

崇城大学学位論文

高い腫瘍選択性を有する
高分子化抗がん剤の開発に関する基礎的研究

平成 27 年度

月 川 健 士

高い腫瘍選択性を有する
高分子化抗がん剤の開発に関する基礎的研究

月 川 健 士

**Investigation of macromolecular antitumor drugs
with high tumor-selective properties**

Kenji Tsukigawa

March, 2016

Investigation of macromolecular antitumor drugs with high tumor-selective properties

Kenji Tsukigawa

Low molecular weight antitumor drugs distribute to both tumor and normal tissues indiscriminately, which causes adverse effects and limit of the dosage in clinic. Compared with low molecular weight drugs, biocompatible macromolecular drugs (> 40 kDa, 10 – 200 nm) show prolonged blood circulation, and it preferentially accumulate in tumor tissue for long time. This phenomenon is now considered as the enhanced permeability and retention (EPR) effect. In this study, I prepared macromolecular antitumor drugs such as polymer conjugates and the conjugates based aggregates, and investigated their tumor-selective properties and antitumor activities.

Firstly, I investigated the release of active drugs from macromolecular antitumor drug. Pegylated zinc protoporphyrin (PEG-ZnPP) is a water-soluble macromolecular antitumor agent. PEG-ZnPP formed aggregates in aqueous solution and accumulated in tumors preferably by the EPR effect. However, pegylation hampers the therapeutic effect on tumor cells because of decreased intracellular uptake. This problem is called PEG dilemma. In this study, I prepared two types of PEG-ZnPP with different chemical bonds between PEG and ZnPP, i.e., PEG-ZnPP with ester bond (esPEG-ZnPP) and PEG-ZnPP with ether bond (etPEG-ZnPP). The depegylation of esPEG-ZnPP appeared to be facilitated by both serine and cysteine proteases in tumor tissues. Meanwhile, etPEG-ZnPP showed no cleavage of PEG chains. And, esPEG-ZnPP showed higher intracellular uptake and cytotoxicity in vitro than etPEG-ZnPP. Moreover, depegylated products of esPEG-ZnPP were observed in tumor tissue in tumor bearing mice after i.v. administration, and esPEG-ZnPP exhibited significant higher in vivo antitumor effect than etPEG-ZnPP. These findings suggest a possible method to overcome PEG dilemma and acquire tumor-selective properties, by using ester linkage for the antitumor drug development.

Next, I investigated pharmacokinetic properties and antitumor effect of macromolecular antitumor drug and parent low molecular weight drug. Previously, in our laboratory, we prepared pirarubicin (THP)-encapsulated micellar drug using styrene-maleic acid copolymer (SMA), in which free THP was non-covalently encapsulated in SMA micelle. However, it was reported that stability of drug-encapsulated micelle by non-covalent interaction was not so adequate. In this study, I developed SMA covalently conjugated THP (SMA-THP conjugate). SMA-THP conjugate formed aggregates and showed albumin binding capacity in aqueous solution. Consequently, SMA-THP conjugate showed

longer blood circulation time (i.e., AUC: 24.5 times) and higher tumor accumulation (i.e., 8.4 times) by the EPR effect, than free THP. Moreover, this conjugate showed superior retention in tumor tissue than in normal tissue, and exhibited remarkable antitumor effect against colon 26 without apparent toxicity in vivo. Interestingly, this conjugate exhibited not only growth suppression of implanted tumor, but also reduction of metastatic tumor in the lung. These findings suggest the potential of SMA-THP conjugate as favorable candidate of antitumor macromolecular drug with tumor targeting property and little toxicity.

Then, I compared pharmacokinetic properties and antitumor effect of macromolecular antitumor drugs with different molecular weights. In previous our study, compared with poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) (PHPMA) conjugate with THP (39 kDa, 40P-THP), higher molecular weight PHPMA conjugated with THP (400 kDa, 400P-THP) showed superior tumor accumulation and antitumor effect. However, the toxicity of 400P-THP was also higher than that of 40P-THP, and body weight loss of mice was observed after treatment with 400P-THP. In this study, to develop P-THP with little toxicity and high therapeutic efficiency, PHPMA conjugate with THP (93 kDa, 90P-THP) was synthesized. 40P-THP and 90P-THP showed similar THP release property and cytotoxicity in vitro. Meanwhile 90P-THP showed prolonged blood circulation and higher tumor accumulation than 40P-THP. And, 90P-THP exhibited higher antitumor activity than 40P-THP, and eradicated tumors in 80% of the treated mice without apparent recurrence longer than 150 days after tumor inoculation. Importantly, it was suggested that potential toxicity of 90P-THP was lower than that of 400P-THP, and 90P-THP exhibited the antitumor effect without apparent adverse effect. These results suggest that 90P-THP appears to be a promising candidate for macromolecular antitumor drug.

In these studies, macromolecular antitumor drugs exhibited the EPR effect and tumor tissue environment based high tumor-selective properties, and then reduced the adverse effects and improved the antitumor activity, compared with the parent low molecular drugs. Development of macromolecular antitumor drugs with high tumor-selective properties is crucial for cancer treatment with macromolecular antitumor drugs. In addition, investigations of multiple-dose, of combination therapy with different macromolecular antitumor drugs and methods to enhance the EPR effect are important, which will lead to efficient and safety cancer therapy. The findings in this study will contribute to development of macromolecular antitumor drugs with high tumor-selective properties.

本論文は学術論文に掲載された次の論文および未投稿のデータを基礎とするものである。

- 1) Effect of different chemical bonds in pegylation of zinc protoporphyrin that affects drug release, intracellular uptake, and therapeutic effect in the tumor

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015; **89**: 259–270

Kenji Tsukigawa, Hideaki Nakamura, Jun Fang, Masaki Otagiri, Hiroshi Maeda

- 2) Synthesis and therapeutic effect of styrene-maleic acid copolymer-conjugated pirarubicin

Cancer Science, 2015; **106**: 270–278

Kenji Tsukigawa, Long Liao, Hideaki Nakamura, Jun Fang, Khaled Greish, Masaki Otagiri, Hiroshi Maeda

- 3) Enhanced pharmacokinetic properties and antitumor activity of diblock poly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide) conjugated pirarubicin

投稿準備中

Kenji Tsukigawa, Hideaki Nakamura, Tomas Etrych, Petr Chytil, Jun Fang, Karel Ulbrich, Masaki Otagiri, Hiroshi Maeda

略語表

本論文では以下の略語を用いる。

ALT	: alanine aminotransferase
AST	: aspartate aminotransferase
BSA	: bovine serum albumin
BUN	: blood urea nitrogen
CK	: creatine kinase
CMC	: critical micelle concentration
CRE	: creatine
DFP	: diisopropyl fluorophosphate
DLS	: dynamic light scattering
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle Medium
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DOX	: doxorubicin
EPR	: enhanced permeability and retention
FBS	: fetal bovine serum
Hb	: hemoglobin
HO-1	: heme oxygenase-1
HPLC	: high performance liquid chromatography
Hsp32	: heat shock protein 32
IC ₅₀	: half maximal (50%) inhibitory concentration
LD ₅₀	: Lethal Dose, 50%
LDH	: lactate dehydrogenase
MALDI-TOFMS	: matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
MMP	: matrix metalloproteinase
MTD	: maximum tolerable dose
MTT	: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
PBS	: phosphate buffered saline

PDI : polydispersity index
PEG : polyethylene glycol
PHPMA : poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide
PMSF : phenylmethylsulfonylfluoride
PP : protoporphyrin IX
PPED : *bis*-diaminoethyl protoporphyrin IX
QOL : quality of life
RBC : red blood cells
S-180 : mouse sarcoma 180
SDS : sodium dodecyl sulfate
SMA : styrene maleic acid
THF : tetrahydrofuran
THP : 4'-*O*-tetrahydropyranyldoxorubicin
TLC : thin layer chromatography
TNBS : trinitrobenzenesulfonic acid
TPCK : *N*-tosylphenylalanylchloromethylketone
WBC : white blood cells
ZnPP : zinc protoporphyrin
ZnPPED : *bis*-diaminoethyl zinc protoporphyrin

目次

第1章 緒論	1
第2章 PEG 化亜鉛プロトポルフィリンの PEG 鎖切断性と細胞内取り込みおよび抗腫瘍効果に関する検討	4
1. 背景	4
2. 実験材料および実験方法	7
3. 実験結果	15
4. 考察	44
第3章 スチレンマレイン酸コポリマー (SMA) 結合型ピラルビシンの体内動態および抗腫瘍効果の検討	46
1. 背景	46
2. 実験材料および実験方法	48
3. 実験結果	53
4. 考察	71
第4章 ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド (PHPMA) 結合型ピラルビシンの体内動態および抗腫瘍効果の検討	73
1. 背景	73
2. 実験材料および実験方法	75
3. 実験結果	78
4. 考察	91
第5章 総括	93
参考文献	96
謝辞	106

第1章 緒論

がんは、多くの疾患の中でも死亡率が高く、1980年代以降、日本人の死亡率第一位を保っている。がんは例えば、増殖のために生体内の栄養を使い続けて患者の体力を奪い、臓器の正常組織を圧迫して機能不全に陥れる。また全身衰弱状態（がん性悪液質、カヘキシー）も見られる。がんの治療は主に、外科的治療、放射線療法、化学療法が用いられており、単独または併用して行われている。

早期に発見された場合や外科的に切除が可能な場合であれば良いが、がんの大きさや場所によっては切除不可能な場合もある。また、外科的に切除したとしても、高度進行がんでは、すでに転移している可能性や後に再発する可能性も高い。放射線療法は、腫瘍細胞の放射線抵抗性が低く、近くの正常臓器の耐容性が高い場合は効果的であるが、逆の場合は正常臓器が大きなダメージを受けてしまい、治療が成り立たなくなってしまう。

化学療法で用いられている薬物の多くは低分子の抗がん剤であり、がんの増殖、成長を遅らせる目的や、手術可能な大きさまで小さくする目的、再発や転移の予防目的などに用いられている。しかしながら、すべてのがんにおいて優れた治療成績が得られているとは言えない。多くの低分子抗がん剤は腫瘍組織への選択性が低く、点滴などにより全身投与された後、標的の腫瘍組織だけでなく、健康な正常組織へも多く分布してしまう。低分子抗がん剤の多くは、細胞分裂の盛んな腫瘍細胞を殺傷する作用を持つが、腫瘍細胞だけでなく正常細胞、特に細胞分裂の盛んな正常細胞にダメージを与えてしまうことが問題となる。このような腫瘍選択性の低さから、例えば骨髄抑制などの重篤な副作用が起り、白血球や血小板の減少が起きることが多い⁽¹⁾。その他にも食欲不振、悪心、嘔吐、発熱、口内炎、脱毛といった副作用もあり、がん患者の生活の質（quality of life、QOL）は大幅に低下してしまう。

また最近では、腫瘍細胞の遺伝子などの解析が進み、腫瘍細胞に特異的に存在する特定の酵素やタンパク質の機能を阻害する分子標的薬が数多く開発されている。しかしながら、がんの原因が単一遺伝子のみの異常でないことが多いことや、腫瘍細胞では夥しい変異が起きていることなどから、期待した治療効果が得られない場合や耐性が生じる場合もある^(2,3)。また、これら分子標的薬も正常組織にダメージを与える場合が多く、例えば間質性肺炎などの副作用が見られる⁽⁴⁾。このように、がんの化学療法において大きな問題となるのは重篤な副作用であり、十分な治療効果が得られる前に投与量が制限されてしまう。

そこでドラッグデリバリーシステム（Drug Delivery System、DDS）の技術を用いて、低分子抗がん剤の正常組織への分布をできるだけ減らし、腫瘍組織に選択的に集積させることが重要だと考えられる。このDDSは、生体内に投与された薬物の体内分布を制御し、必

要な時に、必要な量を、必要な部位に送達させることで治療効果を高める一方、副作用を低減させることが目的である。その結果、より効果的な治療と、がん患者の QOL 低下を防ぐことにもつながると期待できる。

特に腫瘍組織への選択的な集積性を得る手法として、enhanced permeability and retention (EPR) 効果の利用がある⁽⁵⁻⁸⁾。EPR 効果は、多くの固形腫瘍において普遍的に見られる現象で、生体親和性を有する高分子（分子量として 4 万以上、サイズとして約 10 ~ 200 nm）が、腫瘍組織に選択的に集積し、長期間留まる現象のことである。この EPR 効果は、まず正常組織と腫瘍組織における血管構造などの違いに起因している。腫瘍組織では、腫瘍細胞の増殖を支える栄養や酸素を確保するために、血管新生が盛んに起こっている。そして、この新生血管の構造が正常血管の構造と大きく異なっている。腫瘍の新生血管の特徴として、血管平滑筋が少ないことや血管内皮細胞の間隙が大きく開いていること（e.g. ~ 1 μm ）が挙げられ、通常では正常血管からは漏出しない高分子が漏出しやすい構造になっている。さらにブラジキニンや一酸化窒素、プロスタグランジンなどの様々な因子が関与し、腫瘍血管の血管透過性を亢進させている。

これらに加えて、腫瘍組織においてはリンパ管が未発達であり、リンパ管による高分子物質の回収機能が働いていないことから、腫瘍組織に集積した高分子が長期間留まることになる。この EPR 効果に基づく高い腫瘍集積性を得るためには、低分子抗がん剤を高分子化する必要がある。その高分子化抗がん剤の大きさは、腎臓排泄を受けない分子量 4 万以上であることが重要で、長時間血中に滞留することで腫瘍血管から腫瘍組織へと漏出する時間を稼ぐ。また、高分子においても細網内皮系により捕捉されて、血中から速やかに消失してしまうことが報告されている⁽⁹⁾。つまり高分子化抗がん剤は生体に対して毒性が無く、さらに生体内で異物として認識されないこと、すなわち生体親和性を有することが必要である。

本研究では、生体親和性を有するポリマーを用いて、種々の高分子化抗がん剤を作製し、その腫瘍選択性や抗腫瘍効果に関する検討を行った。それら高分子化抗がん剤の腫瘍選択性や抗腫瘍効果を高める手法はそれぞれ異なる。第 2 章では、高分子化抗がん剤からの抗がん剤放出性と、その放出性が細胞取り込みおよび抗腫瘍効果に及ぼす影響に関する検討を行った。薬物にポリエチレングリコール (PEG) を結合させる PEG 化は、薬物の体内動態は改善するが、細胞内取り込みを阻害してしまう問題 (PEG ジレンマ) があることから^(10,11)、PEG 鎖結合部に異なる化学結合を有する PEG 化亜鉛プロトポルフィリン (PEG-ZnPP) を用いて、PEG 鎖がどのように切断脱離するのか、またその PEG 鎖切断性が細胞内取り込みや

抗腫瘍効果にどのように影響するのか検討した。第3章では、アントラサイクリン系抗がん剤ピラルビシン (THP) を用いて高分子化抗がん剤と元の低分子抗がん剤の体内動態、抗腫瘍効果の比較検討を行った。THP の腫瘍集積性を高めるため、スチレンマレイン酸コポリマー (SMA) と共有結合させた高分子化抗がん剤 (SMA-THP conjugate) を作製して、元の低分子抗がん剤 THP と体内動態や抗腫瘍効果などに関して比較した。第4章では、分子量の異なるポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド (PHPMA) 結合型 THP (P-THP) を用いて、体内動態や抗腫瘍効果、毒性について比較検討した。我々の研究グループではこれまでに、平均分子量約4万の P-THP (40P-THP) に比べ、平均分子量約40万の P-THP (400P-THP) が腫瘍集積性および抗腫瘍効果において優れていることを見出しているが、毒性も強くなってしまい、治療の際体重減少も見られた^(12,13)。そこで、低毒性で高い効果を発揮する P-THP の開発を目指して、平均分子量約9万の P-THP (90P-THP) を作製し、体内動態や抗腫瘍効果、毒性などを検討した。以下に本研究で得られた知見を詳述する。

第 2 章 PEG 化亜鉛プロトポルフィリンの PEG 鎖切断性と細胞内取り込みおよび抗腫瘍効果に関する検討

1. 背景

ポリエチレングリコール (polyethylene glycol、PEG) は直鎖状の高分子化合物であり、低毒性で軟膏や坐剤の基剤としても古くより医薬品に用いられている。この PEG をタンパク質製剤や酵素、またはその他の薬物に結合させることを PEG 化と言い、タンパク質の抗原性の低下や難水溶性薬物の可溶化などに加えて、薬物の血中滞留性を向上させることが大きな目的である⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。PEG は薬物の表面に水和層を形成し、血漿タンパク質の吸着や細胞内皮系による捕捉を抑制し、いわゆるステルス効果をもたらす^(17,18)。臨床では、ウイルス性肝炎に用いられる PEG 化インターフェロン α や、リンパ性白血病治療薬として用いられている PEG 化 L-アスパラギナーゼ、その他 PEG 化アデノシンデアミナーゼなどが実用化されている^(19,20)。

また低分子抗がん剤は、PEG 化によって高分子化 (e.g. > 40 kDa) されることで、EPR 効果に基づく高い腫瘍集積性が得られる^(5,16)。しかしながら、PEG 化は元の薬物の血中滞留性や腫瘍集積性といった体内動態は向上させるものの、場合によっては治療効果を妨げることが報告されており、この問題は PEG ジレンマと呼ばれる (Fig. 1A)^(10,11)。この原因は、PEG によって形成された水和層が、標的細胞の細胞膜との相互作用を抑制するなどして標的細胞への取り込みを阻害するためと考えられている。

この PEG ジレンマを解決するために、標的部位 (腫瘍部位) で PEG 化薬物から PEG 鎖を切断離脱させることにより、細胞内への取り込みを改善しようとする研究が行われている (Fig. 1B)。例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase、MMP) やカテプシン B などのプロテアーゼなどに切断されるペプチド、または酸性環境で切断されるヒドラゾン結合を PEG 鎖結合部に導入する研究などが報告されている^(11,21-24)。

その他の PEG 化の問題としては、PEG に対する IgM 抗体が産生されることにより、2 回目以降の投与では血中から速やかに消失してしまうことが知られている⁽²⁵⁾。これは accelerated blood clearance (ABC) 現象と呼ばれているが^(25,26)、抗がん剤を内包した PEG 化リポソームでは ABC 現象が起こらないことも報告されている⁽²⁷⁾。また PEG の代わりに、例えばポリビニルピロリドンやポリグリセロールを用いると、ABC 現象が誘導されないことも報告されている^(28,29)。

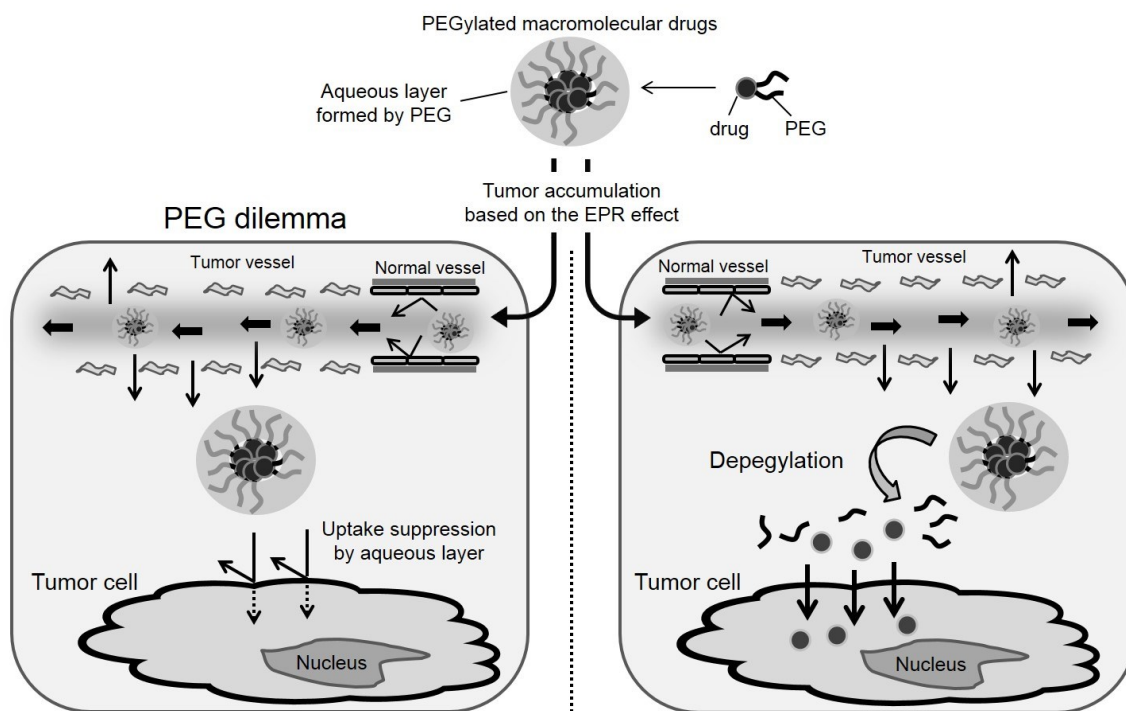


Figure 1. (A) The problem of pegylation called as PEG dilemma and (B) the strategy to overcome PEG dilemma. Pegylated drug micelles are shown as a pegylated macromolecular drug example.

亜鉛プロトポルフィリン (zinc protoporphyrin, ZnPP) は、ヘム酸化酵素 (heme oxygenase-1, HO-1 あるいは heat shock protein 32, Hsp32) を阻害し、抗腫瘍効果を発揮する⁽³⁰⁾。HO-1 は、ヘム代謝に関わる律速酵素であり、ヘムからビリベルジン、一酸化炭素 (CO)、遊離鉄を産生し、ビリベルジンはさらにビリベルジン還元酵素の作用により、ビリルビンへと代謝される。ヘム代謝副産物のビリルビンや CO は、抗酸化作用や抗アポトーシス作用を有し、細胞を酸化ストレスから保護する役割を担う⁽³¹⁾。また腫瘍細胞では、HO-1 が高発現している一方で、活性酸素を消去するカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼなどの発現が抑制されていることが知られている⁽³⁰⁻³³⁾。よって、HO-1 は腫瘍組織において重要な防御因子として機能し、腫瘍の増殖や生存に関して重要な役割を果たしている^(31,33)。また ZnPP は、例えばがん遺伝子 (*bcr/abl*) の制御などその他のメカニズムによっても抗腫瘍効果を発揮することが報告されている^(34,35)。

ZnPP は難水溶性であるが、我々の研究グループでは PEG 化によって高い水溶性を獲得することに成功している⁽³⁶⁾。また、この PEG 化 ZnPP (PEG-ZnPP) が水溶液中で 200 nm 以上の粒子として存在することを報告しており、水溶液中で多数の結合体分子が集まった会

合体を形成し、高分子として挙動できると考えられる。その結果、担がんマウスに静脈投与すると、EPR 効果に基づき選択的に腫瘍に集積し、PEG 化前の free ZnPP より高い腫瘍集積性を示すことを明らかにしている^(37,38)。ところが細胞内取り込みに関しては、free ZnPP と比べて低いことが分かり、他の PEG 化薬物と同様に PEG ジレンマに直面した^(39,40)。培養細胞を用いた検討から、PEG-ZnPP の PEG 鎖が細胞外または細胞内で切断脱離することが分かっている⁽³⁹⁾。しかしながら、PEG 鎖がどのように切断されるのか、またその PEG 鎖の切断脱離が細胞内取り込みや抗腫瘍活性にどのように影響するかについては未だ分かっていない。

これまでに我々の研究グループでは、PEG 鎖結合部に異なる化学結合を有する 2 種類の PEG-ZnPP、すなわち PEG 鎖結合部にエステル結合 (es) を持つ esPEG-ZnPP、あるいはエーテル結合 (et) を持つ etPEG-ZnPP を合成している。そこで、この 2 種類の PEG-ZnPP について、生体内での PEG 鎖の切断性および細胞内取り込みや抗腫瘍活性の比較検討を行い、PEG 鎖切断メカニズムや PEG 鎖切断の重要性について検討することとした。

本検討では、種々の動物血漿や腫瘍組織のホモジネートを用いて、PEG-ZnPP の血中での安定性や腫瘍部位での PEG 鎖切断性をそれぞれ検討し、培養細胞を用いて細胞内取り込みや細胞毒性を評価した。続いて、担がんマウスに静脈投与して抗腫瘍効果の評価、そして体内分布や生体内での PEG 鎖切断性の検討を行った。

2. 実験材料および実験方法

2.1. 実験材料

Protoporphyrin IX (PP)、leupeptin、hemin (以上、Sigma Aldrich Chemical)、Zinc protoporphyrin IX (ZnPP) (Frontier Scientific)、エステルタイプ PEG (ME-20CS, 平均分子量 2322)、エーテルタイプ PEG (ME-20AS, 平均分子量 2280) (以上、NOF Corporation)、トリエチルアミン、クロロギ酸エチル、エチレンジアミン、酢酸亜鉛、無水コハク酸、テトラヒドロフラン (THF)、クロロホルム、ジメチルスルホキシド (DMSO)、メタノール、RPMI 1640、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、ペニシリン G、ストレプトマイシン、diisopropylfluorophosphate (DFP)、phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)、*N*-tosyl-L-phenylalaninechloromethyl ketone (TPCK)、iodoacetamide、*N*-acetylcysteine、 β -Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (β -NADPH) (以上、Wako Pure Chemical)、トリフルオロ酢酸 (Nacalai Tesque)、ジスラノール (Bruker Daltonics)、ウシ胎児血清 (FBS) (GIBCO)、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Dojindo Chemical Laboratories)、ヒト大腸がん組織 (高分化度腺がん) (国立病院機構 熊本医療センターより提供いただき、本研究での使用に関して同センターの倫理委員会にて承認いただいた)。その他の試薬類は、市販の特級品を用いた。

2.2. esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP の合成

2.2.1. Bis-diaminoethyl protoporphyrin (PPED)の合成

PP の PEG 化を行うために、まず PP とエチレンジアミンを結合させた PPED を合成した。100 mg の PP を、モレキュラーシーブ (Nacalai Tesque) で一晩乾燥させた 20 mL の THF に懸濁溶解させ、遮光下、マグネチックスターラーを用いて攪拌しながら 0.25 mL のトリエチルアミンを滴下により加えた。その反応溶液に、あらかじめ 0 °C に冷やした 0.34 mL のクロロギ酸エチルを約 10 分間かけてゆっくりと加え、氷上で 20 分間反応させ、さらに室温 (25°C) で 10 分間反応させた。薄層クロマトグラフィー (TLC) [プレート: シリカゲル 60 F₂₅₄ (MERCK)、展開溶媒: クロロホルム/メタノール = 9/1 (v/v)] により確認後 (R_f 値: 0.9 のスポット)、ろ過 (ろ紙: No.5C 直径 150 mm (ADVANTEC)) し、不溶成分を除去した。ろ液を回収し、ロータリーエバポレーターを用いて、減圧下、50°C の温浴で THF および未反応のクロロギ酸エチルを除去し、プロトポルフィリン活性エステルを得た。これに 20

mL の THF を加え、完全に溶解させた。アルミホイルで遮光したナス型フラスコに、あらかじめ 2.4 mL のエチレンジアミンを入れ、攪拌下に、プロトポルフィリン活性エステル THF 溶液を滴下により 5 分間かけてゆっくりと加えた。その後すり合わせガラス栓で密栓し、室温 (25 °C) で 15 分間反応させた。反応の終点は、TLC (Rf 値: 0 (原点) (ただし、色は暗褐色))、および HPLC (保持時間: 6.3 分) により確認した。確認後、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、40 °C の温浴で THF を除去した。得られた生成物に、室温の 40 mL の蒸留水を加え懸濁液とし、それを遠心沈澱 (8,000 g、5 分) により洗浄した。この操作を上清が肉眼的にほぼ無色になるまで 5 回繰り返し行った。この沈澱物に 10 mL の蒸留水を加え、再懸濁後、凍結乾燥 (VD-800F、TAITEC) し、未精製の PPED を得た。

次に PPED の精製を行った。100 mg の未精製の PPED に 100 mL のクロロホルムを加え、70 °C の温浴にて完全に溶解させ、50 g の活性アルミナ (Wako Pure Chemical) を加えた。攪拌し静置後、上清 (無色～淡桃色) を除いた。次いで 50 mL のクロロホルム/エチレンジアミン=99.8/0.2 (v/v) を加え、攪拌し静置後、上清 (淡桃色) を除いた。この操作を 5 回繰り返し行った。その後 50 mL のクロロホルム/エチレンジアミン=95/5 (v/v) を加え攪拌し静置後、上清 (濃赤色) を回収した。この操作を上清が淡桃色になるまで 4 回繰り返し行った。回収した上清をろ過し、不溶成分を除去した。ロータリーエバポレーターで減圧下、40 °C の温浴でクロロホルムを除去したのち、氷冷した 100 mL の蒸留水を加え、精製した PPED を遠心操作 (8,000 g、4 °C、5 分) にて沈澱させ回収した。この操作をさらに 2 回繰り返し行った。次いで 10 mL の蒸留水を加え懸濁後、凍結乾燥を行い、精製された PPED を得た。

2.2.2. PEG-ZnPP の合成 : PEG 化 PP (PEG-PP) の合成および亜鉛キレート化

アルミホイルで遮光したナス型フラスコに 5 mg の PPED を入れ、モレキュラーシーブにより乾燥脱水したクロロホルムを 20 mL 加え、マグネチックスターラーにより攪拌し溶解させた。esPEG-ZnPP (Fig. 2A) を合成するために、54 mg のエステルタイプ PEG (ME-020CS) を 3 回 (18 mg/回) に分けて 30 分間隔で PPED 溶液に加え、すり合わせガラス栓で密栓し、室温 (25 °C) で 4 時間反応させた。4 時間後、反応溶液に 0.5 mL のメタノールを加え、あらかじめクロロホルムで平衡化した 3 g の活性アルミナカラム [直径 2.5 cm、高さ 0.5 cm] に通し、溶出画分を回収した。回収した約 20 mL の画分に氷冷した蒸留水を加え、分液ロートにて分配後、クロロホルム層を回収した。再度分液ロートにクロロホルムを加え、この操作を 5 回繰り返し行った。回収後、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、40 °C

の温浴でクロロホルムを除去したのち、得られた生成物を 10 mL の蒸留水で溶解させ凍結乾燥し、esPEG-PP を得た。

次に亜鉛をキレートさせるため、100 mg の esPEG-PP をアルミホイルで遮光した 100 mL のナス型フラスコに入れ、20 mL のクロロホルムを加えてマグネチックスターラーにより攪拌して溶解させ、360 mg の酢酸亜鉛を加えた。すり合わせガラス栓で密栓し、室温 (25 °C) で 1 時間反応させた。紫外可視吸収スペクトル測定 (U-3900、Hitachi) により、409 nm の吸収極大が 422 nm にシフトすることを確認した後、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、40 °C の温浴でクロロホルムを除去し、得られた生成物に蒸留水を加え完全に溶解させた。10 kDa cut off フィルターを装着した限外ろ過 (Labscale Tangential Flow Filtration System、Millipore) を用い、過剰の酢酸亜鉛を除去後、凍結乾燥により esPEG-ZnPP を得た。

etPEG-ZnPP (Fig. 2B) 合成の際は、エステルタイプ PEG (ME-020CS) の代わりにエーテルタイプ PEG (ME-020AS) を用いて上記と同様の方法で合成を行った。

2.3. Bis-diaminoethyl zinc protoporphyrin (ZnPPED)および succinyl ZnPPEDs (mono- and bis-succinyl ZnPPED)の合成

ZnPPED (Fig. 7B) を合成するため、アルミホイルで遮光した 100 mL のナス型フラスコに 5 mg の PPED を入れ、モレキュラーシーブにより乾燥脱水したクロロホルムを 20 mL 加え、マグネチックスターラーにより攪拌し溶解させ、15 mg の酢酸亜鉛を加えた。すり合わせガラス栓で密栓し、室温 (25 °C) で 2 時間反応させた。紫外可視吸収スペクトルにより、409 nm の吸収極大が 422 nm にシフトすることを確認した後、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、40 °C の温浴でクロロホルムを除去し、得られた生成物に 20 mL の氷冷した蒸留水を加え、ZnPPED を遠心操作 (8,000 g、4 °C、5 分) にて沈殿させ回収した。この操作をさらに 5 回繰り返し行った。次いで 10 mL の蒸留水を加え懸濁後、凍結乾燥を行い、ZnPPED を得た。

Succinyl ZnPPEDs (Fig. 7C、D) を合成するため、アルミホイルで遮光した 100 mL のナス型フラスコに 5 mg の ZnPPED を入れ、モレキュラーシーブにより乾燥脱水した THF を 20 mL 加えた。マグネチックスターラーにより攪拌し溶解させ、そこに 7 mg の無水コハク酸を加え、すり合わせガラス栓で密栓し、室温 (25 °C) で 5 時間反応させた。

2.4. 動的光散乱測定 (dynamic light scattering; DLS)

PEG-ZnPP をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.4) に溶解させ、孔径 0.45 μm のシリン

ジフィルター (Advantec) を通したのち、大塚電子 (株) 製の DLS-7000HLs を使用し、光源 Laser (He-Ne) : 632.8nm、angle (°) : 90.0°、積算回数 : 200、温度は 25 °C で測定を行った。Maequardt 法にて解析を行い、粒子径を計測した。

2.5. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLC は日本分光株式会社 (JASCO) 製の HPLC ポンプ PU-2080、紫外可視吸光度検出器 UV-2075 (インテグレーターへの出力スケールは 1 V/1.0 AU)、およびインテグレーター 807-IT integrator (パラメーター設定 : ATTENUATION: 32 mV F. S.; CHART SPEED: 5 mm/min; MIN WIDTH: 0.10 min; MIN HEIGHT: 100 μ V; MIN AREA: 100 μ V; DRIFT: 0 μ V/min; DOUBLE WIDTH TIME: 0 min; NOISE LEVEL: 10 μ V) を使用し、カラムは Asahipak GF-310 HQ column (7.5 \times 300 mm) (Showa denko)、プレフィルターは Asahipak GF-1G 7B (7.5 \times 50 mm) (Showa denko) を使用した。分離溶媒は DMSO/メタノール=30/70 に、10 μ L/L になるようにトリフルオロ酢酸を添加したものを使用し、流速は 0.8 mL/min、溶出物は 415 nm における吸光度を利用し検出した。サンプル注入量は 20 μ L である。PEG-ZnPP や PEG 鎖切断物の定量には、各ピークの面積値を利用し、全ピークの面積値合計に対する各ピーク面積値の割合 (%) を算出した。

2.6. MALDI-TOF MS

PEG-ZnPP および PEG-ZnPP の PEG 鎖切断物の解析のため、MALDI-TOF MS による分子量測定を行った。MALDI-TOF MS は Bruker Daltonics 社製の Autoflex II TOF/TOF を使用した。

THF に溶解させた PEG-ZnPP (100 μ g/mL) 10 μ L とジスラノール (10 mg/mL) 10 μ L をよく混合し、その 1 μ L をターゲットプレート (MTP 384 target plate ground steel T F、Bruker Daltonics) 上に乗せ、室温で乾燥させて混合薄膜を形成させた。マススペクトルは測定用ソフトウェア flexControl (Bruker Daltonics) を用いて測定した (パラメーター設定 : method: reflector positive mode; shots: 200; frequency: 100; laser power: 10-30%)。マススペクトルの解析はデータ処理用ソフトウェア flexAnalysis (Bruker Daltonics) を用いた。

PEG 鎖切断物は、HPLC を用いて各ピーク分画を約 5 mL 回収し、ロータリーエバポレーターにて減圧下、40 °C の温浴でメタノールを除去し、10 mL の蒸留水を加えたのち凍結乾燥を行った。得られた粉末を 20 μ L の THF で溶解させ、THF に溶解させたジスラノール (10 mg/mL) 10 μ L とよく混合し、その 1 μ L をターゲットプレート (MTP 384 target plate

ground steel T F、Bruker Daltonics) 上に乗せ、室温で乾燥させて混合薄膜を形成させた。マススペクトルは測定用ソフトウェア flexControl を用いて測定した (パラメーター設定: method: reflector positive mode; shots: 200; frequency: 100; laser power: 10-30%)。マススペクトルの解析はデータ処理用ソフトウェア flexAnalysis を用いた。

2.7. PEG-ZnPP の安定性/PEG 鎖切断性試験 (in vitro) : 血漿、腫瘍組織ホモジネート、正常組織ホモジネートを用いた処理

血中での PEG-ZnPP の安定性を評価するために、esPEG-ZnPP または etPEG-ZnPP (最終濃度 1 mg/mL) を、10%動物血漿 (ヒト、ウサギ、マウス、ラット) を含む PBS (pH 7.4) に溶解させ 37°C にて一定時間静置し、HPLC 解析を行った。esPEG-ZnPP では、エステラーゼ/セリンプロテアーゼ阻害剤の diisopropyl fluorophosphate (DFP) (1 mM) を加えた場合も同様の処理を行った。DFP は PBS (pH 7.4) で希釈して用いた。一定時間静置後、10 µL 取り 1 mL の HPLC の分離溶媒に加え、遠心分離後 (10,000 g、10 分)、上清を回収し、HPLC 測定を行った。

腫瘍組織内での PEG-ZnPP の PEG 鎖切断性を評価するために、腫瘍ホモジネート (マウス肉腫 S-180、ヒト大腸がん) の上清を用いた。上清は、腫瘍組織をホモジネートしたのち、遠心分離後 (10,000 g、4°C、20 分) 回収したものをを用いた。esPEG-ZnPP または etPEG-ZnPP (最終濃度 1 mg/mL) を、腫瘍ホモジネート上清 (タンパク質として 2 または 5 mg/mL) を含むリン酸緩衝液 (pH 6.2) に溶解させ、37 °C にて一定時間静置し、HPLC 解析を行った。タンパク質濃度は bicinchoninic acid (BCA) 法を用いて測定した。S-180 ホモジネート上清 (タンパク質として 5 mg/mL) 処理時、esPEG-ZnPP では、プロテアーゼ阻害剤の *N*-tosylphenylalanylchloromethylketone (TPCK) (1 mM)、phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) (1 mM)、leupeptin (10 µg/mL)、または iodoacetamide (1 mM) を加えた場合も同様の処理を行った。TPCK はエタノール、PMSF は DMSO に溶解させて用いたが、エタノールや DMSO の最終濃度は 0.1%になるようにした。Leupeptin および iodoacetamide はリン酸緩衝液 (pH 6.2) に溶解させて用いた。ヒト大腸がんホモジネート上清 (タンパク質として 5 mg/mL) 処理時、esPEG-ZnPP では *N*-acetylcysteine (100 µM または 1 mM) を加えた場合も同様の処理を行った。*N*-acetylcysteine はリン酸緩衝液 (pH 6.2) に溶解させて用いた。一定時間静置後、10 µL 取り 1 mL の HPLC の分離溶媒に加え、遠心分離後 (10,000 g、10 分)、上清を回収し、HPLC 測定を行った。

正常組織内での esPEG-ZnPP の PEG 鎖切断性を評価するために、esPEG-ZnPP (最終濃

度 1 mg/mL) を、マウス正常組織ホモジネート (脾臓、腎臓、肝臓) の上清 (タンパク質として 2 mg/mL)、またはヒト正常大腸組織ホモジネートの上清 (タンパク質として 5 mg/mL) を含む PBS (pH 7.4) に溶解させ 37°C にて静置した。一定時間静置後、10 μ L 取り 1 mL の HPLC の分離溶媒に加え、遠心分離後 (10,000 g、10 分)、上清を回収し、HPLC 測定を行った。

2.8. 細胞培養

細胞培養に用いた器具は全てオートクレーブ、乾熱滅菌、あるいは電子線滅菌済みのものを使用し、溶液類の調製、希釈には滅菌した PBS (pH 7.4) を使用した。全ての操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。

ヒト慢性骨髄性白血病細胞 (K562 細胞) は、細胞培養ディッシュ ($\phi = 100$ mm、Corning) にて、非働化した 10% FBS および抗生物質 (ペニシリン G 100 unit/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL) を添加した RPMI1640 を用いて、5% CO₂/95% Air、37°C で静置培養した。3~4 日毎に、細胞を遠心操作 (800 rpm、5 分) で回収し、10 倍希釈になるように継代を行った。

ヒト食道扁平上皮がん細胞 (KYSE150 細胞、愛知県がんセンター研究所 組本博司博士より供給いただいた) およびヒト大腸がん細胞 (HT-29 細胞) は、細胞培養ディッシュ ($\phi = 100$ mm) にて、10% FBS および抗生物質 (ペニシリン G 100 unit/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL) を添加した DMEM を用いて、K562 細胞と同条件で培養した。3~4 日毎に、0.25% トリプシン処理により細胞をディッシュから剥離し、細胞を遠心操作 (800 rpm、5 分) で回収し、10 倍希釈になるように継代を行った。

2.9. 細胞内取り込み試験

K562 細胞を 12 ウェルプレート (ウェルの直径 $\phi = 22.1$ mm、Corning) に 5×10^5 cells/well になるように播種し、一晚培養後に、最終濃度が 20 μ M (ZnPP 当量) になるように esPEG-ZnPP、etPEG-ZnPP、free ZnPP、または ZnPPED を加えた。esPEG-ZnPP と etPEG-ZnPP は PBS (pH 7.4) に、free ZnPP と ZnPPED は DMSO に溶解させた。DMSO の最終濃度は 0.5% である。一定時間培養後、細胞を遠心操作 (800 rpm、5 分) で回収し、室温の PBS (pH 7.4) で 3 回洗浄した。その後、フローサイトメトリー (FACSCalibur、Nippon Becton Dickinson) で細胞内に取り込まれた ZnPP 由来の蛍光強度を測定した (励起波長 488 nm、蛍光波長 FL2 (585 nm \pm 21 nm))。

HT-29 細胞を上記と同様に播種し、一晚培養後に、最終濃度が 20 μM (ZnPP 当量) になるように esPEG-ZnPP、etPEG-ZnPP、free ZnPP、または ZnPPED を加えた。一定時間培養後、培地を除去し、細胞を室温の PBS (pH 7.4) で 2 回洗浄し、0.25% トリプシンで剥離させ、遠心操作 (800 rpm、5 分) で回収した。得られた細胞ペレットに 1 mL のメタノールを加え、超音波処理 (30 W, 30 s, Hielscher) で細胞を破碎した。遠心操作 (10,000 g、10 分) 後、上清を回収し、蛍光分光光度計 (FP-6600、JASCO) で ZnPP 由来の蛍光を測定した (励起波長 420 nm、蛍光波長 590 nm)。

2.10. 共焦点レーザー顕微鏡試験

フェノールレッド不含の DMEM を用いて、KYSE150 細胞をガラスボトムディッシュ ($\phi = 35$ mm、松浪硝子工業 (株)) に 2×10^5 cells の細胞密度で播種し、一晚培養後に、最終濃度が 30 μM (ZnPP 当量) になるように esPEG-ZnPP、etPEG-ZnPP、free ZnPP、または ZnPPED を加えた。一定時間培養後、共焦点レーザー顕微鏡 (Eclipse TE2000-E、Nikon) を用いて、細胞内の ZnPP 由来の蛍光像を観察した (励起波長 488 nm、蛍光波長 565–615 nm)。

2.11. 細胞毒性試験

K562 細胞または HT-29 細胞を 96 ウェル平底プレート (Corning) に 3000 cells/well になるように播種し、一晚培養後に、esPEG-ZnPP、etPEG-ZnPP、free ZnPP、または ZnPPED を加えた。72 時間後に MTT 法により細胞生存率を測定した。生細胞により生成されたホルマザン色素は DMSO で溶解させ、マイクロプレートリーダー (Infinite M200 PRO、Tecan) を用いて 570 nm の吸光度を測定した。

2.12. 担がんマウスの作製

すべての動物実験は、崇城大学動物実験委員会および崇城大学における動物実験に関する指針の下、行った。

S-180 細胞は ddY マウス (雄性) (九動より購入) の腹腔内に投与し、およそ 7~10 日毎に継代培養したものを使用した。S-180 担がんマウスは、生理食塩水にて 2×10^7 cells/mL に調整した S-180 細胞懸濁液を、ddY マウス (雄性、6 週齢) の背部の左右各 1 か所 (合計 2 か所) に、0.1 mL (2×10^6 cells) ずつ皮下注射することで作製した。

2.13. 抗腫瘍効果試験

腫瘍の直径がおよそ 4 ~ 6 mm になった S-180 担がんマウスに、15 mg/kg (ZnPP 当量) の各 PEG-ZnPP を尾静脈投与し、試験期間中の腫瘍体積および体重を測定した。腫瘍体積はノギスを用いて長径 mm (L)、短径 mm (W) を測定し、計算式 [腫瘍体積 (mm³) = W² × L/2] により算出した。

2.14. PEG-ZnPP の体内動態および PEG 鎖切断性試験 (in vivo)

腫瘍の直径がおよそ 10 mm になった S-180 担がんマウスに、40 mg/kg (ZnPP 当量) の各 PEG-ZnPP を静脈投与し、24 時間後にジエチルエーテル麻酔により安楽死させ、約 15 mL の生理食塩水で灌流後、各臓器を摘出した。各臓器を秤量し、臓器 100 mg あたりに、500 μL の HPLC の分離溶媒を加えた。氷中にてホモジナイザーで組織を破碎し、遠心分離後 (10,000 g, 10 分)、上清を回収し、HPLC 測定を行った。

3. 実験結果

3.1. esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP の合成

Figure 2 に esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP の合成スキームを示した。本研究では、まず PP にエチレンジアミンを結合させた PPED を合成した。その PPED に、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルで活性化されたエステルタイプ (es) PEG またはエーテルタイプ (et) PEG を結合させて esPEG-PP または etPEG-PP を合成し、最後に PP 部分に亜鉛をキレートさせて esPEG-ZnPP または etPEG-ZnPP を作製した。紫外可視吸収スペクトル測定により、PP の吸収極大が 409 nm から 422 nm にシフトしていたことから亜鉛がキレートされたことが確認できた (Fig. 3A、B)。HPLC 解析により、esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP 共に、それぞれ溶出時間 7.5 分に単独のピークが得られた (Fig. 3C、D)。また、ZnPP の 422 nm における吸光度に基づき作成した検量線から、PEG-ZnPP の ZnPP 含量は esPEG-ZnPP と etPEG-ZnPP 共に約 10% (wt/wt) であると算出された。PEG-ZnPP 中の ZnPP 含有量は、理論値で約 12% (wt/wt) であり、ほぼ理論値通り高い純度で両 PEG-ZnPP を合成できたと考えられ、本検討ではこれらを用いた。

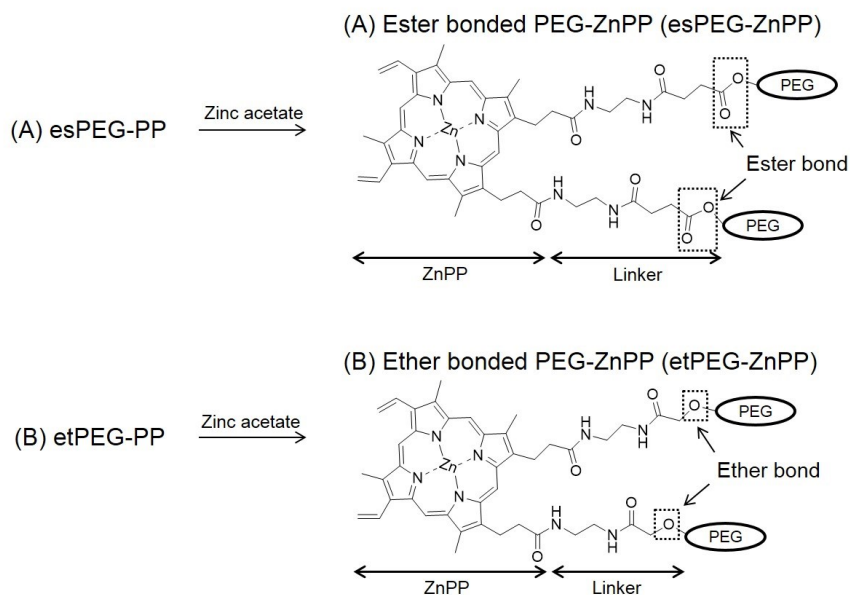
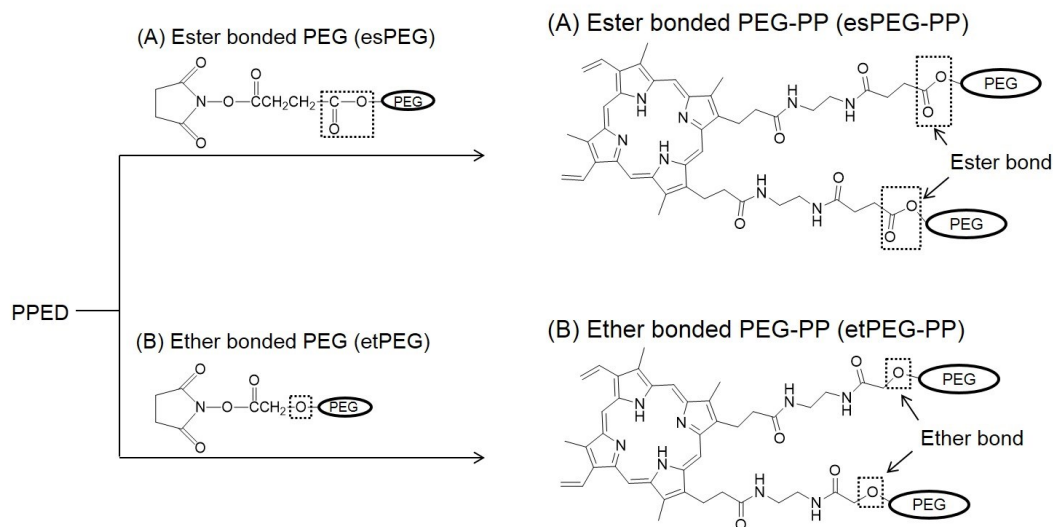
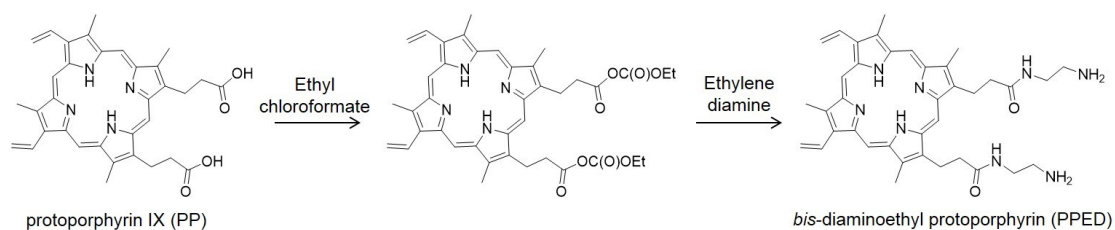


Figure 2. Synthesis of (A) esPEG-ZnPP and (B) etPEG-ZnPP.

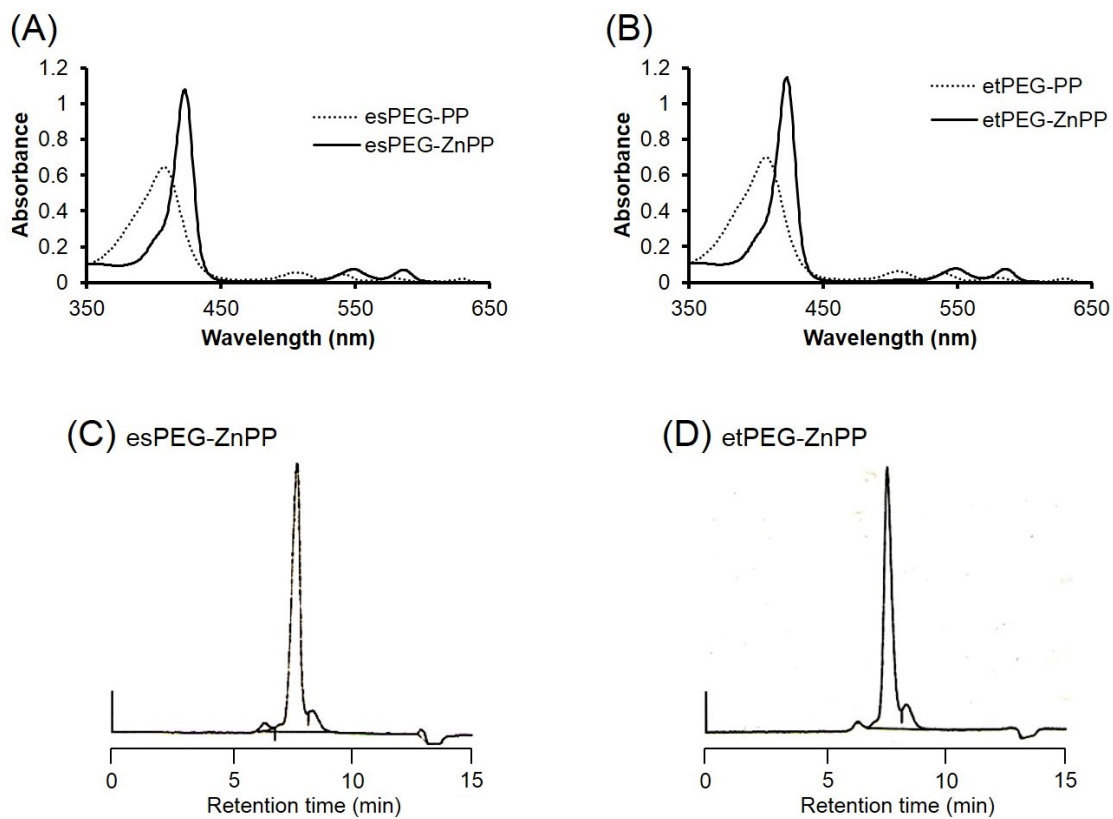


Figure 3. UV-VIS absorption spectra and HPLC analyses of esPEG-ZnPP and etPEG-ZnPP. UV-VIS absorption spectra of (A) esPEG-PP and esPEG-ZnPP or (B) etPEG-PP and etPEG-ZnPP. HPLC analysis of (C) esPEG-ZnPP or (D) etPEG-ZnPP.

3.2. PEG-ZnPP の PEG 鎖切断物の分離検出

本検討において PEG-ZnPP の PEG 鎖切断性は、PEG 鎖が切断脱離した生成物（PEG 鎖切断物）を HPLC で分離検出することで行った。PEG-ZnPP (Fig. 4A-i、peak 1) を動物血漿あるいは腫瘍ホモジネート上清とインキュベーションすると、溶出時間 8.3 分、11.2 分、11.8 分、12.8 分の 4 つのピークが検出された (Fig. 4A-ii、peak 2-5)。

HPLC 測定法の正確性や再現性の検討は、S-180 ホモジネート上清（タンパク質として 5 mg/mL）を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.2) 中で 72 時間インキュベーションした esPEG-ZnPP を用いて行った。各ピーク溶出時間の相対標準偏差 (relative standard deviations、%RSD) は 0.1%未満 (Table 1)、各ピーク面積値の %RSD は 3.7%未満であった (Table 2)。さらに全ピーク (peak 1 - 5) の面積値合計は、インキュベーション前とインキュベーション後 (72 時間後) で有意な差は見られなかった (Table 3)。これらの結果から、この HPLC による解析方法の再現性や信頼性に大きな問題はないと考えられる。

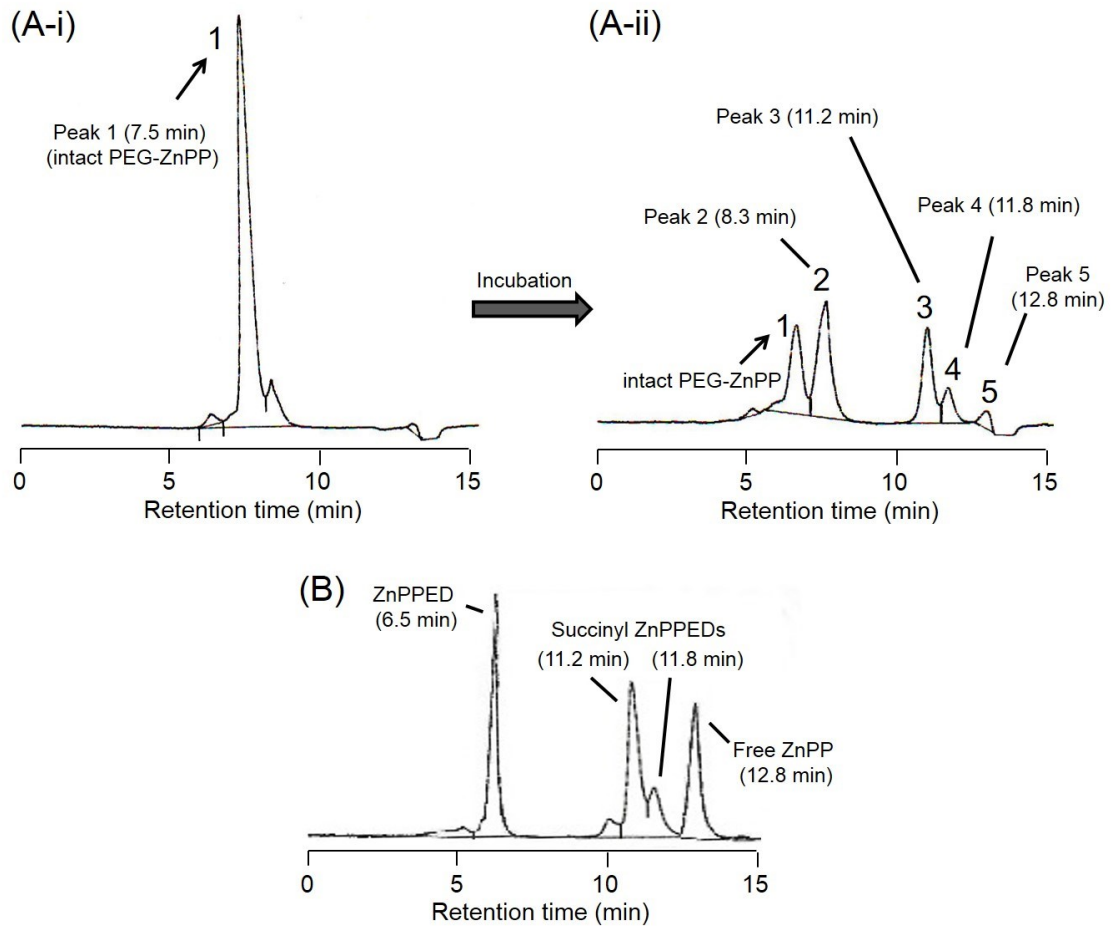


Figure 4. Analyses of PEG-ZnPP by HPLC after treatment with blood plasma or with supernatant of tumor homogenates. (A) The peak of intact PEG-ZnPP, the original sample (A-i), and peaks of the cleavage products after incubation of esPEG-ZnPP with 10% mouse blood plasma for 6 h (A-ii). Similar results were obtained for cleavage products of esPEG-ZnPP incubated with supernatant of mouse and human tumor homogenates. (B) Peaks of standards: free ZnPP, ZnPPED, and succinyl ZnPPEDs (*mono-* and *bis*-succinyl ZnPPED, synthesized), measured by using HPLC. The different concentrations of the compounds were analyzed by HPLC.

Table 1. Average, SD, and %RSD for retention time of each peak at 72 h after incubation of esPEG-ZnPP with supernatant of S-180 tumor homogenates (final conc.: 5 mg/mL protein).

	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5
Average	7.536	8.325	11.175	11.761	12.789
SD	0.005196	0.008	0.008	0.005196	0.005196
%RSD	0.068951	0.096096	0.071588	0.044181	0.04063

Table 2. Average, SD, and %RSD for peak area of each peak at 72 h after incubation of esPEG-ZnPP with supernatant of S-180 tumor homogenates (final conc.: 5 mg/mL protein).

	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5
Average	34842.67	86364.67	51290.33	78296.33	55772.67
SD	1284.869	2983.864	735.5986	641.1375	1979.071
%RSD	3.687632	3.454959	1.434186	0.81886	3.54846

Table 3. Average, SD, and %RSD for total of peak area of all peaks at 72 h after incubation of esPEG-ZnPP with supernatant of S-180 tumor homogenates (final conc.: 5 mg/mL protein).

	0 h	72 h
Average	309975.7	306566.7
SD	3929.408	3260.975
%RSD	1.267651	1.063708

3.3. 各 PEG 鎖切断物の構造推定

各ピークはそれぞれ分離回収し、MALDI-TOFMS を用いて分子量の測定や、合成した候補化合物の HPLC 解析を行うことで、各 PEG 鎖切断物の構造を推定した。

3.3.1. peak 2 の解析

MALDI-TOFMS による分子量測定により、元の完全な PEG-ZnPP (peak 1) は平均分子量約 5,000 であるが (Fig. 5A)、peak 2 は約 3,000 の平均分子量を持っていることが分かった (Fig. 5B)。この peak 2 は、esPEG-ZnPP のみからしか生成されなかった (cf. Fig. 8)。これらのことから、peak 2 はエステル結合が切断され、平均分子量約 2,000 の PEG 鎖が 1 本脱離した 1 本鎖 esPEG-ZnPP であると推定された。また DLS を用いて、PBS (pH 7.4) 中での

1 本鎖 esPEG-ZnPP の平均粒子径を測定した結果、平均粒子径約 170 nm の単一のピークが検出され (Fig. 6B)、元の完全な 2 本鎖の PEG-ZnPP (平均粒子径約 260 nm、Fig. 6A) と同様に高分子として挙動できることが示唆された。

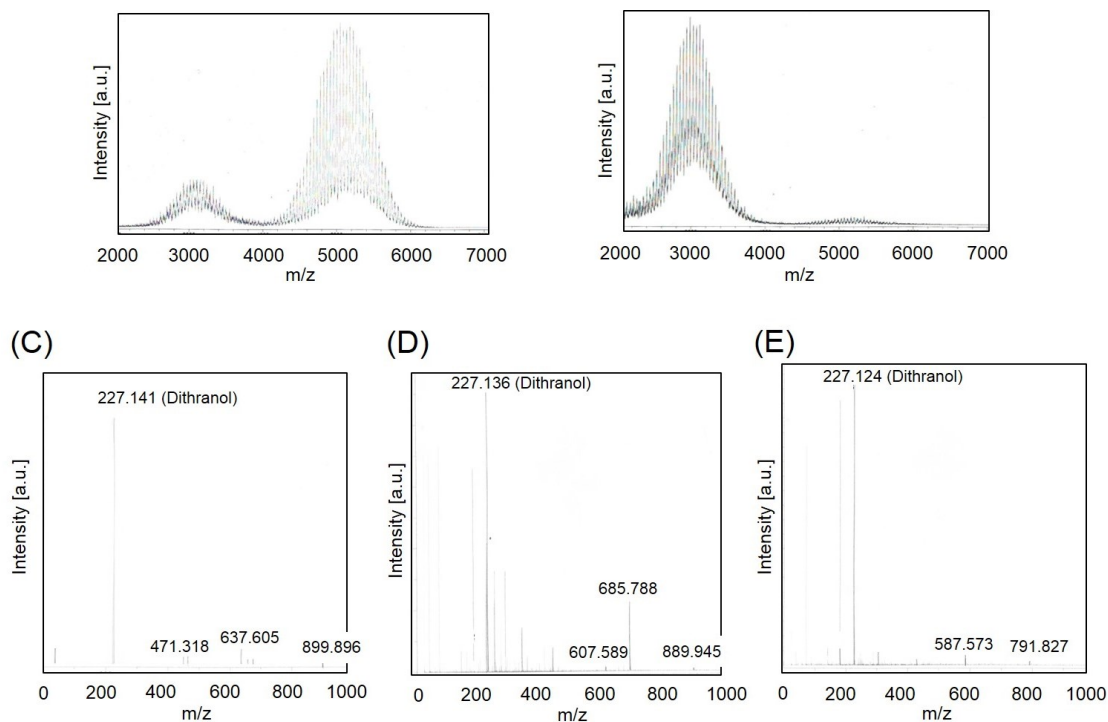


Figure 5. MALDI-TOF MS analyses of intact esPEG-ZnPP and cleavage products. MALDI-TOF MS analyses were performed with dithranol matrix. Mass spectra of (A) intact esPEG-ZnPP (peak 1), (B) peak 2, (C) peak 3, (D) peak 4, and (E) peak 5.

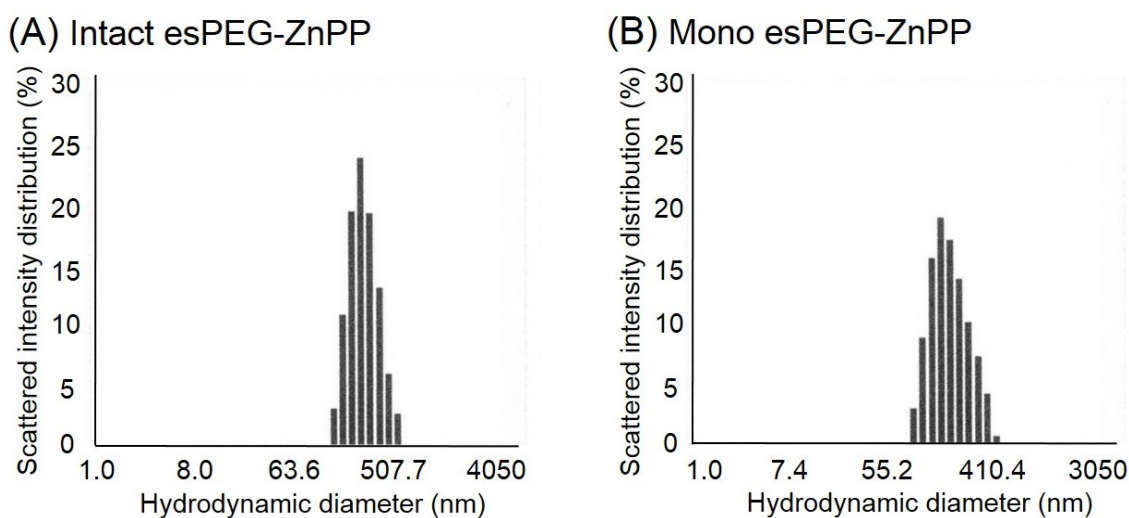
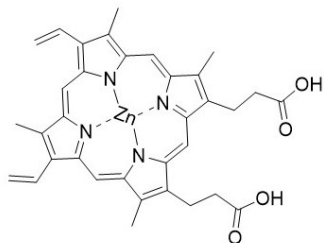


Figure 6. Hydrodynamic diameter of (A) intact esPEG-ZnPP and (B) mono esPEG-ZnPP were measured by DLS in PBS (pH 7.4).

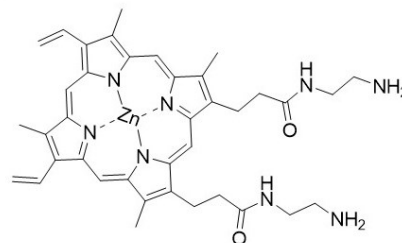
3.3.2. peak 3、4、5の解析

MALDI-TOFMS による分子量測定では、PEG 鎖結合部のエステル結合やアミド結合が切断された PEG 鎖切断物に相当する分子量ピークは検出されなかったが、分子量 1,000 以上のピークも検出されなかった (Fig. 5C、D、E)。続いて、PEG 鎖切断物の候補化合物 (Fig. 7) を合成し、HPLC 解析にて溶出時間の比較検討を行った。合成した候補化合物の溶出時間は、free ZnPP (Fig. 7A) が 12.8 分、ZnPPED (Fig. 7B) が 6.5 分、succinyl ZnPPEDs (Fig. 7C、D) が 11.2 分と 11.8 分であった。これらを Figure 4A-ii の各ピークと比較すると、peak 3、4 は、succinyl ZnPPEDs と一致し、peak 5 は free ZnPP と一致した。以上のことから、peak 3、4、5 は PEG 鎖と ZnPP 間の化学結合が切断され、PEG 鎖が 2 本とも完全に脱離した生成物であると考えられた。

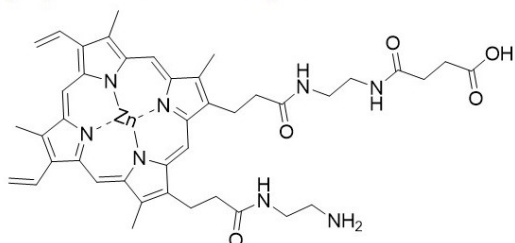
(A) Free ZnPP



(B) ZnPPED



(C) *mono*-succinyl ZnPPED



(D) *bis*-succinyl ZnPPED

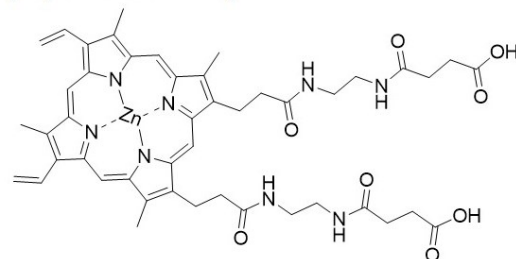


Figure 7. Structures of (A) free ZnPP, (B) ZnPPED, (C) *mono*-succinyl ZnPPED, and (D) *bis*-succinyl ZnPPED.

3.4. 血漿中での esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP の安定性

PEG 化抗がん剤において、投与後 EPR 効果による高い腫瘍集積性を得るには、血中で安定であり高分子として挙動できることが重要である。そこで血中での PEG-ZnPP の安定性について検討するために、esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP をそれぞれ PBS (pH 7.4) に溶解させ、種々の動物血漿 (ヒト、ウサギ、ラットおよびマウス) を 10% になるように加え、37°C でインキュベーションし、経時的に HPLC による解析を行った。PEG-ZnPP において、元の 2 本鎖 PEG-ZnPP (peak 1) と 1 本鎖 PEG-ZnPP (peak 2) は PEG 鎖結合体であり、高分子として挙動できることが重要であるため、本研究では安定性の評価指標として、インキュベーション後の peak 1 と peak 2 の変化を用いた。Figure 8A に esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP の peak 1 の変化を示した。まず、esPEG-ZnPP においては、インキュベーション時間経過と共に peak 1 の減少が見られ、その減少はマウスやラットで速く、ヒトやウサギでは遅かった。一方、etPEG-ZnPP ではインキュベーション後も peak 1 の変化が見られず、元の 2 本鎖 PEG-ZnPP のままであった。次に Figure 8B に示した esPEG-ZnPP の peak 2 の変化を見ると、インキュベーション開始後 peak 2 が生成されたが、後に減少した。またマウスやラットと比べ、ヒトやウサギでは peak 2 の減少が遅く、24 時間後の時点では約 8 倍量の peak 2 が残り、48 時間後の時点では 5~6 倍量の peak 2 が残っていた。

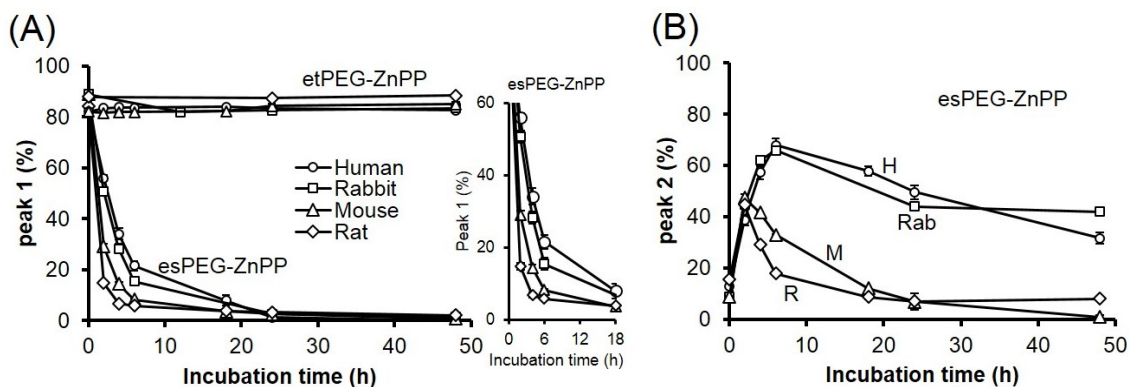


Figure 8. Stability of esPEG-ZnPP and etPEG-ZnPP in 10% blood plasma from different species at pH 7.4, 37 °C, analyzed by HPLC. (A) Changes in peak 1 for esPEG-ZnPP and etPEG-ZnPP, and (B) changes in peak 2 for esPEG-ZnPP, after incubation in 10% blood plasma of human, rabbit, mouse, or rat blood plasma. The inset of (A) shows changes in peak 1 for esPEG-ZnPP with magnified scale. Symbols in (B) are same as those in (A). Values are means \pm S.E. (n = 3). H, Human; Rab, Rabbit; M, Mouse; R, Rat.

3.5. 血漿中での esPEG-ZnPP の安定性に対するエステラーゼ阻害剤の効果

種々の動物血漿を用いて、血中における PEG-ZnPP の安定性を検討したところ、esPEG-ZnPP では PEG 鎖が切断されたが、マウスやラットと比較すると、ヒトやウサギの血漿中では比較的安定で、血中での安定性には種差が見られた (Fig. 8)。この血中での PEG 鎖の切断脱離には、血中に含まれる加水分解酵素の関与が考えられたが、例えば血漿中のエステラーゼ活性は種によって異なることが報告されている⁽⁴¹⁾。そこで血中での安定性に関与する因子および種差の原因を検討するため、エステラーゼ/セリンプロテアーゼ阻害剤である DFP 存在下、ヒト血漿およびマウス血漿中での esPEG-ZnPP の安定性を比較した。ヒト血漿中での peak 1 の減少および peak 2 の生成は、DFP 存在下でも大きな変化は見られなかったが (Fig. 9A、B)、peak 2 の減少に関しては、DFP 存在下で抑制効果が見られた (Fig. 9B)。一方マウス血漿の場合は、DFP 存在下で peak 1 および peak 2 の減少は 48 時間後まで抑制され、ヒト血漿と比較し DFP の効果が大きかった。したがって、esPEG-ZnPP の PEG 鎖切断には血漿エステラーゼが関与していることが示唆され、種差の原因にもなっていると考えられた。また DFP はセリンプロテアーゼ阻害剤でもあり、セリンプロテアーゼの関与も考えられる。

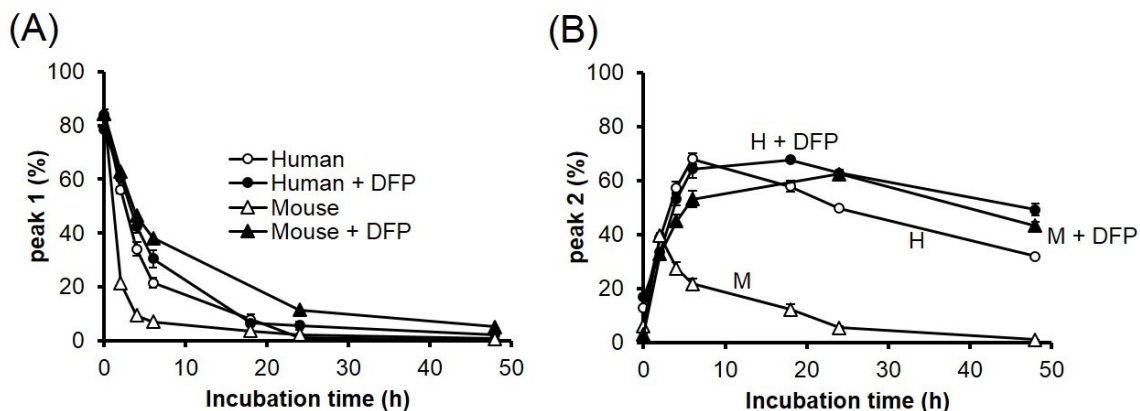


Figure 9. Effect of DFP (1 mM) on stability of esPEG-ZnPP in 10% blood plasma from different species at pH 7.4, 37 °C, analyzed by using HPLC. (A) Changes in peak 1 and (B) peak 2 for esPEG-ZnPP after incubation in 10% human or mouse blood plasma with (solid) or without (open) 1mM DFP. Symbols in (B) are same as those in (A). Values are means \pm S.E. (n = 3). H, Human; M, Mouse.

3.6. マウス腫瘍ホモジネート上清中での esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP の PEG 鎖切断性

PEG 化された高分子化抗がん剤では、EPR 効果によって選択的に腫瘍に集積し、長時間滞留できるものの、細胞内への取り込みが抑えられている。そのため、十分な細胞内取り込みや抗腫瘍効果を得るためには、腫瘍に集積した後に PEG 鎖が切断脱離することが重要である。そこで PEG-ZnPP の腫瘍部での PEG 鎖切断性を評価するため、腫瘍ホモジネートを用いて、PEG 鎖が完全に外れた peak 3、4、5 が生成されるかどうか検討した。腫瘍環境では、解糖系の亢進などにより酸性 pH (pH 7 以下) になっていることが知られている^(42,43)。本検討では、esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP をそれぞれ 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.2) に溶解させ、S-180 腫瘍ホモジネート上清をタンパク質濃度として 2 または 5 mg/mL になるように加えて、37 °C でインキュベーションした。S-180 腫瘍ホモジネート上清未添加の場合は、72 時間後まで esPEG-ZnPP から peak 3 および 4 の生成は見られず、peak 5 の生成も 5% のみであったが、上清添加時は上清量および時間依存的に peak 3、4、5 の生成が増加した (Fig. 10A、B、C)。一方、etPEG-ZnPP では S-180 腫瘍ホモジネート上清 (タンパク質として 5 mg/mL) 添加時においても、いずれのピークの生成も見られなかった。

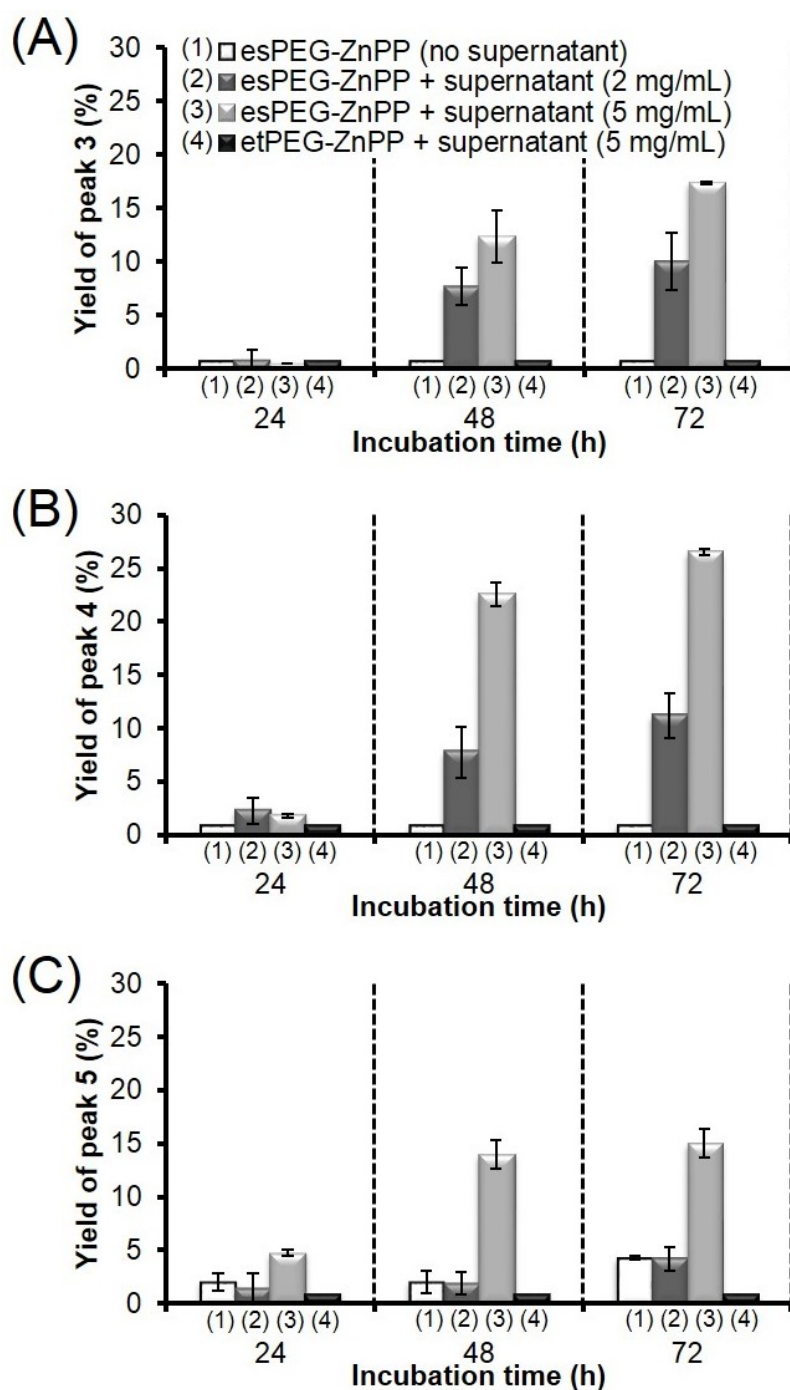


Figure 10. Cleavability of PEG chains from esPEG-ZnPP and etPEG-ZnPP after incubation with supernatant of mouse S-180 tumor homogenates (final conc.: 2 or 5 mg/ mL protein) at pH 6.2, 37 °C, analyzed by HPLC. Yield of (A) peak 3, (B) peak 4, and (C) peak 5 after incubation of esPEG-ZnPP or etPEG-ZnPP with supernatant of tumor homogenates. Notations of bars in (A) apply to (B) and (C) as well. Values are means \pm S.E. (n = 3).

3.7. マウス腫瘍ホモジネート上清中での esPEG-ZnPP の PEG 鎖切断性に対するプロテアーゼ阻害剤の効果

腫瘍ホモジネート上清を添加することで、esPEG-ZnPP では PEG 鎖切断物が生成されることが分かった (Fig. 10)。腫瘍組織では、転移や浸潤のために様々なプロテアーゼが高発現していることが知られており⁽⁴⁴⁾、esPEG-ZnPP の PEG 鎖切断脱離に関与する因子として腫瘍プロテアーゼに着目した。本検討では、セリンプロテアーゼ阻害剤やシステインプロテアーゼ阻害剤が esPEG-ZnPP の PEG 鎖切断性に及ぼす影響を検討した。その結果、PMSF は 72 時間を通して peak 3 の生成をほとんど抑制することが分かった (Fig. 11A)。その他の阻害剤も peak 3 の生成を抑制したが、その効果は PMSF より弱く、TPCK、iodoacetamide、leupeptin の順であった。また、各種プロテアーゼ阻害剤によって peak 4 の生成も抑制されたが、その抑制効果は peak 3 に対する抑制効果より弱かった (Fig. 11B)。これらの結果より、セリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼが peak 3、4 の産生に関与していると考えられた。一方、各種プロテアーゼ阻害剤によって peak 5 の生成は促進されており (Fig. 11C)、他のプロテアーゼなどの酵素の関与が考えられた。

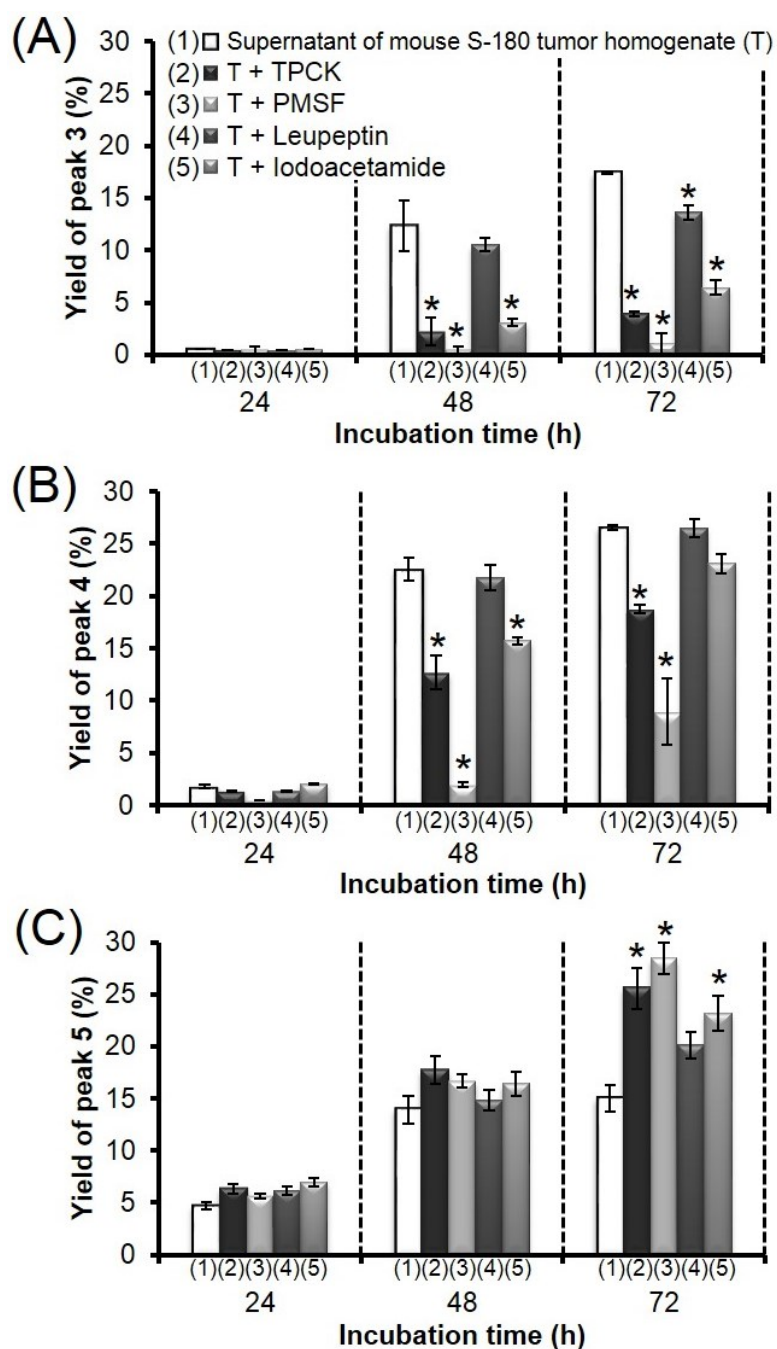


Figure 11. Effect of protease inhibitors on depegylation from esPEG-ZnPP incubated with supernatant of mouse S-180 tumor homogenates (final conc.: 5 mg/mL protein) at pH 6.2, 37 °C, analyzed by HPLC. Yield of (A) peak 3, (B) peak 4, and (C) peak 5 after incubation of esPEG-ZnPP with supernatant of tumor homogenate in the presence or absence of the indicated protease inhibitors. Notations of bars in (A) apply to (B) and (C) as well. Values are means \pm S.E. (n = 3). * p < 0.05, a significant difference from tumor homogenate (T), according to Student's t test.

3.8. マウス正常組織ホモジネート上清中での esPEG-ZnPP の PEG 鎖切断性

S-180 腫瘍の場合と同様に、マウス正常組織を用いて esPEG-ZnPP の PEG 鎖切断性を検討した。本検討では、マウス正常組織（脾臓、腎臓、肝臓）ホモジネート上清（タンパク質として 2 mg/mL）を含む PBS（pH 7.4）中で esPEG-ZnPP をインキュベーションした。PEG 鎖が完全に外れた生成物の量を比較するため、peak 3、4、5 の生成量合計を比較した。正常組織ホモジネート上清添加時も PEG 鎖切断物は生成され、その生成量合計は肝臓で最も多く、続いて腫瘍、腎臓、脾臓の順であった（Fig. 12）。肝臓を除く正常組織と比較し、腫瘍組織でより多くの PEG 鎖切断物が生成されることが分かった。

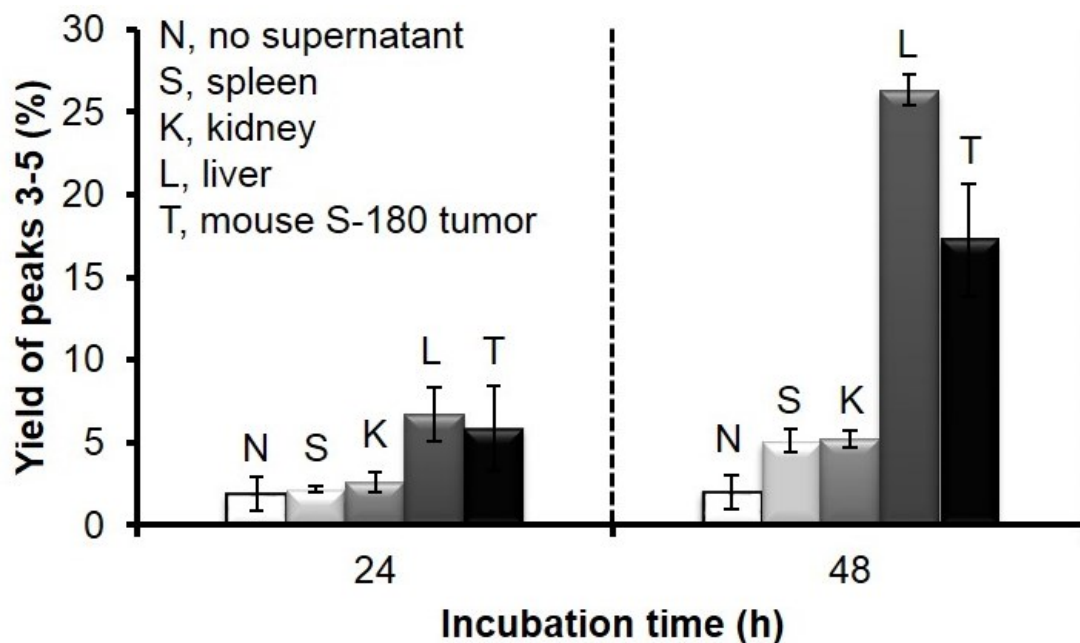


Figure 12. Cleavability of the PEG chains from esPEG-ZnPP after incubation with supernatants of homogenates of different mouse tissues, analyzed by HPLC. Yield of cleavage products (total of peaks 3–5 combined) after incubation of esPEG-ZnPP with supernatants of tissue homogenates of mouse spleen, kidney, and liver (final conc.: 2 mg/mL protein) at pH 7.4 or with supernatant of mouse tumor homogenates at pH 6.2, 37 °C. Values are means \pm S.E. (n = 3). * p < 0.05, a significant difference from no supernatant, according to Student's t test.

3.9. ヒト大腸がんおよびヒト正常大腸組織ホモジネート上清中での esPEG-ZnPP の PEG 鎖切断性

マウス組織の場合と同様に、ヒトの大腸がんおよび正常大腸を用いて esPEG-ZnPP の PEG 鎖切断性を検討した。ヒト大腸がんホモジネート上清（タンパク質として 5 mg/mL）を含む 50 mM リン酸緩衝液（pH 6.2）中で、esPEG-ZnPP をインキュベーションしたところ、マウス腫瘍 S-180 の場合と同様に、PEG 鎖切断物（peak 3、4、5 の合計）の生成が見られた（Fig. 13A）。

Figure 11 より esPEG-ZnPP の PEG 鎖切断にセリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼが関与していることが示唆されたが、システインプロテアーゼはメルカプトエタノールやジチオスレイトールなどの還元剤により活性化されることが知られている。そこで、ヒト大腸がんホモジネート上清を含む 50 mM リン酸緩衝液（pH 6.2）に、*N*-acetylcysteine を添加して PEG 鎖切断性を検討した結果、*N*-acetylcysteine 未添加時に比べ PEG 鎖切断物（peak 3、4、5 の合計）の生成が促進された（Fig. 13B）。

また、ヒト正常大腸のホモジネート上清（タンパク質として 5 mg/mL）を含む PBS（pH 7.4）中で esPEG-ZnPP をインキュベーションしたところ、PEG 鎖切断物（peak 3、4、5 の合計）の生成はヒト大腸がんの場合より少なかった（Fig. 13C）。これらの結果より、ヒトの腫瘍においても esPEG-ZnPP から PEG 鎖切断物は生成され、その生成量は正常組織と比較し多いことが分かった。

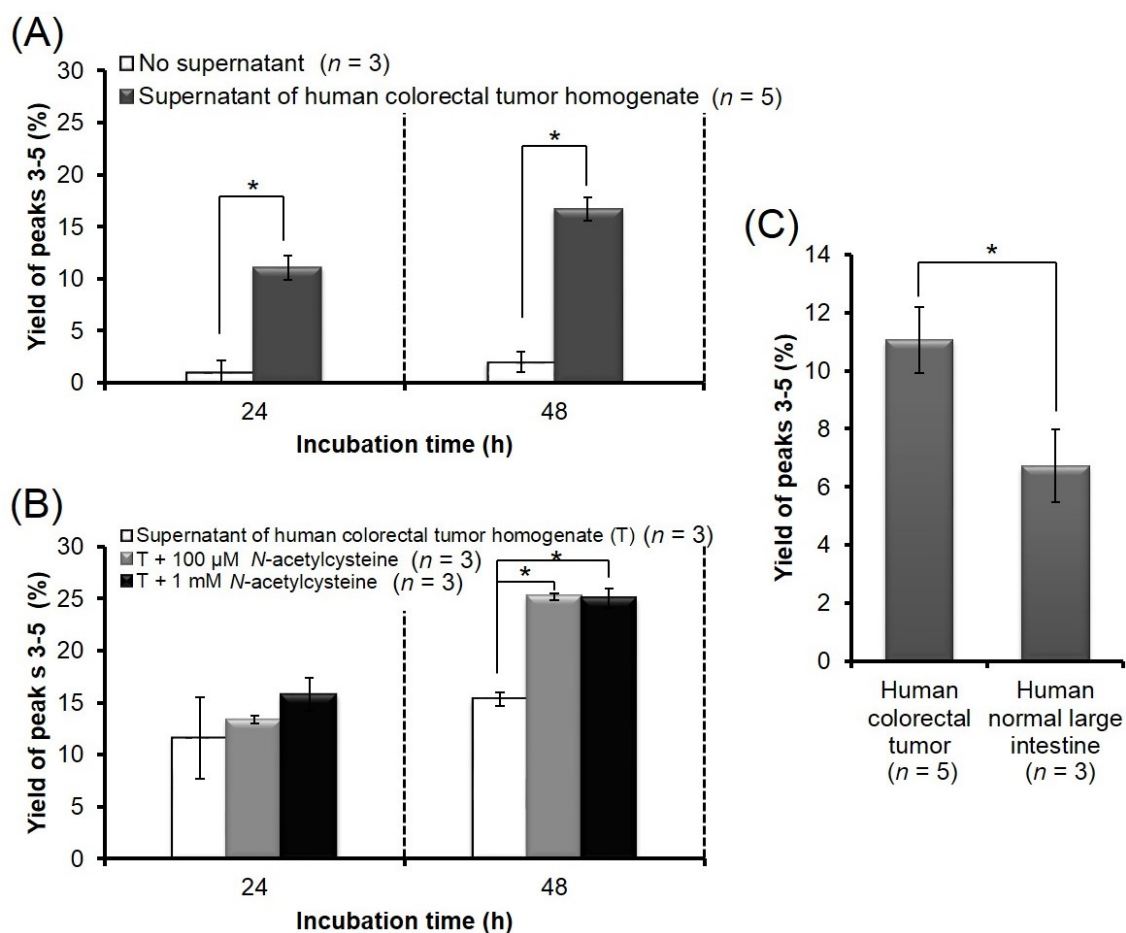


Figure 13. Cleavability of PEG chains from esPEG-ZnPP after incubation with supernatants of human colorectal tumor homogenates at pH 6.2 or human normal large intestine homogenates (final conc.: 5 mg/mL protein) at pH 7.4, 37 °C, analyzed by HPLC. (A) Yield of cleavage products (total of peaks 3–5 combined) after incubation of esPEG-ZnPP with supernatants of tumor homogenates. (B) Yield of cleavage products (total of peaks 3–5 combined) similar to (A) in the presence or absence of activator of thiol proteases, *N*-acetylcysteine. (C) Similar to (A), tumor tissue vs normal large intestine at 24 h after incubation. Values are means \pm S.E. (n = 3–5). * $p < 0.05$, a significant difference according to Student's *t* test.

3.10. esPEG-ZnPP、etPEG-ZnPP、PEG 鎖切断物の細胞内取り込み

PEG 化薬剤の細胞内取り込みは、PEG 鎖の脱離によって改善されることが知られている⁽¹¹⁾。PEG-ZnPP において PEG 鎖の脱離による細胞内取り込みが改善されるかどうか検討した。本検討では、PEG 鎖切断物のモデル化合物として free ZnPP (Fig. 7A) と ZnPPED (Fig. 7B) を用いて、esPEG-ZnPP や etPEG-ZnPP と細胞内取り込みの比較を行った。

各 ZnPP 誘導体で K562 細胞を処理したときの細胞内取り込みは、時間依存的に増加しており、esPEG-ZnPP や etPEG-ZnPP よりも PEG 鎖切断物 (free ZnPP および ZnPPED) の方が速いことが分かった (Fig. 14A)。

HT-29 細胞への取り込みについても同様の結果が得られた (Fig. 14B)。同濃度 (ZnPP 当量) の各 ZnPP 誘導体は、メタノール中ではほぼ同様の蛍光スペクトルおよび蛍光強度を示したため (data not shown)、メタノールで抽出した各 ZnPP 誘導体の蛍光強度を比較することにより細胞内取り込み量を比較できたと考えられる。

また、KYSE150 細胞を PEG-ZnPP や PEG 鎖切断物で 2.5 時間処理後、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、esPEG-ZnPP や etPEG-ZnPP よりも PEG 鎖切断物 (free ZnPP および ZnPPED) の取り込み量が多いことが確かめられた (Fig. 14C)。

さらに重要な知見は、PEG 鎖切断性を有する esPEG-ZnPP が、etPEG-ZnPP よりも細胞内取り込みが速いことであり、K562 細胞では 8 時間後になると、esPEG-ZnPP の取り込み量の方が etPEG-ZnPP よりも多くなり、有意差が見られた (Fig. 14A)。HT-29 細胞では 16 時間以降になると、esPEG-ZnPP の取り込み量の方が多くなり、有意差が見られた (Fig. 14B)。

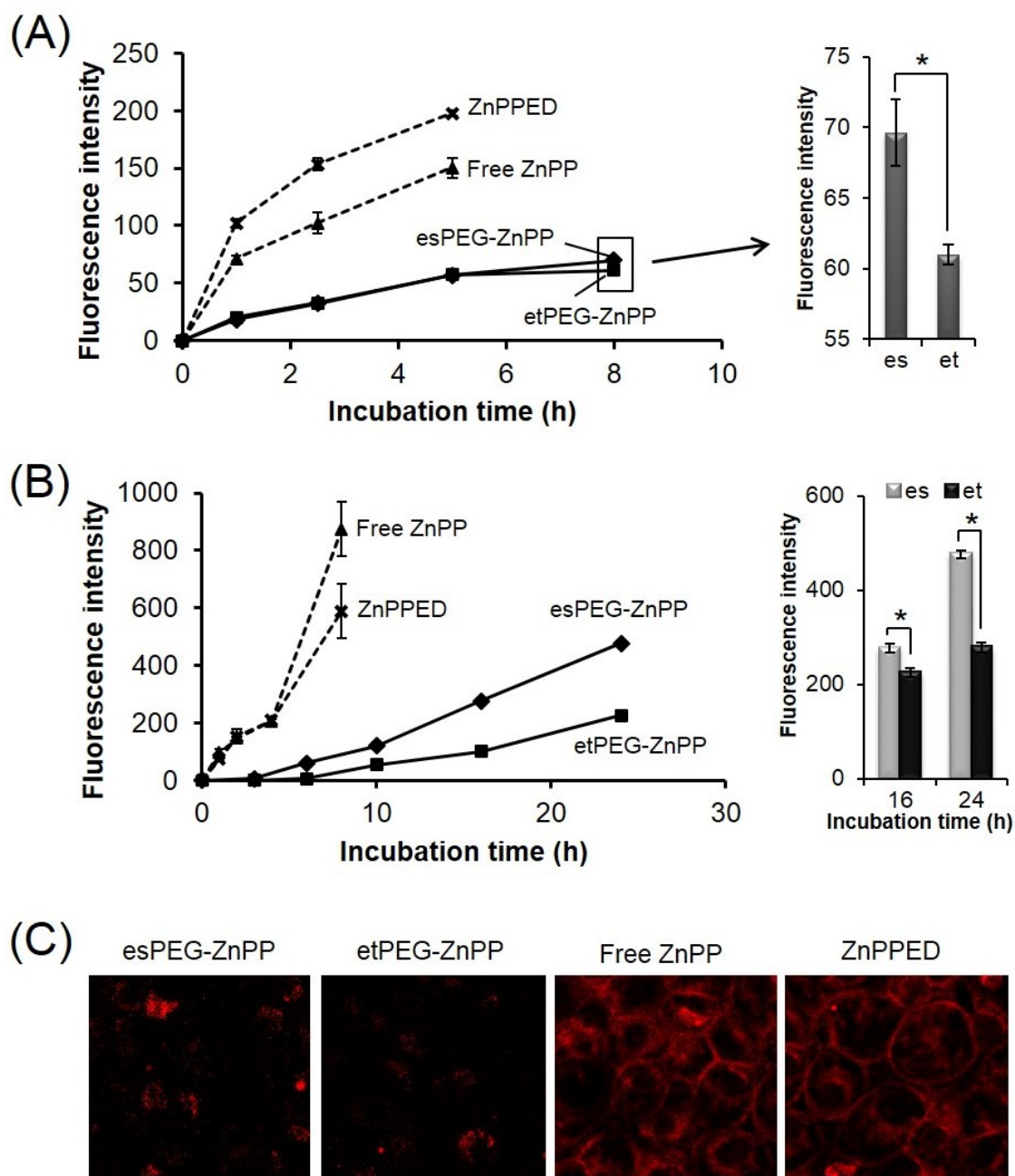


Figure 14. Intracellular uptake of esPEG-ZnPP, etPEG-ZnPP, free ZnPP, and ZnPPED. (A, B) Intracellular uptake (A) in K562 cells measured by FACS analyses and (B) in HT-29 cells quantified by fluorescence intensity. The insets show comparison of intracellular uptake of esPEG-ZnPP and etPEG-ZnPP (A) after 8 h in K562 cells, (B) after 16 h and 24 h in HT-29 cells. Values are means \pm S.E. ($n = 3$). $*p < 0.05$, a significant difference according to Student's t test. (C) Confocal fluorescence microscopic analysis of KYSE150 cells treated with esPEG-ZnPP, etPEG-ZnPP, free ZnPP, or ZnPPED after 2.5 h incubation.

3.11. esPEG-ZnPP、etPEG-ZnPP、PEG 鎖切断物の細胞毒性

細胞内取り込みの比較検討に続き、細胞毒性の比較検討を行うため、K562 細胞 (Fig. 15A) と HT-29 細胞 (Fig. 15B) を各 ZnPP 誘導体で 72 時間処理した。K562 細胞における IC_{50} はそれぞれ、free ZnPP が $0.97 \mu\text{M}$ 、ZnPPED が $0.85 \mu\text{M}$ 、esPEG-ZnPP が $2.88 \mu\text{M}$ 、etPEG-ZnPP が $39.1 \mu\text{M}$ であった (Fig. 15A、Table 4)。よって、細胞取り込みの結果と同様に、PEG 鎖切断物が PEG-ZnPP より高い細胞毒性を示すと共に、PEG 鎖切断性を有する esPEG-ZnPP が、PEG 鎖の切断が見られない etPEG-ZnPP より高い細胞毒性を示した。HT-29 細胞においても同様の結果が得られ、 IC_{50} はそれぞれ free ZnPP が $4.16 \mu\text{M}$ 、ZnPPED が $2.82 \mu\text{M}$ 、esPEG-ZnPP が $27.7 \mu\text{M}$ 、etPEG-ZnPP が $>100 \mu\text{M}$ であった (Fig. 15B、Table 5)。

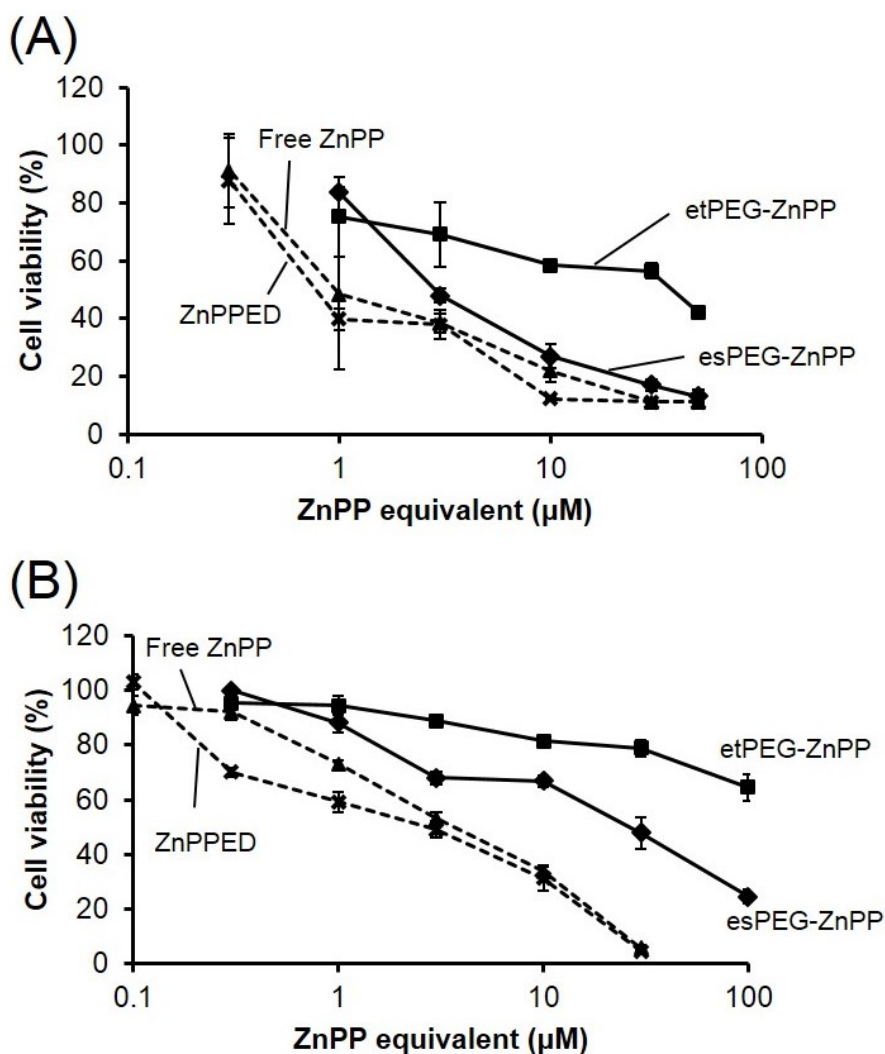


Figure 15. Cytotoxicity of esPEG-ZnPP, etPEG-ZnPP, free ZnPP, and ZnPPED to (A) K562 cells and (B) HT-29 cells after 72 h treatment, analyzed by MTT assay. Values are means \pm S.E.

Table 4. IC₅₀, IC₃₀, and IC₁₀ of esPEG-ZnPP, etPEG-ZnPP, free ZnPP, and ZnPPED against K562 cells.

Drugs	IC ₅₀ (μM)	IC ₃₀ (μM)	IC ₁₀ (μM)
esPEG-ZnPP	2.88	1.76	0.61
etPEG-ZnPP	39.1	2.71	0.41
Free ZnPP	0.97	0.65	0.32
ZnPPED	0.85	0.56	0.24

Data are calculated from the results in Figure 15A.

Table 5. IC₅₀, IC₃₀, and IC₁₀ of esPEG-ZnPP, etPEG-ZnPP, free ZnPP, and ZnPPED against HT-29 cells.

Drugs	IC ₅₀ (μM)	IC ₃₀ (μM)	IC ₁₀ (μM)
esPEG-ZnPP	27.7	2.77	1.03
etPEG-ZnPP	>100	73.4	2.61
Free ZnPP	4.16	1.64	0.14
ZnPPED	2.82	0.65	0.15

Data are calculated from the results in Figure 15B.

3.12. esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP の in vivo 抗腫瘍効果

次に、S-180 担がんマウスを用いて esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP の in vivo 抗腫瘍効果を比較検討した。Figure 16 に示すように 15 mg/kg (ZnPP 当量) の esPEG-ZnPP または etPEG-ZnPP をそれぞれ 3 回尾静脈投与し、試験期間中、腫瘍サイズや体重を測定した。その結果、esPEG-ZnPP では etPEG-ZnPP よりも腫瘍の増殖抑制効果が高く、有意な差が見られた (Fig.16A)。そして、esPEG-ZnPP では etPEG-ZnPP よりも生存期間が延長された (Fig. 16B)。また、esPEG-ZnPP や etPEG-ZnPP の投与によって体重減少などの明らかな副作用は見られなかった (Fig. 16C)。

本検討では、esPEG-ZnPP と etPEG-ZnPP の比較検討が目的であること、また難水溶性の free ZnPP を投与するには、例えば DMSO などを利用する必要があることから、in vivo 抗腫瘍効果検討に free ZnPP は用いなかった。また、free ZnPP は投与するとほとんどが肝臓や脾臓に集積し、腫瘍集積は非常に少ないことが分かっている⁽⁴⁵⁾。

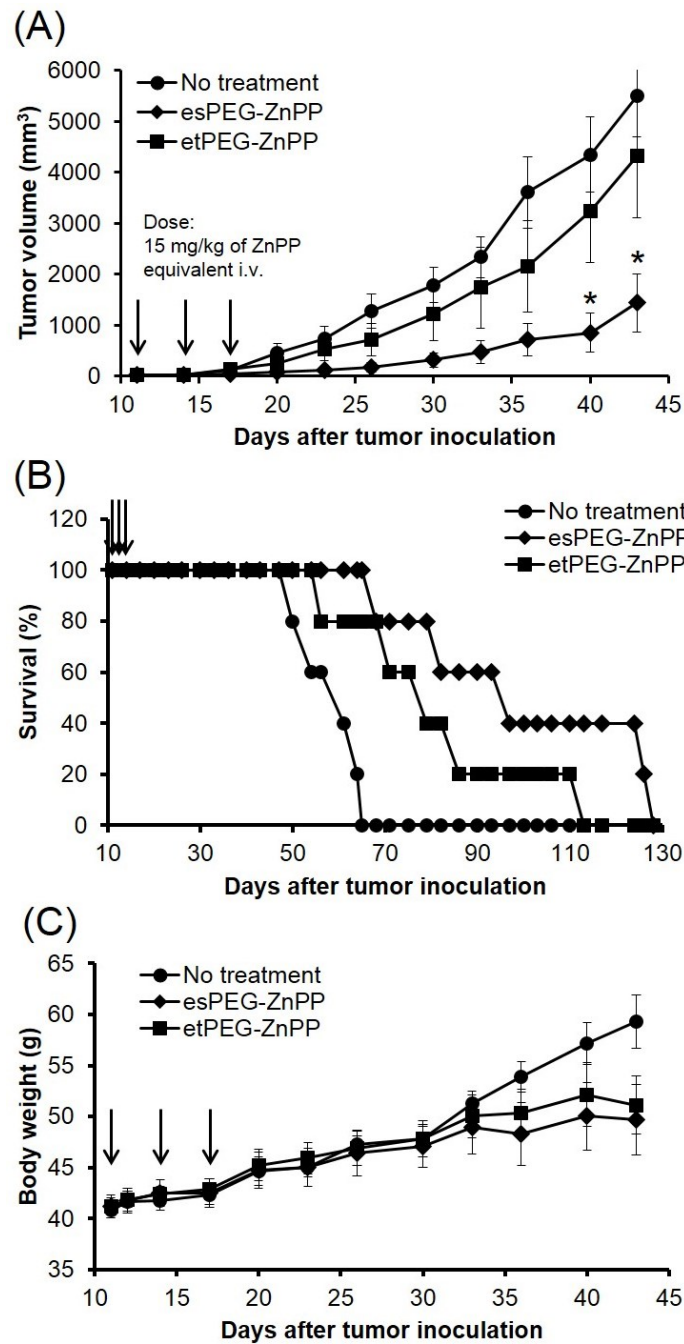


Figure 16. Antitumor effect of esPEG-ZnPP and etPEG-ZnPP at 15 mg/kg of ZnPP equivalent in S-180 tumor bearing male ddY mice. Vertical arrows indicate i.v. injection time of drugs. Values are means \pm S.E. (n = 5). * p < 0.05, a significant difference from etPEG-ZnPP, according to Student's t test. (A) Antitumor effect of esPEG-ZnPP and etPEG-ZnPP. (B) Survival rate of S-180 tumor bearing ddY mice after treatment. (C) Body weight change of S-180 tumor bearing ddY mice after treatment.

3.13. esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP の体内動態と PEG 鎖切断性 (in vivo)

続いて、S-180 担がんマウスを用いて esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP の静脈投与後の体内動態と PEG 鎖切断性について HPLC を用いて検討した。静脈投与から 24 時間後、各組織への PEG-ZnPP の分布量 (peak 1 - 5 の合計量) は、両 PEG-ZnPP でほぼ同様に、腫瘍集積性も有意差は見られなかった (Fig. 17A)。一方で、PEG 鎖切断性、つまり PEG 鎖切断物の生成量に大きな違いが見られた。静脈投与から 24 時間後、各組織内の PEG 鎖切断物の生成 (peak 3、4、5 の合計量) を見ると、esPEG-ZnPP では腫瘍組織内で PEG 鎖切断物の生成が観察された (Fig. 17B)。しかしながら、etPEG-ZnPP は腫瘍組織内でほとんど元の etPEG-ZnPP (peak 1) として存在し、PEG 鎖切断物の生成はほとんど見られなかった (Fig. 17C)。

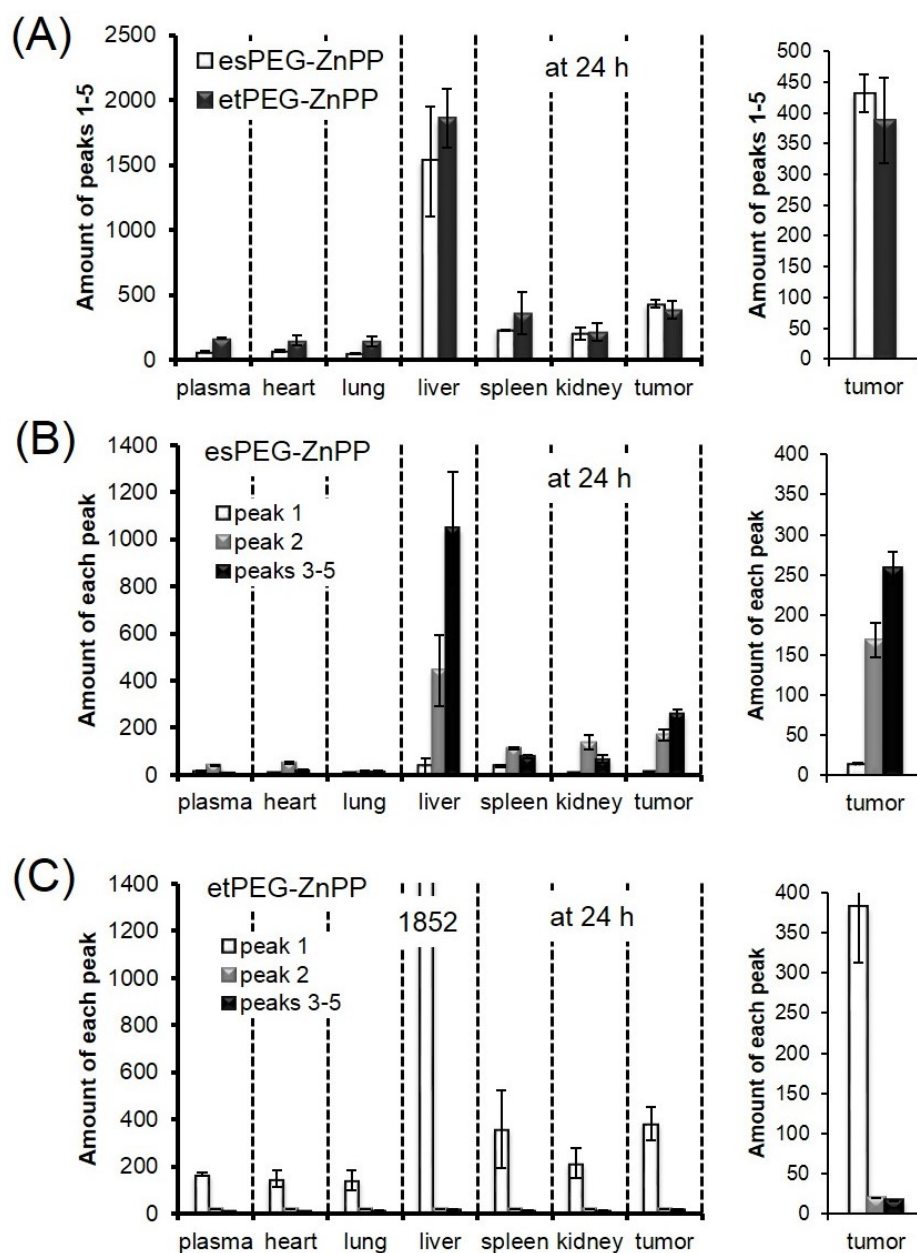


Figure 17. Tissue distribution and PEG cleavability of esPEG-ZnPP and etPEG-ZnPP in S-180 tumor bearing male ddY mice after i.v. administration at 40 mg/kg of ZnPP equivalent, measured by HPLC. (A) Tissue distribution (total of peaks 1–5 combined) of esPEG-ZnPP and etPEG-ZnPP at 24 h after administration. The inset shows amount of each PEG-ZnPP in tumor tissue with magnified scale. (B, C) The amount of each peak in each tissue at 24 h after administration of (B) esPEG-ZnPP and (C) etPEG-ZnPP, using results in (A). The insets show amount of each peak in tumor tissue with magnified scale, respectively. Values are means \pm S.E. (n = 3). Amount of peak is described as the area of the peak.

3.14. esPEG-ZnPP からの PEG 鎖切断推定メカニズム

Figure 18 に esPEG-ZnPP からの PEG 鎖切断推定メカニズムについてまとめた。腫瘍ホモジネート上清などを用いた検討で、PEG 鎖切断物 (peak 3 - 5) の生成は、1 本鎖 esPEG-ZnPP (peak 2) の減少に伴い観察された。このことは、PEG 鎖切断物 (peak 3 - 5) が元の 2 本鎖 esPEG-ZnPP (peak 1) から直接生成されるのではなく、1 本鎖 esPEG-ZnPP (peak 2) を介して生成されることを示唆している。つまり、1 本鎖 PEG-ZnPP の生成がさらなる PEG 鎖の切断に必須で、腫瘍部位ではプロテアーゼが作用し、1 本鎖 PEG-ZnPP の PEG 鎖の切断が進み、PEG 鎖が完全に外れた切断物が生成されることが考えられる。

また esPEG-ZnPP と etPEG-ZnPP は共にアミド結合を有しているが、etPEG-ZnPP は *in vitro* および *in vivo* での検討で PEG 鎖の切断を受けなかった。このことから、PEG 鎖切断に関与するプロテアーゼなどの酵素は、PEG 鎖が 2 本結合した状態では立体障害によって作用できない可能性が考えられる。

PEG 鎖切断物は、PEG と ZnPP 間のエステル結合あるいはアミド結合が切断されたものと予想されるが、一般的にアミド結合はエステル結合より安定とされている。しかし、例えばアマンタジンのプロドラッグ内のアミド結合が、ラット肝臓のホモジネートで処理することで切断されるという報告も見られる⁽⁴⁶⁾。したがって、esPEG-ZnPP においても、片方の PEG 鎖が脱離したのちに、アミド結合の切断も起こりうると考えられる。

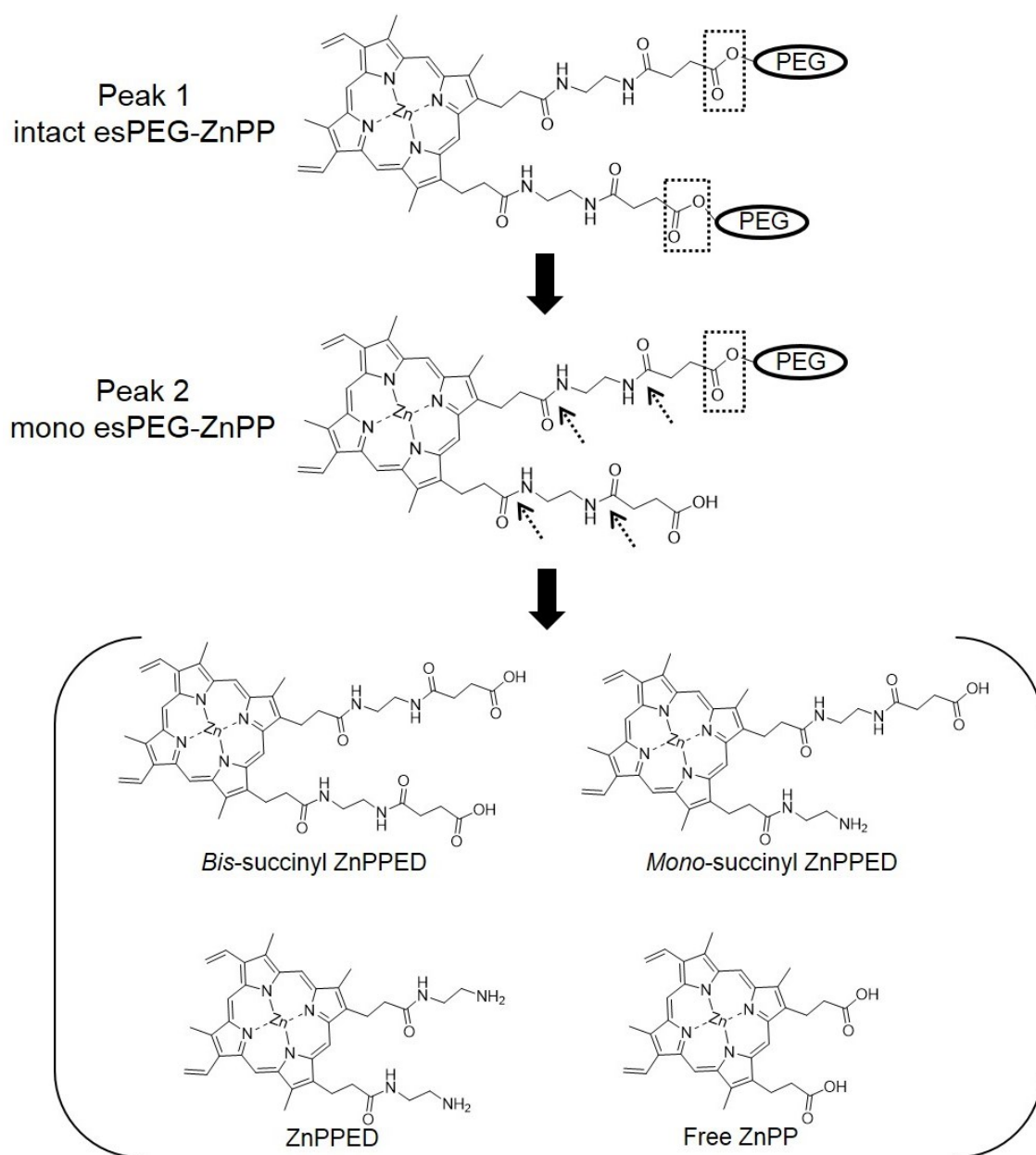


Figure 18. Conceptual mechanism of sequential cleavage of PEG from esPEG-ZnPP and the putative structures of cleavage products. Once PEG chain is detached at ester bond in the dotted box, amide bonds indicated by dotted arrows may be cleaved.

4. 考察

PEG 化抗がん剤 PEG-ZnPP は、高分子として挙動し EPR 効果によって選択的な腫瘍集積性が得られる^(37,38)。しかしながら、元の ZnPP と比べ細胞内取り込みが低いことが分かり、他の PEG 化薬剤と同様に PEG ジレンマに直面した^(39,40)。よって、PEG-ZnPP の PEG 鎖は切断されるのか、またどのように切断されるのか、さらにその PEG 鎖切断性は細胞内取り込みや抗腫瘍効果にどのような影響があるのか明らかにすることは重要である。そこで、我々の研究グループが合成した 2 種類の PEG-ZnPP、すなわち PEG 鎖結合部にエステル結合を持つ esPEG-ZnPP、あるいはエーテル結合を持つ etPEG-ZnPP を用いて、PEG 鎖結合部の違い（化学結合の違い）による PEG 鎖切断性の違いやその重要性に関して検討を行った。

種々の動物血漿を用いて血中での安定性を検討したところ、etPEG-ZnPP では全く PEG 鎖の切断脱離が見られなかったが、esPEG-ZnPP では PEG 鎖の切断脱離が見られ、1 本鎖 PEG-ZnPP (peak 2) が生成された (Fig. 8)。我々は以前に、esPEG-ZnPP および etPEG-ZnPP が、元の free ZnPP より血中滞留性に優れ、EPR 効果によって高い腫瘍集積性を示すことを明らかにしており^(37,38)、本研究においても、肝臓を除く正常組織と比べて腫瘍への集積性が高いことを確かめた (Fig. 17A)。十分な EPR 効果のためには、薬剤の血中濃度を高いレベルに維持して、血管から漏れ出す時間を稼ぐ必要があり、我々の研究グループでは、げっ歯類動物において望ましい血中半減期は 6 時間以上と報告している⁽⁴⁷⁾。マウス血漿を用いた検討で、4~6 時間後まで約 60~80%が PEG 結合体 (peak 1 と peak 2) として残っていたことから (Fig. 8)、esPEG-ZnPP は血液循環中に一定量の PEG 鎖が切断されるものの、高分子として十分な時間挙動できることが示唆された。さらに esPEG-ZnPP の血中安定性に関する重要な知見は、ヒトでは PEG 結合体 (peak 1 と peak 2) としての安定性が、マウスやラットより高いことであり、臨床において EPR 効果による高い腫瘍集積性が期待できる。

マウスおよびヒトの腫瘍組織ホモジネートの上清を用いて、腫瘍部位での PEG 鎖切断性を検討したが、esPEG-ZnPP からのみ PEG 鎖切断物 (peak 3 - 5) の生成が見られた (Fig. 10、13A)。また、この腫瘍部位での PEG 鎖切断脱離には、セリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼが関与することが示唆された (Fig. 11、13B)。腫瘍部位においては、細胞外や細胞膜にマトリブターゼなどのセリンプロテアーゼや、カテプシン B などのシステインプロテアーゼが発現していることが知られており^(44,48,49)、プロテアーゼが高発現している腫瘍において、より効率的に esPEG-ZnPP から PEG 鎖切断物が生成されると期待される。

実際に esPEG-ZnPP を S-180 担がんマウスに静脈投与すると、ほとんどの正常組織より腫瘍組織に多く集積し、PEG 鎖切断物の量 (peak 3 - 5 の合計) も多いことが分かった (Fig.

17A、B)。腫瘍組織以外を見ると、肝臓で集積および PEG 鎖切断物が多かった (Fig. 17A、B)。肝臓に集積が多いのは、以前の報告やその他のポリマー結合体と同様の結果であり^(9,37,45)、PEG 鎖切断物が多いことは、肝臓が薬物などの代謝のためにプロテアーゼなどの酵素を多く持っていることを反映していると考えられ、マウス肝臓のホモジネート上清を用いた検討結果とも一致している (Fig. 12)。しかし、ZnPP は肝毒性をほとんど示さないことが分かっており⁽³⁷⁾、esPEG-ZnPP は高い腫瘍選択性を発揮できると考えられる。

細胞内取り込みや細胞毒性は、PEG 鎖切断物のモデル化合物 (ZnPP や ZnPPED) の方が両 PEG-ZnPP よりも優れており、PEG 鎖切断性を有する esPEG-ZnPP の方が etPEG-ZnPP よりも優れていた (Fig. 14、15)。さらに *in vivo* 抗腫瘍効果も、esPEG-ZnPP の方が etPEG-ZnPP よりも優れていた (Fig. 16)。この結果は、細胞内取り込みや細胞毒性に関して esPEG-ZnPP の方が etPEG-ZnPP よりも優れていたことと一致する。PEG-ZnPP においても、PEG 鎖の切断脱離が細胞内取り込みや抗腫瘍活性に重要であることが確認できた。

PEG ジレンマの解決のためには、例えば分子量が小さく鎖長の短い PEG を用いた PEG 化薬剤の開発や、細胞膜透過性の高いペプチドを用いるナノ粒子の開発なども行われている⁽⁵⁰⁻⁵²⁾。また、腫瘍部位で高発現している MMP などのプロテアーゼにより特異的に切断されるペプチドを PEG 鎖結合部に導入した研究がある^(11,53)。しかし、ペプチド導入はペプチド合成に時間やコストがかかるという欠点がある。

本検討の結果から、esPEG-ZnPP は EPR 効果によって腫瘍に集積した後、腫瘍内プロテアーゼによって PEG 鎖切断物が生成されるため、腫瘍細胞内への取り込み改善につながり、PEG ジレンマの解決が可能になることが示唆された。よって、エステル結合を有し、PEG 鎖切断性を示す esPEG-ZnPP の方が、etPEG-ZnPP よりも腫瘍選択性に有利な特性を持っていると考えられる。一般的に、アミド結合などより加水分解を受けやすいとされているエステル結合であるが、ヒト血中ではマウス血中などと比べ、安定性が高いことが明らかになり、これはエステル結合を有する高分子化抗がん剤開発に関する重要な知見である。またエステル結合は、エステル結合に隣接するメチレン基の長さを変えることで切断されにくくなり安定性が増すことが知られており⁽⁵⁴⁾、血中での安定性や腫瘍部位での PEG 鎖切断性の制御につながると期待できる。

以上、本検討より得られた知見から、PEG などを用いた高分子化抗がん剤において、エステル結合の利用により、PEG ジレンマの解決や高い腫瘍選択性を有した高分子化抗がん剤の開発につながることが期待される。

第3章 スチレンマレイン酸コポリマー (SMA) 結合型ピラルビシンの体内動態および抗腫瘍効果の検討

1. 背景

ピラルビシン (4'-*O*-tetrahydropyranilydoxorubicin, THP) はドキソルビシン (doxorubicin, DOX) の誘導体の一つで、急性白血病、悪性リンパ腫、頭頸部がん、乳がんなどの治療に用いられているアントラサイクリン系抗がん剤である⁽⁵⁵⁾。トポイソメラーゼ II の阻害などにより、G2 期で細胞回転を止めて、腫瘍細胞を致死させることで抗腫瘍効果を示す^(56,57)。さらに THP は、DOX より優れた特徴を持っていることが知られている。例えば、THP は DOX より細胞内取り込みが 100 倍以上速いことや、DOX 耐性株にも効果を発揮すること、また DOX より心毒性が低いことが報告されている⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾。しかしながら、THP は分子量 627 の低分子抗がん剤であり、DOX やその他多くの低分子抗がん剤と同様に、腫瘍組織への選択性が低く、腫瘍集積は少ない。そのため、正常組織への分布も多く、副作用を招き、投与量の制限にもつながる。したがって、THP の腫瘍組織への集積性を高めることが THP の欠点克服に重要であると考えられる。

THP を腫瘍組織へ選択的に集積させる手段として、THP を高分子化し (>40 kDa)、EPR 効果を利用する方法が挙げられる^(5,6)。スチレンとマレイン酸から構成される両親媒性のポリマーであるスチレンマレイン酸コポリマー (styrene maleic acid copolymer, SMA) は、SMA と薬物間で疎水性相互作用やイオン相互作用、または水素結合といった非共有結合を形成することで低分子抗がん剤を包み込み、高分子ミセルを作製することができるため、低分子抗がん剤を高分子化するのに有用である^(61,62)。また、SMA はアルブミン結合能を有することが知られている^(63,64)。アルブミンは生体親和性を有する高分子で、SMA のアルブミン結合能は、薬剤の高分子化と血中滞留性の向上に重要な特性である。よって、本研究グループでは以前に、SMA と THP 間の疎水性相互作用などの非共有結合を利用して、THP 内包型 SMA ミセルの開発を行った⁽⁶⁵⁾。

しかしながら、ポリマーと薬物間の非共有結合のみで形成された高分子化抗がん剤は、血中での安定性が不十分な場合があり、血中に入った際に内包薬物である低分子抗がん剤の多くを放出してしまう問題が報告されている⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾。つまり、血中で高分子として機能せず、元の低分子抗がん剤に戻ってしまうと考えられる。一方、非共有結合ではなく、薬物をポリマーに共有結合させて作製した高分子化抗がん剤は、非共有結合のみで形成された高分子化抗がん剤よりも血中滞留性が良く、腫瘍集積性も高い例が報告されている⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾。

SMA はカルボキシル基を有しており、アミド結合などを介して薬物を共有結合させることができるため、共有結合型の高分子化薬剤も容易に開発可能である。例えば、抗がん性タンパク質ネオカルチノスタチン (neocarzinostatin、NCS) を結合させた SMA 結合型 NCS (SMANCS®) は、生体内で高分子として挙動でき、NCS の血中滞留性を向上させると共に、EPR 効果によって腫瘍組織への集積性を高めることに成功している^(5,71)。

本検討では、SMA を用いた高分子化 THP 製剤の発展のために、THP を SMA に共有結合させた SMA 結合型 THP (SMA-THP conjugate) を合成し、培養細胞を用いて細胞毒性などの評価、担がんマウスを用いて体内動態や抗腫瘍効果の評価などを行った。

2. 実験材料および実験方法

2.1. 実験材料

THP (MicroBiopharm Japan)、Styrene maleic anhydride copolymer (無水 SMA、平均分子量 1600) (Sigma Aldrich Chemical)、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)、トリエチルアミン、ジエチルエーテル、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS)、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、尿素、ウシ血清アルブミン (BSA)、RPMI 1640、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、ペニシリン G、ストレプトマイシン、エバンスブルー (以上、Wako Pure Chemical)、ウシ胎児血清 (FBS) (GIBCO)、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Dojindo Chemical Laboratories)。その他の試薬類は、市販の特級品を用いた。

2.2. 動物

ddY マウス (雄性)、Sprague-Dawley (SD) ラット (雄性) (以上、九動)、BALB/cCrSlc マウス (雄性) (SLC)

2.3. SMA-THP conjugate の合成

SMA-THP conjugate を合成するため、THP のアミノ基と無水 SMA の無水マレイン酸を反応させ、アミド結合を形成させることとした。200 mg の無水 SMA と 100 mg の THP を 10 mL の DMF に溶解させた。攪拌下、20 μ L のトリエチルアミンを加え、遮光下、室温 (25 $^{\circ}$ C) で 24 時間反応させた。反応後、100 mL のジエチルエーテルを加えて反応物を沈殿させ、遠心操作 (10,000 g、10 分) により沈殿を回収した。この沈殿をジエチルエーテルで 3 回洗浄し、トリエチルアミンを除去した。この沈殿物を 5 mL の DMF で溶解させ、ゲル浸透クロマトグラフィー (Bio-Beads SX-1、BioRad) ($\phi = 30$ mm, L = 250 mm) により、未反応の THP を除いた。SMA-THP conjugate 上に残っている無水マレイン酸を加水分解するために、SMA-THP conjugate の溶出液を 300 mL の蒸留水に加えた。溶出液を蒸留水に加えるとすぐに pH の低下が始まるため、pH 5 以下にならないように 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.2) を滴下で加え、加水分解中は pH 8 以下に保った (室温、約 3 時間)。次いで、50 kDa cut off フィルターを装着した限外ろ過 (Labscale Tangential Flow Filtration System、Millipore) を用いて、DMF を除去し、凍結乾燥 (UD-800F、TAITEC) により SMA-THP conjugate の粉末を得た。SMA-THP conjugate 中のアミノ基の検出定量には、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法を用いた。THP の含有率は、紫外可視分光光度計 (U-3900、Hitachi) を用いて、DMF 中で THP の

480 nm における吸光度を測定し、作成した検量線を用いて算出した。

2.4. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

日本分光株式会社 (JASCO) 製の HPLC ポンプ PU-2080 と紫外可視吸光度検出器 UV-2075 (インテグレーターへの出力スケールは 1 V/1.0 AU)、およびインテグレーター 807-IT integrator (パラメーター設定 : ATTENUATION: 32 mV F. S.; CHART SPEED: 5 mm/min; MIN WIDTH: 0.10 min; MIN HEIGHT: 100 μ V; MIN AREA: 100 μ V; DRIFT: 0 μ V/min; DOUBLE WIDTH TIME; 0 min; NOISE LEVEL: 10 μ V) を使用した。サンプル注入量は 20 μ L である。カラムは Asahipak GF-310 HQ column (7.5 \times 300 mm) (Showa Denko) を使用した。分離溶媒は DMF を使用し、流速は 0.5 mL/min、溶出物は 480 nm における吸光度を利用し検出した。また、カラムとして CAPCELL PAK C18 column (Type MG, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm) (Shiseido Fine Chemicals) を使用したときの分離溶媒は、1% 酢酸/アセトニトリル (50/50) で、流速は 0.3 mL/min、溶出物は 480 nm における吸光度を利用し検出した。

2.5. ゲルろ過クロマトグラフィー

Sephacryl S-200 (GE Healthcare) を用いたカラム (ϕ = 15 mm, L = 700 mm) を作製し、溶出液は PBS (pH 7.4) を用いて行った。溶出液は 4 mL ずつ試験管に分取し、各フラクションの 480 nm (THP) および 280 nm (BSA) の吸光度を測定した。

2.6. 粒子径およびゼータ電位測定

SMA-THP conjugate を PBS (pH 7.4) に溶解させて 2 mg/mL に調整し、孔径 0.45 μ m のシリンジフィルター (Advantec) を通したのち、動的光散乱装置 (ELS-Z2、Otsuka Photo Electronics) を用いて、室温にて粒子径とゼータ電位を測定した。

2.7. 蛍光測定

SMA-THP conjugate を PBS (pH 7.4) に溶解させて 10 μ g/mL に調整して、SDS (0.05-5%)、尿素 (5-9 M) または BSA (10-100 μ g/mL) 存在下で、蛍光分光光度計 (FP-6600、JASCO) を用いて蛍光スペクトルを測定した (励起波長 480 nm、蛍光波長 500-700 nm)。

2.8. 細胞培養

細胞培養に用いた器具は全てオートクレーブや乾熱滅菌、あるいは電子線滅菌済みの

ものを使用し、溶液類の調製、希釈には滅菌した PBS (pH 7.4) を使用した。全ての操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。

ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) は、細胞培養ディッシュ ($\phi=100$ mm、Corning) にて、10% FBS および抗生物質 (ペニシリン G 100 unit/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL) を添加した DMEM を用いて、5% CO₂/95% Air、37°C で静置培養した。およそ 3~4 日毎に、0.25% トリプシン処理により細胞をディッシュから剥離し、細胞を遠心操作 (800 rpm、5 分) で回収し、10 倍希釈になるように継代を行った。

マウス大腸がん細胞 (colon 26 細胞) は、RPMI1640 を用いて、上記 HeLa 細胞と同様の条件で培養、継代を行った。

2.9. 細胞毒性試験

HeLa 細胞または colon 26 細胞を 96 ウェルプレート (Corning) に 3000 cells/well になるように播種し、一晚培養後に、free THP または SMA-THP conjugate を加えた。72 時間後に MTT 法により細胞生存率を測定した。生細胞により生成されたホルマゼン色素は DMSO で溶解させ、マイクロプレートリーダー (Infinite M200 PRO、Tecan) を用いて 570 nm の吸光度を測定した。

2.10. 細胞内取り込みおよび SMA-THP conjugate からの free THP の放出

HeLa 細胞を 12 ウェルプレート (ウェルの直径 $\phi=22.1$ mm、Corning) に 5×10^5 cells/well になるように播種し、一晚培養後に、最終濃度が 300 μ M (THP 当量) になるように free THP または SMA-THP conjugate を加えた。一定時間培養後、培地を除去し、細胞を室温の PBS (pH 7.4) で 2 回洗浄し、0.25% トリプシンで剥離させ、遠心操作 (800 rpm、5 分) で回収した。得られた細胞ペレットに 500 μ L の 2 M 塩酸を含む 60%メタノールを加え、超音波処理 (30 W, 30 s, Hielscher) で細胞を破碎し、THP を加水分解するため 50°C で 1 時間処理した。処理後、THP の加水分解物を抽出するため 500 μ L のクロロホルムを加え、遠心操作 (10000 g、10 分) 後、クロロホルム層を回収し、蛍光分光光度計で細胞内に取り込まれた THP 由来の蛍光を測定した (励起波長 480 nm、蛍光波長 590 nm)。

HeLa 細胞を細胞培養ディッシュ (ウェルの直径 $\phi=60$ mm、Corning) に 2×10^6 cells 播種し、一晚培養後に、最終濃度が 300 μ M (THP 当量) になるように free THP または SMA-THP conjugate を加えた。一定時間培養後、培地を除去し、細胞を室温の PBS (pH 7.4) で 2 回洗浄し、0.25% トリプシンで剥離させ、遠心操作 (800 rpm、5 分) で回収した。得られた

細胞ペレットに 300 μ L の DMF を加えた。氷中にて超音波処理 (30 W, 30 s) で細胞を破碎し、遠心操作後 (10000 g、10 分)、上清を回収し、HPLC 測定を行った。

2.11. 担がんマウスの作製

すべての動物実験は、崇城大学動物実験委員会および崇城大学における動物実験に関する指針の下、行った。

S-180 細胞は ddY マウス (雄性) の腹腔内に投与し、およそ 7~10 日毎に継代培養したものを使用した。S-180 担がんマウスは、生理食塩水にて 2×10^7 cells/mL に調整した S-180 細胞懸濁液を、ddY マウス (雄性、6 週齢) の背部の左右各 1 か所 (合計 2 か所) に、0.1 mL (2×10^6 cells) ずつ皮下注射することで作製した。

Colon 26 細胞は細胞培養ディッシュにて培養したものを使用した。Colon 26 担がんマウスは、生理食塩水にて 1×10^7 cells/mL に調整した colon 26 細胞懸濁液を、BALB/cCrSlc マウス (雄性、6 週齢) の背部の左右各 1 か所 (合計 2 か所) に、0.1 mL (1×10^6 cells) ずつ皮下注射することで作製した。

2.12. 体内動態試験

腫瘍の直径がおよそ 10 mm になった S-180 担がんマウスに 10 mg/kg (THP 当量) の生理食塩水に溶解させた free THP または SMA-THP conjugate を静脈投与し、一定時間後にジエチルエーテル麻酔により安楽死させ、生理食塩水で灌流後、各臓器を摘出した。各臓器を秤量し、臓器 100 mg あたりに、1 mL の 2 M 塩酸を含む 60%メタノールを加え、ホモジナイザーで組織を破碎し、THP を加水分解するため 50 $^{\circ}$ C で 1 時間処理した。処理後、THP の加水分解物を抽出するためクロロホルムを加え、遠心操作 (10000 g、10 分) 後、クロロホルム層を回収し、蛍光分光光度計で THP 由来の蛍光を測定した (励起波長 480 nm、最大蛍光波長 590 nm)。

また健康な SD ラット (雄性、6 週齢) を用いて、リンパ節 (腸間膜リンパ節)、骨髄 (大腿骨由来) を含む正常組織への分布を同様の方法で試験した。

2.13. 抗腫瘍効果試験

腫瘍の直径がおよそ 4~6 mm になった colon 26 担がんマウス、または S-180 担がんマウスに生理食塩水に溶解させた free THP または SMA-THP conjugate を静脈投与し、試験期間中の腫瘍体積および体重を測定した。腫瘍体積はノギスを用いて長径 mm (L)、短径 mm

(W) を測定し、計算式〔腫瘍体積 (mm³) = W² × L / 2〕により算出した。

また colon 26 では、皮下腫瘍から肺転移が起きることが知られている^(72,73)。そこで colon 26 接種後 50 日目 (治療開始後 40 日目) に、10 mg/kg のエバンスブルーを静脈投与し、24 時間後、マウスをジエチルエーテル麻酔により安楽死させ、約 15 mL の生理食塩水で灌流後、肺を摘出した。エバンスブルーにより青色に染色された転移性腫瘍を観察し、その数を計測した。

2.14. 毒性の検討

健常な ddY マウス (雄性、6 週齢) に、free THP (5 mg/kg) は 1 回、SMA-THP conjugate (10 または 30 mg/kg THP 当量) は 1 日空けて 2 回静脈注射した。最終投与から 36 時間後、1 週間後、2 週間後にマウスをジエチルエーテル麻酔により安楽死させ、血液を採取し、白血球、赤血球、ヘモグロビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニントランスフェラーゼ (ALT)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、クレアチンキナーゼ (CK)、血液尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE) について評価した。

3. 実験結果

3.1. SMA-THP conjugate の合成

Figure 19 に SMA-THP conjugate の合成スキームを示した。本研究では 200 mg の SMA と 100 mg の THP から 225 mg の SMA-THP conjugate が得られた。SMA-THP conjugate の THP 含有量は、30% (wt/wt) であり、1 本の SMA (平均分子量 1600) に対して、THP 分子 (分子量 627) が 1 つ結合していることが示唆された。

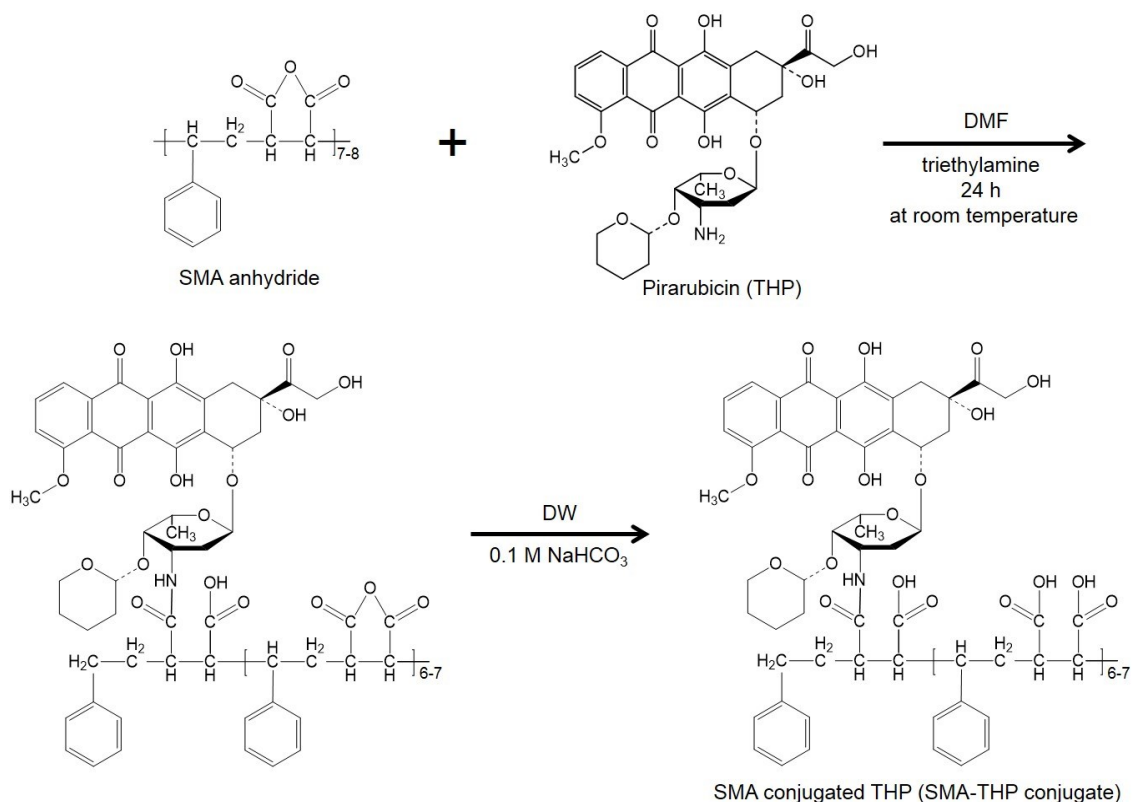


Figure 19. Synthesis of SMA-THP conjugate. Chemical structures and conjugation pathway.

HPLC を用いたゲル浸透クロマトグラフィー（カラム：Asahipak GF-310 HQ column、分離溶媒：DMF）によって、SMA-THP conjugate は元の free THP と比べ、明らかに大きな分子となっていることが分かり、さらに元の free THP や分解物などを含んでいないことが分かった (Fig. 20A)。また、カラムを CAPCELL PAK C18 column、分離溶媒を 1% 酢酸/アセトニトリル (50/50) に変えたときも同様の結果が得られ、SMA-THP conjugate は free THP を含んでいないことを明らかにした (Fig. 20B)。

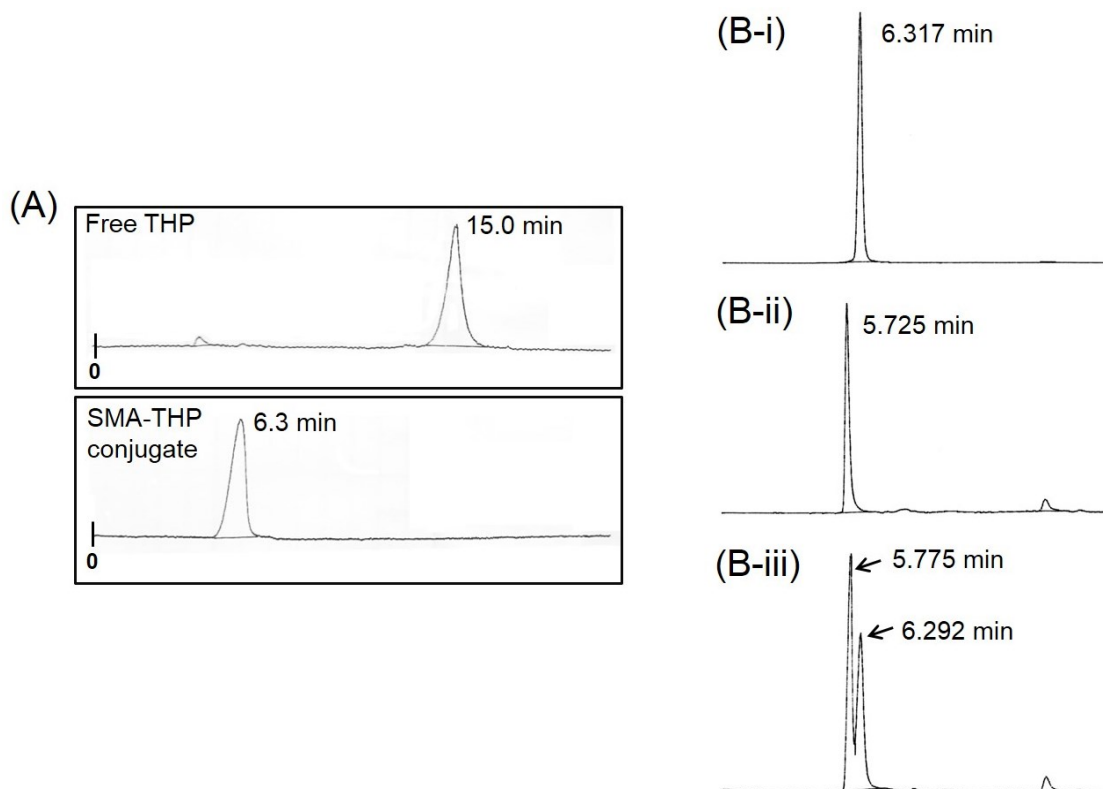


Figure 20. Gel permeation chromatography of free THP and SMA-THP conjugate by using HPLC. Eluate was monitored at 480 nm for THP. (A) HPLC analyses of free THP and SMA-THP conjugate by using Asahipak GF-310 HQ column with DMF as eluate. (B) HPLC analyses of (B-i) free THP, (B-ii) SMA-THP conjugate, and (B-iii) mix of free THP and SMA-THP conjugate by using CAPCELL PAK C18 column with 1% acetic acid/acetonitrile mixture (50:50).

続いて、TNBS 法で SMA-THP conjugate 中の遊離アミノ基を検出定量したところ、アミノ基は検出されなかった (Fig. 21)。この SMA-THP conjugate は水溶液中で conjugate が多数集まり会合体を形成すると考えられるが (cf. Fig. 22)、界面活性剤ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を添加することでその会合体は崩壊する (cf. Fig. 23A)。そこで、5% SDS 添加時にも SMA-THP conjugate 中のアミノ基の検出を TNBS 法で試みた結果、アミノ基は検出されなかった (Fig. 21)。これらのことより THP 由来のアミノ基は、SMA との結合で消費されたと考えられる。

また、この SMA-THP conjugate は高い水溶性を示し、PBS (pH 7.4) に 150 mg/mL (free THP として 45 mg/mL) 以上の濃度で溶解することが分かった。

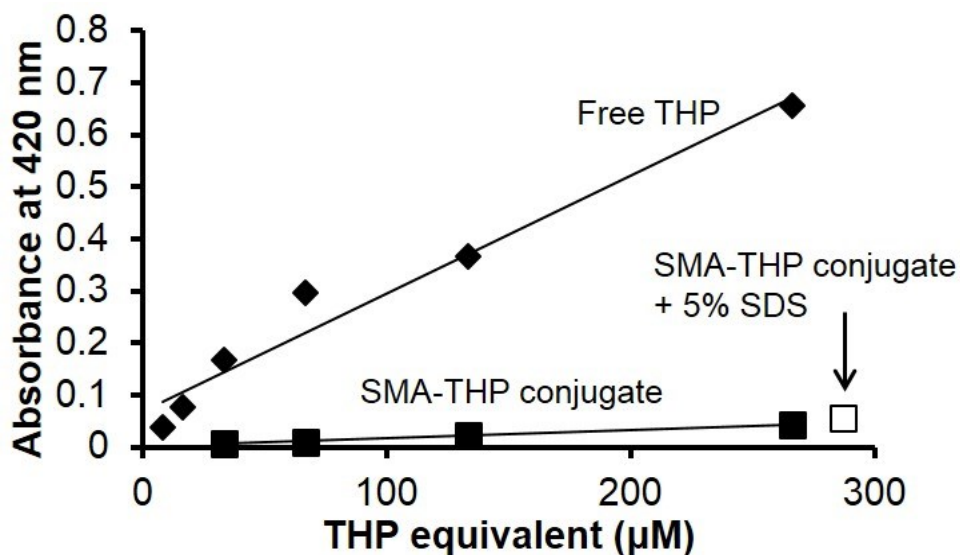


Figure 21. Detection of amino group in free THP and SMA-THP conjugate, measured by TNBS method.

3.2. 水溶液中における SMA-THP conjugate の会合体形成とアルブミン結合能

水溶液中での SMA-THP conjugate の挙動を、まず DLS を用いて検討したところ、PBS (pH 7.4) 中で平均粒子径 18.9 ± 10.0 nm の粒子が形成されていることが示された (Fig. 22A)。このことから、多数の SMA-THP conjugate 分子が集合し、会合体を形成していると考えられる。ゼータ電位は PBS (pH 7.4) 中で -32.38 mV であり、SMA のみの場合は約 $-40 \sim -50$ mV なので負電荷の減少が見られた。

次に、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて水溶液中における挙動を解析した。PBS (pH 7.4) 中で 1 つの粒子として存在することが示され (Fig. 22B、SMA-THP conjugate alone (no BSA))、その見かけの分子量は 62 kDa と算出された (Fig. 22C)。

SMA の重要な特性としてアルブミン結合能があり、薬剤の高分子化に有用である⁽⁶⁴⁾。そこで、SMA-THP conjugate のアルブミン結合能を、ウシ胎児血清アルブミン (BSA) とゲルろ過クロマトグラフィーを用いて検討した。PBS (pH 7.4) 中に、SMA-THP conjugate は 2 mg/mL、BSA は 1 mg/mL または 10 mg/mL になるように調製し、10 分間インキュベーション後、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。SMA-THP conjugate はアルブミンとの結合能を示し、より大きな分子となり、アルブミン結合体を形成することが分かった (Fig. 22B)。そのアルブミン結合体の量は BSA の濃度依存的に増加した (Fig. 22B)。また、10 mg/mL の BSA 存在下での結果を用いて、アルブミン結合体の見かけの分子量を求めたところ、140 kDa と算出された (Fig. 22C)。

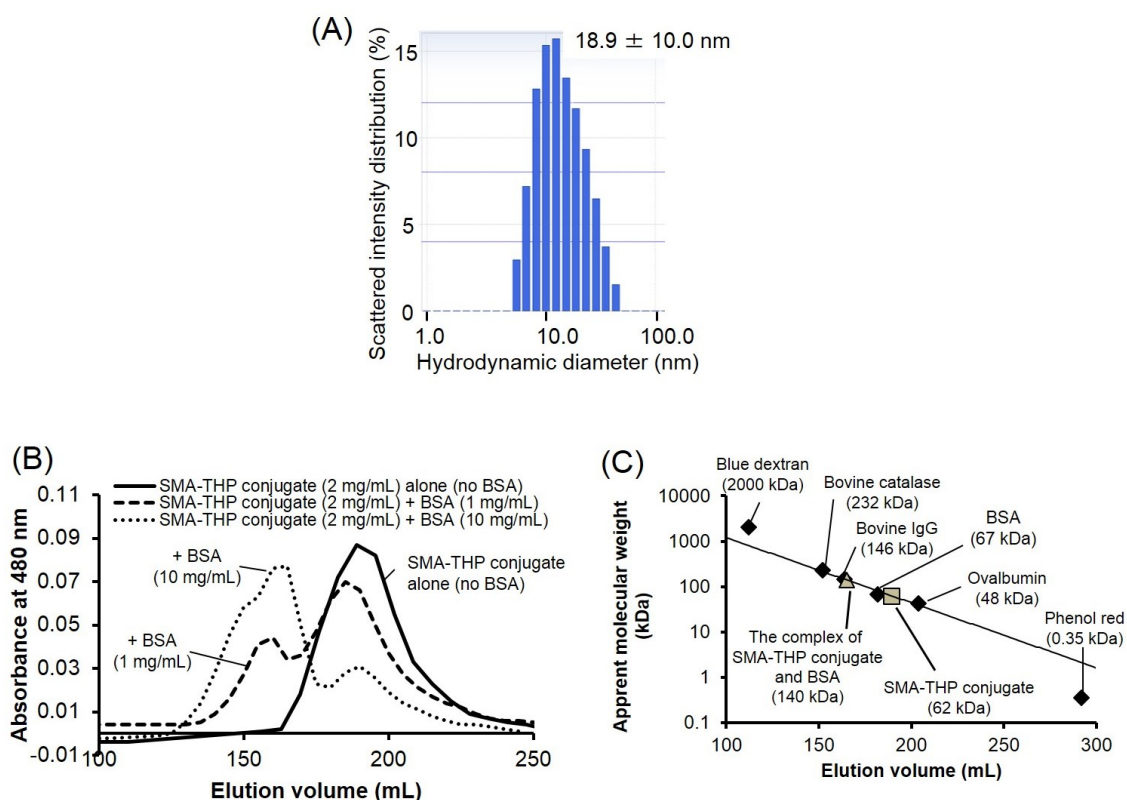


Figure 22. DLS analysis and gel filtration chromatography of SMA-THP conjugate. (A) The hydrodynamic diameter of SMA-THP conjugate at 2 mg/mL in PBS (pH 7.4), measured by DLS. (B) Gel filtration chromatography of SMA-THP conjugate in the presence of different concentrations of BSA by using Sephacryl S-200 with PBS (pH 7.4) as eluate. Eluate was monitored at 480 nm for THP. (C) Results of gel filtration chromatography. The apparent molecular weight of SMA-THP conjugate in the presence or absence of BSA was calculated by the calibration curve based on partition coefficient (K_{av}) using molecular weight standard markers.

THP は蛍光物質であり、励起されることで蛍光を発するが（励起波長 480 nm、最大蛍光波長 590 nm）、PBS (pH 7.4) 中での SMA-THP conjugate の蛍光は free THP と比較して 15% ほどに抑制されており、蛍光の消光が見られた (Fig. 23)。この蛍光消光は、界面活性剤 SDS を添加することで解消され、5% SDS 存在下では free THP の約 70% まで蛍光が回復した (Fig. 23A)。本検討で用いた 0.05% SDS は臨界ミセル濃度 (CMC) 以下であるが、CMC 以下の界面活性剤によっても conjugate の会合体が崩壊し、蛍光消光が解消されることが知られている⁽⁴⁵⁾。また SDS より効果は弱いものの、尿素添加時も蛍光解消が見られ、9 M 尿素存在下では free THP の約 30% まで回復した (Fig. 23B)。一方、free THP の蛍光は SDS や尿素存在下においても変化は見られなかった (data not shown)。これらのことから、SMA-THP conjugate 上の THP は主に、THP 同士や SMA のスチレン環との疎水性相互作用や π - π 相互作用により、水溶液中で強固なスタッキング構造を形成していることが示唆され、その結果、THP の蛍光が消失すると考えられる。また、一部水素結合も関与していると考えられる。このような蛍光消光の特徴は、これまでに本研究グループで開発した薬物内包型 SMA ミセルにおいても報告されている^(62,65)。

また、BSA 添加時では SMA-THP conjugate の蛍光消光の回復が見られなかった (Fig. 23C)。このことから、SMA-THP conjugate は会合体構造を崩壊させることなく会合体のままアルブミンと結合すると考えられる。

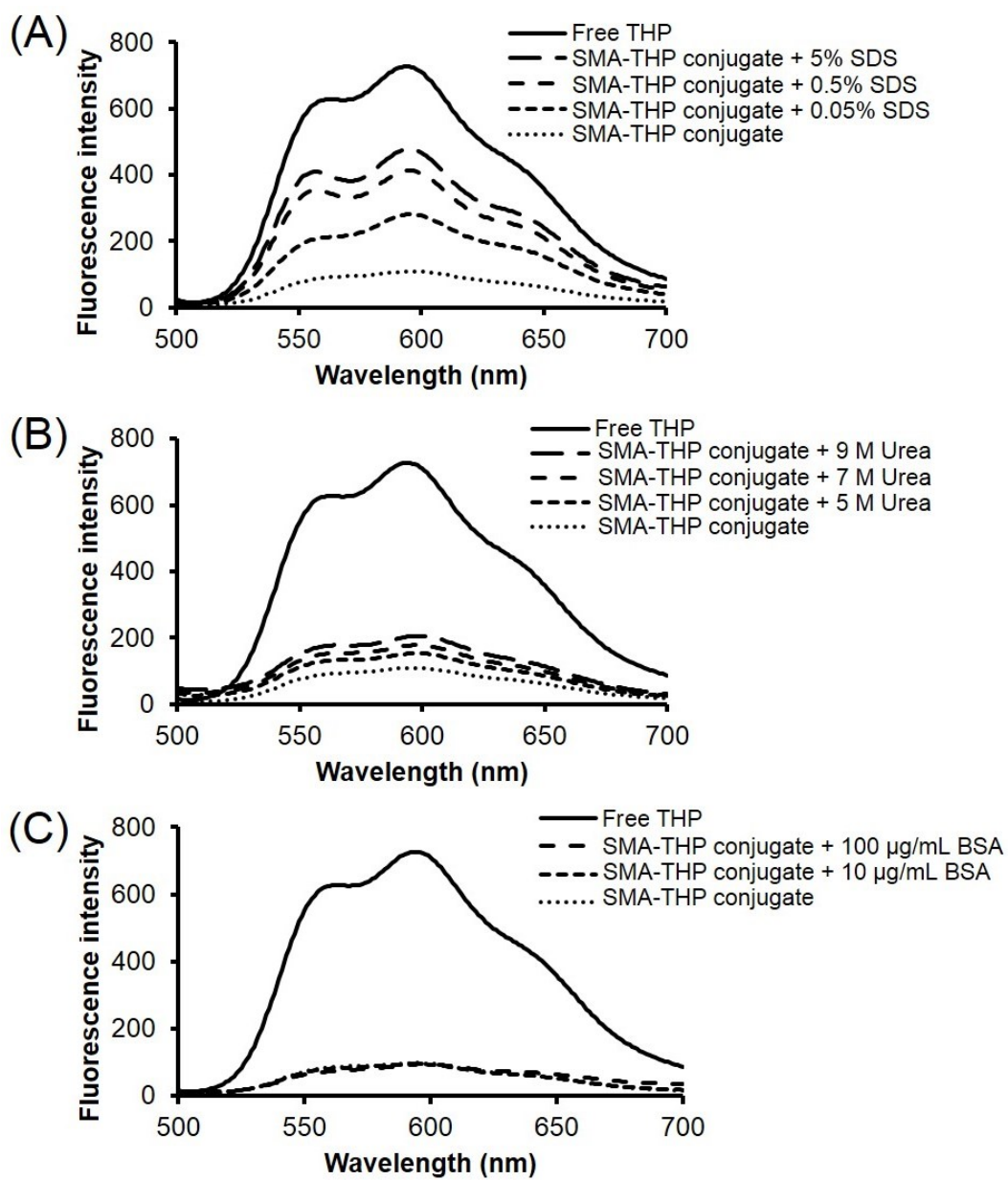


Figure 23. Fluorescence spectra of SMA-THP conjugate in PBS (pH 7.4) in the presence of different concentrations of (A) SDS, (B) urea, and (C) BSA.

3.3. SMA-THP conjugate の細胞毒性

HeLa 細胞または colon 26 細胞に対する SMA-THP conjugate の細胞毒性評価は、72 時間処理後に MTT 法を用いて行った。HeLa 細胞に対して、SMA-THP conjugate は濃度依存的な細胞毒性を示し、 IC_{50} は 22 μ M (THP 当量) であったが、free THP はより細胞毒性が強く IC_{50} は 0.17 μ M であった (Fig. 24A)。同様の結果が colon 26 細胞でも見られ、SMA-THP conjugate の IC_{50} は 12.6 μ M、free THP の IC_{50} は 0.02 μ M であった (Fig. 24B)。どちらの腫瘍細胞に対しても、SMA-THP conjugate の細胞毒性は free THP の 1/100 以下であった。また、THP が結合していない SMA 単独では、本試験で用いた濃度範囲で colon 26 細胞に対して細胞毒性を示さなかった (data not shown)。

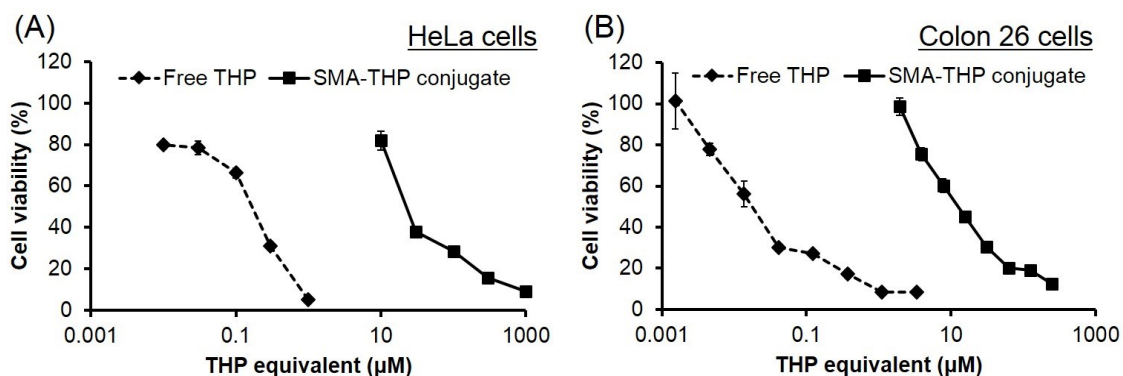


Figure 24. In vitro cytotoxicity of free THP and SMA-THP conjugate against (A) HeLa cells and (B) colon 26 cells. Cells were treated with free THP and SMA-THP conjugate for 72 h, and then MTT assay was carried out to quantify viable cells. Values are means \pm S.E.

3.4. SMA-THP conjugate の細胞内取り込み

HeLa 細胞を用いて SMA-THP conjugate の細胞内取り込みに関する検討を行った。Figure 25A に示すように、SMA-THP conjugate の細胞内取り込みは free THP より遅く、処理から 120 分後時点で、その取り込み量は free THP の 1/40 程度であった。我々は以前に、SMA のマレイン酸残基が酸性条件下では分子型となり、SMANCS®の細胞内取り込みを向上させることを報告しているが⁽⁷⁴⁾、SMA-THP conjugate の細胞内取り込みが腫瘍の酸性環境で改善されるか否かについては、今後の検討を要する。

続いて、細胞内に取り込まれた SMA-THP conjugate について、細胞から抽出後、HPLC を用いて解析した。Figure 25B-i には、6 時間処理後に細胞内に取り込まれた free THP を HPLC で解析した結果を示した。次に SMA-THP conjugate を解析すると、10 時間後において free THP のピークは検出されず、SMA-THP conjugate のピーク (6.275 分) のみ検出された (Fig. 25B-ii)。さらに、40 時間後においても同様に free THP のピークは検出されなかった (Fig. 25B-iii)。また、SMA-THP conjugate 処理から 40 時間後では死滅している細胞も観察された。

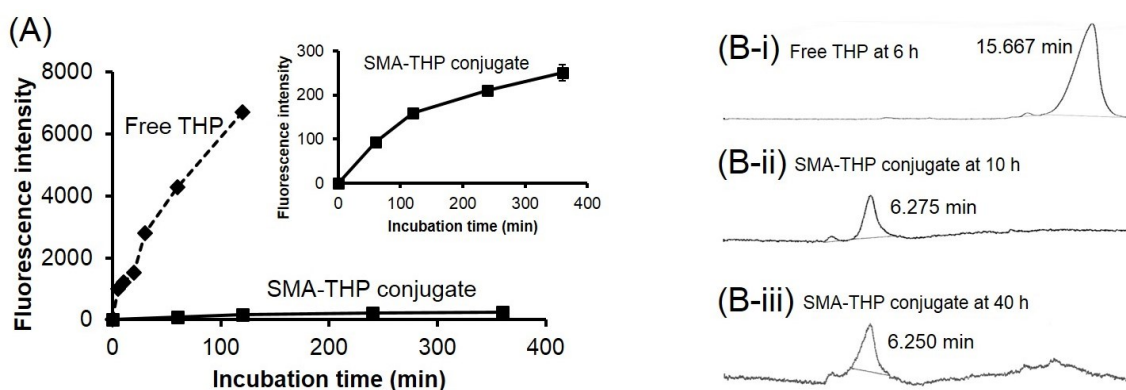


Figure 25. (A) Intracellular uptake of free THP and SMA-THP conjugate in HeLa cells. Values are means \pm S.E. (n = 3). The inset shows intracellular uptake of SMA-THP conjugate with magnified scale. (B) HPLC analyses of (B-i) free THP at 6 h, SMA-THP conjugate (B-ii) at 10 h and (B-iii) 40 h in HeLa cells after each treatment.

3.5. SMA-THP conjugate の体内動態

体内動態は S-180 腫瘍担がんマウスを用いて検討した。Figure 26A に静脈投与後の free THP および SMA-THP conjugate の血中滞留性を示す。Free THP は静脈投与後、血中から速やかに消失していった。一方、SMA-THP conjugate は血中滞留性が向上しており、その AUC (48 時間後まで) は free THP の 24.5 倍であった。次に、free THP と SMA-THP conjugate の組織分布を検討した (Fig. 26B)。投与から 24 時間後、free THP は脾臓に最も多く集積し、次に肝臓であった。腫瘍への集積は少なく、脾臓への集積の約 13% であった。一方、SMA-THP conjugate も肝臓への集積は多かったが、多くの正常組織よりも腫瘍への集積が多かった。肝臓への集積が多いことは、同じく SMA を用いている SMANCS® や、その他の高分子化薬剤でも見られるもので、細網内皮系による取り込みが原因とされている^(6,9)。また、腎臓への集積が多いが、SMA-THP conjugate 自体は分子サイズが大きくなり (分子量 ~ 2200)、会合体から外れた conjugate は腎臓から排泄されやすい分子サイズになってしまうことが原因として考えられる。

SMA-THP conjugate の腫瘍集積は、free THP と比較すると 8.4 倍になっていた (Fig. 26B)。また、肝臓、脾臓、腎臓といった正常組織に集積した SMA-THP conjugate の濃度は、時間経過と共に減少し、投与から 72 時間後の濃度は 24 時間後の濃度と比較するとそれぞれ 24.5%、27%、19% まで減っていた (Fig. 26C)。一方、腫瘍組織では、時間経過に伴う濃度の減少は正常組織より少なく、投与から 72 時間後の濃度は、24 時間後の濃度の 75% であり、生体内で最も高い濃度となった (Fig. 26C)。

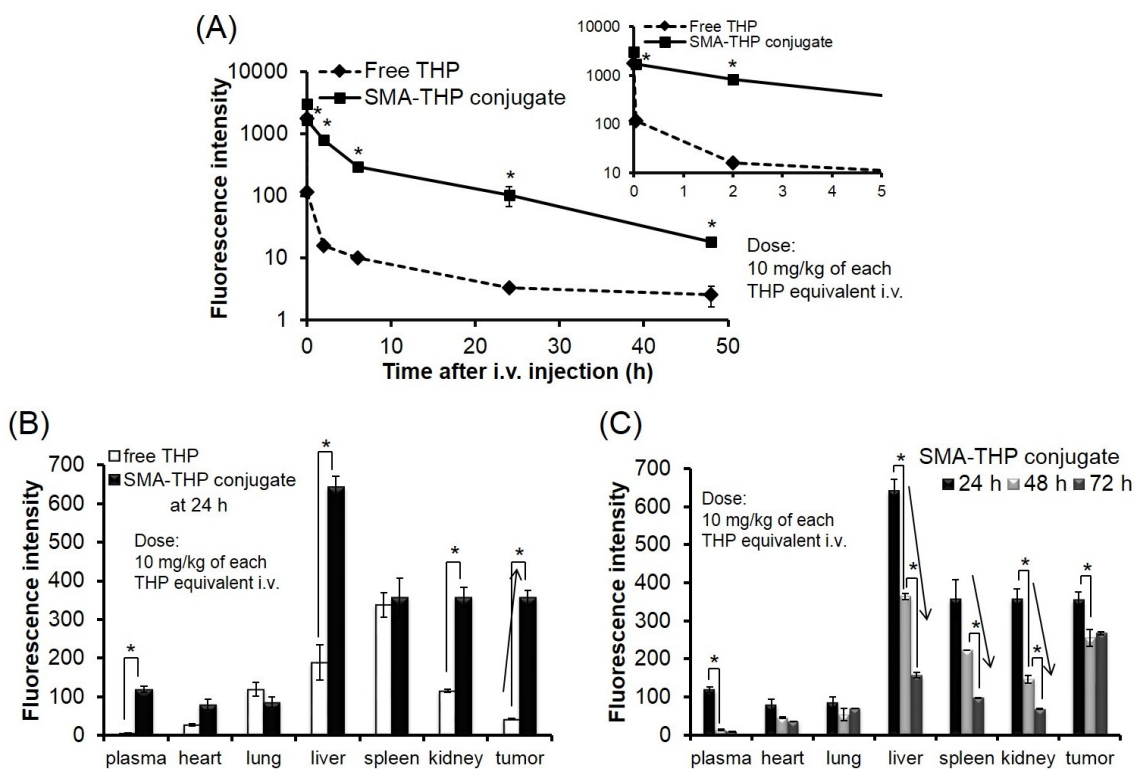


Figure 26. Pharmacokinetics of free THP and SMA-THP conjugate at 10 mg/kg of THP equivalent after i.v. administration in S-180 tumor bearing ddY mice. Values are mean \pm S.E. (n = 3). (A) Blood levels of both drugs after i.v. administration. The inset shows blood levels of both drugs after i.v. administration with magnified scale. $*p < 0.05$, significant differences from free THP, according to Student's *t* test. (B) Tissue distribution of both drugs at 24 h after i.v. administration. $*p < 0.05$, significant differences, according to Student's *t* test. (C) Tissue distribution of SMA-THP conjugate at 24 h, 48 h, and 72 h after i.v. administration. $*p < 0.05$, significant differences, according to Student's *t* test.

また健常 SD ラット（雄性、6 週齢）に SMA-THP conjugate を静脈投与し、リンパ節（腸間膜リンパ節）、骨髓（大腿骨由来）を含む正常組織への分布を検討した（Fig. 27）。投与 24 時間後では、血中滞留性および肝臓集積性は SMA-THP conjugate の方が free THP より高かったが、脳、肺への集積性は SMA-THP conjugate では減っていた（Fig. 27A）。その他の正常組織への集積性は free THP と SMA-THP conjugate で有意な差は見られなかった。重要な知見は、肝臓や腎臓、骨髓などの正常組織へと分布した SMA-THP conjugate は、時間経過と共に速やかに消失していくことである（Fig. 27B）。この結果は、担がんマウスを用いた場合（Fig. 26C）と同様の結果であり、正常組織に分布した高分子の SMA-THP conjugate はリンパ系による回収で排泄されるためと考えられる。一方、腫瘍組織ではリンパ系が未発達であることから、腫瘍組織に集積した SMA-THP conjugate が高い滞留性を示すことができたと考えられる（Fig. 26C）。

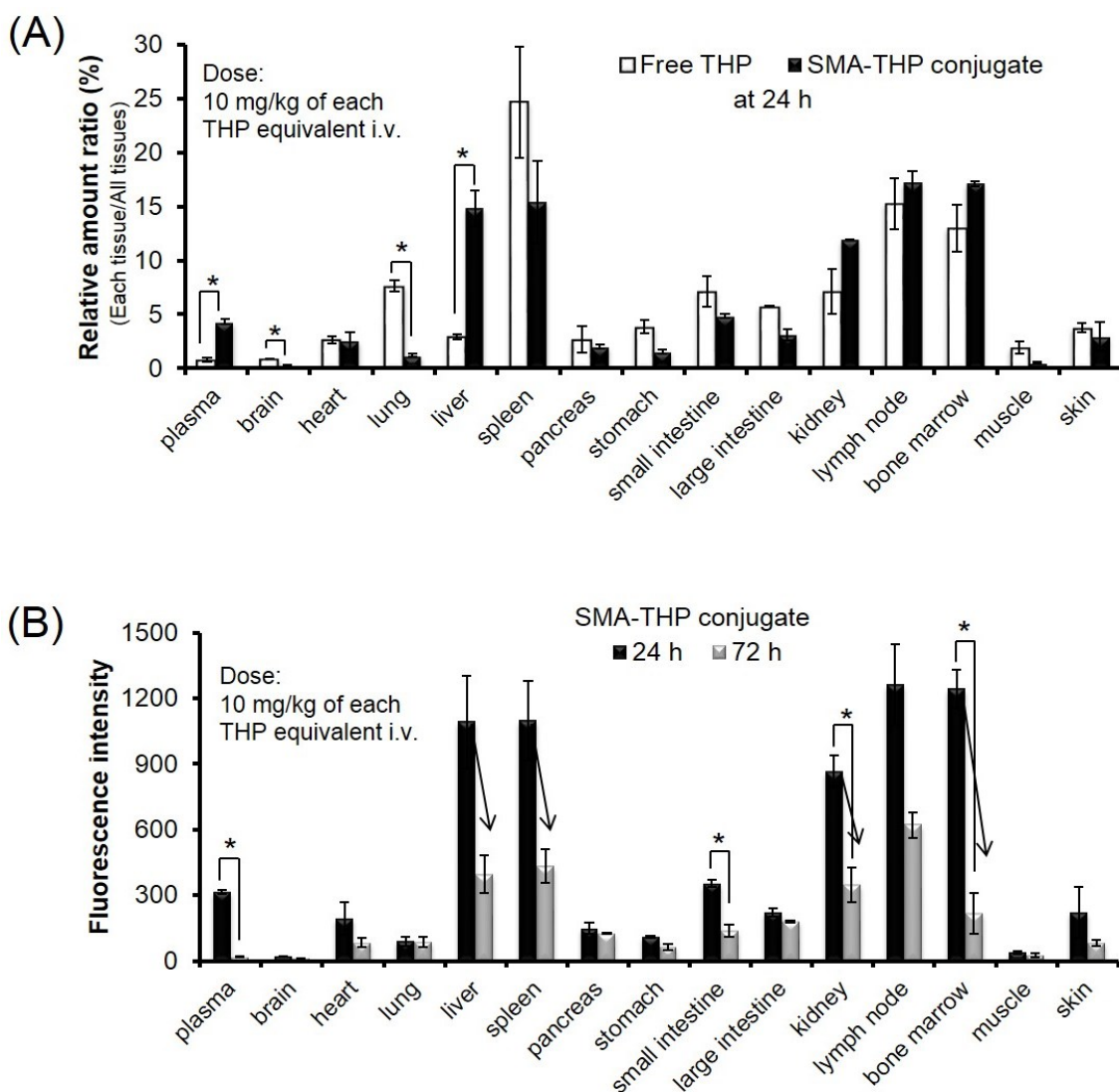


Figure 27. Pharmacokinetics of SMA-THP conjugate at 10 mg/kg of THP equivalent after i.v. administration in healthy SD rats. Values are mean \pm S.E. (n = 3). * p < 0.05, significant differences, according to Student's t test. (A) Relative amount ratio in each tissue at 24 h after i.v. administration of free THP and SMA-THP conjugate. Fluorescence intensity in each tissue was divided by total fluorescence intensity in all tissues. (B) Comparison of tissue distribution of SMA-THP conjugate at 24 h and 72 h after i.v. administration.

3.6. SMA-THP conjugate の in vivo 抗腫瘍効果

SMA-THP conjugate の in vivo 抗腫瘍効果について、colon 26 および S-180 担がんマウスを用いて検討した。Figure 28A に示すように colon 26 担がんマウスに対して SMA-THP conjugate (10 mg/kg THP 当量あるいは 30 mg/kg THP 当量) を 1 回静脈投与すると、投与量依存的な増殖抑制効果が見られた。また投与後の体重減少は無く、毛並みの変化など明らかな副作用も見られなかった (Fig. 28B)。一方、free THP も抗腫瘍効果を示したが (Fig. 28A)、投与量の 5 mg/kg はほぼ最大耐量 (maximum tolerable dose、MTD) とされており、投与後に体重減少が見られた (Fig. 28B)。

また、SMA-THP conjugate の投与によって colon 26 の肺の転移巣が減少したことが分かった (Fig. 28C、D)。SMA-THP conjugate 投与から 40 日目 (腫瘍接種から 50 日目) に、エバンスブルーを静脈投与し、24 時間後に肺を観察したところ、EPR 効果によってエバンスブルーが転移巣に集積し、青く染色された (Fig. 28C)。未治療群のマウスの肺では、青く染色された転移巣が数多く見られたが、SMA-THP conjugate (30 mg/kg THP 当量) 投与群のマウスでは、青く染色された肺転移巣が有意に減少していることが分かった (Fig. 28C、D)。一方、free THP (5 mg/kg) 治療後では肺転移巣の数に有意差は見られず、明らかな効果は見られなかった (Fig. 28C、D)。また、治療開始時にあたる腫瘍接種から 10 日目にエバンスブルーを用いて肺を観察したが、肉眼で観察できる転移巣は確認できなかった (data not shown)。

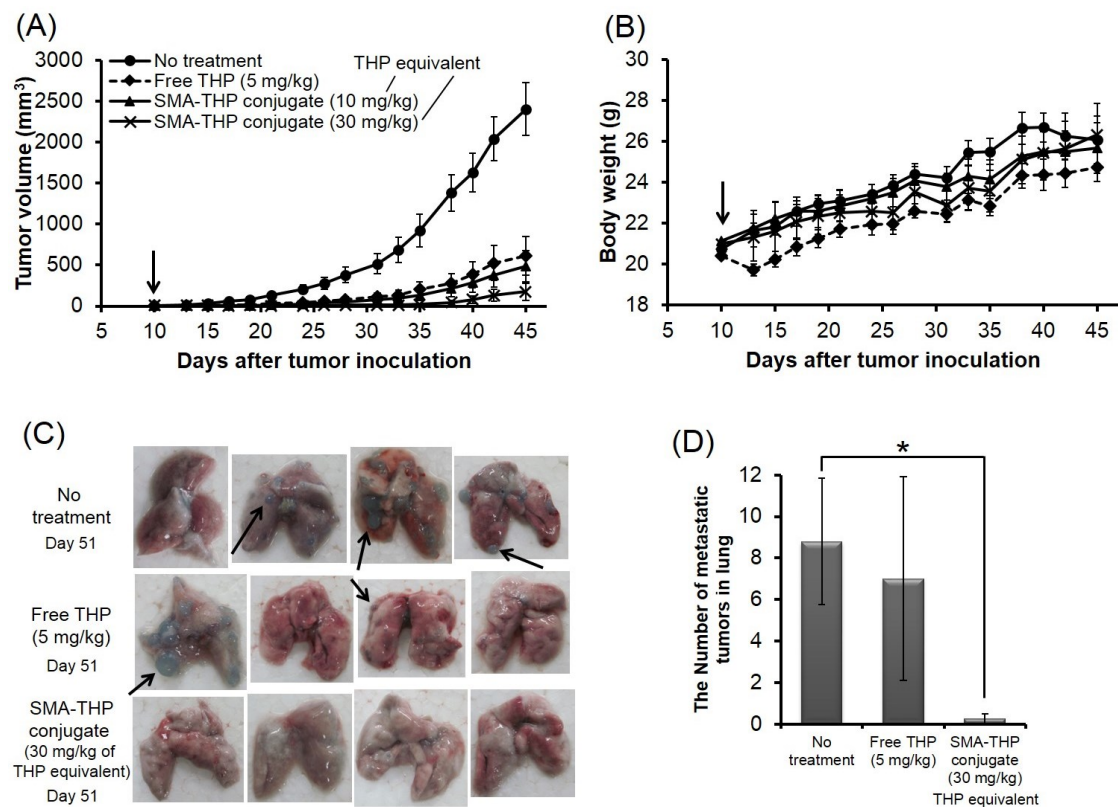


Figure 28. Effect of SMA-THP conjugate on the growth and lung metastasis of colon 26 tumor in male BALB/cCrSlc mice in vivo. Values are means \pm S.E. (n = 4-5). (A) Antitumor effect of SMA-THP conjugate in colon 26 tumor bearing mice. Mice were treated by free THP at 5 mg/kg and SMA-THP conjugate at 10 or 30 mg/kg of THP equivalent. Vertical arrows indicate injection time of drugs. (B) Body weight change of the mice after treatment above (A). Vertical arrows indicate injection time of drugs. Symbols in (B) are same as in (A). (C) Lung specimens in colon 26 tumor bearing mice on 51 day after tumor inoculation in the dorsal skin. Metastatic tumors in the lung were visualized by i.v. injection of Evans blue on 50 day after tumor inoculation. Arrows indicate metastatic tumors. (D) The number of metastatic tumors in the lung for each group. * $p < 0.05$, significant differences, according to Student's *t* test.

続いて、S-180 担がんマウスに SMA-THP conjugate (10 mg/kg THP 当量あるいは 30 mg/kg THP 当量) を 2 回静脈投与し、抗腫瘍効果を検討した (Fig. 29)。投与量依存的な抗腫瘍効果が見られ、体重減少も見られなかった (Fig. 29A、B)。いずれの投与群においても、5 匹中 3 匹のマウスで腫瘍の消失が見られ、その後明らかな再発は見られず 120 日以上生存し続けた (Fig. 29C)。また、free THP (10 mg/kg) も同様に、S-180 担がんマウスに 2 回静脈投与したが、その後 1 週間以内に全てのマウスは死亡した。

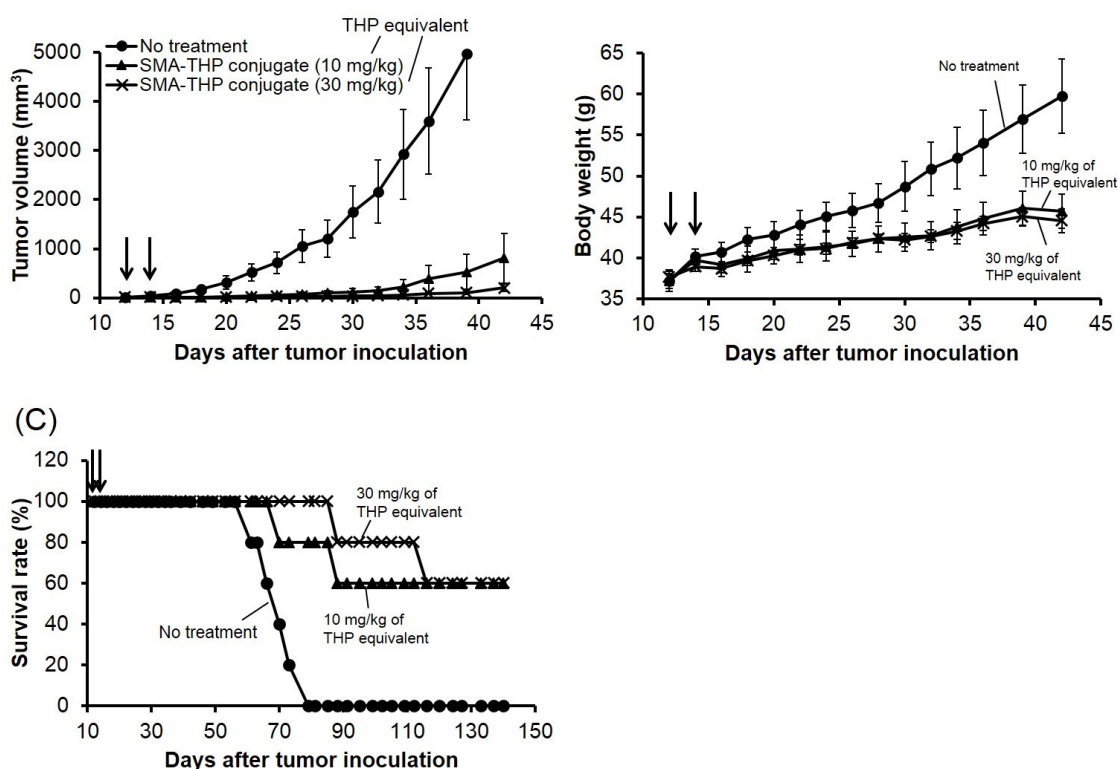


Figure 29. Antitumor effect of SMA-THP conjugate against S-180 tumor in male ddY mice in vivo. Vertical arrows indicate injection time of drugs. Values are means \pm S.E. (n = 5). (A) Antitumor effect of SMA-THP conjugate in S-180 tumor bearing mice. Mice were treated by SMA-THP conjugate at 10 or 30 mg/kg of THP equivalent. (B) Body weight change of ddY mice after treatment above (A). (C) Survival rate of S-180 bearing ddY mice after treatment above (A). Symbols in (B) and (C) are same as in (A).

3.7. SMA-THP conjugate の静脈投与後の毒性評価

健康 ddY マウス (雄性、6 週齢) に SMA-THP conjugate (50、100、または 150 mg/kg THP 当量) を投与したところ、150 mg/kg THP 当量の場合に数日間、体重の減少が続いたが、その後回復した (Fig. 30)。マウスの死亡は見られなかった。このことから、SMA-THP conjugate の MTD は 150 mg/kg THP 当量以上であることが示唆され、free THP の 30 倍以上に相当することが明らかになった。本検討において free THP の場合、colon 26 担がんマウスに 5 mg/kg を 1 回投与時で体重減少が見られ (cf. Fig. 28B)、S-180 担がんマウスに 10 mg/kg を 2 回投与時では、1 週間以内に全てのマウスが死亡しており、free THP の強い毒性は SMA-THP conjugate にすることで低減されていると考えられる。

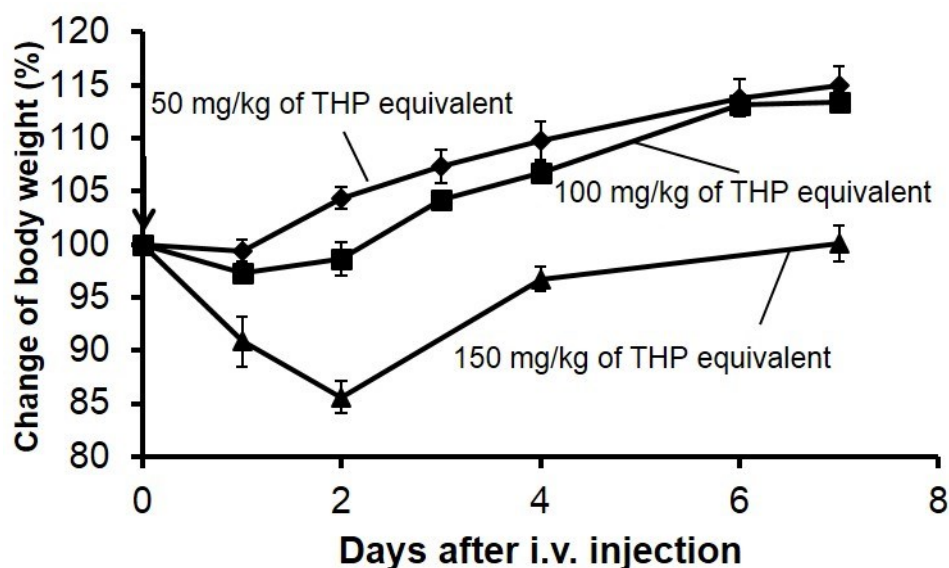


Figure 30. Percent change of body weight of healthy normal male ddY mice after administration of different doses of SMA-THP conjugate (50, 100, or 150 mg/kg of THP equivalent). Vertical arrow indicates injection time of drugs. Values are means \pm S.E. (n = 5).

また、健常 ddY マウスに free THP (5 mg/kg を 1 回)、または SMA-THP conjugate (10 あるいは 30 mg/kg THP 当量を 2 回) 投与したときの血球や正常組織に与える影響について検討した。その結果を Table 6 に示す。SMA-THP conjugate はいずれの投与量においても、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン、そして腎機能に影響は見られなかった。しかしながら、free THP では、投与から 1 週間後および 2 週間後で、赤血球数の有意な抑制が見られた。高投与量 (30 mg/kg THP 当量 × 2) の SMA-THP conjugate で、AST がわずかに上昇していたが、これは SMA-THP conjugate の高い肝臓集積性が影響した可能性が考えられる (cf. Fig. 26B)。また、同じく高投与量の SMA-THP conjugate で CK のわずかな上昇が見られたが、時間経過と共に低下し、投与量が 1/12 量である free THP (5 mg/kg × 1) より CK の上昇が少ないことから、心毒性は軽減されていると考えられる。

Table 6. Influence of free THP and SMA-THP conjugate on hematology and liver, heart, kidney functions.

Dose of drugs	Time after i.v.	WBC (10 ² /μL)	RBC (10 ⁴ /μL)	Hb (g/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	CK (U/L)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)
Control (no drug)		67.0 ± 12.7	1017.3 ± 31.0	15.2 ± 0.3	32.3 ± 2.0	26.3 ± 2.3	170.3 ± 19.5	40.0 ± 5.6	31.4 ± 2.9	0.11 ± 0.01
Free THP† (5 mg/kg × 1) i.v.	36 h	42.5 ± 4.7	971.8 ± 22.0	14.8 ± 0.3	48.3 ± 5.9	33.3 ± 2.2	214.3 ± 29.3	126.3 ± 18.9*	26.1 ± 1.2	0.11 ± 0.01
	1 week	59.3 ± 13.4	844.5 ± 45.1*	12.7 ± 0.7*	50.0 ± 5.5*	29.5 ± 4.7	366.5 ± 115.7	77.8 ± 10.5*	24.5 ± 3.9	0.12 ± 0.01
	2 weeks	60.7 ± 6.9	926.0 ± 10.6*	13.7 ± 0.5	40.0 ± 4.0	26.3 ± 1.5	233.0 ± 35.1	54.7 ± 10.5	28.5 ± 3.5	0.12 ± 0.02
SMA-THP conjugate‡ (10 mg/kg of THP equivalent × 2) i.v.	36 h	70.3 ± 3.4	967.8 ± 22.0	14.9 ± 0.2	52.3 ± 8.1	43.0 ± 12.7	200.3 ± 26.1	79.0 ± 22.0	32.8 ± 1.9	0.13 ± 0.01
	2 weeks	71.3 ± 9.5	997.0 ± 43.7	15.1 ± 0.2	38.7 ± 3.2	29.7 ± 2.2	157.7 ± 6.4	63.7 ± 21.3	22.1 ± 1.8	0.09 ± 0.00
SMA-THP conjugate§ (30 mg/kg of THP equivalent × 2) i.v.	36 h	47.0 ± 9.0	926.5 ± 55.5	14.4 ± 0.5	70.0 ± 6.8*	36.0 ± 5.4	209.5 ± 29.2	82.0 ± 5.3*	26.2 ± 3.1	0.12 ± 0.01
	1 week	55.3 ± 1.8	964.0 ± 23.4	14.1 ± 0.5	45.3 ± 0.9*	27.7 ± 1.9	196.3 ± 14.9	51.3 ± 2.8	28.3 ± 1.6	0.10 ± 0.01
	2 weeks	78.7 ± 9.9	1002.7 ± 25.7	14.9 ± 0.4	46.3 ± 3.8*	31.3 ± 0.9	211.3 ± 35.9	58.0 ± 8.0	26.7 ± 1.3	0.11 ± 0.01

†Free THP was given i.v. only once. THP at 5 mg/kg is about MTD. ‡10 mg/kg of THP equivalent was given i.v. twice on day 1 and 3. Total dose was 20 mg/kg of THP equivalent. §30 mg/kg of THP equivalent was given i.v. twice on day 1 and 3. Total dose was 60 mg/kg of THP equivalent. Blood analyses were carried out at 36 h, one and two weeks after last drug administration. Values are means ± S.E. (n = 4). *p < 0.05, significant differences from untreated control group, according to Student's *t* test. Hb, hemoglobin; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; CK, creatine kinase; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatine.

4. 考察

SMA-THP conjugate は、水溶液中で会合体（見かけの分子量は 62 kDa）やアルブミン結合体（見かけの分子量は 140 kDa）を形成することで、SMA-THP conjugate 自体の分子量（~2200）より大きな分子として挙動できることが示唆された（Fig. 22）。SMA のアルブミン結合能は、薬剤の高分子化と血中滞留性の向上に重要である^(64,75)。アルブミンは血中に大量に存在し、多くの SMA-THP conjugate がアルブミン結合体となることが期待される。実際に、free THP と比較すると血中滞留性の向上や EPR 効果に基づく高い腫瘍集積性を示した（Fig. 26A、B）。また SMA-THP conjugate は、腫瘍組織には長時間高い濃度で滞留するものの（EPR 効果）、肝臓や腎臓、骨髄などの正常組織からは時間経過と共に速やかに消失していった（Fig. 26C、27B）。このように、SMA-THP conjugate が優れた体内動態を示すことから、明らかな副作用はなく、高い in vivo 抗腫瘍効果を発揮できたと考えられる（Fig. 28、29）。また SMA-THP conjugate は投与後に血球数、心機能、肝機能、腎機能に大きな影響を与えないことから、free THP と比べ、低毒性であることが示唆された（Table 6）。

高分子化抗がん剤の体内分布は、例えば表面電荷の影響を受け、負電荷あるいは正電荷が強い場合、肝臓に集積しやすいことが報告されている^(76,77)。SMA-THP conjugate の会合体の表面電荷は-32.38 mV であり、負電荷を帯びている。しかし、SMA のカルボキシル基は容易に修飾が可能で、正電荷を有する分子で修飾するなどして表面電荷を中性に近づけることも可能であると考えられる。またリファンピシンが、肝臓のトランスポーターを介した薬剤の取り込みを抑制することが報告されている⁽⁷⁸⁾。これらのことが SMA-THP conjugate の肝臓取り込みの抑制に有効か否かについては、今後の検討課題である。

SMA-THP conjugate の細胞毒性は、free THP の 1/100 以下であり（Fig. 24）、原因の一つとして、free THP と比べると SMA-THP conjugate の細胞内取り込みが遅いことが考えられる（Fig. 25A）。また、SMA-THP conjugate が完全な conjugate のまま細胞に取り込まれ、細胞内においても free THP の放出が見られないこと（Fig. 25B-ii、iii）も、細胞毒性が低い原因の一つと考えられる。

また、free THP の放出がないことから、SMA-THP conjugate は free THP の放出が無くとも抗腫瘍活性を発揮できることが示唆された。薬物を非切断性の結合でポリマーと結合させた場合でも、薬物の放出がないまま細胞毒性を発揮することが報告されている⁽⁷⁹⁾。しかし、一般的にポリマー結合型薬剤は元の薬物より細胞毒性が低いことが知られており⁽⁸⁰⁾、これらの特徴は SMA-THP conjugate の特徴と一致する。また、細胞毒性が低いことは、正常組織からのクリアランスが速いこと（Fig. 26C、27B）と共に、SMA-THP conjugate の毒性が低

いこと (Fig. 28、29、Table 6) の要因と考えられる。一方腫瘍組織では、例えば IC₅₀ 以上の高い濃度で長時間滞留できるため、抗腫瘍活性が発揮できると考えられる。

腫瘍細胞はアルブミンを積極的に取り込み、アミノ酸やエネルギーの供給源とすることが知られているが、アルブミン結合型薬剤はこの取り込み経路によって腫瘍細胞内に取り込まれることが報告されている^(81,82)。SMA-THP conjugate も、アルブミン結合型薬剤と同様の経路で細胞内に取り込まれ、その後リソソーム内などでのアルブミンの分解と共にアルブミンから脱離し、続いて会合体構造の崩壊が起こり、抗腫瘍効果を発揮するメカニズムが考えられる。また本研究グループでは、レシチンなどの細胞膜構成成分によってミセル構造が崩壊することを明らかにしており⁽³⁹⁾、SMA-THP conjugate が腫瘍細胞に取り込まれる過程で、細胞膜構成成分によって会合体構造が崩壊することも考えられる。

臨床におけるがん治療において、がん転移の予防や治療は極めて難しく、転移性がんは化学療法や放射線療法に対して耐性を示す場合も見られ、再発や死亡の大きな原因となる。本検討での重要な知見として、colon 26 担がんマウスに SMA-THP conjugate を投与すると、移植した皮下腫瘍 (原発巣) の増殖抑制だけでなく、肺の転移巣の減少も同時に見られたことが挙げられる。

我々はすでに、SMANCS®が高いリンパ移行性と EPR 効果による高い腫瘍集積性を示し、リンパ節転移の抑制効果を発揮することを報告している⁽⁸³⁻⁸⁵⁾。また、200 μm ほどの小さな腫瘍であっても、EPR 効果が見られることも報告している⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾。本検討でも、colon 26 腫瘍の肺転移巣に、EPR 効果によってエバンスブルーが選択的に集積することが観察され (Fig. 28C)、転移巣においても EPR 効果が十分に見られるという重要な知見である。

SMA-THP conjugate による治療開始時点 (colon 26 腫瘍接種から 10 日目) において、肉眼的には肺転移巣は確認できなかったが、SMA-THP conjugate が小さな転移巣に集積した可能性も考えられる。しかしながら、SMA-THP conjugate によって接種した皮下腫瘍 (原発巣) の増殖を抑制したことも要因と考えられる。がん転移に対する SMA-THP conjugate の効果については、さらなる検討が必要である。

また SMA 結合型薬剤は、マクロファージや T 細胞、ナチュラルキラー細胞の活性化や、インターフェロンの誘導などといった免疫賦活作用を発揮することが報告されている⁽⁸⁹⁻⁹²⁾。SMA 結合型高分子化抗がん剤にはこのような効果も期待でき、低分子抗がん剤の高分子化と共に注目すべき特性である。

以上の結果より、SMA-THP conjugate は腫瘍選択的に効果を発揮する副作用の少ない高分子化 THP 製剤になりうると期待される。

第4章 ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド (PHPMA) 結合型ピラルビシンの体内動態および抗腫瘍効果の検討

1. 背景

ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド (Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide、PHPMA) は水溶性のポリマーで、毒性や免疫原性が低く生体親和性を有している⁽⁹³⁾。この PHPMA は、分子量 4 万 (40 kDa) 以上になると長時間高い濃度で血中に滞留できるようになり、EPR 効果によって腫瘍に選択的に集積することが知られている⁽⁹⁴⁾。例えば、パクリタキセルやドキソルビシン (DOX) などの低分子抗がん剤を PHPMA と結合させた高分子化抗がん剤など、多くの研究がなされている^(93,95,96)。元の低分子抗がん剤と比較すると、これら PHPMA 結合型抗がん剤では血中滞留性や腫瘍集積性の向上、さらには治療効果の向上や副作用の低減などといった成果が得られている。

アントラサイクリン系抗がん剤ピラルビシン (THP) は、DOX よりも細胞内取り込みが速いことや心毒性が少ないことなど優れた特徴を有している⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾。我々の研究グループでは、これら THP の特徴に注目し、PHPMA 結合型 THP (P-THP) の設計と評価に取り組んできた。これまでに、平均分子量約 4 万 (40 kDa) の P-THP (40P-THP、サイズ: 8.2 ± 1.7 nm、ゼータ電位: 0.62 ± 1.6 mV) を合成し、free THP と体内動態などを比較した⁽¹²⁾。元の free THP は血中から速やかに消失した一方で、40P-THP は血中滞留性が大幅に向上し、EPR 効果に基づき、高い濃度で腫瘍組織に集積した。さらに肝臓などの正常組織への集積は少なく、40P-THP は腫瘍選択的な集積性を示した。

PHPMA や PEG などを用いたポリマー結合型薬剤では、細胞内取り込みの低下およびそれに伴う治療効果の減弱がしばしば見られる (i.e. PEG ジレンマ)^(10,11)。40P-THP では、酸性条件で切断されやすいヒドラゾン結合を介して THP を PHPMA と結合させている⁽¹²⁾。酸性環境 (pH 7 以下) とされている腫瘍組織に集積後、free THP が効率的に放出されるようにして、細胞内取り込みの改善を図った。実際に、40P-THP のままでは細胞内に取り込まれにくく、細胞内に取り込まれているものの多くは、細胞外で 40P-THP から放出された free THP であることが判明している。また、40P-THP を担がんマウスに投与すると、正常組織よりも腫瘍組織内に free THP が多いこと、そして長時間蓄積することが分かった。その結果、40P-THP は free THP よりもはるかに高い抗腫瘍効果を発揮した。さらに、free THP では体重減少が見られた投与量において、40P-THP では体重減少などの副作用はなく、副作用の低減が見られた。

PHPMA 結合型抗がん剤の腫瘍集積性を向上させる方法として、分子量を大きくする方法が挙げられる^(97,98)。これまでに dendrimer を利用した平均分子量約 40 万 (400 kDa) の P-THP (400P-THP、サイズ: 25.9 ± 12.5) の腫瘍集積性や抗腫瘍効果が、40P-THP より優れていることを報告している⁽¹³⁾。しかしながら、毒性も強くなってしまい、治療の際、体重減少が見られることが分かった。そこで、低毒性であり、高い抗腫瘍効果を発揮する P-THP の開発が望まれる。

PHPMA 結合型抗がん剤の分子量を大きくする手法としては、平均分子量約 4 ~ 5 万の PHPMA 結合型薬剤をジスルフィド結合で連結させた diblock 型も開発されている^(99,100)。この diblock 型は血中では安定だが、還元状態でジスルフィド結合が切断され、腎排泄を受けやすくなる (分子量約 4 ~ 5 万以下) まで小さくなる。これにより、体内にポリマーが蓄積するのを防ぐことができる。この diblock 型には、例えば PHPMA 結合型 DOX (P-DOX) の研究が報告されており、平均分子量約 4 万の P-DOX と比較すると、diblock 型である平均分子量約 8 万の P-DOXの方が、血中滞留性、腫瘍集積性、抗腫瘍効果など、全ての点で優れていることが明らかにされている⁽¹⁰¹⁾。

そこで、低毒性かつ高い抗腫瘍効果を発揮する P-THP 開発を目指し、diblock 型の 90P-THP (平均分子量 93000) を合成し、40P-THP (平均分子量 39000) と体内動態や抗腫瘍効果などを比較検討した。

2. 実験材料および実験方法

2.1. 実験材料

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、ペニシリン G、ストレプトマイシン、塩酸、クロロホルム（以上、Wako Pure Chemical）、ウシ胎児血清（FBS）（GIBCO）、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Dojindo Chemical Laboratories)。その他の試薬類は、市販の特級品を用いた。

2.2. 40P-THP および 90P-THP の合成

平均分子量 39000 である 40P-THP および平均分子量 93000 である diblock 型の 90P-THP は、チェコ共和国 科学アカデミー高分子化学研究所より供与していただいた。合成は、以前報告された P-DOX の合成法⁽¹⁰¹⁾に準じ、DOX の代わりに THP を用いた。

2.3. ゲルろ過クロマトグラフィー

ゲルろ過クロマトグラフィーは島津 HPLC システムを用いて行い、カラムは OHpak SB-804 HQ column (8.0 mm × 300 mm) (Showa Denko) を使用した。分離溶媒は PBS (pH 7.4) を使用し、流速は 0.5 mL/min、溶出物は SPD-M20A フォトダイオード検出器を用いて THP の 488 nm における吸光度を利用し検出した。

2.4. 動的光散乱測定 (dynamic light scattering; DLS)

PBS (pH 7.4) に各 P-THP をそれぞれ溶解させて 1 mg/mL に調整し、孔径 0.45 μm のシリンジフィルター (Advantec) を通したのち、動的光散乱装置 (ELS-Z2、Otsuka Photol Electronics) を用いて、粒子径を測定した。

2.5. P-THP からの free THP 放出性

各 P-THP を 1 mg/mL になるように、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) や 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0、pH 6.8、pH 7.4) に溶解させ 37 °C でインキュベーションした。一定時間インキュベーション後、150 μL 取り 150 μL の 0.2 M 重炭酸緩衝液 (pH 9.8) と混ぜ、放出された free THP を抽出するため、1 mL のクロロホルムを加えてよく混合した。遠心後 (8000 rpm、15 分)、クロロホルム層を 800 μL 回収し乾燥させ、HPLC の分離溶媒で再溶解し、島津 HPLC システムを用いて解析を行った。カラムは COSMOSIL 5C₈-MS (4.6 mm × 150 mm) (Nacalai

Tesque) を使用し、カラムオーブンは 40 °C に設定した。分離溶媒はアセトニトリル/0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) (33/67) を使用し、流速は 1.2 mL/min で行い、RF-20AXS 蛍光検出器を用いて free THP の蛍光 (励起波長 488 nm、最大蛍光波長 590 nm) を検出した。放出された free THP の定量は、既知濃度の free THP を用いて作成した標準曲線から算出した。

2.6. 細胞培養

細胞培養に用いた器具は全てオートクレーブや乾熱滅菌、あるいは電子線滅菌済みのものを使用し、溶液類の調製、希釈には滅菌した PBS (pH 7.4) を使用した。全ての操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。

ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) は、細胞培養ディッシュ ($\phi=100$ mm、Corning) にて、10% FBS および抗生物質 (ペニシリン G 100 unit/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL) を添加した DMEM を用いて、5% CO₂/95% Air、37 °C で静置培養した。およそ 3~4 日毎に、0.25% トリプシン処理により細胞をディッシュから剥離し、細胞を遠心操作 (800 rpm、5 分) で回収し、10 倍希釈になるように継代を行った。また DMEM は pH 7.4 または pH 6.9 の 2 種類を使用したが、炭酸水素ナトリウムの添加量を変えること (pH 7.4 の場合は 3.7 g/L、pH 6.9 の場合は 1.0 g/L) で調製した。

2.7. 細胞毒性

HeLa 細胞を 96 ウェルプレート (Corning) に 3000 cells/well になるように播種し、一晚培養後に、free THP、40P-THP、90P-THP をそれぞれ加えた。72 時間後に MTT 法により細胞生存率を測定した。生細胞により生成されたホルマザン色素は DMSO で溶解させ、マイクロプレートリーダー (Infinite M200 PRO、Tecan) を用いて 570 nm の吸光度を測定した。

2.8. 担がんマウスの作製

すべての動物実験は、崇城大学動物実験委員会および崇城大学における動物実験に関する指針の下、行った。

S-180 細胞は ddY マウス (雄性) の腹腔内に投与し、およそ 7~10 日毎に継代培養したものを使用した。S-180 担がんマウスは、生理食塩水にて 2×10^7 cells/mL に調整した S-180 細胞懸濁液を ddY マウス (雄性、6 週齢) の背部の 2 か所に、0.1 mL (2×10^6 cells) ずつ皮下注射することで作製した。

2.9. 体内動態試験

腫瘍の直径がおおよそ 10 mm になった S-180 担がんマウスに、10 mg/kg (THP 当量) の生理食塩水に溶解させた 40P-THP または 90P-THP を静脈投与し、一定時間後にジエチルエーテル麻酔により安楽死させ、生理食塩水で灌流後、各臓器を摘出した。各臓器を秤量し、臓器 100 mg あたりに 900 μ L の PBS (pH 7.4) を加え、ホモジナイザーで組織を破碎し、200 μ L を取り THP を加水分解するため 200 μ L の 2 M 塩酸を加え、50 $^{\circ}$ C で 1 時間処理した。処理後、THP の加水分解物を抽出するため 700 μ L のクロロホルムを加えよく混ぜた後、遠心操作 (10000 g、10 分) し、500 μ L のクロロホルム層を回収した。クロロホルムを乾燥させた後、HPLC の分離溶媒で再溶解し、島津 HPLC システムを用いて解析を行った。カラムは COSMOSIL 5C₈-MS (4.6 mm \times 150 mm) を使用し、カラムオーブンは 40 $^{\circ}$ C に設定した。分離溶媒はアセトニトリル/0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) (33/67) を使用し、流速は 1.2 mL/min で行い、RF-20AXS 蛍光検出器を用いて free THP の蛍光 (励起波長 488 nm、最大蛍光波長 590 nm) を検出した。各組織内の THP 濃度 (P-THP と放出された free THP の合計濃度) の定量は、同様の酸性処理を行った既知濃度の free THP を用いて作成した標準曲線から算出した。

2.10. 抗腫瘍効果試験

腫瘍の直径がおおよそ 4~6 mm になった S-180 担がんマウスに、2 または 5 mg/kg (THP 当量) の各 P-THP を静脈投与し、試験期間中の腫瘍体積および体重を測定した。腫瘍体積はノギスを用いて長径 mm (L)、短径 mm (W) を測定し、計算式 [腫瘍体積 (mm^3) = $W^2 \times L / 2$] により算出した。

2.11. 正常組織への影響の検討

健常な ddY マウス (雄性、6 週齢) に各 P-THP (15 mg/kg THP 当量) を 1 回静脈注射し、投与から 1 日後、5 日後、10 日後にマウスをジエチルエーテル麻酔により安楽死させ、血液を採取し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニントランスフェラーゼ (ALT)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、クレアチンキナーゼ (CK)、血液尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE) について評価した。

3. 実験結果

3.1. 物理化学的特性

Figure 31 に 40P-THP および 90P-THP の構造を示した。90P-THP は 2 つの P-THP ユニットがジスルフィド結合を介して連結されている。また、40P-THP および 90P-THP の物理化学的特性を Table 7 にまとめた。平均分子量や多分散係数 (PDI) はゲル浸透クロマトグラフィー (Fig. 32) から算出し、40P-THP が 39000 (PDI : 2.10)、90P-THP が 93000 (PDI : 1.90) であった。THP 含有量は 40P-THP が 10.0% (wt/wt)、90P-THP が 10.4% (wt/wt) であった。これらのデータは各 P-THP を合成したチェコ共和国 科学アカデミー高分子化学研究所より提供していただいた。

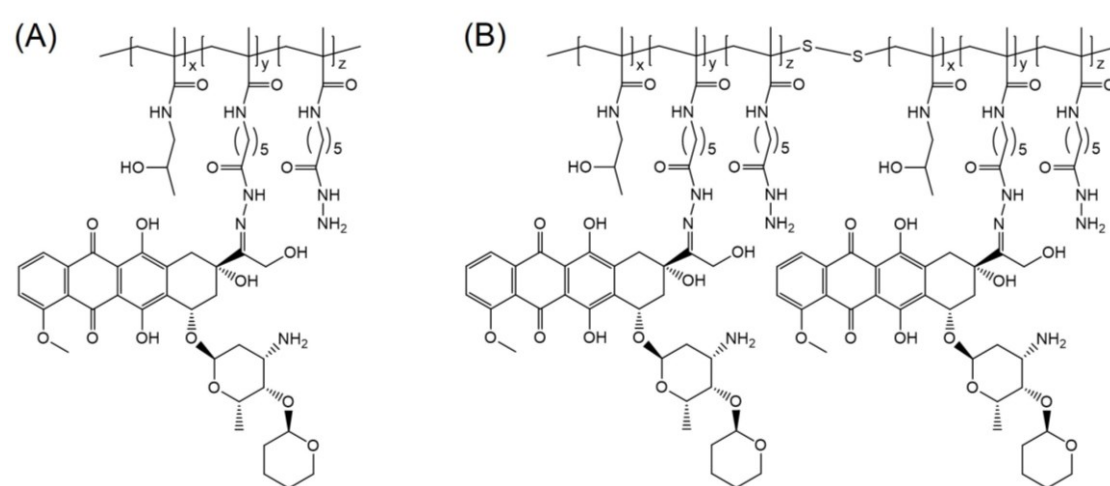


Figure 31. Structures of (A) 40P-THP and (B) 90P-THP.

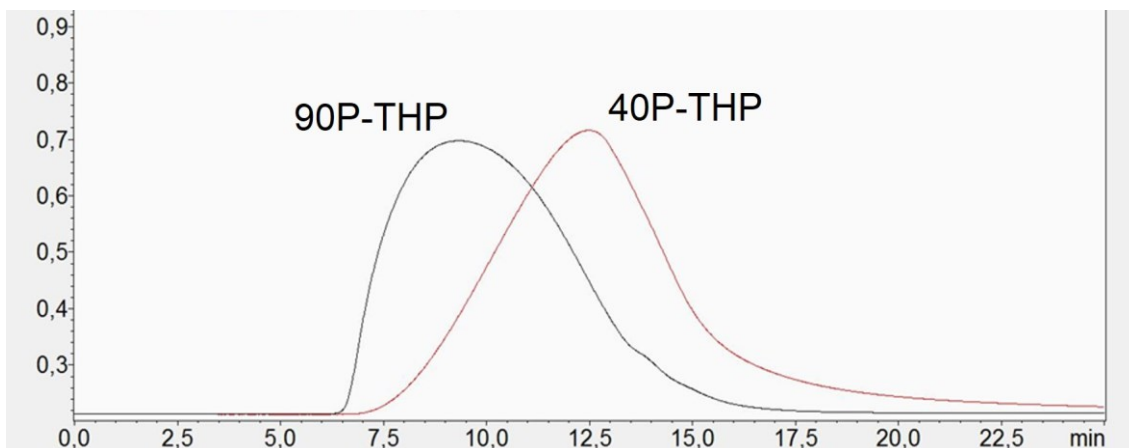


Figure 32. Gel permeation chromatography of 40P-THP and 90P-THP. The average molecular weight (Mw) and the polydispersity of the conjugates was determined with a Shimadzu HPLC system equipped with RI, UV and multiangle light scattering DAWN EOS (Wyatt Co., USA) detectors using a TSKgel G3000SWXL column (7.8 mm × 300 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of 20% 0.3M acetate buffer (pH 6.5; 0.5 g/L NaN₃) and 80 % methanol at a flow rate of 0.5 mL/min.

Table 7. Physicochemical characteristics of 40P-THP and 90P-THP.

	Mean Mw	Polydispersity index (PDI)	THP content (%(wt/wt))
40P-THP	39000	2.10	10.0
90P-THP	93000	1.90	10.4

続いて、HPLC を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって、各 P-THP の水溶液中における挙動を解析した結果、90P-THP の溶出時間は 40P-THP の溶出時間より早く、90P-THP は水溶液中で 40P-THP より大きな分子として挙動できることが示唆された (Fig. 33A)。また DLS によって PBS (pH 7.4) 中での粒子サイズを解析した結果、90P-THP は 19.4 ± 7.9 nm となり (Fig. 33B)、40P-THP (8.2 ± 1.7 nm) ⁽¹²⁾より大きいことが分かった。

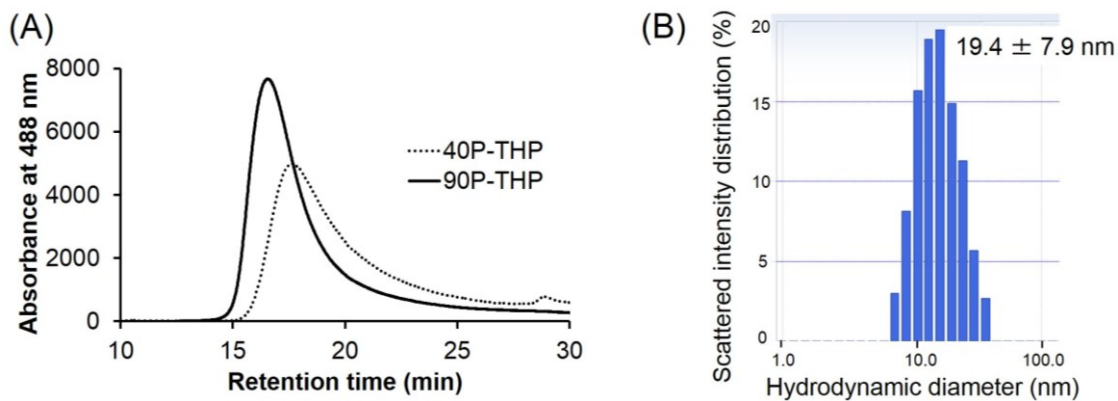


Figure 33. Molecular size of 40P-THP and 90P-THP. (A) Gel filtration chromatography by HPLC using PBS (pH 7.4) as eluate. (B) The hydrodynamic diameter of 90P-THP at 1 mg/mL in PBS (pH 7.4), measured by DLS.

3.2. P-THP からの free THP の放出性

P-THP 中の THP は、酸性条件で切断されやすいヒドラゾン結合を介して PHPMA と結合されている。そこで、40P-THP および 90P-THP をそれぞれ各 pH の緩衝液中でインキュベーションし、各 pH における P-THP からの free THP の放出性について検討した (Fig. 34)。予想通り、より酸性条件下で free THP の放出量が多くなった。24 時間後時点での 40P-THP の free THP 放出量は pH 7.4 で 18.1%、pH 6.8 で 32.9%、pH 5.5 で 60.2%であった。90P-THP では pH 7.4 で 21.1%、pH 6.8 で 32.2%、pH 5.5 で 62.8%と、40P-THP と同様の結果を示し、有意差は見られなかった。また、pH 7 以下とされている腫瘍環境での free THP 放出性を検討するため、40P-THP を用いて pH 6.0 における free THP の放出量も測定したところ、24 時間後で 55.4%と、pH 7.4 や pH 6.8 の場合より放出量が多かった。この知見は重要であり、pH 7 以下とされている腫瘍組織の酸性環境において、効率的な THP 放出が期待できると考えられる。

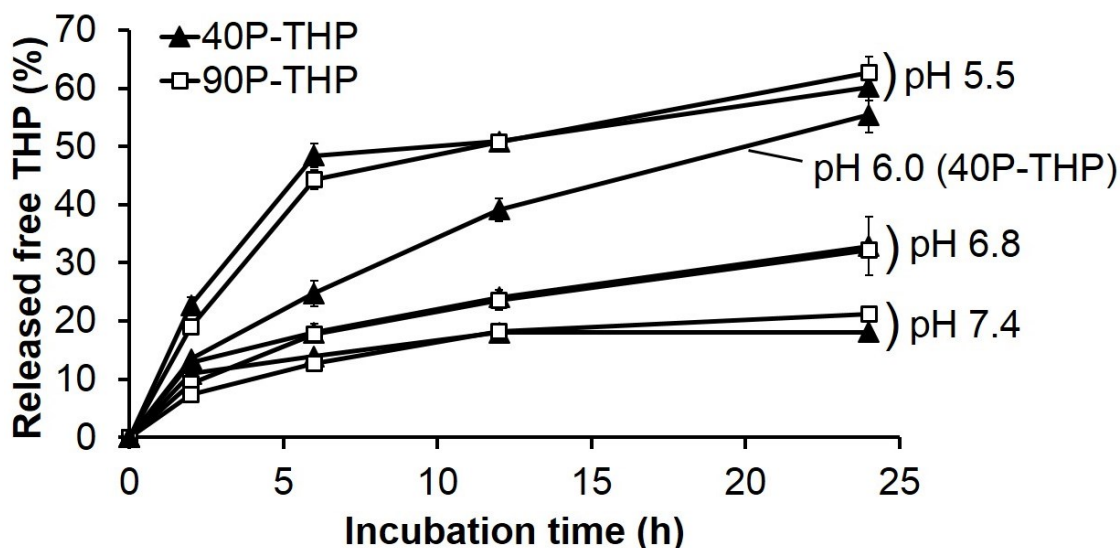


Figure 34. Release of free THP from 40P-THP and 90P-THP. 40P-THP or 90P-THP was incubated at different pHs at 37 °C respectively. At indicated time period, released free THP was determined by HPLC. Values are mean \pm S.D. (n = 3).

3.3. 40P-THP および 90P-THP の細胞毒性

40P-THP と 90P-THP の細胞毒性は、異なる pH 環境 (pH 7.4 または pH 6.8) で培養した HeLa 細胞を用いて検討した。まず pH 7.4 での IC₅₀ は、free THP で 0.07 µg/mL、40P-THP で 0.52 µg/mL (THP 当量)、90P-THP で 0.56 µg/mL (THP 当量) となり、両 P-THP の細胞毒性は free THP の約 1/8 程度であった (Fig. 35A、Table 8)。続いて pH 6.8 での IC₅₀ は、free THP で 0.08 µg/mL、40P-THP で 0.44 µg/mL (THP 当量)、90P-THP で 0.35 µg/mL (THP 当量) となった (Fig. 35B、Table 8)。40P-THP および 90P-THP 共に、酸性条件下 (pH 6.8) で中性条件下 (pH 7.4) より高い細胞毒性を示した。また、40P-THP と 90P-THP の細胞毒性を比較すると、pH 7.4 および pH 6.8 において有意な差は見られず、両 P-THP は同様の細胞毒性を示すことが分かった。

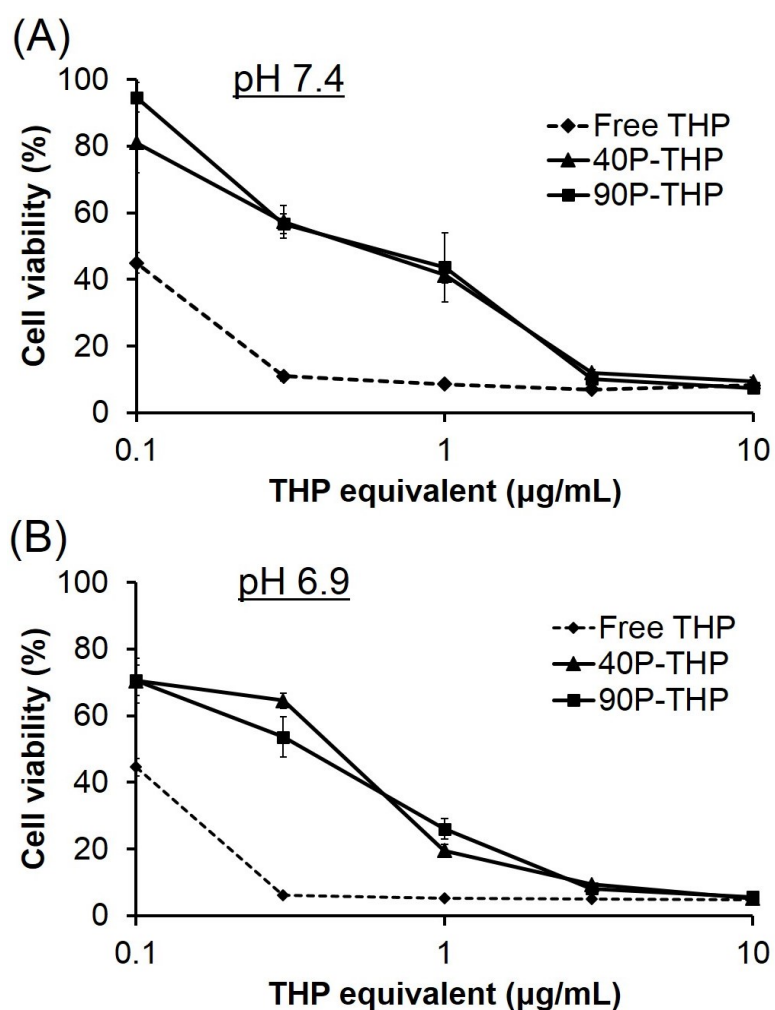


Figure 35. In vitro cytotoxicity of free THP, 40P-THP, and 90P-THP against HeLa cells at (A) pH 7.4 and (B) pH 6.8. Cells were treated with each THP derivatives for 72 h, and then MTT assay was carried out to quantify viable cells. Values are means \pm S.E.

Table 8. IC₅₀ of free THP, 40P-THP, and 90P-THP against HeLa cells at different pHs (pH 7.4 and pH 6.9).

	IC ₅₀ (µg/mL of THP equivalent)	
	pH 7.4	pH 6.9
Free THP	0.07	0.08
40P-THP	0.52	0.44
90P-THP	0.56	0.35

Data are calculated from the results in Figures 35A and 35B.

3.4. 40P-THP および 90P-THP の体内動態

S-180 腫瘍担がんマウスを用いて、40P-THP および 90P-THP の体内動態を検討した。本検討では、40P-THP と 90P-THP で free THP の放出性が同じであったことから、P-THP と放出された free THP の合計濃度を THP 濃度として測定した。Figure 36 に、S-180 腫瘍担がんマウスに 90P-THP を静脈投与してから 5、24、48、72 時間後の組織分布を示した。投与から 72 時間後まで、血中および腫瘍組織内の THP 濃度は他の正常組織内の THP 濃度より高いことが分かった。また投与から 24 時間以降では、腫瘍組織内の THP 濃度が最も高く保たれていることが分かった。

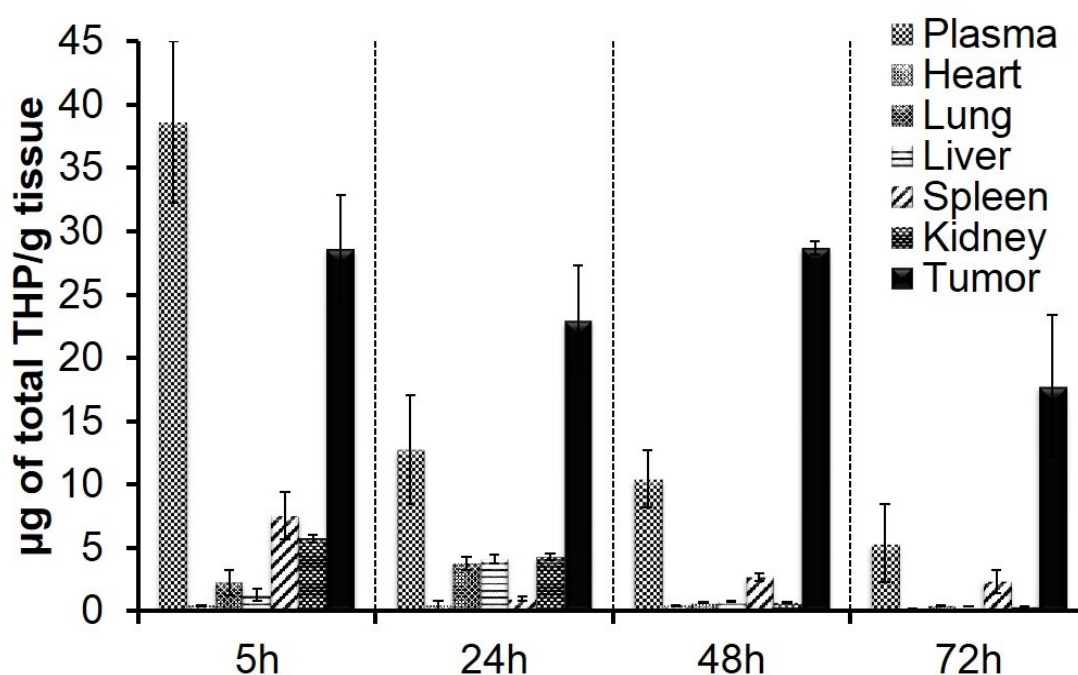


Figure 36. Tissue distribution of 90P-THP at 10 mg/kg of THP equivalent after i.v. administration in S-180 tumor bearing ddY mice. Values are mean \pm S.E. (n = 3). The level of THP conjugates in each tissue was shown as the concentration of total THP (i.e., the sum of released free THP and polymer-bound THP).

次に 40P-THP と 90P-THP の血中滞留性を比較したところ、投与から 72 時間後まで 90P-THP の方が 40P-THP より血中濃度が高く保たれ、血中滞留性が向上していることが分かった (Fig. 37A)。72 時間後までの 90P-THP の AUC は、40P-THP の 1.7 倍となった。続いて腫瘍内の THP 濃度を比較した (Fig. 37B)。いずれの時間においても、90P-THP は 40P-THP よりも高い濃度で腫瘍に集積しており、90P-THP の腫瘍内濃度は 40P-THP と比較すると、24 時間後で 2.5 倍、48 時間後で 5.0 倍、72 時間後で 3.3 倍であった。

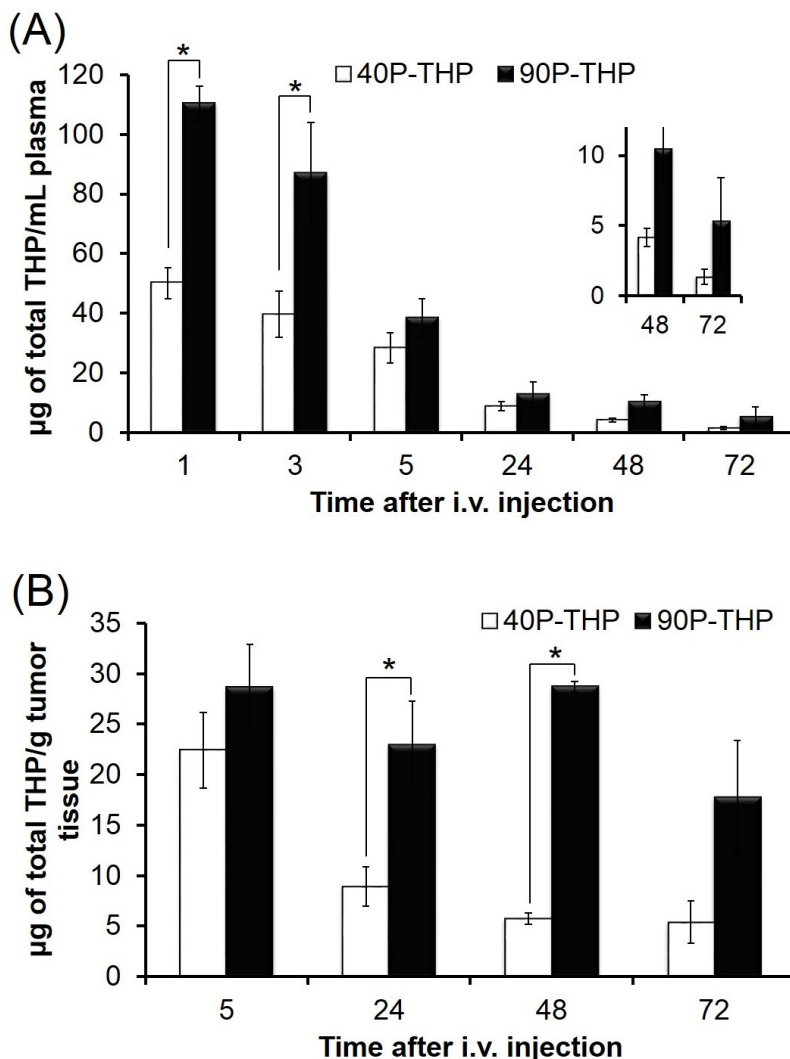


Figure 37. (A) Blood level and (B) tumor accumulation of 40P-THP and 90P-THP at 10 mg/kg of THP equivalent after i.v. administration in S-180 tumor bearing ddY mice. (A) The inset shows blood level of both drugs after i.v. administration with magnified scale. The level of THP conjugates was shown as the concentration of total THP (i.e., the sum of released free THP and polymer-bound THP). Values are mean \pm S.E. (n = 3). * $p < 0.05$, significant differences, according to Student's *t* test.

3.5. 40P-THP および 90P-THP の in vivo 抗腫瘍効果

S-180 担がんマウスに、2 または 5 mg/kg (THP 当量) の free THP、40P-THP、90P-THP をそれぞれ静脈投与して抗腫瘍効果を検討した。いずれの薬剤も、投与量依存的に腫瘍の増殖抑制効果を示し、その効果は 90P-THP が最も高く、次に 40P-THP、free THP という順であった (Fig. 38A)。また 40P-THP と 90P-THP 共にいずれの投与量においても体重減少はなく、明らかな副作用は見られなかった (Fig. 38B)。

一度腫瘍増殖を抑えたとしても、再発する場合が問題になるが、40P-THP では、いずれの投与群においても 5 匹中 2 匹のマウスで腫瘍の消失が見られ、その後明らかな再発は見られず 150 日以上生存し続けた (Fig. 38C)。さらに、90P-THP の 5 mg/kg (THP 当量) 投与群では、5 匹中 4 匹のマウスで腫瘍の消失が見られ、150 日以上生存し続けた (Fig. 38C)。

また同腫瘍モデルにおいて、40P-THP も腫瘍増殖をほとんど抑制しており⁽¹³⁾、90P-THP でも同様の結果が得られた。

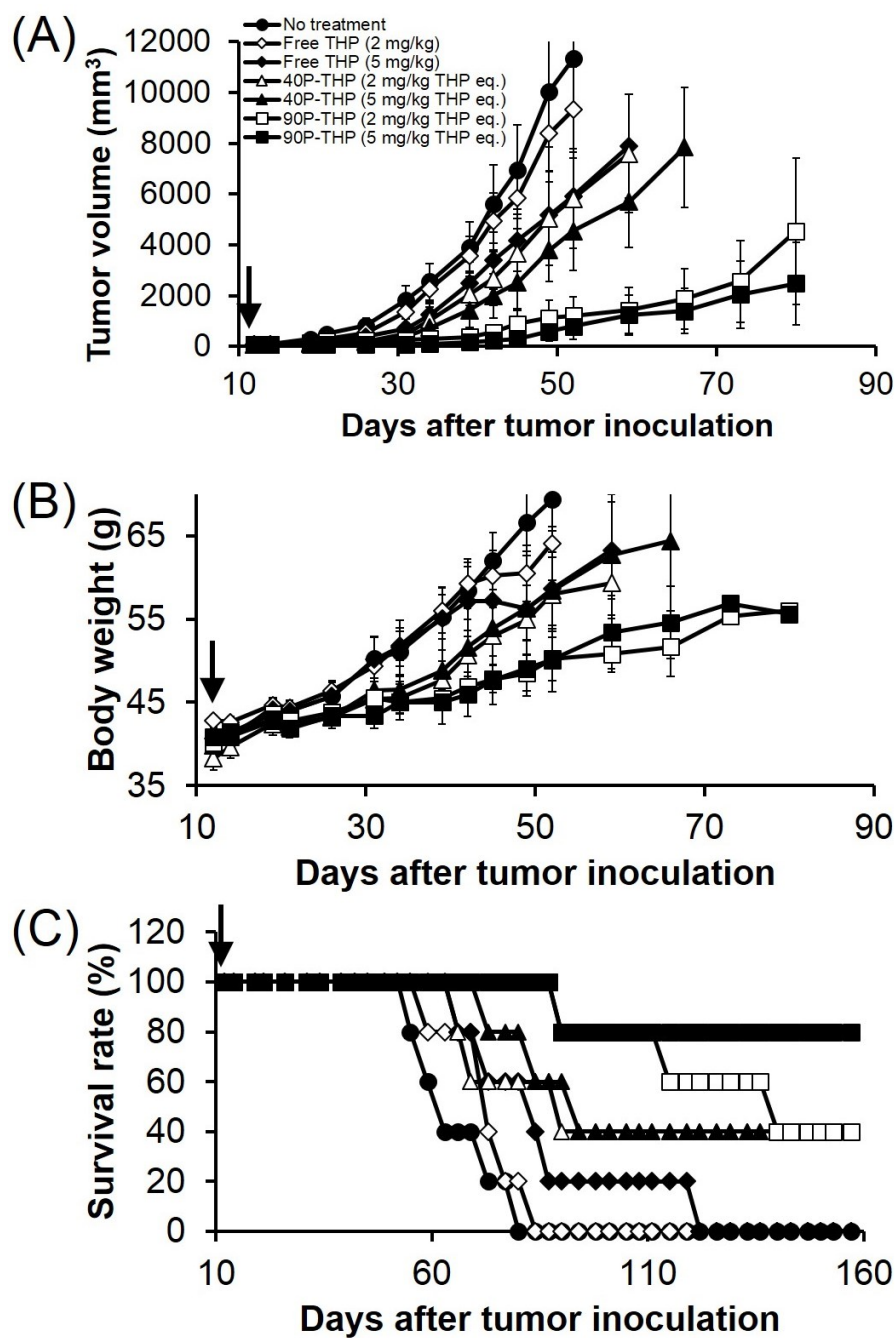


Figure 38. Antitumor effect of free THP, 40P-THP, and 90P-THP against S-180 tumor in male ddY mice in vivo. Vertical arrows indicate injection time of drugs. Values are means \pm S.E. (n = 5). (A) Antitumor effect of THP, 40P-THP, and 90P-THP in S-180 tumor bearing mice. Mice were treated by THP derivatives at 2 or 5 mg/kg of THP equivalent. (B) Body weight change of ddY mice after treatment above (A). (C) Survival rate of S-180 bearing ddY mice after treatment above (A). Symbols in (B) and (C) are same as in (A).

3.6. 40P-THP と 90P-THP の毒性および正常組織への影響

40P-THP および 90P-THP の半数致死量 (Lethal Dose, 50%、LD₅₀) を求めるため、健常な ddY マウス (雄性、6 週齢) に 20、40、60、80 mg/kg (THP 当量) の各 P-THP を静脈投与し、体重の変化や死亡率を検討した。体重減少は投与量依存的であり、同じ投与量では 90P-THP の方が 40P-THP より体重減少が大きくなった (Fig. 39A、B)。また、死亡率も 90P-THP の方がやや高く、LD₅₀ は 40P-THP で 50.0 mg/kg (THP 当量)、90P-THP で 37.3 mg/kg (THP 当量) となった (Table 9)。

次に 40P-THP および 90P-THP の正常組織への影響を検討するため、健常な ddY マウス (雄性、6 週齢) に、free THP は 5 mg/kg (MTD に相当)、40P-THP および 90P-THP は 15 mg/kg (THP 当量) を静脈投与した。いずれの薬剤においても、肝機能や腎機能への影響はなかったが、CK のかすかな上昇が見られた (Table 10)。しかし、両 P-THP の投与量は free THP の 3 倍であるにも関わらず、心毒性に大きな差はなかった。また重要な知見として、正常組織への影響は両 P-THP 間で大きな差はなく、有意差が見られなかったこと、そして体重減少がなかったことが挙げられる。

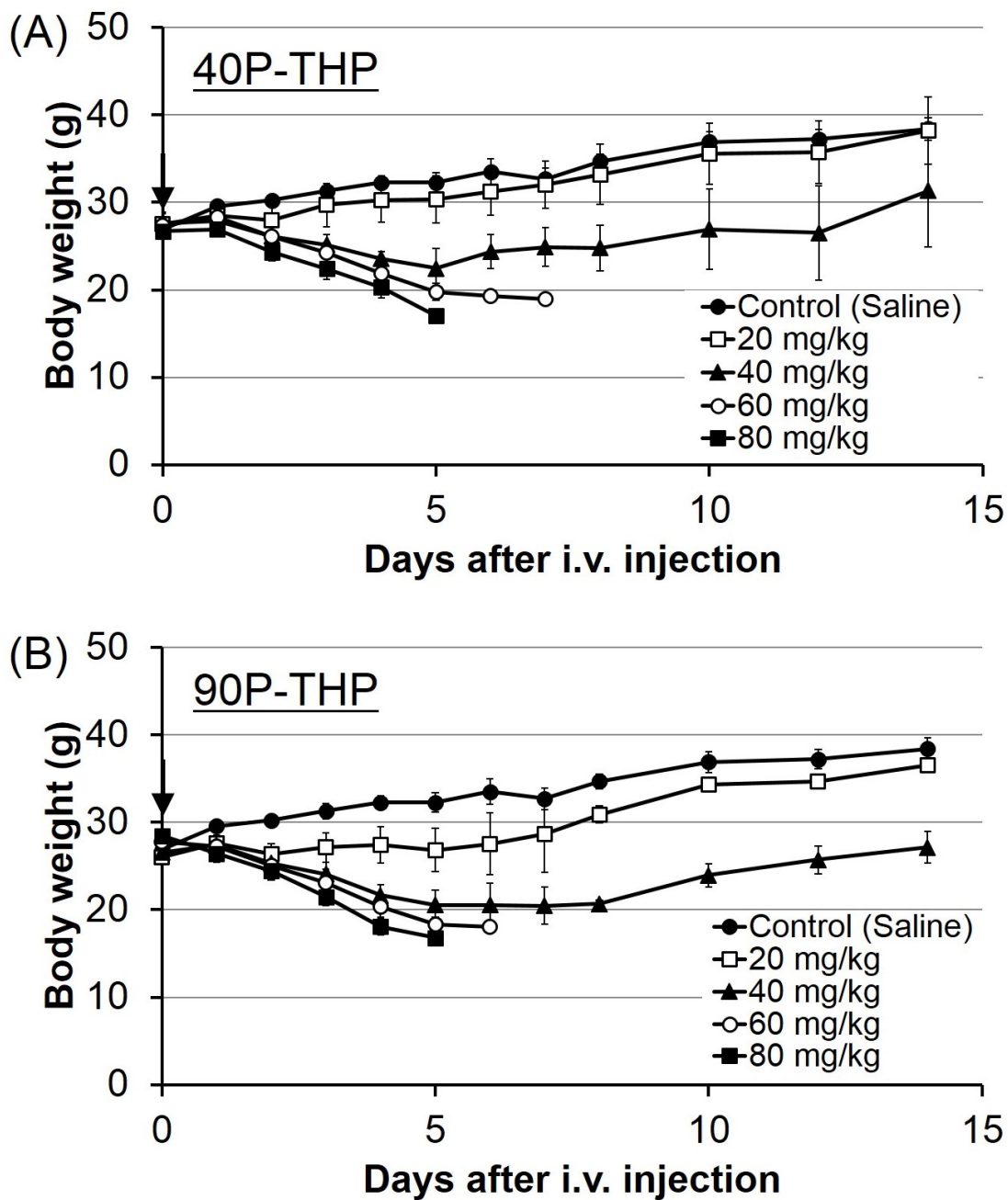


Figure 39. Body weight change of healthy normal male ddY mice after administration of (A) 40P-THP and (B) 90P-THP at different doses (20, 40, 60, or 80 mg/kg of THP equivalent). Vertical arrow indicates injection time of drugs. Values are means \pm S.E. (n = 5).

Table 9. Mortality in mice after i.v. administration of 40P-THP or 90P-THP, and MTD of 40P-THP or 90P-THP.

	Dose of drugs (mg/kg of THP equivalent)	Mortality	LD ₅₀ (mg/kg of THP equivalent)
40P-THP	20	0/6	50.0
	40	0/6	
	60	6/6	
	80	6/6	
90P-THP	20	1/6	37.3
	40	3/6	
	60	6/6	
	80	6/6	

Table 10. Influence of free THP, 40P-THP, and 90P-THP on liver, heart, kidney functions.

Dose of drugs	Time after i.v.	CK (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)
Control (no drug)		18.8 ± 2.3	34.0 ± 2.3	163.0 ± 16.2	27.7 ± 0.8	0.10 ± 0.00
Free THP ^a (5 mg/kg) i.v.	1 day	62.0 ± 19.9	34.5 ± 1.0	193.5 ± 12.8	20.7 ± 1.8	0.10 ± 0.01
	5 days	Not tested	30.3 ± 1.7	173.8 ± 13.5	27.3 ± 1.1	0.11 ± 0.01
	10 days	71.8 ± 9.6*	33.3 ± 2.3	186.5 ± 21.2	31.6 ± 3.1	0.11 ± 0.01
40P-THP ^b (15 mg/kg of THP equivalent) i.v.	1 day	68.3 ± 20.5	34.5 ± 2.5	215.5 ± 14.1	21.8 ± 1.1	0.11 ± 0.01
	5 days	Not tested	30.3 ± 1.6	176.5 ± 13.1	25.3 ± 2.4	0.10 ± 0.01
	10 days	73.5 ± 14.6*	32.3 ± 1.7	172.3 ± 24.3	34.6 ± 2.7	0.11 ± 0.01
90P-THP ^b (15 mg/kg of THP equivalent) i.v.	1 day	65.5 ± 19.1	31.8 ± 0.8	165.5 ± 9.2	24.4 ± 2.0	0.10 ± 0.01
	5 days	Not tested	30.0 ± 1.2	159.0 ± 10.6	25.1 ± 1.6	0.11 ± 0.00
	10 days	60.8 ± 5.3*	30.5 ± 0.9	164.0 ± 6.1	28.7 ± 1.6	0.10 ± 0.00

The analyses were carried out at 1 day, 5 days, and 10 days after drug administration. Values are means ± S.E. (n = 4). **p* < 0.05, significant differences from untreated control group, according to Student's *t* test. CK, creatine kinase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine.

^a 5 mg/kg was given i.v.. THP at 5 mg/kg is about MTD.

^b 15 mg/kg of THP equivalent was given i.v..

4. 考察

本検討では、平均分子量約 4 万の P-THP (40P-THP、Fig. 31A) と、diblock 型である平均分子量約 9 万の P-THP (90P-THP、Fig. 31B) の比較検討を行った。PHPMA の分子量を大きくする方法には直鎖状ポリマーだけでなく、分枝ポリマーやグラフトポリマーを用いる方法もあるが、分枝鎖やグラフトポリマーを正確に制御することは難しく、分子量分布が大きくなるなどの問題がある。

40P-THP および 90P-THP 共に、酸性条件で切断されやすいヒドラゾン結合を介して、THP が結合されているが、free THP の放出量に有意差はなく、平均分子量に違いがあっても同様の放出性を示すことが明らかになった (Fig. 34)。デンドリマーを利用した平均分子量約 400 kDa の 400P-THP も、40P-THP と同様の放出性を示すことが報告されている⁽¹³⁾。いずれの場合においても、すべての THP 分子は PHPMA にヒドラゾン結合を介して結合されており、ヒドラゾン結合の加水分解に分子量の違いは影響しなかったと考えられる。

40P-THP と 90P-THP の細胞毒性に関して検討したところ、いずれの P-THP も中性条件下 (pH 7.4) より酸性条件下 (pH 6.8) で細胞毒性が強くなった (Fig. 35、Table 8)。この結果は free THP の放出性と一致する。酸性条件下では、塩基性薬物 DOX の細胞毒性は減弱することが知られており⁽¹⁰²⁾、P-THP の細胞毒性が酸性条件下で増強することは、塩基性薬物 free THP よりも優れている点であり、腫瘍選択性において有用である。また、P-THP では主に細胞外で放出された free THP が取り込まれること⁽¹²⁾、40P-THP と 90P-THP で free THP の放出性に違いがないことから、40P-THP と 90P-THP は同程度の細胞毒性を発揮したと考えられる。

40P-THP と 90P-THP の重要な違いは挙動サイズや体内動態試験、さらに抗腫瘍効果において見られた。ゲルろ過クロマトグラフィーや DLS によって、90P-THP (19.4 nm) は EPR 効果による選択的な腫瘍集積性が期待できる大きさで、40P-THP (8.2 nm) より大きな分子として挙動できることが示唆された。

90P-THP の体内分布を見ると、24 時間以降で腫瘍への集積が最も多く、EPR 効果による腫瘍選択的な集積性が見られた (Fig. 36)。続いて、血中滞留性と腫瘍集積性を比較したが、90P-THP では血中滞留性の向上 (AUC : 1.7 倍) と共に、腫瘍集積性の向上が見られ、投与から 24 時間後以降で 40P-THP の 2.5 倍以上の濃度で腫瘍組織に集積していた (Fig. 37)。

このように 90P-THP の腫瘍集積性が、40P-THP と比較して優れていることから、in vivo 抗腫瘍活性も 90P-THP の方が優れていた (Fig. 38A)。さらに、同じ投与量においてはもちろんのこと、90P-THP の 2 mg/kg (THP 当量) 投与の方が、40P-THP の 5 mg/kg (THP 当量)

投与より優れた腫瘍増殖抑制効果を示した (Fig. 38A)。同腫瘍モデルにおいて、400P-THP も腫瘍増殖をほとんど抑制しており、つまり 90P-THP も同様の結果が得られたと言える。また 90P-THP では体重減少などの明らかな毒性は見られず、高い治療効果および延命効果を発揮した (Fig. 38)。また 5 mg/kg は、free THP では MTD に相当する。

LD₅₀ を比較すると、40P-THP の LD₅₀ は 50.0 mg/kg、90P-THP の LD₅₀ は 37.3 mg/kg (Fig. 39、Table 9)、また 400P-THP の LD₅₀ は 23.4 mg/kg⁽¹³⁾ であり、90P-THP は 40P-THP よりやや毒性が高いが、400P-THP より低毒性であることが示唆された。P-THP からは、中性条件下でも一定量の free THP 放出が見られ (Fig. 34)、血液中においても free THP の放出が起これると考えられる。血液循環中に放出された free THP は、高分子より正常組織に分布しやすくなると考えられるが、このことが毒性の原因ではないかと考え、40P-THP と 90P-THP の正常臓器への影響について検討した。その結果、両 P-THP とも肝臓や腎臓には大きな影響はなかったが、心臓にかすかな影響が見られた (Table 10)。しかし、投与量が 1/3 の free THP と同程度であったことから、free THP より心臓に及ぼす影響は小さいことが示唆された。さらに 40P-THP と 90P-THP 間で有意な差は見られず、15 mg/kg (THP 当量) では正常組織への影響に違いがないことが分かった。よって、低投与量 (例えば LD₅₀ の 1/2 以下) では、正常組織への影響や毒性に差が見られないと考えられる。さらに本検討で、90P-THP は 2 mg/kg (THP 当量) 投与においても 40P-THP の 5 mg/kg (THP 当量) 投与より優れた抗腫瘍効果を発揮したことから、副作用の少ない低用量でも治療効果が期待でき、頻回投与などの工夫が有用だと考えられる。

90P-THP は、free THP の放出性や細胞毒性に関しては 40P-THP と変わらなかったが、40P-THP よりも大きな分子として挙動できることから、血中滞留性の向上および腫瘍集積性の向上が実現できた。その結果、90P-THP はより高い抗腫瘍効果を示すことができたと考えられる。さらに 400P-THP より低毒性であること、治療に用いた投与量で 40P-THP と毒性が変わらないことが示唆された。また 40P-THP より低投与量で抗腫瘍効果が高かった。以上の結果より、90P-THP はより優れた腫瘍選択性と抗腫瘍活性を有する高分子化抗がん剤になりうると期待できる。

第5章 総括

低分子抗がん剤は、高い細胞毒性（制がん作用）を有するものの、副作用も強いものも多く、がん患者の QOL 低下や投与量の制限などの問題が生じる。そこで、低分子抗がん剤の腫瘍選択性を高めることができれば、治療効果の向上および副作用の低減につながると考えられる。本研究では、生体親和性を有する高分子物質が腫瘍組織に選択的に集積する現象、「EPR 効果」に着目して検討を実施した。この EPR 効果は、多くの固形腫瘍において普遍的に見られる現象で、低分子抗がん剤を高分子化することで得られる大きな利点である^(5,6)。

本研究では、PEG、SMA、PHPMA といったポリマーに、低分子抗がん剤を結合させることで種々の高分子化抗がん剤を作製した。PEG に関しては、PEG 化インターフェロン α （ペガシス®など）や DOX 内包 PEG 化リポソーム（ドキシル®）などすでに臨床で用いられており^(19,103)、SMA に関しては、SMANCS®がすでに臨床で用いられている⁽¹⁰⁴⁾。また PHPMA に関しては、P-DOX などの臨床試験が行われている⁽¹⁰⁵⁾。これらのことから、本研究で用いた3種のポリマーは安全性や生体親和性が高いものであると考えられる。

種々の高分子化抗がん剤において、体内分布や EPR 効果に基づく選択的な腫瘍集積性に関しては、PHPMA を用いた 90P-THP が最も優れており、PEG-ZnPP や SMA-THP conjugate で見られた肝臓などの正常組織への分布が最も少なかった。さらに腫瘍環境選択的な free THP の放出が可能であり、高い腫瘍選択性を有していると考えられる。

SMA は両親媒性ポリマーで、SMANCS®を油性造影剤リピオドール®に溶解させることが可能になり、がんの栄養動脈から投与することで、静脈投与の場合より高い標的腫瘍組織への集積を得られること、さらに診断と治療を同時に行えることが報告されている⁽¹⁰⁶⁾。両親媒性を持つポリマーを用いれば、油性製剤化による動脈投与や経口投与など様々な応用方法が考えられ^(106,107)、肝臓集積性という欠点を補える可能性が期待できる。

また、我々の研究グループでは、SMANCS®が高いリンパ移行性を有することから、がんのリンパ節転移を抑制したことを報告しており⁽⁸³⁻⁸⁵⁾、肝臓への集積やリンパ節への集積は、がん転移の抑制に有効な可能性がある。加えて第3章でも述べたように、EPR 効果によってエバンスブルーが肺の転移巣に集積できることを明らかにしている。当然ながら、各高分子化抗がん剤の組織分布と転移抑制効果など、今後の検討も必要である。

本研究では、低分子抗がん剤をポリマーと結合させることによって高分子化を試みたが、例えばリポソーム製剤も高分子キャリアーとして広く用いられている。実際にドキシル

⑧が臨床で用いられており、血中に長時間滞留し、EPR 効果による高い腫瘍集積性を可能にしている⁽¹⁰³⁾。ところが、リポソームの安定性が高すぎて、腫瘍組織に集積後もリポソームから DOX が遊離できず、治療効果が低くなることが報告されている^(108,109)。多くの抗がん剤の標的分子は、DNA やトポイソメラーゼなどで細胞内に存在することから、腫瘍組織特異的な薬物放出は、細胞内取り込みや抗腫瘍活性において非常に重要である。本研究において、esPEG-ZnPP や 90P-THP が、腫瘍組織選択的に活性本体を放出できることを明らかにしており、細胞外で切断されうるエステル結合やヒドラゾン結合の利用は有効であると考えられる。一方、SMA-THP conjugate では効率的な free THP の放出が見られなかったが、エステル結合やヒドラゾン結合を利用することで細胞内取り込みの改善が期待できると考えられる。ただし、肝臓などへの集積も多かったことから、副作用とのバランスなど今後の検討が必要である。

その他の高分子化には、例えばミセル化剤もある。我々の研究グループにおいて以前に、ZnPP を非共有結合で SMA に内包させた ZnPP 内包型 SMA ミセルを開発したが、血中滞留性や腫瘍集積性が不十分であった⁽⁴⁰⁾。そこで我々は、ZnPP を SMA に共有結合させた SMA-ZnPP conjugate を合成し、EPR 効果によって高い腫瘍集積性を得られることを報告した⁽¹¹⁰⁾。この SMA-ZnPP conjugate における成果および第3章の SMA-THP conjugate における成果は、低分子化抗がん剤を SMA conjugate により高分子化できることを明らかにし、SMA を用いた高分子化抗がん剤開発において重要な知見になると考えられる。

がん治療において、治療薬を1回投与するだけで完治すれば理想的であるが、副作用の少ない高分子化抗がん剤では、複数回投与や併用などを検討することも重要と考える。例えば、第2章で用いた ZnPP は、腫瘍細胞の HO-1 の作用を阻害し、抗酸化作用や抗アポトーシス作用を減弱させて、DOX などの抗腫瘍効果を増強させることが報告されている⁽¹¹¹⁾。したがって、PEG-ZnPP と SMA-THP conjugate や 90P-THP の併用効果が期待できるのではないかと考えられる。

また、腫瘍に高発現しているレセプターによって取り込まれるリガンド、例えば葉酸でナノ粒子を修飾し、腫瘍選択性を高める研究が行われているが、葉酸は全ての腫瘍細胞に普遍的に発現しているわけではなく、期待された効果が見られない場合も報告されている⁽¹¹²⁾。このようなりガンドを用いるアクティブターゲティングと呼ばれる手法においても、EPR 効果による腫瘍組織への漏出が第一条件である。しかし、実際の腫瘍環境は多様であり、血栓などにより血流が確保されず、EPR 効果が不十分な場合もある⁽¹¹³⁾。そこで EPR 効果を増強させる方法を併用することも重要だと考える。これまでに、ニトログリセリン、アンジオテ

ンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン II、一酸化炭素放出剤、S-ニトロソ化アルブミン（SNO アルブミン）などが EPR 効果を増強することが報告されている⁽¹¹⁴⁻¹¹⁹⁾。

高分子化抗がん剤を用いるがん治療においては、まず高い腫瘍選択性を有する高分子化抗がん剤の開発が必要不可欠である。そのうえで、例えば投与量や投与方法、複数の高分子化抗がん剤の併用、EPR 効果の増強法との併用など工夫することで、有効かつ安全ながん治療法の開発につながることが期待される。本研究では、種々の高分子化抗がん剤において、EPR 効果や腫瘍特異的な環境を生かした高い腫瘍選択性、さらには副作用の低減や抗腫瘍効果の向上が確認された。そして、高分子化抗がん剤はがん患者の QOL を低下させない治療が期待できることが示唆された。本研究で得られた知見は、高分子化抗がん剤開発に関する基盤的資料となり、高い腫瘍選択性を有する高分子化抗がん剤の開発への一助となるものと考えられる。

参考文献

- 1 Nurgalieva Z, Liu C-C, Du XL. Chemotherapy use and risk of bone marrow suppression in a large population-based cohort of older women with breast and ovarian cancer. *Med Oncol* 2011; **28**: 716–725.
- 2 Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P *et al*. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science (80-)* 2006; **314**: 268–274.
- 3 Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJM, Schrama JG, Erdkamp FLG, Vos AH, van Groenigen CJ, Sinnige HAM, Richel DJ, Voest EE, Dijkstra JR, Vink-Börger ME *et al*. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; **360**: 563–572.
- 4 Luo C, Lv M, Li Y, Liu P, Yang J. Gefitinib-induced interstitial pneumonia: A case report and review of the literature. *Exp Ther Med* 2014; **7**: 855–859.
- 5 Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986; **46**: 6387–6392.
- 6 Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; **63**: 136–151.
- 7 Maeda H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; **91**: 3–6.
- 8 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**: 71–79.
- 9 Bertrand N, Leroux J-C. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. *J Control Release* 2012; **161**: 152–163.
- 10 Hatakeyama H, Akita H, Kogure K, Oishi M, Nagasaki Y, Kihira Y, Ueno M, Kobayashi H, Kikuchi H, Harashima H. Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Gene Ther* 2007; **14**: 68–77.
- 11 Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; **63**: 152–160.
- 12 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; **174**: 81–87.

- 13 Nakamura H, Koziolová E, Etrych T, Chytil P, Fang J, Ulbrich K, Maeda H. Comparison between linear and star-like HPMA conjugated pirarubicin (THP) in pharmacokinetics and antitumor activity in tumor bearing mice. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; **90**: 90–96.
- 14 Elvira C, Gallardo A, Roman JS, Cifuentes A. Covalent polymer-drug conjugates. *Molecules* 2005; **10**: 114–125.
- 15 Hoffman AS. The origins and evolution of ‘controlled’ drug delivery systems. *J Control Release* 2008; **132**: 153–163.
- 16 Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; **71**: 409–419.
- 17 Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990; **268**: 235–237.
- 18 Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* 2006; **1**: 297–315.
- 19 Zeuzem S, Feinman S V, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O’Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda MJ. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1666–1672.
- 20 Vicent MJ, Ringsdorf H, Duncan R. Polymer therapeutics: clinical applications and challenges for development. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; **61**: 1117–1120.
- 21 Terada T, Iwai M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting. *J Control Release* 2006; **111**: 333–342.
- 22 Xu H, Deng Y, Chen D, Hong W, Lu Y, Dong X. Esterase-catalyzed dePEGylation of pH-sensitive vesicles modified with cleavable PEG-lipid derivatives. *J Control Release* 2008; **130**: 238–245.
- 23 Walker GF, Fella C, Pelisek J, Fahrmeir J, Boeckle S, Ogris M, Wagner E. Toward synthetic viruses: endosomal pH-triggered deshielding of targeted polyplexes greatly enhances gene transfer in vitro and in vivo. *Mol Ther* 2005; **11**: 418–425.
- 24 Guiotto A, Canevari M, Orsolini P, Lavanchy O, Deuschel C, Kaneda N, Kurita A, Matsuzaki T, Yaegashi T, Sawada S, Veronese FM. Synthesis, characterization, and preliminary in vivo tests of new poly(ethylene glycol) conjugates of the antitumor agent 10-amino-7-ethylcamptothecin. *J Med Chem* 2004; **47**: 1280–1289.
- 25 Ishida T, Ichihara M, Wang X, Yamamoto K, Kimura J, Majima E, Kiwada H. Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* 2006; **112**: 15–25.
- 26 Ishida T, Kiwada H. Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *Int J Pharm* 2008; **354**: 56–62.

- 27 Abu Lila AS, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. *J Control Release* 2013; **172**: 38–47.
- 28 Ishihara T, Maeda T, Sakamoto H, Takasaki N, Shigyo M, Ishida T, Kiwada H, Mizushima Y, Mizushima T. Evasion of the accelerated blood clearance phenomenon by coating of nanoparticles with various hydrophilic polymers. *Biomacromolecules* 2010; **11**: 2700–2706.
- 29 Abu Lila AS, Nawata K, Shimizu T, Ishida T, Kiwada H. Use of polyglycerol (PG), instead of polyethylene glycol (PEG), prevents induction of the accelerated blood clearance phenomenon against long-circulating liposomes upon repeated administration. *Int J Pharm* 2013; **456**: 235–242.
- 30 Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, Shibahara S, Ogawa M, Maeda H. Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer* 1999; **80**: 1945–1954.
- 31 Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, Miyamoto Y, Maeda H. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br J Cancer* 2003; **88**: 902–909.
- 32 Sato K, Ito K, Kohara H, Yamaguchi Y, Adachi K, Endo H. Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2525–2533.
- 33 Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 2004; **9**: 27–35.
- 34 Mayerhofer M, Gleixner K V, Mayerhofer J, Hoermann G, Jaeger E, Aichberger KJ, Ott RG, Greish K, Nakamura H, Derdak S, Samorapoompichit P, Pickl WF, Sexl V, Esterbauer H *et al.* Targeting of heat shock protein 32 (Hsp32)/heme oxygenase-1 (HO-1) in leukemic cells in chronic myeloid leukemia: a novel approach to overcome resistance against imatinib. *Blood* 2008; **111**: 2200–2210.
- 35 Yang G, Nguyen X, Ou J, Rekulapelli P, Stevenson DK, Dennery PA. Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. *Blood* 2001; **97**: 1306–1313.
- 36 Sahoo SK, Sawa T, Fang J, Tanaka S, Miyamoto Y, Akaike T, Maeda H. Pegylated zinc protoporphyrin: a water-soluble heme oxygenase inhibitor with tumor-targeting capacity. *Bioconjug Chem* 2002; **13**: 1031–1038.
- 37 Fang J, Sawa T, Akaike T, Akuta T, Sahoo SK, Khaled G, Hamada A, Maeda H. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res* 2003; **63**: 3567–3574.
- 38 Iyer AK, Greish K, Seki T, Okazaki S, Fang J, Takeshita K, Maeda H. Polymeric micelles of zinc protoporphyrin for tumor targeted delivery based on EPR effect and singlet oxygen generation. *J Drug Target* 2007; **15**: 496–506.
- 39 Nakamura H, Fang J, Gahininath B, Tsukigawa K, Maeda H. 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* 2011; **155**: 367–375.
- 40 Fang J, Greish K, Qin H, Liao L, Nakamura H, Takeya M, Maeda H. 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 Biopharm* 2012; **81**: 540–547.
- 41 Bahar FG, Ohura K, Ogihara T, Imai T. Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma. *J Pharm Sci* 2012; **101**: 3979–3988.
- 42 Tannock IF, Rotin D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res* 1989; **49**: 4373–4384.
- 43 Gerweck LE, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res* 1996; **56**: 1194–1198.
- 44 Rakash S. Role of proteases in cancer: A review. *Biotechnol Mol Biol Rev* 2012; **7**: 90–101.
- 45 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**: 191–198.
- 46 Aboul-Fadl T, Sheha M, El-Azab A, Abdel-Aziz H. Amantadine Amides Prodrugs as Hepatic Delivery Systems to Enhance its Activity against HCV. *Dig J Nanomater Biostructures* 2011; **6**: 1675–1683.
- 47 Li CJ, Miyamoto Y, Kojima Y, Maeda H. Augmentation of tumour delivery of macromolecular drugs with reduced bone marrow delivery by elevating blood pressure. *Br J Cancer* 1993; **67**: 975–980.
- 48 Oberst MD, Johnson MD, Dickson RB, Lin C, Singh B, Stewart M, Williams A, Al-Nafussi A, Smyth JF, Gabra H, Sellar GC. Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 1101–1107.
- 49 Jessup JM. Cathepsin B and other proteases in human colorectal carcinoma. *Am J Pathol* 1994; **145**: 253–262.
- 50 Masuda T, Akita H, Niikura K, Nishio T, Ukawa M, Enoto K, Danev R, Nagayama K, Ijiro K, Harashima H. Envelope-type lipid nanoparticles incorporating a short PEG-lipid conjugate for improved control of intracellular trafficking and transgene transcription. *Biomaterials* 2009; **30**: 4806–4814.
- 51 Kuai R, Yuan W, Qin Y, Chen H, Tang J, Yuan M, Zhang Z, He Q. Efficient delivery of payload into tumor cells in a controlled manner by TAT and thiolytic cleavable PEG co-modified liposomes. *Mol Pharm* 2010; **7**: 1816–1826.

- 52 Koren E, Apte A, Jani A, Torchilin VP. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. *J Control Release* 2012; **160**: 264–273.
- 53 Mok H, Bae KH, Ahn C, Park TG. PEGylated and MMP-2 specifically dePEGylated quantum dots: comparative evaluation of cellular uptake. *Langmuir* 2009; **25**: 1645–1650.
- 54 Wichitnithad W, Nimmannit U, Callery PS, Rojsitthisak P. Effects of different carboxylic ester spacers on chemical stability, release characteristics, and anticancer activity of mono-PEGylated curcumin conjugates. *J Pharm Sci* 2011; **100**: 5206–5218.
- 55 Umezawa H, Takahashi Y, Kinoshita M, Naganawa H, Masuda T, Ishizuka M, Tatsuta K, Takeuchi T. Tetrahydropyranyl derivatives of daunomycin and adriamycin. *J Antibiot (Tokyo)* 1979; **32**: 1082–1084.
- 56 Kizek R, Adam V, Hrabeta J, Eckschlager T, Smutny S, Burda J V, Frei E, Stiborova M. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances. *Pharmacol Ther* 2012; **133**: 26–39.
- 57 Zheng S, Xiong S, Lin F, Qiao G, Feng T, Shen Z, Min D, Zhang C, Yao Y. Pirarubicin inhibits multidrug-resistant osteosarcoma cell proliferation through induction of G2/M phase cell cycle arrest. *Acta Pharmacol Sin* 2012; **33**: 832–838.
- 58 Kunimoto S, Miura K, Takahashi Y, Takeuchi T, Umezawa H. Rapid uptake by cultured tumor cells and intracellular behavior of 4'-O-tetrahydropyranyladriamycin. *J Antibiot (Tokyo)* 1983; **36**: 312–317.
- 59 Koh E, Ueda Y, Nakamura T, Kobayashi A, Katsuta S, Takahashi H. Apoptosis in young rats with adriamycin-induced cardiomyopathy—comparison with pirarubicin, a new anthracycline derivative. *Pediatr Res* 2002; **51**: 256–259.
- 60 Kunimoto S, Miura K, Umezawa K, Xu CZ, Masuda T, Takeuchi T, Umezawa H. Cellular uptake and efflux and cytostatic activity of 4'-O-tetrahydropyranyladriamycin in adriamycin-sensitive and resistant tumor cell lines. *J Antibiot (Tokyo)* 1984; **37**: 1697–1702.
- 61 Greish K, Sawa T, Fang J, Akaike T, Maeda H. SMA-doxorubicin, a new polymeric micellar drug for effective targeting to solid tumours. *J Control Release* 2004; **97**: 219–230.
- 62 Iyer AK, Greish K, Fang J, Murakami R, Maeda H. High-loading nanosized micelles of copoly(styrene-maleic acid)-zinc protoporphyrin for targeted delivery of a potent heme oxygenase inhibitor. *Biomaterials* 2007; **28**: 1871–1881.
- 63 Inoue M, Ebashi I, Watanabe N, Morino Y. Synthesis of a superoxide dismutase derivative that circulates bound to albumin and accumulates in tissues whose pH is decreased. *Biochemistry* 1989; **28**: 6619–6624.
- 64 Kobayashi A, Oda T, Maeda H. Protein Binding of Macromolecular Anticancer Agent SMANCS: Characterization of Poly(styrene-co-maleic acid) Derivatives as an Albumin

- Binding Ligand. *J Bioact Compat Polym* 1988; **3**: 319–333.
- 65 Greish K, Nagamitsu A, Fang J, Maeda H. Copoly(styrene-maleic acid)-pirarubicin micelles: high tumor-targeting efficiency with little toxicity. *Bioconjug Chem* 2005; **16**: 230–236.
- 66 Yeo Y, Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res* 2004; **27**: 1–12.
- 67 Hasan AS, Socha M, Lamprecht A, Ghazouani F El, Sapin A, Hoffman M, Maincent P, Ubrich N. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *Int J Pharm* 2007; **344**: 53–61.
- 68 Kaminskis LM, McLeod VM, Porter CJH, Boyd BJ. Association of chemotherapeutic drugs with dendrimer nanocarriers: an assessment of the merits of covalent conjugation compared to noncovalent encapsulation. *Mol Pharm* 2012; **9**: 355–373.
- 69 Lee SJ, Koo H, Jeong H, Huh MS, Choi Y, Jeong SY, Byun Y, Choi K, Kim K, Kwon IC. Comparative study of photosensitizer loaded and conjugated glycol chitosan nanoparticles for cancer therapy. *J Control Release* 2011; **152**: 21–29.
- 70 Hollis CP, Weiss HL, Leggas M, Evers BM, Gemeinhart R a, Li T. Biodistribution and bioimaging studies of hybrid paclitaxel nanocrystals: lessons learned of the EPR effect and image-guided drug delivery. *J Control Release* 2013; **172**: 12–21.
- 71 Maeda H, Ueda M, Morinaga T, Matsumoto T. Conjugation of poly(styrene-co-maleic acid) derivatives to the antitumor protein neocarzinostatin: pronounced improvements in pharmacological properties. *J Med Chem* 1985; **28**: 455–461.
- 72 Iigo M, Nakagawa T, Ishikawa C, Iwahori Y, Asamoto M, Yazawa K, Araki E, Tsuda H. Inhibitory effects of docosahexaenoic acid on colon carcinoma 26 metastasis to the lung. *Br J Cancer* 1997; **75**: 650–655.
- 73 Suzuki I, Iigo M, Ishikawa C, Kuhara T, Asamoto M, Kunimoto T, Moore M a, Yazawa K, Araki E, Tsuda H. Inhibitory effects of oleic and docosahexaenoic acids on lung metastasis by colon-carcinoma-26 cells are associated with reduced matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Int J Cancer* 1997; **73**: 607–612.
- 74 Oda T, Sato F, Maeda H. Facilitated internalization of neocarzinostatin and its lipophilic polymer conjugate, SMANCS, into cytosol in acidic pH. *J Natl Cancer Inst* 1987; **79**: 1205–1211.
- 75 Fang J, Seki T, Qin H, Bharate GY, Iyer AK, Maeda H. Tissue protective effect of xanthine oxidase inhibitor, polymer conjugate of (styrene-maleic acid copolymer) and (4-amino-6-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidine), on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; **235**: 487–496.
- 76 Lee JS, Ankone M, Pieters E, Schiffelers RM, Hennink WE, Feijen J. Circulation kinetics and biodistribution of dual-labeled polymersomes with modulated surface charge in tumor-bearing

- mice: comparison with stealth liposomes. *J Control Release* 2011; **155**: 282–288.
- 77 Xiao K, Li Y, Luo J, Lee JS, Xiao W, Gonik AM, Agarwal RG, Lam KS. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials* 2011; **32**: 3435–3446.
- 78 Maeda K, Ikeda Y, Fujita T, Yoshida K, Azuma Y, Haruyama Y, Yamane N, Kumagai Y, Sugiyama Y. Identification of the rate-determining process in the hepatic clearance of atorvastatin in a clinical cassette microdosing study. *Clin Pharmacol Ther* 2011; **90**: 575–581.
- 79 Malugin A, Kopecková P, Kopecek J. Liberation of doxorubicin from HPMA copolymer conjugate is essential for the induction of cell cycle arrest and nuclear fragmentation in ovarian carcinoma cells. *J Control Release* 2007; **124**: 6–10.
- 80 Veronese FM, Schiavon O, Pasut G, Mendichi R, Andersson L, Tsirk A, Ford J, Wu G, Kneller S, Davies J, Duncan R. PEG-doxorubicin conjugates: influence of polymer structure on drug release, in vitro cytotoxicity, biodistribution, and antitumor activity. *Bioconjug Chem* 2005; **16**: 775–784.
- 81 Stehle G, Sinn H, Wunder A, Schrenk HH, Stewart JCM, Hartung G, Maier-Borst W, Heene DL. Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself—implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Crit Rev Oncol Hematol* 1997; **26**: 77–100.
- 82 Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 2008; **132**: 171–183.
- 83 Maeda H, Takeshita J, Kanamaru R, Sato H, Khatoh J. Antimetastatic and antitumor activity of a derivative of neocarzinostatin: an organic solvent- and water-soluble polymer-conjugated protein. *Gan* 1979; **70**: 601–606.
- 84 Takeshita J, Maeda H, Kanamaru R. In vitro mode of action, pharmacokinetics, and organ specificity of poly (maleic acid-styrene)-conjugated neocarzinostatin, SMANCS. *Gan* 1982; **73**: 278–284.
- 85 Ohtsuka N, Konno T, Miyauchi Y, Maeda H. Anticancer effects of arterial administration of the anticancer agent SMANCS with lipiodol on metastatic lymph nodes. *Cancer* 1987; **59**: 1560–1565.
- 86 Daruwalla J, Greish K, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Iyer A, Maeda H, Christophi C. Styrene maleic acid-pirarubicin disrupts tumor microcirculation and enhances the permeability of colorectal liver metastases. *J Vasc Res* 2009; **46**: 218–228.
- 87 Daruwalla J, Nikfarjam M, Greish K, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Christophi C, Maeda H. In vitro and in vivo evaluation of tumor targeting styrene-maleic acid copolymer-pirarubicin micelles: Survival improvement and inhibition of liver metastases. *Cancer Sci* 2010; **101**: 1866–1874.
- 88 Maeda H. The link between infection and cancer: tumor vasculature, free radicals, and drug

- delivery to tumors via the EPR effect. *Cancer Sci* 2013; **104**: 779–789.
- 89 Oda T, Morinaga T, Maeda H. Stimulation of macrophage by polyanions and its conjugated proteins and effect on cell membrane. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986; **181**: 9–17.
- 90 Suzuki F, Pollard RB, Uchimura S, Munakata T, Maeda H. Role of natural killer cells and macrophages in the nonspecific resistance to tumors in mice stimulated with SMANCS, a polymer-conjugated derivative of neocarzinostatin. *Cancer Res* 1990; **50**: 3897–3904.
- 91 Suzuki F, Munakata T, Maeda H. Interferon induction by SMANCS: a polymer-conjugated derivative of neocarzinostatin. *Anticancer Res* 1988; **8**: 97–103.
- 92 Masuda E, Maeda H. Changes in cellular components of spleen and lymph node cells and the effector cells responsible for Meth A tumor eradication induced by zinostatin stimalamer. *Cancer Res* 1996; **56**: 1868–1873.
- 93 Duncan R, Vicent MJ. Do HPMA copolymer conjugates have a future as clinically useful nanomedicines? A critical overview of current status and future opportunities. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; **62**: 272–82.
- 94 Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohalm J, Ulbrich K, Akaike T, Maeda H. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res* 1998; **89**: 307–314.
- 95 Zhang R, Luo K, Yang J, Sima M, Sun Y, Janát-Amsbury MM, Kopeček J. Synthesis and evaluation of a backbone biodegradable multiblock HPMA copolymer nanocarrier for the systemic delivery of paclitaxel. *J Control Release* 2013; **166**: 66–74.
- 96 Chytil P, Etrych T, Kříž J, Šubr V, Ulbrich K. N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide-based polymer conjugates with pH-controlled activation of doxorubicin for cell-specific or passive tumour targeting. Synthesis by RAFT polymerisation and physicochemical characterisation. *Eur J Pharm Sci* 2010; **41**: 473–482.
- 97 Chytil P, Etrych T, Koňák Č, Šírová M, Mrkvan T, Bouček J, Říhová B, Ulbrich K. New HPMA copolymer-based drug carriers with covalently bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting. *J Control Release* 2008; **127**: 121–130.
- 98 Etrych T, Chytil P, Mrkvan T, Šírová M, Říhová B, Ulbrich K. Conjugates of doxorubicin with graft HPMA copolymers for passive tumor targeting. *J Control Release* 2008; **132**: 184–192.
- 99 Etrych T, Kovar L, Subr V, Braunova A, Pechar M, Chytil P, Rihova B, Ulbrich K. High-molecular-weight Polymers Containing Biodegradable Disulfide Bonds: Synthesis and In Vitro Verification of Intracellular Degradation. *J Bioact Compat Polym* 2010; **25**: 5–26.
- 100 Kostková H, Etrych T, Říhová B, Kostka L, Starovoytová L, Kovář M, Ulbrich K. HPMA Copolymer Conjugates of DOX and Mitomycin C for Combination Therapy: Physicochemical Characterization, Cytotoxic Effects, Combination Index Analysis, and Anti-Tumor Efficacy. *Macromol Biosci* 2013; **13**: 1648–1660.

- 101 Etrych T, Subr V, Laga R, Rihová B, Ulbrich K. Polymer conjugates of doxorubicin bound through an amide and hydrazone bond: Impact of the carrier structure onto synergistic action in the treatment of solid tumours. *Eur J Pharm Sci* 2014; **58**: 1–12.
- 102 Gerweck LE, Kozin S V, Stocks SJ. The pH partition theory predicts the accumulation and toxicity of doxorubicin in normal and low-pH-adapted cells. *Br J Cancer* 1999; **79**: 838–842.
- 103 Udhrain A, Skubitz KM, Northfelt DW. Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Int J Nanomedicine* 2007; **2**: 345–352.
- 104 Maeda H. SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **46**: 169–85.
- 105 Seymour LW, Ferry DR, Kerr DJ, Rea D, Whitlock M, Poyner R, Boivin C, Hesslewood S, Twelves C, Blackie R, Schatzlein A, Jodrell D, Bissett D, Calvert H *et al.* Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer. *Int J Oncol* 2009; **34**: 1629–1636.
- 106 Iwai K, Maeda H, Konno T. Use of oily contrast medium for selective drug targeting to tumor: Enhanced therapeutic effect and X-ray image. *Cancer Res* 1984; **44**: 2115–2121.
- 107 Schmitt DA, Kisanuki K, Kimura S, Oka K, Pollard RB, Maeda H, Suzuki F. Antitumor activity of orally administered SMANCS, a polymer-conjugated protein drug, in mice bearing various murine tumors. *Anticancer Res* 1992; **12**: 2219–2224.
- 108 Zamboni WC. Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 8230–8234.
- 109 Prabhakar U, Maeda H, Jain R, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, Barry ST, Gabizon A, Grodzinski P, Blakey DC. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res* 2013; **73**: 2412–2417.
- 110 Fang J, Tsukigawa K, Liao L, Yin H, Eguchi K, Maeda H. Styrene-maleic acid-copolymer conjugated zinc protoporphyrin as a candidate drug for tumor-targeted therapy and imaging. *J Drug Target* DOI: 10.3109/1061186X.2015.1077851
- 111 Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K, Maeda H. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer* 2004; **109**: 1–8.
- 112 Bae YH, Park K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *J Control Release* 2011; **153**: 198–205.
- 113 Barbosa M. What is the Best Treatment for a Cancer Patient with Thrombosis? *Clinical Medicine Insights : Oncology* 2014; 49–55.
- 114 Seki T, Fang J, Maeda H. Enhanced delivery of macromolecular antitumor drugs to tumors by nitroglycerin application. *Cancer Sci* 2009; **100**: 2426–2430.

- 115 Noguchi A, Takahashi T, Yamaguchi T, Kitamura K, Noguchi A, Tsurumi H, Takashina K, Maeda H. Enhanced tumor localization of monoclonal antibody by treatment with kininase II inhibitor and angiotensin II. *Jpn. J. Cancer Res.* 1992; **83**: 240–243.
- 116 Nagamitsu A, Greish K, Maeda H. Elevating blood pressure as a strategy to increase tumor-targeted delivery of macromolecular drug SMANCS: cases of advanced solid tumors. *Jpn J Clin Oncol* 2009; **39**: 756–766.
- 117 Fang J, Qin H, Nakamura H, Tsukigawa K, Shin T, Maeda H. Carbon monoxide, generated by heme oxygenase-1, mediates the enhanced permeability and retention effect in solid tumors. *Cancer Sci* 2012; **103**: 535–541.
- 118 Kinoshita R, Ishima Y, Ikeda M, Kragh-Hansen U, Fang J, Nakamura H, Chuang VTG, Tanaka R, Maeda H, Kodama A, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano-EPR enhancer applied to macromolecular anti-tumor drugs such as micelles and liposomes. *J Control Release* 2015; **217**: 1–9.
- 119 Fang J, Liao L, Yin H, Nakamura H, Shin T, Maeda H. Enhanced bacterial tumor delivery by modulating the EPR effect and therapeutic potential of *Lactobacillus casei*. *J Pharm Sci* 2014; **103**: 3235–3243.

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り、本論文作成にあたり多大な御教示、御助力を賜りました崇城大学 DDS 研究所 前田 浩 特任教授、崇城大学大学院 薬学研究科 薬物動態学研究室 小田切 優樹 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究ならびに本論文作成にあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました崇城大学 薬学部 薬学科 方 軍 准教授、同 中村 秀明 助教に深甚なる感謝の意を表します。

本論文作成にあたり、有益なる御指導と御校閲を賜りました崇城大学大学院 薬学研究科 平山 文俊 教授、同 國安 明彦 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を頂きました崇城大学大学院 工学研究科 応用化学専攻の先生方に深甚なる感謝の意を表します。

本研究ならびに本論文作成に際し、多大なる御助力を賜りました九州保健福祉大学 薬学部 薬学科 薬剤学講座 横山 祥子 教授、同 堤 敏彦 講師に深甚なる感謝の意を表します。

貴重な研究材料であるヒト大腸がん組織およびヒト正常大腸組織のご提供を頂きました国立病院機構 熊本医療センターの先生方に深く感謝いたします。

貴重な研究材料である KYSE150 細胞のご提供を頂きました愛知県がんセンター研究所 組本 博司 博士に深く感謝いたします。

PHPMA 結合型 THP の合成および供与いただきましたチェコ共和国科学アカデミー 高分子科学研究所所長 Karel Ulbrich 教授、同研究所 Tomas Etrych 博士、同研究所 Petr Chytil 博士に深く感謝いたします。

研究活動に際し、多大なる御協力をいただきました崇城大学 DDS 研究所ならびに崇城大学薬学部 薬物動態学研究室のみなさまに深く感謝いたします。

最後に、ここまで支えてくれた友人、そして温かく見守ってくれた両親、家族に深く感謝の意を表します。

平成 28 年 3 月 月川 健士