

200912034B

別添1

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

がん微小環境制御を併用したナノドラッグによる難治性固形がん治療の実現

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 狩野 光伸

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告 がん微小環境制御を併用したナノドラッグによる難治性固形がん治療の実現	-----	1
狩野 光伸		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	20
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	23

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総合研究報告書

がん微小環境制御を併用したナノドラッグによる難治性固形がん治療の実現

主任研究者 狩野光伸 東京大学大学院医学系研究科分子病理学 講師

研究要旨

腫瘍標的ナノDDS開発において固形癌での蓄積向上は大きな課題であるが、現状は、一部の腫瘍でしか十分な効果は証明されていない。本研究ではナノDDSの効果を規定するEPR効果の要素、すなわち血管など腫瘍間質の構成要素を特異的に制御することで、一般臓器への薬剤蓄積の増悪なく、特に難治性固形癌でのナノDDS貯留増強を実現することを目的とする。

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

我々は、既に膀胱癌・胃癌の動物モデルにおいて、TGF- β 阻害剤を用いた血管新生制御の併用によってナノDDSの効果増大が見られることを証明してきた。本研究では続いて、漏出性腫瘍血管を持つC26大腸癌モデルとそうでないBxPC3膀胱癌モデルを用いて、各種阻害剤の効果を比較した。この結果、C26腫瘍に対してはVEGF阻害が、BxPC3腫瘍ではTGF- β 阻害剤がナノ粒子蓄積増強効果を示すことが明らかにされた。関連して組織学的には、血管の壁細胞による被覆が強いほど元来の漏出性が低く、TGF- β 阻害剤を併用した効果が発揮されることが判明した。この結果から、壁細胞被覆の強い血管を持つ腫瘍においては、本研究の戦略がふさわしいことが示唆された。またBxPC3モデルにおいて、分担研究者により開発された遺伝子発

現ベクター内包およびMRI造影剤内包ナノ粒子に対して、TGF- β 阻害併用時のみ腫瘍内への有意な蓄積が起り、効果が観察されることを示した。さらに、ヒト由来腫瘍細胞株を免疫不全動物に移植するBxPC3モデルに加えて、マウス自発発癌膵癌モデル由来の癌細胞株および線維芽細胞株を、FGF2を混じた状態で正常免疫であるC57BL6マウスに皮下移植することによって、間質豊富かつ血管密度および漏出性の低いモデルが成立することを見出した。これに基づき適応患者の絞込みを行うべく、ヒト腫瘍病理標本に対する血管壁細胞被覆程度の解析を行った結果、膵癌、スキルス胃癌、悪性胸膜中皮腫については同様の血管構築を持ち、本研究による方法の適応対象となりうることを示唆された。なお、各種毒性解析を行った結果、TGF- β 阻害剤の併用投与により有意な体重変化や各種異常所見の出現は認めなかった。

また、分担研究者により、将来的にこれらの難治性固形腫瘍における有効な治療診断ツールとなりうるような新規ナノDDSの開発も進め、高分子ミセル型ナノキャリアの最適化と高機能化を目指した。まず白金錯体制ガン剤であるDACHPtを内包した高分子ミセルを構築し、その基本性能の検証を行った。高分子ミセルを構成するブロック共重合体の組成を最適化することによって、固形ガンに効果的に集積し、優れた抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。次に、白金錯体制ガン剤であるDACHPtを内包した高分子ミセルの生体内における崩壊挙動を明らかにするために、ミセルを構成するブロック共重合体を二種類の蛍光色素で標識し、二重蛍光標識ミセルを調製した。この二重蛍光標識ミセルを利用して、その細胞内取り込みをTime-lapse蛍光顕微鏡観察によって評価したところ、DACHPt内包ミセルは会合状態で細胞内に取り込まれ、約55時間後に後期エンドソーム/リソソームで崩壊することが明らかとなった。さらに、白金錯体制ガン剤であるDACHPtと同時に水溶性薬剤を送達できるナノキャリアとして高分子-金属錯体形成を駆動力とする中空ナノ粒子(プラチナソーム)の構築を行った。

研究分担者

氏名	所属研究機関名	職名
西山 伸宏	東京大学	准教授

A. 研究目的

ナノ粒子の腫瘍内蓄積については、現在多用されているC26マウス大腸癌細胞皮下移植モデルなどでの腫瘍血管における知見すなわち、全ての腫瘍血管が数百nmの物質に対して漏出性であるという前提で開発されてきた。このような動物モデルでは、ナノ粒子単独でも治療効果が見られる。

また、同じ前提にしたがって、VEGF阻害剤を用いることにより薬剤の腫瘍内移行を増加させる方法が提唱され、血管正常化説として知られている(Jain et al, Science, 2005 他)。それによれば、物質の腫瘍内移行を増加させる方法として、腫瘍血管を血管内皮増殖因子(VEGF)阻害剤によって正常化するのが妥当であるとされる。

しかし実際には、ナノ粒子単独による治療効果は、多くのヒト腫瘍において証明されておらず、ことさら難治性固形癌では証明されていない。したがって、難治固形癌をはじめ、ヒト腫瘍の血管構築は、一般的に動物モデルでは見られる血管構築を持たない可能性が考えられる。ここで我々の研究(Kano et al. PNAS, 2007)は、一般的な動物モデルよりも腫瘍間質が豊富な、膵がんおよび胃がんのモデルを用いて、これらモデルにおいては腫瘍血管の漏出性は実は高くなく、逆にTGF- β 阻害剤を用いて漏出性を増加させた方が、ナノ粒子の腫瘍蓄積が増強される可能性を示した。当論文発表後には、米国国立がん研究所(NCI)

のニュースや、Nat Rev Drug Disc誌などでハイライトされ、国際的注目を浴びた。

そこで本研究は、これら腫瘍血管を含む腫瘍微小環境すなわちEnhanced Permeability and Retention Effect (EPR効果)の要素に着目し、その制御の併用により、副作用の増悪なく難治性固形癌でのナノDDSの薬効を増強することを目指す。当研究では、次のことを明らかにしながら、ナノ粒子による難治癌治療を実現するための十分な前臨床的知見を得ることを目的としている。すなわち、ナノ粒子-TGF β 阻害剤併用について、1. 適応癌種は、2. ナノ粒子単独でも蓄積する癌での効果は、3. 他シグナル阻害に比べたメリットは、4. 長期毒性は、そして、5. 腫瘍リンパ管制御の影響は、6. 難治癌微小環境の動物モデル構築、である。

また本研究では、将来的にこれらの難治性固形腫瘍における有効な治療診断ツールとなりうるような新規ナノDDSの開発も進めた。主には、白金錯体制ガン剤である dichloro (1,2- diaminocyclohexane) platinum(II)(DACHPt)(オキサリプラチンの中間活性体)を内包した高分子ミセルの最適化と新規合成を分担研究者が行った。

B. 研究方法

当研究では、ナノ粒子による難治癌治療を実現するための十分な前臨床的知見を得ることを目的として、次の4項目を主に研究

を進めた。すなわち、ナノ粒子-TGF β 阻害剤併用について、1. 適応癌種は、2. ナノ粒子単独でも蓄積する癌での効果は、3. 他シグナル阻害に比したメリットは、4. 長期毒性は、である。さらに、5. 腫瘍リンパ管制御の影響は、6. 難治癌微小環境の動物モデル構築、についても研究を行った。

まず、2. 難治性でない固形癌でも増強効果があるか。1. 膵癌・胃癌以外の難治性固形癌での併用効果はあるか。5. がん新生リンパ管制御はナノDDSの分布増強効果があるか。以上から着手した。

2に関して、C26マウス大腸癌細胞を1匹あたり 1×10^6 細胞をBLAB/cマウスに皮下移植したモデルを用いて検証を行った。まず分子量200万Daの蛍光標識デキストランを用いて、TGF- β 阻害の効果を検討した。また、PEG化リポソーム内包アドリアマイシン（ドキシル®）8mg/kgをTGF- β 阻害剤と併用して投与方法の効果を検討した。TGF- β 阻害剤の投与量は1mg/kgをナノ粒子と同時腹腔内投与とした。

次に、5に関しては、リンパ管新生促進増殖因子であるVEGF-Cを吸着する可溶性VEGFR3のレンチウイルス発現コンストラクトを作成し、可溶性VEGFR3安定発現ヒト膵癌細胞(BxPC3)株を樹立、この細胞株をBALB/c nudeマウス（以下ヌードマウス）への皮下移植することにより、リンパ管の減少を伴う腫瘍モデルを樹立した。これに前

述のドキシルをTGF- β 阻害剤と併用して投与した。また、ヒトスキルス胃癌細胞株OCUM-2MLNは、ヌードマウス胃壁に同所移植した場合、大量の腫瘍内リンパ管新生を惹起し、所属リンパ節への転移を起こす。この系を用いて、消炎鎮痛剤であるCOX2阻害剤を投与することにより、リンパ管新生の制御が可能であるかどうかを検討した。

1に対して、ヒト胆管細胞癌細胞株OCUG-1などのヌードマウス移植モデルを、組織学的に、及び2MDaデキストランにより生理学的に検討した。

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

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

加えて、4.毒性評価に関しては、ヒト膵癌由来BxPC3細胞株を移植したヌードマウスに対して、分担研究者によって供給されたDACHPt内包ナノDDSを投与し、TGF- β 阻害剤1mg/kg併用投与の有無で、体重変化を投与開始後16日間追跡した。なお、DACHPt

(ダハプラチン) は、白金系抗腫瘍剤であるオキサリプラチンの中間活性体である。

また、非担癌ヌードマウスに対して同ナノDDSを継続投与し、これに対して各回TGF- β 阻害剤1mg/kg併用投与の有無で、2か月間継続観察し、体重変化及び各種異常所見の出現がないかを確認した。

さらに¹¹¹Inを内包したミセルを用いて、TGF- β 阻害剤1mg/kg併用投与の有無で体内各臓器への蓄積が変化しないかを、ラジオグラフィーを用いて検討した。

最後に、ヒトにおける1. 適応癌腫を確定するために、ヒト病理標本を用いて組織学的評価を行った。膵癌、胃癌（通常胃癌とスキルス胃癌双方）、大腸癌（組織型はmed, int, sciのうち最も症例数が多いintの症例）、卵巣癌、胸膜中皮腫について、各5症例以上の病理標本に対して、連続切片を作成し、通常のHE染色、血管内皮を染色するCD34の免疫染色、ペリサイトと考えられる血管外周に存在するsmooth muscle actin (SMA)の免疫染色を行った。

次に、分担研究者においては、次のA~Cを行った。

A1. DACHPt内包ミセルの調製

ミセル調製に用いるブロック共重合体として、ポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸ブロック共重合体(PEG-P(Glu))を用いた。PEG-P(Glu)は、 ω 末端にアミノ基を有するポリエチレングリコール(PEG-NH₂:分

子量12,000)を開始剤として、 γ -ベンジル-L-グルタメート N-カルボン酸無水物 (BLG-NCA)を40°C、DMF中で開環重合し、得られたPEG-PBLAを0.5N NaOH水溶液中で加水分解することによって調製した。本研究では、P(Glu)の重合度が異なる3種類の組成のPEG-P(Glu)を合成したが、¹H-NMRならびにGPC解析によって、得られたブロック共重合体のP(Glu)の重合度は20, 40, 70であり、非常に狭い分子量分布(Mw/Mnが1.1以下)を有することが確認された(以下、得られた組成を12-20, 12-40, 12-70と表記する)。DACHPt内包ミセルは、DACHPtに水中で硝酸銀(AgNO₃)を作用させ、塩化銀の沈殿をフィルターを用いて除去することによって、DACHPtを活性化(アコ錯体化)した後に、PEG-P(Glu)と水中で120時間、錯体形成させることによって、調製した。調製したDACHPt内包ミセルの精製は、限外ろ過によって行い(分画分子量:10万)、高分子ミセルの粒子径を動的光散乱(DLS)によって測定した。その結果、ダハプラチン内包高分子ミセルは、30-40nmの平均粒径と非常に狭い粒径分布を有していることが確認された。

A2. DACHPt内包ミセル体内動態と制ガン活性評価

体内動態試験: CDF1マウス(雌,n=6)の皮下にマウス大腸癌C-26細胞(1×10⁶)を移植し、14日後にダDACHPt内包ミセルおよびオキサリプラチンを尾静脈より全身投与した。

一定時間後に、血液およびガンを採取し、ホモジナイズ、5N硝酸中での加熱処理後に、2N塩酸に溶解し、ICP-MSにより白金量を定量した。制ガン活性試験：CDF1マウス(雌,n=6)の皮下にC-26細胞(1×10^6)を移植し、7日後から2日おきに4回DACHPt内包ミセルおよびオキサリプラチンを尾静脈より投与した。その治療効果、副作用は、それぞれ腫瘍体積変化および体重変化を経時的に測定することにより評価した。

B1. 二重蛍光標識PEG-P(Glu)の合成

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

B2. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの調製

DACHPt内包ミセルの調製は、DACHPt

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

B3. DACHPt内包ミセルからのPtリリース量の評価

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

B4. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの蛍光観察

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

B5. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの細胞内取り込みの評価

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

C1. PEGasus-*b*-P(Glu)-Cholブロック共重合

体の合成

PEGasus-NH₂(分子量20,000 (10,000×2))を開始剤としてγ-benzyl L-glutamate (BLG) N-カルボン酸無水物(BLG-NCA)を重合することにより、PEGasus-*b*-PBLGを合成した(PBLGの重合度:20)。次に、PEGasus-*b*-PBLGのN末端にcholesteryl chloroformateを反応させることによって、PEGasus-*b*-PBLG-Cholを合成した。合成したPEGasus-*b*-PBLG-Cholは0.5N NaOH中で脱保護することにより目的とするPEGasus-*b*-P(Glu)-Cholを合成した。

C2. プラチナソームの調製

プラチナソームの調製はPEGasus-*b*-P(Glu)-CholとDACHPtを混合し、水中で120時間反応させることにより行った。その後、限外ろ過を行い、調製したサンプルの動的光散乱(DLS)測定、透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行った。

プラチナソームに内包させるモデル水溶性薬剤として蛍光(FITC, Alexa680)標識dextran(分子量: 10,000)の封入を検討した。薬剤の封入は、上記の方法によりプラチナソームを調製した。

C3. プラチナソームの機能評価

プラチナソームの機能評価として、第一に、150mM NaCl含有リン酸緩衝液(pH7.4)中におけるPtおよび蛍光標識dextranのリリースを透析法により評価した。Pt量はICP-MSにより定量した。次に、プラチナソームの安定性をDLS測定により評価した。

最後に、プラチナソームのin vitroにおける細胞毒性、担がんマウス(Colon-26細胞皮下移植モデル)における体内動態、蛍光標識dextranによる腫瘍のイメージング、制がん活性を評価した。

(倫理面への配慮) 本研究では、あらかじめ研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究について、研究開始前に所定の手続を行った。具体的には、ヒト病理検体を用いた研究内容は、平成20年1月東京大学医学部倫理委員会にて承認された「動物モデルにおいて腫瘍内での薬剤送達を規定したタンパク質の発現をヒト病理組織で確認する(1945)」に含まれる。また、動物を用いた実験は、東京大学医学部の定める規則に従い、動物実験の講習を修了し十分な知識と経験を有するものだけに従事させを行った。これらから、倫理面の問題はないと判断している。

C. 研究結果

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

築、である。

2について、C26皮下移植モデルに投与した分子量200万Daの蛍光標識デキストランは、コントロールですでに多量に腫瘍内分布があり、TGF- β 阻害剤併用によっても有意な増強をもたらさなかった。さらに、ドキシルも単剤で十分な腫瘍増殖抑制効果があり、TGF- β 阻害剤併用により差はなかった。すなわち、TGF- β 阻害剤の効果は、元から漏出性が十分である血管壁に対しては、漏出効果の効果増強を及ぼさないことが示された。

5については、検討したどの方法も、リンパ管新生を抑制するだけでなく血管新生も抑制してしまっただが、なお若干のナノ粒子蓄積増強傾向は観察された。すなわち、可溶性VEGFR3安定発現モデル(リンパ管減少モデル)では、ドキシルをTGF- β 阻害剤と併用投与することにより、薬剤蓄積量の増加傾向を確認した。

1~3について、漏出性腫瘍血管を持つC26大腸癌モデルと低漏出性血管を持つBxPC3膵癌モデルを用いて、TGF β 、PDGF、VEGF、Tie-2の阻害効果をそれぞれ比較した結果、漏出性血管を持つC26腫瘍に対してはVEGF阻害が、そうでないBxPC3腫瘍ではTGF β 阻害がナノ粒子蓄積増強効果を持つことが示された。その他の組合せは増強を示さなかった。血管の壁細胞による被覆程度がこれらの差の組織学的指標として明らかにされ、被覆が強いほど漏出性が低く、TGF β 阻害併

用の効果が発揮されることが判明した。この結果から、壁細胞による被覆の強い血管を持つ腫瘍においては、血管正常化説よりも本研究の戦略がふさわしいことが示唆された。

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

6に関して、ヒト胆管細胞癌細胞株およびヒトスキルス胃癌皮下移植モデルを検討した結果、実際のヒト難治腫瘍と比較して、血管密度はより高く、また腫瘍間質の線維化ははるかに少なく、すなわち組織構築に大きな隔たりがあることが判明した。つまり難治腫瘍由来の細胞であるにもかかわらず、組織型的には難治癌の特徴を備えていないことが示された。このため、さらに、マウス膵癌細胞株および線維芽細胞株を用い、FGF2を混じてC57BL6マウスに皮下移植する方法を試みたが、BxPC3モデルと同等の間質量と組織系にしか到達しえなかった。

4に関しては、投与後24時間の時点で、肝脾腎脳におけるナノ粒子の蓄積量はTGF- β

阻害剤の有無によって有意な差がないことが示された。また、BxPC3細胞担癌ヌードマウスにおいてDACHPt内包ナノDDSに対してTGF- β 阻害剤1mg/kg併用投与の有無で、体重変化を投与開始後16日間追跡した。この結果、TGF- β 阻害剤の有無で体重変化に有意な差は認められなかった。また、非担癌ヌードマウスにおいて同ナノDDSを継続投与し、これに対して各回TGF- β 阻害剤1mg/kg併用投与の有無で、2か月間継続観察した結果でも、体重変化に有意な差は認めず、またTGF- β 阻害剤の有無にかかわらず明らかな異常所見の出現は認められなかった。さらに¹¹¹Inを内包ミセル投与でTGF- β 阻害剤1mg/kg併用投与の有無により¹¹¹Inの体内正常各臓器への蓄積が変化しないかを、ラジオグラフィを用いて検討した結果、TGF- β 阻害剤の有無で明らかな臓器分布の差は認められなかった。

1に関して、今度はヒト病理標本を用いて検討を行った結果、解析した各種腫瘍のうち、膵癌、スキルス胃癌、胸膜中皮腫については、腫瘍血管周囲にSMA陽性細胞がほぼ必ず存在し、ペリサイトによる被覆があることが確認された。一方で、スキルスではなく通常の胃癌、大腸癌、卵巣癌では、血管周囲にSMA陽性細胞はほぼ認められなかった。

次に、将来的にこれらの難治性固形腫瘍における有効な治療診断ツールとなりうる

ような新規ナノDDSの開発を分担研究者が進めた。まずA1. DACHPt内包ミセルの体内動態評価を行った。オキサリプラチンは血中より速やかに消失したが、12-40から形成されたDACHPt内包ミセルは、血流中を長期滞留し(24時間後において投与量の16%が滞留)、固形ガンに効果的に集積することが確認された。また、血中AUCを算出したところ、DACHPt内包ミセルはオキサリプラチンの484倍(24時間後)、540倍(48時間後)の血中AUCを有することが確認された。次に、異なる組成のPEG-P(Glu)から形成されるDACHPt内包ミセルに関して、24時間後のガンと正常組織の集積比を算出した結果、DACHPt内包ミセルは肝臓、脾臓、腎臓の全てに関してガン選択的な集積を示したが、PEG-P(Glu)12-20から形成される高分子ミセルによって最も高いガン選択性が達成された。

次にA2. DACHPt内包ミセルの制ガン活性については、前述のPEG-P(Glu)12-20から形成されるDACHPt内包ミセルのマウス大腸ガンC-26細胞の皮下移植モデルに対する抗腫瘍効果を評価した結果、オキサリプラチン単独投与群では治療効果が見られなかったが、DACHPt内包ミセルは、すべての投与量(4, 6 mg/kg \times 4)において有意な制ガン活性を示した。一方で、DACHPt内包ミセルは4回目の投与によって最大で20%以下の体重減少を示したが、すべてのマウスにおいて体重が回復し、致死性の毒性は認められ

なかった。

B1. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの調製では、Bodipy FL-PEG-P(Glu)- Bodipy TRを用いてDACHPt内包ミセルを調製したところ、蛍光標識を行っていないPEG-P(Glu)から形成されたDACHPt内包ミセルと同等の32nmの会合体の形成が確認された。

そこでB2. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの特性解析を行ったところ、生理的条件[150mM NaClを含有する10mM PBS(7.4)]における蛍光標識DACHPt内包ミセルからのPtリリースは、蛍光非標識ミセルのそれと一致することが確認され、初期バーストを示すことなく、持続的なPtリリースが確認された(40時間後のPtリリース量は約25%)。次に、DACHPt内包ミセルの外殻および内核にそれぞれ導入したBodipy FLおよびBodipy TRの蛍光強度の変化を測定したところ、Bodipy FLは時間に関係なく一定の蛍光強度を示したが、Bodipy TRは最初は全く蛍光を示さないが、時間の経過と共に蛍光強度の上昇を示すことが確認された。ここで、Bodipy TRの蛍光強度変化のprofileは、上記のDACHPt内包ミセルからのPtリリースのそれと一致していることが確認された。この結果は、ミセルの外殻(PEGの末端)に結合されたBodipy FLの蛍光は、ミセルの崩壊に影響を受けないが、ミセルの内核(P(Glu)の末端)に結合されたBodipy TRの蛍光は、ミセル状態においてはquenchされているが、ミセルの崩壊に伴いquenchが解消

されることを示唆しているものと考えられる。すなわち、二重蛍光標識DACHPt内包ミセルでは、Bodipy FLの蛍光によってミセルの局在を評価することができ、Bodipy FLの蛍光によってミセルの会合状態を評価することが可能となることが考えられた。

さらにB3. 二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの細胞内取り込みの評価を行った。HT29細胞による二重蛍光標識DACHPt内包ミセルの取り込みをCLSM観察によって評価した。その結果、24時間後にBodipy FLの顆粒状の蛍光が観察され、後期エンドソーム/リソソームのマーカであるLysoTracker Blueの局在と一致した。一方、24時間後においては、Bodipy TRの蛍光は観察されなかった。この結果より、DACHPt内包ミセルはミセル形態を維持した状態でエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれるものと考えられる。一方、培養55時間後において、Bodipy TRの蛍光も観察されたことから、DACHPt内包ミセルは後期エンドソーム/リソソームでDACHPtを放出し、最終的に崩壊することが示唆された。

最後に、C1. プラチナソームを合成し、その物性評価を行った。PEGasus-*b*-P(Glu)-CholとDACHPtを水中で120時間反応させることによって120nmの粒径分布の狭い会合体の形成が確認された。DACHPt内包ミセルが35nmの粒径を有することを考えると、上記の会合体はミセル以外の形態を有するものと考えられたため、

TEM観察を行った。その結果、中空ナノ粒子の形成が確認された。次に、FITC-dextran存在下でプラチナソームを調製し、封入の確認をゲルろ過クロマトグラフィーにより行った。その結果、プラチナソームが溶出する同じ時間にFITC-dextranも溶出することが確認され、水溶性のFITC-dextranがプラチナソームに封入されることが明らかになった。さらに、150mM NaCl含有リン酸緩衝液(pH7.4)中におけるプラチナソームからのDACHPtとAlexa680-dextranのリリースを評価した。その結果、DACHPtは、プラチナソームより持続的に放出(100時間後に約50%の放出)され、Alexa680-dextranは、最初の12時間は放出されないが、その後、徐放されることが明らかになった(100時間後に約30%の放出)。また、150mM NaCl含有リン酸緩衝液(pH7.4)中におけるプラチナソームの安定性に関しては、30時間後までに120nmから80-90nmに粒径が減少したが、その後はDACHPtのリリース量に拘わらず、80-90nmの一定の粒径が維持されることが確認され、プラチナソームは高い構造安定性を有することが示唆された。

そこで、C2. プラチナソームの生物学的評価を行った。プラチナソームの体内動態試験を実施したところ、静脈内投与24時間後において5%のPt、10%のFITC-dextranが血中に存在していることが明らかになった。ここで、DACHPtおよびFITC-dextranを単独で血中に投与した際は速やかに消失するこ

とが確認されている。一方、がんへの集積に関しては、24時間後に10% dose/g組織のPt、20% dose/g組織のFITC-dextranががんへに集積することが確認された。この値は、他の臓器への集積と比較しても有意に高く、プラチナソームのがんへの選択的な集積が示唆された。また、Alexa680-dextranを搭載したプラチナソームを担がんマウスに投与し、24時間後に生きたマウスの蛍光イメージングを行ったところ、がん組織のみがイメージングされることが確認された。さらに、担がんマウスを用いた制がん活性試験においては、oxaliplatinは、8mg/kgでは薬効を示さず、10mg/kgでは毒性死を示したが、プラチナソームは6mg/kgで著明な制がん活性を示した。一方、体重変化による毒性試験では、プラチナソーム投与群で有意な体重の減少は認められなかった。

D. 考察

本研究の結果、ナノ粒子とTGF β 阻害剤の併用について、適応癌腫はペリサイトに被覆された腫瘍血管を多く持つような腫瘍、すなわちヒト標本でも明らかにされた範囲で、膀胱癌、スキルス胃癌、悪性中皮腫である可能性が示唆された。一方、ナノ粒子単独でも蓄積するような癌腫ではナノDDSの増強作用は見られないが減弱もさせないことが示唆された。このような血管構築を持つヒト腫瘍は、解析した範囲では通常胃癌、

大腸癌、卵巣癌であった。次に、近年広く行われているVEGF阻害に比較すると、本法はペリサイト被覆腫瘍血管に対して効果を発揮する一方、VEGF阻害の併用はペリサイトが被覆していない、もとより漏出性の高い血管に対してナノDDSの薬効を増強する可能性が示された。なお、長期毒性はナノDDS単独に比べてTGF β 阻害剤併用での増悪は見られなかった。なお、TGF- β 阻害剤併用の効果に関してはナノ粒子のサイズ依存的に得られるので、内包する薬剤に関しては、一般的な抗腫瘍剤に限らず、タンパク質、核酸、あるいは造影剤でも用いることができると考えられる。

リンパ管新生の抑制は、EPR効果をさらに増強する可能性が示唆されたが、リンパ管の抑制手法が不十分であり、詳細な解析は困難であった。

難治腫瘍のモデルとしては、簡便さからマウス皮下移植系はそのまま用いるとしても、薬剤が血管から漏出して腫瘍間質を通過し、腫瘍細胞の集団に到達して初めて奏効するという、腫瘍における薬剤送達を研究するモデルとしては、BxPC3細胞皮下移植モデルを超える系は確立困難であった。

さらに本研究では、将来的にこれらの難治性固形腫瘍における有効な治療診断ツールとなりうるような新規ナノDDSの開発も進めた。まず既に優れた血中滞留性と腫瘍選択的な集積性、ならびに有意な制ガン活性が確認され

ているDACHPt内包ミセルに関して、ミセルを構成するPEG-P(Glu)ブロック共重合体の組成の最適化を行った。その結果12-20の組成(X-Y: X: PEGの分子量 $\times 10^{-3}$; Y: polymerization degree of P(Glu))を用いることによって、肝臓や脾臓に対する集積を抑え、ガン選択性に優れたDACHPt内包ミセルが構築できることが明らかとなった。DACHPt内包ミセルは、マウスに致死性の毒性を示すことなく、オキサリプラチンに感受性の低いC-26の皮下移植モデルに対しても有意な制ガン活性を示すことが明らかとなった。

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

ったが、本研究では、二重蛍光標識ミセルを利用することによって、高分子ミセルがミセル形態を維持した状態で細胞内に取り込まれることを初めて明らかにした。これまでの研究において、DACHPt内包ミセルは、HT29細胞に対してオキサリプラチンよりも高い細胞毒性を示し、オキサリプラチン耐性を克服できることが明らかになっているが、この結果は、DACHPt内包ミセルがエンドサイトーシス経路によって取り込まれ、後期エンドソーム/リソソームでDACHPtを放出することに起因するものと考えられる。すなわち、オキサリプラチンは細胞質内でmetallothionein等によって不活性化を受けるが、DACHPt内包ミセルはエンドサイトーシス経路で核近傍まで移行し、細胞質内での不活性化を受けない為に、オキサリプラチンよりも優れた薬理効果を示したものと考えている。このように、二重蛍光標識法は、高分子ミセルの生体内における崩壊挙動を明らかにする上で強力なツールとなるものと考えられる。

さらに本研究では、金属錯体形成を駆動力とする新しい超分子集合体としてプラチナソームを開発した。調製したプラチナソームは、内水相に蛍光標識dextranを内包させることが可能であった。150mM NaCl含有リン酸緩衝液(pH7.4)中におけるミセルの安定性に関しては、PtのP(Glu)のカルボキシル基との配位子交換反応によってDACHPtが放出され、持続的な放出が確認されたが、プラチナソームの構造は長時間維持されることが示唆された。

このような特性には、ブロック共重合体の末端に導入したCholesteryl基による高分子-金属錯体の構造安定化が寄与しているものと考えられる。一方、プラチナソームからDACHPtがリリースされることによって膜の透過性が増大し、12時間後からゆっくりとAlexa680-dextranがリリースされることが明らかになった。また、プラチナソームの生物学的評価に関しては、担がんマウスを用いた体内動態試験において、プラチナソームの長期血中滞留性、がん選択的集積性が確認され、制がん活性試験において著明な制がん活性が確認された。以上のようにプラチナソームは、ペプチドやタンパク質などの水溶性薬剤を搭載でき、キャリアが患部に到達する投与12時間後にそれらの溶性薬剤を放出することができる制御放出型のナノキャリアシステムとして今後のさらなる展開が期待できる。

E. 結論

本研究により、TGF- β 阻害剤を併用したナノDDSの副作用が増悪はしないこと、またこの方法論のヒトでの適応疾患として、膵癌、スキルス胃癌、悪性中皮腫の可能性が示唆された。この結果により、これらの現在難治とされる固形腫瘍に対して、薬物による有効な治療法が提供されることが期待される。なかでも、膵癌やスキルス胃癌はわが国でも多く見られる難治性固形癌であり、また悪性中皮腫はアスベス

ト関連で発がんする難治性の腫瘍として悪名高く、これらの腫瘍に対して効果的かつ副作用の強くない化学療法で奏効率が上がれば福音となる。その方法論として、本研究により、わが国が得意とするナノテクノロジーを用いた製剤を利用し、その特徴である低副作用を保ったまま治療を行う方法を確立できることが現実味を帯びてきたと考える。また本研究による新規治療法の適応可能範囲を、がん組織型からより正確に判断する方法についても、確立が期待される。本研究を通じて、難治性固形癌に対してナノDDSの効果を発揮させられるようになれば、その社会的、医療的効果は計り知れない。本研究終了後も、西山らと連携し、本研究成果をもとに、難治性がんの診断・治療法の実現へと展開していきたい。

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. Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. *J. Control. Release*, in press
2. H. -J. Kim, A. Ishii, K. Miyata, Y. Lee, S.

- Wu, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Introduction of stearyl moieties into a biocompatible cationic polyaspartamide derivative, PAsp(DET), with endosomal escaping function for enhanced siRNA-mediated gene knockdown. *J. Control. Release*, in press
3. K. Miyata, N. Gouda, H. Takemoto, M. Oba, Y. Lee, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. *Biomaterials* 31 (17) 4764-4770 (2010)
4. H. Shimizu, Y. Hori, S. Kaname, K. Yamada, N. Nishiyama, S. Matsumoto, K. Miyata, M. Oba, A. Yamada, K. Kataoka, T. Fujita, siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 21 (4) 622-633 (2010)
5. Y. Lee, T. Ishii, H. -J. Kim, N. Nishiyama, Y. Hayakawa, K. Itaka, K. Kataoka, Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (14) 2552-2555 (2010)
6. K. Miyata, N. Gouda, H. Takemoto, M. Oba, Y. Lee, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. *Biomaterials*, 31 (17) 4764-4770 (2009)
7. M. Harada-Shiba, I. Takamisawa, K. Miyata, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Kangawa, F. Yoshihara, Y. Asada, K. Hatakeyama, N. Nagaya, K. Kataoka, Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Mol. Ther.*, 17 (7) 1180-1186 (2009)
8. M. Zhang, A. Ishii, N. Nishiyama, S. Matsumoto, T. Ishii, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated calcium phosphate nanocomposites as smart environment-sensitive carriers for siRNA delivery. *Adv. Mater.* 21 (34) 3520-3525 (2009)
9. Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, H. -J. Kim, J. -H. Seo, N. Nishiyama, H. Oshima, K.

- Osada, K. Kataoka, Charge-conversional polyionic complex micelles-efficient nanocarriers for protein delivery into cytoplasm. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (29) 5309-5312 (2009)
10. N. Nishiyama, Y. Morimoto, W.-D. Jang, K. Kataoka, Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61 (4) 327-338 (2009)
 11. W. Wang, K. Itaka, S. Ohba, N. Nishiyama, U. Chung, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Improving multipotent differentiation efficiency of mesenchymal stem cells using 3D spheroids method on micropatterned substrates. *Biomaterials*, 30 (14) 2705-2715 (2009)
 12. S. Matsumoto, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Miyata, A. Ishii, M. Oba, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery. *Biomacromolecules*, 10 (1) 119-127 (2009)
 13. N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P.-S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W.-D. Jang, M. Kikuchi, K. Kataoka, Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *J. Control. Release* 133 (3) 245-251 (2009)
 14. H. Cabral, M. Nakanishi, M. Kumagai, W.-D. Jang, N. Nishiyama, K. Kataoka, A photo-activated targeting chemotherapy using glutathione sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles. *Pharm. Res.* 26 (1) 82-92 (2009)
 15. M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. *Mol. Pharm.*, 7 (2) 501-509 (2010)
 16. K. Kiyono, H.I. Suzuki, H. Matsuyama, Y. Morishita, A. Komuro, M.R. Kano, K. Sugimoto, K. Miyazono, Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* (2009) 69 (23) 8844-8852
 17. M. Kumagai, M. R. Kano, Y. Morishita, M. Ota, Y. Imai, N. Nishiyama, M. Sekino, S. Ueno, K. Miyazono, K. Kataoka, Enhanced magnetic resonance imaging of experimental pancreatic tumor in vivo by block-copolymer-coated magnetite nanoparticles combined with TGF-beta inhibitor. *J. Control. Release*, 140 (3) 306-311 (2009)
 18. M. Han, M. Oba, N. Nishiyama, M.R. Kano, S. Kizaka-Kondoh, K. Kataoka, Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol. Ther.*, 17 (8) 1404-1410 (2009)
 19. A. Komuro, M. Yashiro, C. Iwata, Y. Morishita, E. Johansson, Y. Matsumoto, A. Watanabe, H. Aburatani, H. Miyoshi, K. Kiyono, Y.- Shirai, H.I. Suzuki, K. Hirakawa, M.R. Kano, K. Miyazono, Diffuse-type gastric carcinoma: progression, angiogenesis, and transforming growth factor beta signaling. *J. Natl. Cancer Inst.* (2009) 101 (8) 592-604
 20. M.R. Kano, Y. Komuta, C. Iwata, M. Oka, Y.- Shirai, Y. Morishita, Y. Ouchi, K. Kataoka, K. Miyazono, Comparison of the effects of the kinase inhibitors imatinib, sorafenib, and transforming growth factor-beta receptor inhibitor on extravasation of nanoparticles from neovasculature. *Cancer Sci.* (2009) 100 (1) 173-180
 21. M. Oka, C. Iwata, H. I. Suzuki, K. Kiyono, Y. Morishita, T. Watabe, A. Komuro, M. R. Kano, and K. Miyazono. Inhibition of endogenous TGF- β signaling enhances lymphangiogenesis. *Blood*. 111(9):4571-9 (2008)
 22. Ota H, Eto M, Kano MR, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Sep;28(9):1634-9.
 23. Wu S, Nishiyama N, Kano MR, Morishita

- Y, Miyazono K, Itaka K, Chung UI, Kataoka K. Enhancement of Angiogenesis Through Stabilization of Hypoxia-inducible Factor-1 by Silencing Prolyl Hydroxylase Domain-2 Gene. *Mol Ther.* 16(7):1227-34 (2008)
24. Miyata K, Oba M, Kano MR, Fukushima S, Vachutinsky Y, Han M, Koyama H, Miyazono K, Nishiyama N, Kataoka K. Polyplex Micelles from Triblock Copolymers Composed of Tandemly Aligned Segments with Biocompatible, Endosomal Escaping, and DNA-Condensing Functions for Systemic Gene Delivery to Pancreatic Tumor Tissue. *Pharm Res.* 25(12):2924-36 (2008)
25. M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide crosslinks directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking. *Mol. Pharm.* 5 (6) 1080-1092 (2008)
26. K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (48) 16287-16294 (2008)
27. S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive non-viral gene vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (18) 6001-6009 (2008)
28. Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, N. Nishiyama, K. Kataoka, Charge-conversional ternary polyplex with endosome disruption moiety: a new paradigm for the efficient and safe gene delivery. *Angew. Chem., Int. Ed.* 47 (28) 5163-5166 (2008)
29. MR. Kano, N. Nishiyama, et al. Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF- β signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(9): 3460-3465 (2007).
30. C. Iwata, M. R. Kano, et al. Inhibition of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Suppresses Lymph Node Metastasis via Reduction of Lymphangiogenesis. *Cancer Res.* 67 (21):10181-10189 (2007)
31. H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Optimization of (1,2-diamino-cyclohexane) platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity. *J. Control. Release* 121 (3) 146-155 (2007)
2. 学会発表
1. Kano et al. Low-dose TGF-beta inhibitor improves cancer therapy using nanocarriers for intractable solid tumors. The 34th Annual Meeting of the Controlled Release Society, USA. July 7-11, 2007.
2. Kano et al, Low-dose TGF-beta inhibitor improves cancer-targeting therapy using nanocarriers for intractable solid tumors. Gordon Research Conference Angiogenesis, Newport, RI, USA. August 19-24, 2007.
3. Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, "Design of functional drug delivery system based on polymer assemblies", 10th European Symposium on Controlled Drug Delivery (ESCDD), Noordwijk an Zee, The Netherlands, April 2, 2008 (Invited Lecture)
4. Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, "Development of smart nanocarriers for targeting therapy", 2007 International Symposium on Nano-Bioscience, Kyung Hee University, Seoul, Korea, August 20, 2007 (Invited Lecture)
5. Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, "Stimuli-responsive drug and gene nanocarriers based on supramolecular assemblies", 34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CRS), Long Beach, California, July 11, 2007 (Invited Lecture)
6. 西山伸宏, "トランスレーショナルリサーチの実現に向けた高分子ミセル型 DDS の開発", 創剤フォーラム第 13 回若手研究会, 摂南大学大阪センター, 2007 年 12 月 8 日(招待講演)

7. 西山伸宏, 片岡一則, "高分子集合体を基盤とする薬剤・遺伝子送達キャリアの創製", ナノ学会 第5回大会, つくば国際会議場(エポカルつくば), 2007年5月23日(招待講演)
8. 狩野光伸, 西原広史, 岩田要, 片岡一則, 宮園浩平, 「腫瘍血管新生制御が薬剤送達に影響を与える際の組織学的要因の解明」、日本病理学会、金沢、2008年5月16日
9. 古室暁義, 岩田要, 岡雅子, 森下保幸, 八代正和, 平川弘聖, 狩野光伸, 宮園浩平, 「スキルス胃癌の増殖・進展におけるTGF- β の役割」、日本病理学会、金沢、2008年5月16日
10. 狩野光伸, 「ナノ粒子を使って難治がんを治すには?--医学研究との接点」、ナノバイオ若手ネットワークキングシンポジウム、三島、2008年6月12~13日
11. Kano, MR. Manipulation of TGF- β signaling for cancer treatment. 28th Sapporo Cancer Seminar International Symposium. 2008年6月26-27日
12. 狩野光伸, 西原広史, 西山伸宏, 片岡一則, 宮園浩平, 「難治性固形腫瘍に対するナノDDS治療の実現化」、日本DDS学会、東京、2008年6月30日
13. 狩野光伸, 「難治性固形癌における腫瘍血管構築と治療応用」、Vascular Biology Innovation Conference、東京、2008年8月23~24日
14. 狩野光伸, 「「難治」癌を治すにはどうしたらよいか」、聖路加国際病院内科フォーラム、東京、2008年8月29日
15. Kano, MR., Optimal manipulation of tumor vasculature for treatment of intractable solid tumors using nanoparticles. 日本癌学会総会、名古屋、2008年10月28~30日
16. 狩野光伸「固形癌の血管構築と薬剤送達」、放射線医学総合研究所分子病態イメージング研究グループ講演会、千葉、2008年12月10日
17. 狩野光伸「難治性固形癌の血管構築解析と治療法の開拓」、北海道大学 探索病理学講座セミナー(第1回)・腫瘍病理学分野セミナー(第3回)・口腔病態学講座・病理病態学分野セミナー・大学院歯学研究科セミナー、札幌、2009年2月2日
18. 狩野光伸「脈管制御を応用した難治がん治療法の開拓」第7回次世代バイオマテリアル研究会、東京、2009年3月9日
19. 西山伸宏, 松本悟, 宮田完二郎, 武元宏泰, クリステージェームス, 大庭誠, 山崎裕一, 片岡一則, "PEG-ポリカチオンブロック共重合体とsiRNAによる超分子組織体形成とその機能特性", 第57回高分子討論会, 大阪市立大学, 大阪 2008年9月25日(口頭)
20. 西山伸宏, "ナノテクノロジーを利用したDDSの開発", バイオメディカルカリキュラム講義, 東京女子医科大学, 東京 2008年9月18日(特別講義)
21. N. Nishiyama, "Development of smart nanocarriers based on block copolymer assemblies", CNSI-CNBI Symposium on NanoBiotechnology, Iron Gate Memorial Hall, The University of Tokyo, September 9, 2008 (Invited Lecture)
22. 西山伸宏, "高分子ナノテクノロジーを利用したDDSの開発", DDS講座, 星薬科大学, 東京 2008年7月17日(特別講義)
23. 西山伸宏, 片岡一則, "高分子集合体を基盤とした遺伝子・siRNAデリバリーシステムの創製", 第24回日本DDS学会学術総会, 六本木アカデミーヒルズ, 東京 2008年6月29日(招待講演)
24. 西山伸宏, "医工連携による革新的ナノDDSの創出", バイオ・ナノテクフォーラム イブニングセミナー 第一回 テーマ「ナノテクノロジーを活用する薬物・遺伝子送達技術の最前線」、東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, 東京 2008年4月17日(招待講演)
25. N. Nishiyama, K. Kataoka, "Design of functional drug delivery system based on polymer assemblies", 10th European Symposium on Controlled Drug Delivery (ESCDD), Noordwijk an Zee, The Netherlands, April 2, 2008 (Invited Lecture)
26. Kano MR. Optimal choice of kinase inhibitors for manipulation of tumor vasculature; depending on the original degree of pericyte coverage. American Association for Cancer Research 100th Annual Meeting 2009, Colorado

Convention Center, Denver, CO, USA, April 18-22, 2009.

27. 狩野光伸 難治腫瘍モデルを用いた治療法の開拓 第98回日本病理学会総会、京都、2009年5月1日 (ワークショップ、指定演題、口演)
28. 狩野光伸 Histological characteristics of tumor and effect of nanoDDS 第25回日本DDS学会学術総会、東京、2009年6月3~4日(ワークショップ、指定演題、口演)
29. 狩野光伸 Treating "untreatable" tumors 2009年度がん若手ワークショップ、蓼科、2009年9月2~5日(招待、口演)
30. 西山伸宏, 韓ムリ, 大庭誠, カブラル・オラシオ, 狩野光伸, 片岡一則 "がん深部への遺伝子・薬剤デリバリーのためのナノキャリアの設計", 第58回高分子討論会, 熊本大学 黒髪キャンパス, 熊本 2009年9月17日(口頭)
31. 狩野光伸, 西原広史, 岩田要, 西山伸宏, 片岡一則, 宮園浩平 腫瘍脈管の機能解析を目指した動物モデル 第68回日本癌学会学術総会、横浜、2009年10月2日(シンポジウム、指定演題、口演)
32. 狩野光伸 ナノテクノロジーで腫瘍血管構築をとらえなおす 第17回血管生物医学会、東京、2009年10月8日(シンポジウム、指定演題、口演)
33. 狩野光伸 難治腫瘍とナノDDS 放射線医学総合研究所シンポジウム「生体イメージングの未来」、千葉、2009年11月27日(招待、口演)
34. 狩野光伸 難治固形腫瘍にナノDDS製剤を到達させるには: 腫瘍血管の研究を通じて 星薬科大学オープンリサーチシンポジウム、東京、2009年12月5日(招待、口演)
35. 狩野光伸 Bio-creationによる難病解明 第1回バイオクリエーション研究会特別シンポジウム、愛媛、2010年1月25日(招待、口演)
36. 西山伸宏, "高分子ミセルを利用した診断・治療システムの開発", 第48回日本生体医工学会大会 オーガナイズドセッション「ナノキャリアーと物理エネルギーを融合したハイブリット標的化診断・治療」, タワーホール船堀, 東京 2009年4月25日(シンポジスト)
37. 西山伸宏, 片岡一則 "がん標的治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 岡山肝癌研究会, 岡山コンベンションセンター, 岡山 2009年4月25日(特別講演)
38. 西山伸宏, 熊谷康顕, 堀江壮太, 福島重人, 宮崎幸造, 浦野京子, 守本祐司, 張祐銅, 片岡一則, "微小がんの光線力学治療のための診断-治療機能一体型高分子ミセルの開発", 第58回高分子学会年次会, 神戸国際会議場・神戸国際展示場, 神戸 2009年5月27-29日
39. N. Nishiyama, "Block copolymer micelles as smart supramolecular nanodevices for tumor targeting", The 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Bella Center, Copenhagen Denmark, July 19, 2009 (Invited Lecture)
40. N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, W.-D. Jang, K. Kataoka, "Development of dendrimer phthalocyanine-loaded polymeric micelles for diagnosis and treatment of microcarcinoma", The 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Bella Center, Copenhagen Denmark, July 22, 2009
41. 西山伸宏, "ナノ技術を利用した DDS", 第2回 富山ライフサイエンスシンポジウム, 高志会館「カルチャーホール」, 富山 2009年7月25日(招待講演)
42. 西山伸宏, "高分子ミセル型医薬品の開発", 技術情報協会セミナー 難治性がん治療薬開発に向けた治療の現状・DDS 技術・マーカー開発, 大井町きゅりあん, 東京 2009年7月31日(招待講演)
43. 西山伸宏, 韓ムリ, 大庭誠, カブラル・オラシオ, 狩野光伸, 片岡一則 "がん深部への遺伝子・薬剤デリバリーのためのナノキャリアの設計", 第58回高分子討論会, 熊本大学 黒髪キャンパス, 熊本 2009年9月17日(口頭)
44. 西山伸宏 "Development of polymeric micelles for innovative cancer therapy", 第68回 日本癌学会 シンポジウム「ナノテクノロジーがもたらす新規がん治療」, パシフィコ横浜, 神奈川 2009年10月2日(招待講演)
45. 西山伸宏 "ナノテクノロジーが拓く