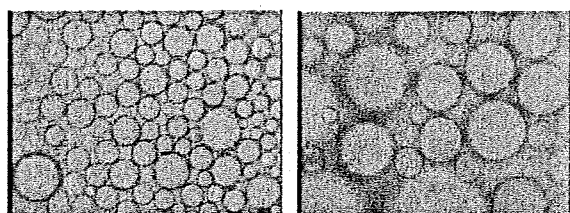


generated emulsions by Y-type microchannel were shown in Fig. 16 when the flow rate of the water phase and the oil phase were 50-0.5 μ l/min and 200-2 μ l/min, respectively. From Fig. 16, as the water and oil flow rate decreased, generated emulsion became larger. Figure 17 shows the optical microscope photographs of generated emulsions by ultrasonic device when the flow rate of the water phase and the oil phase were 50-0.5 μ l/min and 200-2 μ l/min, respectively. As is the case when the flow rate of the water phase and the oil phase were 100 μ l/min and 1 μ l/min, sonicated emulsions were too small. Figure 18 shows the distribution of the emulsion diameter measured by DLS when water and oil phase flow rate was 100-1 μ l/min, 200-2 μ l/min, and 50-0.5 μ l/min, respectively. According to Fig. 18, the difference of residence time had little effect on the emulsion diameter. This reason is considered that concentration of the oil phase was so low. Therefore, change of the residence time didn't influence the emulsion's diameter greatly.

Table 3 Flow rate, residence time, applied voltage and driving frequency.

	C	D	E
Water phase [μ l/min]	100	50	200
Oil phase [μ l/min]	1	0.5	2
Residence time [min]	3.4	1.4	6.8
Applied voltage [V_{p-p}]	100		
Driving frequency [MHz]	2.25		



(仮)

Fig. 16 Optical microscope photographs of generated emulsions by Y-type microchannel. Upper: (D) condition flow rate, under: (E) condition flow rate.

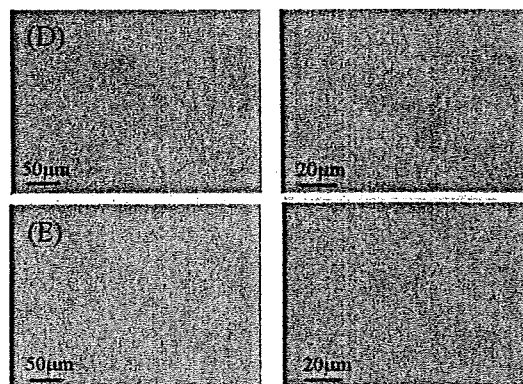


Fig. 17 Optical microscope photographs of generated emulsions by ultrasonic device. Upper: (D) condition, under: (F) condition.

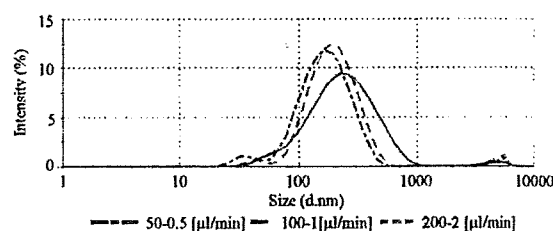


Fig. 18 Relationship between emulsion diameter and intensity measured by DLS when flow rate was changed

In addition, the experiment of changing oil phase concentration was conducted. The applied voltage and the water phase flow rate were constant value, 100 V_{p-p} and 100 μ l/min, respectively. The oil phase flow rate was changed 2, 5, 10 μ l/min. Figure 19 shows the distribution of the emulsion diameter measured by DLS when water and oil phase flow rate was 100-2 μ l/min, 100-5 μ l/min and 100-10 μ l/min respectively. As shown in Fig. 19, as the concentration of the oil phase increased, sonicated emulsions became larger. This reason is considered that the require irradiation intensity to generate small emulsions was increased as the concentration of the oil phase increased. This experiment also corresponded to the references.

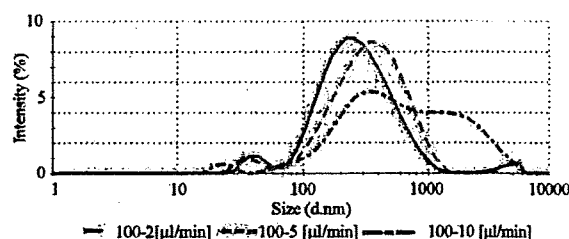


Fig. 19 Relationship between emulsion diameter and intensity measured by DLS when concentration of the oil phase was changed

4. Conclusion

In this paper, the generation of emulsion was conducted by the ultrasonic device and the microchannel. By integrating the ultrasonic device and the microchannel, the small device and a flow process were realized. In addition, contamination of the emulsions was able to be avoided.

As the applied voltage increased, sonicated emulsion became smaller and distribution became sharper. When the applied voltage was 100V_{p-p}, sonicated emulsions' average diameter was about 200nm. However, as the concentration of the oil phase increased, sonicated emulsions became large.

In the future, to realize emulsion generation when the concentration of the oil phase is high, microchannel's cross-section would be changed. In addition, microchannel and ultrasonic device would be laminated to be smaller type.

Acknowledgement

The authors would like to thank Mr. Norihisa Senou of Industrial Technology Center of Okayama Prefecture for valuable advice and his assistance with fabrication of microchannel.

References

1. D.J. McClements, "Food emulsions: principles, practice and techniques", CRC Press, Boca Raton, FL, 1999.
2. F. L. Calderon, V. Schmitt and J. Bibette: *Emulsion Science* (Springer, New York, 2007) 2nd ed., p.5.
3. Juliane Floury, Anne Desrumaux and Jérémie Lardières: *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 1 (2000), 127-134.
4. M.C. Puppo, V. Beaumalb, N. Chapleauc, F. Speronia, M. de Lamballerieç, M.C. Añóna and M. Anton: *Food Hydrocolloids*. 22 (2008), 1079-1089
5. T. Nakashima, M. Shimizu, M. Kukizaki: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45 (2000), 47-56.
6. G. T. Vladislavljević, Helmar Schubert: *Journal of Membrane Science*, 225 (2003), 15-23
7. I. Kobayashi, S. Mukataka, M. Nakajima: *Journal of Colloid and Interface Science*, 279 (2004), 277-280.
8. M. Yamada, S. Doi, H. Maenaka, M. Yasuda, M. Seki: *Journal of Colloid and Interface Science*, 321 (2008), 401-407.
9. J. Kubota, A. Kato and T. Ono: *AIChE Annual Meeting*. 2007, 332p.
10. S. Ee, X. Duan, J. Liew, Q. D. Nguyen: *Chemical Engineering Journal*, 140 (2008), 626-631.
11. T. S. H. Leong, T. J. Wooster, S. E. Kentish and M. A. shokkumar: *Ultrasonic Sonochemistry*. 16 (2009), 721.
12. S. Freitas, G. Hielscher, H. P. Merkle and B. Gander: *Ultrasonic Sonochemistry*. 13 (2006) 76.
13. T. Hielscher and H. GmbH: *Proc. European Nano Systems*. 2005, p.138.
14. S. G. Gaikwad, A. B. Pandit: *Ultrasonics Sonochemistry*. 15 (2008) 554-563.
15. S. Freitas, G. Hielscher, H. P. Merkle and B. Gander: *Ultrasonics Sonochemistry*. 13 (2006) 76-85.
16. T. Harada, N. Ishikawa, T. Kanda, K. Suzumori, Y. Yamada and K. Sotowa: *Sensors and Actuators A*, 155 (2009) 168-174.
17. Y. Fukuoka, K. Ogawara, K. Higaki and T. Kimura: 21st

Hepatic disposition characteristics of Liposomes Coated with Mixture of Hydrophilic Polymers

Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura

(Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,
Okayama University)

Introduction: Although liposomes are good candidates for efficient drug carriers, the rapid clearance by the reticuloendothelial system (RES) limits their application as drug carriers to other tissues and/or cells. Besides several physicochemical properties of liposomes, such as size, lipid composition and surface charge, certain serum proteins associated onto the surface of liposomes, so-called opsonins, largely influence their hepatic disposition after systemic administration. Surface modification of liposomes by polyethylene glycol (PEG) is known to increase their blood circulation time by inhibiting the interaction of liposomes with opsonins. Recently, lipid-modified polyvinyl alcohol (PVA) is also suggested to be suitable for the same purpose. The objective of this study is to evaluate the biodistribution and hepatic disposition characteristics of liposomes coated with the mixture of PEG and PVA.

Materials and Methods: Liposomes, of which the composition is egg phosphatidylcholine:cholesterol:polymers = 55:40:5 (molar ratio), were prepared by solvent evaporation and hydration method. The resultant liposomes were extruded through a polycarbonate membrane filter and their particle sizes were adjusted around 100 nm. In the in-vivo studies, liposomes labeled with ^3H -cholesteryl hexadecyl ether, were intravenously injected into male Wistar rats. Plasma concentrations were determined at different time points and the tissue distribution of liposomes was measured at 6 h after injection. To evaluate the hepatic disposition characteristics of liposomes, single-pass liver perfusion experiments were performed. Furthermore, to analyze the serum proteins associated onto the surface of liposomes, total protein amount was measured and SDS-PAGE analysis was conducted.

Results and Discussion: Liposomes coated with polymer mixture of PEG and PVA (4:1, mol%) (PEG4%/PVA1% liposome) exhibited the highest blood circulating property among liposomes evaluated and showed higher AUC and lower hepatic clearance than any other liposomes including liposomes coated with 5 mol% PEG (PEG5% liposome). These findings were supported by the significantly smaller hepatic disposition of PEG4%/PVA1% liposome than PEG5% liposome in the single-pass liver perfusion experiment. In addition, the pretreatment of perfused liver with trypsin did not affect the hepatic disposition of PEG4%/PVA1% liposome, while the same treatment dramatically decreased that of PEG5% liposomes. These results clearly indicate that the coating of liposome with the mixture of PEG and PVA can avoid the hepatic disposition via the receptor-mediated endocytosis, while the hepatic disposition of PEG5% liposome can mainly be ascribed to the receptor-mediated uptake. On the other hand, the total amount of serum proteins adsorbed on the surface of PEG4%/PVA1% liposome was found to be significantly lower than that for PEG5% liposome. In addition, SDS-PAGE analysis indicated that there was quite large difference in the profiles of serum proteins associated onto these liposomes. These results suggest the decrease in opsonins and/or increase in dysopsonins associated on PEG4%/PVA1% liposome. We are now trying to identify the serum proteins adsorbed on these liposomes. In conclusions, the incorporation of small percentage of PVA into PEG liposome could reduce its affinity to the liver and improve the in-vivo disposition characteristics.

P-糖タンパク質高発現がん細胞に対するドキソルビシン内封 PEG 修飾リポソームの *in vivo* 抗腫瘍効果に関する検討 (57 字)

運 敬太¹⁾、大河原賢一¹⁾、西川元也²⁾、
高倉喜信²⁾、檜垣和孝¹⁾、木村聰城郎¹⁾

1) 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 薬学系

2) 京都大学 大学院薬学研究科

抗がん剤の長期暴露により、がん細胞表面に高発現する P-糖タンパク質 (P-gp) が、抗がん剤の効果を減弱させることが知られている。本研究では、P-gp を高発現する C26 がん細胞を樹立し、ドキソルビシン (DOX) 内封 PEG 修飾リポソーム製剤による抗腫瘍効果を *in vitro*、*in vivo* 実験系において検討した。樹立したがん細胞の DOX に対する *in vitro* 感受性は、IC₅₀ 値で感受性株の約 200 倍高く、本細胞が DOX に対する耐性を獲得したことが確認された。この耐性株により作製した固形がんモデルマウスに対する DOX 内封 PEG 修飾リポソームの抗腫瘍効果を検討したところ、*in vitro* 実験系では効果が認められなかったのに対し、*in vivo* 実験系では感受性株と同程度の高い抗腫瘍効果が認められた。本結果は、耐性株において認められた *in vivo* 抗腫瘍効果に、DOX のがん細胞に対する直接作用以外の機序が関与している可能性を示唆している。

(420 字)

字数制限

タイトル：80 字以内

本文：420 字以内

アルブミン修飾 PEG リポソームの体内動態特性とその抗腫瘍効果の評価

渡 亮輔¹⁾、寺垣 拓哉¹⁾、大河原 賢一¹⁾、横江 淳一²⁾、甲斐 俊哉²⁾、檜垣 和孝¹⁾、
木村 聰城郎¹⁾

1) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬学系

2) ニプロ株式会社 医薬品研究所

我々はこれまでにポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームの表面にアルブミンを化学的に導入することで、その血中滞留性を増大できることを明らかにしてきた。今回はリモートローディング法によるドキシルビシンの効率的な内封が可能となるアルブミンの結合様式として、リポソーム、アルブミン両者を *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate にて活性化する SPDP 法、及びリポソーム側の活性化には異なるリンカーを使用する改良型 SPDP 法を用いることにより、アルブミン修飾 PEG リポソームを調製し、その静脈内投与後の体内動態特性ならびにドキシルビシンの内封したリポソームの固形がんに対する抗腫瘍効果の評価した。結果、改良型 SPDP 法により調製したアルブミン修飾 PEG リポソームは、その血中滞留性、腫瘍への蓄積性、抗腫瘍効果ともに、SPDP 法で調製したリポソームに比して、顕著に優れていることが明らかとなった。

(418 文字)

水酸基を有する高分子安定剤を用いたアニオン分散重合による 単分散ポリ(D,L-乳酸)ミクロスフェアの調製

岡山大院環 ○村中 誠、小野 努

【緒言】 現在、ポリ乳酸(PLA)ミクロスフェアの調製は液中乾燥法が主流である。しかしながら、この手法は予め合成した PLA を用いる多段階プロセスであり、得られる PLA ミクロスフェアの粒径は多分散となる[1]。一方、モノマーからの1段階反応である分散重合法は比較的単分散な PLA ミクロスフェアを調製することができる[2]。本研究室では、これまでに重合開始点である水酸基を有する poly(dodecyl methacrylate)-*co*-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PDMA-*co*-PHEMA) (Fig. 1) を高分子安定剤として用いた D,L-ラクチドの分散重合により単分散 PDLLA ミクロスフェアの調製に成功している。本発表では、PDMA-*co*-PHEMA の分子構造が得られた単分散 PDLLA ミクロスフェアの特性及び生成物形態へ及ぼす影響について報告する。

【実験】 開始剤として過酸化ベンゾイル、溶媒としてトルエンを用いてモノマーである DMA と HEMA を共重合した。得られた PDMA-*co*-PHEMA は、¹H NMR とゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により分子量、分子量分布、HEMA 導入率(CF)を算出した。

モノマーとして D,L-ラクチド、分散安定剤として PDMA-*co*-PHEMA を溶解させたキシレン/ヘプタン = 1/2 (v/v) の混合溶液を調製した。その溶液に触媒として2-エチルヘキサン酸ズ(II)を加えて重合した。調製した PDLLA ミクロスフェアは走査型電子顕微鏡により粒径と粒径分散度を測定した。

【結果・考察】 Fig. 2 に得られた PDLLA ミクロスフェアの SEM 写真を示す。Fig. 2 より、平滑な表面を持つ単分散 PDLLA ミクロスフェアであることが確認できた。このことから、分散安定剤として PDMA-*co*-PHEMA を用いた D,L-ラクチドの分散重合によって単分散 PDLLA ミクロスフェアの調製に成功した。

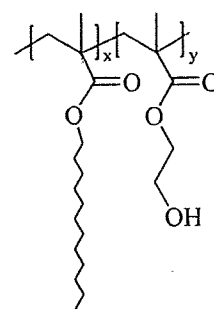


Fig. 1 Chemical structure of PDMA-*co*-PHEMA

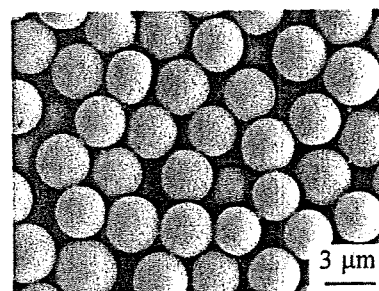


Fig. 2 SEM image of PDLLA microspheres prepared with PDMA-*co*-PHEMA-A.

Preparation of monodisperse poly(D,L-lactic acid) microspheres by anionic dispersion polymerization using the polymeric stabilizer with hydroxyl groups

Makoto MURANAKA, Tsutomu ONO (Graduate school of Environmental Science, Okayama University, 3-1-1 Tushima-naka, Okayama 700-8530, Japan)

Tsutomu ONO: Tel & Fax : +81-086-251-8908, E-mail:tono@cc.okayama-u.ac.jp

Key Word: Graft polymeric stabilizer / Anionic dispersion polymerization / Poly(D,L-lactic acid) microspheres / Polymeric micelles

Abstract: Poly(dodecyl methacrylate)-*co*-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PDMA-*co*-PHEMA), copolymer with hydroxyl groups, was synthesized by free radical copolymerization and was used as a stabilizer for the anionic dispersion polymerization of D,L-lactide. The effects of PDMA-*co*-PHEMA concentration and hydroxyl group number on the particle diameter and polydispersity were examined. In the case of PDMA-*co*-PHEMA with lower hydroxyl group number, monodisperse PDLLA microspheres were obtained. In contrast, in the case of PDMA-*co*-PHEMA with higher hydroxyl group number, polymeric micelles were formed.

Table 1 Characteristic parameters of PDMA-co-PHEMA and the product for dispersion polymerization

Stabilizer	PDMA-co-PHEMA			Product		
	M_w	M_w/M_n	CF (%)	Morphology	dp	CV (%)
PDMA-co-PHEMA-A	49,380	2.46	1.45	Microsphere	4.53 (μm)	6.14
PDMA-co-PHEMA-B	40,851	2.56	6.59	Aggregate	22, 145 (nm)	-
PDMA-co-PHEMA-C	40,817	2.35	9.59	Precipitate	-	-

Fig. 3 に PDMA-co-PHEMA-A を用いて得られた PDLLA ミクロスフェアと重合後の反応溶液中に存在する高分子安定剤の GPC における溶出曲線を示す。まず、PDLLA ミクロスフェアの溶出曲線は単一ピークを示していることから、精製操作により粒子表面に付着していたほぼ全ての高分子安定剤の除去を確認した。通常、分散重合法の欠点として微粒子表面に存在する高分子安定剤の除去が困難である。しかしながら、本重合系においては純粋な PDLLA ミクロスフェアを調製することができた。また、重合後の反応溶液中に存在する高分子安定剤の分子量は用いた PDMA-co-PHEMA よりも高分子量側にシフトしていた。このため、PDMA-co-PHEMA 構造中の水酸基から D,L-ラクチドの重合の進行が示唆された。

Table 1 は HEMA 導入率の異なる 3 種類の PDMA-co-PHEMA の分子構造と、それらを用いて得られた生成物の形態とその特性を示す。HEMA 導入率の最も小さい PDMA-co-PHEMA-A を用いた場合には PDLLA ミクロスフェアが得られた。次に、PDMA-co-PHEMA-B を用いた場合は、反応溶液は白濁することなく、半透明な溶液で得られた。この反応溶液を動的光散乱 (DLS) 測定した結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 より、二峰性ピークの存在が明らかとなり、反応溶液中で高分子会合体を形成していることが示唆された。PDMA-co-PHEMA-C を用いた場合には、反応中に大きなバルク状の塊が析出した。この析出物の ^1H NMR スペクトルを Fig. 5 に示す。Fig. 5 より、PDLLA と PDMA 由来の両ピークの存在を確認したため、この析出物が PDMA-co-PHEMA-co-P(MA-PDLLA)であることを同定した。今回の検討から、PDMA-co-PHEMA 構造中の HEMA 導入率を変化させることで、様々な形態をとる生成物を調製できることが明らかとなった。

【引用文献】

- [1] G. Ma, M. Nagai, O. Shinzo, *J. Colloid Surfaces A*, **153**, 383 (1999).
 [2] S. Sosnowski, M. Gadzinowski, S. Slomkowski, S. Penczek, *J. Bioactive Compatible Polym.*, **9**, 345 (1994)

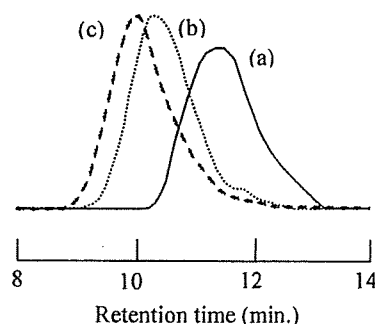


Fig. 3 GPC traces of (a) prepared PDLLA microspheres, (b) PDMA-co-PHEMA-A, (c) PDMA-co-PHEMA-co-P(MA-PDLLA)-A.

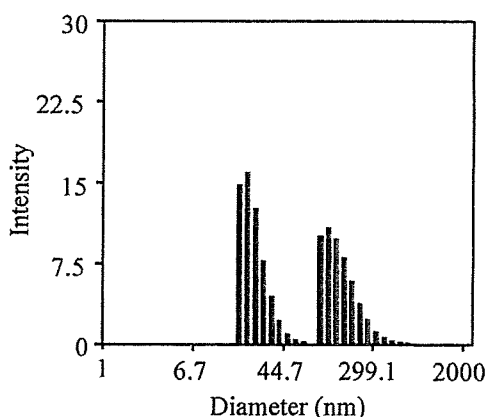


Fig. 4 DLS histogram of the reaction solution after the dispersion polymerization of D,L-lactide using PDMA-co-PHEMA-B.

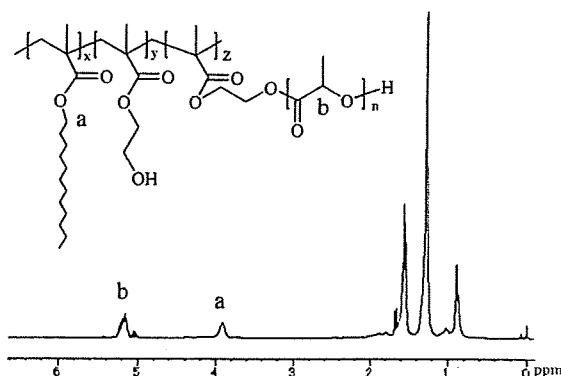


Fig. 5 ^1H NMR spectrum of the precipitate obtained from the dispersion polymerization of D,L-lactide using PDMA-co-PHEMA-C.

Time-Dependent Changes in Opsonin Amount Associated on Nanoparticles Alter Their Hepatic Uptake Characteristics

Ken-ichi Ogawara, Susumu Nagayama, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura

Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

Utilization of nanoparticulate drug carriers is one of the promising approaches to achieve the organ specific drug delivery. Intravenously injected nanoparticles first contact and associate with serum proteins including opsonins which are recognized by their specific receptors on macrophages in reticuloendothelial system, especially in the liver and spleen. This process, so-called opsonization, leads to the rapid elimination of nanoparticles from the blood circulation, which has limited the clinical application of nanoparticulate drug carriers so far. To understand and/or improve their in-vivo disposition, the interaction of nanoparticles with serum proteins has been intensively investigated. Although there are many papers describing the relationship between the opsonin amounts associated on the surface of particles and their affinity to the liver, there is no report investigating whether the time-dependent change in the adsorption profile of serum proteins on nanoparticles substantially alters the hepatic disposition or not. Therefore, in the present study, we investigated the correlation between the time-dependent change in the adsorption pattern of serum proteins on lecithin-coated polystyrene nanoparticle with a size of 50 nm (LNS-50), used as a model nanoparticle, and its disposition characteristics to the liver. The total amount of proteins adsorbed on LNS-50 increased and the qualitative profile of serum proteins adsorbed on LNS-50 changed during the incubation with serum up to 360 min. The liver perfusion study indicated that the hepatic uptake of LNS-50 incubated with serum for 360 min was significantly larger than those of LNS-50 incubated for shorter periods. Semi-quantification of major opsonins, complement C3 (C3) and immunoglobulin G (IgG), and in-vitro uptake study in primary cultured Kupffer cells demonstrated that the increase in C3 and IgG amounts adsorbed on LNS-50 was directly reflected in the increased disposition of LNS-50 to Kupffer cells. In addition, the amounts of some other opsonins that are known to enhance the uptake of nanoparticles by hepatocytes also increased over incubation time periods, which would be responsible for the time-dependent change in the in-vitro uptake characteristics of LNS-50 by hepatocytes. These results demonstrated that the amounts of opsonins associated on nanoparticles would change over time and this process would be substantially reflected in the alteration of their hepatic disposition characteristics.

In Vivo Anti-Tumor Effects of PEG-Modified Liposomal Doxorubicin on P-Glycoprotein Over-Expressing Tumor-Bearing Mice

Keita Un^{a)}, Takaaki Nakao^{a)}, Ken-ichi Ogawara^{a)}, Makiya Nishikawa^{b)}, Yoshinobu Takakura^{b)}, Kazutaka Higaki^{a)} and Toshikiro Kimura^{a)}

a) Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

b) Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

The resistance of cancer cells to various anti-cancer drugs such as doxorubicin (DOX) has been clinically observed and the effectiveness of these drugs gradually decreases during treatment. Multidrug resistance is, therefore, one of the greatest concerns in cancer chemotherapy. It has been considered that the over-expression of P-glycoprotein (P-gp), known as the multidrug efflux pumps, plays a key role in the tumor acquisition of multidrug resistance by inhibiting intracellular accumulation of drug. In the present study, we established the DOX-resistant colon-26 cancer cells (C26/DOX) and evaluated the *in vitro* cytotoxic effect and *in vivo* therapeutic effect of polyethylene glycol (PEG)-modified liposomal DOX for C26/DOX. First of all, we examined the *in vitro* sensitivity of C26/DOX to DOX. IC₅₀ value (40 μM) for C26/DOX was about 250-fold larger than that (0.15 μM) of control C26 (C26/control), demonstrating that C26/DOX was much more resistant to DOX. Western blot analysis confirmed the over-expression of P-gp in C26/DOX. The addition of verapamil, known as a P-gp blocker, to the medium dramatically potentiated the cytotoxic effect of DOX to C26/DOX. On the other hand, PEG liposomal DOX was not able to overcome the resistance of C26/DOX in the *in vitro* study. Then, we evaluated the *in vivo* therapeutic effect of PEG liposomal DOX by measuring the tumor volume in the C26/DOX- or C26/control-bearing mice. Unexpectedly, contrary to the *in vitro* studies, PEG liposomal DOX was significantly effective for both C26/DOX- and C26/control-bearing mice in terms of the extent of tumor growth inhibition. As the *in vivo* tumor accumulation of PEG liposome and the microvessel density within tumors were similar in both C26/DOX- and C26/control-bearing mice, other mechanisms except the direct effect of DOX to tumor cells would be responsible for the *in vivo* anti-tumor effect of PEG liposomal DOX in C26/DOX-bearing mice. Therefore, we focused on the endothelial cells surrounding angiogenic vessels within the tumor. IC₅₀ value of DOX in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), widely used as a model of angiogenic vascular endothelial cells, was found to be 0.16 μM, and this value was similar to that in C26/control. We are now trying to elucidate the substantial role of cytotoxic effect of DOX to endothelial cells in C26/DOX-bearing mice. (2367 letters, 366 words)

332p Phase Inversion Temperature (Pit) Method Utilized Preparation Of O/w Nano-Emulsion By Microreactor System

Jun Kubota¹, Aiko Kato, and Tsutomu Ono². (1) Department of Environmental Chemistry and Material, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-naka, Okayama, Japan, (2) Department of Material & Energy Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-naka, Okayama, Japan

O/W Nano-emulsion was successfully prepared by applying microreactor system in water/polyethylene glycol dodecyl ether (C12E4)/dodecane system by the phase inversion temperature method. Nano-emulsification was carried out by combining two consecutive microreactors. Initially, relatively large droplets were prepared in Y-shaped microchannel as pre-emulsification with distilled water as the continuous phase (flow rate; 100 μ l/min.) and 20 wt% C12E4-80 wt% dodecane solution as the disperse phase (flow rate; 40 μ l/min.). Immediately after that, prepared pre-emulsion was heated up to 333 K by passing through in a tubular microreactor. According to the standard recipe, time required to heat up at 333 K was measured to be 12.6 s. Heated solution was then cooled by air (298 K) to obtain nano-emulsion (droplet diameter; ca 100 nm, measured by dynamic light scattering (DLS)). Stability of the nano-emulsion was also investigated by measurement of the droplet diameter as a function of time. The results showed that the droplet diameter slightly increased from 90 to 120 nm with the elapse of time (up to 100 h). Furthermore, the noble estimation procedure was confirmed to design the suitable microreactor for nano-emulsification by the phase inversion temperature method. These investigations show the great potential for continuously preparing the monodispersed nano-emulsion, and can be expected to apply the pharmaceutical and cosmetic field.

ポリアスパラギン酸ナトリウムを主鎖に持つマクロモノマーを用いた高分子微粒子の調製

(岡山大学院環境学) ○富田恵介・小野 努

[緒言] 表面に機能性高分子鎖を持つ微粒子は様々な応用への展開が期待される先端材料の一つである。反応性官能基を持つ高分子(マクロモノマー)を用いた分散共重合や乳化共重合はワンプットで表面に高分子鎖を持つ微粒子の調製が可能な重合プロセスとして知られている。本研究では、側鎖にビニル基を持つポリアスパラギン酸ナトリウムマクロモノマー(VBA-PAspNa; Fig. 1)を用いたスチレンとの分散共重合を行い、重合挙動に及ぼす各種重合パラメーターの影響について検討した。

[実験] 本実験にはビニル基割合 10 mol%の VBA-PAspNa(重合度=307)を用いた。開始剤(2,2-アゾビスイソブチロニトリル)、モノマー(スチレン)、VBA-PAspNaをエタノール・水の混合溶媒(エタノール/水=3/2)に溶解させた。この溶液を反応器内に入れ、窒素置換後、343 Kで6時間反応させた。得られた微粒子のSEM観察により平均粒径を求め、粒径分布の指標となるCV(=標準偏差/平均粒径×100)を算出した。スチレンモノマー重合率は高速液体クロマトグラフィーにより測定した。粒子数は平均粒径と重合率から算出した。

[結果と考察] 異なるスチレンモノマー濃度でのVBA-PAspNaを用いたスチレンの分散共重合における粒子数・CVの経時変化をFig. 2に示す。重合初期に粒子数とCVの増加が確認された。また、スチレンモノマー濃度の増加に伴い、CVおよび粒子数の増加期間は長くなることがわかった。この粒子数とCVの増加は新生粒子の形成によるものであり、モノマー濃度の増加が新生粒子の形成を促進していることを示す。生成した粒子の表面はVBA-PAspNaで覆われており、スチレンオリゴマーの取り込みは抑制される。すなわち、新粒子の形成は均相で形成されるスチレンオリゴマーが既存の粒子に取り込まれずに析出・凝集したためであると推察される。他の重合パラメーターの影響については本発表にて詳しく説明する。

○とみたけいすけ・おのつとむ

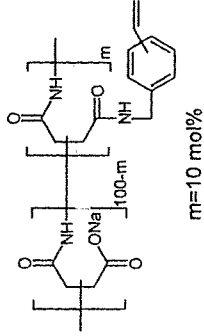


Fig. 1 Chemical structure of VBA-PAspNa

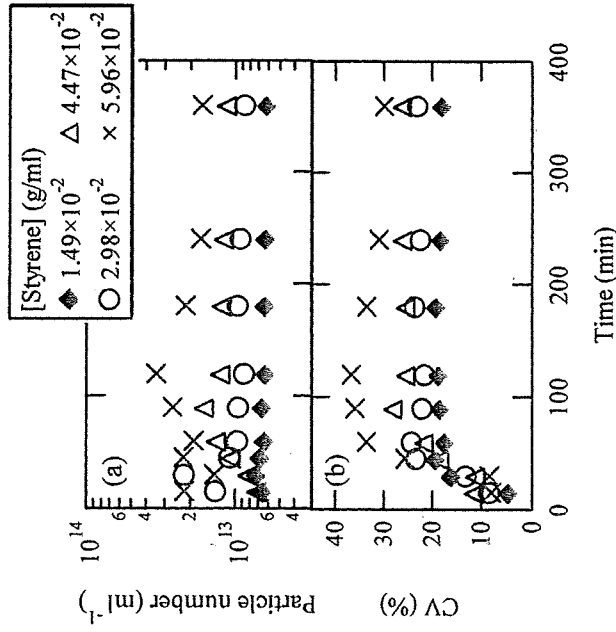


Fig. 2 Time course of (a) particle number, (b) CV in dispersion copolymerization with various concentration of styrene monomer.

RXR α/β 選択的アゴニスト NEt-3IP の開発と生理活性

加来田博貴¹、高松佳代¹、高野敦史¹、薬師寺信匡¹、森下健一¹、師橋一徳¹、大澤史宜¹、
原田隼¹、藤井周司¹、鄭曉霞¹、松浦信康²、槇島誠³、Hamed Ismail Ali⁴、
赤穂榮一⁴、永澤秀子⁵、杉本幸雄¹、田井章博¹、佐々木健二¹

(岡山大院・医歯薬¹、岡山理科大・理²、日本大・医³、神戸学院大・薬⁴、岐阜薬科大・薬⁵)

Development and biological activities of RXR α/β -selective agonist, NEt-3IP

Hiroki Kakuta¹, Kayo Takamatsu¹, Atsushi Takano¹, Nobumasa Yakushiji¹, Ken-ichi Morishita¹,
Kazunori Morohashi¹, Fuminori Ohsawa¹, Shun Harada¹, Zheng Xiaoxia¹, Shuji Fujii¹,
Nobuyasu Matsuura², Makoto Makishima³, Hamed Ismail Ali⁴, Eiichi Akaho⁴,
Hideko Nagasawa⁵, Yukio Sugimoto¹, Akihiro Tai¹, and Kenji Sasaki¹

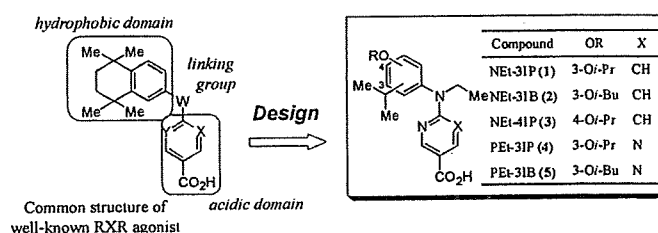
(¹Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, ²Okayama University of Science Faculty of Science, ³Nihon University School of Medicine Division of Biochemistry, Department of Biomedical Sciences,

⁴Kobe Gakuin University Faculty of Pharmaceutical Sciences, High Technology Research Center (Life Science Center),

⁵Gifu Pharmaceutical University, Pharmaceutical Science⁵)

【目的】

近年、RXR はタモキシフェン耐性乳がん、タキソール耐性肺がんに有用な分子標的として注目されている。RXR には α 、 β 、 γ の三つのサブタイプが知られているが、サブタイプ選択的アゴニストは未だ開発されていない。RXR の制御する生理機能は多岐にわたるため、サブタイプ非選択的な RXR アゴニストは目的としない作用発現の可能性がある。そこで我々はサブタイプ選択性を有することで作用スペクトルを適度に限定した RXR アゴニストの開発を目的に、本研究を行った。分子の脂溶性の低減によりサブタイプ選択性が得られるのではないかという仮説のもと、RXR アゴニストの脂溶性部位に共通して見られるテトラメチルシクロヘキシル環構造を極性基であるアルコキシ基へと変換した化合物をデザインし、合成した。



【In vitro 活性評価】

各化合物について、NBT還元法による一次スクリーニングを行った後、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによってそれぞれのサブタイプ活性化能を評価した。その結果、いずれの化合物にもRXRアゴニスト活性があることが示された。中でも、3位にイソプロポキシ基を持つNEt-3IP (1)は既存のRXRアゴニストに匹敵する活性であり、かつRXR α/β 選択性が示唆された (RXR α : EC₅₀ = 27 nM, RXR β : EC₅₀ = 35 nM, RXR γ : EC₅₀ > 380 nM)。

【In vivo 活性評価】

NEt-3IP (1)は毒性試験及び経口吸収試験において良好な結果を示した。RXR α/β 選択性を有する本化合物は既存のRXRアゴニストとは異なる生理活性を示すことが期待されたため、これを検討するべく種々のin vivo試験を行った。まず、RXRアゴニストの主な副作用である血中トリグリセリド(TG)濃度の上昇が、既存のRXRアゴニストであるLGD1069と比べてNEt-3IP (1)では弱いことが分かった。さらに、本化合物は単独にて抗炎症作用を発揮し、また血管新生抑制作用も見られたことから抗がん活性を有することが示唆された。

【まとめ・展望】

我々はRXR α/β 選択的アゴニストNEt-3IP (1)の開発に成功した。本化合物はLGD1069に比べ、RXRアゴニストの主な副作用である血中TG濃度の上昇作用が比較的弱かった。さらに単独にて抗炎症作用を発揮し、血管新生抑制作用も見られたことから、NEt-3IP (1)は新たな抗炎症薬もしくは抗がん薬としてその展開が期待できるものと思われる。

RXR アゴニスト脂溶性部位の脂溶性低減による RXR サブタイプ指向性の創出 —リンカー部位にスルホンアミド基を有する—

(岡山大院・医歯薬¹、岡山理科大・理²、日本大・医³、神戸学院大・薬⁴)

高松佳代¹、高野敦史¹、○薬師寺信匡¹、森下健一¹、大澤史宜¹、藤井周司¹、松浦信康²、
槇島誠³、Hamed Ismail Ali⁴、赤穂榮一⁴、田井章博¹、佐々木健二¹、加来田博貴¹

【はじめに】

RXR(Retinoid X Receptor)とは、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性の転写調節因子の一つであり、RXR α , β , γ の三つのサブタイプが知られている^{1,2}。RXR アゴニストは、既存薬との併用によりタモキシフェン耐性乳がんやタキソール耐性肺がんに有用であるとして注目されている^{3,4}。しかし、代表的な RXR アゴニスト(Figure 1)は、RXR サブタイプ選択性を示さない^{5,6}。そのため作用スペクトルが広く、目的としない作用まで発現してしまうことが予想される。そこで我々は、サブタイプ選択性のある RXR アゴニスト開発を目指し本研究を行った。これまでサブタイプ選択的 RXR アゴニストが見出されていない理由として、RXR サブタイプ間でのリガンド結合部位のアミノ酸配列の相同性が極めて高いことが挙げられる。そのような中、我々は既存の RXR アゴニストの中でも、脂溶性の指標である CLogP の値が他のアゴニストよりも低い PA024 (3)⁷において各サブタイプ間の EC₅₀ 値に差が見られることに着目し、脂溶性の低減によりサブタイプ選択性が得られるのではないかと仮説を立て、本研究を行った。

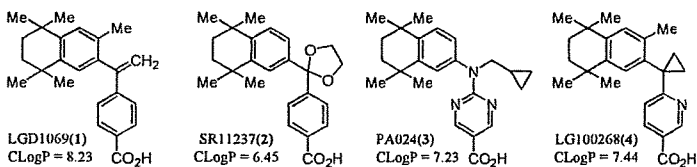


Figure 1. Chemical structures of known RXR agonists.

【分子設計】

脂溶性を低減させた RXR アゴニストの開発のために、極性基であり多くの医薬品の構造に利用されているスルホンアミド基を導入した分子を設計した(Figure 2)。また、より脂溶性を低下させるため、RXR アゴニストに共通するいわゆる酸性部位 (acidic domain) について、安息香酸以外にニコチン酸、ピリミジンカルボン酸に変換した分子を設計した。

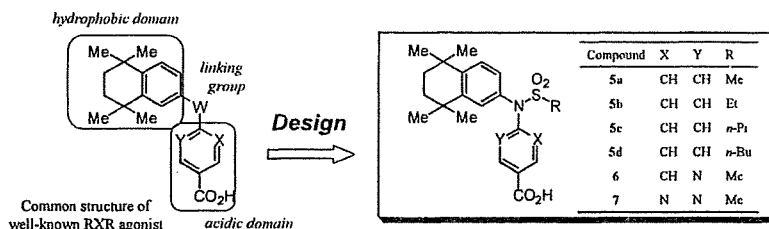


Figure 2. Strategy for the molecular design of low lipophilic RXR agonists possessing sulfonamide moieties.

【活性評価】

RXR アゴニスト活性のみを有する化合物は、単独では分化誘導を示さないが、ごく低用量の RAR アゴニスト (レチノイド) と共存させるとその分化誘導能を相乗的に高める (レチノイドシナジスト作用)^{8,9}。この作用はヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL-60 を用いた NBT 還元試験^{10,11,12}にて、容易に評価出来る。そこで、合成した化合物の一次評価として NBT 還元試験によるレチノイド作用及びレチノイドシナジスト作用を評価した⁷。その結果、化合物 5a, 6 及び 7 にレチノイドシナジスト作用が見られ、RXR アゴニスト作用が示唆された。そこで、これらの活性が RXR を介した作用であるのかを評価し、さらに各 RXR サブタイプごとの EC₅₀ を算出するために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った^{7,13,14}。

その結果、これらのレチノイドシナジスト作用は RXR を介した作用であることが示された。さらに RXR α , β , γ 各サブタイプに対する EC₅₀ がそれぞれ 230 nM, 2800 nM, 630 nM である化合物 5a が見出された(Table 1)。化合物 5a は既存の RXR アゴニストよりも低活性であるものの、RXR α 指向性が見られた。加えて、既存の RXR アゴニストの中でも特に脂溶性の低い SR11237 (2)にもサブタイプ指向性が見られることを見出した。一方、化合物 5a に比べ低い CLogP 値を示す化合物 6, 7 は、サブタイプ間での EC₅₀ 値の差が小さくなったことから、分子全体の脂溶

性を低減させることがサブタイプ選択性につながる訳ではなく、リンカー部位を含む脂溶性部位の脂溶性低減によってサブタイプ選択性を得るという傾向が示された。

スルホンアミド基を導入したものが既存のRXRアゴニストに比べ低活性であった点について、RXR α と化合物5aとで、AutoDock 3.05¹⁵を用いたdocking simulationにより検討したところ、メタンスルホンアミド基がLeu³⁰⁹、Ile³¹⁰、Cys⁴³²を含むRXRの疎水性残基と近接し、不安定な疎水性結合を形成することが化合物5aのRXR活性低下の理由であると示唆された。

【総括】

本研究により、我々は低活性であるもののサブタイプ指向性が見られるRXRアゴニスト5aを見出し

た。さらにRXRサブタイプ指向性を生じるには、分子の脂溶性を低減させる手段として、脂溶性部位の脂溶性を低減させることが重要であることを見出した。この結果を受け、RXRアゴニストに共通して見られるテトラメチルシクロヘキシル環構造の構造変換を次なる戦略として展開している。

Table 1. Cotransfection data for compounds 5, 6, 7 and known RXR agonists

Compounds	RXR α		RXR β		RXR γ		CLogP
	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	
5a	230	112	2800	58	630	59	6.55
5b	300	79	2000	102	1200	112	7.08
5c	1900	71	2400	24	2500	73	7.61
5d	2600	33	3000	28	2000	17	8.14
6	110	98	530	90	380	81	6.17
7	2100	156	260	81	1300	42	5.46
LGD1069(1)	3	105	4	114	3	103	8.23
SR11237(2)	22	95	86	98	430	122	6.45
PA024(3)	3	100	24	100	11	100	7.23

Reduction of lipophilicity at the lipophilic domain of RXR agonists enables production of subtype-preference:RXR α -preferential agonist possessing a sulfonamide moiety

Kayo Takamatsu¹, Atsushi Takano¹, Nobumasa Yakushiji¹, Ken-ichi Morishita¹,
Fuminori Ohsawa¹, Shuji Fujii¹, Nobuyasu Matsuura², Makoto Makishima³,
Hamed Ismail Ali⁴, Eiichi Akaho⁴, Akihiro Tai¹, Kenji Sasaki¹, and Hiroki Kakuta¹

¹Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences,

²Okayama University of Science Faculty of Science,

³Nihon University School of Medicine Division of Biochemistry, Department of Biomedical Sciences,

⁴Kobe Gakuin University Faculty of Pharmaceutical Sciences, High Technology Research Center (Life Science Center)

Retinoid X receptor agonists (RXR agonists, retinoids) are interesting candidates for the treatment of cancers such as tamoxifen-resistant breast cancers and taxol-resistant cancers. However, well-known RXR agonists are likely to produce undesirable side effects caused by their strong lipophilic character and/or multiple working points due to RXRs, which exist ubiquitously in the body and act as heterodimeric partners with various nuclear receptors. In order to create less-lipophilic and action spectrum-diminished RXR agonists, sulfonamidetype RXR agonists were designed to generate 4-[N-methanesulfonyl-N-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)amino]benzoic acid (5a) as an RXR α -preferential agonist, although the potency is less than those of well-known RXR pan-agonists. Our finding that the reduction of lipophilicity at the lipophilic domain of the common structure of RXR agonists enables production of subtype-selective RXR agonists will be useful for the creation of more potent and less-lipophilic subtype-selective RXR agonists aimed at the reduction of undesirable side effects.

References 1) *Endocr. Rev.* 1999, 20, 689-725. 2) *Cell* 1995, 83, 835-839. 3) *Cancer Lett.* 2003, 201, 17-24. 4) *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 8656-8664. 5) *J. Nutr.* 2000, 130, 479-482. 6) *J. Med. Chem.* 2005, 48, 5875-5883. 7) *Chem. Pharm. Bull.* 2000, 48, 1504-1513. 8) *J. Med. Chem.* 1988, 31, 2182-2192. 9) *J. Med. Chem.* 1994, 37, 1508-1517. 10) *J. Med. Chem.* 2005, 48, 5875-5883. 11) *J. Exp. Med.* 1979, 149, 969-974. 12) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987, 145, 514-521. 13) *Cell* 1991, 65, 1255-1266. 14) *Methods Mol. Biol.* 1997, 63, 49-60. 15) *J. Comput. Chem.* 1998, 19, 1693-1662.

高活性 RXR α/β 選択的アゴニスト NEt-3IP の開発 — 脂溶性部位にアルコキシ基を有する —

(岡山大院・医歯薬¹、岡山理科大・理²、日本大・医³)

高松佳代¹、高野敦史¹、薬師寺信匡¹、○森下健一¹、師橋一徳¹、大澤史宜¹、藤井周司¹、
松浦信康²、横島誠³、田井章博¹、佐々木健二¹、加来田博貴¹

【はじめに】

近年、RXR アゴニストはタモキシフェン耐性乳がん、タキソール耐性肺がんに有用な医薬分子として注目されている^{1,2}。RXR アゴニストの開発はいくつか行われているが、それらはサブタイプに対する選択性を持っていない。RXR の制御する生理機能は多岐にわたるため、サブタイプ選択性を持たない RXR アゴニストは目的としない作用発現の可能性がある。そこで我々は、サブタイプ選択性を有することで作用スペクトルを限定した RXR アゴニストの開発に興味を持ち研究を行ってきた。

我々はこれまでに、リンカー部位にスルホンアミド基を有するサブタイプ指向性のある RXR アゴニスト 1 を見出している (Figure 1)³。しかし、本化合物は既存の RXR アゴニストに比べて活性が低いことが問題となった。さらにサブタイプ指向性を得るには、分子全体の脂溶性を低減させることより、いわゆる脂溶性部位の脂溶性を低減させることが重要であることも見出している³。この結果を受け、本研究では RXR アゴニストの脂溶性部位に共通して見られるテトラメチルシクロヘキシル環構造の構造変換を次なる戦略として展開した。

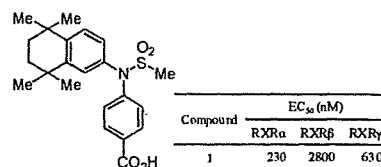


Figure 1. RXR subtype-preferential agonist (1) possessing a sulfonamide group.

【分子設計】

既存の RXR リガンドの脂溶性の高さは脂溶性部位に共通して見られるテトラメチルシクロヘキシル環構造による寄与が大きいと考えられる。そこで我々は、テトラメチルシクロヘキシル環構造を、アルコキシ基とイソプロピル基を含んだ構造に変換した (Figure 2)。また、酸性部位の極性を上げることで活性が増加する傾向にあることから、本化合物の酸性部位にはニコチン酸及び、ピリミジンカルボン酸を導入した。デザインした各化合物について脂溶性の指標である CLogP の値を計算したところ、既存の RXR アゴニストに比べて大幅に脂溶性が低減されることが示唆された。

【活性評価】

各化合物について、1 次スクリーニングとして HL-60 細胞を用いた NBT 還元試験^{4,5,6}を行った。化合物単独では HL-60 細胞が分化誘導を示さないことから、これらの化合物にはレチノイド活性がないことが示された。各化合物とごく低用量の RAR (Retinoic Acid Receptor)

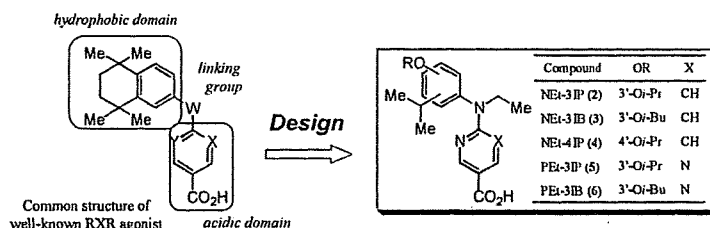


Figure 2. Strategy for the molecular design of subtype-selective RXR agonists possessing alkoxy and isopropyl groups.

Acid Receptor) アゴニストである Am80⁴ を併用することで分化誘導作用を示したことから、これらの化合物にはレチノイドシナジスト活性があり、RXR アゴニスト活性を持つことが示唆された。そこで、このレチノイドシナジスト作用が RXR を介した作用であることを示すために、COS-1 細胞を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ^{7,8}を行ったところ、いずれの化合物にも RXR アゴニスト活性があることが示された (Table 1)。

ピリミジンカルボン酸を有する化合物は、ニコチン酸を有する化合物に比べ活性が増加する傾向にあるが、サブタイプに対する選択性が減少した。このことより、分子全体の脂溶性を低減させるとサブタイプ選択性が生じるわけではなく、脂溶性部位の脂溶性を低減することでサブタイプ選択性が生じるという我々の考えが支持された。また、アルコキシ基を 4 位に有する NEt-4IP (4) が、アルコキシ基を 3 位に有する化合物に比べて活性が低いことから、アルコキシ基の導入は 3 位が適していることが示唆された。3 位にイソプロピル基を持つ NEt-3IB (3) はそれぞれのサブタイプに対する EC₅₀ が、0.77 nM、18 nM、3 nM であり、既存の RXR アゴニストに勝る高活性な RXR アゴニストであった。この化合物は高活性ではあるものの、サブタイプ選択性は低かった。一方、3 位にイソプロ

ポキシ基を持つ NEt-3IP (2) はそれぞれのサブタイプに対する EC₅₀ が、27 nM、35 nM、>380 nM であり、既存の RXR アゴニストに匹敵する活性であると同時に、RXR α / β に対する選択性が見られた。本化合物は初の高活性かつサブタイプ選択性を持った RXR アゴニストであると言える。

【総括】

本研究において、我々は高活性かつサブタイプ選択性を持つ RXR アゴニスト NEt-3IP(2) を見出した。本化合物は RXR α / β サブタイプ選択的 (RXR α / β デュアル) アゴニストであることから、作用スペクトルを限定した RXR アゴニストとして、その機能に大変興味を持たれる。RXR は RAR(Retinoic Acid Receptor)、VDR(Vitamin D Receptor)、PPAR(Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)、TR(Thyroid hormone

Receptor) などの他の核内受容体とヘテロダイマーを形成し、相乗的に働く^{9,10,11}。したがって、これらの核内受容体に対し作用する薬物の副作用軽減を目的とした dose reducer として、NEt-3IP (2) は応用可能ではないかと考えている。本化合物の特徴を解析するために、*in vivo* における活性評価を行っている。なお本化合物の構造・用途などに関しては特許出願済みである。(特願:2007-048059)

Table 1. Cotransfection data for synthetic compounds and known RXR agonists in COS-1 cells

Compound	RXR α		RXR β		RXR γ		CLogP
	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	
NEt-3IP(2)	27	130	35	110	>380	>88	5.61
NEt-3IB(3)	0.77	110	18	140	3.0	100	6.23
NEt-4IP(4)	>660	>110	>1300	>80	>350	>81	5.61
PEt-3IP(5)	6.0	110	18	100	>58	105	4.89
PEt-3IB(6)	2.9	110	7.3	140	4.9	105	5.50
LGD1069	3.3	105	4.3	114	2.8	103	8.23
PA024	3.0	100	24	100	11	100	7.23

The first potent subtype-selective RXR agonist
possessing a 3-isopropoxy-4-isopropylphenylamino moiety,
NEt-3IP (RXR α / β -selective agonist)

Kayo Takamatsu¹, Atsushi Takano¹, Nobumasa Yakushiji¹, Ken-ichi Morishita¹,
Kazunori Morohashi¹, Fuminori Ohsawa¹, Shuji Fujii¹, Nobuyasu Matsuura²,
Makoto Makishima³, Akihiro Tai¹, Kenji Sasaki¹, Hiroki Kakuta¹

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences¹,

Okayama University of Science Faculty of Science²,

Nihon University School of Medicine Division of Biochemistry, Department of Biomedical Sciences³

Retinoid X Receptor (RXR) agonists (retinoids) are attracting much attention recently for their use in treatment of cancers, including tamoxifen-resistant breast cancer and taxol-resistant lung cancer. However, known RXR agonists are likely to have undesirable side effects caused by their highly lipophilic character and/or broad working spectra due to their RXR pan-agonists, we created new RXR agonists possessing alkoxy and isopropyl groups as a lipophilic domain of the common structure of well-known RXR agonists. As a result, compounds possessing branched alkoxy groups, 6-[N-ethyl-N-(3-isopropoxy-4-isopropylphenyl)amino]nicotinic acid (NEt-3IP) and 6-[N-ethyl-N-(3-isobutoxy-4-isopropylphenyl)amino]nicotinic acid (NEt-3IB) showed RXR agonistic activity as potent as or more potent than the activities of representative RXR agonists. Moreover, NEt-3IP was found to be the first RXR α / β -selective (or RXR α / β -dual) agonist. Being potent and less-lipophilic and having RXR subtype selective activity, NEt-3IP is expected to become a new medicinal product with less adverse effects and to be a useful biological tool for clarifying each RXR subtype function.

References 1. *Cancer Lett.* 2003, 201, 17-24. 2. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 8656-8664. 3. *ChemMedChem*, Submitted. 4. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 5875-5883. 5. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15, 3540-3551. 6. *J. Exp. Med.* 1979, 149, 969-974. 7. *Cell* 1991, 65, 1255-1266. 8. *Methods Mol. Biol.* 1997, 63, 49-60. 9. *Endocr. Rev.* 1999, 20, 689-725. 10. *Cell* 1995, 83, 835-839. 11. *Cell* 1995, 83, 841-850.

RXR α/β デュアルアゴニスト NEt-3IP の抗炎症及び抗がん作用の検証
(岡山大院・医歯薬¹、日本大・医²、岐阜薬科大・薬³)

○高野敦史¹、原田隼¹、鄭曉霞¹、薬師寺信匡¹、森下健一¹、大澤史宜¹、藤井周司¹、
杉本幸雄¹、田井章博¹、横島誠²、永澤秀子³、佐々木健二¹、加来田博貴¹

【はじめに】

我々はこれまでに、世界初のレチノイドX受容体 (retinoid X receptor; RXR) α/β デュアルアゴニストであるNEt-3IP (1)の開発に成功している (Figure 1)。本化合物は、市販の安価な原料を用いて合成可能である。RXRには α 、 β 、 γ の3つのサブタイプが存在する¹が、既存のRXRアゴニストはいずれのサブタイプにも同等の活性があるRXRパンアゴニストであるのに対し、本化合物は高活性でRXR α/β サブタイプ選択性を有する (RXR α : EC₅₀ = 27 nM, RXR β : EC₅₀ = 35 nM, RXR γ : EC₅₀ > 380 nM)。そのため、本化合物は既存のRXRアゴニストとは異なる生理活性を示すことが期待された。本研究においては、本化合物の生理活性を検討するために*in vivo*試験を行った。

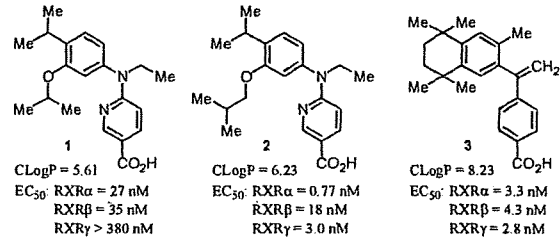


Figure 1. Chemical structures, CLogP and EC₅₀ values of NEt-3IP (1), NEt-3IB (2) and LGD1069 (3).

【経口吸収試験、急性毒性試験】

開発化合物の経口吸収を、ラットを用いて調べた。その結果、NEt-3IP (1)は30 mg/kg投与で投与後30分において最大血中濃度を与えた (Figure 2)。一方でNEt-3IB (2)は、*in vitro*試験においてサブタイプ選択性は乏しいもののNEt-3IP (1)や既存のRXRアゴニストで有名なLGD1069 (3)をしのぐ高活性を示すが、十分な血中濃度が確認出来なかった。NEt-3IP (1)について、マウスを用いた急性毒性試験を行ったところ、300 mg/kgの腹腔内投与においても顕著な毒性が認められなかった。

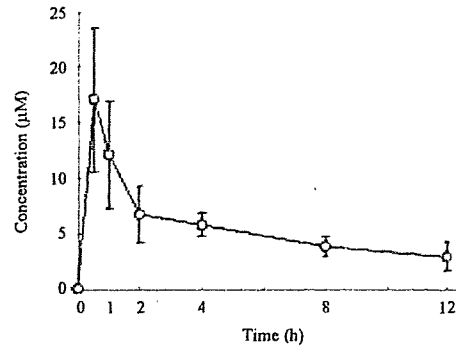


Figure 2. Plasma concentration of NEt-3IP (1) (30 mg/kg p.o.).

【体重変化、血中トリグリセリド濃度測定】

既存のRXRアゴニスト投与による問題点として、血中トリグリセリド (TG) 濃度の上昇が挙げられる²。そこで、SDラットに対しNEt-3IP (1)もしくはLGD1069 (3)をそれぞれ10 mg/kg/dで7日間経口投与し、被験化合物投与直前の体重測定および1、3、5、7日目の化合物投与2時間後に得た血漿中のTG濃度測定を行った (Figure 3)。その結果、LGD1069 (3)ではcontrolに比べ顕著な体重増加が見られたが、NEt-3IP (1)ではその現象は見られなかった。一方、血中TG濃度については、NEt-3IP (1)はLGD1069 (3)よりも影響が少なかった。血中TG濃度上昇の原因の一つに、RXRによる甲状腺刺激ホルモン (TSH) の発現抑制が知られている²³。この作用は特にRXR γ の寄与が大きいという報告⁴もある。したがって、NEt-3IP (1)において血中TG上昇がLGD1069 (3)に比べて抑制されたのはRXR γ に対する作用が弱いためだと考えられる。

【抗炎症試験】

RXRアゴニストには、抗炎症効果が知られているPPAR γ アゴニストとヘテロダイマーを形成し、その効果を増強するシナジスト効果が知られている⁵。そこで弱いPPAR γ アゴニストである

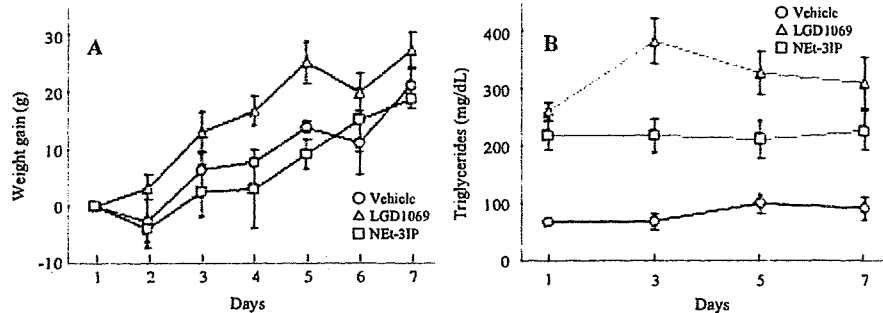


Figure 3. Effects of RXR agonists on body weight gain (A) and plasma triglyceride levels (B) in Sprague Dawley (SD) rats. SD rats (each group: n = 5-6) were treated with vehicle (1% ethanol/99% carboxymethyl cellulose), LGD1069 (3) (10 mg/kg) or NEt-3IP (1) (10 mg/kg) by oral gavage for 7 days. A; Body weights were measured at 0.5 h before drug administration. B; Plasma triglyceride levels were measured at 2 h after administration on day 1, 3, 5 and 7.

5-aminosalicylic acid
(5-ASA)との併用による
NEt-3IP (1)の抗炎症効果

を、カラゲニン浮腫試験⁶を用いて評価した (Table 1)。その結果、5-ASA 100 mg/kgではほとんど抗炎症作用が見られなかったのに対し、NEt-3IP (1) 10 mg/kg併用では効果が見られた。しかし、NEt-3IP (1) 10 mg/kg単独投与における抗炎症効果と比較したところ、併用時との差が認められなかった。この結果はNEt-3IP (1)にPPAR γ アゴニスト作用があり、自身のPPAR γ 活性がNEt-3IP (1)自身のシナジスト作用により増強されたためではないかと考えている。現在、NEt-3IP (1)のPPAR γ に対するルシフェラーゼレポータージーンアッセイを行っている。

【抗がん活性評価】

既知のRXR アゴニストは血管新生抑制作用、抗タモキシフェン耐性乳がん作用などの抗がん作用が報告されている⁷。そこでNEt-3IP (1)についてもこれらの活性を検討した。有精卵を用いた chorioallantoic membranes (CAM)法⁸によるNEt-3IP (1)の血管新生抑制作用を調べたところ、100 ng/CAMにおいて有効であることが示唆された。各種がん細胞を用いたMTT法による抗がん活性評価も検討中である。LGD1069 (3)との比較結果も併せて発表する。

【総括・展望】

我々が開発したRXR α/β デュアルアゴニストNEt-3IP (1)は、既存のRXRアゴニストであるLGD1069 (3)に見られる急激な体重上昇が見られず、また主な副作用である顕著な血中TG濃度の上昇作用が比較的弱かった。またNEt-3IP (1)は単独にて抗炎症作用を発揮した。さらに、血管新生抑制作用も見られたことから、NEt-3IP (1)は抗がん活性を有することが示唆された。これらの結果から、NEt-3IP (1)は、新たな抗炎症薬もしくは抗がん薬としてその展開が期待できるものと思われる。

Table 1. Effects of 5-ASA, NEt-3IP (1) and 5-ASA + NEt-3IP on carrageenin-induced paw edema in rats

Compound	Swelling (%)	Inhibition ^a (%)
Control	43.9 \pm 0.1	-
5-ASA (100 mg/kg)	43.6 \pm 4.5	0.6
NEt-3IP (1) (10 mg/kg)	36.9 \pm 3.8	15.9
5-ASA (100 mg/kg) + NEt-3IP (1) (10 mg/kg)	37.5 \pm 4.0	14.5

a) Inhibition (%) was calculated as follows: Inhibition (%) = (1 - swelling (%) in treated group / swelling (%) in control group) \times 100.

Anti-inflammatory and antitumor activities of RXR α/β dual agonist, NEt-3IP

oAtsushi Takano¹, Shun Harada¹, Zheng Xiaoxia¹, Nobumasa Yakushiji¹, Ken-ichi Morishita¹, Fuminori Ohsawa¹, Shuji Fujii¹, Yukio Sugimoto¹,

Akihiro Tai¹, Makoto Makishima², Hideko Nagasawa³, Kenji Sasaki¹, Hiroki Kakuta¹

(Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences¹, Nihon University School of Medicine Division of Biochemistry, Department of Biomedical Sciences² Gifu Pharmaceutical University, Pharmaceutical Science³)

NEt-3IP (1), the first potent RXR α/β dual agonist, is expected to become new drug candidates and to show different biological activities from known RXR agonists. In this study, *in vivo* activities of NEt-3IP (1) were evaluated. As a result, NEt-3IP (1) was absorbed satisfactorily in rats (30 mg/kg, *p.o.*) and showed no acute toxicity in mice (300 mg/kg, *i.a.*). Although LGD1069 (3) increased body weight gain compared with control, NEt-3IP (1), interestingly, showed no effects on body weight gain. In addition, TG increase by NEt-3IP (1) was less than by LGD1069 (3). In order to evaluate for PPAR γ synergistic activity of NEt-3IP (1), carrageenin-induced paw edema test was performed with combination of NEt-3IP (1) and 5-aminosalicylic acid, a quite weak PPAR γ agonist. NEt-3IP (1) (10 mg/kg) alone showed anti-inflammatory activity. For antitumor activity of NEt-3IP (1), anti-angiogenic activity assay using chorioallantoic membranes (CAM) of growing chick embryos was performed. As a result, NEt-3IP (1) was suggested to possess anti-angiogenic activity. These results suggest that NEt-3IP (1) might be a new RXR agonist for anti-inflammatory and/or antitumor agents.

References 1) *Endocr. Rev.* 1999, 20, 689-725. 2) *Clin. Cancer Res.* 1999, 5, 1658-1644. 3) *Endocrinology* 2002, 143, 2880-2885. 4) *Endocrinology* 2006, 147, 1438-1451. 5) *Cell* 1995, 83, 841-850. 6) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95, 13313-13318. 7) *Cancer Lett.* 2003, 201, 17-24. 8) *Eur. J. Pharmacol.* 1993, 249, 113-116.

末端にビニル基を導入した縮合系マクロモノマーの合成と微粒子調製への応用

(岡山大院環) O(学)富田恵介・(正)小野 努*

1. 緒言

反応性分散安定剤であるマクロモノマーを用いた分散重合や乳化重合は、表面に高分子鎖を持つ機能性微粒子の調製が可能なワンポットプロセスとして知られている。分散重合や乳化重合において、主にポリエチレンオキシド(PEO)系のマクロモノマーが使用されており、多くの報告がなされている。しかしながら PEO 鎖の化学修飾、すなわち機能性官能基の導入は困難である。そこで我々は機能性官能基の導入が容易なポリアスパラギン酸ナトリウム(PAspNa)を主鎖に持つマクロモノマーの設計を検討した。このマクロモノマーを微粒子調製に用いることで、様々な機能性を微粒子表面に付与することが期待できる。本報告では PAspNa の主鎖末端にビニル基を導入した PAspNa マクロモノマーを合成し、スチレンとの分散共重合に应用することで機能性微粒子の調製を試みた。

2. 実験

2. 1. PAspNa マクロモノマーの合成

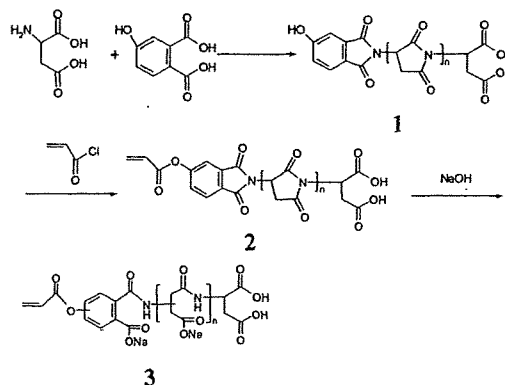
リン酸存在下、4-ヒドロキシフタル酸(HPA)を加えた L-アスパラギン酸の重縮合により 1 を得た。さらに 1 とアクリロイルクロライドの反応により 2 を合成し、水酸化ナトリウムで主鎖のイミド環を加水分解させることで PAspNa マクロモノマー 3 を合成した。また比較として、1 を加水分解することでビニル基を持たない PAspNa 誘導体 3' を合成した。

2. 2. マクロモノマー分散共重合による微粒子調製

開始剤(2,2'-アゾビスイソブチロニトリル)、モノマー(スチレン)、PAspNa マクロモノマーをエタノール-水の混合溶媒(エタノール/水=3/2)に溶解させた。この溶液を反応器内に入れ、窒素置換後、343 K で6時間反応させた。得られた高分子微粒子は SEM により観察し、粒径を測定した。

3. 結果・考察

HPA を添加した L-アスパラギン酸の重縮合プロセスにより 1 が得られた。¹H-NMR 測定により 1 の末端にはヒドロキシフタルイミド基が定量的に導入されていることが確認された。また全モノマー中の HPA 割合を 0.6-6.9 mol%と変化させることで重量平均分子量



Scheme 1 Synthesis of PAspNa macromonomer

(M_w)を 5,200-32,000 と制御することができた。

$M_w=7,688$ の 1 を用いて、ビニル基を持つ PAspNa マクロモノマーとビニル基を持たない PAspNa 誘導体を合成し、それぞれを分散安定剤として用いたスチレンの分散(共)重合を試みた。得られた高分子微粒子の SEM 画像を Fig. 1 に示す。図から明らかなように、ビニル基を持つ PAspNa マクロモノマーを用いた重合では、ビニル基を持たない PAspNa 誘導体を用いた重合に比べて 1 オーダー小さい粒径の微粒子が得られた。このことから末端にビニル基を導入した PAspNa マクロモノマーは微粒子調製のための反応性分散安定剤として有効であることがわかった。

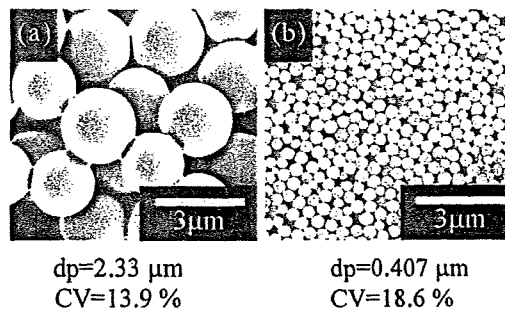


Fig. 1 SEM images of the particles prepared by dispersion copolymerization of styrene with PAspNa derivatives: (a) PAspNa derivative without vinyl terminal group (3'); (b) PAspNa macromonomer (3). $[3 \text{ or } 3'] = 2.22 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$

* Tel&Fax: 086-251-8908
tono@cc.okayama-u.ac.jp

単分散ポリ乳酸ミクロスフェアの調製における高分子分散剤の分子設計

(岡山大院環) ○(学) 村中 誠, (正) 小野 努*

1. 緒言

近年、バイオマス由来の環境調和型高分子材料であるポリ乳酸 (PLA) は合成や成形から分解に至るまで幅広く研究されている。しかしながら、PLA の微粒子化技術の研究は十分に行われていない。そこで本研究では、モノマーからの一段階反応で高分子ミクロスフェアが調製できる分散重合を用いて高機能性 PLA ミクロスフェアの調製を目指している。この際、粒径の単分散化は機能性微粒子を調製するための重要な要素技術であることから、ポリ(D,L-乳酸) (PDLLA) をグラフト鎖に持つ PDMA-co-P(MA-PDLLA)、および重合開始基でもある水酸基を有する PDMA-co-PHEMA を分散剤に用いて単分散 PDLLA ミクロスフェアの調製を試みた (Fig. 1)。本講演では、合成した高分子分散剤の分子構造が得られる PDLLA ミクロスフェアの粒径や粒径分散度に与える影響について報告する。

2. 実験

PDMA-co-P(MA-PDLLA)の合成は、末端に重合基を有するマクロモノマーMA-PDLLA とメタクリル酸ドデシル (DMA) の共重合によって行った。また、PDMA-co-PHEMA は、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (HEMA) と DMA を共重合することで合成した。

D,L-ラクチドの分散重合は、合成した高分子分散剤とモノマーである D,L-ラクチドを溶解させたキシレン/ヘプタン = 1/2 (v/v)の混合溶液で行った。その際、2-エチルヘキサン酸スズ(II)を触媒として用いて重合した。

3. 結果及び考察

Fig. 2 に 2 種類の高分子分散剤を用いて得られた PDLLA ミクロスフェアの SEM 写真を示す。Fig. 2 より、PDMA-co-P(MA-PDLLA)を用いた場合は、比較的単分散なサブミクロンオーダーの PDLLA ミクロスフェアが得られた。また、PDMA-co-P(MA-PDLLA)濃度とグラフト鎖導入率を変化させることで、200 nm から 5 μ m までの広範囲において粒径を制御できた。一方、PDMA-co-PHEMA を用いた場合は、ミクロンオーダーの単分散 PDLLA ミクロスフェアが得られた。Fig. 3 は PDMA-co-PHEMA を用いて得られた単分散 PDLLA ミクロスフェアの ^1H NMR スペクトルを示す。Fig. 3 より、この粒子は PDLLA であることを同定し、溶媒中に含まれる微量の水分から重合は開始されることが分かった。また、スペクトル中に PDMA-co-PHEMA に由来するピークが存在しないため、PDMA-co-

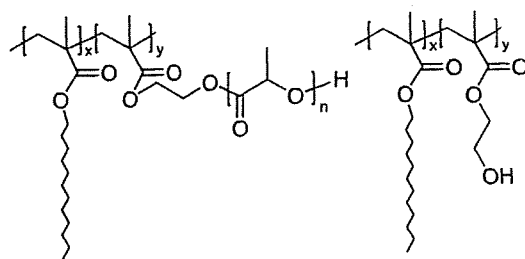


Fig. 1 Chemical structures of polymeric stabilizers; left: PDMA-co-P(MA-PDLLA) ($x = 94, y = 3, n = 49$), right: PDMA-co-PHEMA ($x = 159, y = 2$).

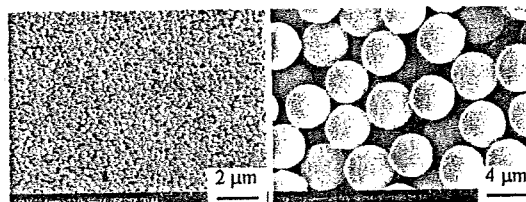


Fig. 2 SEM images of PDLLA microspheres prepared with a polymeric stabilizer; left: PDMA-co-P(MA-PDLLA), right: PDMA-co-PHEMA.

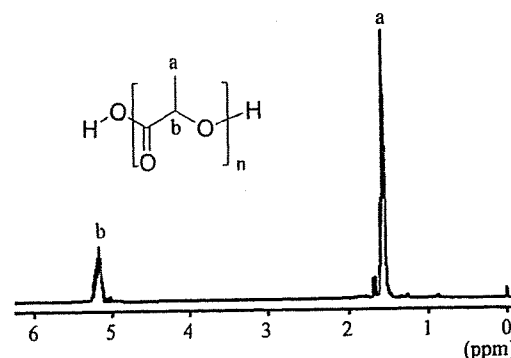


Fig. 3 ^1H NMR spectrum of PDLLA microspheres prepared with PDMA-co-PHEMA as a polymeric stabilizer.

PHEMA は粒子表面へ固定化されていないことが分かった。一方、PDMA-co-P(MA-PDLLA)の場合は、粒子の ^1H NMR スペクトル中に PDMA-co-P(MA-PDLLA)に由来するピークが存在することを確認した。

これらの結果から、PDMA-co-P(MA-PDLLA)は、形成した 1 次粒子に吸着するセグメントを重合前から有しており、粒子表面に対して不可逆的に吸着する。対照的に、PDMA-co-PHEMA は、重合途中に粒子表面に強く吸着するセグメントを形成し、粒子表面に対して可逆的に吸着する。このように、単分散 PDLLA ミクロスフェアの調製においては、高分子分散剤の粒子表面への固定化は必ずしも必要でなく、吸脱着特性を制御することが重要であることが分かった。

*Tel&Fax: 086-251-8908

e-mail: tono@cc.okayama-u.ac.jp