

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20015045  
 研究課題名（和文）HSP32 を標的とする高分子型制癌剤 PEG 化亜鉛プロトポルフィリン（ZnP）  
 研究課題名（英文）Macromolecular anticancer agent, PEGylated Zinc protoporphyrin (ZnP)  
 targeting HSP32  
 研究代表者  
 前田 浩（MAEDA HIROSHI）  
 崇城大学・薬学部・教授  
 研究者番号：90004613

研究成果の概要（和文）：①目的とする高分子化 ZnPP（Hsp-32/HO-1 の阻害剤）の PEG 化 ZnPP 結合物および SMA-ZnPP ミセル剤を再現性よく合成することができた。とくに PEG-ZnPP の合成は ZnPP にスパーサーの  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}_2$  を導入して、そのアミノ基に PEG を結合させた。両者とも EPR 効果を示したが、PEG の方が腫瘍組織への集積性は高かった。②しかし、SMA-ZnPP ミセルの細胞への取り込みは PEG-ZnPP よりも 4-8 倍効率がよかった。③SMA-ZnPP ミセルは細胞内に取り込まれた後は、レシチンなど細胞膜成分との接触により崩壊し、free の ZnPP を放出した。④PEG-ZnPP は腫瘍組織によく集積し、その後、その局所のプロテアーゼ（セリン型およびチオール型）により次第にアミド結合が切断され、free の ZnPP を放出した。⑤LED 光の 420nm の照射により、in vitro の食道癌細胞 Kyse510、ATL 細胞の MT-2、CML 細胞の K562、乳癌細胞の SW30 などに対し、殺細胞効果は増強された。

研究成果の概要（英文）：We prepared two types of polymeric drugs having anti-HO-1 and antitumor activities, (i) PEGylated ZnPP (covalently linked) and (ii) SMA-ZnPP micelles. Cell uptake was several fold faster in SMA-ZnPP micelles than PEG-ZnPP conjugates. They exhibited both in vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity having  $\text{IC}_{50}$  of 1-7  $\mu\text{M}$  and 10mg/kg in vivo respectively. They also exhibited enhanced cytotoxicity to human tumor cells (CML cell line, K562; ATL cell line, MT-2; esophageal cell line, Kyse 510) in culture under the exposure to LED light at 420nm. Mouse tumors were more effectively suppressed with SMA-ZnPP plus LED light at 420nm than drug alone both in vivo and in vitro. PEG-ZnPP conjugates (covalent) undergo hydrolytic cleavage by serine and thiol proteases in the tumor tissue and released free ZnPP, whereas SMA-ZnPP micelles underwent micelle disintegration upon the contact with to cell membrane components such as lecithin, and released the drug ZnPP effectively in cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,600,000	0	4,600,000
2009 年度	4,900,000	0	4,900,000
総計	95,000,00	0	9,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：HSP32 阻害剤, HO-1 阻害剤, 高分子型制癌剤, DDS, 腫瘍ターゲティング, Zn  
プロトポルフィリン, 新しい光化学療法, PEG 化制癌剤

### 1. 研究開始当初の背景

(1) Hsp90 (熱ショックの蛋白 90) はシャペロン分子の一つで、Her2/ErbB2、Bcr/Abl、p53 などオンコジーンとの重要な関係がよく知られており、そのインヒビターは有力な制癌剤の候補として開発が進められている。我々は亜鉛プロトポルフィリン (ZnP) が HO-1/HSP32 の阻害剤になり、制癌作用を発現することをはじめて見出ししており (Cancer Re. 2003)、本研究はそのことに基づき制癌剤の開発を目的とする研究である。

PEG-ZnP の特長の第 1 として我々は、その腫瘍集積性を上げる目的のため PEG 化 (→ PEG-ZnP となし) し [Bioconj. Chem. 13, 1031-1038 (2002)], ZnP の腫瘍集積性を高めることができた。事実 PEG-ZnP の腫瘍/血液比は (T/B) > 13 と優れている [Cancer Res. 63, 3567-3574 (2003); J. Drug Targeting 15, 496-506 (2007)]. ZnP を投与すると抗酸化能の強いビリルビン生成が抑えられ、それによる癌細胞の抗酸化能が低下し、細胞はアポトシスになることを発見した [Cancer Res 63, 2003; Int. J. Cancer 2004: Apoptosis, 2004].

(2) さらに興味深いことに CML 等の白血病関連細胞を用いた研究から、PEG-ZnP 処理により bcr-abl の oncogene の発現の suppression がみられ、1~10  $\mu$ M の ZnP でアポトシスに至った [Kondo R. et al Blood, 2007 & 2008].

特長として、PEG-ZnP 処理によって、他の制癌剤との併用で in vitro 系において感受性が上がることがわかってきた [Int. J. Cancer 109, 1-8 (2004); Apoptosis 9, 27-35 (2004)].

また、PEG-ZnP 投与投与 24 時間後、ZnP が EPR 効果により腫瘍に充分集積したところで内視鏡光を照射すると腫瘍部で一重項酸素が発生し、DMBA 誘発乳癌は完全に壊死し、著しい治療効果を示した [Bioconj. Chem., 13, 1031-1038 (2002)]; Bioconj. Chem. 18, 494-499 (2007); J. Drug Target. 15, 496-506 (2007)]. この光照射は 600nm のレーザーではなく、通常の >400nm の xenon 光源による一重項酸素の生成による画期的な癌治療法と

なる可能性を示している。

### 2. 研究の目的

本研究目的は画期的な制癌剤を開発すること。その条件として毒性がなく、腫瘍に集中し、多くの癌腫にユビキタスに有効な性質が求められる。製造コストも安いことが必要である。(今日の分子標的薬の多くは単独ではほとんど無効で、3 剤併用で 1~3 コースで 2~数千万円という話もあり、しかも効果が保証されていないのが現状である)。本研究は PEG 化プロトポルフィリン (PEG-ZnP) および SMA-ZnP ミセル化剤という新規の高分子型制癌剤を作成し、in vitro、in vivo の抗腫瘍効果を明らかにするとともに、薬理学的な本物質の動態を明らかにする。

(1) ヒト食道癌をヌードマウスに移植し、それに対し PEG-ZnP 単体、さらに、それに加え内視鏡光源照射併用における効果を検討する。

(2) ヒト食道癌細胞 Kyse510 その他を用いヌードマウスの xenograft モデルをもとに、薬剤濃度、投与頻度(間隔)/月、光照射の dose 等を考慮した、ヒトの臨床をめざした投与スケジュールを系統的に検討する。

(3) 両 ZnPP の高分子製剤の腫瘍での集積性と腫瘍細胞への取り込みを検討する。

(4) bcr/abl の高発現が考えられるヒト blioblastoma、マウスおよびヒトの malignant melanoma および、 imanitib (Gleevec) 耐性 CML 等について、in vitro における活性の検討を行う。さらにヒトがん細胞の xenograft モデルの in vivo の系で内視鏡光源照射群もあわせ検討する。HO-1 および、Abl/Bcr の Western および ELISA によるこれらの蛋白の発現抑制の定量を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 既報により PEG 化 ZnP を合成した。ZnP との結合には  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$  のスペーサと活性化 PEG2000 を使用。[Bioconj. Chem., 13, 1031-1038 (2002)]

(2) PEG-ZnP の Dose limiting toxicity を検

討。マウス/ラットでの iv, ip, po 投与後、動物の生死、肝・腎機能、血液像、体重など、および vital organ の病理学などを中心に行った。

(3) 腫瘍への集積および細胞への取り込みは ZnPP をエタノールで抽出し、その蛍光強度(励起光 425nm、蛍光 560nm) で定量する。また、コンフォーカル顕微鏡で追跡する。

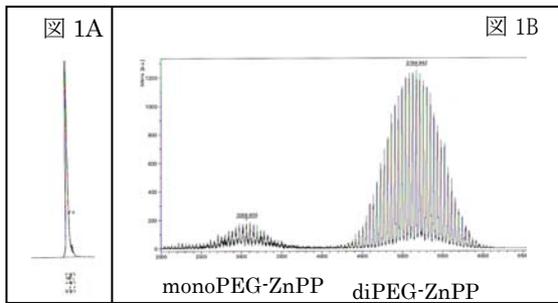
(4)すでに in vitro で一部で明らかにしている cisplatin, doxorubicin 以外の制癌剤との併用投用により、in vivo の相乗効果を検討する。

(5) In vivo/ vitro で内視鏡光源(xenon 光)と PEG-ZnP との併用による DMBA による化学発がん(乳がん)モデルを用い、より詳細な治療効果を検討する。あわせ ESR により、一重項酸素の生成を定量する。

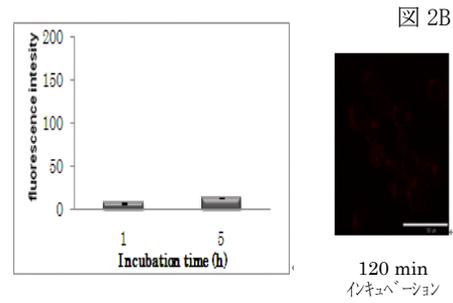
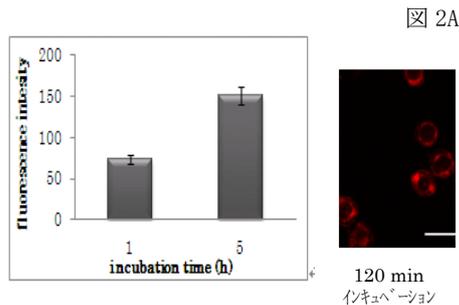
(6)腫瘍細胞への PEG-ZnP の uptake を放射標識 PEG-ZnP、及びその自家蛍光にもとづき定量する。

#### 4. 研究成果

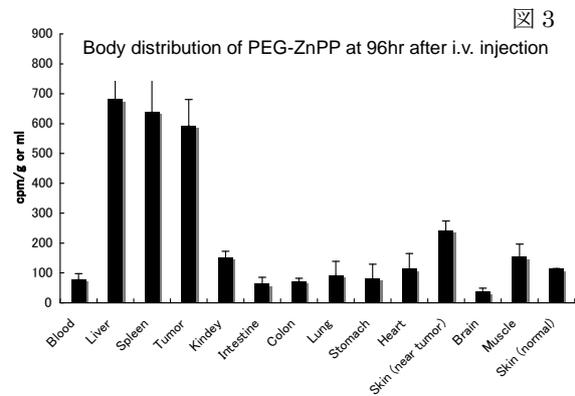
(1)SMA-ZnPP ミセル (以下 SZP) と PEG-ZnPP conjugate (以下 PZP) の HPLC による解析ではシングルピークを示した。また、MALD-TOF-MS では、93%が diPEG-ZnP であった(図 1A, B)。これらの分子量分布をセファクリル HR300 およびセファロース 4B のゲルクロマトにより、これらのみかけ上の分子量は SZP が 158KDa、PZP が 29.3KDa であった。



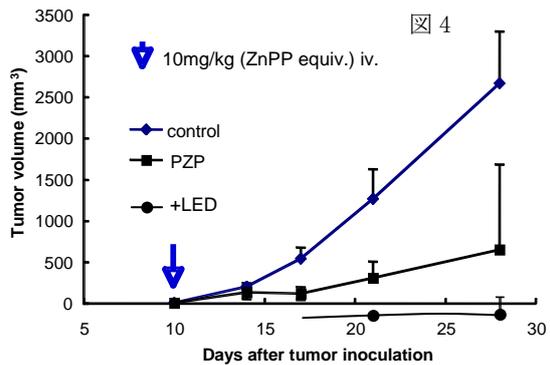
(2)PZP および SZP の細胞内への取り込みを慢性骨髄性白血病細胞 K562 を用い、コンフォーカルレーザー顕微鏡にて測定したデータを図 2A, B に示す。



(3)PZP の静注後の体内分布を図 3 に示す。腫瘍部への集積は肝臓、脾臓の次いで高値で、腸、腎臓、心臓、筋肉の約 6 倍であった。しかしながら、SZP の 30% Loading では弱く、10~15%では腫瘍部に多く見られ、8%以下の ZnP は目下検討中である。



(4) In vivo 抗腫瘍効果を ddy マウスの S-180 腫瘍で検討した結果を図 4 に示す。これに LED 420nm を 30 分光照射したものではさらに抗腫瘍効果は強かった。



(5)PZP に対する腫瘍ならびに肝臓のホモゲネート上清による分解を HPLC を用いて、分解物のピーク生成度合いの割合から図 5A-C のようなプロテアーゼによる分解スキームと推定した。

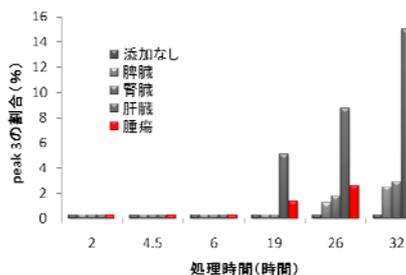


図 5A. 各組織ホモジネートを用いた Peak3 の経時的変化  
2mg protein/mL 組織抽出物

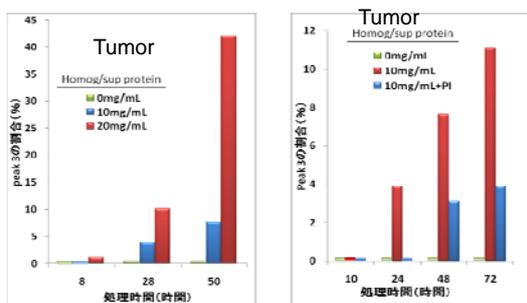


図 5B. 腫瘍ホモジネートによる Peak 3 の生成  
PI=protease inhibitor (PMSF+leupeptin)

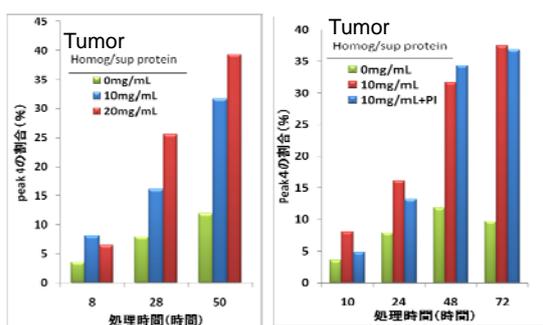


図 5C. 腫瘍ホモジネートによる Peak 4 の生成  
PI=protease inhibitor (PMSF+Leupeptin)

(6) 各種培養癌細胞に対する効果を表 1 に示す。

Cell line		IC50 (uM, ZnPP equivalent)		
		ZnPP	PEG-ZnPP	SMA-ZnPP
<b>Cancer cell</b>				
MT-2	Human T-cell Leuk	3.5	18	3.5
Raji	Human B-cell Leuk	2		3
Daudi		5		5
K562	CML	2		2
ASPC1	Human panc cell	6	12	10
KYSE510	Human esopha cell	>50	>50	18
Hela	Human cervic cell	>50	>50	>50
Sw480	Human colon cell	13	>50	26
<b>Normal cell</b>				
MDCK	Canine kidney epith cell	>50	>50	25
RPE	Human retinal pigm epith cell	>50	>50	>50

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 18 件)

- ① J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda: EPR effect: the unique characteristics of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, its limitation and augmentation, **Adv. Drug Deliv. Rev.** (in press, 2010)
- ② H. Maeda, Y. Matsumura: History and impact of EPR effect for the nanomedicine drug developments in cancer chemotherapy, **Adv. Drug Deliv. Rev.** (in press, 2010)
- ③ H. Herrmann et al, H. Maeda (14/15 番目) and P. Valent: Identification of Hsp32 as a novel target in CD34+/CD38+ and CD34+/CD38- leukemic progenitor cells in AML. **Cancer Res.** (Submitted, 2010.)
- ④ H. Maeda: Nitroglycerin enhances vascular blood flow and drug delivery in hypoxic tumor tissues: Analogy between angina pectoris and solid tumors and enhancement of the EPR effect, **J. Cont. Release** 142, 296-298 (2010)
- ⑤ H. Maeda: Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: Background and future prospects, **Bioconj. Chem.** 21, 797-802 (2010)
- ⑥ J. Fang (1/6 番目), T. Seki *et al* and H. Maeda (6/6 番目): Tissue protective effect of xanthine oxidase inhibitor, polymer conjugate SMA-AHPP, on hepatic ischemia-reperfusion injury, **Exp. Biol. Med.** 235, 487-496 (2010)
- ⑦ J. Daruwalla, et al, C. Christophi and H. Maeda (7/7 番目): In vitro and in vivo evaluation of tumor targeting SMA-pirarubicin micelles: Survival improvement and inhibition of liver metastases. **Cancer Sci.**, (Aug, 2010)
- ⑧ J. Daruwalla *et al*, H. Maeda (6/7 番目) and C. Christophi: Styrene maleic acid-pirarubicin disrupts tumor microcirculation and enhances the permeability of colorectal Liver Metastases, **J. Vascul. Res.**, 46, 218-228 (2009)
- ⑨ H. Maeda, G. Y. Bharate, J. Daruwalla: Polymeric drugs and nanomedicines for efficient tumor targeted drug delivery based on EPR-effect. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 71, 409-419, (2009)
- ⑩ H. Maeda: Controlling oxidative stress: therapeutic and delivery strategies. **Adv. Drug Delivery Reviews** 61, 285-286 (2009)

- ⑪ A. Nagamitsu, K. Greish, H. Maeda: Elevating blood pressure as a strategy to increase tumor targeted delivery of macromolecular drug SMANCS: Cases of advanced solid tumors, **Japan. J. Clinical Oncol.** 39, 756-766 (2009)
- ⑫ K. Gleixner *et al*, H. Maeda(16/18 番目), P. Valent: Targeting of Hsp32 in solid tumors and leukemias: A novel approach to optimize anticancer therapy, **Curr. Cancer Drug Targets** 9, 675-89 (2009)
- ⑬ T. Seki J. Fang, H. Maeda: Enhanced delivery of macromolecular antitumor drugs to tumors by nitroglycerin application, **Cancer Science** 100, 2426-2430 (2009)
- ⑭ M. Mayerhofer *et al*, H. Maeda(15/16 番目), P. Valent. 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**, 111, 2200-2210 (2008)
- ⑮ J. Fang(1/8 番目), H. Nakamura(3/8 番目) *et al*, H. Maeda(8/8 番目): Oxystress inducing antitumor therapeutics via tumor-targeted delivery of PEG-conjugated D-amino acid oxidase. **Int. J. Cancer** 122 1135-1144 (2008)
- ⑯ T. Seki *et al*, H. Maeda(6/7 番目) and K. Kida: Immunostimulation-mediated antitumor activity by preconditioning with rice-shochu distillation residue against implanted tumor in mice. **Nutrit. Cancer** 60, 776-783 (2008)
- ⑰ E. Hadzijufovic *et al*, H. Maeda(13/15 番目), P. Valent: Targeting of heat-shock protein32/heme oxygenase-1 in canine mastocytoma cells is associated with reduced growth and induction of apoptosis. **Exp. Hematol.** 36, 1461-1470 (2008)
- ⑱ 前田 浩, 関 孝弘: 高分子薬剤のEPR効果による腫瘍デリバリーと癌治療、「血管医学」Vol.9 11月号 p.83-95 (2008)
- [学会発表] (計 21 件)
- ① 関 孝弘, 方 重, 前田 浩: ニトログリセリン軟膏塗布による癌局所への高分子制癌剤のEPR効果増強に基づくデリバリーと治療効果の増強、第9回日本NO学会、2009年5月9日(静岡市)
- ② 前田 浩 等、Enhancing the EPR-effect by nitroglycerin, The 8<sup>th</sup> Int' l Symposium on Frontiers in Biomed. Polymers, 2009年5月21日(静岡県三島市)
- ③ 前田 浩 等、ニトログリセリン軟膏塗布による癌局所でのEPR効果増強に基づく制癌剤のデリバリーと治療効果の増強、2009年7月3日(東京)
- ④ 前田 浩、制癌剤開発における諸問題とDDSの役割(特別講演)、第25回日本DDS学会、2009年7月4日(東京)
- ⑤ T. Seki, J. Fang, H. Maeda, Remarkable augmentation of tumor delivery based on EPR-effect by topical applications of nitroglycerin, 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2009年7月20日(コペンハーゲン)
- ⑥ H. Maeda: Tumor selective targeting using macromolecular drugs based on EPR effect: Future solutions for solid tumor chemotherapy, Int' l Symposium on Crystal Engineering & Drug Delivery System, 2009年9月7日(天津(中国))
- ⑦ H. Maeda: Tumor selective targeting using macromolecular drugs based on EPR effect: Future solutions for solid tumor chemotherapy, 3rd Roche Marco Polo Symposium on Drug Delivery, 2009年9月16日(ソウル)
- ⑧ 方 重 等、キセノン光照射によるミセル化亜鉛プロトポルフィリンの抗癌作用の増強、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日(横浜)
- ⑨ 覃 海波, 方 重, 中村 秀明, 前田 浩、成人T細胞白血病細胞に対するミセル化亜鉛プロトポルフィリンの増殖抑制作用、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日(横浜)
- ⑩ H. Maeda: Current problems in cancer chemotherapy and new developments toward more cancer selective drug targeting based on EPR-effect, アジア薬科会議、2009年10月17日(福岡)
- ⑪ H. Maeda: Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect of Solid Tumor-The Universal Mechanism for Tumor Selective Delivery Using Macromolecular Therapeutics and Beyond, Seminar at Cedars-Sinai Medical Center, 2009年11月6日, (LA, USA)
- ⑫ H. Maeda: Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect of Solid Tumor-The Universal Mechanism for Tumor Selective Delivery Using Macromolecular Therapeutics and Beyond, USC-AAPS Moving Targets Symposium, 2009年11月7日(LA, USA)
- ⑬ H. Maeda: The EPR effect for tumor selective drug targeting: Its mechanism and future outlook, International Advanced Drug Delivery Symposium, 2010年

4月30日、Industrial Tech. Res. Inst. (台湾)

- ⑭ 前田浩、Enhanced permeability and retention (EPR) effect of Solid tumor- The universal mechanism for tumor selective delivery using macromolecular therapeutics and beyond, City of Hope, 2008年12月12日、(LA, USA)
- ⑮ 前田浩、Enhanced permeability and retention (EPR) effect of Solid tumor- The universal mechanism for tumor selective delivery using macromolecular therapeutics and beyond, Thomas Jefferson Univ., 2008年12月8日、(Philadelphia, USA)
- ⑯ P. Valent 他、Identification of heat shock protein32 (Hsp32) as a novel target in acute lymphoblastic leukemia (ALL)、American Society of Hematology、2008年12月6日(San Francisco, USA)
- ⑰ 方軍 他、Oxystress-induced antitumor therapeutics via targeted-inhibiting heme oxygenase-1 (HSP32) in tumor、Ehrlich II 2nd World conference on Magic Bullets、2008年10月3日(Nuremberg, Germany)
- ⑱ 前田浩 他、ニトログリセリンの局所塗布による表層がんへの高分子制がん剤のデリバリーと治療効果の増強、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月29日(名古屋)
- ⑲ 方軍 他、ミセル化ヘムオキシゲナーゼ-1 (熱ショック蛋白質32) 阻害剤PZPの抗腫瘍効果と前臨床研究、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月29日(名古屋)
- ⑳ 前田浩 他、Enhanced antitumor drug-delivery by topical applications of nitroglycerin on superficial tumors、NO 5th International conference、2008年8月26日(Bregenz, Austria)
- ㉑ 前田浩、Tumor targeted delivery of PEG-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide、International Symposium on Polymer Therapeutics、2008年5月27日(Valencia, Spain)

[図書] (計2件)

- ① H. Maeda、Recollections of 45 years in research: From protein chemistry to polymeric drugs to the EPR effect in cancer therapy, **Nova Science** Book Chapter, (in press, 2010)
- ② T. Seki, J. Fang, H. Maeda: Tumor targeted macromolecular drug delivery based on the enhanced permeability and

retention effect in solid tumor. *In Pharm. Perspective of Cancers Therapeutics* (eds. Y. Lu and R.I. Mahato), AAPS Springer Press, New York, 93-120 (2009)

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: Antitumor agents  
発明者: H. Maeda  
権利者: H. Maeda  
種類: United States Patent  
番号: US 7514076 B2  
取得年月日: April 7, 2009  
国内外の別: 国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田浩 (MAEDA HIROSHI)  
崇城大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90004613

### (2) 研究分担者

方軍 (FAN JUN)  
崇城大学・薬学部・講師  
研究者番号: 20412736

中村秀明 (NAKAMURA HIDEAKI)  
崇城大学・薬学部・助手  
研究者番号: 30435151