

201308026B

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

グロメルロイド血管制御ナノsiRNAによる膠芽腫の革新的治療戦略開発

平成24年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 狩野 光伸

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
グロメルロイド血管制御ナノsiRNAによる膠芽腫の革新的治療戦略開発	----- 2
狩野 光伸	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 9
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 10

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（総合）研究報告書

グロメルロイド血管制御ナノsiRNAによる膠芽腫の革新的治療戦略開発

研究代表者 狩野 光伸 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

膠芽腫は脳腫瘍の中でも最も悪性度が高い。しかし、現状において有効な治療法はほぼなく、治療成績は悪性腫瘍の中でも特に悪い。効果的な化学療法の開発が待たれる状況である。他方で、近年、ナノ薬剤送達システム（ナノDDS）はがん治療において有効性を示しつつある。しかし、膠芽腫に対してはやはり製剤設計のみではナノDDSの十分な薬効発揮は難しい状況にある。本研究ではこれらの現状に鑑みて、膠芽腫の特徴的病理構造、特にグロメルロイド血管（glomeruloid vessel, GV）に着目し、膠芽腫の新規治療戦略確立を目指した。

研究分担者

岸村顕広・九州大学大学院工学系研究科・准教授
松崎典弥・大阪大学大学院工学系研究科・助教
西原広史・北海道大学大学院医学研究科・特任准教授

A. 研究目的

悪性膠芽腫はヒト脳腫瘍のなかでももともと悪性度が高い腫瘍である。その特徴的病理学的所見として、異常の血管構造であるグロメルロイド血管（GV）が知られている。しかし、その意義はこれまで悪性膠芽腫における顕微鏡的な形態学的特徴としての理解に留まっており、その機能的意義は明確ではない。

他方、我々はこれまで、ナノ薬剤の薬効という観点から腫瘍血管を解析し、とりわけ難治の膵癌などにおいては、腫瘍血管構造がこれまで考えられていたよりも壁細胞(pericyte, PC)に豊かに覆われ、また

ナノ粒子に対する漏出性が低いことを明らかにしてきた。

これと関連して、我々はこれまでの研究から、GVは血管内皮の異常増殖であるとこれまで言われてきたところ、実態は一層の血管内皮細胞と周囲の壁細胞（pericyte, PC）集積が豊富であることを見出した。これによりPCの過剰増殖が血管バリア能を異常に強化している可能性が示唆された。そこで本研究では膠芽腫組織内におけるPCを抑制することでGV形成を回避しうる可能性を考えた。

この観点によって立つと、妥当な実験系は現在しない。これをヒト病理学的所見に照らしながら確立し、主にGVを治療標的として、PCの血管内皮細胞（endothelial cells, EC）への接着や成熟を抑制しその漏出性を高くするための制御対象分子を見出し、その分子に対するsiRNA配列を特定し、そのsiRNAを搭載したナノDDSを、ヒトにおける適用可能性を視野に入れつつ開発することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

まずH24年度は、GV形成機構解明を行う本研究の目的にかなう膠芽腫モデル細胞株の選定を行った。我々はこれまでの研究から、GV血管では血管内皮細胞周囲の壁細胞集積が豊富であることを見出し、これにより壁細胞の過剰増殖が血管バリア能を異常に強化している可能性が示唆された。そこで、本研究で用いる膠芽腫モデル細胞株の選定にあたっては、その細胞由来の分泌性因子が壁細胞分化を促進することを指標とした。当初計画で使用を予定していたTSRA細胞では予想に反して動物での移植生着が十分でなく、これに代わる細胞株の選定を行う必要が生じた。しかし、最終的に、ヒト膠芽腫病理像、とりわけGV様構造を形成する新たなモデル細胞株としてTS-GFP細胞 (Sampetean et al, *Neoplasia* 2011) を見出した。GV構造についてはこの他のいかなる動物モデルでも十分に再現できておらず、このモデルは画期的であった。このTS-GFP細胞を用いた膠芽腫動物モデルの作製や、GV形成を司るシグナル分子の候補特定とGV制御に最も効果的な治療標的分子群の同定を進めた。治療標的分子群としては、GV形成に対し促進的に働く腫瘍由来因子に着目し、同定を試みた。本研究では主に老化関連分泌因子群 (Senescence-associated secretory proteins, SASPs) に着目した解析の結果、TS-GFP細胞ではSASPs分子群が高く発現していることが確認された。

続いてTS-GFP細胞を用いてGV形成に関する評価を行った。始めに、TS-GFP細胞によるマウス移植モデルにおけるGV様構造の解析を行った。TS-GFP細胞は、これまでの報告においては頭蓋内移植モデルにより検討が進められてきた。我々も同モデルの同所移植標本について組織学的解析を行った。その結果、GV様の構造はヒト同様にSMA陽性細胞が他モデルに比較し厚く血管周囲を覆っていることを見いだした。これら同所移植モデルは十分にヒト膠芽腫病理を反映しているものの、腫瘍生育に3-4週間の時間を要する。本研究では、siRNA製剤の薬効を病理組織構築と比較をしつつ、十分に検証する必要がある。そこでより迅速な解析を行うために、TS-GFP細胞による皮下移植モデルの組織構築についても解析を行うこととした。

制御対象分子としては、H24年度に確立したヒト膠芽腫に関する既存データベースを用いた*in silico*

解析手法により導出した、GV抑制の有力な候補分子の中から、始めにCXCL12について検証を進めた。

具体的にはCXCL12の受容体であるCXCR4の低分子阻害剤 (AMD3100) をTS-GFP細胞皮下移植モデルに投与し、PC被覆およびナノ粒子 (PICsome, 粒径100 nm) 分布に関して組織学的に解析した。

さらに、CXCL12を抑制するsiRNA配列 (siCXCL12) を決定した上で、cRGD付加PEG-イミノチオラン修飾ポリリシンによるミセルに内包し、(siCXCL12ミセル)、同様にPC被覆並びにPICsome分布を評価した。

(倫理面への配慮)

患者の病理検体に関して：本研究で用いられる病理検体はすべて研究開始前に研究分担者により北海道大学において人体から採取された試料であり、患者個人に不利益・危険性が及ぶことはない。人権擁護の観点から原則として研究開始前までに当該患者から試料の利用に係る同意を受けるものとし、同意を受けることが出来ない場合には臨床研究に関する倫理指針 (平成20年厚生労働省告示第415号) に基づいて、当該機関の倫理委員会 で得られている本研究課題の承認内容に基づき、組織代表者の許可を得る原則のもと研究を遂行した。また、成果発表等の際には個人の特定が行われないよう最大限の配慮をとっている。

動物実験に関して：本研究課題で行う動物実験については、各所属機関の動物実験施設の動物生命倫理に関する審査委員会に申請し、承認を得て行った。全ての動物は本学ガイドラインに基づいて愛護的に扱い、実験に際して苦痛は最小限になるよう努め、殺処分の際は安楽死させるようにした。

C. 研究結果

H24年度は、まずTSRA細胞 (Sasai et al, *Molecular Cancer*, 2007) を膠芽腫モデル細胞として利用し、GV形成に関与する膠芽腫由来のシグナル分子群の同定を進めた。まず、本細胞に由来する液性因子が血管壁細胞 (pericyte, PC) の分化度に与える影響について*in vitro*において検討を行った。具体的には同細胞の培養上清によりマウス間葉系幹細胞10T1/2細胞を培養し、定量的PCRにより各種PCマーカー分子の発現変動を解析した。その結果、NG2、CD1

3などのPCマーカー発現の増加が示されたが、より一般的なPCマーカーとされるSMA、PDGFR β の発現上昇は十分ではなかった。また、*in vivo*の検討も並行して開始を試みたところ、このTSRA細胞を動物へ脳内移植した場合の生着率・腫瘍形成効率が報告ほど十分でなく、従って本研究遂行にさらに適切な細胞株を探索する必要が生じた。検討の結果、TS-GFP細胞 (Sampetean et al, *Neoplasia* 2011) を用いることとした。報告によれば同細胞株による同所腫瘍の病理組織はGV様構造を呈するが、同報告においてPCマーカー発現までは解析されていなかった。そこで、まず*in vitro*実験を行った結果、同細胞の培養上清により10T1/2におけるNG2、CD13、SMA、PDGFR β すべての発現上昇が認められた。一方、*in vivo*、すなわちTS-GFP細胞の同所移植標本を組織学的に解析した結果、GV様の構造はヒト同様にSMA陽性細胞が他モデルに比較し厚く血管周囲を覆っていることが示された。さらにTS-GFP細胞における各種SASPsの発現についても定量的PCRにより評価を行った。その結果、TS-GFP細胞ではCXCLs、VEGFA、PAI1、IL-6、EGFなどのSASPs遺伝子群が高く発現していることが示された。さらに既存データベースを用いた*in silico*解析により、膠芽腫予後と各種SASPs分子発現量の相関について解析を行った結果、SASPsであるCXCLs、MMPs、EGF等の発現量が膠芽腫予後と有意に相関することが示唆された。以上より、TS-GFP細胞中から分泌されるSASPsが壁細胞分化に影響をもたらすこと、すなわちSASPsがGV抑制の標的候補として妥当であることが改めて示唆され、GV抑制による膠芽腫予後改善を試みるモデル細胞としてTS-GFP細胞が有用であることも確認された。また、既存データベースを用いた*in silico*解析をさらに進めた結果、膠芽腫予後に有意に相関する壁細胞関連分子を複数見出した。これらの候補分子の中から、既にその受容体であるCXCR4に対する臨床認可された低分子化合物阻害剤も存在することから、CXCL12について検証を進めることとした。

CXCL12の標的分子としての妥当性について検証を行うために、TS-GFP細胞による皮下移植モデルの組織構築について解析を行った。TS-GFP細胞を移植する際に調製する細胞懸濁液の至適条件についても検討を行うため、TS-GFP細胞 3×10^5 個を、TS-GFP細胞の培養培地 (TS培地) またはTS培地とマトリゲル基底膜マトリックグロースファクター

リデュースト(コーニング社、マトリゲルGFR)を等量ずつ混じた溶液で懸濁し、マウス腹部に移植した。腫瘍体積の経時変化を追ったところ十分に生着し、移植後10日目には解析を予定していた 500mm^3 に達した。組織学的な評価を行った結果、皮下腫瘍組織内の血管もまた、脳同所移植モデルと同様にSMA陽性細胞による被覆が顕著に見られ、血管密度が高く、形状も不整であった。この傾向は、特にTS培地とマトリゲルGFRを混じた溶液で細胞懸濁液を調製した群において顕著であった。

この結果より、皮下移植モデルを用いることでより迅速にGV内PC抑制による薬効評価を行うことが可能であると考え、初期検討において皮下移植モデルを利用することとした。また、以後の実験ではTS培地とマトリゲルGFRを等量混じた溶液で移植細胞の懸濁液を調製した。なお、腫瘍細胞の三次元培養を行う条件についての最適化も行った。この結果、多層化した状態で長期間培養維持することが可能な培養法の確立に成功した。

次に、CXCL12の受容体であるCXCR4の低分子阻害剤 (AMD3100) を、TS-GFP細胞移植モデルに対し移植後7-9日目に 0.25 mg/kg ずつ腹腔内投与し、10日目に腫瘍組織を回収し、PC被覆に関して組織学的に解析を行った。その結果、PC (SMA陽性細胞) による血管の被覆が約50%低下していることを見いだした。続いて、AMD3100による処置後にCy5標識nano-PICsome (Cy5-PICsome) を尾部静脈より投与した個体に関してPC被覆とCy5-PICsome分布について評価し、粒径が 100 nm であるナノ粒子の腫瘍内分布にAMD3100が与える影響について解析した。その結果、AMD3100によりCy5-PICsomeの腫瘍内分布領域が有意に拡大することが明らかになった。

そこでさらに、CXCL12を抑制するsiRNA配列 (siCXCL12) を設計した (siCXCL12-CDS1またはCDS2)。始めに*in vitro*における抑制効率を解析した結果、いずれも70-80%程度CXCL12の発現を抑制可能であることを確認した。そこで、これらのsiRNAをcRGD付加PEG-イミノチオラン修飾ポリリシンによるミセルに搭載し (対照ミセルおよびsiCXCL12ミセル)、同様にPC被覆並びにCy5-PICsome分布を評価した。

始めに、TS-GFP細胞皮下移植モデルに対し移植後3、5、7、9日目に、siCXCL12-CDS1またはCDS2または対照siRNAを各々内包した高分子ミセルをsiRNA濃度 $9.2\text{ }\mu\text{M}$ となるよう調製された水溶液を20

0 µl/匹の投与量で尾静脈より投与し、移植後10日目に腫瘍組織を回収した。PC被覆に関して組織学的に解析を行った結果、siCXCL12-CDS1またはCDS2のいずれを内包したミセルによっても、PC被覆の有意な抑制は観察されなかった。さらに詳細に血管構築を解析したところ、CXCL12の抑制により血管の形状が対照群とは異なることを見いだした。CXCL12は血管新生亢進にも寄与するという報告もなされていることから、腫瘍形成期間の初期からCXCL12を抑制する今回の治療プロトコルでは、PC被覆を伴う腫瘍血管に対する薬効については解析が難しいと判断した。そこで次に、TS-GFP細胞皮下移植モデルにおける10日間の腫瘍形成期間のうち、腫瘍内血管が十分にPCにより被覆される時期の特定を試みた。TS-GFP細胞移植後3-8日目の期間に関して腫瘍内血管のPC被覆率を評価した結果、移植後6日目以降には血管構築が安定化し、PC被覆も80-90%ほどの血管で豊富に見られることを確認した。以上より、TS-GFP細胞皮下移植モデルにおいてPC抑制を行うミセル製剤の投与は、移植後6日目以降が適切であると考えた。

そこで、改めてsiCXCL12ミセルのPC被覆に対する影響を再評価するために、TS-GFP細胞皮下移植モデルに対し移植後6、8日目にsiCXCL12ミセルまたは対照ミセルを投与後、10日目に腫瘍組織を回収して組織学的に解析を行った。その結果、PC被覆(SMA, NG2陽性)血管の有意な減少が確認できた。さらに、同様にsiCXCL12ミセルまたは対照ミセルを投与後、さらに9日目にCy5-PICsomeを投与し、10日目に腫瘍組織を回収して組織学的に解析を行った結果、siCXCL12ミセル投与群においてPICsome分布領域が拡大することを確認した。また、これと同様のプロトコルで、脳内同所移植モデルにおいても、局所におけるPICsome分布領域の拡大の傾向を認めた。

以上の結果より、TS-GFP細胞による膠芽腫モデルにおいてCXCL12を特異的に抑制するsiRNAミセルを投与すれば、その後に投与するナノ薬剤の腫瘍実質への到達効率を改善することができることが示された。

D. 考察

本研究では、従来とは異なるアプローチによる膠芽腫の画期的な化学療法の確立を目指してきた。これまでに治療標的として着目されたことのない

グロメロイド血管 (glomeruloid vessel, GV) に焦点を当て、ナノ粒子を用いたsiRNAの送達によりGVにおける漏出性を制御することで、腫瘍組織全体への薬剤送達効率を改善することを目指した。我々はこれまでの研究においてGVに着目した解析を行い、GVは一層の内皮細胞およびそれを取り囲む多層のPCから構成されることを確認し、組織中にGVが多い症例は予後不良であることを明らかにしている。また膠芽腫以外の腫瘍ではPC抑制によりナノ薬剤による治療効率が大きく改善されることを膀胱癌ほかで実証してきた。したがって、GVを標的とすることで、国民の死因の第一位であるがんの中でも特に治療が困難な膠芽腫において、化学療法の効能および患者QOLの大幅な改善をもたらすことができると確信される。また本研究のアプローチ、すなわちSASPsと関連する病巣血管構築の制御を通じた治療法開発の試みは他に類を見ないものであるが、SASPs自体は腫瘍のみならず各種難治炎症性疾患への関与が指摘されており、本研究を通じ得られる知見は他難治疾患に対しても将来的に応用性を示しうるものである。以上の目的を鑑み、GV形成機構解明のためによりふさわしい細胞株であるTS-GFP細胞の選定に至ることができたのは大きな前進であったといえる。ヒト病理と同様にGVを形成する膠芽腫動物モデルがほとんど存在しない中、TS-GFP細胞は、他の膠芽腫細胞株に比べてよりヒトGVに近い血管構築を示す非常に有用なモデル細胞であり、新規治療法開発にあたっては非常に有用である。一方、研究の加速を図るためにヒト膠芽腫に関する既存データベースを用いた*in silico*解析手法を確立した。当初計画には*in silico*解析は含まれなかったが、着手した結果、GV抑制にあたり有力な候補分子の同定に至っている。このように、ヒト膠芽腫病理を反映するモデル細胞とヒト病理検体を元としたデータベースによる*in silico*解析の併用による新規治療法の開発が多疾患においても一般化されれば、新薬開発において有力な手段となると考えられた。

この*in silico*解析より、標的候補としてCXCL12を得たことを受け、この発現を抑制するsiRNAやその受容体であるCXCR4阻害剤をTS-GFP細胞移植モデルに投与し、PC被覆率ならびにCXCL12抑制後の腫瘍内におけるナノ薬剤の分布について解析を行い、またGV様構造における壁細胞 (pericyte, PC) を抑制することを試みた。異なる投与スケジュールによる複数の検討の結果、TS-GFP細胞による腫瘍

組織内で血管が十分に構築され、PC被覆も豊富になった時期からCXCL12を抑制するミセル製剤を投与すれば、その後投与するナノ薬剤の分布効率を向上させられることが明らかになった。この結果から、膠芽腫においても血管構築を制御することにより100 nm程度の比較的大きな粒径を持つナノ粒子の腫瘍実質への送達効率を改善することが可能であることが示唆された。今回用いた膠芽腫モデルはマウス由来細胞であるため、ヒト臨床検体由来の膠芽腫モデル細胞を用いて同様の検証を行う必要があることは課題であるが、西原らによるヒト病理組織の解析から、ヒト膠芽腫のGVにおいても、CXCL12受容体であるCXCR4陽性細胞が存在することが明らかになった。CXCR4陽性の患者は予後が悪いことが既存データベースによる解析より明らかになり、一方、これまでの研究より、予後の悪い症例においてGVが多く観察されることも見出している。これらより、ヒト膠芽腫においてもCXCR4のGV形成への関与が示唆され、マウス由来モデル細胞であるTS-GFP細胞で確認されたCXCL12阻害によるナノ粒子分布増大の傾向がヒトにおいても再現可能であることが期待できると考えている。

E. 結論

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性度が高いが、現状において有効な治療法はほぼなく、治療成績は依然として悪性腫瘍の中でも特に悪く、効果的な化学療法の開発が待たれる。近年、ナノ薬剤送達システム（ナノDDS）はがん治療において有効性を示しつつあるが、膠芽腫に対しては製剤設計のみではナノDDSの十分な薬効発揮は難しい。したがって、本研究では膠芽腫の特徴的病理構造、特にグロメルロイド血管（glomeruloid vessel, GV）に着目し、膠芽腫の新規治療戦略確立を目指した。本研究により、下記の進展があった。

まずGV構成細胞を抑制するシグナル分子の同定については、TSRA細胞（Sasai et al, Molecular Cancer, 2007）を膠芽腫モデル細胞として用い、*in vitro*でGV形成の責任シグナル分子群の同定を進めた。本細胞に由来する因子が、血管周皮細胞（pericyte, PC）の分化度に与える影響を同細胞の培養上清と間葉系幹細胞とされる10T1/2細胞を用いて*in vitro*で調べ、NG2、CD13など一部のPCマーカー発現の増加が示された。次に述べる理由で、TS-GFP細胞（Sampetean et al, Neoplasia 2011）を用いた

ところ今度は10T1/2にて一般的にPCマーカーとされるNG2、CD13、SMA、PDGFR β すべての発現上昇が認められた。さらに、本研究でGV形成の責任因子として主に着目している各種老化関連分泌因子群（Senescence-associated secretory proteins, SASPs）の発現について定量的PCRにより評価した結果、SASPs遺伝子群（特にEGF, CXCLs）がTS-GFP細胞では高く発現していることが示された。以上よりSASPsがGV抑制の標的候補であることが改めて示唆された。既存データベースを用いた*in silico*解析結果を合わせた結果、この中でもCXCL12をまず標的分子候補として解析を進めた。薬効の評価基準として壁細胞マーカーであるSMA陽性細胞による血管被覆率を指標とし、TS-GFP細胞移植モデルを用いた解析を行った結果、CXCL12の受容体であるCXCR4の低分子阻害剤を投与することによりより壁細胞被覆が有意に低下することを見出した。

さらに、ヒト膠芽腫CXCL12受容体であるCXCR4のヒト病理における発現解析の結果、GV構造が主に見られるGradeIVの検体においてのみ、GV構造においてCXCR4陽性細胞が確認できた。GradeIVの検体ではGV構造周囲においても、CXCR4陽性細胞がGVに向けて集積する病理像が得られており、CXCL12-CXCR4シグナルがヒト病理においてもGV形成に関与する可能性が示唆された。以上から、続いてCXCL12を抑制するミセル製剤の開発を実施した。

siRNA内包高分子ミセルの開発については、siRNAosomeは動的光散乱法（DLS）にて110nmの粒径であったが、siRNAmicelleの開発も並行し、こちらはDLS測定より直径が約50nmかつ分布の狭い（多分散指数0.1以下）ナノ粒子形成が確認された。また、10%FBS中でのsiRNAmicelleの安定性を蛍光相関分光法により評価したところ、カチオン部位への疎水性官能基の導入により、その安定性が大幅に改善されることが明らかになった。次いで皮下移植肺がん(A549)モデルおよび蛍光標識siRNAmicelleを用いてsiRNAの腫瘍集積性を評価したところ、環状RGDペプチドの導入による腫瘍集積性の有意な向上が認められた。そこで、がん細胞のアポトーシスを誘導するpolo-like kinase 1 (PLK1)-siRNAをmicelleに封入し、がん治療実験を行ったところ、腫瘍組織でのPLK1 mRNAの減少および抗腫瘍効果を得ることに成功した。このようにsiRNAosome, siRNAmicelleともに、ツールとしての有効性が示唆されたと考えられ、特にsiRNAmicelleは動物における遺伝子抑

制効果も確認された。

他方で、本研究期間中に動物実験においても有効性のある結果に到達するべき観点から、脳腫瘍動物モデルにおいては、すでに企業導出済みの技術であるsiRNA送達用ナノデバイスである、cRGD付加PEG-イミノチオラン修飾ポリリシンによるミセルにCXCL12に対するsiRNAを搭載し用いる検討に着手した。このsiRNA内包高分子ミセルは、腫瘍血管内皮細胞に過剰発現するインテグリン受容体の特異的に認識する環状RGDペプチドを表層に搭載したものであり、標的分子発現を抑制する種々のsiRNAについてin vivoにおける奏功が確認されている。

このミセルにCXCL12に対するsiRNAを設計して搭載し (siCXCL12ミセル)、TS-GFP細胞移植モデルに投与した。その結果、siCXCL12投与群において壁細胞が強く抑制され、siCXCL12ミセル処置後に投与されるナノ薬剤の腫瘍内分布が向上することが明らかになった。

さらに、siCXCL12の投与スケジュールに関し検討した結果、わずか一回の投与でもナノ薬剤分布改善の効果がみられることを確認した。これらの結果から、siCXCL12をナノ担体に内包して腫瘍血管を特異的に抑制し、さらにナノ薬剤を投与すれば、膠芽腫においても十分な治療効果を達成しうることが示唆された。

本研究で得た以上の成果の産業化を促進するため、関連企業とも共同研究を開始した。

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kano MR. Nanotechnology and tumor microcirculation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013. Epub ahead of print.

Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, Kano MR, Ino Y, Nomoto T, Matsumoto Y, Koyama H, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Cyclic RGD-Linked Polymeric Micelles for Targeted Delivery of Platinum Anticancer Drugs to Glioblastoma through the Blood-Brain Tumor Barrier. *ACS Nano.* 2013, in press.

Kokuryo D, Anraku Y, Kishimura A, Tanaka S, Kano MR, Kershaw J, Nishiyama N, Saga T, Aoki I, Kataoka K. SPIO-PICsome: Development of a highly sensitive and stealth-capable MRI nano-agent for tumor detection using SPIO-loaded unilamellar polyion complex vesicles (PICsome). *J Control Release.* 2013;169(3):220-7.

Kokuryo D, Anraku Y, Kishimura A, Tanaka S, Kano MR, Kershaw J, Nishiyama N, Saga T, Aoki I, Kataoka K. SPIO-PICsome: Development of a highly sensitive and stealth-capable MRI nano-agent for tumor detection using SPIO-loaded unilamellar polyion complex vesicles (PICsome). *J Control Release.* 2013 in press.

Wu S, Kasim V, Kano MR, Tanaka S, Ohba S, Miura Y, Miyata K, Liu X, Matsushashi A, Chung UI, Yang L, Kataoka K, Nishiyama N, Miyagishi M. Transcription factor YY1 contributes to tumor growth by stabilizing hypoxia factor HIF-1 α in a p53-independent manner. *Cancer Res.* 2013;73(6):1787-99.

Harada M, Iwata C, Saito H, Ishii K, Hayashi T, Yashiro M, Hirakawa K, Miyazono K, Kato Y, Kano MR. NC-6301, a polymeric micelle rationally optimized for effective release of docetaxel, is potent but is less toxic than native docetaxel in vivo. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2713-27.

Zhang L, Nishihara H, Kano MR. Pericyte-coverage of human tumor vasculature and nanoparticle permeability. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(5):761-6.

2. 学会発表

Kano MR. Use of nanoparticle to analyze vasculature in diseases. 第90回日本生理学会大会 2013年3月28日、東京

狩野光伸 腫瘍血管構築とナノ薬剤 第20回日本血管生物医学会学術集会 2012年12月7日、徳島

Kano MR. Use of nanoparticle to analyze vasculature in diseases. 2012年11月5日-8日、IEEE nanomed 2013, Bangkok, Thailand

狩野光伸 腫瘍血管のナノ病態生理学 第29回日本DDS学会 2012年7月4日-5日、札幌

Use of nanoparticle to analyze vasculature in

diseases、Kano MR、The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC' 13)、大阪、口頭発表（招待）、2013.7.

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

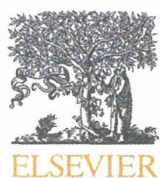
該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

研究成果の刊行に関する一覧表

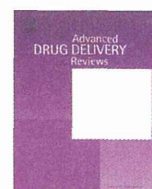
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kano, MR	Nanotechnology and tumor microcirculation.	Adv Drug Deliv Rev.	掲載確定	掲載確定	2013
Nishihara, H	Human pathological basis of blood vessels and stromal tissue for nanotechnology.	Adv Drug Deliv Rev.	掲載確定	掲載確定	2013



Contents lists available at ScienceDirect

Advanced Drug Delivery Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/addrNanotechnology and tumor microcirculation[☆]

Mitsunobu R. Kano

Department of Pharmaceutical Biomedicine, Graduate School of Medicine, Dental, and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-Naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 22 August 2013

Available online xxxxx

Keywords:

Nanotechnology

Nanoparticle

Nanomedicine

Capillary

Vasculature

Pericyte

Leakiness

Permeability

Pathology

ABSTRACT

Though much progress has been made in the development of anti-tumor chemotherapeutic agents, refractoriness is still a major clinical difficulty because little is known about the non-autonomous mechanisms involved. Abnormal capillary structures in tumors, for example, are well documented, but a thorough characterization of microcirculation, including functional consequences with particular regard to drug delivery and intratumor accumulation, is still required for many kinds of tumor. In this review, we highlight how use of synthesized nanoparticles, themselves a product of emerging nanotechnology, are beginning to open up new perspectives in understanding the functional and therapeutic consequences of capillary structure within tumors. Furthermore, nanoparticles promise exciting new clinical applications. I also stress the urgent necessity of developing clinically relevant tumor models, both in vivo and in vitro.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	0
2. Nanoparticles and tumor microcirculation	0
2.1. Structure of tumor microcirculation and distribution of nanoparticles in tumor tissue	0
2.1.1. Pericyte coverage as a factor to explain permeability of nanoparticles	0
2.2. Nanoparticle size and distribution in tumor tissue	0
2.3. Optimizing the effects of nanoparticles: balancing particle size with capillary structure	0
2.4. New technologies offer novel perspectives on tumor microcirculation	0
3. Conclusions	0
Acknowledgments	0
References	0

1. Introduction

A major difficulty for patients with inoperable tumors and those treating them is disease resistance to chemotherapy. The reasons for this refractoriness have been studied in various ways including tumor cell-autonomous mechanisms, chemosensitivity and/or chemoresistance [1], higher metastatic tendency [2,3], and intratumor heterogeneity including stemness [4,5]. Another promising approach has been to analyze what surrounds tumor cells, or the tumor microenvironment [6,7]. This microenvironment has several major components including fibrotic

tissue, various immune cells and, most important of all to this paper, tumor capillaries. This review will focus on the delivery of nano-sized drugs (which we will refer to as “nanoparticles”) and the structure of tumor capillaries, or microcirculation within a tumor.

Microcirculation is the key peripheral system involved in delivering and distributing oxygen, nutrition, and drugs to the whole body. As with normal organs, diseased loci have microcirculation. Judah Folkman [8] was the first person to recognize this in 1971, and thereafter capillaries in tumors have been studied extensively [6,7,9]. Tumors induce the formation of capillaries, in a process now known as angiogenesis, via secretion of growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) [10], in connection with tumor hypoxia [11,12]. Capillaries formed in tumor angiogenesis are both leaky and disorganized (Fig. 1) [13]. VEGF signaling is thought to be one of the principal causes of leakiness and capillary disorganization [14]. And VEGF was first identified as

[☆] This review is part of the *Advanced Drug Delivery Reviews* theme issue on “Nano-pathophysiology: a novel integrated approach to disease through application of nanotechnology”.

E-mail address: mikano-ty@umin.net

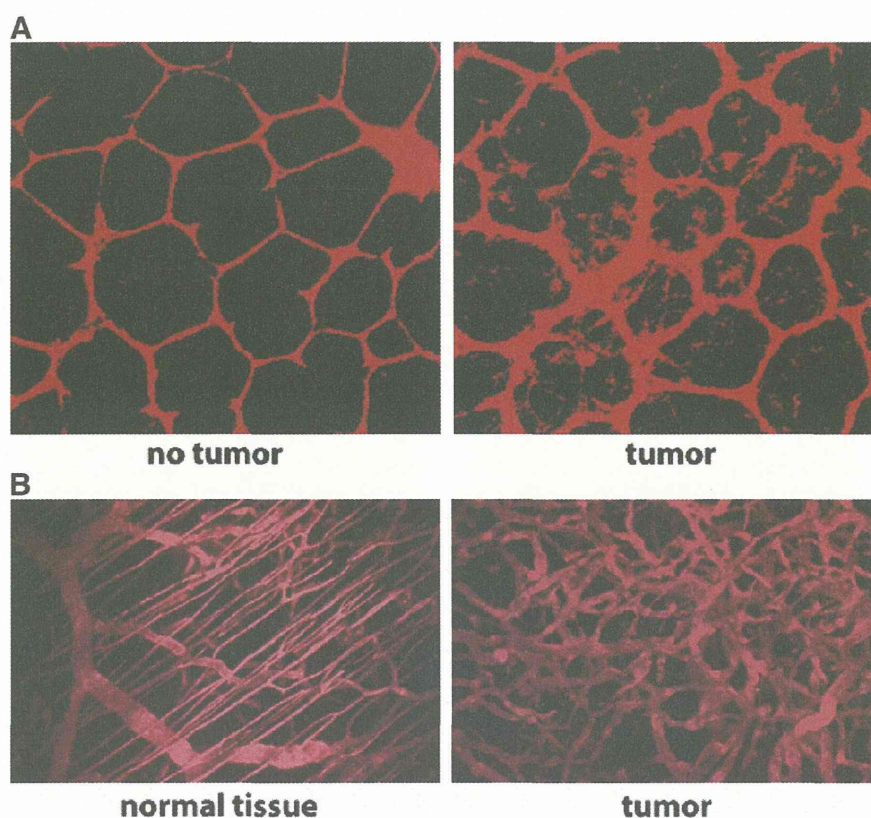


Fig. 1. Tumor capillary. (A) Distribution of injected dextran illustrates the leakiness of tumor capillaries compared to normal capillaries. (Courtesy of Dr. Ruth Muschel.) (B) Intravital imaging of capillaries in normal tissue and tumors. Capillaries in tumors are disorganized compared to those in normal tissue. From [38], Figs. 13.15 and 13.34.

a “vascular permeability factor (VPF)” [15]. Therefore inhibition of VEGF signaling has become a target for inhibition of tumor growth. Bevacizumab, for example, is licensed to treat various cancers via inhibition of VEGF-A [16]. Although Bevacizumab was designed to act on its own, clinical studies have shown its adjuvant capacity to enhance the effects of other chemotherapeutic agents [17]. This works as part of the vascular normalization theory [18] in which antiangiogenic agents temporarily “normalize” both structure and function of tumor vasculature and make more efficient the delivery of oxygen and therapeutic drugs. We know little, however, about this temporary normalization process and nanoparticle delivery.

Use of synthesized nanoparticles in biomedicine can offer exciting new perspectives, just as past technological innovations have done [19]. First, the discovery of microcirculation, invisible to the naked eye, by Marcello Malpighi in 1661 [20] was made possible by utilizing the new microscope invented by Galileo Galilei and others around 1600. Furthermore, the cellular wall surrounding microcirculation was also discovered using new technology. Application of chemical dyes invented during the 19th century made it possible for Theodor Schwann to discover the cells surrounding the capillary lumen in 1839 [21]. However, the first modern anatomical studies of the human body, its organs and systems began in the Renaissance with Andreas Vesalius and publication of *De Humani Corporis Fabrica* (1543) [22]. And it was William Harvey (1578–1657) who experimentally proved in 1628 the circulation of blood in men and animals: *Exercitatio de motu cordis et sanguinis in animalibus* [23].

In this review and in others in this series, we will explore how new technologies, especially nanotechnology, can open up new viewpoints in biomedicine.

2. Nanoparticles and tumor microcirculation

2.1. Structure of tumor microcirculation and distribution of nanoparticles in tumor tissue

Nanoparticles already in clinical use are known to be effective for a number of tumor types – at least in animal studies. However, most nanoparticles are clinically approved for only a few types of tumors. For example, Doxil, or PEGylated liposome incorporating Doxorubicin, shows potential in animal models of colon cancer [24] but has been approved by the FDA only for Kaposi's sarcoma, recurrent ovarian cancer and for multiple myeloma (MM), although only in combination with Bortezomib for MM [25]. It is not yet licensed for colon cancer. Since there may be a discrepancy between preclinical and clinical results it is important to have reliable preclinical models to predict the effects of use in humans. A common model of colon cancer uses CT26 murine colon cancer cells. And preclinical tests of Doxil have been done using the same cell line [24].

As a model nanoparticle, large molecular weight dextran is commonly used because of estimated hydrodynamic diameter of 2,000,000 (2M) Da dextran is 50 nm [26]. However, dextran of 70,000 (70k) Da, with an estimated hydrodynamic diameter of 15 nm, is more commonly used in experiments perhaps because it has the same molecular weight as the albumin molecule [26]. Dextran of various molecular weights is already used clinically as a plasma volume expander. We previously examined the extravasation of 2M Da dextran in the CT26 murine colon model and found that a certain amount of the molecule extravasated [27]. This observation confirmed the results of preclinical tests with nanoparticles such as Doxil [24]. The observation was also

consistent with the known “enhanced permeability and retention (EPR)” effect [28,29], which hypothesizes that nanoparticles can extravasate from tumor capillaries only because of their hyper permeability. The EPR effect also refers to an immature – that is to a less functional – lymphatic system in tumors as the cause of greater nanoparticle accumulation. However we have not studied the lymphatic system in tumors in detail. Hirakawa et al. discuss this matter in their review, but here we focus on capillaries.

Moreover, VEGF inhibition, in this case with a multiple kinase inhibitor Sorafenib, resulted in enhanced distribution of 2M Da dextran in the CT26 model [27] (Fig. 2). This observation was consistent with the “vascular normalization theory”, although we still need to test other VEGF inhibitors such as Bevacizumab to confirm the result.

2.1.1. Pericyte coverage as a factor to explain permeability of nanoparticles

Despite the largely promising results of the CT26 murine model, there still are human tumors untreatable with these drugs. We believe this is due to poor vascular leakiness leading to insufficient drug

delivery. We thus explored coverage of tumor microcirculation by pericytes as a potential factor to explain the discrepancy between commonly used animal models and human tumors. Pericytes were first identified in 1923 [30] and so named because of their surrounding proximity to endothelial cells. The role of pericytes on vascular integrity and leakiness was clarified using knockout mice for platelet derived growth factor (PDGF)-B (or PDGF-BB as the product ligand protein, a homodimer of two PDGF-B molecules) or PDGF Receptor β (PDGFR β) [31–33]. Although no molecular marker has yet been identified that is specific to only pericytes, alpha smooth muscle actin (aSMA), PDGFR β , or NG2 proteoglycan is commonly used [34]. We confirmed the function of pericytes on vascular leakiness in our previous study [35], using mice subcutaneously injected with Matrigel plug mixed with ligands such as VEGF-A or FGF-2 but no cells mixed. Our finding was that double stimulation by VEGF-A and FGF-2 resulted in more upregulation of PDGF-BB–PDGFR β signaling than with single VEGF-A or FGF-2, and with more pericyte coverage of the neovasculature in Matrigel plug. Inhibition of PDGF-BB/PDGFR β signaling in the

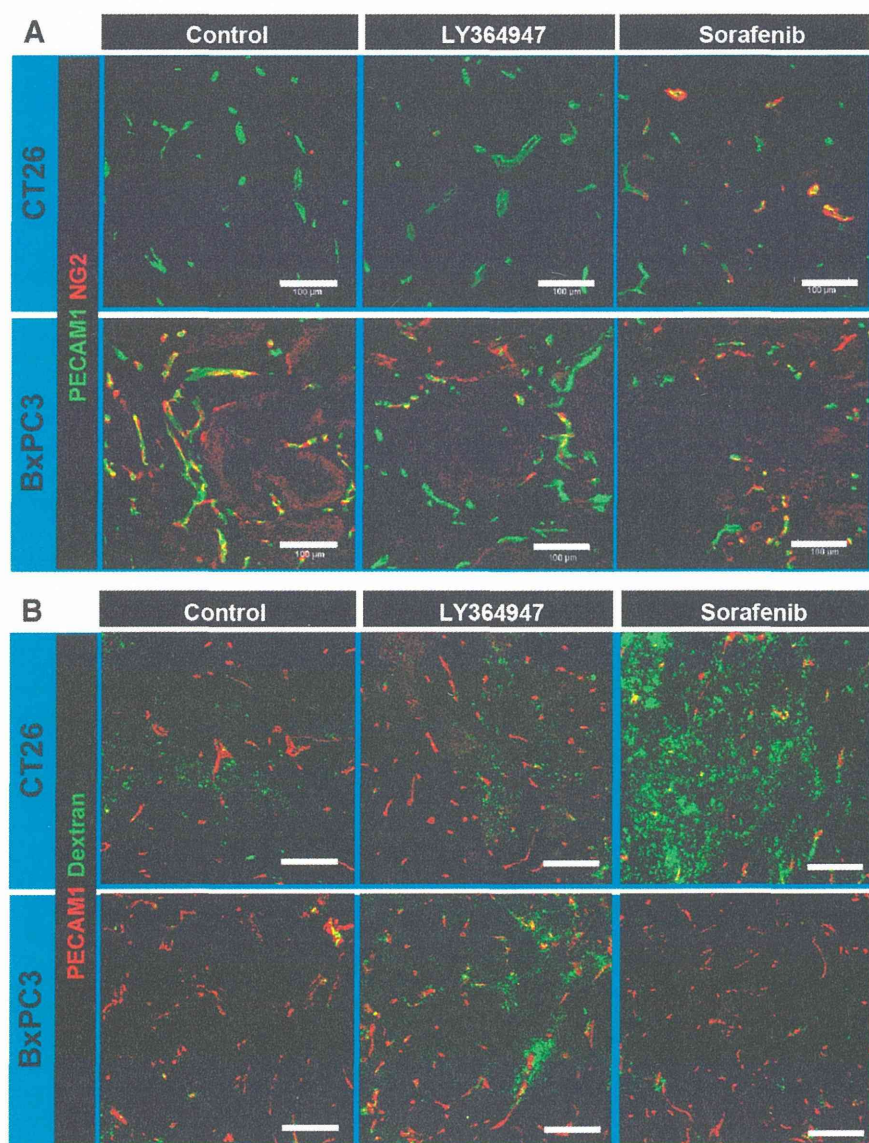


Fig. 2. Effects of Sorafenib and TGF- β inhibitor (LY364947) in the CT26 or BxPC3 model. (A) Vascular phenotypes revealed by immunohistochemistry. Green, CD31 or platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1; red, NG2. (B) Extravasation of 2M Da dextran from vasculature. Dextran in green and CD31/PECAM-1 in red. Scale bars = 100 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) Modified from [27].

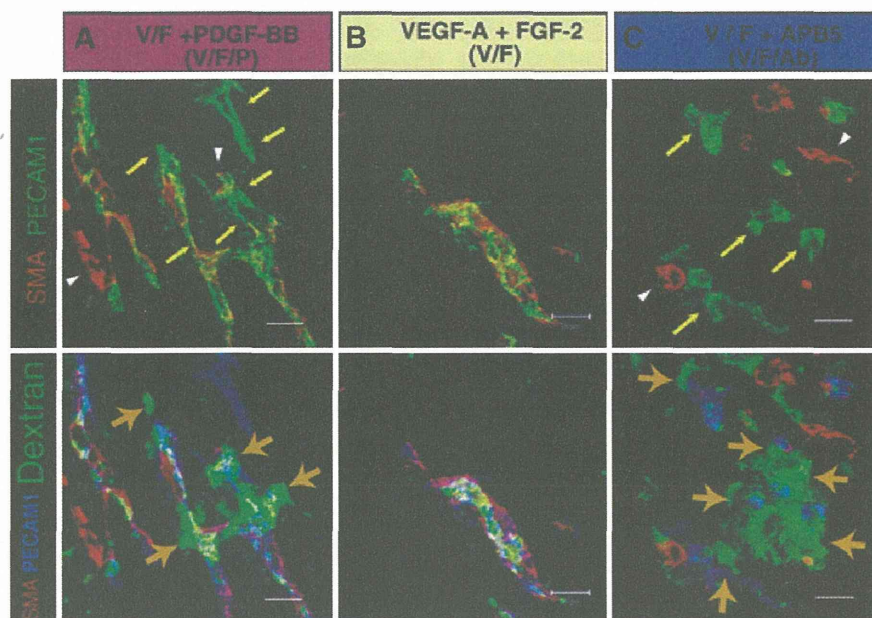


Fig. 3. (A–C) Effects of addition of PDGF-BB (A) or anti-PDGFR β neutralizing antibody (APB5) (C) with VEGF-A and FGF-2 (expressed as V/F in the figure) (B) as control in the in vivo Matrigel plug assay. First row: SMA staining (red) with CD31/PECAM1 staining (green). White arrowheads: detached SMA+ cells (designated as pericytes). Arrows: CD31/PECAM1+ cells not covered by SMA+ cells. Second row: permeability assay using dextran of 2M Da administered intravenously (green), merged with SMA (red), and CD31/PECAM1 (blue) images. Arrows; leakage of dextran. Scale bars: 20 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) Modified from [35].

double-stimulation state, by either adding neutralizing antibody anti-PDGFR β (APB5) or excess PDGF-BB ligand to “submerge” concentration gradient of the signal to inhibit migration of pericytes to the neovasculature, resulted in fewer pericytes around capillaries,

and more distribution of fluorescent labeled dextran of 2,000,000 (2M) Da extravasating from capillaries (Fig. 3).

Consequently, we analyzed whether coverage of tumor capillaries by pericytes differs with regard to human tumor type [36], by defining

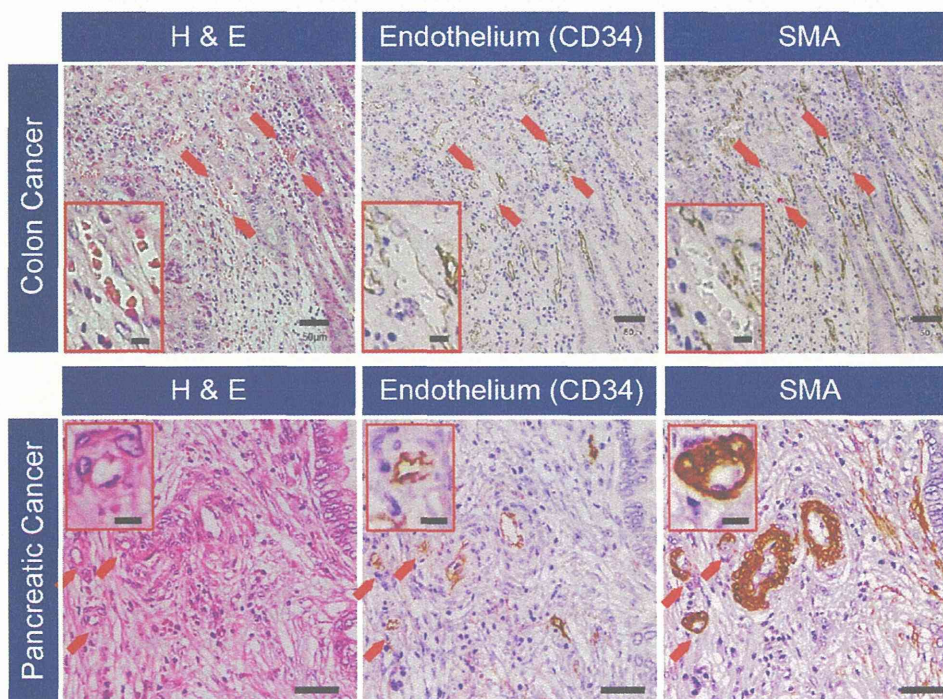


Fig. 4. Serial sections from histopathologic samples obtained from surgically resected human colon and pancreatic cancers: HE-stained or immunostained against CD34 and SMA. Red arrows indicate vasculature. Bars, 50 μ m. Inset: a representative image of the vasculature at higher magnification. Bars, 10 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

From [36].

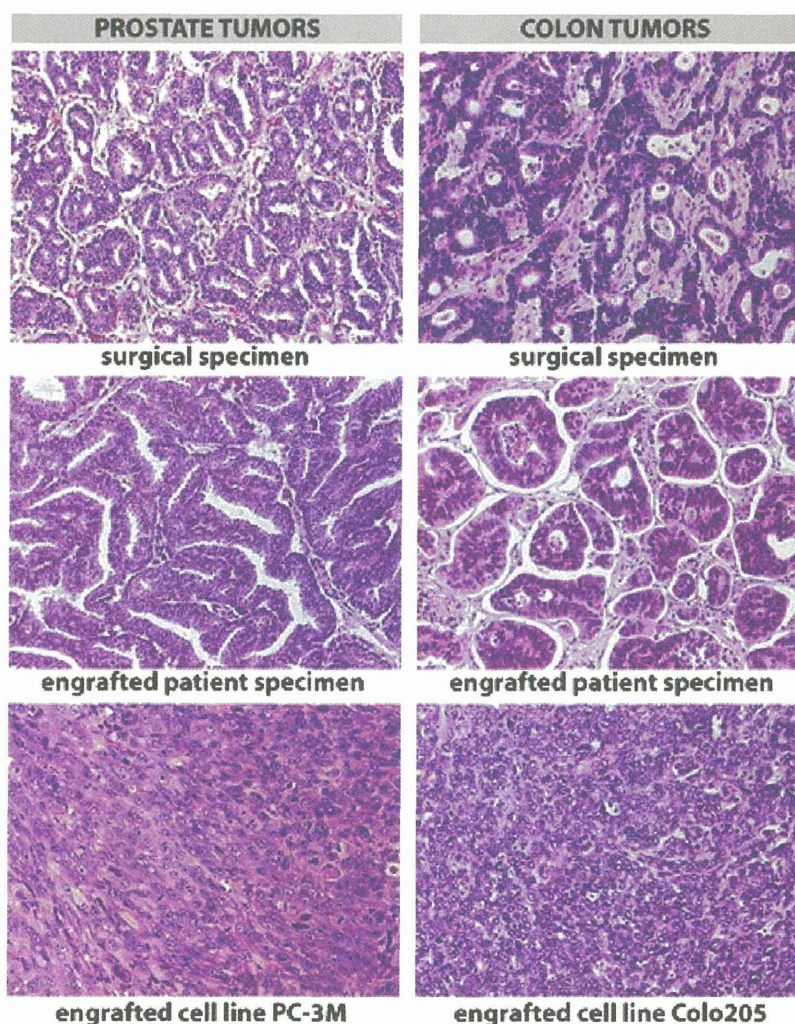


Fig. 5. A comparison of the histopathology of human surgical tumor specimens (left, prostate tumor; right, colon tumor) and animal tumor xenograft models. Note the difference in tissue architecture and the volume of interstitium. (Courtesy of Dr. Elizabeth A. Repasky.) From [38], Fig. 13-8.

pericytes as α SMA-positive cells attached to vascular endothelial cells. We established that more coverage matches a worse prognosis for pancreatic and diffuse-type gastric cancer, when compared to cancers with a better prognosis such as colon and ovarian (Fig. 4). Furthermore, a recent study has shown that in patients with clear cell renal cell carcinomas, tumors with more pericyte coverage correlate with a worse clinical outcome, thus suggesting that more is worse even within the same tumor type [37]. These results combined suggest that tumors with more pericytes attached to their capillaries are clinically more intractable. The results also suggest that tumors with more pericytes are also more fibrotic, or are characterized by more interstitium. Accordingly, we need a more realistic experimental model with more pericytes and more fibrotic tissue than the CT26 model. CT26 has far fewer pericytes and much less fibrotic tissue than human pancreatic cancer, for example. The discrepancy in the volume of interstitium including fibrotic tissue, between human tumor tissue and xenograft animal models using tumor cell lines, also makes the effects of new cancer drugs difficult to predict in patients (Fig. 5 and [38]).

We thus prefer to use an animal model xenografted subcutaneously with BxPC3 cells, derived from human pancreatic cancer (adenocarcinoma), because it has more fibrotic tissue and pericytes compared to the CT26 and other commonly used models (Fig. 6).

By using the BxPC3 model, we have shown that only a combination of TGF- β inhibitor and nanoparticles can inhibit tumor growth [39], whereas the incorporated agent (in this case doxorubicin) by itself or even nanoparticles alone cannot treat the tumor effectively (Fig. 7). TGF- β promotes proliferation of mesenchymal cells including pericytes, but inhibits proliferation of epithelial and endothelial cells [40]. Because of this the effect of TGF- β inhibition is unknown. This investigation was the first to show that weak inhibition of TGF- β signaling inhibits pericytes and maintains endothelial cells resulting in increased leakiness of tumor capillaries to nanoparticles. In more detail: we used the BxPC3 model and two more animal models of pancreatic cancer, plus a model of diffuse type gastric cancer, to test whether combined use of TGF- β inhibitor enhances the therapeutic effect of polymeric micelle incorporating Adriamycin [41]. We demonstrated that the combination inhibited tumor growth *in vivo* more than other approaches including: Adriamycin alone, Adriamycin with TGF- β inhibitor, or micelle only, TGF- β inhibitor only, or control. We also confirmed the distribution of naked Adriamycin using autofluorescence. Doxil, the PEGylated liposome incorporating Adriamycin, was also shown to be more effective in growth inhibition of the BxPC3 model when administered in combination with TGF- β inhibitor. The finding was applied to nanoparticles incorporating various agents such as contrast media [42,43] and nucleic

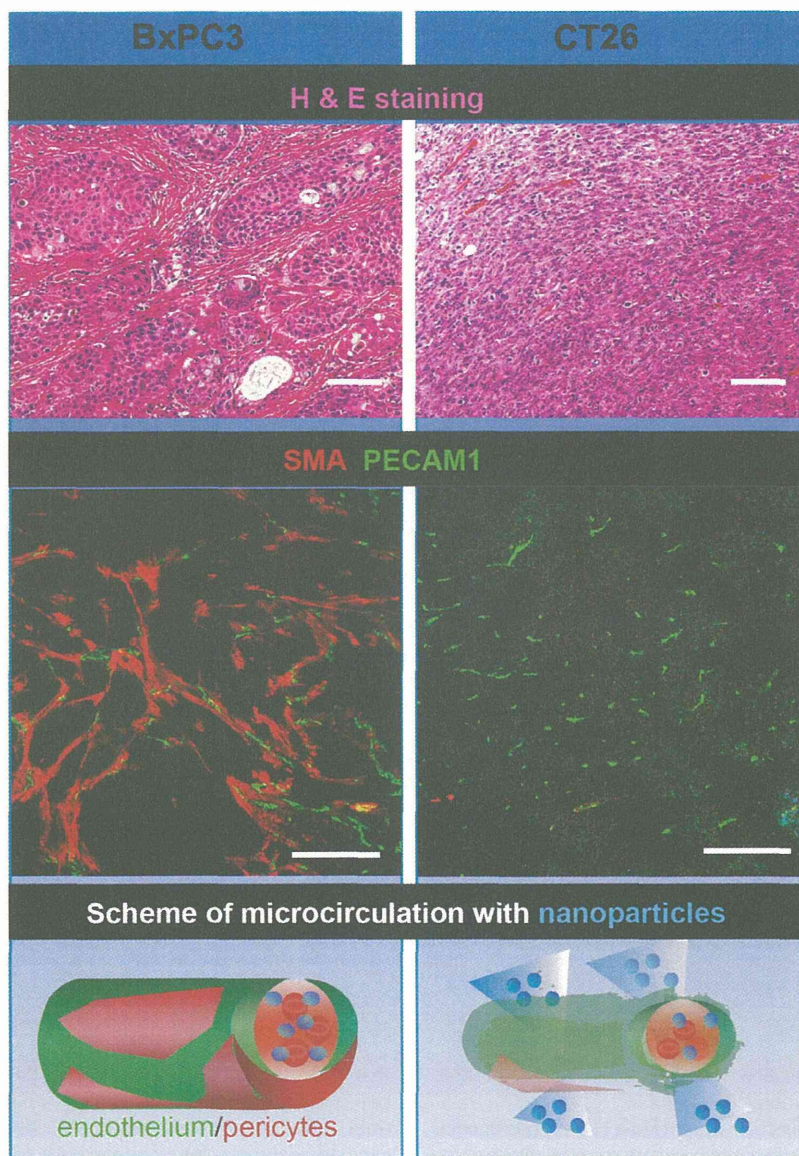


Fig. 6. Two animal tumor models using CT26 and BxPC3 cell lines. HE staining and immunohistochemistry with CD31/PECAM-1 in green and SMA in red. Scale bars = 100 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) Modified from [27].

acids [44]. Furthermore, Sorafenib, the VEGF-inhibiting agent that enhances distribution in the CT26 model of 2M Da dextran, had no significant effect in the BxPC3 model (Fig. 2).

The picture was more complicated with Sorafenib, pericyte coverage and leakiness. In the CT26 model, Sorafenib increased pericyte coverage of tumor capillaries in combination with increased extravasation of 2M Da dextran. In the BxPC3 model, Sorafenib decreased vasculature volume and intratumoral accumulation of 2M Da dextran. Pericyte increase in modeled tumors following VEGF inhibition was also observed by D. M. McDonald's group. [45]. First, we believe that the differing responses of vasculature with VEGF inhibition may reflect original levels of VEGF secretion in tumors, but this needs further study. Second, the discrepancy between pericyte-coverage and Dextran extravasation also needs further study. A range of balances between leakiness due to pericyte coverage and physicochemical properties of used nanoparticles, is summarized in Fig. 9A. However, it is also possible that pericyte coverage is just one of many factors influencing extravasation of

nanoparticles. In addition, we do not really know how pericytes influence extravasation: it may be due to paracellular gaps between endothelial cells, or some other factor.

2.2. Nanoparticle size and distribution in tumor tissue

The work using BxPC3 cells and TGF- β inhibitor [39] was also the first to use histopathologic methods to demonstrate distribution of nanoparticle in tumor tissue. The nanoparticles used in this work were a polymer micelle [41] and Doxil, both of which are effective in inhibiting tumor growth when used in combination with a TGF- β inhibitor. Interestingly, although both nanoparticles are effective, their distribution patterns in tumor tissue are different, although it is not clear why. Because Doxil and the micelle were of different sizes, surface charge (zeta potentials), material, releasing mechanism, and so on it was impossible to make a direct comparison.

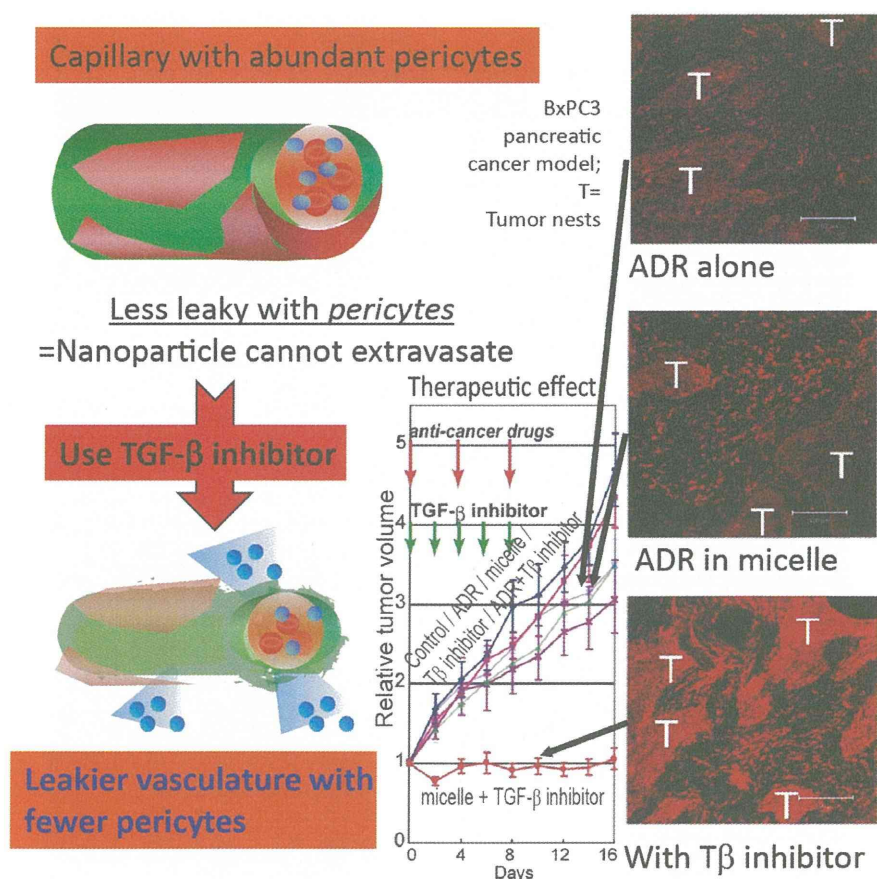


Fig. 7. The combined use of TGF- β inhibitor with nanoparticles in the BxPC3 model. Nanoparticles were unable to extravasate from pericyte-covered capillaries in the model without adjuvant use of TGF- β inhibitor, which decreases pericyte coverage. Growth inhibitory study, shown in graph lower right, of the BxPC3 tumor in vivo revealed that the tumor inhibited growth only when treated with the combination of TGF- β inhibitor (T β inhibitor) with the micelle incorporating Adriamycin (ADR). This is consistent with the histopathologic analysis of specimens of the BxPC3 tumor using autofluorescence of ADR, as shown on the right. Modified from [39].

This gives rise to the next question: How does a difference in particle size affect nanoparticle distribution?

Using dextran of various molecular weights in a FaDu tumor model, others have already demonstrated variable distribution relative to molecular weight [26]. In this study, as in our own, the authors used dextran molecules of 3.3 kDa, 70 kDa (identical to albumin), and 2M Da. 30 min of intravital video microscopy of the tumor revealed that while 3.3 kDa dextran entered all tumor tissues quickly and smoothly it also soon dissipated. 70 kDa dextran had an EPR effect: it gradually extravasated into, and remained in the tissue. 2M Da dextran remained inside the vascular lumen throughout.

Cabral and Kataoka et al. succeeded in developing micelles from 30 to 100 nm in diameter, but otherwise possessing identical properties [46], and we compared distribution of these nanoparticles in CT26 and BxPC3 models, respectively. Interestingly, distribution was almost uniform in the CT26 model regardless of particle size, whereas it was far more limited with larger particles in the BxPC3 model (Fig. 8A). We then examined the behavior of 30 and 70 nm micelles in more detail using the BxPC3 model. Detection of the anti-cancer agent platinum, incorporated into 30 nm micelles using X-ray fluorescent tags, revealed smooth distribution. However, platinum incorporated into 70 nm micelles did not reach tumor cells, unless it was administered with a TGF- β inhibitor (Fig. 8B). These results are very much consistent with the growth inhibitory study in the BxPC3 model in vivo.

These observations emphasize the importance of tailoring the diameter of nanoparticle products, even those with a diameter less than 100 nm, in treating disease, despite the mistaken assumption

that 100 nm micelles have similar EPR effects. There are a further two methods, aside from modification of nanoparticle diameter, to treat a disease such as pancreatic cancer. The first is to regulate capillary leakiness, for example, with a TGF- β inhibitor: as discussed earlier. And the second is to design a slower drug release rate from the nanoparticles [47]. In the latter case, drugs incorporated into nanoparticles release gradually when particles remain active longer. In a murine model of diffuse-type gastric cancer, which was not treatable with a 65 nm micelle without a slow release mechanism, growth was inhibited by a 120 nm micelle. Nanoparticles with this kind of release system do not necessarily remain longer in the bloodstream. They remain, for example, in connective tissues adjacent to tumor cells to release incorporated anti-cancer agents over a prolonged period. Nanoparticles conjugated with antibodies against connective tissue will stick to fibrotic tissue within a tumor and gradually release their incorporated drugs: as shown by Matsumura and his group [48,49]. Previous targeting strategies with nanoparticles have aimed to deliver them directly to target cells [50], but a “two-step approach” like that described above may also be effective.

2.3. Optimizing the effects of nanoparticles: balancing particle size with capillary structure

Emerging nanoparticle technology creates a need for new hypotheses, because the drugs used hitherto in a clinical setting have smaller molecular weight (SMW) of around 300–1000. We now need to balance a number of factors including: 1) capillary structure,

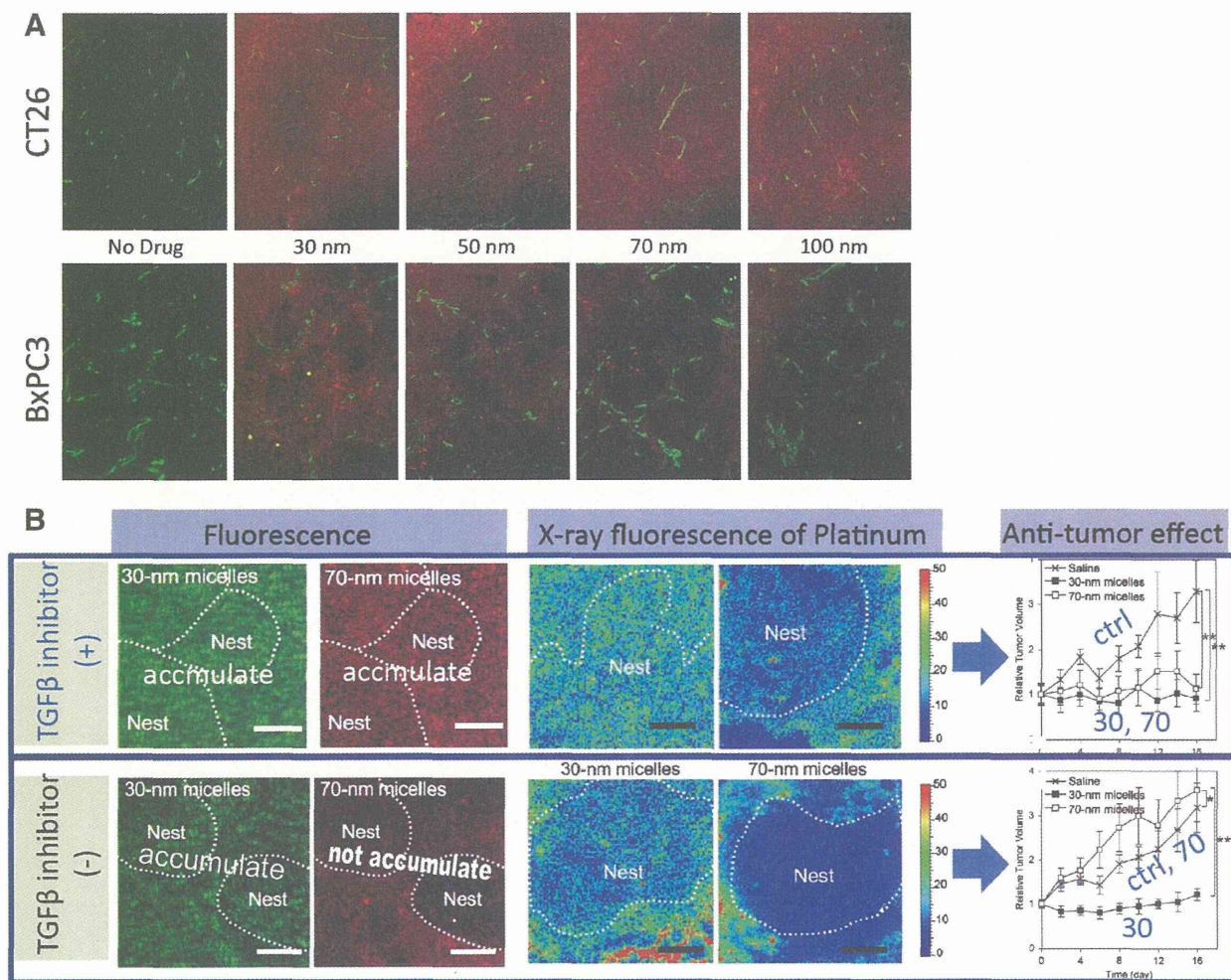


Fig. 8. Size-dependent differences in the distribution of nanoparticles. (A) Fluorescence with micelles of various sizes. In the CT26 model, micelles of 30 to 100 nm in diameter distribute almost uniformly in tumor tissue. However in the BxPC3 model, only micelles 30 nm in diameter can distribute with difficulty in tissue, while others show little distribution. (B) Distribution and therapeutic efficacy in the BxPC3 model, with or without, TGF- β inhibitor. Analyses using both fluorescence and X-ray fluorescence revealed that the 30 nm micelle does distribute in the BxPC3 model without modification of capillaries by TGF- β inhibitor, while the 70 nm micelle does need inhibitor. These results were consistent with a growth inhibitory study of the same model. Modified from [46].

and 2) nanoparticle size with regard to optimizing its performance (Fig. 9A). If particle size is too large, relative to capillary structure with a certain level of leakiness, the particle will not extravasate. On the other hand, if particle size is too small, it may not be retained and distribute into tissue. Thus we need a particle size that facilitates extravasation and retention. Furthermore lymphatic drainage in the disease locus may also play a role in this: we don't know. But, we do know we want the drug to target the diseased tissue more accurately to avoid side effects.

Let us consider the matter further by examining what circulates in the bloodstream. There are several molecules, from oxygen with a molecular weight (MW) of 32 – although largely bound to red blood cells (RBCs) with a diameter of 7 μm – to glucose with a MW of 180 bound to blood cells such as RBCs (Fig. 9B). There are antibodies including those used as drugs, virus particles or particles that mimic them (some vaccines, for example), plus albumin and compounds bound to albumin. Using such particles we want to develop our future hypothesis. However, arriving at a general theory of the behavior of nanoscale particles in the blood may not be so straightforward because particles are influenced not only by size, but also by other properties such as surface electric charge [51], shape – Are they spheres or rods, for example? [52–54] – flexibility [55], and other factors may also be important.

2.4. New technologies offer novel perspectives on tumor microcirculation

In addition to consideration of the many kinds of particles of different sizes described above, we also need to consider the novel possibility of being able to tailor nanoparticles of different sizes or softness that have similar properties and an almost neutral electric charge from biocompatible polymers (see review by Kishimura et al. in this series). This novel technology enables us to consider the size-dependent behavior of nanoparticles independent of other factors.

However, novel observations using nanoparticles of tumor microcirculation in pancreatic cancer, for example, also raise new challenges. One is a need to establish clinically realistic animal models of tumors characterized by rich fibrosis and capillaries with dense pericyte coverage. The establishment of novel in vitro models is also needed to analyze the detailed mechanism of pericyte–endothelial interaction in relation to nanoparticle extravasation.

3. Conclusions

In this review, we discuss the exciting new perspectives opened up by use of nanoparticles in understanding tumor microcirculation: this is especially true of the relationship between the capillary structure of

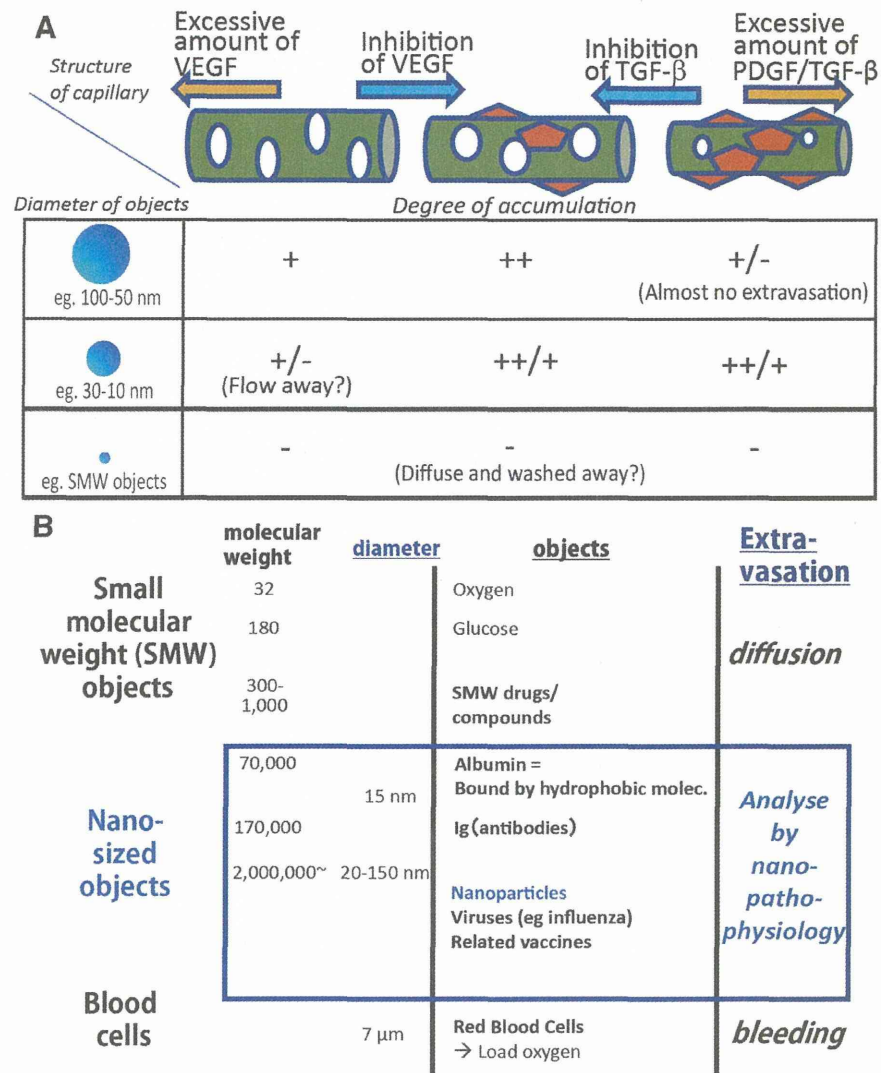


Fig. 9. Particle size and extravasation. (A) Balance between capillary structure in disease foci, especially with regard to pericyte coverage, and nanoparticle size. (B) Sizes of particles flowing in the bloodstream vary in the range $\mu\text{m} - \text{\AA}$: a difference of the order of 10^4 in diameter, or 10^8 in sectional area.

a given tumor and its clinical tractability. An advantage of using nanoparticles is that we can integrate morphological and physiological information. Various structural factors are likely implicated in determining the physiological characteristics of capillaries, including vascular permeability to differing agents, but analyzing the distribution of nanoparticles of different sizes within tissue offers a unique means of elucidating how they work. For this reason we call our field of research: “nano-pathophysiology”, and anticipate exciting discoveries from its further development.

Acknowledgments

The author would like to thank Hiroyoshi Y. Tanaka especially for his careful and critical reading of the manuscript, and his extensive writing assistance. The author also thanks Sayaka Tanaka for her critical reading of the manuscript and Michael W. Miller for editorial work.

This work was supported by JSPS KAKENHI Grants (Nos. 19790282 and 23790433), Health Labor Sciences Research Grants, grants from the Japan Foundation for Applied Enzymology, and the Funding Program for World-Leading Innovative R & D on Science and Technology

(FIRST program) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS).

References

- [1] K.G. Chen, B.I. Sikic, Molecular pathways: regulation and therapeutic implications of multidrug resistance, *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 1863–1869.
- [2] P. Mehlen, A. Puisieux, Metastasis: a question of life or death, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 449–458.
- [3] D.X. Nguyen, P.D. Bos, J. Massagué, Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization, *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 274–284.
- [4] E. Sugihara, H. Saya, Complexity of cancer stem cells, *Int. J. Cancer* 132 (2013) 1249–1259.
- [5] N.A. Saunders, F. Simpson, E.W. Thompson, M.M. Hill, L. Endo-Munoz, G. Leggatt, et al., Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives, *EMBO Mol. Med.* 4 (2012) 675–684.
- [6] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* 100 (2000) 57–70.
- [7] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- [8] J. Folkman, E. Merler, C. Abernathy, G. Williams, Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis, *J. Exp. Med.* 133 (1971) 275–288.
- [9] M. Potente, H. Gerhardt, P. Carmeliet, Basic and therapeutic aspects of angiogenesis, *Cell* 146 (2011) 873–887.
- [10] D.W. Leung, C. Cachianes, W.J. Kuang, D.V. Goeddel, N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science* 246 (1989) 1306–1309.

Please cite this article as: M.R. Kano, Nanotechnology and tumor microcirculation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.010>

- [11] D.E. Richard, E. Berra, J. Pouyssegur, Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266 (1999) 718–722.
- [12] G.U. Dachs, G.M. Tozer, Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 1649–1660.
- [13] H.F. Dvorak, J.A. Nagy, J.T. Dvorak, A.M. Dvorak, Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules, *Am. J. Pathol.* 133 (1988) 95–109.
- [14] P. Carmeliet, VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer, *Oncology* 69 (Suppl. 3) (2005) 4–10.
- [15] D.R. Senger, S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, H.F. Dvorak, Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science* 219 (1983) 983–985.
- [16] L.S. Rosen, Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers, *Cancer Control* 9 (2002) 36–44.
- [17] H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, et al., Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 2335–2342.
- [18] R.K. Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy, *Science* 307 (2005) 58–62.
- [19] C. Hwa, W.C. Aird, The history of the capillary wall: doctors, discoveries, and debates, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293 (2007) H2667–H2679.
- [20] M. Malpighi, G.A. Borelli, De pulmonibus, observationes anatomicae, Typis Io. Baptistae Ferronij, Bononiae, 1661.
- [21] T. Schwann, *Microscopical Researches into the Accordance in the Structure and Growth of Animals and Plants*, Sydenham Society, London, 1847.
- [22] A. Vesalius, *De Humani Corporis Fabrica*, Johannes Oporinus, Basel, Switzerland, 1543.
- [23] W. Harvey, *Exercitatio de motu cordis et sanguinis in animalibus*, Guilielmi Fitzeri, Frankfurt, 1628.
- [24] P.K. Working, M.S. Newman, S.K. Huang, E. Mayhew, J. Vaage, D.D. Lasic, Pharmacokinetics, biodistribution and therapeutic efficacy of doxorubicin encapsulated in Stealth® liposomes (Doxil®), *J. Liposome Res.* 4 (1994) 667–687.
- [25] Doxil Prescribing Information, 2012.
- [26] M.R. Dreher, W. Liu, C.R. Michelich, M.W. Dewhirst, F. Yuan, A. Chilkoti, Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (2006) 335–344.
- [27] M.R. Kano, Y. Komuta, C. Iwata, M. Oka, Y. Shirai, Y. Morishita, et al., Comparison of the effects of the kinase inhibitors imatinib, sorafenib, and transforming growth factor- β receptor inhibitor on extravasation of nanoparticles from neovasculature, *Cancer Sci.* 100 (2009) 173–180.
- [28] Y. Matsumura, H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Res.* 46 (1986) 6387–6392.
- [29] J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, 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 (2011) 136–151.
- [30] K.W. Zimmermann, Der feinere Bau der Blutcapillaren, *Z. f. d. Ges. Anat.* 63 (1923) 29–109.
- [31] P. Leveen, M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, C. Betsholtz, Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities, *Genes Dev.* 8 (1994) 1875–1887.
- [32] M. Hellstrom, M. Kal n, P. Lindahl, A. Abramsson, C. Betsholtz, Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse, *Development* 126 (1999) 3047–3055.
- [33] P. Lindblom, H. Gerhardt, S. Liebner, A. Abramsson, M. Enge, M. Hellstrom, et al., Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall, *Genes Dev.* 17 (2003) 1835–1840.
- [34] A. Armulik, G. Genové, C. Betsholtz, Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises, *Dev. Cell* 21 (2011) 193–215.
- [35] M.R. Kano, Y. Morishita, C. Iwata, S. Iwasaka, T. Watabe, Y. Ouchi, et al., VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFR β signaling, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 3759–3768.
- [36] L. Zhang, H. Nishihara, M.R. Kano, Pericyte-coverage of human tumor vasculature and nanoparticle permeability, *Biol. Pharm. Bull.* 35 (2012) 761–766.
- [37] Y. Cao, Z.-L. Zhang, M. Zhou, P. Elson, B. Rini, H. Aydin, et al., Pericyte coverage of differentiated vessels inside tumor vasculature is an independent unfavorable prognostic factor for patients with clear cell renal cell carcinoma, *Cancer* 119 (2013) 313–324.
- [38] R.A. Weinberg, *The Biology of Cancer*, Garland Science, New York, NY, USA, 2007.
- [39] M.R. Kano, Y. Bae, C. Iwata, Y. Morishita, M. Yashiro, M. Oka, et al., Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF- β signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 3460–3465.
- [40] J.M. Yingling, K.L. Blanchard, J.S. Sawyer, Development of TGF- β signalling inhibitors for cancer therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 1011–1022.
- [41] Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro, K. Kataoka, Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy, *Bioconjug. Chem.* 16 (2004) 122–130.
- [42] T. Minowa, K. Kawano, H. Kuribayashi, K. Shiraishi, T. Sugino, Y. Hattori, et al., Increase in tumour permeability following TGF- β type I receptor-inhibitor treatment observed by dynamic contrast-enhanced MRI, *Br. J. Cancer* 101 (2009) 1884–1890.
- [43] M. Kumagai, M.R. Kano, Y. Morishita, M. Ota, Y. Imai, N. Nishiyama, et al., Enhanced magnetic resonance imaging of experimental pancreatic tumor in vivo by block copolymer-coated magnetite nanoparticles with TGF- β inhibitor, *J. Control. Release* 140 (2009) 306–311.
- [44] K. Miyata, M. Oba, M.R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, et al., Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor tissue, *Pharm. Res.* 25 (2008) 2924–2936.
- [45] M.R. Mancuso, R. Davis, S.M. Norberg, S. O'Brien, B. Sennino, T. Nakahara, et al., Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 2610–2621.
- [46] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, et al., Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 815–823.
- [47] M. Harada, C. Iwata, H. Saito, K. Ishii, T. Hayashi, M. Yashiro, et al., NC-6301, a polymeric micelle rationally optimized for effective release of docetaxel, is potent but is less toxic than native docetaxel in vivo, *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 2713–2727.
- [48] M. Yasunaga, S. Manabe, D. Tarin, Y. Matsumura, Cancer-stroma targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue, *Bioconjug. Chem.* 22 (2011) 1776–1783.
- [49] M. Yasunaga, S. Manabe, D. Tarin, Y. Matsumura, Tailored immunoconjugate therapy depending on a quantity of tumor stroma, *Cancer Sci.* 104 (2013) 231–237.
- [50] Z. Cheng, A. Al Zaki, J.Z. Hui, V.R. Muzykantor, A. Tsourkas, Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities, *Science* 338 (2012) 903–910.
- [51] E. Fröhlich, The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 5577–5591.
- [52] B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Lett.* 6 (2006) 662–668.
- [53] G. Adriani, M.D. de Tullio, M. Ferrari, F. Hussain, G. Pascazio, X. Liu, et al., The preferential targeting of the diseased microvasculature by disk-like particles, *Biomaterials* 33 (2012) 5504–5513.
- [54] K. Yang, Y.-Q. Ma, Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer, *Nat. Nanotechnol.* 5 (2010) 579–583.
- [55] C. Huang, P.J. Butler, S. Tong, H.S. Muddana, G. Bao, S. Zhang, Substrate stiffness regulates cellular uptake of nanoparticles, *Nano Lett.* 13 (2013) 1611–1615.