

201308027A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進

医療機器開発

総合推進

研究事業

腫瘍血管内皮細胞への薬物送達システムによる  
耐性癌の化学療法と臨床応用へ向けた製剤化

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 櫻井 遊

平成26(2014)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進（医療機器開発

（ナノテクノロジーなど）総合推進）研究事業

腫瘍血管内皮細胞への薬物送達システムによる  
耐性癌の化学療法と臨床応用へ向けた製剤化

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 櫻井 遊

平成26（2014）年 5月

# 目次

I. 総括研究報告	1
腫瘍血管内皮細胞への薬物送達システムによる 耐性癌の化学療法と臨床応用へ向けた製剤化	
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・別刷り	10

# I. 総括研究報告

腫瘍血管内皮細胞への薬物送達システムによる

耐性癌の化学療法と臨床応用へ向けた製剤化

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進（医療機器開発（ナノテクノロジーなど）総合推進）研究事業  
総括研究報告書

腫瘍血管内皮細胞への薬物送達システムによる耐性癌の化学療法と  
臨床応用へ向けた製剤化

研究代表者 櫻井 遊 北海道大学 大学院薬学研究院 特任助教

## 研究要旨

がん細胞自身ではなく血管新生を阻害することは耐性癌治療の有用な手段であり、薬物送達システム (DDS) による腫瘍血管内皮選択的な抗癌剤の送達は、効果の向上と副作用の軽減に有効である。申請者は標的化リガンドと細胞膜透過性ペプチドを組み合わせた dual-ligand リポソームにより腫瘍血管へ選択的な薬物送達と耐性癌治療に成功している。従来治療効果に乏しい癌種でも DDS で血管に薬物を送達し抗腫瘍効果が示されれば、既存の抗癌剤の適応拡大とライフサイクルの延長など医薬品産業の競争力を下支えする基盤技術として貢献が期待される。またポソーム製剤の開発を通じて医薬品レギュレーション行政へ貢献が期待される。本事業では、dual-ligand リポソームを用いた耐性癌化学療法を最終目的として、適応癌種拡大と非臨床試験へむけた製剤化の検討を行った。

平成25年度の研究では、閉鎖流路を用いたリポソームの大量製造に着手した。閉鎖流路として、有機化合物合成に用いられるマイクロリアクターとシリンジポンプを組み合わせたシステムを作成した。流速や脂質濃度などの検討を行うことで、目的の大きさを有する、およそ 100 mL/hr 単位でのリポソームの大量製造法の確立に成功した。

### A. 研究目的

がん治療の際に外科的療法と並んで用いられる化学療法において、最も問題とされるのは薬剤耐性化である。原因としてよく知られているものは、白金製剤では白金を解毒するメタロチオネイン、その他の低分子化合物では薬剤の細胞外への排出を担う P 糖たんぱく質の発現後身である。これらの特性変化はがん細胞自

身の増殖速度が通常の細胞と比較して非常に早く、それに伴いゲノム配列が変異を起こしやすいという特徴に起因するとされている。こういった背景の元、がん細胞に酸素や栄養の供給を担う腫瘍内の血管を標的とした血管新生阻害療法が注目されており、薬剤耐性癌にも有効であることが報告されている。しかし、一方では消化管出血や腎障害など重篤な副作用

用が問題となっている。これは、がん組織以外の正常組織の血管においても既存の血管新生阻害剤の標的遺伝子が阻害され、正常組織のホメオスタシスが崩れてしまうことが一因である。したがって、疾患部位であるがん組織の腫瘍血管に選択的薬物送達を可能とする薬物送達システム (Drug Delivery System; DDS) は治療効果の増強と副作用の軽減に有効な手立てとなる。

我々は、腫瘍血管内皮細胞に選択的に薬物を送達可能な腫瘍血管内皮標的化 dual-ligand リポソームの開発に成功している (PCT/JP2011/053963)。Dual-ligand リポソームは、腫瘍血管に特異的に発現している標的分子を認識する選択的リガンドと、細胞内取り込みを飛躍的に向上させる細胞膜透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide; CPP) が修飾されている。また、腫瘍血管への親和性の向上を目的として、直径を約 300 nm に制御している (Fig. 1)。これまでにドキソルビシン封入リポソーム Doxil<sup>®</sup>では全く効果の無い薬剤耐性がん種であるヒト腎細胞がんを用いた *in vivo* モデルにおいて、抗腫瘍効果が得られることを明らかとしている (Takara K *et al.*, *J Control Release* 2013)。本システムを臨床に適用することが可能となれば、既存の抗がん剤の適応拡大、すなわち医薬品のライフサイクルマネジメントが容易になることが期待される。さらに、リポソームは水相や疎水相に核酸を含む様々な医薬品分子を封入することができることから、今後革新的医薬品の創製にもつながり得ると考えられる。また、リポソ

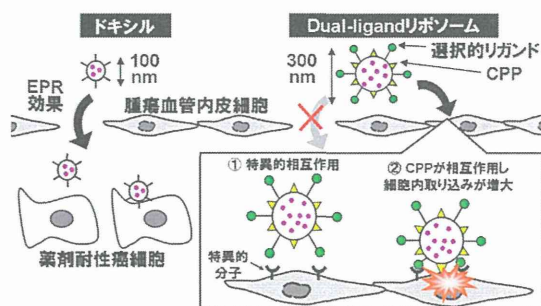


Fig. 1 Dual-ligand リポソームの概念図

ーム製剤の開発を通じて医薬品医療機器総合機構「医薬品・医療機器や久慈戦略相談」を活用し、ナノテクノロジーを基盤とする医薬に置いて必要な規格試験や特性解析などの検討を通じて、医薬品レギュレーション行政への貢献が見込まれる。

以上より、本研究事業の2年目 (平成25年度) では、腫瘍血管へ抗がん剤を送達し薬剤耐性がんを治療可能な dual-ligand リポソームの臨床応用化を最終目的として、非臨床試験に向けた GMP 基準の製剤化に向けた大量調製法の確立を目的として研究を遂行した。また、粒子径の増大がもたらす腫瘍血管内皮細胞への結合力の増大メカニズムの解明も合わせて行った。

## B. 研究方法

### ① 新規 ligand 修飾ラージサイズリポソームの開発と *in vivo* での機能評価

本年度は、dual-ligand リポソームを修飾する標的化リガンドとして腫瘍血管内皮細胞に高発現する  $\alpha_v\beta_3$  integrin を認識する cyclic RGD ペプチドを用いた (RGD リポソーム)。初めにこれまでと同様大きな粒子径を有するリポソームが効

果的に腫瘍血管内皮細胞を標的化可能かの評価を行った。

本実験で用いたリポソームは単純水合法で調製を行った。Egg phosphatidylcholine (EPC) とコレステロール (chol)、polyethyleneglycol (PEG) 脂質、およびその他のリガンド、CPP 等を、EPC:chol が 7:3、その他が任意の顔料となるようにガラス試験管に滴下し、よく混合した。その後、減圧下有機溶媒を留去することで、脂質薄膜を得た。等張にした 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) あるいは 20 mM アンモニウム硫酸緩衝液 (pH 5.5) を加えて水和したのち、拡張することで脂質薄膜をかき離させた。その後、任意のサイズの小孔を有するポリカーボネート膜を用いて粒子径を整えた。粒子径ならびにゼータ電位は動的光散乱法 (Zetasizer Nano ZA ZEN3600、Malvern 社) によって測定した。

血管内皮細胞への RGD リポソームの取り込みはヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討を行った。取り込みを見る際には、RGD リポソームの脂質薄膜を調製する際に 0.1% の蛍光物質ローダミン標識脂質を添加することで、RGD リポソームに蛍光標識を施した。HUVEC 細胞への取り込みは、リポソームを添加してから 2 時間後に共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) あるいは細胞溶解液の蛍光強度を測定することにより求めた。

in vivo での機能評価はヒト腎細胞がん OS-RC-2 細胞  $1.0 \times 10^6$  細胞を免疫不全マウス (BALB/cAJcl nu/nu) の背

部皮下に移植したがんモデルを用いた。移植して 10 日程度経過したのちに、蛍光標識 RGD リポソームを尾静脈内より投与し、24 時間後に腫瘍の様子を CLSM (Nikon A1r) を用いて観察した。血管の造影にはフルオレセインで蛍光標識された *Griffonia simplicifolia* 由来の isolectin B4 40  $\mu\text{g}$  を腫瘍採取の 10 分前に静脈内投与することで行った。

ドキソルビシン (DOX) 封入 RGD リポソームの薬理効果を調べる際には、先ほど同様に作製した担がんマウスに対して、DOX 量で 1.0 - 2.0 mg/kg body weight の投与量で投与したのちに、継続的に腫瘍体積を測定し、抗腫瘍効果の判定を行った。なお、全身毒性の目安としては体重をモニタリングすることで簡易的に評価した。

RGD リポソームの HUVEC 細胞との解離定数 (dissociation constant;  $K_D$ ) は、種々のリポソームを添加した際の細胞内取り込み量をプロットし、シグマプロットを用いて近似曲線を描くことにより算出した。

## ② GMP 基準での製造に向けた、閉鎖流路でのリポソーム製造

閉鎖流路による連続式のリポソーム調製を行った。流路としてはワイエムシ社のマイクロリアクター (SUS 製、Deneb (helix) 型) を用いた。脂質アルコール溶液と緩衝液はそれぞれ 10 mL ディスポーザブルシリンジ (Henke-Sass, Wolf 社) をシリンジポンプ (ハミルトン社) を用いて任意の流速で射出するように操作した。

リポソーム溶液中のアルコールはタンジェンシャルフローろ過により除去した。MicroKros (Spectrum 社、MWCO 50,000) を用いて、溶液を 500  $\mu$ L まで濃縮したのちに、PBS 5 mL を加え、再び 500  $\mu$ L まで濃縮した。この操作を 3 回行うことで、ICH ガイドラインに定められているアルコール残存量よりも理論的に少ないように設定している。

なお、本研究事業は動物実験を実施するため、北海道大学が定める「動物実験に関する規定」に基づく承認を取得済みであり、必要最低限の個体数やがん治療実験における適切なエンドポイントの設定など、動物愛護上の配慮をした上で、遂行した。

### C. 研究結果

#### ① 新規 ligand 修飾ラージサイズリポソームの開発と *in vivo* での機能評価

RGD モチーフを含む $\alpha_v\beta_3$  integrin 標的リガンド修飾リポソームを 100 nm と 400 nm のポアサイズを持つポリカーボネート膜に通すことにより平均粒子径約 100 nm の small size リポソーム (Small) と 300 nm の large size リポソーム (Large) を得た (Fig. 2)。

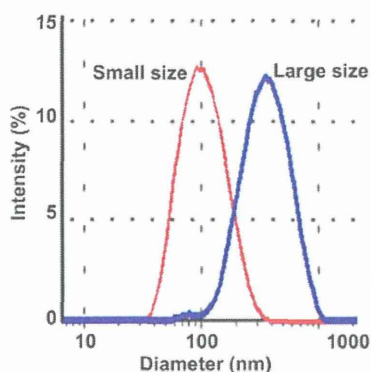


Fig. 2 各粒子径のリポソームの粒度分布

蛍光標識を施した、これら異なるサイズを持つリポソームを HUVEC 細胞に添加し、2 時間後に細胞を CLSM により観察した。その結果、Large においてより強い蛍光が細胞内に認められた (Fig. 3)。一方で、リガンドを修飾していないリポソームではこのような増大は認められなかった。

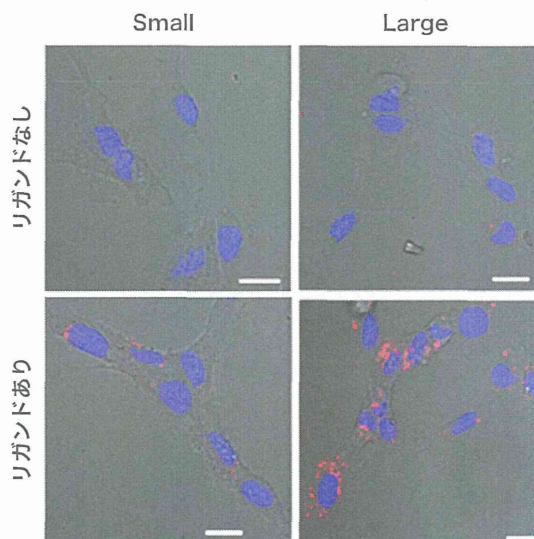


Fig. 3 リポソームの大きさが細胞内取り込み量に与える影響。赤はリポソーム、青は細胞核を表す。

同様に蛍光標識した Small と Large を細胞に脂質濃度で  $0.2-10 \times 10^{10}$  粒子となるように添加し、2 時間後の細胞内の蛍光量を定量した。これをプロットすることで得た近似曲線から各々の  $K_D$  値を算出したところ Small で 6.96、Large で 0.62 粒子/well であった。このことから、細胞への結合力は Large のほうが 10 倍高いことが示唆された。

次に担がんマウスを用いて *in vivo* での検討を行った。担癌マウスはヒト腎細胞がん移植免疫不全マウスを用いた。初めに Large と Small の腫瘍血管内皮細胞



への結合力の違いが *in vivo* でも見られるかを評価するために、Small と Large の各 RGD リポソームを担がんマウスの尾静脈内より投与を行い、腫瘍血管との共局在を CLSM によって観察した。その結果、Large において腫瘍血管とより多くのリポソームが共局在している様子が観察された (Fig. 4)。

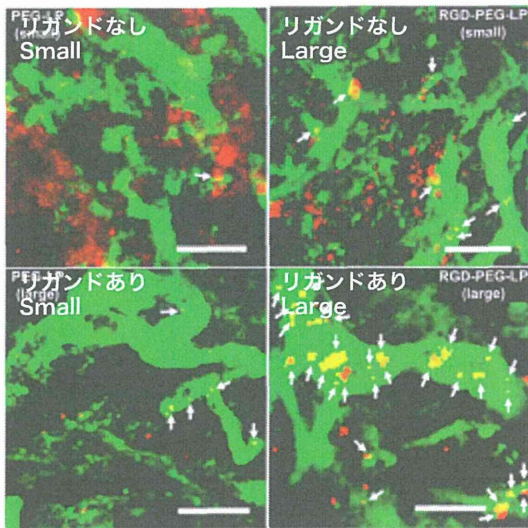


Fig. 4 リポソームの大きさが *in vivo* での腫瘍血管内皮細胞標的性に与える影響。赤はリポソーム、緑は血管を表す。

最後にこれまで見られてきた Large と Small の血管内皮細胞への結合力の違いが治療効果に影響を与えるのか検証を行った。ドキソルビシンをリガンドなしリポソーム、Small、Large に封入し、ドキソルビシン量として 1.5 mg/kg で毎日 3 日間投与を行い、腫瘍の体積を継続的に測定した。その結果、Large においてのみ有意な抗腫瘍効果が認められた (Fig. 5)。

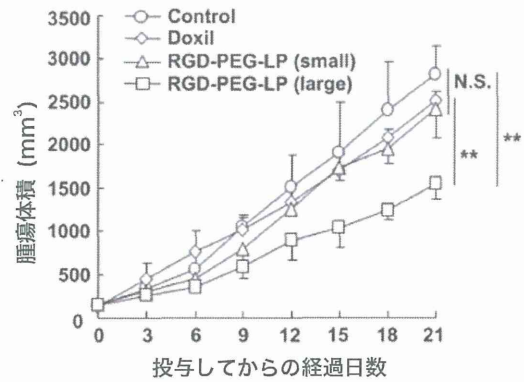


Fig. 5 ヒト腎細胞がん移植モデルにおける治療効果。

## ② GMP 基準での製造に向けた、閉鎖流路でのリポソーム製造

閉鎖流路によるリポソーム製造は下記の図に示すような装置を作成して行った (Fig. 6)。ワイエムシ社のマイクロリアクター (heilx 型) に対して、ハミルトン社製のシリンジポンプを用いて、流路内にリン酸緩衝液と脂質アルコール溶液を注入した。リン酸緩衝液と脂質アルコール溶液は図に示すようなそれぞれ 0.3 ~ 12.0 mL/min、0.1 ~ 3.0 mL/min で流している。なお流速比については簡単な予備検討より、リン酸緩衝液と脂質アルコール溶液が 3:1 となるようにした。

初めに流速が粒子形成に与える影響の評価を行った。流速をそれぞれ上記のよ

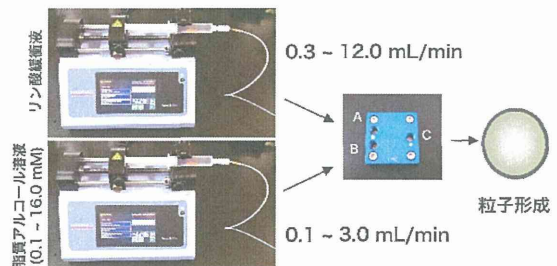


Fig. 6 閉鎖流路によるリポソーム調製の模式図

うに変化させ、形成した粒子の物性を動的散乱法によって測定した。その結果、流速の増大に応じて粒子径は逆相関的に減少した (Fig. 7A)。このことから、流速の調節によって粒子のサイズは制御可能であることが示唆された。次に、脂質濃度と粒子サイズの相関について検討を行った。脂質濃度を 0.1 ~ 16.0 mM まで変化させて粒子を形成させた際の粒子物性を同様に動的散乱法によって決定した。その結果、2.0 mM 以上では安定に粒子形成が可能であることが明らかとなった (Fig. 7B)。

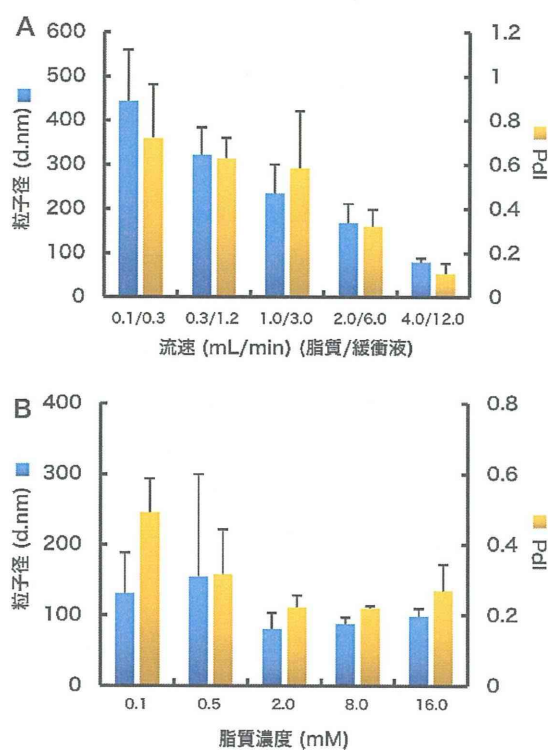


Fig. 7 閉鎖流路により調製したリポソームの物性。A) 流速を変えた際のリポソームの物性変化。B) 脂質濃度を変えた際のリポソームの物性変化。

さらに流速を 4.0/12.0 (脂質アルコール溶液/緩衝液) mL/min によって作成した粒子径の小さなリポソームについてろ過滅菌が可能かの検討も行った。0.2  $\mu\text{m}$  のセルロースアセテート、ポリエーテルスルホン製のフィルターを用いてろ過操作を行った。あらかじめ脂質膜に蛍光標識を施すことでろ過前後の脂質回収率を算出した。その結果、セルロースアセテート製のメンブレンを用いた際にはろ過後にリポソームの脂質由来の蛍光は検出できなかった。一方で、ポリエーテルスルホン製のメンブレンを用いた際にはろ過後でも 90%程度の高い回収率で改修することが可能であった。

#### D. 考察

粒子増大による標的細胞に対する親和性の向上が認められた。これは、リポソーム上のリガンドが細胞と多価で結合することが可能になっているためだと考えられる (Fig. 8)。これにより、in vivo においても腫瘍血管内皮細胞への結合力が高まり、血中を循環する RGD リポソームが腫瘍血管内皮細胞への結合・細胞内取り込みが誘起されやすくなったものと推察される。

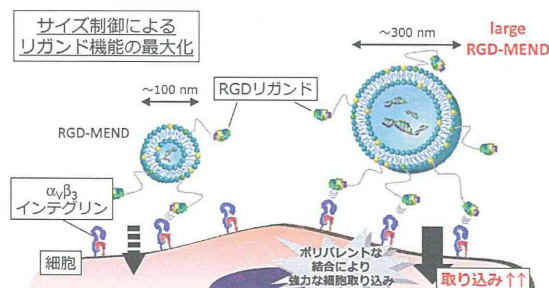


Fig. 8 粒子径を増大させた際の細胞への多価的結合

また、連続的な製剤調製に関しては、閉鎖流路を用いても特定の流速比、脂質濃度で溶液を注入することにより、任意の粒子径のリポソームを調製することに成功した。アルコールに溶解した脂質溶液を水溶液によって希釈してリポソームを形成する際には、それぞれの溶液の混合速度が重要であると報告されている。この結果は、過去のリポソーム形成の報告を満たすものであると言える。また、最終滅菌処理についても検討を行い、親水性のポリマーを使用することで脂質を損なうことなくリポソームをフィルター滅菌に供することが可能となった。今後、大きな粒子径を有するリポソーム調製の場合には原材料のろ過滅菌と最終製材の $\gamma$ 線による滅菌するなどすることで、無菌状態を担保した製剤の開発を行っていく予定である。

## E. 結論

粒子サイズを大きくすることで細胞への親和性が大きく向上していることが明らかとなった。これは、細胞膜上の受容体とリポソーム上のリガンドがより多価の結合が可能となっていると考えられる。

また、製剤化においては目的とする粒子サイズへの制御を可能とする連続式製造法の確立に成功した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kibria G, Hatakeyama H, Harashima H. “Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system.” *Archives of Pharmacol Research*, 37(1): 4-15 (2014)
- 2) Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Ohga N, Hida K, Harashima H. “RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system.” *Journal of Controlled Release*, 173:110-118 (2014)
- 3) Akhter A, Hayashi Y, Sakurai Y, Ohga N, Hida K, Harashima H. “A liposomal delivery system that targets liver endothelial cells based on a new peptide motif present in the ApoB-100 sequence.” *International Journal of Pharmaceutics*, 456(1): 195-201 (2013)
- 4) Kibria G, Hatakeyama H, Ohga N, Hida K, Harashima H. “The effect of liposomal size on the targeted delivery of doxorubicin to Integrin  $\alpha v \beta 3$ -expressing tumor endothelial cells.” *Biomaterials*. 34(22): 5617-5627 (2013)
- 5) 櫻井遊, “核酸医薬の現状と創薬のパラダイムシフト” *道薬誌*, 30 巻

12号: 4-10 ページ 2013  
年

(2013年10月で研究代表者の変更があったため、畠山と櫻井、両者の成果について記載している。)

## 2. 学会発表

- 1) 櫻井遊, 畠山浩人, 兵藤守, 秋田英万, 原島秀吉 “腫瘍血管内皮細胞標的型 siRNA デリバリーシステムの構築”, 日本薬剤学会第28年会、2013年5月23-25日、ウイנקあいち、名古屋
- 2) Hakeyama H *et al.*, “Development

of a pH-sensitive multifunctional envelope-type nano device (MEND) as an efficient nucleic acids delivery system”, July 21-24 2013, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, U.S.A

(2013年10月で研究代表者の変更があったため、畠山と櫻井、両者の成果について記載している。)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

本調製法に関しては、特許の出願に関して、本学の知財部と協議中である。

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍  
該当なし

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
Kibria G, Hatakeyama H, Harashima H.	Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system.	Archives of Pharmacal Research	37 巻 1 号	4-15	2014 年
Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Ohga N, Hida K, Harashima H.	RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system.	Journal of Controlled Release	173 号	110-118	2014 年
Akhter A, Hayashi Y, Sakurai Y, Ohga N, Hida K, Harashima H.	A liposomal delivery system that targets liver endothelial cells based on a new peptide motif present in the ApoB-100 sequence.	International Journal of Pharmaceutics	456 巻 1 号	195-201	2013 年
Kibria G, Hatakeyama H, Ohga N, Hida K, Harashima H.	The effect of liposomal size on the targeted delivery of doxorubicin to Integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing tumor endothelial cells.	Biomaterials	34 巻 22 号	5617-5627	2013 年
櫻井遊	核酸医薬の現状と創薬のパラダイムシフト	道薬誌	30 巻 12 号	4-10	2013 年

### Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷り

# Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system

Golam Kibria · Hiroto Hatakeyama ·  
Hideyoshi Harashima

Received: 25 September 2013 / Accepted: 22 October 2013 / Published online: 23 November 2013  
© The Pharmaceutical Society of Korea 2013

**Abstract** Multidrug resistance (MDR), the principal mechanism by which many cancers develop resistance to chemotherapy, is one of the major obstacles to the successful clinical treatment of various types of cancer. Several key regulators are responsible for mediating MDR, a process that renders chemotherapeutic drugs ineffective in the internal organelles of target cells. A nanoparticulate drug delivery system (DDS) is a potentially promising tool for circumventing such MDR, which can be achieved by targeting tumor cells themselves or tumor endothelial cells that support the survival of MDR cancer cells. The present article discusses key factors that are responsible for MDR in cancer cells, with a specific focus on the application of DDS to overcome MDR via the use of chemotherapy or macromolecules.

**Keywords** Cancer multidrug resistance (MDR) · Key regulators · Drug delivery system · Reversal of MDR

## Introduction

Cancer is one of the leading causes of death globally. According to the reports of World Health Organization (WHO), there are over 7.6 million deaths and over 12.4 million new cases of cancers reported each year (Boyle and Levin 2008). Cancer chemotherapy, a journey that began in the 1940s with the use of general cytotoxic agent such as

nitrogen mustard, followed by the development of potent natural-origin anti-cancer drugs in the 1960s, such as *Vinca* alkaloids and anthracyclines, is currently used in the treatment of cancers (Chabner and Roberts 2005). Approximately 50 different types of chemotherapeutic drugs are currently available for treating about 200 different types of cancers. Due to lack of selective efficacy in tumors, the use of chemotherapeutic drugs is typically accompanied by severe side effects, resulting in damage to normal organs. To limit the toxicity of such agents toward normal tissues, nanoparticulate drug delivery systems (DDS), such as liposomes, micelles, minicells, lipoplexes, gold nanoparticles, magnetic nanoparticles, carbon nanotubes, dendrimers, quantum dots, polymer-drug conjugates etc. have been developed, where the drug molecules are loaded or encapsulated in the nanoparticles and which can deliver the loaded drugs more specifically to cancer cells (Peer et al. 2007; Zhang et al. 2008). Although chemotherapeutic drugs efficiently kill cancer cells, cancer cells can defend themselves from such toxic compounds when they are used for an extended period or sometimes even after use for a short time, a process called the cancer multidrug resistance (MDR) (Luqmani 2005; Persidis 1999). Some cancers such as non-small cancers, lung cancer, renal and rectal cancer do not respond to chemotherapeutic drugs from the beginning of the drug exposure. Such a phenomenon referred to as primary or natural resistance. On the other hand, some cancers respond well to drugs in the early stages of treatment but show poor response later, a phenomenon that is referred to as acquired resistance. Cancer cells can become intrinsically resistant to similar or completely different types of drugs or under drug exposure, where it can express different types of compounds for use as a “Shield” (acquired resistance) against the drug molecules (Chabner and Roberts 2005;

G. Kibria · H. Hatakeyama · H. Harashima (✉)  
Laboratory of Innovative Nanomedicine, Faculty of  
Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita 12, Nishi 6,  
Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0812, Japan  
e-mail: harasima@pharm.hokudai.ac.jp



Luqmani 2005; Persidis 1999). On the other hand, cells in normal tissues of the cancer patients remain drug-sensitive even under prolonged treatment (Wright et al. 1990).

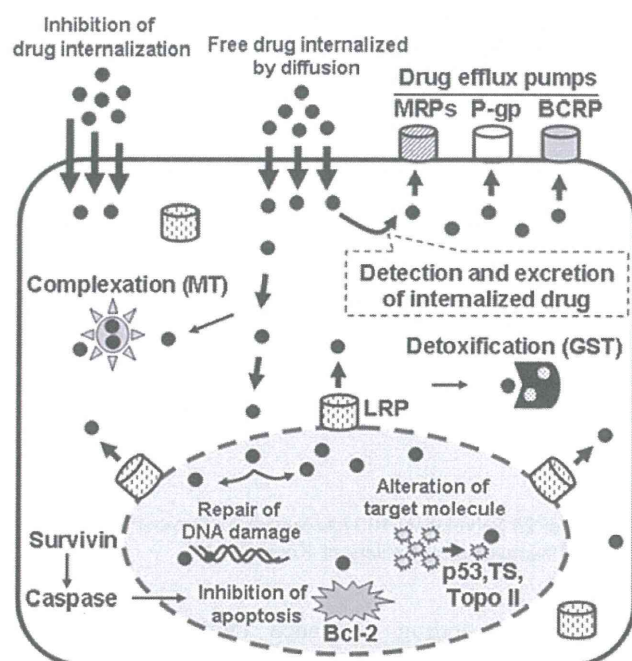
The exposure of cancer cells to chemotherapeutic drugs induces the expression of different genes that protect the cells, which limits the efficacy of chemotherapy and leads the failure of the treatment clinically (Persidis 1999), more specifically in over 90 % of patients with metastatic stage (Luqmani 2005). Due to such effects, applications of chemotherapeutic drugs are limited. Therefore, it is immensely important to explore strategies for utilizing currently available robust anti-cancer drugs against the MDR cancer cells. To accomplish this, it is important to understand the mechanisms responsible for the resistance of cancer cells to such drugs. The focus of this review is to discuss the mechanisms responsible for this resistance as well as on strategies for overcoming the MDR of cancer cells by utilizing DDS.

#### Factors responsible for multidrug resistance (MDR)

MDR, the principal mechanism by which cancer cells develop resistance to chemotherapy, remains a major obstacle for the successful treatment of cancer. It affects patients with a variety of blood cancers and solid tumors, including breast, ovarian, kidney, lung, prostate and gastrointestinal tract cancers (Persidis 1999; Dalton 1997). Over the past two decades, substantial efforts have been made to elucidate the mechanism of MDR in cancers. In this review, several notable factors responsible for mediating the cancer MDR are briefly discussed.

#### ABC transporters (ATP-binding cassette transporters)

One of the mechanisms that play a critical role in cancer patients is the prevention of the intracellular accumulation of anti-cancer drugs by the expression of transport proteins that pump the drugs out of the cells (Fig. 1). In addition, these transporters act on cellular compartments and block the access of anti-cancer drugs to their cellular targets (Rajagopal and Simon 2003). Several of these proteins belong to the mammalian adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) family of transporters, a large number of functionally diverse transmembrane proteins that are associated with the plasma membrane of cells (Fig. 1). In humans, 48 types of ABC transporters have been identified and are divided into 7 distinct subfamilies (ABCA-G) on the basis of their sequence homology and domain organization (Gottesman et al. 2002; Linton 2007). After the internalization of drugs through the plasma membrane, drug molecules are recognized by the transporters, where they use the energy provided by ATP hydrolysis to expel the drug molecules out of the cells,



**Fig. 1** Mechanism of cancer MDR showing the key regulator proteins responsible for excreting as well as the inactivation of chemotherapeutic drugs

resulting in a low bioavailability and finally leads to resistant to the drug in cancer cells.

#### Multidrug-resistant protein (P-glycoprotein)

The efflux of drugs mostly governs the defense of cancer cells against the chemotherapeutic drugs. P-glycoprotein (P-gp/MDR1; also called ABCB1), one of the major transmembrane transporters in humans (Fig. 1), is encoded by the ABCB1/MDR1 gene (Gottesman et al. 2002). It is a 170 kDa plasma membrane protein consisting of 12 transmembrane domains and two ATP-binding sites, and its function is energy-dependent. The expression of MDR1 RNA or P-gp has been observed in human tissues, including tumor cells. It is expressed in epithelial cells (gastrointestinal tract, liver, kidney etc.) and on the surface of capillary endothelial cells (brain, testes, ovaries, adrenal glands, bile canaliculi, renal tubular cells, placenta etc.) (Zhou 2008), where it acts as a barrier to the uptake of xenobiotics. P-gp is overexpressed in cancers that are intrinsically resistant to chemotherapy such as renal, adrenocorticoid, hepatocellular, pancreatic and colorectal carcinomas. Moreover, cancers with low or no initial P-gp expression, such as acute myeloid leukemia, breast cancer and small-cell lung cancer (SCLC) show elevated levels of expression after chemotherapy. P-gp plays a role in the development of the simultaneous resistance to multiple cytotoxic drugs in cancer cells. It actively transports several anti-cancer drugs (anthracyclines, vinca alkaloids,

podophyllotoxins, taxanes) and other hydrophobic compounds (fluorescent dyes, ethidium bromide, puromycin, gramicidin D etc.) out of cells (Wang et al. 2003; Zhou 2008). It excretes xenobiotics such as cytotoxic compounds into the gastrointestinal tract, bile and urine. It also participates in the function of the blood–brain barrier.

#### Multidrug resistance-associated proteins (MRPs)

Multidrug resistance-associated proteins (MRPs), the second type of drug pumps present in the cell membrane (Fig. 1), confer resistance of cancer cells to anti-cancer drugs. The MRP family proteins (MRP1-9) belong to the C group of the ABC transporters, which currently consists of 13 related members (ABCC1-13), that transport various organic anions (Borst et al. 2000; Toyoda et al. 2008) through conjugation with glutathione, glucuronide, glucose or sulfate; however, they can also be transported along with free glutathione without conjugation. The resistance profile mediated by MRPs is different from that of P-gp mediated resistance, although many anti-cancer drugs are affected by both mechanisms. Overexpression of MRPs results in resistance to anthracyclines, vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, methotrexate, cisplatin, etoposide, epirubicin, mitoxantrone etc. (Borst et al. 2000; Choi 2005; Toyoda et al. 2008; Zhang et al. 2012).

#### Breast cancer resistance protein (BCRP)

The BCRP, which is located in the plasma membrane of cells (Fig. 1), is a member of the G subfamily of ABC transporters (denoted as ABC-G2), also known as the mitoxantrone resistance gene (MXR) or ABC transporter in placenta (ABC-P) (Diestra et al. 2002; Doyle et al. 1998). Functionally it is a homodimer, and a half transporter consisting of six transmembrane domains and an ATP-binding domain. In normal human tissues, the expression of BCRP is elevated in the placenta, bile canaliculi, colon, small bowel and brain microvessel endothelium. In tumors, BCRP promotes the efflux of mitoxantrone, topotecan, irinotecan and methotrexate from cells, thereby leading to the resistance of cancer cells. The expression of this protein was detected in patients with acute myelogenous leukemia or acute lymphoblastic leukemia, but no clear association with response to chemotherapy or patient survival has been confirmed. In addition, the expression of BCRP was observed clinically in specimens taken from 21 different types of solid tumors with more frequent expressions in adenocarcinomas of the digestive tract, endometrium, and lung, as well as in melanomas (Diestra et al. 2002), suggesting the clinical relevance of drug resistance to BCRP expression in these types of cancers.

#### Lung resistance-related protein (LRP)

LRP, the major vault protein, is a complex ribonucleoprotein involved in intracellular transport processes (Scheffer et al. 2000). It is located in the cytoplasm where a small portion is localized in the nuclear membrane and nuclear pore complex (Fig. 1), and mediates the bidirectional distribution of compounds including the transport of cytotoxic drugs between the nucleus and the cytoplasm. LRP is not an ABC transporter but it is frequently expressed at high levels in drug-resistant cell lines and tumors, and might confer MDR by transporting drugs away from their intracellular targets and by the sequestration of drugs (Kickhoefer et al. 1998; Zhang et al. 2012). However, in addition to enhanced drug efflux, a number of studies using drug-resistant cell lines have demonstrated that LRP plays a role in the alteration of intracellular drug distribution (Dietel et al. 1990; Hazlehurst et al. 1999). Such an effect in drug distribution within the cellular compartments is most notable for DNA interacting drugs such as doxorubicin (DOX), where LRP expression is associated with the redistribution of DOX from the nucleus to the cytoplasm (Kitazono et al. 1999) without changing the total intracellular concentration of the drug (Fig. 1). With regard to clinical drug resistance, LRP expression in acute myelogenous leukemia, multiple myeloma, diffuse large B cell lymphoma and advanced ovarian carcinoma was reported to be associated with poor response to chemotherapy and shorter survival of patients with these types of cancers (Izquierdo et al. 1995; List et al. 1996; Raaijmakers et al. 1998).

#### Glutathione-S-transferases (GSTs)

GSTs, also called glutathione transferases or GSTs, are phase II detoxification enzymes that are ubiquitously expressed by most living organisms where they function to protect cells from being attacked by reactive electrophiles, thereby functioning as cell housekeepers engaged in detoxification (Fig. 1) and the elimination of xenobiotics and toxic compounds (Laborde 2010). Specifically, GSTs catalyse the conjugation of glutathione to a wide variety of endogenous and exogenous electrophilic compounds. In cancer therapeutics, GSTs have emerged as promising targets because their expression is higher in solid tumors and the fact that they function as an enzyme involved in the deactivation of anticancer agents as well as an inhibitor of signaling pathways of cell apoptosis. A notable example of this is the role of GSTs in the resistance of cancer cells to cisplatin. After cancer cells are exposed to cisplatin, the platinum (Pt) present in cisplatin is chelated by glutathione and the glutathione-Pt complex is excreted from the cell with the help of ATP dependent glutathione-S-conjugate

export (GS-X) pump or by the ABC-transporter (MRP2) (Borst et al. 2000).

### Metallothionein (MT)

MT, a group of low-molecular weight (6–7 kDa) cysteine-rich intracellular proteins (Cherian et al. 2003), binds and forms complexes (Fig. 1) with a number of trace metals including zinc, copper, cadmium, mercury, platinum and silver, and also protects cells against heavy metal toxicity, suggesting that it may also have a functional role in drug resistance. It is generally considered that anti-cancer drugs that contain metal ions (such as, cisplatin) in their structures would be more sensitive to the intracellular expression of MT. In several studies, it was found that the elevated level of MT and MT mRNA regulates the resistance of human SCLC, ovarian, testicular and colon tumors as well as fibroblasts, to anticancer drugs including to cisplatin, melphalan, bleomycin and cytarabine (Chin et al. 1993; Dziegiel et al. 2003; Kasahara et al. 1991; Kondo et al. 1995). In addition, MT also functions as a potential negative regulator of apoptosis (Shimoda et al. 2003) and due to such an effect, several cancer cells like lung cancer, hepatoma and hepatocellular carcinoma are resistant to etoposide.

### DNA topoisomerase II (Topo II)

Topoisomerase II (Topo II) has been identified as the site of action of several clinically used chemotherapeutic drugs, including doxorubicin, actinomycin D, mitoxantrone, etoposide, teniposide etc. (Liu 1989; Smith et al. 1993). These drugs, commonly called Topo II poisons, cause enzyme-mediated DNA damage (Tewey et al. 1984) followed by the induction of cell apoptosis, thus representing a promising and effective strategy for cancer chemotherapy. Cancer cells can defend themselves by altering the expression of Topo II with which the drug functions. The level of expression of Topo II in the cell nuclei is associated with the function of the drug (Fig. 1) as well as the sensitivity of the respective cells. Cells with reduced levels of Topo II were found to be resistant to Topo II poisons (such as DOX) as compared to cells overexpressing Topo II (Beck et al. 1993; Zhang et al. 2012), suggesting that the MDR of cancer cells is mediated through a reduction in enzyme-mediated DNA damage.

### Catalytic enzymes

Thymidylate synthase (TS) catalyzes the methylation of fluorodeoxyuridine monophosphate (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTMP), an important process for DNA biosynthesis (Danenber 1977; Jonston et al. 1995)

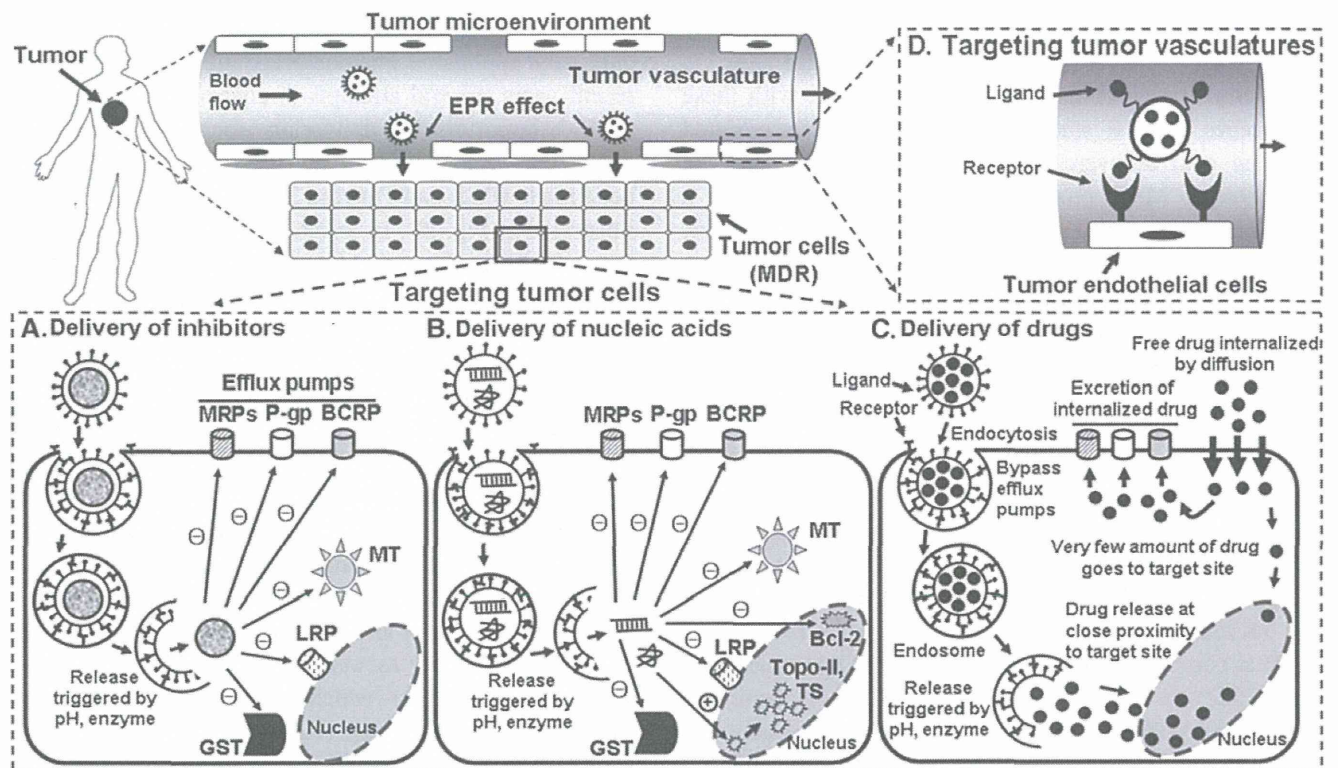
and this enzyme is the target of several chemotherapeutic drugs (Fig. 1), such as 5-fluorouracil (5-FU), methotrexate etc. It was reported that the prognosis of cancer patients with adenocarcinoma, colorectal cancer and non-SCLC (NSCLC) is significantly related to the expression of TS and its mRNA levels (Lenz et al. 1995; Shintani et al. 2003; Yamachika et al. 1998). On the other hand, the expression of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in solid tumors, a key enzyme responsible for the catabolism of 5-FU, was found to reduce the efficacy of 5-FU (Fischel et al. 1995). Therefore, the activity of these enzymes in tumors, including gastric cancer, colorectal cancer, breast cancer, and NSCLC is considered to be associated with chemosensitivity to 5-FU (Beck et al. 1994; Salonga et al. 2000).

### Others

Including the factors discussed above, some other factors also play a role in the development of MDR by cancer cells. In MDR cancer cells, increased levels of detoxification enzymes such as cytochrome p450 rapidly metabolize and inactivate the internalized drugs (Gottesman et al. 2002). In addition, cancer cells can defend themselves against drug induced apoptosis through the upregulation of anti-apoptotic proteins such as survivin and Bcl-2 family members (Fig. 1) (Kanwar et al. 2011; Zhang et al. 2012;), where survivin stimulates drug resistance by directly suppressing apoptotic proteins such as caspase and procaspase signaling mechanisms, consequently resulting in the upregulation of the expression of MDR proteins such as P-gp, MRP-1 and MRP-2. In a variety of tumors, the deletion of tumor suppressor genes (p53) has been reported to cause drug resistance (Luqmani 2005). The drugs that enhance DNA damage leads to p53-mediated cell death, and the loss of p53 function thereby allows the cells to continue to replicate with damaged DNA, and for which the cancer cells become resistance to DNA-damaging drugs.

### Strategies for overcoming cancer MDR using DDS

The resistance of cancer cells, lead by several precursor genes, to cytotoxic drugs is one of the major causes of the failure of cancer chemotherapy. Therefore, it becomes necessary to explore strategies for circumventing the MDR of cancers as well as to make the treatment effective by utilizing the available drugs. Strategies for circumventing MDR by using a DDS are presented in Fig. 2 and are discussed here because they have the potential for serving as an innovative and promising alternative to conventional small-molecule chemotherapeutics, by encapsulating and conjugating drug molecules within a nanocarrier.



**Fig. 2** Schematic representation of the application of a DDS for reversing cancer MDR. The expression of proteins or enzymes, responsible for MDR in cancer cells, can be controlled by delivering either a specific inhibitor or nucleic acids followed by the delivery of cytotoxic drug (either concurrently or separately) via a nanoparticle. The free drug, internalized by diffusion, can easily be detected by the

ABC-transporters and excreted out before going to the depth of the cells. Nanoparticles loaded with free drug can be endocytosed, thus permitting them to bypass the ABC-transporters and deliver their payload to the target organelle where the drug exerts its action. These delivery approaches would reverse the MDR of cancer cells by making them chemosensitive

### Delivery of inhibitors of the MDR proteins

The activity of cytotoxic drugs that are internalized by cells depends on their concentration and availability in the cell cytosol and in nuclei. However, several proteins, such as P-gp, MRP, BCRP, LRP, play a role in transporting the internalized drug molecules to the outer environment of the cell (Fig. 1). In addition to these, GST detoxifies the internalized drug molecules through its enzymatic activity (Fig. 1). Therefore, to make drug molecules available as well as for them to function effectively in the cellular compartment, inhibiting the expression of the responsible proteins or enzymes is the prime concern. Several inhibitors of these proteins or enzymes have been identified (Choi 2005; Wang et al. 2003) and could be utilized to down-regulate their expressions. To inhibit and antagonize the function of P-gp, several potent and selective inhibitors, including verapamil, diltiazem, tariquidar, quinidine, cyclosporin A, astemizole, itraconazole, doxorubicin-gallium-transferrin conjugate etc. can be used (Choi 2005; Wang et al. 2003). Erythromycin, itraconazole, difloxacin, ofloxacin, rifampicin, indomethacin, NSAIDs, doxorubicin-gallium-transferrin conjugates etc. were found to

inhibit the activity of MRP (Choi 2005). Genistein, estrone, fumitremorgin C etc. were reported to be representative inhibitors of BCRP (Choi 2005). A variety of GST inhibitors, including ethacrynic acid, 6-mercaptohexanol derivative (NBDHEX), nitazoxanide, Haloenol lactone, Aloe-modin, Benastatin A etc. (Laborde 2010) were shown to modulate drug resistance by sensitizing tumor cells to anticancer drugs.

While the inhibitors are efficient enough to antagonize the function of MDR proteins, they have no specificity towards the target sites and can block the functions of the target proteins in normal organs, which leads to the development of adverse effects. Cardiotoxicity, nephrotoxicity, and neurotoxicity, for example, are among the common side effects associated with these inhibitors (Rezzani 2004). To avoid such undesirable circumstances in normal tissues, it is necessary to specifically deliver the inhibitors to the tumor sites by encapsulating them in nanoparticles (Fig. 2A), which can further be modified with specific ligands to render them to be more specific to tumor cells. The delivered inhibitor can function in specific tumor cells to down-regulate the expression of the responsible MDR proteins (Fig. 2A). Following down-