

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700927

研究課題名（和文） 亜鉛プロトポルフィリン含有高分子ミセルとキセノン光源を用いる癌の光化学療法の研究

研究課題名（英文） Development of zinc protoporphyrin micelles for cancer photodynamic therapy with xenon light

研究代表者

方 軍 (Fang, Jun)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：20412736

研究成果の概要（和文）：

本研究で、各種 ZnPP ミセルの物理化学的な特徴、体内動態等を検討した結果、粒子直径が約 80nm である HPMA-ZnPP は高い血中安定性、長い血中半減期と著名な腫瘍選択的な集積を示した。HPMA-ZnPP は LED 光源照射することにより、HeLa 細胞に対し強い細胞毒性を示した。In vivo において、HPMA-ZnPP 濃度依存的な、及び光照射量（照射強度、時間）依存的な腫瘍増殖の顕著な抑制が見られた。またその高い腫瘍集積により in vivo imaging システムで腫瘍を検出できた。以上の結果より、HPMA-ZnPP は腫瘍検出の可能な新たな癌の光化学治療薬になることが強く期待される。

研究成果の概要（英文）：

In this study, by comparing the physiochemical characteristics, stability as well as in vivo pharmacokinetics of different ZnPP micelles, we found that HPMA-ZnPP, with the particle size of about 80 nm, showed good stability in circulation, resulting in prolonged plasma half-life as well as tumor-selective accumulation (EPR effect). We thus selected HPMA-ZnPP for further development. In vitro studies using Hela cells exhibited a strong cytotoxicity of HPMA-ZnPP upon light irradiation. In vivo experiments showed an HPMA-ZnPP dose-dependent and irradiation dependent (intensity and duration) suppression of tumor growth. Moreover, the tumor-selective accumulation of HPMA-ZnPP was clearly detected in an in vivo imaging system. Taken together, these findings strongly suggest the potential of HPMA-ZnPP as a new PDT drug for cancer, at the same time with tumor-detecting potency.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学
キーワード：ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

ZnPP が強力な HO-1 の阻害剤であると知られている。これまで、HO-1 が多くの腫瘍に高発現していることが報告され、腫瘍の survival factor として認識されている。このことに基づき、我々が ZnPP を用いる HO-1 をターゲットとした抗癌療法を開発した。

最近 ZnPP の新しい抗がんメカニズムとして、光照射による抗癌作用にわれわれが注目している。即ち、ZnPP は光増感剤として、光で励起した時に、光化学反応により singlet oxygen (1O_2) などの活性酸素を産生する。この活性酸素の細胞毒性により抗癌作用を発揮する癌治療法は、光線力学療法 (PDT) として知られている。現在の PDT において、高価なレーザー光源が用いられるが、本研究中、連続波長のキセノン光源を用い、ZnPP の光照射抗癌治療法の有用性を検討したい。

しかしながら、ZnPP は水溶性に乏しいため、その作用の解析や臨床への本格的な応用が困難であった。そこで、我々は水溶性ポリマーであるポリエチレングリコール (PEG) や両親媒性のスチレンマレイン酸コポリマー (SMA) を用い、ZnPP の水溶性高分子ミセル製剤 PEG-ZnPP および SMA-ZnPP を作製し、抗癌剤への開発に成功している。このミセル化により、ZnPP の水難溶性の問題点が解決された。さらに、高分子薬剤として、EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果により選択的に固型腫瘍に集積することができ、より効率的かつ副作用の少ない抗癌作用が得られる。

以上の ZnPP の多彩な生物活性 (特に光増感作用) による抗癌ポテンシャルと本研究室で開発したミセル作製法などの研究背景をもとに、ZnPP の水溶性高分子ミセルの光照射抗癌治療法に関する研究を行った。

2. 研究の目的

以上の背景で、本研究中でわれわれは、ZnPP の光増感作用に着目し、その水溶性高分子ミセルを用い、キセノン光照射による癌治療法の開発を目指した研究を行った。特に、EPR 効果による腫瘍選択的治療の有用性および本治療法における通常のキセノン光源の実用性について検討した。

3. 研究の方法

(1) ZnPP ミセルの作製

① PEG-ZnPP: ZnPP にアミノ基を導入

し、PEG のカルボキシル基とのアミド結合により合成した (Sahoo SK et al., Bioconjugated Chemistry 13(5):1031-8, 2002)。エーテル型 (PEG-50HS) とエステル型 (PEG-50CS) の二種類の PEG を用いた。

② SMA-ZnPP: スチレンマレイン酸コポリマー (SMA) を用いて、SMA のスチレンと ZnPP との疎水結合によりミセルを作製した (Iyer AK et al., Biomaterials. 28(10): 1871-81, 2007)。

③ HPMA-ZnPP: HPMA コポリマーを用いて、アミド結合/エステル結合により作製した (Nakamura H et al., J Control Release 165:191-8, 2013)。

(2) ZnPP ミセルの物理化学性質の解析

① 物質の同定: 紫外可視分光法 (UV)、赤外分光法 (IR) 及び MALDI-TOFMS を行った。

② 構造評価: ZnPP ミセルの分子量はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により、溶液状態の粒子径は動的光散乱 (DLS)、走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) により検討した。

③ 安定性: PEG-ZnPP の各種緩衝液および血清/血漿における安定性について、HPLC 法により検討した。

④ 光増感作用: 各種ミセルの光照射による 1O_2 の産生を ESR により検出した。

(3) In vitro 生物活性の検討

① 細胞毒性: 多種 (10 種類以上) の腫瘍細胞を用い、MTT 法により検討した。

② 細胞内取込み: ZnPP の蛍光性質を生かし共焦点顕微鏡および FACS により調べた。また、細胞内の ZnPP を抽出し、蛍光測定による定量を行った。

(4) ZnPP ミセルの体内動態

マウス S-180 腫瘍モデルにおいて、ZnPP ミセルを経静脈注射し、所定の時間後に血液、腫瘍を含む各臓器を採取し、DMSO により、ZnPP ミセルを抽出した。ZnPP 濃度は蛍光強度より定量した。一部の試験で放射性 ^{65}Zn acetate によりラベルした $^{65}\text{ZnPP}$ ミセルを用いて行った。さらに、組織内特に腫瘍内の分布は in vivo imaging により蛍光イメージング像を撮影した。

(5) ZnPP ミセル光化学療法の in vivo 抗腫瘍作用

光源: キセノン光源 (プロジェクター、

朝日分光 MAX303)、波長特異性の高い (420 nm 前後) LED/蛍光光源

腫瘍モデル: マウスザルコーマ S-180 モデル、マウス大腸がん Colon26 モデル及びラット DMBA 化学誘導乳がんモデル

治療は各種 ZnPP ミセルを経尾静脈投与した。PDT の場合、ZnPP ミセル投与 24h 後に各種光源により腫瘍を 5-30 分照射した。治療効果は腫瘍のサイズの変化ならびに病理学的検討により評価した。

4. 研究成果

(1) PEG-ZnPP の構造、体内動態、生物活性の解析

① 生体成分による PEG-ZnPP 結合体の PEG 鎖切断と PEG 鎖切断による生成物の分離精製と構造解析

エステルタイプ PEG-ZnPP を動物の血漿、あるいはマウス腫瘍ホモジネート上清とインキュベーションすると、PEG 鎖結合部が切断され、4 種類の生成物が生じることが分かった (図 1、Peak 2-5)。

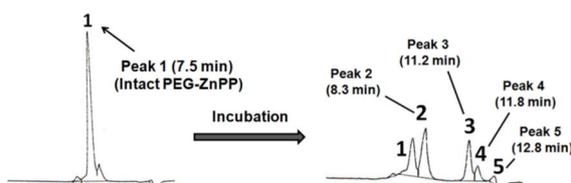


図 1: 血漿/腫瘍ホモジネートにおけるエステル型 PEG-ZnPP の切断

各 peak を MALDI-TOFMS 等の解析した結果により、Peak 1 は完全な PEG-ZnPP で、Peak 2 は 1 本鎖 PEG-ZnPP で、もとの PEG-ZnPP と同様に高分子であることから、EPR 効果に基づく高い腫瘍集積性が期待できると考えられた。Peak 3、4、5 は PEG 鎖が切断された生成物であり、細胞内取り込みが PEG-ZnPP より有利であると考えられた。

② PEG-ZnPP 結合体における PEG 鎖切断生成物の細胞内取り込み

ヒト成人 T 細胞白血病由来細胞 (MT-2) を、PEG-ZnPP や PEG 鎖が切断された生成物で処理し、2 時間後の細胞内取り込み量をフローサイトメトリーを用いて比較した。両タイプ PEG-ZnPP と比較するとフリーの ZnPP や ZnPPED では、細胞内取り込み量のはるかに多いことが分かった (図 2)。また、両タイプ PEG-ZnPP 結合体を比較すると、エステルタイプの方が取り込み量が多かった (図 2 inlet)。このことから、エーテルタイプとエステルタイプでは PEG 鎖切断性に違いがあると考えられた。同様な結果はヒト食道扁平上皮癌由来細胞 (KYSE150) を用いて共焦点レーザー顕微鏡測定で得られた。

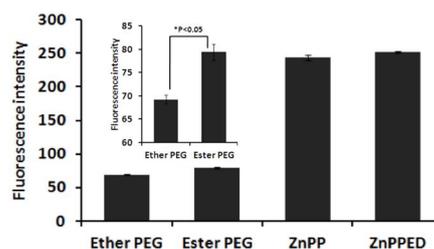


図 2: PEG-ZnPP の細胞内取り込み (MT-2 細胞)

③ PEG-ZnPP の血中安定性

各種血漿を用いて検討した結果、エステルタイプ PEG-ZnPP おいて、Peak 1 の減少および Peak 2 の生成が見られた。さらに、Peak 2 の生成が 4-8 時間まで増加したが、その後だんだん減少し、PEG 鎖が完全に切断されるようになった (図 3)。

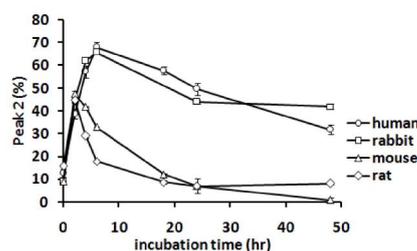


図 3: エステル型 PEG-ZnPP の血中安定性

エーテルタイプ PEG-ZnPP は、いずれの動物の血漿中においても PEG 鎖の切断が見られず、もとの PEG-ZnPP として安定であった。よって、エーテルタイプは血中で安定であり、EPR 効果に基づく高い腫瘍集積性が期待できると考えられた。

以上の結果から、PEG-ZnPP は PEG のタイプの違いにより、血中安定性や体内動態が変わっていることが分かった。エステルタイプの PEG-ZnPP が PEG 鎖の切断が容易に起こることで、細胞内取り込みがよくなったが、血中安定性と腫瘍集積性が欠けている。これに対し、エーテルタイプの PEG-ZnPP は血中安定性と腫瘍集積性がよいものの、PEG ジレンマにより細胞取り込みが悪い欠点がある。さらに、PEG-ZnPP において、その ZnPP の loading が低い (~5%) ので、その薬への応用が大きく制限される。このことより、我々は他の選択肢の SMA-ZnPP と HPMA-ZnPP の検討を行った。

(2) SMA-ZnPP の構造、体内動態、生物活性の解析

① SMA-ZnPP の細胞内取り込み

慢性骨髄性白血病細胞 K562 を用いて検討した。図 4 に示したように、PEG-ZnPP の少ない細胞内取り込みに対し、SMA-ZnPP ミセルは ZnPP と同様に、細胞内へ速やかに取込まれた。

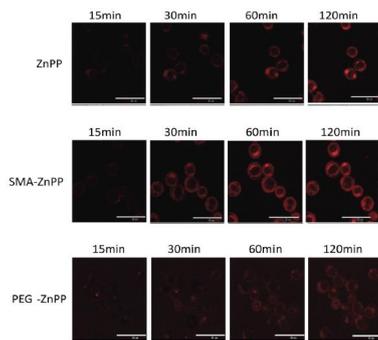


図4：SMA-ZnPPの細胞内取込み。

② SMA-ZnPPの細胞毒性

多種の腫瘍細胞と正常細胞に対するSMA-ZnPPの細胞毒性はTable 1にまとめている。腫瘍細胞において、平均IC₅₀は11.1 Mである。これに対し、正常細胞におけるIC₅₀は50 M以上になり、腫瘍細胞選択的な細胞毒性が見られた。

Table 1
IC₅₀ of SMA-ZnPP against various tumor cells and normal cells.

Tumor cells	IC ₅₀ (μM)	Normal cells	IC ₅₀ (μM)
DLD-1	14.0	CV-1	50.0
Sk-Hep	16.0	HBE140	>50.0
HT-29	5.8	RLF	>200.0
A431	15.0	Hc	>50.0
KP-1N	3.6	HEK293	>50.0
CNE	19.4	CEF	25.2
ES2	9.8		
Lxc	4.2		
MCF-7	3.1		
Meth A	10.8		
B16/F10	20.1		
Mean	11.1 ± 1.9	Mean	>50.0

IC₅₀ was determined by the MTT assay. See text for details.

DLD-1 and HT-29, human colon cancer cells; Sk-Hep, human liver cancer cell; A431, human lung cancer cell; CNE and Lxc, human laryngeal cancer cells; ES2, human ovarian cancer cell; KP-1N, human pancreatic cancer cell; MCF-7, human breast cancer cell; Meth A, mouse fibrosarcoma cell; B16/F10, mouse melanoma cell; CV1, monkey kidney fibroblast; HBE140, human bronchial epithelial cell; RLF, rat liver fibroblast; HEK293, human embryonic kidney cell; CEF, chick embryonic fibroblast; Hc, human hepatic cell.

③ SMA-ZnPPの体内動態

マウス S-180 腫瘍モデルで、⁶⁵Zn ラベルした SMA-ZnPP を用い、SMA-ZnPP の体内動態を検討した結果、SMA-ZnPP は肝臓と脾臓の分布が非常に高く、また予想に反し明らかな腫瘍集積は見られなかった (図5)。肝臓と脾臓への高集積性の一因として ZnPP の特性 (肝臓、脾臓で代謝される) によるものと考えられた。腫瘍分布が十分でないことについては、SMA-ZnPP ミセルの構造、特に血中の不安定性と関わることが考えられた。

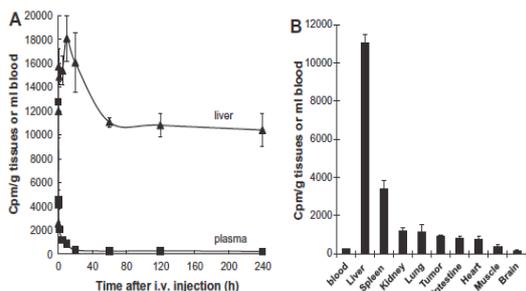


図5：SMA-ZnPPの体内動態。A、血中及び肝臓における経時変化。B、投与24h後の組織分布。

④ SMA-ZnPPのin vivo 抗腫瘍効果

まずウサギの肝臓移植がん VX-2 モデルを用いて検討した結果、SMA-ZnPP 治療後、著名な腫瘍細胞の壊死と線維化が見られ、未治療群と比較し、治療群の生存率が顕著に延長した (Table 2)。

Table 2
Therapeutic effect of SMA-ZnPP on rabbit VX-2 papiloma implanted in the liver.

Group	Dose (mg/kg) ^a	% Survival after treatment ^c			Histological changes (by laparotomy)
		40 days ^b	60 days ^b	80 days ^b	
Control	0	0	0	0	Growing with invasion
SMA-ZnPP	4	100	60	60	Fibrosis appearing
	8	100	80	80	Necrosis, fibrosis in tumors
	12	100	100	100	Necrosis, totally fibrosis

See text and Fig. 4 for details.

^a ZnPP equivalent. SMA-ZnPP was injected once weekly for 4 weeks at the indicated doses.

^b Days after tumor inoculation.

^c n = 5-7 Per group.

同様な結果はマウス B16 メラノーマモデルにおいても認められた。

以上の結果より、SMA-ZnPP は腫瘍細胞特異的な傷害作用ならびに細胞内取込み効率は高く、in vivo においても顕著な抗腫瘍作用をしめした。しかしながら、その血中安定性や腫瘍集積性が低く、本研究課題の腫瘍高選択的な PDT 治療剤の目標には達していない。

SMA-ZnPP または PEG-ZnPP の欠点を補うことを目的として、我々は次に HPMA コポリマーを用い、新たな高分子化 ZnPP (HPMA-ZnPP) を作成した。

(3) HPMA-ZnPPの高腫瘍選択性PDT治療剤としての検討

① HPMA-ZnPPのミセル構造

HPMA-ZnPP の溶解度は非常に高く、水溶液中では、直径およそ 80nm の高分子ミセル構造を形成した (図6 A, B)。ZnPP を疎水コアとしての 50~100nm 程度の球形構造をしていると考えられる (図6 C)。

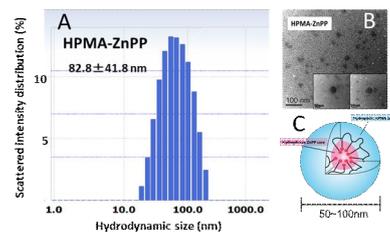


図6：HPMA-ZnPPのミセル構造。A、動的光散乱測定。B、透過型電子顕微鏡測定。C、推定ミセル構造

② HPMA-ZnPPの光増感作用と細胞毒性

HPMA-ZnPP はフリーの ZnPP と比較しその細胞毒性作用弱かった。しかし、光照射によりその細胞毒性作用は大きく増強し、IC₅₀=5~8 μg/ml を示した (図7)。

その光増感作用のメカニズムは ¹O₂ の生

成によるものと考えられる。このことは electron spin resonance (ESR) 法により確認された。HPMA-ZnPP の水溶液に Tween 20 を添加しミセルを崩壊させ、光を照射したところ、光照射時間に依存して 1O_2 の発生が見られた (図 8)。

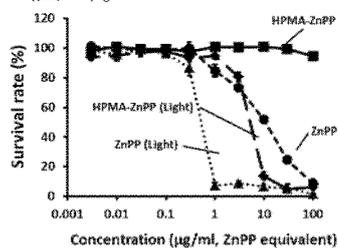


図 7 : HPMA-ZnPP の細胞毒性と光増感作用

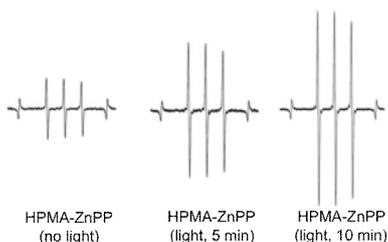


図 8 : 光照射による HPMA-ZnPP からの 1O_2 生成

③ HPMA-ZnPP の体内動態とそれによる in vivo イメージング

ddY マウスにおいて、フリーの ZnPP と比較し、HPMA-ZnPP は優れた血中滞留性を示した (図 9 A)。S-180 担癌マウスでの体内分布に関して、ZnPP 投与後、90%以上が肝臓や脾臓に集積し、腫瘍への分布が認められなかった。しかし、HPMA-ZnPP の投与により、腫瘍濃度は肝臓と同程度、肺、心臓、腎臓に対し 10 倍程度の集積を認めた (図 9 B)。

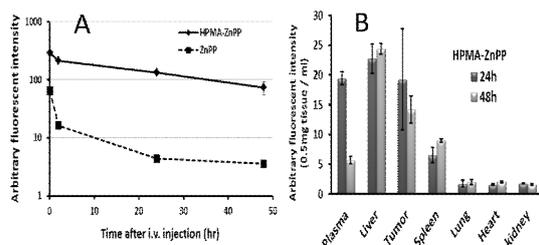


図 9 : HPMA-ZnPP の血中動態(A)と体内分布(B)

HPMA-ZnPP の高い腫瘍集積性により、in vivo 腫瘍イメージングの可能性を検討した。HPMA-ZnPP を投与したマウスでは腫瘍部特異的に蛍光が認められた (図 10)。

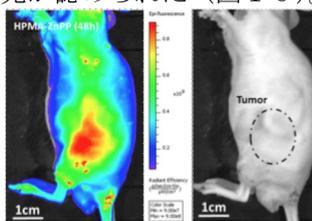


図 10 : HPMA-ZnPP による腫瘍イメージング

④ HPMA-ZnPP の in vivo 抗腫瘍効果

マウス S-180 腫瘍モデルにおいて、HPMA-ZnPP の光照射により、顕著な、かつ HPMA-ZnPP 濃度、照射強度依存的な治療効果が見られた (図 11 A, B)。

この結果より、HPMA-ZnPP の PDT 治療の至適プロトコールは以下のように考えられた。HPMA-ZnPP, 20 mg/kg ; 照射強度、40-60% (朝日分光 MAX303) ; 照射時間、5 分間。このプロトコールで、ラット DMBA 乳がんモデルにおいて顕著な腫瘍増殖の抑制が見られた (図 11 写真)。

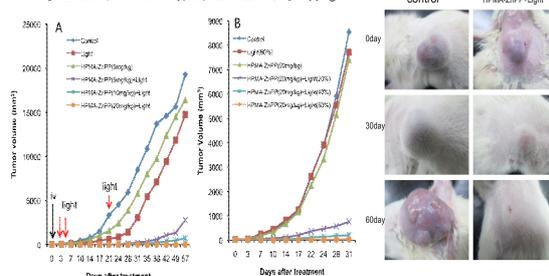


図 11 : HPMA-ZnPP 濃度依存的な(A)、照射強度依存的な(B) PDT 治療効果。写真でラット DMBA 乳がんモデルにおける治療作用を示した。

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

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 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.* 査読有、Vol.165、No.3、2013、pp.191-198.
DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.11.017.
- ② 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.* 査読有、Vol.65、No.1、2013、pp.71-79.
DOI: 10.1016/j.addr.2012.10.002.
- ③ 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.** 査読有、Vol.81、No.3、2012、pp.540-547. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.04.016.

- ④. Nakamura H, Fang J, Bharate G, 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** 査読有、Vol.155、No.3、2011、pp.367-375. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.04.025.
- ⑤. 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** 査読有、Vol.63、No.3、2011、pp.136-151. DOI: 10.1016/j.addr.2010.04.009.

[学会発表] (計6件)

- ①. Maeda H, Nakamura H, Tsukigawa K, Fang J. *The EPR effect and beyond for cancer selective drug delivery and imaging.* **ICBS2013 in Tsukuba.** Tsukuba, Japan, March 19-22, 2013.
- ②. Fang J, Nakamura H, Qin H, Subr V, Hitaka Y, Ulbrich K, Maeda H. *Tumor targeted imaging and photodynamic therapy by HPMA-polymer conjugated Zn-protophyrin micelle.* **71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.** Sapporo, Japan, Sept. 19-21, 2012.
- ③. Nakamura H, Liao L, Subr V, Hitaka Y, Tsukigawa K, Fang J, Ulbrich K, Maeda H. *Tumor selective delivery of Zn-Protoporphyrin conjugated hydroxypropylmethacrylamide polymer (HPMA) micelle for imaging and light induced antitumor effect.* **The 39th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society.** Quebec city, Canada, July 15-18, 2012.
- ④. Maeda H, Nakamura H, Qin H, Tsukigawa K, Fang J. *The EPR effect as seen by tumor imaging of fluorescent proteins and synthetic nanoparticles.* **9th International Symposium on Polymer Therapeutics.** Valencia, Spain, May 28-30, 2012.

- ⑤. Tsukigawa K, Nakamura H, Fang J, Shinkai S, Maeda H. *The importance of cleavage of PEG chains from pegylated zinc protoporphyrin (PEG-ZnPP) by tumor proteases on intracellular uptake.* **The 38th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society.** National Harbor, Maryland, USA, July 30-Aug. 3, 2011.
- ⑥. Nakamura H, Qin H, Bharate GY, Tsukigawa K, Fang J, Maeda H. *Intracellular uptake of water-soluble ZnPP micelles (SMA-ZnPP and PEG-ZnPP) and the unique release mechanism of the drug from their micelles.* **The 37th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society.** Portland, USA, July 10-14, 2010.

[図書] (計1件)

- ①. Fang J, Nakamura H, Seki T, Qin H, Bharate GY, Maeda H. *PEGylated zinc protoporphyrin: a micelle forming polymeric drug for cancer therapy.* In: Sahoo S et al (eds.), **Nanotechnology in Health Care**, Singapore, Pan Stanford Publisher, 169-191, 2012.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：高分子型蛍光分子プローブ
発明者：前田 浩
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2012/072640
出願年月日：2012年09月05日
国内外の別：国内（国際）

6. 研究組織

(1)研究代表者

方 軍 (FANG JUN)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：20412736