

201220042A

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24年度 総括・分担研究報告書

平成25 (2013) 年 5月

研究代表者 前田 浩

崇城大学DDS研究所

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 前田 浩

平成25 (2013) 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. HPMA-亜鉛プロトポルフィリンミセル(HPMA-ZnPP)の in vivo PDT 効果の評価 ---- 08

方 軍

2. 蛍光内視鏡に使用する蛍光ナノプローブに関する研究 ----- 13

中村 秀明

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 19

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 21

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ことを示している。

[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。その蛍光の光っている個所に対してさらに光照射を加え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癌の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、奏効率も高いと予想されることから医療経済の面においても医療費も低減化をもたらすなど、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635 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二つの理由による。この二つの問題に対して、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、腫瘍選択的に蛍光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、これら蛍光 (FL/PS) 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）を用いても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이버オプティックスを用い、さらにUVと赤外カットの内視鏡システムにすれば、UVや熱による火傷などの正常組織の非特異的障害を避けることができる。
- (3) EPR効果を利用した腫瘍選択性を有する高分子FL/PSミセルの創製は可能になってきている。
- (4) 在来型の内視鏡により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による照射装置が不要になる。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にfitするXe光源の波長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が可能となる。そのためにSMA-RB（ローズベンガル）、SMA-MB（メチレンブルー）、HPMA-ZnPPを作成し、抗腫瘍効果を検討する。

<研究分担者>

方 軍 崇城大学DDS研究所／薬学部 准教授

中村 秀明 崇城大学DDS研究所／薬学部 助教

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 2012 年までに約 1 万件も引用され、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 効果は肝転移癌の娘結節で調べると 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ことをみている[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: フォトフォリンやレザフィリン) は全身くまなく分布し、日常的な光さえも正常の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研究はなく、また 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, J. Cont. Release 2009-2012 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 を内視鏡下に行うという手法は未だ報告されていない。

(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。

これまで、在来のフォトフォリンやレザフィリン類以外、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 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 (蛍光ナノプローブ) の合成

我々は高分子ナノプローブ (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有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明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強度から測定する。

(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の自家発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 ナノ分子プローブは溶液中、組織間、血液内に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/P S 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。

B. 研究成果

本プロジェクトの H24 年度の成果としては図 1 ~ 図 5 のように蛍光性分子プローブのローダミン、ZnPP、ICG などを合成高分子、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等に結合した蛍光ナノプローブの作製である。それらナノプローブを静脈投与すると腫瘍部選択的に集積し、蛍光によりはっきりと腫瘍を検出/描出することがわかった (図 1)。即ち、成果の一つは HPMA (ヒドロキシプロピルメタアクリルアミド) ポリマー (P-HPMA) を ZnPP に結合した P-HPMA-ZnPP を合成し (図 2)、それを静注後約 420nm で励起、550nm 付近の蛍光波長によりマウスの S-180 腫瘍を IVIS 装置で観察すると、蛍光ナノプローブは腫瘍によく集積し、腫瘍部特異的な蛍光画像をきれいに描出した (図 1A)。同様にローダミン標識のアルブミン静注後、2 時間で脱毛なしのマウス腫瘍に対しても著明な蛍光像として検出できた (図 1B)。この結果は SMA-ICG でも同様であった (図 3)。これら腫瘍部の蛍光強度は正常部の約 15 倍であった。

これらの高分子でナノ化した蛍光ナノプローブ (ミセル化薬剤) に比べ、もとの低分子蛍光プローブは腫瘍部に対する選択性は全くなかった。例えば、低分子 free (遊離) の ZnPP および free のローダミンは何れも腫瘍部に対する濃染像がみとめられず、EPR 効果がないことがわかった (図 1A'、B')。現在、臨床で用いられている低分子であるレザフィリン® (明治) でも腫瘍選択性は全くなかった。

さらに、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 *in vitro* 系での培養食道癌細胞 KYSE150 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 の蛍光ナノプローブよりも 8~10 倍程高いことがわかった。

今回のプロトタイプの蛍光内視鏡とカメラは図 5A に示してある。

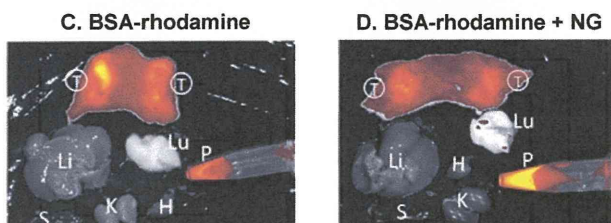
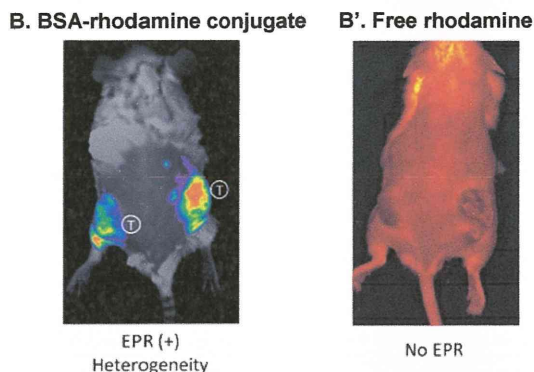
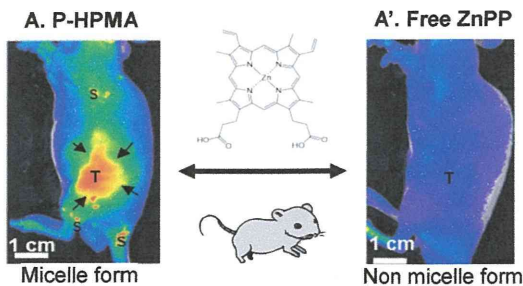


図1. HPMAポリマー結合ZnPP (A) あるいはアルブミンに結合のローダミン (B) を静注後、数時間後に光照射すると、腫瘍部は強い蛍光像を示した。In vitroでは著明な一重項酸素を生成し、強抗腫瘍効果を示すことを確認した (図4)。C, Dは腫瘍 (T) とそれ以外の臓器を剖検したときの蛍光像を示している。特にニトログリセリン (NG) 投与により血中濃度 (P) が高く維持され、腫瘍においてはより均一な蛍光染色をみた。

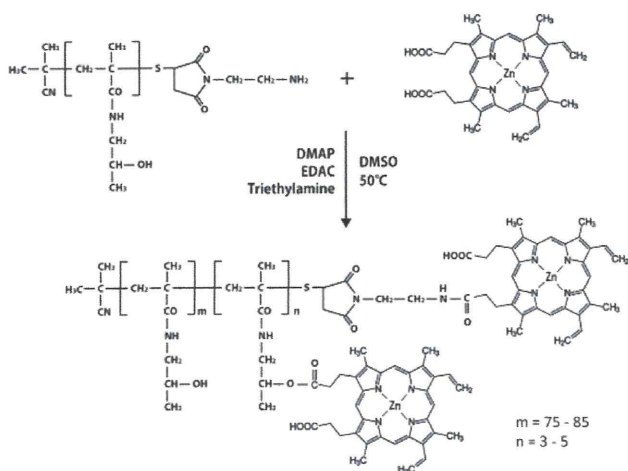
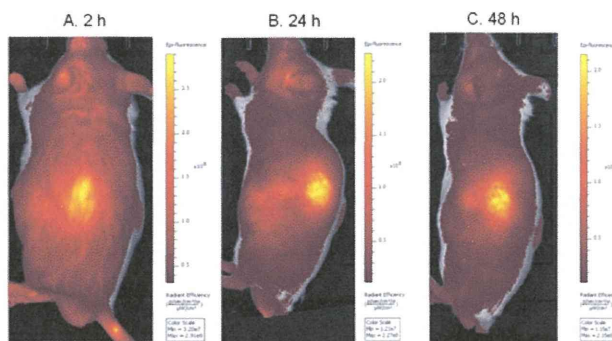
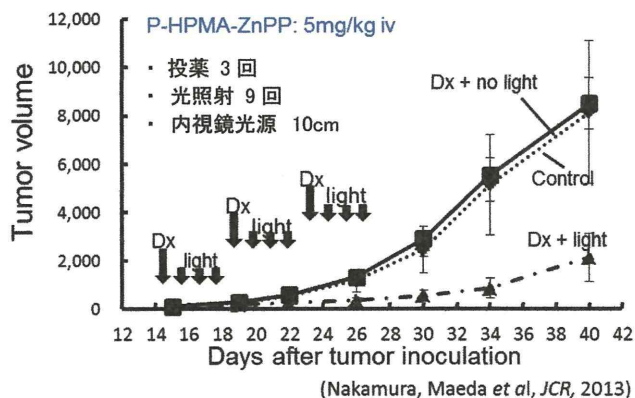


図2. HPMAポリマー-ZnPP結合体の合成。結合物は水溶液中で自然にミセルになる。



The drug is cleared from the normal tissue
→ becoming high S/N by EPR effect

図3. SMA-ICG静注後の腫瘍の蛍光像。腫瘍は投与2時間後 (A) から濃染し、24~48時間 (B, C) と経時的に腫瘍のコントラストは改善した。S/N比はコントロールと比べ約15倍以上となる。



(Nakamura, Maeda et al, JCR, 2013)

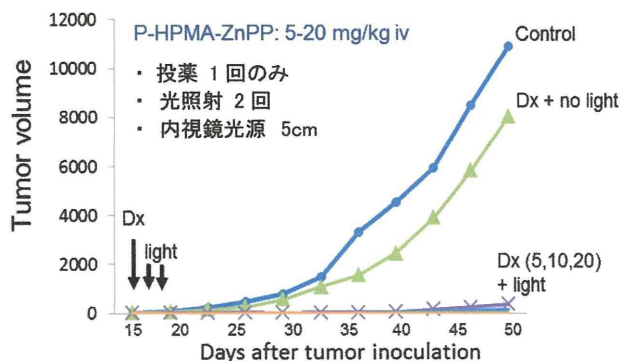


図4. HPMAポリマー結合 ZnPP iv 投与後、光照射による抗腫瘍効果。光源は内視鏡 xenon 光で 400~700nm. Dx は薬剤。5, 10, 20mg/kg 投与。

本実験ではICRマウスの自家化学発癌 (大腸癌) モデルをデキストラン硫酸とアゾキシメタンの投与で作成し、大腸癌の早期検出と光照射による治療をめざした研究を進めてきた。その成果を図5B (対照5C) に示した。このモデルで

は大腸癌のみが蛍光検出できた。また、DMBAにより自家発癌した乳癌のin vivoイメージングは図6に示した。腫瘍部のみ強い蛍光がみられる。今回用いられているPDTのプロープであるレザフィリンを用いて大腸癌を対照群として検討したが、レザフィリンは低分子であり、EP R効果もなく、腫瘍選択的な集積も蛍光像もみられなかった(図7)。

HPMA-ZnPP投与後、キセノンビーム光(400-700nm)をDMBA誘発ラット乳癌に対して試みたところ、HPMA-ZnPPと光の両doseに比例して制癌効果を示した(図8A)。そのとき、ラットに対する副作用(体重減少)はみられなかった(図8B)。

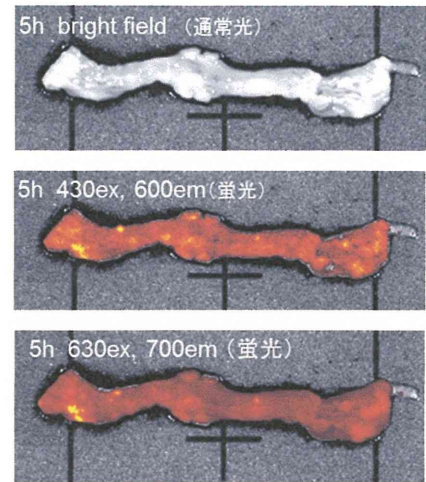


図7. レザフィリンによるマウス大腸癌の蛍光検出。上の現在実用化されているレザフィリンによるPDTは、腫瘍選択性がほとんどない。(文献 C. J. Gomer & A. Ferrario, *Cancer Res.* 50, 3985-3990, 1990)

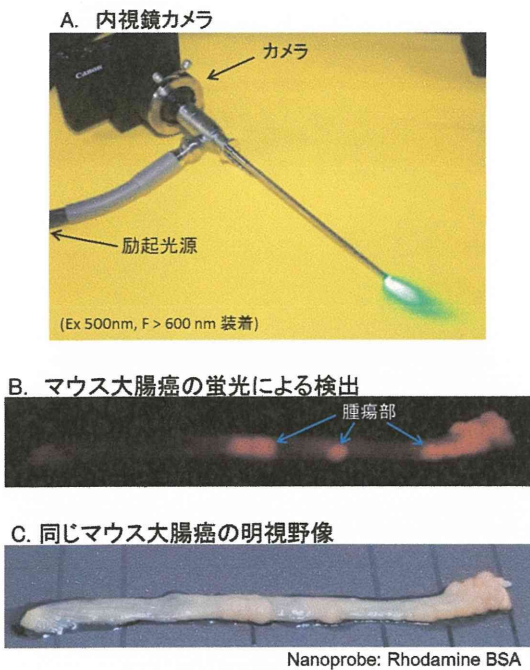
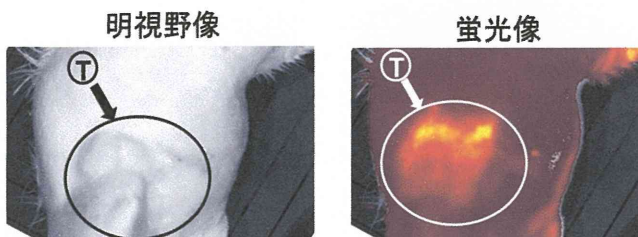


図5. 蛍光内視鏡による大腸癌の検出



DMBA induced autochthonous breast cancer in rat.

図6. ラット乳癌の蛍光イメージ/HPMA-ZnPP

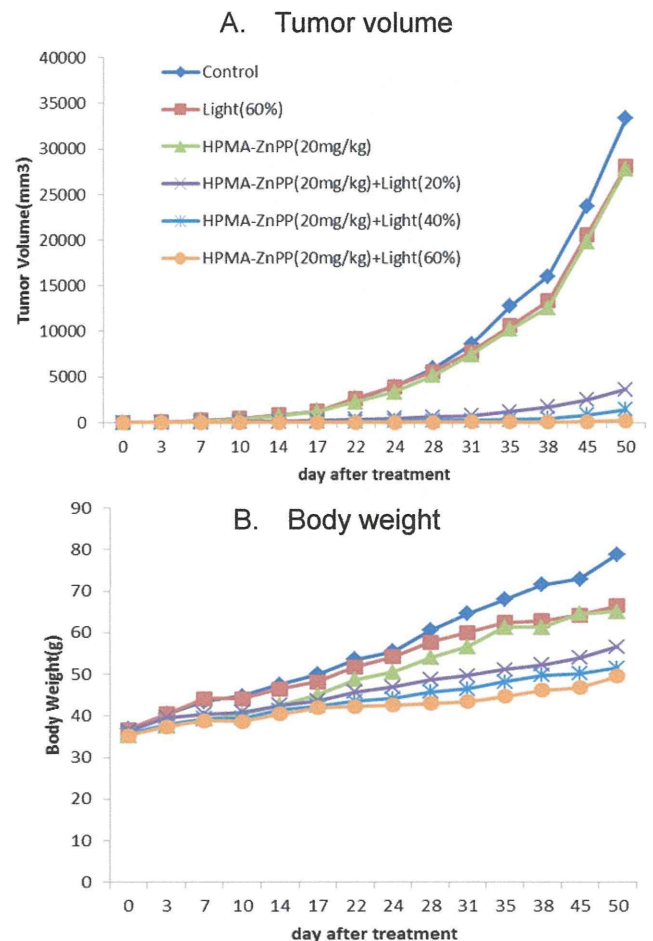


図8. A. HPMA-ZnPP結合物投与マウスの抗腫瘍効果。B. HPMA-ZnPP結合物投与マウスの体重変化(毒性評価)。HPMA-ZnPP 20g/kgで光源出力40%、60%でも50日後にはほぼ完治し、尚かつ副作用等毒性は現れなかった。光照射なしでは何れの効果もない。

C. 今後の展開

これまで、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～数時間で腫瘍が検出できた。まさに画期的であると確信している。しかも、光照射で腫瘍の著明な退縮をみとめた。

現在、蛍光検出用内視鏡/カメラのフィルター系は満足すべきものであるが、カメラは市販のものを改良して試作品を作ったが、focusing が充分でなく、その系の改善を急いでいる。

また、蛍光ナノプローブに関し、HPMA-ZnPP の結合を腫瘍環境応答性をもつ bond にしたものについて評価を進めている。HPMA-ZnPP 間の結合がアミドまたはエステル結合の場合、この結合物は生体内で安定で、free の ZnPP の遊離があまり起こらない。一方、free の ZnPP は蛍光 (イメージング) に加えて Hsp-32 の阻害によりそれ自体で抗腫瘍活性を発現するので、腫瘍部で free の ZnPP を遊離する蛍光ナノプローブにすることはとくに好ましいと我々は考えており、その方向で今後は研究を進める。

腫瘍動物モデルも Autochthonos モデルが最も好ましいので、時間がかかるが、今後はそのモデルを用いた評価を中心に行いたい。

D. 健康危機情報

とくになし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ① J. Fang, K. Greish, H. Qin, H. Nakamura, M. Takeya, and H. Maeda, 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. Biopharma.* 81, 540-547 (2012)
- ② H. 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.* 237, 703-708 (2012)
- ③ Y. Ishima, D. Chen, J. Fang, H. Maeda, A. Minomo, U. Kragh-Hansen, T. Kai, T. Maruyama and M. Otagiri: S-Nitrosated human serum albumin dimer is not only a novel anti-tumor drug but also a potentiator for anti-tumor drugs with augmented EPR effects. *Bioconj. Chem.* 23, 264-271 (2012)
- ④ H. Maeda, Macromolecular therapeutics in cancer

treatment: the EPR effect and beyond, *J. Control. Release*, 164, 138-144 (2012)

- ⑤ 前田 浩, EPR効果に基づく腫瘍のターゲティングと蛍光イメージング, *Progress in Drug Delivery System XXI*, 5-12, 2012 (静岡DDSカンファレンス 同年9月1日開催)
- ⑥ H. Nakamura, L. Liao, Y. Hitaka, K. Tsukigawa, V. Subr, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda, Micelles of zinc protoporphyrin conjugated to *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) copolymer for imaging and light-induced antitumor effects in vivo, *J. Control. Release* 165, 191-198 (2013)
- ⑦ H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improved tumor uptake, less systemic toxicity, and improved tumor imaging - Review of the vascular permeability of tumors and the EPR effect, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 65, 71-79 (2013)
- ⑧ U. Prabhakar, H. Maeda, R. K. Jain, E. Sevick-Muraca, W. Zamboni, O. C. Farokhzad, S.T. Barry, A. Gabizon, P. Grodzinski and D.C. Blakey, Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect (EPR) for nanomedicine drug delivery in oncology, *Cancer Res.* 73, 2412-2417 (2013)
- ⑨ H. Maeda, The link between infection and cancer: Tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect, *Cancer Sci.* (published online, in press, 2013)
- ⑩ J. Fang, T. Seki, T. Tetsuya, H. Qin, H. Maeda, Protection from inflammatory bowel disease and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2, 6-dimethoxyphenol (canolol) via suppression of oxidative stress, *Carcinogenesis* (in press, 2013)
- ⑪ H. Nakamura, H. Maeda, Nanomedicine and cancer drug delivery based on the EPR effect and EPR augmentation, [Eds. I. Uchegbu *et al*] *In Fundamentals in Pharmaceutical Nanosciences*, Springer (in press, 2013)
- ⑫ [翻訳] J.H. Grossman and S. McNeil, Nanotechnology in Cancer Medicine, *Physics Today* 65, 38-42 (2012) Aug. doi: 10.1063/PT3.1678, 「がん治療におけるナノテクノロジー」パリティ誌、丸善書店、8月号 (in press, 2013)

2. 学会発表

- ① Protection of inflammatory bowel diseases and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) via suppressing oxidative stress. J. Fang, T. Seki, T. Tsukamoto, H. Qin, H. Maeda. Keystone Symposia – The role of inflammation during carcinogenesis– (Doubling, Ireland) (2012年5月21日)
- ② The EPR effect as seen by tumor imaging of fluorescent proteins and synthetic nanoparticles. H. Maeda, H. Nakamura, H. Qin, K. Tsukigawa, J. Fang. 9th International Symposium on Polymer Therapeutics (Valencia, Spain) (2012年5月28日~30日)
- ③ Tumor targeting polymeric drugs based on the EPR effect: its augmentation for drug delivery and efficacy, and extension to tumor imaging. H. Maeda, H. Nakamura, K. Tsukigawa, V. Subr, J. Fang, K. Ulbrich, 77th Microsymposium of Prague Meetings on Macromolecules, Polymers in Medicine (Prague, Czech Republic) (2012年7月3日)
- ④ Tumor selective targeting and light induced cytotoxicity of Zn-protoporphyrin conjugated hydroxypropylmethacrylamide polymer (HPMA-ZnPP) micelle. H. Nakamura, Q. Haibo, L. Long, V. Subr, Y. Hitaka, F. Jun, K. Ulbrich, H. Maeda. The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Quebec, Canada) (2012年7月17日)
- ⑤ Nanomedicine Roundtable Discussion: The EPR effect and its augmentation for enhanced tumor drug delivery and imaging. H. Maeda. The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Quebec, Canada) (2012年7月17日)
- ⑥ EPR Workshop: Fluorescent in vivo cancer imaging using macromolecular fluorescent probes. H. Maeda. The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Quebec, Canada) (2012年7月14日)
- ⑦ EPR 効果に基づく高分子製剤の腫瘍ターゲティング、とくに各種ポリマー結合ポリマー結合制癌剤と蛍光性ナノメディスンによる癌の高感度内視鏡的検出と治療、前田 浩、大塚製薬 藤井記念研究所 講演 (滋賀県)、2012年7月27日
- ⑧ EPR 効果に基づく腫瘍のターゲティングと蛍光イメージング、前田 浩、第21回 DDS カンファレンス (静岡)、2012年9月1日
- ⑨ Synthesis and characterization of SMA-copolymer-Cisplatin complex for tumor

targeted delivery based on the EPR-effect、税所 篤行、中村 秀明、前田 浩、第71回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012年9月19~21日

- ⑩ Distinct tumor targeting and fluorescent imaging using nanoparticle based on EPR effect: Toward fluorescent endoscopy、前田 浩、中村 秀明、方 軍、月川 健士、第71回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012年9月20日
- ⑪ The review of EPR effect in solid tumors for macromolecular drug targeting, and further augmentation for imaging and treatment of cancers, H. Maeda, Workshop on Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Nanomedicine (National Institutes of Health in Bethesda, USA) (2012年10月10日)

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

国際出願番号：PCT/JP2012/072640

国際出願日：2012年9月5日

発明者：前田 浩、方 軍、中村 秀明 他

状況：公開

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）

分担研究報告書

HPMA-亜鉛プロトポルフィリンミセル (HPMA-ZnPP)の in vivo PDT 効果の評価

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)は多くの腫瘍に高発現しているヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1, HSP32)を阻害することで、抗腫瘍活性を示す。また、光照射により一重項酸素 (1O_2) を発生することで、PDT (photodynamic therapy)効果を持つと同時に、蛍光を発生することより腫瘍イメージングが可能である。このことより、ZnPP は、がんの治療剤であると同時に蛍光ナノプローブとしての可能性が期待される。ZnPP の水難溶性と低い腫瘍集積性を改善するために、これま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。そのうち、HPMA-ZnPP がその高い腫瘍集積性と腫瘍イメージング能力により注目された。本研究では、前年度の研究成果に基づいて、マウスの移植がんモデルおよびラットの化学発がんモデルを用い、HPMA-ZnPP の PDT 治療効果を中心に検討を行った。マウスザルコーマ S-180 モデルにおいて、朝日分光のキセノン光源を用い、HPMA-ZnPP 濃度依存的、及び照射光の強度、さらに時間依存的に腫瘍増殖の抑制が見られた。HPMA-ZnPP は 20 mg/kg の dose で一回注射し、24 h, 48 h に強度 60%で5分間2回照射した結果、ほとんどの腫瘍 (>70%) が消失した。同様な治療プロトコルで、DMBA 化学誘導のラット乳がんモデルにおいてもほぼ同様な結果が認められ、治療一ヶ月後にほとんどの腫瘍のサイズは直径 15-20 mm から 3-5 mm まで縮小した(>90%抑制)。これらの結果より、HPMA-ZnPP は腫瘍の検出が可能な光線力学診断・治療剤としての可能性が強く示唆された。

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が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年度の研究成果を踏まえ、本年度の分担課題ではその有力な候補である HPMA-ZnPP の高分子ミセルに注目し、その in vivo PDT 治療効果と治療プロトコルを明らかにした。

B. 研究方法

1) HPMA-ZnPP の合成方法はすでに確立している (Nakamura H et al., J Control Release, 165:191-8, 2013)。前年度の報告書を参照。

2) 腫瘍モデル

マウスザルコーマ S-180 モデル : S-180

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) することにより作製する。

マウス大腸がん Colon26 モデル : Colon 26 細胞 (2×10^6) を Balb/c マウス (雄, 5 週零) の背部に皮下注射 (0.1 ml) することにより作製する。

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。

3) PDT 治療 : S-180, Colon26 腫瘍モデルにおいて、腫瘍直径が約 5-7mm になった時に、治療を開始する。DMBA 腫瘍モデルに

においては、腫瘍が発生し触れられるサイズになる（直径が約 15 mm 以上）時に治療を開始する。

治療は HPMA-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。HPMA-ZnPP 投与後 24 h または 48 h に、朝日分光のキセノン光源（MAX303）を用いて各強度で腫瘍に 5 分間照射した。

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い、崇城大学動物実験倫理委員会に承認された上で行なっている。

C. 研究結果

1) HPMA-ZnPP の PDT 治療効果(1)：濃度依存性

図 1 に示したように、HPMA-ZnPP 5mg/kg 単独処理や光照射（80%）強度単独で、すこし腫瘍増殖の抑制が見られたが、光照射と HPMA-ZnPP との combination を行った結果、顕著な、かつ HPMA-ZnPP 濃度依存的な治療効果が見られた。HPMA-ZnPP が 20mg/kg の場合、ただ一回の投与と 3 回の光照射（5 分ずつ、図の矢印で示している）で、治療 40 日後、ほぼ全ての腫瘍が消失した。ところが、80%の強度で光照射だけでも、腫瘍の縮小が見られたので、最適な治療プロトコルには、照射光の強度の減量調整が必要である。

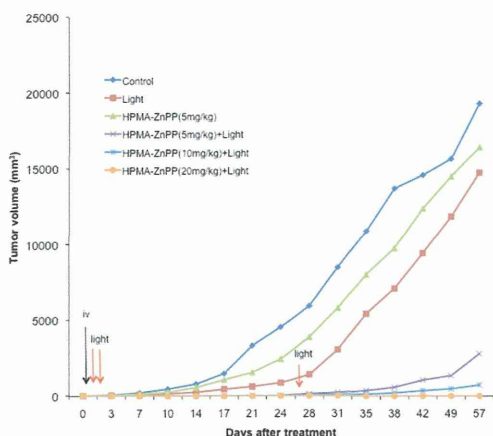


図 1：HPMA-ZnPP の PDT 抗腫瘍効果(1)：濃度依存性。S-180 腫瘍モデルにおいて、HPMA-ZnPP (5-20mg/kg) を経静脈注射後、赤矢印に示したように光照射（朝日分光 MAX303, 80%強度, 5 分間）。

また、いずれの治療においても、動物の体重の顕著な変化が認められなかった。この結果より、本治療法の高い安全性/少ない副作用が示唆された。

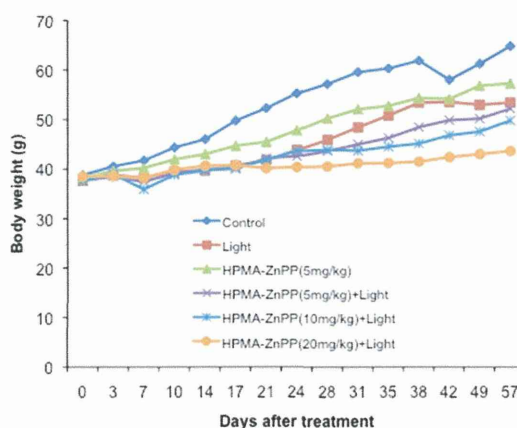


図 2：HPMA-ZnPP の PDT 治療における動物の体重変化。治療プロトコルは図 1 と同様である。

2) HPMA-ZnPP の PDT 治療効果(2)：光照射強度依存性

HPMA-ZnPP : 20mg/kg (ZnPP equivalent) で一回投与し、24 h と 48 h 後に各強度の光で 5 分間照射した結果、照射強度（20 - 40%）依存的な顕著な腫瘍増殖の抑制が見られた。また、60%強度で光照射だけの場合、腫瘍増殖への影響はほとんど見られなかった（図 3）。

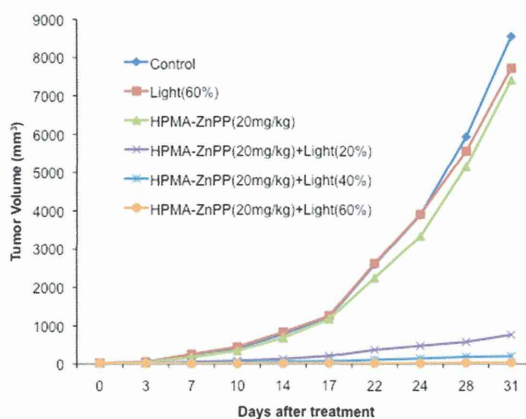


図3：HPMA-ZnPPのPDT抗腫瘍効果(2)：照射強度依存性。光照射はHPMA-ZnPP投与24h, 48h後に行った。光源、朝日分光MAX303, power 60%；照射距離：10 cm、照射時間：5分間。腫瘍モデル：マウスS-180モデル。

以上の結果より、HPMA-ZnPPのPDT治療の至適プロトコールは以下のように考えられた。HPMA-ZnPP, 20 mg/kg；照射強度、40-60%（朝日分光MAX303）；照射時間、5分間。

さらに、本治療においても、動物体重の変化等は認められず、毒性はないと考えられた（図4）。

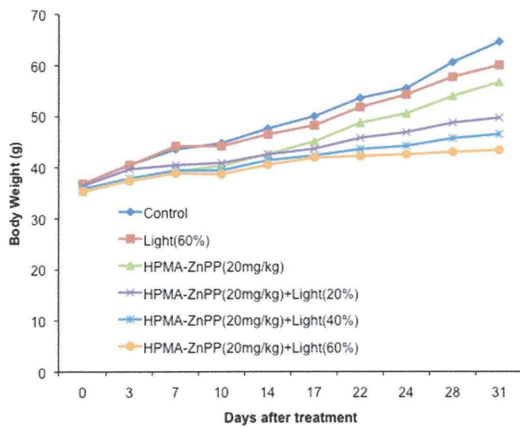


図4：HPMA-ZnPPのPDT治療における動物の体重変化。治療プロトコールは図3と同様である。

3) HPMA-ZnPPのPDT治療効果(3)：ラットDMBA化学誘導乳がんモデルにおける治療効果

上記の至適プロトコールで行った。HPMA-ZnPP：20mg/kg (ZnPP equivalent)で一回投与し、24hと48h後に40%強度の光で5分間照射した結果、顕著な腫瘍増殖の抑制が見られた。また、HPMA-ZnPP単独では治療効果が見られなかった（図5）。

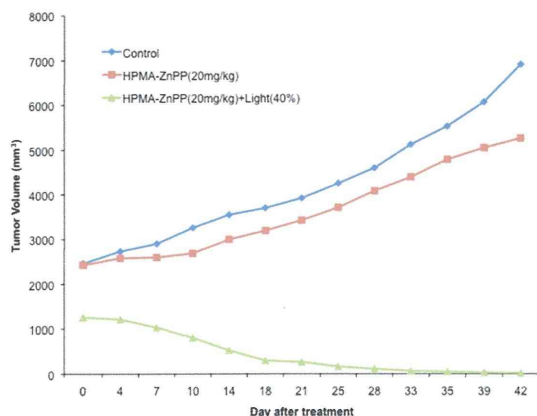


図5：ラットDMBA化学誘導乳がんモデルにおけるHPMA-ZnPP治療効果

図6に各治療グループの治療前後の腫瘍の変化が示されている。コントロールの腫瘍は著しく進行し、増大したが、HPMA-ZnPPのPDT治療により、腫瘍の著明な縮小が認められた。治療60日後に、腫瘍の増殖が完全に抑えられた。

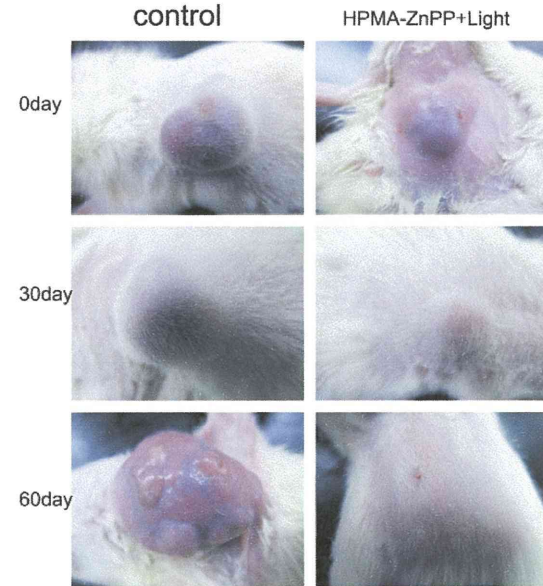


図6：ラットDMBA化学誘導乳がんモデルにおけるHPMA-ZnPP治療効果。HPMA-ZnPP/光照射治療後、腫瘍がだんだんと縮小し、60日後の時点で、腫瘍がほとんど消滅した。

D. 考察

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 (1O_2)を生成することをに基づき、この活性酸素(ROS)の細胞毒性による光線力学療法(PDT)の検討を行った。また、高価なレーザー光源ではなく、連続波長のキセノン光源を用いる光化学療法の有用性を検討した。さらに、ZnPPの蛍光性質により、腫瘍検出する同時にPDT治療を行なうことを目指した。

ZnPPの水難溶性と低い腫瘍選択性(低分子のため)等の欠点を改善するため、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、効率のかつ副作用の少ない抗癌作用が得られると考えられる。

前年度の研究で、各ZnPPミセルの物理化学的性質、体内動態、腫瘍集積性等を検討した結果、HPMA-ZnPPは優れた血中安定性と腫瘍集積性 (EPR 効果) を示すことが分かった。このため、本年度の研究はHPMA-ZnPPを中心に進めた。

前年度の結果で、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。これはHPMA-ZnPPの低い細胞内取込みに関わると考えられる。この問題点を解決するため、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、その作製に成功した (中村秀明 報告書を参照)。そのin vitro, in vivoの抗腫瘍活性について、現在検討を進めている。

ところが、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。このPDT治療効果は本年度の研究でさらにマウスS-180腫瘍モデル及びラットDMBA化学誘導乳がんモデルにおいて確認された。この結果より、動物モデルにおけるHPMA-ZnPPのPDT治療の至適プロトコールが得られた (結果を参照)。さらに重要なことに、本当のヒトの癌に近い、ラットDMBA化学発癌による自家乳がんモデルにおいて、腫瘍がだいぶ大きくなった時点で (図6) 治療しても、完治に近い顕著な腫瘍の縮小が得られた (図6)。これらの結果は、HPMA-ZnPPミセルの照射治療の有用性が強く示唆された。また、この結果と、HPMA-ZnPPの腫瘍イメージングの結果 (中村秀明 報告書を参照) 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

HPMA-ZnPPは優れた腫瘍集積性により、

顕著なPDT治療効果がみとめられた。またその独特な蛍光性質により、腫瘍検出用の蛍光ナノプローブのPDT治療剤として、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される。

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) Nakamura H, Liao L, Hitaka Y, Tsukigawa K, Subr V, Fang J, Ulbrich K, Maeda H. *Micelles of zinc protoporphyrin conjugated to N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) copolymer for imaging and light-induced antitumor effects in vivo.* **J Control Release.** 2013;165(3):191-8.
- 2) Maeda H, Nakamura H, Fang J. *The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo.* **Adv Drug Deliv Rev.** 2013;65(1):71-9.
- 3) Nakamura H, Fang J, Mizukami T, Nunoi H, Maeda H. *PEGylated D-amino acid oxidase restores bactericidal activity of neutrophils in chronic granulomatous disease via hypochlorite.* **Exp Biol Med (Maywood).** 237(6):703-8, 2012.
- 4) 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.** 81(3):540-7, 2012.
- 5) Ishima Y, Chen D, Fang J, Maeda H, Minomo A, Kragh-Hansen U, Kai T, Maruyama T, Otagiri M. *S-Nitrosated Human Serum Albumin Dimer is not only a Novel Anti-Tumor Drug but also a Potentiator for Anti-Tumor Drugs with*

Augmented EPR Effects. Bioconjug Chem.
23(2):264-71, 2012.

Symposia 2012 in Dublin. Dublin,
Ireland, May 20-24, 2012.

2. 学会発表

- 1) Jun Fang, Gahininath Y. Bharate, Haibo Qin, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda. *Water-soluble polymeric xanthine oxidase inhibitors as a novel therapeutic for ROS related inflammatory diseases. ICBS2013 in Tsukuba.* Tsukuba, Japan, March 19-22, 2013.
- 2) Jun Fang, Hideaki Nakamura, Haibo Qin, Vladimir Subr, Yuki Hitaka, Karel Ulbrich, Hiroshi Maeda. *Tumor targeted imaging and photodynamic therapy by HPMA-polymer conjugated Zn-protophyrin micelle.* **71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.** Sapporo, Japan, Sept. 19-21, 2012.
- 3) Jun Fang, Gahininath Y. Bharate, Haibo Qin, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda. *Water soluble polymeric xanthine oxidase inhibitor, PEG-AHPP micelles, as a novel therapeutic for ROS related inflammatory bowel diseases. The 39th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society.* Quebec city, Canada, July 15-18, 2012.
- 4) Jun Fang, Gahininath Y. Bharate, Haibo Qin, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda. *Therapeutic effect of polymer-AHPP micelle on inflammatory colitis.* **28th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System.** Sapporo, Japan, July 4-5, 2012.
- 5) Jun Fang, Takahiro Seki, Tetsuya Tsukamoto, Haibo Qin, Hiroshi Maeda. *Protection of inflammatory bowel diseases and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) via suppressing oxidative stress.* **Keystone**

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

発明の名称：高分子型蛍光分子プローブ

国際出願番号：PCT/JP2012/072640

国際出願日：2012年9月5日

発明者：前田 浩、方 軍、中村 秀明 他

状況： 公開

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）
分担研究報告書

蛍光内視鏡に使用する蛍光ナノプローブに関する研究

研究分担者 中村 秀明 崇城大学 DDS 研究所/薬学部 助教

研究要旨

①化学発がんラット（自家癌モデル）を用いた腫瘍の蛍光イメージング、および②新規の高分子蛍光イメージング剤の合成を目的として研究を行った。①前年度までは移植腫瘍を用いて蛍光イメージングを行い、良好な結果が得られた。本年度はより本物の癌に近い自家化学発がんマウスモデル（AOM/DSS 誘導大腸がん）を用い、蛍光イメージングの可否に関して検討を行った。大腸がんは蛍光内視鏡の適用候補の第一になると考えられる。前年度に報告した HPMA-ZnPP ならびにローダミン結合ウシ血清アルブミン（BSA-ローダミン）を用いて検討した。両薬剤とも *in vivo* 蛍光イメージング装置を用いることで癌の蛍光イメージングが可能であった。さらに、BSA-ローダミンを投与したマウスにおいてはプロトタイプの蛍光内視鏡を用いて、明瞭に癌の検出が可能であった。

②腫瘍の酸性 pH でフリーの ZnPP を結合高分子から放出しうる高分子ナノプローブの合成を行った。高分子ポリマー（HPMA）に亜鉛プロトポルフィリン（ZnPP；蛍光分子、光増感剤）をヒドラゾン結合（酸で解離）で結合した HPMA-hyd-ZnPP を新規に合成した。HPMA-hyd-ZnPP は腫瘍環境下でフリーの ZnPP を放出するように設計した高分子結合体であり、より安定な結合体の HPMA-ZnPP に比べ高い抗腫瘍効果を示すとともに、高い腫瘍の蛍光検出能が期待できた。HPMA-hyd-ZnPP は 20nm 程度のナノ粒子を形成した。また前年度報告の HPMA-ZnPP に比べ、細胞傷害性および光増感作用が増強していることを *in vitro* の実験により明らかにした。詳細な検討はまだであるが、腫瘍の蛍光イメージングも可能であった。

I. 研究成果

① HPMA-ZnPP または BSA-ローダミンによる AOM/DSS 誘発大腸癌の検出（蛍光イメージング装置）

蛍光検出が可能であるかを検討した（*in vivo* 蛍光イメージング装置）（図 2、3）。

A. 研究目的

1) 蛍光ナノプローブ（BSA-ローダミン）を合成し、それを用いて、蛍光内視鏡による AOM/DSS 誘発大腸癌（自家癌）の蛍光検出が可能であるかを検討した（図 1）。

2) 蛍光ナノプローブ（HPMA-ZnPP）を合成し、それを用いて AOM/DSS 誘発大腸癌（自家癌）の

B. 方法

1) アゾキシメタン（AOM）およびデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）により大腸癌を誘発した。BSA-ローダミン（200 mg/kg）または HPMA-ZnPP（75 mg/kg）を尾静脈投与し、開腹後、蛍光イメージング装置（IVIS）で蛍光観察を行った（図 1、2）。

2) BSA-ローダミン（200 mg/kg）を AOM/DSS

誘発大腸癌モデルマウスに投与し、24時間後に開腹し、蛍光内視鏡を用いて蛍光観察を行った(図3)。

C. 結果

1) -1

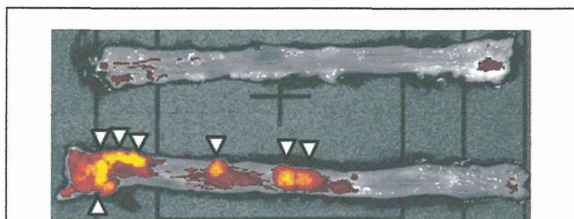


図1 BSA-ローダミンによる大腸がんの蛍光イメージング (IVIS) 正常の大腸(上)では蛍光が見られないが、担癌大腸(下)では、癌部位特異的に蛍光が認められる。矢印は癌を示す。

1) -2

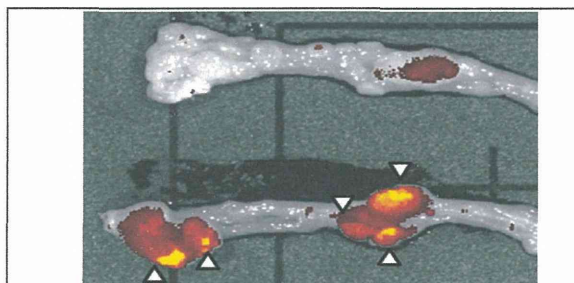


図2 HPMA-ZnPPによる大腸がんの蛍光イメージング(IVIS) コントロール(薬剤の投与なし)(上)。担癌大腸(下)では、癌部位特異的に蛍光が認められる。矢印は癌を示す。

2)

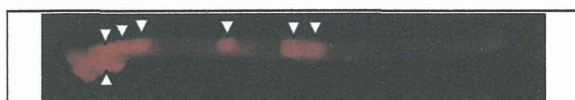


図3 BSA-ローダミンによる大腸がんの蛍光イメージング(蛍光内視鏡) 腫瘍部位特異的に蛍光が認められ、正常部には蛍光が認められない。矢印は腫瘍を示す。

D. 考察

前年度の報告では、S-180 移植癌に対して蛍光イメージングが可能であることを検討した。本年度は化学発癌マウスに対しても同様に蛍光イメージングが可能であることを検討したところ、高いコントラスト比で腫瘍の蛍光イメージングが可能であった。本結果は蛍光内視鏡に対するアプリケーションに合致した癌であり、かつより本物(臨床)に近い癌であるといえる。さらに試作型の蛍光内視鏡によっても癌の蛍光イメージングを行ったところ、蛍光イメージング装置と同様に蛍光観察が可能であった。現状は臓器を体外に摘出後に観察を行っているが、今後は体腔内で腫瘍の蛍光観察が可能であることを、腹膜腫や大腸がん等またはラットなどのより大型の動物を用いて検討を行いたい。

② HPMA-hyd-ZnPP の合成と抗腫瘍効果の評価

A. 研究目的

1) HPMA-ZnPP の改良型として、腫瘍部でより強い蛍光および一重項酸素を発生させることを目的として HPMA-hyd-ZnPP を合成する。このものは腫瘍部などの低 pH 条件において遊離の低分子 ZnPP 化合物を放出する。従来の HPMA-ZnPP はアミドやエステル結合を介しており、容易に ZnPP が放出されない(高分子化合物として存在する)ため、蛍光や一重項酸素の発生が制限されるが、本化合物では遊離の ZnPP が放出されるため、より強い蛍光発生および一重項酸素発生能が期待される(図4~7)。

2) HPMA-hyd-ZnPP の水溶液中での挙動(粒子サイズ、ゼータ電位)を明らかにする(図8)。

3) HPMA-hyd-ZnPP の細胞傷害性を明らかにする(図9、10)。

4) HPMA-hyd-ZnPP を用い、腫瘍の蛍光イメージングが可能であることを検討する(図11)。

B. 方法

1) 下記に示す合成経路により合成を行った。

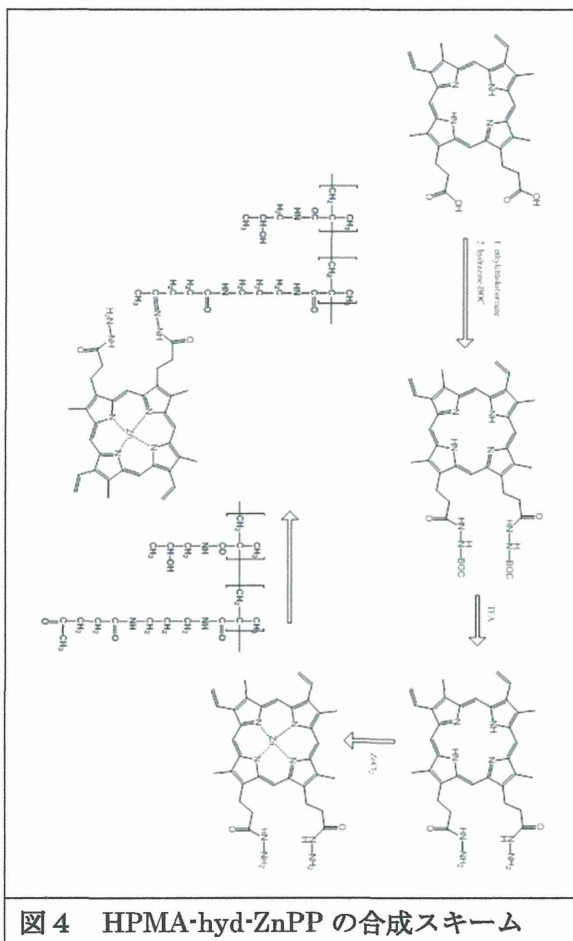


図4 HPMA-hyd-ZnPPの合成スキーム

プロトポルフィリン IX (PP) のカルボキシル基をクロロギ酸エチルを用いて活性化したのち、片側を BOC 基で保護したヒドラジン (BOC-hydrazine) を反応させ PP-hydrazide-BOC を合成した。PP-hydrazide-BOC をトリフルオロ酢酸中で脱 BOC した後に、塩化亜鉛を用いて PP のテトラピロール環に亜鉛を配位させ ZnPP-hydrazide を得た。ケト基を有するポリ HPMA と ZnPP-hydrazide をトリフルオロ酢酸を触媒としてメタノール中で反応させ、HPMA-hyd-ZnPP を得た。未反応の ZnPP-hydrazide はゲル浸透クロマトグラフィにより除いた (図4~7)。

2) HPMA-hyd-ZnPP を PBS 中に 2mg/ml の濃度で溶解、シリンジフィルタ (0.25 μ m) を用いフィルタ濾過を行った後に、動的光散乱測定装置

(ELS-Z2、大塚) を用いて粒子径およびゼータ電位を測定した (図8)。

3) HeLa 細胞を 96well プレートに 3000 細胞/well となるように播種し、24 時間後に ZnPP または HPMA-hyd-ZnPP を処理した。処理 24 時間後に青色蛍光灯 (422nm, 1mW/cm²) を 15 分間照射し、48 時間培養後に MTT 法により細胞生存率を測定した (図9、10)。

4) S-180 担がんマウス (腫瘍径 10~15mm) に 76mg/kg (ZnPP 量として 4mg/kg) の HPMA-hyd-ZnPP を尾静脈投与した。投与 12 時間後に in vivo 蛍光イメージング装置を用いて蛍光観察を行った (図11)。

C. 結果

1) -1

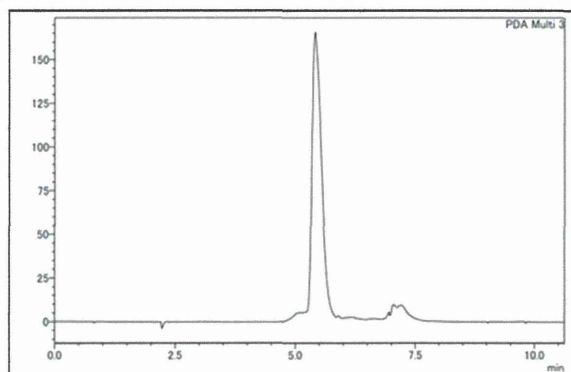


図5 ZnPPヒドラジドのHPLC解析 プロトポルフィリン (RT=11.5 min) のピークが消失し RT=5.5min に新しいピークが見られる。

1) -2

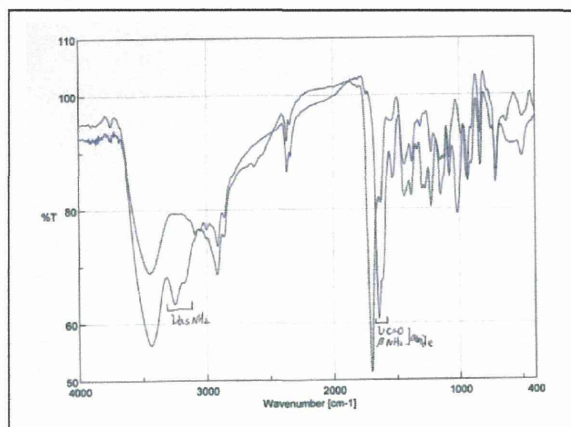


図6 ZnPP ヒドラジドの赤外分光解析
ZnPP に見られるカルボキシル基のピーク
(1700cm^{-1} 付近) のピークが消失し、
ZnPP-hydrazide では新たなアミドピーク
(1650cm^{-1} 付近) およびアミノ基のピーク
(3200cm^{-1} 付近) が認められる。

1) - 3

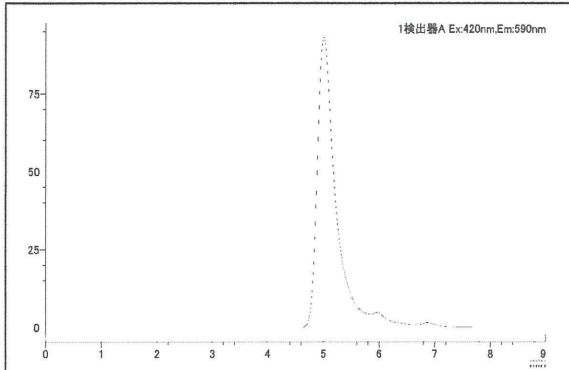


図7 HPMA-hyd-ZnPP の HPLC 解析
ZnPP-hydrazide(RT=5.5min)が消失し、新たに
RT=4.9min にピークが見られた。

2)

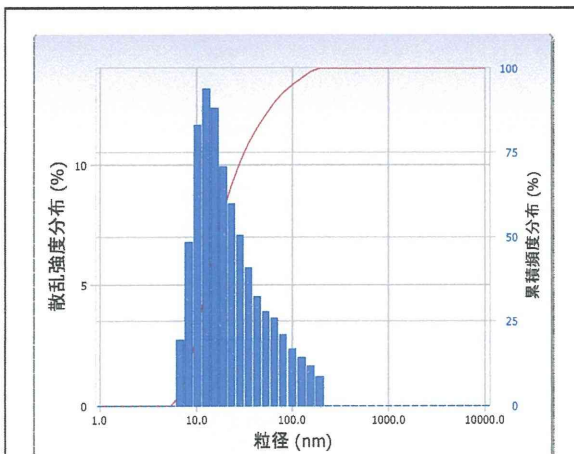


図8 HPMA-hyd-ZnPP の粒子径分布とゼータ
電位 PBS 中では、平均粒子径としておよ
そ 20.3nm の大きさの粒子を形成している。

3) - 1

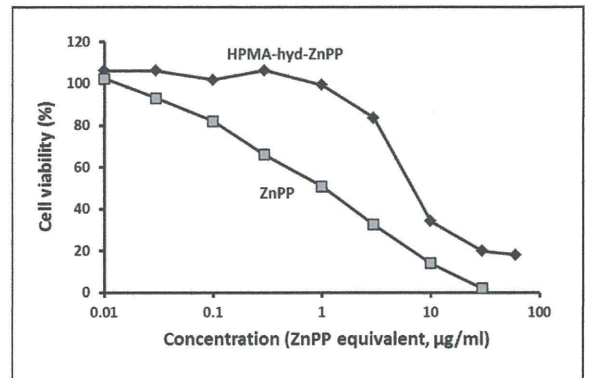


図9 HPMA-hyd-ZnPP の細胞傷害性

3) - 2

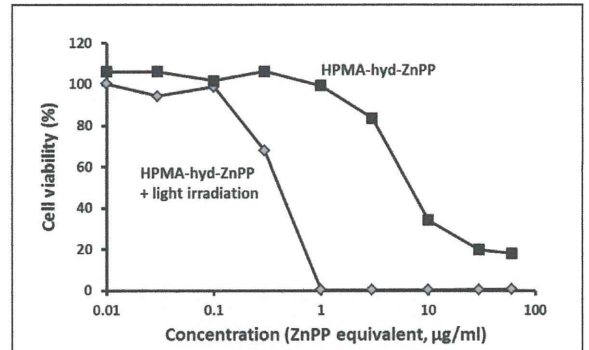


図10 HPMA-hyd-ZnPP の光細胞傷害性

4)

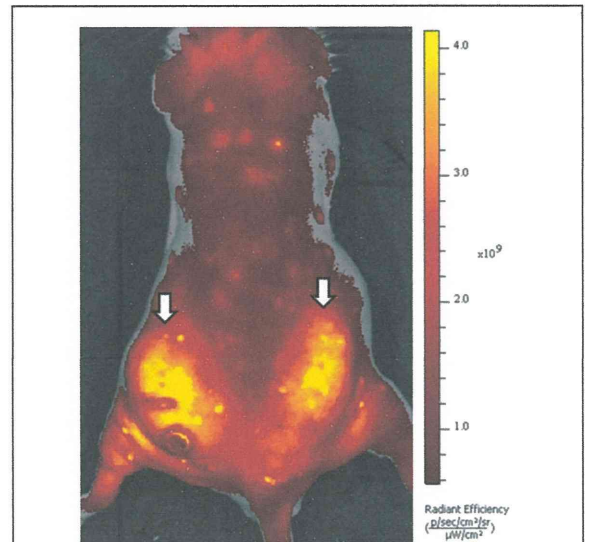


図11 HPMA-hyd-ZnPP による腫瘍の蛍
光イメージング

D. 考察

本年度はヒドラゾン結合を介し HPMA と ZnPP を結合した HPMA-hyd-ZnPP を合成した。HPLC で検討した結果では、90%以上の高い純度のものが合成でき、ZnPP の内包率としておよそ5%であった。水溶性も向上しており、HPMA-hyd-ZnPP として50mg/ml以上の濃度で蒸留水中に溶解することができた。

HPMA-ZnPP (非切断型、内包率20%)は粒子径が80nmと大きなナノ粒子を形成していたが、本年度作成した HPMA-hyd-ZnPP (酸切断型、内包率5%)は20nmと比較的小さい粒子サイズであった。この違いはZnPPの内包率によるものと考えられ、今後は内包率との関係を調べていきたい。粒子径20nmはEPR効果による腫瘍集積性を示すには十分なサイズであるため、今回作成した HPMA-hyd-ZnPP も昨年度に作成したものと同様に腫瘍集積性を示すと考えられる。

他の高分子薬物と同様に HPMA-hyd-ZnPP はフリーの ZnPP に比べ低い細胞傷害性を示した。しかし、HPMA-ZnPP が100 μ g/mlでもまったく細胞傷害性を示さなかったのに対し、HPMA-hyd-ZnPP は $IC_{50}=5\sim 7\mu$ g/mlを示し、細胞傷害性が増強していた。また光細胞傷害性も増強しており、HPMA-ZnPP ($IC_{50}=6\sim 9\mu$ g/ml)に対し、HPMA-hyd-ZnPP では $IC_{50}=0.5\sim 0.6\mu$ g/mlと高い細胞傷害性を示した。HPMA-hyd-ZnPP はフリーの ZnPP を細胞内または細胞外でフリーの ZnPP を放出しうるため、非切断型の HPMA-ZnPP に比べ優位な細胞傷害性を示すことができたと考えられる。

前年度報告の HPMA-ZnPP と同様に腫瘍の蛍光イメージングは可能であった。投与量の最適化などの検討はできておらず、より明瞭に癌の検出が可能となると確信している。今後は、非切断型 HPMA-ZnPP と酸解離型 HPMA-hyd-ZnPP を用いた比較検討も行っていきたい。

II. 研究発表

1. 論文発表

1. H. 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.* 237, 703-708 (2012)
2. H. Nakamura, L. Liao, Y. Hitaka, K. Tsukigawa, V. Subr, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda, Micelles of zinc protoporphyrin conjugated to *N*(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer for imaging and light-induced antitumor effects in vivo, *J. Control. Release* 165, 191-198 (2013)
3. H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improved tumor uptake, less systemic toxicity, and improved tumor imaging – Review of the vascular permeability of tumors and the EPR effect, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 65, 71-79 (2013)

[Monograph]

1. H. Nakamura, H. Maeda, Nanomedicine and cancer drug delivery based on the EPR effect and EPR augmentation, *In Fundamentals in Pharmaceutical Nanosciences*, Springer (2013, August)

2. 学会発表

1. The EPR effect as seen by tumor imaging of fluorescent proteins and synthetic nanoparticles. H. Maeda, H. Nakamura, H. Qin, K. Tsukigawa, J. Fang. 9th International Symposium on Polymer Therapeutics (Valencia, Spain) (2012年5月28日~30日)
2. Tumor targeting polymeric drugs based on the EPR effect: its augmentation for drug delivery and efficacy, and extension to tumor imaging. H. Maeda, H. Nakamura, K. Tsukigawa, V. Subr, J. Fang, K. Ulbrich, 77th Microsymposium of Prague Meetings on Macromolecules, Polymers in Medicine (Prague, Czech Republic) (2012年7月3日)