

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%、II期では45.9%が5年生存し、III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。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) ファイバー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 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存率を測定。[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ザ-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、血液内にあつてはミセル内にコンパクトに重層しており、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 を生ずるといった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会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。

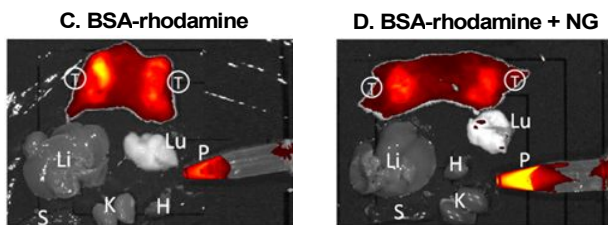
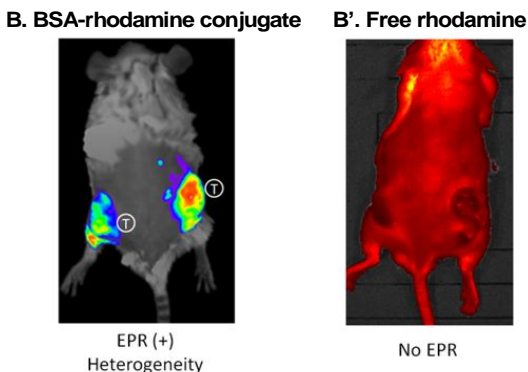
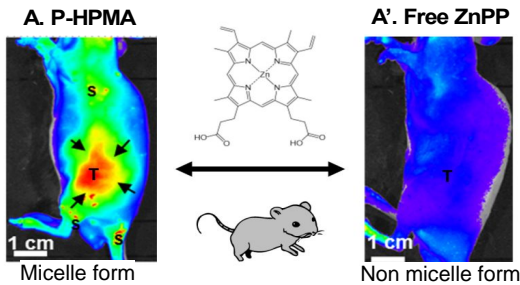


図1. HPMAポリマー結合ZnPP (A)あるいはアルブミンに結合のローダミン (B) を静注後、数時間後に光照射すると、腫瘍部は強い蛍光像を示した。In vitroでは著明な一重項酸素を生成し、強抗腫瘍効果を示すことを確認した(図4)。C, Dは腫瘍(T)とそれ以外の臓器を剖検したときの蛍光像を示している。特にニトログリセリン(NG)投与により血中濃度(P)が高く維持され、腫瘍においてはより均一な蛍光染色をみた。

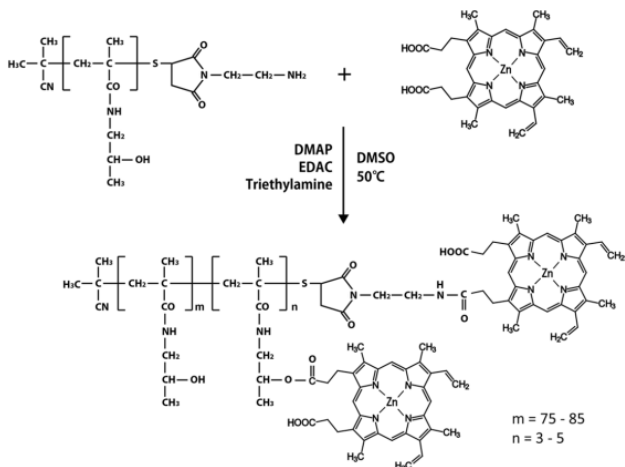
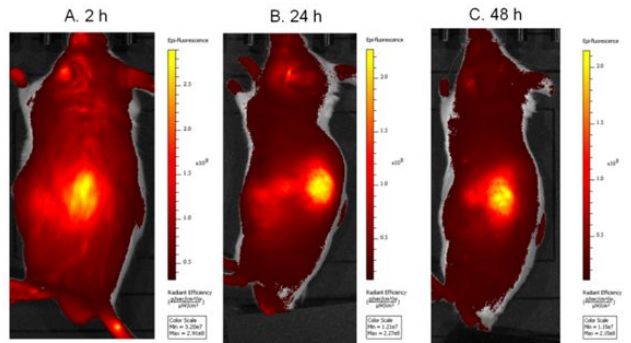


図2. HPMAポリマー-ZnPP結合体の合成。結合物は水溶液中で自然にミセルになる。



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。

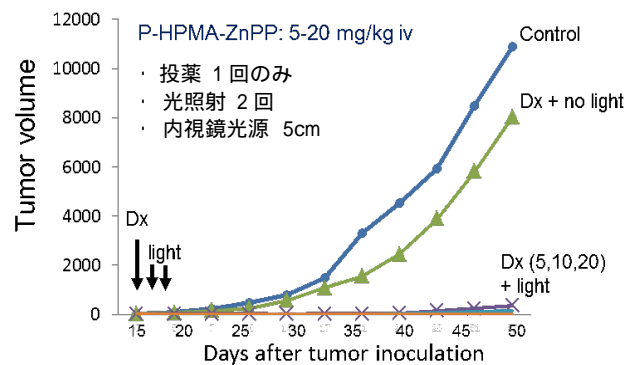
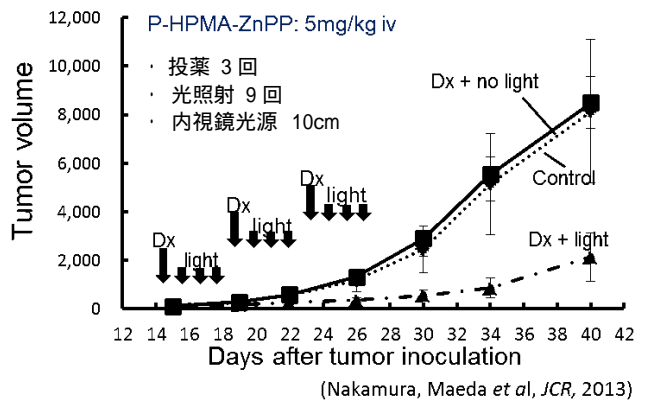


図4. HPMA - ポリマー結合 ZnPP iv 投与後、光照射による抗腫瘍効果。光源は内視鏡 xenon 光で 400 ~ 700nm. Dx は薬剤。5, 10, 20mg/kg 投与。

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)。

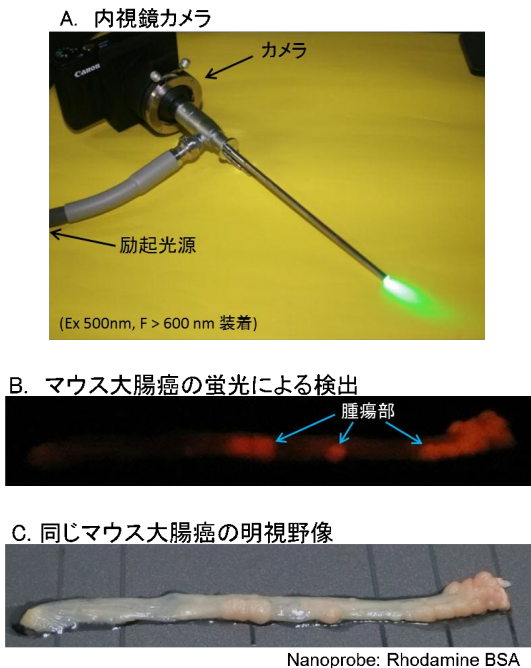
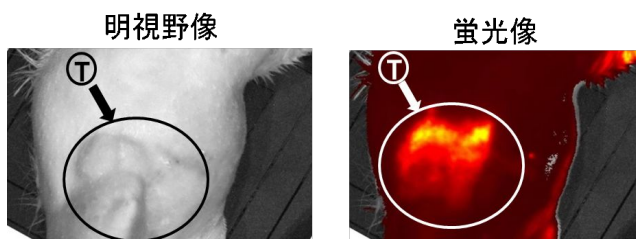


図5. 蛍光内視鏡による大腸癌の検出



DMBA induced autochthonous breast cancer in rat.

図6. ラット乳癌の蛍光イメージ/HPMA-ZnPP

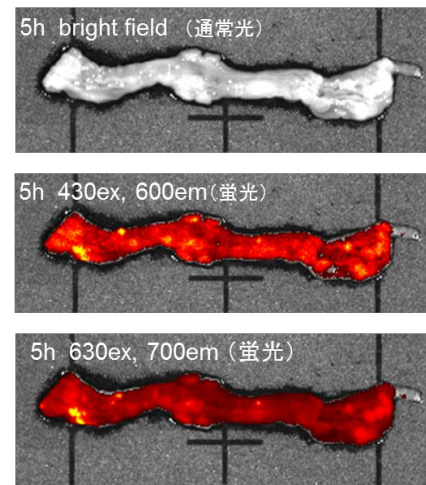


図7. レザフィリンによるマウス大腸癌の蛍光検出。上の現在実用化されているレザフィリンによるPDTは、腫瘍選択性がほとんどない。(文献 C.J. Gomer & A. Ferrario, *Cancer Res.* 50, 3985-3990, 1990)

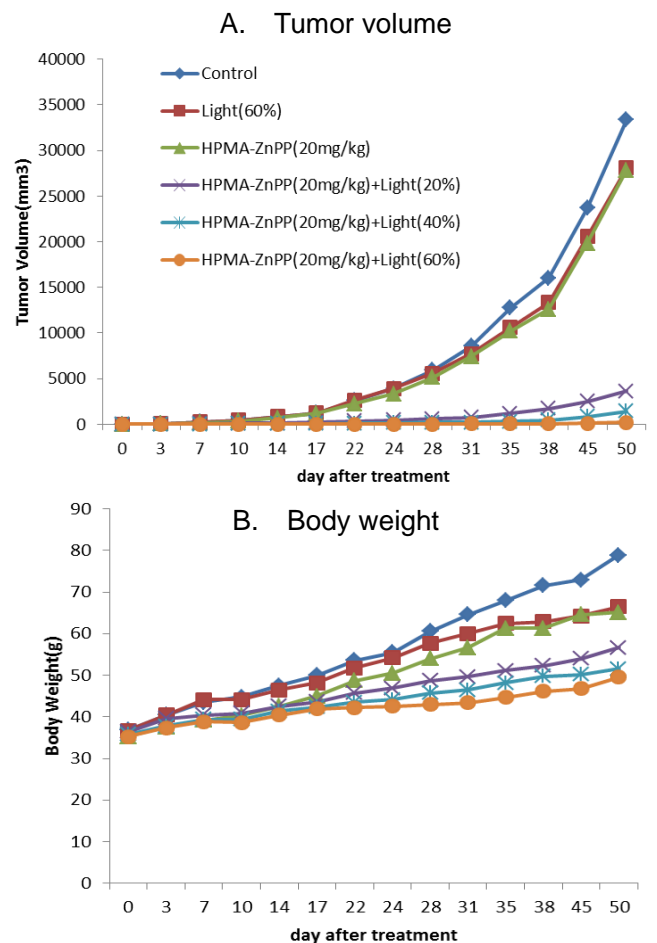


図8. A. HPMA-ZnPP結合物投与マウスの抗腫瘍効果。B. HPMA-ZnPP結合物投与マウスの体重変化(毒性評価)。HPMA-ZnPP 20g/kgで光源出力40%、60%でも50日後にはほぼ完治し、尚かつ副作用等毒性は現れなかった。光照射なしでは何れの効果もない。

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 Autochthonous 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

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)

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)

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. **Bioconjug. Chem.** 23, 264-271 (2012)

H. Maeda, Macromolecular therapeutics in cancer

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

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)

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)

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)

U. Prabhakar, H. Maeda, R. K. Jain, E. Sevcik-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)

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)

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)

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)

[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

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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

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

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

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

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