

2013/303/B

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

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

平成23～25年度 総合研究報告書

平成26(2014)年 5月

研究代表者 前田 浩

崇城大学DDS研究所

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

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

平成23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 前田 浩

(崇城大学 DDS研究所)

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総合研究報告

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 ----- 01

前田 浩

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 17

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 23

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）
総合研究報告書

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5年生存率は99.1%、III期では45.9%、IV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、在来の内視鏡から蛍光内視鏡にすることで、癌の検出限界を理論的に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の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ックスを用い、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傷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φ0.3mm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リーンやメチレンブルーを含有させる方法を確認した(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残率を測定。 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ーザー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。

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。

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、血液内にあっ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、 1O_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 1O_2 を生ずるという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

C. 研究成果

平成 23 年度

本プロジェクトのH23年度末までの成果は図1~4のように高分子ミセル化した蛍光プローブ(ローダミン、ZnPP、ICGなど)、さらにアルブミンやトランスフェリンなどの血清タンパクの蛍光標識プローブが、はっきりと腫瘍部に集積し、蛍光により腫瘍が感知、描出できることがわかった。HPMA (ヒドロキシプロピルメタアクリルアミド) 高分子を結合したZnPPを静注後、420nmで励起、550nmの蛍光波長でマウスのS-180腫瘍をin vivo光イメージング装置 (IVIS) でみると、腫瘍によく集積し、腫瘍部の蛍光画像をきれいに描出した (図1A)。とくにローダミン標識トランスフェリンやICG (インドシアニンググリーン) のSMAミセル静注後、2時間で脱毛なしのマウス腫瘍でも著明な蛍光として検出できた (図1 B, C)。この腫瘍部の蛍光強度は正常部の約15倍であった。

図1に示すポリエチレングリコール (PEG) あるいはSMAコポリマー結合のZnPPとともに、光照射により著明な一重項酸素を生成し (図2)、抗腫瘍効果を示すことを確認した (図3、図4)。

さらに、SMAを用いたミセルとして、ローダミン、ローズベンガルおよびメチレンブルー含有SMAミセルの培養食道癌細胞 (Kys150) への取り込みは正常上皮細胞に比べ約5倍ほど効率がよく、また、これらの血中半減期も10時間と十分に長くなり、さらに腫瘍濃度はfreeのPSよりも8~10倍程高いことがわかった。

本実験に用いる大腸癌モデルは、IRCマウスに対し、デキストラン硫酸の経口投与とアゾキシメタンの腹腔内投与を行うことで作成に成功している。今後、大腸癌の早期検出と予防、さらに治療をめざした研究を進展させる。

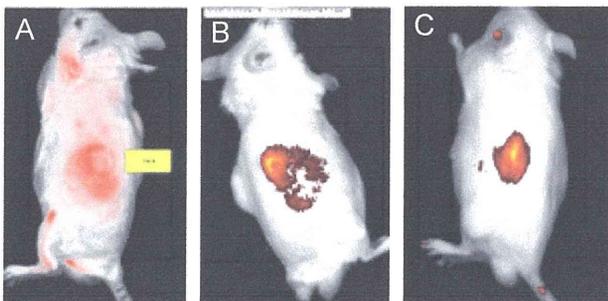


図1 A. HPMA-ZnPP, B. Rhodamine-transferrin, C. SMA-ICG micelle i.v.投与マウスの腫瘍イメージング

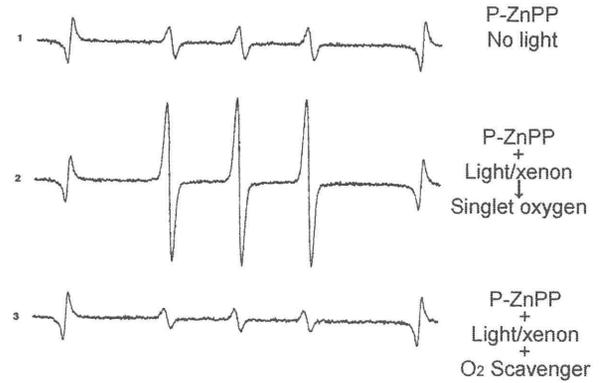


図2 内視鏡光源による光照射療法(PEG-ZnPPなど)における一重項酸素のESRシグナルの検出

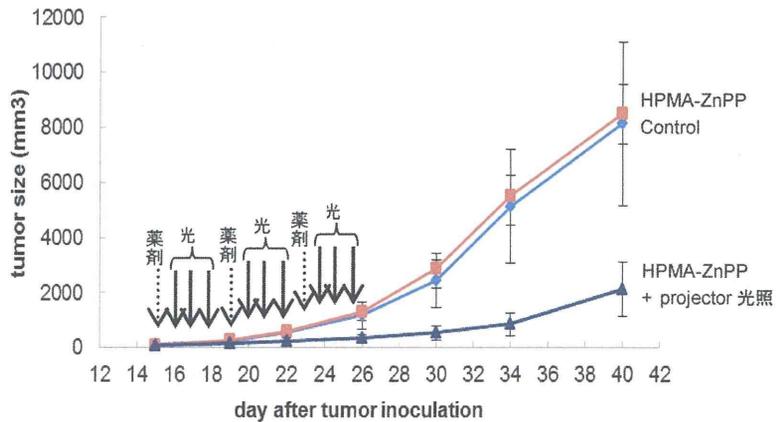


図3 HPMA-ZnPP 静注後の光照射によるマウス S-180 腫瘍の治療効果

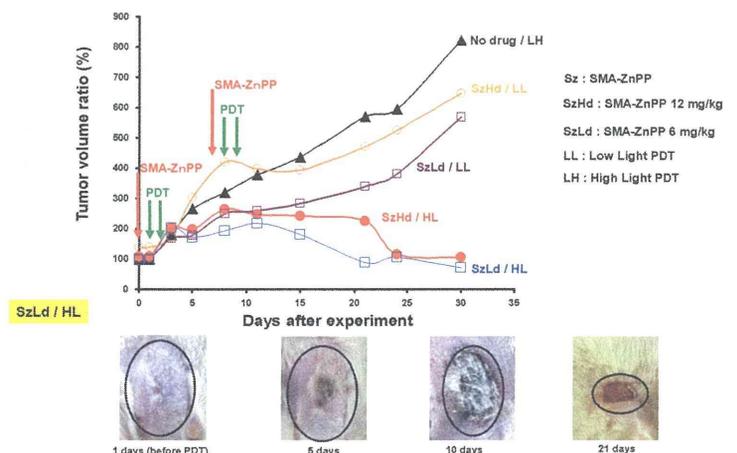


図4 SMA-ZnPP の PDT による DMBA 誘発乳癌の治療

本プロジェクトのH24年度の成果としては図5～11のように蛍光性分子プローブのローダミン、ZnPP、ICGなどを合成高分子、さらにアルブミンやトランスフェリンなどの血清タンパク等に結合した蛍光ナノプローブの作製である。それらナノプローブを静脈投与すると腫瘍部選択的に集積し、蛍光によりはっきりと腫瘍を検出/描出できることがわかった(図5)。即ち、成果の一つはHPMA(ヒドロキシプロピルメタアクリルアミド)ポリマー(P-HPMA)をZnPPに結合したP-HPMA-ZnPPを合成し(合成スキーム1)、それを静注後、約420nmで励起、550nm付近の蛍光波長によりマウスのS-180腫瘍をin vivo光イメージング装置(IVIS)で観察すると、蛍光ナノプローブは腫瘍によく集積し、腫瘍部特異的な蛍光画像をきれいに描出した(図5A)。同様にローダミン標識のアルブミンを静注後、2時間後において著明な蛍光像として検出できた(図5B)。また、ニトログリセリンの併用により、ローダミン標識アルブミンの血中濃度が高く維持され、腫瘍においてより均一な蛍光染色が認められた。この結果はSMA-ICGでも同様であり、脱毛なしのマウス腫瘍に対しても、腫瘍の蛍光観察が可能であった(図6)。これら腫瘍部の蛍光強度は正常部の約15倍であった。

これらの高分子でナノ化した蛍光ナノプローブ(ミセル化薬剤)に比べ、もとの低分子蛍光プローブは腫瘍部に対する選択性は全くなかった。例えば、低分子free(遊離)のZnPPおよびfreeのローダミンは何れも腫瘍部に対する濃染像がみとめられず、EPR効果がないことがわかった(図5A', B')。現在、臨床で用いられている低分子であるレザフィリン®(明治)でも腫瘍選択性は全くなかった。

さらに、ローダミン、ローズベンガルおよびメチレンブルー含有SMAミセルのin vitro系での培養食道癌細胞KYSE150への取り込みは正常上皮細胞に比べ約5倍ほど効率がよく、また、これらの血中半減期も10時間と充分に長くなり、さらに腫瘍濃度はfreeの蛍光ナノプローブよりも8～10倍程高いことがわかった。(図省略)

今回のプロトタイプ of 蛍光内視鏡とカメラは図8Aに示してある。

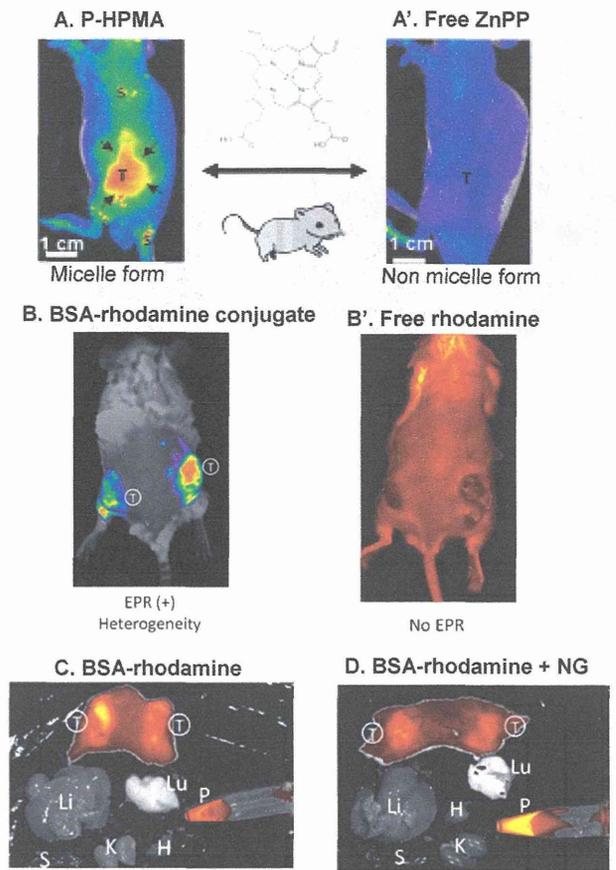
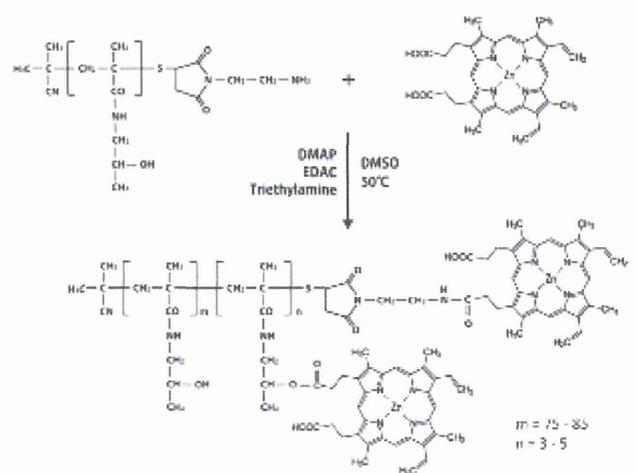
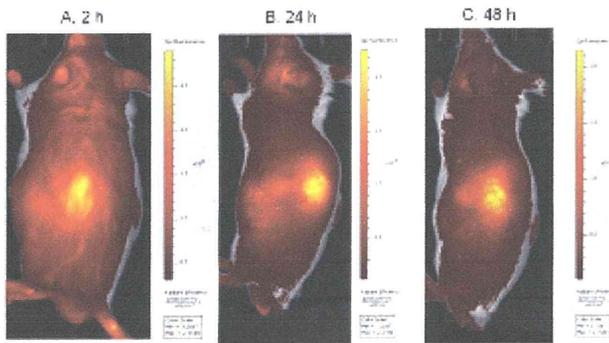


図5. HPMAポリマー結合ZnPP(A)あるいはアルブミンに結合のローダミン(B)を静注後、数時間後に光照射すると、腫瘍部は強い蛍光像を示した。In vitroでは著明な一重項酸素を生成し、強抗腫瘍効果を示すことを確認した(図7)。C、Dは腫瘍(T)とそれ以外の臓器を剖検したときの蛍光像を示している。特にニトログリセリン(NG)投与により血中濃度(P)が高く維持され、腫瘍においてはより均一な蛍光染色をみた。



合成スキーム1. HPMAポリマー-ZnPP結合体の合成。結合物は水溶液中で自然にミセルになる。



The drug is cleared from the normal tissue
 → becoming high S/N by EPR effect

図6. SMA-ICG静注後の腫瘍の蛍光像。腫瘍は投与2時間後(A)から濃染し、24~48時間(B, C)と経時的に腫瘍のコントラストは改善した。S/N比はコントロールと比べ約15倍以上となる。

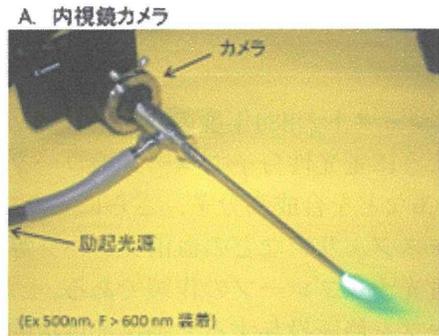


図8. 蛍光内視鏡による大腸癌の検出

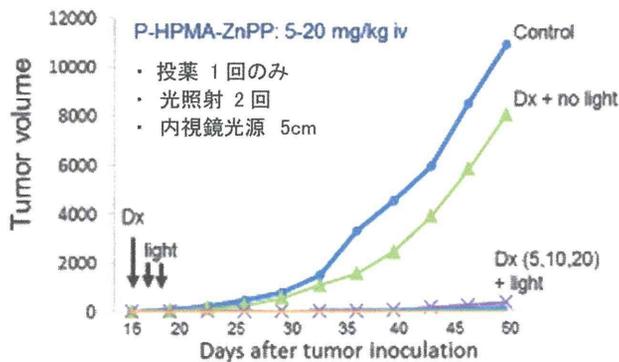
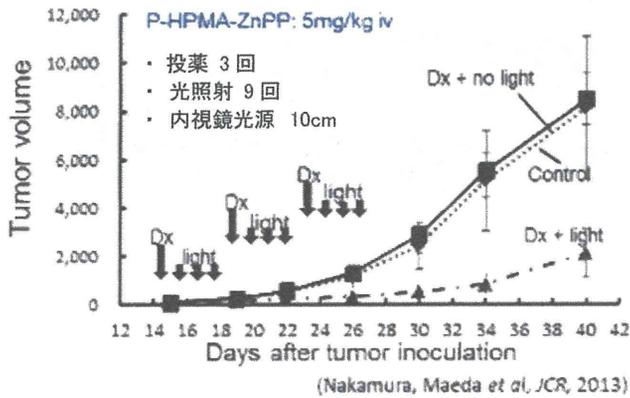
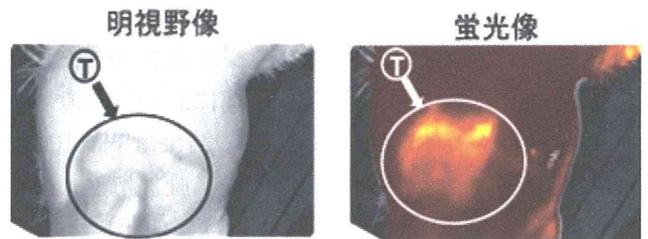


図7. HPMA-ポリマー結合 ZnPP iv 投与後、光照射による抗腫瘍効果。光源は内視鏡 xenon 光で 400~700nm. Dx は薬剤。5,10,20mg/kg 投与。



DMBA induced autochthonous breast cancer in rat.

図9. 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。

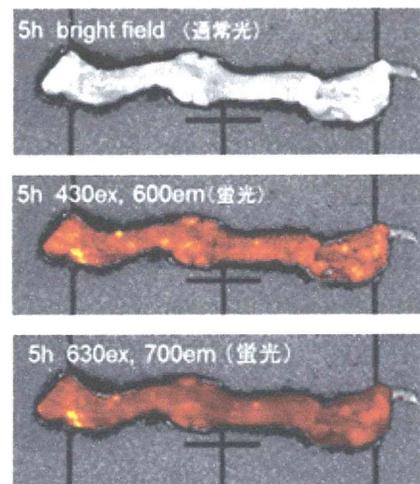


図10. レザフィリンによるマウス大腸癌の蛍光検出。上の現在実用化されているレザフィリンによるPDTは、腫瘍選択性がほとんどない。(文献 C.J. Gomer & A. Ferrario, *Cancer Res.* 50, 3985-3990, 1990)

(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、効率よく蛍光を発生し、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ルアミド) 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 12 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 $\text{HPMA}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{ZnPP}$ 、ヒドラゾン結合 $\text{HPMA}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{N}-\text{ZnPP}$ 、あるいはアミド結合 $\text{HPMA}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2-\text{ZnPP}$ 、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 13A~D に示す。

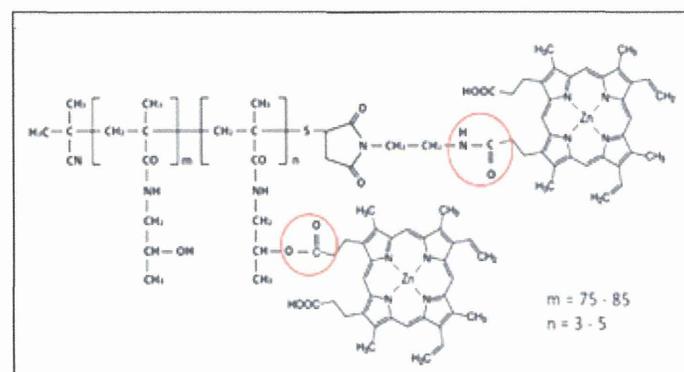


図 12. HPMA ポリマー-ZnPP 結合体の化学構造。ZnPP (プロトポルフィリン) とポリマーの化学結合様式○内。本ポリマー結合体は水溶液中で自然にミセルになる。

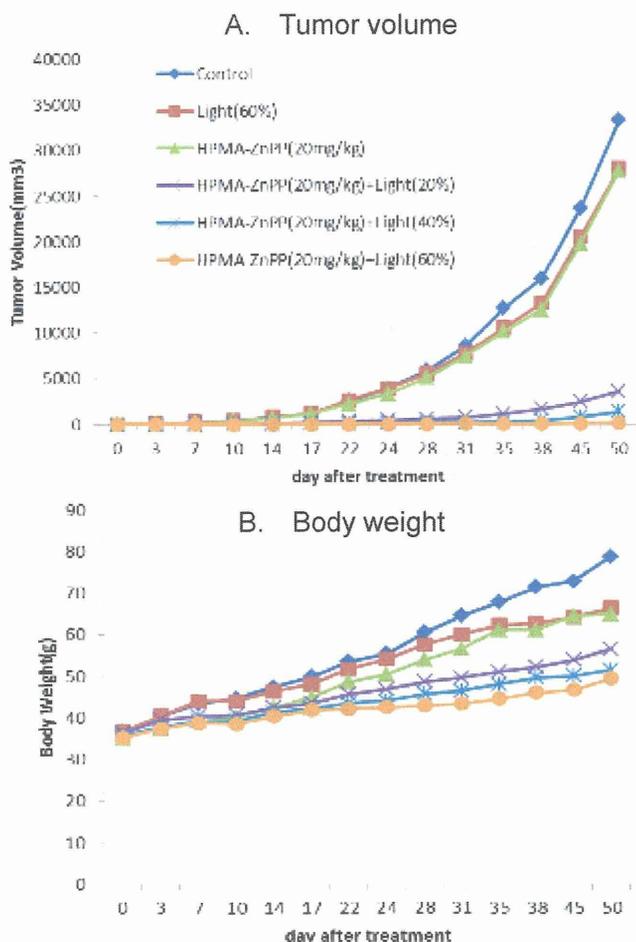


図 11. A. HPMA-ZnPP 結合物投与マウスの抗腫瘍効果。B. HPMA-ZnPP 結合物投与マウスの体重変化 (毒性評価)。HPMA-ZnPP 20g/kg で光源出力 40%、60% でも 50 日後にほぼ完治し、尚かつ副作用等毒性は現れなかった。光照射なしでは何れの効果もない。

本実験では ICR マウスの自家化学発癌 (大腸癌) モデルをデキストラン硫酸とアゾキシメタンの投与で作成し、大腸癌の早期検出と光照射による治療をめざした研究を進めてきた。その成果を図 8B (対照図 8C) に示した。このモデルでは大腸癌のみが蛍光検出できた。また、DMBA により自家発癌した乳癌の *in vivo* イメージングは図 9 に示した。腫瘍部のみ強い蛍光がみられる。今回用いられている PDT のプローブであるレザフィリンを用いて大腸癌を対照群として検討したが、レザフィリンは低分子であり、EPR 効果もなく、腫瘍選択的な集積も蛍光像もみられなかった (図 10)。

HPMA-ZnPP 投与後、キセノン光 (400-700nm) を DMBA 誘発ラット乳癌に対して試みたところ、HPMA-ZnPP と光の両 dose に比例して制癌効果を示した (図 11A)。そのとき、ラットに対する副作用 (体重減少) はみられなかった (図 11B)。

(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

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ーを用いて、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し、ZnPP 含量が多くなるに伴い、蛍光の消光が観察された（図 14A, 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 14B）。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 15）。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。

(3) 蛍光イメージング

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 にしたものでは、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 13A, 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充分な明るさで確認できた。

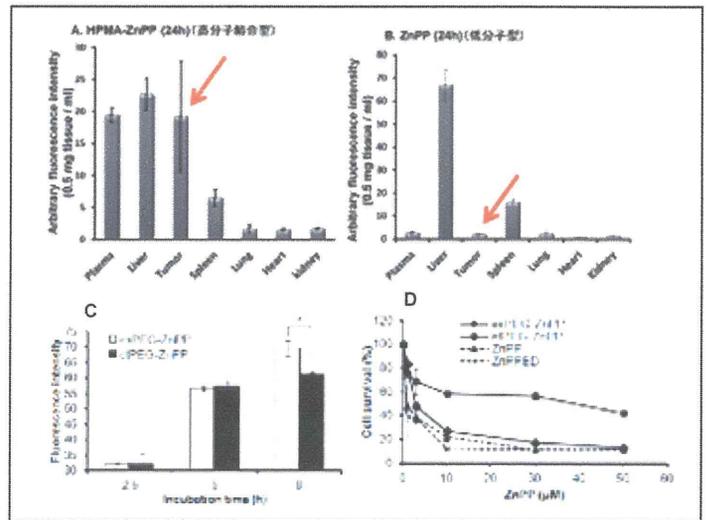


図 13. A. HPMA 高分子結合型 ZnPP の iv 後の組織分布。B. もとの free ZnPP の iv 後の組織分布。C. 各化学結合の異なる結合物 esPEG-ZnPP と etPEG-ZnPP の細胞内取り込み：エステル結合の方が 8 時間以上で優位である。D. 各 ZnPP 誘導体の細胞毒性。ポリマーと ZnPP 間の化学結合の違いによる切断と薬効の差。es はエステル、et はエーテル結合を示す。

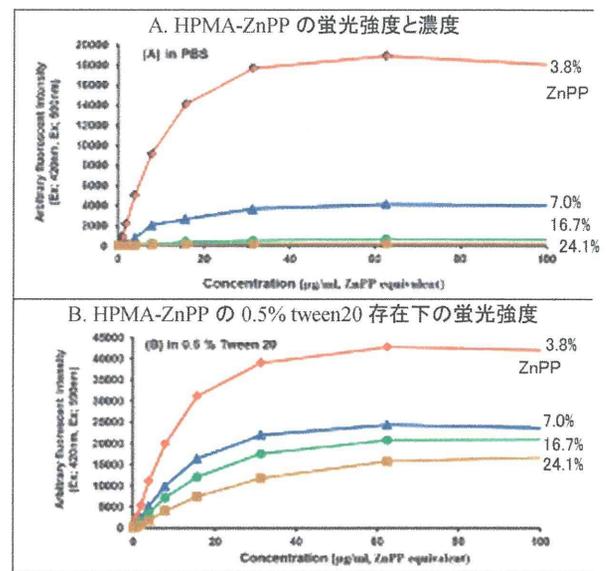


図 14. PHPMA-ZnPP の蛍光強度と一重項酸素の生成強度。ZnPP 含量の少ない HPMA-ZnPP ほど、強い蛍光を発する。特に HPMA-ZnPP (3.8%) は強い蛍光を発し、HPMA-ZnPP (16.7%) や HPMA-ZnPP (24.1%) と比べると、50~100 倍程度の蛍光強度を示した。Tween 20 などの界面活性剤で HPMA-ZnPP のミセル構造を壊すと、すべての HPMA-ZnPP において、蛍光の回復が認められたが、依然として ZnPP 含量の低いものにおいて高い蛍光が観察された。

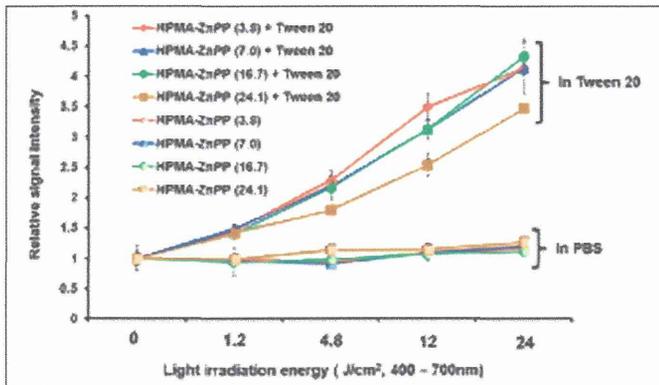


図 15. PHPMA-ZnPP の一重項酸素生成能。PBS 中ではすべての HPMA-ZnPP に関して一重項酸素の発生は認められない。Tween 20 を用い、ミセル構造を破壊すると、一重項酸素の発生が認められた。

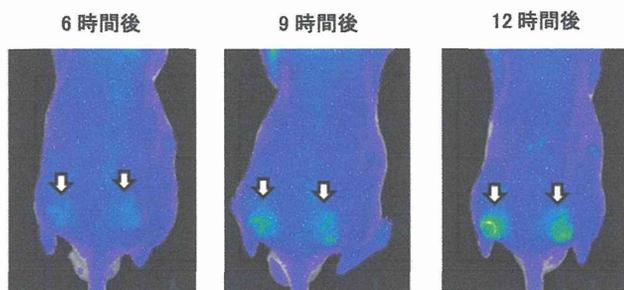


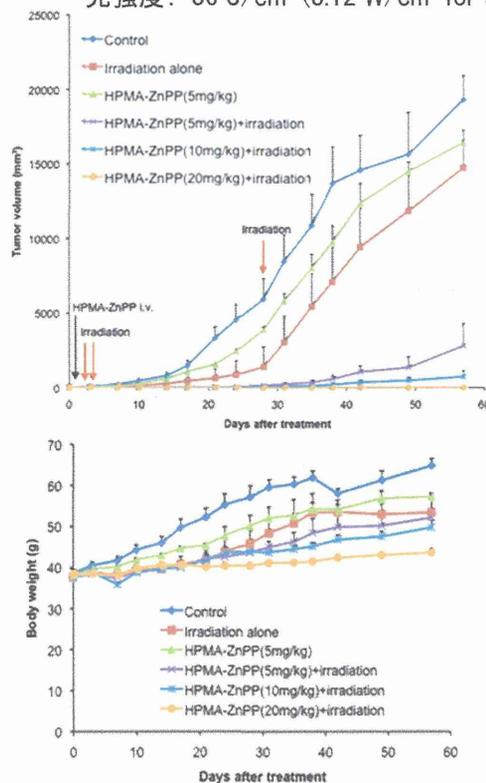
図 16. ポリマー結合型ピラルピシンは腫瘍部選択的に集積していることが、その蛍光像で判定できる。投与後 6 時間目から腫瘍部の蛍光が認められ、経時的に漸増する。(白矢印)



図 17. 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。

A. 量依存性

光強度: 36 J/cm² (0.12 W/cm² for 5 min)



B. 光量依存性

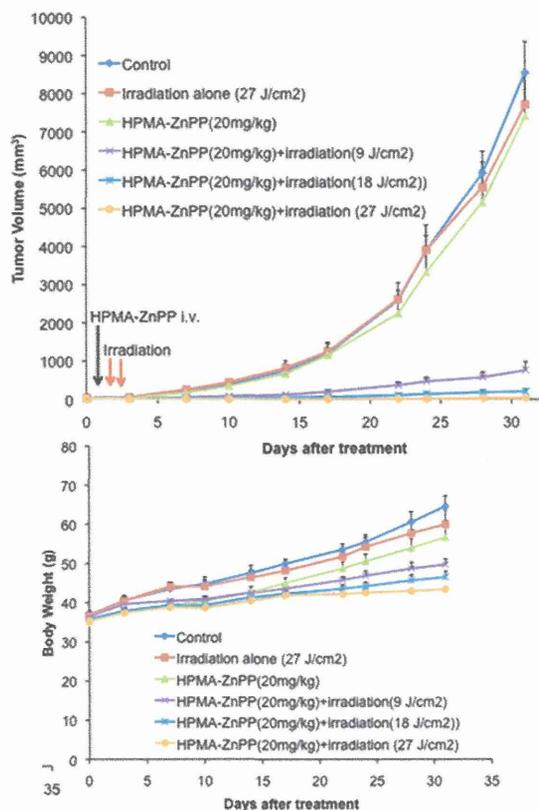


図 18. HPMA-ZnPP の PDT 抗腫瘍効果: 濃度依存性 (A) と照射量依存性 (B)。S-180 腫瘍モデルにおいて、HPMA-ZnPP (5-20mg/kg) を経静脈注射後、赤矢印に示したように光照射 (朝日分光 MAX303) を行った。下の図にそれぞれの治療後の担癌マウスの体重変化を示した。何れも体重でみる限り、副作用はみられなかった。

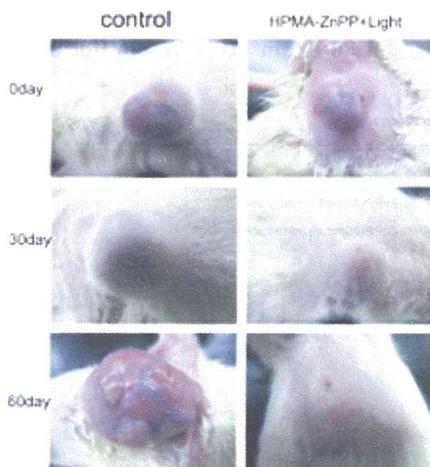


図 19.ラット化学発癌剤 DMBA による自家乳がんモデルにおける HPMA-ZnPP 治療効果。HPMA-ZnPP/光照射治療後、腫瘍は次第に縮小し、60日後の時点で、腫瘍がほとんど消滅した。

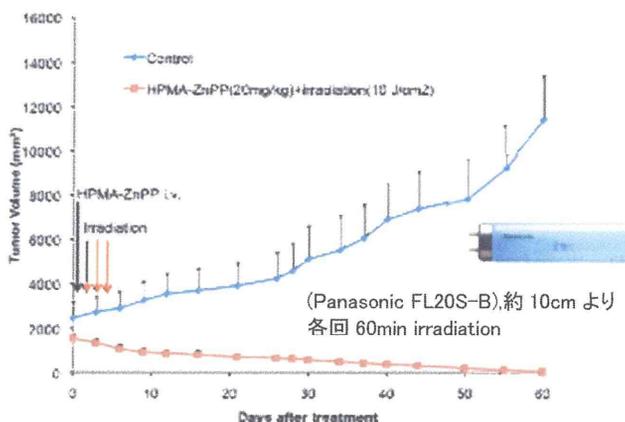


図 20.ブルー蛍光灯を用いる HPMA-ZnPP の PDT 治療効果。腫瘍モデル: 発癌剤 DMBA による自家乳がんモデル。矢印は HPMA-ZnPP の投与と光照射(赤矢印)を示した。

(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 PEG 及び 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 18~20)。同様な治療プロトコールで、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 19)。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 20)。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。

D. 考察

光線力学療法 Photodynamic Therapy (PDT) の理論は 100 年以上前から知られており、当初は皮膚結核の治療法として脚光をあび、1903 年のノーベル賞 (NR Finsen) となっている。1960~70 年代に入りレーザーの使用により PDT は革新されるやにみえたが、一般化には至っていない。

その第一の理由は、PDT に必須の光増感剤 (photosensitizer, PS) は低分子化合物のテトラピロール類 (レザフィリン、フォトフォリン、クロリンなど) に限られており、それを注射 (iv) したとき、これらの PS は腫瘍選択的な集積がなく、全身まばくまなく分布し、とくに皮膚に対して通常レベルの室内光でさえも障害を引き起こすことであった。また、管腔臓器などに対しても、これまで蛍光内視鏡の開発などによる高感度検出の工夫がほとんどされていなかった。

次に第二の問題は、PS の励起に必要な分光学的観点からすると一重項酸素生成の最も効率の高い量子収量を得る波長 (Soret band, 400-450nm) とはほど遠い波長 633nm (HeNe レーザー) を用いている。

これに対し我々はヒト乳癌に近似のラット自家発癌 (DMBA) した乳癌に対し、キセノン光源 (内視鏡)、LED 光源 (410-450nm)、およびブルー蛍光灯 (λ_{max} 430nm パナソニック FL20S-B) の何れを用いても、ほぼ完治することができた。勿論、この治療効果は薬剤の Dose (5-30mg/kg) と光量に依存的であった。また、内視鏡光源は 40% の出力でも充分完治した。

このプロジェクトの重要な成果の一つは、我々の高分子結合型 PS (蛍光ナノプローブ FNP) は、水溶液中では光を当てても 1O_2 を生じないが、この FNP ミセルを細胞に取り込ませるか、レシチンやアルコールで、あるいは腫瘍周辺の低 pH (5.8-7.0) にさらすと、free の ZnPP、あるいはミセルの分解を生じ、光に対し応答して 1O_2 を生じ、その局所の殺細胞効果を確認した。これに対して、在来から用いられている低分子 PS はそのまま、光により 1O_2 を生じ、例

えば全身の皮膚で発赤を生ずる。また、我々の ZnPP はミセルから遊離するとすみやかに細胞に、とくに癌細胞に早く取り込まれる。

ZnPP は細胞内では H0-1 を阻害し、また熱ショックタンパク HSP-32 を抑え、さらに oncogene の BCR/ABL の抑制があることを我々とウィーン大学の研究で発見している (文献 32)。これらは ZnPP の毒性が正常細胞では弱く (IC_{50} 500 μ g/ml 以上)、多くの癌細胞では強く (IC_{50} 0.1~5 μ g/ml) 発現するため、EPR 効果以外にさらなる腫瘍選択性があるということである。

このように光の照射は皮膚癌、乳癌のみならず内視鏡的に体内各所 (管腔臓器/GI、腹壁、腹膜、胸壁、膀胱、子宮、その他) などにも応用できると考えられる。このような側壁の効率的な検出と光照射のための新しい内視鏡も開発し (図 17 上、下)、一段と臨床応用をめざした TR の展開をしたいと考えている。

さらに平成 25 年度の成果の一つは新型 DDS 製剤のポリマーによる結合ピラルビシンを用いて、その薬物が腫瘍部に確実に集積していることを示す画像化に成功している (図 16)。これによってこの薬剤が癌にピンポイントしていることがわかる。これは担当医師の立場からも、その薬剤投与患者自身にそのデータを提示できることにより、患者本人に安心感を与えることができる。

E. 結論

- ① ポリマー結合型 PS (photosensitizer) は EPR 効果により腫瘍集積性を示す極めて優れたナノ PS (NPS) である。
- ② 上の事項に基づき、固型腫瘍を蛍光像として超早期に検出が可能になる (図1, 5)。
- ③ そのような NPS 投与マウスおよびラット (自家乳癌) の *in vivo* 腫瘍に対し、照射を行ったところ、確実に抗腫瘍効果を示した (図3, 4, 7, 11, 19)。
- ④ ポリマー結合型蛍光プローブ (NPS) はそのまま PBS 中では光をあてても ROS (1O_2) は生じないが、ZnPP を遊離させるか (腫瘍の低 pH)、細胞膜成分レシチンの接触により遊離の ZnPP となり、光応答性的に ROS/ 1O_2 を生じることがわかった。先発の低分子 PS のレザフィリンでは、そのまま光により ROS/ 1O_2 を生じるため、光毒性が強烈であった (図2, 10, 15)。
- ⑤ 上の NPS を用いるのと同様に、アントラサイクリン系の DDS 製剤 P-HPMA-THP (ピラルビシン) 投与担癌マウスにおいて、薬効が効率よく癌部のみに集積することを可視画像でみることができた

(図16)。これは担当医師が自分の投与した薬剤が癌に集まったかどうかを確認するとともに、投与患者にそのことをインフォームすることができる、安心感を与えることができる。

- ⑥ この NPS の ZnPP 含有製剤は多面的な抗癌作用がみられ、多くの他の制癌剤と比べはるかに優れていることを益々確信した。

- a. Free の ZnPP はそれ単体でも癌で高発現している H0-1 を抑える (正常細胞では H0-1 の発現はない)。そのため癌はオキシストレスでアポトーシスとなり死ぬ (PDT 以外の作用)。
- b. ZnPP はまた、HSP-32 を標的として、tumor survival factor (HSP-32) をブロックする。→癌の細胞死 (正常細胞は OK)。
- c. ZnPP は正常細胞に対する毒性は極めて弱い (500 μ g/ml 以上) が多くの腫瘍細胞では 0.3~5.0 μ g/ml であり、ここでも腫瘍選択性がある。
- d. ZnPP は肝底護剤として知られている。即ち、オーバードースしても毒性の危険はまずない。
- e. 癌部の低 pH (6 前後) でこの NPS から free の ZnPP を遊離する (正常では生じない)。Free ZnPP の癌部の細胞取り込みは正常よりもはるかに早い。そのため、さらに第 3 の癌選択性が発揮される。

E. 健康危機情報

とくになし。

F. 研究発表

I. 論文発表

- 1 H. Maeda, Y. Matsumura, History and impact of EPR effect for the nanomedicine drug developments in cancer chemotherapy, **Adv. Drug Delivery Reviews** 63, 129-130 (2011).
- 2 J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda, EPR effect: the unique characteristics of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, its limitation and augmentation, **Adv. Drug Delivery Reviews** 63,136-151(2011).
- 3 H. Nakamura, J. Fang, B. Gahininath, K. Tsukigawa, H. Maeda, Intracellular uptake and behavior of two types zinc protoporphyrin (ZnPP) micelles, SMA-ZnPP and PEG-ZnPP as anticancer agents; Unique intracellular disintegration of SMA micelles, **J. Control. Release**, 155, 367-375 (2011).
- 4 G.Y. Bharate, J. Fang, H. Nakamura, H. Qin, S.

- Shinkai, and H. Maeda, 4-Amino-6-hydroxypyrazolo [3,4-d] pyrimidine (AHPP) conjugated PEG micelles: Water soluble polymeric xanthine oxidase inhibitor. **J. Drug. Targeting** 19, 954-966 (2011)
- 5 N. Larson, K. Greish, H. Bauer, H. Maeda, H. Ghandehari. Synthesis and evaluation of poly(styrene-co-maleic acid) micellar nanocarriers for the delivery of tanespimycin. **Int'l. J. Pharmaceutics**. 420, 111-117 (2011)
- 6 J. Fang, H. Qin, T. Seki, H. Nakamura, K. Tsukigawa, H. Maeda: Therapeutic potential of pegylated hemein for ROS-related diseases via induction of heme oxygenase-1: results from a rat hepaticischemia/reperfusion injury model. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 339, 779-789 (2011)
- 7 H. Maeda, Recollections of 45 years in research: From protein chemistry to polymeric drugs to the EPR effect in cancer therapy *In Science Education in a Rapidly Changing World* (Seth D. Grahame) Nova Science Publishers, N.Y., USA, Chapter 1, PP 1-30 (2011)
- 8 H. Maeda: Enhanced permeability and retention effect in relation to tumor targeting. *In Drug Delivery in Oncology. From Basic Research to Cancer Therapy* (Eds. F. Kratz, P. Senter, H. Steinhagen) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, Vol.1, pp 65-84 (2011)
- 9 K. Hochdörffer, G. DiStefano, L. Fiume, H. Maeda, F. Kratz: Liver tumor targeting *In Drug Delivery in Oncology. From Basic Research to Cancer Therapy* (Eds. F. Kratz, P. Senter, H. Steinhagen) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, Vol. 3, pp 1519-1568 (2011)
- 10 H. Nakamura, J. Fang, H. Maeda. Protective Role of D-Amino Acid Oxidase Against Bacterial Infection. **Infection and Immunity**. 80, 1546-1553 (2012)
- 11 H. Herrmann, M. Kneidinger, S. Cerny-Reiterer, T. Rüllicke, M. Willmann, K.V. Gleixner, K. Blatt, G. Hörmann, B. Peter, P. Samorapoompichit, W. Pickl, G. Y. Bharate, M. Mayerhofer, W. R. Sperr, H. Maeda, P. Valent: The Hsp32 inhibitors SMA-ZnPP and PEG-ZnPP exert major growth-inhibitory effects on CD34⁺/CD38⁺ and CD34⁺/CD38⁻ AML progenitor cells. **Current Cancer Drug Targets**. 12(1), 51-63 (2012)
- 12 H. Maeda: Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. **Proc. Jpn. Academy, Series B**, 88, 53-71 (2012)
- 13 G. Bharate, H. Nakamura, J. Fang, S. Shinkai, H. Maeda. Styrene-co-maleic Acid (SMA) Telomeric Micelles Encapsulated-Zinc Protoporphyrin (SMA-ZnPP) and Other Drugs: Stability Study. CRS Newsletter, 29,6-7 (2012)
- 14 J. Fang, H. Qin, H. Nakamura, K. Tsukigawa, H. Maeda, Carbon monoxide, generated by heme oxygenase-1, mediates the enhanced permeability and retention (EPR) effect of solid tumor, **Cancer Science** 102, 535-541 (2012)
- 15 J. Fang, K. Greish, H. Qin, H. Nakamura, M. Takeya, and H. Maeda, HSP32 (HO-1) inhibitor, copoly(styrene-maleic acid)-zinc protoporphyrin IX, a water-soluble micelle as anticancer agent: In vitro and in vivo anticancer effect. **Eur. J. Pharm. Biopharma**. 81, 540-547 (2012)
- 16 H. Nakamura, J. Fang, T. Mizukami, H. Nunoi, H. Maeda, Pegylated D-amino acid oxidase restores bactericidal activity of neutrophils in chronic granulomatous disease via hypochlorite, **Exp. Biol. Med.** 237, 703-708 (2012)
- 17 Y. Ishima, D. Chen, J. Fang, H. Maeda, A. Minomo, U. Kragh-Hansen, T. Kai, T. Maruyama and M. Otagiri: S-Nitrosated human serum albumin dimer is not only a novel anti-tumor drug but also a potentiator for anti-tumor drugs with augmented EPR effects. **Bioconjug. Chem.** 23, 264-271 (2012)
- 18 H. Maeda, Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond, **J. Control. Release**, 164, 138-144 (2012)
- 19 前田 浩、EPR効果に基づく腫瘍のターゲティングと蛍光イメージング、Progress in Drug Delivery System XXI, 5-12, 2012 (静岡DDSカンファレンス 同年9月1日開催)
- 20 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)
- 21 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)
- 22 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)
- 23 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)
- 24 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)
- 25 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)
- 26 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)
- 27 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)
- 28 J. Fang, T. Seki, T. Tetsuya, H. Qin, 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)
- 29 [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」パリティ誌、丸善書店、8月号 (2013)
- 30 [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. Uchevbu, A.G. Schätzlein, W.P. Cheng, A. Lalatsa) Springer New York, pp 401-427 (2013)
- 31 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, 81-87 (2014)
- 32 S. Cerny-Reiterer, R. A. Meyer, H. Herrmann, B. Peter, K. V. Gleixner, G. Stefanzi, E. Hadzijusufovic, 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.
- 33 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)
- 34 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)
- 35 H. Maeda, Emergence of EPR effect theory and development of clinical applications for cancer therapy, **Therapeutic Delivery (Future Science)** (in press, 2014)
- 36 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)
- 37 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)
- 38 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)
- 39 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」月刊「化学工業」6月号 (in press 2014)

- 40 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)
- 41 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
- 1 H. Maeda, H. Nakamura, G. Y. Bharate, K. Tsukigawa, H. Qin, J. Fang, Nanoparticles of styrene-co-maleic acid telomer (SMA) containing anthracycline and zinc-protoporphyrin (ZnPP) as new micellar anticancer agents, and SMA conjugate of AHPP, a xanthine oxidase inhibitor for oxidative diseases <Review>, International Conference on Biomaterials Science, 2011.3 (茨城)
- 2 G. Y. Bharate, H. Nakamura, J. Fang, B. Klumperma, S. Shinkai and H. Maeda, Evaluation of (styrene-co-maleic acid) telomer micelles encapsulated-zinc protoporphyrin (SMA-ZnPP): A stability study for three different types of SMA micelles, International Conference on Biomaterials Science, 2011.3 (茨城)
- 3 月川 健士、中村秀明、方 軍、新海 征治、前田 浩、PEG 化亜鉛プロトポルフィリン (PEG-ZnPP) の安定性および腫瘍部位での PEG 鎖切断による細胞内取り込みの改善、第 27 回日本 DDS 学会、2011.6 (東京)
- 4 前田 浩、DDS の社会的役割と癌治療におけるジレンマ、第 27 回日本 DDS 学会 永井賞受賞記念講演、2011.6 (東京)
- 5 G. Y. Bharate, H. Nakamura, J. Fang, B. Klumperma, S. Shinkai and H. Maeda, Styrene-co-maleic acid (SMA) telomer micelles encapsulated-zinc protoporphyrin (SZP): Arginine formulation for improved stability and solubility, 第 27 回日本 DDS 学会、2011.6 (東京)
- 6 H. Maeda, K. Greish, and A. Nagamitsu, Enhanced Drug Delivery and Therapeutic Effect for Lung Cancer Using NO Releasing Agent (ISDN) and SMANCS Administered via the Bronchial Artery: Experiences with Unresectable Advanced Bronchogenic Cancer, The 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2011.8 (Maryland, USA)
- 7 K. Tsukigawa, H. Nakamura, J. Fang, H. Maeda, The importance of cleavage of PEG chains from pegylated zinc protoporphyrin (PEG-ZnPP) by tumor proteases on intracellular uptake, The 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2011.8 (Maryland, USA)
- 8 G. Y. Bharate, H. Nakamura, J. Fang, B. Klumperma, S. Shinkai and H. Maeda, Stability of styrene-co-maleic acid telomer micelles encapsulated-zinc protoporphyrin (SZP), The 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2011.8 (Maryland, USA)
- 9 H. Maeda, Macromolecular therapeutics: EPR effect and beyond in cancer treatment, Drug Delivery and Cancer: Challenges and New Directions for Cancer Therapy” symposium, 2011.10 (Indiana, USA)
- 10 前田 浩、感染における生体内ラジカルの生成ならびに「癌化学療法における高分子型制癌剤の研究と EPR 効果の発見、第 70 回日本癌学会学術総会 吉田賞受賞記念講演、2011.10 (愛知)
- 11 中村秀明、水上智之、布井博幸、前田 浩、慢性肉芽腫に対するポリエチレングリコール修飾 D-アミノ酸酸化酵素 (PEG 化 DAO) を用いた過酸化水素補充療法、食細胞昨日異常症研究会、2011.12 (東京)
- 12 J. Fang, T. Seki, T. Tsukamoto, H. Qin, H. Maeda, Protection of inflammatory bowel diseases and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) via suppressing oxidative stress. Keystone Symposia – The role of inflammation during carcinogenesis– (Doubling, Ireland) (2012 年 5 月 21 日)
- 13 H. Maeda, H. Nakamura, H. Qin, K. Tsukigawa, J. Fang, The EPR effect as seen by tumor imaging of fluorescent proteins and synthetic nanoparticles. 9th International Symposium on Polymer Therapeutics (Valencia, Spain) (2012 年 5 月 28 日~30 日)
- 14 H. Maeda, H. Nakamura, K. Tsukigawa, V. Subr, J. Fang, K. Ulbrich, Tumor targeting polymeric drugs based on the EPR effect; its augmentation for drug delivery and efficacy, and extension to tumor imaging. 77th Microsymposium of Prague Meetings on Macromolecules, Polymers in Medicine (Prague, Czech Republic) (2012 年 7 月 3 日)
- 15 H. Nakamura, Q. Haibo, L. Long, V. Subr, Y. Hitaka, F. Jun, K. Ulbrich, H. Maeda, Tumor selective targeting and light induced cytotoxicity of Zn-protoporphyrin conjugated hydroxypropyl methacrylamide polymer (HPMA-ZnPP) micelle. The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Quebec, Canada) (2012 年 7 月 17 日)
- 16 H. Maeda, Nanomedicine Roundtable Discussion: The EPR effect and its augmentation for enhanced

- tumor drug delivery and imaging. The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Quebec, Canada) (2012年7月17日)
- 17 H. Maeda, EPR Workshop: Fluorescent in vivo cancer imaging using macromolecular fluorescent probes. The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Quebec, Canada) (2012年7月14日)
 - 18 前田 浩, EPR 効果に基づく高分子製剤の腫瘍ターゲティング、とくに各種ポリマー結合ポリマー結合制癌剤と蛍光性ナノメディシンによる癌の高感度内視鏡的検出と治療、大塚製薬 藤井記念研究所 講演 (滋賀県)、2012年7月27日
 - 19 前田 浩, EPR 効果に基づく腫瘍のターゲティングと蛍光イメージング、第21回 DDSカンファレンス (静岡)、2012年9月1日
 - 20 税所 篤行、中村 秀明、前田 浩、Synthesis and characterization of SMA-copolymer-Cisplatin complex for tumor targeted delivery based on the EPR-effect、第71回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012年9月19~21日
 - 21 前田 浩、中村 秀明、方 軍、月川 健士、Distinct tumor targeting and fluorescent imaging using nanoparticle based on EPR effect: Toward fluorescent endoscopy、第71回日本癌学会学術総会 (札幌)、2012年9月20日
 - 22 H. Maeda, The review of EPR effect in solid tumors for macromolecular drug targeting, and further augmentation for imaging and treatment of cancers, Workshop on Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Nanomedicine (National Institutes of Health in Bethesda, USA) (2012年10月10日)
 - 23 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)
 - 24 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)
 - 25 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)
 - 26 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)
 - 27 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
 - 28 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
 - 29 K. Tsukigawa, L. Long, H. Nakamura, J. Fang, H. Maeda, Targeting of SMA-pirarubicin 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
 - 30 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
 - 31 J. Fang, L. Long, Y. Hongzhuang, 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
 - 32 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
 - 33 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
 - 34 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
 - 35 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

- 36 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
- 37 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)
- 38 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)
- 39 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)
- 40 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
H. Maeda	Recollections of 45 years in research: From protein chemistry to polymeric drugs to the EPR effect in cancer therapy.	Seth. D. Grahame	Science Education in a Rapidly Changing World	Nova Science Publishers	New York, USA	2011	1-30
H. Maeda	Enhanced permeability and retention effect in relation to tumor targeting.	F. Kratz, P. Senter, H. Steinhagen	Drug Delivery in Oncology. From Basic Research to Cancer Therapy	Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.	Weinheim, Germany	2011	Vol. 1, 65-84
K. Hochdörffer, G. DiStefano, L. Fiume, H. Maeda, F. Kratz	Liver tumor targeting.	F. Kratz, P. Senter, H. Steinhagen	Drug Delivery in Oncology. From Basic Research to Cancer Therapy	Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.	Weinheim, Germany	2011	Vol.3, 1519-68
H. Nakamura, H. Maeda	Nanomedicine and cancer drug delivery based on the EPR effect and EPR augmentation.	I. Uchegbu	Fundamentals in Pharmaceutical Nanosciences	Springer	New York, USA	2013	401-27

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
H. Maeda, Y. Matsumura	History and impact of EPR effect for the nanomedicine drug developments in cancer chemotherapy.	Adv. Drug Delivery Reviews	63	129-30	2011
J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda	EPR effect: the unique characteristics of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, its limitation and augmentation.	Adv. Drug Delivery Reviews	63	136-51	2011
H. Nakamura, J. Fang, B. Gahininath, K. Tsukigawa, H. Maeda	Intracellular uptake and behavior of two types zinc protoporphyrin (ZnPP) micelles, SMA-ZnPP and PEG-ZnPP as anticancer agents; Unique intracellular disintegration of SMA micelles.	J. Control. Release	155	367-75	2011