

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430162

研究課題名(和文) 診断と治療が同時に可能な腫瘍標的型亜鉛プロトポルフィリンミセルの設計と有用性評価

研究課題名(英文) Design and evaluation of the theranostic potential of tumor-targeted polymeric micelle of zinc protoporphyrin

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で各種ポリマー(SMA, HA, HPMA)を用いZnPPのポリマーミセルを作製し、検討した。SMA-ZnPP conjugateは非共有結合によるSMA-ZnPPミセルより高い血中安定性と腫瘍集積性を示した。HA-ZnPPは高い腫瘍集積性を示す一方、CD44の高発現するがん細胞において高い細胞内取込みと細胞毒性を示した。各種ZnPPミセルのうち、HPMA-ZnPPは最も高い血中安定性と腫瘍選択的な集積を示し、光照射することにより強い細胞毒性を發揮し、化学発がんモデルを含む様々な腫瘍モデルで顕著な腫瘍イメージング効果と抗癌作用を示し、新たなPDT/PDD薬としての応用が強く期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, by using different biocompatible polymer (SMA, HA, HPMA), we prepared different polymeric conjugated ZnPP, and investigated their physiochemical characteristics, in vivo pharmacokinetics as well as antitumor activities. The results showed, 1) SMA conjugated ZnPP showed much better circulating stability and tumor accumulation than previously reported SMA-ZnPP micelle using noncovalent bond; 2) HA-ZnPP exhibited tumor-selective accumulation, more important its intracellular uptake was active in tumor cells highly expressed CD44, leading to high cytotoxicity and antitumor effect; 3) among these ZnPP micelles, HPMA-ZnPP exhibited the best tumor accumulation, resulting in clear tumor imaging and remarkable tumor suppression upon light irradiation in different solid tumor models including carcinogen-induced tumor models. These findings suggest the potential of ZnPP micelles for cancer treatment, especially the potential of HMPA-ZnPP as a cancer theranostic PDT/PDD agent.

研究分野：総合生物

キーワード：ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

我国において、がん(悪性新生物)の死亡者数は年々増加傾向(年間30万人~40万人)にあり、その医療費も増大している。そのため、新規の抗がん剤の研究開発は喫緊の課題であることはいうまでもない。また、がん治療において、がんの早期発見も重要な課題であり、後期ステージで治療を開始した場合に対し、早期発見・治療により、実に3~10倍ほどの5年生存率を示す。これらのことより、抗癌作用を持つ薬剤の開発のみならず、がんの早期発見に寄与する薬剤の開発はがん治療において重要な位置づけを占めるものと考えられる。

本研究室では抗腫瘍剤の創製を目的として、亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)に着目して研究を行ってきた。ZnPPはヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1/HSP32)を阻害することで、腫瘍細胞には細胞毒性を示すが、正常細胞に対しては細胞毒性が低いという特性を持つ。また、光線照射により一重項酸素( $^1O_2$ )を発生することで、抗腫瘍効果を示すことから、新規の抗がん剤として、有用な可能性を秘めている。しかし、ZnPPは水溶性が非常に低いこと、腫瘍組織への集積性がないことから、*in vivo*への応用が困難であった。そこで、本研究ではヒドロキシプロピルメタアクリルアミド(HPMA)を用い、ZnPPを結合させたHPMA-ZnPPを作成した。HPMA-ZnPPは水溶液中でミセルを形成し、高い腫瘍集積性を示すことを確認している。

## 2. 研究の目的

本研究は、高分子ミセル化剤を利用することで、がんの早期発見および治療につながる薬剤の創製を行うことを目的とする。本研究のポイントは、腫瘍集積性を持ち、抗腫瘍活性を持つミセル剤を用いる点にある。さらに、本高分子ミセルの活性本体亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)は蛍光特性があり、また光増感作用も持つため、光照射による腫瘍イメージング/検出と腫瘍標的PDTと同時に可能な新規がんの診断・治療薬の創製を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) ZnPP 高分子ミセルの作製

① HA-ZnPP: ZnPPにアミノ基を導入し、ヒアルロン酸(HA)のカルボキシル基とのアミド結合により合成した。

② SMA-ZnPP conjugate: ZnPPにアミノ基を導入し、スチレンマレイン酸コポリマー(SMA)を用いて、アミド結合により作製した。

③ HPMA-ZnPP: DMSO中またはDMF中においてHPMAポリマーとZnPPとの縮合

反応により行われる。合成の際はカルボジイミド(WSC)、ジメチルアミノピリジン(DMAP)、トリエチルアミンを反応促進剤として用いる(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)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)により検討した。

③ 安定性: ZnPPミセルの各種緩衝液および血清/血漿における安定性について、SEC及び蛍光測定により検討した。

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 細胞毒性と細胞内取り込み

① 細胞毒性: 各がん細胞はMTT法により細胞の生存率を測定し、HPMA-ZnPP単独ならびに光照射による細胞毒性増強作用を確認する。

② 細胞内取り込み: 細胞内のZnPPを抽出し、蛍光測定による定量を行った。

### (4) ZnPP ミセルの薬物動態

ddYマウスS180肉腫皮下移植モデルを用い、HPMA-ZnPPを経静脈注射後経時的に血中または腫瘍および正常臓器・組織中の薬物量を測定する。測定はDMSO抽出、蛍光分光光度計を用いて測定する。

### (5) ZnPP ミセルの 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(420nm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、AOM/DSS誘発マウス大腸がんモデル及びDMBA誘導ラット乳がんモデル

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。

### (6) ZnPP ミセルの腫瘍イメージング効果

上記の各種腫瘍モデルにおいて、各種ZnPPミセルを経尾静脈投与し、経時的に*in vivo*イメージング装置(IVIS Lumina-XR)を用い、ZnPPミセルのイメージング能力を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) HA-ZnPP の構造、体内動態、生物活性の解析

① HA-ZnPPの合成と物理化学性質の同定

ZnPPのカルボキシル基にエチレンジアミンによりアミノ基を導入し(ZnPPED)、こ

れを介し HA とアミド結合により合成した。

分子量の異なる HA を用い、また ZnPP の feeding ratio を変えて合成した結果、高分子量 HA の場合、ゲルを形成し、ZnPP の feeding ratio が高くなると合成産物の水溶性が著しく低下した。このため、本研究では、平均分子量の 3000 Da の HA を用い、ZnPP の loading が 10% の HA-ZnPP を用いた。

この合成は DMF を用いる Gel Permeation Chromatography (GPC) により確認された。合成した HA-ZnPP は水溶液中に平均粒子サイズは約 260 nm (動的光散乱 DLS により) を示し、高分子ミセルとして挙動することが示唆された。また、このミセル形成は ZnPP の蛍光 quenching によりサポートされた。即ち、水溶液中に HA-ZnPP の蛍光がほとんど検出されなかったが、溶媒 (THF) 中に強い蛍光が検出された。

### ② HA-ZnPP の細胞内取り込みと in vivo 細胞毒性

ヒト子宮頸がん細胞 HeLa を用い、HA-ZnPP の細胞内取り込みを調べた結果、Free ZnPP と比較し、HA-ZnPP の細胞内取り込みは約 1/3 であり (図 1)、これまで報告した HPMa-ZnPP Nakamura et al., J Control Release. 2013; 165(3): 191-198) より取り込みが多いに改善された。

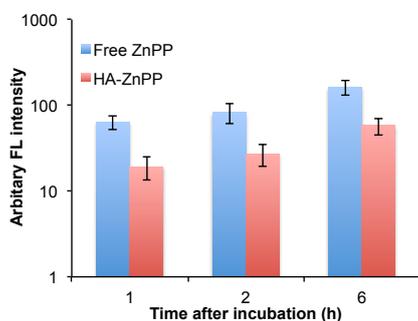


図 1 : HA-ZnPP の細胞内取り込み (HeLa 細胞)

この細胞内取り込みと平行し、HA-ZnPP は強い細胞毒性を示し ( $IC_{50} = 30 \mu M$  vs  $10 \mu M$  of free ZnPP)、さらに、波長 420 nm (ZnPP の最大吸収と一致) の蛍光光源の照射により、細胞毒性が著しく上昇し ( $IC_{50} < 0.1 \mu M$ )、著名な PDT 効果が得られた。同様な結果はヒト大腸がん細胞 HT-29 と DLD-1 においても認められた。

### ③ HA-ZnPP の血中動態と組織分布

マウスザルコーマ S180 腫瘍モデルを用い、HA-ZnPP を経静脈注射し、その in vivo pharmacokinetics を検討した結果、HA-ZnPP は free ZnPP より約 1.0 倍長い血中半減期と AUC を示した。注射 48 時間後の各組織への分布は、ZnPP の代謝と関わる、または高分

子をよくトラップする臓器である肝臓と脾臓への集積が高いが、腫瘍においてこれとほぼ同程度の集積が見られた。肝臓と脾臓以外の正常臓器の比較し、腫瘍内の HA-ZnPP の集積が遥かに高い。さらに Free ZnPP と比較し、腫瘍内濃度は約 5 倍高いことが分かった (図 2)。

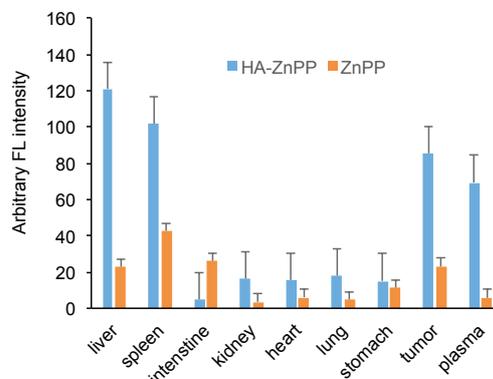


図 2 : HA-ZnPP の in vivo 体内分布

続いて、S180 腫瘍モデルに用い HA-ZnPP の in vivo 抗腫瘍治療効果を検討した。図 3 に示しているように、腫瘍サイズが約 10 mm になった時に HA-ZnPP で四日一回計 3 回治療した結果、腫瘍の増殖が顕著に抑えられた。また、 $6 J/cm^2$  の光照射 (HA-ZnPP 注射 24h 後) により、顕著な PDT 効果が見られなかった。

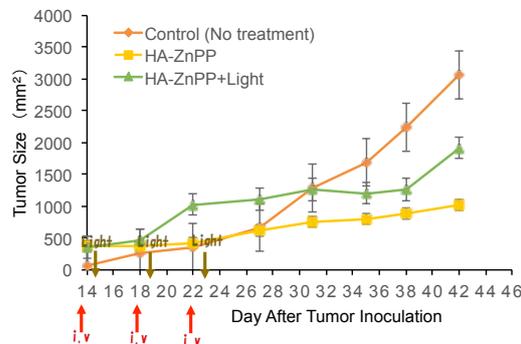


図 3 : HA-ZnPP の in vivo 抗腫瘍効果

以上の結果から、HA-ZnPP はこれまでの HPMa-ZnPP より高い細胞内取り込みと細胞毒性を示し、さらに長い血中半減期と腫瘍集積性を示している。このため、HMPa0-ZnPP に見られない単独抗腫瘍効果が得られた。今回の PDT 効果が見られなかったが、これは光照射の量が足りない (これまでの実験により、 $20 J/cm^2$  以上の照射が必要) と考えられる。新しい抗がん薬の開発に、向けて HA-ZnPP の細胞取り込みの機序 (CD44 の参与、ヒアルロニダーゼの役割など)、治療 dosing、光照射の最適化について検討を続けている。

### (2) SMA-ZnPP conjugate の構造、体内動態、生物活性の解析

#### ① SMA-ZnPP conjugate の物理化学的性質

共有結合により作製した SMA-ZnPP conjugate は水溶液中に平均サイズ 111.6nm のミセルを形成し、血中 (アルブミン存在下) にアルブミンと結合しさらに高分子として挙動する (図 4)。

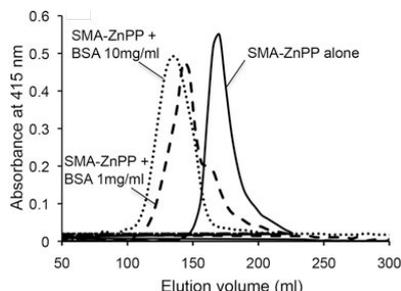


図 4 : SMA-ZnPP conjugate のミセル形成とアルブミン結合能。

#### ② SMA-ZnPP ミセルの安定性

水溶液中に、SMA-ZnPP conjugate はミセルを形成し、蛍光 quenching を示している。このミセル構造は界面活性剤 (e.g., Tween 20) により崩壊され、強い蛍光が検出される。ミセルの崩壊は細胞膜の成分であるレシチンにおいても見られ、SMA-ZnPP が細胞に取込まれる時にミセルが崩壊し、free ZnPP を放出し、強い PDT 作用を発揮することが示唆されている。さらに、血中 (アルブミン存在下) において、蛍光 quenching の変化はなく、ミセルとして安定に存在することが示唆されている。

#### ③ SMA-ZnPP conjugate の体内動態と in vivo イメージング

マウス S-180 腫瘍モデルで、SMA-ZnPP conjugate の体内動態を検討した結果、SMA-ZnPP は ZnPP の代謝が起こる主な臓器である肝臓と脾臓における分布が高いが、他の正常臓器と比べ高い腫瘍集積が見られた (図 5 A)。その腫瘍集積により、in vivo imaging で腫瘍部位の強い蛍光が検出された (図 5 B)。

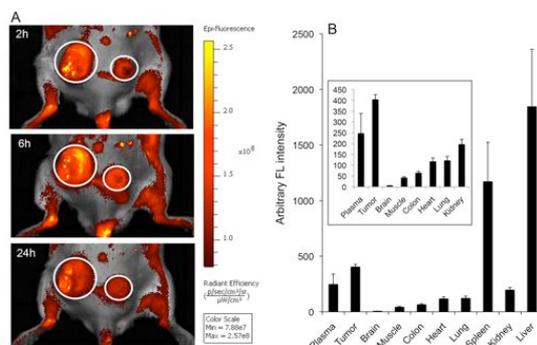


図 5 : SMA-ZnPP conjugate の体内動態。A, in vivo imaging。B, 投与 24 h 後の組織分布。

#### ④ SMA-ZnPP conjugate の細胞毒性と PDT 効果

ヒト子宮頸がん細胞 Hela を用い SMA-ZnPP conjugate の細胞毒性を調べた結果、free ZnPP と比較し細胞毒性が低い (IC50 33ug/ml vs 5 ug/ml)、照射により細胞毒性が顕著に上昇し、PDT への応用が示唆された。

以上の結果より、SMA-ZnPP conjugate は共有結合により血中安定性と腫瘍集積性が有意に改善され、新規抗がん薬になる可能性が見られた。SMA-ZnPP conjugate に関する研究は今後も続いている。

#### (3) HPMA-ZnPP の高腫瘍選択性 PDT/PDD 薬としての検討

HPMA-ZnPP について、これまでの研究で、その作製法が確立された。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することが分かってきた。HPMA-ZnPP は非常に高い血中滞留性と腫瘍集積性を示し、ほとんどの正常臓器と比較し、経静脈注射 24-72 時間後の腫瘍内濃度は 10 倍以上高く、肝臓と脾臓への集積も遥かに減少した。In vivo の preliminary 実験で、著名な腫瘍イメージング効果と PDT 治療効果が見られた (Nakamura et al., J Control Release. 2013; 165(3): 191-198)。

この延長線上で、本研究はヒト癌に近い化学発がんモデルを含む各種固型がんモデルを用い、HPMA-ZnPP の PDT 効果と腫瘍イメージング能力を検討した。その結果：

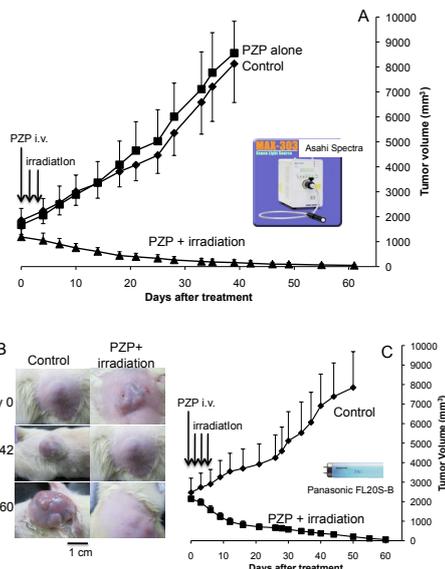


図 6 : DMBA ラット乳がんモデルにおける HPMA-ZnPP の PDT 効果。

① HPMA-ZnPP 濃度依存的、または光強度依存的な著名な in vivo 抗腫瘍 PDT 効果が見られた。

② DMBA 誘発ラット乳がんモデルにお

いて、HPMA-ZnPP 投与後、キセノン光源または蛍光灯光源で照射すると、顕著な腫瘍増殖の抑制、腫瘍の減少が認められ、半数以上の腫瘍が完全になくなり、治療2ヶ月後までに再発が認められなかった (図6)

③ AOM/DSS 誘発マウス大腸がんモデルにおいても、同様な結果が見られた。HPMA-ZnPP 投与後、光ファイバーを用い大腸内照射した結果、著名な腫瘍ノジュールの減少、縮小が認められた (図7)。

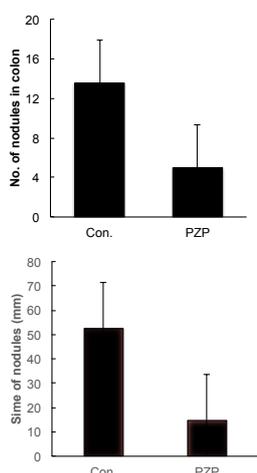


図7：AOM/DSS マウス大腸がんモデルにおける HPMA-ZnPP の PDT 効果

④ 上記の DMBA ラット乳がんモデル及び AOM/DSS マウス大腸がんモデルにおいて、*in vivo imaging* で腫瘍部位の強い蛍光が検出され (図8)、HPMA-ZnPP の腫瘍検出への応用が強く示唆された。

#### A, DMBA induced rat breast cancer



#### B, AOM/DSS induced mouse colon cancer

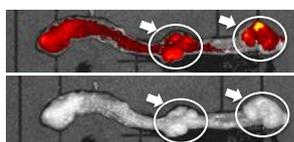


図8：DMBA ラット乳がんモデル (A) 及び AOM/DSS マウス大腸がんモデル (B) における HPMA-ZnPP の腫瘍イメージング・検出。

⑤ これまでの研究で、HPMA-ZnPP は水溶液中のミセル状態で照射後の一重項酸素 ( $^1O_2$ ) の産生がほとんどなく、ミセルの崩壊が PDT 効果を発揮する前提であることが分かってきた (Nakamura et al., *J Control Release*. 2013; 165(3): 191-198)。

HPMA-ZnPP の *in vivo* PDT 作用メカニズムについて、細胞膜成分であるレシチンを用い、照射による  $^1O_2$  の産生が ESR により検討された。HPMA-ZnPP の水溶液は照射後  $^1O_2$  の産生がほとんど認められなかったが、レシチンの添加により、著名な  $^1O_2$  の産生が見られた (図9)。この結果より、HPMA-ZnPP は腫瘍に集積後、腫瘍細胞に取込まれ、その段階でミセルが細胞膜成分により崩壊され、PDT 効果を発揮することが考えられる。

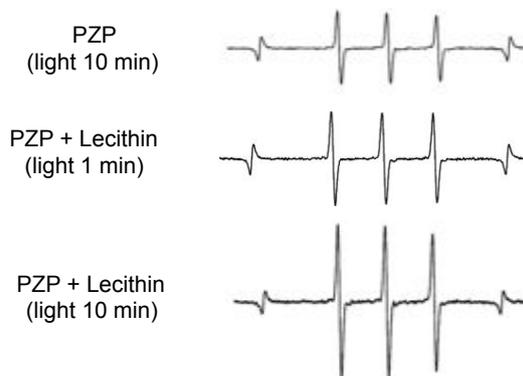


図9：レシチン処理による HPMA-ZnPP からの  $^1O_2$  生成

さらに、HPMA-ZnPP の治療効果の向上を目指し、腫瘍の弱酸性環境で選択的に切断できるヒドラゾン結合をもつ HPMA-hyd-ZnPP についても検討した。その合成法が確立したが、血中安定性と腫瘍集積性がエステル結合・アミド結合をもつ HPMA-ZnPP より劣っているため、PDT/PDD を目的する ZnPP 高分子ミセル剤として、高い血中安定性と腫瘍集積性を有する HPMA-ZnPP が相応しいと考えられ、臨床応用を目指し、検討を続けている。

以上の結果をまとめると、本研究で開発された各種 ZnPP 高分子ミセル剤は、それぞれの特徴により違う用途で使い分けられることが考えられている。HA-ZnPP と SMA-ZnPP は HO 阻害による治療薬として開発する価値があると思われ、特に HA-ZnPP は CD44 高発現する腫瘍に対する治療効果が多いに期待している。一方、HPMA-ZnPP は HO 阻害活性が低い、PDT/PDD 薬剤としての可能性が強く示唆され、その臨床への応用が期待されている。

#### 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. 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.** 査読有、Vol.24、No.5、2016、pp.399-407.  
DOI: 10.3109/1061186X.2015.1077851.

- ②. Maeda H, Tsukigawa K, Fang J. A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic-therapy-Problems, Solutions, Prospects. **Microcirculation.** 査読有、Vol.23、No.3、2016、pp.173-182. DOI: 10.1111/micc.12228.
- ③. Fang J. Enhanced permeability and retention effect based nanomedicine, a solution for cancer. **World J Pharmacology.** 査読有、Vol.4、No.2、2015、pp.168-171. DOI: 10.5497/wjp.v4.i2.168.
- ④. Fang J, Liao L, Yin H, Nakamura H, Subr V, Ulbrich K, Maeda H. Photodynamic therapy and imaging based on tumor-targeted nanoprobe, polymer-conjugated zinc protoporphyrin. **Future Sci. OA.** 査読有、Vol. 1, No. 3、2015. DOI: 10.4155/FSO.15.2
- ⑤. Tsukigawa K, Nakamura H, Fang J, Otagiri M, Maeda H. Effect of different chemical bonds in pegylation of zinc protoporphyrin that affects drug release, intracellular uptake, and therapeutic effect in the tumor. **Eur J Pharm Biopharm.** 査読有、Vol.89、2015、pp.259-270. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.12.016.

[学会発表] (計 6 件)

- ①. Fang J, Nakamura H, Subr V, Ulbrich K, Maeda H. Photodynamic therapy and imaging based on tumor-targeted nanoprobe, pHPMA-conjugated zinc protoporphyrin, and its augmentation. **Symposium of 30 Years Anniversary of the EPR Effect: Revolution in Tumor Drug Delivery using Nanomedicine.** Changchun, P.R.China, Nov. 23-25, 2015.
- ②. Fang J, Nakamura H, Subr V, Ulbrich K, Maeda H. Photodynamic therapy and imaging based on tumor-targeted nanoprobe, pHPMA-conjugated zinc protoporphyrin, and its augmentation. **International conference on Clinical Sciences and Drug Discovery (CSDD-2015).** Baltimore, MA, USA, Nov. 2-4, 2015.
- ③. Fang J, Liao L, Nakamura H, Subr V, Ulbrich K, Maeda H. Tumor-targeted

zinc protoporphyrin-PHPMA micelle for cancer photodynamic therapy and imaging. 第 3 1 回日本 DDS 学会. 京王プラザホテル、東京新宿区, July 2-3, 2015.

- ④. Fang J, Qin H, Yin H, Nakamura H, Maeda H. Micelles of CO releasing molecules encapsulated by styrene-maleic acid copolymer, exhibit therapeutic potential for inflammatory bowel disease with disease-targeting property by EPR effect. **10<sup>th</sup> International Symposium on Polymer Therapeutics: From laboratory to Clinical Practice.** Valencia, Spain, May 19-21, 2014.
- ⑤. Fang J, Liao L, Yin H, Nakamura H, Maeda H. Evaluation of the targeted photodynamic therapeutic effect of HPMa-zinc protoporphyrin micelle in different tumor models. 第 7 2 回日本癌学会. パシフィコ横浜、神奈川県横浜市, Oct. 3-5, 2013.
- ⑥. Fang J, Qin H, Yin H, Nakamura H, Maeda H. Preparation of a water soluble carbon monoxide donor, SMA-CORM2 micelles, and therapeutic potential for inflammatory bowel diseases. **The 40th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society.** Hawaii, USA, July 21-24, 2013.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 高分子型蛍光分子プローブ  
発明者: 前田 浩、橋爪 誠、方 軍  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特許 2 0 1 3-5 3 2 6 3 0  
取得年月日: 2016 年 03 月 25 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: 2 0 4 1 2 7 3 6

(2) 研究分担者

中村 秀明 (NAKAMURA Hideaki)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号: 3 0 4 3 5 1 5 1