

20118059A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略 研究事業

蛍光内視鏡をめざした高分子型分子プローブの創製に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 前田 浩

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
蛍光内視鏡をめざした高分子型分子プローブの創製に関する研究	-----	01
前田 浩		
II. 分担研究報告		
1. 水溶性高分子亜鉛プロトポルフィリンミセルの in vivo 抗腫瘍活性の評価	----	08
方 軍		
2. 蛍光顕微鏡に使用する蛍光ナノプローブHPMA-ZnPPに関する研究	-----	14
中村 秀明		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	28

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略 研究事業）
総括研究報告書

蛍光内視鏡をめざした高分子型分子プローブの創製に関する研究

研究代表者 前田 浩 | 崇城大学DDS研究所 特任教授

研究要旨

[背景]

癌の治療的研究で最も進歩が著しいのが診断である。例えばPET、超音波ならびに生化学的マーカーである。さらに早期発見による早期治療に関して言えば、胃癌、大腸癌、子宮癌、肺癌（気管支癌）などは外科手術でも可成りの成功率になっているが、胃癌I期の治療成績は99.1%、Ⅲ期では45.9%が5年生存し、Ⅳ期では7.2%である。これは早期癌の発見がいかに重要であるかを示している。

[目的・必要性]

本研究では、在来の肉眼による検出限界を蛍光内視鏡にすることで理論的には10～100倍高めることが可能になる。さらにその光っている個所に対して選択的に一重項酸素を生じさせることが出来れば超早期検出と治療が同時に可能になり癌治療がより容易になる。さらにこの方法は外来で可能となり、奏効率も高いことから医療経済の面においても医療費も低減化できるなど、社会的意義は大きい。

[問題点]

これまで蛍光内視鏡の開発が未開であったのは、主に腫瘍選択的に集積する蛍光 [FL] /光増感 [PS] 分子プローブがなかったこと、さらに630 nmのHeNeレーザー光しか皮下に到達しないと思われていたことの2つの理由による。この2つの問題に対して、内視鏡のキセノン (Xe) 光源は手の平に照射すると厚さ2-3 cmを透過し手の甲まで到達する。また、腫瘍選択的にプローブ分子を集積させる方法はその高分子化によって可能となる。即ち、これら分子プローブを含有する高分子のミセルや高分子結合物にすることで、いわゆるEPR効果という当申請者の発見した原理を応用することが可能になり、腫瘍集積化も可能になる。

[特色と独創的な点]

- (1) 高分子型FL/PS分子プローブがあれば、Xe光源（400—700 nmの連続波長光源）と半値巾の短い高機能フィルターの活用（任意の分子プローブの利用が可能になる）による内視鏡開発が現実的になる。
- (2) ファイバーオプティックスとUVと赤外カットの内視鏡システムでは、UVや熱による火傷などの非特異的障害を抑える。
- (3) EPR効果を利用した腫瘍選択性を有する高分子FL/PSミセルの創製が可能になりつつある。
- (4) 在来型の内視鏡で光照射療法が可能になると、約5千万円もするレーザー光源装置が不要になる。また、本蛍光内視鏡と光照射療法は外来で可能となる。
- (5) 励起プローブ分子の吸収帯波長域の帯内にfitするXe光源を用いることにより、より強いエネルギーをインプットできるのでより強い蛍光ならびに一重項酸素を発生する。そのためにSMA-RB、SMA-MB、HPMA-ZnPPを作成し、抗腫瘍効果を検討する

A. 研究目的

(1) 研究の目的、必要性及び特色・独創的な点

癌の「診断」と「治療」は何れも化学物質を用いる点においては共通であり、両者とも薬剤の癌局所への集積に基づいている。本課題は両者の同時達成を目指す。即ち高分子型蛍光[FL]分子プローブおよび光増感剤[PS]を癌局所に選択的にデリバリーすることを目的とするが、それは本申請者が発見した EPR 効果 (enhanced permeability and retention effect) の原理に基づいている。EPR 効果は 2010 年までに約 8 千件も引用され、DDS の国際的な 1 つのエポックを作っている。一方、内視鏡光源は連続波長で十分な光量があるので、各々の蛍光分子プローブの分光特性に適合する光学フィルターシステムの組み合わせにより表層癌が肉眼の 10~100 倍の高感度で検出可能となることを我々は予備的に認めている。癌部に選択的にこれら分子プローブ (PS を含む) を集積できることを PS に応用した例はない。この研究の目的は EPR 効果に基づく腫瘍デリバリーにより PS の腫瘍選択的な集積を可能にする。EPR 効果は肝転移娘結節で調べると ϕ 0.3mm の微小癌に対しても超高感度の検出が可能になる [*Cancer Sci.* (2010) 101, 1866-1874]。即ち、安全な PDT を可能にする。

従来の PDT に使用する PS (例: フォトフォリン) は全身くまなく分布し、日常的な光さえも皮膚などに傷害を起こすため、あまり普及しなかったが、本課題が成功すれば、癌の PDT は飛躍的に向上するといえる。このような画期的な診断と治療をめざした腫瘍学と EPR 依存的 DDS の知識を併せ持つのは前田研究室のみである。事実、前田らの開発した亜鉛プロトポルフィリンミセルは蛍光と同時に一重項酸素を生じ、治療効果があることをマウス腫瘍において予備的に確認している。

(2) 現在までに行った研究等

前田は EPR 効果の発見 (*Cancer Res.*, 1986) 以来、EPR 効果のメカニズムとそれを利用したミセル化剤の研究を中心に展開してきた (*Cancer Sci.*, 2009, 2010; *Bioconj. Chem.* 2010, 2007, 2005; *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010 他)。しかしながら、EPR 効果に基づく癌の「検出 (蛍光プローブ)」と同時に PS のターゲティングによる PDT を内視鏡下に

(3) 当該研究の特色・独創的な点の明らかになっている点、残されている点。

この研究の癌の高感度検出と治療の両要因は EPR 効果 (前田の発明) による高分子プローブ薬の腫瘍選択的なデリバリー技術に基づいていることが明らかになっている。これまで、在来のフォトフォリン類以外、実用化の試みはなかったが、Zn プロトポルフィリン、その他多くの類縁化合物にも可能性が残されている。事実、我々は平成 23 年度に HPMa コポリマー、SMA コポリマー結合 PS が腫瘍選択的に集積し、高感度に検出可能なことをマウスモデルで証明した。

B. 研究方法

平成 23 年度

・癌選択的蛍光/光増感 (FL/PS) 高分子型分子プローブの合成

我々は高分子プローブ (FL/PS) としてスチレンコマレイン酸テロマー (SMA) ミセルにインドシアニングリーンやメチレンブルーを含むさせる方法を確立した (K. Greish, H. Maeda et al, *Bioconj. Chem.* 2005; *J. Cont. Release*, 2006, 他)。

・高分子型分子プローブの一重項酸素 [1O_2] 生成能

上記 (1) で作製した高分子型分子プローブを含む水溶液に対し、Xe 光源を用いて光照射を行った。

1O_2 の生成はラジカル捕捉剤を利用した ESR 装置により検出を行った。

・担癌マウスおよびラットを用いた in vivo イメージング

高分子型分子プローブを担癌モデル動物に尾静脈より投与し、経時的に腫瘍部への集積を蛍光イメージング装置を用いて確認した。とくに IVIS 社の蛍光イメージングにより脱毛後の担癌マウスで生きたまま著名な腫瘍像を確認できた。

平成 24 年度

(1) 平成 23 年度の実験の継続

(2) PS 光照射による細胞毒性作用の研究

各種培養癌細胞 (食道癌、大腸癌、子宮癌) などに対し、高分子型プローブを処理後、Xe ランプの光照射 (10-30min) を行い、MTT アッセイにより細胞の生残率を測定。 1O_2 の生成と細胞毒性オキシストレスプローブの DCFH-DA 等を利用し、フローサイトメトリーで解析。プローブの細胞内取り込みは共焦点レーザー顕微鏡並びに細胞内抽出物の蛍光

(3) 担癌マウスに対する PS 光照射療法

担癌マウスに対し、H23 年に作製した高分子型プローブを尾静脈より投与し、プローブが腫瘍部に十分に集積したところで Xe ランプを用い PDT を行う。

(4) 担癌マウスに対する PS 光照射療法

蛍光内視鏡の光源系の確立において、平成23年度の成果に基づく分光学的特性を組み込んだプロトタイプを作成する。

(5) 民間企業との連携・協力

SMA ミセルよりなる高分子型の蛍光分子プローブを用いた in vivo イメージングは、はっきりと検出できる。つまり、内視鏡においても同様の光学システムの構築ができない理由はない。東京の新興光器製作所（代表取締役：福与恒雄）との連携を継続し、腹腔鏡を目指した検討を引き続き行う。

平成 25 年度

(1) 平成 24 年度の実験、民間企業との連携・協力の継続

(2) マウス癌の他に、DMBA やアゾキシメタンによるラットの発ガンモデルの乳癌および大腸癌モデルを作製する。予算措置が十分であれば、ヒト食道癌の SCID マウスモデルを用いる。

(3) 蛍光内視鏡による微小癌結節の検出

内視鏡メーカーと協力し、蛍光内視鏡の試作タイプを作製する。アゾキシメタン誘発大腸癌モデルラットに対し高分子型分子プローブを投与し、蛍光内視鏡により腫瘍の微小癌結節が検出可能か否かを検討する。検出された腫瘍結節に対しては、組織切片を病理学的に検定する。

<本研究の他にない特長>

上記ミセル内のPS/FL分子プローブは溶液中、組織間、血液内にあってはミセル内にコンパクトに重層しており、 π - π 相互作用によって光照射を行っても蛍光を生ずることはなく、 1O_2 もほとんど生じない。しかし、ひとたびendocytosisでミセルが癌細胞内へ取り込まれ、フォスファチジルコリン（界面活性剤）など膜成分の影響で崩壊し、freeのFL/PSを放出すると蛍光と 1O_2 を生ずるという画期的な性質をもつ。一方、血流中では、無毒・無蛍光である。これは高い腫瘍集積能に加え、在来の他の分子プローブとは異なるSMAミセルの最大の特長である。つまりS/N比が極めて高い分子プローブである。この画期的な方法を発展すべく、研究を行う。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施にあたっては、崇城大学が定めた動物取り扱いプロトコール/ガイドラインおよび日本学術会議が定めた動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに遵守し、行った。

C. 研究結果

本プロジェクトのH23年度末までの成果は図1～図5のように高分子ミセル化した蛍光プローブ（ローダミン、ZnPP、ICGなど）、さらにアルブミンやトランスフェリンなどの血清タンパクの蛍光標識プローブは、はっきりと腫瘍部に集積し、蛍光により腫瘍を感知、描出することがわかった。HPMA（ヒドロキシプロピルメタアクリレート）高分子を結合したZnPPを静注後420nmで励起、550nmの蛍光波長でマウスのS-180腫瘍をIVIS装置でみると、腫瘍によく集積し、腫瘍部の蛍光画像をきれいに描出した（図1）。とくにローダミン標識トランスフェリンやICG（インドシアニンググリーン）のSMAミセル静注後、2時間で脱毛なしのマウス腫瘍でも著明な蛍光として検出できた（図2 A, B）。この腫瘍部の蛍光強度は正常部の約15倍であった。

図1に示すヒドロキシメタアクリルアミド（HPMA）ポリマーあるいはSMAコポリマー結合のZnPPとともに、光照射により著明な一重項酸素を生成し（図3）、抗腫瘍効果を示すことを確認した（図4、図5）。

さらに、SMAを用いたミセルとして、ローダミン、ローズベンガルおよびメチレンブルー含有SMAミセルの培養食道癌細胞（Kys150）への取り込みは正常上皮細胞に比べ約5倍ほど効率がよく、また、これらの血中半減期も10時間と十分に長くなり、さらに腫瘍濃度はfreeのPSよりも8～10倍程高いことがわかった。

今後、本実験に用いる大腸癌モデルをIRCマウスについて、デキストラン硫酸とアゾキシメタンの経口投与で発癌した大腸癌モデルの作成に成功しており、大腸癌の早期検出と予防、さらに治療をめざした研究が進展している（J. Fang, H. Nakamura, H. Qin, H. Maedaら投稿中）

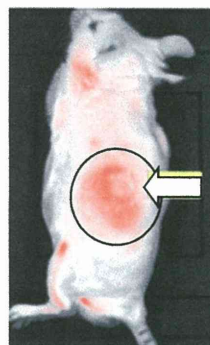


図1 HMPA-ZnPP i.v.投与マウスの腫瘍イメージング



A. Rhodamine-transferrin



B. SMA-ICG micelle

図2 高分子プローブ(Rhodamine-transferrinとSMA-ICG)による癌の高感度検出。矢印が腫瘍部。Bは投与2時間後の脱毛なしの像。その腫瘍部の蛍光は背景の約15倍の強さ。

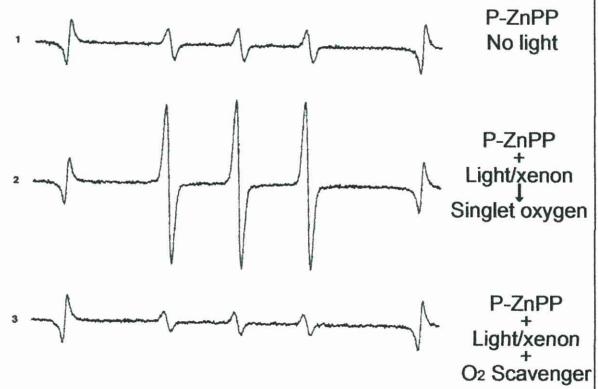


図3 内視鏡光源による光照射療法(PEG-ZnPPなど)における一重項酸素のESRシグナルの検出

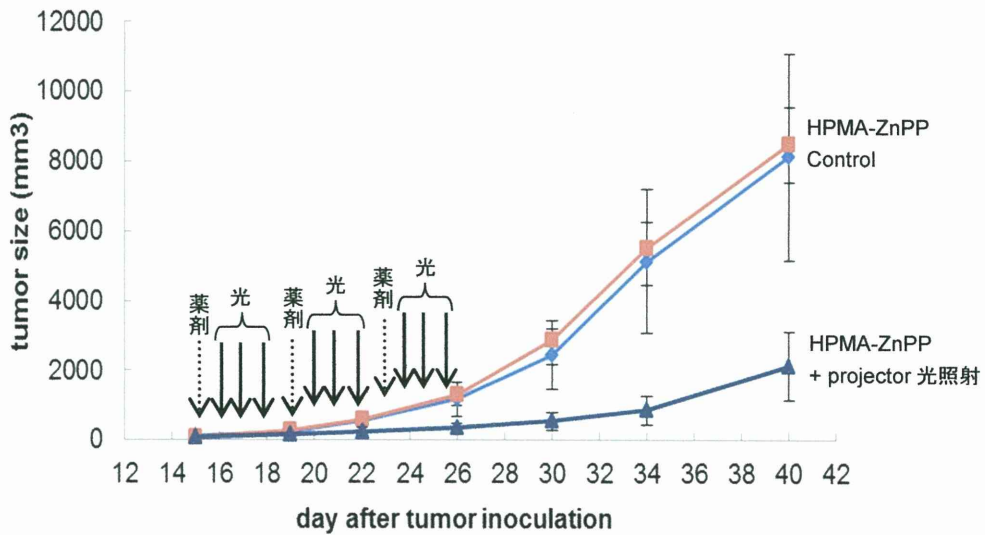
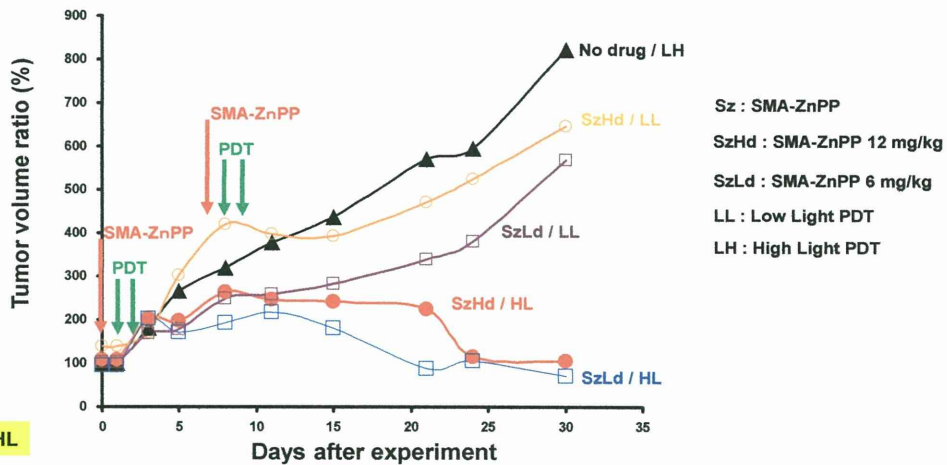


図4 HPMA-ZnPP 静注後の光照射によるマウス S-180 腫瘍の治療効果



SzLd / HL

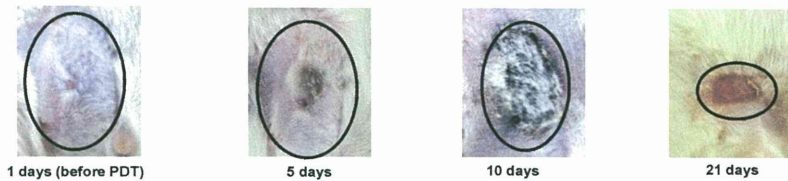


図5 SMA-ZnPP の PDT による DMBA 誘発乳癌の治療

D. 考察

IVIS 蛍光イメージング装置により、非常にクリアに蛍光高分子プローブ投与後 2 時間から数時間で腫瘍が検出できた。しかも、光照射で腫瘍の著明な退縮をみとめている。今後、さらにメーカーと協力してより実用化を見据えた展開が期待できる。

E. 結論

(1) 高分子プローブとして下記のもの作製に成功した。

(i) HPMA-ZnPP、(ii) SMA-ICG ミセル、(iii) テトラエチルローダミン標識ヒトアルブミン、(iv) 同ローダミン標識トランスフェリン、(v) SMA-ローズベンガル、(vi) SMA-メチレンブルー

(2) 上記の(i)-(vi)を用いて、IVIS 社のイメージング装置により生きた担癌マウスの腫瘍を確実に検出できた。

(3) ①は光照射 (キセノン光源) で腫瘍の蛍光検出とともに、一重項酸素を発生し、著名な抗腫瘍効果を認めた (マウス S-180 腫瘍)。

(4) 蛍光内視鏡によるラットモデルの実施への第一歩の目途が得られた。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① H. Maeda, Y. Matsumura, History and impact of EPR effect for the nanomedicine drug developments in cancer chemotherapy, *Adv. Drug Delivery Reviews* **63**, 129-130 (2011).
- ② J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda, EPR effect: the unique characteristics of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, its limitation and augmentation, *Adv. Drug Delivery Reviews* **63**, 136-151 (2011).
- ③ H. Nakamura, J. Fang, B. Gahininath, K. Tsukigawa, H. Maeda, Intracellular uptake and behavior of two types zinc protoporphyrin (ZnPP) micelles, SMA-ZnPP and PEG-ZnPP as anticancer agents; Unique intracellular disintegration of SMA micelles, *J. Control. Release*, **155**, 367-375 (2011).
- ④ G. Y. Bharate, J. Fang, H. Nakamura, H. Qin, S. Shinkai, and H. Maeda, 4-Amino-6-hydroxypyrazolo [3,4-d] pyrimidine (AHPP) conjugated PEG micelles: Water soluble polymeric xanthine oxidase inhibitor. *J. Drug Targeting* **19**, 954-966 (2011).
- ⑤ N. Larson, K. Greish, H. Bauer, H. Maeda, H. Ghandehari. Synthesis and evaluation of poly(styrene-co-maleic acid) micellar nanocarriers for the delivery of tanespimycin. *Int'l. J. Pharmaceutics*. **420**, 111-117.
- ⑥ J. Fang, H. Qin, T. Seki, H. Nakamura, K. Tsukigawa, H. Maeda: Therapeutic potential of pegylated hemin for ROS-related diseases via induction of heme oxygenase-1: results from a rat hepatic ischemia/reperfusion injury model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **339**, 779-789 (2011)
- ⑦ H. Maeda, Recollections of 45 years in research: From protein chemistry to polymeric drugs to the EPR effect in cancer therapy, Nova Science Publishers, N.Y., USA, PP 1-78 (2011)
- ⑧ H. Maeda: Enhanced permeability and retention effect in relation to tumor targeting. *In Drug Delivery in Oncology. From Basic Research to Cancer Therapy* (Eds. F. Kratz, P. Senter, H. Steinhagen) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG, Weinheim, Germany, Vol.1, pp 65-84 (2011)
- ⑨ K. Hochdörffer, G. DiStefano, L. Fiume, H. Maeda, F. Kratz: Liver tumor targeting *In Drug Delivery in Oncology. From Basic Research to Cancer Therapy* (Eds. F. Kratz, P. Senter, H. Steinhagen) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG, Weinheim, Germany, Vol. 3, pp 1519-1568 (2011)
- ⑩ H. Nakamura, J. Fang, H. Maeda. Protective role of D-amino acid oxidase against bacterial infection. *Infection and Immunity*. **80**, 1546-1553 (2012)

- ①H. Herrmann, M. Kneidinger, S. Cerny-Reiterer, T. Rülcke, M. Willmann, K.V. Gleixner, K. Blatt, G. Hörmann, B. Peter, P. Samorapoompichit, W. Pickl, G. Y. Bharate, M. Mayerhofer, W. R. Sperr, H. Maeda, P. Valent: The Hsp32 inhibitors SMA-ZnPP and PEG-ZnPP exert major growth-inhibitory effects on CD34⁺/CD38⁺ and CD34⁺/CD38⁻ AML progenitor cells. **Current Cancer Drug Targets**. 12(1), 51-63 (2012)
- ②H. Maeda: Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. **Proc. Jpn. Academy, Series B**. 88, 53-71 (2012)
- ③G. Bharate, H. Nakamura, J. Fang, S. Shinkai, H. Maeda. Styrene-co-maleic acid (SMA) telomeric micelles encapsulated-zinc protoporphyrin (SMA-ZnPP) and other drugs: Stability study. **CRS Newsletter**, 29,6-7 (2012)
- ④J. Fang, H. Qin, H. Nakamura, K. Tsukigawa, H. Maeda, Carbon monoxide, generated by heme oxygenase-1, mediates the enhanced permeability and retention (EPR) effect of solid tumor, **Cancer Science** 102, 535-541 (2012)
- ⑤H. Nakamura, J. Fang, T. Mizukami, H. Nunoi, H. Maeda, Pegylated D-amino acid oxidase restores bactericidal activity of neutrophils in chronic granulomatous disease via hypochlorite, **Exp. Biol. Med.** (in press)
- ⑥H. Maeda, Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond, **J. Control. Release** (in press).
- ⑦J. Fang, K. Greish, H. Qin, H. Nakamura, M. Takeya, H. Maeda, HSP32 (HO-1) inhibitor, zinc protoporphyrin IX, a water soluble micelle of copoly(styrene maleic acid) as anticancer agent: in vitro and in vivo anticancer effect, **Eur. J. Cancer**, published online (2012)
- or for oxystress diseases <Review>, Hiroshi Maeda, Hideaki Nakamura, Gahininath Y. Bharate, Kenji Tsukigawa, Haibo Qin, Jun Fang, International Conference on Biomaterials Science, 2011.3 (茨城)
- ② Evaluation of (styrene-co-maleic acid) telomer micelles encapsulated-zinc protoporphyrin (SMA-ZnPP): A stability study for three different types of SMA micelles, Gahininath Y. Bharate, Hideaki Nakamura, Jun Fang, Bert Klumperma³, Seiji Shinkai and Hiroshi Maeda, International Conference on Biomaterials Science, 2011.3 (茨城)
- ③ PEG化亜鉛プロトポルフィリン (PEG-ZnPP) の安定性および腫瘍部位でのPEG鎖切断による細胞内取り込みの改善, 月川健士, 中村秀明, 方軍, 新海征治, 前田浩, 第27回日本DDS学会, 2011.6 (東京)
- ④ DDSの社会的役割と癌治療におけるジレンマ, 前田浩, 第27回日本DDS学会 永井賞受賞記念講演, 2011.6 (東京)
- ⑤ Styrene-co-maleic acid (SMA) telomer micelles encapsulated-zinc protoporphyrin (SZP): Arginine formulation for improved stability and solubility, Gahininath Y. Bharate, Hideaki Nakamura, Jun Fang, Bert Klumperma³, Seiji Shinkai and Hiroshi Maeda, 第27回日本DDS学会, 2011.6 (東京)
- ⑥ Enhanced Drug Delivery and Therapeutic Effect for Lung Cancer Using NO Releasing Agent (ISDN) and SMA NCS Administered via the Bronchial Artery: Experiences with Unresectable Advanced Bronchogenic Cancer, Hiroshi Maeda, Khaled Greish, and Akinori Nagamitsu, The 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2011.8 (Maryland, USA)

2. 学会発表

- ① Nanoparticles of styrene-co-maleic acid telomer (SMA) containing anthracycline and zinc-protoporphyrin (ZnPP) as new micellar anticancer agents, and SMA conjugate of AHPP, a xanthine oxidase inhibitor
- ⑦ The importance of cleavage of PEG chains from pegylated zinc protoporphyrin (PEG-ZnPP) by tumor proteases on intracellular uptake, Kenji Tsukigawa, Hideaki Nakamura, Jun Fang, Hiroshi Maeda, The 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2011.8 (Maryland, USA)

- ⑧ Stability of styrene-co-maleic acid telomer micelles encapsulated-zinc protoporphyrin (SZP), Gahininath Y. Bharate, Hideaki Nakamura, Jun Fang, Bert Klumperman³, Seiji Shinkai and Hiroshi Maeda, The 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2011.8 (Maryland, USA)
- ⑨ Macromolecular therapeutics: EPR effect and beyond in cancer treatment, Hiroshi Maeda, Drug Delivery and Cancer: Challenges and New Directions for Cancer Therapy” symposium, 2011.10 (Indiana, USA)
- ⑩ 感染における生体内ラジカルの生成」ならびに「癌化学療法における高分子型制癌剤の研究と EPR 効果の発見、前田 浩、第 70 回日本癌学会学術総会 吉田賞受賞記念講演、2011.10 (愛知)
- ⑪ 慢性肉芽腫に対するポリエチレングリコール修飾 D-アミノ酸酸化酵素 (PEG 化 DAO) を用いた過酸化水素補充療法、中村秀明、水上智之、布井博幸、前田浩、食細胞昨日異常症研究会、2011.12 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録情報 特許出願

発明の名称：高分子型蛍光分子プローブ

国名：日本

出願番号：特願 2011-193237

出願日：平成 23 年 9 月 5 日

水溶性高分子亜鉛プロトポルフィリンミセルの in vivo 抗腫瘍活性の評価

研究分担者 方 軍 崇城大学 DDS 研究所/薬学部 准教授

研究要旨

亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)はヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1, HSP32)を阻害することで、腫瘍細胞には細胞毒性を示すが、正常細胞に対しては細胞毒性が低いという特性を持つ。また、光線照射により一重項酸素(1O_2)を発生することで、抗腫瘍効果を示す。さらに、励起光の照射により、ZnPPの蛍光を利用した腫瘍特異的なイメージングが可能であることを証明している。このことより、ZnPPはがんの検出(早期発見と治療効果の判定)および治療を同時に行うことの可能な新規抗がん剤として、有用な可能性を秘めている。しかし、ZnPPは水溶性が非常に低いこと、腫瘍組織への集積性がないことから、in vivoへの応用が困難であった。そこで、我々は水溶性高分子ポリマーであるポリエチレングリコール(PEG)、スチレンマレイン酸コポリマー(SMA)およびヒドロキシプロピルメタアクリルアミド(HPMA)を用い、ZnPPの水溶性高分子ミセル剤PEG-ZnPP, SMA-ZnPPおよびHPMA-ZnPPを合成した。これらの高分子ミセルは、EPR効果により、高い腫瘍集積性と選択的な抗腫瘍活性が期待している。本研究で、マウス、ラットおよびラビット腫瘍モデルを用い、各種ZnPPミセルのpharmacokineticsおよび抗腫瘍効果(単独および光照射下)を検討した。PEG-ZnPPとHPMA-ZnPPが優れた血中滞留性と腫瘍集積性を示したが、SMA-ZnPPは高い肝臓への分布が見られた。いずれのZnPPミセルは顕著な抗腫瘍活性を示し、SMA-ZnPPは特に肝臓の腫瘍に高い治療効果が見られた。さらに、キセノン光源(内視鏡光源を含め)の光照射により、抗腫瘍効果が著しく増強された。このことより、ZnPPミセルは新規抗がん剤およびPDT(photodynamic therapy)剤としての可能性が示唆され、特にHPMA-ZnPPは高い腫瘍集積性により、腫瘍の検出が可能な光線力学診断・治療剤への開発に着目し、研究を進んでいる。

A. 研究目的

本プロジェクトは、がんの診断と治療を同時に行なうことの可能な高分子型蛍光プローブの開発を最終目的としている。H23年度の本分担課題ではその候補の一つであるZnPPの高分子ミセルに着目し、そのin vivo薬物動態と抗腫瘍効果を明らかにした。

B. 研究方法

1) ZnPPミセルの合成: PEG-ZnPP, SMA-ZnPPの合成方法はすでに確立している(SK Sahoo et al., Bioconj. Chem. 2002; AK Iyer et al., Biomaterials 2007)。放射ラベルしたPEG- $^{65}ZnPP$, SMA- $^{65}ZnPP$ は $^{65}Zinc$ acetateを用いて同様な方法で作製した。HPMA-ZnPPの合成は研究分担者中村秀明の報告書を参照してください。

2) 腫瘍モデル

マウスザルコーマS180モデル: S180細胞(2×10^6)をddYマウス(雄、6週零)の背部に皮下注射(0.1 ml)するにより作製する。

マウス線維肉腫MethAモデル: MethA細胞(2×10^6)をBalb/cマウス(雄、6週零)の背部に皮下注射(0.1 ml)するにより作製する。

マウスメラノーマB16モデル: B16/F10細胞(2×10^6)をc57/BLマウス(雄、6週零)の背部に皮下注射(0.1 ml)するにより作製する。

ラットDMBA化学誘導乳がんモデル: 10 mg DMBA(1, 12-dimethyl bezanthracene)を1 mlのコーンオイルに溶かし、SDラット(雌、6週零)に経口投与により作製す

る。DMBA 投与後 8-12 週に乳がんが発生する。

ウサギの肝臓移植がん VX-2 モデル：VX-2 パピローマ固形腫瘍 (約 $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$) を開腹手術によニュージランドウサギ (2-2.25 kg) の肝臓に移植する。

3) 薬物動態：上記の S180 腫瘍モデルにおいて、PEG-⁶⁵ZnPP, SMA-⁶⁵ZnPP を経静脈注射し (10-20 mg/kg, ZnPP equivalent, 10000-50000 cpm/mouse)、所定の時間後にマウスを屠殺し、下大静脈から血液を採取した後へパリン (5 unit/ml) を含む PBS(-) で灌流を行う (10-15 ml)。それから、腫瘍を含む各臓器を採取し、秤量後、ガンマカウンターにより各臓器における放射量 (cpm) を測定する。

HPMA-ZnPP の体内動態は ZnPP の蛍光測定により検討した (研究分担者中村秀明の報告書を参照)。

4) 抗腫瘍活性：S180, MethA, B16 腫瘍モデルにおいて、腫瘍直径が約 5-7mm のなる時に、治療を開始する。DMBA 腫瘍モデルにおいて、腫瘍が発生し触れられるサイズになる (直径が約 10mm 以上) 時に治療を開始する。VX-2 腫瘍モデルにおいて、腫瘍を移植した 2 週間後に治療を開始する。

治療は各種 ZnPP ミセルを生理食塩水で所定の濃度の溶液を調製し、経尾静脈 (0.1 ml/mouse, 0.2-0.5 ml/rat) 投与する。PDT の場合、ZnPP ミセル投与 24h 後に各種光源により腫瘍を 5-30 分照射する。

治療効果は腫瘍サイズの変化および動物の生存率等により評価する。また、動物体重の変化等により副作用を評価する。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は崇城大学動物実験指針に従って、崇城大学動物実験倫理委員会に承認されたいうえ行なっている。

C. 研究結果

1) ZnPP ミセルの Pharmacokinetics：図 1 に示したように、PEG-ZnPP は高い腫瘍選択的な集積が見られ、経静脈注射 48h 後、ZnPP の高親和性臓器 (肝臓、脾臓) 以外のほとんどの臓器と組織と比較し、腫瘍内の

PEG-ZnPP の濃度は約 2-3 倍高くなり、また、血中濃度よりも約 2 倍高い。

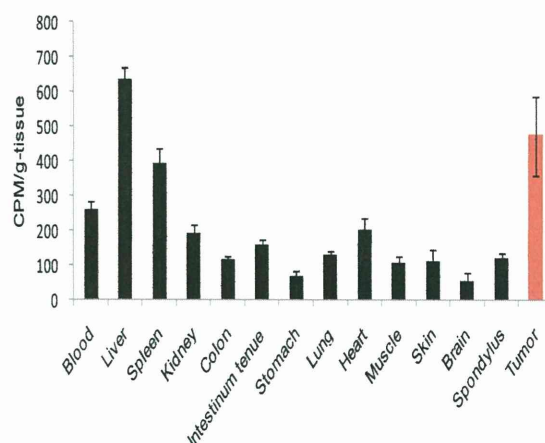


図 1：PEG-ZnPP の体内分布。PEG-⁶⁵ZnPP (10 mg/kg, 14000 cpm/mouse) 経静脈投与 48 時間後の体内分布を示す。

同様に、HPMA-ZnPP も優れた腫瘍集積性を示し、PEG-ZnPP と類似な体内分布を示した。また、in vivo imaging により、腫瘍選択的な蛍光を検出し、正常臓器にその蛍光はほとんど見られなかった (研究分担者中村秀明の報告書を参照)。

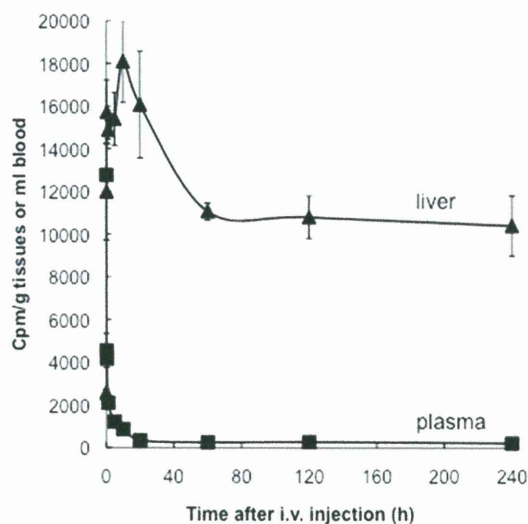


図 2：SMA-ZnPP の血中および肝内動態。SMA-⁶⁵ZnPP (15 mg/kg, 45000 cpm/mouse) 経静脈投与。

しかしながら、SMA-ZnPP ミセルに関し

て、腫瘍選択的な集積が見られなく、肝臓への集積と貯留が見られた(図2、3)。このことより、SMA-ZnPPの肝臓腫瘍に対する治療作用に注目した。

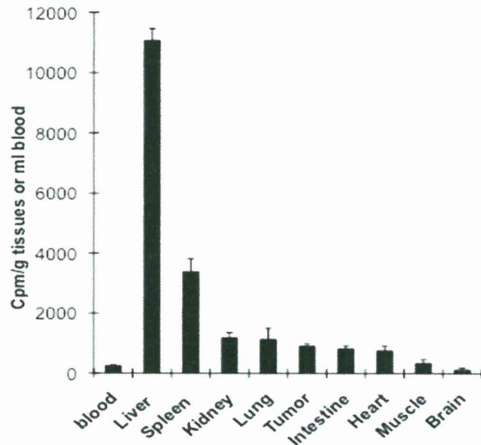


図3 : SMA-ZnPPの静脈投与24時間後の臓器分布。SMA-⁶⁵ZnPP (15 mg/kg, 45000 cpm/mouse) 経静脈投与。

2) ZnPPミセルの抗腫瘍活性

PEG-ZnPP : 0.5-2 mg/kg (ZnPP equivalent) で三日連日投与した結果、濃度依存的な顕著な腫瘍増殖の抑制が見られた。また、光照射(プロジェクターのキセノン光源、照射距離10 cm、照射時間5分間)により、抗腫瘍効果はさらに上昇した。(図4)

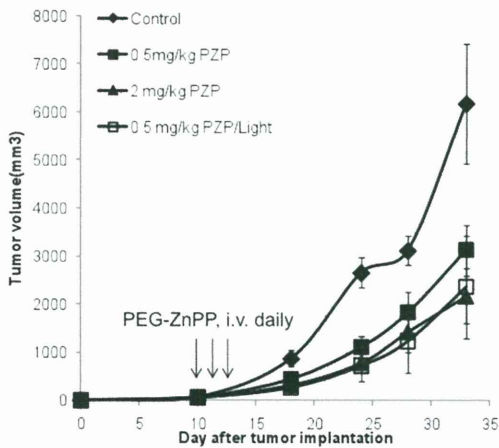


図4 : PEG-ZnPPの単独およびPDT抗腫瘍作用。PZP, PEG-ZnPP。光照射はPEG-ZnPP投与24h後に行った。光源、プロジェクターキセノン光源; 照射距離: 10cm、照射時間: 5分間。腫瘍モデル: マウスS180モデル。

SMA-ZnPP : SMA-ZnPPの高い肝臓集積性により、まずウサギの肝臓移植がんモデルVX-2において実験した。図5と表1に示したように、未治療のコントロール群は腫瘍の高度な浸潤が認められ、腫瘍移植40日後に、すべての動物が死亡した。これに対し、SMA-ZnPP治療により、腫瘍細胞の壊死と組織の線維化が見られ(図5)、12 mg/kgの濃度、週1回で4回治療した結果、少なくとも80日まで全部の動物が生存している(表1)。

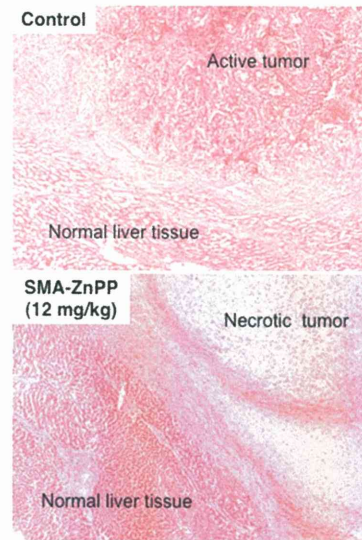


図5 : SMA-ZnPP治療後、VX-2腫瘍の病理所見。

表1 : VX-2腫瘍におけるSMA-ZnPPの治療効果

Group	Dose (mg/kg)	% Survival after treatment			Histological changes (by laparotomy)
		40 days ²	60 days ²	80 days ²	
Control	0	0	0	0	growing with invasion
SMA-ZnPP	4	100	60	60	fibrosis appearing
	8	100	80	80	necrosis, fibrosis in tumors
	12	100	100	100	necrosis, totally fibrosis

¹ SMA-ZnPP 週1回、計4回投与している。

² 腫瘍移植後の日数。5-7匹/群。

さらに、マウス腫瘍モデル MethA (図6) および B16 (図7、8) においても、著名な腫瘍増殖抑制と担癌マウスの生存率の延長が見られた。

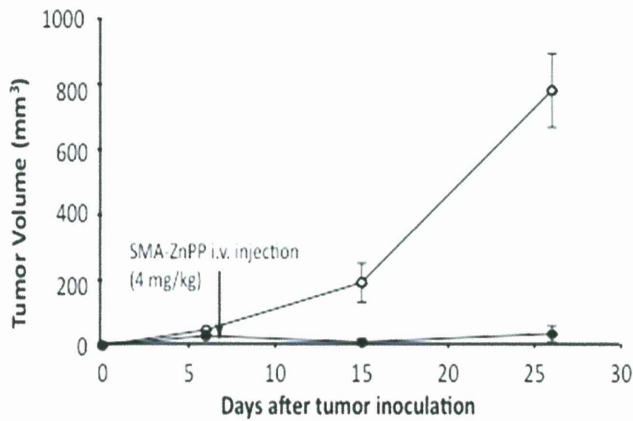


図6：マウス MethA 腫瘍における SMA-ZnPP の治療効果。SMA-ZnPP は一回ボラス投与している。

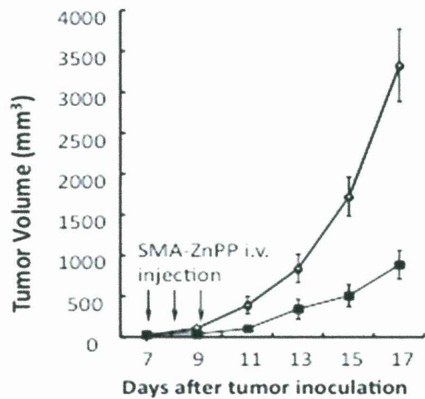


図6：マウス B16 腫瘍における SMA-ZnPP の治療効果。SMA-ZnPP は 30mg/kg で三日連日投与している。

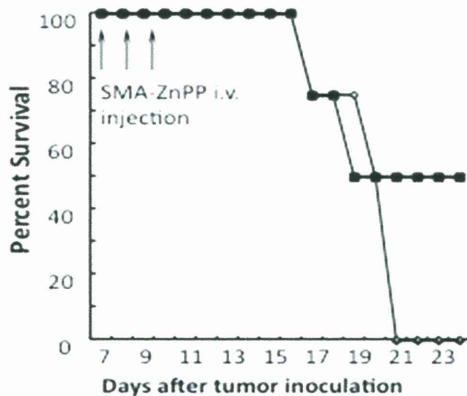


図7：マウス B16 腫瘍における SMA-ZnPP の治療効果：生存率の延長。

また、SMA-ZnPP の光照射治療について、ラット DMBA 化学誘発乳がんモデルにおいて検討した。SMA-ZnPP 単独で腫瘍増殖の抑制が見られたが、プロジェクターキセノン光源の照射により、著しく腫瘍が小さくなり、一部の腫瘍が壊死し、完全に消滅した (図8)。

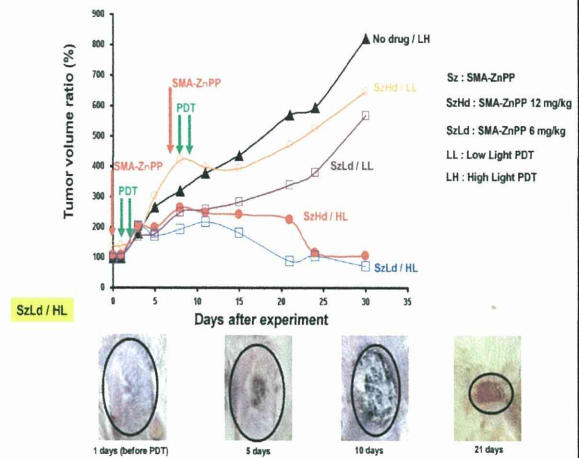


図8：ラット DMBA 化学誘発腫瘍における SMA-ZnPP の PDT 治療効果。赤い矢印は SMA-ZnPP の投与を示し、24 及び 48 時間後に光照射の行なった。光源、プロジェクターキセノン光源；照射距離：10cm、照射時間：5 分間。Low light, 25000 LUX; High light, 50000LUX。

HPMA-ZnPP：HPMA-ZnPP は高い腫瘍集積性を示したが、マウス S180 モデルにおいて単独で有意な抗腫瘍効果が見られなかった。ところが、キセノン光源照射により、顕著な腫瘍増殖の抑制が見られ、3 回の治療で、約 4 週間まで腫瘍の増殖はほぼ完全に抑制され、そのうち、約半数の腫瘍が消滅した (研究分担者中村秀明の報告書を参照してください)。

D. 考察

ZnPP は強力な HO-1 の阻害剤であると知られている。HO-1 はヘム代謝の中核的な酵素であり、最近熱ショックタンパク質の一つである HSP32 と同一であることが分かってきた。このヘム分解反応の産物としてビリベルジン (→ビリルビン)、一酸化炭素

(CO) および Fe²⁺が知られているが、これらが抗酸化、抗アポトーシス作用を発揮する (Fang et al. Apoptosis 9:27-35, 2004)。これまで、HO-1 が多くの腫瘍に高発現していることにより抗酸化能を高めており、それによって HO-1 が腫瘍の survival factor として機能している。そのため、我々は ZnPP を用いて HO-1 阻害をターゲットした抗癌療法を開発した (Tanaka et al. Br. J Cancer 88:902-9, 2003; Fang et al. Cancer Res. 63:3567-74, 2003)。

本研究では ZnPP を光増感剤として、光で励起し、光化学反応により singlet oxygen (¹O₂) (活性酸素 ROS) を生成する。この活性酸素 (ROS) の細胞毒性により抗癌作用を発揮する癌治療法は、光線力学療法 (PDT) として知られている。現在の PDT において、高価なレーザー光源が用いられるが、本研究では、連続波長のキセノン光源と ZnPP を用いる光化学療法の有用性を検討した。また、光の励起状態で ZnPP が蛍光を放出することより、腫瘍検出すると同時に PDT 治療を行なうことを目指し研究と行なった。

しかしながら、ZnPP は水溶性に乏しいため、その作用の解析や臨床への本格的な応用が困難であった。そこで、我々は ZnPP の水溶性高分子ミセル PEG-ZnPP, SMA-ZnPP および HPMA-ZnPP を合成した。このミセル化により、ZnPP の水難溶性の問題点を解決している。さらに、高分子ミセル化剤は EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果により、在来の低分子抗がん剤より 10~20 倍も固形腫瘍に選択的に集積することができる。その結果より、効率的かつ副作用の少ない抗癌作用が得られる。

予想通りに、PEG-ZnPP と HPMA-ZnPP は優れた血中滞留性と腫瘍集積性を示した (図 1 と中村報告書)。しかしながら、SMA-ZnPP は EPR 効果が見られなかった (図 2、3)。その原因は SMA-ZnPP の弱い血中安定性、すなわち、そのミセルが血中に速やかに崩壊し、フリーの ZnPP を放出することにあると考えられる。その結果、SMA-ZnPP は体内で高分子としての性質が失い、腫瘍集積が得られなくなり、逆に

ZnPP 高親和性の肝臓に蓄積し、貯留して要る。

従って、体内動態とだいたい一致し、PEG-ZnPP は顕著な抗腫瘍効果が見られ、SMA-ZnPP も肝臓の移植がんに対して、優れた治療効果が得られた。さらに、SMA-ZnPP は腫瘍集積性がなかったものの、MethA, B16 などのマウス皮下移植がんにたいしても著名な治療作用が認められた。これは ZnPP の非 HO-1 依存性の抗腫瘍活性 (免疫誘導、Zn のアポトーシス誘導活性等) によるものと考えられる。

しかしながら、HPMA-ZnPP は高い腫瘍集積が見られたものの、抗腫瘍活性がほとんど見られなかった (中村報告書を参照)。これは HPMA-ZnPP の低い細胞内取込みに関わると考えられる (中村報告書を参照)。現在、腫瘍内で切断しやすい、フリー ZnPP を放出しやすい結合を持つ HPMA-ZnPP ミセルを検討している。

ところが、光照射によりもともと抗腫瘍活性のない HPMA-ZnPP は著しい抗腫瘍効果を示した (中村報告書を参照)。PEG-ZnPP も SMA-ZnPP も同様な結果が得られた (図 4、8)。このことより、ZnPP ミセルの光照射治療の有用性が示唆された。また、こと結果と、HPMA-ZnPP の腫瘍イメージングの結果と合わせ、HPMA-ZnPP を用いる腫瘍蛍光診断と同時な PDT 治療法の可能性が強く示唆された。

E. 結論

ZnPP 水溶性高分子ミセルはその自身の抗癌作用と光増感作用により、二重増強した新規光照射がん治療薬への開発が期待できる。特に、HPMA-ZnPP は優れた腫瘍集積性独特な蛍光性質により、腫瘍の蛍光プローブ・PDT 治療薬として、手術下や内視鏡下の腫瘍の検出と治療における応用性が多いに期待している。

F. 健康危険情報

総括報告書に記載している。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fang J, Greish K, Qin H, Liao L, Nakamura H, Takeya M, Maeda H. *HSP32 (HO-1) inhibitor, copoly(styrene maleic acid)-zinc protoporphyrin IX, a water soluble micelle as anticancer agent: in vitro and in vivo anticancer effect.* **Eur J Pharm. Biopharm.** 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.04.016>.
 - 2) Fang J, Qin H, Nakamura H, Tsukigawa K, Shin T, Maeda H. *Carbon monoxide, generated by heme oxygenase-1, mediates the enhanced permeability and retention (EPR) effect of solid tumor.* **Cancer Sci** 103(3):535-41, 2012.
 - 3) Fang J, Qin H, Seki T, Nakamura H, Tsukigawa K, Maeda H. *Therapeutic potential of pegylated hemin for ROS-related diseases via induction of heme oxygenase-1: results from a rat hepatic ischemia/reperfusion injury model.* **J Pharmacol Exp Ther** 339(3):779-89, 2011.
 - 4) Fang J, Nakamura H, Maeda H. *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect.* **Adv Drug Deliv Rev** 63:136-151, 2011.
 - 5) Fang J, Seki T, Qin H, Bharate GY, Iyer AK, Maeda H. *Tissue protective effect of xanthine oxidase inhibitor, polymer conjugate of (styrene-maleic acid copolymer) and (4-amino-6-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidine), on hepatic ischemia-reperfusion injury.* **Exp Biol Med (Maywood)** 235(4):487-96, 2010.
2. 学会発表
 - 1) Jun Fang, Haibo Qin, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda. *Pegylated micellar form of hemin for antioxidant, anti-inflammatory therapeutics.* **Annual Meeting of the Japanese Biochemistry Association at Kyushu in 2011.** Kurume, Japan, May 21-22, 2011.
 - 2) Jun Fang, Haibo Qin, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda. *Enhancement of EPR effect by heme oxygenase-1.* **27th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System.** Tokyo, Japan, June 9-10, 2011.
 - 3) Jun Fang, Haibo. Qin, Hideaki. Nakamura, Hiroshi. Maeda. *Augmentation of EPR effect by heme oxygenase-1 (HO-1).* **The 38th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society.** National Harbor, Maryland, USA, July 30-Aug. 3, 2011.
 - 4) Jun Fang, Haibo Qin, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda. *Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 (HO-1) mediates EPR effect of solid tumor.* **70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.** Nagoya, Japan, Oct. 3-5, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

特許出願

発明の名称：高分子型蛍光分子プローブ

国名：日本

出願番号：特願 2011-193237

出願日：平成 23 年 9 月 5 日

蛍光顕微鏡に使用する蛍光ナノプローブ HPMA-ZnPP に関する研究

研究分担者 中村 秀明 崇城大学 DDS 研究所/薬学部 助手

研究要旨

高分子蛍光ナノミセル製剤を調製し、ミセルの物理化学的評価及び体内動態・マウス腫瘍の蛍光イメージングを行った。本研究では蛍光分子プローブとして亜鉛プロトポルフィリン (ZnPP) を用いた。ZnPP は、蛍光プローブとして機能するだけでなく、光増感剤として機能するため、腫瘍の検出および治療を目的とする本テーマに合致する薬剤として考えられる。Hydroxypropyl methacrylamide (HPMA) ポリマーと ZnPP の結合はワンステップで行い、精製後に得られた HPMA-ZnPP サンプルには未反応の ZnPP は含まれていなかった。HPMA-ZnPP は水溶液中で球形のミセル構造を形成し、流体力学的サイズはおよそ 80nm を示し、体内で EPR 効果を示すには十分な大きさミセルを形成することを明らかにした。さらに、HPMA-ZnPP は疎水性相互作用によりミセル構造を形成しており、HPMA-ZnPP がミセル構造を保持している時は、蛍光および一重項酸素を生成しないことを明らかにし、HPMA-ZnPP ミセルが細胞膜成分 (レシチン) を含む界面活性剤により壊れたときに、蛍光および一重項酸素を発生することが明らかとなった。HPMA-ZnPP はその一重項酸素生成能により、*in vitro* および *in vivo* において、殺細胞効果ならびに抗腫瘍効果を示した。注目すべき点はその体内動態であり、フリーの ZnPP では静脈注射後に、肝臓や脾臓に集積し、腫瘍にはほとんど集積しないのに対し、HPMA-ZnPP の腫瘍集積性は高く、肝臓と同程度の集積性が認められた。また、蛍光イメージング装置で腫瘍イメージングを行ったところ、腫瘍組織選択的な蛍光が確認されたことから、HPMA-ZnPP は、蛍光内視鏡を用いた、*in vivo* 蛍光イメージングに応用することが可能であると考えられる。

I. 研究成果

① HPMA-ZnPP の合成と純度検定

① - A. 研究目的

光増感作用および蛍光性を併せ持つ亜鉛プロトポルフィリンを利用し、腫瘍の検出 (蛍光イメージング) ならびに光照射によるがん治療に用いる高分子 ZnPP 製剤の創製を目的とする。高分子化には、生体親和性が極めて高い Hydroxypropyl methacrylamide (HPMA) ポリマーを使用し、ZnPP を HPMA ポリマーに結合した、HPMA-ZnPP を作製する。

① - B. 方法

HPMA-ZnPP は ZnPP のカルボキシル基と HPMA のヒドロキシル基またはアミノ基との縮

合反応により行った。570mg の HPMA (平均分子量 12,000) と 281mg の ZnPP を 50mL の DMSO 中に加え、50℃ にすることで溶解させた。ついで、1.37ml のトリエチルアミン、1.2g のジメチルアミノピリジン、1.2 グラムのカルボジイミドを加え、50℃ で 12 時間反応させた。反応後、150ml のジエチルエーテルを加えることで HPMA-ZnPP を沈殿・洗浄する操作を 3 回繰り返し、トリエチルアミン、ジメチルアミノピリジン、カルボジイミドを除いた。HPMA-ZnPP ペレットを 10ml のジメチルホルムアミドに溶解し、サイズ排除クロマトグラフィー (Bio Beads SX-1, BioRad) を用いて、未反応の ZnPP を除いた。HPMA-ZnPP の溶出液を 500ml の超純水に加え、

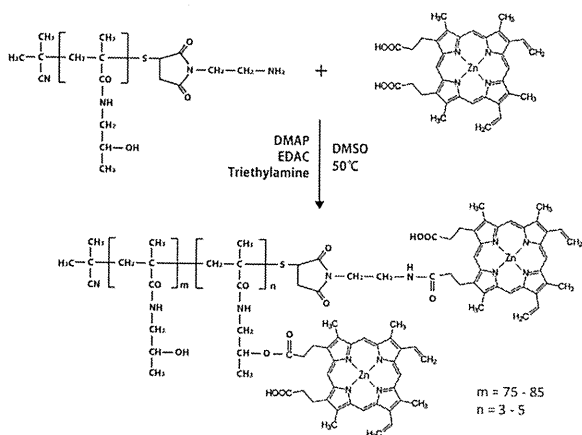
限外ろ過 (100kDa cut off) を行い、ジメチルホルムアミドおよび未反応の HPMA を除いた。凍結乾燥後 (UD-800F, TAITEC) に粉末の HPMA-ZnPP (635mg) を得た。

純度検定ならびに ZnPP の HPMA への結合は、ゲル浸透クロマトグラフィーにより行った。1mg の HPMA-ZnPP または 0.2mg の ZnPP を 1ml のジメチルホルムアミドに溶解し、Bio-beads SX-1 カラム ($\phi=2.5\text{cm}$, $L=60\text{cm}$) に重層した。ジメチルホルムアミドを溶出液とし、室温、0.1ml/min の流速で行った。溶出液 1.5ml ずつを試験管に集め、各フラクションを 422nm の吸光度で測定した。

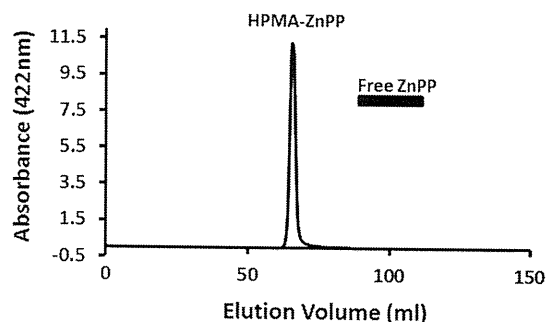
ZnPP の HPMA への結合は、偏光蛍光解消法により確認した。ジメチルホルムアミドを用い、2.5 $\mu\text{g/ml}$ の HPMA-ZnPP または 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の ZnPP 溶液を作製した。蛍光分光光度計 (FP6600, JASCO) を用い、25 $^{\circ}\text{C}\pm 0.1$ において、420nm の偏光で励起し、励起偏光に対し 0 $^{\circ}\text{C}$ (I_H) または 90 $^{\circ}\text{C}$ (I_V) の蛍光強度を測定した (E_m : 590nm)。蛍光偏光値 (P) は式 $P=(I_H-I_V)/(I_H+I_V)$ により算出した。

① - C. 結果

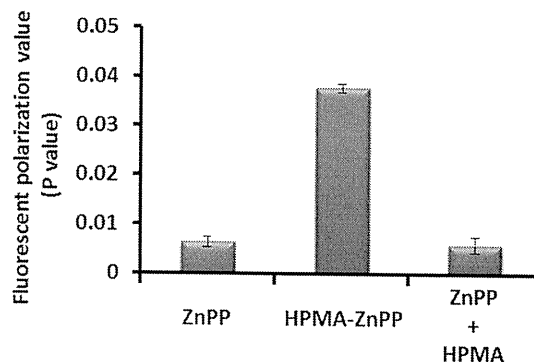
(図 1) HPMA-ZnPP の合成スキーム



(図 2) ゲルろ過クロマトグラフィー



(図 3) 蛍光偏光解消法



① - D. 考察

HPMA ポリマーへの ZnPP の結合はワンステップで行い、20%(wt/wt) の ZnPP 含有量の HPMA-ZnPP を作製した。ゲルろ過クロマトグラフィーならびに蛍光偏光解消法の結果より、HPMA ポリマーへの ZnPP の結合を確認した(図 2、図 3)。さらに、最終生成物に未反応の ZnPP は含まれていないことを確認できたことから、本法において、純度の高い HPMA-ZnPP が作製できたと考えられる(図 2)。しかし、本法での ZnPP ベーズの収率はおおよそ 47%程度であり、今後の改良が必要であると考えられる。

② HPMA-ZnPP によりミセル構造の形成

② - A. 目的

HPMA-ZnPP は疎水性部分 (ZnPP) と水溶性部分 (HPMA) を持つ両親媒性物質であるため、HPMA-ZnPP は水溶液中では ZnPP を疎水性コアとするミセルを形成すると考えられるため、HPMA-ZnPP の流体力学的サイズならびにミセル径を検討した。

② - B. 方法

流体力学的サイズの測定は動的光散乱法により行った。PBS(-)に HPMA または HPMA-ZnPP を 1mg/ml となるように溶解し、0.2 μ m のシリジフィルタを通したのち、動的光散乱装置 (ELS-Z2, Otsuka) を用いて、流体力学的サイズを測定した。

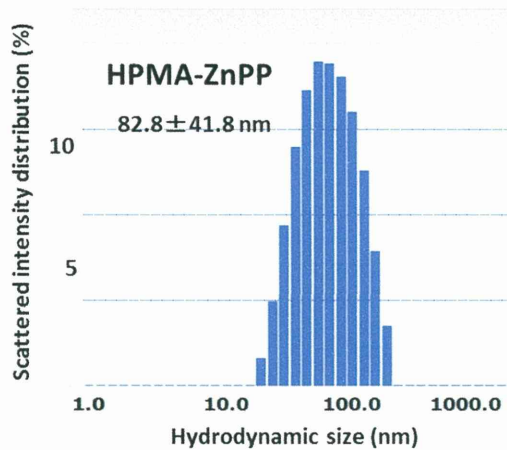
ミセル径は透過型電子顕微鏡を用い測定した。

0. 1mg/ml の HPMA-ZnPP 溶液に STEM カーボン支持膜を浸漬し、常温で乾燥させた。HPMA-ZnPP のミセルサイズは透過型電子顕微鏡 (TECNAI F20, FEI) を用いて測定した。

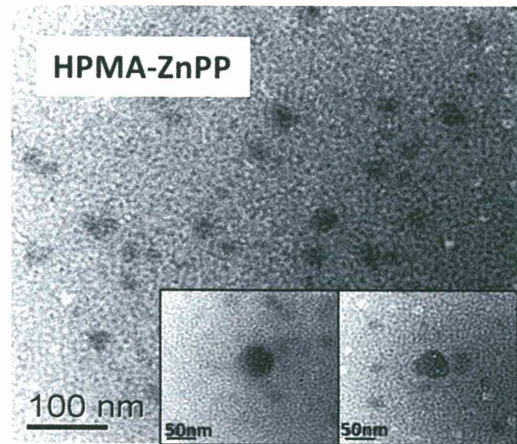
ミセル構造の推定は、ZnPP と HPMA との切断を HPLC により検出することで行った。2.5mg/ml の HPMA-ZnPP を 40% DMSO 存在下または非存在下で、NaOH (10mM)、50 $^{\circ}$ C でインキュベーションした。加水分解により遊離した ZnPP は、HPLC (カラム: GF-310HQ、溶離液: 30%DMSO、70% メタノール、10ppm トリフルオロ酢酸)により検出した。

② - C. 結果

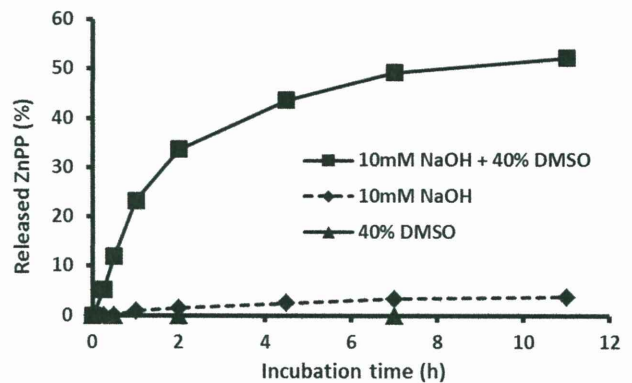
(図 4) 動的光散乱測定



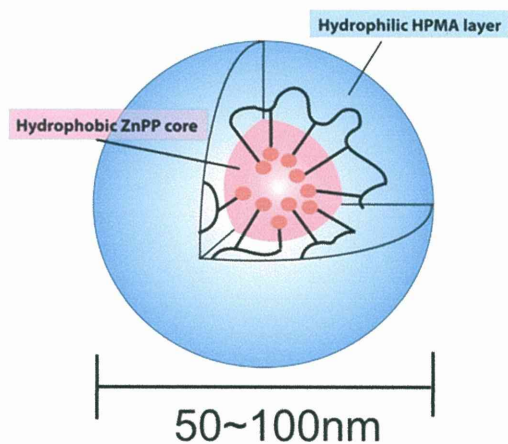
(図 5) 透過型電子顕微鏡測定



(図 6) ミセル構造の推定



(図 7) 推定ミセル構造



② - D. 考察

HPMA-ZnPP の溶解度は非常に高く、蒸留水に対して、30mg/ml 以上の溶解度を示した。HPMA-ZnPP は両親媒性を持つため、水溶液中ではミセル構造を形成すると考えられる。実際に水

溶液中では、高分子ミセル構造を形成し、およそ 80nm の流体力学的サイズを示した (図 4)。透過型電子顕微鏡による解析により、HPMA-ZnPP は 30~80nm 程度の球形のミセルを形成していた (図 5)。HPMA-ZnPP からの ZnPP の切断・解離は、40%DMSO を加えたときのみを確認された (図 6)。ZnPP はミセル構造の疎水性コアに埋め込まれており、水溶液中でミセル構造を形成している場合は加水分解が抑制されており、DMSO によりミセル構造が壊されて、ZnPP が露出することで、加水分解および ZnPP の解離が促進されたと考えられた。これらの結果より、水溶液中では、HPMA-ZnPP は ZnPP を疎水コアとし、表面を HPMA が覆った、50~100nm 程度の球形構造をしていると考えられる (図 7)。

③ 疎水結合による HPMA-ZnPP のミセル形成

③ - A. 目的

水溶液中において、どのように HPMA-ZnPP はミセルを形成しているのかを明らかにする。

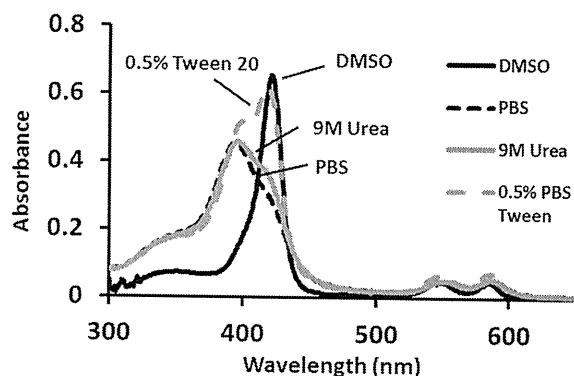
③ - B. 方法

10 μ g/ml の HPMA-ZnPP を DMSO、PBS(-)、9M 尿素または 0.5% Tween 20 に溶解し、紫外可視吸収スペクトルを測定した。

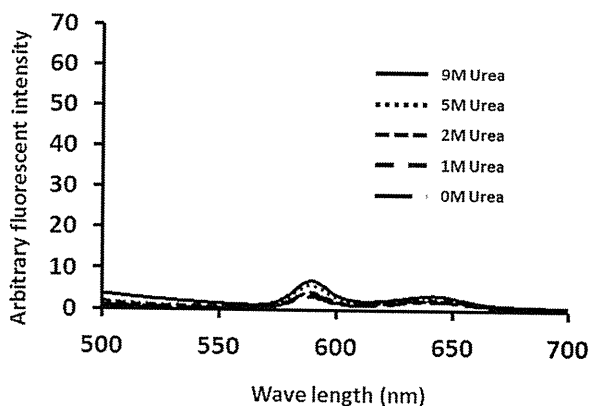
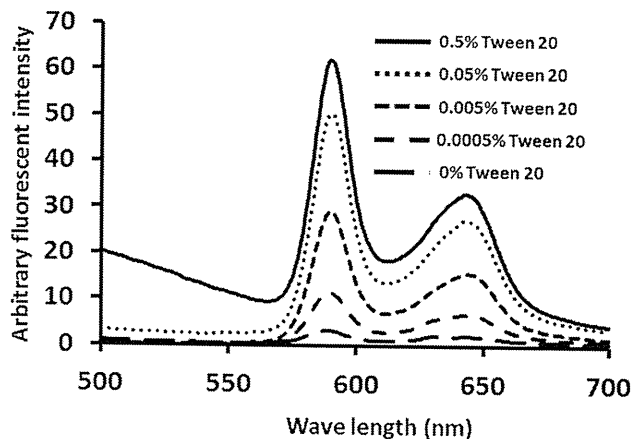
10 μ g/ml の HPMA-ZnPP を 0~0.5% の Tween 20 または 0~9M 尿素に溶解し、420nm の励起光で励起した際の 590nm における蛍光スペクトルを、蛍光分光光度計で測定した。

③ - C. 結果

(図 8) 紫外可視吸収スペクトル



(図 9) 蛍光スペクトル



③ - D. 考察

ZnPP は DMSO などの有機溶媒中では分散状態となり、422nm に鋭い吸収極大を示す。しかし、水溶液中ではスタッキング構造を形成し、なだらかな吸収ピークを示す。HPMA-ZnPP の吸光度を DMSO 中で測定したところ、422nm に鋭い吸収極大を示すが、PBS 中または 9M 尿素中では、なだらかな吸収ピーク ($\lambda_{max}=390nm$) をしめし、ZnPP はスタッキング構造を形成していると推察

される (図 8)。しかし、界面活性剤である Tween 20 を添加することにより、422nm に吸収極大を示すようになった (図 8)。同様の結果は、ZnPP の蛍光を指標とした試験においても示された。ZnPP の蛍光は ZnPP の状態により大きく異なり、分散状態では強い蛍光を示すが、スタッキング構造を形成すると、蛍光の消失が見られる。図 9 に示すように、HPMA-ZnPP は PBS 中では蛍光の消失が認められる。しかし、Tween 20 を添加することにより、蛍光の回復が認められた。しかし、蛍光の回復は 9M 尿素では認められなかった。これらの結果は、水素結合ではなく、疎水性相互作用を介して ZnPP は疎水性コアを形成し、HPMA-ZnPP ミセルを形成していることを示唆している。

④ HPMA-ZnPP の光増感作用と細胞毒性

④ - A. 目的

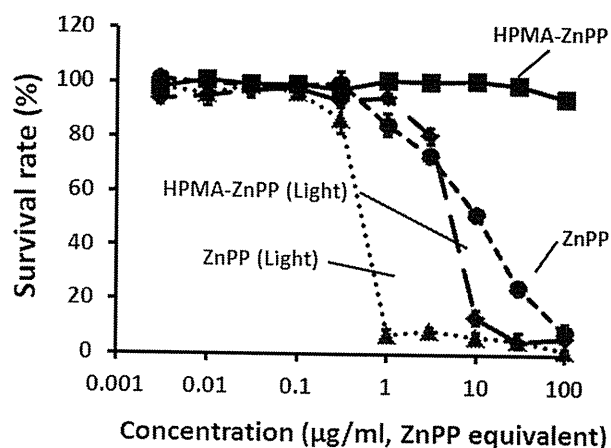
HPMA-ZnPP の細胞障害性ならびに、光照射による細胞障害性の増強作用を明らかにする。

④ - B. 方法

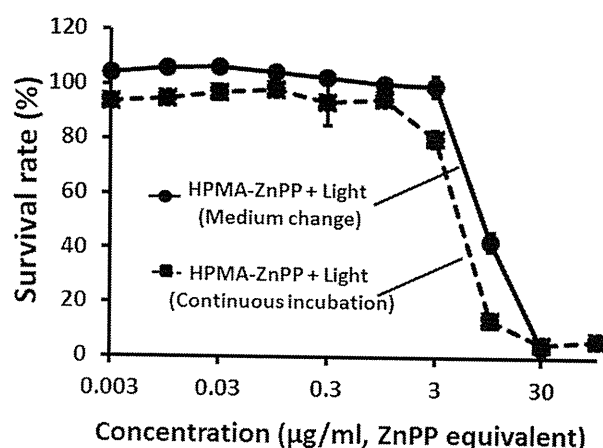
HeLa 細胞を 96well プレートに 3,000cells/well となるように播種した。24 時間後、0.003 ~1000 μ g ZnPP 当量/ml の ZnPP または HPMA-ZnPP を処理し、72 時間後に MTT 法により細胞生存率を測定した。生細胞で生成したホルマザン色素は DMSO で溶解し、570nm の吸光度で測定した。光を照射する場合は ZnPP または HPMA-ZnPP 処理 24 時間後に、422nm の光を照射 (1J/cm²) した。

④ - C. 結果

(図 10-A) 細胞毒性試験



(図 10-B) 細胞毒性試験



④ - D. 考察

ZnPP は細胞生存因子である HO-1 を阻害し、癌細胞に対して細胞毒性効果を示すことをこれまでに明らかにしてきている。さらに、光を照射することにより、 $^1\text{O}_2$ の生成を介し、細胞毒性効果が大きく増強される。そこで、HPMA-ZnPP の HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌細胞) に対する細胞障害性を検討した。ZnPP および HPMA-ZnPP は 72 時間のインキュベーション後に、MTT 法により生存細胞数を定量した。光の照射 (420nm, 1J/cm²) は ZnPP および HPMA-ZnPP 添加 24 時間後に行った。ZnPP はおよそ IC₅₀=10 μ g/ml を示し、光照射により 15~20 倍強い細胞毒性効果を示した (図 10)。しかし、HPMA-ZnPP は細胞毒性作用を全く示さず、ZnPP 当量で 100 μ g/ml においても、細胞毒性作用は認められなかった。光照射によりその細胞毒性作用は大きく増強し、