

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略 研究事業）
分担研究報告書

HPMA-亜鉛プロトポルフィリンミセル (HPMA-ZnPP)の in vivo PDT 効果の評価 II：光源、
照射強度・時間の検討

研究分担者 方 軍 崇城大学 DDS 研究所 / 薬学部 准教授

研究要旨

亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)は多くの腫瘍に高発現しているヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1, HSP32)を阻害することで、抗腫瘍活性を示す。また、光照射により一重項酸素(1O_2)を発生することで、PDT (photodynamic therapy)効果を持つ同時に、蛍光を発生することより腫瘍イメージングが可能である。このことより、ZnPP はがんの治療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、ここまで我々は水溶性高分子ポリマーであるヒドロキシプロピルメタアクリルアミド (HPMA)を用い、ZnPP の水溶性高分子ミセル剤 HPMA-ZnPP を合成した。HPMA-ZnPP は高い腫瘍集積性を示し、その腫瘍イメージング能力が注目されている。前年度の研究により、マウスザルコーマ S-180 モデルにおいて、朝日分光のキセノン光源およびを用い HPMA-ZnPP 濃度依存的な、及び光照射の強度依存的に腫瘍増殖を抑制することが分かってきた。この延長線上で、本研究は照射エネルギー一定下で照射強度・照射時間のバランスを検討した。S-180 モデルにおいて、朝日分光のキセノン光源を用い照射強度 20%, 40%, 60% で総照射エネルギーを 27 J/cm² にするように照射時間を調整し実験した結果、高い照射強度はより顕著な治療効果が見られ、治療一ヶ月後にすべての腫瘍が消失し、治療開始 62 日まで再発が認められなかった。また、DMBA 化学誘導のラット乳がんモデルにおいて、HPMA-ZnPP 20mg/kg で著名な治療効果が見られなかったが、中心波長 420nm のブルー蛍光灯光源を用い 10 J/cm² で三回照射した結果、腫瘍の増殖が著しく抑制された。さらに、HPMA-ZnPP の細胞内作用メカニズムについて、in vitro ESR により検討した結果、HPMA-ZnPP は水溶液中に光照射による一重項酸素の産生がほとんどなかったが、細胞膜成分であるレシチン存在下で照射時間依存的に一重項酸素の産生が認められた。これらの結果より、HPMA-ZnPP は細胞取り込みの段階でミセル構造を崩壊し、光照射により一重項酸素や蛍光を放出し、腫瘍の検出が可能な光線力学診断・治療剤としての可能性が強く示唆された。また、この PDT について、通常の光源の有用性が示唆された。

A. 研究目的

本プロジェクトは、がんの診断と治療を同時に行なうことの可能な高分子型蛍光プローブの開発を最終目的としている。H24 年度の研究成果を踏まえ、本年度本分担課題ではその有力な候補である HPMA-ZnPP の高分子ミセルに注目し、その in vivo PDT 治療効果と治療プロトコルを明らかにした。

B. 研究方法

1) HPMA-ZnPP の合成方法はすでに確立している (Nakamura H et al., J Control

Release, 165:191-8, 2013)。前年度の報告書を参照してください。

2) 腫瘍モデル

マウスザルコーマ S-180 モデル：S-180 細胞 (2×10^6) を ddY マウス (雄、6 週零) の背部に皮下注射 (0.1 ml) するにより作製する。

ラット DMBA 化学誘導乳がんモデル：10 mg DMBA (1, 12-dimethyl benanthracene) を 1 ml のコーンオイルに溶かし、SD ラット (雌、6 週零) に経口投与により作製する。DMBA 投与後 8-12 週に乳がんが発生する。

3) PDT 治療: S-180 腫瘍モデルにおいて、腫瘍直径が約 5-7mm のなる時に、治療を開始する。DMBA 腫瘍モデルにおいて、腫瘍が発生し触れられるサイズになる(直径が約 15 mm 以上)時に治療を開始する。

治療は HPMA-ZnPP ミセルを生理食塩水で所定の濃度の溶液を調製し、経尾静脈(0.1 ml/mouse, 0.2-0.5 ml/rat)投与する。HPMA-ZnPP 投与後 24 h または 48 h に、朝日分光のキセノン光源(MAX303)及びブルー蛍光灯を用いて腫瘍を照射した。

治療効果は腫瘍サイズの変化および動物の生存率等により評価する。また、動物体重の変化等により副作用を評価する。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は崇城大学動物実験指針に従って、崇城大学動物実験倫理委員会に承認されたうえ行なっている。

C. 研究結果

1) HPMA-ZnPP の PDT 治療効果: 照射強度・時間の関係

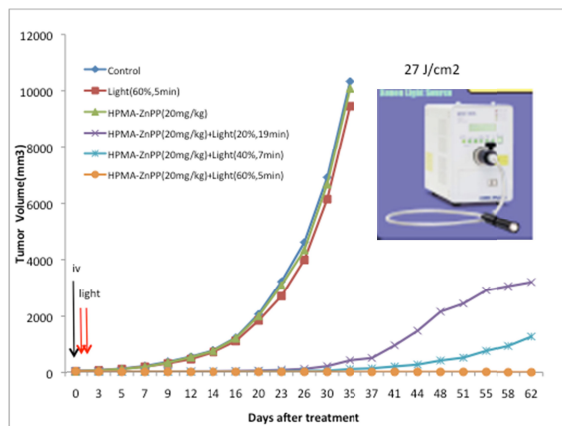


図 1: HPMA-ZnPP の PDT 抗腫瘍効果: 照射強度・時間関係。S-180 腫瘍モデルにおいて、HPMA-ZnPP (20mg/kg)を経静脈注射後、赤矢印に示したように光照射(朝日分光 MAX303)。

図 1 に示したように、HPMA-ZnPP 20mg/kg 単独処理や朝日分光のキセノン光源を用い光照射(60%)単独で、腫瘍増殖の抑制が見られなかったが、光照射と HPMA-ZnPP との combination を行った結果、顕著な治療効果が見られた。照射強度 20%,

40%, 60%で総照射エネルギーを 27 J/cm² にするように照射時間を調整し実験した結果、高い照射強度はより顕著な治療効果が見られ、治療一ヶ月後にすべての腫瘍が消失し、治療開始 62 日まで再発が認められなかった。

また、いずれの治療において、動物の体重の顕著な変化が認められなかった。この結果より、本治療法の高い安全性/少ない副作用が示唆された。

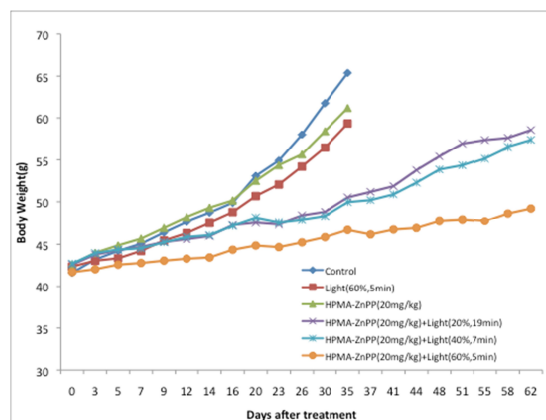


図 2: HPMA-ZnPP の PDT 治療における動物の体重変化。治療プロトコルは図 1 と同様である。

2) HPMA-ZnPP の PDT 治療効果: ラット DMBA 化学誘導乳がんモデルにおいて、ブルー蛍光灯を用いる治療効果

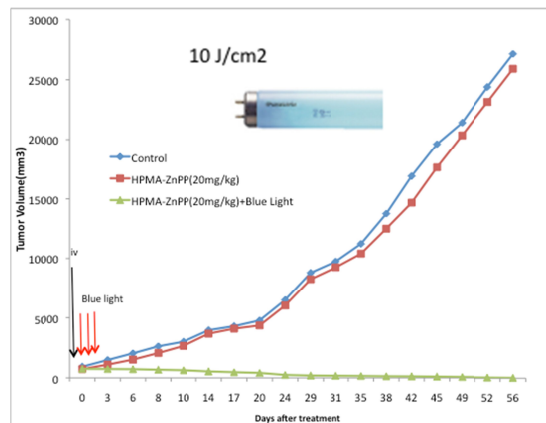


図 3: HPMA-ZnPP の PDT 抗腫瘍効果 2: ブルー蛍光灯を用いる治療効果。光照射は HPMA-ZnPP 投与 24h, 48, 72h 後に行った。光源、ブルー蛍光灯(Panasonic FL20S-B); 照射時間: 20 分間。腫瘍モデル: ラット DMBA 化学誘導乳がんモデル。

HPMA-ZnPP : 20mg/kg (ZnPP equivalent) で一回投与し、24, 48, 72 h 後にブルー蛍光灯 (Panasonic FL20S-B) で 20 分間照射 (10 J/cm²) した結果、顕著な腫瘍増殖の抑制が見られた。治療 50 日後ほとんどの腫瘍サイズは 2mm 以下 (ほとんど治癒) になった。また、光照射だけは、腫瘍増殖への影響はほとんど見られなかった (図 3)。

3) HPMA-ZnPP の PDT 治療 : 細胞内動態と一重項酸素の産生

In vitro において、光照射による HPMA-ZnPP からの一重項酸素の産生を検討した。ESR 測定により、HPMA-ZnPP は水溶液中に、光照射による一重項酸素の産生がほとんど認められなかったが、Tween 20 の界面活性剤によりミセル構造を壊すと、強い一重項酸素のシグナルが検出された (図 4)。

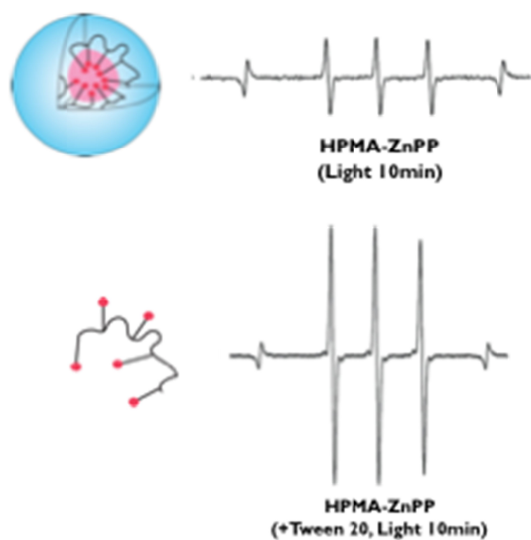


図 4 : HPMA-ZnPP ミセルの崩壊と光照射による一重項酸素の産生。

さらに、細胞膜成分であるレシチンの存在下で、光照射により HPMA-ZnPP から時間依存的に一重項酸素の産生が認められた (図 5)。この結果から、HPMA-ZnPP は細胞取り込みの段階でミセル構造を崩壊し、光照射により一重項酸素や蛍光を放出することが示唆された。これは HPMA-ZnPP の in vivo PDT 治療効果および in vivo imaging と繋がると考えられる。

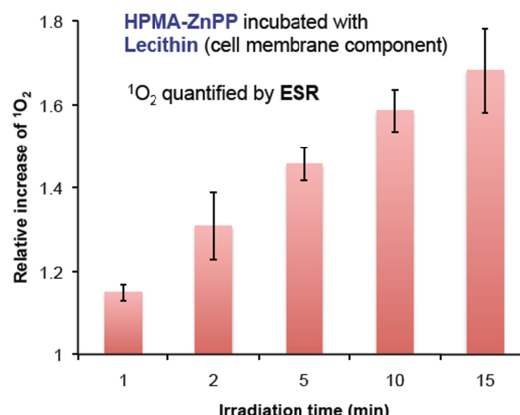


図 6 : レシチンによる HPMA-ZnPP ミセルの崩壊と一重項酸素の産生。

D. 考察

本研究では ZnPP を光増感剤として、光で励起し、光化学反応により singlet oxygen (¹O₂) を生成することに基づき、この活性酸素 (ROS) の細胞毒性による光力学療法 (PDT) の検討を行った。また、高価なレーザー光源ではなく、連続波長のキセノン光源や中心波長 420nm 前後の光源を用いる光化学療法の有用性を検討した。さらに、ZnPP の蛍光性質により、腫瘍検出する同時に PDT 治療を行なうことを目指した。

ZnPP の水難溶性と低い腫瘍選択性 (低分子のため) 等の欠点を改善するため、我々は ZnPP の水溶性高分子ミセルを合成した。このミセル化により、ZnPP の水難溶性の問題点を解決している。さらに、高分子ミセル化剤は EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果により、在来の低分子抗がん剤より 10~20 倍も固形腫瘍に選択的に集積することができる。その結果より、効率的かつ副作用の少ない抗癌作用が得られると考えられる。

これまでの研究で、各 ZnPP ミセルの物理化学的性質、体内動態、腫瘍集積性等を検討した結果、HPMA-ZnPP は優れた血中安定性と腫瘍集積性 (EPR 効果) を示すことが分かった。また、マウスザルコーマ S-180 モデルにおいて、朝日分光のキセノン光源およびを用い HPMA-ZnPP 濃度依存的な、及び光照射の強度依存的に腫瘍増殖を抑制

することが分かってきた。本年度の研究はこの延長線上で、照射エネルギー一定下で照射強度・照射時間のバランスを検討し、さらに中心波長 420nm のブルー蛍光灯を用い PDT 効果の検討を進めた。

その結果、マウス S-180 腫瘍モデルにおいて、同じ照射エネルギーで、高い照射強度はより顕著な治療効果が得られることが分かった。また、ラット DMBA 化学誘導乳がんモデルにおいて、市販のブルー蛍光灯の応用可能性も確認された。さらに、HPMA これらの結果は、HPMA-ZnPP ミセルの光照射治療の有用性が強く示唆された。また、さらに、HPMA-ZnPP の PDT 作用メカニズムについて、in vitro ESR により検討した結果、細胞膜成分であるレシチン存在下で照射時間依存的に一重項酸素の産生が認められた。これらの結果より、HPMA-ZnPP は細胞取り込みの段階でミセル構造を崩壊し、光照射により一重項酸素や蛍光を放出し、PDT 効果および in vivo imaging 効果を発揮することが示唆された。これらの結果と、HPMA-ZnPP の腫瘍イメージングの結果(中村報告書を参照)と合わせ、HPMA-ZnPP を用いる腫瘍蛍光診断と同時な PDT 治療法の可能性が強く示唆された。

E. 結論

HPMA-ZnPP は優れた腫瘍集積性により、顕著な PDT 治療効果が期待できる。またその独特な蛍光性質により、腫瘍の蛍光プローブ・PDT 治療薬として、手術下や内視鏡下の腫瘍の検出と治療における応用性が多いに期待している。

F. 健康危険情報

総括報告書に記載している。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura H, Etrych T, Chytil P, Ohkubo M, Fang J, Ulbrich K, Maeda H. *Two step mechanisms of tumor selective delivery of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugated with pirarubicin via an acid-cleavable linkage.* **J Control**

Release. 2014;174C:81-87.

- 2) Fang J, Seki T, Tsukamoto T, Qin H, Yin H, Liao L, Nakamura H, Maeda H. *Protection from inflammatory bowel disease and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) involve suppression of oxidative stress and inflammatory cytokines.* **Carcinogenesis.** 2013;34(12):2833-41.
- 3) Nakamura H, Liao L, Hitaka Y, Tsukigawa K, Subr V, Fang J, Ulbrich K, Maeda H. *Micelles of zinc protoporphyrin conjugated to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer for imaging and light-induced antitumor effects in vivo.* **J Control Release.** 2013;165(3):191-8.
- 4) Maeda H, Nakamura H, Fang J. *The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo.* **Adv Drug Deliv Rev.** 2013;65(1):71-9.

2. 学会発表

- 1) Jun Fang, Hongzhan Yin, Long Liao, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda. *Preparation of a water soluble carbon monoxide donor, SMA-CORM2 micelles, and therapeutic potential for inflammatory bowel diseases.* **29th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System.** Kyoto, Japan, July 4-5, 2013.
- 2) Jun Fang, Haibo Qin, Hongzhan Yin, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda. *Preparation of a water soluble carbon monoxide donor, SMA-CORM2 micelles, and therapeutic potential for inflammatory bowel diseases.* **The 40th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society.** Hawaii, USA, July 21-24, 2013.
- 3) Jun Fang, Long Liao, Hongzhan Yin, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda. *Evaluation of the targeted photodynamic therapeutic effect of HPMA-zinc protoporphyrin micelle in different tumor*

models. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, Japan, Oct. 3-5, 2013.

- 4) Jun Fang, Hongzhuan Yin, Long Liao, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda. *Preparation of water-soluble carbon monoxide (CO) donor, SMA/CORM2 micelles with sustained CO release property, and its anti-inflammatory effect.* **134th Annual Meeting of The Pharmaceutical Society of Japan.** Kumamoto, Japan, March 27-30, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

発明の名称：高分子型蛍光分子プローブ

国際出願番号：PCT/JP2012/072640

国際出願日：2012年9月5日

発明者：前田 浩、方 軍、中村 秀明 他

状況：公開

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