

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

|                   |   |
|-------------------|---|
| 題目(和文)            | pH応答性高分子ミセル型ナノメディシンの乳がんリンパ節転移への治療応用に関する研究   |
| Title(English)    |   |
| 著者(和文)            | 千田司   |
| Author(English)   | Tsukasa Chida   |
| 出典(和文)            | 学位:博士(工学),<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第11556号,<br>授与年月日:2020年6月30日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:西山 伸宏,上田 宏,小島 英理,三重 正和,三浦 裕   |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Engineering),<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第11556号,<br>Conferred date:2020/6/30,<br>Degree Type:Course doctor,<br>Examiner:,,,,, |
| 学位種別(和文)          | 博士論文  |
| Type(English)     | Doctoral Thesis   |

博士論文

**pH** 応答性高分子ミセル型ナノメディシンの  
乳がんリンパ節転移への治療応用  
に関する研究

千田 司

# 謝辞

本研究は、国立研究開発法人化学技術振興機構（JST）が運営するセンター・オブ・イノベーション（COI）プログラム、および国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）が運営する次世代がん医療創生研究事業（P-CREATE）の資金的援助を受けて実施致しました。

最初に、西山 伸宏教授に深く感謝を申し上げます。西山教授には、本研究に携わる機会を与えて頂くとともに、その推進において数多くの有益なご助言を頂きました。また、私の社会人としての立場を尊重頂き、研究のみならず多方面にわたり真摯にご指導を頂いたことに関しては心より感謝を申し上げます。

また、研究の推進にあたり、ディスカッションを通して数々のご助言を頂きました西山研究室の全てのスタッフ、並びに学生の皆様に深く感謝を申し上げます。特に、三浦 裕准教授、武元 宏泰助教、野本 貴大助教、並びに松井 誠特任助教におかれましては、基礎的な手技を含む実験の指導から、その結果の学術的な解釈にわたるご指導を頂き、研究者としての在り方をご教授頂いた点に深く感謝を申し上げます。

また、数々の有意義なご助言を頂きました川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンター 片岡 一則センター長、並びに東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 カブラル オラシオ准教授に深く感謝を申し上げます。

また、学位取得へのご理解を頂き業務への配慮を含め資金的、および精神的に多大なご援助を頂きました、興和株式会社常務取締役執行役員研究統括部統括部長 奥村 睦男様を代表とする関係者の皆様に深く感謝を申し上げます。

最後に、本研究の遂行に深い理解を頂き、日常生活面での多大なご協力を頂きました、妻 千田 明音、そして長男 千田 健に深く感謝を申し上げます。

# 略語集

|        |   |                        |
|--------|---|------------------------|
| ALNM   | axillary lymph node metastasis                      | 腋窩リンパ節転移               |
| Asp    | aspartic acid                                       | アスパラギン酸                |
| AUC    | area under the concentration-curve                  | 時間曲線下面積                |
| BAFA1  | bafilomycin A1                                      |                        |
| CLSM   | confocal laser scanning microscopy                  | 共焦点レーザー走査型顕微鏡          |
| CT     | computed tomography                                 | コンピュータ断層撮影             |
| DACHPt | ( <i>trans</i> -1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) |                        |
| DCM    | dichloromethane                                     | ジクロロメタン                |
| DDS    | drug-delivery system                                | ドラッグデリバリーシステム          |
| DLS    | dynamic light scattering                            | 動的光散乱法                 |
| DMF    | <i>N,N</i> -dimethylformamide                       | <i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド |
| DMSO   | dimethyl sulfoxide                                  | ジメチルスルホキシド             |
| DOX    | doxorubicin   | ドキソルビシン                |
| D-PBS  | Dulbecco's phosphate-buffered saline                |                        |
| EPI    | epirubicin  | エピルビシン                 |
| EPI/m  | epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle   |                        |
|        |   | エピルビシン内包 pH 応答性高分子ミセル  |
| EPR 効果 | enhanced permeability and retention effect          |                        |
| FBS    | fetal bovine serum                                  | ウシ血清アルブミン              |
| GFP    | green fluorescent protein                           | 緑色蛍光タンパク質              |

|                    |   |                           |
|--------------------|---|---------------------------|
| Glu                | glutamic acid   | グルタミン酸                    |
| GPC                | gel permeation chromatography   | ゲル浸透クロマトグラフィー             |
| H&E 染色             | hematoxylin and eosin staining  | ヘマトキシリンおよびエオジン染色          |
| HER2               | human epidermal growth factor 2/neu                                       |                           |
| HIF                | hypoxia-inducible factor  | 低酸素誘導性因子                  |
| <sup>1</sup> H-NMR | proton nuclear magnetic resonance spectroscopy                            | プロトン核磁気共鳴分光法              |
| IC <sub>50</sub>   | 50% growth inhibitory concentration                                       | 50%増殖阻害濃度                 |
| IVIS               | <i>in vivo</i> imaging system   | <i>in vivo</i> イメージングシステム |
| MMPs               | matrix metalloproteases   | マトリックスメタロプロテアーゼ           |
| MRI                | magnetic resonance imaging  | 核磁気共鳴画像                   |
| MTT                | 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 <i>H</i> -tetrazolium bromide |                           |
| NCA-BLA            | <i>N</i> -carboxyanhydride of $\beta$ -benzyl L-aspartate                 |                           |
| PDI                | polydispersity index  | 多分散指数                     |
| PEG                | polyethylene glycol   |                           |
| RES                | reticuloendothelial system  | 細網内皮系                     |
| ROI                | regions of interest   | 関心領域                      |
| RPLC               | reversed phase liquid chromatography                                      | 逆相液体クロマトグラフィー             |
| TME                | tumor microenvironment  | 腫瘍微小環境                    |
| TNBC               | triple negative breast cancer   | トリプルネガティブ乳がん              |
| VCAM-1             | vascular cell adhesion molecule-1   |                           |
| VEGF               | vascular endothelial growth factor  | 血管内皮細胞増殖因子                |

# 目次

## 第1章 序論

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 1.1 緒言.....                           | 2  |
| 1.2 乳がんの転移とその治療に関する現状.....            | 2  |
| 1.2.1 乳がんの転移.....                     | 2  |
| 1.2.2 腋窩リンパ節転移の治療戦略.....              | 3  |
| 1.2.3 トリプルネガティブ乳がんの化学療法.....          | 4  |
| 1.3 がん治療におけるドラッグデリバリーシステム.....        | 5  |
| 1.3.1 ドラッグデリバリーシステム.....              | 5  |
| 1.3.2 ナノテクノロジーを利用したドラッグデリバリーシステム..... | 5  |
| 1.3.3 乳がん治療におけるドラッグデリバリーシステム.....     | 8  |
| 1.4 高分子ミセルを用いたドラッグデリバリーシステム.....      | 10 |
| 1.4.1 薬物キャリアとして的高分子ミセル.....           | 10 |
| 1.4.2 pHによる内包薬物の放出制御.....             | 13 |
| 1.4.3 pH応答性高分子ミセルの臨床応用.....           | 15 |
| 1.4.4 高分子ミセルによる転移がん治療の可能性.....        | 16 |
| 1.5 本論文の概要.....                       | 18 |
| 1.5.1 本研究の重要性.....                    | 18 |
| 1.5.2 本論文の構成.....                     | 20 |
| 1.6 参考文献.....                         | 21 |

## 第2章 *In vitro* 評価によるエピルビシン内包 pH 応答性高分子ミセルの環境応答性薬物放出能の検証

|             |    |
|-------------|----|
| 要旨.....     | 34 |
| 2.1 緒言..... | 34 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| 2.2        | 実験  | 36 |
| 2.2.1      | 試薬  | 36 |
| 2.2.2      | 細胞株および培養方法  | 37 |
| 2.2.3      | EPI 結合ブロック共重合体の合成   | 37 |
| 2.2.4      | 高分子の構造解析  | 39 |
| 2.2.5      | EPI 含量の測定   | 40 |
| 2.2.6      | EPI/m の調製   | 41 |
| 2.2.7      | EPI/m の物性評価   | 42 |
| 2.2.8      | in vitro 薬物放出性評価  | 42 |
| 2.2.9      | 細胞取り込み量の定量  | 43 |
| 2.2.10     | 細胞内局在部位観察   | 44 |
| 2.2.11     | エンドソーム内の pH 低下阻害下における細胞取り込み量の定量                             | 45 |
| 2.2.12     | in vitro 抗腫瘍活性評価  | 46 |
| 2.3        | 結果および考察   | 46 |
| 2.3.1      | EPI 結合ブロック共重合体の合成および構造解析                                    | 46 |
| 2.3.2      | EPI/m の調製   | 49 |
| 2.3.3      | EPI/m の in vitro 薬物放出性評価                                    | 50 |
| 2.3.4      | EPI/m の細胞取り込み挙動に関する検証                                       | 52 |
| 2.3.5      | EPI/m の in vitro 細胞増殖阻害活性評価                                 | 57 |
| 2.4        | 結論  | 59 |
| 2.5        | 参考文献  | 60 |
| <b>第3章</b> | <b>術前化学療法を模倣した治療条件におけるエピルビシン内包 pH 応答性高分子ミセルの抗腫瘍効果に関する検討</b> |    |
|            | 要旨  | 65 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1 緒言.....   | 65 |
| 3.2 実験.....   | 67 |
| 3.2.1 試薬.....   | 67 |
| 3.2.2 細胞および実験動物.....  | 67 |
| 3.2.3 高分子ミセルの調製.....  | 67 |
| 3.2.4 腋窩リンパ節転移形成を伴う乳がん同所移植モデルマウスの作製.....                                      | 68 |
| 3.2.5 原発腫瘍及びリンパ節転移の増殖推移の評価.....   | 68 |
| 3.2.6 乳がん同所移植モデルマウスに対する抗腫瘍効果.....   | 69 |
| 3.2.7. 統計学的解析.....  | 69 |
| 3.3 結果および考察.....  | 70 |
| 3.3.1 MDA-MB-231-luc-D3H2L 乳がん同所移植モデルにおける原発腫瘍の増殖性<br>評価.....                  | 70 |
| 3.3.2 MDA-MB-231-luc-D3H2L 乳がん同所移植モデルにおける転移形成過程の評<br>価.....                   | 73 |
| 3.3.3 腋窩リンパ節転移形成を伴う MDA-MB-231-luc-D3H2LN 乳がん同所移植モ<br>デルに対する EPI/m の治療効果..... | 75 |
| 3.4 結論.....   | 79 |
| 3.5 参考文献.....   | 79 |
| <b>第4章 術前化学療法を模倣した治療条件におけるエピルビシン内包 pH 応答性高<br/>        分子ミセルの薬物送達機序に関する検討</b> |    |
| 要旨.....   | 85 |
| 4.1 緒言.....   | 85 |
| 4.2 実験.....   | 87 |
| 4.2.1 試薬.....   | 87 |

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| 4.2.2      | 細胞および実験動物 .....   | 87  |
| 4.2.3      | 高分子ミセルの調製 .....   | 88  |
| 4.2.4      | 乳がん同所移植モデルマウスの作製 .....                                      | 89  |
| 4.2.5      | 血漿および原発腫瘍中のエピルビシン濃度推移の評価 .....                              | 89  |
| 4.2.6      | Alexa 647 標識 EPI/m の原発腫瘍内分布の観察 .....                        | 91  |
| 4.3        | 結果および考察 .....   | 92  |
| 4.3.1      | EPI/m の血漿および原発腫瘍中濃度推移 .....                                 | 92  |
| 4.3.2      | Alexa 647 標識 EPI/m の調製 .....                                | 96  |
| 4.3.3      | Alexa 647 標識 EPI/m の原発腫瘍内微小分布 .....                         | 97  |
| 4.3.4      | 考察 .....  | 100 |
| 4.4        | 結論 .....  | 101 |
| 4.5        | 参考文献 .....  | 101 |
| <br>       |   |     |
| <b>第5章</b> | <b>術後化学療法を模倣した治療条件におけるエピルビシン内包 pH 応答性高分子ミセルの抗腫瘍効果に関する検討</b> |     |
|            | 要旨 .....  | 106 |
| 5.1        | 緒言 .....  | 106 |
| 5.2        | 実験 .....  | 108 |
| 5.2.1      | 試薬 .....  | 108 |
| 5.2.2      | 細胞および実験動物 .....   | 109 |
| 5.2.3      | 高分子ミセルの調製 .....   | 109 |
| 5.2.4      | 生物発光強度の細胞数に対する直線性の確認 .....                                  | 109 |
| 5.2.5      | 原発腫瘍切除下における腋窩リンパ節転移残存乳がんモデルマウスの作製 .....                     | 110 |
| 5.2.6      | 腋窩リンパ節転移の組織学的観察 .....                                       | 110 |

|   |  |     |
|---|--|-----|
| 5.2.7   | pH 応答性エピルビシン内包高分子ミセルの抗腫瘍効果の確認 .....        | 111 |
| 5.2.8.  | 統計学的解析 .....                               | 111 |
| 5.3   | 結果および考察 .....                              | 112 |
| 5.3.1   | 原発腫瘍切除下における腋窩リンパ節転移残存乳がんモデルマウスの作製<br>..... | 112 |
| 5.3.2   | 残存腋窩リンパ節転移の定量的評価による分類 .....                | 114 |
| 5.3.3   | 腋窩リンパ節転移残存乳がんモデルマウスを用いた抗腫瘍効果の評価 ...        | 118 |
| 5.3.4   | 考察 .....                                   | 121 |
| 5.4   | 結論 .....                                   | 122 |
| 5.5   | 参考文献 .....                                 | 122 |
| <b>第6章 術後化学療法を模倣した治療条件におけるエピルビシン内包 pH 応答性高<br/>分子ミセルの薬物送達機序に関する検討</b> |  |     |
|   | 要旨 .....                                   | 128 |
| 6.1   | 緒言 .....                                   | 128 |
| 6.2   | 実験 .....                                   | 131 |
| 6.2.1   | 試薬 .....                                   | 131 |
| 6.2.2   | 細胞および実験動物 .....                            | 131 |
| 6.2.3   | 高分子ミセルの調製 .....                            | 131 |
| 6.2.4   | 血漿および転移/健常リンパ節中のエピルビシン濃度推移の評価 .....        | 132 |
| 6.2.5   | Alexa 647 標識 EPI/m の原発腫瘍内分布の観察 .....       | 133 |
| 6.3   | 結果および考察 .....                              | 134 |
| 6.3.1   | EPI/m の血漿中濃度推移のモデル間差に関する検証 .....           | 134 |
| 6.3.2   | 転移/健常リンパ節における EPI/m の組織中濃度推移 .....         | 136 |
| 6.3.3   | 転移リンパ節における EPI/m の微小分布の観察 .....            | 137 |

|               |  |     |
|---------------|--|-----|
| 6.3.4         | 転移/健常リンパ節における EPI/m の薬物放出挙動に関する検証..... | 140 |
| 6.3.5         | 考察.....                                | 143 |
| 6.4           | 結論.....                                | 146 |
| 6.5           | 参考文献.....                              | 147 |
| <b>第7章 総括</b> |  |     |
|               | 総括.....                                | 152 |

# 第 1 章

## 序論

## 1.1 緒言

抗体医薬を用いた分子標的治療や体外診断薬を用いた悪性腫瘍関連遺伝子検査など、治療および診断技術の革新的な進歩にも関わらず、がんは依然として非感染性疾患関連死亡における大きな割合を占めている[1,2]. がんの転移は、原発腫瘍細胞の新生血管もしくはリンパ系を介した拡散に伴う二次的な腫瘍形成により引き起こされ、その結果、がんは極めて悪性度の高い難治性疾患となる[3,4]. 実際に、転移はがんの死亡要因の90%を占めており[5]、治療および診断の重要な標的となっている[6].

一方、高分子化学と材料工学の発展を基盤として創製された機能性材料は、がんの治療および診断においても有用性が期待されており、特にナノテクノロジーを応用した薬物の送達性改善は革新性の高い創薬/創剤技術として注目を集めている[7,8].

本論文では、転移がん治療における有効性と安全性の高い新たな薬剤の設計方針を提示することを目的とし、ナノテクノロジーを応用したドラッグデリバリーシステムの乳がんリンパ節転移に対する有用性について述べる. 本章では、本論文に関連する医学的・学術的背景について論ずる. 1.2 項では、乳がんの転移とその治療に関する現状について述べる. 1.3 項では、がん治療におけるナノテクノロジーを応用したドラッグデリバリーシステムについて、乳がん治療における実用化事例を紹介しながら説明する. 1.4 項では、薬物キャリアとして的高分子ミセルの有用性と転移がん治療への応用の可能性について述べる.

## 1.2 乳がんの転移とその治療に関する現状

### 1.2.1 乳がんの転移

乳がんは、種々の原発性腫瘍の中で女性の罹患率が最も高い腺癌である[2]. 初期乳がん患者のうち30%は再発と遠隔転移を経験し[9]、その転移パターンは、リンパ節

を起点として、骨、肝臓、および肺等の遠隔臓器へと進行することが知られている[10]. リンパ節の中でも腋窩リンパ節は、原発病変の近傍に位置するために最初にがんが転移する部位となる[10]. そのため、腋窩リンパ節転移 (axillary lymph node metastasis, ALNM) は乳がんの進行度の指標とみなされ、その予後との相関性については 20 世紀前半から盛んに検証されてきた[11]. 近年では大規模コホート研究により、直径約 0.2 mm の微小転移の形成でさえ、独立した予後不良因子となることが判明している[12–16]. このような背景から、乳がんのケアにおいては ALNM を制御するための様々な診断/治療アプローチが研究されつつある.

### 1.2.2 腋窩リンパ節転移の治療戦略

ALNM に対する治療手段としては、外科的切除[17]、放射線療法[18]、および化学療法[19,20]が挙げられる. その内、外科的切除と放射線療法は、局所転移には有効な手法であるが、高い侵襲性を伴うために現在の転移性乳がんの治療においては推奨されていない[21]. 一方、化学療法は遠隔転移や微小転移を含む全身の標的に対して有効性を示すことが知られており、ALNM の治療に於いても有力な選択肢となり得る. 従って現在の臨床現場では、治療期全般において種々の薬剤の組み合わせによる多剤併用化学療法が適用されている[22].

乳がんの化学療法における薬剤選択では、ホルモン (エストロゲン, もしくはプロゲステロン) 受容体の有無, および human epidermal growth factor 2/neu (HER2) 過剰発現の有無により分類される 4 種類のサブタイプが考慮される[22]. すなわち、ホルモン受容体陽性のサブタイプに関してはホルモン療法, HER2 陽性のサブタイプに関しては分子標的薬を用いた抗 HER2 療法がそれぞれ第一選択となる[22]. しかし、これらの標的化可能なバイオマーカーが欠如したトリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) は、臨床像が多様であり全体的に予後不良であること

から、難治性のサブタイプと認識されている[23].

### 1.2.3 トリプルネガティブ乳がんの化学療法

TNBC の化学療法においては、低分子薬剤であるアントラサイクリンとタキサンが主に用いられる[22]. これらの薬剤を用いた化学療法は、原発性の TNBC に対して高い奏効率を示している[24]. しかし、転移性 TNBC における有効性は低く、患者の 5 年生存率は 30%未満に留まる[24]. 一方、アントラサイクリンやタキサンの高用量投与は転移性 TNBC 患者に対する有効性が示唆されているが[25], 抹消神経毒性[26]や心毒性[27]といった重篤な副作用の懸念によって実用化に至っていない. 特に、アントラサイクリンの中で最も古典的な薬剤であるドキソルビシン (doxorubicin, DOX) は、累積投与量の増大に伴い重篤な心毒性の発生頻度が高くなることが報告されており[28], 患者一人当たりの総投薬量が  $500 \text{ mg/m}^2$  に規制されている[29]. この投薬量は、転移性乳がん患者に対する標準的な用法[29]として 8 回分の投薬にしか相当していない. そのため DOX を長期的ながん治療薬として適用することは極めて困難である. また、DOX の立体異性体であるエピルビシン (epirubicin, EPI) は、安全性の問題を改善したアントラサイクリンであり、DOX の代替薬として最も多く用いられる. しかし、EPI 投与によるうっ血性心不全のリスクが報告されていることから、その総投薬量は  $900 \text{ mg/m}^2$  に規制されている[30]. このような治療上の制限を克服するために、遺伝子異常の種類による新たな TNBC の分類に従った新薬の探索が進められているものの、現在までに治療上有用と認められる標的分子は見出されるに至っていない[24]. 従って現在の臨床現場においては、TNBC の ALNM に有効であり、かつ、副作用のリスクが低い革新的な治療薬の開発が求められている.

## 1.3 がん治療におけるドラッグデリバリーシステム

### 1.3.1 ドラッグデリバリーシステム

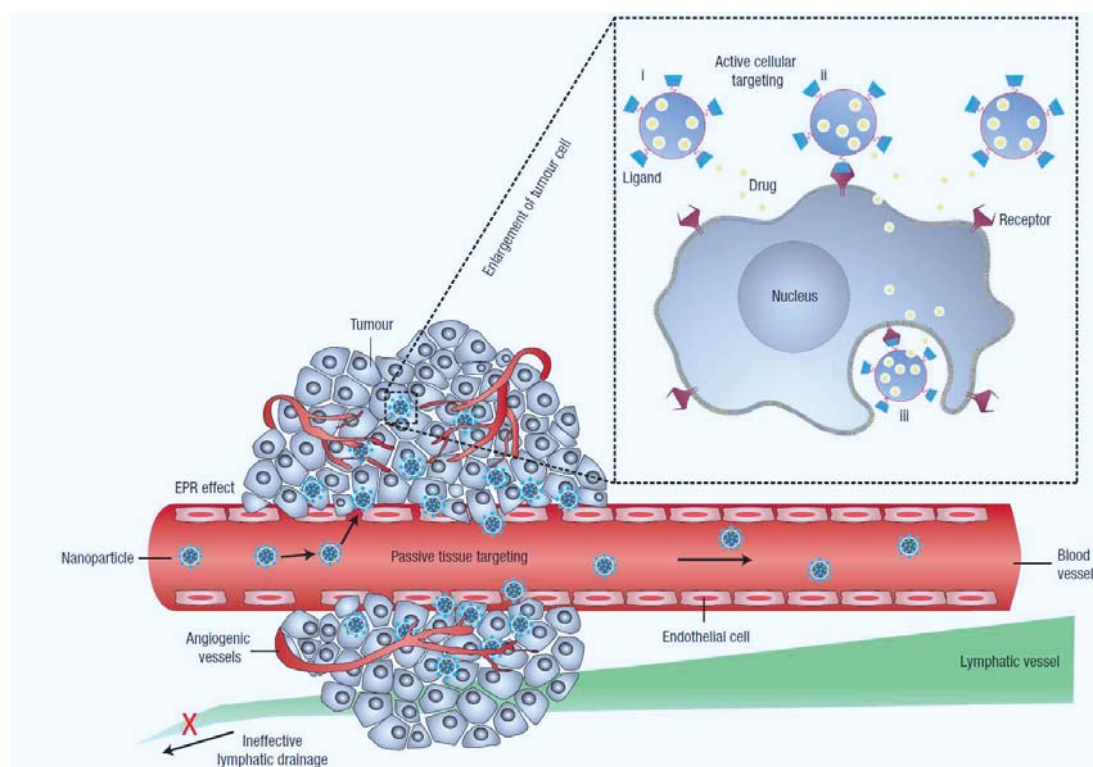
低分子薬剤を用いた化学療法では、用量依存的な薬効と副作用発現のバランスを考慮した投与方法の最適化が行われている。しかし、正常組織への非選択的な分布や血中からの速やかなクリアランスにより、その有効性は制限されている。薬物の部位選択性や動態を改善するため、投与された薬物の体内分布を量的かつ時空間的に制御し、必要な場所で必要な時間のみに薬物が作用する理想的な薬物送達方法の構築が試みられている。このような方法は、ドラッグデリバリーシステム (drug-delivery system, DDS) として広く認知されており、その具体的な制御対象は、i) 薬物の吸収性改善、ii) 標的指向性の付与、iii) 放出制御となっている[7]。これまでも数多くのDDS研究が進められ、それらの一部は治療・診断の両面において臨床試験が実施されている[31,32]。

### 1.3.2 ナノテクノロジーを利用したドラッグデリバリーシステム

ナノテクノロジーは、材料工学におけるカーボンナノチューブ等の炭素材料や半導体工学における Nano Electro Mechanical Systems (NEMS) のようなデバイス作製技術等、種々の分野において広く材料開発への応用が進められている[33]。がん治療薬への応用においては、ナノ粒子の構造的特性を利用した固形がんへの標的化技術について盛んに研究が行われている[34]。

固形がん組織は、自律的な増殖能を維持するために血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等の血管新生因子を産生し、血管新生を促進することが知られている[35,36]。固形がん組織において形成される新生血管 (腫瘍血管) は、正常血管と比較して構造的に未成熟であり、血管内皮に広い細胞間隙が生じているた

め、物質の透過性が高い[34,37]. この構造的特徴によりナノ粒子を含む高分子量体は、腫瘍血管を選択的に透過し固形がん組織に集積することが知られている[34,37]. さらに、固形がん組織では高分子の排出に関与するリンパ系が機能不全を起こしているため、浸透したナノ粒子は組織内で持続的に滞留する[34,37]. このようなナノ粒子の集積特性は enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) と呼ばれている[34,37,38] (Figure 1-1). 一般的な低分子薬剤は血管細胞の膜透過により血管外に漏出するため、非選択的に組織に分布する. EPR 効果の方法論によれば、ナノ粒子を利用した薬物送達は、組織への分布が血管内皮細胞間隙の透過性により支配されるため、薬物の分布に固形がんへの組織選択性の向上をもたらす. それ故に EPR 効果は、固形がんを標的としたナノテクノロジー応用医薬品 (ナノメディシン) の開発における、有力な学術的根拠となっている.



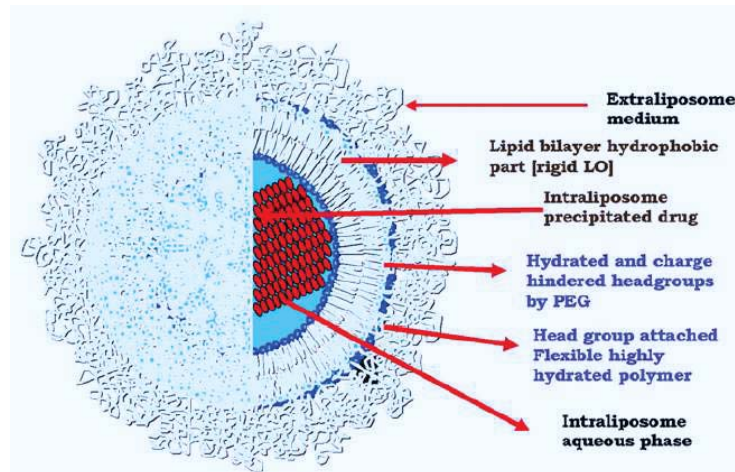
**Figure 1-1.** Schematic representation of enhanced permeability and retention effect (EPR effect) [37].

EPR効果における薬物の送達過程は血流を介しており、かつナノ粒子の血管外漏出プロセスは受動的であると考えられている[39]。従って、固形がんに対するナノ粒子の集積を最大化するためには、薬物の運搬体（薬物キャリア）となるナノ粒子の構成成分に対して、長期の血中滞留に堪え得る分子デザインを付与することが重要である[39]。それ故に薬物キャリアには、血液構成成分との非特異的相互作用、肝臓、脾臓および肺における細網内皮系（reticuloendothelial system, RES）による異物認識、腎臓における糸球体ろ過といった障壁を回避する能力が求められる[34]。また、これらの障壁は、粒子サイズや生体適合性高分子による表面修飾といった粒子特性の最適化によって克服し得ることが知られている。例えば薬物キャリアの粒子径は、腎クリアランスの閾値である約6 nm[40,41]よりも大きく、RESによる認識を免れ得る200 nm[42]よりも小さいことが望ましい。更に、血液構成成分との非特異的相互作用を回避するためには、ポリエチレングリコール（polyethylene glycol, PEG）、ポリグリセロール、ポリオキサゾリン、およびポリビニルピロリドンといったノニオン性の生体適合性高分子による表面修飾が有効である[34,42,43]。中でもPEGは、i) エーテル酸素原子と水分子との水素結合がもたらす高い水との相溶性、ii) 分子内の回転運動が容易であることによる高い運動性と柔軟性、および iii) 水中での大きな排除体積効果といった分子構造に由来する特性から生体との界面において広く適用されている[43]。また、免疫原性や毒性が低いことよりインターフェロン $\alpha$ （Pegasys®）、アデノシンデアミナーゼ（Adagen®）、およびアスパラギナーゼ（Oncaspar®）といった種々のタンパク質医薬品における修飾材として承認実績がある[43]。薬物キャリアへの応用においてPEGによる表面修飾は、血液構成成分からのオプソニン化を妨げることにより貪食細胞への取り込みを抑制させ、血中滞留性を延長させる[44]。さらに、高い運動性がもたらす立体反発力による分散安定性の向上、および電荷の遮蔽効果による生体成分との静電的相互作用の回避といったメリットを薬物キャリアにもたらすことが知られ

ている[34,42].

### 1.3.3 乳がん治療におけるドラッグデリバリーシステム

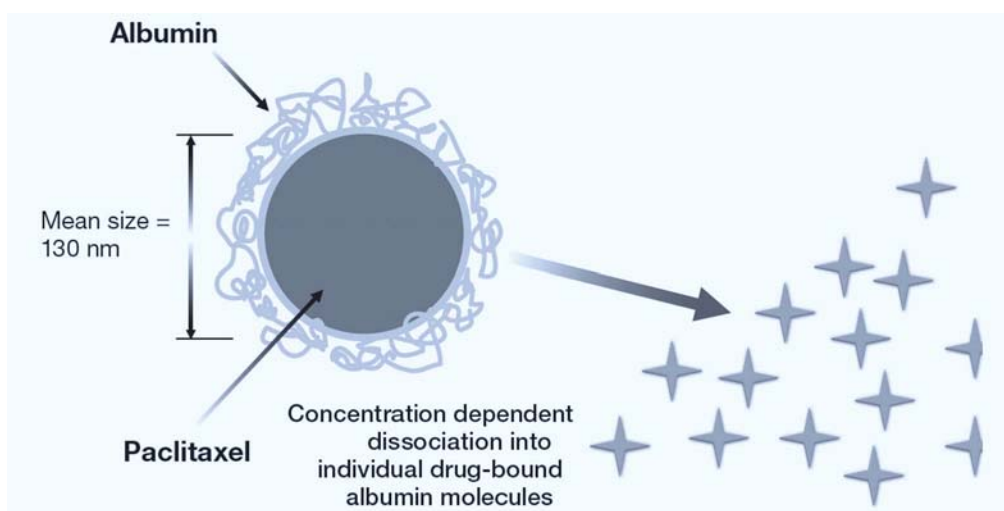
ナノサイズの薬物キャリアを利用した DDS 医薬品は、既に乳がんの化学療法において実用化されている。例えば、EPR 効果の有用性を臨床的に証明した代表的なナノメディシンとして Doxil® (別名 Caelyx®) が挙げられる[45]。Doxil®は DOX を封入した粒子径 80 nm の PEG グラフトリポソームであり (Figure 1-2), 臨床試験において DOX 単体の溶液投与と比較して内包薬物の血中滞留性の向上と腫瘍組織における集積性の向上が実証されている[45]。さらに, Doxil®は DOX に由来する重篤な心毒性の発現リスクを低減するなど, 副作用の軽減が確認されている[45]。これらの成果から Doxil®は, 転移性乳がん, 後天性免疫不全症候群関連カポジ肉腫, および再発卵巣がんの治療薬として認可されている[45]。一方で, 転移性乳がんを対象とした臨床試験において Doxil®の治療効果は DOX と比較して同等との結果が得られており[46], 有効性の改善効果については議論の余地がある。実際に, Doxil®の課題として, i) リポソームの高い物理化学的安定性により患部における内包薬物の利用率が低い点[47], もしくは ii) 腫瘍血管漏出後の組織浸透性が低いために適応可能ながん種が限定される点[48,49]などが指摘されており, その粒子設計には改善の余地が残されている。



**Figure 1-2.** Formation of doxorubicin loaded unilamellar liposome (Doxil®)[45].

ナノテクノロジーを利用した難水溶性薬物の可溶化により副作用低減を達成した事例としては、Abraxane®が挙げられる[50,51]. Abraxane®は、パクリタキセルをヒト血清アルブミンへ可逆的に結合させることで水溶液中での安定分散性を獲得させた懸濁性注射剤である (Figure 1-3) [50,51]. この可溶化技術は、先発のパクリタキセル含有製剤 (タキソール®) が含有する可溶化剤 (ポリオキシエチレンひまし油, および無水エタノール) 由来の過敏症を軽減することにより、推奨用量の増大, 並びに点滴時間の短縮といった利便性の向上をもたらしている[50–52]. さらに推奨用量の増大によりAbraxane®は、先発製剤との比較臨床試験において転移性乳がんに対する奏効率の改善が確認されている[50,51]. 以上の臨床成績からAbraxane®は、乳がん, 胃がん, 非小細胞肺癌, および切除不能膵がんにおいて、パクリタキセルの代替薬として用いられている[53]. 一方で、Abraxane®におけるパクリタキセルの体内動態は先発製剤と同等であり、がん組織への集積における選択性を持たないため[50,51], 有効性の改善効果は限定的であると考えられる. 実際に、Abraxane®は実験的なTNBCのALNMモデルにおいてパクリタキセルに対する優位性を示しておらず[54], 難治性疾患の治療薬としては標的組織への薬物の送達性の向上が必要であると思われる.

以上の様に、現在臨床で使用されているナノメディシンは、標的組織への薬物キャリアの集積性の向上や難溶性化合物の溶解性改善といったナノテクノロジーがもたらす恩恵の一部を実現したものである。しかし、低分子薬剤の課題である有効性と安全性の改善効果の両立には至っておらず、薬物送達方法の更なる改良が求められている。特に、有効性改善の観点においてこれらのナノメディシンの設計には工夫の余地があり、薬物キャリアへの更なる機能の集約はナノテクノロジーを応用したDDSの進歩において必達の課題であると考えられる。



**Figure 1-3.** Schematic image of albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane®) [51].

## 1.4 高分子ミセルを用いたドラッグデリバリーシステム

### 1.4.1 薬物キャリアとしての高分子ミセル

この数十年、合成高分子は、低分子薬物、核酸、ペプチド、およびタンパク質といった種々の生理活性物質を搭載可能なナノメディシンの構成分子として注目されている[55,56]。中でも低分子薬物の高分子担体への結合は、機能性の観点において、水溶性の改善、安定性の向上、血中半減期の延長、活性成分の効率的な細胞内送達、生

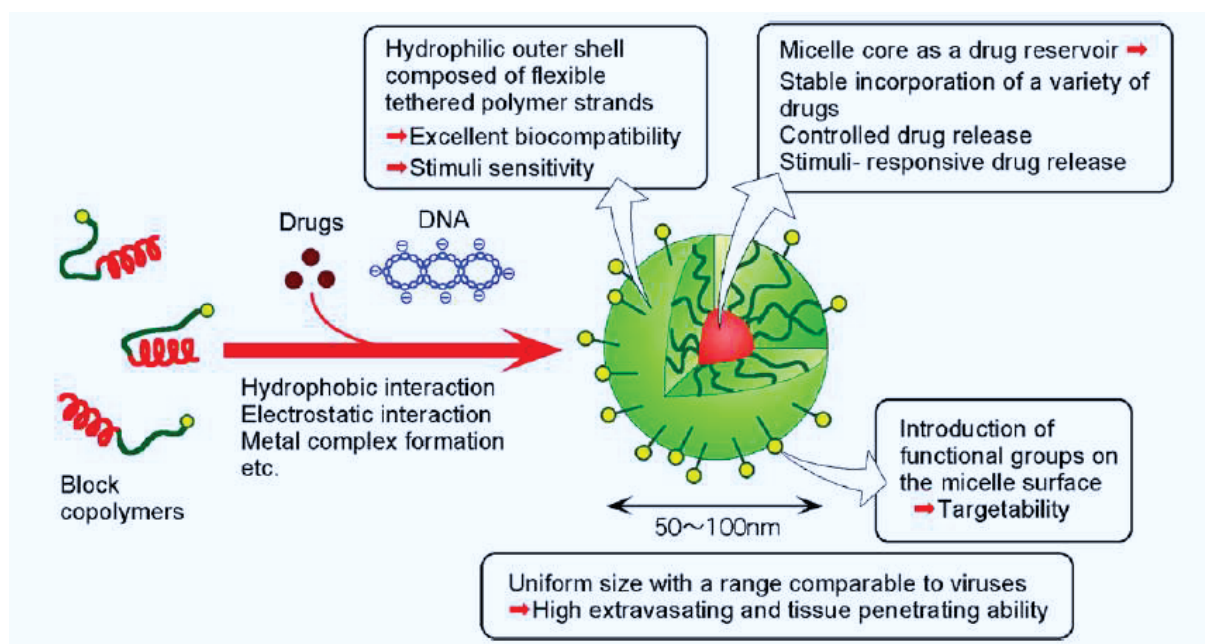
体内分布の改善, および標的指向性の付与といった, 種々の利点をもたらすと考えられている[57]. さらに, 高分子と薬物とのリンカーを適切に選択することで, 結合薬物の制御リリース能を付与することが可能となっている[57]. このように, 合成高分子はDDSの薬物担体として求められる種々の機能を集約可能なプラットフォームであり, 種々の形態の薬物キャリアが開発されている. 特に, Kataokaらの開発した自己組織化高分子ミセルは, 既に2品目が第III相臨床試験において実用化に向けた最終の検証段階に入っており[58], がんの治療用途における薬物キャリアとして最も有望な材料の一つであると考えられる.

高分子ミセルは, 両親媒性のブロック共重合体が水性媒体中で自発的に形成する, 直径数十nmのコア-シェル型会合体である[59,60]. ブロック共重合体は低分子界面活性剤と比較して疎水性セグメントの表面積が大きいため, 高分子ミセルは熱力学的に安定な会合体を形成する[60]. 実際に, 高分子ミセルの臨界会合濃度は界面活性剤ミセルと比較して著しく低く, 静脈投与に伴う過剰な希釈条件下においても速やかに解離し難い[61,62]. この特性は, 高分子ミセルが血中を長期にわたって循環することを可能にすると共に, 疎水性薬物を安定に内包することを可能にする[60]. さらに, 高分子ミセルへの薬物内包は疎水性相互作用のみならず, 静電相互作用, 共有結合, もしくは配位結合によっても可能である[60].

このような高分子ミセルの物理化学的特性は, EPR効果を介した固形がんへの集積と内包薬物放出制御といった複合的な機能を搭載する薬物キャリアの設計を可能にしている. その構成成分であるブロック共重合体としては, 高い生体適合性と分子修飾の容易さの利点からPEG-*b*-poly(amino acid)が最も汎用されている[59,60,63]. 実際に, PEG-*b*-poly(amino acid)を担体として, DOX, EPI, パクリタキセル, SN-38, シスプラチン, および(*trans*-1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt) といった, 物理化学的性質の異なる種々の低分子薬物を内包/結合した高分子ミセルが調製可能であり,

その多くが臨床開発へと進んでいる[56,64].

PEG-*b*-poly(amino acid)の設計において、PEGは高密度に内核を被覆することで高分子ミセルの血中滞留性の向上に貢献するとともに、末端官能基を介したリガンド分子の導入により標的指向性を付与することが可能である[59,60]. また、内核を形成するポリアミノ酸セグメントは、主鎖の生分解性により高分子の体内への不要な蓄積を回避することができる[60]. さらに、アスパラギン酸(aspartic acid, Asp), グルタミン酸(glutamic acid, Glu), およびリシンといったアミノ酸を側鎖に持つことで、簡便に分子修飾が可能であり、薬物キャリアに対して種々の高機能性を付与することができる[59,60] (Figure 1-4) .



**Figure 1-4.** Schematic representation of polymeric micelles prepared from polyethylene glycol-*b*-poly(amino acid)[59].

### 1.4.2 pH による内包薬物の放出制御

外部環境からの刺激を利用した薬物放出制御は、高分子ミセルの設計に取り入れられる代表的な機能の一つである。具体的な環境刺激としては、pH、酵素、アデノシン三リン酸（ATP）、還元環境、および活性酸素種（ROS）といった内因性の刺激と、熱、光、および超音波といった外因性の刺激が挙げられる[60,65,66]。このうち内因性の刺激は、がん組織の生理学的特性を利用した高精度な放出制御を可能とし、特にpHを利用した設計については種々の新薬候補化合物の開発が進められている[67]。

固形がんの間質pHは、高い代謝要求がもたらす好氣的解糖と乳酸産生によりpH 6.5-7.2の弱酸性を示す[68,69]。加えて、標的到達後における高分子ミセルの細胞内経路であるエンドソーム/リソソームはpH 4.5-6.5の酸性であることが知られている[70]。従って、高分子ミセルに酸性環境において薬物放出を促進する機能を搭載することにより、薬物放出の腫瘍組織選択性を付与することが可能となる。さらにエンドソーム内での薬物放出促進によりP-glycoproteinを介した細胞外への排出を回避することが可能であるため、高分子ミセルの設計によっては多剤耐性の克服にも貢献し得ると期待されている[71]。

生体内での精密な放出制御機能を達成するための高分子-薬物間のリンカーとしては、ヒドラゾン結合、アセタール結合、および*cis*-アコニチル結合などの酸解離性結合が広く用いられている[67]。これらの酸解離性結合の選択は主に薬物の化学構造に依存するが、複数の結合様式を適用可能な場合では、酸性環境における内包薬物の放出速度を考慮する必要がある。この点に関して、DOXと*N*-(2-hydroxy-propyl) methacrylamide とのpH応答性高分子-薬物複合体の検討事例では、*cis*-アコニチル結合とヒドラゾン結合との特性の差異を検証している。両結合様式は、いずれも当該高分子-薬物複合体に組み込むことが可能であり、かつpH 7.4での放出抑制効果は同等である。一方、酸性条件での薬物放出においてはヒドラゾン結合の方が良好な応答性を示

す[72]. さらにこのpH特性は、腫瘍組織/細胞内での内包薬物の利用率に影響し、*in vitro*, および*in vivo*のいずれにおいてもヒドラゾン結合の方が高い抗腫瘍効果をもたらしている[72]. これらの知見は、pH応答性ナノメディシンの有効性を担保するために、内包薬物の放出特性と薬効との相関性の把握が重要であることを示唆している.

さらに、pH 応答性薬物放出機能の利用は既存薬の毒性低減にも貢献し得る. この点に関して Bae らは PEG-*b*-p(Asp)誘導体を用いて DOX を内包した pH 応答性高分子ミセル (DOX/m) の研究を行っている[73–76]. その薬物結合高分子の分子設計において、Bae らはヒドラゾン結合を介した DOX の結合を選択している[73,74]. DOX/m は、正常組織の pH に相当する pH 7.4 では内包薬物の漏出を高度に抑制するが、pH の低下に対して感度良く呼応し薬物放出速度を増大させている[74]. さらに、DOX/m の粒子径が 65 nm の場合には、内包薬物の血中滞留性の延長、並びに皮下腫瘍への集積性の向上が達成されている[74]. その結果 DOX/m は、DOX の抗腫瘍効果を増強しながら、副作用による体重減少を抑制し、pH 応答性高分子ミセルのがん治療薬としての有用性が示されている[74].

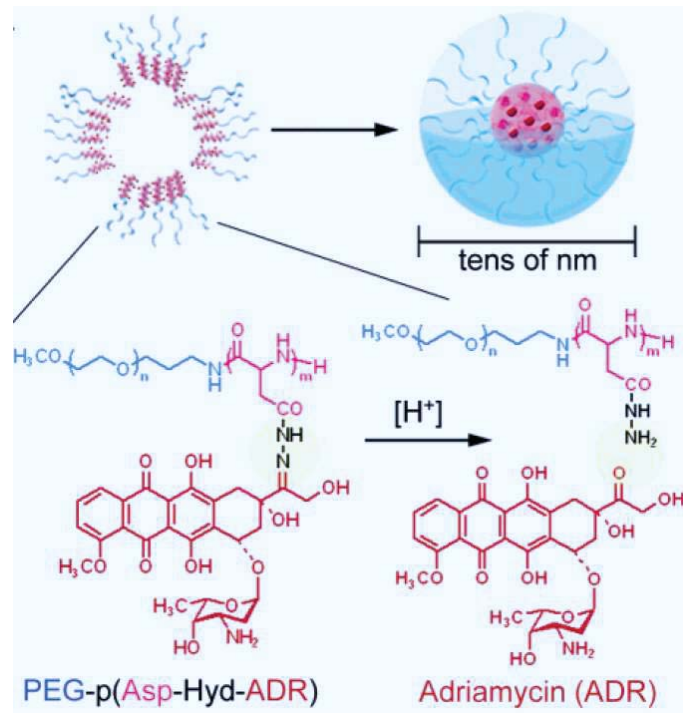


Figure 1-5. Formation of doxorubicin conjugated pH-sensitive polymeric micelle[74].

### 1.4.3 pH 応答性高分子ミセルの臨床応用

pH応答性高分子ミセルの有用性は、既に非臨床/臨床試験における検証が進められている。その代表的な事例として、EPI内包pH応答性高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle, EPI/m, NC-6300) が挙げられる。EPI/mは、DOX/mの分子設計を基に、内包薬物と疎水性側鎖の構造を最適化した粒子径55 nmのpH応答性高分子ミセルである[77-80]。内包薬物であるEPIについては、DOXと有効性が同等でありながら心毒性のリスクが低いことが確認されている[77]。また、ブロック共重合体の疎水性側鎖については、血中循環中における薬物の高い内包安定性と酸性環境における速やかな薬剤放出性を両立するため、p(Asp)鎖の一部をベンジル基へと置換し、高分子あたりの薬物結合数を約10分子に制御している[77]。

非臨床試験においてEPI/mは、期待される薬物動態を示すとともに、高い有効性と安全性を示し、その分子設計の妥当性を立証している。薬物動態においてEPI/mは、

内包薬物の血中半減期をEPIと比較して有意に延長し、血中循環中の薬物放出を最小限に留めることが確認されている[78]。皮下腫瘍への集積挙動においては、長時間にわたる組織中濃度の維持が確認されるとともに、腫瘍組織中での内包薬物の放出促進が示唆されている[78]。正常組織への分布に関しては、肝臓への集積が認められたが、薬効発現用量における肝機能パラメーターの変化は無視できる程度であることが確認されている[78]。さらにラット12週間反復投与における安全性評価では、EPI/m投与群が心機能への影響を示さなかったのに対し、EPI投与群では不可逆的な心機能の低下が確認されている[79]。また薬効評価においてEPI/mは、ヒト由来TNBC細胞の原発腫瘍に対してEPIよりも優れた抗腫瘍活性を示している[78]。このような非臨床試験でのポジティブな結果は、臨床試験においても再び強調されている。すなわち、EPI/mは乳がんを含む様々な固形がんに対して有効性を示すとともに、推奨用量の向上（EPI/m 170 mg/m<sup>2</sup> vs. EPI 100 mg/m<sup>2</sup>）や、累積投与量の向上（EPI/m 2250 mg/m<sup>2</sup> vs. EPI 900 mg/m<sup>2</sup>）といった毒性低減のポテンシャルを第 I 相臨床試験において示している[80]。これらの知見は、EPI/mが将来的にEPIの代替薬として実用化される可能性を示唆している。従って、ALNMを含む転移性TNBCのような既存薬が頻繁に適用される疾患に対する有効性を基礎研究において検証する意義は極めて高い。

#### 1.4.4 高分子ミセルによる転移がん治療の可能性

高分子ミセルの転移がんに対する有効性は、DACHPtを内包した高分子ミセル（DACHPt/m, NC-4016）の種々の転移がんモデルマウスに対する治療効果に関する一連の研究において検証されている。DACHPtは幅広い抗腫瘍スペクトルを示す化合物の一つであり、そのシュウ酸塩（oxaliplatin）は結腸直腸がんを含む悪性腫瘍の治療薬として承認されている[81]。DACHPt/mは、dichloroDACHPtのアコ錯体とPEG-*b*-poly(L-glutamic acid)のカルボキシル基との高分子-金属錯体形成によって、平均粒子径約30

nmの単分散粒子として調製される[82]. さらにDACHPt/mの粒子径は、ミセル調製時におけるpoly(L-glutamic acid)ホモポリマーの添加により、内包薬物の血中滞留性を変えることなく精密に制御することができる[83]. この性質を利用し、Cabralらは高分子ミセルの粒子径と腫瘍組織への浸透性との関係性を明らかにしている. 具体的には、リンパ節転移を有するメラノーマモデルマウスに対し、粒子径30 nmと70 nmのDACHPt/mをそれぞれ静脈投与したところ、両者の転移リンパ節に対する集積量は同等であるにも関わらず、粒子径30 nmのミセルのみが転移組織の深部に浸透することを明らかにした[49]. 当該リンパ節転移モデルでは粒子径80 nmのDoxil®が転移組織の辺縁部に滞留することも明らかとなっている[49]. さらに、当該リンパ節転移モデルに対する抗腫瘍効果においては、粒子径30 nmのDACHPt/mが最も高い有効性を示し、疾患部位への組織浸透性と治療効果との相関性が確認されている[49]. これらの知見は、転移がんを指向した高分子ミセルの設計において、標的組織全体への均一な内包薬物の送達を達成するために、粒子径の厳密な制御が重要であることを強調している.

DACHPt/mの転移がんに対する高い活性は、子宮頸がんの腹腔内転移[82]、スキルス胃がんのリンパ節転移[84]、メラノーマの肺転移[85]、および大腸がんの肝転移[86]といった種々の転移がんモデルマウスにおいても実証されている. 特に大腸がんの肝転移では、DACHPt/mが炎症性微小環境へ選択的に集積することで、微小転移の増殖を抑制することが示されている[86]. さらに他の白金化合物の内包した事例として、シスプラチンを内包した高分子ミセル (CDDP/m, NC-6004) においても頭頸部扁平上皮がんの顎下リンパ節転移に対する薬物集積性の向上と抗腫瘍効果の増強が確認されている[87]. これらの研究は、高分子ミセルが血管系を介した転移組織への選択的な集積と滞留により、新生血管系を伴うマクロ転移と微小転移部位の双方に有用であることを示唆している.

このような転移がんに対する選択的な集積は、DACHPt/mと同様に長期血中滞留性

を有する粒子径55 nmのEPI/mにおいても期待される。一方で、pH応答性ナノメディシンの転移がん送達後における内包薬物の活性化機序に関してはこれまで詳細な検証が行われていないため、EPI/mの薬効発現の可能性については不明確である。実際に、転移がん組織の酸性化については生理学的な観点からも検証の余地が残されていることから[69]、薬物放出の組織選択性については特に詳細な評価が必要である。従って、EPI/mの転移がん治療における効果を実証するためには、疾患モデル動物を用いた有効性の確認や体内動態の確認のみならず、疾患部位における内包薬物の放出性の確認を含めた包括的な検証が必要である。

## 1.5 本論文の概要

### 1.5.1 本研究の重要性

乳がん患者の主な死亡要因は転移であり、その生存率を向上するために ALNM の根絶が強く望まれている。現在の ALNM 治療は化学療法が重要な役割を占めているが、最も難治性のサブタイプである TNBC の ALNM に対しては、古典的な低分子化合物に代わる有効かつ安全な治療薬が存在せず、アンメットメディカルニーズとして顕在化している。

近年、薬物による治療効果の向上と副作用の低減を図ることを目的として、ナノテクノロジーを応用した DDS 医薬品の開発が盛んに行われている。しかし、乳がん治療において実用化されている DDS 医薬品については、副作用軽減により治療の利便性の向上に貢献しているものの、有効性の向上に関しては改善の余地が残されている。そのような中、高分子の精密合成技術を基盤として開発された高分子ミセルは、その粒子径を厳密に制御することにより、静脈投与において選択的に標的部位に到達し浸透する能力を示し、リンパ節転移に対する有効性を発揮することが明らかになっている。一方、高分子ミセルに pH 応答性の薬物放出機能を付与した EPI/m

は、乳がんに対する有効性と安全性が臨床的に示されているにも関わらず、ALNM に対する有用性は未確認となっている。特に、EPI/m の抗腫瘍効果は標的組織への集積性のみならず薬物放出性にも大きく依存すると考えられるため、ALNM への送達後に高分子ミセルの内包薬物が活性化する過程については詳細に考究する必要がある。

そこで本研究では、転移性乳がんにおける既存薬 (EPI) の臨床的な治療条件を模倣しながら、EPI/m による TNBC の ALNM に対する治療効果を検証した。また、EPI/m の標的組織に対する薬物送達機序を詳細に検証し、抗腫瘍効果と機能性との関連について考察した。転移性乳がんの臨床的な治療とは原発腫瘍の外科的切除の前後における化学療法であり、具体的には、自発的 ALNM 形成を伴う TNBC 同所移植モデルマウスと原発腫瘍切除後の ALNM 残存乳がんモデルマウスの作製、並びにそれらに対する EPI/m の治療効果の確認を行った。さらに、原発腫瘍、および転移リンパ節における EPI/m の集積性、並びに内包薬物の放出性を検証し、各治療標的に対する薬物送達機序について詳細に考察した。

内包薬物の放出制御機能を搭載した pH 応答性ナノメディシンはこれまでに数多く報告されているが、臨床での治療を模倣した条件においてその有用性を検証した報告は無い。さらに、転移がんに対するナノメディシンの治療効果と生体内における機能発現を包括的に検証し、個々の機能の妥当性に言及した報告は無い。また、既に臨床応用が進められている EPI/m を題材とすることは、より実用化に近い研究段階の知見として pH 応答性ナノメディシンの材料開発を促進する効果を促し得る。従って本研究の発見は、転移がんを標的としたナノメディシンの分子設計に新たな指針を提示し、当該研究分野の更なる発展に貢献する知見となり得る。

## 1.5.2 本論文の構成

本論文は全7章から構成される。このうち、第1章、および第7章はそれぞれ序論、および総括である。

第2章では、EPI/mの生理学的条件下における薬物放出特性と抗腫瘍活性との関連性について *in vitro* での検証を行った。実験においては、EPI/mの生理学的pHにおける薬物放出挙動を評価し、生体内での放出制御の実態について考察した。さらに、腫瘍細胞取り込み後の酸性オルガネラにおけるpH低下をトリガーとした薬物放出の可能性について、ヒト由来TNBC細胞を用いた種々の *in vitro* 評価により検証した。最後に、当該細胞に対するEPI/mの *in vitro* 抗腫瘍活性を評価し、薬物放出特性と抗腫瘍活性の関連性について考察した。

第3章では、術前化学療法を模倣した治療条件におけるEPI/mの *in vivo* 抗腫瘍活性を評価した。実験においては、自発的ALNM形成を伴うTNBC同所移植モデルマウスを作製し、原発腫瘍の増殖推移とALNMの形成過程の観察結果から評価系としての妥当性について考察した。さらに、EPI/mの当該モデルマウスに対する原発腫瘍の増殖抑制効果、およびALNMの形成抑制効果をfree EPIと比較し、既存薬に対する優位性について考察した。

第4章では、術前化学療法を模倣した治療条件におけるEPI/mの薬物送達機序について検証した。実験においては、TNBC同所移植モデルマウスにおけるEPI/mの血漿中濃度、および原発腫瘍内濃度の経時変化を評価し、ミセルの集積性、並びに集積後の薬物放出の選択性について考察した。さらに、蛍光標識EPI/mの原発腫瘍内分布を観察し、腫瘍集積後における薬物結合高分子の酸性環境への暴露の可能性について考察した。

第5章では、術後化学療法を模倣した治療条件におけるEPI/mの *in vivo* 抗腫瘍活性を評価した。実験においては、原発腫瘍切除後のALNM残存乳がんモデルマウス

を作製し、2水準の異なる大きさの微小転移（早期 ALNM, および成熟期 ALNM）を実験条件として設定した。さらに、それぞれの実験条件における EPI/m の ALNM に対する増殖抑制効果を free EPI と比較し、既存薬に対する優位性について考察した。

第6章では、術後化学療法を模倣した治療条件における EPI/m の薬物送達機序について検証した。実験においては、原発腫瘍切除下における成熟期 ALNM 残存乳がんモデルマウスを用いて、EPI/m の血漿中濃度、健常リンパ節内濃度、および転移リンパ節内濃度の経時変化を評価し、転移リンパ節に対するミセルの集積性、および集積後の薬物放出の選択性について考察した。さらに、蛍光標識 EPI/m の転移リンパ節内分布を観察し、ミセルの成熟期 ALNM に対する浸透性、および滞留性について考察した。

## 1.6 参考文献

- [1] L.A. Torre, R.L. Siegel, E.M. Ward, A. Jemal, Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 25 (2016) 16–27. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0578.
- [2] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA. Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- [3] S.A. Eccles, D.R. Welch, Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies., *Lancet (London, England).* 369 (2007) 1742–1757. doi:10.1016/S0140-6736(07)60781-8.
- [4] K. Pantel, R.H. Brakenhoff, B. Brandt, Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells, *Nat. Rev. Cancer.* 8 (2008) 329–340. doi:10.1038/nrc2375.

- [5] G.P. Gupta, J. Massagué, Cancer Metastasis: Building a Framework, *Cell*. 127 (2006) 679–695. doi:10.1016/j.cell.2006.11.001.
- [6] P.S. Steeg, Targeting metastasis, *Nat. Rev. Cancer*. 16 (2016) 201–218. doi:10.1038/nrc.2016.25.
- [7] R. Langer, Drug delivery and targeting system, *Nature*. 392 (1998) 5–10. doi:10.1517/14728222.2.1.145.
- [8] M.W. Tibbitt, J.E. Dahlman, R. Langer, Emerging Frontiers in Drug Delivery, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 704–717. doi:10.1021/jacs.5b09974.
- [9] A.J. Redig, S.S. Mcallister, Breast cancer as a systemic disease: A view of metastasis, *J. Intern. Med.* 274 (2013) 113–126. doi:10.1111/joim.12084.
- [10] K.R. Hess, G.R. Varadhachary, S.H. Taylor, W. Wei, M.N. Raber, R. Lenzi, J.L. Abbruzzese, Metastatic patterns in adenocarcinoma, *Cancer*. 106 (2006) 1624–1633. doi:10.1002/cncr.21778.
- [11] O. Saphir, G.D. Amromin, Obscure axillary lymph-node metastasis in carcinoma of the breast, *Cancer*. 1 (1948) 238–241. doi:10.1002/1097-0142(194807)1:2<238::AID-CNCR2820010208>3.0.CO;2-U|.
- [12] I. Jatoi, S.G. Hilsenbeck, G.M. Clark, C.K. Osborne, Significance of Axillary Lymph Node Metastasis in Primary Breast Cancer, *J. Clin. Oncol.* 17 (1999) 2334–2340. <http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.1999.17.8.2334>.
- [13] B. Weigelt, J.L. Peterse, L.J. Van't Veer, Breast cancer metastasis: Markers and models, *Nat. Rev. Cancer*. 5 (2005) 591–602. doi:10.1038/nrc1670.
- [14] M. Colleoni, N. Rotmensz, G. Peruzzotti, P. Maisonneuve, G. Mazzarol, G. Pruneri, A. Luini, M. Intra, P. Veronesi, V. Galimberti, R. Torrisesi, A. Cardillo, A. Goldhirsch, G. Viale, Size of breast cancer metastases in axillary lymph nodes: Clinical relevance of

- minimal lymph node involvement, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 1379–1389.  
doi:10.1200/JCO.2005.07.094.
- [15] S. Ran, L. Volk, K. Hall, M.J. Flister, Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer, *Pathophysiology.* 17 (2010) 229–251.  
doi:10.1016/j.pathophys.2009.11.003.
- [16] J. Iqbal, O. Ginsburg, V. Giannakeas, P.A. Rochon, J.L. Semple, S.A. Narod, The impact of nodal micrometastasis on mortality among women with early-stage breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 161 (2017) 103–115. doi:10.1007/s10549-016-4015-5.
- [17] G.H. Lyman, A.E. Giuliano, M.R. Somerfield, A.B. Benson, D.C. Bodurka, H.J. Burstein, A.J. Cochran, H.S. Cody, S.B. Edge, S. Galper, J.A. Hayman, T.Y. Kim, C.L. Perkins, D.A. Podoloff, V.H. Sivasubramaniam, R.R. Turner, R. Wahl, D.L. Weaver, A.C. Wolff, E.P. Winer, American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 7703–7720. doi:10.1200/JCO.2005.08.001.
- [18] T.J. Whelan, I.A. Olivotto, W.R. Parulekar, I. Ackerman, B.H. Chua, A. Nabid, K.A. Vallis, J.R. White, P. Rousseau, A. Fortin, L.J. Pierce, L. Manchul, S. Chafe, M.C. Nolan, P. Craighead, J. Bowen, D.R. McCready, K.I. Pritchard, K. Gelmon, Y. Murray, J.-A.W. Chapman, B.E. Chen, M.N. Levine, Regional Nodal Irradiation in Early-Stage Breast Cancer, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 307–316. doi:10.1056/NEJMoa1415340.
- [19] National Institutes of Health Consensus Development Panel, National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement : Adjuvant Therapy for Breast Cancer , November 1 – 3 , 2000, *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (2001) 979–989.  
doi:10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003460.

- [20] L.S. Dominici, V.M.N. Gonzalez, A.U. Buzdar, A. Lucci, Cytologically Proven Axillary Lymph Node Metastases Are Eradicated in Patients Receiving Preoperative Chemotherapy With Concurrent Trastuzumab for HER2-Positive Breast Cancer, *Cancer*. 116 (2010) 2884–2889. doi:10.1002/cncr.25152.
- [21] R. Badwe, R. Hawaldar, N. Nair, R. Kaushik, V. Parmar, S. Siddique, A. Budrukkar, I. Mitra, S. Gupta, Locoregional treatment versus no treatment of the primary tumour in metastatic breast cancer: An open-label randomised controlled trial, *Lancet Oncol*. 16 (2015) 1380–1388. doi:10.1016/S1470-2045(15)00135-7.
- [22] National Comprehensive Cancer Network, Breast Cancer, NCCN Clin. Pract. Guidel. *Oncol*. (2017). doi:10.1093/med/9780199363315.003.0020.
- [23] W.D. Foulkes, I.E. Smith, J.S. Reis-Filho, Triple-Negative Breast Cancer, *N. Engl. J. Med*. 363 (2010) 1938–1948. doi:10.1056/NEJMra1001389.
- [24] G. Bianchini, J.M. Balko, I.A. Mayer, M.E. Sanders, L. Gianni, Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease, *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 36 (2016) 674–690. doi:10.1002/jmri.23741.Proton.
- [25] F. André, C.C. Zielinski, Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents, *Ann. Oncol*. 23 (2012) vi46–vi51. doi:10.1093/annonc/mds195.
- [26] E. Rivera, M. Cianfrocca, Overview of neuropathy associated with taxanes for the treatment of metastatic breast cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol*. 75 (2015) 659–670. doi:10.1007/s00280-014-2607-5.
- [27] B.R.J. Healey Bird, S.M. Swain, Cardiac toxicity in breast cancer survivors: Review of potential cardiac problems, *Clin. Cancer Res*. 14 (2008) 14–24. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1033.

- [28] A.U. Buzdar, C. Marcus, G.R. Blumenschein, T.L. Smith, Early and delayed clinical cardiotoxicity of doxorubicin, *Cancer*. 55 (1985) 2761–2765. doi:10.1002/1097-0142(19850615)55:12<2761::AID-CNCR2820551206>3.0.CO;2-P.
- [29] アスペンジャパン株式会社, アドリアシン®注用10 アドリアシン®注用50 医薬品インタビューフォーム, 2017.
- [30] ファイザー株式会社, ファルモルビシン®注射用10mg ファルモルビシン®注射用50mg 医薬品インタビューフォーム, 2016.
- [31] V. Wagner, A. Dullaart, A.K. Bock, A. Zweck, The emerging nanomedicine landscape, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1211–1217. doi:10.1038/nbt1006-1211.
- [32] B.Y.S. Kim, J.T. Rutka, W.C.W. Chan, Nanomedicine, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 2434–2443.
- [33] B. Bhushan, *Springer handbook of nanotechnology*, Springer, 2017.
- [34] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O.C. Farokhzad, Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66 (2014) 2–25. doi:10.1016/j.addr.2013.11.009.
- [35] J. Folkman, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat. Med.* 1 (1995) 27–30.
- [36] P. Carmeliet, R.K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature*. 407 (2000) 249–257.
- [37] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 751–760. doi:10.1038/nnano.2007.387.
- [38] Y. Matsumura, H. Maeda, A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the

- Antitumor Agent Smancs, *Cancer Res.* 46 (1986) 6387–6392.
- [39] H. Maeda, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Adv. Enzyme Regul.* (2001).
- [40] H. Soo Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J.P. Zimmer, B. Iitty Ipe, M.G. Bawendi, J. V. Frangioni, Renal clearance of quantum dots, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1165–1170. doi:10.1038/nbt1340.
- [41] P.. Michelle Longmire, Peter L. Choyke, M.D., and Hisataka Kobayashi, M.D., Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Consideration and Caveats, *Nanomedicine.* 3 (2012) 703–717. doi:10.2217/17435889.3.5.703.Clearance.
- [42] S. Stolnik, L. Illum, S.S. Davis, Long circulating microparticulate drug carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16 (1995) 195–214.
- [43] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U.S. Schubert, Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 49 (2010) 6288–6308. doi:10.1002/anie.200902672.
- [44] D.E. Owens, N.A. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 93–102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
- [45] Y.C. Barenholz, Doxil® — The first FDA-approved nano-drug : Lessons learned, *J. Control. Release.* 160 (2012) 117–134. doi:10.1016/j.jconrel.2012.03.020.
- [46] M.E.R. O’Brien, N. Wigler, M. Inbar, R. Rosso, E. Grischke, A. Santoro, R. Catane, D.G. Kieback, P. Tomczak, S.P. Ackland, F. Orlandi, L. Mellars, L. Alland, C. Tendler, Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of

- pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer, *Ann. Oncol.* 15 (2004) 440–449. doi:10.1093/annonc/mdh097.
- [47] Y. Zhao, D.Y. Alakhova, J.O. Kim, T.K. Bronich, A. V. Kabanov, A Simple Way to Enhance Doxil® Therapy: Drug Release from Liposomes at the Tumor Site by Amphiphilic Block Copolymer, *J. Control. Release.* 168 (2013) 61–69. doi:10.1016/j.jconrel.2013.02.026.
- [48] R.K. Jain, T. Stylianopoulos, Delivering nanomedicine to solid tumors, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7 (2010) 653–664. doi:10.1038/nrclinonc.2010.139.
- [49] H. Cabral, J. Makino, Y. Matsumoto, P. Mi, H. Wu, T. Nomoto, K. Toh, N. Yamada, Y. Higuchi, S. Konishi, M.R. Kano, H. Nishihara, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Systemic targeting of lymph node metastasis through the blood vascular system by using size-controlled nanocarriers, *ACS Nano.* 9 (2015) 4957–4967. doi:10.1021/nm5070259.
- [50] E. Miele, G.P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, S. Tomao, Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer, *Int. J. Nanomedicine.* 4 (2009) 99–105. doi:10.2147/IJN.S3061.
- [51] 馬場 一彦, アブラキサン®の製剤特性と臨床試験成績概要, *Drug Deliv. Syst.* 28 (2013) 180–188. doi:10.2745/dds.28.180.
- [52] ブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社, タキソール®注射液30mg タキソール®注射液100mg 医薬品インタビューフォーム, 2018.
- [53] 大鵬薬品工業株式会社, アブラキサン®点滴静注用100mg 医薬品インタビューフォーム, 2019.
- [54] L.D. Volk, M.J. Flister, C.M. Bivens, A. Stutzman, N. Desai, V. Trieu, S. Ran, Nab-

- paclitaxel efficacy in the orthotopic model of human breast cancer is significantly enhanced by concurrent anti-vascular endothelial growth factor A therapy., *Neoplasia*. 10 (2008) 613–623. doi:10.1593/neo.08302.
- [55] A.S. Hoffman, The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems, *J. Control. Release*. 132 (2008) 153–163. doi:10.1016/j.jconrel.2008.08.012.
- [56] I. Ekladios, Y.L. Colson, M.W. Grinstaff, Polymer–drug conjugate therapeutics: advances, insights and prospects, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2019) 273–294.
- [57] H. Ringsdorf, Structure and properties of pharmacologically active polymers, in: *J. Polym. Sci. Polym. Symp.*, Wiley Online Library, 1975: pp. 135–153.
- [58] E. Luque-Michel, E. Imbuluzqueta, V. Sebastián, M.J. Blanco-Prieto, Clinical advances of nanocarrier-based cancer therapy and diagnostics, *Expert Opin. Drug Deliv.* 14 (2017) 75–92. doi:10.1080/17425247.2016.1205585.
- [59] N. Nishiyama, K. Kataoka, Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 630–648. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.05.006.
- [60] H. Cabral, K. Miyata, K. Osada, K. Kataoka, Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications, *Chem. Rev.* 118 (2018) 6844–6892. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00199.
- [61] Y. Yamamoto, Y. Nagasaki, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Kataoka, Long-circulating poly (ethylene glycol)–poly (d, l-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge, *J. Control. Release*. 77 (2001) 27–38.
- [62] Y. Yamamoto, K. Yasugi, A. Harada, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of poly (ethylene glycol)–poly (d, l-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu, *J. Control. Release*. 82 (2002)

- 359–371.
- [63] H. Xu, Q. Yao, C. Cai, J. Gou, Y. Zhang, H. Zhong, X. Tang, Amphiphilic poly(amino acid) based micelles applied to drug delivery: The in vitro and in vivo challenges and the corresponding potential strategies, *J. Control. Release.* 199 (2015) 84–97. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.012.
- [64] H. Cabral, K. Kataoka, Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies, *J. Control. Release.* 190 (2014) 465–476. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.042.
- [65] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nat. Mater.* 12 (2013) 991–1003. doi:10.1038/nmat3776.
- [66] V.P. Torchilin, Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 813–827. doi:10.1038/nrd4333.
- [67] X. Pang, Y. Jiang, Q. Xiao, A.W. Leung, H. Hua, C. Xu, PH-responsive polymer-drug conjugates: Design and progress, *J. Control. Release.* 222 (2016) 116–129. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.024.
- [68] B.A. Webb, M. Chimenti, M.P. Jacobson, D.L. Barber, Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression, *Nat. Rev. Cancer.* 11 (2011) 671–677. doi:10.1038/nrc3110.
- [69] C. Corbet, O. Feron, Tumour acidosis: From the passenger to the driver's seat, *Nat. Rev. Cancer.* 17 (2017) 577–593. doi:10.1038/nrc.2017.77.
- [70] M. Forgac, Vacuolar ATPases : rotary proton pumps in physiology and pathophysiology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007). doi:10.1038/nrm2272.
- [71] X. Ke, D.J. Coady, C. Yang, A.C. Engler, J.L. Hedrick, Y.Y. Yang, pH-sensitive polycarbonate micelles for enhanced intracellular release of anticancer drugs: a strategy to circumvent multidrug resistance, *Polym. Chem.* 5 (2014) 2621–2628.

- [72] K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelínková, B. Říhová, HPMA copolymers with pH-controlled release of doxorubicin: In vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity, *J. Control. Release.* 87 (2003) 33–47. doi:10.1016/S0168-3659(02)00348-6.
- [73] Y. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka, Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: Polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 42 (2003) 4640–4643. doi:10.1002/anie.200250653.
- [74] Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro, K. Kataoka, Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: Tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 122–130. doi:10.1021/bc0498166.
- [75] Y. Bae, W.D. Jang, N. Nishiyama, S. Fukushima, K. Kataoka, Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery, *Mol. Biosyst.* 1 (2005) 242–250. doi:10.1039/b500266d.
- [76] M.R. Kano, Y. Bae, C. Iwata, Y. Morishita, M. Yashiro, M. Oka, T. Fujii, A. Komuro, K. Kiyono, M. Kaminishi, K. Hirakawa, Y. Ouchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Miyazono, Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 3460–3465. doi:10.1073/pnas.0611660104.
- [77] I. BOBE, N. SHIBATA, H. SAITO, M. HARADA, BLOCK COPOLYMER FOR DRUG COMPLEX AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION, WO/2008/047948, 2008.

- [78] M. Harada, I. Bobe, H. Saito, N. Shibata, R. Tanaka, T. Hayashi, Y. Kato, Improved anti-tumor activity of stabilized anthracycline polymeric micelle formulation, NC-6300, *Cancer Sci.* 102 (2011) 192–199. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01745.x.
- [79] A. Takahashi, Y. Yamamoto, M. Yasunaga, Y. Koga, J.I. Kuroda, M. Takigahira, M. Harada, H. Saito, T. Hayashi, Y. Kato, T. Kinoshita, N. Ohkohchi, I. Hyodo, Y. Matsumura, NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, extends the antitumor effect and reduces the cardiotoxicity of epirubicin, *Cancer Sci.* 104 (2013) 920–925. doi:10.1111/cas.12153.
- [80] H. Mukai, T. Kogawa, N. Matsubara, Y. Naito, M. Sasaki, A. Hosono, A first-in-human Phase 1 study of epirubicin-conjugated polymer micelles (K-912/NC-6300) in patients with advanced or recurrent solid tumors, *Invest. New Drugs.* 35 (2017) 307–314. doi:10.1007/s10637-016-0422-z.
- [81] I. Chau, D. Cunningham, Oxaliplatin for Colorectal Cancer in the United States: Better Late Than Never, *J. Clin. Oncol.* 21 (2003) 2049–2051. doi:10.1200/JCO.2003.03.074.
- [82] H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Optimization of ( 1 , 2-diamino-cyclohexane ) platinum ( II ) -loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity, *J. Control. Release.* 121 (2007) 146–155. doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.024.
- [83] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M.R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 815–823. doi:10.1038/nnano.2011.166.
- [84] M. Rafi, H. Cabral, M.R. Kano, P. Mi, C. Iwata, M. Yashiro, K. Hirakawa, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polymeric micelles incorporating (1,2-

- diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis, *J. Control. Release.* 159 (2012) 189–196.  
doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.038.
- [85] S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Phenylboronic Acid-Installed Polymeric Micelles for Targeting Sialylated Epitopes in Solid Tumors, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 15501–15507. doi:10.1021/ja406406h.
- [86] H. Wu, H. Cabral, K. Toh, P. Mi, Y.C. Chen, Y. Matsumoto, N. Yamada, X. Liu, H. Kinoh, Y. Miura, M.R. Kano, H. Nishihara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation, *J. Control. Release.* 189 (2014) 1–10.  
doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.018.
- [87] K. Miyano, H. Cabral, Y. Miura, Y. Matsumoto, Y. Mochida, H. Kinoh, C. Iwata, O. Nagano, H. Saya, N. Nishiyama, K. Kataoka, T. Yamasoba, cRGD peptide installation on cisplatin-loaded nanomedicines enhances efficacy against locally advanced head and neck squamous cell carcinoma bearing cancer stem-like cells, *J. Control. Release.* 261 (2017) 275–286. doi:10.1016/j.jconrel.2017.06.021.

## 第 2 章

*In vitro* 評価によるエピルビシン内包  
pH 応答性高分子ミセルの  
環境応答性薬物放出能の検証

## 要旨

エピルビシン内包 pH 応答性高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle, EPI/m) は、血中循環中における薬物の高い内包安定性と、酸性条件における速やかな薬物放出性を両立した環境応答性薬物キャリアである。一方で、その治療標的となる腫瘍周辺環境における内包薬物の活性化の実態については詳細に解明されていない。本章では、EPI/m の生理学的条件下における薬物放出挙動を *in vitro* にて検証し、抗腫瘍活性との関連性について考察した。生理学的条件を模倣した薬物放出特性評価より、EPI/m の薬物放出は血管漏出後の腫瘍内酸性環境において誘起され、細胞取り込み後の後期エンドソーム内においてさらに促進された。また、モデル腫瘍細胞 (MDA-MB-231-luc-D3H2LN) を用いた *in vitro* 評価より、EPI/m は細胞取り込み後に後期エンドソームに局在し、液胞内の pH 低下をトリガーとした薬物放出により抗腫瘍活性を発現することが示唆された。以上の結果は、EPI/m の pH 応答性薬物放出能が腫瘍周辺環境において発現する可能性を実証する知見であると考えられる。

## 2.1 緒言

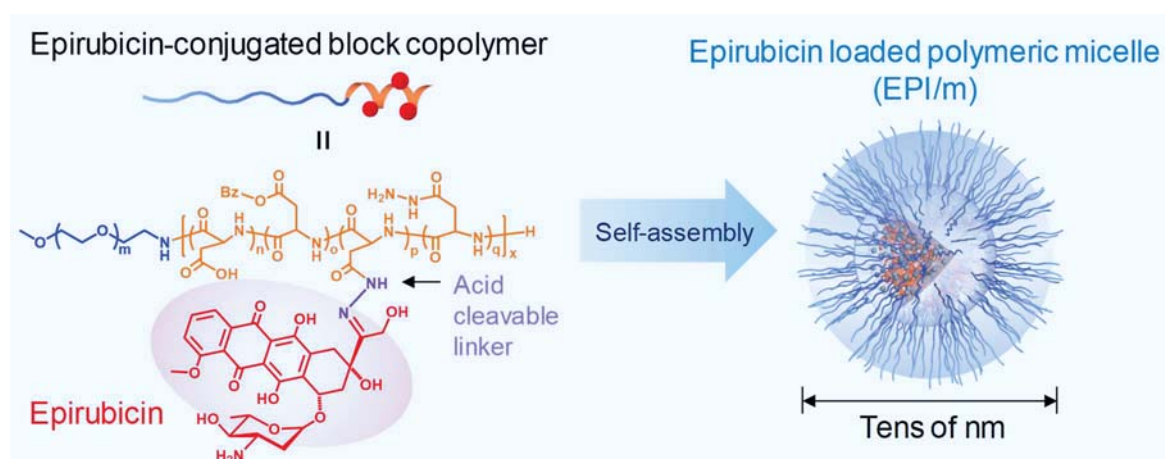
固形がんを標的とした薬物キャリアの設計において、内包薬物の活性を適切に制御するために、生体内の pH 変化をトリガーとした薬物放出制御機構が数多く研究されている[1,2]。それらの多くは、腫瘍微小環境 (tumor microenvironment, TME) (pH 6.7) [3,4]や、酸性オルガネラ (後期エンドソーム ; pH 5.5, ライソソーム ; pH 4.5-5.5) [5]といった、生体内の弱酸性環境における薬物の放出促進を目的として、キャリア-薬物間に酸解離性リンカーを導入した分子設計を採用している[1,2]。このような pH 応答性ナノメディシンの中でも、エピルビシン内包 pH 応答性高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle, EPI/m) は、臨床試験において有効性と安全性が確認された有望な新薬候補である[6-8]。

EPI/m は、エピルビシン (EPI) 結合ポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) -ポリ (アスパラギン酸) (poly(aspartic acid), poly(Asp)) ブロック共重合体が水中にて自己組織化したコア-シェル型の高分子ミセルである[6]. その分子設計において, EPI は poly (Asp)側鎖に酸解離性のヒドラゾンを経由して結合している (Scheme 2-1) [6].

高分子ミセルを構成するブロック共重合体には, 薬物キャリアとして求められる機能を発現するための高度な構造最適化が必要である. 特に, 薬物の導入によって両親媒性となる共重合体の場合は, その薬物導入率が会合体の物理化学的特性に種々の影響を及ぼす重要な因子となる[9]. EPI/m においても, 薬物放出速度と会合体の安定性を勘案した構造最適化が検討されている[6,10–14]. 合成方法の観点からは, 無水ヒドラジンをを用いたエステル-アミド交換反応による PEG-*b*-poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) (PEG-*b*-PBLA) への一段階反応が検討されており, 高分子へのリンカー導入率や薬物導入率の定量的な制御方法が確立されている[12]. また, 酸性条件において EPI/m からの速やかな薬物放出を達成させるための最適な EPI 導入率については, 高分子に対する EPI の重量割合として 20 wt%以下であることが見出されている[13]. なお, 当該範囲においては会合体の安定性が低く, 高分子ミセルの血中半減期も短いことが明らかとなっている[14]. この点に関して Harada らは, poly(Asp)側鎖の一部をベンジルエステル基で保護し高分子の疎水性を増強することで, 高分子ミセルの血中滞留性を改善している[6,14]. 以上のように, EPI/m は血中循環中における薬物の高い内包安定性と酸性環境における速やかな薬物放出性の両立を目指して分子設計を最適化した pH 応答性ナノメディシンとなっている. しかしながら, Harada らの研究では腫瘍周辺環境における内包薬物の活性化の実態について未解明となっており, 更なる研究による追求が求められていた.

そこで本章では, EPI/m の生理学的条件下における薬物放出挙動を *in vitro* にて検証

し、抗腫瘍活性との関連性について考察した。最初に、既報に従い調製した EPI/m について、種々の生理学的条件下における薬物放出特性を評価した。次に、想定される内包薬物の活性化機序の一つである腫瘍細胞取り込み後の酸性オルガネラにおける pH 低下をトリガーとした薬物放出の可能性について、生物発光能を有するヒト由来トリプルネガティブ乳がん (triple-negative breast cancer, TNBC) 細胞株 MDA-MB-231-luc-D3H2LN[15] をモデル腫瘍細胞として検証した。最後に、当該細胞に対する EPI/m の *in vitro* 抗腫瘍活性を評価し、薬物放出特性と抗腫瘍活性の関連性について考察した。



**Scheme 2-1.** Formation of epirubicin loaded polymeric micelles (EPI/m) incorporating acid cleavable linkage.

## 2.2 実験

### 2.2.1 試薬

*N*-Carboxyanhydride of  $\beta$ -benzyl L-aspartate (NCA-BLA) は中央化成品株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -aminopropylpoly (ethylene glycol) (MeO-PEG-NH<sub>2</sub> ;  $M_w$  = 12,000) は日油株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。ジクロロメ

タン (Dichloromethane, DCM), ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO), および *N,N*-ジメチルホルムアミド (*N,N*-dimethylformamide, DMF) は関東化学株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した. エピルビシン塩酸塩 (epirubicin hydrochloride, EPI · HCl) はナノキャリア株式会社 (Chiba, Japan) より提供を受けた. ウシ血清アルブミン (fetal bovine serum, FBS), LysoTracker® deep red, および Hoechst 33342 は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した. 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide (MTT) は株式会社同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan) から購入した. その他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した.

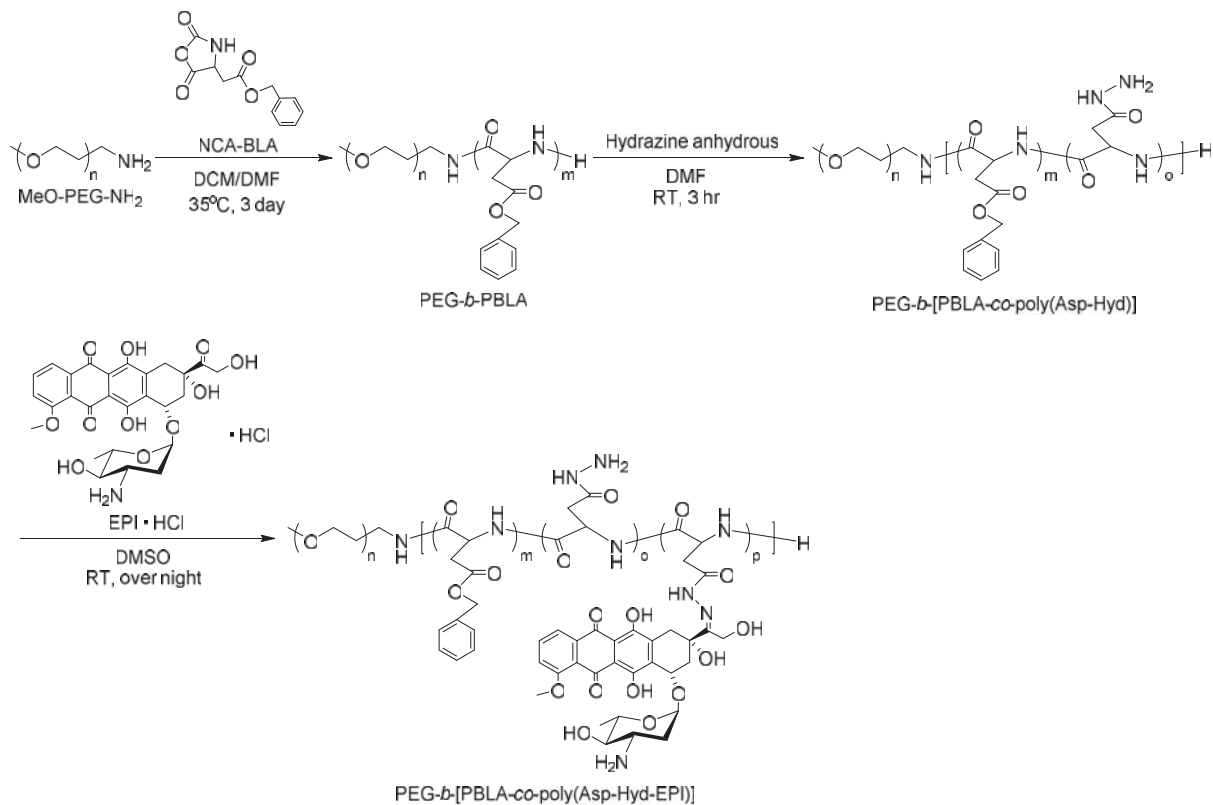
### 2.2.2 細胞株および培養方法

ヒト由来 TNBC 細胞株である MDA-MB-231 は住商ファーマインターナショナル株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した. また, MDA-MB-231 のリンパ節転移好発性ルシフェラーゼ発現株である MDA-MB-231-luc-D3H2LN は, PerkinElmer (Waltham, MA, USA) から購入した. いずれの細胞株も 10% FBS 含有 RPMI1640 培地中, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下にて培養した.

### 2.2.3 EPI 結合ブロック共重合体の合成

EPI 結合 PEG-poly(Asp) ブロック共重合体 (PEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd-EPI)]) は既報に従い合成した [12,14] (**Scheme 2-2**). 以下にその概略を示す. アルゴン雰囲気下にて MeO-PEG-NH<sub>2</sub>, および NCA-BLA を, 脱水 DCM と脱水 DMF の混合溶媒 [DCM/DMF = 15/1 (v/v)] にそれぞれ溶解した. 溶解確認後, マクロ開始剤である MeO-PEG-NH<sub>2</sub> に対し 40 当量の NCA-BLA を添加し, 35 °C 3 日間重合した. 反応溶液をヘキサンと酢酸エ

チルの混合溶媒[ヘキサン/酢酸エチル = 3/2 (v/v)]に対して再沈殿した後、フィルターろ過し、沈殿物を回収した。得られた沈殿物を室温にて一晩真空乾燥し、PEG-*b*-PBLAを得た。次に、PEG-*b*-PBLAを脱水DMFに溶解した後、高分子に対して20当量の無水ヒドラジン (Hydrazine anhydrous) を添加し、室温にて3時間攪拌した。反応溶液をジエチルエーテルに対して再沈殿した後、フィルターろ過し、沈殿物を回収した。得られた沈殿物を室温にて一晩真空乾燥し、ヒドラジド導入PEG-*b*-PBLA (PEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd)]) を得た。次に、PEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd)]を脱水DMSOに溶解した後、高分子に対して30当量のEPI・HClを添加し、室温にて一晩攪拌した。得られた溶液を、ゲルろ過 (充填剤: sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich), カラム口径: 2 cm, 充填剤高さ: 15 cm, 溶離液: メタノール) にて粗精製し、未反応のEPI・HClを除去した。カラムより溶出した高分子画分を更に室温にて2日間透析精製 (透析膜: Spectra/Por Regenerated Cellulose Membrane1, molecular cut off: 6,000-8,000 Da, 外液: メタノール/精製水) した。最後に内液を凍結乾燥することでPEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd-EPI)]を得た。



**Scheme 2-2.** Synthesis route of epirubicin conjugated poly(ethylene glycol)-*b*-poly(aspartate) block copolymers (PEG-*b*-[PBLA-co-poly(Asp-Hyd-EPI)]).

## 2.2.4 高分子の構造解析

得られた高分子の分子量分散度 ( $M_w/M_n$ ) はゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography, GPC) を用いて測定した。

[GPC測定条件]

カラム : TSK-gel G3000H<sub>HR</sub> およびG4000H<sub>HR</sub> (Tosoh co., Inc., Tokyo, Japan)

移動相 : 10 mM塩化リチウムを含むDMF

流速 : 0.8 mL/min

検出器 : 示差屈折検出器

温度 : 25 °C

また, PEG-*b*-PBLAの合成におけるPBLAの重合度, およびPEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd)]のエステル-アミド交換反応におけるヒドラジド基の導入率は, プロトン核磁気共鳴分光法 (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy,  $^1\text{H-NMR}$ ) により決定した. PBLAの重合度 ( $\text{DP}_{\text{PBLA}}$ ) は, PEG鎖のメチレンに由来するプロトン ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ :  $\delta = 3.5$  ppm) の積分値をPBLA鎖におけるフェニル基のプロトン ( $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ :  $\delta = 7.3$  ppm) と比較することにより推定した. PEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd)]については, 高分子中のヒドラジド基を無水酢酸によりアセチル化した後に $^1\text{H-NMR}$ 測定を行い, アセチル基のプロトン ( $-\text{COCH}_3$ :  $\delta = 1.8$  ppm) の積分値からヒドラジド基の導入率を推定した.

[ $^1\text{H-NMR}$ 測定条件]

周波数 : 400 MHz

測定溶媒 : DMSO- $d_6$

積算回数 : 64 回

温度 : 25 °C

### 2.2.5 EPI 含量の測定

PEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd-EPI)]のEPI含量は, 逆相液体クロマトグラフィー (reversed phase liquid chromatography, RPLC) により評価した. 検体調製方法の概略を以下に示す. PEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd-EPI)] 約10 mgを精密に量り, 0.1N塩酸を加えて溶かし, 0.1N塩酸で正確に10 mLとした. この液1 mLを正確にとり, 0.1N塩酸で正確に50 mLとした. この溶液を, 30 °Cの水浴にて1時間インキュベートし, 高分子に結合したEPIを完全に遊離した. インキュベート終了後, 溶液を氷冷下にて冷

却し試料溶液とした。別にEPI・HCl 約10 mgを精密に量り、移動相を加えて溶かし、移動相で正確に10 mLとした。この液1 mLを正確にとり、移動相で正確に50 mLとし、標準溶液とした。試料溶液、および標準溶液10  $\mu$ LにつきRPLC測定を行い、EPIのピーク面積をそれぞれ求めた後、下式よりPEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd-EPI)]のEPI含量を算出した。

EPI 含量 (wt%)

$$= [\text{EPI} \cdot \text{HCl の秤取量 (mg)} ] / \{ \text{PEG-}b\text{-[PBLA-}co\text{-poly(Asp-Hyd-EPI)] の秤取量 (mg)} \} \\ \times (\text{標準溶液のピーク面積}) / (\text{試料溶液のピーク面積}) \times 100$$

[RPLC 測定条件]

検出器 : 紫外吸光光度計 (測定波長 : 254nm)

カラム : TSK-GEL ODS-80<sub>TM</sub> (TOSOH)

カラム温度 : 40 °C

移動相 : メタノール/4 mM ギ酸緩衝液 (pH3.0) 混液 (3/2)

### 2.2.6 EPI/m の調製

PEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd-EPI)]を高分子濃度として10 mg/mLとなるよう10 wt%スクロース水溶液に対し添加した後、超音波処理を行い均一に分散した。得られた分散液をpolyvinylidene fluoride (PVDF) 製フィルター (Millipore Millex, pore size : 0.22  $\mu$ m, Merck, Darmstadt, Germany) を用いてフィルターろ過し、EPI/mの水分散液を得た。溶液保存下における経時的なEPIの遊離を抑制するため、得られたミセル分散液は-80 °Cにて凍結保存した。

### 2.2.7 EPI/m の物性評価

EPI/mの粒子径，および多分散指数（polydispersity index, PDI）はZetasizer Nano ZS（Malvern Instruments; Worcestershire, UK）を用いて動的光散乱法（dynamic light scattering, DLS）により評価した。

[DLS測定条件]

レーザー波長 : 633 nm

温度 : 25 °C

高分子濃度 : 約1 mg/mL

また，ミセル分散液中のEPI濃度は調製したEPI/m 1mLを試料として，2.2.5項に示す手法に従い定量した。

### 2.2.8 *in vitro* 薬物放出性評価

種々の生理学的条件を模倣した試験液として pH，および NaCl 濃度の異なる下記 4 種類の緩衝液を選択した[16].

1. 血中および正常組織 : 150 mM の NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)
2. 初期エンドソーム内環境 : 20 mM の NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.9)
3. TME : 150 mM の NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.7)
4. 後期エンドソーム内環境 : 70 mM の NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 5.5)

EPI/m を EPI 換算として 20 µg/mL となるように試験液で希釈し，37 °Cにてインキュベートした。インキュベート開始後，2 時間ごとに 1 mL をサンプリングし，氷冷したものを試料溶液とした。試料溶液中の EPI 濃度を 2.2.5 項に示す手法に従い測定し，下式に従い各時点における薬物放出率を算出した。

薬物放出率 (%)

$$= [\text{試料溶液中の EPI 濃度 } (\mu\text{g/mL}) ] / 20 \times 100$$

## 2.2.9 細胞取り込み量の定量

$3 \times 10^6$  cells/dish の MDA-MB-231-luc-D3H2LN を培養面積  $175 \text{ cm}^2$  の細胞培養用フラスコに播種し、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$   $5 \text{ \%CO}_2$  雰囲気下にて 24 時間インキュベートした。インキュベート終了後、Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS (-)) にて細胞を 1 回洗浄し、EPI 換算として  $10 \mu\text{g/mL}$  に調整した EPI/m 含有 RPMI1640 培地 25 mL を添加し、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$   $5 \text{ \%CO}_2$  雰囲気下にて所定時間インキュベートした。所定時間経過後、 $0.05 \text{ \%}$  Trypsin-EDTA にて細胞を剥離、回収し、トリパンブルー染色により細胞数を計測した。遠心分離（遠心力： $300 \text{ g}$ ，時間： $5 \text{ 分}$ ，温度： $4^\circ\text{C}$ ）により回収した細胞を  $0.1\text{M}$  リン酸緩衝液（ $\text{pH } 7.4$ ） $1 \text{ mL}$  に懸濁し、液体窒素を用いた凍結融解、並びにビーズ式粉碎機処理により細胞を破碎した後、遠心分離（遠心力： $5,000\text{g}$ ，時間： $5 \text{ 分}$ ，温度： $4^\circ\text{C}$ ）を行い、上清を回収した。

得られた上清について、ミセルから遊離した EPI 濃度 (released EPI) と、released EPI に高分子結合 EPI を含めた総 EPI 濃度 (total EPI) をそれぞれ異なる試料調製処理により定量した。released EPI の定量においては、上清  $50 \mu\text{L}$  に対し、アセトニトリル  $125 \mu\text{L}$ ，および  $1 \text{ v/v\%}$  Triton X-100/D-PBS(-)溶液  $25 \mu\text{L}$  を添加し、ボルテックス処理を行った後、遠心分離（遠心力： $5,000\text{g}$ ，時間： $5 \text{ 分}$ ，温度： $4^\circ\text{C}$ ）し、上清  $75 \mu\text{L}$  を回収した。これを  $2 \mu\text{g/mL}$  ダウノルビシン塩酸塩/ $20 \text{ mM}$  リン酸緩衝液（ $\text{pH } 7.4$ ）溶液  $75 \mu\text{L}$  と混合し、試料溶液とした。total EPI の定量においては、上清  $50 \mu\text{L}$  に対し、アセトニトリル  $130 \mu\text{L}$ ，および  $1\text{N}$  塩酸  $20 \mu\text{L}$  を添加し、室温にて 1 時間インキュベートした。その後、 $1 \text{ v/v\%}$  Triton X-100/D-PBS(-)溶液  $25 \mu\text{L}$  を添加し、ボルテックス処

理を行った後，遠心分離（遠心力：5,000g，時間：5分，温度：4℃）し，上清 75  $\mu$ L を回収した．これを 2  $\mu$ g/mL ダウノルビシン塩酸塩/25 mM ギ酸緩衝液（pH 3.0）溶液 75  $\mu$ L と混合し，試料溶液とした．別に EPI  $\cdot$  HCl 約 5 mg を精密に量り，移動相を加えて溶かし，正確に 100 mL とした．この液 2 mL を正確にとり，移動相で正確に 50 mL とし，標準溶液とした．試料溶液，および標準溶液 50  $\mu$ L につき RPLC 測定を行い，EPI のピーク面積，およびダウノルビシン塩酸塩のピーク面積をそれぞれ求めた後，その面積比を用いて下式より細胞あたりの EPI 取り込み量を算出した．

細胞あたりの released EPI 取り込み量 (pg/cell)

$$=[\text{EPI} \cdot \text{HCl の秤取量 (mg)}] / 2,500 \times (\text{試料溶液のピーク面積比}) / (\text{標準溶液のピーク面積比}) \times 4 / \text{細胞数 (cells)}$$

細胞あたりの total EPI 取り込み量 (pg/cell)

$$=[\text{EPI} \cdot \text{HCl の秤取量 (mg)}] / 2,500 \times (\text{試料溶液のピーク面積比}) / (\text{標準溶液のピーク面積比}) \times 4.5 / \text{細胞数 (cells)}$$

[RPLC 測定条件]

検出器：蛍光分光光度計（励起波長：488 nm，蛍光波長：560 nm）

カラム：TSK-GEL ODS-100V（TOSOH）

カラム温度：40  $^{\circ}$ C

移動相：アセトニトリル/25 mM ギ酸緩衝液（pH 3.0）混液（3/7）

### 2.2.10 細胞内局在部位観察

$6 \times 10^4$  cells/well の MDA-MB-231-luc-D3H2LN をチャンバー型カバーガラス（Lab-

Tek 8-well chambered coverglass, Thermo) に播種し, 5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下, 24 時間, 37 °C にてインキュベートした. インキュベート終了後, D-PBS (-)にて細胞を 1 回洗浄し, EPI 換算として 5 µg/mL に調整した EPI/m 分散液 1 mL を添加し, 37 °C 5 %CO<sub>2</sub> 雰囲気下にてさらに 24 時間インキュベートした. インキュベート終了後, 余剰の EPI/m を除去するために D-PBS (-)を用いて細胞を 2 回洗浄した後, 酸性オルガネラ, および細胞核を LysoTracker® deep red, および Hoechst 33342 を用いて染色し, 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy, CLSM, Zeiss LSM780; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) にて観察した. EPI/m, LysoTracker® deep red, および Hoechst 33342 の観察には, それぞれ波長 488, 633, および 405 nm の励起光源を使用した.

### **2.2.11 エンドソーム内の pH 低下阻害下における細胞取り込み量の定量**

3 × 10<sup>6</sup> cells/dish の MDA-MB-231-luc-D3H2LN を培養面積 175 cm<sup>2</sup> の細胞培養用フラスコに播種し, 37 °C 5 %CO<sub>2</sub> 雰囲気下にて 24 時間インキュベートした. インキュベート終了後, Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS (-)) にて細胞を 1 回洗浄し, 10 ng/mL Bafilomycin A1 (BAFA1) 含有 RPMI1640 培地 25 mL を添加し, 37 °C 5 %CO<sub>2</sub> 雰囲気下にて 1 時間インキュベートした. その後, BAFA1 含有培地をアスピレーターにより除去し, EPI 換算として 10 µg/mL に調整した EPI/m, および 10 ng/mL Bafilomycin A1 含有 RPMI1640 培地 25 mL を添加し, 37 °C 5 %CO<sub>2</sub> 雰囲気下にて 24 時間インキュベートした. インキュベート終了後, 0.05 % Trypsin-EDTA にて細胞を剥離, 回収し, トリパンブルー染色により細胞数を計測した. 遠心分離 (遠心力: 300 g, 時間: 5 分, 温度: 4°C) により回収した細胞を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1 mL に懸濁し, 液体窒素を用いた凍結融解, 並びにビーズ式粉砕機処理により細胞を破碎した後, 遠心分離 (遠心力: 5,000g, 時間: 5 分, 温度: 4°C) を行い, 上清を回収した.

得られた上清について, ミセルから遊離した EPI 濃度 (released EPI) と, released

EPI に高分子結合 EPI を含めた総 EPI 濃度 (total EPI) を、2.2.9 項に示す方法に従い、それぞれ定量した。また、液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase の選択的阻害剤である BAFA1 が free EPI の細胞取り込み量に与える影響を確認するため、10 μg/mL EPI・HCl 水溶液を用いて上記と同様の評価を行った。

### 2.2.12 *in vitro* 抗腫瘍活性評価

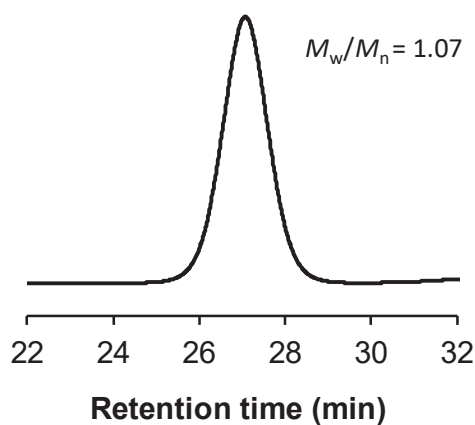
EPI/m のモデル腫瘍細胞 (MDA-MB-231-luc-D3H2LN, および MDA-MB-231) に対する 50%増殖阻害濃度 (50% growth inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) は MTT を用いた細胞生存率アッセイにより評価した。5,000 cells/well/50 μL の MDA-MB-231-luc-D3H2LN, もしくは MDA-MB-231 を 96-well plate に播種し、37 °C 5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下にて 24 時間インキュベートした。その後、種々の濃度に調整した EPI/m 分散液, もしくは free EPI 溶液 50 μL を各ウェルに添加し、37 °C 5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下にて 48 時間, もしくは 72 時間インキュベートした。インキュベート終了後、5 mg/mL MTT 溶液 10 μL を各ウェルに添加し、37 °C 5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下にて 2.5 時間インキュベートした。その後、100 mg/mL ラウリル硫酸ナトリウム水溶液 100 μL を各ウェルに添加し、37 °C 5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下にて 24 時間インキュベートした。インキュベート終了後、各ウェルの波長 595 nm における吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。細胞生存率はコントロールと各薬液添加系列との吸光度の比から算出した。さらに、得られた細胞生存率-薬物濃度曲線より IC<sub>50</sub> 値を解析した。

## 2.3 結果および考察

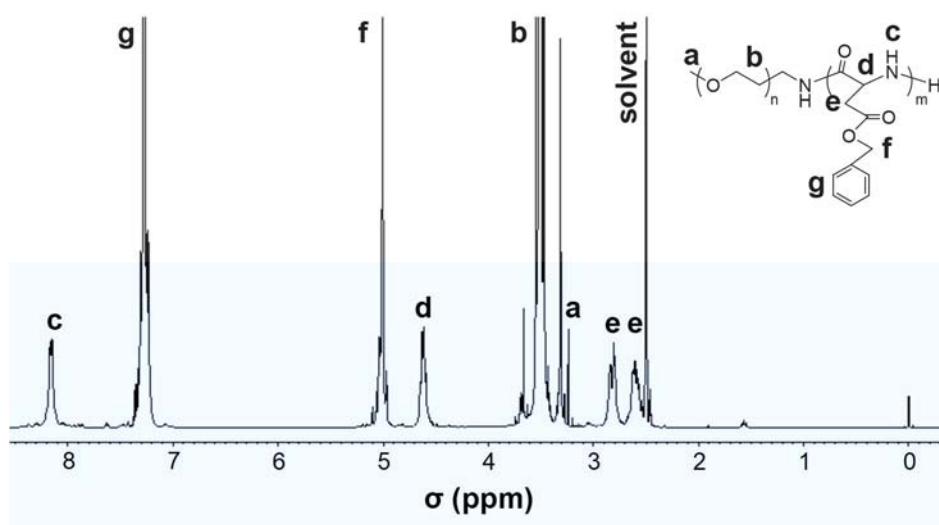
### 2.3.1 EPI 結合ブロック共重合体の合成および構造解析

EPI結合ブロック共重合体 (PEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd-EPI)]) は、MeO-PEG-NH<sub>2</sub> ( $M_w = 12,000$ ) を出発原料として合成した。まず、MeO-PEG-NH<sub>2</sub>をマクロ開始剤とし

たNCA-BLAの開環重合によりPEG-*b*-PBLAを得た。GPC測定結果 (Figure 2-1) より、得られたPEG-*b*-PBLAの分子量分布は狭く ( $M_w/M_n = 1.07$ )、分子量の均一性は良好であった。また、PBLAの重合度 ( $DP_{PBLA}$ ) を得られた高分子の $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (Figure 2-2) より評価した。PEG鎖のメチレンに由来するプロトン ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ;  $\delta = 3.5$  ppm) を基準とし、PBLA鎖におけるフェニル基のプロトン ( $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ;  $\delta = 7.3$  ppm) との積分値を比較した結果、 $DP_{PBLA}$ は39であった。

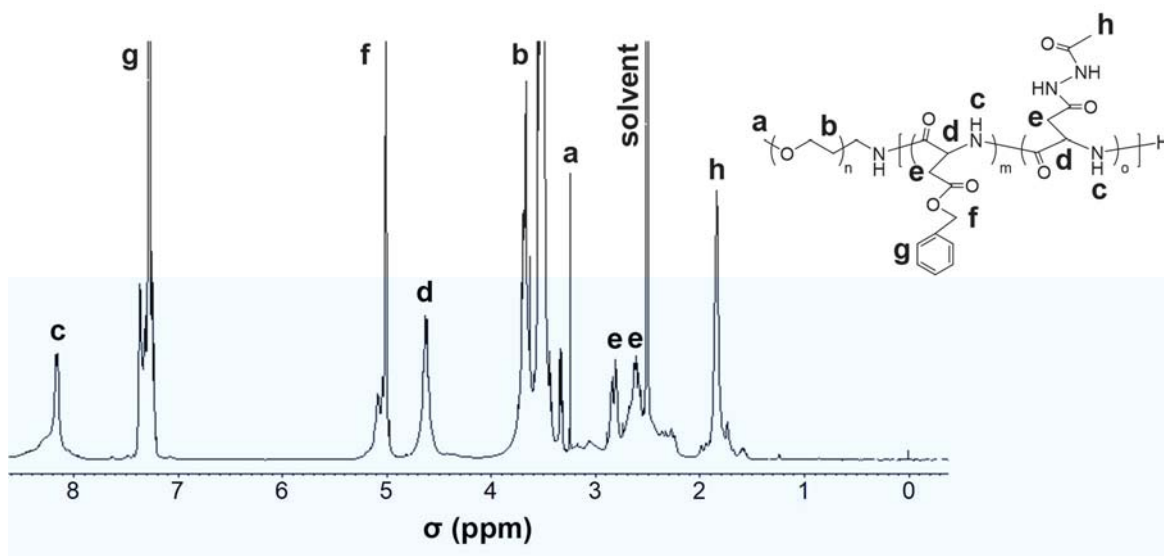


**Figure 2-1.** Gel permeation chromatography of PEG-*b*-PBLA (column: TSK-gel G3000H<sub>HR</sub>, G4000H<sub>HR</sub>; eluent: DMF containing 10 mM LiCl; flow rate: 0.8 mg/ml; temperature: 25 °C; detected signal: refractive index). The obtained molecular weight distribution ( $M_w/M_n$ ) of the polymer was shown in the figure.



**Figure 2-2.** Proton nuclear magnetic resonance spectra of PEG-*b*-PBLA in DMSO-*d*<sub>6</sub> at 25 °C. The spectra was obtained at 400 MHz and accumulated 64 times.

次に、無水ヒドラジンを用いたエステル-アミド交換反応により、PEG-*b*-PBLA に薬物結合部位となるヒドラジド基を導入した。得られたPEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd)]の構造確認においては、ヒドラジド基を無水酢酸によりアセチル化した後に<sup>1</sup>H-NMR測定を実施した。得られた<sup>1</sup>H-NMRスペクトル (**Figure 2-3**) より、1分子あたり15残基のヒドラジド基の導入が確認されたと共に、PBLA側鎖における未反応のベンジルエステル基の残存が確認された。本検討における無水ヒドラジンの添加当量は20当量であり、当該反応は概ね定量的に進行したと考察した。

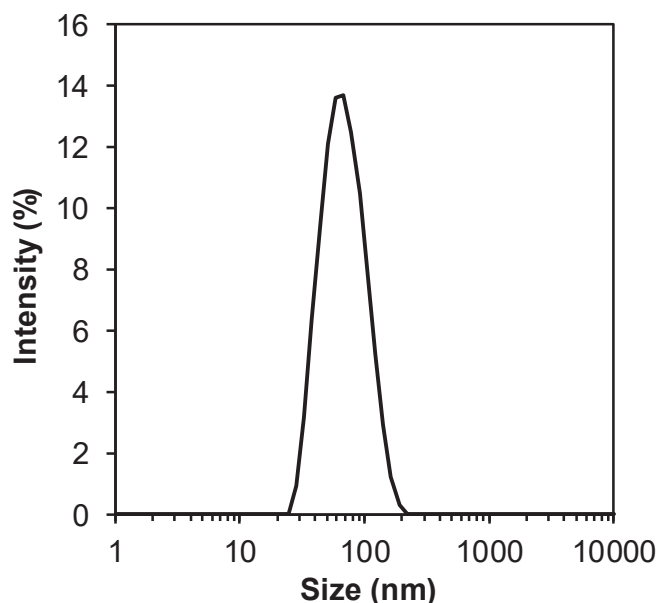


**Figure 2-3.** Proton nuclear magnetic resonance spectra of PEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd)] in DMSO-*d*<sub>6</sub> at 25 °C. The hydrazone group was labeled with acetic anhydride for quantification of the introduction rate. The spectra was obtained at 400 MHz and accumulated 64 times.

最後に、得られたPEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd)]に対しDMSO中にてEPI・HClとの結合反応を実施した。得られたPEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd-EPI)]のEPI含量はRPLC測定により評価した。0.1N塩酸中にて高分子からEPI・HClを完全に遊離した後、溶液中のEPI濃度を定量した結果、高分子中のEPI含量は20 wt%と求められた。なお、本評価結果を高分子1分子あたりのEPI分子数に換算した結果、10 molEPI/mol<sub>polymer</sub>に相当した。

### 2.3.2 EPI/*m* の調製

EPI/*m* は前項において合成した PEG-*b*-[PBLA-*co*-poly(Asp-Hyd-EPI)]を 10 wt%スクロース水溶液に分散し、フィルターろ過を行うことで調製した。DLS 測定より、調製した高分子ミセルは Z 平均粒子径 55 nm (PDI = 0.09) の単分散会合体として得られた (Figure 2-4)。

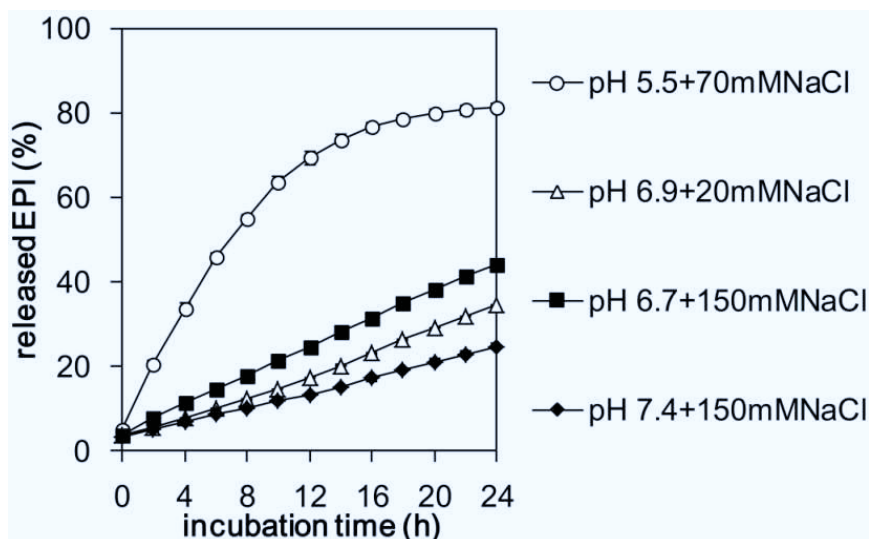


**Figure 2-4.** Size distribution of EPI/m determined by dynamic light scattering measurement (Laser wavelength: 633 nm; temperature: 25 °C).

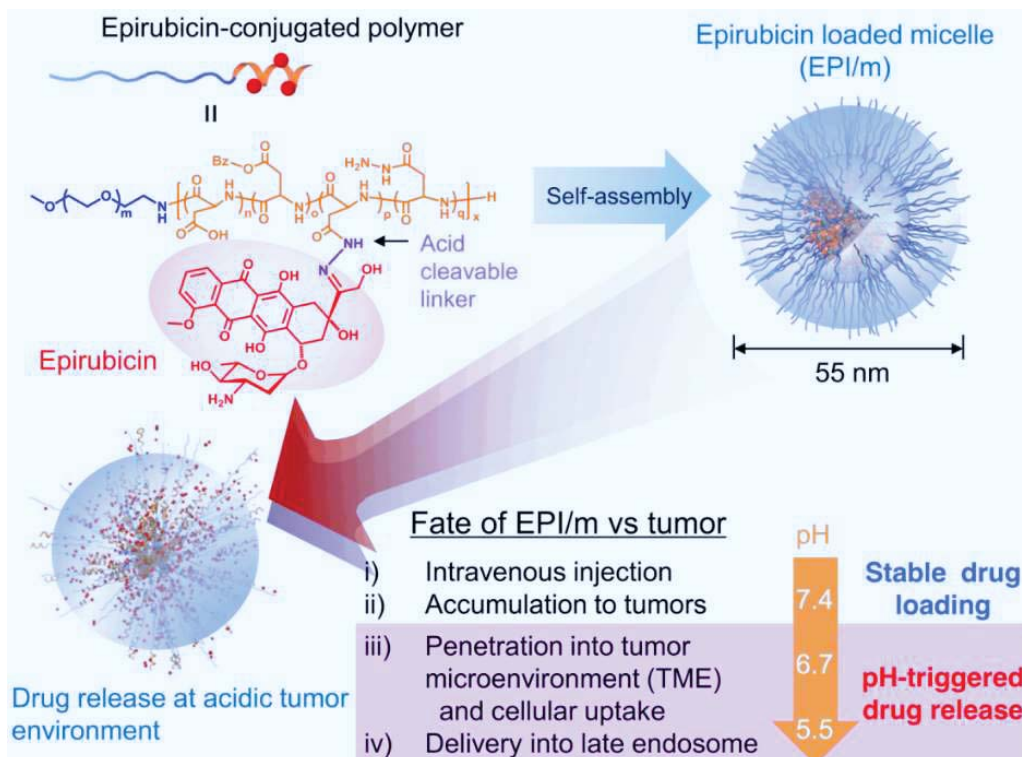
### 2.3.3 EPI/m の *in vitro* 薬物放出性評価

次に、EPI/m の pH 応答性薬物放出挙動について評価した。当該評価については既に、pH 3.0～pH 7.4 における薬物放出プロファイルが報告されており、pH 7.0 以下の弱酸性領域においてミセルからの薬物放出速度が増加することが確認されている[6]。一方で、ミセルの腫瘍組織への送達過程において想定される生理学的な弱酸性条件下における放出挙動は詳細に検証されていない。そこで本研究では、血中および正常組織 (pH 7.4, 150mM NaCl)、TME の細胞外環境 (pH 6.7, 150mM NaCl)、細胞取り込み後の初期エンドソーム内 (pH 6.9, 20mM NaCl)、および後期エンドソーム内 (pH 5.5, 70mM NaCl) を模倣した緩衝液中における、EPI/m の薬物放出挙動を評価した (**Figure 2-5**)。各 pH における放出プロファイルより、ミセルからの薬物放出は pH 依存的な傾向を示し、pH 7.4 において最も低い放出速度を示した。EPI の放出速度は、pH 7.4 か

ら pH 6.7 にかけて徐々に上昇し, pH 5.5 において急激に増加した. 従って, EPI/m の薬物放出は TME (pH 6.7) を含む腫瘍内酸性環境において誘起され, 細胞取り込み後の後期エンドソーム内においてさらに促進されると考えられた (**Scheme 2-3**).



**Figure 2-5.** *in vitro* pH-triggered drug release profile of EPI/m. Released EPI was measured by reversed phase liquid chromatography. Data are presented mean  $\pm$  SD (n=3).



**Scheme 2-3.** Controlled release system of epirubicin loaded micelles (EPI/m) incorporating acid cleavable linkage

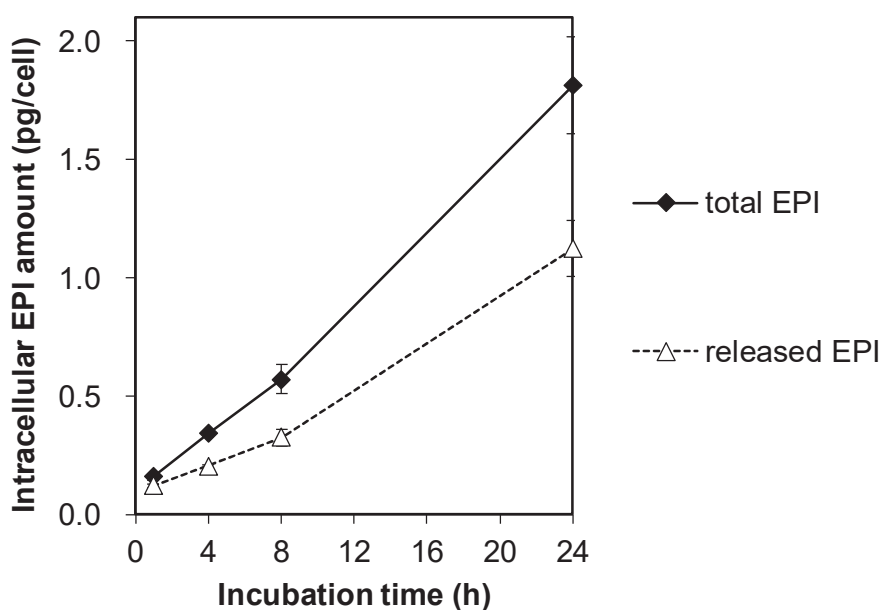
### 2.3.4 EPI/m の細胞取り込み挙動に関する検証

EPI/m の薬物放出特性と抗腫瘍活性との関連性を考察するためには、ミセルの生体内動態を踏まえた検証が必要である。本章では、EPI/m からの後期エンドソーム内における薬物放出の可能性を検証するため、モデル腫瘍細胞 (MDA-MB-231-luc-D3H2LN) を用いた *in vitro* での検証を行った。

はじめに、EPI/m の細胞内在化の有無を検証するため、EPI を指標成分とした細胞取り込み量の定量的評価について検討した。EPI 換算として 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調整した EPI/m 含有培地を MDA-MB-231-luc-D3H2LN と所定時間接触した後、細胞を洗浄、回収、および破碎し、細胞内の EPI 量を定量した。ここで、細胞取り込み後に想定される EPI の存在状態としては、ミセルから遊離した EPI と高分子に結合した EPI の 2 種

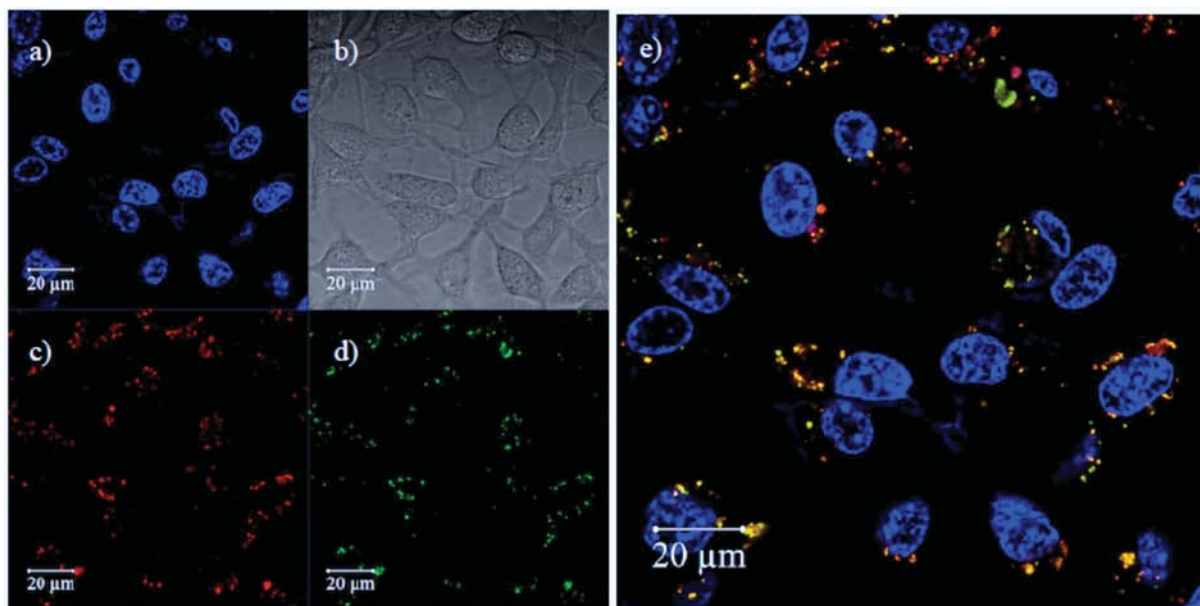
類が想定される。本研究では、細胞内在化後のミセルからの薬物放出の可能性についても考察するため、EPI/m から遊離した EPI 濃度 (released EPI) と、released EPI に高分子結合 EPI を含めた総 EPI 濃度 (total EPI) をそれぞれ異なる試料調製処理により定量した。

**Figure 2-6** に MDA-MB-231-luc-D3H2LN に対する EPI/m の細胞取り込み量の経時推移を示す。細胞あたりの released EPI 量、および total EPI 量はいずれも経時的に増加する傾向を示し、時間依存的に EPI/m が細胞に内在化し、細胞内で EPI を放出する可能性を示唆した。



**Figure 2-6.** Intracellular EPI amount in MDA-MB-231-luc-D3H2LN cells at 1h, 4h, 8h and 24h after addition of EPI/m 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on an EPI basis. EPI/m was quantified as total drug concentration from micelle (released drug and polymer conjugated drug in micelle, total EPI) and released drug from micelle (released EPI) by reversed phase liquid chromatography. Data are presented mean  $\pm$  SE (n=3).

次に、EPI/m の細胞内在化後の局在部位を同定するため蛍光顕微鏡による観察を行った。EPI 換算として 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調整した EPI/m 含有培地を MDA-MB-231-luc-D3H2LN と 24 時間接触した後、細胞を洗浄し、細胞内のミセル局在部位を released EPI に由来する蛍光[10,11]を指標として観察した。その際、細胞核、および酸性オルガネラをそれぞれ LysoTracker® deep red, および Hoechst 33342 を用いて染色した (Figure 2-7)。released EPI に由来する蛍光 (緑色, Figure 2-7 d) は細胞質に分布し、EPI/m の細胞への内在化を裏付けた。さらに、ミセルの細胞内分布は酸性オルガネラ (後期エンドソーム, およびライソソーム) を示す赤色蛍光 (Figure 2-7 c) の分布と概ね一致し、その共局在部位は merge 画像において黄色蛍光として観察された (Figure 2-7 e)。ナノ粒子の細胞内動態に関する先行研究において、PEG-pAsp 誘導体を構成担体とする高分子ミセルは、クラスリン介在型エンドサイトーシスを主経路として腫瘍細胞に取り込まれた後、酸性オルガネラにおいて解離することが報告されている[17]。本研究における観察結果は先行研究の主張とも一致することから、EPI/m は細胞内在化後に後期エンドソーム等に輸送され、液胞内の酸性環境に暴露されると考察した。

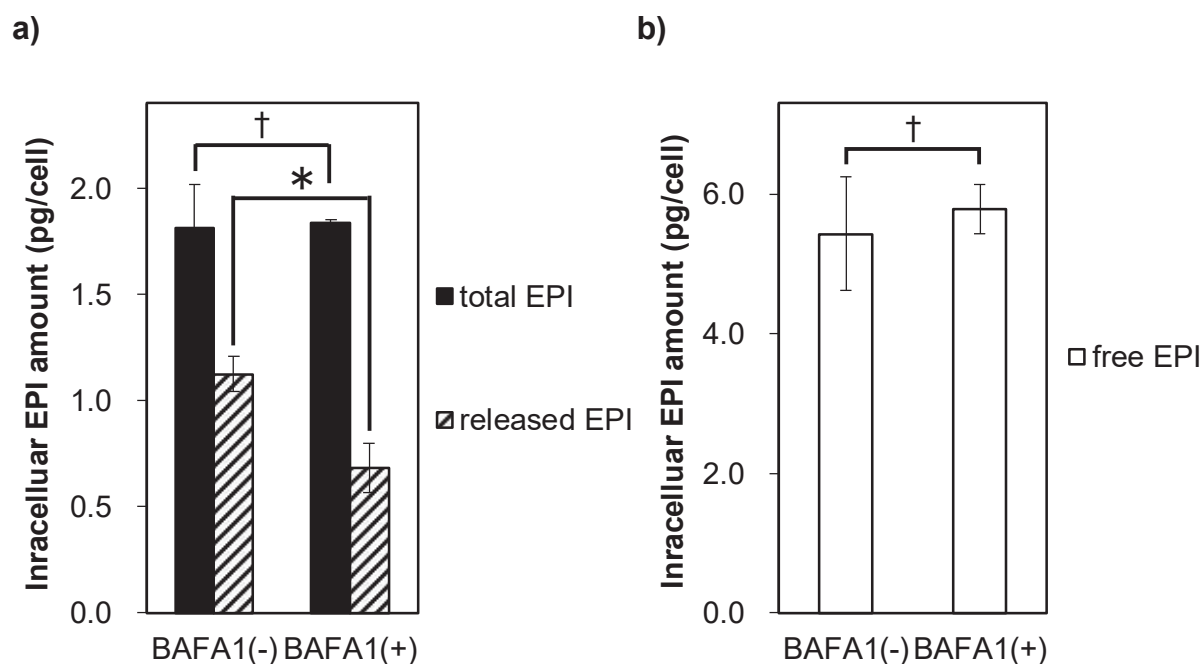


**Figure 2-7.** Intracellular localization of EPI/m at 24 h after the addition of the micelles to MDA-MB-231-luc-D3H2LN cells observed by confocal laser scanning microscopy. Nucleus and acidic organelles were stained by Hoechst 33342 and LysoTracker® deep red, respectively. Confocal images showing a) nucleus, b) phase contrast, c) acidic organelles, d) released EPI from EPI/m and e) a merged image of a), c) and d).

最後に、細胞内での薬物放出における酸性環境の寄与について考察するため、エンドソームの pH 低下阻害が EPI/m の細胞取り込み量に与える影響について評価した。エンドソームの pH 低下阻害剤としては、液胞型  $H^+$ -ATPase の選択的阻害剤である BAFA1 を選択し[18]、阻害剤非共存/共存下における EPI/m、および free EPI の細胞取り込み量を比較した (**Figure 2-8**)。接触 24 時間経過時点において、total EPI の細胞取り込み量には阻害剤添加による影響を認めなかったのに対し、released EPI の細胞取り込み量は BAFA1 添加群において有意に低下した (**Figure 2-8 a**)。なお同実験条件において、free EPI の細胞取り込み量には阻害剤の有無による変化を認めなかった (**Figure 2-8 b**)。従って、BAFA1 添加による released EPI の減少は、後期エンドソーム内の pH 低下阻害に伴いミセルからの薬物放出が抑制されたことによるものである

と考察した。

以上の結果より，EPI/m の腫瘍組織における活性化機序の一つは，腫瘍細胞取り込み後の後期エンドソームにおける pH 低下をトリガーとした薬物放出であると考えられた。

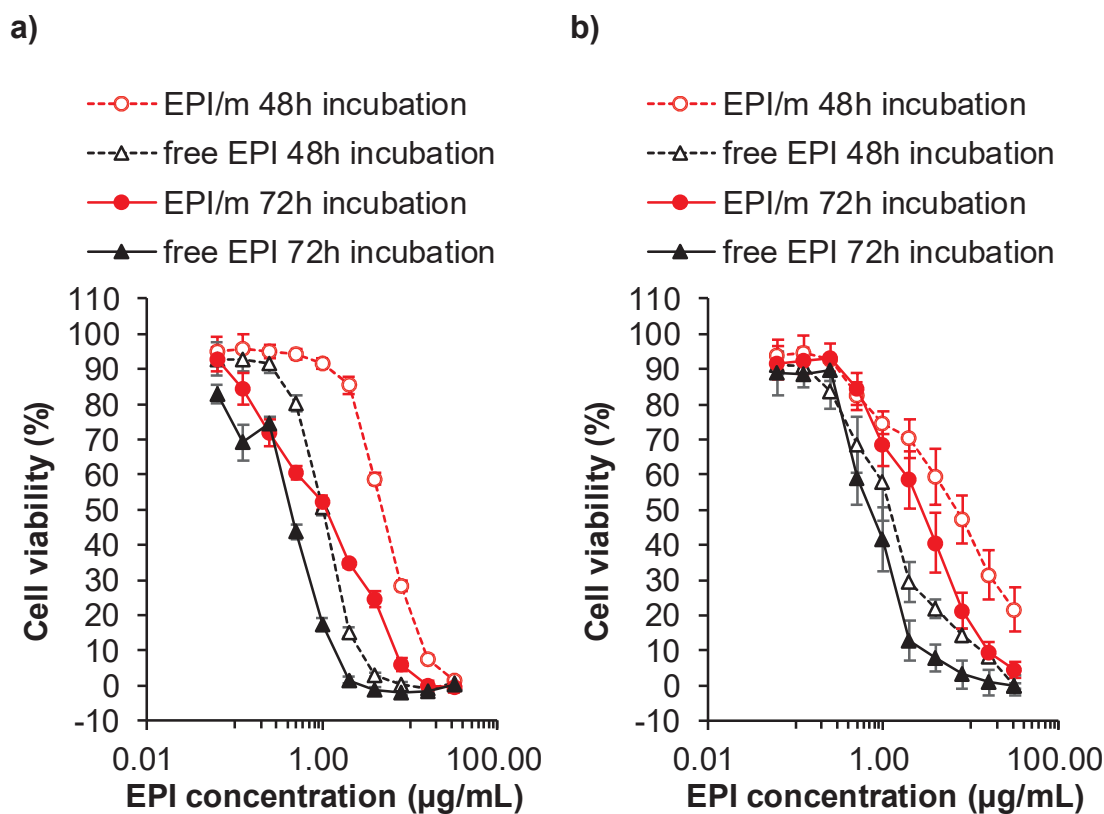


**Figure 2-8.** The effect of a proton pump inhibitor on the intracellular EPI amount in MDA-MB-231-luc-D3H2LN cells. Cells were incubated for 24h with free EPI or EPI/m 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on an EPI basis. a) Intracellular amount of EPI/m. EPI/m was quantified as total drug concentration from micelle (released drug and polymer conjugated drug in micelle, total EPI) and released drug from micelle (released EPI) by reversed phase liquid chromatography. b) Intracellular amount of free EPI quantified by reversed phase liquid chromatography. Data are presented mean  $\pm$  SE (n=3). \* < 0.05 was determined by Student's *t*-test.

### 2.3.5 EPI/m の *in vitro* 細胞増殖阻害活性評価

最後に、EPI/m の MDA-MB-231-luc-D3H2LN, および parental cell line である MDA-MB-231 に対する細胞増殖阻害活性を MTT アッセイにより評価した. EPI 換算として種々の濃度に調整した EPI/m 分散液, および free EPI 溶液をそれぞれ細胞に添加し, 48 時間, および 72 時間インキュベート後における細胞生存率を MTT により検出した.

得られた生存曲線より, EPI/m, および free EPI とともに濃度依存的に細胞生存率は減少し, これらの腫瘍細胞に対する薬理活性が確認された (**Figure 2-9**). 先行研究において, EPI のエピマーであるドキシソルビシンは高分子結合状態において薬理活性を示さないことが知られている[19,20]. 従って, EPI/m の細胞増殖阻害活性は細胞への添加後にミセルより放出された released EPI に起因すると考えられる.



**Figure 2-9.** The Growth inhibitory effects of EPI/m and free EPI on triple negative breast cancer cell lines. MDA-MB-231-luc-D3H2LN or MDA-MB-231 cells were cultured with various concentrations of EPI/m or free EPI. After 48 and 72 hours, cell proliferation was measured by MTT assay. Results represent the mean  $\pm$  SD of three experiments performed in triplicate. a) Dose-dependent inhibitory effect of EPI/m and free EPI on MDA-MB-231-luc-D3H2LN. b) Dose-dependent inhibitory effect of EPI/m and free EPI on MDA-MB-231.

さらに、**Figure 2-9**において直線的に生存率が減少する濃度範囲より 50%増殖阻害濃度 (50% growth inhibitory concentration ,  $IC_{50}$ ) を算出した (**Table 2-1**)。両細胞種の  $IC_{50}$  は投与液、およびインキュベート時間によらず同等であり、EPI の薬理活性はルシフェラーゼの遺伝子導入による影響を受けないと判断した。

また、両細胞種ともにインキュベート時間の増加に伴い、EPI/m の  $IC_{50}$  は free EPI に近接し、EPI/m と free EPI の効果比は経時的に減少した。前項の検討結果から、

released EPI は後期エンドソーム内において経時的に EPI/m より放出されることが示唆されている。従って、インキュベーション時間の増加に伴う効果比の減少は、released EPI 生成量の経時的な増加に伴い EPI/m の細胞障害活性が増大したことによるものと考察した。

**Table 2-1.** 50 % growth inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of EPI/m and free EPI against MDA-MB-231-luc-D3H2LN or MDA-MB-231 were determined by MTT assay. Cells were treated with several concentrations of EPI/m or free EPI for 48hours and 72 hours. Data are presented as mean ± SD (n=3).

| Samples                | IC <sub>50</sub> (µg/mL) |              |            |             |
|------------------------|--------------------------|--------------|------------|-------------|
|                        | MDA-MB-231-luc-D3H2LN    |              | MDA-MB-231 |             |
|                        | 48h                      | 72h          | 48h        | 72h         |
| EPI/m                  | 5.1 ± 0.28               | 0.88 ± 0.055 | 6.1 ± 2.6  | 2.5 ± 0.57  |
| free EPI               | 0.91 ± 0.048             | 0.45 ± 0.018 | 1.2 ± 0.36 | 0.73 ± 0.12 |
| Ratio (EPI/m/free EPI) | 5.6 ± 0.54               | 1.9 ± 0.19   | 5.1 ± 2.1  | 3.4 ± 0.25  |

## 2.4 結論

本章では、EPI/m の pH 応答性薬物放出能に着目し、腫瘍周辺環境における内包薬物の活性化の実態について *in vitro* での検証を試みた。緩衝液を用いた薬物放出特性評価より、EPI/m の薬物放出は TME を含む腫瘍内酸性環境において誘起され、細胞取り込み後の後期エンドソーム内において促進されると考えられた。さらに、細胞取り込み後におけるミセルからの薬物放出の可能性について詳細な検証を行ったところ、EPI/m はモデル腫瘍細胞に内在化した後に後期エンドソームに局在し、液胞内の pH 低下をトリガーとして内包薬物を放出する可能性が示された。また、モデル腫瘍細胞に対する EPI/m の増殖阻害活性は接触時間の増大とともに上昇する傾向を示し、細胞内におけるミセルからの薬物放出と薬理活性との相関を示唆した。これらの知見

は、EPI/m が pH 応答性ナノメディシンとして、腫瘍組織選択的に薬理活性を発現する可能性を示唆すると考えられる。

## 2.5 参考文献

- [1] J. Liu, Y. Huang, A. Kumar, A. Tan, S. Jin, A. Mozhi, X.-J. Liang, pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 693–710. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.009.
- [2] X. Pang, Y. Jiang, Q. Xiao, A.W. Leung, H. Hua, C. Xu, PH-responsive polymer-drug conjugates: Design and progress, *J. Control. Release.* 222 (2016) 116–129. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.024.
- [3] B.A. Webb, M. Chimenti, M.P. Jacobson, D.L. Barber, Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression, *Nat. Rev. Cancer.* 11 (2011) 671–677. doi:10.1038/nrc3110.
- [4] C. Corbet, O. Feron, Tumour acidosis: From the passenger to the driver's seat, *Nat. Rev. Cancer.* 17 (2017) 577–593. doi:10.1038/nrc.2017.77.
- [5] M. Forgac, Vacuolar ATPases : rotary proton pumps in physiology and pathophysiology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007). doi:10.1038/nrm2272.
- [6] M. Harada, I. Bobe, H. Saito, N. Shibata, R. Tanaka, T. Hayashi, Y. Kato, Improved anti-tumor activity of stabilized anthracycline polymeric micelle formulation, NC-6300, *Cancer Sci.* 102 (2011) 192–199. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01745.x.
- [7] A. Takahashi, Y. Yamamoto, M. Yasunaga, Y. Koga, J.I. Kuroda, M. Takigahira, M. Harada, H. Saito, T. Hayashi, Y. Kato, T. Kinoshita, N. Ohkohchi, I. Hyodo, Y. Matsumura, NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, extends the antitumor effect and reduces the cardiotoxicity of epirubicin, *Cancer Sci.* 104 (2013) 920–925.

doi:10.1111/cas.12153.

- [8] H. Mukai, T. Kogawa, N. Matsubara, Y. Naito, M. Sasaki, A. Hosono, A first-in-human Phase 1 study of epirubicin-conjugated polymer micelles (K-912/NC-6300) in patients with advanced or recurrent solid tumors, *Invest. New Drugs*. 35 (2017) 307–314. doi:10.1007/s10637-016-0422-z.
- [9] H. Cabral, K. Miyata, K. Osada, K. Kataoka, Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications, *Chem. Rev.* 118 (2018) 6844–6892. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00199.
- [10] Y. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka, Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: Polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 42 (2003) 4640–4643. doi:10.1002/anie.200250653.
- [11] Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro, K. Kataoka, Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: Tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 122–130. doi:10.1021/bc0498166.
- [12] Y. Bae, W.D. Jang, N. Nishiyama, S. Fukushima, K. Kataoka, Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery, *Mol. Biosyst.* 1 (2005) 242–250. doi:10.1039/b500266d.
- [13] K. Kataoka, Y. Bae, S. Fukushima, W.D. Jang, N. Nishiyama, NOVEL BLOCK COPOLYMER USED FOR PREPARING pH-RESPONSIVE POLYMER MICELLE, AND METHOD FOR PRODUCING SAME, WO/2006/115923, 2006.

- [14] I. BOBE, N. SHIBATA, H. SAITO, M. HARADA, BLOCK COPOLYMER FOR DRUG COMPLEX AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION, WO/2008/047948, 2008.
- [15] D.E. Jenkins, Y.S. Hornig, Y. Oei, J. Dusich, T. Purchio, Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivodetection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice, *Breast Cancer Res.* 7 (2005) R444. doi:10.1186/bcr1026.
- [16] N.D. Sonawane, J.R. Thiagarajah, A.S. Verkman, Chloride concentration in endosomes measured using a ratioable fluorescent Cl<sup>-</sup> indicator. Evidence for chloride accumulation during acidification, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5506–5513. doi:10.1074/jbc.M110818200.
- [17] K. Sakai-Kato, K. Un, K. Nanjo, N. Nishiyama, H. Kusuhara, K. Kataoka, T. Kawanishi, Y. Goda, H. Okuda, Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components, *Biomaterials.* 35 (2014) 1347–1358. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.027.
- [18] P. Montcourrier, I. Silver, R. Farnoud, I. Bird, H. Rochefort, Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism, *Clin. Exp. Metastasis.* 15 (1997) 382–392. doi:10.1023/A:1018446104071.
- [19] T. Nakanishi, S. Fukushima, K. Okamoto, M. Suzuki, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin, *J. Control. Release.* 74 (2001) 295–302. doi:10.1016/S0168-3659(01)00341-8.
- [20] K. Sakai-Kato, K. Ishikura, Y. Oshima, M. Tada, T. Suzuki, A. Ishii-Watabe, T. Yamaguchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, T. Kawanishi, H. Okuda, Evaluation of

intracellular trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers, *Int. J. Pharm.* 423 (2012) 401–409. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.022.

## 第 3 章

術前化学療法を模倣した治療条件  
におけるエピルビシン内包 **pH** 応答性  
高分子ミセルの抗腫瘍効果に関する検討

## 要旨

乳がんの治療において、術前化学療法の奏功は患者の生存率の向上のみならず、生活の質の改善にも大きく貢献し得る。エピルビシン (epirubicin, EPI) を含むアントラサイクリン系抗がん剤は、腋窩リンパ節転移 (axillary lymph node metastasis, ALNM) 陽性のトリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) 患者に対する術前化学療法に広く用いられている。しかし、その有用性には議論の余地があり、現在に於いても有効性の高い新規治療薬が求められている。本章では、乳がんの術前化学療法を模倣した動物モデルとして、ALNM 形成を伴う TNBC 同所移植モデルを構築し、pH 応答性 EPI 内包高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle, EPI/m) の既存薬に対する優位性を検証した。コントロール群との比較において、EPI/m は原発腫瘍の増殖、並びに ALNM の形成を用量依存的かつ有意に抑制した。一方、既存薬である free EPI の溶液投与においては、原発腫瘍の増殖抑制効果は確認されたものの、ALNM の形成抑制効果は認めなかった。これらの結果は、原発腫瘍および ALNM の双方に対して有効な新規治療薬として、EPI/m が乳がんの術前化学療法において有用であることを示す知見となり得る。

### 3.1 緒言

エピルビシン (epirubicin, EPI) を含むアントラサイクリン系抗がん剤は、乳がんの化学療法における中心的な薬剤であり、主に難治性のトリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) に対して適用されている[1]。乳がんの化学療法は外科的切除の周術期において最も頻繁に適用され、原発腫瘍の所属リンパ節である腋窩リンパ節転移 (axillary lymph node metastasis, ALNM) の治療が主な目的である[2]。周術期の化学療法は術前化学療法と術後化学療法に大別される [3,4]。このうち術前化学療法は、主に外科的切除が困難な原発腫瘍を有する ALNM 陽性患者に対し

て適用される [2]. 一般に術前化学療法の治療上の利点は、原発腫瘍周辺の微小転移の治療、および原発腫瘍の縮小により外科的切除での完治が困難な腫瘍を治療可能とし得る点とされている[5]. さらに乳がんにおいては、乳房の切除に伴う患者の精神的苦痛軽減も重要な治療目的であり、乳房温存療法[6]や乳房再建術[7]といった術前化学療法奏功を前提とした治療方法が提案されている. 故に、患者の生存率の向上のみならず、生活の質の改善にも寄与し得る点で術前化学療法の意義は乳がんにおいて特に重要である[8]. しかしながら、既存薬であるアンスラサイクリン系抗がん剤の有効性は臨床研究における試験間差が大きいため、その有用性には依然として議論の余地があり[9], 新規治療薬の開発が望まれている. このような臨床的背景から、エピルビシン内包 pH 応答性高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle, EPI/m) [10–12]を TNBC の ALNM に対する薬物とし、術前化学療法に関する有用性を検証する意義は大きい.

そこで本章では、術前化学療法を模倣した治療条件として自発的 ALNM 形成を伴う TNBC 同所移植モデルマウスを用いて、EPI/m の *in vivo* 抗腫瘍活性を評価した. TNBC 同所移植モデルマウスは第 2 章にてモデル腫瘍細胞とした MDA-MB-231-luc-D3H2LN を用いて作製した. 当該細胞株は、乳腺組織への同所移植により原発腫瘍の増大と共に腋窩リンパ節選択的に転移形成を示すことが知られている[13]. 本研究では最初に、本担がんモデルの抗腫瘍評価系への妥当性を検証するため、原発腫瘍の増殖推移と ALNM の形成過程を *in vivo* イメージングシステム (IVIS) により観察し、MDA-MB-231-luc-D3H2LN の親株細胞である MDA-MB-231 と比較した. 次に EPI/m の当該モデルに対する原発腫瘍の増殖抑制効果、および ALNM の形成抑制効果を free EPI と比較し、既存薬に対する優位性を検証した.

## 3.2 実験

### 3.2.1 試薬

ウシ血清アルブミン (fetal bovine serum, FBS) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。Matrigel basement membrane matrix (マトリゲル) は Corning (Corning, NY, USA) から購入した。VivoGlo ルシフェリンは Promega (Madison, WI, USA) から購入した。その他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。

### 3.2.2 細胞および実験動物

ヒト由来 TNBC 細胞株である MDA-MB-231 は住商ファーマインターナショナル株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。また、MDA-MB-231 のリンパ節転移好発性ルシフェラーゼ発現株である MDA-MB-231-luc-D3H2LN は、PerkinElmer (Waltham, MA, USA) から購入した。いずれの細胞株も 10 %FBS 含有 RPMI1640 培地中、37 °C 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下にて培養した。BALB/Cヌードマウス (遺伝子型 BALB/C nu/nu ; 雌 ; 入手時 4 週齢) は Charles River Japan (Kanagawa, Japan) より購入し、1 週間の馴化期間を経た後に実験に供した。全ての動物実験は、ナノ医療イノベーションセンター (Kawasaki, Japan), もしくは東京大学 (Tokyo, Japan) における動物委員会の承認下において実施した。

### 3.2.3 高分子ミセルの調製

本章において使用した EPI/m は第 2 章に示す手法にて調製した。抗腫瘍効果における投与液は、EPI 換算として 2 mg/mL の 10 wt% スクロース分散液を stock solution と

し、-80℃にて凍結保存を行うとともに、投与開始前日のマウスの平均体重を基準として用事調製した。その際、希釈液には 10 wt%スクロース水溶液を用いた。

### 3.2.4 腋窩リンパ節転移形成を伴う乳がん同所移植モデルマウスの作製

自発的ALNM形成を伴うTNBC同所移植モデルマウスは既報[13]に従い調製した。MDA-MB-231-luc-D3H2LN の細胞懸濁液 ( $2 \times 10^6$  cells/50  $\mu$ L) を Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS (-)) とマトリゲルの1:1混液を用いて調製し、BALB/Cヌードマウス (雌; 16-21 g/body; 移植時5週齢) の左腹部乳腺組織に移植した。なお原発腫瘍の増殖速度を比較するため、親株細胞であるMDA-MB-231についても同様の条件にて同所移植モデルマウスを作製した。

### 3.2.5 原発腫瘍及びリンパ節転移の増殖推移の評価

MDA-MB-231-luc-D3H2LN 移植マウスにおける原発腫瘍の増殖とリンパ節転移の形成過程は、腫瘍体積と生物発光強度の測定によりそれぞれ評価した。

腫瘍体積 ( $V$ ) はノギスにより測定した原発腫瘍の長径 ( $a$ ) と短径 ( $b$ ) より、以下の式にて算出した。

$$V (\text{mm}^3) = [a (\text{mm}) \times b^2 (\text{mm}) ]/2$$

ルシフェラーゼ活性を利用した MDA-MB-231-luc-D3H2LN の生物発光強度は、IVIS (PerkinElmer) を用いて機器製造元の推奨する手順に従い測定した。以下に測定手順の概略を示す。イソフルラン吸入麻酔下において、MDA-MB-231-luc-D3H2LN 移植マウスに VivoGlo ルシフェリン/D-PBS(-)溶液 150 mg/kg を尾静脈より投与した。ルシフ

ェリンの投与より 1 分経過後，IVIS を用いて MDA-MB-231-luc-D3H2LN 移植マウスの生物発光を撮像した．生物発光強度は，Living Image software (PerkinElmer) を用いて撮像結果より関心領域 (regions of interest, ROI) を指定した後，単位時間あたりの光子カウント数 (photon counts per second, photons/sec) として定量化した．撮像時間は，測定対象の生物発光強度に応じて，1 秒から 5 分の範囲で調整した．ルシフェラーゼ活性の持続時間を考慮し，5 分間の撮像においても明瞭な生物発光シグナルが確認されなかった場合は，転移腫瘍が存在しないものと定義した．

### 3.2.6 乳がん同所移植モデルマウスに対する抗腫瘍効果

3.2.4 項に従い MDA-MB-231-luc-D3H2LN 乳がん同所移植モデルマウスを作製し，20 日間経過した後に腫瘍体積を基準として 4 群に群分けした (各群 n=6)．群分け翌日より，free EPI 溶液 (投与量 ; 10 mg/kg)，EPI/m 分散液 (投与量 ; EPI 換算として 10 mg/kg，および 20 mg/kg)，10 wt% スクロース溶液をマウス尾静脈より 1 週間おきに 3 回投与した．実験期間中，投薬による影響を体重測定により確認するとともに，原発腫瘍，並びに ALNM の形成過程をそれぞれ評価した．

### 3.2.7 統計学的解析

投与群間の治療効果の比較における統計解析手法には 2 元配置分散分析 (two-way analysis of variance, two-way ANOVA) を用いた．両側検定における  $P$  値が 0.05 未満の場合，比較群間の治療効果には有意差があるとみなした．

### 3.3 結果および考察

#### 3.3.1 MDA-MB-231-luc-D3H2LN 乳がん同所移植モデルにおける原発腫瘍の増殖性評価

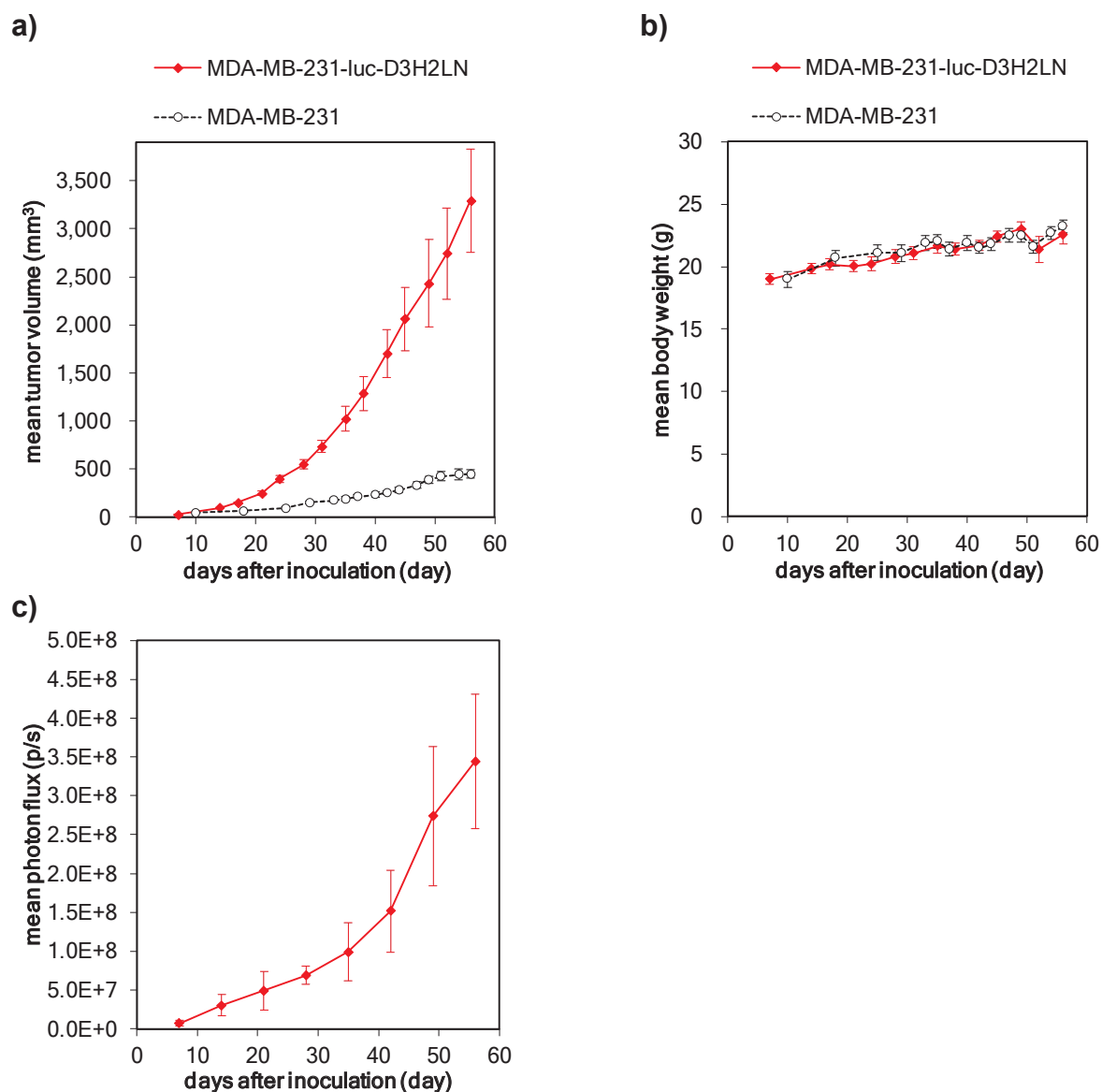
本研究では、術前化学療法を模倣した原発腫瘍共存下における ALNM 併発モデルとして、MDA-MB-231-luc-D3H2LN 乳がん同所移植モデルを選択した。当該細胞種は高い浸潤性を有するヒト由来 TNBC 細胞株 MDA-MB-231 のルシフェラーゼ導入 subclone であり[13]、その乳がん同所移植モデルは転移抑制効果の検証を目的とした新規治療薬の *in vivo* 評価において汎用されている[14–19]。しかし、観察期における転移形成過程を経時的に追跡した評価事例は少なく[15]、転移の発症時期や発症部位に関する個体間差についての知見が乏しい。そこで、治療効果の確認に向けた予備検討として、当該モデルにおける原発腫瘍の増殖推移と転移形成過程を評価した。

最初に、MDA-MB-231-luc-D3H2LN 原発腫瘍の増殖推移を評価し、親株細胞である MDA-MB-231 との比較を行った。2 × 10<sup>6</sup> cells の MDA-MB-231-luc-D3H2LN、もしくは MDA-MB-231 をヌードマウスの左腹部乳腺組織に移植した後、原発腫瘍の腫瘍体積、および体重の経日的推移を比較した (**Figure 3-1**)。移植後の目視観察結果より、いずれの細胞においても移植マウス全例で原発腫瘍の形成が確認され、細胞の生着率は良好であった。腫瘍体積の経時変化について、MDA-MB-231-luc-D3H2LN 原発腫瘍体積の増加速度は MDA-MB-231 と比較して著しく速く、高い腫瘍増殖能を示した (**Figure 3-1 a**)。両群間の平均体重の推移は同等であったことから (**Figure 3-1 b**)、腫瘍増殖能の差異は細胞の特性に依存するものであると考察した。

MDA-MB-231-luc-D3H2LN は、ルシフェラーゼ導入 MDA-MB-231 のマウス乳腺組織移植下におけるリンパ節転移腫瘍から樹立されたリンパ節転移好発性株である[13]。高転移性の腫瘍細胞では、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteases,

MMPs) 等の酵素発現が亢進することが、乳がんを含む複数のがん種において報告されている[20]. 中でも MDA-MB-231 においては、これらの酵素発現が原発腫瘍の増殖速度の増加にも寄与することが報告されている[21]. 従って、MDA-MB-231-luc-D3H2LN の高い腫瘍増殖能には、高転移性の獲得に伴う酵素発現レベルの変化が関与している可能性が考えられる.

また、MDA-MB-231-luc-D3H2LN 原発腫瘍については生物発光強度の経時推移についても評価を行った. IVIS を用いた生物発光測定により、原発腫瘍の生物発光強度 (**Figure 3-1 c**) は、腫瘍体積 (**Figure 3-1 a**) と同様に試験期間を通じて漸増することを確認した. 原発腫瘍の増殖性評価において、腫瘍体積と生物発光強度の経時推移が試験後期において乖離し、生物発光強度が低下する事例が報告されている[13,22]. これは、急激な腫瘍の増殖に伴う壊死により、原発腫瘍中心部の生物発光強度が減衰することが原因であると考えられている[22]. **Figure 3-1 a**), および **c**) より、本研究の試験期間 (細胞移植後 56 日間) においては腫瘍体積と生物発光強度の推移は同様であったため、いずれの評価手法も腫瘍増殖の実態を反映していると判断した. 従って、以下の検討においては原発腫瘍の増殖の指標として腫瘍体積を用いることとした.



**Figure 3-1.** Primary tumor growth after orthotopic inoculation of human-derived triple-negative breast cancer cell lines.  $2 \times 10^6$  cells of MDA-MB-231-luc-D3H2LN or MDA-MB-231 were inoculated into the left abdominal mammary gland of female nude mice. Primary tumor growth was measured by a vernier caliper and an *in vivo* imaging system. Results represent the mean  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). a) Comparison of primary tumor growth between MDA-MB-231-luc-D3H2LN and MDA-MB-231. b) Comparison of body weight change between MDA-MB-231-luc-D3H2LN and MDA-MB-231. c) Time course of the bioluminescence signal derived from MDA-MB-231-luc-D3H2LN primary tumor.

### 3.3.2 MDA-MB-231-luc-D3H2L 乳がん同所移植モデルにおける転移形成過程の評価

次に、MDA-MB-231-luc-D3H2LN 乳がん同所移植モデルの原発腫瘍存在下における転移形成について、IVIS を用いて評価した。前項における原発腫瘍の IVIS 測定実施後、直ちに原発腫瘍を遮蔽し露光時間 5 分にて撮像を実施し、転移腫瘍に由来する生物発光の有無を確認した。転移形成を認めたマウスについては、生物発光の検出部位から転移部位を推定し、組織間の発症頻度を比較した (Table 3-1)。

転移形成に由来する生物発光は、細胞移植後 4 週経過時点より検出された。転移の発症頻度は経時的に増加し、試験終了時 (細胞移植後 8 週経過時点) において、8 例中 6 例 (転移形成率 75%) であった。転移形成部位の推移においては、転移形成を示したマウス全例について初発転移部位は腋窩リンパ節であり、MDA-MB-231-luc-D3H2LN の高い腋窩リンパ節指向性が示唆された。初発転移形成後の推移としては、両側の腋窩リンパ節に転移を形成した後に胸腔内臓器への遠隔転移へと進行する傾向を示した。これらの傾向はヒト乳がんにおける転移形成過程とも合致しており [23]、臨床を反映した動物モデルとしての有用性を示唆した。なお、腋窩リンパ節間の選択性に関して、原発腫瘍の形成部位は左腹部であるにも関わらず、右側の腋窩リンパ節が初発転移部位となる個体も見られた。従って、体側両側の腋窩リンパ節に対する選択性に関しては、同移植方法の今後の課題として残されている。

**Table 3-1.** Time course of metastasis formation in mice having MDA-MB-231-luc-D3H2LN orthotopic breast cancer primary tumor.  $2 \times 10^6$  cells of MDA-MB-231-luc-D3H2LN were inoculated into the left abdominal mammary gland of female nude mice. Metastasis formation of the tumor-bearing mice was evaluated by an *in vivo* imaging system.

| days after inoculation (day) | incidence of metastasis | location of metastasis |       |      |             |
|------------------------------|-------------------------|------------------------|-------|------|-------------|
|                              |                         | axillary lymph node    |       |      | other sites |
|                              |                         | left                   | right | both |             |
| 7                            | 0/8                     | 0                      | 0     | 0    | 0           |
| 14                           | 0/8                     | 0                      | 0     | 0    | 0           |
| 21                           | 0/8                     | 0                      | 0     | 0    | 0           |
| 28                           | 2/8                     | 2                      | 0     | 0    | 0           |
| 35                           | 2/8                     | 2                      | 0     | 0    | 0           |
| 42                           | 3/8                     | 1                      | 0     | 2    | 0           |
| 49                           | 5/8                     | 0                      | 2     | 3    | 2           |
| 56                           | 6/8                     | 1                      | 0     | 5    | 2           |

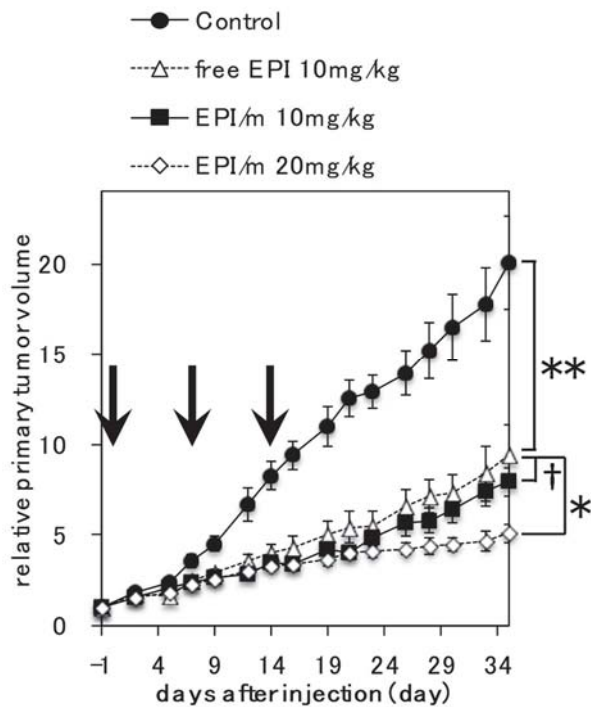
以上の結果より MDA-MB-231-luc-D3H2LN 乳がん同所移植モデルは、ヒト乳がんの転移形成過程を模倣した高選択的 ALNM 発症モデルとして、EPI/m の治療効果の確認に適用可能であると考えられた。その腫瘍形成能に関する知見として、原発腫瘍では高い生着率、および腫瘍増殖速度の均一性を認めたが、初発転移の発症時期については個体間差を認めた。そこで本研究では、各治療標的に対する EPI/m の有効性の評価指標を、原発腫瘍については増殖抑制効果、また ALNM については転移形成の抑制効果とすることとした。具体的な *In vivo* 評価の試験条件について、治療開始時期は ALNM が IVIS にて検出される直前の細胞移植 3 週間経過後とし、EPI/m の投与スケジュールは既報[11]を参考に設定した。なお、上記の試験条件は ALNM の検出が治療実施の基準とならない点で、臨床上的術前化学療法とは適用段階が異なる。この点に関して、ALNM に対する EPI/m の直接的な増殖抑制効果については、モデル作製方法の詳細を含め第 5 章にて議論する。

### 3.3.3 腋窩リンパ節転移形成を伴う MDA-MB-231-luc-D3H2LN 乳がん同所移植モデルに対する EPI/m の治療効果

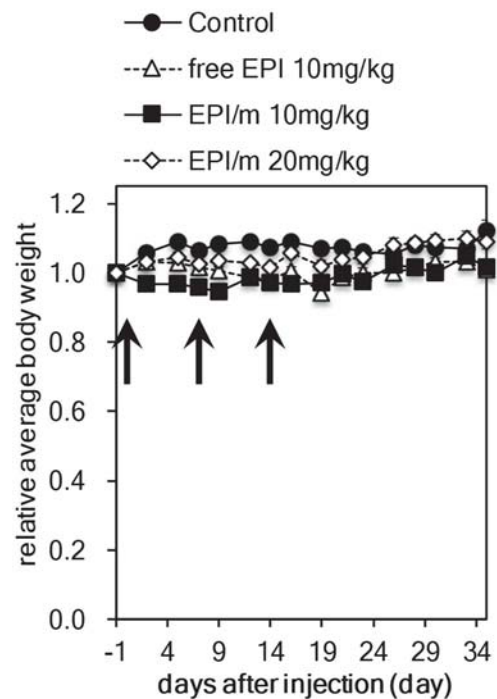
最後に、本章で確立した ALNM 形成を伴う TNBC 同所移植モデルマウスを用いて、EPI/m の原発腫瘍に対する増殖抑制効果と ALNM に対する形成抑制効果を検証した。MDA-MB-231-luc-D3H2LN 細胞移植 3 週間経過後より、10 wt% スクロース溶液（コントロール群）、free EPI 溶液（投与量；10 mg/kg）、もしくは EPI/m 分散液（投与量；EPI 換算として 10 mg/kg、および 20 mg/kg）をマウス尾静脈より 1 週間おきに 3 回投与した。その後、原発腫瘍の増殖推移と ALNM の形成抑制について腫瘍径と IVIS によりそれぞれ評価した（**Figure 3-2**、および **3**）。

原発腫瘍に対する作用として、EPI/m 投与群は 10 mg/kg 投与にて、コントロール群と比較して有意に高い増殖抑制効果を示した（black squares in **Figure 3-2 a**）。さらに 20 mg/kg 投与においては、10 mg/kg 投与と比較して有意に抗腫瘍効果が増強し、用量依存性が確認された（white squares in **Figure 3-2 a**）。平均体重の推移より、薬物投与に伴う明確な体重減少は確認されなかった。したがって、上記の用量依存的な腫瘍増殖抑制効果は EPI/m の薬効に由来すると考えられた（**Figure 3-2 b**）。また、free EPI 投与群は最大耐用量[11]である 10 mg/kg において、同一投与量の EPI/m 投与群と同等の抗腫瘍効果を示した（white triangles in **Figure 3-2 a**）。

a)



b)



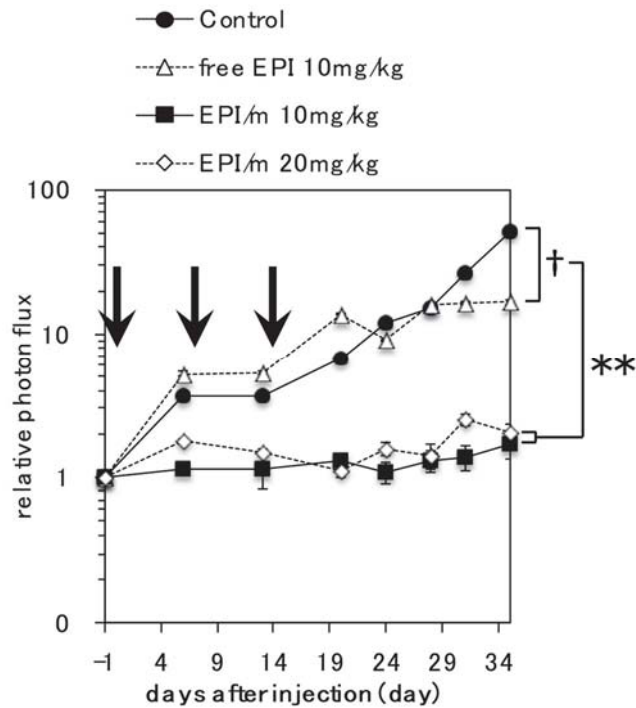
**Figure 3-2.** Inhibitory effect of free EPI or EPI/m on primary tumor growth in MDA-MB-231-luc-D3H2LN orthotopic breast cancer primary tumor model mice. a) Relative orthotopic breast cancer primary tumor growth in mice treated with 10% sucrose (control), free EPI 10 mg/kg, EPI/m 10 mg/kg or EPI/m 20 mg/kg on days 0, 7 and 14 (black arrows). Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=6). † > 0.05, \* < 0.05 and \*\* < 0.01 were determined by two-way ANOVA test. b) Changes in relative average body weight of mice. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n = 6). No significant body weight loss *i.e.* -20 % within 1 week was observed in any of the mice during the experiment.

ALNM 形成に対する作用について、EPI/m は評価したいずれの投与量においてもコントロール群、および free EPI 投与群と比較して ALNM 形成に由来する発光強度の増大を有意に抑制し、著しい転移抑制効果を示した (**Figure 3-3 a**)。free EPI 投与群においてはコントロール群と同様に経時的な発光強度の増大が確認され、転移抑制効

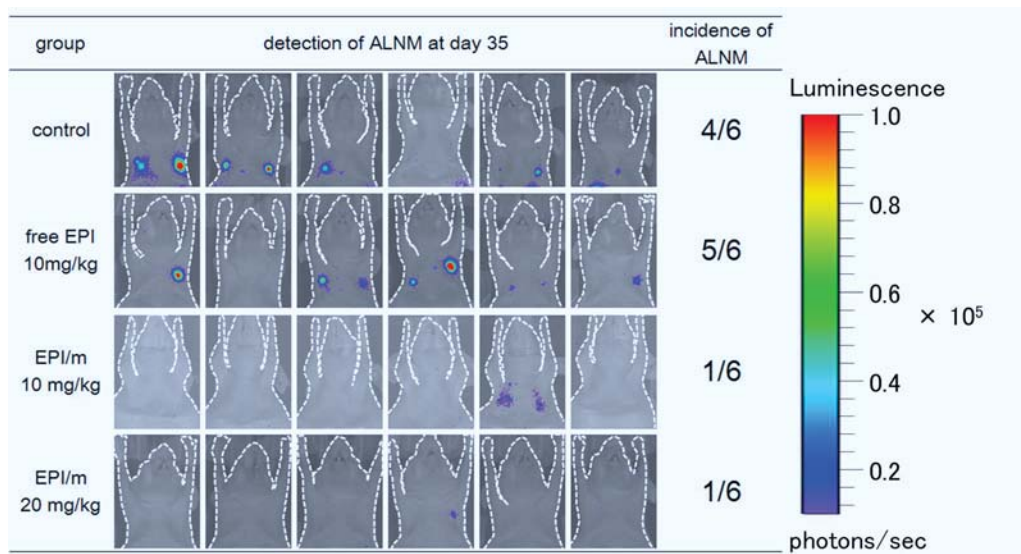
果を認めなかった。さらに、3.3.2 項にて示した ALNM 発症における個体間差を考慮し、評価終了時における IVIS 測定結果より投与群間の転移発症率を比較した (**Figure 3-3 b**)。EPI/m 投与群は、いずれの投与量においてもコントロール群と比較して著しく低い転移発症率を示し、**Figure 3-3 a**) における転移抑制効果を裏付けた。また、free EPI 投与群における転移発症率はコントロール群と同等であり、転移抑制効果を認めなかった。

各治療標的に対する有効性について、原発腫瘍に対する EPI/m の抗腫瘍活性は free EPI と同等であった (**Figure 3-2 a**)。平均体重の推移 (**Figure 3-2 b**) より、EPI/m は free EPI よりもマウスにおける忍容性が高く、最大投与量においては EPI/m の方が free EPI よりも高い抗腫瘍効果を示した (**Figure 3-2 a**)。これは、MDA-MB-231-luc-D3H2LN の親株細胞である MDA-MB-231 に対する抗腫瘍効果[10]を再現する結果であり、TNBC 原発腫瘍に対する EPI/m の有用性を示唆した。一方 ALNM については、free EPI が最大耐用量においても薬効を示さなかったのに対し、EPI/m は free EPI と同一投与量にて有意な転移抑制効果を示した (**Figure 3-3**)。free EPI は、転移腫瘍の治療を目的とした周術期の乳がんにおける標準療法薬の一つであるが[2]、ALNM に対する発症抑制効果、および増殖阻害効果には患者間のばらつきがあり、治療の有効性については議論の余地がある[9]。従って、本章において示された EPI/m の優れた原発腫瘍の増殖抑制効果、および ALNM 形成抑制効果は、乳がんの術前化学療法における奏効率、および治療の確実性を向上し得る新薬としての EPI/m の有用性を示唆する知見であると考えられる。

a)



b)



**Figure 3-3.** Inhibitory effect of free EPI or EPI/m on spontaneous ALNM development. a) Relative average photon flux from spontaneous ALNM in mice treated with 10% sucrose (control), free EPI 10 mg/kg, EPI/m 10 mg/kg or EPI/m 20 mg/kg on days 0, 7 and 14 (black arrows). Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=6). † > 0.05 and \*\* < 0.01 were determined by two-way ANOVA test. b) Bioluminescent images of mice each four treatment groups at day 35.

### 3.4 結論

本章では、EPI/m の乳がん治療における有用性評価の一環として、術前化学療法を模倣した動物モデルを構築し、抗腫瘍効果の検証を試みた。構築した MDA-MB-231-luc -D3H2LN 乳がん同所移植モデルは、原発腫瘍の増殖に伴い選択的かつ高効率に ALNM を形成し、ヒト乳がんにおける転移の様態を反映した動物モデルとしての有用性を示唆した。当該モデルマウスを用いて EPI/m の抗腫瘍効果を評価した結果、EPI/m 投与群はコントロール群と比較して原発腫瘍の増殖と ALNM の形成を用量依存的に抑制した。一方、free EPI 投与群においては、原発腫瘍の増殖抑制効果は確認されたものの、ALNM の形成抑制効果は認めなかった。ALNM の形成抑制効果はミセル投与群特異的に見られる作用であることより、EPI/m は原発腫瘍、および ALNM の双方に有効な新規治療薬として乳がんの術前化学療法において既存薬よりも有用であると考えられた。

### 3.5 参考文献

- [1] M. Khasraw, R. Bell, C. Dang, Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review, *Breast*. 21 (2012) 142–149. doi:10.1016/j.breast.2011.12.012.
- [2] National Comprehensive Cancer Network, Breast Cancer, NCCN Clin. Pract. Guidel. *Oncol.* (2017). doi:10.1093/med/9780199363315.003.0020.
- [3] J.S.D. Mieog, J.A. Van Der Hage, C.J.H. Van De Velde, Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer, *Br. J. Surg.* (2007) 1189–1200. doi:10.1002/bjs.5894.
- [4] J. Anampa, D. Makower, J.A. Sparano, Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: An overview, *BMC Med.* 13 (2015) 1–13. doi:10.1186/s12916-015-0439-8.
- [5] A.U. Buzdar, Preoperative chemotherapy treatment of breast cancer - A review, *Cancer*. 110 (2007) 2394–2407. doi:10.1002/cncr.23083.

- [6] A.M. Chen, F. Meric-Bernstam, K.K. Hunt, H.D. Thames, M.J. Oswald, E.D. Outlaw, E.A. Strom, M.D. McNeese, H.M. Kuerer, M.I. Ross, S.E. Singletary, F.C. Ames, B.W. Feig, A.A. Sahin, G.H. Perkins, N.R. Schechter, G.N. Hortobagyi, T.A. Buchholz, Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy: The M.D. Anderson cancer center experience, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 2303–2312. doi:10.1200/JCO.2004.09.062.
- [7] K. Azzawi, A. Ismail, H. Earl, P. Forouhi, C.M. Malata, Influence of neoadjuvant chemotherapy on outcomes of immediate breast reconstruction, *Plast. Reconstr. Surg.* 126 (2010) 1–11. doi:10.1097/PRS.0b013e3181da8699.
- [8] G.M. Kiebert, J.C. De Haes, C. Van De Velde, The impact of breast-conserving treatment and mastectomy on the quality of life of early-stage breast cancer patients: a review., *J. Clin. Oncol.* 9 (1991) 1059–1070. doi:10.1200/JCO.1991.9.6.1059.
- [9] F. Montemurro, S. Redana, G. Valabrega, M. Aglietta, Controversies in breast cancer: adjuvant and neoadjuvant therapy, *Expert Opin Pharmacother.* 6 (2005) 1055–1072. doi:10.1517/14656566.6.7.1055.
- [10] M. Harada, I. Bobe, H. Saito, N. Shibata, R. Tanaka, T. Hayashi, Y. Kato, Improved anti-tumor activity of stabilized anthracycline polymeric micelle formulation, NC-6300, *Cancer Sci.* 102 (2011) 192–199. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01745.x.
- [11] A. Takahashi, Y. Yamamoto, M. Yasunaga, Y. Koga, J.I. Kuroda, M. Takigahira, M. Harada, H. Saito, T. Hayashi, Y. Kato, T. Kinoshita, N. Ohkohchi, I. Hyodo, Y. Matsumura, NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, extends the antitumor effect and reduces the cardiotoxicity of epirubicin, *Cancer Sci.* 104 (2013) 920–925. doi:10.1111/cas.12153.
- [12] H. Mukai, T. Kogawa, N. Matsubara, Y. Naito, M. Sasaki, A. Hosono, A first-in-

- human Phase 1 study of epirubicin-conjugated polymer micelles (K-912/NC-6300) in patients with advanced or recurrent solid tumors, *Invest. New Drugs*. 35 (2017) 307–314. doi:10.1007/s10637-016-0422-z.
- [13] D.E. Jenkins, Y.S. Hornig, Y. Oei, J. Dusich, T. Purchio, Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice, *Breast Cancer Res*. 7 (2005) R444. doi:10.1186/bcr1026.
- [14] R. Liu, D.M. Gilmore, K.A. V. Zubris, X. Xu, P.J. Catalano, R.F. Padera, M.W. Grinstaff, Y.L. Colson, Prevention of nodal metastases in breast cancer following the lymphatic migration of paclitaxel-loaded expansile nanoparticles, *Biomaterials*. 34 (2013) 1810–1819. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.11.038.
- [15] M. V. Yigit, S.K. Ghosh, M. Kumar, V. Petkova, A. Kavishwar, A. Moore, Z. Medarova, Context-dependent differences in miR-10b breast oncogenesis can be targeted for the prevention and arrest of lymph node metastasis, *Oncogene*. 32 (2013) 1530–1538. doi:10.1038/onc.2012.173.
- [16] J.W. Astin, S.M.F. Jamieson, T.C.Y. Eng, M. V. Flores, J.P. Misa, A. Chien, K.E. Crosier, P.S. Crosier, An in vivo antilymphatic screen in zebrafish identifies novel inhibitors of mammalian lymphangiogenesis and lymphatic-mediated metastasis, *Mol. Cancer Ther*. 13 (2014) 2450–2462. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0469-T.
- [17] E. Lee, S.J. Lee, J.E. Koskimaki, Z. Han, N.B. Pandey, A.S. Popel, Inhibition of breast cancer growth and metastasis by a biomimetic peptide, *Sci. Rep*. 4 (2014) 1–12. doi:10.1038/srep07139.
- [18] L. Shan, X. Zhou, X. Liu, Y. Wang, D. Su, Y. Hou, N. Yu, C. Yang, B. Liu, J. Gao, Y. Duan, J. Yang, W. Li, J. Liang, L. Sun, K. Chen, C. Xuan, L. Shi, Y. Wang, Y. Shang,

- FOXX2 Elicits Massive Transcription Repression and Suppresses the Hypoxic Response and Breast Cancer Carcinogenesis, *Cancer Cell*. 30 (2016) 708–722. doi:10.1016/j.ccell.2016.09.010.
- [19] Y. Li, J.A. Hickson, D.J. Ambrosi, D.L. Haasch, K.D. Foster-Duke, L.J. Eaton, E.L. DiGiammarino, S.C. Panchal, F. Jiang, S.R. Mudd, C. Zhang, S.S. Akella, W. Gao, S.L. Ralston, L. Naumovski, J. Gu, S.E. Morgan-Lappe, Abt-165, a dual variable domain immunoglobulin (dvd-ig) targeting dll4 and vegf, demonstrates superior efficacy and favorable safety profiles in preclinical models, *Mol. Cancer Ther.* 17 (2018) 1039–1050. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0800.
- [20] I. Stamenkovic, Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis, *Semin. Cancer Biol.* 10 (2000) 415–433. doi:10.1006/scbi.2000.0333.
- [21] A.M. Tester, M. Waltham, S.J. Oh, S.N. Bae, M.M. Bills, E.C. Walker, F.G. Kern, W.G. Stetler-Stevenson, M.E. Lippman, E.W. Thompson, Pro-Matrix Metalloproteinase-2 Transfection Increases Orthotopic Primary Growth and Experimental Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells in Nude Mice, *Cancer Res.* 64 (2004) 652–658. doi:10.1158/0008-5472.CAN-0384-2.
- [22] D.B. Mendel, A. Douglas Laird, X. Xin, S.G. Louie, J.G. Christensen, G. Li, R.E. Schreck, T.J. Abrams, T.J. Ngai, L.B. Lee, L.J. Murray, J. Carver, E. Chan, K.G. Moss, J.Ö. Haznedar, J. Sukbuntherng, R.A. Blake, L. Sun, C. Tang, T. Miller, S. Shirazian, G. McMahon, J.M. Cherrington, In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 327–337.
- [23] K.R. Hess, G.R. Varadhachary, S.H. Taylor, W. Wei, M.N. Raber, R. Lenzi, J.L.

Abbruzzese, Metastatic patterns in adenocarcinoma, *Cancer*. 106 (2006) 1624–1633.

doi:10.1002/cncr.21778.

## 第 4 章

術前化学療法を模倣した治療条件  
におけるエピルビシン内包 **pH** 応答性  
高分子ミセルの薬物送達機序  
に関する検討

## 要旨

エピルビシン (epirubicin, EPI) を含むアントラサイクリン系抗がん剤は、低酸素誘導因子の用量依存的な転写阻害作用により転移形成を抑制し得る可能性がある。しかし、この阻害作用の発現には、原発腫瘍内の薬物濃度の持続的な維持が必要であるため、既存の低分子薬物においては当該薬理作用の *in vivo* での実証は困難である。本章では高分子ミセルに期待される腫瘍組織への滞留性に着目し、pH 応答性エピルビシン内包高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle, EPI/m) の MDA-MB-231-luc-D3H2LN 乳がん同所移植モデルにおける原発腫瘍内分布を評価した。その結果、EPI/m は free EPI と比較して、原発腫瘍に対して多量の薬物を高分子結合体として送達するとともに、腫瘍組織内で内包薬物を選択的に活性化することによって長期間にわたり原発腫瘍内の活性成分濃度を維持した。このような動態特性により、EPI/m は原発腫瘍の増殖を効果的に抑制するとともに、効率的かつ安全に原発腫瘍の細胞遊走を阻害し、特異的に腋窩リンパ節転移の形成を抑制することが明らかとなった。

### 4.1 緒言

エピルビシン (epirubicin, EPI) を含むアントラサイクリン系抗がん剤は、高浸潤性乳がんが発現する低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 関連酵素の発現を下方制御することによって腫瘍細胞の遊走を阻害する作用を有する[1]。この作用はアントラサイクリン系抗がん剤による転移抑制に寄与すると考えられているが、*in vivo* では未だに実証されていない[2,3]。また、重篤な心機能への影響が懸念されるため、既存製剤では転移抑制に必要な高用量の頻回投与を実施できない状況である[2]。従って、アントラサイクリン系抗がん剤の転移抑制効果を *in vivo* において実証するためには、原発腫瘍への選択的な薬物送達方法の確立が不可欠である。

高分子ミセルは Enhanced Permeability and Retention effect (EPR 効果) [4]により, 固形がん組織に対して選択的かつ持続的に薬物を送達することが可能であり[5-7], 上記に示した活性成分の送達性に起因する課題を解決し得る可能性がある. 実際に, Makino らは(*trans*-1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt) を内包した高分子ミセルを用いて, 原発腫瘍からの細胞遊走阻害によるリンパ節転移抑制作用を実証している[8]. 当該研究における高分子ミセルの細胞遊走阻害効果は, 高分子鎖末端に結合した標的指向性分子 (cyclic Arg-Gly-Asp, cRGD) と内包薬物の組み合わせにより発現する効果であり, 高分子ミセルの原発腫瘍への集積性向上が薬効発現の機序と推定されている[8].

第3章において, pH 応答性 EPI 内包高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle, EPI/m) は, 術前化学療法を模倣したトリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) の同所移植モデルにおいて原発腫瘍に対する増殖抑制効果を示すとともに, 腋窩リンパ節転移 (axillary lymph node metastasis, ALNM) の形成を抑制している. 特に EPI/m による ALNM 形成の抑制は free EPI には見られない作用であり, 乳がんの術前化学療法における重要な知見である. 上述した研究背景より EPI/m による ALNM の形成抑制には, EPR 効果による原発腫瘍への持続的な薬物の集積による細胞遊走阻害が関与すると考えられる. さらに, 固形腫瘍の間質 pH は高い代謝要求がもたらす好氣的解糖と乳酸産生により pH 6.5-7.2 の弱酸性を示すことが知られている[9,10]. そのため EPI/m においては, 酸性環境をトリガーとした選択的薬物放出により原発腫瘍内の活性成分濃度を維持する効果についても期待される.

そこで本章では, EPI/m の特異的な ALNM 形成抑制効果の機序を考究するために原発腫瘍に対する集積の選択性と腫瘍組織内での薬物放出挙動について検証した. 具体的な方法としては, 第3章で作製した TNBC 同所移植モデルマウスを用いて EPI/m

の血漿中濃度，および原発腫瘍内濃度の経時変化を評価した．また，ミセルから漏出した遊離 EPI の濃度を測定し，腫瘍内における活性化薬物の濃度推移を評価した．さらに，原発腫瘍集積後における高分子ミセルの腫瘍周辺酸性環境への暴露を検証するため，蛍光標識した EPI/m の原発腫瘍内における分布を観察した．

## 4.2 実験

### 4.2.1 試薬

ウシ血清アルブミン (fetal bovine serum, FBS), Hoechst 33342, および Alexa Fluor™ 647 N-hydroxysuccinimidyl ester (Alexa 647 NHS ester), は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した．Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した．DyLight 488 conjugated tomato lectin は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) から購入した．Matrigel basement membrane matrix (マトリゲル) は Corning (Corning, NY, USA) から購入した．VivoGlo ルシフェリンは Promega (Madison, WI, USA) から購入した．その他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した．

### 4.2.2 細胞および実験動物

ヒト由来 TNBC 細胞株である MDA-MB-231 のリンパ節転移好発性ルシフェラーゼ発現株である MDA-MB-231-luc-D3H2LN は, PerkinElmer (Waltham, MA, USA) から購入した．また, MDA-MB-231 の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) 発現株である MDA-MB-231/GFP は, Cell Biolabs (San Diego, CA, USA) から購入した．いずれの細胞株も 10 %FBS 含有 RPMI1640 培地中, 5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下, 37 °C にて培養した．BALB/C ノードマウス (遺伝子型 BALB/C nu/nu ; 雌 ; 入手時 4 週齢)

は Charles River Japan (Kanagawa, Japan) より購入し, 1 週間の馴化期間を経た後に実験に供した. 全ての動物実験は, ナノ医療イノベーションセンター (Kawasaki, Japan), もしくは東京大学 (Tokyo, Japan) における動物委員会の承認下において実施した.

### 4.2.3 高分子ミセルの調製

本章において使用した EPI/m は第 2 章に示す手法にて調製した. *In vivo* 評価における投与液は, EPI 換算として 2 mg/mL の 10 wt%スクロース分散液を stock solution とし, 投与開始前日のマウスの平均体重を基準として用事調製した. その際, 希釈液には 10 wt%スクロース水溶液を用いた. 尚, 実験期間中, stock solution は $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した. また, Alexa 647 標識 EPI/m は *N* 末端に蛍光色素を導入した PEG-*b*-poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) (PEG-*b*-PBLA) を用いて調製した[11]. 以下に蛍光色素導入反応の概略を示す. PEG-*b*-PBLA を脱水ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) に溶解した後, 高分子に対して 1/6 当量の Alexa 647 NHS ester を添加し,  $50^{\circ}\text{C}$ にて 3 時間攪拌した. 得られた溶液をゲルろ過 (充填剤: sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich), カラム口径: 2 cm, 充填剤高さ: 15 cm, 溶離液: メタノール) にて粗精製し, 未反応の Alexa 647 NHS ester を除去した. カラムより溶出した高分子画分をさらに室温にて 2 日間透析精製 (透析膜: Spectra/Por Regenerated Cellulose Membrane1, molecular cut off: 6,000-8,000 Da, 外液: メタノール/精製水) した後, 内液を凍結乾燥して Alexa 647 標識 PEG-*b*-PBLA を得た.

Alexa 647 標識 PEG-*b*-PBLA へのヒドラジド基の導入, および EPI との結合については第 2 章に記載する方法に従い合成と物性評価を行った. また, Alexa 標識 EPI/m は蛍光標識高分子と未標識高分子をモル比 1/1 にて混合した後, 第 2 章に示す手順に従いミセルを調製し物性評価を行った.

#### 4.2.4 乳がん同所移植モデルマウスの作製

MDA-MB-231-luc-D3H2LN を用いたTNBC同所移植モデルマウスは第3章に示す手法にて作製した。また，Alexa 647標識EPI/mの腫瘍組織内における微小分布の確認を目的として，MDA-MB-231/GFPについても第3章と同様の手順にてTNBC同所移植モデルマウスを作製した。

#### 4.2.5 血漿および原発腫瘍中のエピルビシン濃度推移の評価

BALB/C ノードマウス（雌；16-21 g/body；移植時 5 週齢）の左腹部乳腺組織に MDA-MB-231-luc-D3H2LN の細胞懸濁液（ $2 \times 10^6$  cells/50  $\mu$ L）を移植した。マウスは移植より 20 日間経過した後，腫瘍体積を基準として 2 群に分けた（各群 15 匹）。群分け翌日に，EPI 換算として 25 mg/kg の free EPI 溶液，もしくは EPI/m 分散液を尾静脈投与した。投与から 1，8，24，48，96 時間経過後において，血液と原発腫瘍を採取した。採材組織の前処理として，血液については遠心分離（遠心力：5,000g，時間：5 分，温度：4°C）後に上清（血漿）を回収した。原発腫瘍については，組織重量に対して 3 倍量の Dulbecco's phosphate-buffered saline（D-PBS（-））を添加した後，ビーズ式粉碎機処理により組織をホモジナイズした。さらに得られた組織破砕液を遠心分離（遠心力：5,000g，時間：5 分，温度：4°C）し上清を回収した。得られた上清について，ミセルから遊離した EPI 濃度（released EPI）と，released EPI に高分子結合 EPI を含めた総 EPI 濃度（total EPI）をそれぞれ異なる試料調製処理により定量した。released EPI の定量においては，上清 50  $\mu$ L に対しアセトニトリル 125  $\mu$ L，1 v/v% Triton X-100/D-PBS(-)溶液 25 $\mu$ L を添加し，ボルテックス処理を行った。その後，遠心分離（遠心力：5,000g，時間：5 分，温度：4°C）し，上清 75  $\mu$ L を回収した。これを 2  $\mu$ g/mL ダウノルビシン塩酸塩/20 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）溶液 75  $\mu$ L と混合して試料溶液とし

た. total EPI の定量においては, 上清 50  $\mu\text{L}$  に対してアセトニトリル 130  $\mu\text{L}$ , 1N 塩酸 20  $\mu\text{L}$  を添加し, 室温にて 1 時間インキュベートした. 次に 1 v/v% Triton X-100/D-PBS(-)溶液 25 $\mu\text{L}$  を添加し, ボルテックス処理を行った後, 遠心分離(遠心力:5,000g, 時間:5分, 温度:4 $^{\circ}\text{C}$ )にて上清 75  $\mu\text{L}$  を回収した. これを 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ダウノルビシン塩酸塩/25 mM ぎ酸緩衝液 (pH 3.0) 溶液 75  $\mu\text{L}$  と混合して試料溶液とした. 別に EPI $\cdot$ HCl 約 5 mg を精密に量り, 移動相を加えて溶かし, 正確に 100 mL とした. この液 2 mL を正確にとり, 移動相で正確に 50 mL として標準溶液とした. 試料溶液, および標準溶液 50  $\mu\text{L}$  につき逆相液体クロマトグラフィー (reversed phase liquid chromatography, RPLC) 測定を行い, EPI のピーク面積とダウノルビシン塩酸塩のピーク面積をそれぞれ求めた後, その面積比を用いて下式より組織中の EPI 量を算出した. なお, free EPI 投与群については total EPI と同様の試料処理手順にて試料溶液を調製した.

血漿中の対投与量換算 released EPI 量 (% dose/mL)

$$= [\text{EPI} \cdot \text{HCl の秤取量 (mg)} ] / 2,500 \times (\text{試料溶液のピーク面積比}) / (\text{標準溶液のピーク面積比}) \times 4/5$$

血漿中の対投与量換算 total EPI 量 (% dose/mL)

$$= [\text{EPI} \cdot \text{HCl の秤取量 (mg)} ] / 2,500 \times (\text{試料溶液のピーク面積比}) / (\text{標準溶液のピーク面積比}) \times 4.5/5$$

原発腫瘍中の対投与量換算 released EPI 量 (% dose/g organ)

$$= [\text{EPI} \cdot \text{HCl の秤取量 (mg)} ] / 2,500 \times (\text{試料溶液のピーク面積比}) / (\text{標準溶液のピーク面積比}) \times 4 \times (\text{D-PBS(-)による組織破碎液の希釈率}) / 5$$

原発腫瘍中の対投与量換算 released EPI 量 (% dose/g organ)

= [EPI・HCl の秤取量 (mg) ] / 2,500 × (試料溶液のピーク面積比) / (標準溶液のピーク面積比) × 4.5 × (D-PBS(-)による組織破碎液の希釈率) / 5

[RPLC 測定条件]

検出器 : 蛍光分光光度計 (励起波長 : 488 nm, 蛍光波長 : 560 nm)

カラム : TSK-GEL ODS-100V (TOSOH)

カラム温度 : 40 °C

移動相 : アセトニトリル/25 mM ギ酸緩衝液 (pH3.0) 混液 (3/7)

#### 4.2.6 Alexa 647 標識 EPI/m の原発腫瘍内分布の観察

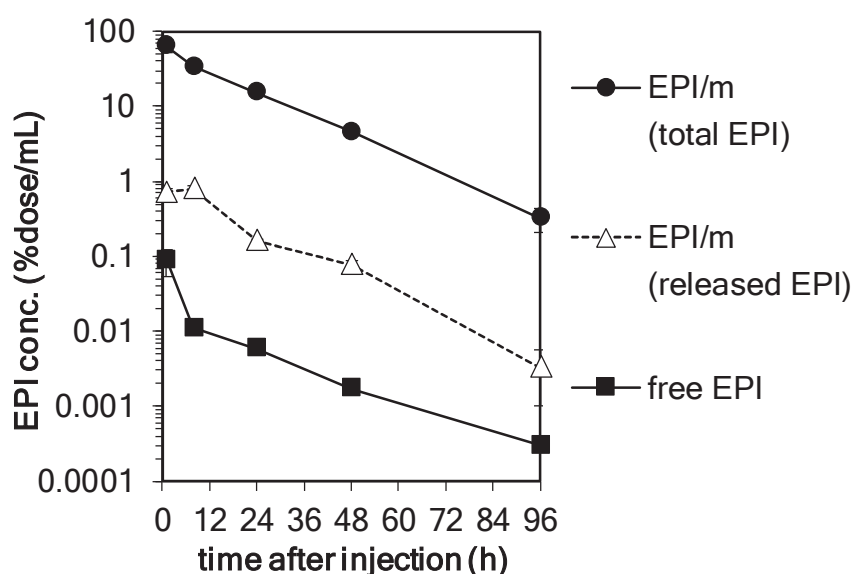
BALB/C ノードマウス (雌; 16-21 g/body; 移植時 5 週齢) の左腹部乳腺組織に MDA-MB-231-luc-D3H2LN, もしくは MDA-MB-231/GFP の細胞懸濁液 ( $2 \times 10^6$  cells/50  $\mu$ L) を移植し 3 週間経過した後に, EPI 換算として 50 mg/kg の Alexa 647 標識 EPI/m 分散液を尾静脈投与した. 投与後 24 時間経過時点において, イソフルラン麻酔下放血致死によりマウスを安楽死処置し, 原発腫瘍を採取した. その際, DyLight 488 conjugated tomato lectin と Hoechst 33342 との 1/1 混液を臓器摘出の 30 分前に投与し, 腫瘍血管, および細胞核を染色した. その後, 摘出した原発腫瘍を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy, CLSM, Nikon A1R, および ECLIPSE FN1 ; Nikon, Tokyo, Japan) にて観察した. Alexa647 標識 EPI/m, DyLight 488 conjugated tomato lectin, および Hoechst 33342 は, それぞれ波長 640, 489, および 404 nm のレーザーにより励起し, 662.5–737.5, 500–550, および 425–475 nm のバンドパスフィルターを用いて蛍光を検出した.

## 4.3 結果および考察

### 4.3.1 EPI/m の血漿および原発腫瘍中濃度推移

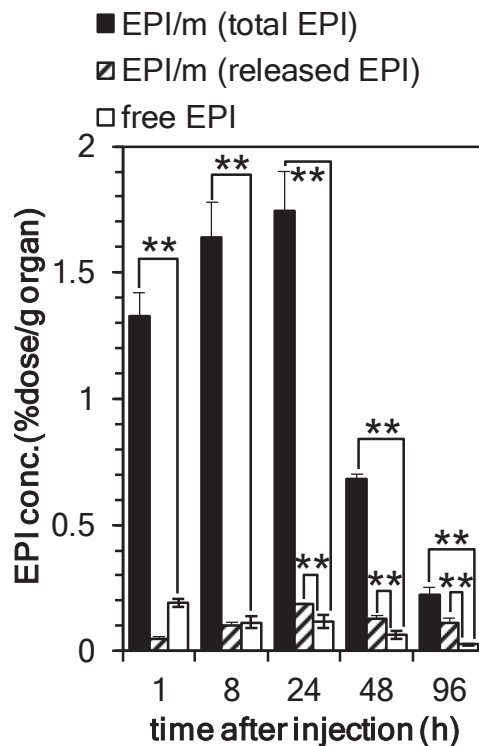
EPI/m は EPR 効果による原発腫瘍への選択的な集積に加え、腫瘍周辺の酸性環境をトリガーとした選択的薬物放出により標的組織内の活性成分濃度を維持すると期待される。本章では、このような EPI/m の動態特性について TNBC 同所移植モデルマウスを用いて検証した。はじめに、TNBC 同所移植モデルマウスにおける薬物の血漿中濃度推移を評価した。EPI 換算として 25 mg/kg の free EPI 溶液、もしくは EPI/m 分散液を尾静脈投与し、1, 8, 24, 48, 96 時間経過時点において血液を採取した。血漿中 EPI 濃度は RPLC を用いて定量した。EPI/m に関しては、動物投与後に想定される EPI の存在状態として、ミセルから遊離した EPI と高分子に結合した EPI の 2 種類が想定される。本研究ではミセルからの薬物放出の選択性について考究するため、第 2 章と同様に EPI/m から遊離した EPI 濃度 (released EPI) と released EPI に高分子結合 EPI を含めた総 EPI 濃度 (total EPI) をそれぞれ異なる試料調製処理により定量した (Figure 4-1)。

薬物の血漿中濃度推移において、free EPI (squares in Figure 4-1) は血中から速やかに消失したのに対し、total EPI (circles in Figure 4-1) は投与後 96 時間にわたり緩やかな減少推移を示した。さらに、ミセルから漏出した released EPI (triangles in Figure 4-1) の濃度は、total EPI よりも極めて低値を推移した。従って、EPI/m は血中循環中において担持薬物の遊離を最小限に抑制していることが示唆された。



**Figure 4-1.** Plasma clearance of EPI in mice having orthotopic breast cancer primary tumor at 1h, 8h, 24h, 48h and 96h after injection of EPI/m or free EPI at 25 mg/kg on an EPI basis. For EPI/m, both of total drug concentration (released drug and polymer conjugated drug in micelle, total EPI) and released drug from micelle (released EPI) were quantified. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=3).

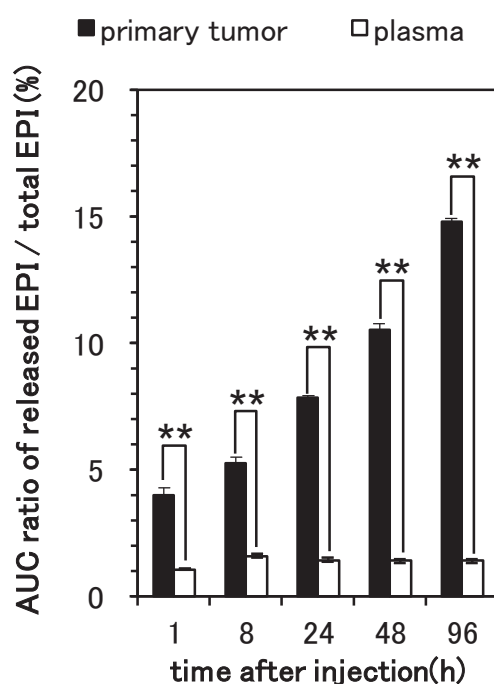
次に、原発腫瘍における薬物の集積傾向を評価した。血液採取と同時点において原発腫瘍を摘出し、組織破碎、除タンパク処理の過程を経て薬物を抽出した。EPI濃度の定量にはRPLCを用いた（**Figure 4-2**）。EPI/m投与群において、腫瘍に集積したEPIの総量（black bars in **Figure 4-2**）は、free EPI（white bars in **Figure 4-2**）と比較して全ての評価時点において有意に高値であった。一方、EPI/mから遊離したEPIの腫瘍内濃度（diagonally striped bars in **Figure 4-2**）は投与後24時間にかけて経時的に上昇した。また、24時間から96時間にかけては、total EPIが顕著な減少傾向を示したにも関わらず、概ね一定の濃度を推移した。さらに、released EPIの腫瘍内濃度は24時間から96時間にかけてfree EPIと比較して有意に高値を示した。



**Figure 4-2.** EPI concentration in orthotopic breast cancer primary tumor resected 1h, 8h, 24h, 48h and 96h after injection of EPI/m or free EPI at 25 mg/kg on an EPI basis. For EPI/m, both of total drug concentration (released drug and polymer conjugated drug in micelle, total EPI) and released drug from micelle (released EPI) were quantified. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=3). \*\* < 0.01 was determined by Student's *t*-test.

以上の結果より，EPI/m は free EPI と比較して，高い血中滞留性と腫瘍集積性を示し，EPR 効果による組織選択的な薬物送達能を有することが示唆された．これは，第 3 章において示した EPI/m の原発腫瘍に対する増殖抑制効果を裏付ける知見である．また，released EPI の組織中濃度は，血漿中では total EPI の減少と相関する推移を示したのに対し，原発腫瘍中では経時的に上昇し，長時間一定の濃度を維持した．この挙動は，EPI/m が腫瘍において選択的に内包薬物を放出している可能性を示唆している．そこで，腫瘍内でのミセルからの薬物放出の選択性を検証するため，各測定時点までの released EPI と total EPI の時間曲線下面積（area under the concentration-curve, AUC）

比を解析し，組織間の推移を比較した（**Figure 4-3**）．その結果，血漿中での AUC 比は常に 1%前後を推移し，ミセルからの EPI の遊離が抑制されていることが明らかとなった．一方，原発腫瘍内の AUC 比は経時的に増加し，血漿中と比較して全ての時点において有意に高値を示した．このような組織間の差異は，EPI/m が腫瘍内の酸性環境において選択的に内包薬物を放出する可能性を示唆している．

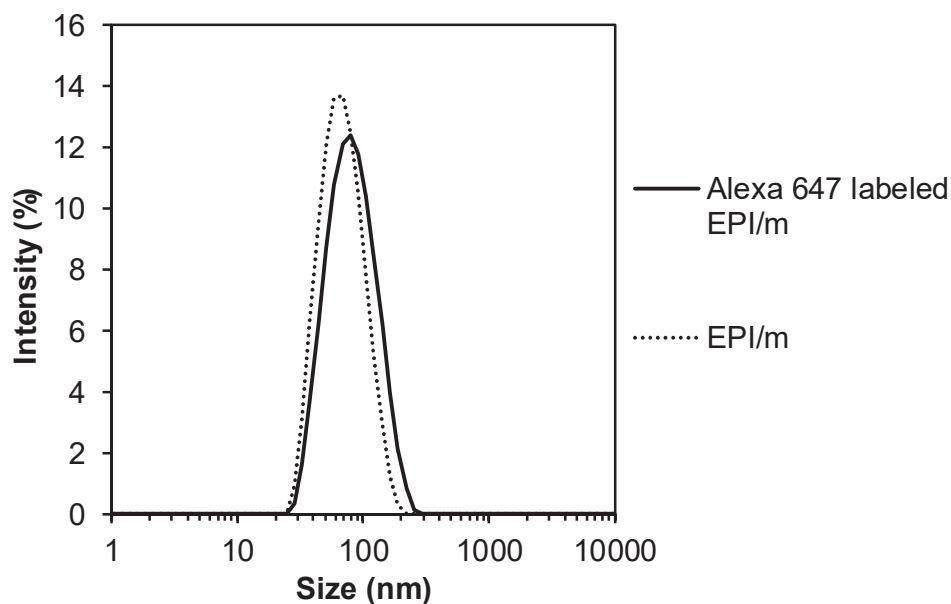


**Figure 4-3.** Changes in the area under the concentration-curve (AUC) ratio of release EPI and total EPI from EPI/m in primary tumor or plasma. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=3). \*\*< 0.01 was determined by Student's *t*-test.

### 4.3.2 Alexa 647 標識 EPI/m の調製

さらに、腫瘍組織内における EPI/m の微小分布について共焦点顕微鏡を用いて観察した。EPI/m は内包薬物に由来する蛍光を指標として組織内分布を観察可能であるが [12]、その励起/蛍光波長域は組織の自家蛍光と重複するため [13]、組織観察における特異性が低い。そこで本実験では、EPI 結合ブロック共重合体を Alexa 647 を用いて蛍光標識して Alexa 647 標識 EPI/m を調製した。

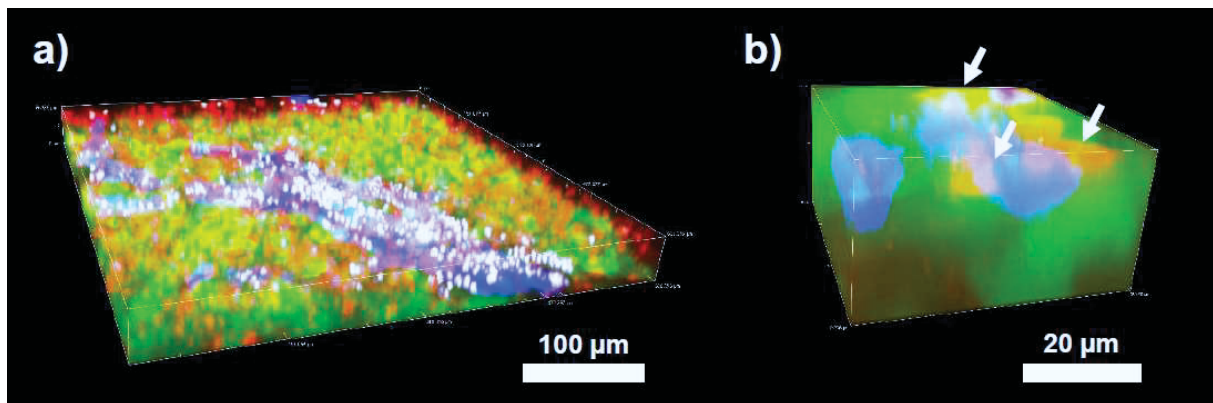
蛍光標識に伴う EPI/m の物性への影響については、高分子の EPI 含量とミセルの粒子径から検証した。高分子の EPI 含量は RPLC を用いて評価した。0.1N 塩酸中にて高分子から EPI を完全に遊離した後、溶液中の EPI 濃度を定量した。その結果、高分子中の EPI 含量は 14 wt% であり、未標識高分子の値 (20 wt%, 第 2 章参照) と比較して低下した。EPI の結合反応は、薬物結合高分子の合成経路における最終工程であるため、Alexa 647 の立体障害による影響を受けた可能性が考えられる。また、ミセルの粒子径を動的光散乱法 (dynamic light scattering, DLS) により評価した。評価の結果、得られた Alexa 647 標識 EPI/m の Z 平均粒子径は 53 nm (PDI=0.13) であり、未標識高分子の値 (55 nm, PDI=0.09) と同等であった (Figure 4-4)。以上の結果より、EPI 含量の低下に伴う高分子の会合特性への影響は軽微であると判断し、得られた Alexa 647 標識 EPI/m を用いて腫瘍組織内におけるミセルの微小分布を観察した。



**Figure 4-4.** Size distribution of Alexa 647 labeled EPI/m determined by dynamic light scattering measurement (Laser wavelength: 633 nm; temperature: 25 °C).

### 4.3.3 Alexa 647 標識 EPI/m の原発腫瘍内微小分布

前項において得られた Alexa 647 標識 EPI/m を用いて、TNBC 同所移植モデルマウスの原発腫瘍におけるミセルの微小分布を検証した。まず、腫瘍組織に対するミセルの送達性を確認するため、MDA-MB-231/GFP を移植したマウスに対して Alexa 647 標識 EPI/m を投与し、投与 24 時間後における摘出腫瘍を CLSM にて観察した。その際、Hoechst 33342 を臓器摘出 30 分前に投与し、細胞核を染色した (**Figure 4-5**)。その結果、Alexa 647 標識 EPI/m に由来する赤色蛍光は、緑色蛍光にて示される腫瘍組織の内部に均一に観察され、EPI/m の腫瘍組織への分布を示唆した (**Figure 4-5 a**)。さらに高倍率測定においては、Alexa 647 標識 EPI/m 由来蛍光と腫瘍細胞由来蛍光の重複が観察され、EPI/m の腫瘍血管漏出を経た腫瘍細胞への送達を示唆した (arrows in **Figure 4-5 b**)。)

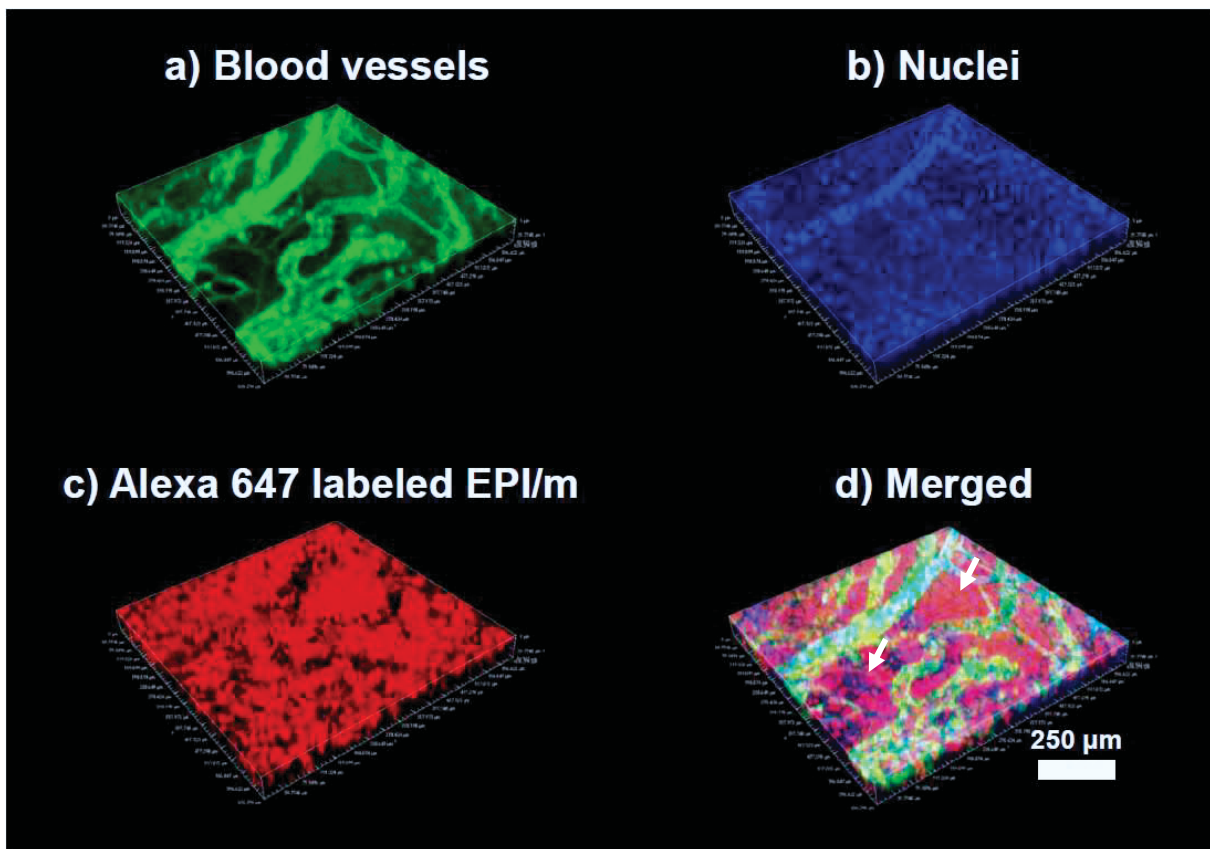


**Figure 4-5.** Fluorescence microscopic images of the orthotopic breast cancer primary tumor excised from the mouse 24 h after injection of Alexa 647 labeled EPI/m (red). Tumor cells were visualized by using of a green fluorescence protein expressing cell line (MDA-MB-231/GFP, green). The cell nuclei (blue) were stained with an injection of Hoechst 33342. Confocal images showing the distribution of Alexa 647 labeled EPI/m a) in tumor tissue and b) around tumor cells.

さらに、腫瘍血管漏出後の分布について考察するため、MDA-MB-231-luc-D3H2LN を移植したマウスについても同様の試験条件にて Alexa 647 標識 EPI/m の原発腫瘍内分布を観察した。その際、DyLight 488 conjugated tomato lectin と Hoechst 33342 との 1/1 混液を臓器摘出の 30 分前に投与し、腫瘍血管と細胞核を染色した (**Figure 4-6**)。その結果、Alexa 647 標識 EPI/m に由来する赤色蛍光 (**Figure 4-6 c**) は近傍の腫瘍血管 (**Figure 4-6 a**) から 100 µm 程度離れた組織内部においても観察され、EPI/m の高い組織浸透性を示唆した (arrows in **Figure 4-6 d**)。この点に関して、free EPI のエピマーであるドキシソルビシンは血管壁細胞への急速な取り込みにより、組織内部への浸透性は指数関数的に減衰することが知られている[13,14]。従って、EPI/m は free EPI と比較して、薬物の微小分布においても優れた送達性を有すると考えられる。

EPI/m の微小分布と内包薬物の放出性との関連性について、MDA-MB-231 皮下腫瘍

組織の細胞外 pH は 6.8 まで低下していることが核磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging, MRI) により実証されている[15,16]. また, 腫瘍内部の間質 pH は一般的に血管からの距離と相関して低下することが知られている[17]. 従って, EPI/m の腫瘍組織深部に至る均一な分布は, 酸性環境への暴露とそれに応じた薬物放出の促進を示唆している.



**Figure 4-6.** Fluorescence microscopic images of the orthotopic breast cancer primary tumor excised from the mouse 24 h after injection of Alexa 647 labeled EPI/m (red). Perfused blood vessels (green) and the cell nuclei (blue) were stained with an injection of DyLight 488 conjugated tomato lectin and Hoechst 33342, respectively. Confocal images showing a) Blood vessels, b) Nuclei, c) Alexa 647 labeled EPI/m and d) a merged image of a), b) and c).

#### 4.3.4 考察

本章では、EPI/m の原発腫瘍に対する内包薬物の送達性について TNBC 同所移植モデルマウスを用いて検証した。その結果、EPI/m は free EPI と比較して、原発腫瘍に対して多量の薬物を高分子結合体として送達するとともに、腫瘍組織内で内包薬物を選択的に活性化することによって、長期間にわたり原発腫瘍内の活性成分濃度を維持することを実証した。このような EPI/m の動態特性は、原発腫瘍への高い抗腫瘍効果と毒性軽減による投与量の増大へ寄与するとともに、細胞遊走の阻害による ALNM の形成抑制にも貢献すると考えられる。

がんの転移抑制における主な治療標的は、原発腫瘍細胞の血管外遊走や浸潤に関わる因子である[18]。中でも HIF やその関連因子については転移形成との因果関係が指摘されており[19,20]、MDA-MB-231 を含む高浸潤性乳癌においては HIF により発現誘導される lysyl oxidase (LOX) の関与が知られている[3,21]。アントラサイクリン系抗がん剤は、HIF の転写阻害によりこれらの HIF 関連因子の発現を抑制し、原発腫瘍細胞の遊走を阻害する効果を有する[1-3]。この転写阻害作用は、*in vitro* では極めて低濃度 (0.2  $\mu\text{M}$  以上) で確認されるが、転移抑制には脈管新生と細胞浸潤の持続的な阻害が必要となるため、*in vivo* では原発腫瘍内の薬物濃度を持続的に維持することが必要となる[2]。先行研究では、低分子薬物の 5 日間連続投与により HIF 関連因子の発現抑制を確認しているが、薬物の全身性の分布がもたらす重篤な心毒性に伴い転移抑制効果の確認には至っていない[2]。

一方、EPI/m は単回投与において活性成分の原発腫瘍内濃度を 3 日以上にわたり一定に維持した (Figure 4-2)。その腫瘍内濃度は free EPI と比較して有意に高値であり、対投与量換算として約 0.1 %dose/g organ であった。これは、EPI/m の薬効発現用量である 10 mg/kg においては約 0.3  $\mu\text{M}$  に相当し、アントラサイクリン系抗がん剤の転写阻害作用が見込まれる薬物濃度と相関する。従って EPI/m は、低分子薬物の連日投与

と同様に、長期間にわたり原発腫瘍に活性成分を供給することによって効率的かつ安全に原発腫瘍の細胞遊走を阻害し、ALNMの形成を抑制したと考えられる。

#### 4.4 結論

本章では、EPI/mの特異的なALNM形成抑制の機序に関する考察の一環として、原発腫瘍に対する集積の選択性、並びに腫瘍組織内での薬物放出挙動について検証した。組織内薬物濃度の定量結果より、EPI/mはfree EPIと比較して、原発腫瘍に対して多量の薬物を高分子結合体として送達するとともに、腫瘍組織内で内包薬物を選択的に放出することによって、長期間にわたり原発腫瘍内の活性成分濃度を維持した。このようなEPI/mの動態特性は、原発腫瘍の増殖抑制効果に加えて、細胞遊走の阻害によるALNMの形成抑制効果にも貢献していると考えられる。すなわちEPI/mは、内包薬物の放出性を生体内で時空間的に制御することで、アントラサイクリン系抗がん剤の潜在的な薬理作用を、効率的かつ安全に発現させる可能性を有することが示唆された。

#### 4.5 参考文献

- [1] B. Onnis, A. Rapisarda, G. Melillo, Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 2780–2786. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00876.x.
- [2] K. Lee, D.Z. Qian, S. Rey, H. Wei, J.O. Liu, G.L. Semenza, Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 2353–2358. doi:10.1073/pnas.0812801106.
- [3] T. Tanaka, J. Yamaguchis, K. Shojis, M. Nangakus, Anthracycline inhibits recruitment

- of hypoxia-inducible transcription factors and suppresses tumor cell migration and cardiac angiogenic response in the host, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 34866–34882. doi:10.1074/jbc.M112.374587.
- [4] Y. Matsumura, H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Res.* 46 (1986) 6387–6392. doi:10.1021/bc100070g.
- [5] N. Nishiyama, K. Kataoka, Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 630–648. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.05.006.
- [6] H. Cabral, K. Kataoka, Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies, *J. Control. Release.* 190 (2014) 465–476. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.042.
- [7] H. Cabral, K. Miyata, K. Osada, K. Kataoka, Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications, *Chem. Rev.* 118 (2018) 6844–6892. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00199.
- [8] J. Makino, H. Cabral, Y. Miura, Y. Matsumoto, M. Wang, H. Kinoh, Y. Mochida, N. Nishiyama, K. Kataoka, cRGD-installed polymeric micelles loading platinum anticancer drugs enable cooperative treatment against lymph node metastasis, *J. Control. Release.* 220, Part (2015) 783–791. doi:10.1016/j.jconrel.2015.10.017.
- [9] B.A. Webb, M. Chimenti, M.P. Jacobson, D.L. Barber, Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression, *Nat. Rev. Cancer.* 11 (2011) 671–677. doi:10.1038/nrc3110.
- [10] C. Corbet, O. Feron, Tumour acidosis: From the passenger to the driver's seat, *Nat. Rev. Cancer.* 17 (2017) 577–593. doi:10.1038/nrc.2017.77.
- [11] R. Taniguchi, Y. Miura, H. Koyama, T. Chida, Y. Anraku, A. Kishimura, K.

- Shigematsu, K. Kataoka, T. Watanabe, Adequately-Sized Nanocarriers Allow Sustained Targeted Drug Delivery to Neointimal Lesions in Rat Arteries, *Mol. Pharm.* 13 (2016) 2108–2116. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00219.
- [12] J. Lankelma, H. Dekker, R.F. Luque, S. Luykx, K. Hoekman, P. Van Der Valk, P.J. Van Diest, H.M. Pinedo, Doxorubicin gradients in human breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 1703–1707.
- [13] A.J. Primeau, A. Rendon, D. Hedley, L. Lilge, I.F. Tannock, The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 8782–8788. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1664.
- [14] A.I. Minchinton, I.F. Tannock, Drug penetration in solid tumours, *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 583–592. doi:10.1038/nrc1893.
- [15] R.J. Gillies, N. Raghunand, G.S. Karczmar, Z.M. Bhujwalla, MRI of the tumor microenvironment, *J. Magn. Reson. Imaging.* 16 (2002) 430–450. doi:10.1002/jmri.10181.
- [16] L.Q. Chen, E.A. Randtke, K.M. Jones, B.F. Moon, C.M. Howison, M.D. Pagel, Evaluations of Tumor Acidosis Within In Vivo Tumor Models Using Parametric Maps Generated with AcidoCEST MRI, *Mol. Imaging Biol.* 17 (2015) 488–496. doi:10.1007/s11307-014-0816-2.
- [17] G. Helmlinger, Y. Fan, M. Dellian, R.K. Jain, Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation, *Nat. Med.* 3 (1997) 177–182. doi:10.1038/nm0297-177.
- [18] P.S. Steeg, Targeting metastasis, *Nat. Rev. Cancer.* 16 (2016) 201–218. doi:10.1038/nrc.2016.25.
- [19] G.L. Semenza, Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 721–

732. doi:10.1038/nrc1187.

- [20] V. Petrova, M. Annicchiarico-Petruzzelli, G. Melino, I. Amelio, The hypoxic tumour microenvironment, *Oncogenesis*. 7 (2018). doi:10.1038/s41389-017-0011-9.
- [21] C.C.-L. Wong, D.M. Gilkes, H. Zhang, J. Chen, H. Wei, P. Chaturvedi, S.I. Fraley, C.-M. Wong, U.-S. Khoo, I.O.-L. Ng, D. Wirtz, G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 16369–16374. doi:10.1073/pnas.1113483108.

## 第 5 章

術後化学療法を模倣した治療条件  
におけるエピルビシン内包 **pH** 応答性  
高分子ミセルの抗腫瘍効果に関する検討

## 要旨

腋窩リンパ節転移 (axillary lymph node metastasis, ALNM) は、原発腫瘍切除後における乳がんの重要な治療標的であり、術後化学療法を中心とした集学的な治療が行われている。しかし、難治性のトリプルネガティブ乳がん (triple-negative breast cancer, TNBC) においては、治療効果に患者間差が散見されるアントラサイクリン系抗がん剤が未だ標準療法薬剤となっており、より信頼性の高い新規治療薬の開発が求められている。本章では、乳がんの術後化学療法を模倣した動物モデルとして、原発腫瘍を切除した ALNM 残存 TNBC モデルマウスを構築し、pH 応答性エピルビシン (epirubicin, EPI) 内包高分子ミセル (EPI/m) の治療効果を free EPI と比較した。直径が異なる 2 条件の ALNM について評価を行った結果、直径 0.2 mm 以下の早期 ALNM に対しては free EPI, および EPI/m 共に高い治療効果を示したが、直径 0.2 mm 以上の成熟期 ALNM においては EPI/m のみが有意な増殖抑制作用を示した。これらの結果は、EPI/m が ALNM に対する信頼性の高い治療薬として乳がんの術後化学療法へと適用できる明確な根拠となり得る。

## 5.1 緒言

乳がんにおける腋窩リンパ節転移 (axillary lymph node metastasis, ALNM) 治療は少なくとも 16 世紀後半には重要性が認識されており、医療技術の進歩と協調しながら種々の手法が検討されている[1]。1970 年代前半までの ALNM 治療は外科治療が中心であり、主に Halsted らの提唱した転移の有無を問わず原発腫瘍と共に腋窩リンパ節を切除する手法 (radical mastectomy) [2]が用いられている[1]。しかし、i) センチネルリンパ節生検等の術前/術中診断技術の向上[3], ii) 放射線療法や化学療法の治療成績の向上[4,5], および iii) 根治を目指す治療から患者の生活の質を重視した治療への治療方針の変化[6]といった社会状況の変遷により外科治療の手術範囲は縮小傾向にあ

る[7]. そのため、現在の乳がんの外科治療では術前/術中診断において直径 2 mm 以上の ALNM を認める場合を除いて腋窩リンパ節の切除は行われていない[8]. 一方で、局所的な組織学的検査や空間分解能 0.5 mm 程度のコンピュータ断層撮影 (computed tomography, CT) 等の術前/術中診断では、微小な ALNM の残存によるリスクを否定し得ないため、原発腫瘍の切除後の乳がん患者の多くは集学的な術後治療の対象となる[8]. 実際に近年の大規模コホート研究では、CT の空間分解能を下回る直径 0.2 mm 程度の微小な ALNM でさえも独立した予後不良因子となることが明らかとなっており[9,10], ALNM に対する有効な術後治療の開発は重要性を増している.

現在の ALNM に対する術後の治療手法としては放射線療法, ホルモン療法, および化学療法が挙げられる[8]. 中でも、術後化学療法は ALNM を含む全身の微小転移に対する有効性が期待され、ホルモン非依存的な増殖を示す乳がん患者に対しても適用可能であることから、最も効果的な治療方法であると考えられている[8]. 近年ではトラスツズマブ (ハーセプチン®) 等の分子標的薬の開発により ALNM に対する術後化学療法の治療成績は飛躍的な向上を遂げている[11]. 一方、既知の標的化可能なバイオマーカーが存在しないトリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) の術後化学療法においては、依然としてエピルビシン (epirubicin, EPI) を含むアントラサイクリンのような古典的な低分子薬剤が標準療法薬剤として使用されている[8]. しかし、アントラサイクリン系抗がん剤の術後化学療法における効果には著しい患者間差があり、投薬による副作用を考慮した上での治療上のベネフィットについては依然として議論の余地がある[12–14]. 従って TNBC の術後化学療法においては、有効性のばらつきが改善された革新的な治療薬の開発が望まれている.

EPI 内包 pH 応答性高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle, EPI/m) は、有効性と安全性を改良した free EPI の代替薬として、乳がんを含むがん治療への有用性が期待されている[15]. 本研究ではこれまでに、EPI/m の ALNM 治療に

おける有用性について術前化学療法を模倣した条件での検証を行ってきた。第3章では、EPI/m が原発腫瘍存在下において TNBC の ALNM 形成を特異的に抑制することを明らかにした。さらに第4章では、EPI/m の原発腫瘍に対する集積特性と内包薬物の放出特性が ALNM の形成抑制に寄与することを明らかにした。一方、第3章における検討では ALNM の形成直前から EPI/m を投与しているため、ALNM に対する直接的な増殖抑制作用については検証し得ていない。また、第4章における検討は原発腫瘍に対する集積性に注目しているため、ALNM に対する EPI/m の集積特性についても未解明である。従って、EPI/m の ALNM 治療における free EPI の代替薬としての有用性を実証するためには、術後化学療法を模倣した治療条件において ALNM に対する直接的な増殖抑制効果を検証する必要がある。

そこで本章では、術後化学療法を模倣した実験系として、生物発光能を有するヒト由来 TNBC 細胞株である MDA-MB-231-luc-D3H2LN[16]を用いて原発腫瘍切除後の ALNM 残存乳がんモデルマウスを作製し、EPI/m の抗腫瘍効果を検討した。さらに、ALNM 検出後の治療開始時期を変動することにより、2種類の異なる大きさの微小転移に対する EPI/m の有効性を検証し、free EPI に対する有用性を考察した。

## 5.2 実験

### 5.2.1 試薬

ウシ血清アルブミン (fetal bovine serum, FBS) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。Matrigel basement membrane matrix (マトリゲル) は Corning (Corning, NY, USA) から購入した。VivoGlo ルシフェリンは Promega (Madison, WI, USA) から購入した。その他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。

### 5.2.2 細胞および実験動物

ヒト由来 TNBC 細胞株である MDA-MB-231 のリンパ節転移好発性ルシフェラーゼ発現株である MDA-MB-231-luc-D3H2LN は, PerkinElmer (Waltham, MA, USA) から購入した. 細胞は 10%FBS 含有 RPMI1640 培地中, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下, 37°Cにて培養した. BALB/C ノードマウス (遺伝子型 BALB/C nu/nu ; 雌 ; 入手時 4 週齢) は Charles River Japan (Kanagawa, Japan) より購入し, 1 週間の馴化期間を経た後に実験に供した. 全ての動物実験は, ナノ医療イノベーションセンター (Kawasaki, Japan), もしくは東京大学 (Tokyo, Japan) における動物委員会の承認下において実施した.

### 5.2.3 高分子ミセルの調製

本章において使用した EPI/m は第 2 章に示す手法にて調製した. 抗腫瘍効果における投与液は, EPI 換算として 2 mg/mL の 10 wt%スクロース分散液を stock solution とし, 投与開始前日のマウスの平均体重を基準として用事調製した. その際, 希釈液には 10 wt%スクロース水溶液を用いた.

### 5.2.4 生物発光強度の細胞数に対する直線性の確認

種々の濃度に調製した MDA-MB-231-luc-D3H2LN 細胞懸濁液を 96-well plate に播種した (2,000-20,000 cells/well/50  $\mu$ L, n=4). 播種後, 300  $\mu$ g/mL VivoGlo ルシフェリン/D-PBS(-)溶液 50  $\mu$ L を各ウェルに添加し, 直ちに *in vivo* イメージングシステム (IVIS, PerkinElmer) を用いて生物発光を撮像した. 撮像結果より各ウェルの生物発光強度を, Living Image software (PerkinElmer) を用いて単位時間あたりの光子カウント数 (photon counts per second, photons/sec) として定量化し, 播種細胞数との相関係数を最小二乗

法により解析した。

### 5.2.5 原発腫瘍切除下における腋窩リンパ節転移残存乳がんモデルマウスの作製

原発腫瘍切除下におけるALNM残存乳がんモデルマウスは以下の手順に従い調製した。MDA-MB-231-luc-D3H2LN の細胞懸濁液 ( $1 \times 10^6$  cells/10  $\mu$ L) を Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS (-)) とマトリゲルの1/1混液を用いて調製し、BALB/Cヌードマウス (雌; 16-21 g/body; 移植時5週齢) の左前肢に移植した。その後、左前足の原発腫瘍の増殖とALNMの形成に由来する生物発光をIVISにて測定した (第3章記載の測定方法を使用)。左腋窩にリンパ節転移が検出された後、ALNMに由来する発光強度が  $6 \times 10^5$  photon/sec, もしくは  $2 \times 10^6$  photon/sec となった時点において原発腫瘍を切除した。以下、前者を早期ALNMモデル, 後者を成熟期ALNMモデルと呼称する。また、実験結果の再現性を確保するため、原発腫瘍切除後、4日経過後と7日経過後にIVIS測定を実施した。原発腫瘍の切除に伴うALNMの減衰と原発腫瘍の再発が無いことを確認した後に以下の実験に供した。

### 5.2.6 腋窩リンパ節転移の組織学的観察

5.2.5 項の手順に従い作製した ALNM 残存乳がんモデルマウスをイソフルラン吸入麻酔下放血致死により安楽死処置した。次に左腋窩リンパ節を摘出した。摘出臓器は10%中性緩衝ホルマリン溶液を用いて浸漬固定し、パラフィンに包埋後に5  $\mu$ m に薄切した。その後、ヘマトキシリンおよびエオジン (hematoxylin and eosin, H&E) 染色し、光学顕微鏡を用いてALNMを観察した。

### 5.2.7 pH 応答性エピルビシン内包高分子ミセルの抗腫瘍効果の確認

5.2.5 項に従い異なる大きさの ALNM 残存乳がんモデルマウス (早期 ALNM モデル および成熟期 ALNM モデル) を作製した。早期 ALNM モデルについては、リンパ節 転移に由来する生物発光強度を基準として 4 群に群分けした後 (各群 n=4 ), 群分け 翌日より, free EPI 溶液 (投与量 ; 10 mg/kg), EPI/m 分散液 (投与量 ; EPI 換算として 10 mg/kg, および 20 mg/kg), および 10 wt% スクロース溶液をマウス尾静脈より 1 週 間おきに 3 回投与した。成熟期 ALNM モデルについては, 早期 ALNM と同様に 5 群 に群分け (各群 n=4 ) した翌日から free EPI 溶液 (投与量 ; 10 mg/kg), EPI/m 分散液 (投与量 ; EPI 換算として 10 mg/kg, 20 mg/kg, および 25 mg/kg), および 10 wt% ス クロース溶液をマウス尾静脈より 1 週間おきに 3 回投与した。実験期間中, 投薬によ る影響を体重測定により確認するとともに, ALNM に由来する生物発光強度の経時推 移を IVIS により評価した。

### 5.2.8. 統計学的解析

投与群間の治療効果の比較における統計解析手法には 2 元配置分散分析 (two-way analysis of variance, two-way ANOVA) を用いた。両側検定における  $P$  値が 0.05 未満 の場合, 比較群間の治療効果には有意差があるとみなした。

## 5.3 結果および考察

### 5.3.1 原発腫瘍切除下における腋窩リンパ節転移残存乳がんモデルマウスの作製

本研究では術後化学療法を模倣した実験系として MDA-MB-231-luc-D3H2LN を用いた ALNM 残存乳がんモデルマウスの作製を試みた。MDA-MB-231-luc-D3H2LN はリンパ節転移後発性のトリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) 由来細胞株であり[16]、乳腺組織への同所移植による ALNM 形成モデル[16-22]や経静脈投与による遠隔転移形成モデルが報告されているが[16,21,23]、ALNM 単独を有する動物モデルについては報告事例が無い。同細胞種は親細胞株と比較して高い浸潤性を有するため、乳腺組織への同所移植においては ALNM 形成後における原発腫瘍の完全な摘出が困難であることがその要因とされている[24]。さらに、第3章における検討結果より、乳腺組織への同所移植においては体側両側の腋窩リンパ節に対する選択性の制御が困難であり、再現性の高い実験系として同移植方法による ALNM 残存乳がんモデルの構築は不適當であると考えられる。

そこで本章では、原発腫瘍の形成部位を前肢へ変更することにより選択性の高い ALNM 残存乳がんモデルの構築を試みた。本手法は、実験的なリンパ節転移の作製方法の一つとして知られており、前肢と共に原発腫瘍を切除することで残存した転移腫瘍のみを有するモデルマウスを作製することが可能である[25]。

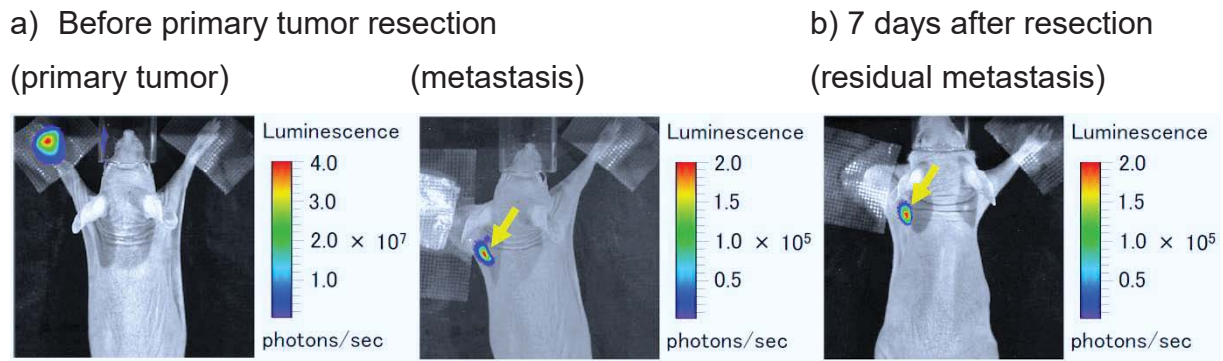
最初に、当該移植手法における転移形成過程を検証した。MDA-MB-231-luc-D3H2LN の細胞懸濁液 ( $1 \times 10^6$  cells/10  $\mu$ L) をヌードマウス (雌; 16-21 g/body; 移植時 5 週齢) の左前肢に移植し、転移腫瘍に由来する生物発光を IVIS により評価した。転移形成を認めたマウスについては、生物発光の検出部位から転移部位を推定し、組織間の発症頻度を比較した (Table 5-1)。転移形成に由来する生物発光は、細胞移植後 2 週経

過時点より検出された。転移の発症頻度は経時的に増加し、試験終了時において、8例中7例（転移形成率88%）であった。転移形成部位の推移においては、転移形成を示したマウス全例について初発転移部位は腋窩リンパ節であり、MDA-MB-231-luc-D3H2LNの高い腋窩リンパ節指向性が再現された。注目すべきことに、転移形成部位は細胞を移植した左前肢の所属リンパ節のみであり、移植方法の変更により転移リンパ節の選択性が向上したと考えられた。

次に、リンパ節転移形成を認めたマウス（7例）について左前肢を切除し、7日後にIVIS測定を行った。その結果、7例中6例においてリンパ節転移の残存を認めた。さらに、撮像結果においては、原発腫瘍の残存、もしくは二次的な遠隔転移に伴う生物発光を認めなかった（**Figure 5-1**）。従って本手法は、転移部位選択的なALNM残存乳がんモデルマウスの作製方法として妥当であると考えられた。

**Table 5-1.** Time course of metastasis formation after footpad injection of MDA-MB-231-luc-D3H2LN.  $1 \times 10^6$  cells of MDA-MB-231-luc-D3H2LN were inoculated into the left forepaw of female nude mice. Metastasis formation of the tumor-bearing mice was evaluated by an *in vivo* imaging system.

| days after inoculation (day) | incidence of metastasis | location of metastasis |       |      |             |
|------------------------------|-------------------------|------------------------|-------|------|-------------|
|                              |                         | axillary lymph node    |       |      | other sites |
|                              |                         | left                   | right | both |             |
| 7                            | 0/8                     | 0                      | 0     | 0    | 0           |
| 14                           | 1/8                     | 1                      | 0     | 0    | 0           |
| 22                           | 4/8                     | 4                      | 0     | 0    | 0           |
| 29                           | 7/8                     | 7                      | 0     | 0    | 0           |

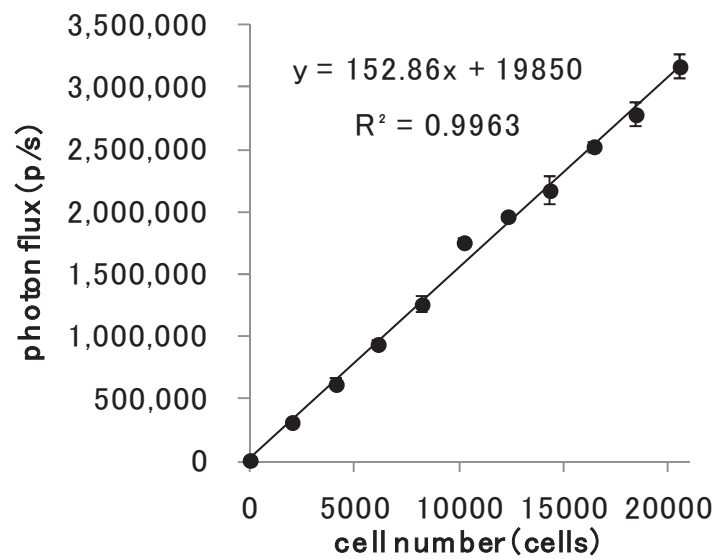


**Figure 5-1.** Representative images of the mouse having spontaneous axillary lymph node metastasis detected by an *in vivo* imaging system. a) Bioluminescent images of the mouse before primary tumor resection. Metastasis was imaged by masking the primary tumor. b) Bioluminescent image of the mouse seven days after resection of primary tumor. Yellow arrows indicated the location of spontaneous axillary lymph node metastasis.

### 5.3.2 残存腋窩リンパ節転移の定量的評価による分類

乳がんの ALNM は直径 0.2 mm 程度の微小転移においても独立した予後不良因子となることが知られていることから[9,10], 治療開始時の転移腫瘍の大きさは薬物の治療効果に著しく影響を及ぼすと考えられる. そこで, 得られた ALNM 残存乳がんモデルについて転移腫瘍の大きさを定量的に解析し, 2 水準に分類することを試みた.

まず, 転移腫瘍に由来する生物発光強度を細胞数へと変換するため, MDA-MB-231-luc-D3H2LN の播種細胞数と単位時間あたりの光子カウント数との相関性を確認した (**Figure 5-2**). その結果, 20,000 cells までの範囲において良好な相関を示し ( $R^2 = 0.9963$ ), 直線性が得られた.



**Figure 5-2.** Calibration curve of the bioluminescence intensity against the number of cells for MDA-MB-231-luc-D3H2LN cells. 2,000 to 20,000 cells were seeded in a 96-well plate, 50  $\mu$ L of 300  $\mu$ g / mL luciferin solution was added to each well, and then photon counts of each well were measured by an *in vivo* imaging system. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 4). The result of the approximation by the least squares method suggests that the photon count per cell is approximately 150 photons/sec.

次に、原発腫瘍の切除時期を調節することにより、残存 ALNM の生物発光強度が異なる 2 種類のマウスを作製した。得られたマウスにおける残存 ALNM の生物発光強度の平均値はそれぞれ、 $6.2 \times 10^5$  photon/sec, および  $2.4 \times 10^6$  photon/sec であった (Table 5-2)。この値について Figure 5-2 より求めた回帰直線式を用いて ALNM の構成細胞数の平均値を算出した結果、前者については  $4.1 \times 10^3$  cells, 後者については  $1.6 \times 10^4$  cells であった (Table 5-2)。さらに、各群の平均値に最も近いマウスより転移リンパ節を摘出し、*ex vivo* での IVIS 測定により ALNM の位置を同定した後、組織切片を作製し、H&E 染色により ALNM の組織学的観察を行った (Figure 5-3)。その結果、ALNM の直径は、前者については 0.1-0.2 mm, 後者については 0.2 mm 以上と推定され

た (Table 5-2).

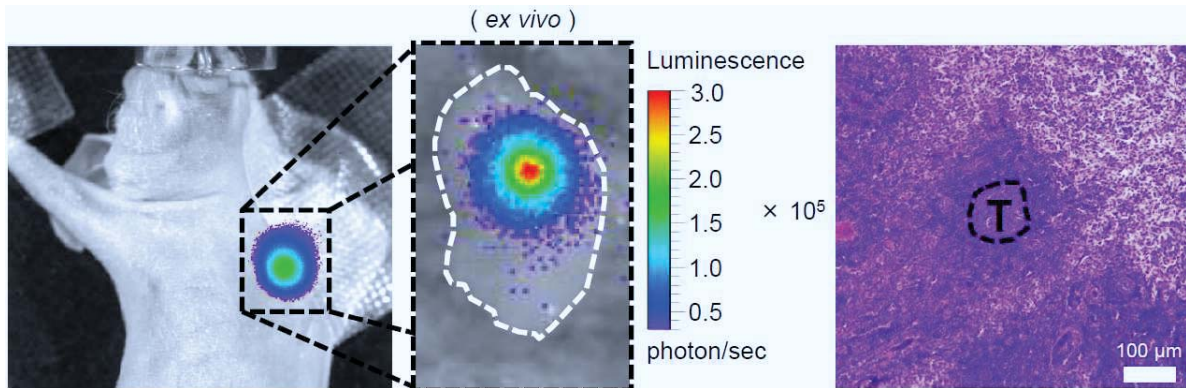
微小転移は、古典的な定義としては構成細胞数  $1 \times 10^6$  cells 以下の転移腫瘍を指す [26]. Table 5-2 において算出した構成細胞数より、得られたモデルマウスの ALNM はいずれも微小転移の範囲に含まれる. 加えて、乳がんの ALNM においてはさらに組織学的検査における直径を基準として 0.2 mm 以上 2.0 mm 以下の転移腫瘍を微小転移と定義している [27]. Figure 5-3 における観察結果より、平均生物発光強度  $6.2 \times 10^5$  photon/sec における ALNM は微小転移の基準を下回る大きさであった. このような非常に初期段階の転移の場合、転移腫瘍はその増殖能を維持するために、腫瘍由来の血管新生ではなく、宿主由来血管を共用している [28]. 一方、平均生物発光強度  $2.4 \times 10^6$  photon/sec における ALNM は微小転移に該当する大きさであり、自律的な増殖能を獲得していると考えられる. そこで本研究においては、両者を早期 ALNM (early-stage ALNM)、および成熟期 ALNM (mature-stage ALNM) と呼称し、以下のように定義する. すなわち、早期 ALNM とは、腫瘍径が約 0.1~0.2mm の大きさであり、IVIS 測定において約  $6 \times 10^5$  photon/sec の発光強度を示し、細胞数としては約 4000 cells に相当するものである. 一方、成熟期 ALNM とは、0.2mm 以上の大きさであり、IVIS 測定において約  $2 \times 10^6$  photon/sec の発光強度を示し、細胞数としては約 16000 個に相当するものである.

**Table 5-2.** Summary of the state of axillary lymph node metastasis in this study.

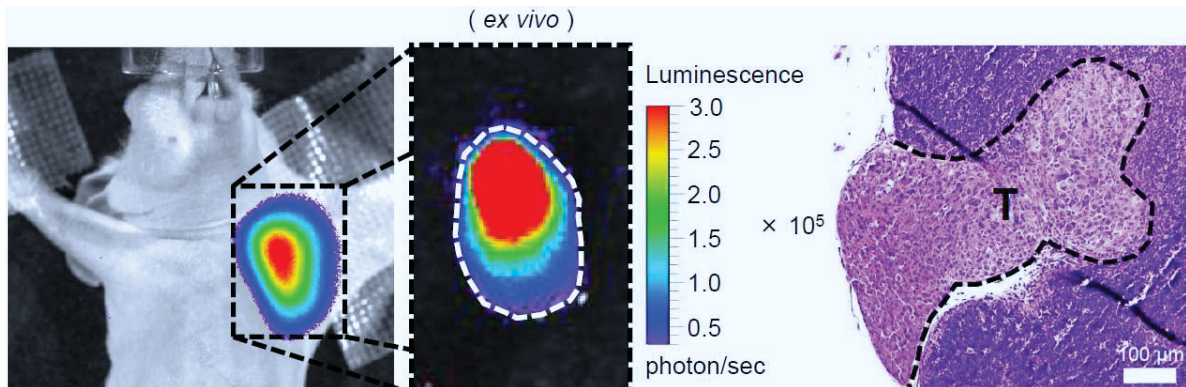
| photon counts (p/s) <sup>a</sup>      | cell number (cells) <sup>b</sup>      | size (diameter) <sup>c</sup> | stage             |
|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|-------------------|
| $6.2 \times 10^5 \pm 5.2 \times 10^4$ | $4.1 \times 10^3 \pm 3.4 \times 10^2$ | 0.1 - 0.2 mm                 | early-stage ALNM  |
| $2.4 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^5$ | $1.6 \times 10^4 \pm 2.3 \times 10^3$ | > 0.2 mm                     | mature-stage ALNM |

<sup>a</sup> Measured by an *in vivo* imaging system. Data are mean  $\pm$  SE (n = 16). <sup>b</sup> Results calculated from the calibration curve shown in Figure 5-2. <sup>c</sup> Results obtained by H&E stained metastatic lymph node sections shown in Figure 5-3.

a)



b)



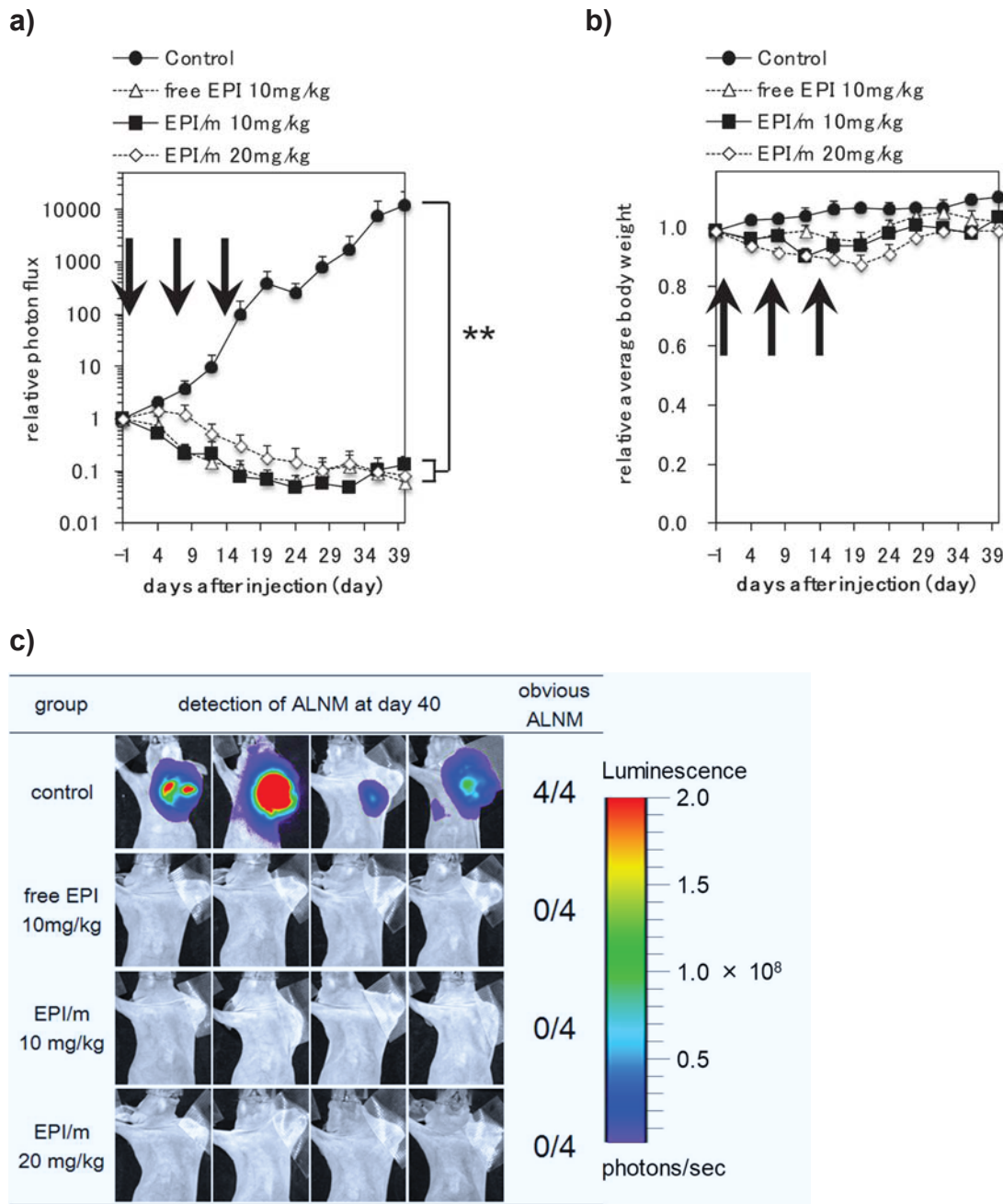
**Figure 5-3.** Representative images of the two states of axillary lymph node metastasis defined in this study. a) Representative image of the mouse having axillary lymph node metastasis with luminescence intensity of approximately  $6 \times 10^5$  photon/sec detected by an *in vivo* imaging system. The metastatic lesion of the excised metastatic lymph node was identified by bioluminescent measurement and H&E staining of ordered section. The H&E staining image indicated the size of metastasis was 0.1-0.2 mm. b) Representative images of the mouse having axillary lymph node metastasis with luminescence intensity of approximately  $2 \times 10^6$  photon/sec detected by an *in vivo* imaging system. The metastatic lesion of the excised metastatic lymph node was identified as described above. The H&E staining image indicated the size of metastasis was over 0.2 mm.

### 5.3.3 腋窩リンパ節転移残存乳がんモデルマウスを用いた抗腫瘍効果の評価

最後に、前項において定義した2種類のALNM残存乳がんモデルマウスを用いて、EPI/mのALNMに対する増殖抑制効果を評価した。早期ALNMモデルにおいては、10 wt%スクロース溶液（コントロール群）、free EPI溶液（投与量；10 mg/kg）、もしくはEPI/m分散液（投与量；EPI換算として10 mg/kg、もしくは20 mg/kg）をマウス尾静脈より1週間おきに3回投与し、ALNMの増殖推移をIVISにて追跡した。成熟期ALNMモデルにおいては、上記の投与群に加えてEPI換算として25 mg/kgのEPI/m投与群についても併せて評価を行った。

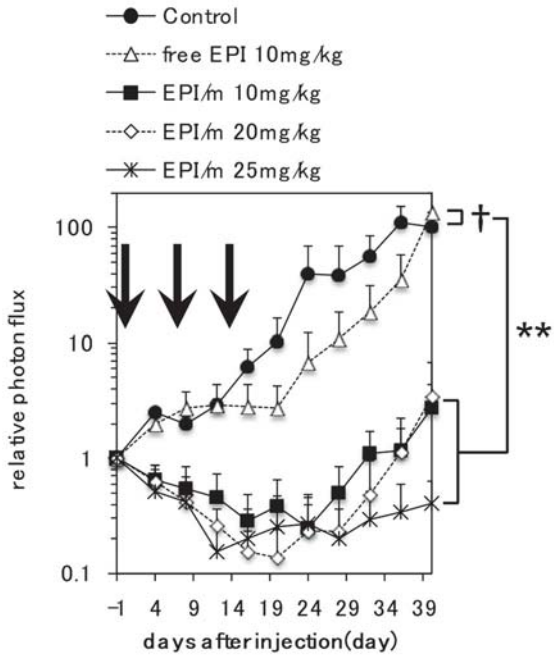
評価の結果、早期ALNMモデルでは、コントロール群を除く全ての群において、ALNMに由来する生物発光強度が著しく減少した（**Figure 5-4 a**）。さらに、観察終了時においては、いずれのマウスにおいてもALNMが検出されず、転移が完全に抑制されたことが確認された（**Figure 5-4 c**）。なお、平均体重の推移より、薬物投与に伴う明確な体重減少は確認されなかったことから、ALNMの増殖抑制効果はfree EPI、およびEPI/mの薬効に由来するものであると考えられた（**Figure 5-4 b**）。

一方、成熟期ALNMモデルにおいては、free EPI投与群が腫瘍増殖抑制効果を示さなかったのに対し、EPI/m投与群は有意にALNMの増殖を抑制した（**Figure 5-5 a**）。重要なことに、EPI/m投与群の増殖抑制効果は、free EPIと同一の投与量（EPI換算として10 mg/kg）においても確認され、EPI/mの優位性を示唆した。さらに、EPI/mの高用量群（EPI換算として20 mg/kg、および25 mg/kg）においては、実験終了時に4例中3例のマウスにおいてALNMが未検出となるレベルまで生物発光強度が低下した（**Figure 5-5 c**）。なお、平均体重の推移よりEPI/mは高用量投与においても顕著な体重増加抑制傾向を認めず、成熟期ALNMに対する用量依存的な薬効の増大を示唆した（**Figure 5-5 b**）。

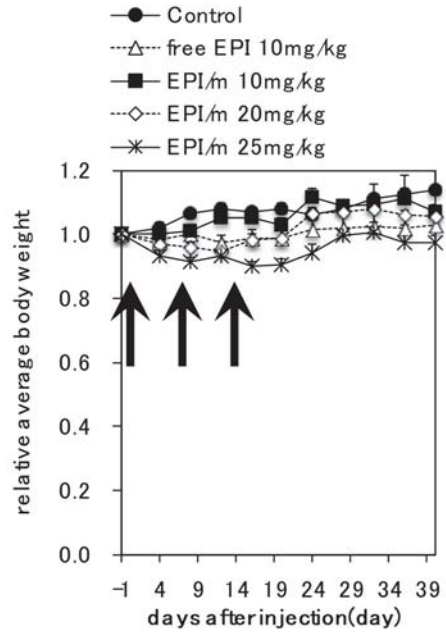


**Figure 5-4.** Efficacy of free EPI or EPI/m against the early-stage ALNM growth after primary tumor resection. a) Relative photon flux from the early-stage ALNM in mice treated with 10% sucrose (control), free EPI 10 mg/kg, EPI/m 10 mg/kg or EPI/m 20 mg/kg on day 0, 7 and 14 (black arrows). Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=4). \*\* < 0.01 was determined by two-way ANOVA test. b) Changes in relative average body weight of mice. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n = 4). c) Bioluminescent images of mice each four treatment groups at day 40.

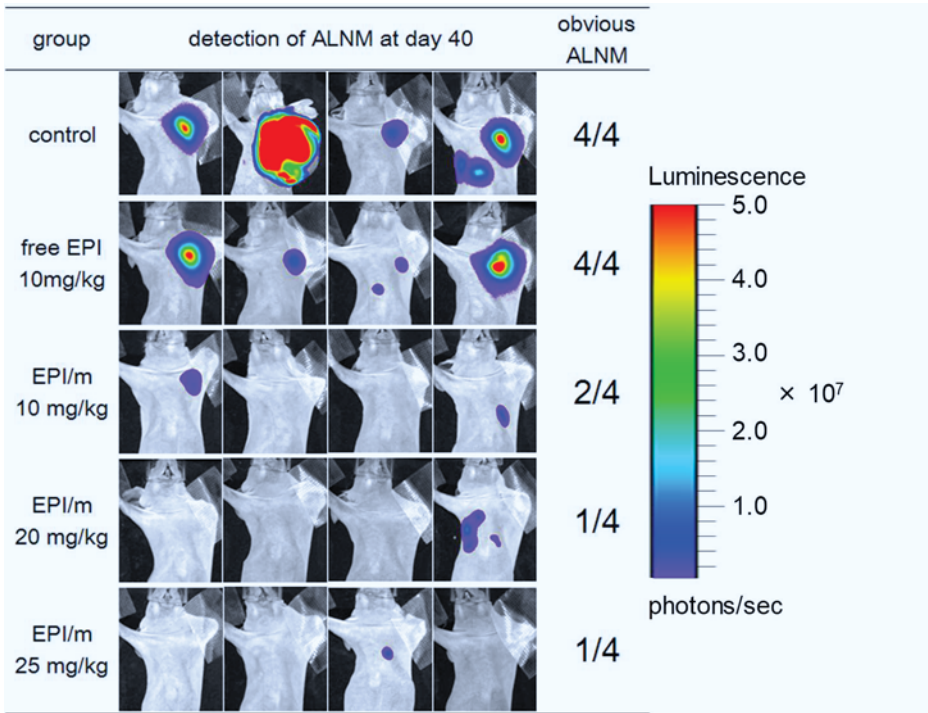
a)



b)



c)



**Figure 5-5.** Efficacy of free EPI or EPI/m against the mature-stage ALNM growth after primary tumor resection. a) Relative photon flux from the mature-stage ALNM in mice treated with 10% sucrose (control), free EPI 10 mg/kg, EPI/m 10 mg/kg, EPI/m 20 mg/kg or EPI/m 25 mg/kg on day 0, 7 and 14 (black arrows). Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=4). \*\* < 0.01 was determined by two-way ANOVA test. b) Changes in relative average body weight of mice. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n = 4). c) Bioluminescent images of mice each five treatment groups at day 40.

#### 5.3.4 考察

本章では術後化学療法を模倣した実験系として、原発腫瘍切除後の ALNM 残存 TNBC モデルマウスを構築し、EPI/m の抗腫瘍効果を検討した。評価の結果、EPI/m は成熟度が異なる 2 種類の ALNM のいずれに対しても直接的な増殖阻害作用を有することが明らかとなり、乳がんの術後化学療法における有用性が示唆された。

ALNM への集学的治療が検討されている現在の乳がん治療において、free EPI による術後化学療法は難治性の TNBC に対して最も汎用される治療手法である[8]。しかし、free EPI の ALNM に対する有効性には著しい患者間差があることが知られており、標準療法薬剤としての適性については依然として議論の余地がある[12–14]。本モデルマウスにおける検討結果 (**Figure 5-4** および **5-5**) は、free EPI が臨床的な乳がんの微小転移の定義[27]に該当しない形成初期の ALNM のみに対して有効であることを示している。この実験結果は、術後化学療法に関する臨床研究において ALNM に対する free EPI の有効性に一貫性が無いことを説明するための知見となり得る。一方、EPI/m は早期–成熟期のいずれの ALNM に対しても顕著な増殖抑制効果を示した。このような EPI/m の高い有効性は、原発腫瘍のみならず、ALNM に対する確実な治療効果をも兼ね備えた乳がんの新規治療薬として既存薬に対する優位性を示唆するも

のであると考えられる。

## 5.4 結論

EPI/m の ALNM に対する直接的な増殖阻害作用を検証するため、原発腫瘍切除下における ALNM 残存 TNBC モデルマウスを構築し、EPI/m の治療効果を free EPI と比較した。2 種類の異なる大きさの ALNM を有するモデルマウスを用いた評価の結果、直径 0.2 mm 以下の早期 ALNM に対しては free EPI、および EPI/m 共に高い治療効果を示したが、直径 0.2 mm 以上の成熟期 ALNM においては EPI/m のみが有意な増殖抑制作用を示した。以上の結果は、EPI/m が ALNM に対する直接的な増殖阻害作用を示すことを実証する知見である。さらに、EPI/m は、微小転移の大きさに依存しない確実な有効性を有する新規治療薬として、乳がんの術後化学療法において有用であると考えられる。

## 5.5 参考文献

- [1] A.M. Cotlar, J.J. Dubose, D.M. Rose, History of surgery for breast cancer: Radical to the sublime, *Curr. Surg.* 60 (2003) 329–337. doi:10.1016/S0149-7944(02)00777-8.
- [2] W.S. Halsted, I. The results of operations for the cure of cancer of the breast performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894, *Ann. Surg.* 20 (1894) 497.
- [3] V.K.M. Tan, B.K.P. Goh, S. Fook-Chong, L.W. Khin, W.K. Wong, W.S. Yong, The feasibility and accuracy of sentinel lymph node biopsy in clinically node-negative patients after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer - A systematic review and meta-analysis, *J. Surg. Oncol.* 104 (2011) 97–103. doi:10.1002/jso.21911.

- [4] J. Van de Steene, G. Soete, G. Storme, Adjuvant radiotherapy for breast cancer significantly improves overall survival: the missing link, *Radiother. Oncol.* 55 (2000) 263–272.
- [5] J. Anampa, D. Makower, J.A. Sparano, Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: An overview, *BMC Med.* 13 (2015) 1–13. doi:10.1186/s12916-015-0439-8.
- [6] J. Engel, J. Kerr, A. Schlesinger-Raab, H. Sauer, D. Hölzel, Quality of life following breast-conserving therapy or mastectomy: results of a 5-year prospective study, *Breast J.* 10 (2004) 223–231.
- [7] U. Veronesi, S. Zurrada, Breast cancer surgery: a century after Halsted, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122 (1996) 74–77.
- [8] National Comprehensive Cancer Network, Breast Cancer, NCCN Clin. Pract. Guidel. *Oncol.* (2017). doi:10.1093/med/9780199363315.003.0020.
- [9] B. Weigelt, J.L. Peterse, L.J. Van't Veer, Breast cancer metastasis: Markers and models, *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 591–602. doi:10.1038/nrc1670.
- [10] M. Colleoni, N. Rotmensz, G. Peruzzotti, P. Maisonneuve, G. Mazzarol, G. Pruneri, A. Luini, M. Intra, P. Veronesi, V. Galimberti, R. Torrasi, A. Cardillo, A. Goldhirsch, G. Viale, Size of breast cancer metastases in axillary lymph nodes: Clinical relevance of minimal lymph node involvement, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 1379–1389. doi:10.1200/JCO.2005.07.094.
- [11] S. Dawood, K. Broglio, A.U. Buzdar, G.N. Hortobagyi, S.H. Giordano, Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: An institutional-based review, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 92–98. doi:10.1200/JCO.2008.19.9844.

- [12] C. Bernard-Marty, Facts and Controversies in Systemic Treatment of Metastatic Breast Cancer, *Oncologist*. 9 (2004) 617–632. doi:10.1634/theoncologist.9-6-617.
- [13] F. Montemurro, S. Redana, G. Valabrega, M. Aglietta, Controversies in breast cancer: adjuvant and neoadjuvant therapy, *Expert Opin Pharmacother*. 6 (2005) 1055–1072. doi:10.1517/14656566.6.7.1055.
- [14] M. Joerger, B. Thürlimann, Chemotherapy regimens in early breast cancer: major controversies and future outlook, *Expert Rev. Anticancer Ther*. 13 (2013) 165–178. doi:10.1586/era.12.172.
- [15] H. Mukai, T. Kogawa, N. Matsubara, Y. Naito, M. Sasaki, A. Hosono, A first-in-human Phase 1 study of epirubicin-conjugated polymer micelles (K-912/NC-6300) in patients with advanced or recurrent solid tumors, *Invest. New Drugs*. 35 (2017) 307–314. doi:10.1007/s10637-016-0422-z.
- [16] D.E. Jenkins, Y.S. Hornig, Y. Oei, J. Dusich, T. Purchio, Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice, *Breast Cancer Res*. 7 (2005) R444. doi:10.1186/bcr1026.
- [17] L. Qin, F. Zhang, X. Lu, X. Wei, J. Wang, X. Fang, D. Si, Y. Wang, C. Zhang, R. Yang, C. Liu, W. Liang, Polymeric micelles for enhanced lymphatic drug delivery to treat metastatic tumors, *J. Control. Release*. 171 (2013) 133–142. doi:10.1016/j.jconrel.2013.07.005.
- [18] M. V. Yigit, S.K. Ghosh, M. Kumar, V. Petkova, A. Kavishwar, A. Moore, Z. Medarova, Context-dependent differences in miR-10b breast oncogenesis can be targeted for the prevention and arrest of lymph node metastasis, *Oncogene*. 32 (2013) 1530–1538. doi:10.1038/onc.2012.173.

- [19] J.W. Astin, S.M.F. Jamieson, T.C.Y. Eng, M. V. Flores, J.P. Misa, A. Chien, K.E. Crosier, P.S. Crosier, An in vivo antilymphatic screen in zebrafish identifies novel inhibitors of mammalian lymphangiogenesis and lymphatic-mediated metastasis, *Mol. Cancer Ther.* 13 (2014) 2450–2462. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0469-T.
- [20] E. Lee, S.J. Lee, J.E. Koskimaki, Z. Han, N.B. Pandey, A.S. Popel, Inhibition of breast cancer growth and metastasis by a biomimetic peptide, *Sci. Rep.* 4 (2014) 1–12. doi:10.1038/srep07139.
- [21] L. Shan, X. Zhou, X. Liu, Y. Wang, D. Su, Y. Hou, N. Yu, C. Yang, B. Liu, J. Gao, Y. Duan, J. Yang, W. Li, J. Liang, L. Sun, K. Chen, C. Xuan, L. Shi, Y. Wang, Y. Shang, FOXP2 Elicits Massive Transcription Repression and Suppresses the Hypoxic Response and Breast Cancer Carcinogenesis, *Cancer Cell.* 30 (2016) 708–722. doi:10.1016/j.ccell.2016.09.010.
- [22] Y. Li, J.A. Hickson, D.J. Ambrosi, D.L. Haasch, K.D. Foster-Duke, L.J. Eaton, E.L. DiGiammarino, S.C. Panchal, F. Jiang, S.R. Mudd, C. Zhang, S.S. Akella, W. Gao, S.L. Ralston, L. Naumovski, J. Gu, S.E. Morgan-Lappe, Abt-165, a dual variable domain immunoglobulin (dvd-ig) targeting dll4 and vegf, demonstrates superior efficacy and favorable safety profiles in preclinical models, *Mol. Cancer Ther.* 17 (2018) 1039–1050. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0800.
- [23] T. Zhang, H. Lip, C. He, P. Cai, Z. Wang, J.T. Henderson, A.M. Rauth, X.Y. Wu, Multitargeted Nanoparticles Deliver Synergistic Drugs across the Blood–Brain Barrier to Brain Metastases of Triple Negative Breast Cancer Cells and Tumor-Associated Macrophages, *Adv. Healthc. Mater.* 8 (2019) 1–15. doi:10.1002/adhm.201900543.
- [24] S. Yano, K. Takehara, H. Kishimoto, H. Tazawa, Y. Urata, S. Kagawa, T. Fujiwara, M. Bouvet, R.M. Hoffman, Comparison of tumor recurrence after resection of highly- and

- poorly-metastatic triple-negative breast cancer in orthotopic nude-mouse models, *Anticancer Res.* 37 (2017) 57–60. doi:10.21873/anticancerres.11288.
- [25] J.E. Price, *Xenograft Models in Immunodeficient Animals*, in: *Metastasis Res. Protoc. Vol. II Anal. Cell Behav. Vitro. Vivo*, Humana Press, Totowa, NJ, 2001: pp. 205–213. doi:doi.org/10.1385/159259137X.
- [26] F.M. Schabel Jr, Concepts for systemic treatment of micrometastases, *Cancer*. 35 (1975) 15–24. doi:10.1002/1097-0142(197501)35:1<15::AID-CNCR2820350104>3.0.CO;2-W.
- [27] F.L. Greene, C.M. Balch, I.D. Fleming, A. Fritz, D.G. Haller, M. Morrow, D.L. Page, *AJCC Cancer Staging Handbook: TNM Classification of Malignant Tumors*, Springer New York, 2002. <https://books.google.co.jp/books?id=0SP-gyH0-bMC>.
- [28] H.S. Jeong, D. Jones, S. Liao, D.A. Wattson, C.H. Cui, D.G. Duda, C.G. Willett, R.K. Jain, T.P. Padera, Investigation of the Lack of Angiogenesis in the Formation of Lymph Node Metastases, *J. Natl. Cancer Inst.* 107 (2015) 1–11. doi:10.1093/jnci/djv155.

# 第 6 章

術後化学療法を模倣した治療条件  
におけるエピルビシン内包 **pH** 応答性  
高分子ミセルの薬物送達機序  
に関する検討

## 要旨

pH 応答性ナノメディシンのがん治療における有用性は主に固形がんを対象として検証が進められ、転移がんに対してもその優れた有効性を示すことが明らかとなりつつある。しかし、転移がんに対する pH 応答性ナノメディシンの薬物送達機序については検証の余地が残されており、特に薬物放出の組織選択性については詳細な評価が必要である。本章では、トリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) の原発腫瘍切除下における腋窩リンパ節転移 (axillary lymph node metastasis, ALNM) 残存モデルマウスを用いて、pH 応答性エピルビシン内包高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle, EPI/m) の成熟期 ALNM に対する集積特性と内包薬物の放出特性を評価した。その結果、EPI/m は血管系を介して成熟期 ALNM に選択的に分布し、長期にわたって滞留することが明らかとなった。また転移リンパ節においては、EPI/m が成熟期 ALNM の酸性環境をトリガーとして内包薬物の放出を促進し、free EPI よりも有意に多い released EPI を供給することを明らかにした。一方、健常リンパ節においては EPI/m からの薬物放出は抑制されており、released EPI の生成量は free EPI を有意に下回った。以上の結果は、pH 応答性ナノメディシンが転移がんにおいても標的組織選択的に内包薬物の放出を促進することを実証する知見である。

### 6.1 緒言

ナノサイズの薬物キャリアを利用した薬物送達は、主に enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) を駆動力として固形がんへの集積性向上が見込めるため、治療薬の効果を増強させ得る先端技術として期待されている[1,2]。また pH 応答性ナノメディシンは、内包薬物の放出性に組織選択性を付与することが可能となっており、上述の EPR 効果による集積性向上と併せて治療薬の効果をさらに向上させ得ると考

えられている[3,4]. 例えば, Zhu らは種々の結合様式でドキソルビシン (doxorubicin, DOX) を導入したポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) 修飾ポリアミドアミン (polyamidoamine, PAMAM) デンドリマーを用いて, 悪性黒色腫の皮下腫瘍に対する遊離 DOX の腫瘍内集積量と抗腫瘍効果との相関性を検証している[5]. Zhu らの研究結果においては, 結合様式に pH 応答性の *cis*-アコニチル結合を用いた PAMAM が, アミド結合を用いた場合と比較して遊離 DOX の腫瘍内集積量を約 7 倍に向上すると共に皮下移植モデルマウスの生存期間を延長している[5]. また Etrych らは, ヒドラゾン結合により DOX もしくは蛍光色素を導入した *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide を用いることで, pH 応答性ナノメディシンの皮下腫瘍における遊離薬物の集積量と抗腫瘍効果が相関することを実証している[6,7].

近年, pH 応答性ナノメディシンは転移がんに対しても有効性を示すことが明らかとなってきている[8]. He らは, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) の選択的阻害剤である Succinobucol を物理封入した pH 応答性 worm like micelle を用いて, 乳がんの肺転移モデルマウスにおける治療効果を検証している[9]. He らの知見では, pH 応答性 worm like micelle が Succinobucol の溶液投与と比較して有意な肺転移の増殖抑制効果を示している[9]. しかし, He らの報告では肺転移における遊離薬物の動態については検証されておらず, pH 応答性 worm like micelle の薬効発現における薬物放出特性の寄与については不明確である. また, 好氣的解糖と乳酸産生の亢進が組織の酸性化の要因として明らかとなっている固形がんとは異なり, 転移がん組織の酸性化については検証の余地が残されている[10,11]. 従って, pH 応答性ナノメディシンは転移がん治療においても有望な設計であると考えられるが, その有用性を生理学的な観点からも理解するためには, 標的組織選択的な内包薬物の放出促進とその詳細について実証する必要がある.

本研究では, pH 応答性エピルビシン内包高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-

responsive polymeric micelle, EPI/m) の乳がん腋窩リンパ節転移 (axillary lymph node metastasis, ALNM) 治療における有用性について、既存薬であるエピルビシン (epirubicin, EPI) との比較検証を行っている。第 5 章においては、EPI/m が術後化学療法を模倣したトリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) の原発腫瘍切除下における腋窩リンパ節転移 (axillary lymph node metastasis, ALNM) 残存モデルマウスに対し ALNM の増殖抑制効果を示している。特に直径 0.2 mm 以上の成熟期 ALNM においては、free EPI が薬効を示さなかったのに対し、EPI/m は特異的かつ用量依存的な増殖抑制効果を示すことが明らかとなっている。これらの知見は、EPI/m が乳がんの術後化学療法においても既存薬を上回る有用性を示すことを示唆する知見である。一方で、EPI/m の成熟期 ALNM に対する薬物送達機序については未解明であり、標的組織におけるミセルの集積特性と内包薬物の放出特性について詳細に検証する必要がある。

そこで本章では、第 5 章において構築した原発腫瘍切除後の成熟期 ALNM 残存乳がんモデルマウスを用いて EPI/m の成熟期 ALNM に対する集積特性と内包薬物の放出特性を検証した。EPI/m の成熟期 ALNM に対する集積特性に関する評価としては、転移/健常リンパ節における EPI/m の組織中濃度の経時推移を free EPI と比較した。さらに、Alexa 647 標識 EPI/m を用いて転移リンパ節におけるミセルの微小分布を観察した。また、EPI/m の成熟期 ALNM における内包薬物の放出特性については、転移/健常リンパ節におけるミセルから漏出した遊離 EPI の組織中濃度を測定し、両リンパ節間の経時推移を比較した。

## 6.2 実験

### 6.2.1 試薬

ウシ血清アルブミン (fetal bovine serum, FBS), Hoechst 33342, および Alexa Fluor™ 647 *N*-hydroxysuccinimidyl ester (Alexa 647 NHS ester) は, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した. DyLight 488 conjugated tomato lectin は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) から購入した. Matrigel basement membrane matrix (マトリゲル) は Corning (Corning, NY, USA) から購入した. VivoGlo ルシフェリンは Promega (Madison, WI, USA) から購入した. その他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した.

### 6.2.2 細胞および実験動物

ヒト由来 TNBC 細胞株である MDA-MB-231 のリンパ節転移好発性ルシフェラーゼ発現株である MDA-MB-231-luc-D3H2LN は, PerkinElmer (Waltham, MA, USA) から購入した. 細胞は 10 %FBS 含有 RPMI1640 培地中, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下, 37°Cにて培養した. BALB/C ノードマウス (遺伝子型 BALB/C nu/nu; 雌; 入手時 4 週齢) は Charles River Japan (Kanagawa, Japan) より購入し, 1 週間の馴化期間を経た後に実験に供した. 全ての動物実験は, ナノ医療イノベーションセンター (Kawasaki, Japan), もしくは東京大学 (Tokyo, Japan) における動物委員会の承認下において実施した.

### 6.2.3 高分子ミセルの調製

本章において使用した EPI/m と Alexa 647 標識 EPI/m は, それぞれ第 2 章と第 4 章に示す手法により調製した. また, *In vivo* 評価における投与液の取り扱い第 4 章と

同様に行った。

#### 6.2.4 血漿および転移/健常リンパ節中のエピルビシン濃度推移の評価

原発腫瘍切除下における成熟期 ALNM 残存乳がんモデルマウスを第 5 章に示す手法にて作製した後、リンパ節転移に由来する生物発光強度を基準として 2 群に分けた (各群 15 匹)。群分け翌日に、EPI 換算として 25 mg/kg の free EPI 溶液、もしくは EPI/m 分散液を尾静脈投与した。投与から 1, 8, 24, 48, 96 時間経過時点において、血液、転移リンパ節、および反対側の健常腋窩リンパ節を採取した。採材組織の前処理として、血液については遠心分離 (遠心力 : 5,000g, 時間 : 5 分, 温度 : 4°C) を行い、上清 (血漿) を回収した。転移/健常リンパ節については、組織重量に対して 3 倍量の Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS (-)) を添加した後、ビーズ式粉碎機処理により組織をホモジナイズした。さらに得られた組織破砕液を、遠心分離 (遠心力 : 5,000g, 時間 : 5 分, 温度 : 4°C) し上清を回収した。

得られた上清について、第 4 章に示す手順に従い各採材時点における組織中の対投与量換算薬物分布量を評価した。概略として、ミセルから遊離した EPI 濃度 (released EPI) と released EPI に高分子結合 EPI を含めた総 EPI 濃度 (total EPI) とを、それぞれ異なる試料調製処理により定量した後、各採材時点における薬物の組織中濃度を下に示す式に従い算出した。

血漿中の対投与量換算 released EPI 量 (% dose/mL)

$$= [\text{EPI} \cdot \text{HCl の秤取量 (mg)}] / 2,500 \times (\text{試料溶液のピーク面積比}) / (\text{標準溶液のピーク面積比}) \times 4/5$$

血漿中の対投与量換算 total EPI 量 (% dose/mL)

$$=[\text{EPI} \cdot \text{HCl} \text{ の秤取量 (mg) } ] / 2,500 \times (\text{試料溶液のピーク面積比}) / (\text{標準溶液のピーク面積比}) \times 4.5 / 5$$

転移/健常リンパ節中の対投与量換算 released EPI 量 (% dose/g organ)

$$=[\text{EPI} \cdot \text{HCl} \text{ の秤取量 (mg) } ] / 2,500 \times (\text{試料溶液のピーク面積比}) / (\text{標準溶液のピーク面積比}) \times 4 \times (\text{D-PBS(-)による組織破碎液の希釈率}) / 5$$

転移/健常リンパ節中の対投与量換算 released EPI 量 (% dose/g organ)

$$=[\text{EPI} \cdot \text{HCl} \text{ の秤取量 (mg) } ] / 2,500 \times (\text{試料溶液のピーク面積比}) / (\text{標準溶液のピーク面積比}) \times 4.5 \times (\text{D-PBS(-)による組織破碎液の希釈率}) / 5$$

### 6.2.5 Alexa 647 標識 EPI/m の原発腫瘍内分布の観察

原発腫瘍切除下における成熟期 ALNM 残存乳がんモデルマウスを第 5 章に示す手法にて作製した後, EPI 換算として 50 mg/kg の Alexa 647 標識 EPI/m 分散液を尾静脈投与した. 投与後 24 時間経過時点において, イソフルラン麻酔下放血致死によりマウスを安楽死処置し, 転移リンパ節を採取した. その際, DyLight 488 conjugated tomato lectin と Hoechst 33342 との 1/1 混液を臓器摘出の 30 分前に投与し, 腫瘍血管と細胞核を染色した. 摘出した転移リンパ節は直ちに 300 μg/mL VivoGlo ルシフェリン/D-PBS(-)溶液に浸漬し, *in vivo* イメージングシステム (IVIS, PerkinElmer) により病変部位を同定した. その後, 転移リンパ節における Alexa647 標識 EPI/m の分布を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy, CLSM, Nikon A1R, および ECLIPSE FN1 ; Nikon, Tokyo, Japan) を用いて観察した. Alexa647 標識 EPI/m, DyLight 488 conjugated tomato lectin, および Hoechst 33342 は, それぞれ波長 640, 489,

および 404 nm のレーザーにより励起し、662.5–737.5, 500–550, および 425–475 nm のバンドパスフィルターを用いて蛍光を検出した。CLSM 観察後の転移リンパ節は、10%中性緩衝ホルマリン溶液を用いて浸漬固定した後、パラフィンに包埋した。得られたパラフィン包埋ブロックを 5  $\mu\text{m}$  に薄切した後、ヘマトキシリンおよびエオジン (hematoxylin and eosin, H&E) 染色し、光学顕微鏡下にて ALNM の部位を観察し、IVIS 測定における発光部位との相関性を確認した。

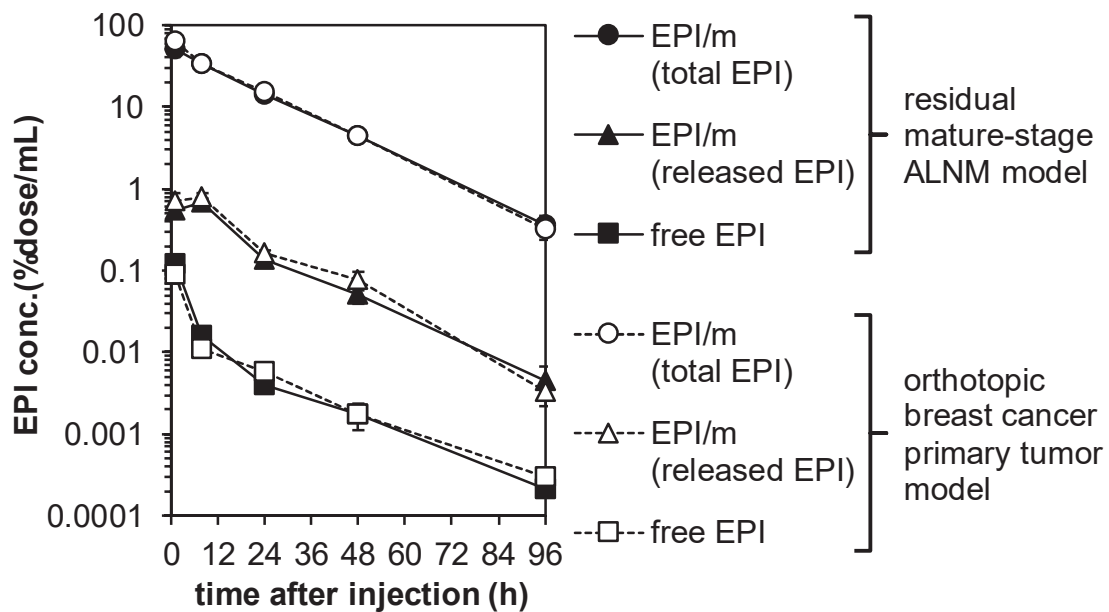
## 6.3 結果および考察

### 6.3.1 EPI/m の血漿中濃度推移のモデル間差に関する検証

EPI/m と同様に PEG-*b*-poly(amino acid)から構成される薬物内包高分子ミセルは、血管系を介してリンパ節転移に集積し選択的に滞留する特性を有することが Cabral らの研究により明らかとなっている[12]。また、この特性には高分子ミセルの血中滞留性が関与すると考えられている[12]。従って、EPI/m の成熟期 ALNM に対する集積特性を考察するためには、ミセルの血中滞留性を考慮に入れる必要があると考えられる。

EPI/m の血中滞留性については、既に第 4 章において TNBC 同所移植モデルマウスを用いた検証を行っている。一方、本章で用いた成熟期 ALNM 残存モデルマウスは、腫瘍細胞の移植部位および原発腫瘍の切除の有無等の点で実験条件が異なる。そこで、本章で用いたモデルマウスについても薬物の血漿中濃度を測定し、両担がんモデル間の推移を比較した。EPI 換算として 25 mg/kg の free EPI 溶液もしくは EPI/m 分散液を尾静脈投与し、1, 8, 24, 48, 96 時間経過時点において血液を採取し、RPLC を用いて血漿中 EPI 濃度を定量した。その際 EPI/m に関しては、動物投与後におけるミセルからの EPI の遊離を考慮し、EPI/m から遊離した EPI 濃度 (released EPI) と released EPI に高分子結合 EPI を含めた総 EPI 濃度 (total EPI) を、それぞれ異なる試料調製処理により定量した (Figure 6-1)。評価の結果、成熟期 ALNM 残存モデルマウスにおけ

る薬物の血中濃度推移は TNBC 同所移植モデルマウスにおける挙動と一致し、モデル間での同等性が示された。従って EPI/m は、成熟期 ALNM 残存モデルにおいても free EPI と比較して高い血中滞留性を示すと共に、血中循環中において担持薬物の遊離を最小限に抑制すると考えられた。

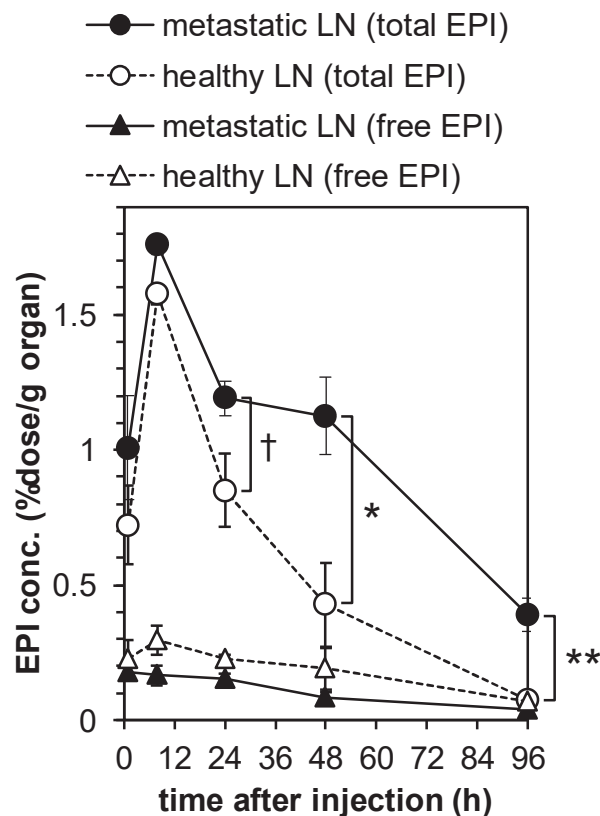


**Figure 6-1.** Comparison of drug concentrations in plasma between the orthotopic breast cancer primary tumor model and the residual mature-stage axillary lymph node metastasis (ALNM) model at 1h, 8h, 24h, 48h and 96h after injection of EPI/m or free EPI at 25 mg/kg on an EPI basis. For EPI/m, both of total drug concentration (released drug and polymer conjugated drug in micelle, total EPI) and released drug from micelle (released EPI) were quantified. Trends in the orthotopic breast cancer primary tumor model were quoted from chapter 4. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=3).

### 6.3.2 転移/健常リンパ節における EPI/m の組織中濃度推移

次に、転移/正常リンパ節中の薬物濃度を測定し、EPI/m と free EPI の集積挙動を比較した。実験では前項の検討における血液採取と同時点において、転移リンパ節と反対側の健常腋窩リンパ節を摘出し、組織中の total EPI もしくは free EPI 濃度をそれぞれ定量した (Figure 6-2)。

total EPI について転移/健常リンパ節間の集積挙動を比較したところ、その組織中濃度は投与後 8 時間時点までは両リンパ節間で同等の推移であった。しかし、24 時間以降においては転移リンパ節中の total EPI 濃度 (black circles in Figure 6-2) は健常リンパ節 (white circles in Figure 6-2) よりも有意に高値を推移した。これらの経時的な濃度推移の差異は、EPI/m が転移リンパ節に対して選択的に滞留する可能性を示唆した。一方、free EPI の組織中濃度は健常リンパ節 (white triangles in Figure 6-2) において転移リンパ節 (black triangles in Figure 6-2) よりもわずかに高値を推移した。また投与群間の組織中濃度を比較したところ、転移リンパ節における total EPI の濃度は free EPI と比較して 10 倍以上の高値を推移した。



**Figure 6-2.** Drug concentrations in metastatic lymph node (LN) and contralateral healthy LN at 1h, 8h, 24h, 48h and 96h after injection of EPI/m or free EPI at 25 mg/kg on an EPI basis. EPI/m was quantified as total drug concentration from micelle (released drug and polymer conjugated drug in micelle, total EPI). Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=3). † > 0.05, \* < 0.05 and \*\* < 0.01 were determined by Student's *t*-test.

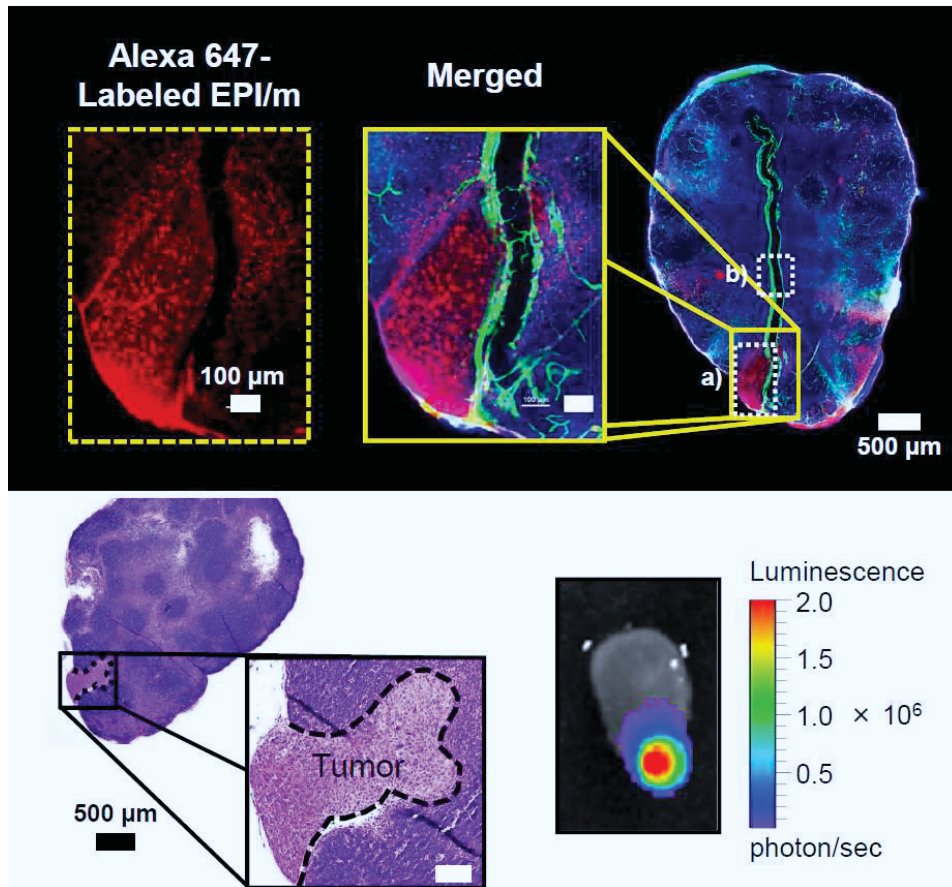
### 6.3.3 転移リンパ節における EPI/m の微小分布の観察

さらに、転移リンパ節におけるミセルの集積特性について詳細に検証するため、蛍光顕微鏡を用いて EPI/m の微小分布を観察した。実験では、成熟期 ALNM 残存モデルマウスに対して Alexa 647 標識 EPI/m を投与し、投与 24 時間後に転移リンパ節を摘出し CLSM にて観察した。その際、DyLight 488 conjugated tomato lectin と Hoechst 33342 との 1/1 混液を臓器摘出の 30 分前に投与し、腫瘍血管と細胞核を染色した

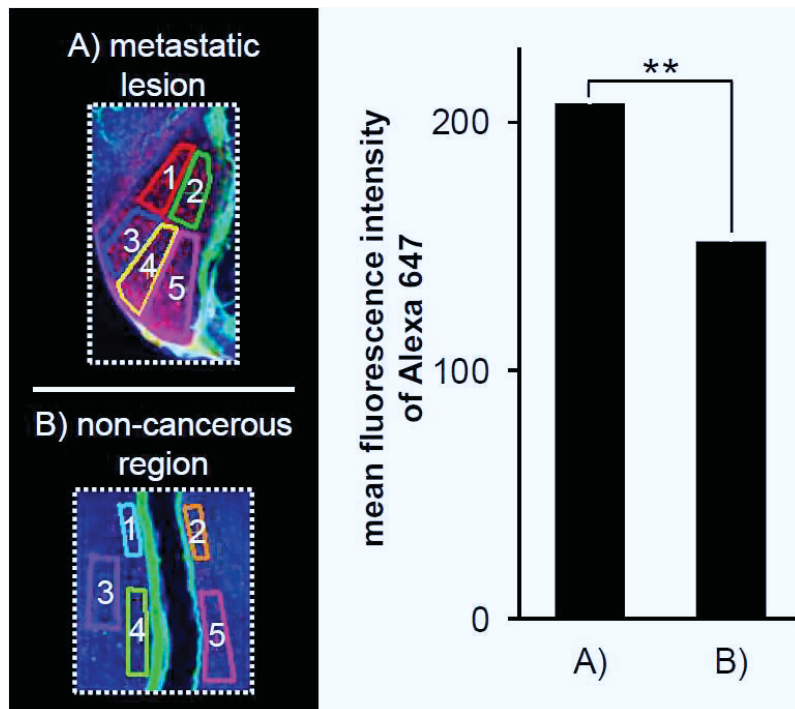
(Figure 6-3).

観察の結果, Alexa 647 標識 EPI/m に由来する赤色蛍光の分布は, H&E 染色による組織切片観察, および *ex vivo* での IVIS 測定より同定した転移部位と一致した (Figure 6-3 a)). さらに, 転移部位と非がん性部位について関心領域 (region of interest, ROI) を指定し蛍光強度を定量したところ, Alexa 647 標識 EPI/m に由来する赤色蛍光は転移部位において有意に高値を示した (Figure 6-3 b)). これらの観察結果は, Figure 6-2 において total EPI の濃度推移から示唆された EPI/m の転移リンパ節における滞留に, ミセルの成熟期 ALNM への選択的な浸透と均一な分布が関与することを示唆すると考えられる.

a)



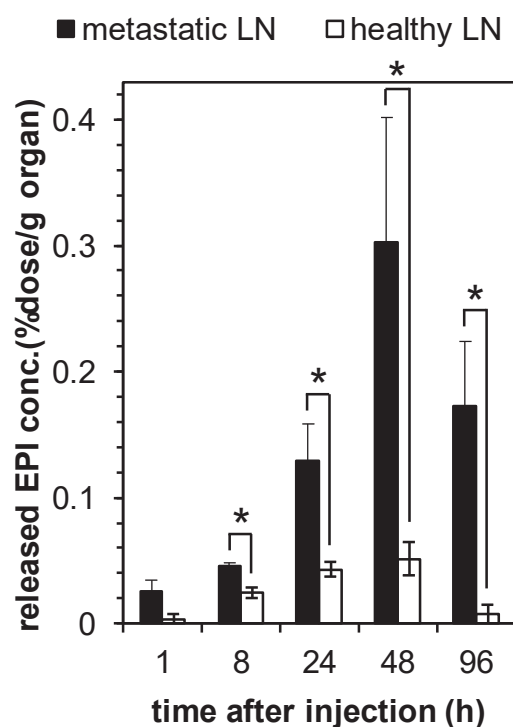
b)



**Figure 6-3.** The microdistribution of Alexa 647 labeled EPI/m in the metastatic lymph node. a) Fluorescence microscopic images of the metastatic lymph node (LN) excised from the mouse 24 h after injection of Alexa 647 labeled EPI/m. Perfused blood vessels (green) and the cell nuclei (blue) were stained with an injection of DyLight 488 conjugated tomato lectin and Hoechst 33342, respectively. The metastatic lesion of the excised metastatic lymph node was identified by bioluminescent measurement and H&E staining of ordered section. b) Quantification of the fluorescent intensity from the micelle within the metastatic lesion and in the non-cancerous region of the excised lymph node. The regions on interest were created from five independent areas of each region shown in magnification images from white dotted square in a). Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=5). \*\* < 0.01 was determined by Student's *t*-test.

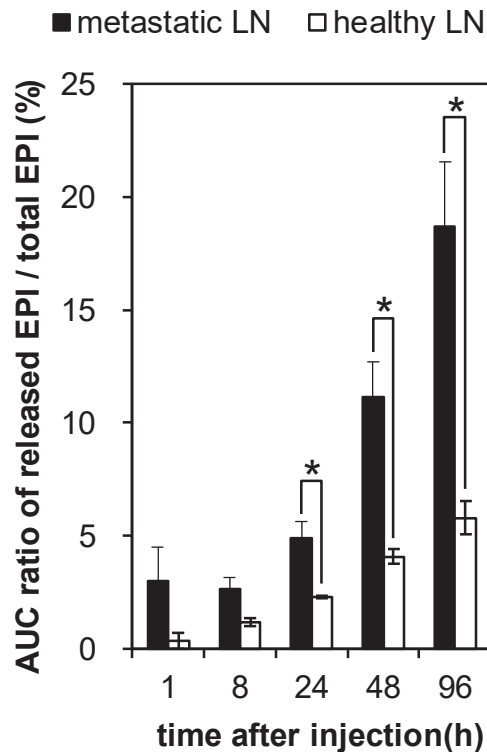
#### 6.3.4 転移/健常リンパ節における EPI/m の薬物放出挙動に関する検証

次に、成熟期 ALNM 到達後におけるミセルからの薬物放出特性について考察するため、転移/健常リンパ節における EPI/m から遊離した EPI (released EPI) の濃度推移を比較した (**Figure 6-4**)。転移リンパ節内の released EPI 濃度 (black bars in **Figure 6-4**) は、投与後 8 時間以降において健常リンパ節 (white bars in **Figure 6-4**) よりも有意に高値を推移した。この点に関して、投与後 8 時間時点での total EPI の組織中濃度推移は両リンパ節間で同等であり (**Figure 6-2**)、EPI/m の集積量に転移/健常リンパ節間の差は無いことが示唆されている。従って、投与後 8 時間時点における転移リンパ節内の released EPI 濃度の増大は、EPI/m の薬物放出が転移リンパ節において促進されている可能性を示唆すると考えられる。



**Figure 6-4.** Released EPI concentration from EPI/m in metastatic lymph node (LN) and contralateral healthy LN at 1h, 8h, 24h, 48h and 96h after injection of EPI/m on an EPI basis. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=3). \* < 0.05 was determined by Student's *t*-test.

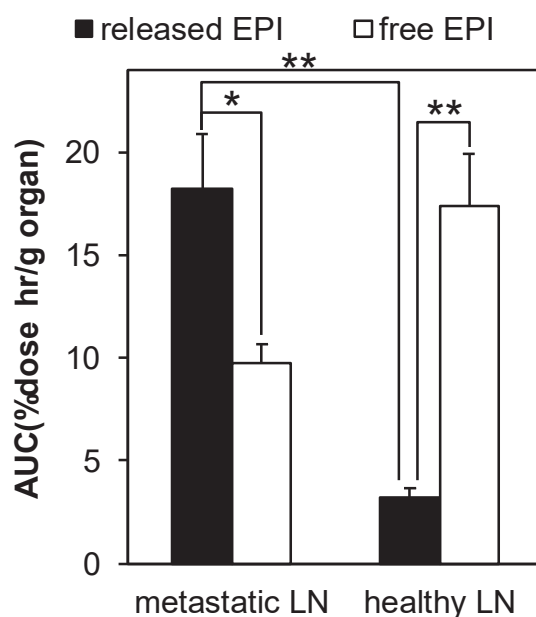
そこで、転移/健常リンパ節間での EPI/m の薬物放出挙動の差異についてさらに考察するために、各測定時点までの released EPI と total EPI の時間曲線下面積 (area under the concentration-curve, AUC) 比を解析し、両リンパ節間の推移を比較した (**Figure 6-5**)。その結果、AUC 比は転移/健常の両リンパ節において経時的な増加傾向を確認した。また、健常リンパ節では 96 時間まで一定の微弱な推移を示したのに対し、転移リンパ節においては投与 8 時間以降で急激に増加する傾向を示した (**Figure 6-5**)。転移リンパ節における AUC 比は 24 時間以降において健常リンパ節よりも有意に高値を示した (**Figure 6-5**)。投与 24 時間後の転移リンパ節における EPI/m の微小分布 (**Figure 6-3**) を考慮すると、これらの挙動は EPI/m からの薬物放出が成熟期 ALNM において促進されている可能性を示唆すると考えられる。



**Figure 6-5.** Changes in the area under the concentration-curve (AUC) ratio of release EPI and total EPI from EPI/m in metastatic lymph node (LN) and contralateral LN. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n = 3). \* < 0.05 was determined by Student's *t*-test.

また、第5章において示した成熟期 ALNM に対する EPI/m の増殖抑制効果に関する研究結果について、活性成分の転移/健常リンパ節における累積量の観点から比較した。転移/健常リンパ節における released EPI と free EPI の AUC を比較したところ、転移リンパ節における released EPI の AUC は free EPI を有意に上回ることが明らかとなった (**Figure 6-6**)。従って、EPI/m は転移リンパ節に対して free EPI よりも大量の活性成分を送達することにより、特異的に成熟期 ALNM の増殖を抑制したと考えられた。さらに健常リンパ節での比較においては、released EPI の AUC は free EPI を有意に下回った。第5章において、EPI/m は free EPI の最大耐用量 (10 mg/kg) [13]の 2.5 倍に相当する高用量投与においても担がんモデルマウスの体重減少を引き起こさず、

高い忍容性が示唆されている。従って、健常リンパ節における released EPI の低い AUC は、EPI/m が正常臓器での薬物放出を抑制することにより全身性の分布に伴う free EPI の副作用を軽減したことを示唆すると考えられる。



**Figure 6-6.** Comparison of the area under the concentration-curve (AUC) between released EPI concentration from EPI/m (released EPI) and free EPI concentration in metastatic lymph node (LN) and contralateral healthy LN. The AUC were calculated from each drug concentrations at 1h, 8h, 24h, 48h and 96h after injection of EPI/m or free EPI at 25 mg/kg on an EPI basis. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n=3). \* < 0.05 and \*\* < 0.01 were determined by Student's *t*-test.

### 6.3.5 考察

本章では、第5章において明らかとなった EPI/m の成熟期 ALNM に対する特異的な増殖抑制効果について、転移/健常リンパ節に対するミセルの集積特性と集積後における薬物放出の選択性の観点から検証した。その結果、EPI/m は成熟期 ALNM に選択的に分布することで、転移リンパ節に健常リンパ節よりも長時間滞留することが明

らかとなった。さらに、EPI/m は転移リンパ節において内包薬物の放出を選択的に促進し、free EPI の溶液投与よりも多量の活性成分を成熟期 ALNM に供給したと考えられた。このような EPI/m の集積特性と内包薬物の放出特性は、第 5 章において示された成熟期 ALNM に対する EPI/m の特異的な増殖抑制効果を支持する知見であると考えられる。

Cabral らは、poly(L-glutamic acid) に (*trans*-l-1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt) を内包した高分子ミセル (DACHPt/m, NC-4016) を用いて種々の転移がんモデルマウスに対する治療効果を検討している[12,14–17]。中でも悪性黒色腫のリンパ節転移に対する治療効果を検討した報告では、DACHPt/m が血管系を介して病変部位に直接集積し滞留することを示しており、その集積特性に薬物キャリアの血中滞留性が関与することを主張している[12]。当該研究における DACHPt/m の血中での残存率は投与後 6 時間時点において約 60 %であり[12]、**Figure 6-1** における total EPI の血漿中濃度推移と合致する。従って、**Figure 6-2** において示された EPI/m の転移リンパ節における滞留は、ミセルの血管系を介した直接的な集積によりもたらされた効果であると考えられる。

また Cabral らは、粒子径が薬物キャリアの腫瘍組織への浸透性に関与する構造因子であることを見出し、治療効果にも影響を及ぼすことを明らかにしている[12,18]。Cabral らの知見によれば、粒子径 50 nm 以下の高分子ミセルはリンパ節転移巣を含む腫瘍の深部領域への到達が可能であり、高い腫瘍増殖抑制効果を示し得る[12,18]。本研究における成熟期 ALNM の CLSM による観察結果 (**Figure 6-3**) からは、EPI/m が成熟期 ALNM に選択的に浸透し均一に分布することが明らかとなっている。従って、粒子径 55 nm (第 2 章参照) の EPI/m は成熟期 ALNM にも浸透可能な大きさであり、その高い組織浸透性が抗腫瘍効果の増強に寄与したと考えられる。

さらに、成熟期 ALNM の増殖抑制効果に EPI/m の pH 応答性薬物放出能が関与す

ることを示唆する知見として、転移リンパ節における released EPI の生成量は健常リンパ節よりも有意に高値を推移することが明らかとなった (Figure 6-4 および 6-5). この点に関して、pH 応答性ナノメディシンは転移がんにも治療効果を示すことが明らかになっているにも関わらず、その詳細な薬物送達機序に関しては依然として解明されていない[9]. 一方、イメージングの分野においては、Mi らの開発した PEG 化リン酸カルシウムナノ粒子[19]や、Xiong らの開発した PEG 化近赤外プローブ[20]のような pH 応答性生体材料が高感度な微小転移の検出を達成している. これらのプローブはいずれも、第 2 章において示した EPI/m の薬物放出特性と同様に腫瘍微小環境 (tumor microenvironment, TME) や後期エンドソームに相当する酸性条件にて特異的に活性化する性質を有している[19,20]. 従って、転移リンパ節における EPI/m の遊離は腫瘍周辺の酸性環境によって選択的に促進されたものであると推察される.

なお第 5 章の検討では、EPI/m が血管新生の無い早期 ALNM においても free EPI に匹敵する増殖抑制効果を示している. 健常リンパ節における released EPI と free EPI の AUC の比較によれば (Figure 6-6), EPI/m が健常リンパ節において放出する released EPI の量は free EPI よりも少ないため、初期段階の ALNM における増殖抑制効果には異なる機序が関与していると推測される. この点に関して、Wu らは DACHPt/m が TME の炎症性細胞に集積することによって、血管形成前の微小転移を抑制することを明らかにしている[17]. 従って、早期 ALNM においては EPI/m が同様の機序により増殖抑制効果を示したと推察される.

一方、健常リンパ節において EPI/m は、組織から速やかに消失するとともに内包薬物の放出を抑制し (Figure 6-2 および 6-5), 活性成分である released EPI の分布を free EPI の溶液投与と比較して有意に低減した (Figure 6-6). この特性は、第 5 章における抗腫瘍効果の検討において EPI/m が free EPI よりも高い忍容性を示したことと相関する知見であると考えられる. 実際に Mukai らの報告した EPI/m の第 I 相臨床試験結果で

は、推奨用量の向上 (EPI/m 170 mg/m<sup>2</sup> vs. free EPI 100 mg/m<sup>2</sup>) や累積投与量の向上 (EPI/m 2250 mg/m<sup>2</sup> vs. free EPI 900 mg/m<sup>2</sup>) といった毒性低減効果が示されており[21], ヒトにおいても投与量の増大が期待できると考えられる. さらに, フランスの術後化学療法研究グループは, free EPI を含む多剤の高用量投与が, 重篤な副作用のリスクを伴うにも関わらず, 乳がんの術後化学療法において予後を改善することを示している[22]. 第5章において EPI/m は成熟期 ALNM に対して用量依存的な増殖抑制効果の増大を示している. 従って, EPI/m による術後化学療法は, 安全性の向上に伴い既存薬の投与可能量を増大し得る点で, 予後を含む乳がん患者の生活の質の改善に貢献すると考えられる.

## 6.4 結論

本章では, EPI/m の成熟期 ALNM に対する特異的な増殖抑制効果について考察するために, 成熟期 ALNM における EPI/m の集積特性と内包薬物の放出特性を検証した. 転移/健常リンパ節における total EPI の血漿中濃度推移, 並びに転移リンパ節における Alexa 647 標識 EPI/m の微小分布の観察結果より, EPI/m の成熟期 ALNM に対する集積特性として i) 血管系を介した成熟期 ALNM への選択的な分布, および ii) 転移リンパ節における長期間の滞留の2点が明らかとなった. また, 転移/健常リンパ節における released EPI の血漿中濃度推移を free EPI と比較した結果, 転移リンパ節における内包薬物の放出特性として, EPI/m は成熟期 ALNM の酸性環境に応答して内包薬物の放出を促進し, free EPI の溶液投与よりも有意に大量の released EPI を転移リンパ節に供給することが明らかとなった. 以上の結果は, 第5章における EPI/m の成熟期 ALNM に対する特異的な増殖抑制効果を裏付ける知見であると考えられる.

## 6.5 参考文献

- [1] V. Wagner, A. Dullaart, A.K. Bock, A. Zweck, The emerging nanomedicine landscape, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1211–1217. doi:10.1038/nbt1006-1211.
- [2] B.Y.S. Kim, J.T. Rutka, W.C.W. Chan, Nanomedicine, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 2434–2443.
- [3] J. Liu, Y. Huang, A. Kumar, A. Tan, S. Jin, A. Mozhi, X.-J. Liang, pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 693–710. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.009.
- [4] X. Pang, Y. Jiang, Q. Xiao, A.W. Leung, H. Hua, C. Xu, pH-responsive polymer-drug conjugates: Design and progress, *J. Control. Release.* 222 (2016) 116–129. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.024.
- [5] S. Zhu, M. Hong, G. Tang, L. Qian, J. Lin, Y. Jiang, Y. Pei, Partly PEGylated polyamidoamine dendrimer for tumor-selective targeting of doxorubicin: The effects of PEGylation degree and drug conjugation style, *Biomaterials.* 31 (2010) 1360–1371. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.10.044.
- [6] T. Etrych, T. Mrkvan, P. Chytil, Č. Koňák, B. Říhová, K. Ulbrich, N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-based polymer conjugates with pH-controlled activation of doxorubicin. I. New synthesis, physicochemical characterization and preliminary biological evaluation, *J. Appl. Polym. Sci.* 109 (2008) 3050–3061. doi:10.1002/app.28466.
- [7] P. Chytil, S. Hoffmann, L. Schindler, L. Kostka, K. Ulbrich, H. Caysa, T. Mueller, K. Mäder, T. Etrych, Dual fluorescent HPMA copolymers for passive tumor targeting with pH-sensitive drug release II: Impact of release rate on biodistribution, *J. Control. Release.* 172 (2013) 504–512. doi:10.1016/j.jconrel.2013.05.008.

- [8] C. Liang, L. Xu, G. Song, Z. Liu, Emerging nanomedicine approaches fighting tumor metastasis: animal models, metastasis-targeted drug delivery, phototherapy, and immunotherapy, *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016) 6250–6269. doi:10.1039/C6CS00458J.
- [9] X. He, H. Yu, X. Bao, H. Cao, Q. Yin, Z. Zhang, Y. Li, pH-Responsive Wormlike Micelles with Sequential Metastasis Targeting Inhibit Lung Metastasis of Breast Cancer, *Adv. Healthc. Mater.* 5 (2016) 439–448. doi:10.1002/adhm.201500626.
- [10] B.A. Webb, M. Chimenti, M.P. Jacobson, D.L. Barber, Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression, *Nat. Rev. Cancer.* 11 (2011) 671–677. doi:10.1038/nrc3110.
- [11] C. Corbet, O. Feron, Tumour acidosis: From the passenger to the driver's seat, *Nat. Rev. Cancer.* 17 (2017) 577–593. doi:10.1038/nrc.2017.77.
- [12] H. Cabral, J. Makino, Y. Matsumoto, P. Mi, H. Wu, T. Nomoto, K. Toh, N. Yamada, Y. Higuchi, S. Konishi, M.R. Kano, H. Nishihara, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Systemic targeting of lymph node metastasis through the blood vascular system by using size-controlled nanocarriers, *ACS Nano.* 9 (2015) 4957–4967. doi:10.1021/nm5070259.
- [13] A. Takahashi, Y. Yamamoto, M. Yasunaga, Y. Koga, J.I. Kuroda, M. Takigahira, M. Harada, H. Saito, T. Hayashi, Y. Kato, T. Kinoshita, N. Ohkohchi, I. Hyodo, Y. Matsumura, NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, extends the antitumor effect and reduces the cardiotoxicity of epirubicin, *Cancer Sci.* 104 (2013) 920–925. doi:10.1111/cas.12153.
- [14] H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Optimization of ( 1 , 2-diamino-cyclohexane ) platinum ( II ) -loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity, *J. Control. Release.* 121 (2007) 146–155.

- doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.024.
- [15] M. Rafi, H. Cabral, M.R. Kano, P. Mi, C. Iwata, M. Yashiro, K. Hirakawa, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis, *J. Control. Release.* 159 (2012) 189–196. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.038.
- [16] S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Phenylboronic Acid-Installed Polymeric Micelles for Targeting Sialylated Epitopes in Solid Tumors, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 15501–15507. doi:10.1021/ja406406h.
- [17] H. Wu, H. Cabral, K. Toh, P. Mi, Y.C. Chen, Y. Matsumoto, N. Yamada, X. Liu, H. Kinoh, Y. Miura, M.R. Kano, H. Nishihara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation, *J. Control. Release.* 189 (2014) 1–10. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.018.
- [18] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M.R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 815–823. doi:10.1038/nnano.2011.166.
- [19] P. Mi, D. Kokuryo, H. Cabral, H. Wu, Y. Terada, T. Saga, I. Aoki, N. Nishiyama, K. Kataoka, A pH-activatable nanoparticle with signal-amplification capabilities for non-invasive imaging of tumour malignancy, *Nat. Nanotechnol.* 11 (2016) 724–730. doi:10.1038/nnano.2016.72.
- [20] H. Xiong, H. Zuo, Y. Yan, G. Occhialini, K. Zhou, Y. Wan, D.J. Siegwart, High-

Contrast Fluorescence Detection of Metastatic Breast Cancer Including Bone and Liver Micrometastases via Size-Controlled pH-Activatable Water-Soluble Probes, *Adv. Mater.* 29 (2017) 1–10. doi:10.1002/adma.201700131.

- [21] H. Mukai, T. Kogawa, N. Matsubara, Y. Naito, M. Sasaki, A. Hosono, A first-in-human Phase 1 study of epirubicin-conjugated polymer micelles (K-912/NC-6300) in patients with advanced or recurrent solid tumors, *Invest. New Drugs.* 35 (2017) 307–314. doi:10.1007/s10637-016-0422-z.
- [22] the French Adjuvant Study Group, Benefit of a High-Dose Epirubicin Regimen in Adjuvant Chemotherapy for Node-Positive Breast Cancer Patients With Poor Prognostic Factors : 5-Year Follow-Up Results of, *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 602–611.

# 第7章

## 総括

## 総括

転移はがんの死亡要因の 90 %を占めており、治療および診断の重要な標的となっている。女性における罹患率が最も高い乳がんでは、腋窩リンパ節転移 (axillary lymph node metastasis, ALNM) が予後不良の主要なリスクファクターであることから種々の治療手法が集学的に検討されてきている。中でも化学療法は ALNM に対する現状最も有力なアプローチとされ、抗体医薬を利用した分子標的治療等が乳がん患者に対する革新的な治療手法として予後の改善に大きく貢献している。しかし、明確な標的分子が存在しないトリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) では、依然として薬効と副作用のバランスを制御し難い古典的な低分子薬剤の多剤併用のみが治療手法として選択されており、アンメットメディカルニーズとして顕在化している。

一方、ここ十数年の間にナノテクノロジーを基盤とするドラッグデリバリーシステム (drug delivery system, DDS) は、既存薬の有効性と安全性の改善、並びに治療効果の向上をも図れる理想的な薬物送達技術として注目されてきた。現在開発が進んでいるナノテクノロジー応用医薬品 (ナノメディシン) の中でも pH 応答性ナノメディシンには、固形がんへの選択的な集積能に加えて腫瘍組織内の酸性環境に呼応した内包薬物の放出能がその設計に組み込まれている。実際、多くの関連研究によって、Doxil® などの既承認のナノメディシンよりも原発並びに転移腫瘍に対する高い有効性を示すことが確認されつつある。しかし、pH 応答性ナノメディシンの転移がんに対する薬物放出機序については未だ詳細が明らかになっておらず、今後の臨床試験への展開や医療現場での実用を勘案すると更なる研究の必要性が喫緊の課題となっていた。

本研究では、種々の固形がん患者に対する有効性と安全性が第 I 相臨床試験において示されている pH 応答性エピルビシン内包高分子ミセル (epirubicin-loaded pH-responsive polymeric micelle, EPI/m) について、既存薬であるエピルビシン (epirubicin,

EPI) の臨床的な治療条件を模倣しながら、TNBC の ALNM に対する治療効果を検証した。また、EPI/m の標的組織に対する薬物送達機序を詳細に検証し、抗腫瘍効果と機能性との関連について考究した。

第 2 章では、EPI/m の pH 応答性薬物放出能と抗腫瘍活性との関連性について *in vitro* での検証を行った。種々の生理学的条件における薬物放出挙動を評価した結果、EPI/m が腫瘍周辺もしくは細胞内の酸性環境において選択的に内包薬物を放出すると確認された。さらにヒト TNBC 由来細胞を用いた検証結果から、EPI/m の抗腫瘍活性は細胞取り込み後の液胞内における pH 低下に呼応した薬物放出の促進により発現することが明らかになった。

第 3 章では、術前化学療法を模倣した治療条件における EPI/m の *in vivo* 抗腫瘍活性について検証を行った。原発腫瘍共存下の TNBC 同所移植モデルマウスを用いた評価の結果、EPI/m は原発腫瘍の増殖と ALNM の形成を用量依存的かつ有意に抑制した。free EPI の溶液投与では ALNM の抑制作用が見られなかったことから、EPI/m は原発腫瘍および ALNM の双方に対して有効な新規治療薬として位置付けられ、乳がんの術前化学療法に適用可能であると推察された。

第 4 章では、上記の治療条件における EPI/m の特異的な ALNM 抑制作用の機序について考察するため、原発腫瘍に対するミセルの集積特性と腫瘍組織内での薬物放出特性を検証した。組織中の薬物濃度測定および原発腫瘍における蛍光標識ミセルの微小分布の観察結果より、EPI/m は free EPI と比較して原発腫瘍に対して多量の薬物を高分子結合体として送達可能であり、また、腫瘍組織内で内包薬物を選択的に活性化することが明らかとなった。さらに、EPI/m は上記の薬物送達機序により長期間にわたり原発腫瘍内の活性成分濃度を維持し、原発腫瘍からの細胞遊走を効率的に阻害したと考えられた。その結果、原発腫瘍共存下の TNBC 同所移植モデルマウスでは EPI/m が ALNM の形成を高度に抑制したとの知見が新たに見出された。

第 5 章では、術後化学療法を模倣した治療条件における EPI/m の *in vivo* 抗腫瘍活性について検証を行った。原発腫瘍を切除した ALNM 残存 TNBC モデルマウスを用いた評価では、直径 0.2 mm 以下の早期 ALNM に対して、free EPI および EPI/m 共に高い治療効果が示された。しかし、直径 0.2 mm 以上の成熟期 ALNM においては EPI/m のみが有意な増殖抑制作用を示した。これらの知見より、EPI/m は微小転移の大きさに非依存的に治療効果を発揮する新規治療薬として既存薬よりも有用であり、乳がんの術後化学療法への応用が可能であることが明らかとなった。

第 6 章では、原発腫瘍を切除した成熟期 ALNM 残存 TNBC モデルマウスを用いて、EPI/m の転移リンパ節に対する集積特性と内包薬物の放出特性を評価した。転移リンパ節中の薬物濃度測定および蛍光標識ミセルの微小分布の観察結果より、EPI/m は血管系を介して成熟期 ALNM に選択的に分布し、長期にわたって滞留すると考えられた。また転移リンパ節においては、EPI/m が成熟期 ALNM の酸性環境に呼応して内包薬物の放出を促進し、free EPI よりも有意に多い released EPI を供給した。一方、健常リンパ節中の薬物濃度測定結果より、正常組織において EPI/m の薬物放出は抑制され、活性成分の分布は free EPI を有意に下回ることが明らかとなった。これらの結果は、EPI/m の成熟期 ALNM に対する治療効果を裏付ける知見であると共に、pH 応答性ナノメディシンが転移がんにおいても標的組織選択的に内包薬物の放出を促進することを実証した初めての研究例である。

転移の形成は、i) 原発腫瘍から脈管への細胞遊走を起点とし、ii) 脈管内の移動、iii) 正常臓器への浸潤、iv) 微小転移の形成、v) 腫瘍血管の誘導を経て、vi) マクロ転移の形成へと至る多段階の連鎖的な過程によって成り立っている。本研究の知見は、EPI/m が独立した薬物送達機序により TNBC の ALNM 形成過程における複数の段階、すなわち、上記 i), iv), v) の段階を効果的に阻害することを示唆しており、今後の臨床応用における EPI/m の転移性乳がんに対する有用性を確証し得る。

さらに本研究の知見は、以下の2つの点に於いて転移がんを標的としたナノメディシンの分子設計に新たな指針を提示可能とする。

はじめに、EPI/mが成熟期ALNMにおいて内包薬物の放出を促進し、増殖阻害効果を発揮した点（第5章および第6章）は、生体内の酸性環境で選択的に解離する高分子-薬物間の結合、すなわちヒドラゾン結合やcis-アコニチル結合の薬物キャリアへの導入が、原発腫瘍のみならず初期転移腫瘍を標的としたナノメディシンの設計においても有用であることを強く示唆している。

次に、EPI/mが原発腫瘍からの細胞遊走を阻害し、特異的にALNMの形成を抑制した点（第3章および第4章）は、ナノメディシンが既存薬の薬効を増強し、転移の抑制にも働き得ることを示した重要な知見であると考えられる。これまでfree EPIによる転移抑制は、全身性の分布に伴う重篤な心機能障害への懸念により*in vivo*での実証が困難とされ、潜在的な薬理作用として認識されていた。本研究の知見は、ナノメディシンが内包薬物の組織分布を時空間的に制御することにより、既存薬の細胞増殖抑制作用を最大限まで引き出すとともに転移の抑制作用にまで薬理作用を反映させ得る可能性を有することを示唆している。

また本研究では、EPI/mの原発および初期転移腫瘍における抗腫瘍活性の発現に標的組織の酸性化が関与することを明らかにしている（第2章、第4章、第6章）。しかし、がんの多様性を考慮すると転移腫瘍における酸性化の実態は依然として不明確であるため、標的組織の酸性化度のばらつきによってEPI/mの治療効果が変動する可能性も懸念される。従って、EPI/mの優れた抗腫瘍効果を臨床応用においても再現するためには、標的組織の酸性化を治療前に判定する技術についても考慮に入れる必要がある。現在の乳がんの化学療法では、バイオマーカーの高精度かつ簡便な体外診断技術の発展が分子標的治療における高い奏効率の達成に貢献していることから、EPI/mの臨床応用に向けた新たな治療前診断技術の開発は不可欠であると考えられる。

実際、診断の分野においても微小転移に滞留し組織内の酸性化度を判定可能な診断用ナノマテリアルの開発が数多く試みられているが、未だ臨床で応用されるには至っていない。がん組織の実態に関する包括的な理解の不足、治療と診断の融合を目指したキャリアプラットフォームの開発状況、およびナノメディシンを対象としたレギュラトリーサイエンスの整備状況などがナノマテリアルの臨床応用を加速するための課題とも考えられる。しかし、本研究で見出された pH 応答性ナノメディシンの転移がんへの応用に関する知見は、今後の pH 応答性診断/治療用ナノ粒子の研究開発へも十分に転用できるであろうことに疑いの余地はない。さらに、このような材料工学を基盤としたナノメディシンの医療分野への応用は、既存の生理学的手法では検証困難、かつ未だに全容が明らかとなっていない悪性腫瘍の病態解明を支援し、医学の更なる進歩へも貢献し得ると確信する。