

厚生労働科学研究費補助金（第 3 次対がん総合戦略 研究事業）
総括研究報告書

蛍光内視鏡をめざした高分子型分子プローブの創製に関する研究

研究代表者 前田 浩 崇城大学DDS研究所 特任教授

研究要旨

【背景】

癌の治療的研究で最も進歩が著しいのが診断である。例えばPET、超音波ならびに生化学的マーカーである。さらに早期発見による早期治療に関して言えば、胃癌、大腸癌、子宮癌、肺癌（気管支癌）などは外科手術でも可成りの成功率になっているが、胃癌I期の治療成績は99.1%、II期では45.9%が5年生存し、III期では7.2%である。これは早期癌の発見がいかに重要であるかを示している。

【目的・必要性】

本研究では、在来肉眼による検出限界を蛍光内視鏡にすることで理論的には10～100倍高めることが可能になる。その蛍光の光っている個所に対してさらに光照射を加え選択的に一重項酸素を生じさせることが出来れば超早期癌の検出と治療が同時に可能になり、癌治療がより容易になる。さらにこの方法は外来で可能となり、奏効率も高いと予想されることから医療経済の面においても医療費も低減化をもたらすなど、社会的意義は大きい。

【問題点】

これまで蛍光内視鏡の開発が未開であったのは、主に腫瘍選択的に集積する**蛍光【FL】/光増感【PS】**分子プローブがなかったこと、さらに635 nmのHeNeレーザー光しか皮下に到達しないと思われていたことの二つの理由による。この二つの問題に対して、内視鏡のキセノン（Xe）光源は手の平に照射すると厚さ2-3 cmを透過し手の甲まで到達する。また、腫瘍選択的に蛍光プローブ分子を集積させる方法はその高分子化によって可能となる。即ち、これら蛍光（FL/PS）分子プローブを含有する高分子のミセルや高分子結合物にすることで、いわゆるEPR効果という当申請者の発見した原理を応用することが可能になり、腫瘍集積化も可能になる。

【特色と独創的な点】

- (1) 高分子型FL/PS分子プローブがあれば、Xe光源（400—700 nmの連続波長光源）を用いても半値巾の短い高機能フィルターの活用（任意の分子プローブの利用が可能になる）による内視鏡開発が現実的になる。
- (2) ファイバーオプティクスを用い、さらにUVと赤外カットの内視鏡システムにすれば、UVや熱による火傷などの正常組織の非特異的障害を避けることができる。
- (3) EPR効果を利用した腫瘍選択性を有する高分子FL/PSミセルの創製は可能になってきている。
- (4) 在来型の内視鏡により光照射療法が可能になると、約5千万円もするレーザー光源による照射装置が不要になる。また、本蛍光内視鏡と光照射療法は外来で可能となる。
- (5) 励起プローブ分子の吸収帯波長域にfitするXe光源の波長を用いることにより、より強いエネルギーをインプットできるのでより強い蛍光ならびに一重項酸素を発生が可能となる。そのためにSMA-RB（ローズベンガル）、SMA-MB（メチレンブルー）、HPMA-ZnPPを作成し、抗腫瘍効果を検討する。

< 研究分担者 >

方 軍 崇城大学DDS研究所 / 薬学部 准教授

中村 秀明 崇城大学DDS研究所 / 薬学部 助教

A. 研究目的

(1) 研究の目的、必要性及び特色・独創的な点

癌の「診断」と「治療」は何れも化学物質を用いる点においては共通であり、両者とも薬剤の癌局所への集積に基づいている。本課題は両者の同時達成を目指す。即ち高分子型蛍光[FL]分子プローブおよび光増感剤[PS]を癌局所に選択的にデリバリーすることを目的とするが、それは本申請者が発見した EPR 効果 (enhanced permeability and retention effect) の原理に基づいている。EPR 効果は 2012 年までに約 1 万件も引用され、DDS の国際的な 1 つのエポックを作っている。一方、内視鏡光源は連続波長で十分な光量があるので、各々の蛍光分子プローブの分光特性に適合する光学フィルターシステムの組み合わせにより表層癌が肉眼の 10~100 倍の高感度で検出可能となることを我々は予備的に認めている。癌部に選択的にこれら分子プローブ (PS を含む) を集積できることを PS に応用した例はない。この研究の目的は EPR 効果に基づく腫瘍デリバリーにより PS の腫瘍選択的な集積を可能にする。EPR 効果は肝転移癌の娘結節で調べると ϕ 0.3mm の微小癌に対しても超高感度の検出が可能になることをみている [Cancer Sci. (2010) 101, 1866-1874]。即ち、安全な PDT を可能にする。

従来の PDT に使用する PS (例: フォトフォリンやレザフィリン) は全身くまなく分布し、日常的な光さえも正常の皮膚などに傷害を起こすため、あまり普及しなかったが、本課題が成功すれば、癌の PDT は飛躍的に向上するといえる。このような画期的な診断と治療をめざした研究はなく、また EPR 依存的 DDS の知識を併せ持つのは前田研究室のみである。事実、前田らの開発した亜鉛プロトポルフィリンミセルは蛍光と同時に一重項酸素を生じ、治療効果があることをマウス腫瘍において予備的に確認している。

(2) 現在までに行った研究等

前田は EPR 効果の発見 (Cancer Res., 1986) 以来、EPR 効果のメカニズムとそれを利用したミセル化剤の研究を中心に展開してきた (Cancer Sci., 2009, 2010; Bioconj. Chem. 2010, 2007, 2005; Adv. Drug Deliv. Rev. 2010, J. Cont. Release 2009-2012 他)。しかしながら、EPR 効果に基づく癌の「検出 (蛍光プローブ)」と同時に PS のターゲティングによる PDT を内視鏡下に行うという手法は未だ報告されていない。

(3) 当該研究の特色・独創的な点の明らかになっている点、残されている点。

この研究の癌の高感度検出と治療の両要因は EPR 効果 (前田の発明) による高分子プローブ薬の腫瘍選択的なデリバリー技術に基づいてい

る。これまで、在来のフォトフォリンやレザフィリン類以外、実用化の試みはなかったが、Zn プロトポルフィリン、その他多くの類縁化合物にも可能性が残されている。事実、我々は HPMA コポリマー、SMA コポリマー結合 PS が腫瘍選択的に集積し、高感度に検出可能なことをマウスモデルで証明した。

B. 研究方法

平成 23 年度

・癌選択的蛍光/光増感 (FL/PS) 高分子型分子プローブ (蛍光ナノプローブ) の合成

我々は高分子ナノプローブ (FL/PS) としてスチレンコマレイン酸テロマー (SMA) ミセルにインドシアニンググリーンやメチレンブルーを含有させる方法を確立した (K. Greish, H. Maeda et al, Bioconj. Chem. 2005; J. Cont. Release, 2006, 他)。

・高分子型分子プローブの一重項酸素 [1O_2] 生成能

上記(1)で作製した高分子型分子プローブを含む水溶液に対し、Xe 光源を用いて光照射を行った。

1O_2 の生成はラジカル捕捉剤を利用した ESR 装置により検出を行った。

・担癌マウスおよびラットを用いた in vivo イメージング

高分子型分子プローブを担癌モデル動物に尾静脈より投与し、経時的に腫瘍部への集積を蛍光イメージング装置を用いて確認した。とくに IVIS 社の蛍光イメージングにより脱毛後の担癌マウスで生きたまま著明な腫瘍像を確認できた。

平成 24 年度

(1) 平成 23 年度の実験の継続

(2) PS 光照射による細胞毒性作用の研究

各種培養癌細胞 (食道癌、大腸癌、子宮癌) などに対し、高分子型プローブを処理後、Xe ランプの光照射 (10-30min) を行い、MTT アッセイにより細胞の生存率を測定。 [1O_2] の生成と細胞毒性オキシストレスプローブの DCFH-DA 等を利用し、フローサイトメトリーで解析。プローブの細胞内取り込みは共焦点レザ顕微鏡並びに細胞内抽出物の蛍光強度から測定する。

(3) 担癌マウスに対する PS 光照射療法

担癌マウスに対し、H23 年に作製した高分子型プローブを尾静脈より投与し、プローブが

腫瘍部に十分に集積したところで Xe ランプを用い PDT を行う。

(4) 担癌マウスに対する PS 光照射療法

蛍光内視鏡の光源系の確立において、平成 23 年度の成果に基づく分光学的特性を組み込んだプロトタイプを作成する。

(5) 民間企業との連携・協力

SMA ミセルよりなる高分子型の蛍光分子プローブを用いた *in vivo* イメージングは、はっきりと検出できる。つまり、内視鏡においても同様の光学システムの構築ができない理由はない。東京の新興光器製作所(代表取締役: 福与恒雄)との連携を継続し、腹腔鏡を目指した検討を引き続き行う。

平成 25 年度

(1) 平成 24 年度の実験、民間企業との連携・協力の継続

(2) マウス癌の他に、DMBA やアゾキシメタンによるラットの発ガンの乳癌および大腸癌の自家発癌モデルを作製する。予算措置が十分であれば、ヒト食道癌の SCID マウスモデルを用いる。

(3) 蛍光内視鏡による微小癌結節の検出

内視鏡メーカーと協力し、蛍光内視鏡の試作タイプを作製する。アゾキシメタン誘発大腸癌モデルラットに対し高分子型分子プローブを投与し、蛍光内視鏡により腫瘍の微小癌結節が検出可能か否かを検討する。検出された腫瘍結節に対しては、組織切片を病理学的に検定する。

< 本研究の他にない特長 >

上記ミセル内の PS/FL ナノ分子プローブは溶液中、組織間、血液内にあつてはミセル内にコンパクトに重層しており、 π - π 相互作用によって光照射を行っても蛍光を生ずることはなく、 $^1\text{O}_2$ もほとんど生じない。しかし、ひとたび *endocytosis* でミセルが癌細胞内へ取り込まれ、フォスファチジルコリン(界面活性剤)など膜成分の影響で崩壊し、free の FL/PS を放出すると蛍光と $^1\text{O}_2$ を生ずるといった画期的な性質をもつ。一方、血流中では、無毒・無蛍光である。これは高い腫瘍集積能に加え、在来他の分子プローブとは異なる SMA ミセルの最大の特長である。つまり S/N 比が極めて高い分子プローブである。この画期的な方法を発展すべく、研究を行う。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施にあたっては、崇城大学が定めた動物取り扱いプロトコール/ガイドラインおよび日本

学術会議が定めた動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに遵守し、行った。

C. 研究成果

(1) ナノプローブの合成と生体内の挙動特性

本年度は高分子化した蛍光ナノプローブが固型癌組織に対して各種移植癌と同様に自家発癌のラット乳癌、同マウス大腸癌においても EPR 効果により効率よく集積し、蛍光像として確認できることを証明した。さらに、これら蛍光ナノプローブにおける高分子キャリアーの分子量 1 万あたり、蛍光プローブの個数の(% loading) がいくつぐらいなら生体内に投与したときに生体親和性を損なうことなくよく血中を循環し、EPR 効果を十分に発現し、さらに分光学的に消光の不都合もなく、効率よく蛍光を発し、同時に一重項酸素を生成し、抗腫瘍効果を示すかということを検討した。End point は上記自家発癌ラット乳癌等各種の固型癌を含むモデル腫瘍での抗腫瘍効果の有効性である。

キャリアーポリマーのモデルとしては HPMA (ヒドロキシプロピルメタアクリレート) ポリマーに 3% ~ 27% の蛍光プローブ(亜鉛プロトポルフィリン、ZnPP) を結合したものを中心に、一部 PEG 化 ZnPP についても検討した。

また、図 1 の枠内のポリマーと ZnPP の化学結合様式に関し、エステル結合 $\text{HPMA}-\text{C}(=\text{O})-\text{ZnPP}$ 、ヒドラゾン結合 $\text{HPMA}-\text{C}(\text{NH})-\text{N}=\text{ZnPP}$ 、あるいはアミド結合 $\text{HPMA}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{ZnPP}$ 、エーテル結合 $\text{HPMA}-\text{O}-\text{ZnPP}$ を目下検討しているが、これら 4 つのうち生体内に静注して血中濃度を測定するとヒドラゾン結合は生体内での安定性にやや難があり、エステル結合では EPR 効果を発現するのに十分な期間(数時間 ~ 100 時間)において安定で EPR 効果を示し腫瘍選択的蛍光像を示すことがわかった。その担癌マウスにおける組織分布、血中動態、細胞内取り込み、各化学結合の安定性は図 2A ~ D に示す。

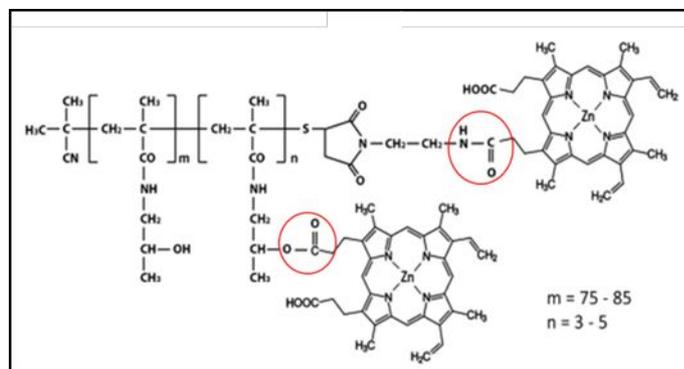


図 1. HPMA ポリマー-ZnPP 結合体の化学構造。ZnPP (プロトポルフィリン) とポリマーの化学結合様式 内。本ポリマー結合体は水溶液中で自然にミセルになる。

(2) 蛍光ナノプローブの蛍光特性、一重項酸素の生成および抗腫瘍効果

次に ZnPP の蛍光性および一重項酸素の生成効率は ZnPP 分子の存在状態（凝集体または単分子分散か）に大きく依存する。ZnPP の存在状態は PHPMA への ZnPP の付加率によって大きく変化すると考えられるため、PHPMA への ZnPP の付加率を変化させ、ミセルサイズや安定性などを測定し、これらの関連を検討した。即ち、蛍光および一重項酸素の発生能を総合的に判断し、蛍光ナノプローブとしての HPMA-ZnPP の最適化を目指した。

ZnPP 含量として 3.8 % (wt/wt)、7.0 %、16.7 % (wt/wt)、24.1 % の 4 種類を作成し（データ略）、サイズ排除クロマトグラフィを用いて、各 HPMA-ZnPP の溶液中での分子の挙動サイズを検討したところ、ZnPP 含量の増加に伴い、HPMA-ZnPP ミセルサイズの増大が観察された（図略）。次に PHPMA-ZnPP の蛍光特性に関して検討を行った。PBS 中においては、PHPMA-ZnPP(3.8%)が最も高い蛍光を発生し、ZnPP 含量が多くなるに伴い、蛍光の消光が観察された（図 3A,B）。これは、PHPMA 鎖に結合した ZnPP が多くなると、ZnPP 同士の凝集が起こりやすくなり、 $\pi\pi$ 相互作用のため消光が起こったと考えられる。HPMA-ZnPP で見られる消光は界面活性剤 (Tween20) の添加により、分子間作用が離脱し、解消された（図 3B）。PBS 中において、HPMA-ZnPP に可視光を照射しても、顕著な一重項酸素の発生は認められなかったが、界面活性剤の添加により一重項酸素の発生が認められた（図 4）。上記の結果をまとめると、HPMA-ZnPP の含量を変化させることで、粒子サイズを調整することが可能である。粒子サイズは腫瘍集積性などの薬物動態に大きな影響を及ぼすため、今回作製した、各 HPMA-ZnPP 群の薬物動態にも違いが見られる可能性が高く、今後検討したい課題である。

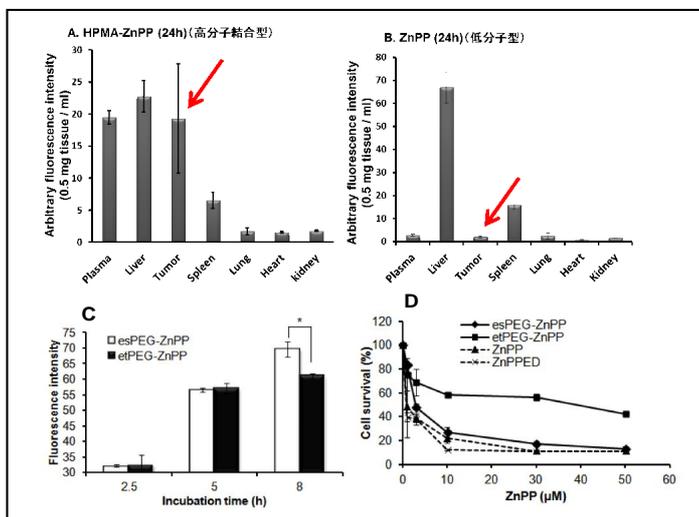


図 2. A. HPMA 高分子結合型 ZnPP の iv 後の組織分布。B. もとの free ZnPP の iv 後の組織分布。C. 各化学結合の異なる結合物 esPEG-ZnPP と etPEG-ZnPP の細胞内取り込み：エステル結合の方が 8 時間以上で優位である。D. 各 ZnPP 誘導体の細胞毒性。ポリマーと ZnPP 間の化学結合の違いによる切断と薬効の差。es はエステル、et はエーテル結合を示す。

(3) 蛍光イメージング

In vivo の自家発癌乳癌ラットを用い蛍光イメージングを行った。ここでは HPMA-ZnPP (7.0%)を用い、投与 5 時間後の蛍光イメージング結果を示す（図 5）。ZnPP の分光特性のみを考慮にいたった場合は、励起（ 430 ± 30 nm）と蛍光（575 ~ 650 nm）の組み合わせが最も適している。これにより腫瘍の検出は可能となり、蛍光強度も最も強いが、非特異的な蛍光も強く見られた。一方、蛍光フィルタを 695 ~ 770nm にしたものは、腫瘍がより均一かつ選択的に検出されていることが分かった。このときのポリマー-ZnPP エステル結合体を iv したときの血中濃度を図 2A,B に示す。また、移植癌 C26 に対する抗腫瘍効果も以下の結果と同様に明らかとなった。さらにこれらをマウス自家発癌 (AOM/DSS) の大腸癌を蛍光内視鏡カメラで観察すると腫瘍部が十分な明るさで確認できた。（図 7）

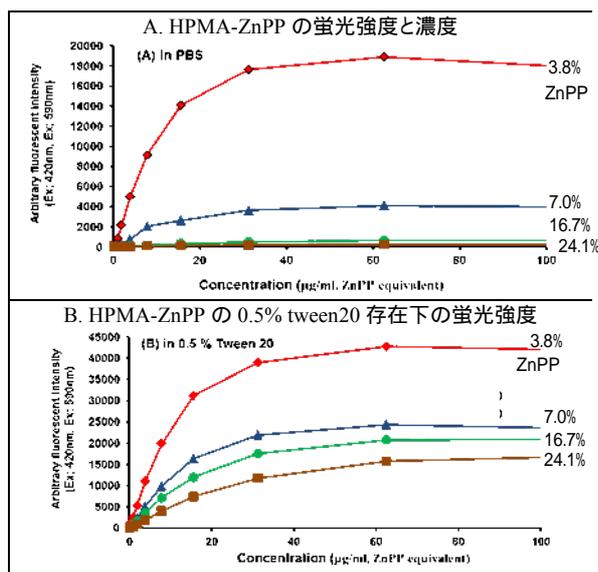


図 3. PHPMA-ZnPP の蛍光強度と一重項酸素の生成強度。ZnPP 含量の少ない HPMA-ZnPP ほど、強い蛍光を発生する。特に HPMA-ZnPP (3.8%)は強い蛍光を発生し、HPMA-ZnPP (16.7%)や HPMA-ZnPP (24.1%)と比べると、50 ~ 100 倍程度の蛍光強度を示した。Tween 20 などの界面活性剤で HPMA-ZnPP のミセル構造を壊すと、すべての HPMA-ZnPP において、蛍光の回復が認められたが、依然として ZnPP 含量の低いものにおいて高い蛍光が観察された。

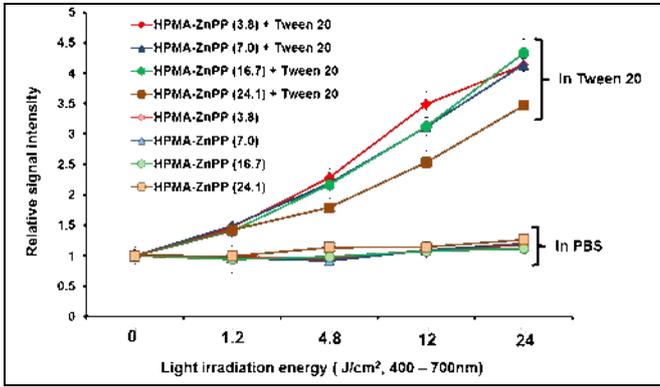
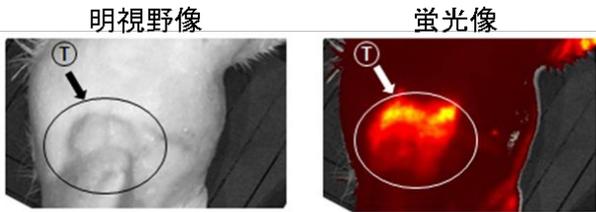


図4. PHPMA-ZnPPの一重項酸素生成能。PBS中ではすべてのHPMA-ZnPPに関して一重項酸素の発生は認められない。Tween 20を用い、ミセル構造を破壊すると、一重項酸素の発生が認められた。



DMBA induced autochthonous breast cancer in rat

図5.ラット乳癌の蛍光イメージ/PHPMA-ZnPP。ピンポイント的に腫瘍部に集積。

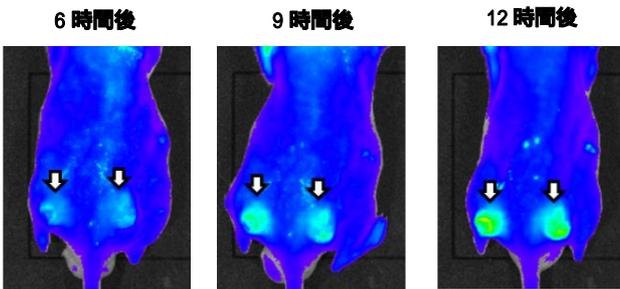


図6. ポリマー結合型ピラルピシンは腫瘍部選択的に集積していることが、その蛍光像で判定できる。投与後6時間目から腫瘍部の蛍光が認められ、経時的に漸増する。(白矢印)

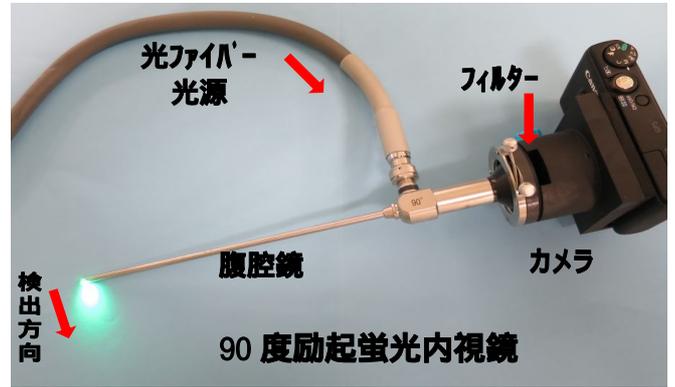


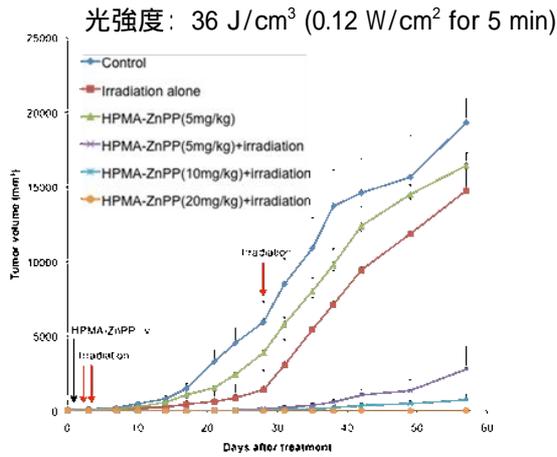
図7. プロトタイプ蛍光内鏡。上は管壁、腹壁など90度側面を観察・光照射することができる。下は在来型の直進方向を観察・光照射する腹腔鏡である。青色光は430nmのXenonの光。

4) 亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP) の高分子ミセルの in vivo 抗腫瘍効果 (PDT)

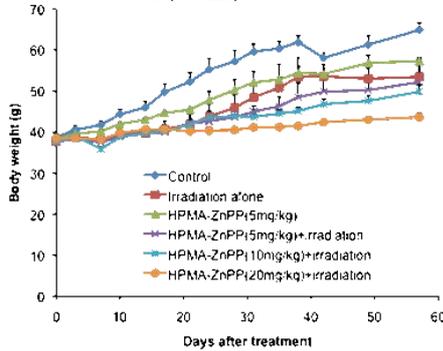
多くの腫瘍に高発現しているヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1, HSP32)の阻害剤である亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)は上記のように PDT (photodynamic therapy)効果を持つ同時に、蛍光を発生することができ、癌の治療ができる蛍光プローブとしての可能性を期待している。ZnPPの水難溶性と低い腫瘍集積性を改善するために、これまで我々は水溶性高分子ポリマーであるHPMAを用い、ZnPPの水溶性高分子ミセル剤PEG-ZnPPおよびHPMA-ZnPPを合成した。前半に記したように、そのうち、HPMA-ZnPPがより高い腫瘍集積性と腫瘍イメージング能を見出した。今回マウスの移植癌およびラットのDMBA自家発癌モデルを用い、HPMA-ZnPPのPDT治療効果を中心に検討を行った。光源の一つは朝日分光のキセノン光源を用い、HPMA-ZnPP濃度依存的、及び光照射エネルギー(強度、時間)依存的な腫瘍増殖の抑制が見られた(図8~10)。同様な治療プロトコルで、移植癌S-180モデルにおいてもほぼ同様な結果が認められ、未治療のコントロールと比較し、腫瘍の増殖は著しく抑制され、縮小した。治療二ヶ月後にほとんどの腫瘍の増殖は完全に抑えられた(90%~100%抑制、図9)。また、市販のブルー蛍光灯を用いても、同様な治療効果が得ら

れた(図10)。これらの結果より、HPMA-ZnPPは腫瘍の検出およびPDT治療剤としてより優れていることがわかった。

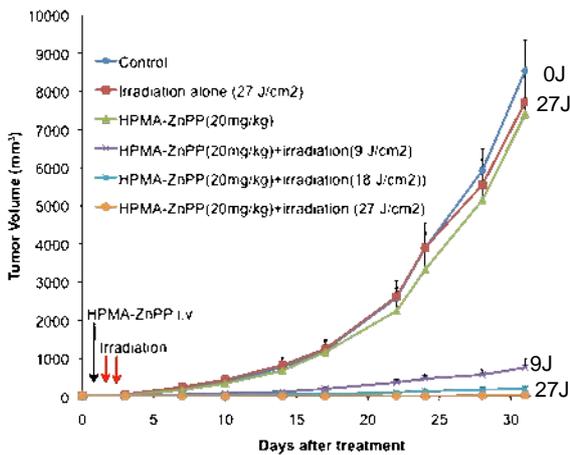
A. 量依存性



副作用(体重)



B. 光量依存性



副作用(体重)

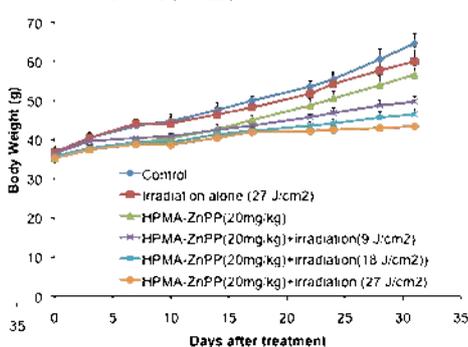


図8:HPMA-ZnPPのPDT抗腫瘍効果:濃度依存性(A)と光照射依存性(B)。S-180腫瘍モデルにおいて、HPMA-ZnPP(5-20mg/kg)を経静脈注射後、赤矢印に示したように光照射(朝日分光MAX303)を行った。右の図にそれぞれの治療後の担癌マウスの体重変化を示した。何れも体重でみ限り、副作用はみられなかった。

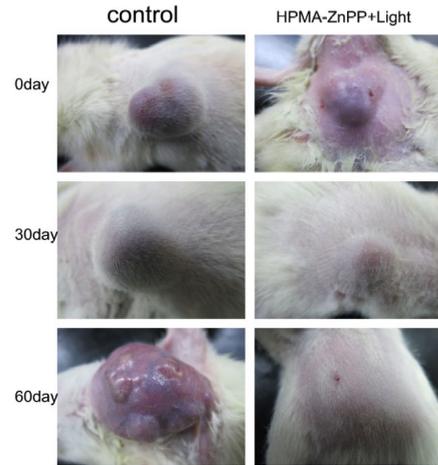


図9.ラット化学発癌剤DMBAによる自家乳がんモデルにおけるHPMA-ZnPP治療効果。HPMA-ZnPP/光照射治療後、腫瘍は次第に縮小し、60日後の時点で、腫瘍がほとんど消滅した。

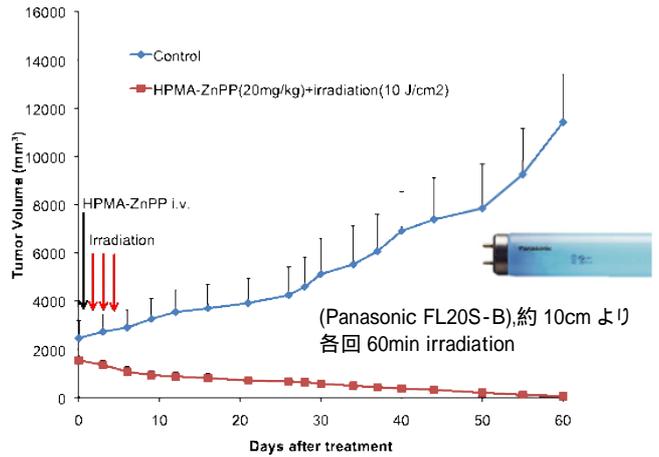


図10.ブルー蛍光灯を用いるHPMA-ZnPPのPDT治療効果。腫瘍モデル:発癌剤DMBAによる自家乳がんモデル。矢印はHPMA-ZnPPの投与と光照射(赤矢印)を示した。

(5) 考察

蛍光強度の測定に関しては、少なくとも、in vitro においては、ZnPP 含量の低いものほど、高い蛍光性を示すことから、腫瘍集積性が同じであれば、ZnPP 含量の低い HPMA-ZnPP ほど高い感度で腫瘍の検出が出来ると思われる。しかし、これまでの in vivo の研究結果より、生体内では細胞膜成分により、HPMA-ZnPP のミセル構造が崩壊し、蛍光強度が増強することも報告している。そのため、各 HPMA-ZnPP を担癌マウスに投与し、in vivo の蛍光イメージングをさらに詳細に検討する必要がある。蛍光強度ならびに一重項酸素の発生に関しても、ミセル構造の崩壊により、その発生効率は格段に増強された(図 3,4)ことから、ZnPP 含量の高い安定なミセル構造よりも、多少ゆるいミセル構造を持ち、腫瘍部で切断される HPMA のエステル結合型 ZnPP の方が、腫瘍検出および治療において優れていると考えられた。

D. 今後の展開 (結論)

本成果 in vivo の自然自家発癌モデル(乳癌、大腸癌)でも、蛍光ナノ粒子の腫瘍選択的な集積をみとめ直接的な蛍光の画像化に成功した。さらに ZnPP という多機能性蛍光プローブを結合した蛍光ナノプローブは 3~30%(w/w)のローディングで、光照射を Xenon 光源、内視鏡光源またはブルー蛍光灯を用いても効率よく、一重項酸素を発生し、抗腫瘍効果をみた。このナノプローブの 1 回の iv 投与で、光を内視鏡光源の 40~60% の出力で 1~4 回照射することにより固型癌を完治するものもみられた。実用的には 100-200W の Xenon 光源を用いて 1/10000 の光量で殺細胞効果があることから、レーザーよりも波長特性の優れた Xenon あるいはブルー蛍光灯による表層癌、さらに内視鏡照射による体腔内、胸腔、腹腔、胸膜、大網、肺・肝の表層、子宮、膀胱、食道以下の消化管、尿道にも容易に応用が見込まれる。本蛍光ナノプローブは合成が簡単のため、製造コストは抗体医薬の 1/100 以下で供給可能と思われる。またこの手法はピラルピシンなどの cytotoxic agent との結合物でも in vivo の治療の有効性が全く毒性のない状況で著効になることを確認している。今後のサポートが望まれる。

E. 健康危機情報

とくになし。

F. 研究発表

1. 論文発表

H. Nakamura, L. Liao, Y. Hitaka, K. Tsukigawa, V. Subr, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda, Micelles of zinc protoporphyrin conjugated to *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) copolymer for imaging and light-induced antitumor effects in vivo, **J. Control. Release** 165, 191-198 (2013)

H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improved tumor uptake, less systemic toxicity, and improved tumor imaging - Review of the vascular permeability of tumors and the EPR effect, **Adv. Drug Deliver. Rev.** 65, 71-79 (2013)

U. Prabhakar, H. Maeda, R. K. Jain, E. Sevick-Muraca, W. Zamboni, O. C. Farokhzad, S.T. Barry, A. Gabizon, P. Grodzinski and D.C. Blakey, Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect (EPR) for nanomedicine drug delivery in oncology, **Cancer Res.** 73, 2412-2417 (2013)

S. Yamamoto, Y. Kaneo, H. Maeda, Styrene maleic acid anhydride copolymer (SMA) for the encapsulation of sparingly water-soluble drugs in nanoparticles. **J. Drug Del. Sci. Tech.**, 23, 231-237 (2013)

H. Maeda, The link between infection and cancer: Tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect, **Cancer Sci.** 104, 779-789 (2013)

J. Fang, T. Seki, T. Tetsuya, H. Qin, L. Liao, H. Nakamura, H. Maeda, Protection from inflammatory bowel disease and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) via suppression of oxidative stress, **Carcinogenesis**, 34, 2833-2841 (2013)

[翻訳] J. H. Grossman and S. McNeil, Nanotechnology in Cancer Medicine, *Physics Today* 65 (8), 38-42 (2012) doi: 10.1063/PT3.1678, 「がん治療におけるナノテクノロジー」**バリテイ誌**, 丸善書店、8月号 (2013)

[Monograph] H. Nakamura, H. Maeda, Nanomedicine and cancer drug delivery based on the EPR effect and EPR augmentation, *In Fundamentals of Pharmaceutical Nanosciences*, (Eds. I.F. Uchegbu, A.G. Schätzlein, W.P. Cheng, A. Lalatsa) Springer New York, pp 401-427 (2013)

H. Nakamura, T. Etrych, P. Chytil, M. Ohkubo, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda: Two step

mechanisms of tumor selective delivery of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugated with pirarubicin via an acid-cleavable linkage, **J. Control. Release**, 174, (2014)

S. Cerny-Reiterer, R. A. Meyer, H. Herrmann, B. Peter, K. V. Gleixner, G. Stefanzi, E. Hadzijušufovic, W. F. Pickl, W. R. Sperr, J. V. Melo, H. Maeda, U. Jäger, P. Valent, Identification of heat shock protein 32 (Hsp32) as a novel target in acute lymphoblastic leukemia, **Oncotarget**. published online March 4, 2014.

H. Yin, J. Fang, L. Liao, H. Nakamura, and H. Maeda, Styrene-maleic acid copolymer-encapsulated CORM2, a water-soluble carbon monoxide (CO) donor with a constant CO-releasing property, exhibits therapeutic potential for inflammatory bowel disease, **J. Control Release** (in press, 2014)

H. Maeda, Analysis of the causes of failures in cancer chemotherapy and improvements for tumor-selective drug delivery, therapeutic efficacy, and eliminating adverse effects, **Proc. Jpn. Academy Ser. B** (in press, 2014)

H. Maeda, Emergence of EPR effect theory and development of clinical applications for cancer therapy, **Therapeutic Delivery (Future Science)** (in press, 2014)

H. Nakamura, J. Fang and H. Maeda, Macromolecular cancer drug development for next generation drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls, **Expert Opinion on Drug Delivery** (in press, 2014)

H. Nakamura, E. Koziolová, T. Etrych, P. Chytil, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda, Improved pharmacokinetics and antitumor activity of new dendrimer-derived poly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide) conjugates of pirarubicin, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** (in press, 2014)

Y. Ishima, J. Fang, Ulrich Kragh-Hansen, H. Yin, L. Liao, N. Katayama, H. Watanabe, T. Kai, A. Suenaga, H. Maeda, M. Otagiri, and T. Maruyama, Tuning of Poly-S-Nitrosated Human Serum Albumin as Superior Antitumor Nanomedicine, **J. Pharm. Sci.** (in press, 2014)

中村 秀明、方 軍、前田 浩、「EPR効果に基づくポリマー抗癌剤の腫瘍デリバリー：微小癌の検出・治療を目的としたセラノスティック薬剤の開発」(in press 2014)

J. Fang, L. Liao, H. Yin, H. Namamura, T. Shin, H. Maeda, Enhanced bacterial tumor delivery by modulating the EPR effect, and therapeutic potential of *Lactobacillus casei*, **J. Pharm. Sci.** (submitted 2014)

前田 浩、「現今のがん治療薬のかかえる問題」公益財団法人札幌がんセミナー会報 SCSコミュニケーションThe Way Forward (in press 2014)

2. 学会発表

H. Maeda, H. Nakamura, K. Tsukigawa and J. Fang, Targeting of fluorescent nanoprobe to autochthonous primary tumors and metastatic tumors for ultra sensitive detection and treatment based on EPR effect. The Int'l Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers (Vancouver, Canada) (Invited, Plenary) (2013 年 6 月 5 日)

H. Maeda, H. Nakamura, K. Tsukigawa, L. Liao, J. Fang, EPR effect in metastatic and autochthonous tumor and antimetastatic effect of SMA-pirarubicin (THP). The 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Honolulu, USA) (Invited, Plenary) (2013 年 7 月 23 日)

H. Nakamura, T. Etrych, P. Chytil, K. Tsukigawa, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda, Double selective antitumor action of pirarubicin-conjugated N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer. The 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Honolulu, USA) (2013 年 7 月)

H. Maeda, The EPR effect and beyond for cancer selective drug delivery for treatment and imaging using nanomedicine. Int'l Society for the Study of Xenobiotics Meeting (Tronto, Canada) (Invited, Plenary) (2013 年 10 月 2 日)

方 軍、殷 紅専、廖 龍、中村 秀明、前田 浩、水溶性 DDS 型 CO ドナー-SMA ミセルの作製とその抗炎症作用、第 29 回日本 DDS 学会学術集会 (京都) 2013 年 7 月 4 日

中村 秀明、T. Etrych、P. Chytil、月川 健士、方 軍、K. Ulbrich、前田 浩、ヒドラゾン結合 PHPMA-ピラルピシンは、pH 応答的にピラルピシンを遊離し抗腫瘍効果を発揮する、第 29 回日本 DDS 学会学術集会 (京都) (優秀発表賞受賞) 2013 年 7 月 4 日

K. Tsukigawa, L. Long, H. Nakamura, J. Fang, H. Maeda, Targeting of SMA-pirarubicine nanomedicine to the metastatic lung cancer: therapeutic effect and imaging based on the EPR

effect. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜)
2013 年 10 月 4 日

H. Nakamura, T. Etrych, P. Chytil, K. Tsukigawa, J. Fang, K. Ulbrich, H. Maeda, Two step tumor-selective action of pirarubicin-conjugated N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 4 日

J. Fang, L. Long, Y. Hongzhuan, H. Nakamura, H. Maeda, Evaluation of the targeted photodynamic therapeutic effect of HPMA-zinc protoporphyrin micelle in different tumor models. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 4 日

L. Liao, J. Fang, H. Nakamura, H. Yin, H. Maed, Nitroglycerin induced enhancement of EPR effect for tumor-targeted delivery of bacteria given i.v. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 4 日

前田 浩、現今のがん治療薬のかかえる問題点、第 28 回札幌冬季がんセミナー(札幌)(Invited)、2014 年 2 月 8 日

廖 龍、方 軍、中村 秀明、前田 浩、EPR 効果増強剤による静脈内投与乳酸菌の腫瘍内デリバリーの増強と制癌作用、日本薬学会第 134 年会(熊本)、2014 年 3 月 29 日

方 軍、殷 紅専、廖 龍、中村 秀明、前田 浩、水溶性持続性 CO ドナー、SMA/CORM2 ミセルの作成とその抗炎症作用、日本薬学会第 134 年会(熊本)、2014 年 3 月 30 日

中村 秀明、T. Etrych、P. Chytil、方 軍、K. Ulbrich、前田 浩、腫瘍選択的に活性抗癌剤を放出する、高分子制癌剤(P-THP)の作成と抗腫瘍作用の検討、日本薬学会第 134 年会(熊本)、2014 年 3 月 29 日

H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, The EPR effect in metastatic cancer, and heterogeneity status quo. 10th International Symposium on Polymer Therapeutics (Valencia, Spain) (Invited, Plenary) (2014 年 5 月)

H. Maeda, The bigger is better in the cancer targeting drugs: The EPR effect for the primary and metastatic tumors for treatment and imaging, and beyond. Drug Discovery and Therapy World Congress 2014 (Plenary, Special Lecture) (Boston, USA) (Invited, Plenary, Special Lecture) (2014 年 6 月)

H. Maeda, H. Dozono, H. Nakamura, T. Etrych, P. Chytil, J. Fang S. Yanazume, and K. Ulbrich, Three steps cancer selective mechanisms of polymer conjugated pirarubicin and superior in

vivo antitumor effect, Drug Discovery and Therapy World Congress 2014 (Boston, USA) (Invited Symposium, Plenary) (2014 年 6 月)

H. Maeda, H. Nakamura and J. Fang, Nanomedicine for cancer selective drug delivery; Advantages of the EPR effect and pitfalls. 9th International Conference of Anticancer Research (Sithonia, Greece) (Invited, Plenary) (2014 年 10 月)

G . 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

発明の名称：スチレン-マレイン酸共重合体の誘導体

出願番号：特願 2013-239222

国際出願日：2013 年 11 月 19 日

発明者：前田 浩、方 軍、中村 秀明

状況：出願