

- [8] T. Okuda, S. Kawakami, M. Yokoyama, T. Yamamoto, F. Yamashita, M. Hashida, Block copolymer design for stable encapsulation of *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide into polymeric micelles in mice, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 318–322.
- [9] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), Nomenclature of retinoids. Recommendations 1981, *Pure Appl. Chem.* 55 (1983) 721–726.
- [10] A.L. Fields, D.R. Soprano, K.J. Soprano, Retinoids in biological control and cancer, *J. Cell Biochem.* 102 (2007) 886–898.
- [11] E. Garattini, M. Gianni, M. Terao, Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations, *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 1375–1400.
- [12] Z.Y. Wang, Z. Chen, Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable, *Blood* 111 (2008) 2505–2515.
- [13] M.B. Sporn, A.B. Roberts, D.S. Goodman (Eds.), *The Retinoids*, 2nd ed., Raven Press, New York, 1994.
- [14] B. Davidovici, Y. Tüzün, R. Wolf, Retinoid receptors, *Dermatol. Clin.* 25 (2007) 525–530.
- [15] E. Garattini, M. Gianni, M. Terao, Retinoid related molecules an emerging class of apoptotic agents with promising therapeutic potential in oncology: pharmacological activity and mechanisms of action, *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 433–448.
- [16] N. Hail, H. Kim, R. Lotan, Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis, *Apoptosis* 11 (2006) 1677–1694.
- [17] H. Kagechika, Novel synthetic retinoids and separation of the pleiotropic retinoid activities, *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 591–608.
- [18] H. Kagechika, K. Shudo, Synthetic retinoids: recent developments concerning structure and clinical utility, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 5875–5883.
- [19] T. Tobita, A. Takeshita, K. Kitamura, K. Ohnishi, M. Yanagi, A. Hiraoka, T. Karasuno, M. Takeuchi, S. Miyawaki, R. Ueda, T. Naoe, R. Ohno, Treatment with a new synthetic retinoid, Am80, of acute promyelocytic leukemia relapsed from complete remission induced by all-trans retinoic acid, *Blood* 89 (1997) 967–973.
- [20] T. Sanda, T. Kuwano, S. Nakao, S. Iida, T. Ishida, H. Komatsu, K. Shudo, M. Kuwano, M. Ono, R. Ueda, Antimyeloma effects of a novel synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) through inhibition of angiogenesis, *Leukemia* 19 (2005) 901–909.
- [21] N. Takeda, I. Manabe, T. Shindo, H. Iwata, S. Imuro, H. Kagechika, K. Shudo, R. Nagai, Synthetic retinoid Am80 reduces scavenger receptor expression and atherosclerosis in mice by inhibiting IL-6, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 1177–1183.
- [22] H. Umemiya, H. Fukasawa, M. Ebisawa, L. Eyrolles, E. Kawachi, G. Eisenmann, H. Gronemeyer, Y. Hashimoto, K. Shudo, H. Kagechika, Regulation of retinoid actions by diazepinylbenzoic acids. Retinoid synergists which activate the RXR-RAR heterodimers, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 4222–4234.
- [23] M.L. Forrest, C.Y. Won, A.W. Malick, G.S. Kwon, In vitro release of the mTOR inhibitor rapamycin from poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ϵ -caprolactone) micelles, *J. Control. Release* 110 (2006) 370–377.
- [24] W.H. Daly, D. Poche, The preparation of *N*-carboxyanhydrides of α -amino acids using bis(trichloromethyl) carbonate, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 5859–5862.
- [25] M. Yokoyama, G.S. Kwon, M. Naito, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, Preparation of micelle-forming polymer-drug conjugates, *Bioconjug. Chem.* 3 (1992) 295–301.
- [26] T. Yamamoto, M. Yokoyama, P. Opanasopit, A. Hayama, K. Kawano, Y. Maitani, What are determining factors for stable drug incorporation into polymeric micelle carriers? Consideration on physical and chemical characters of the micelle inner core, *J. Control. Release* 123 (2007) 11–18.
- [27] M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, K. Kawano, Y. Maitani, Polymer design and incorporation methods for polymeric micelle carrier system containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin, *J. Drug Target.* 12 (2004) 373–384.
- [28] V. Saudek, H. Pivcová, J. Drobník, NMR study of poly(aspartic acid). II. α - and β -peptide bonds in poly(aspartic acid) prepared by common methods, *Biopolymers* 20 (1981) 1615–1623.
- [29] P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani, T. Okano, Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting, *Pharm. Res.* 21 (2004) 2001–2008.
- [30] A. Lavasanifar, J. Samuel, G.S. Kwon, Micelles self-assembled from poly(ethylene oxide)-block-poly(*N*-hexyl stearate *t*-aspartamide) by a solvent evaporation method: effect on the solubilization and haemolytic activity of amphotericin B, *J. Control. Release* 77 (2001) 155–160.
- [31] M. Yokoyama, S. Fukushima, R. Uehara, K. Okamoto, K. Kataoka, Y. Sakurai, T. Okano, Characterization of physical entrapment and chemical conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to a solid tumor, *J. Control. Release* 50 (1998) 79–92.
- [32] J.D. Meyer, M.C. Manning, Hydrophobic ion pairing: altering the solubility properties of biomolecules, *Pharm. Res.* 15 (1998) 188–193.
- [33] H. Zhou, C. Lengsfeld, D.J. Claffey, J.A. Ruth, B. Hybertson, T.W. Randolph, K.Y. Ng, M.C. Manning, Hydrophobic ion pairing of isoniazid using a prodrug approach, *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 1502–1511.
- [34] M. Trotta, E. Ugazio, E. Peira, C. Pulitano, Influence of ion pairing on topical delivery of retinoic acid from microemulsions, *J. Control. Release* 86 (2003) 315–321.
- [35] E. Kajiwara, K. Kawano, Y. Hattori, M. Fukushima, K. Hayashi, Y. Maitania, Long-circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy, *J. Control. Release* 120 (2007) 104–110.

Preparation of Perfluorocarbon/Fluoroalkyl Polymer Nanodroplets for Cancer-targeted Ultrasound Contrast Agents

Masamichi Nishihara, Kenji Imai, and Masayuki Yokoyama*

Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST), KSP East 404, 3-2-1 Sakado, Takatsu-ku, Kawasaki 213-0012

(Received March 2, 2009; CL-090210; E-mail: yp-yokoyama2093ryo@newkast.or.jp)

Perfluorocarbon (PFC) nanodroplets formed from PEG-*b*-poly(fluoroheptyl aspartate) were developed for a cancer-targeted ultrasound (US) contrast agent. 10% esterified fluoroalkyl polymer (F10) was the optimal composition for PFC solubilization in aqueous solution. PFC/F10 nanodroplets showed echogenicity with US irradiation, and long-term stability of PFC nanodroplets at 4 °C was confirmed.

Ultrasound irradiation is an important technology for diagnostic imaging like MRI and X-ray imaging and is also useful for therapeutic purposes. Ultrasound has a number of attractive advantages; noninvasiveness, portability, real time imaging, and relatively low cost. Thus, effective ultrasound (US) contrast agents^{1,2} and US-mediated therapeutic agents³⁻⁶ have been actively investigated. Particularly, microbubbles have been successful US contrast agent and US-mediated therapeutic agents. From the physical characteristics, microbubbles mainly provide images of vascularity,⁷ and most microbubbles show no tumor-targeting properties by extravasating through defective vasculature and by accumulating nanoparticles at tumor sites (EPR effect). Therefore, nanosized US contrast agents have been investigated.

Maruyama's group has developed a bubble liposome which consists of liposomes encapsulating perfluoropropane as an US contrast gas.⁸ Rapoport's group has studied perfluoropentane (PFP) nanodroplets formed with amphiphilic block copolymers.⁹ Encapsulated PFP nanodroplets do not show US contrast. Above physiological temperature, encapsulated PFP nanodroplets form microbubbles easily through vaporization (bp PFP is 29 °C), exhibiting echogenicity. Rapoport et al. suggested that nanodroplets could extravasate at tumor sites and coalesce into larger and highly echogenic microbubbles, providing strong tumor contrast in ultrasonography.

As shown in Rapoport's work, polymer nanocarrier-encapsulated PFP should be a promising US contrast agent. However, it is difficult to retain nanosize of the PFP nanodroplets because of easy nanodroplet/microbubble conversion from the low PFP boiling point. To solve this problem, we applied amphiphilic fluorinated polymers, PEG-*b*-poly(fluoroheptyl aspartate)s, as PFP carriers. The fluorinated polymers have high compatibility with perfluorocarbons, and the block copolymer can form a hydrophobic core/hydrophilic shell structure easily. In this paper, we measured PFP encapsulation capacity of the amphiphilic fluorinated polymers and optimized composition as a nanosized polymeric carrier for PFP encapsulation. Moreover, we also investigated the echogenicity of the resulting nanodroplets with US irradiation.

PEG-*b*-poly(fluoroheptyl aspartate)s were prepared according to a modified procedure.¹⁰ We used 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptyl iodide (C₇H₆F₉I) as a fluorinated hydrophobic unit.

Table 1. Concentration of encapsulated PFP and weight average diameters of nanodroplets at 10 °C

	Esterification/%	PFP in aq /mg·mL ⁻¹	Diameter/nm
F0	0	0	—
F5	5.9	46.1	609.0 ± 140.2
F10	13.5	108.9	693.9 ± 200.9
F20	22.3	31.4	568.2 ± 129.7
F40	38.5	2.7	562.5 ± 108.1
F70	67.0	1.9	361.7 ± 76.4
H10	13.2	46.0	269.0 ± 68.1
F10(C9)	13.5	45.5	332.4 ± 110.8
F10(C11)	13.6	22.4	657.5 ± 143.9

PFP was mixed with perfluorohexane (PFH), which has an elevated boiling point (59 °C), in order to form stable perfluorocarbon nanodroplets and suppress echogenic error in the nanodroplets. The ratio of PFP and PFH was 85:15 (vol). The PFC mixture was encapsulated into nanodroplets by vigorous stirring in aqueous polymer solutions below 10 °C (described in Supporting Information¹¹). PFP concentrations in the PFC/polymer mixture were measured by gas chromatography (GC) and summarized in Table 1.

First, we compared PFC encapsulation capability between the fluorinated polymer and a nonfluorinated polymer, H10. H10 was a nonfluorinated heptyl ester. The PFP concentration in H10 was about 40% lower than that of F10. This difference clearly indicated that PFP solubilization in fluoroalkyl ester is greater than in nonfluorinated ester.

We examined effects of esterification degree on PFC encapsulation. First, we expected that highly esterified fluoroheptyl polymer would have higher compatibility with PFC than low esterified materials, thus F70 should have the highest encapsulation capability for PFC. However, F10 showed the highest PFP concentration in polymer solution. Moreover, PFP concentration in a lower esterified fluoroheptyl polymer solution, F5, was lower than that of F10. These results indicated that around 10% esterification was optimal for PFP encapsulation with the fluoroheptyl ester.

We hypothesized a mechanism as described below (Figure 1). Fluoroalkyl ester groups are highly compatible with PFC; therefore, the fluoroheptyl polymers would orient the fluoroheptyl pendant group into the PFC droplets. The number of fluoroheptyl groups oriented into one PFC droplet would be defined because the surface area of the PFC droplets would be constant. In the case of F10, a large quantity of F10 should be used for PFC solubilization because F10 has a small number of fluoroheptyl groups in the polymer. Therefore, PFC droplets formed from F10 polymer would expose many PEG units to aqueous media and show a high PEG density on the surface of the PFC

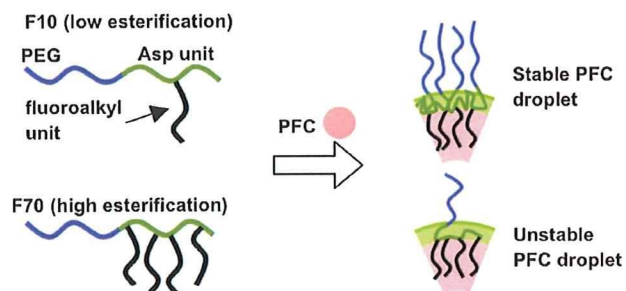


Figure 1. Mechanism of PFC encapsulation with fluoroalkyl polymers.

droplet. On the other hand, high-esterified polymer such as F70 would expose lower numbers of PEG units than F10 because many fluoroheptyl units are present in the PFC droplets from one polymer. Therefore, the PFC droplets formed with F70 would have a low PEG density on the surface of the droplet. The high density of PEG units should stabilize the PFC droplet compared with the low density case. Thus, F10 could solubilize the highest amount of PFP in the aqueous polymer solution. F5 would also show the high PEG density on the PFC droplet. However, the number of fluoroheptyl units in the polymer was too low to stabilize PFC droplets in aqueous media. Therefore, 10% esterification was the best composition for PFC encapsulation with the fluoroheptyl polymers.

Particle sizes of PFC droplets were measured with DLS at 10 °C. Most samples showed unimodal distributions (Figure 1Sa¹¹), and the diameters were 300–700 nm at 10 °C (Table 1). These particle sizes were a bit larger than the optimal size for EPR effect (<200 nm). However, particle size can be reduced with an extruder (Figure 1Sb¹¹). Moreover, the size of PFC droplets was observed to change with temperature. The particle size of the PFC/F10 droplets at 37 °C was 186.9 ± 42.5 nm (Figure 2a). The mechanism of droplet size change with temperature was not clear. However, the diameter of the PFC droplets formed with the fluorinated polymers can be tuned.

Effects of chain length of the fluoroalkyl unit on PFC encapsulation were examined. F10(C9) and F10(C11) were a fluoro-nonyl and a fluoro-undecyl unit, respectively. PFP concentrations of these samples showed lower values than that of F10, and the PFP concentration decreased with the increase of chain length of the fluoroalkyl unit. High hydrophobicity might be stabilized large PFC droplets which precipitate easily due to large amount of PFC. This result implied balance of hydrophobicity and the ratio of esterification of the fluorinated polymers should be a very important factor for the PFC encapsulation.

Finally, we confirmed echogenicity of PFC droplets prepared from F10 with US irradiation (Figure 2b). A PFC droplet embedded into a polyacrylamide gel did not show any contrast before US irradiation because the PFC inside the droplet was liquid. However, the PFC droplets showed high contrast in an US image after the US irradiation because PFC became gas, which has high echogenicity. This meant that the PFC (liquid

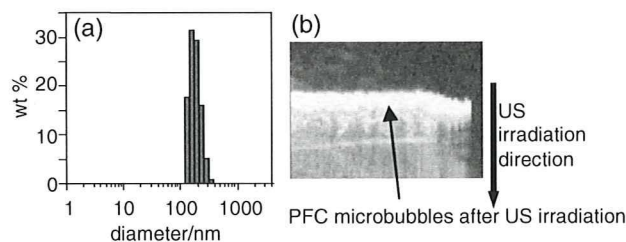


Figure 2. Size distribution of a PFC/F10 droplet at 37 °C (a) and US image of the droplet after US irradiation (b).

phase) droplet became the PFC (gas phase) microbubble by means of US irradiation and had sufficient capability as an US contrast reagent. Moreover, loss of PFP from PFC droplets at 4 °C was little even after 4 weeks (Figure 2S¹¹). From this result, long-term stability of PFC droplets at 4 °C was confirmed.

In this paper, we reported that PFC droplets formed from PEG-*b*-poly(fluoroheptyl aspartate) were developed as an US contrast reagent. We confirmed that a fluoroheptyl unit was the optimal hydrophobic group for PFC solubilization to an aqueous solution, and 10% esterified polymer was the best composition for the preparation of the PFC droplet. The reported PFC encapsulation method is very easy to manipulate compared with other preparation methods, thus the reported method would be a promising procedure for preparations of US contrast agents. In future study, we will evaluate tumor accumulation of the PFC droplets and echogenicity in mice.

We thank the group of Dr. Y. Tabata, Kyoto University, for GC measurements, and the group of Dr. K. Kawabata, Hitachi, for US irradiation experiments. This research was supported by the R&D project “Next-generation DDS Therapy Systems for Deep Therapy” undertaken by the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO).

References and Notes

- M. A. Wheatley, J. D. Lathia, K. L. Oum, *Biomacromol.* **2007**, *8*, 516.
- E. Pisani, N. Tsapis, J. Paris, V. Nicolas, L. Cattel, E. Fattal, *Langmuir* **2006**, *22*, 4397.
- Z. Gao, H. D. Fain, N. Rapoport, *Mol. Pharm.* **2004**, *1*, 317.
- N. Y. Rapoport, D. A. Christensen, H. D. Fain, L. Barrows, Z. Gao, *Ultrasonics* **2004**, *42*, 943.
- Z. Gao, H. D. Fain, N. Rapoport, *J. Controlled Release* **2005**, *102*, 203.
- R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Negishi, N. Utoguchi, K. Sawamura, K. Tanaka, E. Namai, Y. Oda, Y. Matsumura, K. Maruyama, *J. Controlled Release* **2008**, *125*, 137.
- V. R. Stewart, P. S. Sidhu, *Br. J. Radiol.* **2006**, *79*, 188.
- R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Negishi, K. Hagiwara, K. Tanaka, K. Sawamura, N. Utoguchi, T. Nishioka, K. Maruyama, *J. Controlled Release* **2007**, *117*, 130.
- N. Rapoport, Z. Gao, A. Kennedy, *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*, 1095.
- T. Yamamoto, M. Yokoyama, P. Opanasopit, A. Hayama, K. Kawano, Y. Maitani, *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 11.
- Supporting Information is available electronically on the CSJ-Journal Web site, <http://www.csj.jp/journals/chem-lett/index.html>.

3 DDS と分子イメージング : MRI 造影剤を例にして

横山 昌幸

東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 医用エンジニアリング研究室

はじめに

本稿では、ドラッグデリバリーシステム (DDS)、その中で特にターゲティングの領域と、合成高分子を用いた MRI 造影剤合成 (イメージング研究) の領域に触れる。2つの領域では、疾病部位に選択的に薬物・造影剤を運ぶことができればメリットがある点などで共通している点が多い一方、かなり異なっている要素も多い。本総説では、その類似点と相違点について MRI 造影剤を主な例として解説したい。本稿が、薬物ターゲティング研究・開発で集積された知識・技術がより有効にイメージングの領域で活用されることと、その逆方向の活用のための触媒となることを願う。

薬物ターゲティングとは

まず薬物ターゲティングを短く説明する。キャリアー (担体) を用いる意義などは、後の説明のために必要なので、基本概念を整理する。薬物ターゲティング¹⁾とは「薬物治療が必要な部位に選択的に薬物を送りこみ働かせること」と定義され、薬物治療が必要な部位での薬物濃度が上げられるために、目的とする薬理作用が増強される一方、他の部位への送達量を少なくすることで副作用を軽減することが可能となる。このターゲティングを行うには、キャリアーを利用することになる。高分子あるいは脂質の集合体からなるキャリアーに薬物を結合あるいは封入することで、標的とする治療部位に選択的に運搬するのである。このキャリアーの代表的タイプを図1に示す。

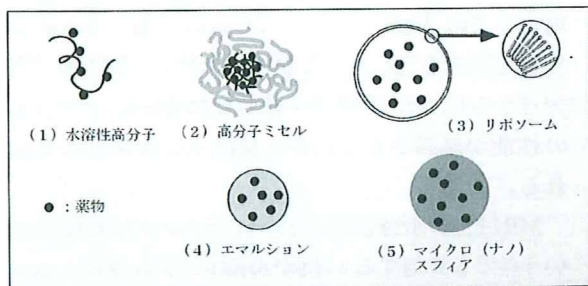


図1 ターゲティングのために用いられるキャリアーのタイプ

さて、本総説で重要な事柄は、ターゲティングには標的選択性を得る方式によって、アクティブターゲティングとパッシブターゲティングの2つの方法論があることである。²⁾ 表1にその2つの方法論を比較する。

表1 ターゲティング方法論の分類

方法論	利用する性質	制御する対象	キャリアーの例
アクティブターゲティング	<ul style="list-style-type: none"> 生体の特異的な相互作用 外部からの物理的信号 	標的部位での相互作用	抗体 磁気含有微粒子
パッシブターゲティング	<ul style="list-style-type: none"> キャリアーの物理的、化学的性質 	主に非標的的部位 (特に細胞内皮系) での相互作用	合成高分子 リボソーム 微粒子

その第1の方法論の、アクティブターゲティング (active targeting) は標的との明確な特異的相互作用を利用してターゲティングを行うものである。生物学的に特異な相互作用を利用した抗体が代表例である。

一方、パッシブターゲティング (passive targeting) は物理的、化学的な性質と生体側の解剖学的、生理学的特性とのバランスで受動的に規定される現象を利用してデリバリーを行うもので、標的との特異的な相互作用は利用しない。例えば合成高分子をキャリアーとしてターゲティングを行う場合、合成高分子の分子量、親水性/疎水性、荷電状態といった物理的、化学的要素によって、このキャリアーシステムの体内動態と分布を制御するのである。

薬物ターゲティングとイメージングの違い

キャリアーを用いて薬物と造影剤を標的部位に選択的に送達して、治療と画像診断の効果・性能の向上を図る研究開発は、「DDS」と「イメージング」の双方の研究領域で活発に進められてきた。この2つの研究領域で大きな差異があると考えられる点が2つある。それは送達するものの量と、キャリアーシステムの毒性評価である。

(1) 送達する量の問題

まず例として特異抗体を用いて抗がん剤を運ぶ場合 (DDS) と放射性同位元素を運ぶ場合 (イメージング)

を比較する。多くの抗がん剤のヒト1人の投与量は数十 mg から数百 mg であり、この量を抗体に結合してターゲティングすることでは、実はこの投与量はかなり多いと認識すべき量である。抗体の機能を損なわないためには、抗体1つ当たりに結合する薬物分子をなるべく少なくした方がよい（薬物数分子/抗体1分子のオーダーで）が、そうなると用いる抗体量が巨大なものとなってしまい、抗体自身の生体に対する副作用が問題となる。例えば、分子量 500 で投与量が 50mg の抗がん剤を分子量 16 万の抗体分子に 5 分子結合する場合を想定すると、投与する抗体量は 3.2g にも及ぶ。事実、抗体と抗がん剤の結合体で唯一認可を得ている MylotargTM (gemtuzumab ozogamicin) は、殺細胞活性が非常に強い抗がん剤を用いることで、投与する抗体量を減量化できたこと（成人で 15mg 程度）が一つの成功要因と思われる。ここで、薬物分子が多く結合することは、抗体のアクティブターゲティング能を減ずるのみならず、パッシブターゲティング能を損なうという点が重要である。よって、後述するアルブミンやデキストランといったパッシブターゲティングのキャリアーにおいても薬物結合量の問題は依然として存在するのである。これとは反対に、放射性同位元素は投与量が小さく、抗がん剤での抗体量の問題が生じることはない。

量に関する第2の点は、造影剤の場合には標的に到達させるべき割合が相対的であることである。抗がん剤のターゲティングの場合には、投与量のうち一定の割合ががんへ送達されないとターゲティング効果が発揮されないという最低割合が存在する。がん以外の正常部位に到達したものは副作用を起こすので、「投与量に対するがん到達の割合を高める」ことが重要である。一方、造影剤の場合には、「投与量に対する到達の割合」ではなく、造影に必要な一定の量が送達され、その時に標的と見分けるべき周囲の組織の送達量が、相対的に低ければよい（見分けるべき部位が血管・血液である場合には、正常組織・臓器への分布は無視できる）。よって、同一の送達効率のキャリアーを造影剤と抗がん剤で共通に用いる場合でも、片方の目的のみでしか利用できない場合が想定される。

(2) 毒性

異なる第二の点は毒性である。治療と診断では許容される危険度が大きく異なるのは自明である。抗がん剤治療ではかなり重篤な副作用の出現もある範囲内であれば許容され得るが、診断では、重篤な副作用は限りなくゼロに近づけることが求められる。よって、キャリアー自体の毒性は、抗がん剤ターゲティングでは問題にならないレベルであっても、造影剤を対象とした「診断」の場合には大きな問題となることあり得る。

陽性 MRI 造影剤と薬物ターゲティングの比較

Gd イオンをキャリアーに結合・内包する MRI 造影剤は、抗がん剤をキャリアーでターゲティングすることと共通点が多いので、若干の研究例を紹介しつつ比較したい。

キャリアーとして研究されてきた素材には DDS とイメージング技術に共通な点が多く、デキストラン^{3,4)}、アルブミン^{5,6,7)}、水溶性合成高分子⁸⁾ など、Gd イオンと抗がん剤を結合した研究が多数存在する。Gd イオンも抗がん剤も投与量としては多いので、前項目で言及した薬物（造影剤）とキャリアーの比率の問題が共通に存在する。キャリアー自身は優れた性能でも、薬物（造影剤）を多く結合しすぎるとキャリアーの性能を失う懸念がある。この点は、ターゲティング研究には非常に重要な検討課題であるが、系統的に検討された研究は1つしかない。⁹⁾ この例の他には、水溶性合成高分子と抗がん剤の組み合わせを検討した重要な研究^{10,11)} が、比較的低い薬物結合量であることの重要性を示唆している程度である。Gd 系造影剤の場合、この造影剤/キャリアー比の問題を系統的に解析した研究を見出すことが出来ない。造影剤研究の観点からも、造影剤を多く結合した場合に、キャリアーの性能が維持されているか検討する事は重要と思われる。

MRI 造影剤と抗がん剤ターゲティングは刺激応答という点でも共通する。抗がん剤システムの大多数は、キャリアーから抗がん剤が放出されて初めて薬効を発揮する。Gd イオンの場合には、その周りの環境を変えることで画像コントラストを生む能力は変わってくる

12,13,14)。よって、患部での環境の違い(pH, 特定の酵素濃度など)や患部に与える外部刺激(温度、磁場等)によって、薬効や画像コントラストを制御する工夫が必要になるのは、この2つの研究に共通の事柄であり、キャリアシステムの設計という点では両者とも興味深い対象である。

さて、最後に高分子ミセルキャリアー(図1の(2))を用いた抗がん剤とMRI造影剤ターゲティングの例を紹介する。キャリアーを用いるからといって結合・封入されたものが必ずターゲティングされるわけではなく、運ぶ対象にあったキャリアー設計が必要である。我々の研究では、幸いなことに、図2に示すように、抗がん剤とMRI造影剤の両方でマウスC26がんを選択性高くターゲティングすることができた。^{15,16)}さらに、両者の体内動態・分布が極めて類似したものであった。この結果を単純に考えれば、抗がん剤治療の効果を個々人で予想し得る診断システムができたことになる。(この造影剤でがんが明瞭に造影できた患者は、同タイプのキャリアーによって抗がん剤も効率よく運ばれるので、高い治療効果が期待できる。)ただし、現段階では動物実験のみの結果であり、臨床の結果と乖離する可能性も高い。抗がん剤を封入したシステムではキャリアーに起因する副作用は、がん治療を目的とした試験では確認されていない(Phase Iのみが終了した現段階^{17,18,19,20)}では医学的に副作用について明確な結果と言えない状況)が、診断を目的とした場合には問題になることがあり得る。また、この高分子ミセルのようにポリエチレングリコールを成分として含むナノサイズの製剤では、ABC (Accelerated Blood Clearance) 現象という特異な現象が問題となり得る。PEG修飾リポソームでよく知られているが、二度目の投与では免疫的な作用によって、極めて迅速に血液から除かれてしまい、ターゲティング性能が発揮できなくなることである。抗がん剤ターゲティングシステムでは免疫系に対する抗がん剤に副作用でABC現象は起きないか、起きても影響が少ない程度で済む。造影剤の一度目の投与でABC現象が引き起こされると、二度目の投与はそれが治療であろうと診断であろうと実施不可能となる。このように、課題は多くても、同じキャリアーで診断と治療の両方が担えることには大きな魅力がある。

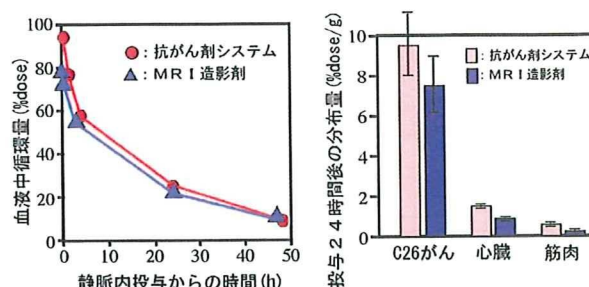


図2 高分子ミセル造影剤と高分子ミセル抗がん剤システムとの体内動態・分布

おわりに

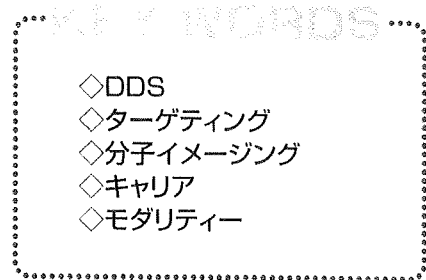
DDS領域とイメージング領域の2つの研究領域について、その共通点よりは相違点の大きさに驚かされる。分子イメージングは、これまでは大きな隔たりがあった2つの領域を接近させる格好なキーワードであると考えるときにも、分子イメージングの研究開発が大きな注目を集めている現在が、これら2つの領域の接近と情報交換を進める絶好の時期であると確信する。

参考文献

1. Yokoyama M, *et al.*: Targetable drug carriers: Present status and a future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews* 21: 77-80, 1996.
2. 高倉喜信, 他.: パッシブターゲティングの意義, *Drug Delivery System*, 14(6), 425-426, 1999.
3. R. Rabizak, *et al.*, *Bioconju. Chem.*, 8, 605-610, 1997.
4. S.-C. Wang, R. C. Brasch, *et al.*: Evaluation of Gd-DTPA-labeled dextran as an intravascular MR contrast agent: Imaging characteristics in normal rat tissues. *Radiology*, 175: 483-488, 1990.
5. U. Schmiedel, R.C. Brasch, *et al.*: Magnetic resonance imaging of myocardial infarction using albumin-(Gd-DTPA), a macromolecular blood-volume contrast agent in a rat model. *Investigative radiology*, 22, 713-721, 1987.
6. R. Brasch, *et al.*, *J. Magnetic Resonance Imaging*, 7, 68, 1997.
7. U. Schmiedel, *Investigative Radiology*, 22, 713, 1987.
8. F. Ye, *et al.*, *Molecular Pharmaceutics*, 3, 507, 2006.
9. K. J. Hamblett, P. D. Senter, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 10: 7063-7070, 2004.
10. Ulbrich, *et al.*, *Makromol. Chem.*, 188, 1261-1272, 1987.
11. R. Duncan, *et al.*, *J. Controlled Release*, 19, 331, 1992.
12. R.A. Moats, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Engl.*, 36, 726, 1997.
13. W.H. Li, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1413, 1999.
14. J.L. Major, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 13881, 2007.
15. M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, and K. Kataoka, Selective delivery of adriamycin to a solid tumor using a polymeric micelle carrier system, *J. Drug Targeting*, 7(3), 171-186, 1999.
16. Kouichi Shiraishi, Kumi Kawano; Takuya Minowa, Yoshie Maitani, and Masayuki Yokoyama, Preparation and *in vivo* imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents, *Journal of Controlled Release* (in press).
17. Hamaguchi, *et al.*, *Br J Cancer* 2007; 97: 170-6.
18. Uchino H, *et al.*, *Br J Cancer* 2005; 93: 678-87.
19. Koizumi F, *et al.*, *Cancer Res* 2006; 66: 10048-56.
20. 濱口哲弥. 血液・腫瘍科, 54, 702, 2007

DDS と分子イメージング

財団法人 神奈川科学技術アカデミー
 横山「高分子ナノメディカル」プロジェクト
 Masayuki Yokoyama 横山昌幸



ドラッグデリバリーシステム(drug delivery system; DDS)技術, 特に薬物キャリア設計技術がどのように分子イメージングに応用されているかについて解説する。まず, 分子イメージングと薬物ターゲティング(DDS の中で分子イメージングに応用されている領域として)の概念と方法を概説する。次いで, 両領域の歴史的な関係について述べる。最後に, 疾病部位に選択的・高効率でプローブや薬物を運搬するためのキャリアの設計は, 分子イメージングと薬物ターゲティングではどこが同じでどこが異なるかを, 4 つのキャリアの例を挙げて解説する。

はじめに

本稿では, 分子イメージングに用いられるドラッグデリバリーシステム(drug delivery system; DDS)技術について概観する。医療において分子イメージングは診断の役割を担い, DDS は治療の役割を担う。両者とも疾病部位を選択的に診断・治療すれば有用性が増大し得る点では共通しているので, これまでの研究・開発において密接に関連しながら発展してきたと想像されるかもしれないが, 現実はそのようなわけではない。それだけに, 今後 DDS 技術が分子イメージングに本格的に応用されれば, 大いなる発展の可能性があるかと筆者は信じている。本稿では, DDS (その中でも特に薬物ターゲティングについて)と分子イメージングの基礎的概念を説明してから両領域の共通性と違いについて述べ, 薬物キャリア技術の分子イメージングへの応用例を紹介する。

DDS とは

DDS は, コントロールドリリース, 吸収改善, ターゲティングの3つの方法論からなり, 薬物を「より有効に, より安全に, より容易な投与形態で」用いるための技術である。ここでは DDS 自体には詳しく触

れず, 本稿のテーマである分子イメージングに関連するターゲティングについてまとめることとする。

ターゲティング(targetting)とは, 「薬物の薬効が求められる疾患部位に選択的に薬物を運搬して, 薬効を発揮させる」ことである。疾患部位に直接注入する場合もターゲティングに含まれるが, DDS としての研究開発がなされてきたのは, 主に血液内に投与したものがキャリアの機能によって, 疾患臓器・組織に選択的に運搬される場合である。本章でもキャリアを用いた血液内投与のターゲティングシステムにのみ焦点を当てる。

ターゲティングの概念は図1に示したように, 通常の薬剤は疾病部位(ここでは標的部位と呼ぶ)に選択的に運搬されることはなく, ほぼ全身に均一に分布するので, 標的部位以外に運搬された薬物が有害な副作用を起こす場合がある。一方, ターゲティング化された製剤では, 標的への運搬効率を高める事で薬物の主作用を高め, 副作用を減らすことができる。ただし, 図1のように投与した薬物が100%標的に集まることは必要なく, 何らかの選択性を持って標的に運搬されて薬効を発揮すればよいのである。この選択的運搬に用いるのが薬物キャリアである。

もうひとつここで解説させていただきたいのは, タ

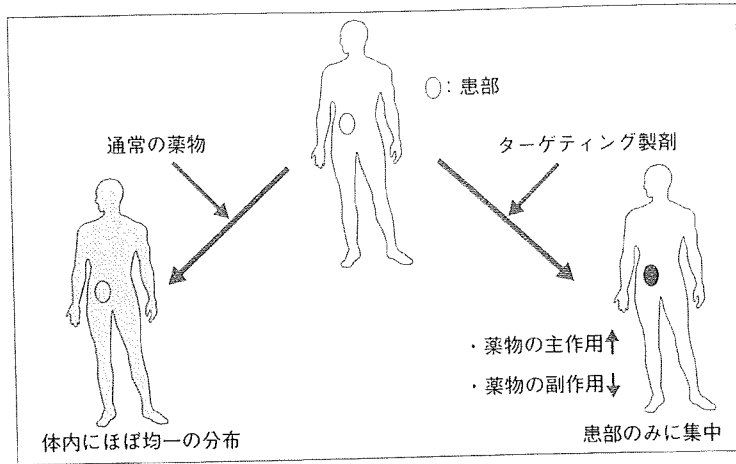


図1. 薬物ターゲティングの概念

表1. ターゲティングの2つの方法

	利用する性質	制御する対象	キャリアの例
Active targeting	<ul style="list-style-type: none"> 生体の特異的な相互作用 外部からの物理的信号 	<ul style="list-style-type: none"> 標的部位での相互作用 	<ul style="list-style-type: none"> 抗体 磁気含有微粒子
Passive targeting	<ul style="list-style-type: none"> キャリアの物理的、化学的性質 	<ul style="list-style-type: none"> 主に非標的部位 (特に細網内皮系) での相互作用 	<ul style="list-style-type: none"> 合成高分子 リポソーム 微粒子

ターゲットングには表1に示す2つのタイプが存在することである。第一の active targeting は標的との特異的相互作用を利用するターゲットング法で、癌特異抗体をキャリアとした場合が代表的である。特異抗体の癌細胞表面の特異抗原に対する「鍵と鍵穴」の関係による高い選択性・結合性によるターゲットングであり、多くの方が容易に理解できると思う。それに対して第二の方法の passive targeting は初めて聴く人には少し理解しにくいと思われるが、キャリアの物理的、化学的性質と生体側の解剖学的、生理学的特性とのバランスで受動的に規定される現象をうまく利用してデリバリーを行うものである。例えば合成高分子をキャリアとしてターゲットングを行う場合、合成高分子の

分子量、親水性/疎水性、荷電状態といった物理的、化学的要素によって、このキャリアシステムの体内動態・分布を制御するのである。固形癌組織を標的とする場合には、腫瘍血管の高分子物質に対する透過性が亢進している現象に基づく EPR (enhanced permeability and retention) 効果¹²⁾が有効に活用できるために、passive targeting が可能となる。EPR 効果に関する説明は、本連載の编者である松村らの総説と文献¹²⁾を参照されたい。

この active と passive のターゲットングを特定の血管部位へのターゲットングの場合に対比させると、次のようになる。Active targeting では疾患血管部位に特異的に発現するリガンドに対するモノクローナル抗体をキャリアとする。Passive targeting では、透過性の亢進した血管部位への高分子キャリアを用いることとなる。

◆ 分子イメージングとは^{3,11)} ◆

分子イメージングとは、従来の生体組織の形態を画像化したものではなく、疾患などの特定の状態で発現される分子、あるいは分子受容体、または分子によって変化した環境を画像化するものである。ここでの分子には、低分子化合物、特異的 DNA 配列、mRNA、タンパク質、多糖が含まれる。この画像化手法により、形態変化を示す以前の早期の病的状態の検出が可能になることが期待されている。もちろん、癌診断の場合には従来の画像診断では見出されない早期の癌や、より確度の高いマス・スクリーニング等への活用が期待されている。

一方、分子イメージングでの画像化の方法は大別すると3つある。まず第一に、疾患で特異的に発現する(あるいは増加、減少、消失する)分子を直接画像化す

るものである。

第二に、分子の受容体や輸送体の分布や機能を画像化するもので、既に医療の場を導入されているグルコース誘導体による PET 診断はこの分類である。これは癌細胞などグルコース受容体が多く発現した細胞を、陽電子を放出するグルコース誘導体の取り込み量で画像化するものである。

第三の形式は、分子によって変化した状態を従来の医用画像でない形式で画像化するものである。これに含まれるのは、癌組織の血管の高分子物質に対する透過性が亢進した状態を高分子の MRI 造影剤によって画像化する例である。この癌組織血管の透過性亢進は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)やキニンといった分子によって引き起こされるものであり、従来の MRI 画像では透過性亢進の現象を画像化することはできない。この亢進現象は薬物デリバリーの領域では、EPR 効果¹⁾²⁾として固形癌組織へのターゲティングの原理として広く知られている。よって、もし高分子 MRI 造影剤の透過性を定量的に画像化できたら、形態だけ見てもわからない組織の機能が画像化できることとなる。

特定の病変部位から画像形成のためのシグナルを得るために用いるのが、プローブである。現在、実用化されているプローブの大部分が低分子である。X 線造影のためのヨウ素原子を多く結合した有機化合物、MRI 造影剤のガドリニウム(Gd)イオンキレート低分子化合物、PET 用の陽電子を放出する同位体を含んだグルコース化合物などである。これらは、低分子化合物では「シグナルユニット」=「プローブ」である。これに対して、シグナルを出すユニットとキャリアが結びついて形成するプローブが、本総説で DDS 技術との関連から説明すべきプローブシステムである。つまり、「プローブ」=「キャリア」+「シグナルユニット」である。このプローブシステムのキャリアとしては、薬物キャリアとして研究されてきた天然高分子、合成高分子、高分子ミセル、リポソーム、微粒子などが研究されているが、薬物キャリアに比べると、その

研究の歴史も短く、研究数も少ないものに留まっている。

◆ DDS と分子イメージングとの関わり ◆

DDS は、その源流を薬剤学に発し、1970 年代に認識されるようになった学問・技術分野である。日本 DDS 学会は 2008 年には 24 回の学術大会が開催され(本連載の編者である松村保広先生は 2009 年の日本 DDS 学会学術会議の大会長である)。その国際組織に相当する Controlled Release Society の年会は、2008 年までで 35 回開催されている。一方、分子イメージングはもっと新しく、最近 10 年間で提唱され、この名の下で研究が開始された新しい分野といえる。2008 年には、国際的な分子イメージングの学会である The Society for Molecular Imaging は第 7 回目の年会を開催し、日本分子イメージング学会は第 3 回目の年会を開催したに過ぎない。ただし、甲状腺にヨウ素が選択性高く集積することを利用した医用画像はかなりの歴史があり、これは最初の分子(というより原子)イメージングといえる。よって 10 年よりも前には全く分子イメージングが存在していなかったわけではないが、分子イメージングという明確な枠組みを設定して研究・開発を推進する活動は、最近 10 年以内に始まったといつてよい。

分子イメージングは、病変部位に集積したプローブが信号を発して画像を形成するので、そのプローブが病変部位に効率的に運搬されることが好ましいのは、薬物ターゲティングの薬物の場合と共通である。

しかしながら DDS と分子イメージングの両分野は、これまでは強りに連携していないように筆者は感じている。DDS の薬物ターゲティングでは、画像診断装置や局所照射装置(マイクロ波や超音波等)と組み合わせることで従来のターゲティングでは不可能であった事柄の達成が期待されるが、現状では診断・治療機器とリンクした研究・開発はあまり盛んではない。一方、分子イメージングは主に放射線医学の領域が中心となって現在まで発展をみている。画像診断に用いられる

造影剤は、通常の薬物とは異なった企業で作成され（造影剤は専門のメーカーによって作成されていることが多い）、放射線医や造影剤の作成に関わる科学者がDDSの領域に興味を抱く例は稀であると思う。数少ない例外が、放射性同位元素を結合した抗体による画像診断である。

以上のような状況であるから、これら2つの領域の接近と情報交換を進めることが、今後の分子イメージングの急速な発展につながる可能性が大きいと考えられる。

分子イメージングのモダリティーとDDS薬物キャリアとの関連

イメージングにおけるモダリティーとは画像化の原理であり、表2に示すように4つの原理に大別される。X線、MRI、超音波は既に良く普及した方法であり、それぞれ従来の医用画像と分子イメージングの手法を含んでいる。X線を外部から照射して画像化するX線CTは、最も普及している医用画像である。これに対し、特定のレセプターに対する特異抗体にX線を放出する同位元素を結合したものを体内に投与して、その分布を輪切りの画像にできるものがスペクト（SPECT）であり、これは典型的な分子イメージングの手法である。表2の右側に、それぞれのモダリティーに対応して研究されている主なキャリアを示す。最近の研究の傾向としては、1つのキャリアシステムで多数のモダリティーに対応するシステムが良く研究されていることであるが、多彩なキャリアシステムが研究・開発されているという点では、MRI造影剤がその代表となる。次節では、いくつかのMRI造影剤キャリアシステムの研究例を挙げて解説を加える。

キャリアを用いた分子イメージング用造影剤の例

ここでは、DDSで研究されたキャリアを用いて研究されたMRI造影剤の例を、4つ紹介する。薬物ターゲティングの場合と、分子イメージングの場合でキャリアの設計・求められる性質などで異なる点に焦点を当てて解説したい。

1. デキストラン

生体内で不活性と考えられているデキストランをキャリアとしたMRI造影剤には、2つのタイプがある。第一のタイプは、図2A-1に示すデキストランをキャリアにGd低分子キレート体を結合するシステムである⁵⁶⁾。このタイプは、T1緩和時間を変えることによって画像を形成するので、T1強調型造影剤と分類される。血液中に投与した場合に、肝臓で急速に取り込まれることなく比較的の不活性と考えられるデキストランに結合させる意義は2つある。その第一は、高分子であるデキストランをキャリアとすることで造影剤の分子量が大きくなり、血液中循環性が上昇することである。高分子量の造影剤は血管内貯留型造影剤（blood pool agent）として働き、血管を長時間にわた

表2. 画像のモダリティーとキャリア

モダリティー	医用画像法	研究されている主なキャリア
放射線	(1) X線 体外から：X線CT 体内から：SPECT (2)陽電子：PET (3)その他	抗体
核磁気共鳴	MRI, ESRを用いたイメージング	抗体, 合成高分子, 微粒子, リボソーム, 高分子ミセル
超音波	超音波造影法	マイクロバブル*
光	蛍光法, 発光法, 色素法, 光CT, 赤外線サーモグラフィ	微粒子

*：ミクロンサイズの気体の泡を界面活性剤等で安定化させたもの。

って明瞭に描出する。また先述のEPR効果を利用して、固形癌へターゲティングできる高分子造影剤が考え得るが、現状では癌選択的な造影剤の方向では、あまり数多く研究されていない。この方向の研究を進展させるには高分子の分子量のみではなく、どのような結合様式か、どんな密度でGdキレートと結合するかについての検討が必要と考えられる。なぜなら、キャリアの高分子単独では好適なターゲティング能を有していても、Gdキレートの結合によって高分子の物理化学的性質が変わり、肝臓等の取り込みや排出作用が大きく影響された結果、ターゲティング能が失われることも懸念される。抗癌剤のターゲティングでは薬物分子の疎水性と正荷電がキャリアのターゲティング能を失わせる例が数多くあった。よって、EPR効果を利用した癌ターゲティング造影剤を得るには、キャリア設計に薬物ターゲティングの知識と技術を十分に活用する必要がある。

デキストランをキャリアとして用いる第二の意義は、結合によってGdイオン1つ当たりのT1緩和時間短縮能(つまりは画像化する能力)を上げるものである。低分子に比べて水溶液(血液)中での分子の動きが規制

されている高分子と動きを共にする事(rotational correlation timeが延長すること)でより緩和効率が上がる。Rabizakら³⁾の例では、低分子のGd-DTPAの2.5倍のT1緩和能が得られた事を報告している。この点は、薬物キャリアの場合にはなかった高分子キャリアの利点となる。

デキストランはT2タイプのMRI造影剤にも用いられている。図2A-2に示すT2強調型MRI造影剤、いわゆる磁性微粒子である。磁性微粒子は、そのもの自身を投与するわけではなくSPIO (superparamagnetic iron oxide)と呼ばれる5~35nmの磁性酸化鉄や、USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxide)と呼ばれる4~6nmの磁性酸化鉄をそれぞれデキストランで7~8nmの厚みにコーティングし、数十ないしは数百nmの粒子として加工されている。これらのMRI造影剤は主に肝臓の細網内皮系に取り込まれ、正常な肝臓の信号強度の低下させることで特異的な可視化を可能にしている。デキストランコーティングすることで磁性微粒子が凝集することを防ぎ、生体内投与を可能にしている。デキストランコーティングのもう1つの意味は、デキストランにリガンド分子などを結合して新たな部位選択性を持たせることであり、この方向の研究が盛んである。

2. デンドリマー

デンドリマーとは枝わかれ状の合成高分子で、分子量が均一であることに大きな特長を持つ(通常の合成高分子は分子量に広がりがあり、平均分子量でのみ分子量を表現できる)。このデンドリマーにGdキレート化合物を結合した図2Bに示すものがMRI造影剤として研究開発されてきた。その比較的大きな分子量(約17,000)によって血液、すなわち血管を造影する目的で用いら

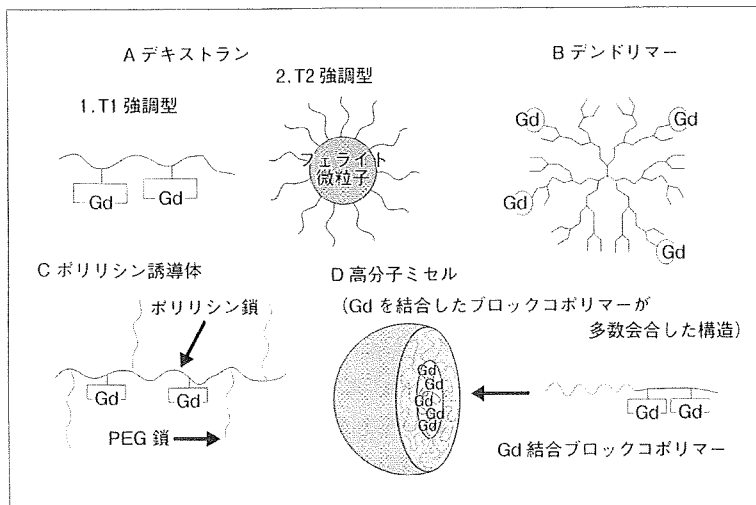


図2. MRI造影剤キャリアの形態

れる。Blood pool agentは、至適造影時間を長くすることによって血液プール相で高いコントラスト分解能と空間分解能の血管撮像を行うことができ、米国で臨床試験に入っている^{7,8)}。これは、その分子量が単一で表現できる dendrimer の長所を生かした応用と言える。

薬物のターゲティングの場合には、生体でその薬効や副作用が発揮される時間スケール(例えば抗癌剤などは1~数日スケール)で標的組織に集積したり血液から排泄されれば良いので、キャリアに用いる高分子の分子量の幅はあまり大きな問題ではない。しかし造影剤の場合には、診断目的の安全性の確保のために薬物治療の場合よりも造影剤の排泄が重要視される。腎臓からの排泄は分子量に大きく依存する。よって排泄の速度と効率を単一の分子量で規定できることは、大きな意義がある。また標的の高い画像コントラストを得るためにも、血液からの排泄速度が単一分子量で制御可能な事は利点である。つまり dendrimer を造影剤に用いることによって、薬物ターゲティングにはない重要な役割を果たすことが可能になる。

3. ポリリシン誘導体

ポリアミノ酸であるポリ(L-リシン)も古くから Gd キレートキャリアとして研究されてきた^{10,11)}。ただし、ポリカチオンであるポリ(L-リシン)は、その自身の自身は肝臓に急速に捕捉される性質を有する事と、分子量依存性の生体に対する毒性(分子量が大きいほど毒性が大きい)があり、MRI 造影剤の研究としてはあくまで基礎研究に留まるものであった。この限界をポリエチレングリコール(PEG)鎖をグラフトすることによって解決したのが、Weissleder らのグループの研究例である。これは、薬物ターゲティングの研究で明らかとなった PEG の性質を造影剤のターゲティングに有効に活用された例である。

これは、固形癌へのターゲティングを明確な目標として行った研究¹²⁾で、キャリアとしてはポリ(L-リシン)と PEG のグラフトコポリマーを用いている。図

2C に示す Gd-DTPA をポリ(L-リシン)に結合させたものであるが、ポリ(L-リシン)は塩基性高分子であるので、血中循環性が乏しく、EPR 効果を示すことができない。この塩基性を PEG を結合することでシールドし、長い血中半減期(36時間)を達成することができた。これに伴って、相当に高い効率でラットの固形癌に運搬された。抗癌剤の場合ならば、高い抗癌活性が得られるはずの成功したターゲティングと言える。しかし、この研究においても癌選択的な MRI 画像は報告されていない。造影剤の場合には、血液にある造影剤が不要なバックグラウンドとして癌選択的画像の障害となり得ることが、薬物ターゲティングと異なる事柄である。癌組織での高分子物質の血管透過は、低分子薬物の透過に比べると圧倒的に遅い現象なので、EPR 効果によって有効な量の高分子化抗癌剤の集積を得るためには、高い血中濃度が長く保たれる必要がある。この必要とされる高い血中濃度が、MRI 造影剤の場合には好ましくない画像バックグラウンドとなり得る。血管は癌組織のみではなく正常組織も通っているからである。よって、癌選択的 MRI 造影剤を成功させるには、薬物ターゲティングの場合には必要のなかった血液の画像バックグラウンドを下げるための新たな工夫がキャリアシステムに求められるのである。

4. 高分子ミセル

筆者は過去 20 年にわたって、高分子ミセルキャリアによる固形癌への抗癌剤のターゲティングの研究を展開してきた^{13,14)}。抗癌剤がターゲティングできるならば、造影剤をターゲティングすることによって癌診断を進展させることも可能と考えられる。この観点から筆者らは近年、図 2D に示す高分子ミセル型 MRI 造影剤の研究に取り組んでいる。高分子ミセルに限らずに、EPR 効果を利用した固形癌への薬物ターゲティングにおいては、腫瘍血管の血圧、血流量、高分子の透過性、血管からの癌細胞までの距離などが、ターゲティング効率を決める重要な因子と考えられる。実

させ
子で
すこ
とで
るこ
ット
い抗
と言
MRI
液中
選択
ング
管透
現象
抗癌
たれ
度が、
グラ
常組
MRI
の場合
を下
られ

キャリ
ア研究を
るな
る癌診
見点か
MRI
に限ら
ターゲット
分子
ター
る、実

験動物の移植癌では、これらの因子がそろった評価系で抗癌活性の評価を行っている。これに対し、臨床ではたとえ同一種類の癌においても、患者ごとに以上の因子が大きく異なっていることが予想される。よって、もし同じキャリアシステムの造影剤によって明瞭に画像化されれば、その患者の癌組織の諸因子はターゲティングに好ましい事となり、このキャリアシステムの抗癌剤を用いた治療の有効率は高いものと予想される。よって、同一キャリアを用いた診断と治療が一体となった、患者個々に対応したオーダーメイド医療の実現が期待される。

まずこの高分子ミセル MRI 造影剤が求められる要件は高い血中循環性であり、その結果としての癌集積性である。既にマウス癌モデルにおいて、抗癌剤のターゲティングと同じ程度の血中循環性と癌集積性を得ることに成功している。これは、癌ターゲティングで得られた技術を MRI 造影剤に有効に活用できたことを意味する。

前記の図 2 C で述べたように、抗癌剤の場合には求められないが、MRI 造影能では満たすと好ましいと考えられる要件は、癌組織で選択的に造影能を発揮する機能である。この機能を得るために、高分子ミセルの形成と解離現象を利用するのが、抗癌剤ターゲティングの場合には無かった仕掛けである。高分子ミセルはブロックコポリマー分子が多数会合してできる構造で、抗癌剤の場合はミセルの疎水性内核に抗癌剤を内封してターゲティングするとともに、疎水性場に薬物を保持することで薬物分子の体内での不活性化を抑制する効果もあった¹⁵⁾。MRI 造影剤においては図 3 に示すように、ミセル構造形成によってミセル内に位置する Gd キレートが周囲の水分子から隔離されることで、T1 緩和時間短縮能(緩和能)を抑制することが可能と考えられる。すなわち、ミセル形態で血液を循環して

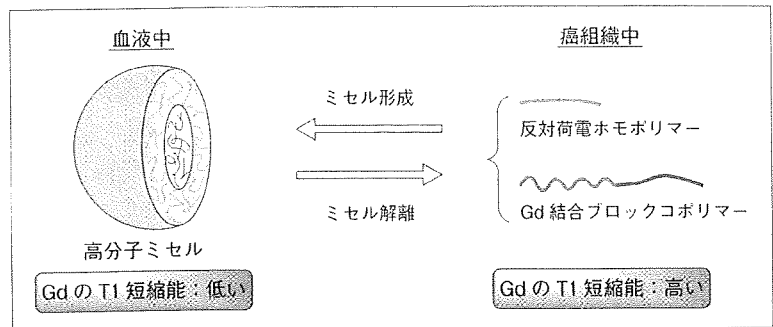


図 3. ミセル構造形成・解離による T1 緩和能の制御

いる間は、血液の画像コントラストは抑制される一方、癌組織内でミセル構造からブロックコポリマーに解離すると、Gd キレートは周囲の水に自由に接触することができ、T1 緩和能を発揮して癌組織をコントラスト高く映し出す。癌組織内では、分子量一万程度のブロックコポリマーでも EPR 効果によって長時間組織内に留まるのであるが、血液内でミセル構造が解離して生じたブロックコポリマーは、その分子量が腎臓の分画分子量より小さいので、速やかに排出されて血液の画像バックグラウンドは低く保たれる。この高分子ミセルシステムは、*in vitro* でミセル構造の形成・解離によって約 4 倍の T1 緩和能の変化を得ることに成功した¹⁶⁾。今後は、*in vivo* でのターゲティングと癌選択画像取得に進んでゆくこととなる。

おわりに

ここでは、選択的な運搬を行うキャリアを分子イメージングに応用する例を説明する事で、薬物ターゲティングと分子イメージングとの関連を述べた。2つの領域が相互作用を強くしながら、大きく発展することを願っている。

◎文献

- 1) Matsumura Y, Maeda H: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins

- and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46(12pt1) : 6387-6392, 1986
- 2) Maeda H, Seymour LW, Miyamoto Y : Conjugates of anticancer agents and polymers : Advantages of macromolecular therapeutics in vivo. *Bioconjug Chem* 3 : 351-362, 1992
 - 3) Fenster A : A TRENDS Guide to Imaging Technologies. *Trends Biotechnol* 20 : S1-S2, 2002
 - 4) Weissleder R, Mahmood U : Molecular imaging. *Radiology* 219 : 316-333, 2001
 - 5) Rebizak R, Schaefer M, Dellacherie E : Polymeric Conjugates of Gd³⁺-diethylenetriaminepentaacetic acid and dextran. I. Synthesis, characterization, and paramagnetic properties. *Bioconjug Chem* 8 : 605-610, 1997
 - 6) Wang SC, Wikström MG, White DL, et al : Evaluation of Gd-DTPA-labeled dextran as an intravascular MR contrast agent : imaging characteristics in normal rat tissues. *Radiology* 175 : 483-488, 1990
 - 7) Kobayashi H, Brechbiel MW : Dendrimer-based macromolecular MRI contrast agents : characteristics and application. *Mol Imaging* 2 : 1-10, 2003
 - 8) Kobayashi H, Kawamoto S, Jo SK, et al : Macromolecular MRI contrast agents with small dendrimers : pharmacokinetic differences between sizes and cores. *Bioconjug Chem* 14 : 388-394, 2003
 - 9) Venditto VJ, Regino CA, Brechbiel MW : PAMAM dendrimer based macromolecules as improved contrast agents. *Mol Pharm* 2 : 302-311, 2005
 - 10) Grandin C, Van Beers BE, Demeure R, et al : Comparison of gadolinium-DTPA and polylysine-gadolinium-DTPA--enhanced magnetic resonance imaging of hepatocarcinoma in the rat. *Invest Radiol* 30 : 572-581, 1995
 - 11) Schneider G, Seidel R, Uder M, et al : In vivo microscopic evaluation of the microvascular behavior of FITC-labeled macromolecular MR contrast agents in the hamster skinfold chamber. *Invest Radiol* 35 : 564-570, 2000
 - 12) Bogdanov A Jr, Wright SC, Marecos EM, et al : A long-circulating co-polymer in "passive targeting" to solid tumors. *J Drug Target* 4 : 321-330, 1997
 - 13) Yokoyama M : Polymeric micelles as nano-sized drug carrier systems. In : Nanoparticles for Pharmaceutical Applications. (Tabata Y, ed.) American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, 2007, pp63-72
 - 14) Aliabadi HM, Lavasanifar A : Polymeric micelles for drug delivery. *Expert Opin, Drug Deliv* 3 : 139-162, 2006
 - 15) Yokoyama M, Miyauchi M, Yamada N, et al : Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug, adriamycin-conjugated poly (ethylene glycol) -poly (aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res* 50 : 1693-1700, 1990
 - 16) Nakamura E, Makino K, Okano T, et al : A polymeric micelle MRI contrast agent with changeable relaxivity. *J Control Release* 114 : 325-333, 2006

特集 自己組織化と高分子材料

自己組織化高分子のターゲティングへの応用

Applications of Self-Assembling Polymers to Drug Targeting

横山昌幸

Masayuki YOKOYAMA

Medical Engineering Laboratory,
Jikei University School of Medicine

E-mail: masajun2093ryo@jikei.ac.jp

薬物ターゲティングシステムへの高分子材料の自己組織化の応用について、高分子ミセルキャリアシステムを中心に解説する。ターゲティングの目的、方法論を解説した後、高分子を用いた薬物キャリアの分類を示し、その分類の中で高分子の自己組織化に関係したキャリアーについて、研究例を示しながら解説する。

Abstract: In this review, applications of self-assembling polymeric materials to drug targeting systems are explained with a focus on polymeric micelle drug carriers. The definition and methodologies of drug targeting are briefly summarized, then examples of self-assembling polymeric drug carrier systems are introduced.

Keywords: Drug Targeting / Polymeric Micelle / Self-Assembling Polymer / DDS

1. 薬物ターゲティングとは

本総説は、薬物ターゲティングシステムへの高分子材料の自己組織化の応用について、高分子ミセルキャリアシステムを中心に解説する。

内容に入る前に、ドラッグデリバリーシステム(DDS)におけるターゲティングの位置づけについてまとめておく。

DDSとは「薬物をより有効に、より安全に、より容易な投与形態で用いるためのシステム」と記述される。DDSは三つの方法論に大別される。吸収改善、コントロールドリリース、ターゲティングである。吸収改善とは「従来は用いられなかった投与部位から吸収させたり、従来は血中投与しかできなかった薬物を小腸、皮膚などのほかの経路で投与すること」である。禁煙のためにニコチンをガムのようなもので摂取したり、皮膚に貼る方法で摂取するDDS技術はこの方法論の代表例である。コントロールドリリースは、「一度投与すると長期間にわたって薬物治療が可能となるようにデバイスからの薬物放出を制御する技術」のことである。最近では単に長期間の薬物放出のみでなく、薬物治療が必要なときにのみ薬物を放出させる技術も含む。ターゲティングとは、「薬物治療が必要な部位に選択的に薬物を送りこみ働かせること」である。

注意したいことは、この三つの方法論は互いに独立



横山昌幸 Masayuki YOKOYAMA

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
[105-8461] 東京都港区西新橋3-25-8
工学博士。
専門はバイオマテリアル、ドラッグデリバリーシステム。

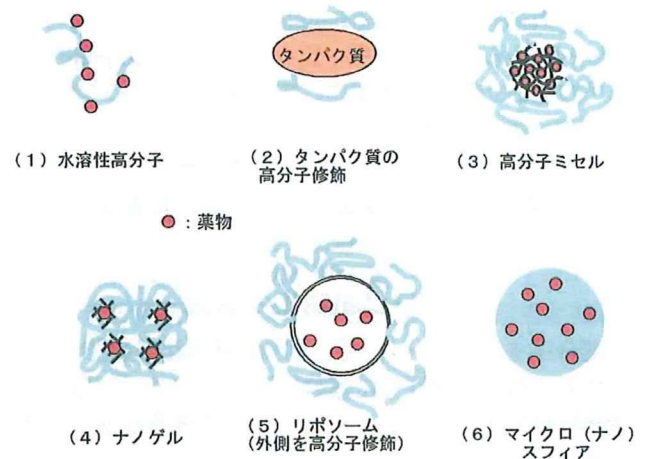


図1 高分子を用いた薬物キャリアーの形態

したものではなく、互いにオーバーラップすることもある。たとえば狭心症薬ニトログリセリンを皮膚から吸収させるDDSシステムは、皮膚からの吸収という吸収改善と長期間にわたって薬効が持続するコントロールドリリースの両側面を有する。DDSについて詳しくは、参考文献^{1),2)}を参照されたい。

ターゲティングの実現には薬物をキャリアーに結合または封入して治療部位に選択的に送達する。高分子をキャリアーとして用いる場合、図1に示すようなタイプがある。天然あるいは合成の水溶性高分子に薬物を化学結合させたものが(1)のタイプである。(2)は薬物が高分子であるタンパク質であって、ポリエチレングリコールなどの合成高分子を修飾する場合である。(3)の高分子ミセルは複数の高分子鎖が会合して形成するミセル構造である。(4)に挙げたナノゲルも高分子の会合体であるが、疎水性の核が多数存在することなどが高分子ミセルと異なる。(5)には高分子修飾リポソームを挙げた。ポリエチレングリコー

ルを二分子膜の構成脂質に結合することで、パッシブターゲティングによるがんターゲティングを達成できることが知られており、薬剤としての使用認可を受けたものもある。(6)のマイクロスフィアはいわゆる微粒子で、水に不溶性の高分子からなるもので、粒径が1 μm未満の場合には、ナノスフィアと呼ばれることが多い。以上のうち高分子の自己組織化を利用したものは、(3)と(4)であり、本論はこれらについて解説する。

さて、本論で扱うターゲティングについて、二つの様式の解説をここに加えることを許されたい。次項の説明に必要なからである。薬物ターゲティングを実現するためには、アクティブターゲティングとパッシブターゲティングの二つの様式がある。抗体のように、標的細胞・組織との特異的相互作用を利用してターゲティングを行う方法をアクティブターゲティングと呼ぶ。一方、キャリアーの物理的、化学的な性質と生体側の解剖学的、生理学的特性とのバランスで受動的に規定される現象をうまく利用してデリバリーを行うものを、パッシブターゲティングと呼ぶ。この分類に関してはこれ以上の解説をここでは加えないが、キャリアーの大きさ、電荷、親水疎水性などの物理化学的性質が、パッシブターゲティングで重要性を有することから、高分子を自己組織化することが有意義なのである。

2. 自己組織化の意義

高分子を図1の(1)や(6)の単純な形態でなく、わざわざ自己組織化して薬物キャリアーとして用いる意義は何であろうか？ 筆者は二つの意義があると考える。表1にまとめる。

その意義の第一はキャリアーの大きさである。血液内に投与した薬物キャリアーシステムの運命を大きく左右する二つの「大きさ」がある。

その第一は、腎臓のろ過の大きさである。高分子がこの大きさより小さいと尿として速やかに排泄される。この腎臓排出の境界は通常、分子量3万~4万程度と記述され³⁾、この分子量は粒径としては約3 nm程度に対応する。この腎臓からの排出の有無は以下に述べる二つの事柄と密接に関連する。その第一は、血液中の循環性である。固形がんなどを標的とするターゲティングでは、血液の循環性を高めることが有益な場合が多いが、そのためにはキャリアーが腎臓のろ過作用によって排出されない十分な大きさである必要がある。その第二は長期的な毒性である。腎臓から排出されないキャリアーシステムは、生体外へ排出されないことによる長期の蓄積毒性の懸念がある。もちろん、肝臓から胆汁排泄を通しての経路も存在するが、腎臓からの排泄の確保は、現時点では重要と考えられている。通常材料では、高い血液循環性と長期的な腎臓からの排出性を両立するには、材料を生体内分解性の

表1 薬物ターゲティングのために高分子を自己組織化する意義

- | |
|-------------------------------|
| 1. キャリヤーの大きさの制御 |
| (1) 腎臓からの排出 (分子量約4万または、直径3nm) |
| ・血中循環性の確保 |
| ・長期毒性の問題 |
| (2) がん組織への透過 (直径200~400nm) |
| 2. キャリヤーの機能 |
| (1) 表面物性 |
| (2) 薬物封入・放出 |
| (3) 形 |

もので作製する必要がある。しかし、必ずしも目的に適した生分解性の高分子が得られるわけではなく、その場合には血液循環性を犠牲にしても、分子量が3万より小さな高分子を用いるのが従来の方であった⁴⁾。ここで、自己組織化が機能を発揮し得る。高分子ミセルを形成するブロックコポリマーの分子量を腎臓から排出されるように(約3万以下にする)する。高分子ミセルは、血液循環性が必要な時間範囲ではミセル構造によって腎臓からの排出を免れ、長期的に見れば高分子ミセルは1本1本の高分子鎖に解離するため、生体に蓄積して毒性を及ぼす心配が概念上ないことになる。

薬物キャリアーシステムの運命を大きく左右する第二の「大きさ」は、固形がんのパッシブターゲティングに適したサイズの上限である。固形がんのパッシブターゲティングはがん組織の血管の特有の性質に基づくEPR効果(Enhanced Permeability and Retention effect)によることが知られている。これはナノサイズのキャリアーは本質的に固形がん部位に選択的に蓄積しやすい性質のことで、1986年に前田、松村によって提唱された^{5), 6)}。この上限サイズは、球状のキャリアーシステムの場合に、200 nm~300 nm程度と認識されている^{7), 8)}。

次に高分子を自己組織化して薬物キャリアーとして用いる第二の意義、キャリアーの機能を説明する。EPR効果の実現のためには大きさ以外にもう一つ大切な要素として表面物性の制御がある。キャリアー表面が親水的で、中性か弱く負に荷電することが求められる⁹⁾。これは肝臓・脾臓の細網内皮系に捕捉されにくくするために必要なことである。しかし、封入して運搬する薬物がこれと反対に疎水性で、正荷電を有することが多い。そこで、薬物をキャリアー内に封じ込めて、キャリアーシステムの表面に出てこないようにする必要がある。この封じ込めのために、自己組織化が有効に活用され得るのである。高分子ミセルは、図2に示す親水鎖と疎水鎖からなるAB型ブロックコポリマーからなるので、疎水性の内核が薬物封入部分となり、それを親水性の外殻が包んでいる。この内核と外殻が明確に相分離していることが、「薬物を封じ込めて、その性質を表面に出さないこと」を比較的容易に実現させる。

機能の第二は、薬物の封入安定性および薬物放出速

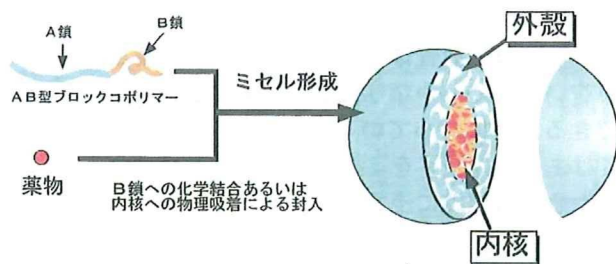


図2 典型的な高分子ミセル薬物キャリアーシステムの構造

度の制御である。薬物の放出挙動は次の三つの因子によって決まると考えられる。内核の物理化学的性質（疎水性の強さ、流動性/固体性、粘弾性等）、内核の大きさ、そしてミセルの安定性である。これらの三つの因子はブロックポリマーの化学構造によって制御し得るものである。高分子には多彩な化学構造、物性をもったものが利用できるため、薬物放出速度の非常に広い範囲で得られる。同一の薬物について、内核を液体状態にしてミセル溶液が希釈されると瞬時に薬物放出するものから、数日のオーダーで薬物を放出するものまでのキャリアーシステムが比較的容易に得ることが可能である。さらには、外部刺激にตอบสนองして薬物を放出する仕組み^{10)~12)}を入れることも可能である。

機能の第三はキャリアーの形である。これまでは球状の高分子ミセルとナノゲルが専ら研究されてきたが、最近、紐状（シリンダー状）の高分子ミセルを薬物キャリアーとした例が出現した。次項の3.4で述べる。同系統の材料を使いながら多彩な形が得られるのも自己組織化の特長と言える。

3. 自己組織化薬物ターゲティングシステムの例

3.1 ホモポリマーの薬物キャリアーの場合の会合

この例は自己組織化キャリアーではないが、高分子キャリアーで初めて高分子の会合を報告したものであり、自己組織化の薬物キャリアー研究に大きな影響を及ぼしたので、ここで紹介する¹³⁾。これは Kopecekらのポリ[N-2(ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド] (PHPMA) ホモポリマーを図1(1)に示した水溶性のキャリアーとして用いる研究で、この論文では薬物モデルとして疎水性モデル化合物を末端に有するトリペプチドをポリマー側鎖に結合した。この結合率はポリマーユニットの7 mol.%と低いにもかかわらず、結合した疎水性によって平均五つのポリマー鎖が会合していた。つまり、ホモポリマーの場合でも、疎水性相互作用による高分子間の会合が存在したのである。この会合挙動のために、このPHPMAに実際の薬物を結合させたシステムでは、薬物結合量を3 mol.%という小さい値に抑えている¹⁴⁾。ここでは、薬物-ポリマー複合体の会合挙動を検証している点で先駆性が高い。本総説で扱う薬物キャリアーの自己組織化とは、ホモポリマーでは制御し難かった会合挙動を、ブロックコ

ポリマーなどの自己組織化を通して巧みに制御したものとも言えよう。

3.2 高分子ミセルキャリアーシステム（筆者の研究例に重点を当てて）

図2に示す、親水鎖と疎水鎖からなるAB型ブロックコポリマーが形成する高分子ミセルに抗がん剤を封入あるいは結合した薬剤は現在4種類が臨床試験中である^{15)~18)}。いずれも、適切な組成にすることにより、EPR効果による固形がんへのターゲティングを達成する。

本総説では高分子ミセル組成の3要素の、がんターゲティングへの影響についてまとめる。その3要素とは、(1)高分子鎖の長さ、(2)疎水性高分子鎖の化学構造、そして(3)薬物封入（結合）量である。

(1) 高分子鎖の長さ

高分子鎖の長さを変えたときに変化する高分子ミセルの基本的物性は、臨界ミセル濃度 (CMC) と粒径である。一般に、疎水性の高分子鎖を長くすると、CMCは小さくなり、粒径は大きくなる。著者らが行った抗がん剤アドリアマイシンを内包させた高分子ミセルでは、親水性（外殻になる）のポリエチレングリコール鎖が長く、疎水核になるポリアミノ酸誘導体の短いものが高い抗がん活性を示した¹⁹⁾。この結果は、疎水性の内核が親水性の外殻で十分に覆われているミセル構造が好ましいことを示唆する。

(2) 疎水性高分子鎖の化学構造

これまでの研究で、単に疎水性がミセル形成と薬物封入に足るのに充分であれば、ターゲティングが達成できるわけではないことがはっきりしている。

抗がん活性物質カンプトテシン封入高分子ミセル^{20), 21)}では、ミセルを形成する高分子鎖が中間的な疎水性のときに高い血中循環性を示し、ターゲティングが達成された。カンプトテシンは水に溶解しないので、疎水性相互作用が主たる薬物封入の相互作用であり、疎水性を有する高分子鎖のミセルであれば封入は比較的容易であった。にもかかわらず、特定の疎水性度のもののみ高い血中循環性を示した事実は、血液中の高い血中循環性を得るためには、疎水性以外の因子が重要であることを意味する。その因子として考えられるのは、高分子鎖の立体構造や、固体性の強さなどである。

(3) 封入薬物量

封入する薬物量はターゲティング性能に影響するのだろうか？ これについては影響する場合と、影響しない場合が知られている。

まず、影響したアドリアマイシン封入ミセル¹⁹⁾では、ブロックコポリマーを固定して、物理的に封入するアドリアマイシンの量を変えると、封入薬物量が多いほうが血中循環性が高く、より固形がんを集積した。封入薬物がミセル内核の環境をより疎水的にすることで、薬物の封入安定性が向上したと考えられる。

一方、カンプトテシン封入ミセルではその封入量をブロックコポリマーに対して5~40 wt.%の範囲では、血液循環性には変化が見られない²²⁾。薬物封入の安定性は疎水性高分子鎖と薬物間の相互作用によって決まり、薬物封入にともなう内核の環境変化は影響しなかったと考えられる。

以上のように、高分子ミセル製剤の設計については、判明していることもあるが、まだ不明な点も多い。

3.3 ナノゲルキャリアシステム

図1(4)に示したナノゲルも高分子の会合体であるが、疎水性の核が多数存在する点が高分子ミセルと異なる。用いる高分子もプルランなどのホモポリマー(分岐はある)にコレステロール基などの疎水基をランダムに結合したものである。東京医科歯科大の秋吉一成教授がこのナノゲルの研究を展開されている^{23), 24)}。疎水基の種類と含量を制御することで、直径10~20 nm程度の安定な会合体が形成され、その中に、疎水性薬物やタンパク質が内包される。また、薬物キャリア以外に、ナノゲルが変性したタンパク質を元の状態に戻すシャペロンとしての機能を示すという、興味深い報告をしている。

3.4 紐状高分子ミセルキャリアシステム

高分子からなる会合体は専ら球形のものが用いられてきたが、2007年に紐状(シリンダー状)の高分子ミセルを応用した研究が発表された²⁵⁾。疎水性鎖として非生分解性のポリエチレンあるいは生分解性のポリ(ϵ -カプロラクトン)を有するブロックコポリマーから形成した紐状の高分子ミセルである。その長さは最も長いもので、16 μm にも及び、長いほうが血液中の循環性が高くなっている。興味深いのは、とても長い血中半減期を達成していることである。非生分解性の場合、3.5 μm のもので、静脈投与後4日経過してもほとんど血中濃度が下らない。生分解性の場合、16 μm のもので血中半減期が7日くらいである。血中

半減期を短くする大きな要因は肝臓による取り込みである。肝臓の血管はミクロンサイズにも及ぶ大きな穴が空いていて、かなり自由に肝臓の細胞が血液と接触できるようになっている。この紐状の直径は数十nmではあるが、長さをミクロンよりも長くすることで血液から肝臓組織に浸透しなくなるのであろうか? アイデア、結果ともに興味あるものである。

文 献

- 1) 橋田 充, ドラッグデリバリーシステム—創薬と治療への新たな挑戦, 化学同人 (1995)
- 2) 堀 了平, 橋田 充, 改訂 図解 夢の薬剤DDS, じほう (1997)
- 3) Seymour, *et al.*, *Eur. J. Cancer*, **31A**, 766 (1995)
- 4) R. Duncan, *et al.*, *J. Controlled Release*, **19**, 331 (1992)
- 5) Y. Matsumura and H. Maeda, *Cancer Res.*, **46**, 6387 (1986)
- 6) H. Maeda, *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **3**, 351 (1992)
- 7) O. Ishida, K. Maruyama, and M. Iwatsuru, *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **190**, 49 (1999)
- 8) D. C. Litzinger, A. M. J. Buiting, and L. Huang, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1190**, 99 (1994)
- 9) 横山昌幸, 機能材料, **22**, 22 (2002)
- 10) M. Nakayama and T. Okano, *Macromolecules*, **41**, 504 (2008)
- 11) J. E. Chung, *et al.*, *Colloids Surf., B*, **9**, 37 (1997)
- 12) F. Kohori, *et al.*, *J. Controlled Release*, **55**, 87 (1998)
- 13) Ulbrich, *et al.*, *Makromol. Chem.*, **188**, 1261 (1987)
- 14) R. Duncan, *et al.*, *J. Controlled Release*, **19**, 331 (1992)
- 15) Hamaguchi, *et al.*, *Br. J. Cancer*, **97**, 170 (2007)
- 16) H. Uchino, *et al.*, *Br. J. Cancer*, **93**, 678 (2005)
- 17) F. Koizumi, *et al.*, *Cancer Res.*, **66**, 10048 (2006)
- 18) 濱口哲弥, 血液・腫瘍科, **54**, 702 (2007)
- 19) M. Yokoyama, *et al.*, *J. Drug Targeting*, **7**, 171 (1999)
- 20) M. Watanabe, *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **308**, 183 (2006)
- 21) K. Kawano, *et al.*, *J. Controlled Release*, **112**, 329 (2006)
- 22) M. Watanabe, *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **308**, 183 (2006)
- 23) H. Ayame, *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **19**, 882 (2008)
- 24) T. Shimizu, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**, 330 (2008)
- 25) Y. Geng, T. Minko, and D. E. Discher, *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **2**, 249 (2007)

Increase in tumour permeability following TGF- β type I receptor-inhibitor treatment observed by dynamic contrast-enhanced MRI

T Minowa¹, K Kawano¹, H Kuribayashi², K Shiraishi³, T Sugino⁴, Y Hattori¹, M Yokoyama³ and Y Maitani^{*1}

¹Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University, Ebara 2-4-41, Shinagawa, Tokyo 142-8501, Japan; ²Varian Technologies Japan Limited, Shibaura 4-16-36, Minato, Tokyo 108-0023, Japan; ³Kanagawa Academy of Science and Technology, Sakado 3-2-1, Takatsu, Kawasaki, Kanagawa 213-0012, Japan; ⁴Department of Basic Pathology, Fukushima Medical University, Hikaniga-oka 1, Fukushima 960-1295, Japan

BACKGROUND: To enhance the success rate of nanocarrier-mediated chemotherapy combined with an anti-angiogenic agent, it is crucial to identify parameters for tumour vasculature that can predict a response to the treatment of the anti-angiogenic agent.

METHODS: To apply transforming growth factor (TGF)- β type I receptor (T β R-I) inhibitor, A-83-01, to combined therapy, dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) was carried out in mice bearing colon 26 cells using gadolinium (Gd)-DTPA and for its liposomal formulation to evaluate changes in tumour microvasculature following A-83-01. Tumour vascular parameters from DCE-MRI were compared with histological assessment and *apparent diffusion coefficient* of water in tumour generated by diffusion-weighted MRI.

RESULTS: Contrary to evaluations reported for anti-angiogenic agents, A-83-01 treatment increased the initial area under the Gd concentration–time curve (IAUGC₆₀), volume transfer constant (K^{trans}) and fractional plasma volume (v_p) significantly within 24 h, that was positively related to α -smooth muscle actin-positive pericyte coverage and tumour cell proliferation, and was correlated inversely with the *apparent diffusion coefficient*. The vascular function of the tumour improved by A-83-01 treatment was well assessed on post-liposomal Gd-DTPA-enhanced MR images, which predicted delivery of a liposomal drug to the tumour.

CONCLUSION: These findings suggest that DCE-MRI and, in particular, K^{trans} and v_p quantitation, provide important additional information about tumour vasculature by A-83-01 treatment.

British Journal of Cancer (2009) 101, 1884–1890. doi:10.1038/sj.bjc.6605367 www.bjcancer.com

Published online 3 November 2009

© 2009 Cancer Research UK

Keywords: MRI; liposome; angiogenesis; TGF- β inhibitor; contrast agent; tumour

The success of chemotherapeutic agents with solid tumours is critically dependant on the access that these agents have to the tumours via the so-called 'leaky vasculature'. In particular, tumour vasculature is crucial for the delivery of drugs encapsulated in nanocarriers (Matsumura and Maeda, 1986). Anti-angiogenesis effects are known to change the tumour vasculature; therefore, this technique has been already applied to combined therapy. Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody, was developed for blocking angiogenesis and it is clinically used with other drugs to improve the efficiency of chemotherapy.

The roles of transforming growth factor (TGF)- β in cancer biology are complex; TGF- β can suppress or promote tumour growth depending on the type of cancer. Small molecule TGF- β type I receptor (T β R-I) inhibitor has a wide variety of effects (Jakowlew, 2006; Tsuchida *et al*, 2006). The T β R-I inhibitor LY364947 was reported to increase the accumulation of an anti-cancer drug encapsulated in nanocarriers by changing the micro-environmental vasculature (Kano *et al*, 2007). The T β R-I inhibitor A-83-01 is one of more potent inhibitors of T β R-I kinase/activin

receptor-like kinase (ALK)-5 (IC₅₀ = 12 nM) (Tojo *et al*, 2005) than a previously described ALK-5 inhibitors including LY364947 (IC₅₀ = 59 nM) (Li *et al*, 2006), although the *in vivo* effect has not been made known. To estimate the tumour state after treatment with T β R-I inhibitor is important to determine an administration schedule for T β R-I inhibitor-combined therapy. However, it is difficult to rationally determine whether tumour blood vessels are amenable to nanocarrier-mediated therapy in an individualised manner.

Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) is one of the evaluation methods of anti-angiogenic agents, such as anti-VEGF antibody and tyrosine kinase inhibitor, clinically (Morgan *et al*, 2003; O'Connor *et al*, 2007) and preclinically (Marzola *et al*, 2004; Nakamura *et al*, 2006; Bradley *et al*, 2009), by calculating pharmacokinetic parameters, including fractional plasma volume (v_p) and the volume transfer constant (K^{trans}) from the enhancement of tumour signal intensity by gadolinium (Gd) contrast agent (Tozer, 2003; Kiessling *et al*, 2007). To my knowledge, however, there are no reports to evaluate T β R-I inhibitor by DCE-MRI. In clinical studies, small molecular weight contrast agents, Gd chelates, have been used. K^{trans} , the Gd exchange constant between blood and tumour interstitial tissue, depends on the balance between permeability and blood flow. Therefore, the K^{trans} parameter depends on the size of the contrast

*Correspondence: Dr Y Maitani; E-mail: yoshie@hoshi.ac.jp

Received 8 July 2009; revised 2 September 2009; accepted 17 September 2009; published online 3 November 2009

agent. The choice of the optimal contrast agent is considered to be essential for a successful characterisation of tumour angiogenesis. As macromolecule contrast media show lower permeability than Gd cheleates, it is useful for permeability change monitoring in tumour vasculature (Daldrup-Link *et al*, 2004; Turetschek *et al*, 2004); Liposomes are self-closed colloidal particles in which bilayer membranes composed from self-aggregated lipid molecules encapsulate a fraction of the medium. Liposomes have been used as drug carriers for anticancer drugs such as Doxil. For this reason, liposomal Gd has a substantial potential to detect permeability-limited conditions. There are still no reports on the use of liposomes as a DCE-MRI contrast agent. Furthermore, liposomal contrast agents to evaluate nanocarrier behaviour in tumour directly will be a hopeful method of examination for combination therapy.

Thus, the purpose of this study was to evaluate changes in tumour vasculature as parameters using DCE-MRI to monitor responses in mice following A-83-01 administration. In addition to DCE-MRI, diffusion-weighted imaging was used to estimate the apparent diffusion coefficient of tissue water (Koh and Padhani, 2006; Patterson *et al*, 2008). T β R-I inhibitor activity was also evaluated in representative experiments through tumour vascularity, the proportion of endothelial cells associated with pericytes, and microvessel density from histological slices.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All animal experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals of Hoshi University. Colon 26 cells (1×10^6) were inoculated subcutaneously into the right back at the side of the heart in CDF1 female mice (6-weeks old, Sankyo Labo Service, Tokyo, Japan). When the tumour size reached approximately 100 mm³, A-83-01 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) (Supplementary Figure S1A) dissolved in DMSO/saline = 3 out of 2 (v/v) was injected intraperitoneally. The tail vein was catheterised post-injection of contrast agent during the DCE-MRI experiment. Mice were anaesthetised with 1.5% isoflurane (Abbott Japan, Tokyo, Japan) throughout the MRI experiment during their insertion into a 9.4T vertical type MRI (Varian, Palo Alto, CA, USA). For a single treatment of A-83-01, mice (N=4) were injected with A-83-01 at a dose of 1 mg kg⁻¹ at '0 h' (Supplementary Figure S1B). In this experiment, 0 h was the time of the first A-83-01 intraperitoneal injection and the number of hours represents time after the first injection of A-83-01. For repeated treatment, mice (N=4) were injected with A-83-01 at 0 and 21 h at the same dose as for the single treatment.

Preparation of liposomal Gd-DTPA

For the preparation of liposomal Gd-DTPA (Gd-L), mixture of egg phosphatidylcholine (Q.P. Company, Tokyo, Japan), cholesterol (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), and polyethyleneglycol 2000-distearoyl phosphatidylethanolamine (NOF, Tokyo, Japan) in a molar ratio of 5:2:0.35 was dissolved in ethanol at 60°C, hydrated with Gd-DTPA (Magnevist, Bayer-Schering Pharma AG, Berlin, Germany), stirred, and evaporated under a vacuum to remove ethanol. This mixture was exposed to ultrasound until the particle diameter was about 120 nm, followed by exhausted dialysis against phosphate buffered saline (pH 7.4) solution. The particle size of the liposomes was determined at 25°C using an ELS-Z2 instrument (Otsuka Electronics, Tokyo, Japan). The Gd concentration was determined using inductively coupled plasma with an SPS7800 apparatus (SII NanoTechnology, Tokyo, Japan). T¹ relaxation times of Gd-L and Gd-DTPA were measured over the concentration range of 0–0.25 mM Gd at 9.4 T₁ at room

temperature. Relaxivity (R¹) was then determined from the slope of the linear regression fits of 1/T₁ vs the Gd concentration: 1/T₁ = R₁ × [Gd] + 1/T₁₀, where T₁₀ represents T₁ of 0 mM Gd solution. R₁ of Gd-L was 4.48 mm⁻¹s⁻¹, which was similar to that of Gd-DTPA (4.39 mm⁻¹s⁻¹).

MRI

Apparent diffusion coefficient was estimated and mapped from diffusion-weighted imaging using the following parameters: repetition time (TR) = 2000 ms, echo time (TE) = 45 ms, slice thickness 3 mm, 64 × 64 data matrix, axial orientation, and field-of-view of 3 × 3 cm². Three slices through the centre of the tumour were acquired. Diffusion gradients equivalent to b-values of 0, 200, 400, and 800 s mm⁻² were employed using gradient pulse widths of $\delta = 7$ ms and $\Delta = 20$ ms.

Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging was carried out with Gd-DTPA and Gd-L before ('pre') and after treatment in each animal. With the use of Gd Gd-L, injected lipids containing Gd-L were retained in the tumour; therefore, different mice were used to compare pretreatment with treatment of A-83-01. Before DCE-MRI high spatial resolution, two-dimensional T₂-weighted spin-echo axial images were acquired to detect the tumour position. Pre-contrast tumour T₁ was determined using an inversion recovery-prepared spoiled gradient-recalled echo (SPGR) sequence. The inversion-recovery was carried out using a 180° hard RF pulse followed by a gradient crusher pulse. Inversion times were 0.2, 0.4, 0.8, 1.4, 2, and 3 s. The other MRI parameters were: TE = 3 ms, field-of-view = 3 × 3 cm², slice thickness = 4 mm, and matrix size = 64 × 64. Both RF and gradient spoilers were applied. In DCE-MRI acquisition, it was applied repeatedly to acquire the axial slice SPGR images through the tumour and left ventricle with a second temporal resolution over 6 min: TR = 7.8125 ms, TE = 2.06 ms, matrix resolution = 64 × 64, field-of-view = 3 × 3 cm², slice thickness = 4 mm, flip angle = 30°, number of slices = 1, and two signal averages. Approximately 20 s of baseline DCE-MRI images were acquired. Gd-DTPA or Gd-L was administered at 20 μ l g⁻¹ (0.1 mmol Gd kg⁻¹) as a bolus with heparinized saline (total volume ~0.4 ml) via manual injection over 2–3 s.

Quantitative evaluation of MRI

Tumour regions-of-interest (ROI) covering the whole tumour was segmented on the T₂-weighted axial images, using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA), and the tumour ROI was transferred to the apparent diffusion coefficient map calculated from diffusion-weighted imagings.

A T₁ map of tumour was prepared by the imaging of the inversion-recovery method to quantitate tumour Gd concentrations. The concentration of Gd at each imaging time point in each voxel was estimated using the formula Bradley *et al* (2009) used. T₁ in blood plasma at 9.4 T was 2.2 s, as reported previously (Tsekos *et al*, 1998) and T₁ in tumour was from the T₁ map. 1/T₁ (t) was calculated for every time point for the blood and tumour Gd concentrations. The initial area under the Gd concentration–time curve over 60 s (IAUGC₆₀) was calculated. The tumour haemodynamic parameters K^{trans} and v_p were calculated using a two-compartment model (Ewing *et al*, 2003). The plasma concentration over time was calculated from the left ventricle data, which were averaged for all mice in the Gd-DTPA and Gd-L groups for this value.

Histological and immunohistochemical analysis

For the histological assessment of A-83-01 effects on tumour vasculature, tumour sections were observed at 24 h after repeated injection of A-83-01. Each of four tumours from A-83-01 treated