because the stability of dendrimer–drug complexes is strongly affected by the strength of their interaction and the water solubility of drug molecules [6,10]. For example, methotrexate molecule, with two carboxyl groups, is bound tightly to the interior of PEG-modified PAMAM dendrimer, which contains many tertiary amines in water. However, it is released quickly from the dendrimer under physiological conditions, where electrostatic interaction is weakened by shielding of their charges [13].

Conjugation of drugs to the dendrimer is an attractive approach for accurate drug delivery because a single dendrimer molecule can stably carry many drug molecules using many functional groups in the periphery and reach the target cancer site through EPR effects. For the appearance of therapeutic activity, it is necessary for them to release drug molecules at the target [6,10]. Therefore, stability and cleavability of linkage, which combines a polymer and a drug molecule, are important keys for effectiveness of the polymer–drug conjugates. To date, various drug molecules have been connected to polymer chains through an amide bond, but this bond is known to be very stable chemically under biological environments. Hydrazone linkage is a useful chemical bond for conjugation of polymers with drug molecules because this linkage is stable at physiological pH but is cleaved under mildly acidic conditions, e.g., inside of endosomes and lysosomes [14,15].

Various drugs have been conjugated to terminal groups of dendrimers. Their feasibility for targeted, specific drug delivery has been investigated extensively [10,16–19]. Considering that surface properties of dendrimer–drug conjugates might affect their distribution in the body, it is highly desirable that drug molecules be hindered by highly hydrophilic polymer chains, such as poly(ethylene glycol) (PEG), which avoid nonspecific interaction and increase their blood circulation time [20]. Szoka and coworkers attempted to incorporate

PEG chains into adriamycin-functionalized dendrimers: their designs were based on joining of dendrons with terminal adriamycin residues to either chain terminal moieties of a three-arm PEG star polymer [21] or core moieties of PEG-terminated dendrons [22,23]. However, for these drug-conjugated PEG–dendrimer hybrids, drug residues might not be fully covered with PEG chains because of their molecular architectures.

For an earlier study, we developed polyamidoamine (PAMAM) dendrimers with PEG grafts at all chain ends, in which the dendrimer surface was covered efficiently with biocompatible PEG chains [13,24,25]. For the present study, we attempted to prepare a new type of PEG-modified dendrimer–anticancer drug conjugate in which PEG chains efficiently shield drug molecules. We incorporated glutamic acid (Glu) residues between the dendrimer chain end and PEG grafts of the PEG-modified PAMAM dendrimers to introduce the sites for drug conjugation to these dendrimers. Then, adriamycin molecules were attached to the side chain of Glu residues via an amide or hydrazone bond. We examined toxicity of these adriamycin-conjugated PEG-modified dendrimers to various cancer cells, such as HeLa, SBC-3, and adriamycin-resistant SBC-3/ADM100 cells. Correlation between their cytotoxic activity and cleavability of the linkage of drug conjugation and their potential usefulness for treatment of adriamycin-resistant cancer cells are explained herein.

2. Materials and methods

2.1. Materials

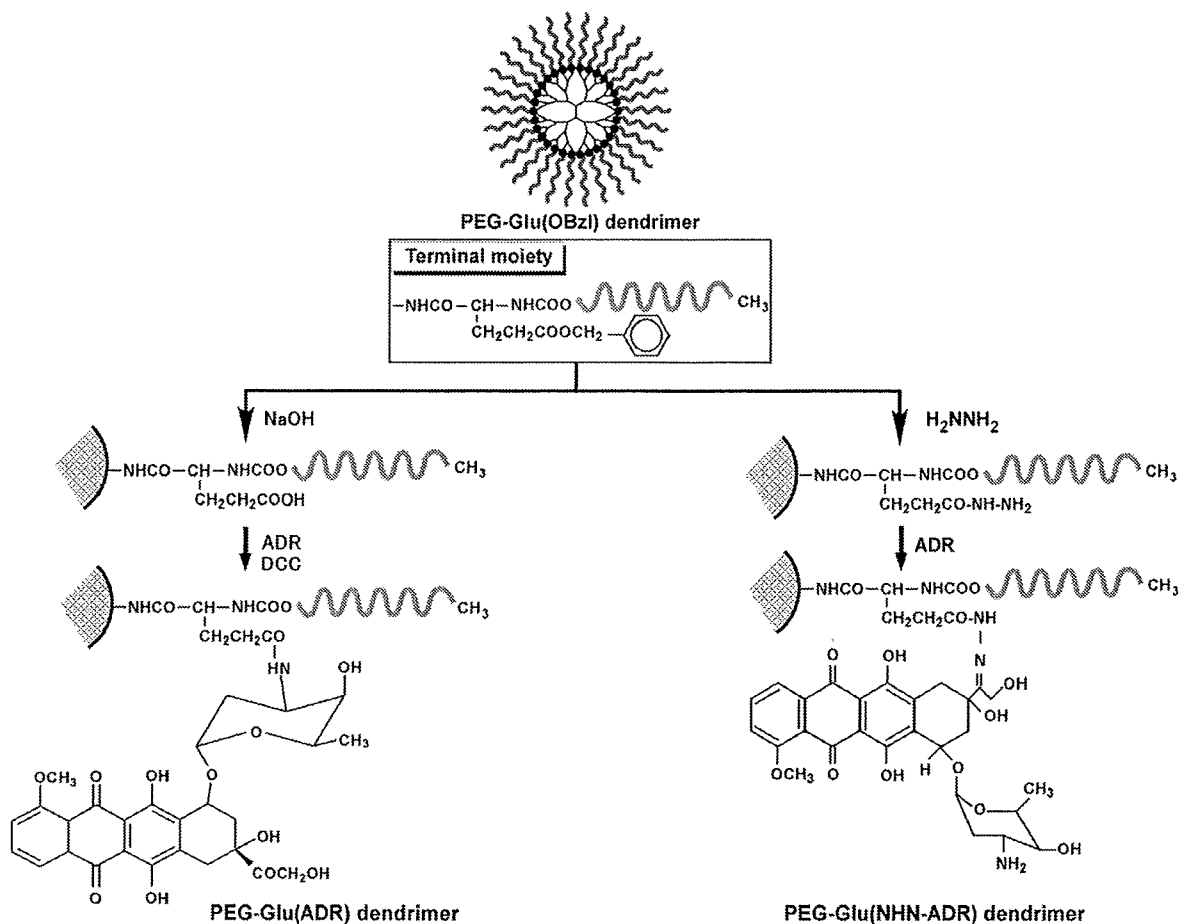
PAMAM G4 dendrimer and polyethylene glycol monomethyl ether with the number average molecular weight of 2000 were purchased from Aldrich Chemical (St. Louis, MO). *tert*-Butyl-oxycarbonyl glutamic acid γ -benzyl ester (Boc–Glu(OBzl)) was purchased from Peptide Institute (Osaka, Japan). 1,3-Dicyclohexycarbodiimide (DCC) and *N*-hydroxysuccinimide (HNS), trifluoroacetic acid (TFA) were obtained from Tokyo Kasei Kogyo (Tokyo, Japan), and triethylamine (TEA) and hydrazine were from Kishida Chemical (Osaka, Japan), respectively. Adriamycin was kindly gifted from Kyowa Hakko Co. Ltd. (Tokyo, Japan). PAMAM G0 dendrimer was synthesized using ethylenediamine and methyl acrylate purchased from Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan), according to the previous reports [26,27].

2.2. General procedure for the synthesis of PEG-modified dendrimers with adriamycin

We synthesized PEG-modified PAMAM G4 dendrimers with adriamycin via amide bond or hydrazone bond (PEG–Glu(ADR)-G4 and PEG–Glu(NHN–ADR)-G4) according to Scheme 1. Their counterparts with low generation, PEG–Glu(ADR)-G0 and PEG–Glu(NHN–ADR)-G0, were also prepared using PAMAM G0 dendrimer by the same procedure (Fig. 1). PEG–Glu(OBzl) dendrimers were synthesized according to our previous report [25,28]. These compounds were characterized by ¹H NMR whose spectra were recorded on JNM-LA-400 (JEOL, 400 MHz).

2.2.1. Synthesis of Boc–Glu(OBzl)-G0

Boc–Glu(OBzl) (13.3 mmol) was reacted with HNS (15.9 mmol), DCC (19.9 mmol) and TEA (19.9 mmol) in distilled *N,N*-dimethyl formamide (DMF) for 4 h on ice. PAMAM G0 dendrimer (2.21 mmol) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added, and the reaction mixture was stirred for 4 days at room temperature. These compounds were purified using a Sephadex LH-20 column with methanol as the eluent. The yield of Boc–Glu(OBzl)-G0 was 45%. ¹H NMR (DMSO): δ 1.35 (s, Boc), 1.74 and 1.90 (br, H β), 2.16



Scheme 1. Synthetic routes for PEG-Glu(ADR) and PEG-Glu(NHN-ADR) dendrimers.

(br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 2.36 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 2.50 (br, H γ), 2.61 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 3.08 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH and NHCH₂CH₂NHCO), 3.88 (br, H α), 5.07 (s, benzyl), 6.89 and 7.91 (br, NHCO), and 7.33 (s, phenyl).

2.2.2. Synthesis of Boc-Glu(OBzl)-G4

Boc-Glu(OBzl) (2.70 mmol) was reacted with HNS (3.24 mmol), DCC (4.05 mmol) and TEA (4.05 mmol) in distilled *N,N*-dimethyl formamide (DMF) for 4 h on ice. PAMAM dendrimer (28.2 μ mol) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added, and the reaction mixture was stirred for 4 days at room temperature. Boc-Glu(OBzl)-G4-dendrimer was purified using a Sephadex LH-20 column with methanol as the eluent. The yield of Boc-Glu(OBzl)-G4 was 73%. ¹H NMR (DMSO): δ 1.34 (s, Boc), 1.76 and 1.96 (br, H β), 2.17 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 2.36 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 2.61 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 3.06 (CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH and NHCH₂CH₂NHCO), 3.91 (br, H α), 5.06 (s, benzyl), 6.91, 7.80, 7.90 and 7.93 (br, NHCO), and 7.33 (s, phenyl).

2.2.3. Synthesis of PEG-Glu(OBzl)-G0

TFA (6 ml) was added to Boc-Glu(OBzl)-G0 (0.99 mmol) on ice and kept for 4 h to remove Boc groups. TFA was removed by evaporation and subsequent drying under vacuum. And then, methoxy PEG 4-nitrophenylcarbonate (5.94 mmol) was reacted with Glu(OBzl)-G0 in the presence of TEA (11.1 mmol) for 5 days to combine PEG chains to Glu residues via urethane bonds, as previously reported [8,16]. The yield of PEG-Glu(OBzl)-G0 was 15%. ¹H NMR (D₂O containing NaOD): δ 1.68 and 1.82 (br, H β), 2.07 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 2.24 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 2.42 (br, H γ), 2.61 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 3.12 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH

and NHCH₂CH₂NHCO), 3.19 (s, OCH₃), 3.49 (m, CH₂CH₂O), 4.03 (br, H α), 4.46 (s, benzyl), and 7.24 (s, phenyl).

2.2.4. Synthesis of PEG-Glu(OBzl)-G4

TFA (4 ml) was added to Boc-Glu(OBzl)-G4 (20.7 μ mol) on ice and kept for 4 h to remove Boc groups. TFA was removed by evaporation and subsequent drying under vacuum. And then, methoxy PEG 4-nitrophenylcarbonate (2.69 mmol) was reacted to Glu(OBzl)-G4 in the presence of TEA (4.08 mmol) for 5 days to combine PEG chains to Glu residues via urethane bonds, as previously reported [8,16]. The yield of PEG-Glu(OBzl)-G4 was 75%. ¹H NMR (D₂O containing NaOD): δ 1.68 and 1.85 (br, H β), 2.00 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 2.22 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 2.44 (br, H γ), 2.61 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 3.10 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH and NHCH₂CH₂NHCO), 3.19 (s, OCH₃), 3.52 (m, CH₂CH₂O), 4.01 (br, H α), 4.44 (s, benzyl), and 7.22 (s, phenyl).

2.2.5. Synthesis of PEG-Glu-dendrimers

One molar (405 or 291 μ l) NaOH solution was added to PEG-Glu(OBzl)-G4 (6.32 μ mol) or PEG-Glu(OBzl)-G0 (72.7 μ mol) dissolved in 6 or 8 ml of methanol on ice and the mixed solution was kept for 40 min. The mixture was dialyzed in distilled water for 6 h, in aqueous HCl solution (pH 3.5) for 12 h and again in distilled water for 6 h and then the solution was lyophilized. ¹H NMR of PEG-Glu-G4 (D₂O containing NaOD): δ 1.66 and 1.80 (br, H β), 2.09 (br, H γ), 2.22 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 2.42 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 2.61 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH), 3.10 (br, CH₂CH₂NCH₂CH₂CONH and NHCH₂CH₂NHCO), 3.15 and 3.19 (s, OCH₃), 3.52 (m, CH₂CH₂O), and 4.01 (br, H α). ¹H NMR of Boc-Glu-G0 (D₂O containing NaOD): δ 1.70 and 1.83 (br, H β), 2.11 (br, H γ), 2.24

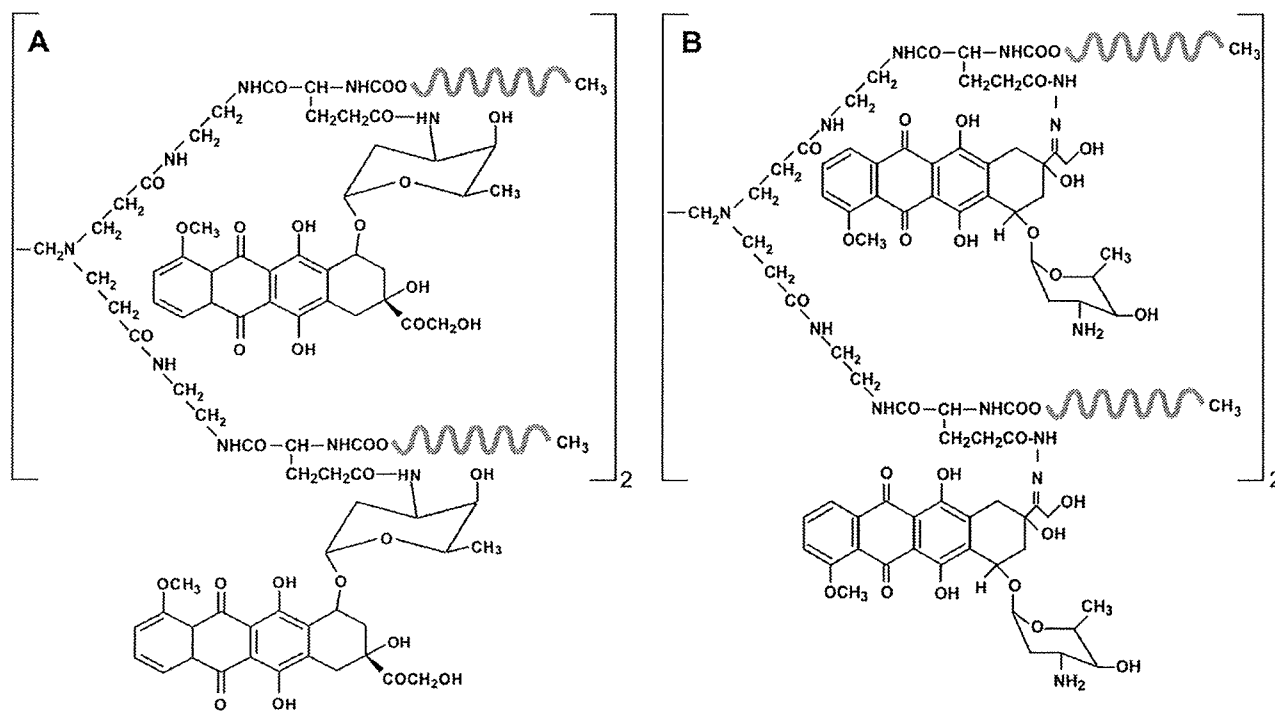


Fig. 1. Structures of PEG–Glu(ADR)-G0 (A) and PEG–Glu(NHN–ADR)-G0 (B) dendrimers. Dendrimers with four adriamycin residues are shown.

(br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.42 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.61 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 3.11 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ and $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.16 and 3.20 (s, OCH_3), 3.52 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), and 4.03 (br, $\text{H}\alpha$).

2.2.6. Synthesis of PEG–Glu(NHNH₂)–dendrimers

PEG–Glu(OBzl)-G4 (3.17 μmol) or PEG–Glu(OBzl)-G0 (48.2 μmol) was dissolved in 3 or 7 ml of DMF and was reacted with hydrazine (10.1 mmol) for 4 days at 35 °C under nitrogen [14,18]. These compounds were purified using a Sephadex LH-20 column with methanol as the eluent. Yields of PEG–Glu(NH_2NH_2)-G4 and PEG–Glu(NH_2NH_2)-G0 were 98 and 99%, respectively. ¹H NMR of PEG–Glu(NH_2NH_2)-G4 (D_2O): δ 1.74 and 1.94 (br, $\text{H}\beta$), 2.16 (br, $\text{H}\gamma$), 2.32 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.59 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.76 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 3.18 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ and $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.22 (s, OCH_3), 3.55 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), and 4.06 (br, $\text{H}\alpha$). ¹H NMR of PEG–Glu(NH_2NH_2)-G0 (D_2O): δ 1.76 and 1.94 (br, $\text{H}\beta$), 2.16 (br, $\text{H}\gamma$), 2.30 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.51 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.69 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 3.17 (br, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ and $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.23 (s, OCH_3), 3.54 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), and 4.07 (br, $\text{H}\alpha$).

2.2.7. Synthesis of PEG–Glu(ADR)–dendrimers (adriamycin conjugates via amide linkage)

PEG–Glu-G4 (0.666 μmol) was reacted with HNS (85.2 μmol) and DCC (85.2 μmol) in distilled DMSO for 2 h at 18 °C. PEG–Glu-G0 (11.0 μmol) was reacted with HNS (87.8 μmol) and DCC (87.8 μmol) in distilled DMSO for 2 h at 18 °C. Various molar ratios of adriamycin–HCl dissolved in DMSO containing TEA were added, and the reaction mixture was stirred for 2 days under nitrogen condition. The mixture was dialyzed for 3 days and lyophilized.

2.2.8. Synthesis of PEG–Glu(NHN–ADR)–dendrimers (adriamycin conjugates via hydrazone linkage)

Adriamycin–HCl and acetic acid were added to PEG–Glu($\text{NH}-\text{NH}_2$)-G4 or PEG–Glu($\text{NH}-\text{NH}_2$)-G0 dissolved in methanol at different ratios and the reaction occurred under nitrogen condition for 3 days. The mixtures were

purified using a Sephadex LH-20 column, and then were dialyzed for 6 h and lyophilized [14,18].

2.3. Characterization of adriamycin-conjugated PEG-modified dendrimers

The adriamycin contents of the conjugates were characterized by UV spectrophotometry (488 nm) [14]. The release of adriamycin from PEG–Glu-G4 in phosphate buffer saline (PBS) of pH 7.4 and 5.5 was estimated according to our previous report [13,24].

2.4. Cell culture

HeLa cells were maintained at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone). SBC-3 and SBC-3/ADM100 cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)–DMEM with 10% FBS [29].

2.5. Cytotoxicity of the conjugates

The HeLa cells (2×10^5 cells) incubated for 1 day in a 12-well plate were added to free adriamycin and the conjugates at varying concentrations. After 72 h incubation, survived cells were evaluated using MTT assay [27]. The SBC-3 or SBC-3/ADM100 cells (2×10^5 cells) incubated for 1 day in a 24-well plate were added to free adriamycin and the conjugates at varying concentrations. After 72 h incubation, survived cells were evaluated using MTT assay.

2.6. Subcellular localization of adriamycin

The HeLa cells (2×10^5 cells) incubated for 1 day in 85-mm glass dishes were added to 7.4 μM of free adriamycin or adriamycin-conjugated dendrimers. After 1 h incubation, cells were washed with PBS and incubated in DMEM with 10% FBS for 5 h. Then, the cells were washed with PBS and observed using a fluorescence microscopy (BX51WI; Olympus).

3. Results

3.1. Synthesis of PEG-modified dendrimers bearing adriamycin

We designed the PEG–Glu–G4 dendrimer, which has 64 chain terminals, as a PEG-modified dendrimer having a site for adriamycin attachment at every chain terminal of dendrimer moiety. We selected two types of linkage for drug conjugation: amide and hydrazone bonds to determine how properties of linkage affect the cytotoxic activity of the dendrimer–adriamycin conjugates. The PEG–Glu–G4 dendrimers bearing adriamycin through an amide or hydrazone bond were prepared according to Scheme 1.

Fig. 2 shows ^1H NMR spectra for the PEG–Glu(OBzl)–G4 and PEG–Glu(NHNH₂)–G4 dendrimers. The numbers of Glu(OBzl) residues and PEG chains incorporated to the dendrimer were evaluated from the integral ratios of signals of PAMAM dendrimer, Glu(OBzl), and PEG chain, as shown in

Fig. 2A. Fig. 2B shows the ^1H NMR spectrum of PEG–Glu(NH–NH₂)–G4, which was obtained by reaction of PEG–Glu(OBzl)–G4 dendrimer with hydrazine. Hydrazinolysis of esters has been used to introduce hydrazide groups to synthetic polymers and dendrimers [18,30]. After the reaction, signals derived from benzyl groups disappeared, indicating that benzyl ester of Glu residues were replaced completely by hydrazide groups. We also performed saponification of PEG–Glu(OBzl)–G4 dendrimer and confirmed that benzyl groups were removed completely after the reaction, as indicated using ^1H NMR. The PEG–Glu(OBzl)–G0 and PEG–Glu(NHNH₂)–G0 dendrimers, which have four chain terminals, were also prepared using the same procedure as that used for small molecular-size controls. Compositions of these PEG-modified dendrimers are presented in Table 1.

After removal of benzyl ester groups of Glu residues through saponification or hydrazine treatment, the resultant PEG-modified dendrimers with carboxyl or hydrazide groups were reacted with adriamycin molecules at varying ratios.

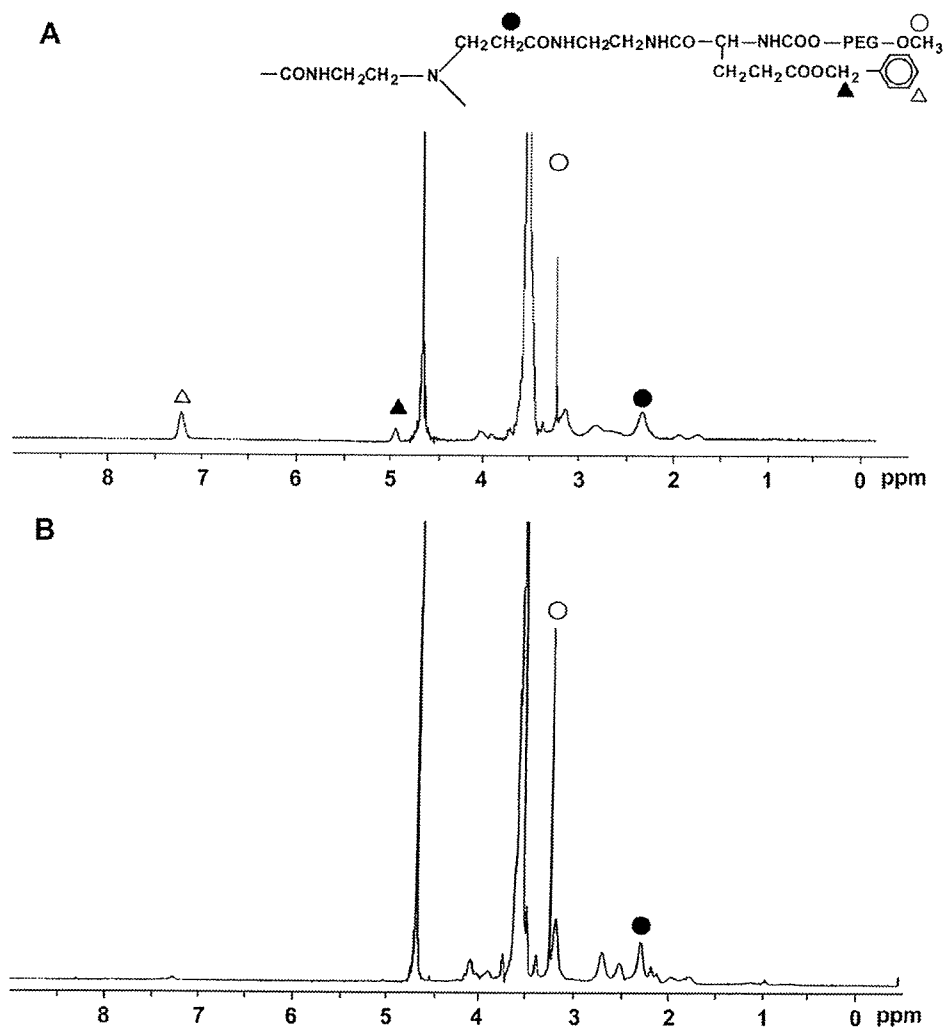


Fig. 2. ^1H NMR spectra for PEG–Glu(OBzl)–G4 (A) and PEG–Glu(NHNH₂)–G4 (B) dendrimers in D₂O.

Table 1
Characterization of PEG–Glu(OBzl)–dendrimers and their conjugates with ADR

Dendrimer	End group	Glu(OBzl) ^a	PEG ^a	ADR	
				Amide	Hydrazone
PEG–Glu–G4	64	64	66	20	18
PEG–Glu–G0	4	3.8	4.5	3.4	2.8

^a Determined by ¹H NMR.

The adriamycin molecules were linked to the side chains of Glu residues via amide or hydrazone bonds. These adriamycin-attached dendrimers were designated, respectively, as PEG–Glu(ADR) dendrimers and PEG–Glu(NHN–ADR) dendrimers (Scheme 1). Fig. 3A shows the conjugation of adriamycin to PEG–Glu–G4 dendrimer through amide linkage. The number of adriamycin molecules per dendrimer increased with increasing amount of adriamycin in feed and reached 20 by the reaction at the adriamycin/dendrimer ratio of 40. A similar tendency was observed for the adriamycin–dendrimer conjugation via hydrazone linkage, although a much greater amount of adriamycin was required to obtain the conjugate with the same number of adriamycin molecules, than the amount of adriamycin for conjugation via amide bonding (Fig. 3B). We used these PEG-modified G4 dendrimers bearing 20 adriamycin molecules for evaluation of cytotoxic activity. In addition, we prepared their smaller counterparts and used them for cytotoxicity measurements. The numbers of adriamycin molecules per dendrimer and compositions of these adriamycin-conjugated PEG-modified dendrimers are shown in Table 1.

3.2. Release of adriamycin from PEG-modified dendrimers

Hydrazone bonds are known to be cleaved under mildly acidic conditions, but amide bonds are very stable under equivalent conditions [2]. We investigated the release behavior

of adriamycin from these dendrimers using dialysis of the PEG-modified G4 dendrimer bearing adriamycin in phosphate buffers at neutral and weakly acidic pH. Fig. 4 shows the percentage increase of adriamycin in the outer phase during dialysis of the dendrimer–adriamycin conjugates. Free adriamycin molecules permeated rapidly through the dialysis bag and transferred to the outer phase. However, permeation of adriamycin molecules was negligible for dialysis of the PEG–Glu(ADR)–G4 dendrimer at pH 7.4 and 5.5, indicating that the amide bond linking the dendrimer and adriamycin was very stable at both pH values (Fig. 4A). Similarly, PEG–Glu(NHN–ADR)–G4 releases adriamycin molecules only slightly at pH 7.4, indicating that the hydrazone bond is stable at this pH (Fig. 4B). However, a marked increase in adriamycin concentration in the outer phase was observed for dialysis at pH 5.5, indicating that adriamycin molecules were released efficiently from the dendrimer under the weakly acidic condition.

3.3. Cytotoxicity of adriamycin-bearing PEG-modified dendrimers against HeLa cells

Fig. 5 shows the viability of HeLa cells after incubation with various PEG-modified dendrimers bearing adriamycin or free adriamycin. As shown in Fig. 5A, the dendrimers having adriamycin through amide bond exhibited markedly lower cytotoxicity than free adriamycin. In addition, the toxicity of PEG–Glu(ADR)–G4 was lower than PEG–Glu(ADR)–G0, suggesting that their size influences their cytotoxic activity. Similarly, PEG-modified dendrimers bearing adriamycin via the hydrazone bond expressed lower cytotoxic activity than free adriamycin, whereas PEG–Glu(NHN–ADR)–G4 and PEG–Glu(NHN–ADR)–G0 showed almost equal cytotoxicity (Fig. 5B).

As a control, we also examined the toxicity of PEG-modified dendrimers without adriamycin, PEG–Glu–dendrimer or PEG–Glu(NH₂NH₂)–dendrimer. Almost no toxicity was

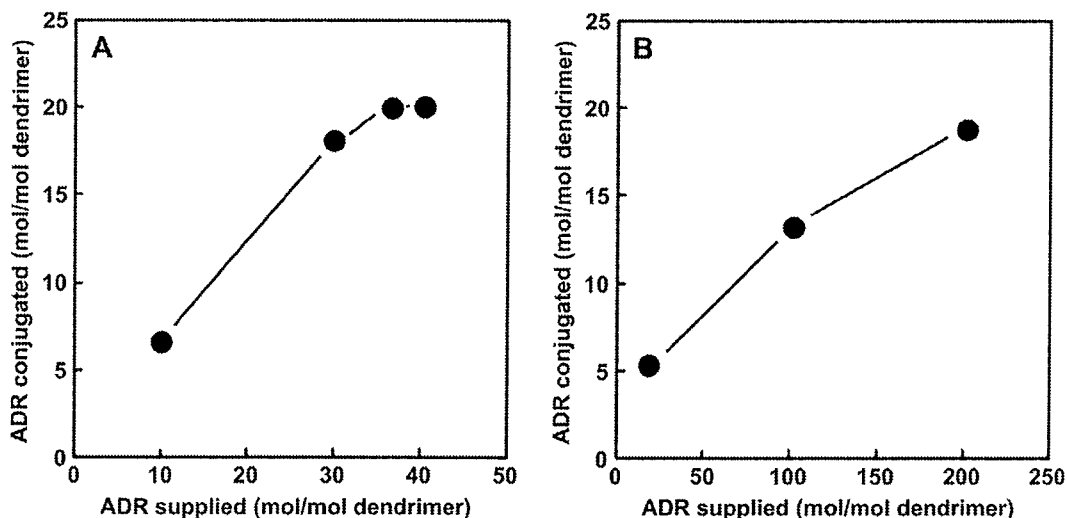


Fig. 3. Conjugation of adriamycin to PEG–Glu–G4 (A) and PEG–Glu(NHNH₂)–G4 (B).

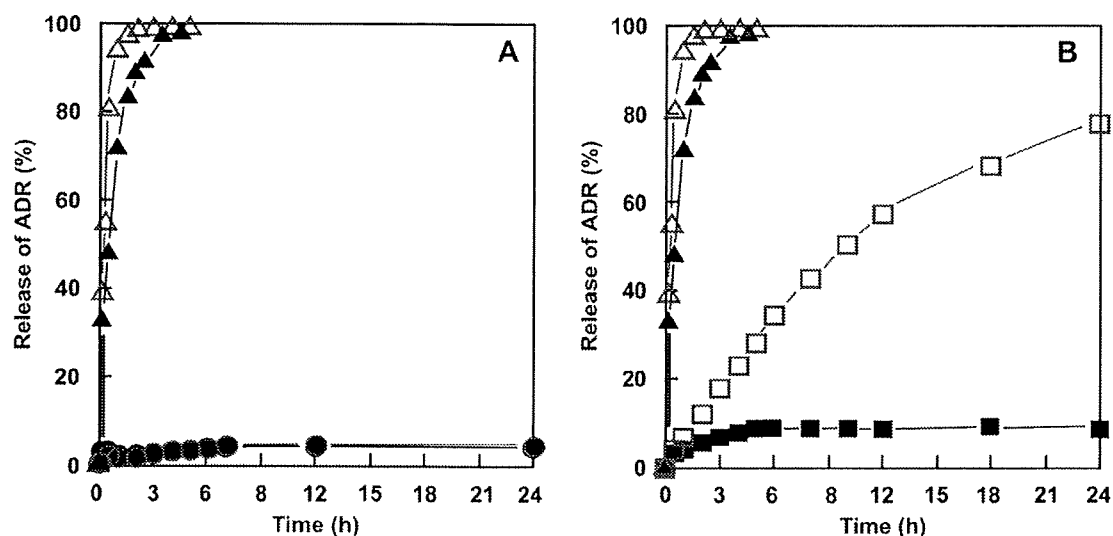


Fig. 4. Release of adriamycin from PEG-Glu(ADR)-G4 (A) and PEG-Glu(NHN-ADR)-G4 (B) in PBS at pH 7.4 (closed symbols) and 5.5 (open symbols). Profiles for free adriamycin are also shown (triangles). Adriamycin release (%) was evaluated from absorbance of adriamycin in the outer phase during dialysis of adriamycin-conjugated dendrimers and free adriamycin.

observed for both types of PEG-modified dendrimers under the experimental condition (data not shown). Therefore, the toxicity to HeLa cells was apparently resulted from adriamycin bound to PEG-modified dendrimers.

The IC_{50} values for the PEG-modified dendrimers bearing adriamycin through amide linkage [PEG-Glu(ADR)-G0 and PEG-Glu(ADR)-G4] and those through hydrazone linkage [PEG-Glu(NHN-ADR)-G0 and PEG-Glu(NHN-ADR)-G4] are shown in Table 2. Actually, PEG-Glu(ADR)-G4 was much less toxic than other dendrimers. In addition, PEG-Glu(NHN-ADR)-G4 exhibited the highest toxicity among these adriamycin-bearing dendrimers, of which cytotoxicity was of the same order as that of the free adriamycin.

Comparing adriamycin-bearing dendrimers with amide and hydrazone linkages of the same generations, the cytotoxicity of adriamycin-loaded G4 dendrimers differed greatly, but a difference in cytotoxicity between both the G0 dendrimers was not great, which suggests that cleavability of the linkage in G4 dendrimers, but not in G0 dendrimers, was crucial for the action of adriamycin.

3.4. Subcellular localization of adriamycin-bearing PEG-modified dendrimers in HeLa cells

Free adriamycin molecules are known to permeate the plasma membrane via simple diffusion, then enter the nucleus

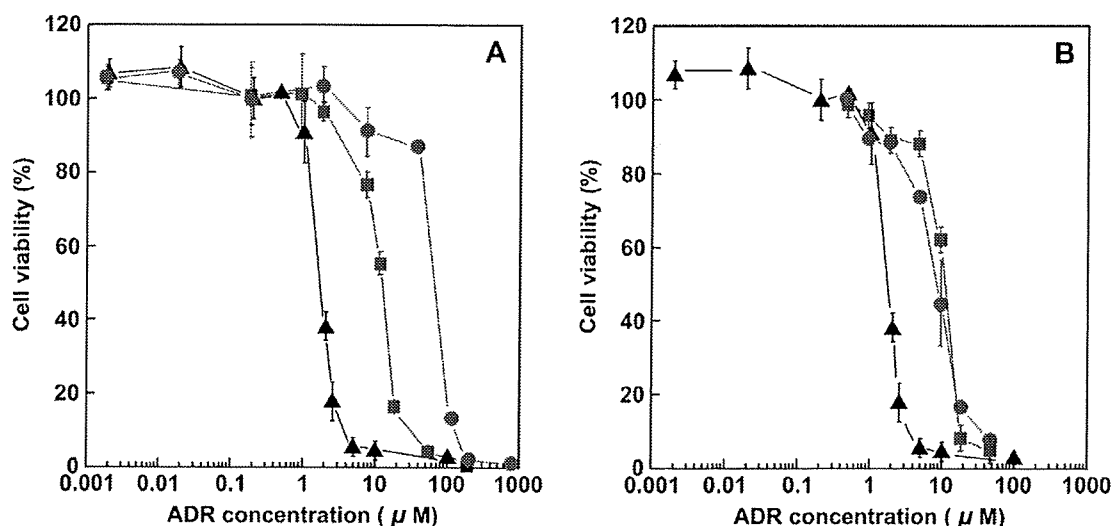


Fig. 5. Cytotoxicity of PEG-Glu(ADR) dendrimers (A) and PEG-Glu(NHN-ADR) dendrimers (B) to HeLa cells. Free adriamycin, G4 and G0 dendrimers were shown in triangles, circles and squares, respectively. Cell viability was expressed as the percentage of the untreated control cells.