

20111020A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

腹膜播種巣を標的とする抗がん剤担持ヒアルロン酸
ナノゲルとその徐放システムの開発に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 大知

平成24（2012）年5月

目次

I. 総括研究報告書

腹膜播種巣を標的とする抗がん剤担持ヒアルロン酸ナノゲル
とその徐放システムの開発に関する研究

伊藤 大知 _____ 1

II. 分担研究報告書

1. イミノ二酢酸修飾カルボキシメチルセルロース、及びナノゲル担体への
蛍光標識修飾体の合成に関する研究

鈴木 幸光 _____ 8

2. 腹膜播種モデルへのシスプラチン担持ヒアルロン酸ナノゲル
投与に関する研究

北山 丈二 _____ 15

3. 腹膜播種細胞株に対するナノゲル担体の生体適合性に関する研究

石神 浩徳 _____ 20

4. 腹膜播種細胞株に対するナノゲル担体取り込み量に関する研究

山口 博紀 _____ 27

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 34

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

総括研究報告書

腹膜播種巣を標的とする抗がん剤担持ヒアルロン酸ナノゲルと その徐放システムの開発

研究代表者： 伊藤 大知 （東京大学大学院医学系研究科・准教授）

【研究要旨】

我国の死亡原因の上位を占める胃がんの死亡原因で最も多いのが腹膜播種である。腹膜播種の効果的な治療法を確立することは、国民が希望を持って、充実した健康な生活を送る上で極めて重要な国家的課題である。近年胃がん腹膜播種に対し、タキソール腹腔投与の静脈投与に対する有効性が臨床試験で示された。しかしセカンドラインとして期待されるシスプラチン（CDDP）は動物実験レベルでも腹腔からのクリアランスが速く、投与方法が課題である。さらに診断には非侵襲的な腹腔鏡の使用が標準となり、腹腔鏡と連動した投与方法が期待されている。そこで我々は、新たにCDDP担持ヒアルロン酸（HA）ナノゲルの作製を行っている。加えてクリックケミストリーを架橋反応に利用した、腹腔鏡で注入しながら、生体内で迅速架橋する新規 *in situ* 架橋ゲルを開発する。最終的に両者を融合し、HAナノゲルを含有した *in situ* 架橋ゲルをマウス腹膜播種モデルに適用し、腹腔中で1週間に渡りCDDPを徐放し、3回投与で播種巣数を5%以下まで消失させ、臨床検討への基盤を作ることを目標としている。

本年度は、疾患生命工学センターグループが、イミノ二酢酸を導入したカルボキシメチルセルロースの合成（CMC-IDA）に成功し、さらにCDDP存在下で、直径が約100nmのヒアルロン酸ナノゲルを作製することに成功した。さらにナノゲルの細胞内動態を調べるために、HA-IDAとCMC-IDAをそれぞれ蛍光色素で化学的に標識し、共焦点顕微鏡で観察可能とした。また腫瘍外科グループ（分担者・北山准教授・石神講師・山口助教）は、腹膜播種モデルに改善を加えて実験再現性を向上させるとともに、HA-IDAとCDDPから成るヒアルロン酸ナノゲルを腹膜播種モデルに投与して、CDDP単独よりも効果が挙がること、またCDDP未担持でも播種抑制効果が見られる可能性が見出した。

研究分担者

鈴木 幸光 （東京大学大学院工学系研究科・助教）

北山 丈二 （東京大学医学部附属病院・准教授）

石神 浩徳 （東京大学医学部附属病院・講師）

山口 博紀 （東京大学医学部附属病院・助教）

A. 研究目的

がん細胞に特異的なレセプターは、上で挙げたようにがん細胞の種類によって異なる。胃腺がんの細胞であるMKN45を同期化すると、CD44が多様な種類のスプライシングを受けてできるCD44v4、CD44v5、CD44v7が多く発現することが分かっている。このことから、胃がんの腹膜播種細胞株であるMKN45PにおいてもCD44が多く発現することが期待される。よって、HAとCD44の特異的な相互作用を用いたドラッグデリバリーシステムを考案することは有効であると考えられる。

HAは6～8繰り返し単位がCD44レセプターと結合することが報告されているが、これに極めて物理化学的性質が似ているカルボキシメチルセルロース(CMC)は、ヒトが持つあらゆるレセプターと相互作用しない

ことが知られている。後述のように分担者・鈴木がHA及びCMCにシスプラチン配位子となるイミノ二酢酸部位を導入したHA-IDA及びCMC-IDAの合成に成功している。

そこで今年度は、In vitroにおけるHA-IDA、及び対照材料となるCMC-IDAの細胞内への取り込みを調べるため、MKN45P(ヒト胃がん腹膜播種細胞株)、Colon26(マウス大腸がん細胞株)、HepG2(ヒト肝臓がん細胞株)、NIH3T3(マウス線維芽細胞株)、MCF7(ヒト乳がん細胞株)の培養を行い、材料を処置して、蛍光顕微鏡で観察を行った。CD44の発現量は細胞株によって異なるため、CD44とHA-IDAがHAと同等の取り込み挙動を示すかどうかを調べることを目標とした(図1)。

(倫理面への配慮)
特段の必要はない

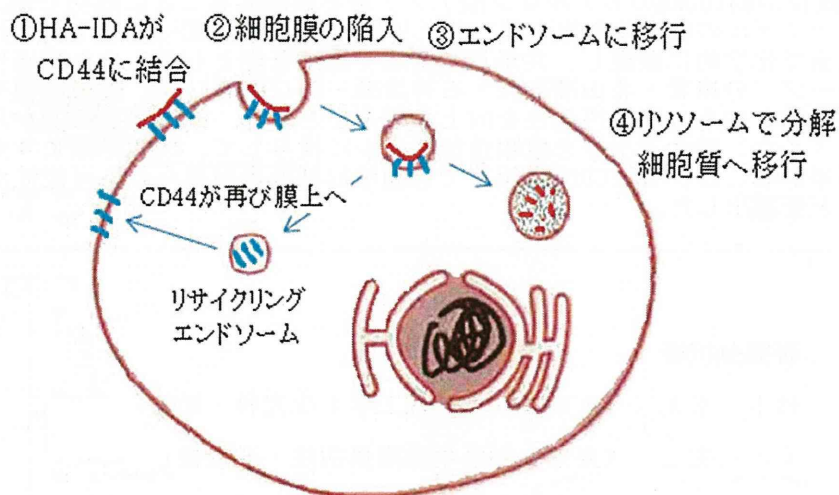


図1 HAおよびHA-IDA細胞内取り込み挙動

B. 研究方法

下記に示す各種がん細胞培養株、及び正常細胞として NIH-3T3 を用いて、フルオロセイン修飾を施した HA、HA-IDA、CMC、CMC-IDA を投与して、in vitro での細胞のポリマー取り込みの様子を共焦点顕微鏡観察で観察した。以下実験手順の詳細を示す。

●用いた実験試料

<細胞>

MKN45P, Colon26, NIH3T3, MCF7

<培地>

D-MEM,RPMI-1640

<試薬>

PBS 溶液

LysoTracker® Red Lysosomal Probe タカラバイオ PA-3015

<ポリマー>

HA-FTSC

HA-IDA-FTSC

CMC-FTSC

CMC-IDA-FTSC

●実験方法

(1) 培養フラスコ中の培地をパスツールピペットで吸引した。

(2) PBS 10 mL を加え、洗浄・吸引。浮遊細胞や死細胞を除去した。

(3) トリプシン 5 mL を加え、5 分間 37 °C 恒温槽でインキュベートし細胞を剥離させた。

(4) 培地を加え、剥離した細胞をトリプシンごと 50 mL フェルコンチューブに回収した。一部を取り分け、トリパンブルー

で染色して細胞数をカウントした。

(5) 1000 rpm, 3 min で遠心分離を行い、細胞をチューブ底に集めた。

(6) 上澄み液をアスピレーターで除去し、培地を加え、細胞濃度を $1 \times [10]^6$ cells/mL とする。よくサスペンドして細胞分布を均一にするようにした。

(7) ポリリジンコートガラスボトムディッシュに調製した細胞溶液を 3 mL 滴下

(8) 37 °C 恒温槽で 24 時間培養

(9) 培地をパスツールピペットで吸引した。

(10) PBS 1 mL で計 3 回洗浄

(11) クリーンベンチ内で 3 時間 UV 滅菌したサンプルを PBS に溶解し、HA-FTSC, HA-IDA-FTSC, CMC-FTSC, CMC-IDA-FTSC 3.0 mg/mL 溶液を作製。ガラスボトムディッシュに 1 mL ずつ添加し 2 時間培養

(12) 溶液を除去し、PBS 1 mL で計 3 回洗浄

(13) LysoTracker Red 300 nM を 1 mL 添加。30 分培養

(14) LysoTracker 溶液を除去し、PBS 1 mL で計 3 回洗浄。PBS 1 mL を添加

(15) 共焦点顕微鏡で観察

C. 研究結果

【MKN45Pに対するHA、HA-IDA、CMC-IDAの取り込み挙動の観察】

HA-FTSC と HA-IDA-FTSC では、Lysotracker とマージ画像が重なっており、エンドサイトーシスされた後にリソソームに移行していることがわかる。

また HA をイミノ二酢酸で修飾しているにも関わらず、HA-IDA は、MKN45P に高い効率で取り込まれていることがわ

かる(図2, 3)。同様の傾向は、HepG2、Colon26でも観察された。

HA-IDAのIDA修飾率は10%であり、CD44は6~8単糖ユニットを認識すると言われており、ランダムに修飾が入った場合は若干のエンドサイトーシス能の低下が見られることが予想されたが、本研究程度の修飾率であれば、十分ががん細胞標的性が維持されることが明らかになった。

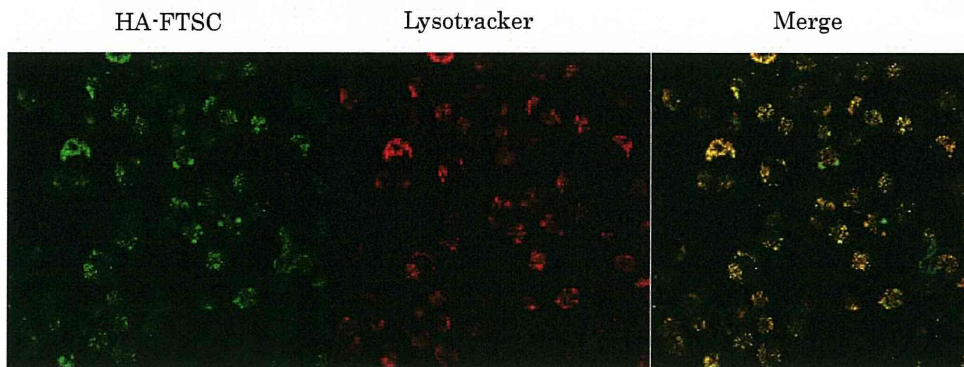


図2 MKN45Pに対するHA-FTSCの取り込み：共焦点画像

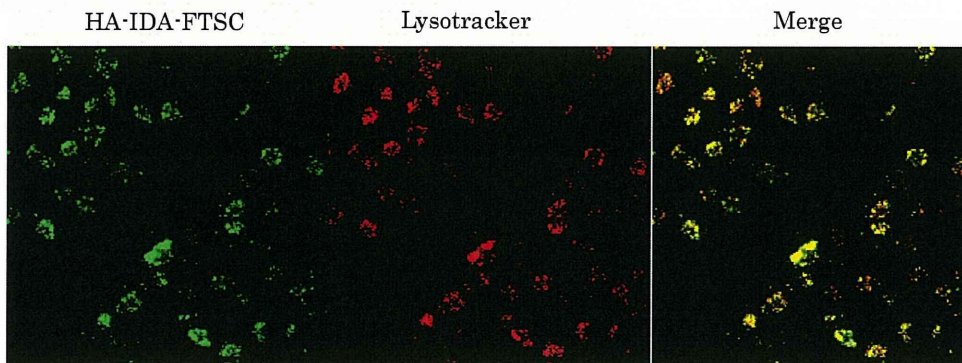


図3 MKN45Pに対するHA-IDA-FTSCの添加：共焦点画像

【CMC-IDA の MKN45P 取り込み挙動】

一方で CMC と CMC-IDA は MKN45P に投与しても、ほとんど取り込まれない。CD44 を介した取り込みであるとの直接の証拠ではないが、ナノゲルポリマーとして HA でなく CMC を用いると細胞にほとんど取り込まれないことがわかる (図 4、5)。

【HA-IDA の MCF7 取り込み挙動】

CD44 陰性であることが知られている乳がん細胞株である MCF7 に HA、HA-IDA を投与しても、ほとんど取り込まれないことがわかった (HA-IDA のみ図 6 に示す)。またリソソーム位置と一致しない。

改めて、本研究のナノゲルが CD44 標的の可能性があると示唆された。

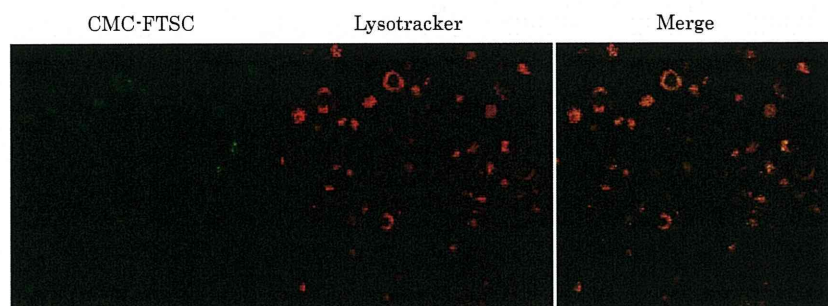


図 4 MKN45P に対する CMC-FTSC の添加

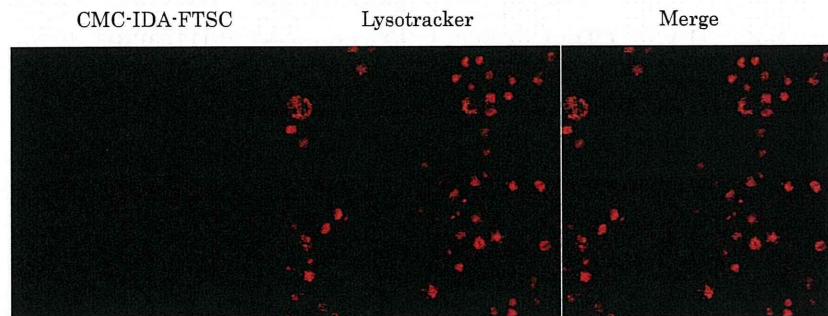


図 5 MKN45P に対する CMC-IDA-FTSC の添加

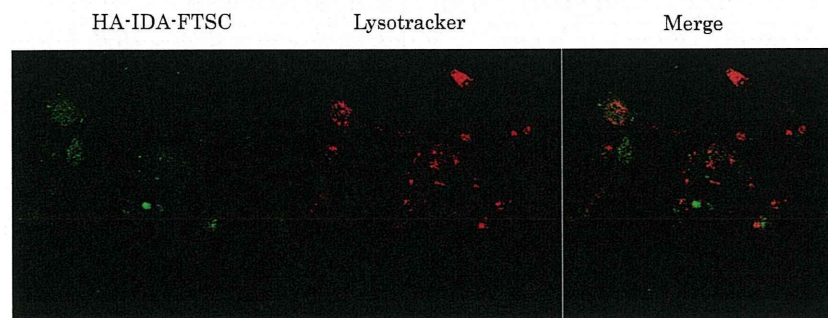


図 6 MCF7 に対する HA-IDA-FTSC の添加

D. 考察

FTSC（緑色蛍光を発する傾向プローブ）修飾を、HA、HA-IDA、CMC、CMC-IDAに施すことにより、CD44発現量が異なることが報告されている様々な細胞株を用いることによって、共焦点顕微鏡観察することによって、その細胞への取り込み挙動を明らかにした。過去に報告されている通り、HAはリソソームを介して細胞内に取り込まれることがわかる。本研究において重要な点は、イミノ二酢酸（IDA）修飾を行ってもHA（HA-IDA）はCD44標的性を失わないことが明らかになったために、本研究のHAナノゲルの播種細胞標的性が保証されることが明らかになったことである。

またCMCやCMC-IDAの細胞取り込み挙動との比較を行ったのも、世界で初めての結果である。HAのCD44標的性は過去から言及されていたが、他のポリマーとの比較を行ってこれを明確にしたのは本研究が初めてであると考えられる。

E. 結論

CMC-IDAに比べて、HA-IDAでは高い播種細胞（MKN45P）取り込み能が明らかになった。次年度はHA-IDAを用いたナノゲルのみでなく、CMC-IDAを用いたナノゲルを用いることによって、CDDPを担持したナノゲル化製剤の取り込み能の差を明らかにしていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hidenori Kuroki, Taichi Ito, Hidenori Ohashi, Takanori Tamaki, and Takeo Yamaguchi,

Analytical Chemistry 83(24)9226-9229 (2011)

2) Hyangmi Jung, Keitaro Fujii, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Taichi Ito, and Takeo Yamaguchi, Journal of Membrane Science 373(1-2)107-111(2011)

3) Takanori Tamaki, Akiko Yamauchi, Taichi Ito, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, 2011(3)395-403

2. 学会発表

国際学会

なし

国内学会

1) Copper-free click chemistry を用いた医用 *in situ* 架橋ゲルの創製 高橋彬・鈴木幸光・清水篤志・伊藤大知 第8回医工連携研究会 東京大学医学部教育研究棟13階 東京 2011年12月17日

2) *in situ* 架橋ゲルからのシスプラチン徐放挙動の解明と腹膜播種への応用 須原宜史・鈴木幸光・亀井隆雄・山口博紀・石神浩徳・北山丈二・伊藤大知 第8回医工連携研究会 東京大学医学部教育研

究棟 13 階 東京 2011 年 12 月 17 日

3) ラット肝切除術後癒着モデルを用いた癒着防止材料の有効性の比較研究 大道清彦・清水篤志・須原宜史・伊藤大知・長谷川潔・國土 典宏 第 8 回医工連携研究会 東京大学医学部教育研究棟 13 階 東京 2011 年 12 月 17 日

東京大学 第 7 回医工連携研究会

(2011/2/2)

医療応用を目指した新規 *in situ* 架橋ハイドロゲルの開発

鈴木幸光、高橋 彬、茂木祐大、清水篤志、長谷川潔、國土典宏、伊藤大知

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

本研究の新規クリック *in situ* 架橋ハイドロゲルを 5/31 に東大 TLO より下記特許出願。

伊藤大知、鈴木幸光、高橋彬、清水篤志

発明の名称：ハイドロゲル及び

その製造方法

特願 2011-122183

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

イミノ二酢酸修飾カルボキシメチルセルロース、及びナノゲル担体への 蛍光標識修飾体の合成に関する研究

研究分担者： 鈴木 幸光 （東京大学大学院工学系研究科・助教）

【研究要旨】

本研究提案では、CDDPを二座配位した担持したヒアルロン酸ナノゲルを創製し、正常細胞よりもがん細胞に発現量が多いCD44を標的として、ヒアルロン酸とCD44の相互作用を利用して、腹膜播種細胞特異的にCDDPを送達することを目指している。

初年度はヒアルロン酸ナノゲルの担体ポリマーとなるイミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸（HA-IDA）の合成に成功した。さらにこれにシスプラチン（CDDP）を担持して、直径が100nm程度のナノゲルを作製することに成功した。本年度はHAに対照物質となるカルボキシメチルセルロース（CMC）に着目し、これにイミノ二酢酸修飾を施したCMC-IDAを合成することに成功した。さらに共焦点顕微鏡での可視化を行うために、カルボジイミド反応を用いて緑色蛍光プローブであるFTSC（Fluorescein-5-thiosemicarbazide）を修飾したHA-FTSC、HA-IDA-FTSC、CMC-FTSC、CMC-IDA-FTSCの合成に成功した。

最終年度において、*in vivo*マウスモデルにおいて、ナノゲルを腹腔に投与した際に、確かに播種巣に薬物が送達すること確認、あるいは定量的に評価するために重要な化学ツールの作製に成功した。

A. 研究目的

昨年度はHAをベースにしたCDDP担持担体ポリマーであるイミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸(HA-IDA)の合成に成功した。このポリマーの胃癌播種細胞標的性をin vitro及びin vivoで解析するために、蛍光標識を行うことは重要である。

HAは6～8繰り返し単位がCD44レセプターと結合することが報告されているが、これに極めて物理化学的性質が似ているカルボキシメチルセルロース(CMC)は、ヒトが持つあらゆるレセプターと相互作用しないことが知られている。このためHA-IDAの対照物質としてCMC-IDAを新たに合成することは、非常に有用と考えられた。

このために、昨年度確立したHA-IDAの合成法を基盤に新たにイミノ二酢酸修飾CMC(CMC-IDA)の合成、及びHA-IDA、CMC-IDAに対する蛍光プローブFTSC(Fluorescein-5-thiosemicarbazide)のカルボジイミド反応による標識を行った。同様の標識を未修飾のHAとCMCにも行った。

(倫理面への配慮)
特段の必要はない

B. 研究方法

●CMC-IDAの合成

HA-IDAのコントロールとなるナノゲル担体としてCMC-IDAを新たに合成した。合成スキームを次頁図1に、詳細を下記に示す。

[試薬]

ヒアルロン酸(CMC) …分子量100,000

イミノ二酢酸(IDA)

カルボジイミド塩酸塩(EDCI)

ジメチルスルホキシド(DMSO)

NaOH

NaCl

[CMC-IDA合成手順]

(1) CMC 0.5 g を 100 mL の純水に冷蔵下で2時間溶解

(2) 1M HCl で pH を 6.8 に調整

(2) EDCI 0.78 g を、DMSO 3 mL と純水 3 mL を混合させたものに溶解させ、添加。これを4時間攪拌

(3) IDA 1.2 g と 1M NaOH 10 mL をそれぞれ添加し、一晩攪拌

(4) Spectra/Por MWCO=6000～8000の透析膜を用いて、純水で透析フルオロレsein修飾を施したHA、HA-IDA、CMC、CMC-IDAを投与して、in vitroでの細胞のポリマー取り込みの様子を共焦点顕微鏡観察で観察した。以下実験手順の詳細を示す。

- (5)凍結乾燥
- (6)得られた固体を 5 wt%の NaCl 水溶液に溶解させ、Spectra/Por MWCO=6000~8000 の透析膜を用いて純水で透析
- (7)凍結乾燥
- (8)重水中、NMR にて合成確認

●HA-IDA-FTSC 合成

HA-IDA の FTSC 修飾を下記のスキームに従って行った。

- (1) 50 mL ナスフラスコに純水 15 mL と HA-IDA (または HA,CMC,CMC-IDA) 0.20 g を加えて溶解

- (2) EtOH 5.0 mL を HA が凝集しないように微量ずつ滴下
- (3) 2-chloro-1-methylpyridinium iodide 66 mg を添加
- (4) Triethylamine 70 μ L 滴下
- (5) マイクロチューブに FTSC 4.0 mg を DMSO 0.8 ml にとかしたものを用意。ナスフラスコに滴下
- (6) 110 $^{\circ}$ C の油浴で 24 時間還流
- (7) 溶液をろ過後、NaCl 0.10 g 添加
- (8) Spectra/Por MWCO=6000 ~ 8000 の透析膜を用いて、NaCl 水溶液で 3 日間透析。後に純水で 4 日間透析
- (9) 凍結乾燥

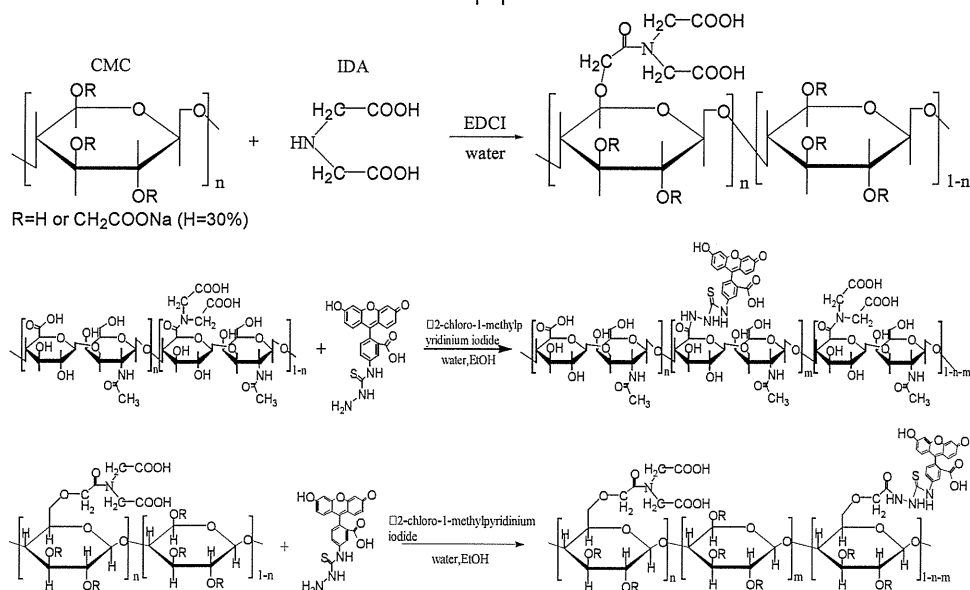


図1 CMC-IDA、HA-IDA-FTSC、CMC-IDA-FTSC の合成

(*)HA-IDA の合成は昨年度と同様のスキームで行った

●FTSC 修飾率の算出

作製した蛍光標識ポリマーの修飾率を算出した。

[検量線の作製]

- (1) FTSC 1.7 mg を PBS 300mg に溶解
- (2) (1)の溶液を 5 分の 1 に希釈。この操作を 8 回繰り返して、計 9 種の濃度の FTSC 溶液を作製
- (3) 蛍光測定用 96 穴マイクロプレートの列ごとに (2) で作製した FTSC 溶液を 50 μ L ずつ添加。コントロールとして PBS を添加した列を 1 列置く。計 10 列に添加。
- (4) プレートリーダーにて励起波長 485 nm, 測定波長 535 nm で蛍

光を測定

- (5) 蛍光強度をもとに検量線を作製

[蛍光標識ポリマー溶液の蛍光強度の測定と修飾率の算出]

- (6) HA-FTSC, HA-IDA-FTSC, CMC-FTSC, CMC-IDA-FTSC, CMD-FTSC, CMD-IDA-FTSC 5.0 mg を PBS 1 mL に溶解
- (7) (6) で作製した溶液を 10 分の 1 に希釈
- (8) 先ほどと同様に蛍光強度を測定
- (9) 作製した検量線により蛍光標識ポリマー溶液中の FTSC 濃度を求め、それをもとに FTSC 修飾率を算出

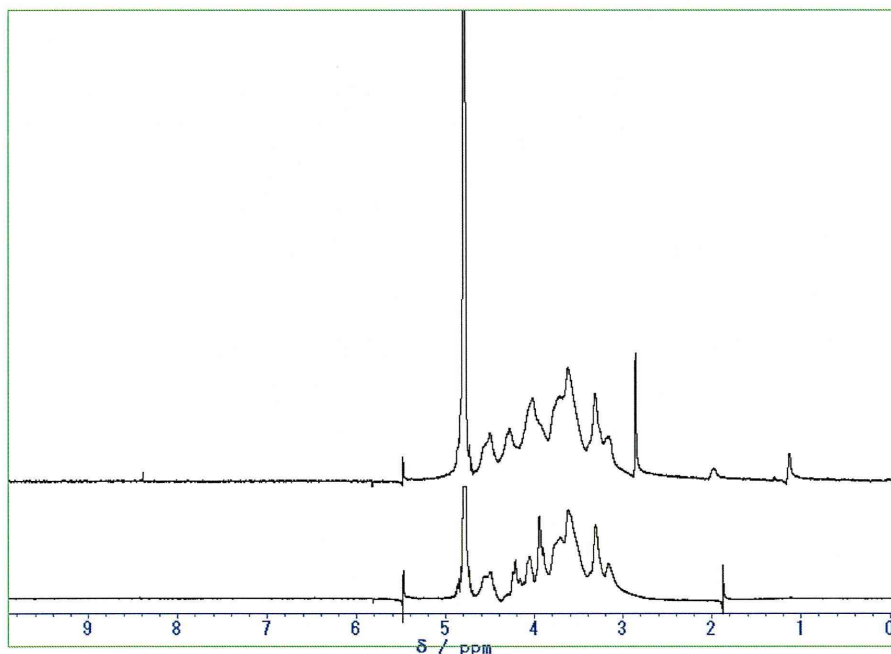


図2 CMC-IDA ^1H NMR 上図: CMC-IDA、下図: CMC

C. 研究結果

【CMC-IDA の合成結果】

図 2 に NMR 測定結果を示す。2.85 ppm のピークは IDA のメチレン基のプロトン由来である。3.0 ppm~4.7 ppm のピークがその他のプロトン由来であると考えられる。CMC の 1 ユニットのプロトン数は 12.1 個。イミノ二酢酸は 4 個。ピーク面積比は 1: 0.354 であり、し

たがって IDA 修飾率は 10.4% となった。HA-IDA とほぼ同等の IDA 修飾率の CMC-IDA が得られ、HA ナノゲルの対照実験となる物質の合成に成功した。

【FTSC 修飾率の測定結果】

下記検量線に基づいて、未修飾 HA、CMC, HA-IDA、CMC-IDA の FTSC 修飾を行い、表 1 に示す修飾率を得た。

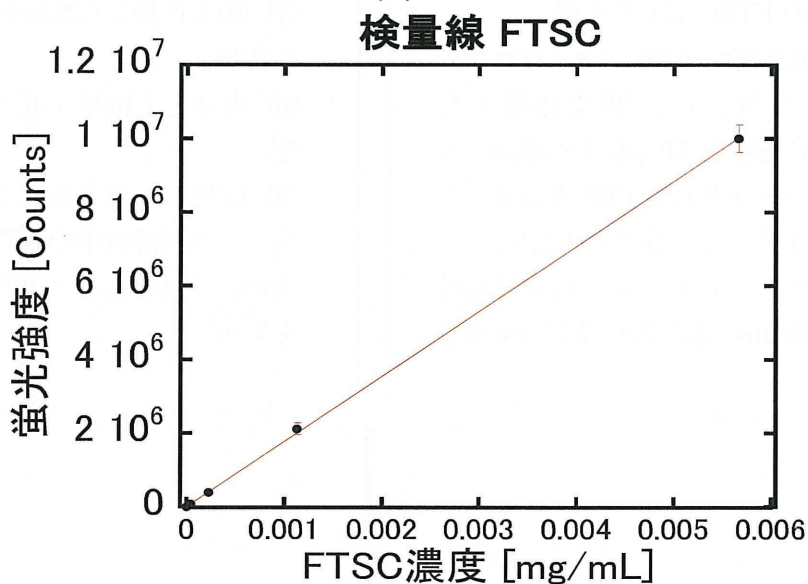


図 3 FTSC 検量線

(HA-IDA への修飾率をこの検量線に基づき決定)

	修飾率 [mol/mol%]
HA-FTSC	0.00123
HA-IDA-FTSC	0.00338
CMC-FTSC	0.00164
CMC-IDA-FTSC	0.00332
CMD-FTSC	0.0223
CMD-IDA-FTSC	0.140

表 1 各蛍光標識ポリマーの修飾率

D. 考察

二座配位子を持つヒアルロン酸 HA-IDA の対照物質となる、CMC-IDA の合成に成功した。初期合成条件では修飾率が上がらなかったが、合成条件を最適化することによって、高い修飾率を実現することに成功した。

さらに FTSC をコンジュゲーションすることによって、蛍光標識を行い、蛍光顕微鏡で可視化する準備を行った。

E. 結論

疾患生命工学センターグループにて、二座配位子を持つヒアルロン酸 HA-IDA に加え、CMC-IDA の合成に初めて成功した。さらに未修飾 HA、HA-IDA、CMC、CMC-IDA の蛍光ラベリングに成功した。

次年度は、これらポリマーを基に CDDP と反応させてナノゲルを作製し、HA ナノゲルと CMC ナノゲルでの、播種抑制効果の検討を行っていく基礎材料としていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

国際学会

なし

国内学会

1) Copper-free click chemistry を用いた医用 in situ 架橋ゲルの創製
高橋彬・鈴木幸光・清水篤志・伊藤大知 第 8 回医工連携研究会
東京大学医学部教育研究棟 13 階
東京 2011 年 12 月 17 日

2) in situ 架橋ゲルからのシスプラチン徐放挙動の解明と腹膜播種への応用
須原宜史・鈴木幸光・亀井隆雄・山口博紀・石神浩徳・北山丈二・伊藤大知 第 8 回医工連携研究会
東京大学医学部教育研究棟 13 階
東京 2011 年 12 月 17 日

3) ラット肝切除術後癒着モデルを用いた癒着防止材料の有効性の比較研究
大道清彦・清水篤志・須原宜史・伊藤大知・長谷川潔・國土典宏 第 8 回医工連携研究会
東京大学医学部教育研究棟 13 階 東京
2011 年 12 月 17 日

東京大学 第 7 回医工連携研究会

(2011/2/2)

医療応用を目指した新規 in situ 架橋ハイドロゲルの開発

鈴木幸光、高橋 彬、茂木祐大、清水篤志、長谷川潔、國土典宏、伊藤大知

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

本研究の新規クリック *in situ* 架橋
ハイドロゲルを 5/31 に東大 TLO よ
り下記特許出願。

伊藤大知、鈴木幸光、高橋彬、
清水篤志

発明の名称：ハイドロゲル及び
その製造方法

特願 2011-122183

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

腹膜播種モデルへのシスプラチン担持ヒアルロン酸ナノゲル 投与に関する研究

研究分担者： 北山 丈二 （東京大学医学部附属病院・准教授）

【研究要旨】

本研究提案では、CDDPを二座配位した担持したヒアルロン酸ナノゲルを創製し、正常細胞よりもがん細胞に発現量が多いCD44を標的として、ヒアルロン酸とCD44の相互作用を利用して、腹膜播種細胞特異的にCDDPを送達することを目指している。初年度はヒアルロン酸ナノゲルの担体ポリマーとなるイミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸(HA-IDA)の合成に成功した。さらにこれにシスプラチン(CDDP)を担持して、直径が100nm程度のナノゲルを作製することに成功した。

3ヵ年計画2年目にあたる本年度は、イミノ二酢酸を導入したヒアルロン酸の合成(HA-IDA)を用いて、CDDPと共に加熱することによって合成したHAナノゲルをマウス腹膜播種モデルに投与し、その播種抑制効果を検証した。その播種抑制効果は、腹腔内停留時間がCDDPとほぼ同等のために同濃度のCDDPと同程度であったが、条件によってはCDDPを担持しないHA-IDAも播種抑制効果を示し、新たな抗がん剤のパイプラインの可能性も示唆された。

最終年度において、*in vivo*マウスモデルにおいて、担体ゲルにナノゲルを封入して腹腔に投与し、本研究の目的を*in vivo*で実証することを目指す。その基盤は整った。

A. 研究目的

腹腔内投与の利点は高い濃度の薬剤を投与でき、かつ全身への薬剤以降が低いために副作用がおきにくいことである。研究分担者らのグループはマウスにおいて腹膜播腫モデルをつくり、疎水性の抗癌剤であるパクリタキセルの腹腔内投与が有効であることを見出し、2009年11月に高度医療の認定を受けている。さらにマウス腹膜播種モデルにおいて、ヒアルロン酸+パクリタキセル(PTX)の投与は、PTX単剤に比べて、有意に播腫巣の成長を抑えることを見出している。

一方でCDDPはPTXに比べて腹腔からのクリアランスが早く、治療効果を上げるためには、製剤技術の改善によって、CDDPを長時間腹腔内に停留させる必要がある。

今年度は、初年度に作製に成功したHAナノゲルを実際にマウス腹膜播種モデルに投与することによって、その効果を検証する。

(倫理面への配慮)

特段の必要はない

B. 研究方法

[動物への投与]

以下全ての実験は、P2レベル施設で行った。

1) あらかじめ5週齢のBALB/

CヌードマウスにMKN45Pを 3×10^6 個/1mlPBS腹腔内投与し、播腫を形成する。(Day 1)

2) 1週おきにBALB/Cnuideマウスの腹腔中に各サンプル溶液を1mLずつ注入する。分子量10万のHAをIDAで10%修飾したポリマーから作製したナノゲルを用いた。

その際、飼育用のゲージを新しくかえ、エサと水を補充する。

～解剖～

3) 28日目にマウスを安楽死後、開腹し腹膜播腫の量を調べる。播種個数のカウントと総播種重量により評価を行った。

(次頁 図1)

(倫理面への配慮)

なお本研究は動物実験は東京大学医学部倫理委員会により承認を受け、実施した。

C. 研究結果

CDDP 換算で同濃度の、PBS に溶解した CDDP 水溶液と、HA ナノゲル水溶液を投与した結果を図 1 に示す。

Free の CDDP でも HA ナノゲル化

製剤でも、播種抑制効果はほぼ同等の効果となった。腹腔停留時間の延長はナノゲル化製剤では、腹腔からのクリアランスが速く、実現できないために、播種抑制効果は Free の CDDP と同等になったものと考えられる。

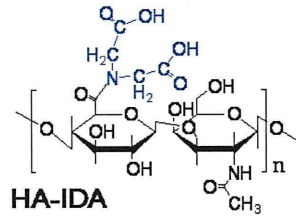


BALB/c ノードマウス

0日目
MKN45Pを腹腔内投与

7日目,14日目,21日目
各薬剤を腹腔内投与

28日目
解剖、播種重量測定



以下のPBS溶液1 mLずつ投与
各群6匹

A群: PBSのみ

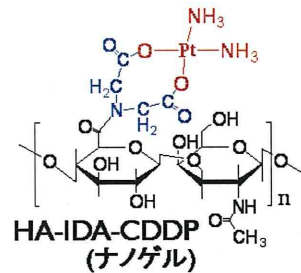
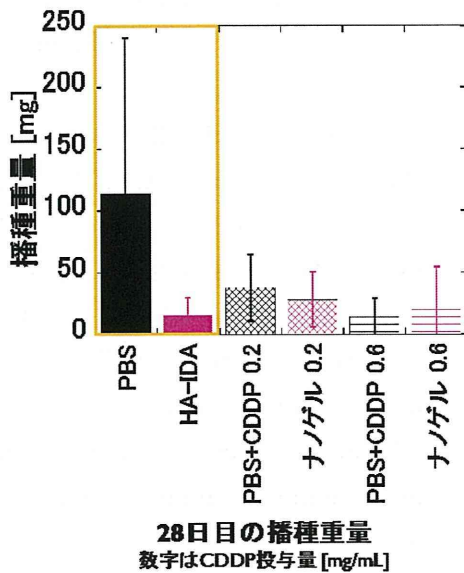
B群: HA-IDA 0.33 mg/mL

C群: CDDP 20 µg/mL

D群: HA-IDAナノゲル 0.33 mg/mL

E群: CDDP 60 µg/mL

F群: HA-IDAナノゲル 1.0 mg/mL



PBS群に比べ
HA-IDA群の腫瘍が抑制

HA-IDAが
抗腫瘍効果を持つ可能性

図 1 ナノゲルの腹膜播種モデルへの投与スキームと結果

D. 考察

腹腔滞留時間の観点から、ナノゲル単独で CDDP より優れた播種抑制効果を示さなかった。

予期せぬことに、CDDP なしの HA-IDA でも、CDDP や HA ナノゲルと同等の効果を示した。作用機序や再現性はこれからの検証が必要であるが、新たな抗がん剤開発につながるテーマとなる可能性が示唆された。

E. 結論

腫瘍外科チームで、本研究の HA ナノゲル製剤の、マウス腹膜播種モデルへの投与を行い、CDDP と同等の効果を得た。最終年度のハイブリッドゲル化によって、目標の播種抑制効果を得られる基盤が整った。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishigami H, Kitayama J, Kaisaki S, Yamaguchi H, Yamashita H, Emoto S, Nagawa H. Phase I study of biweekly intravenous paclitaxel plus intraperitoneal cisplatin and paclitaxel for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Oncology*.

(in press), 2. Kamei T, Kitayama J, Yamaguchi H, Soma D, Emoto S, Konno T, Ishihara K, Ishigami H, Kaisaki S, Nagawa H. Spatial distribution of intraperitoneally administrated paclitaxel nanoparticles solubilized with poly (2-methacryloxyethyl phosphorylcholine-co n-butyl methacrylate) in peritoneal metastatic nodules. *Cancer Sci*. 2010 doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01747.x

3. Kitayama J, Ishigami H, Kaisaki S, Hidemura A, Kato M, Otani K, Kamei T, Soma D, Miyato H, Yamashita H, Nagawa H. Weekly intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for malignant ascites due to advanced gastric cancer. *Oncology*. 2010;78(1):40-6.
4. Ishigami H, Kitayama J, Kaisaki S, Hidemura A, Kato M, Otani K, Kamei T, Soma D, Miyato H, Yamashita H, Nagawa H. Phase II study of weekly intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for advanced gastric cancer with peritoneal metastasis. *Ann Oncol*. 2010;21(1): 67-70.
5. Soma D, Kitayama J, Konno T, Ishihara K, Yamada J, Kamei