

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ールで、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ールを明らかにした。

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 benanthracene) 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。

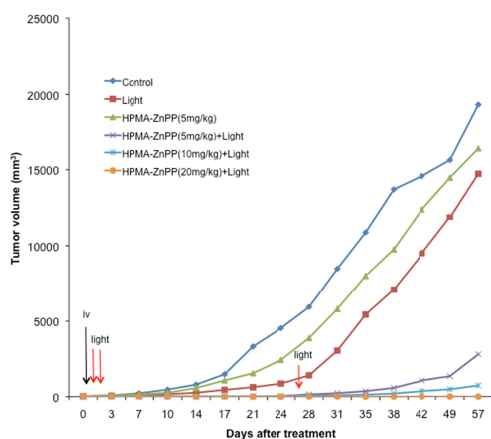


図 1：HPMA-ZnPP の PDT 抗腫瘍効果(1)：濃度依存性。S-180 腫瘍モデルにおいて、HPMA-ZnPP (5-20mg/kg) を経静脈注射後、赤矢印に示したように光照射（朝日分光 MAX303, 80%強度, 5 分間）。

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。

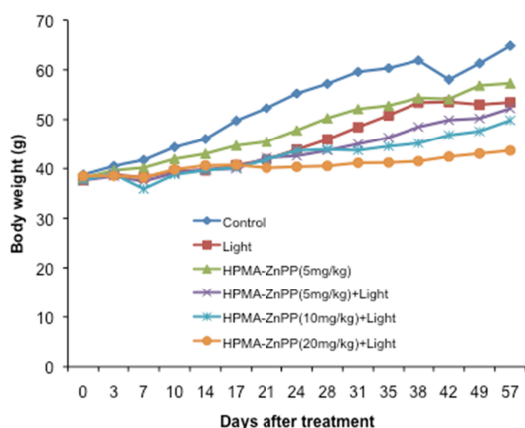


図 2：HPMA-ZnPP の PDT 治療における動物の体重変化。治療プロトコルは図 1 と同様である。

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）。

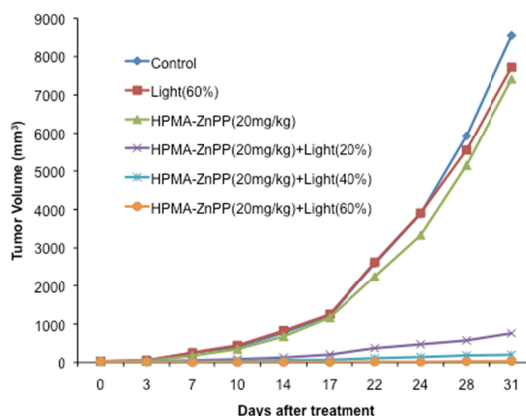


図 3：HPMA-ZnPP の PDT 抗腫瘍効果(2)：光照射強度依存性。光照射は HPMA-ZnPP 投与 24h, 48h 後に行った。光源、朝日分光 MAX303, power 60%；照射距離：10 cm、照射時間：5 分間。腫瘍モデル：マウス S-180 モデル。

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）。

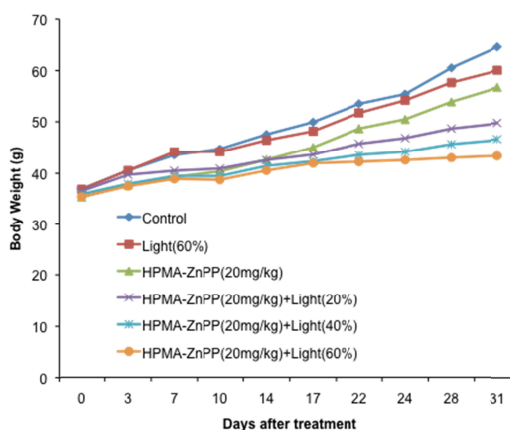


図 4：HPMA-ZnPP の PDT 治療における動物の体重変化。治療プロトコルは図 3 と同様である。

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ルで行った。HPMA-ZnPP：20mg/kg (ZnPP equivalent) で一回投与し、24 h と 48 h 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つた (図 5)。

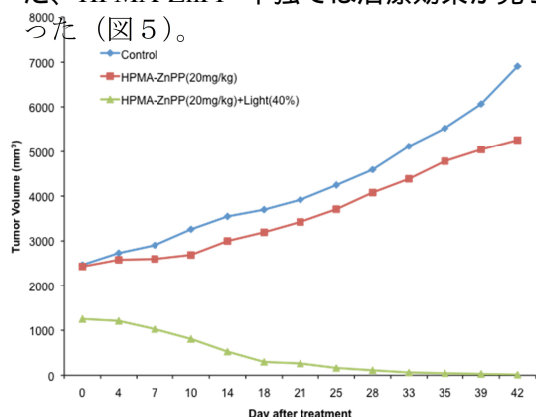


図 5 : ラット DMBA 化学誘導乳がんモデルにおける HPMA-ZnPP 治療効果

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。

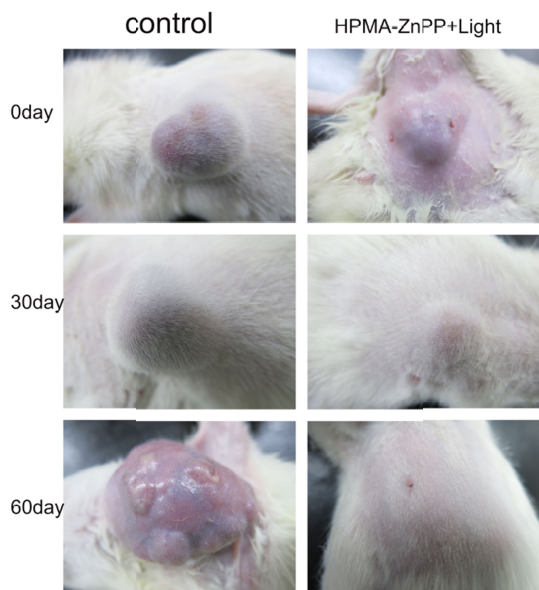


図 6 : ラット DMBA 化学誘導乳がんモデルにおける HPMA-ZnPP 治療効果。HPMA-ZnPP / 光照射治療後、腫瘍がだんだんと縮小し、60 日後の時点で、腫瘍がほとんど消滅した。

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、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。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 ミセルの光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.

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

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

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。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。

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。

・ 研究成果

**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）**

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)。

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

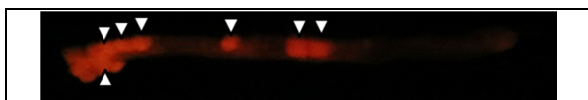


図3 BSA-ローダミンによる大腸がんの蛍光イメージング(蛍光内視鏡) 腫瘍部位特異的に蛍光が認められ、正常部には蛍光が認められない。矢印は腫瘍を示す。

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

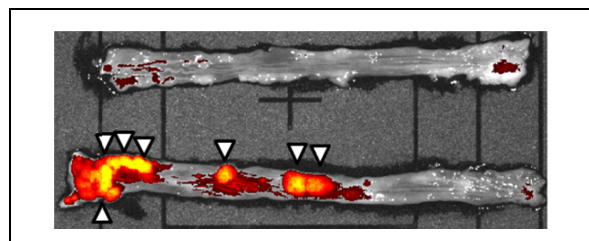


図1 BSA-ローダミンによる大腸がんの蛍光イメージング (IVIS) 正常の大腸 (上) では蛍光が見られないが、担癌大腸 (下) では、癌部位特異的に蛍光が認められる。矢印は癌を示す。

1)-2

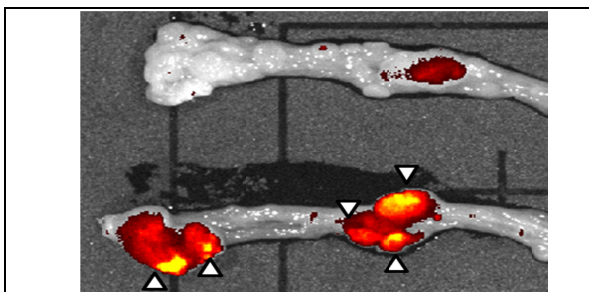


図2 HPMA-ZnPP による大腸がんの蛍光イメージング (IVIS) コントロール (薬剤の投与なし) (上)。担癌大腸 (下) では、癌部位特異的に蛍光が認められる。矢印は癌を示す。

2)

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かを検討した。本年度は¹⁴⁾ 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かを検討したところ、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かを、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。

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)。

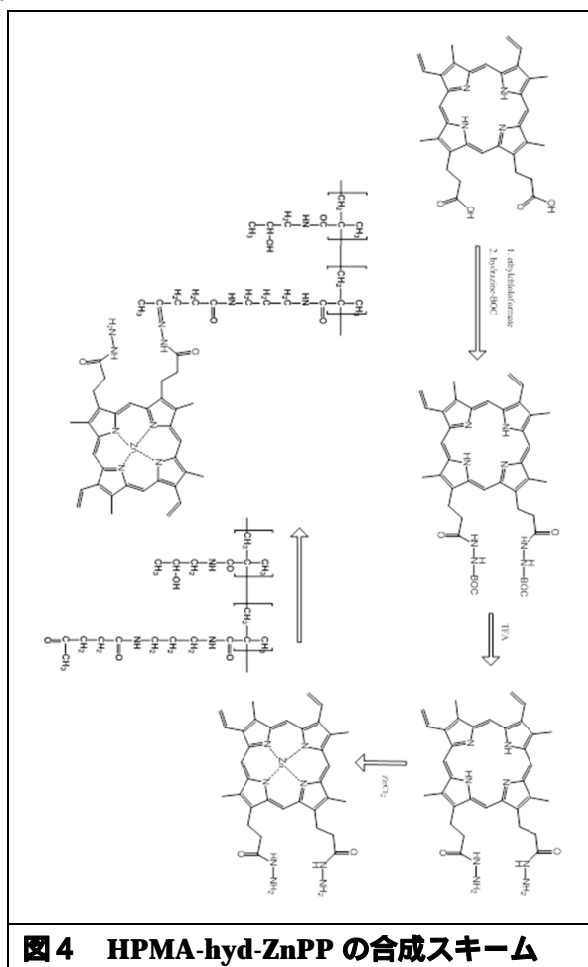
2) HPMA-hyd-ZnPP の水溶液中での挙動 (粒子サイズ、ゼータ電位) を明らかにする (図8)。

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かを検討する (図11)。

B. 方法

1) 下記に示す合成経路により合成を行った。



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 (0.25um) 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

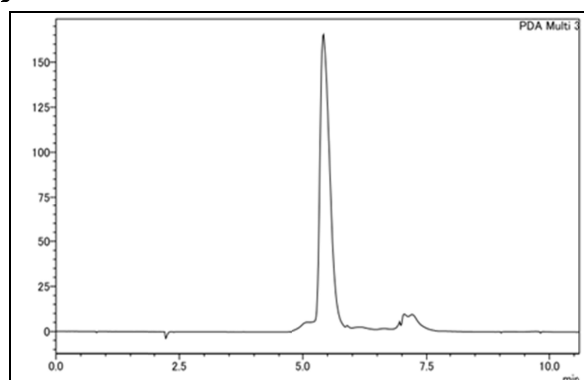


図5 ZnPP ヒドラジドのHPLC解析 プロトポルフィリン (RT = 11.5 min) のピークが消失し RT = 5.5min に新しいピークが見られる。

1) - 2

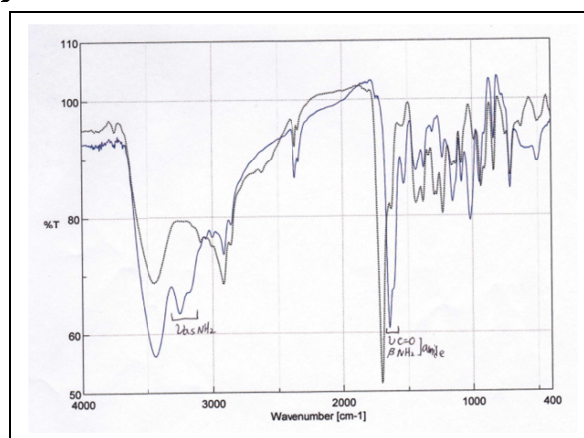


図6 ZnPP ヒドラジドの赤外分光解析
 ZnPP に見られるカルボキシル基のピーク (1700 cm^{-1} 付近) のピークが消失し、ZnPP-hydrazide では新たなアミドピーク (1650 cm^{-1} 付近) およびアミノ基のピーク (3200 cm^{-1} 付近) が認められる。

3) - 1

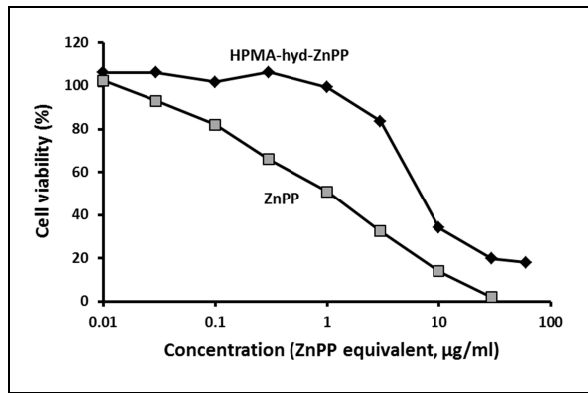


図9 HPMA-hyd-ZnPP の細胞傷害性

1) - 3

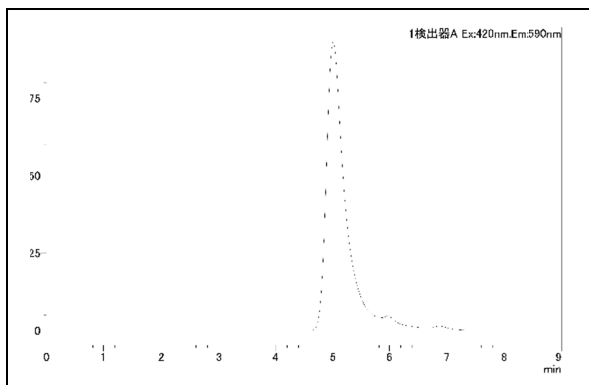


図7 HPMA-hyd-ZnPP の HPLC 解析
 ZnPP-hydrazide (RT=5.5min) が消失し、新たに RT=4.9min にピークが見られた。

3) - 2

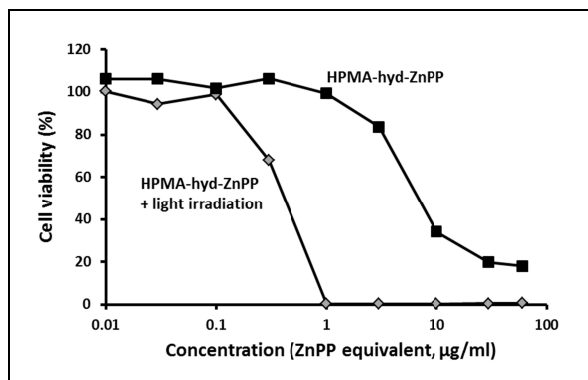


図10 HPMA-hyd-ZnPP の光細胞傷害性

2)

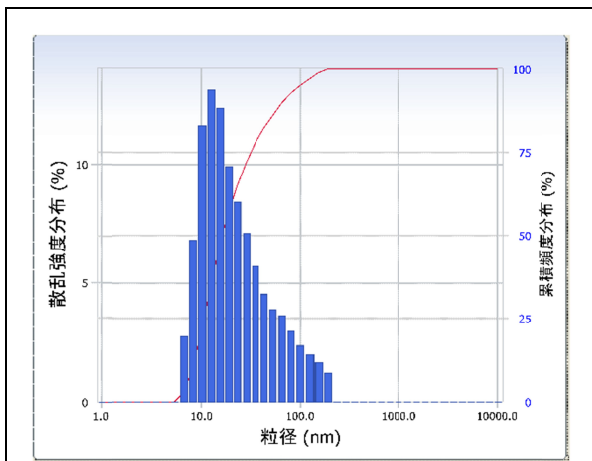


図8 HPMA-hyd-ZnPP の粒子径分布とゼータ電位 PBS 中では、平均粒子径としておよそ 20.3nm の大きさの粒子を形成している。

4)

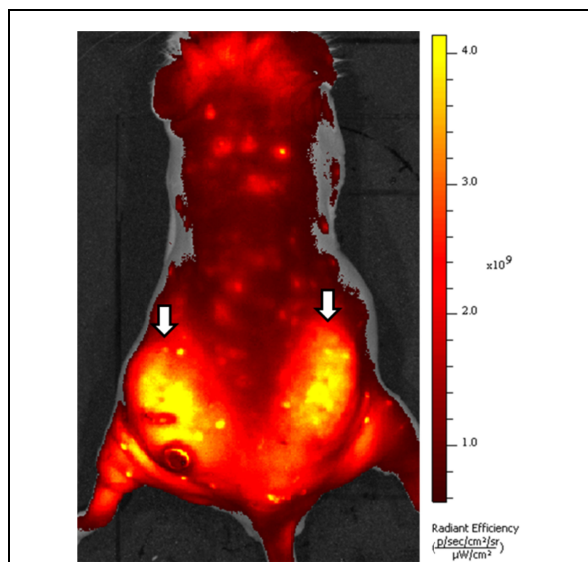


図11 HPMA-hyd-ZnPP による腫瘍の蛍光イメージング

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IC₅₀=5~7 μ 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(IC₅₀=6~9 μ g/ml)に対し、HPMA-hyd-ZnPPではIC₅₀=0.5~0.6 μ 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を放出しうするため、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。

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)

3. 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)
4. 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
5. 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

・ 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