

崇 城 大 学 学 位 論 文

高分子化亜鉛プロトポルフィリンを使った
光線力学療法による抗腫瘍効果に関する研究

平 成 2 9 年

江 口 佳 菜 未

高分子化亜鉛プロトポルフィリンを使った
光線力学療法による抗腫瘍効果に関する研究

江口 佳菜未

A study of zinc protoporphyrin-polymer
conjugates for photodynamic antitumor therapy

Kanami Eguchi

September, 2017

目 次

第1章 緒 論	1
第2章 スチレン-マレイン酸コポリマー結合型亜鉛プロトポルフィリン(SMA-ZnPP)の調製と蛍光イメージング	3
2. 1 背 景	3
2. 2 実験材料および実験方法	5
2. 3 実験結果	9
SMA-ZnPP の調製	9
SMA-ZnPP の蛍光特性	11
SMA-ZnPP の細胞傷害性と薬物動態と蛍光イメージング	14
2. 4 考 察	16
第3章 ヒアルロン酸結合型亜鉛プロトポルフィリン(HA-ZnPP)の調製と抗腫瘍効果	18
3. 1 背 景	18
3. 2 実験材料および実験方法	19
3. 3 実験結果	25
HA-ZnPP の調製と特性評価	27
HA-ZnPP の抗腫瘍効果の評価	37
3. 4 考 察	44
第4章 結 論	46
謝 辞	48
参考文献	54

本論文で使した略号一覧

DMEM	ダルベッコ改変イーグル培地	Dulbecco's modified Eagle medium
DMF	<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	ジメチルスルホキシド	dimethylsulfoxide
EPR	enhanced permeability and retention	
ESR	電子スピン共鳴	electron spin resonance
HA	ヒアルロン酸	hyaluronic acid
HPLC	高速液体クロマトグラフィー	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	半数阻害濃度	50% inhibitory concentration
PBS	リン酸緩衝生理食塩水	phosphate-buffered saline
PDT	光線力学療法	photodynamic therapy
PEG	ポリエチレングリコール	poly(ethylene glycol)
PHPMA	poly(<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methacrylamide)	
PP	プロトポルフィリン IX	protoporphyrin IX
PPED	bis(ethylenediamino)protoporphyrin	
ROS	活性酸素種	reactive oxygen species
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム	sodium dodecylsulfate
SMA	poly(styrene-co-maleic acid)	
THF	テトラヒドロフラン	tetrahydrofuran
TLC	薄層クロマトグラフィー	thin layer chromatography
ZnPP	亜鉛プロトポルフィリン	zinc protoporphyrin
ZnPPED	zinc bis(ethylenediamino)protoporphyrin	

第1章 緒 論

今日のがん治療では、外科的療法、化学療法、放射線療法の三つの手法が主要な治療法となっている。抗がん剤を使った薬物療法による治療は化学療法の主体である。がんの進行期は外科的療法(手術)が治療の主体となるが、治癒、症状出現延長、緩和、延命を目的として、術前後に化学療法が実施される。

抗がん剤の作用機序は、DNA 合成阻害、細胞分裂阻害、代謝拮抗など多岐にわたる。抗がん剤は、がん細胞に対して高い細胞傷害性を示すことが認められる一方で、正常細胞に対しても毒性を示すため、投与量に制限が設けられているものが多い。正常細胞への有害な副作用を抑えるために、がん細胞への指向性を向上させる試みが行われ、抗がん剤の誘導体化や分子標的薬などの開発に力が注がれてきた。

固形がん組織の形態的特徴に基づいた **enhanced permeability and retention (EPR)** 効果を利用してがんに対する選択的毒性を上げるための研究も、がん細胞への指向性を向上させる試みのひとつである。正常組織における血管内皮細胞の間隙は 5 nm 以下であるため、血中に投与された数十 nm の大きさの分子あるいは分子集合体は、その血管内皮細胞間隙を通過することはできない。しかし、がん組織における血管内皮細胞の間隙はおよそ 200–300 nm であり、コロイドサイズの物質であっても血管内皮細胞間隙を透過してがん組織内へ分布することができる。このような現象に基づいて数十 nm 以上の大きさの抗がん剤を利用することにより、効果的にがん組織を攻撃することが可能になる[1–6]。

他方、がん組織選択的に傷害を与える治療法に、光線力学療法 (**photodynamic therapy**、**PDT**) がある。そのメカニズムは、光増感剤に、特定波長の光が照射されることで、光増感剤が基底状態から一重項状態へと励起される。そして、項間交差により三重項状態となり、分子状酸素にエネルギーを与えながら基底状態に戻る。このときエネルギーを与えられた分子状酸素が **ROS** となる。この **ROS** が、がん組織に損傷を与えることで、がん治療を可能とする[7–10]。

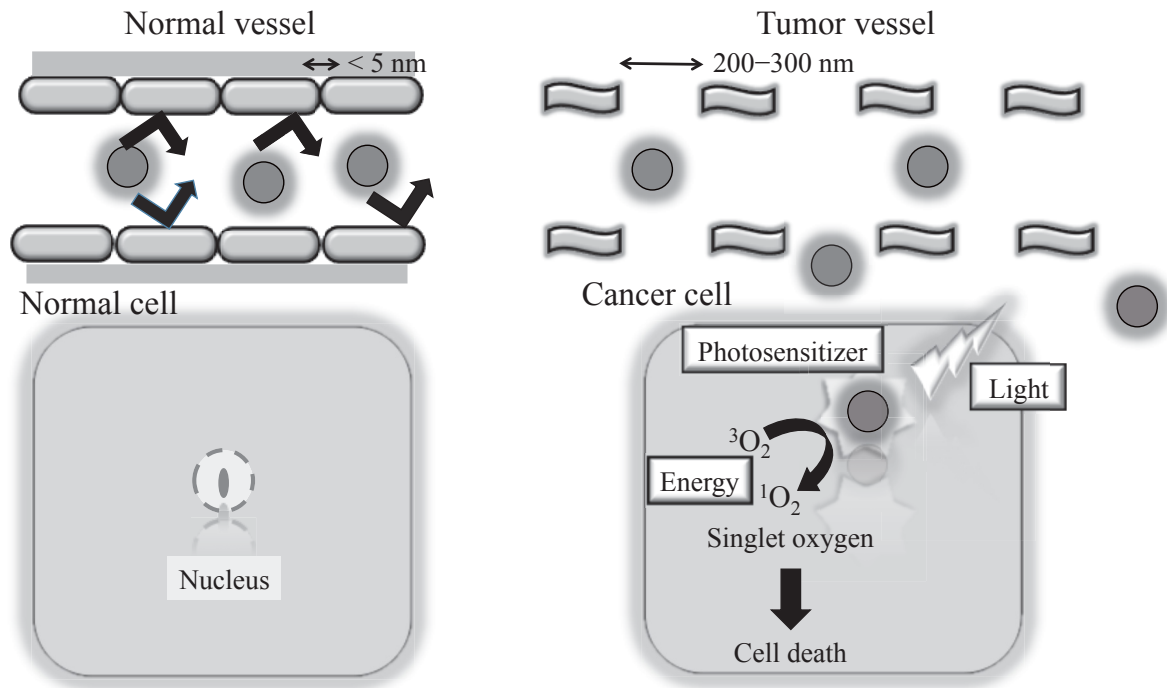


Figure 1. Schematic drawing of enhanced permeability and retention effect and photodynamic therapy

PDT は患部への低エネルギーの光照射による治療であり、正常組織へのダメージが非常に少ないというメリットがある[11-15]。また、単回のみではなく、繰り返し実施が可能である。手術では取り除くことが困難な病巣部にも適用することが可能であり、低侵襲的である。さらに、高齢者や体力がなく手術や放射線療法が受けられない患者にも適用することができる。わが国ではフォトフリンを静注投与して約 48 時間後に腫瘍部位に 630 nm のエキシマダイレーザーを照射する方法で、早期肺癌および表在性食道癌、表在性早期胃癌、子宮頸部初期癌において 1996 年に認可されている。一重項酸素が細胞膜やミトコンドリアを傷害し細胞死を引き起こすと言われている。しかし、フォトフリンやレザフィリンは、がん組織に対する選択性が低いこと、また、皮膚に分布した薬物によって生じる光線過敏症が問題となっている。

本研究では EPR 効果と PDT を組み合わせることで、正常組織へのダメージが軽減すると考えられ、選択的ながん治療を目指して検討を行った。

第2章 スチレン-マレイン酸コポリマー結合型亜鉛プロトポルフィリン(SMA-ZnPP)の調製と 蛍光イメージング

2.1 背景

亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)は、4つのピロールから構成されるポルフィリン環に、4つのメチル基と、2つのビニル基、2つのカルボキシエチル基が結合したプロトポルフィリン IX (PP) に、亜鉛が配位した化学構造を有している (Figure 2)。ZnPP の抗腫瘍効果は後述する二つの機能に起因するものであると考えられている。その 1 つ目は、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の阻害である。HO-1 は、肝臓や脾臓に多く発現する酵素であり、生理的にヘムの分解を担っている。その分解の過程において、一酸化炭素 (CO) や biliverdin を産生する。CO や biliverdin は、抗酸化効果や抗アポトーシス効果を示し、細胞生存因子として機能する [16-21]。そのため ZnPP が HO-1 を阻害することにより、CO や biliverdin の産生を抑制し、細胞に酸化ストレス傷害による細胞死を誘導する [22-27]。PP に配位する金属は HO-1 阻害作用に強く影響し、金属フリーの PP や Fe-PP、Cu-PP、Ni-PP、Co-PP などは HO-1 阻害作用を示さず、Zn-PP、Sn-PP、Mg-PP のみが HO-1 阻害作用を示すことが知られる [28]。2 つ目は、ZnPP は光増感剤として働く点である。ZnPP に波長 400–700 nm の可視領域の光を照射すると、活性酸素の一種である一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) が発生する。ZnPP の $^1\text{O}_2$ 発生量子収率はポルフィリン系薬物の中でも特に高いため、ZnPP は優れた光増感剤と考えられる。代表的なポルフィリン系薬物と量子収率を示す、ZnPP (0.91)、PP (0.56)、クロリン e6 (0.64)、フォトフリン (0.89) [29]。 $^1\text{O}_2$ は反応性が高く、細胞内で DNA 損傷やタンパク質、脂質等の酸化を引き起こし、細胞傷害を招く。

上記のように、ZnPP は HO-1 の阻害および活性酸素の生成を介して、優れた細胞傷害性を示すが、難水溶性であり、かつ *in vivo* において腫瘍集積性の低さを示す [8, 30]。これまでに、合成高分子であるポリエチレングリコール (PEG) やポリヒドロキ

シプロピルメタアクリルアミド (PHPMA) を ZnPP に結合した PEG-ZnPP や PHPMA-ZnPP では、高い腫瘍集積性を示すことを明らかにしている。しかし、PEG-ZnPP および PHPMA-ZnPP は細胞内への取り込み率が低く、ZnPP による細胞傷害性は十分に発揮されていなかった[31-34]。

本章では、PEG や PHPMA に代えて、ZnPP にエチレンジアミン鎖を導入し (ZnPPED)、スチレン-マレイン酸コポリマーと共有結合させた SMA-ZnPP (Figure 2) を調製し、水溶性ならびに腫瘍への集積性を改善することを企図した[35]。

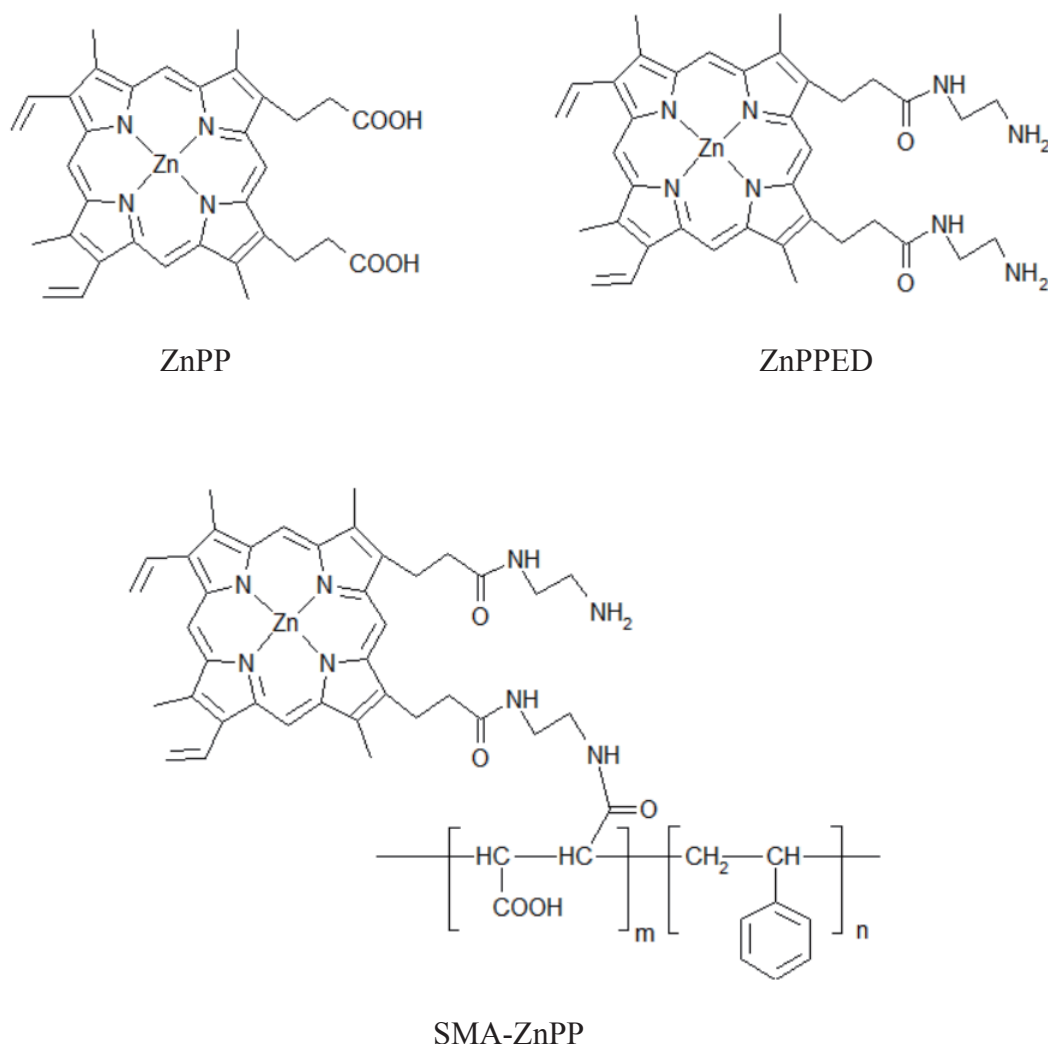


Figure 2. Chemical structures of zinc protoporphyrin (ZnPP), zinc bis(ethylenediamino) protoporphyrin (ZnPPED) and poly(styrene-co-maleic acid)-conjugated zinc protoporphyrin (SMA-ZnPP).

2. 2 実験材料および実験方法

実験材料

プロトポルフィリン IX (PP) およびスチレン-無水マレイン酸共重合体 (SMA) (平均分子量 7,000) はシグマアルドリッチ社製を使用した。3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) および水溶性カルボジイミド (WSC) は同仁化学から購入した。その他の試薬は、和光純薬の特級あるいは相当品を購入し、精製することなく使用した。

Bis(ethylenediamino)protoporphyrin (PPED) の合成

プロトポルフィリン IX (PP) 100 mg (0.178 mmol) をテトラヒドロフラン (THF) 20 mL に入れ懸濁分散させた。内容物を攪拌しながら、10 倍モル当量のトリエチルアミン 0.245 mL、クロロギ酸エチル 0.34 mL を順次ゆっくりと滴下し、氷浴中で 20 分間反応させた。室温に戻してさらに 10 分間反応させた。ろ紙 (5C、150 mm、アドバンテック) を用いてろ過後、50 °C の温浴中でエバポレーターを使用して、THF や未反応のクロロギ酸エチルを留去した。THF を再び 20 mL 加え溶解した後、エチレンジアミン 2.4 mL 中に、滴下により加え、15 分間反応させた。反応終了後は、40 °C で、ロータリーエバポレーターで THF を留去し、数回に分け、大量の蒸留水を加えて沈殿させ、未反応のエチレンジアミンを分離した。凍結乾燥により褐色粉末状の PPED を得た。

得られた PPED は HPLC 分析に供した。分析条件は、Asahipak GF-310 (内径 7.5×300 mm、昭和電工) のカラムで、移動相は 10ppm トリフルオロ酢酸含有ジメチルスルホキシド (3)/メタノール (7) 混合液、溶出時間 15 分、流速は 0.8 mL/min、検出波長は 415 nm である。PPED では、溶出時間 12 分に出現する PP のピークが消失し、新たに 5.1 分にピークが現れた。

TLC (展開溶媒 クロロホルム/メタノール=9/1 (v/v)、シリカゲル 60F₂₅₄、MERCK)

で R_f 値の確認を行った。PP の R_f 値は 0、クロロギ酸エチルで活性化した活性化 PP の R_f 値は 0.9、PPED の R_f 値は 0、色は暗褐色であった。

Zinc bis(ethylenediamino)protoporphyrin(ZnPPED)の合成

PPED 100 mg (0.154 mmol) をジメチルスホキシド (DMSO) 100 mL に溶解させ、PPED の 10 倍モルの酢酸亜鉛を加えた。マグネティックスターラで攪拌しながら 60 °C で 2 時間反応させた。反応溶液を室温まで冷却して、10 倍容量の冷蒸留水 (DMSO 量に対して) を加えて 4,000 g で 5 分間遠心分離し、上清を除去することで未反応の酢酸亜鉛を除去した。

Poly(styrene-co-maleic acid)-conjugated zinc protoporphyrin の合成

Poly(styrene-co-maleic anhydride) (SMA) 100 mg に ZnPPED 20 mg (0.028 mmol)、DMF 10 mL に溶解させた。続いて、ZnPPED の 10 倍モル相当のトリエチルアミンとWSCを加え、遮光下で 60 °C で 24 時間攪拌した。反応終了後、反応溶液に 10 倍量のジエチルエーテルを加えて生成物を沈殿させ、洗浄した。さらに、無水マレイン酸残基を加水分解するために 0.2 M 炭酸ナトリウム溶液 40 mL に溶解させ、60 °C で 24 時間攪拌した。未反応の ZnPPED を取り除くために、ゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex G-50 Fine column) を用いて分離し、さらに、蒸留水で透析した後に凍結乾燥した。

高速液体クロマトグラフィー

UV-2075 UV/可視検出器を装着した高速液体クロマトグラフ LC-2000Plus series (日本分光) を使用した。カラムには Asahipak GF-310 HQ (内径 7.5×300 mm、昭和電工)、移動相には DMF を使用し、流速は 0.5 mL/min、検出波長は 415 nm で行った。

粒子径およびゼータ電位の測定

SMA-ZnPP を 2 mg/mL になるように、リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解させ、孔径 0.45 μm のフィルターでろ過した。得られたろ液を動的光散乱解析装置 ELS-Z2 (大塚電子) に供し、粒子径およびゼータ電位を測定した。

蛍光分光光度法

SMA-ZnPP を DMSO あるいはリン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、蛍光分光光度計 F-4500 (日立ハイテクサイエンス) を使用して励起波長 420 nm、蛍光波長 550–700 nm の蛍光スペクトルを測定した。さらに、SMA-ZnPP 溶液に、Tween 20 (最終濃度 : 0.2、0.5、1 v/v%) あるいは尿素 (最終濃度 : 5、7、9 M)、レシチン (最終濃度 : 0.1、0.2、0.5 mg/mL) を混合し、同様に蛍光スペクトルを測定した。

細胞傷害性の評価

HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん細胞) を 10% ウシ胎児血清 (ニチレイバイオサイエンス) を含んだダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、和光純薬) で 37 °C、5% CO₂ の条件下で培養した。96 well プレート (コーニング) に HeLa 細胞を 3,000 cells/well となるように播種した。24 時間培養した後、異なる濃度の SMA-ZnPP 溶液を一定容量添加した。SMA-ZnPP 溶液添加 24 時間後に、蛍光ブルーライト (波長 420 nm、11.1 W/m²) を使って 15 分間光照射を行い、さらに 24 時間培養を続けた。各 well に 0.5 mg/mL となるように MTT を加えて 3 時間培養した後、培地を除き、DMSO 100 μL を加えてホルマザン色素を溶解させた。マイクロプレートリーダーを使用して、波長 570 nm における吸光度を測定した。

SMA-ZnPP の体内分布測定

6 週齢雄性 ddY マウス (体重 35–40 g) (九動株式会社) の背部に、 2×10^6 cells のマウス肉腫由来 S-180 細胞を皮下接種した。背部に形成された腫瘍径が 10 mm の大きさに成長したマウスに、SMA-ZnPP (15 mg-ZnPP/kg) を尾静脈投与した。投与 24 時間後、

頸椎脱臼により屠殺し、生理食塩水で灌流した後に所望の臓器を摘出した。取り出した臓器は、100 mg 当り 1 mL の DMSO を加えて破碎し、12,000 g で 10 分間遠心分離 (25 °C) した。得られた上清の蛍光強度を測定 (励起波長 420 nm、蛍光波長 590 nm) し、臓器内薬物を定量した。マウスの取扱いは、崇城大学動物実験倫理委員会のガイドラインに従って実施した。

インビボ蛍光イメージング

腫瘍径がおおよそ 10 mm の大きさに成長した担がんマウス (S-180) に、SMA-ZnPP (15 mg-ZnPP/kg) を尾静脈から投与した。適当な時間間隔で IVIS Lumina XR (Caliper Life Science) 装置を使用して、蛍光イメージング (励起波長 430 ± 15 nm、蛍光波長 695–770 nm) を行った。

2. 3 実験結果

SMA-ZnPP の調製

本研究では、Figure 2 に示すように、PPED への亜鉛の配位、ならびに ZnPPED のアミノ基を介して SMA のカルボキシ基に脱水縮合させた。紫外可視吸収スペクトル測定により、PPED のピーク波長は 405 nm から 422.5 nm にシフトし、Q バンドの数が 4 つから 2 つに減少したことより、ZnPPED が合成できたことを確認した。さらに、高速液体クロマトグラフィーを用いて、ZnPPED のピークの消失および SMA-ZnPP のピークの出現を確認した。

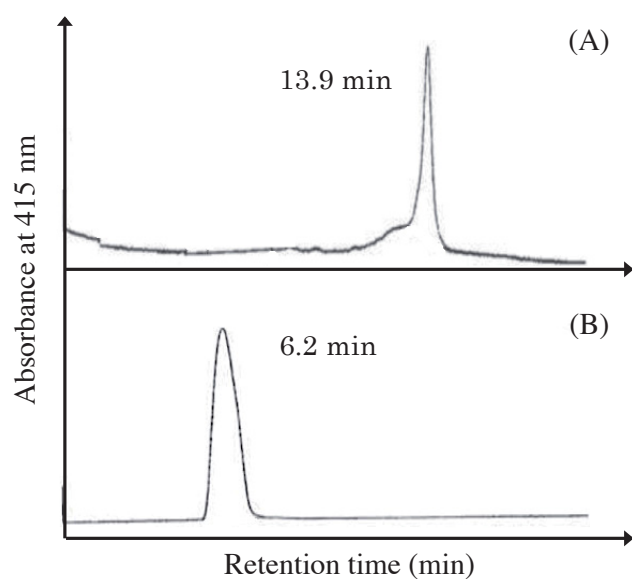


Figure 3. Typical chromatograms of ZnPPED (A) and SMA-ZnPP (B)

SMA-ZnPP conjugate was analyzed by high performance size exclusion chromatography. Column: Asahipak GF-310 HQ (i.d. 7.5 × 300 mm), mobile phase: DMF, flow rate: 0.5 mL/min, detection: absorbance at 415 nm.

ゲル浸透クロマトグラフィーにより分析したところ、ZnPPED のピークは保持時間 13.9 分に観察された (Figure 3 A)。一方、SMA-ZnPP のピークは、高分子化による

分子量の増大を反映して遊離 ZnPPED よりも短い保持時間 6.2 分に溶出した (Figure 3 B)。また、SMA-ZnPP の中には ZnPPED のピークは検出されず、未反応の ZnPPED から良好に分離されていた。SMA-ZnPP の合成収率は 55%であった。吸光度測定を用いた ZnPP 検量線から算出した SMA-ZnPP 中の ZnPP 含量は 15 wt%であった。また、PBS に対して 20 mg/mL 以上の濃度で溶解し、SMA-ZnPP は高い水溶性を示した。

水溶液中における SMA-ZnPP の粒子径

動的光散乱法を用いて、水溶液中の SMA-ZnPP の粒子径を測定したところ、平均粒子径は 74.3 ± 33.2 nm であった (Figure 4)。また、水溶液中における SMA または SMA-ZnPP のゼータ電位を測定したところ、SMA が -50.0 mV に対して、SMA-ZnPP は -32.4 mV となり、SMA-ZnPP は SMA よりも小さな負電荷の値を示した。このことから、SMA のカルボキシ基が ZnPPED との結合に利用されていることが示唆された。

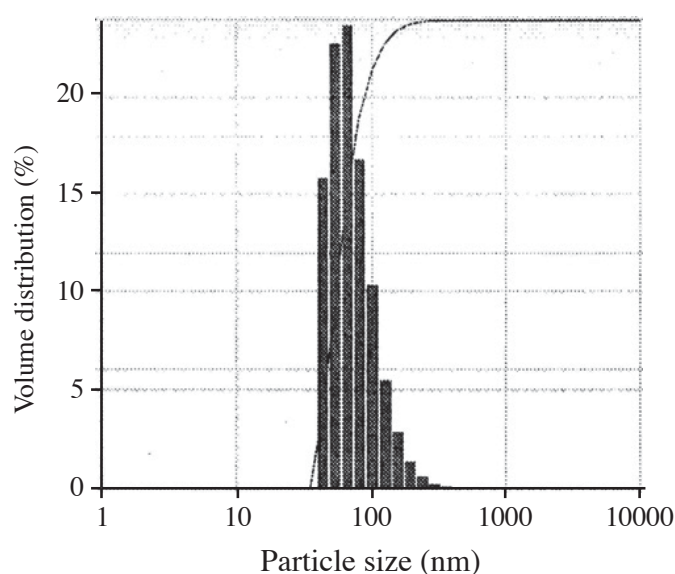


Figure 4. Particle size of SMA-ZnPP conjugate in PBS.

Hydrodynamic particle size of SMA-ZnPP conjugate was measured by dynamic light scattering, showing a mean particle size of 74.3 nm.

SMA-ZnPP の蛍光特性

動的光散乱法によって観察された SMA-ZnPP の凝集体に関する情報を得るため、さまざまな条件下での ZnPP 由来の蛍光スペクトルを測定した。DMSO 中での SMA-ZnPP の蛍光スペクトルと比較すると、脱イオン水中での蛍光は減弱した (Figure 5 A)。ポルフィリンは π - π 相互作用に基づいて自身が重なり合った凝集体を形成することが知られている。そして、ポルフィリンに亜鉛などの金属原子が配位するとポルフィリンの配向は変化することなくポルフィリン間の π - π 相互作用は増強されることが報告されている；ポルフィリンと金属の電子の局在化の程度が大きくなると、ポルフィリン間の π - π 相互作用は増強されると考えられている [36,37]。したがって、有機溶媒に SMA-ZnPP を溶解すると、ZnPP が分散状態となるのに対して、水溶液中では ZnPP 間の π - π 相互作用や SMA-ZnPP 分子間の疎水性相互作用などにより、SMA-ZnPP 分子が凝集体を形成しているためではないかと考えられた。

そこで、SMA-ZnPP 水溶液に界面活性剤 Tween 20 を加えて蛍光スペクトルの測定を行なった。すると、添加した Tween 20 の濃度依存的に SMA-ZnPP 由来の蛍光の回復が観察された。これは、Tween 20 の可溶化作用により、ZnPP が脱凝集されたことによるものと考えられた (Figure 5 B)。さらに、細胞膜の構成成分であるレシチンを使って同様の検討を行なった (Figure 5 C)。Tween 20 の場合と同じように、レシチンを添加した場合もその濃度に依存した、SMA-ZnPP の蛍光の増大が観察された。一方、水素結合を切断する作用を持つ尿素の添加では蛍光の増大は観察されなかった。したがって、SMA-ZnPP 凝集体形成における水素結合の寄与は小さいものと考えられた (Figure 5 D)。

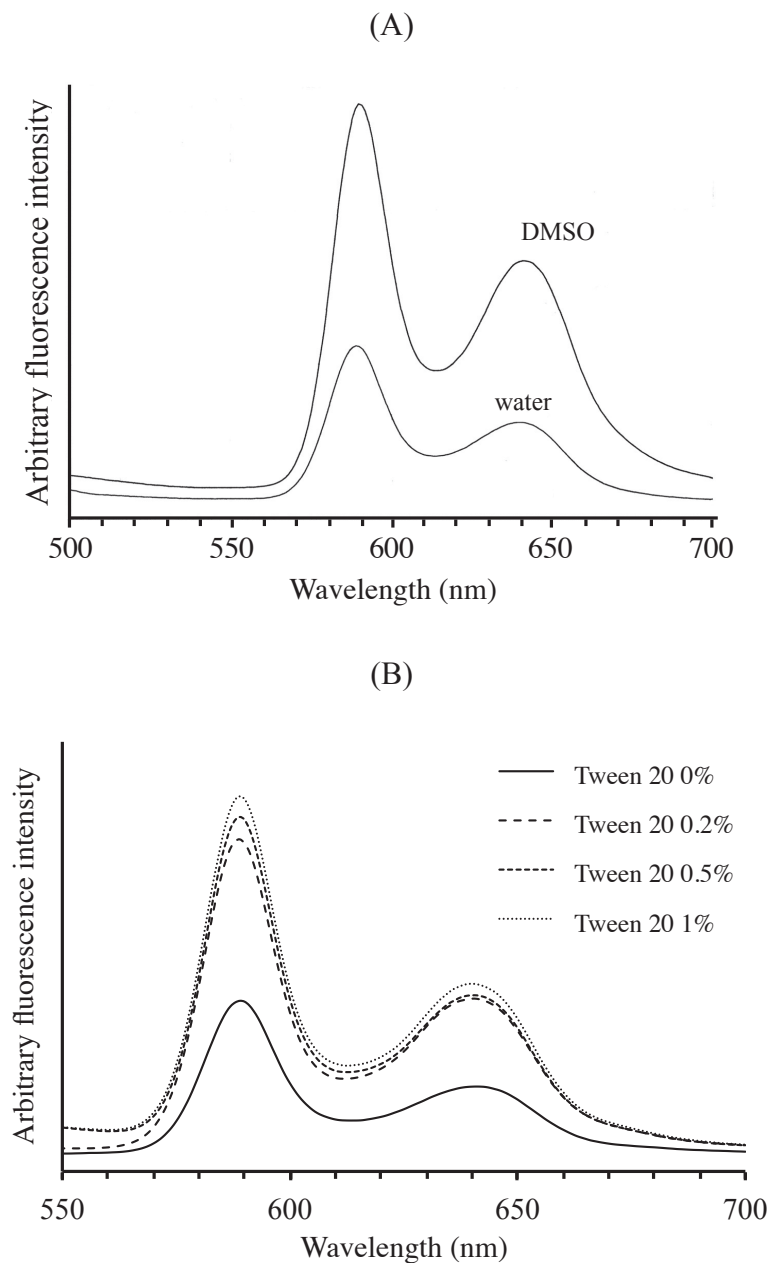


Figure 5. Fluorescence spectra of SMA-ZnPP conjugate under various conditions.

Fluorescence intensity of SMA-ZnPP in distilled water was smaller than that in DMSO (A). SMA-ZnPP (0.01 mg/mL) was dissolved in PBS, and its fluorescence intensity in the presence of Tween 20 (B), urea (C) and lecithin (D) were measured. (*Continued*)

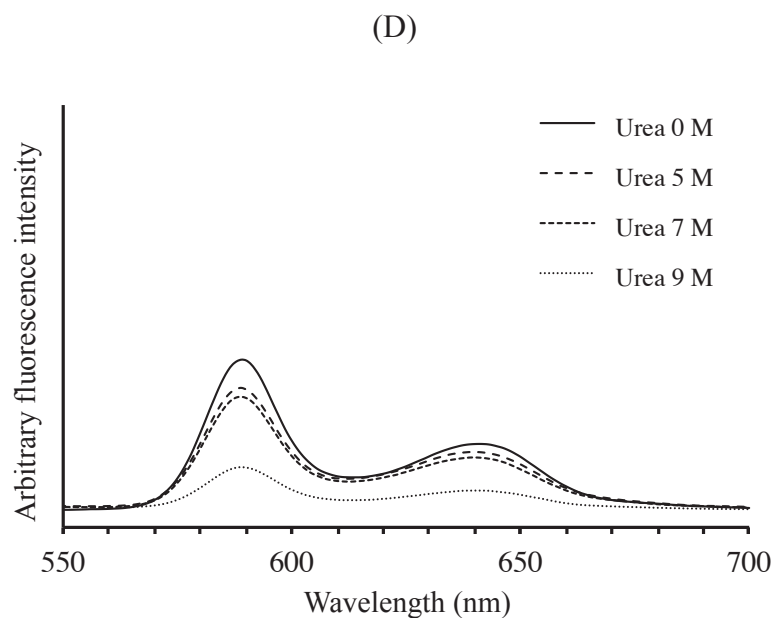
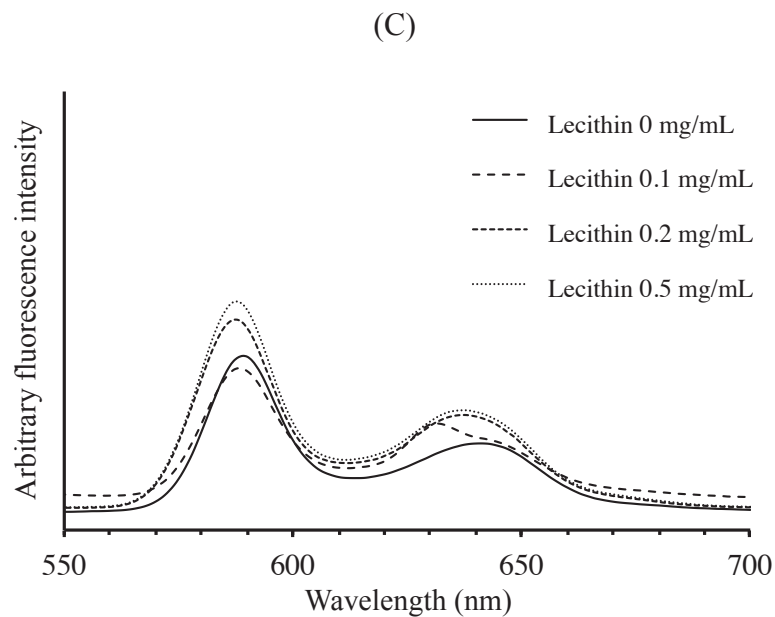


Figure 5. Fluorescence spectra of SMA-ZnPP conjugate under various conditions.

SMA-ZnPP の細胞傷害性

がん細胞に対する SMA-ZnPP の細胞傷害性を評価するために、HeLa 細胞を用いて SMA-ZnPP と ZnPP の殺細胞効果を比較した。また、強い光を ZnPP に照射することにより一重項酸素を発生することから、光照射による SMA-ZnPP の細胞傷害性の検討も行った (Figure 6)。

SMA-ZnPP の殺細胞効果は濃度依存的に増強し、ZnPP 当量換算した IC_{50} が約 33

$\mu\text{g-ZnPP/mL}$ であった。一方、ZnPP の IC_{50} は約 $5 \mu\text{g/mL}$ であったので、SMA-ZnPP の IC_{50} の約 6 分の 1 に相当し、ZnPP の方が SMA-ZnPP よりも強い細胞傷害性を示した。また、SMA-ZnPP 投与後に光照射すると、SMA-ZnPP の IC_{50} は約 $12 \mu\text{g-ZnPP/mL}$ となり、殺細胞効果は未光照射の場合の 3 倍に増大した。

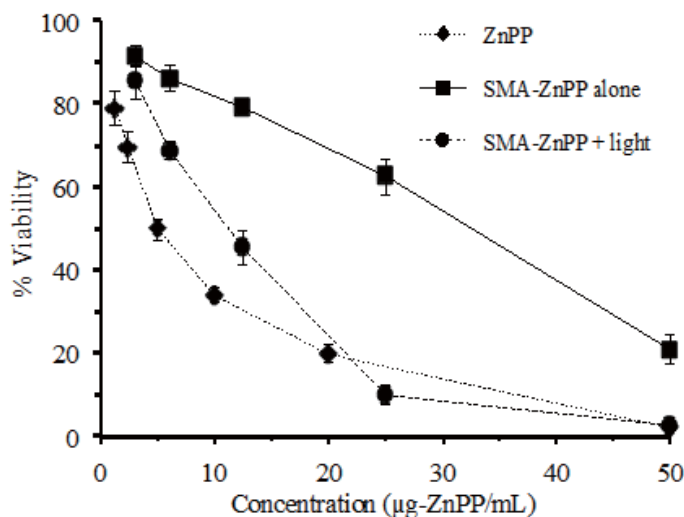


Figure 6. *In vitro* cytotoxicity of SMA-ZnPP conjugate with or without light irradiation in HeLa cells.

HeLa cells seeded on a 96 well plate at 3,000 cells per well. At 24 h later, HeLa cells were treated with SMA-ZnPP or ZnPP. After another 24 h, HeLa cells were treated with or without light irradiation (blue fluorescent light 420 nm, 1.0 J/cm^2), which were incubated for 48 h. Cell viability was determined by MTT assay. Data were mean \pm standard error ($n = 3$).

SMA-ZnPP の薬物動態と蛍光イメージング

S-180 担がんマウスの尾静脈から SMA-ZnPP を投与し、IVIS Lumina-XR 装置を使って蛍光イメージング法により SMA-ZnPP の体内動態を経時的に追跡した。投与 2 時間後に、SMA-ZnPP 由来の蛍光が腫瘍部位に集積していることが確認された (Figure 7

A)。さらに、摘出した臓器から SMA-ZnPP を抽出し、蛍光強度を測定したところ、肝臓、脾臓に次ぐ高い蛍光が腫瘍で検出され、SMA-ZnPP が腫瘍へ集積していることが確認された (Figure 7 B)。

(A)

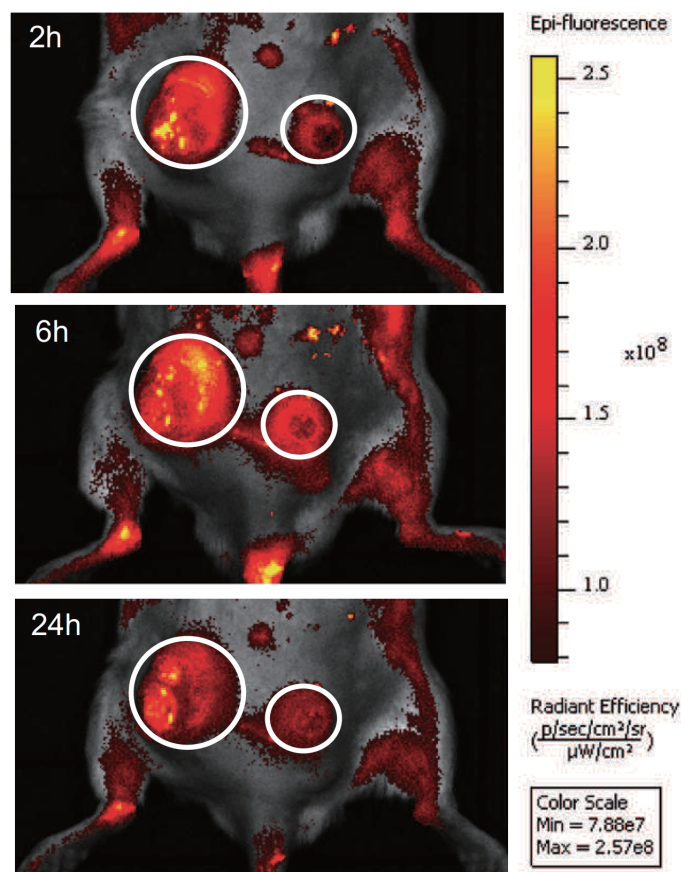


Figure 7. *In vivo* tumor imaging (A) and body distribution of SMA-ZnPP conjugate (B) after i.v. injection in tumor-bearing mice.

SMA-ZnPP (15 mg-ZnPP/kg) was injected into S-180 tumor bearing mice. (A) At indicated times, fluorescence images were taken by an IVIS Lumina-XR. (B) At 24 h later, mice were dissected, which each organ was collected. SMA-ZnPP was extracted from one organ, and was quantified by fluorescence spectrometer. Excitation wavelength: 420 nm. Data were mean \pm standard deviation ($n = 3$). (Continued)

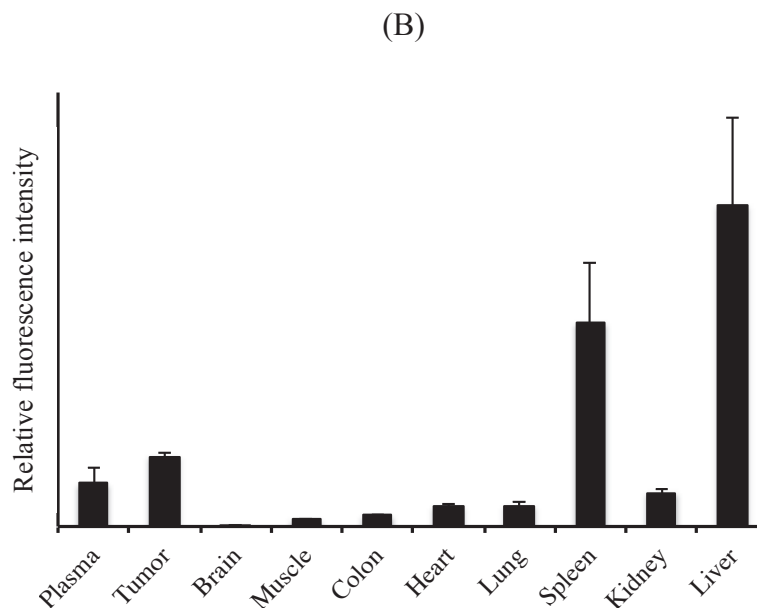


Figure 7. *In vivo* tumor imaging (A) and body distribution of SMA-ZnPP conjugate (B) after i.v. injection in tumor-bearing mice.

2. 4 考 察

腫瘍への集積性を高めることを目的として、エチレンジアミン鎖を介するアミド結合により SMA に ZnPP を共有結合させた SMA-ZnPP を調製した。

水溶液中の SMA-ZnPP の蛍光スペクトルに ZnPP 由来の強い蛍光が観察されなかったことから、SMA-ZnPP は凝集体を形成しているのではないかと考えられた。その水溶液に Tween 20 を添加すると僅かではあるが SMA-ZnPP の蛍光は回復した。しかし、尿素の添加では回復しなかった。したがって、SMA-ZnPP の凝集体の形成は、水素結合の寄与は小さく、疎水性相互作用や ZnPP 部分の π - π 相互作用などに基づいているものと推察された。一方、有機溶媒中では、SMA-ZnPP 分子は凝集することなく良好に分散したために、ZnPP 由来の強い蛍光が観察されたものと考えられた。

細胞膜の主成分であるレシチンを添加すると、その濃度依存的に SMA-ZnPP の蛍光強度は増大した。これは、生体内に SMA-ZnPP の投与を想定した場合、SMA-ZnPP

の凝集体は、細胞内や組織中で崩壊し、SMA-ZnPP 分子が良好に分散していることを示唆する結果であった。そのため、SMA-ZnPP に光照射を併用すると、一重項酸素も発生しやすく、HO-1 阻害作用と併せたより高い抗がん効果を得られることが期待できた。

ZnPP と SMA の非共有結合混合物を用いると、*in vitro* では細胞内への取り込み率は高く、高い細胞傷害性が得られた。しかし、*in vivo* においては、血中半減期は短く、腫瘍への顕著な集積は認められなかった[26, 38, 39]。ZnPP と SMA の非共有結合混合物を血中に投与すると、SMA と ZnPP の凝集体は容易に脱凝集したため、ZnPP の高い腫瘍集積性を得ることはできなかったと考えられた。本章に示した共有結合型 SMA-ZnPP は、EPR 効果により選択的に腫瘍へ送達され、心臓、肺、腎臓などの正常臓器よりも高い腫瘍集積性を達成できたものと考えられた[26]。

以上のことより、高分子化のための合成高分子に SMA を用いることにより ZnPP の腫瘍集積性を改善することができた。今後、抗腫瘍効果の検討や一重項酸素の発生などを検証する実験を行う必要がある。

第3章 ヒアルロン酸結合型亜鉛プロトポルフィリン(HA-ZnPP)の調製と抗腫瘍効果

3.1 背景

ヒアルロン酸は、*N*-アセチルグルコサミンとグルクロン酸を単位構造とした繰り返し多糖類である。ヒアルロン酸は、生体内に豊富に存在し、その繰り返し単位構造が異なる、数百~数十万もの幅広い分子量範囲のヒアルロン酸が存在する。親水性および水和性に非常に富み、その働きは、皮膚や関節の保水、潤滑作用、免疫反応、がんの浸潤・転移に至るまで多岐にわたる。

がん細胞には、がん受容体とも称されるヒアルロン酸受容体が発現している。例えば CD44 や RHAMM、LYVE-1 など他、多種類のがん受容体が存在する[40-43]。

がん細胞の増殖や浸潤、転移または、がんの悪性度において、ヒアルロン酸受容体を介したヒアルロン酸の細胞内の取り込みが重要な役割を担っている事が知られている。[44-46] そのため、細胞傷害性の強い薬物をヒアルロン酸に結合させ、ヒアルロン酸受容体により、選択的にがん細胞に取り込ませることで、効果的にがん細胞を傷害することができると考えられる。実際、ヒアルロン酸と、シスプラチンやタキサン系のパクリタキセルの抗がん剤等を結合または内包させて、がん細胞に対する効果に関する研究事例がいくつか報告されている[47-50]。

本章で検討したヒアルロン酸結合型亜鉛プロトポルフィリン(HA-ZnPP、Figure 8)は、ヒアルロン酸に ZnPP を結合させることにより、ZnPP の水溶性の改善と高分子化を図ったものである。さらに、EPR 効果により腫瘍に集積させ、がん細胞表面に発現しているヒアルロン酸受容体を介して能動的にがん細胞に取り込まれることを企図した。そこで、HA-ZnPP のがん治療効果を高めるため、HA-ZnPP が腫瘍に集積したのちに、光照射を行い活性酸素である一重項酸素生成による抗腫瘍効果の検討を行った[51]。

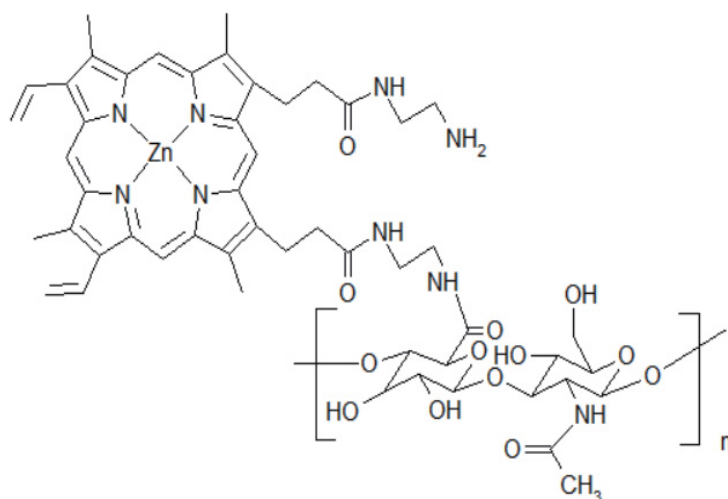


Figure 8. Chemical structure of HA-ZnPP conjugate

3. 2 実験材料および実験方法

実験材料

5 週齢雄性 ddY マウスは、九動株式会社で購入し、プロトポルフィリン IX (PP)、ヒアルロニダーゼ は、シグマアルドリッチ社から購入した。テトラヒドロフラン (THF)、トリエチルアミン、クロロギ酸エチル、エチレンジアミン、クロロホルム、ジメチルスルホキシド (DMSO)、メタノール、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)、4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chlorid (DMT-MM)、酢酸亜鉛、2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid sodium salt dehydrate (TNBS)、DMEM (低グルコース)、RPMI 1640、ペニシリン G-ストレプトマイシン (×100)、0.25% trypsin-EDTA、ヒアルロン酸 (平均分子量 100,000) は、全て和光純薬製を使用した。

その他の 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazoliumbromide (MTT)、2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2*H*-tetrazolium, monosodium salt (WST-1) は同仁化学から購入した。ヒアルロン酸は大同株式会社 (平均分子量 3,000) および MRC ポリサッカライド株式会社 (平均分子量 30,000) から購入したものを使用した。

Zinc protoporphyrin(ZnPP)の合成

PP 500 mg を DMSO 200 mL に完全に溶解させた。酢酸亜鉛 15 g を加え、70 °C で 2 時間反応させた。室温に戻し、トリフルオロ酢酸 400 μ L を加えることで、PP のプロピオン酸に結合した亜鉛を除いた。その後、冷蒸留水 500 mL で洗浄し、0 °C、4,000 g で 5 分間遠心分離を行い、目的物を沈降させた。この洗浄・分離操作を数回繰り返した後、凍結乾燥することにより、黒紫色粉末の ZnPP を得た。

ZnPPED の合成

ZnPP 100 mg を THF 20 mL に懸濁溶解させた。その後、トリエチルアミン 0.25 mL とクロロギ酸エチル 0.34 mL を滴下しながら加え、30 分間氷上で反応させた。反応後は、THF、トリエチルアミン、未反応のクロロギ酸エチルを留去するために、60 °C の温浴で、エバポレーターにかけた。得られた活性化 ZnPP に再度 THF を加えて完全に溶解させた。続いて、活性化 ZnPP をエチレンジアミン 0.25 mL 中に滴下しながらゆっくりと加え、攪拌し、室温で、30 分間反応させた。再び、エバポレーターで THF を留去し、残留した沈殿物を冷やした蒸留水で洗浄、遠心操作を数回行い、得られた沈降物を凍結乾燥して、粉末状の ZnPPED を得た。

HA-ZnPP の合成

HA 100 mg (平均分子量 3,000) と DMT-MM 180 mg を DMSO 10 mL に溶解させ、さらに、別に溶解させていた ZnPPED 8 mg と DMSO 2 mL の混液を HA の混液に滴下しながら加え、室温で 4 時間攪拌しながら反応させた。反応後は、反応混合物に 10 倍量のエタノールを加え、HA-ZnPP を沈殿させることで、未反応の ZnPPED や HA を分離した。さらに、数回に分けて、沈殿している HA-ZnPP に少量の DMSO を加え、再溶解させ、エタノールで分離した。最後に、エタノールのみで HA-ZnPP を数回洗浄し、デシケーターで乾燥させた。

アミノ基の定量

DMSOに溶解させたHA-ZnPP (0.5 mg/mL)あるいはZnPPED (0.05 mg/mL) 各 10 μ L に対して、0.1 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.8) 10 μ L、TNBS (0.5 mg/mL) 10 μ L、DMSO 70 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させ、波長 420 nm における吸光度を測定した。予め L-アラニンを使って検量線を作成し、検量線法から試料中アミノ基含有量を算出した。

高速液体クロマトグラフィー

ZnPPED および HA-ZnPP の分離分析は次の条件で行った。ポンプ：PV-2080 (日本分光)、検出器：UV-2075 (日本分光)、カラム：Asahipak GF-310 HQ (内径 7.5 \times 300 mm)、検出波長：415 nm、移動相：10ppm トリフルオロ酢酸を含む DMSO (3)/メタノール (7) 混合液、流速：0.8 mL/min の条件下で実施した。ヒアルロニダーゼによる HA-ZnPP 分解実験は、0.15 M KCl を含む酢酸緩衝液 (pH 5.4) に溶解させた (10 mg/mL) ヒアルロニダーゼ溶液を、HA-ZnPP 溶液 (10 mg/mL) と混合し 37 $^{\circ}$ C で放置し経時的に混合液試料を採取して、Prominence HPLC シリーズ (島津製作所) で解析を行った。条件は、カラム：OHpak SB-804HQ (内径 8.0 \times 300 nm)、移動相：0.1 M リン酸緩衝液、流速：0.5 mL/min の下で実施した。

粒子径の測定

HA-ZnPP を PBS に溶解させ (0.5 mg/mL)、得られた溶液を孔径 0.45 μ m のセルロース膜を通した。光路長 1 cm の石英セルに試料溶液を移し入れ、動的光散乱装置 ELS-Z2 (大塚電子) を用いて粒子径を測定した。

Electron spin resonance(ESR)の測定

HA-ZnPP あるいは ZnPP を DMF、PBS、1% SDS、レシチンに溶解させた。 $^1\text{O}_2$ の捕捉剤として、2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidone を最終濃度が 20 mM になるように

加えた。キセノンランプ(400–700 nm)で光照射(50 W/m²)を行い、経時的に、生成した TEMPD を電子スピン共鳴装置 JES-FA100 (日本電子)で測定した。

細胞培養

HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌細胞)の培養には DMEM(低グルコース)培地を、S-180(マウス肉腫細胞)には RPMI(Roswell Park Memorial Institute)1640 培地をそれぞれ使用した。培地には 10%ウシ胎児血清および抗生物質(ペニシリン G-ストレプトマイシン)を加え、37 °C、5% CO₂ の条件で培養した。また、0.05% EDTA-trypsin を使用して細胞を剥離し、継代を行った。

細胞内への取り込みの評価

HeLa 細胞を 24 well plate に 2×10^5 cells/well の細胞密度で播種し、24 時間培養した。ZnPP または HA-ZnPP(最終濃度 10 µg-ZnPP/mL)を培地に添加した。適当な時間間隔で経時的に培地を除き、PBS で 2 回洗浄した後、1% SDS で細胞を破壊し、細胞内の薬物を回収した。回収した細胞溶解液を 60 W で 20 秒、超音波処理した。細胞溶解液を DMSO で希釈し、HA-ZnPP または ZnPP 由来の蛍光を測定した(励起波長 420 nm、蛍光波長 500–700 nm)。予め作成した HA-ZnPP および ZnPP の検量線を用い、蛍光強度から薬物量を算出した。また、BCA protein assay kit を用いてタンパク質濃度を測定した。検量線作成のための標準タンパク質にはウシ血清アルブミンを用いた。HA 処理した細胞には、平均分子量 100,000 の HA(最終濃度 1 mg/mL)を添加して 2 時間培養し、同様に測定操作を行った。

細胞傷害性の評価

HeLa あるいは S-180 細胞を 96 well plate の 1 well あたり 3,000 cells 播種した。24 時間培養した。HA-ZnPP または ZnPP を加えて培養し、24 および 48 時間後にキセノンランプ(50 W/m²)を 5 分間照射した。48 時間後、WST-1 あるいは MTT 試薬を加え

て一定時間処理し、吸光度測定を行った；WST-1 では 4 時間培養した後、波長 420 nm の吸光度を、MTT では 3 時間培養した後、波長 570 nm の吸光度をそれぞれ測定した。ただし、MTT 処理した細胞試料は、MTT を添加した培地を除き、100 μ L の DMSO を加えてホルマザン色素を溶解したのちに吸光度を測定した。ヒアルロニダーゼ処理した HA-ZnPP 試料は、0.15 M KCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.4) に対して、ヒアルロニダーゼ (3 mg/mL) を溶解させた溶液に、HA-ZnPP を溶かし (HA-ZnPP 濃度 3 mg/mL)、37 $^{\circ}$ C でヒアルロニダーゼと HA-ZnPP を 3 時間反応させた。反応終了後、適宜希釈して、細胞処理に使用した。

担がんマウスの作製

S-180 細胞 (1×10^7 cells) を 6 週齢雄性 ddY マウスの腹腔内に接種し、10 日ほど腹腔内培養を行った。腹腔内培養した S-180 細胞を回収し、生理食塩水で数回洗浄した。その後、5 週齢雄性 ddY マウスの背部に、 1×10^6 cells 皮下接種し、S-180 担がんマウスを作製した。マウスの飼育および実験は、崇城大学動物実験倫理規定に従って実施した。

薬物動態

腫瘍径が 10 mm 前後の大きさである、担がんマウスに、HA-ZnPP、ZnPP 15 mg-ZnPP/kg を尾静脈より投与した。薬物投与 24 および 48 時間後に、頸椎脱臼により屠殺した後、生理食塩水を用いて左心室から灌流を行った。解剖を行い、臓器を摘出した後、臓器 100 mg に対して DMSO 0.9 mL を加え、ホモジナイザーを用いて破碎を行った。続いて、15,000 rpm (血液試料は 3,000 rpm) で 15 分間遠心分離を行った。得られた上清を回収し、THF で希釈した後、蛍光スペクトルを測定すること (励起波長 420 nm、蛍光波長 500–700 nm) により臓器中の HA-ZnPP または ZnPP を定量した。

抗腫瘍効果の評価

腫瘍の大きさが約 5 mm の大きさに成長したマウスに対して HA-ZnPP あるいは ZnPP の投与を開始した。HA-ZnPP および ZnPP 投与量は、15 mg-ZnPP/kg であり、光照射は、投与 24 および 48 時間後に、キセノンランプ MAX-303 (波長 400–700 nm) を使って、20 mW/cm²、5 分間光照射した。一週間おきにこの操作を 2 回行った。抗腫瘍効果の判定には、ノギスを用いて腫瘍の長径 mm (L)、短径 mm (W) を測定し、腫瘍体積 (mm³) = $W^2 \times L / 2$ の計算式を使って算出した。

3. 3 実験結果

HA-ZnPP の調製と特性評価

ZnPP の生成は、反応液の紫外可視吸収スペクトルに観察される Soret 帯の極大波長が 405 nm から 422.5 nm にシフトし、Q バンドの数が 2 本消失していることから確認した。

ZnPPED への誘導反応の進行を薄層クロマトグラフィー(TLC)により確認したところ(Figure 9)、ZnPP は概ね原点に留まり、クロロギ酸エチルで活性化された ZnPP は溶媒先端に展開された。そして、活性化された ZnPP とエチレンジアミンとの反応生成物である ZnPPED は原点からはほとんど移動せず、その R_f 値はほぼ 0 であった(Figure 9)。

精製後に得られた HA-ZnPP の重量から、HA-ZnPP の収率は約 20 wt%であった。また、波長 415 nm における吸光度を使って作成した ZnPP の検量線から HA-ZnPP 中の ZnPP 含有率を算出したところ、HA-ZnPP 中の ZnPP 含有率は 10 wt%であった。HA-ZnPP の精製過程のエタノール洗浄液は洗浄の進行に伴い未反応の ZnPPED 由来の紅色が明らかに薄くなった(Figure 10 A)。さらに、ZnPPED と HA-ZnPP の HPLC 分析を行ったところ、ZnPPED は保持時間約 5.1 分に、精製した HA-ZnPP は約 7.4 分にそれぞれ溶出した(Figure 10 B)。精製した HA-ZnPP のクロマトグラムには遊離の ZnPPED のピークはほとんど観察されなかった。

ZnPPED は分子内に二つの化学的に等価なアミノ基を有しているため(Figure 2)、HA と ZnPPED の反応では ZnPPED 分子内の一つのアミノ基だけではなく、二つが結合することも予測された;HA 分子内の二点結合あるいは HA 分子間での二点結合(架橋)。そこで、ZnPPED の両方のアミノ基が HA とアミド結合しているのか、あるいは一つだけなのか、ZnPP の HA への結合様式を推定するために HA-ZnPP の遊離アミノ基含量を定量した。HA-ZnPP および ZnPPED に含有されるアミノ基の濃度は、それぞれ 0.0526 および 0.1085 μM であった($n = 4$)。つまり、HA に結合した ZnPP のほぼ

半数のアミノ基は遊離で存在していた。したがって、本研究で調製した HA-ZnPP では、ZnPPED はその何れか一方のアミノ基を介して HA と結合していると考えられた。

PBS に溶解させた HA-ZnPP の大きさを動的光散乱法で測定すると、平均粒子径は 129.8 ± 49.1 nm であった (Figure 11)。一方、HA-ZnPP の合成原料として用いた平均分子量 3,000 の HA の粒子径は平均 3.1 ± 1.2 nm であった。

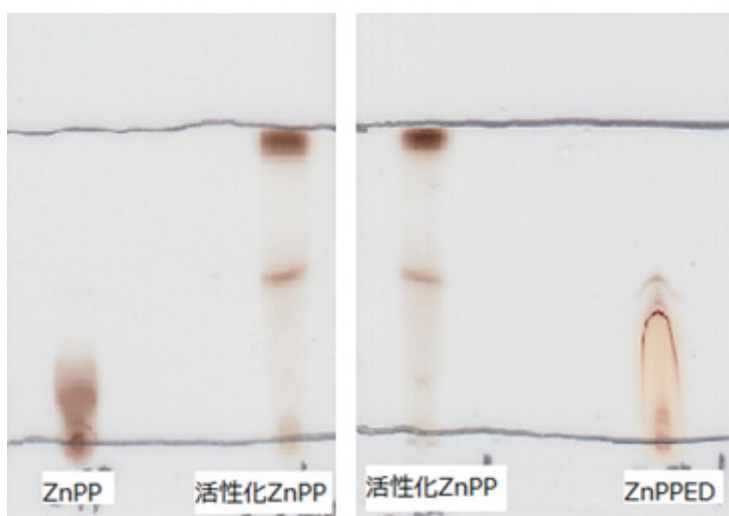
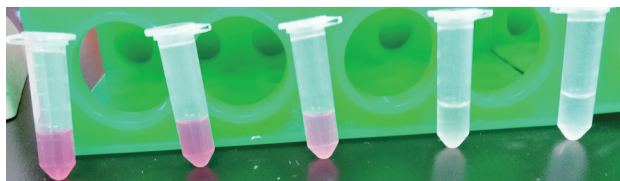


Figure 9. Thin-layer chromatographic analyses of ZnPP, activated ZnPP and ZnPPED in the synthesis of ZnPPED.

Developing solvent: chloroform (9)/methanol (1).

(A)



(B)

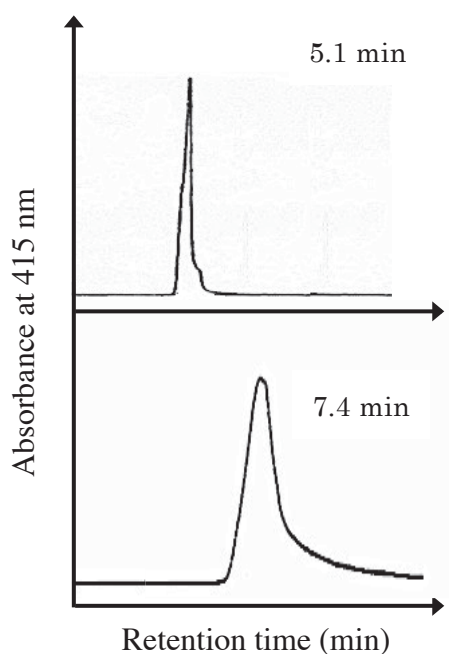


Figure 10. Picture of ethanol washings during the purification of HA-ZnPP after conjugation of ZnPPED to HA (A) and typical HPLC chromatograms of ZnPPED (top of B) and HA-ZnPP (bottom of B).

HA-ZnPP conjugate was analyzed by high performance size exclusion chromatography. Column: Asahipak GF-310 HQ (i.d. 7.5×300 mm), mobile phase: mixture of DMSO (3) and methanol (7) containing 10ppm of trifluoroacetic acid, flow rate: 0.8 min/mL.

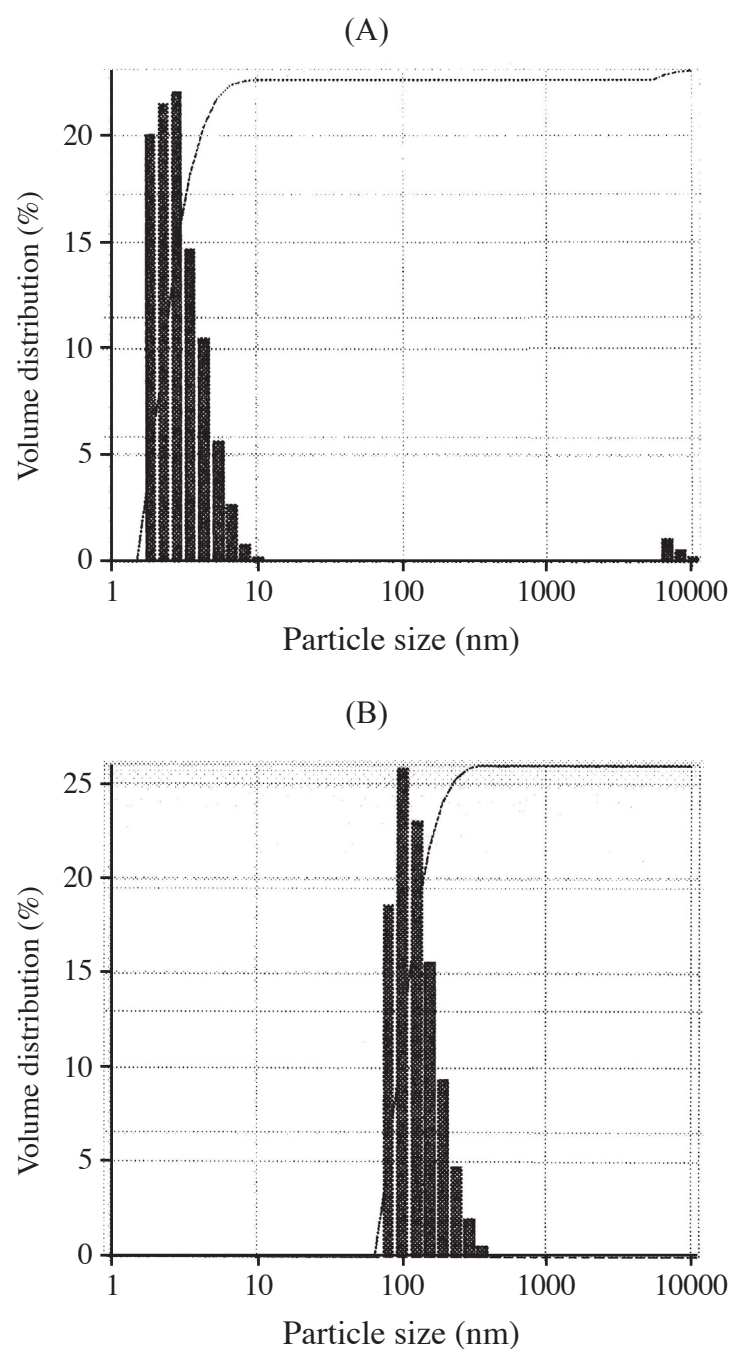


Figure 11. Particle size of HA (A) and HA-ZnPP (B) in PBS.

Hydrodynamic particle sizes of HA and HA-ZnPP conjugate were measured by dynamic light scattering, showing mean particle size of 3.1 and 129.8 nm, respectively.

HA-ZnPP の紫外可視吸収スペクトル(測定波長 350–700 nm)および蛍光スペクトル(励起波長 420 nm、蛍光波長 500–700 nm)の測定を行った。HA-ZnPP および ZnPP は、有機溶媒中においては 422.5 nm に吸収極大を示した。一方、水溶液中における吸収極大は 400 nm に観察された。また、SDS 存在下における HA-ZnPP および ZnPP の吸収極大は 422.5 nm に、レシチン存在下では 400 nm に観察された (Figure 12)。PP は、ポルフィリン環の π - π 相互作用や疎水性相互作用により凝集体を形成すると吸収極大が短波長にシフトし、ピーク形状はブロードになることが知られている [52]。そのため、HA-ZnPP は水溶液やレシチン中では凝集体を形成しているのではないかと推察された。

蛍光スペクトルを測定した結果、HA-ZnPP は水溶液中では弱い蛍光しか観測されなかった。これに対して、有機溶媒中では強い蛍光が観測された。これは、HA-ZnPP は水溶液中では凝集体を形成しているが、有機溶媒中では HA-ZnPP 分子の分散性が高くなり強い蛍光が観察されたものと考えられた (Figure 13)。

水溶液中に界面活性剤 SDS あるいはレシチンを添加すると、わずかではあるが HA-ZnPP の蛍光は増大した。水溶液中の HA-ZnPP の凝集状態が、界面活性剤の添加により解消されたことによるものである。また、ZnPP でも HA-ZnPP と同様の結果を示した。

さらに、レシチン存在下での HA-ZnPP の蛍光スペクトルを測定した (Figure 14 A)。HA-ZnPP とレシチンの混合 30 分後のスペクトルは混合直後のそれと比べて顕著な変化は観察されなかった。HA-ZnPP の凝集状態に著しい変化は生じていないものと考えられた。次に、レシチンに替えて尿素存在下で HA-ZnPP の蛍光スペクトルを測定した (Figure 14 B)。HA-ZnPP 水溶液に尿素を加えても蛍光強度の増大は観察されなかった。HA-ZnPP の凝集体形成には、主に疎水性相互作用が働き、水素結合による寄与は小さいと推察された。

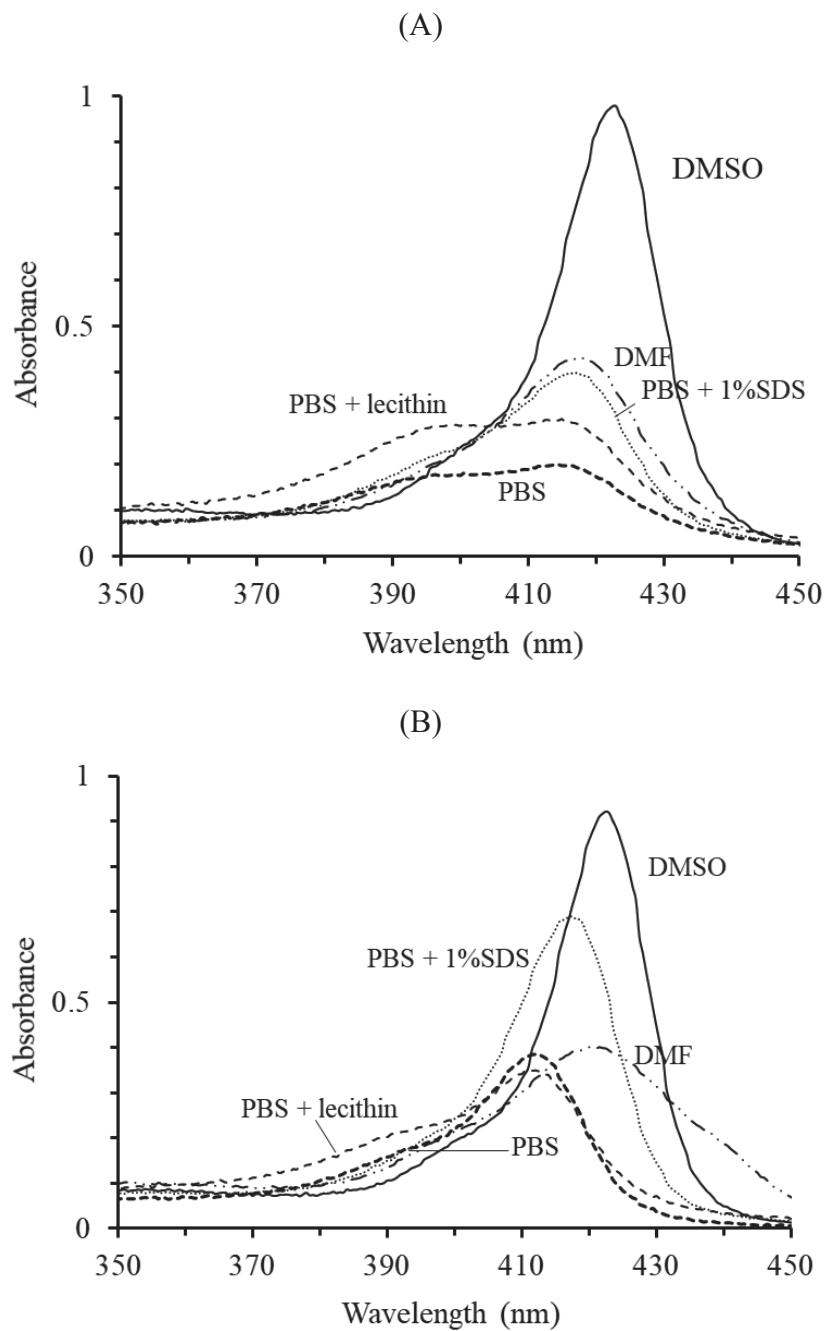


Figure 12. UV-Vis absorption spectra of HA-ZnPP (A) and ZnPP (B) in various media.

HA-ZnPP or ZnPP was dissolved in various media indicated in the panels, and their absorption spectra were measured by a spectrophotometer.

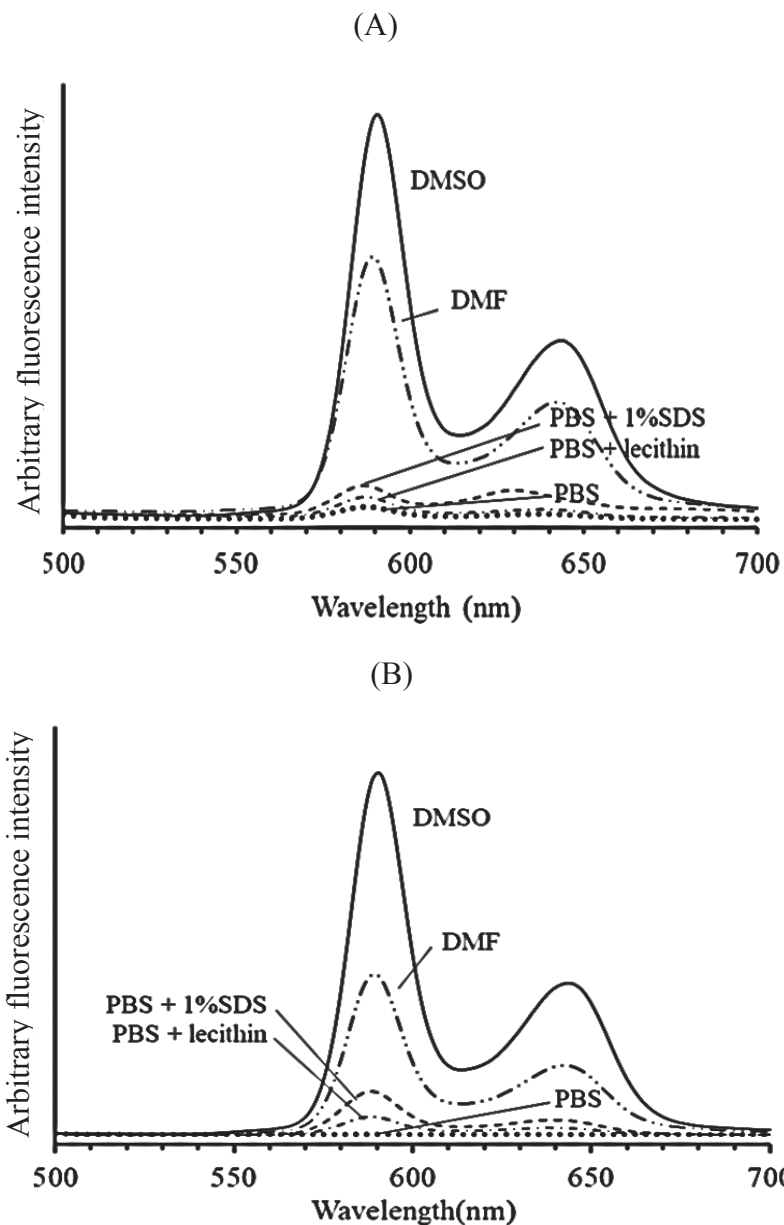


Figure 13. Fluorescence spectra of HA-ZnPP (A) and ZnPP (B) in various media.

HA-ZnPP or ZnPP was dissolved in the indicated solutions in the panels, and their fluorescence spectra were measured by a fluorescence spectrometer. Excitation wavelength: 420 nm.

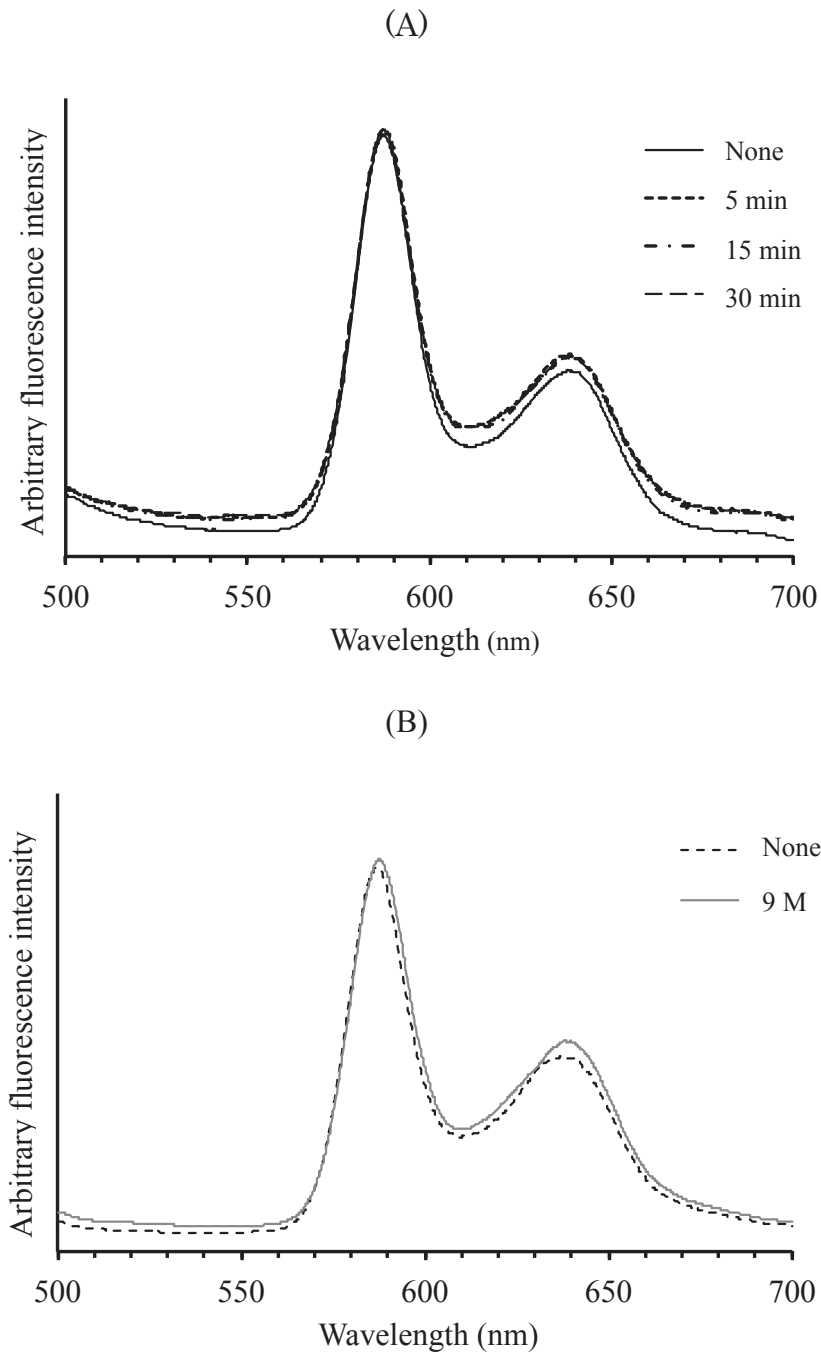


Figure 14. Fluorescent spectra of HA-ZnPP in PBS containing lecithin (A) and urea (B).

HA-ZnPP was dissolved in PBS, and was mixed with lecithin (A) and urea (B).

Fluorescence spectra of HA-ZnPP in each was measured by a fluorescence spectrometer.

Excitation wavelength: 420 nm.

ZnPP は強い光を照射されることにより、一重項酸素を発生する。そこで、HA-ZnPP または ZnPP をさまざまな溶液・溶媒中に溶解して光照射を行い、X-band ESR を用いて生成される $^1\text{O}_2$ を測定した。得られた結果より、有機溶媒中では、HA-ZnPP や ZnPP は、時間依存的に、短い光照射時間で多量の一重項酸素を発生させた (Figure 15 D)。一方、水溶液中では、ZnPP からは一重項酸素の発生は見られなかったが、HA-ZnPP からは、わずかではあるが一重項酸素の発生が確認された (Figure 15 A)。また、水溶液中に SDS やレシチンなどの界面活性剤を添加すると、一重項酸素の発生量は増大した。この効果は、特に、HA-ZnPP において顕著であった (Figure 15 B、C)。これらの結果から、HA-ZnPP は水溶液中では凝集性であるため、わずかな一重項酸素しか発生しないが、有機溶媒中や界面活性剤を添加した水溶液中では、HA-ZnPP の凝集が解消され ZnPP の分散性が改善されるため、一重項酸素を生成しやすくなるものと考えられた。

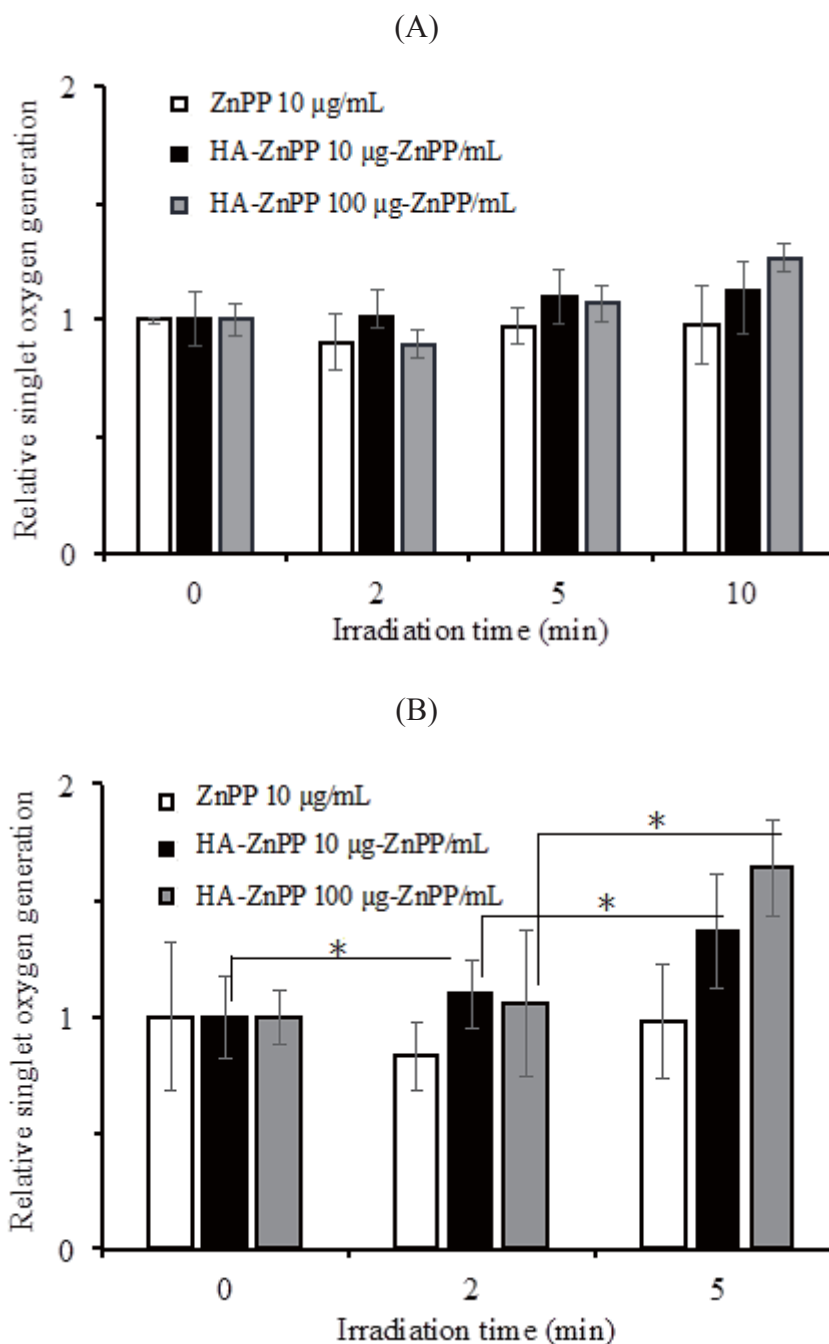
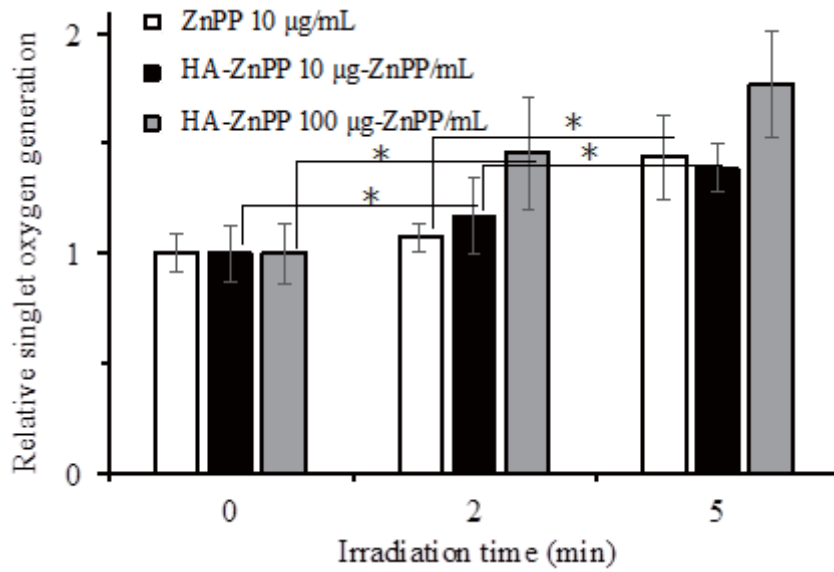


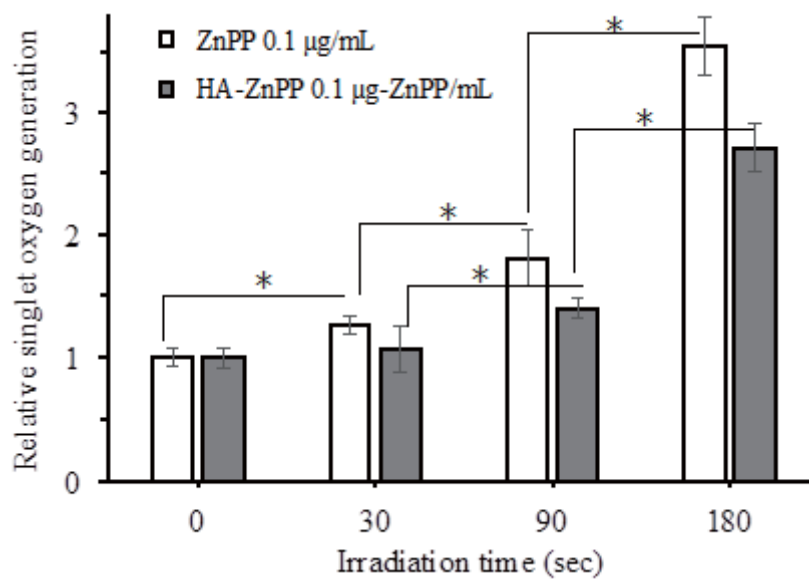
Figure 15. $^1\text{O}_2$ generation from HA-ZnPP upon light irradiation.

$^1\text{O}_2$ generation from HA-ZnPP and ZnPP dissolved in (A) PBS and PBS containing (B) 0.1% lecithin, (C) 1% SDS or (D) DMF. HA-ZnPP or ZnPP solutions were irradiated with a xenon lamp at 400–700 nm (20 mW/cm^2) for indicated time period. $^1\text{O}_2$ generated in the solutions was captured by 4-oxo-TEMP, and the resulting 4-oxo-TEMPO was detected by ESR. Data were mean \pm standard deviation to the no light-irradiation control ($n = 3$). * $P < 0.05$. (Continued)

(C)



(D)



HA は、ヒアルロニダーゼの作用によりその β (1 \rightarrow 4) グリコシド 結合が切断され分解される。そこで、水溶液中において HA-ZnPP に含まれる HA が、ヒアルロニダーゼの作用によって切断されることで、HA-ZnPP の凝集状態に変化が見られるかを検討した。

HPLC 分析の結果、HA-ZnPP ピークの保持時間は長くなり低分子量化が観察されたことから、ヒアルロニダーゼにより HA-ZnPP 分子中の β (1 \rightarrow 4) グリコシド結合が分解され、HA-ZnPP の分子が小さくなることが示された (Figure 16)。また、(Figure 17) における HA-ZnPP の蛍光強度に対して、反応時間経過ごとに、変化は見られなかった。これは、HA-ZnPP に含有される HA を分解しても、HA-ZnPP は脱凝集されないことを示唆していた。

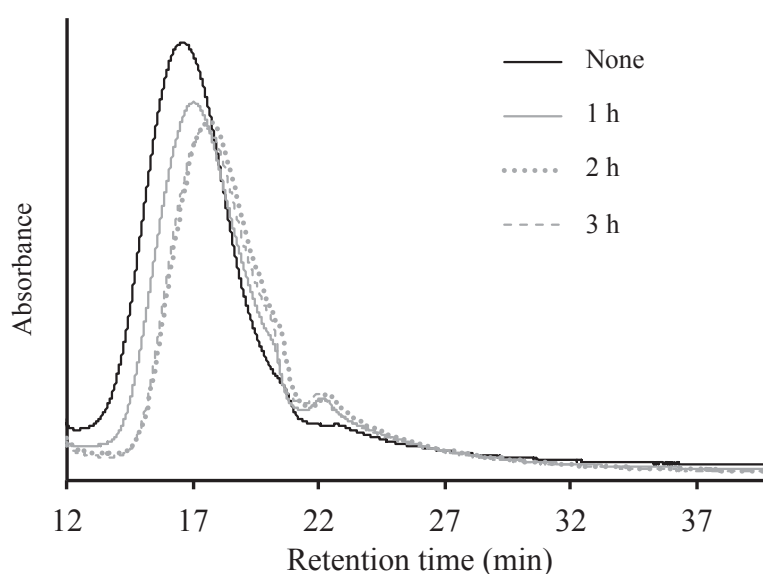


Figure 16. HPLC chromatograms of HA-ZnPP treated with hyaluronidase.

HA-ZnPP was allowed reacting with hyaluronidase in acetate buffer (pH 5.4) containing 0.15 M KCl at 37 °C, and the resulting materials were analyzed by HPLC. Column: Asahipak SB804 HQ (i.d. 8.0 \times 300 mm), mobile phase: 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), flow rate: 0.5 min/mL.

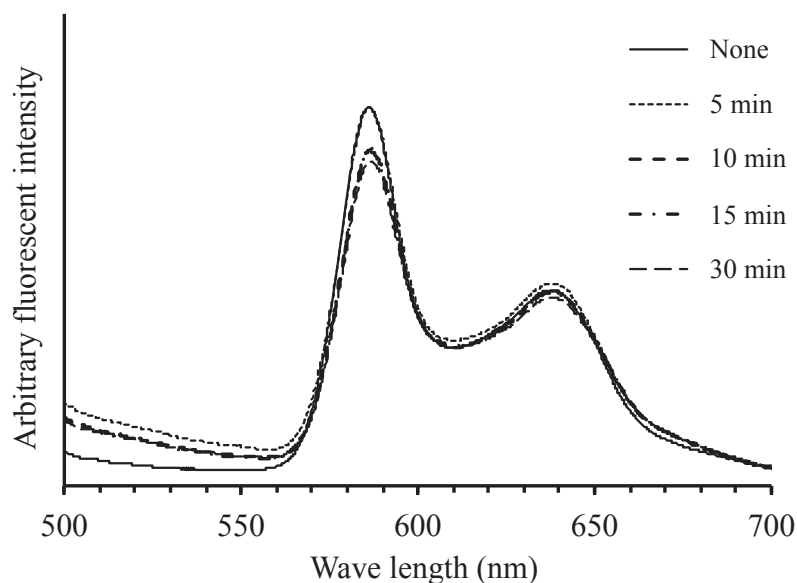


Figure 17. Fluorescence spectra of HA-ZnPP treated with hyaluronidase.

HA-ZnPP (0.5 mg/mL) was dissolved in acetate buffer (pH 5.4) containing 0.15 M KCl, and was allowed reacting with 0.5 mg/mL hyaluronidase at 37 °C. Fluorescent spectra of HA-ZnPP were measured by a fluorescence spectrometer at the indicated time after mixing with the enzyme. Excitation wavelength: 420 nm.

HA-ZnPP の抗腫瘍効果の評価

HeLa (ヒト子宮頸がん)細胞を用いて、細胞内に取り込まれた HA-ZnPP 量と ZnPP の量を比較した。また、HA-ZnPP が、細胞に取り込まれる際に、ヒアルロン酸受容体 (CD44, RHAMM 等)を介して細胞に取り込まれているのか検討してみた。高分子化合物である HA-ZnPP は、細胞内取り込みが非常に遅く、24 時間後の HA-ZnPP の取り込み量は ZnPP のその約 4 分の 1 であった。このように、高分子化薬物の細胞内取り込み量が低分子性薬物より低くなることは、高分子化合物では一般的に観察される現象である。また、HA 処理した細胞の HA-ZnPP 取り込み量は、HA 処理していないものと比較すると、24 時間後には 2 分の 1 以下に抑制されていた。このことから、HA-ZnPP の HeLa 細胞内への取り込みには、ヒアルロン酸受容体が媒介する経路が含まれていることが示唆された (Figure 18)。

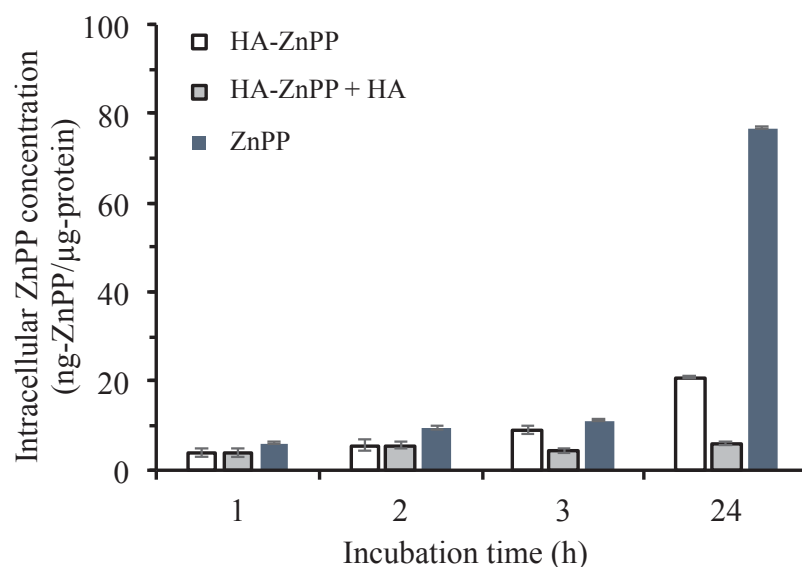


Figure 18. Cellular uptake of HA-ZnPP into HeLa cells.

HeLa cells seeded on 1.88 cm² dishes were treated with ZnPP or HA-ZnPP in the absence or presence of HA for indicated time period. Intracellular drug amount was determined by fluorescence spectrometry, and normalized by the cellular protein amount. Data were mean \pm standard deviation ($n = 6$).

HeLa 細胞と S-180 細胞に対する HA-ZnPP の細胞傷害性を検討した。ポルフィリン系化合物は、光照射をすることで、一重項酸素生成により細胞傷害性が增強されるため、HA-ZnPP でも光照射することにより細胞傷害性が增強するかどうかを検討した。また、HA-ZnPP にヒアルロニダーゼ処理を行い、HA が分解されることにより、HA-ZnPP または HA-ZnPP と光照射を併用することで細胞傷害性が変化するか否かを検討した。検討した濃度範囲では、HA-ZnPP は HeLa 細胞および S-180 細胞に対して細胞傷害性を示さなかった (Figure 19 A)。HA-ZnPP 処理した細胞に光照射を行っても、明らかな細胞傷害性は観察されなかった (Figure 19 B)。また、ヒアルロニダーゼ処理した HA-ZnPP を添加して光照射しても、細胞傷害性は示さなかった (Figure 19 C)。

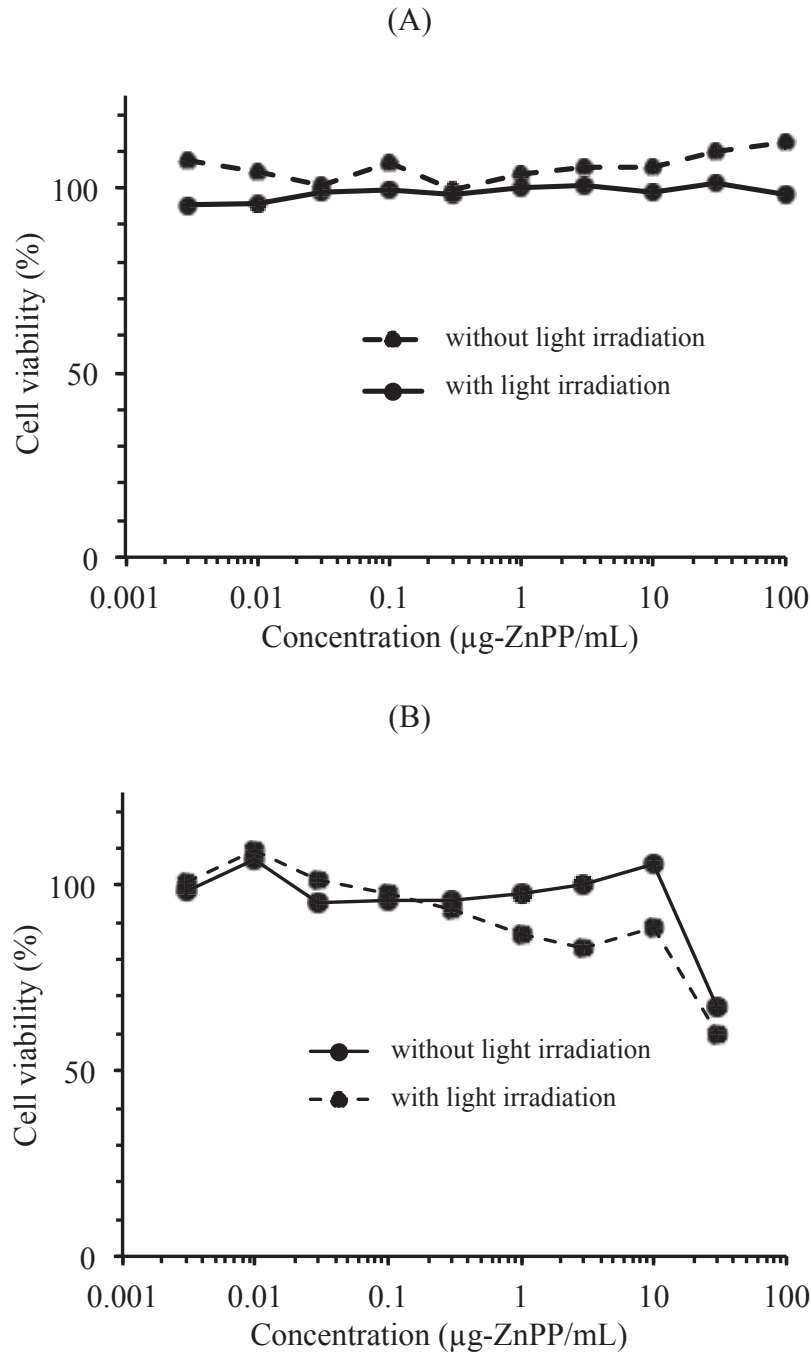
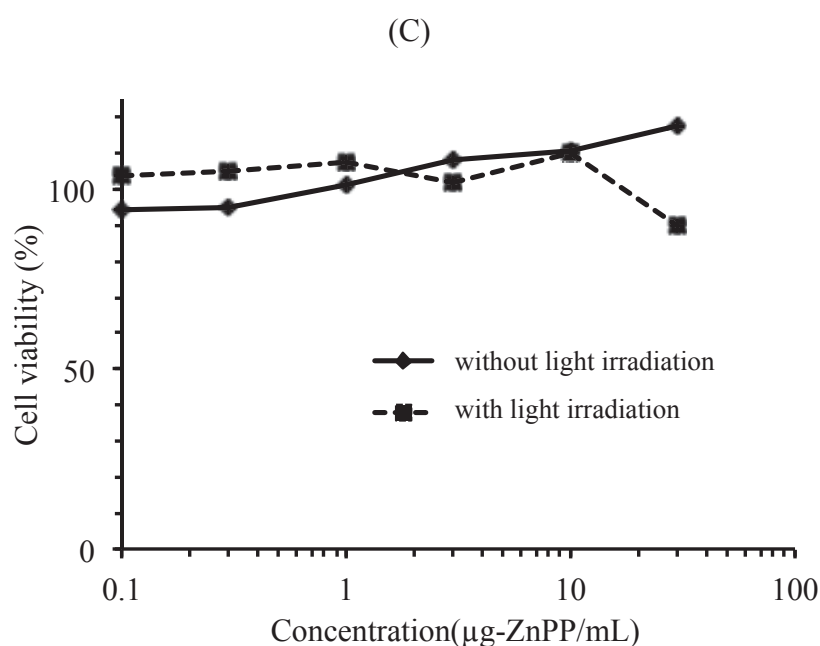


Figure 19. Cytotoxicity of HA-ZnPP to HeLa (A and C) and S-180 cells (B).

HeLa (A) and S-180 (B) cells seeded on 96-well plates were treated with HA-ZnPP. HeLa cells (C) were also treated with HA-ZnPP pretreated with hyaluronidase. At 24 h light irradiation, cells were incubated another 48 h. Cell viability was determined by MTT or WST-1 assay. Data were mean \pm standard deviation ($n = 3$). (Continued)



担がんマウスの静脈から HA-ZnPP あるいは ZnPP を投与し、それらの体内動態を検討した。投与 24 時間後では、ZnPP は脾臓への高い集積を示したが、腫瘍への集積は非常に低いものであった。一方、HA-ZnPP の脾臓への集積は ZnPP より顕著に低く、標的臓器である腫瘍に対して高い集積を示した。投与 48 時間後も HA-ZnPP は、腫瘍への高い集積性を示した。EPR 効果に基づいた HA-ZnPP の腫瘍への集積と保持が認められた (Figure 20)。

腫瘍径がおよそ 5 mm の S-180 担がんマウスに、HA-ZnPP を尾静脈から投与し、腫瘍の大きさを経時的に測定した。実験には、HA-ZnPP 投与群、HA-ZnPP 投与 + light 照射群、ZnPP 投与群、ZnPP 投与 + light 照射群、無処置群、light 照射群を準備した。HA-ZnPP 投与 + light 照射群では、腫瘍作成から 31 日後 (最終投与から一週間後) から有意差が見られ、腫瘍増殖を抑制した。また、ZnPP 投与 + light 照射群でも腫瘍増殖抑制効果が見られたが、こちらは、マウスの生存率が低かった。最終投与から約一ヵ月後 (腫瘍作成から 56-70 日後の間) の各々の生存率は、HA-ZnPP 投与 + light 照射群が生存率 100% に対して、無処置群・HA-ZnPP 投与群・ZnPP 投与群は、40% 以下であり、ZnPP 投与 + light 照射群・light 照射群は、60% 以下であった (Figure 21)。

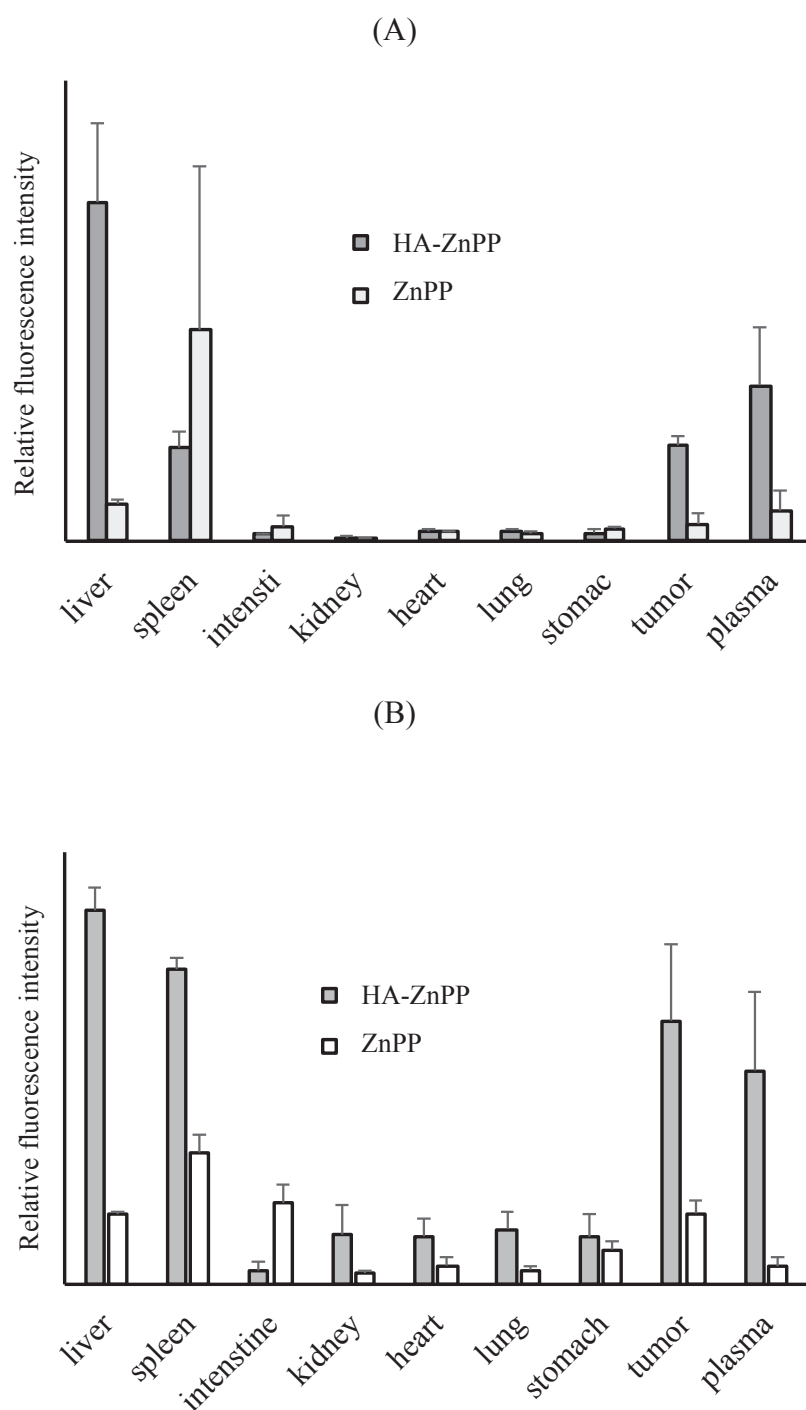


Figure 20. Body distribution of HA-ZnPP in S-180 tumor-bearing mice at 24 (A) and 48 (B) h after the ZnPP or HA-ZnPP administration.

S-180 tumor-bearing mice were received ZnPP or HA-ZnPP at 15 mg-ZnPP/kg via the tail vein. At 24 and 48 h after the ZnPP or HA-ZnPP administration, mice were sacrificed and selected organs were collected after transcardial perfusion with saline. The amounts of the ZnPP after extraction were measured by fluorescence spectrometry. Data were mean \pm

standard deviation ($n = 6$).

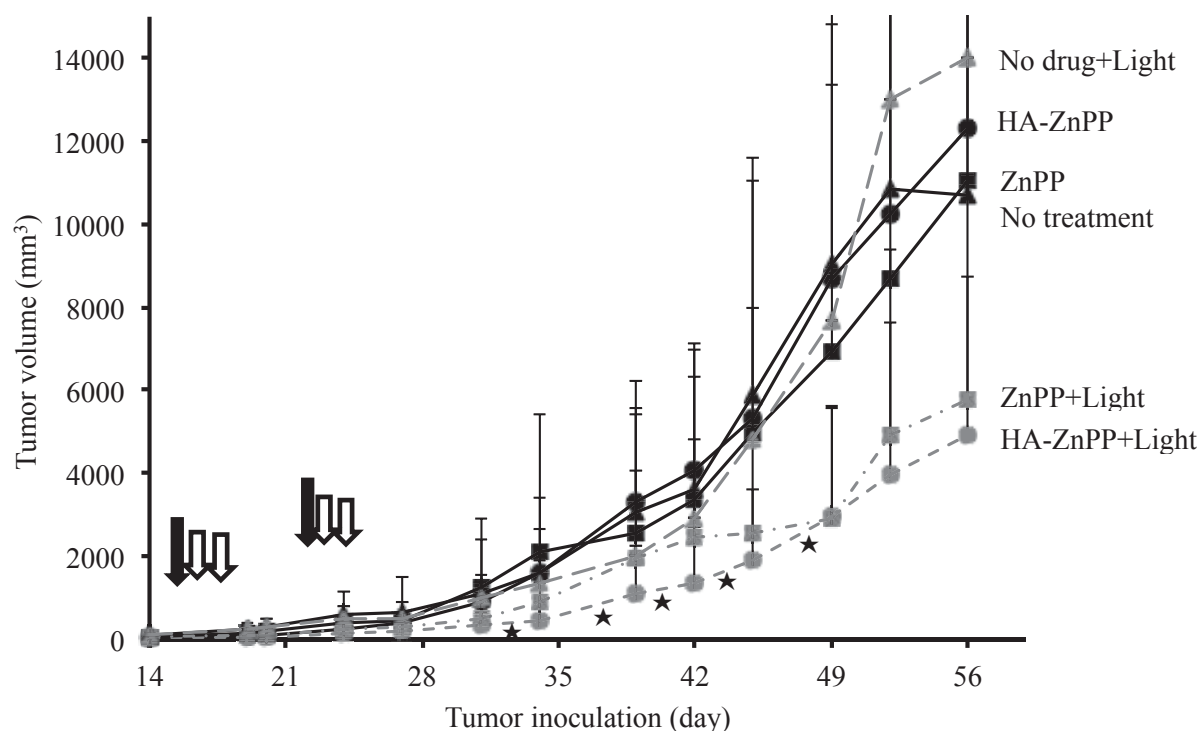


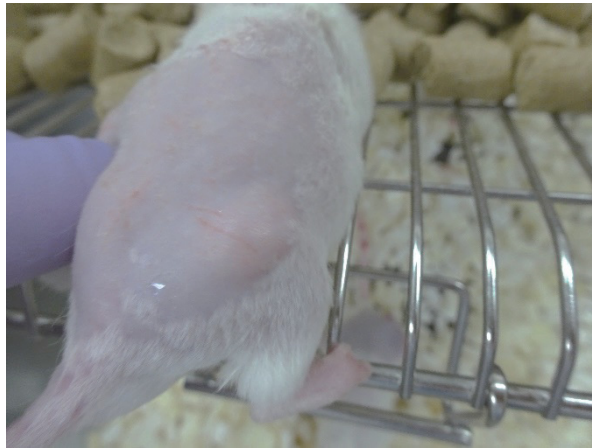
Figure 21. Antitumor effect of HA-ZnPP in S-180 tumor-bearing mice.

S-180 tumor-bearing mice were treated with 15 mg-ZnPP/kg of ZnPP or HA-ZnPP (black arrows) followed by with or without light irradiation (white arrows). Tumor volumes were measured as described in Materials and Methods. Data were mean + standard deviation ($n = 5$). * $P < 0.05$ versus HA-ZnPP singly-treated group (★).

(A)



(B)



(C)

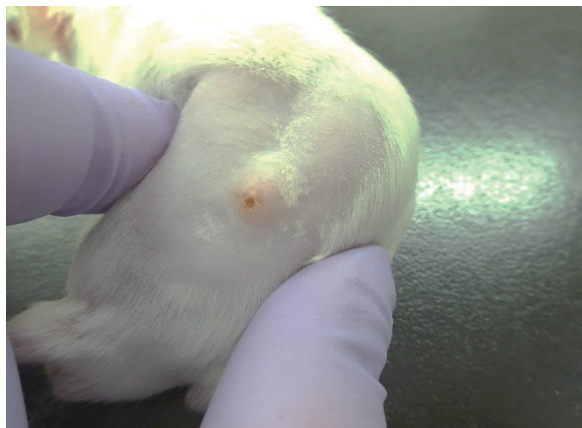


Figure 22. Representative images of mouse treated without drug (A), and mouse treated with HA-ZnPP + light (B) and ZnPP + light (C) at 30 days after S-180 tumor inoculation.

3.4 考 察

本章で使用した HA-ZnPP は、平均分子量 3,000 の HA に ZnPPED を反応させてを調製した。予備検討において、平均分子量 30,000 の HA を用いて調製した HA-ZnPP はほとんどの溶媒に不溶であった。ZnPPED による HA の架橋反応なども進行しているものと考えられた。また、平均分子量 3,000 の HA を用いても、反応させる ZnPPED の量を増加させると (HA 100 mg に対して ZnPPED 10 mg 以上)、結合した ZnPP の疎水的性質が反映された極難水溶性の HA-ZnPP が生成した。反応後の粗 HA-ZnPP を、エタノールを使って分離精製することにより、未反応の ZnPPED や HA は取り除かれていた。使用した HA-ZnPP 中の ZnPP 含有率は 10 wt%であったことから、HA-ZnPP が分子量 3,000 の HA 1 分子と ZnPP 1 残基から構成されていると仮定した場合の計算値 (14.0 wt%) と近似した。したがって、本研究に使用した HA-ZnPP は、平均分子量 3,000 の HA 分子に対して約 1 個の割合で ZnPP 残基が結合しているの見積もられた。また、アミノ基の定量から、HA-ZnPP は ZnPPED の何れか一つのアミノ基を介して HA に結合した構造であることが示唆された。

HA-ZnPP は、水溶液中において ZnPP 間の相互作用に基づいて凝集体を形成すると考えられるため、HA-ZnPP 分子の凝集に伴いその紫外可視吸収スペクトルや蛍光スペクトルには何らかの変化が生じると予見された。つまり、HA-ZnPP の紫外可視吸収スペクトルでは、吸収極大が短波長 (400 nm 付近) に観察され、蛍光は減弱すると推測され、結果として光照射しても一重項酸素が生成しにくい状態にあると考えられた。他方、有機溶媒中では、HA-ZnPP の分散性が上昇したことを反映して、HA-ZnPP の吸収極大は 422.5 nm に観察され、ZnPP 由来の強い蛍光も確認された。したがって、ESR の測定を行った際には、短時間のうちに、多量の一重項酸素が生成したと考えられた。界面活性剤 SDS 存在下の HA-ZnPP の紫外可視吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルの測定結果は、ZnPP 残基が分散性の高い状態にあることを支持した。他方、レシチン存在下でも、スペクトルの変化はやや小さいものの、分散が促進される傾向

が観察された。SDS とレシチンの効果の差異は、それらの可溶化能に依存しているのではないかと考えられた。さらに、SDS およびレシチンは遊離の ZnPP に対しても同様の効果を示した。

ESR の測定結果から、SDS 存在下では、一重項酸素の経時的な発生が確認された。また、HA-ZnPP による水溶液中における一重項酸素の発生は、レシチン存在下においても観察された。これらのことから、腫瘍に集積した HA-ZnPP がレシチンなどのバイオサーファクタントと相互作用して分散が進み、そこへ光照射すれば一重項酸素が発生することが期待された。

腫瘍細胞 S-180 を用いた *in vitro* 評価実験では、HA-ZnPP 処理して光照射しても著しい細胞傷害性は観察されなかった。一方、担がんマウスを用いた動物実験において、HA-ZnPP 投与と光照射を併用すると腫瘍増殖抑制効果が得られた。これは、HA-ZnPP とバイオサーファクタントの相互作用により HA-ZnPP の凝集に対する改善が起きたためであると考えられた。そのため、HA-ZnPP に光照射を行うことで一重項酸素を発生し、動物実験において腫瘍増殖抑制効果が示されたと推察された。

第4章 結 論

亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)は光照射により一重項酸素を発生し、強い細胞傷害性を発揮することが知られていた。本研究では ZnPP を親水性ポリマーに付与させることにより、ZnPP の水溶性の改善と EPR 効果に基づく腫瘍集積性の向上を図り、ZnPP を使った光線力学療法に基づく高分子化抗がん剤の開発に関する基礎的な検討を実施した。

まず、第2章では、スチレン-マレイン酸コポリマー結合型 ZnPP(SMA-ZnPP)を調製し、その腫瘍集積性を検討した。SMA のマレイン酸ユニットのカルボキシ基とのアミド結合を介してエチレンジアミン鎖を導入した ZnPP を結合させて高分子化した。遊離 ZnPP の腫瘍への集積性は非常に低いため、SMA に結合させることにより ZnPP の高分子化を行った。S-180 担がんマウスを使って体内動態を調べたところ、SMA-ZnPP の腫瘍への高い集積性を達成することに成功した。また、インビボ蛍光イメージング装置を利用して SMA-ZnPP 由来蛍光の体内分布を追跡したところ、腫瘍への良好な集積も検証された。

次に、第3章では、ヒアルロン酸結合型亜鉛プロトポルフィリン(HA-ZnPP)を調製し、その腫瘍集積性を検討した。高分子化による EPR 効果とがん細胞の受容体介在エンドサイトーシスのシナジー効果による腫瘍集積性の向上を企図し、HA に ZnPP を結合させた高分子化抗がん剤を設計した。EPR 効果により腫瘍に集積した HA-ZnPP が、がん細胞表面に高発現している HA 受容体を介して細胞内へ取り込まれることを期待した。遊離 ZnPP は脾臓への高い集積を示したが、HA-ZnPP の脾臓への集積は遊離 ZnPP のその 3 分の 1 以下に抑えられた。そして、腫瘍に対して HA-ZnPP では投与 48 時間後まで高い ZnPP 濃度が維持されており、腫瘍への高い集積性と優れた滞留性を示した。

本研究では、活性部位となる ZnPP を異なるポリマーに結合させて高分子化 SMA-ZnPP と HA-ZnPP を調製した。得られた SMA-ZnPP や HA-ZnPP の物理化学的性

質には、ZnPP だけではなく高分子の諸性質も反映されていた。また、それらの物理化学的性質がそれぞれの体内動態やがん細胞に対する抗腫瘍効果にも深く関連しているものと考えられた。例えば、SMA-ZnPP は、水に対する溶解度、ZnPP 含有率が高いので、投与量を増加したい場合や、少量の投与量で ZnPP を多く生体内に取り入りたい場合は有効であると考えられる。他方、HA-ZnPP はヒアルロン酸受容体が高発現しているがん細胞治療にはその効果の増大が期待できるものと考えられた。以上の検討結果から、がんや細胞特性を考慮して適切な高分子化合物を選択することにより、より優れた治療効果を発揮する高分子化抗がん剤の設計・開発が可能であると考えられた。

謝 辞

本研究活動にあたり、御助力を受け賜りました崇城大学薬学部・薬学科 横溝 和美 教授に感謝致します。

本研究・論文作成にあたり多大なる御助力、御指導を受け賜りました崇城大学薬学部・薬学科 原武 衛 教授に深く感謝するとともに、謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行と論文作成にあたり、終始熱心な御指導を受け賜りました崇城大学薬学部・薬学科 中村 秀明 講師に衷心より最大の感謝を申し上げます。

本論文作成にあたり有益なる御校閲並びに御指導を受け賜りました崇城大学薬学部・薬学科 平山 文俊 教授、山崎 啓之 教授に謹んで厚く御礼を申し上げます。

本研究活動にあたり、御助力を受け賜りました崇城大学薬学部・薬学科 方 軍 准教授、周 建融 助教に感謝致します。

本研究活動にあたり、御支援をいただきました崇城大学薬学部 薬学科 微生物研究室の皆様、崇城大学大学院 薬学研究科の皆様ならびに、友人に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Fang J., Nakamura H., Maeda H., The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 136–151 (2011).
- 2) Matsumura Y., Maeda H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392 (1986).
- 3) Duncan R., Vicent M. J., Polymer therapeutics-prospects for 21st century: the end of the beginning. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 60–70 (2013).
- 4) Torchilin V., Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 131–135 (2011).
- 5) Maeda H., Research spotlight: emergence of EPR effect theory and development of clinical applications for cancer therapy. *Ther. Deliv.*, **5**, 627–630 (2014).
- 6) Nakamura H., Fang J., Maeda H., Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **12**, 53–64 (2015).
- 7) van Nostrum C. F., Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 9–16 (2004).
- 8) Dolmans D. E., Fukumura D., Jain R. K., Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 380–387 (2003).
- 9) Chilakamarthi U., Giribabu L., Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem. Rec.*, (2017).
- 10) Fernandez J. M., Bilgin M. D., Grossweiner L. I., Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **37**, 131–140 (1997).
- 11) Itoh Y., Ninomiya Y., Tajima S., Ishibashi A., Phototoxic therapy for acne vulgaris with

- topical 5-aminolevulinic acid. *Arch Dermatol.*, **136**, 1093–1095 (2000).
- 12) Dierickx C. C., Goldenhersh M., Dwyer P., Stratigos A., Mihm M., Anderson R. R.,
Photodynamic therapy for nevus sebaceous with topical delta aminolevulinic acid. *Arch Dermatol.*, **135**, 637–640 (1999)
 - 13) 肺癌診療ガイドライン, 99 (2003)
 - 14) Nakaseko H., Matsumoto Y., Photodynamic therapy in the dermatological field. *J. Jpn Soc. Laser Surg. Med.*, **27**, 2 (2007)
 - 15) Kato H., Okunaka T., Shimatani H., Photodynamic therapy for early-stage bronchogenic carcinoma. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, **14**, 235–238 (1996)
 - 16) Hamori C. J., Vreman H. J., Rodgers P. A., Stevenson D. K., Zinc protoporphyrin inhibits CO production in rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **8**, 110–115 (1989).
 - 17) Siow, R. C. M., Ishii T., Sato H., Taketani S., Leake D. S., Sweiry J. H., Pearson J. D.,
Bannai S., Mann G. E., Induction of the antioxidant stress proteins heme oxygenase-1 and MSP23 by stress agents and oxidized LDL in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **368**, 239–242 (1995).
 - 18) Clark J. E., Foresti R., Green C. J., Motterlini R., Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem. J.*, **348**, 615–619 (2000).
 - 19) Soares M. P., Usheva A., Brouard S., Berberat P. O., Gunther L., Tobiasch E., Bach F. H.,
Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid. Redox Signal.*, **4**, 321–329 (2002).
 - 20) Fang J., Akaike T., Maeda H., Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis*, **9**, 27–35 (2004).
 - 21) Abraham N. G., Kappas A., Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol. Rev.*, **60**, 79–127 (2008).
 - 22) Tanaka S., Akaike T., Fang J., Beppu T., Ogawa M., Tamura F., Miyamoto Y., Maeda H.,

- Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br. J. Cancer*, **88**, 902–909 (2003).
- 23) Fang J., Sawa T., Akaike T., Akuta T., Sahoo S. K., Khaled G., Hamada A., Maeda H., In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res.*, **63**, 3567–3574 (2003).
- 24) Fang J., Greish K., Qin H., Liao L., Nakamura H., Takeya M., Maeda H., HSP32 (HO-1) inhibitor, copoly (styrene-maleic acid)-zinc protoporphyrin IX, a water-soluble micelle as anticancer agent: in vitro and in vivo anticancer effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **81**, 540–547 (2012).
- 25) Hadzijasufovic E., Rebuzzi L., Gleixner K. V., Ferenc V., Peter B., Kondo R., Gruze A., Kneidinger M., Krauth M.-T., Mayerhofer M., Samorapoompichit P., Greish K., Iyer A. K., Pickl W. F., Maeda H., Willmann M., Valent P., Targeting of heatshock protein 32/heme oxygenase-1 in canine mastocytoma cells is associated with reduced growth and induction of apoptosis. *Exp. Hematol.*, **36**, 1461–1470 (2008).
- 26) Mayerhofer M., Gleixner K. V., Mayerhofer J., Hoermann G., Jaeger E., Aichberger K. J., Ott R. G., Greish K., Nakamura H., Derdak S., Samorapoompichit P., Pickl W. F., Sexl V., Esterbauer H., Schwarzingner I., Sillaber C., Maeda H., Valent P., Targeting of heat shock protein 32 (Hsp32)/heme oxygenase-1 (HO-1) in leukemic cells in chronic myeloid leukemia: a novel approach to overcome resistance against imatinib. *Blood*, **111**, 2200–2210 (2008).
- 27) Gleixner K.V., Mayerhofer M., Vales A., Gruze A., Hormann G., Cerny-Reiterer S., Lackner E., Hadzijasufovic E., Herrmann H., Iyer A. K., Krauth M.-T., Pickl W. F., Marian B., Panzer-Grumayer R., Sillaber C., Maeda H., Zielinski C., Valent P., Targeting of Hsp32 in solid tumors and leukemias: a novel approach to optimize anticancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **9**, 675–689 (2009).
- 28) Drummond G. S., Kappas A., Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin

- protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 6466–6470 (1981)
- 29) J., F., B. M., and G. L., Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **37**, 131–140 (1997)
- 30) Iyer A. K., Greish K., Seki T., et al. Polymeric micelles of zinc protoporphyrin for tumor targeted delivery based on EPR effect and singlet oxygen generation. *J. Drug Target.*, **15**, 496–506 (2007).
- 31) Sahoo S. K., Sawa T., Fang J., et al. Pegylated zinc protoporphyrin: a water-soluble heme oxygenase inhibitor with tumor-targeting capacity. *Bioconjugate Chem.*, **13**, 1031–1038 (2002).
- 32) Hatakeyama H., Akita H., Harashima H., The polyethyleneglycol dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 892–899 (2013).
- 33) Tsukigawa, K., et al., Effect of different chemical bonds in pegylation of zinc protoporphyrin that affects drug release, intracellular uptake, and therapeutic effect in the tumor. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **89**, 259–270 (2015).
- 34) Tanielian C., Wolff C., Porphyrin sensitized generation of singlet molecular oxygen: comparison of steady-state and time resolved methods. *J. Phys. Chem.*, **99**, 9825–9830 (1995).
- 35) Fang J., Tsukigawa K., Liao L., Yin H., Eguchi K., Maeda H., Styrene-maleic acid-copolymer conjugated zinc protoporphyrin as a candidate drug for tumor-targeted therapy and imaging. *J. Drug Target.*, **24**, 399–407 (2016).
- 36) Hunter C. A., Leighton P., Sanders J. K. M. Allosteric ligand binding to cofacial metalloporphyrin dimers: the mechanism of porphyrin disaggregation *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 547–552 (1989).
- 37) Hunter C. A., Leighton P., Sanders J. K. M., The nature of .pi.-.pi. interactions *J. Am.*

- Chem. Soc.*, **112**, 5525–5534 (1990).
- 38) Nakamura H., Liao L., Hitaka Y., Tsukigawa K., Subr V., Fang J., Ulbrich K., Maeda H., Micelles of zinc protoporphyrin conjugated to *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer for imaging and light-induced antitumor effects in vivo. *J. Controlled Rel.*, **165**, 191–198 (2013).
- 39) Iyer, A. K., Greish K., Fang J., Murakami R., Maeda H., High-loading nanosized micelles of copoly(styrene-maleic acid)-zinc protoporphyrin for targeted delivery of a potent heme oxygenase inhibitor. *Biomaterials*, **28**, 1871–1881 (2007).
- 40) Racine R., Mummert M. E., Hyaluronan endocytosis: mechanisms of uptake and biological functions, in molecular regulation of endocytosis. Cersa B., Editor. 2012, InTech.
- 41) Li J., Huo M., Wang J., Zhou J., Mohammad J. M., Zhang Y., Zhu Q., Waddad A. Y., Zhang Q., Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel. *Biomaterials*, **33**, 2310–2320 (2013).
- 42) Eliaz R. E., Szoka F. C. Jr., Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CA44: a strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.*, **61**, 2592–2601 (2001).
- 43) Ishimoto T., Nagano O., Yae T., Tamada M., Motohara T., Oshima H., Oshima M., Ikeda T., Asaba R., Yagi H., Masuko T., Shimizu T., Ishikawa T., Kai K., Takahashi E., Imamura Y., Baba Y., Ohmura M., Suematsu M., Baba H., Saya H., CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc⁻ and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*, **19**, 387–400 (2011).
- 44) Kosaki R., Watanabe K., Yamaguchi Y., Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res.*, **59**, 1141–1145 (1999).
- 45) Itano N., Sawai T., Miyaishi O., Kimata K., Relationship between hyaluronan production

- and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells, *Cancer Res.*, **59**, 2499–2504 (1999).
- 46) Cheng X. B., Sato N., Kohi S., Koga A., Hirata K., Receptor for hyaluronic acid-mediated motility is associated with poor survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Cancer*, **6**, 1093–1098 (2015)
- 47) Lee H., Lee K., Park T. G., Hyaluronic acid-paclitaxel conjugate micelles: synthesis, characterization, and antitumor activity. *Bioconjugate Chem.*, **19**, 1319–1325 (2008).
- 48) Bajaj G., Kim M. R., Mohammed S. I., Yeo Y., Hyaluronic acid-based hydrogel for regional delivery of paclitaxel to intraperitoneal tumors. *J. Controlled Rel.*, **158**, 386–392 (2012).
- 49) Choi K. Y., Min K. H., Na J. H., Choi K., Kim K., Park J. H., Kwon I. C., Jeong S. Y., Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and *in vivo* biodistribution. *J. Mater. Chem.*, **19**, 4102–4107 (2009).
- 50) Chiara D. M., Luigi P., Capitani D., Mannina L., Banzato A., Rondina M., Renier D., Rosato A., Crescenzi V., Hyaluronic as carrier of carboranes for tumor targeting in born neutron capture therapy. *Biomacromolecules*, **8**, 552–559 (2007).
- 51) Eguchi K., Nakamura H., Zhou J., Fang J., Yokomizo K. and Haratake M., Hyaluronic acid-zinc protoporphyrin conjugates for photodynamic antitumor therapy. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, **8**, 440 (2017).
- 52) Khairutdinov R. F., Serpone N., Photoluminescence and transient spectroscopy of free base porphyrin aggregates. *J. Phys. Chem. B.*, **103**, 761–769 (1999)