

博 士 論 文

がんのセラノステイクスを目指した 医用工学的研究

平成 30 年度

崇城大学 大学院 工学研究科
応用生命科学専攻 博士後期課程
医用生体工学講座

1619D02

奥 村 真 樹

目次

| | |
|---|----|
| 第1章 緒論 | 1 |
| 第2章 ハイブリッドリポソームおよびインドシアニンググリーン含有 ハイブリッドリポソームの膜物性 | |
| 2-1 序 | 8 |
| 2-2 実験 | |
| 2-2-1 試料 | 9 |
| 2-2-2 ハイブリッドリポソームの調製 | 10 |
| 2-2-3 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの調製 | 10 |
| 2-2-4 動的光散乱法による膜直径の測定 | 10 |
| 2-3 結果と考察 | |
| 2-3-1 ハイブリッドリポソームの膜直径 | 11 |
| 2-3-2 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの膜直径 | 13 |
| 2-4 総括 | 16 |
| 第3章 ハイブリッドリポソームの <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での 大腸がんに対する制がん効果 | |
| 3-1 序 | 17 |
| 3-2 実験 | |
| 3-2-1 試料 | 18 |
| 3-2-2 ハイブリッドリポソームの調製 | 18 |
| 3-2-3 使用細胞 | 18 |
| 3-2-4 使用動物 | 18 |
| 3-2-5 マウス正常大腸細胞の分離 | 19 |
| 3-2-6 WST-8 assay を用いた細胞増殖抑制試験 | 20 |
| 3-2-7 TUNEL 法によるアポトーシス誘導の観察 | 21 |
| 3-2-8 PI assay による DNA 断片化率の測定 | 22 |
| 3-2-9 細胞膜流動性の測定 | 23 |
| 3-2-10 大腸がん皮下および同所移植モデルマウスの作製 | 24 |
| 3-2-11 大腸がん皮下および同所移植モデルマウスに対する ハイブリッドリポソームの治療実験 | 24 |

| | |
|---|----|
| 3-2-12 腫瘍組織切片の観察 | 25 |
| 3-3 結果と考察 | |
| 3-3-1 ハイブリッドリポソームの大腸がん細胞に対する増殖抑制効果 | 26 |
| 3-3-2 ハイブリッドリポソームの大腸がん細胞に対する アポトーシス誘導 | 30 |
| 3-3-3 ハイブリッドリポソームの大腸がん細胞の 膜流動性に与える影響 | 33 |
| 3-3-4 大腸がん皮下移植モデルマウスに対する ハイブリッドリポソームの治療効果 | 36 |
| 3-3-5 大腸がん同所移植モデルマウスに対する ハイブリッドリポソームの治療効果 | 41 |
| 3-4 総括 | 46 |
| 第4章 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 大腸がんに対する特異的蓄積 | |
| 4-1 序 | 48 |
| 4-2 実験 | |
| 4-2-1 試料 | 50 |
| 4-2-2 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの調製 | 50 |
| 4-2-3 使用細胞 | 50 |
| 4-2-4 使用動物 | 50 |
| 4-2-5 マウス正常大腸細胞の分離 | 51 |
| 4-2-6 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 大腸がん細胞への特異的蓄積 | 51 |
| 4-2-7 大腸がん皮下および同所移植モデルマウスの作製 | 52 |
| 4-2-8 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 大腸がん皮下および同所移植モデルマウスの 腫瘍への蓄積の観察 | 52 |
| 4-3 結果と考察 | |
| 4-3-1 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 大腸がん細胞への特異的な蓄積 | 53 |
| 4-3-2 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 大腸がん皮下移植モデルマウスの腫瘍への蓄積 | 57 |
| 4-3-3 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 大腸がん同所移植モデルマウスの腫瘍への蓄積 | 59 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4-4 | 総括 | 61 |
| 第5章 | 乳がん同所移植モデルマウスに対する ハイブリッドリポソームのセラノスティクス | |
| 5-1 | 序 | 62 |
| 5-2 | 実験 | |
| 5-2-1 | 試料 | 65 |
| 5-2-2 | ハイブリッドリポソームの調製 | 65 |
| 5-2-3 | インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの調製 | 65 |
| 5-2-4 | 使用細胞 | 65 |
| 5-2-5 | 使用動物 | 65 |
| 5-2-6 | マウス正常乳腺細胞の分離 | 66 |
| 5-2-7 | WST-8 assay を用いた細胞増殖抑制試験 | 66 |
| 5-2-8 | PI assay による DNA 断片化率の測定 | 67 |
| 5-2-9 | 細胞膜流動性の測定 | 68 |
| 5-2-10 | 乳がん同所移植モデルマウスの作製 | 69 |
| 5-2-11 | 乳がん同所移植モデルマウスに対する ハイブリッドリポソームの治療実験 | 69 |
| 5-2-12 | TUNEL 法によるアポトーシス誘導の観察 | 69 |
| 5-2-13 | インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの <i>in vitro</i> での乳がん細胞および正常乳腺細胞への蓄積の比較 | 70 |
| 5-2-14 | インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 乳がん同所移植モデルマウスの腫瘍への蓄積の観察 | 71 |
| 5-3 | 結果と考察 | |
| 5-3-1 | ハイブリッドリポソームの乳がん細胞に対する アポトーシス誘導による増殖抑制効果 | 72 |
| 5-3-2 | ハイブリッドリポソームの乳がん細胞の膜流動性に与える影響 | 75 |
| 5-3-3 | 乳がん同所移植モデルマウスに対する ハイブリッドリポソームのアポトーシス誘導による治療効果 | 78 |
| 5-3-4 | インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 乳がん細胞への特異的な蓄積 | 83 |
| 5-3-5 | インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 乳がん同所移植モデルマウスの腫瘍への蓄積 | 86 |
| 5-4 | 総括 | 88 |

| | |
|--------|-----|
| 第6章 総論 | 90 |
| 参考文献 | 95 |
| 謝辞 | 100 |

第1章 緒論

がんは1981年以降から日本の死亡原因の第1位である。現在では医療技術の発展により、死亡率そのものは減少しているが、超高齢社会につれ死亡者数は増加している¹⁾。

がんの治療法には、外科療法、化学療法、放射線療法がある²⁾。外科療法は腫瘍組織を、外科的手術によって切除し、治療を行う方法である。胃がん、肺がん、大腸がん、乳がんなど多くのがんの治療で行われており、腫瘍組織を完全に摘出できれば、再発の危険性は大きく下がる。しかし、腫瘍組織を完全に摘出できるケースは少なく、完全摘出には周辺の組織と一緒に切除する必要もあるため、臓器の機能を大きく損なう可能性がある。また、乳がんなどに代表される身体の表面にあるがん腫瘍組織の摘出には、患者の生活の質(Quality of life ; QOL)の低下につながるため、配慮が必要である。また、進行がんのように全身に転移している場合には外科療法だけでは治療は行えないという欠点もある。進行がんに対する治療には、化学療法が用いられる。化学療法に用いられる薬は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、植物アルカロイド、抗生物質、プラチナ製剤、ビタミンA誘導体、インターフェロン、ホルモン剤がある。多くの抗がん剤の作用機序は、DNAの破壊や増殖に関係する分子の阻害によって効果を示すため、がん細胞以外の頻繁に増殖している細胞にも影響することで副作用を伴う。放射線療法では腫瘍組織に放射線を照射し、DNAを破壊することで治療を行う。外科療法と異なり、治療を行った組織を温存した治療を行うため、患者のQOLに配慮した治療効果を得られる場合がある。乳がんにおける、乳房温存療法がそれにあたり、外科手術で最小限の腫瘍組織を摘出し、残存したがん細胞は放射線療法を実施し、乳房の完全摘出を行わない治療が行われる。しかし、多量の被爆を伴うという問題がある。

従来のがん化学療法では、がんのステージ毎に決められた薬剤投与スケジュールに則り治療を行い、治療効果を評価するまでに長い時間を要した。そこで近年注目を集めているのが、がんの個別化医療(テーラーメイド医療)である。個別化医療では患者のがんを遺伝子のオミックス解析などで特徴づけを行い、効果的な抗がん剤などを選定し、患者の副作用の軽減や治療期間の短縮を目的としている。例えばトラスツズマブはHER2(EGFR2)を特異的に阻害する分子標的薬であり、乳がんや胃がんにおいてHER2遺伝子の異常が認められれば効果的な治療を行える³⁾。他にも、肺がん治療薬であるゲフィチニブとEGFR遺伝子の検査⁴⁾、大腸がんにおけるセツキシマブとKRAS変異の検査⁵⁾、慢性骨髄性白血病におけるイマチニブとBcr-Abl遺伝子変異の検査⁶⁾において遺伝子検査の有用性が得られている。

個別化医療と同様に、患者の QOL を向上させるためにセラノスティクス薬剤についての研究が活発に行われている。セラノスティクス(Theranostics)とは治療(Therapeutics)と診断(Diagnostics)を組み合わせた言葉であり、一つの薬剤で治療と診断を同時に行うという概念である。従来のがん治療においては、診断・治療・治療効果の評価といったプロセスが必要であったが、セラノスティクス薬剤を用いれば診断と治療を同時に行え、治療時間の短縮や経済的負担の軽減が期待できる。

セラノスティクスの概念は近年提唱されたものだが、甲状腺がんにおいては治療と診断を同時に行える放射性ヨウ素(^{131}I)が 1952 年より使用されてきた⁷⁾。生体内にあるヨウ素はほぼ全てが甲状腺で代謝されるため、放射性ヨウ素を投与し、放射線量を画像化(シンチグラフィ検査)することでバセドウ病などの甲状腺機能亢進症や転移性の甲状腺がんの診断に使用することができる。また、甲状腺がんの外科手術後、残存がん細胞に対して放射性ヨウ素を投与することにより放射線による治療を行うことができる。さらに、遠隔転移していた場合は生体内の局在を観察することで、転移巣の場所の確認と治療を同時に行うことができ、セラノスティクス薬剤であるのは間違いない。しかし、日本においては放射性同位体の取り扱いが法令で厳しく規制されているため、使用には特殊な施設が必要であり、診断や治療が行える施設が少ない。また、放射線による治療は周囲の細胞にも影響を与えるため予期せぬ副作用が現れる危険性がある。

そこで、放射性同位体を用いずに副作用が少ない診断や治療法の開発を行うため、ナノパーティクルを用いたセラノスティクス薬剤の開発が行われている。金属粒子やリポソームなどのナノパーティクルは、これまで DDS(Drug Delivery System)研究において広く使用されてきた歴史があり、腫瘍に集まりやすく排出されにくい(Enhanced permeability and retention ; EPR)効果による腫瘍選択性が明らかになっている。現在、セラノスティクスへの応用研究がされているナノパーティクルは主に金コロイドなどの金属粒子、超常磁性ナノ粒子、リポソーム、ミセルなどがある(Fig. 1-1)。

金コロイドは直径が数 nm~300 nm 程度の粒子で、表面電荷が負に帯電しているため、正に帯電している抗体などのタンパク質を容易に結合させることができる。腫瘍に蓄積した金コロイドは表面増強ラマン散乱や CT による検出が行えるため、がん診断薬として用いることができる⁸⁾。また、金コロイドに 700~800 nm の近赤外光を照射することで熱を発生させ治療を行う方法や X 線の照射で活性酸素を発生させ治療を行う方法が開発されている⁹⁾。

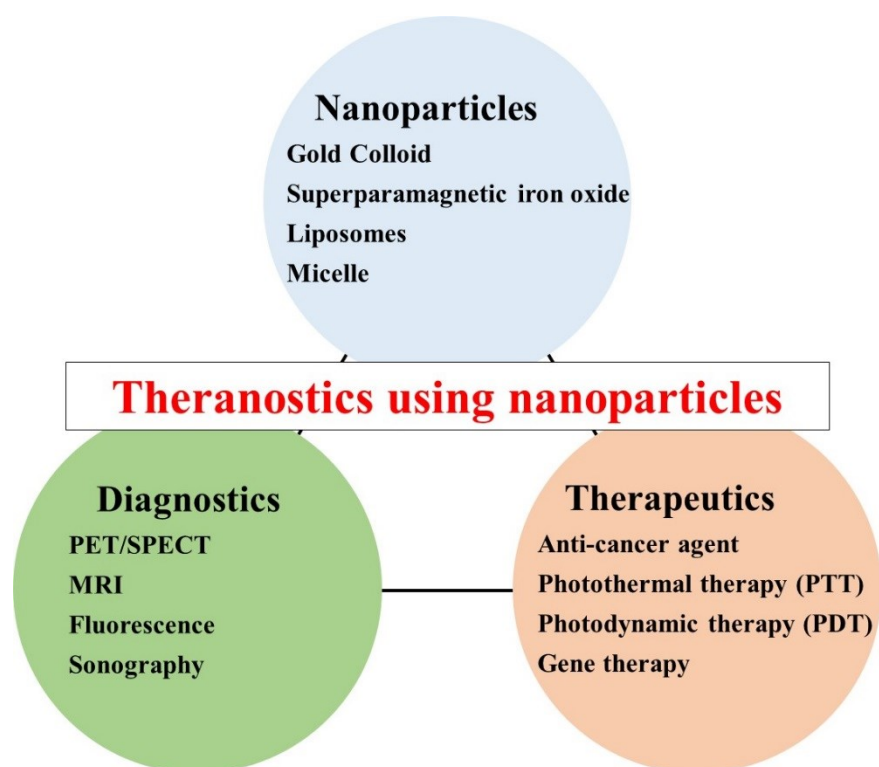


Fig. 1-1 Theranostics using nanoparticles.

常磁性ナノ粒子は水溶液中で温度変化やブラウン運動によって磁気の向きがランダムに入れ替わる物質のことをいう。超常磁性ナノ粒子とは、磁気の方角の入れ替わりが早いため、外部に磁場がないときは見かけ上では磁気がない（測定できない）物質のことである。しかし、外部に磁気が発生したときには常磁性物質よりも磁気に対する感受性が強いことが特徴である。この特徴を利用すると、MRI の撮影時に局在部位を容易に判別することができるため、MRI 増感剤として使用されてきた¹⁰⁾。セラノスティクスへの応用としては、超常磁性ナノ粒子として広く用いられている酸化鉄ナノ粒子に抗がん剤を含有させる方法や交番磁界を照射することで発生する熱を利用した治療（温熱療法）について研究がされている^{11,12)}。

リポソームやミセルは、素材や調製方法を変えることで膜サイズなどを調整可能で、親水性、疎水性の物質を内包させることができるため様々な特徴を付加できる医薬材料である。古くから DDS への応用研究が行われており、抗がん剤であるドキソルビシンを内包したリポソーム製剤が上市している。近年では pH 応答性、温度応答性、超音波応答性といった何らかの応答性を利用したトリガー式のリポソームの開発が行われており、能動的な薬物輸送の試みが行われている。セラノスティクス薬剤としての応用には蛍光試薬を用いたがん検出、抗がん

剤による治療効果を併せ持つ多機能リポソームの研究が行われている。

セラノスティクス研究での治療法に光温熱療法(Photothermal therapy ; PTT)や光線力学的療法(Photodynamic therapy ; PDT)がある¹³⁻¹⁵。蛍光物質などの光感受性物質に励起光を照射すると、エネルギーを受けとった物質は励起状態になる。励起状態は不安定であり、光感受性物質は基底状態に戻るためにエネルギーを放出する。蛍光物質では光エネルギー（蛍光）を放出するが、一部のエネルギーは熱や活性酸素の発生に寄与する。PTT/PDT ではこの熱や活性酸素を利用し、がんを物理的にダメージを与えることで治療を行っている(Fig. 1-2)。

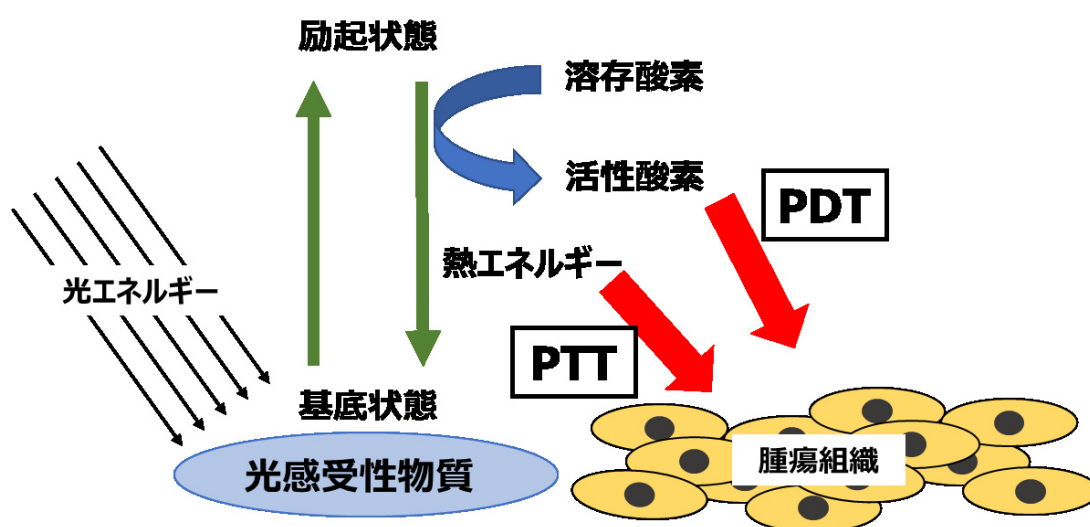


Fig. 1-2 光温熱療法(PTT)および光線力学的療法(PDT)

PTT/PDT によるがん治療薬としては、第一世代のフォトフリンと第二世代のレザフィリンがある¹⁶⁻²⁰。しかし、フォトフリンは副作用の問題があり、レザフィリンが主に使用されている。レザフィリンは 664 nm 付近に吸収極大を持ち、活性酸素を発生させることで抗腫瘍効果を示す。腫瘍に対して親和性があるため静脈投与により腫瘍に選択的に集まる特徴を持っている。現在、保険適用で治療が行われるのは早期肺癌、局所遺残再発食道癌、悪性脳腫瘍に対する治療においてのみだが、他のがんに対しても臨床試験が行われている。しかしながら、レザフィリンは非常に高価であり、光過敏症のリスクがある。光過敏症に対する予防策として、照度 500 ルクス以下の室内で 2 週間過ごす必要があり、直射日光を浴びてはならないことは患者の QOL を損ねる可能性がある。

PTT/PDT に用いられる光感受性試薬は、フタロシアニン系化合物やインドシアニンググリーン(ICG)などがある。フタロシアニン系化合物で研究が進んでいるものは、小林らが開発した上皮成長因子受容体(EGFR)に対する抗体(MAb)にIRDye700DX (IR700)というフタロシアニン誘導体を結合させた MAb-IR700 がある²¹⁾。MAb-IR700 は現在、頭頸部扁平上皮がんに対する第 I / II 相の治験がアメリカで行われており、日本でも第 I 相の治験が行われる予定である。治療方法としては、EGFR に結合した MAb-IR700 に近赤外光を照射し、熱が発生して細胞障害を示した。このときに、死滅したがん細胞由来物質を抗原として免疫系が活性化するため、転移したがんにも有効であった²²⁾。

ICG は肝機能測定試薬や血管造影剤としてアメリカ食品医薬品局(Food and Drug Administration ; FDA)に認可されており、日本でも一般的に使用されている。ICG は、(1) 生体内でほとんど代謝を受けず、肝臓から速やかに排出されるため非常に低毒性である。(2) 励起光波長、蛍光波長がともに生体透過性に優れた近赤外光であるため、他の試薬よりも深部の観察が行えるといった利点がある。また、ICG は(3) リン脂質と親和性が高いため²³⁻²⁵⁾、リポソームといったナノ粒子に含有させ、がんを検出する試みが行われている²⁶⁾。ICG を用いた乳がん²⁷⁾や肝臓がん²⁸⁾に対する PTT/PDT への応用が最近報告されており、ICG は優れたセラノスティクス薬剤の素材である。

一方、セラノスティクス薬剤の開発研究において、いくつかの課題が指摘されてきた(Table 1-1)。例えば、(1) 複数の機能を付加する場合の試料調製の煩雑さである。蛍光試薬などの修飾において未反応のものを分離する工程が必要であるため、機能が多くなればなるほど最終生成物の収率が悪くなる可能性がある。(2) 生体由来である抗体は大量生産が難しいため、これらを組み合わせたものは非常に高価になると考えられる。また、凝集などにより長期間の保存が難しい金ナノ粒子は、調製が複雑である場合がある。(3) 生分解性ではない基材を用いることにより、抹消組織への沈着といった副作用を伴う危険性もある。そのため、簡便に調製でき、生体適合性が高く、治療と診断の能力を有したセラノスティクス薬剤の開発が必要である。

Table 1-1 セラノスティクス開発研究に用いられているナノ粒子

| 物質 | 問題点 |
|-----------|-----------------------------|
| 金コロイド | 凝集が起きやすい、生分解性ではない、特異性が低い、高価 |
| 超常磁性ナノ粒子 | 粒径の調節が難しい、親水性ではない、特異性が低い |
| リポソーム/ミセル | 膜の不安定性、調製の煩雑さ、特異性が低い |

上岡らが開発したハイブリッドリポソーム(HL)^{29,30)}は、ベシクル分子とミセル分子を緩衝溶液中で超音波照射することで得られ(Fig. 1-3)、従来のリポソーム調製法のように有機溶媒に溶解し、エバポレーターによる揮発作業を必要とせず、有機溶媒の混入のない簡便で安全な手法で調製できる。素材および組成比を変更することで、容易に膜サイズ、相転移温度、膜流動性のコントロールが可能な医用素材である³¹⁻³⁴⁾。当初の HL は、ベシクル分子に二本鎖四級アンモニウム塩、ミセル分子に一本鎖四級アンモニウム塩を用い、酵素の触媒作用を *in vitro* で再現し、膜反応場の機能解明を目的として用いられてきた³⁵⁻⁴⁴⁾。その後、リン脂質と中性ミセル分子を素材とする HL に薬物を内包させ、薬物送達システム(DDS)のキャリアーとして用いる他に⁴⁵⁻⁴⁸⁾、HL のみを用いたがん治療効果が明らかとなっている⁴⁹⁻⁵⁹⁾。さらに、正常細胞には影響を与えず、がん細胞に特異的に融合・蓄積し⁶⁰⁾、アポトーシスを誘導することが明らかとなっている⁶¹⁻⁶⁶⁾。また、HL の制がん効果と細胞膜流動性との間に相関性が得られており^{67,68)}、HL が細胞の物理的特性を認識することでがん細胞に特異的に蓄積し、アポトーシス誘導による治療を行っていることが考えられる。*in vivo* における担がんモデルマウスを用いた実験では、HL のみによる治療効果⁶⁹⁻⁸⁵⁾や肝転移抑制効果⁷²⁾が明らかとなっている。安全性試験において、正常動物に対する長期間の反復投与毒性試験^{73,74,76)}および体内動態試験⁷⁴⁾で毒性は確認されなかった。さらに、生命倫理委員会の承認を経て、悪性リンパ腫の患者に対する延命効果および顕著な固形リンパ腫の縮小が確認され^{73,74)}、従来の副作用の大きな抗がん剤に変わる新たな化学療法剤として期待される。

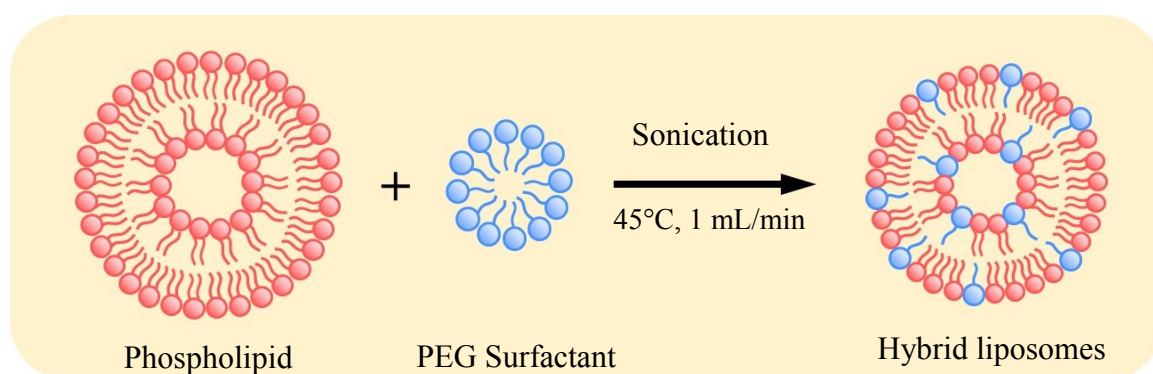


Fig. 1-3 Schematic representation of hybrid liposomes.

本研究では、日本人における死亡率の高い大腸がんと日本人女性の罹患率が高い乳がんの治療と診断を目的とした新規セラノスティクス薬剤の開発を目指した。大腸がんは内視鏡による検出が可能であり、乳がんは表層近傍であるため

蛍光検出が容易である。HL を用いて、*in vitro* および *in vivo* における大腸がん細胞および乳がん細胞に対する治療効果を検討した。また、がんの診断を目的として近赤外蛍光試薬である ICG を含有させた HL(HL/ICG)を新たに創製し、*in vitro* および *in vivo* における大腸がん細胞および乳がん細胞への蓄積を検討した。

本論文は、以下の 6 章で構成される。第 2 章では、HL および ICG 含有 HL の膜物性について述べる。第 3 章では、HL の *in vitro* および *in vivo* における大腸がん細胞に対するセラノスティクスへの応用としてアポトーシス誘導による抗腫瘍効果（治療）について述べる。第 4 章では、ICG 含有 HL の大腸がんに対するセラノスティクスへの応用として特異的蓄積（診断）について述べる。第 5 章では、HL および ICG 含有 HL の乳がんに対するセラノスティクスについて述べる。第 6 章は、以上の研究結果の総論である。

第2章 ハイブリッドリポソームおよびインドシアニンググリーン含有 ハイブリッドリポソームの膜物性

2-1 序

生体膜とは、脂質(リン脂質、コレステロール、糖脂質)やタンパク質によって構成される脂質二分子膜である。脂質二分子膜は細胞の内外を区別するバリアとしての機能があり、水溶性の物質は通過できないようになっている。細胞の内外を区切ることで、物質の濃度勾配が生じる。細胞はこの濃度勾配の変化によって環境に適応しており、細胞内外の区分が生存に重要だとわかる。物質の輸送には膜に存在する各チャネルやポンプによって行われ、細胞に必要な環境を構築している。この輸送は細胞に必要な物質を、必要量だけ輸送し、不要なものを排出する機能としても活躍しており、生物の恒常性を維持するために重要な役割を担っている。

Bangham らによって、フォスファチジルコリンを水溶液中に懸濁することで、生体膜と似た構造を持つ閉鎖水胞(リポソーム)を形成することが初めて明らかとなった⁸⁶⁾。近年においてはリポソームを用いた医用工学的な応用が盛んに行われている。リポソームは触媒の反応場としての機能や、薬物を輸送し効果的に機能させる DDS (Drug delivery system) キャリアーとして用いられ、副作用の低減などに注目されている。

リポソームを生体内で用いる場合、素材の安全性、リポソームの安定性、サイズが重要である。リポソームを静脈内投与する場合、肝臓での細網内皮系(RES: Reticuloendothelial System)^{87,88)}への取り込みを回避しなければならない。RES を回避するためには直径を 100 nm 以下にする必要がある。また、PEG (Polyethylene glycol) を修飾したリポソームにおいて RES を回避し、体内残留性が高くなることが報告されている⁸⁹⁻⁹²⁾。

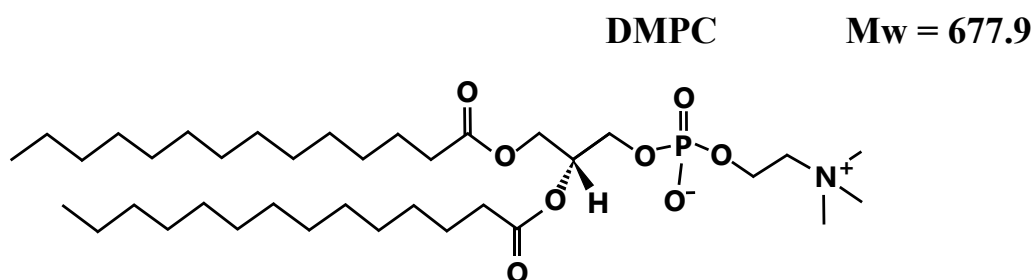
本章では、ハイブリッドリポソームのがん治療薬への応用として RES 回避可能な制がん剤の開発を目的とし、双性リン脂質(DMPC)と PEG 系界面活性剤(C₁₂(EO)₂₅)からなるハイブリッドリポソーム(HL)の膜物性について検討した。さらに、近赤外蛍光試薬である Indocyanine green (ICG) を含有させた HL/ICG を新たに創製し、膜直径の測定による膜安定性について検討した。

2-2 実験

2-2-1 試料

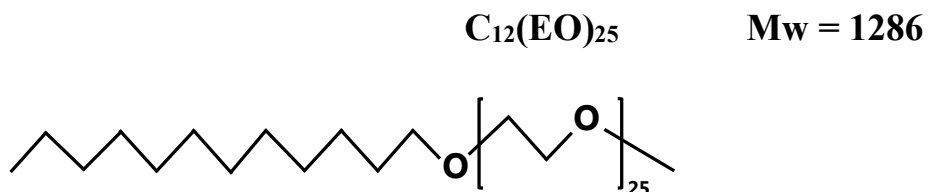
【リン脂質】

L- α -ジミリストイルフォスファチジルコリン (DMPC)は、市販品(COATSOME MC-4040, Purity >99%, 日本油脂)をそのまま使用した。以下に構造式を示す。



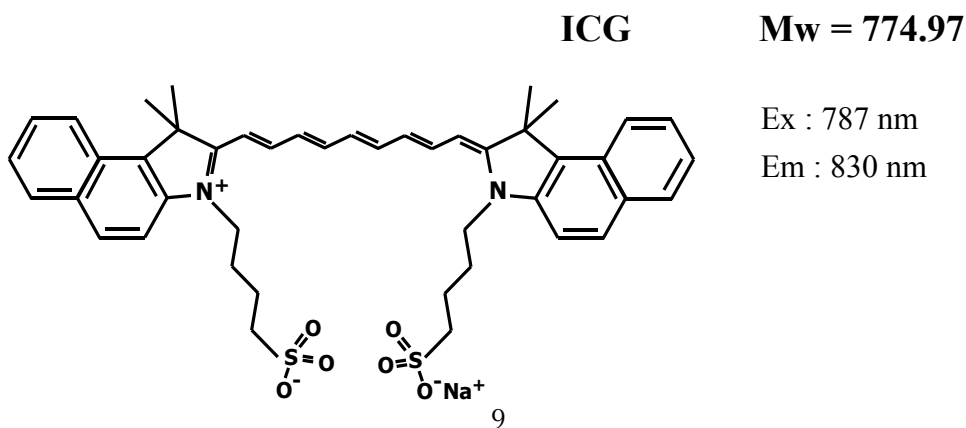
【界面活性剤】

純度が高いポリ(オキシエチレン)(25)ドデシルエーテル (C₁₂(EO)₂₅)は、市販品(日本ケミカル)をそのまま使用した。以下に構造式を示す。



【蛍光試薬】

近赤外蛍光試薬であるインドシアニングリーン (ICG)は、市販品(東京化成工業)をそのまま使用した。以下に構造式を示す。



2-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

90 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅, Hybrid liposomes (HL)の調製はリン脂質および界面活性剤を秤量し、5%ブドウ糖水溶液(大塚製薬)中で超音波卓上型洗浄機(ULTRASONIC-CLEANER, WT-200-M, 200 W, 28/45 kHz)により窒素雰囲気下で超音波照射(45 °C, 1 mL/min)し、均一な溶液が得られたことを確認し、滅菌済みメンブレンフィルター(孔径 0.20 μm, DISMIC-13CP, ADVANTEC)でろ過滅菌したものを試料溶液とした。試料は室温(25 °C)で保存した。

2-2-3 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの調製

インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソーム(HL/ICG)の調製はリン脂質、界面活性剤に加えて ICG(1 mol%および 4 mol%)を秤量し、HL と同様にろ過滅菌まで行った。保存温度は、蛍光試薬の退色を考慮し冷蔵(4 °C)で行った。

2-2-4 動的光散乱法による膜直径の測定

ハイブリッドリポソームおよびインドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの膜直径(d_{hy} : Hydrodynamic Diameter)は、光散乱光度計(ELSZ-0, 大塚電子)を用い、動的光散乱法により測定した。光源として He-Ne レーザーの 633 nm の発振線を出力 10 mW で用い、散乱角 90°で測定し、得られた拡散係数(D)を(1)式(Stokes-Einstein)に代入し、膜直径(d_{hy})を求めた。

$$d_{hy} = \kappa T / (3 \pi \eta D)$$

ここで、 κ は Boltzmann 定数、 T は絶対温度、 η は溶媒の粘度である。試料溶液の測定は 25 °C で行った。

2-3 結果と考察

2-3-1 ハイブリッドリポソームの膜直径

ハイブリッドリポソーム(90 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅, HL)の膜直径を動的光散乱法に基づき測定し、膜の安定性について検討した。結果を Fig. 2-1 に示す。HL の膜直径は調製直後は約 77 nm で、その後調製 7 日目まで緩やかに小さくなり、約 24 nm まで減少し、1 ヶ月以上安定な膜直径を維持した。DMPC は調製直後は約 118 nm で、その後大きく膜サイズが変化し、調製 14 日目に沈殿した。このことから、HL は長期間に渡って安定的な膜を形成していたことが明らかとなった。

以上の結果から、HL は臨床応用において静脈内投与で細網内皮系(RES)を回避可能な 100 nm 以下⁸⁹⁻⁹²⁾の膜直径を 1 ヶ月以上維持できることが明らかとなった。

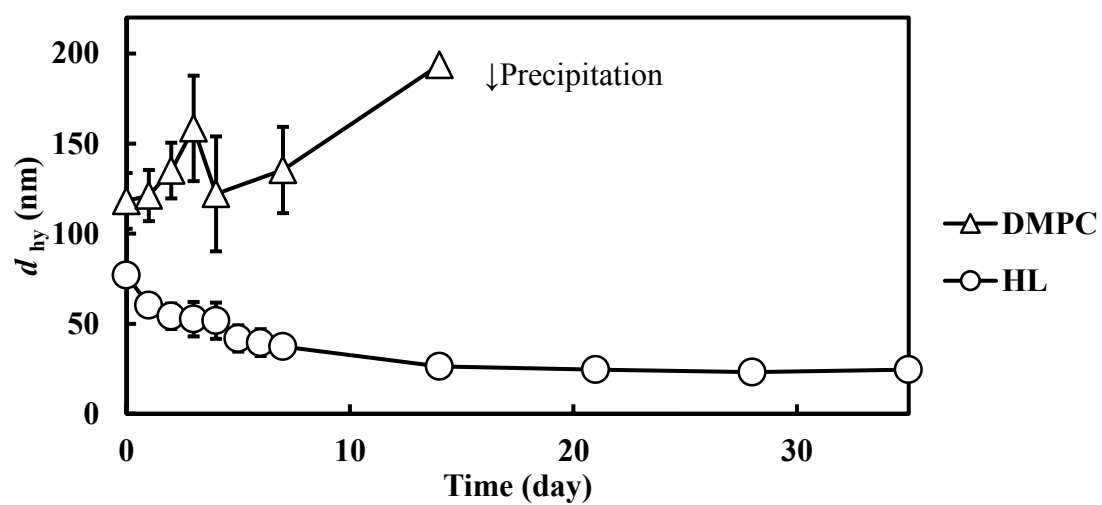


Fig. 2-1 Time courses of d_{hy} change for HL at 25 °C.

Data represent the mean ($n=1\sim4$) \pm S.E.

[DMPC] = 2.0×10^{-2} M, [C₁₂(EO)₂₅] = 2.33×10^{-3} M.

2-3-2 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの膜直径

インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソーム(86 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅/4 mol% ICG, HL/4 mol% ICG)の膜直径を Fig. 2-2 に示す。HL/4 mol% ICG は調製直後から 4~10 nm の膜直径を 1 ヶ月以上維持していた。また、DMPC/4 mol% ICG は調製直後から 50~70 nm の膜直径を 1 ヶ月以上維持していた。

ICG を 4 mol%含有させた場合、RES 回避可能な膜直径であったが、膜粒径の分布のばらつきが大きく膜の安定性に問題があった。そのため、インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソーム(89 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅/1 mol% ICG, HL/1 mol% ICG)を調製した。HL/1 mol% ICG の膜直径を Fig. 2-3 に示す。DMPC/1 mol% ICG は調製直後から 150 nm 前後の膜直径を 1 ヶ月維持しており、HL/1 mol% ICG は調製直後から 15 nm 前後の膜直径を 1 ヶ月維持していた。

以上の結果から、HL/ICG は臨床応用において静脈内投与で細網内皮系(RES)を回避可能な 100 nm 以下⁸⁹⁻⁹²⁾の膜直径を 1 ヶ月以上維持できることが明らかとなった。

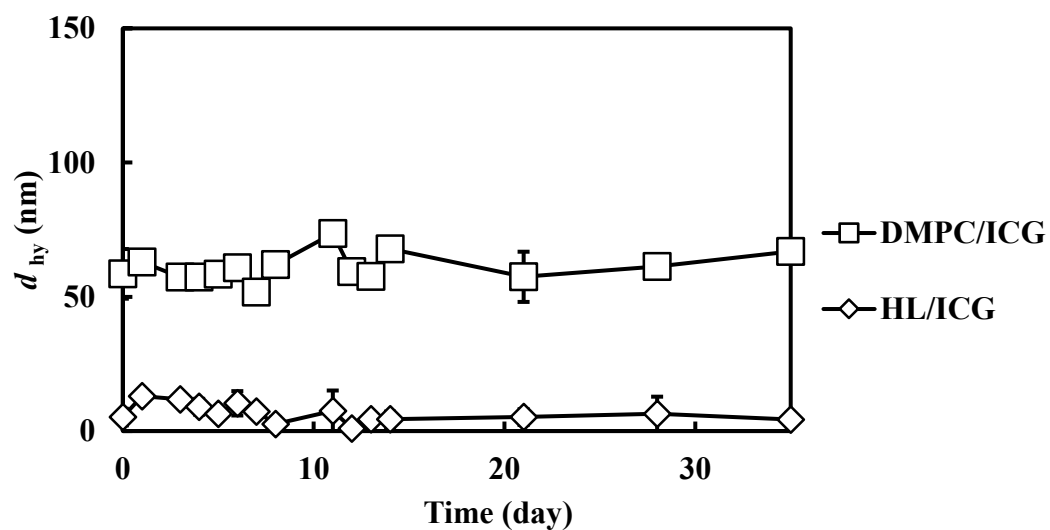


Fig. 2-2 Time courses of d_{hy} change for HL/4 mol% ICG at 4 °C.

Data represent the mean ($n=1\sim3$) \pm S.E.

[DMPC] = 2.0×10^{-2} M, [C₁₂(EO)₂₅] = 2.33×10^{-3} M, [ICG] = 9.30×10^{-4} M.

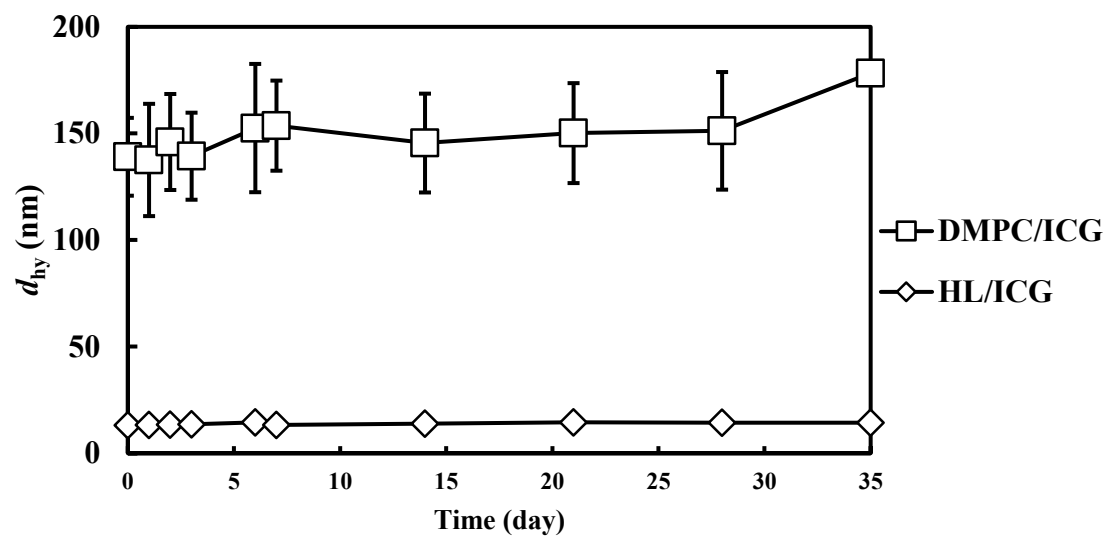


Fig. 2-3 Time courses of d_{hy} change for HL/1 mol% ICG at 4 °C.

Data represent the mean ($n=1\sim3$) \pm S.E.

[DMPC] = 2.0×10^{-2} M, [C₁₂(EO)₂₅] = 2.25×10^{-3} M, [ICG] = 2.20×10^{-4} M.

2-4 総括

本章では、HL(90 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅)および HL/4 mol% ICG (86 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅/4 mol% ICG)、HL/1 mol% ICG (89 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅/1 mol% ICG)の膜物性を検討し、以下のような知見が得られた。

1. HL の膜直径は調製直後は約 77 nm で、調製 7 日目まで緩やかに約 24 nm まで小さくなり、その後 1 ヶ月以上 100 nm 以下の安定な膜直径を維持した。
2. HL/4 mol% ICG は調製直後から 4~10 nm の膜直径を 1 ヶ月以上維持していた。また、DMPC/4 mol% ICG は調製直後から 100 nm 以下の 50~70 nm の膜直径を 1 ヶ月以上維持していた。
3. DMPC/1 mol% ICG は調製直後から 150 nm 前後の膜直径を 1 ヶ月維持しており、HL/1 mol% ICG は調製直後から 100 nm 以下の 15 nm 前後の膜直径を 1 ヶ月維持していた。

以上の結果から、HL および HL/ICG は臨床応用において静脈内投与で細網内皮系 (RES) を回避可能なサイズであることが明らかとなった。

第3章 ハイブリッドリポソームの *in vitro* および *in vivo* での 大腸がんに対する制がん効果

3-1 序

大腸がんとは直腸や結腸に発生した悪性腫瘍の総称である。近年は、食生活との関連が指摘されており、赤肉の摂取や食品添加物の多量摂取、食物繊維不足からくる便秘などが発生の要因であると考えられている。日本においては、食生活の欧米化によって増加傾向にあるがんの一種である。大腸がんの発生には Adenomatous polyposis coli (APC)がん抑制遺伝子が大きく関わっていることが明らかとなり⁹³⁾、APC がん抑制遺伝子の変異は家族性大腸腺腫症の原因遺伝子でもある。APC は細胞の移動に関係しており、欠損すると大腸内に無数のポリープを生じる。APC 遺伝子の他にがん遺伝子やがん抑制遺伝子の欠損が生じると、ポリープががん化すると考えられている。

大腸がんの症状としては、血便や排便の変化、腹部の膨満感、痛みを伴う下腹のしこり、体重減少があげられる。しかし、患者の多くは症状をがんによるものだと考えることが少なく、早期発見が困難な要因となっている。

大腸がんの治療は、早期の場合は内視鏡を用いた切除によって行われるが、病巣が広範囲に検出された場合、開腹後の切除が必要になる。術後の経過を良くするため、切除後には抗がん剤や放射線による治療が行われることもある。

ハイブリッドリポソーム(95 mol% DMPC/5 mol% C₁₂(EO)₂₅)の大腸がん(WiDr)細胞および WiDr 細胞肝転移モデルマウスに対する治療効果がすでに報告されている⁹⁴⁾。そこで、本章では双性リン脂質(DMPC)と PEG 系界面活性剤(C₁₂(EO)₂₅)を用いた 90mol% DMPC/10mol% C₁₂(EO)₂₅ ハイブリッドリポソームの大腸がん(WiDr, HCT116)細胞に対するアポトーシスによる増殖抑制効果を検討した。さらに、WiDr 細胞皮下移植モデルマウスに対する局所投与による治療効果および HCT116 細胞同所移植モデルマウスに対する静脈投与による治療効果についても検討した。

3-2 実験

3-2-1 試料

リン脂質(DMPC)と界面活性剤($C_{12}(EO)_{25}$)は、2-2-1 と同様のものを使用した。

3-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

ハイブリッドリポソームは 2-2-2 と同様の調製方法で作製した。サンプル濃度は 20 mM、保存は 25 °C で行った。

3-2-3 使用細胞

使用細胞は、ヒト結腸腺がん細胞株である WiDr 細胞(理化学研究所)および HCT116 細胞(理化学研究所)を用いた。培地には、WiDr 細胞は MEM (Gibco BRL)+10% Fetal bovine serum (FBS; HyClone Laboratories Inc.)+1% Non essential amino acid (NEAA; Gibco BRL)を HCT116 細胞には RPMI1640 (Gibco BRL)+10% FBS (HyClone Laboratories Inc.)を用い、37 °C、CO₂ 濃度 5%、湿度 95%条件下で培養した。

3-2-4 使用動物

使用動物は、高度免疫不全マウス(BALB/c-R/J)(雄性、7~10 週齢)を用いた。BALB/c-R/J⁹⁵は熊本大学の岡田誠司教授より恵贈して頂いたものを、自家繁殖して使用した。特徴として Jak3, Rag-2 遺伝子の 2 重欠損が挙げられ、T 細胞、B 細胞、NK 細胞が完全に欠如している。

マウスは、恒温恒湿環境下(室温 24±2 °C、湿度 55±10%、照明時間 12 時間)で飼育した。水および飼料はオートクレーブ滅菌済みのものを自由摂取させた。

3-2-5 マウス正常大腸細胞の分離

大腸がん細胞に対する HL の特異性を検討するため正常大腸細胞の分離を行った。マウス正常大腸細胞は、BALB/c-R/J マウスから大腸組織を摘出し、コラゲナーゼ法⁹⁾を用いて分離を行った。実験手順を以下に示す。

〈試薬〉

○高濃度抗生物質培地

マウス由来の微生物によるコンタミネーションを予防するため、RPMI1640/10% FBS 培地にペニシリン-ストレプトマイシンを通常の 5 倍濃度 (ペニシリン : 500 U/mL, ストレプトマイシン : 250 µg/mL) で添加したものを使用した。

○0.1% コラゲナーゼ培地

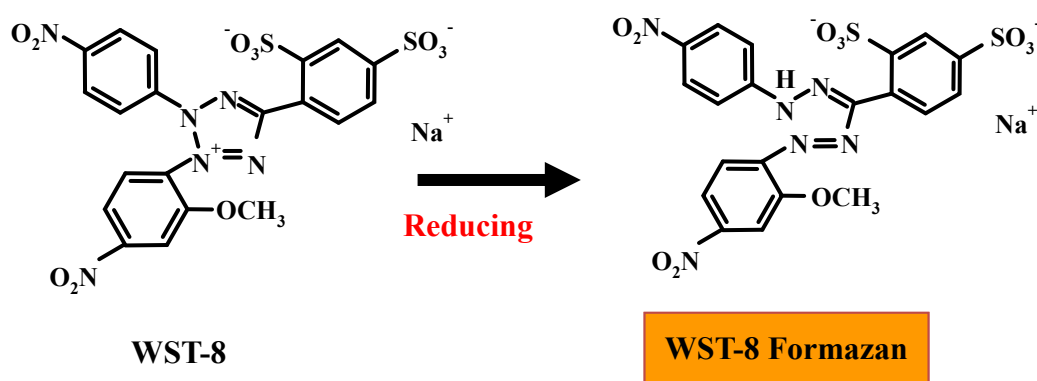
高濃度抗生物質培地にコラゲナーゼ(和光純薬 : 038-22361)を 0.1%溶解し、メンブレンフィルター(孔径 : 0.20 µm, DISMIC-13P, ADVANTEC)でろ過滅菌したものを使用した。

〈実験手順〉

- 1) 安楽死後のマウスから大腸組織を摘出し、PBS(-)中で手術用ハサミを用いて縦に切り開き、腸内の便を取り除いた。
- 2) 大腸組織を PBS(-)で 2 度洗浄し、手術用メスを用いて 1mm×1mm 程度に細切した。
- 3) 0.1%コラゲナーゼ培地中で 37 °C, 3 時間インキュベートし、シリンジと 24G の針を用いて細胞を分散させた。
- 4) 1000 rpm/3 min で遠心を行い、上清を除去後 RPMI1640 培地で懸濁した。この工程を合計 3 回行いコラゲナーゼの除去を行った。
- 5) 細胞を高濃度抗生物質含有培地で懸濁し、60 mm Dish に播種した。その後は 2~3 日ごとに培地交換を行った。

3-2-6 WST-8 assay を用いた細胞増殖抑制試験

WST-8 assay は細胞内電子伝達系における脱水素酵素反応により、高感度水溶性ホルマザンを生成する WST-8(2-[2-methoxy-4-nitrophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H tetrazolium, monosodium salt)を発色基質として用いることにより、細胞の増殖活性の評価や生細胞数を算出する方法である。WST-8 は kit 中に含まれる 1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate を介して培地中の細胞外乳酸脱水素酵素の補酵素である NADH から電子を受け取ることで還元され、水溶性の WST-8 formazan を生成する。この WST-8 formazan の生成量は生細胞数と比例関係にあるため、この比色値を吸光度として測定し、細胞増殖の指標をすることができる。そこで、HL の大腸がん(WiDr, HCT116)細胞および正常大腸細胞に対する増殖抑制効果を WST-8 assay により評価した。実験手順を以下に示す。



〈実験手順〉

- 1) 初期細胞数を 5.0×10^4 cells/mL に調整した細胞懸濁液を 96 well plate (Nunc)に 0.1 mL 播種し、インキュベーター内で 24 時間培養を行った。
- 2) 10~1000 μ M に調整した HL を 10 μ L/well 添加し、48 時間培養を行った。
- 3) WST-8 溶液を添加し、3 時間後に分光光度計を用いて波長 450 nm における WST-8 formazan の吸光度を測定した。

得られた吸光度(A_{mean})とコントロールの吸光度(A_{control})から細胞生存率 $(A_{\text{mean}})/(A_{\text{control}}) \times 100$ を算出し、さらに各試料濃度依存の増殖抑制曲線から、 IC_{50} を算出した。

3-2-7 TUNEL 法によるアポトーシス誘導の観察

細胞にアポトーシスが誘導されるとヌクレオソーム単位での DNA 断片化が起こり、3'-OH 末端が多く生成される。TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)法ではこの 3'-OH 末端を認識し、標識が可能な Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)を酵素として用いて Fluorescein-dUTP を結合させる。Fluorescein-dUTP が発する蛍光を顕微鏡で観察することでアポトーシス細胞を識別できる。そこで、HL の大腸がん(WiDr)細胞に対するアポトーシスの誘導を TUNEL 法を用いて観察した。実験手順を以下に示す。

〈実験手順〉

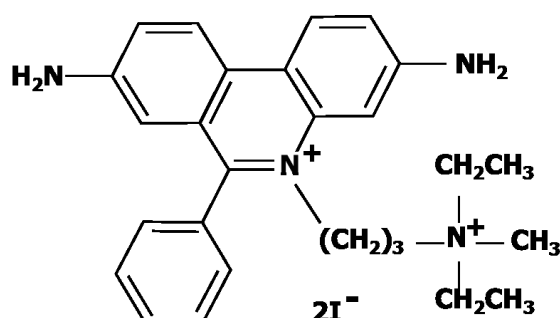
- 1) 初期細胞数を 5.0×10^4 cells/mL に調整した細胞懸濁液をガラスボトムカルチャーディッシュに 2 mL 播種し、インキュベーター内で 24 時間培養を行った。
- 2) 上澄みを除去後、試料溶液(200 μ M)を添加した培地を加え、48 時間培養を行った。
- 3) HBSS(gibco)で洗浄し 10%中性緩衝ホルマリン容液を 2 mL 加え、室温で 30 分固定化処理を行った。
- 4) HBSS で洗浄後、浸透化溶液(0.1% クエン酸三ナトリウム二水和物、0.1% TritonX-100)を 1 mL 加え遮光し 2 分間処理した。
- 5) HBSS で洗浄後 50 μ L の TUNEL 反応混合液(Terminal deoxytransferase fluorescein-dUTP)を加え 37 °C で 60 分間反応させた。
- 6) HBSS で洗浄後 TO-PRO-3 を 100 μ L 加え、遮光し室温で 20 分処理した。
- 7) HBSS で洗浄後、1 mL の HBSS を加え、共焦点レーザー顕微鏡(Leica)により光源として Ar レーザー(488 nm)および He-Ne レーザー(633 nm)を用い、一定波長領域(FITC : 491~521 nm, TO-PRO-3 : 640~700 nm)の範囲域で観察した。ここで、すべての細胞は核が赤色蛍光で、アポトーシスを誘導された細胞は DNA の 3'-OH 末端が緑色蛍光で観察される。

3-2-8 PI assay による DNA 断片化率の測定

HL の大腸がん(HCT116)細胞に対する DNA 断片化率を PI assay により測定した。実験手順を以下に示す。

【Propidium Iodide】

Propidium iodide(PI)は Thermo Fisher Scientific から購入したものを、500 $\mu\text{g/mL}$ となるように PBS(-)に溶解して使用した。



Propidium Iodide(PI)

Ex : 535 nm

Em : 617 nm

〈実験方法〉

- 1) 大腸がん(HCT116)細胞を 5.0×10^4 cells/mL に調整し 60 mm Dish (Falcon)に 4 mL 播種後、インキュベーター内で 24 時間培養を行った。
- 2) 上澄みを除去後、HL の濃度が 100~600 μM となるように調整した完全培地を加え、48 時間培養を行った。
- 3) 細胞を回収し、3000 rpm/3 min で遠心を行い、上清を除去した。
- 4) PBS(-)で懸濁し細胞数を $0.1 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL になるようにエッペンに移した。
- 5) エッペンを 3000 rpm, 2 min で遠心し、上清を除去した。
- 6) エッペンに浸透化溶液を 500 μL 、RNase を 250 μL 、PBS(-)を 250 μL 加えた。
- 7) 細胞懸濁液 900 μL をナイロンメッシュを通してテストチューブに加えた(暗所、氷冷)。
- 8) テストチューブに PI を 100 μL 加え、氷冷(暗所)で 10 分間染色し、フローサイトメトリー(CytoFLEX, Beckman Coulter)で解析を行った。

3-2-9 細胞膜流動性の測定

HL の大腸がん(HCT116)細胞の膜流動性に与える影響については蛍光分光光度計(F-7100, HITACHI)を用いて蛍光偏光解消法に基づき測定した。蛍光プローブには、膜内部の流動性を反映させる 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH, ナカライテスク)を使用した。実験手順を以下に示す。

〈実験方法〉

- 1) 100 mm Dish(Falcon)でサブコンフルエントまで培養した大腸がん(HCT116)細胞を遠心管に回収した。
- 2) 1000 rpm/5 min で遠心後、上澄みを除去し、HBSS で細胞数を 1.0×10^6 cells/mL に調整した。
- 3) DPH(2.0 mM)を 1 μ L/mL 添加(最終濃度 2.0 μ M)し、37 °C 暗所条件で 35 分間染色した。
- 4) 3000 rpm/5 min で遠心し、上清除去後に HBSS(10 mL)を加えた。この工程を合計 3 度繰り返し、未挿入の DPH を除去した。
- 5) HBSS で懸濁し細胞数を 2.5×10^5 cells/mL に調整した。
- 6) 石英セルに細胞懸濁液を 2.5 mL 入れ、F-7100 を用いて 37 °C 条件下で細胞の膜流動性を測定した。
- 7) HL の膜流動性に与える影響は、測定開始 60 秒後に HL を最終濃度 100 μ M となるように添加し、すぐに測定を開始し合計 300 秒まで変化の観察を行った。

3-2-10 大腸がん皮下および同所移植モデルマウスの作製

○大腸がん皮下移植モデルマウスの作製

大腸がん(WiDr)細胞を回収後、PBS(-)とマトリゲル(BD Bioscience)を 1 : 9 の割合となるように加え、移植用細胞懸濁液(1.0×10^8 cells/mL)を調整した。BALB/c-R/J マウスの後背部をあらかじめ剃毛しておき、移植用細胞懸濁液を 26G の針を用いて 0.05 mL(5.0×10^6 cells/body)皮下移植しモデルマウスの作製を行った。マトリゲルは 10 °C 以上でゲル化し始めるため、移植の際に使用するシリンジ、針、移植用細胞懸濁液は氷冷したものを使用した。

○大腸がん同所移植モデルマウスの作製

大腸がん(HCT116)細胞を回収後、PBS(-)とマトリゲル(BD Bioscience)を 1 : 9 の割合となるように加え、移植用細胞懸濁液(1.0×10^8 cells/mL)を調整した。移植日当日のマウスの体重を基に層別無作為化法によって Control 群、DMPC 投与群、HL 投与群に群分けを行った。麻酔下で BALB/c-R/J マウスを開腹し、盲腸組織を露呈させ 26G の針を用いて盲腸の漿膜下に移植用細胞懸濁液 0.05 mL(5.0×10^6 cells/body)移植し、同所移植モデルマウスの作製を行った。マトリゲルは 10 °C 以上でゲル化し始めるため、移植の際に使用するシリンジ、針、移植用細胞懸濁液は氷冷したものを使用した。

3-2-11 大腸がん皮下および同所移植モデルマウスに対する

ハイブリッドリポソームの治療実験

○大腸がん皮下移植モデルマウスに対するハイブリッドリポソームの治療実験

WiDr 細胞を皮下移植して 2 日後にキャリパーを用い、皮下腫瘍の大きさを(3-1)式に基づいて測定⁹⁷⁻⁹⁹⁾し、腫瘍体積を元に層別連続無作為化法により Control 群、HL 局所投与群の 2 群に分けた。群分け後から HL を 2.5 mL/kg (DMPC Dose : 34 mg/kg)腫瘍近傍に局所投与した。投与は 1 日 1 回、14 日間行った。投与終了翌日に麻酔下で解剖し、腫瘍重量の測定を行った。

$$\text{腫瘍体積(mm}^3\text{)} = \text{長径(mm)} \times \text{短径(mm)} \times \text{短径(mm)} \times 0.5 \quad \cdots \cdots (3-1)$$

○大腸がん同所移植モデルマウスに対するハイブリッドリポソームの 治療実験

HCT116 細胞を同所移植した翌日から HL を 10 mL/kg(DMPC Dose : 136 mg/kg) で尾静脈投与した。投与は 1 日 1 回、28 日間行った。投与終了翌日に麻酔下で解剖し、盲腸重量の測定を行い相対臓器重量による評価を行った。

3-2-12 腫瘍組織切片の観察

3-2-11 で摘出した皮下腫瘍および盲腸組織は、10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (Wako) 中で 4 °C 条件で固定した。その後、腫瘍および盲腸組織をバイオ病理研究所に TUNEL 染色切片および HE 染色の作成を依頼した。TUNEL 切片の観察には、培養倒立顕微鏡(TS100, Nikon)を用い、デジタル顕微鏡カメラヘッド(DS-Fi1, Nikon)とデジタルイメージングコントローラー(DS-L2, Nikon)で撮影を行った。HE 染色の観察には、蛍光顕微鏡(BZ-X700, KEYENCE)を用いて撮影を行った。

3-3 結果と考察

3-3-1 ハイブリッドリポソームの大腸がん細胞に対する増殖抑制効果

ハイブリッドリポソーム(90 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅)を用いて大腸がん(WiDr, HCT116)細胞に対する増殖抑制効果について検討を行った。WiDr 細胞に対する HL の IC₅₀ を Fig. 3-1 に示す。DMPC の WiDr 細胞に対する IC₅₀ は 205 μ M であり HL の IC₅₀ は 110 μ M だった。

次に、HCT116 細胞に対する HL と DMPC の IC₅₀ を比較した結果を Fig. 3-2 に、HL の正常大腸細胞および HCT116 細胞に対する IC₅₀ を Fig. 3-3 に示す。DMPC の HCT116 細胞に対する IC₅₀ は 648 μ M であり HL の IC₅₀ は 272 μ M であった。また、HL の正常大腸細胞に対する IC₅₀ は 522 μ M であった。

以上の結果から、HL は DMPC の約半分の濃度で大腸がん(WiDr, HCT116)細胞の増殖を抑制し、正常大腸細胞に対しては低毒性であることが明らかになった。

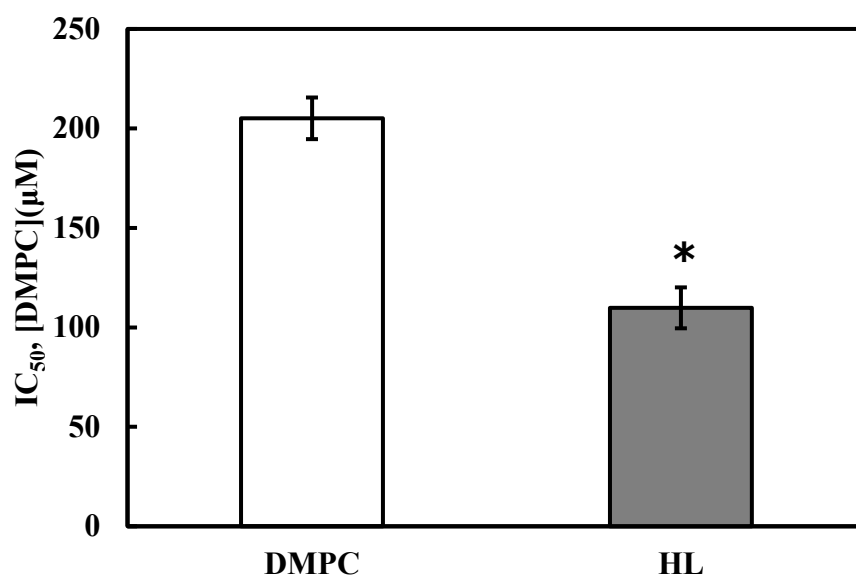


Fig. 3-1 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of DMPC and HL on the growth of WiDr cells for 48 h.

Data represent the mean (n=6) ± S.E.

* $p < 0.05$ (vs. DMPC).

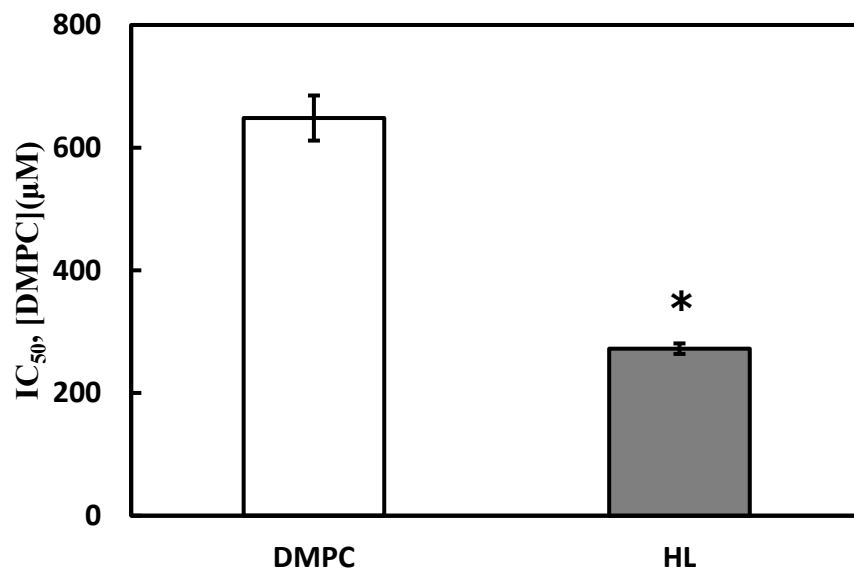


Fig. 3-2 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of DMPC and HL on the growth of HCT116 cells for 48 h.

Data represent the mean (n=3) ±S.E.

* $p < 0.05$ (vs. DMPC).

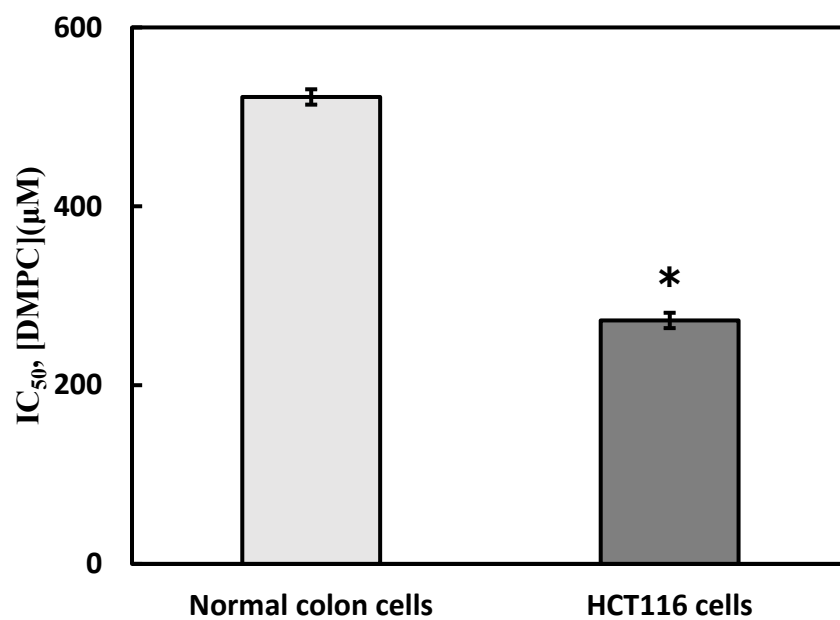


Fig. 3-3 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of HL on the growth of colon carcinoma (HCT116) cells and normal colon cells for 48h.

Data represent the mean (n=3) ±S.E.

* $p < 0.05$ (vs. Normal colon cells).

3-3-2 ハイブリッドリポソームの大腸がん細胞に対するアポトーシス誘導

3-3-1 において HL の大腸がん(WiDr, HCT116)細胞に対する顕著な増殖抑制効果が明らかになった。そこで本節では、HL の大腸がん細胞に対するアポトーシス誘導について検討するため、TUNEL 染色および PI assay による DNA 断片化率の測定を行った。

HL の WiDr 細胞に対するアポトーシス誘導を TUNEL 染色によって蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を Fig. 3-4 に示す。HL で処理した WiDr 細胞において TUNEL 陽性細胞が多く観察された。一方、DMPC で処理した WiDr 細胞では TUNEL 陽性細胞はほとんど観察されなかった。

次に、HL の HCT116 細胞に対するアポトーシス誘導について、フローサイトメーターを用いて DNA 断片化率による評価を行った。結果を Fig. 3-5 に示す。HL で処理した HCT116 細胞の DNA 断片化率は濃度依存的に増加していき、600 μ M では 60%であった。一方、DMPC で処理した HCT116 細胞では、DNA 断片化は見られず、600 μ M では 4%の断片化率であった。

以上の結果から、HL は大腸がん(WiDr, HCT116)細胞に対してアポトーシスを誘導することにより増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

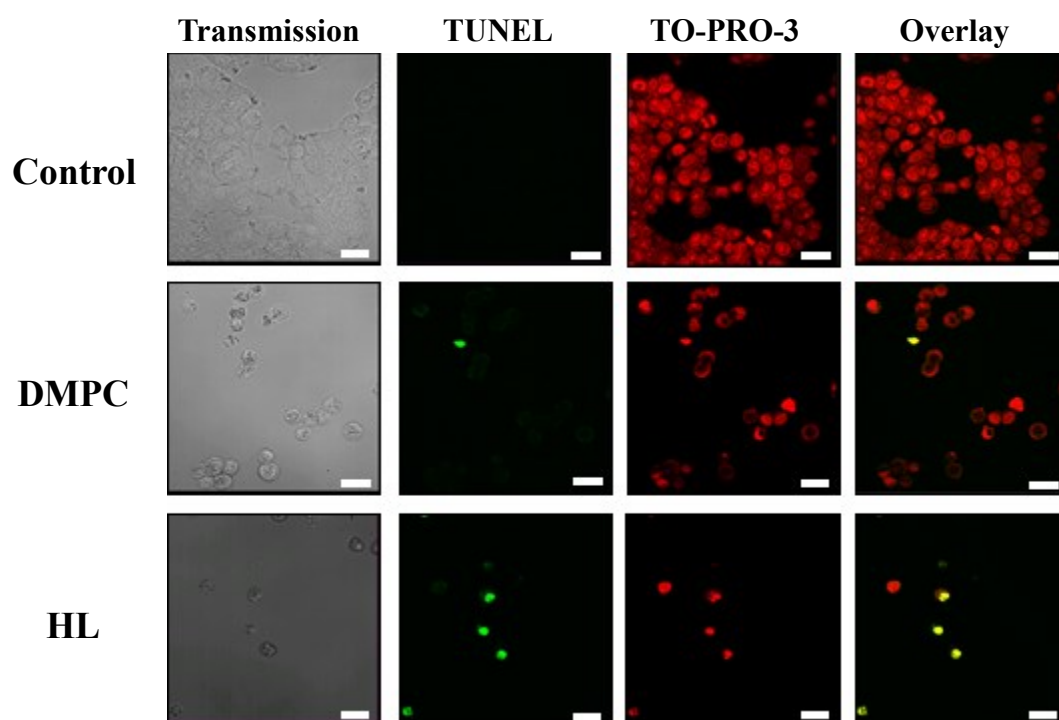


Fig. 3-4 Fluorescence micrographs of cancer cells (WiDr) after the treatment with HL using TUNEL assay for 24h.
Scale bar : 20 μ m.

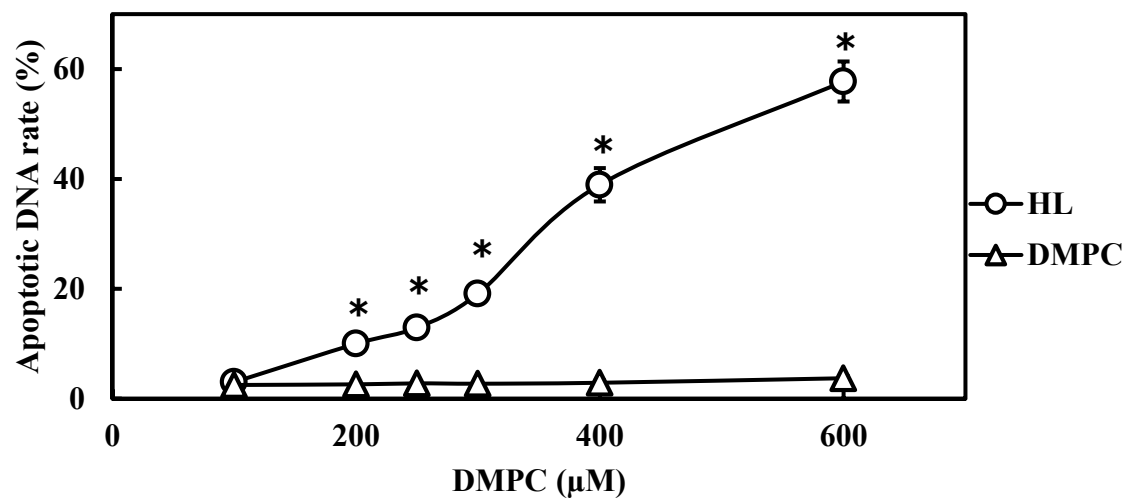


Fig. 3-5 Apoptotic DNA rate of HCT116 cells treated with HL for 48h.

Data represent mean ($n=4$) \pm S.E. * $p < 0.05$.

3-3-3 ハイブリッドリポソームの大腸がん細胞の膜流動性に与える影響

3-3-1, 3-3-2 において HL の大腸がん(WiDr, HCT116)細胞に対するアポトーシス誘導による増殖抑制効果が明らかになった。そこで、本節では HL の抗腫瘍効果と相関性が報告されている細胞膜流動性の変化について観察を行った。蛍光偏光解消法によって得られる蛍光偏光度(P : Fluorescence Polarization)は、膜流動性が高いときに値が小さくなり、膜流動性が低いときに値が大きくなる。

HL の HCT116 細胞の膜流動性に与える影響について検討した結果を Fig. 3-6 に示す。また、250-300 秒間に測定した結果を平均化し Fig. 3-7 に示す。DMPC および HL で処理した HCT116 細胞において蛍光偏光度(P)が減少し、細胞膜の流動性が増大したことが明らかになった。DMPC と比較すると、HL で処理した細胞はより流動性が増大していることが明らかになった(Fig. 3-7)。

以上の結果から、HL は HCT116 細胞の膜流動性を顕著に増大させることが明らかとなった。

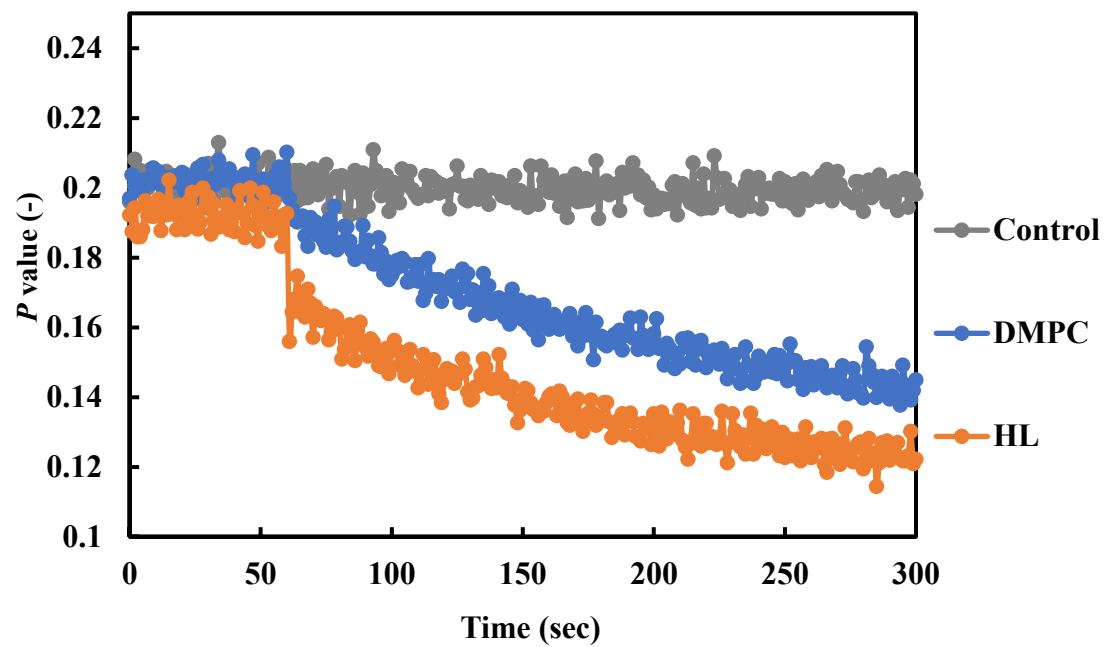


Fig. 3-6 Time course of fluorescence polarization (P value) change for DPH-labeled HCT116 cells after the treatment with HL.
[DMPC]=100 μ M.

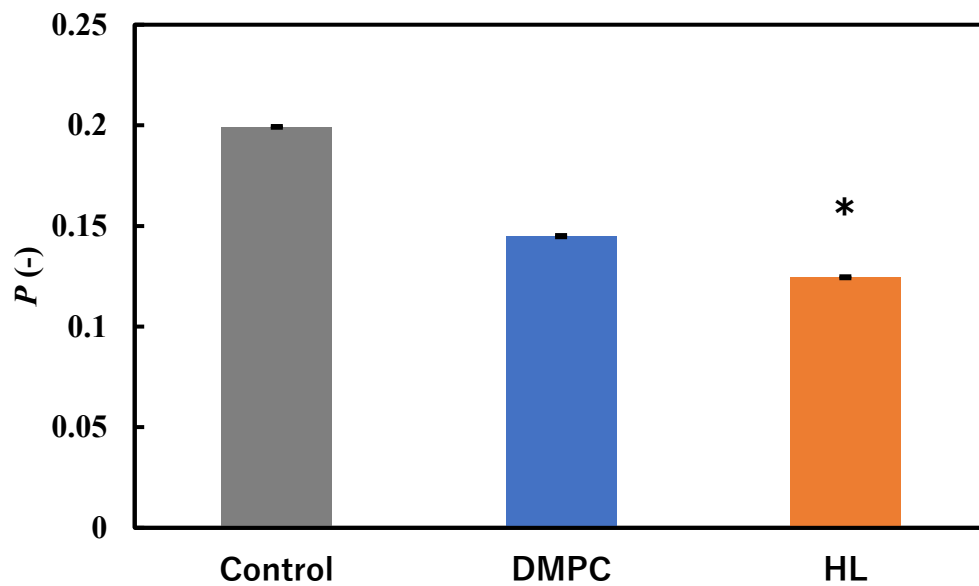


Fig. 3-7 Increase in membrane fluidity of HCT116 cells after the treatment with HL.
Data represent the mean (n=4) \pm S.E., * $p < 0.05$ (vs. Control, DMPC)
[DMPC]=100 μ M.

3-3-4 大腸がん皮下移植モデルマウスに対するハイブリッドリポソームの治療効果

3-3-1, 3-3-2 において *in vitro* での大腸がん(WiDr)細胞に対する HL のアポトーシス誘導による増殖抑制効果が明らかになったため、WiDr 細胞皮下移植モデルマウスに対する HL の局所投与による治療効果について検討した。HL を皮下腫瘍近傍に皮下局所投与した投与期間中の腫瘍体積の結果を Fig. 3-8 に示す。5% glucose を投与した Control 群において、腫瘍体積は経時的に増加していき、測定最終日である 15 日目には腫瘍体積は 758 mm^3 となった。また、HL を皮下局所投与した群では、腫瘍体積の増加が抑制され、測定最終日には 274 mm^3 となった。測定最終日の腫瘍体積を比較したところ、64% ($p<0.05$) の増殖抑制効果が得られた。

次に、15 日目に剖検によって摘出したマウスの腫瘍重量の測定結果を Fig. 3-9 に示す。Control 群における腫瘍重量の平均は 0.39 g であった。一方、HL 投与群から摘出した腫瘍重量の平均は 0.20 g であった。抑制率は 51% ($p<0.05$) であった。摘出した腫瘍の写真からも他の結果と同様に、HL 投与群において腫瘍の縮小効果が得られた(Fig. 3-10)。

摘出した腫瘍をホルマリン固定し、パラフィン切片化後に TUNEL 染色による観察を行った。観察結果を Fig. 3-11 に示す。Control 群では TUNEL 陽性細胞がほとんど確認できないが、HL 投与群において局所投与部位に、TUNEL 陽性細胞が多く観察された。

以上の結果から、HL の大腸がん(WiDr)皮下移植モデルマウスに対する局所投与により、アポトーシスを伴う治療効果が明らかとなった。

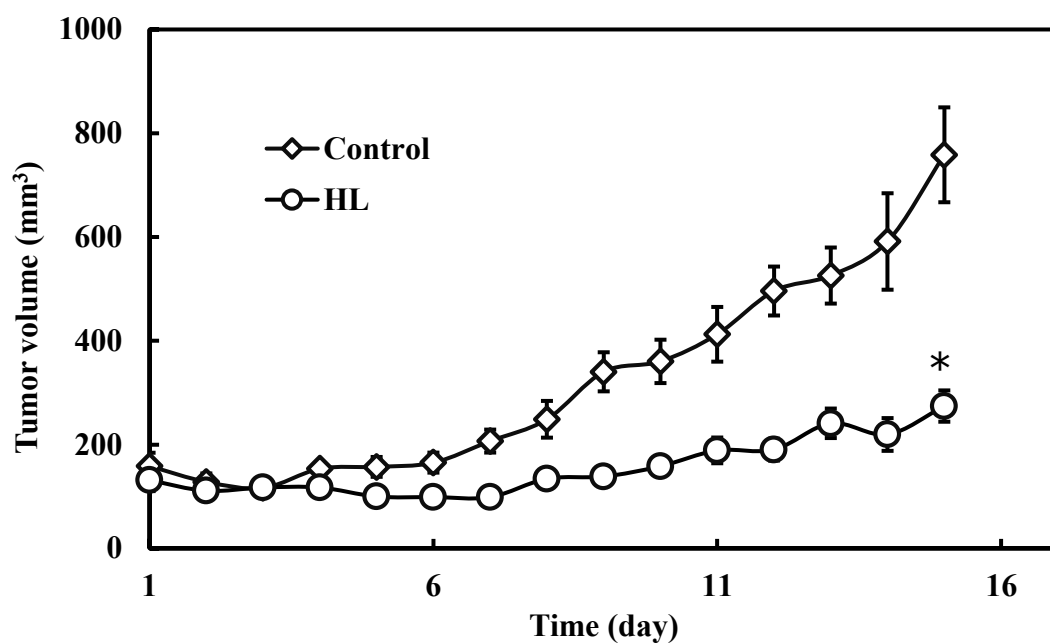


Fig. 3-8 Suppression of tumor volume in xenograft model mice topically treated with HL after the subcutaneous inoculation of WiDr cells.
Data represent the mean (n=7) \pm S.E. * $p < 0.05$.

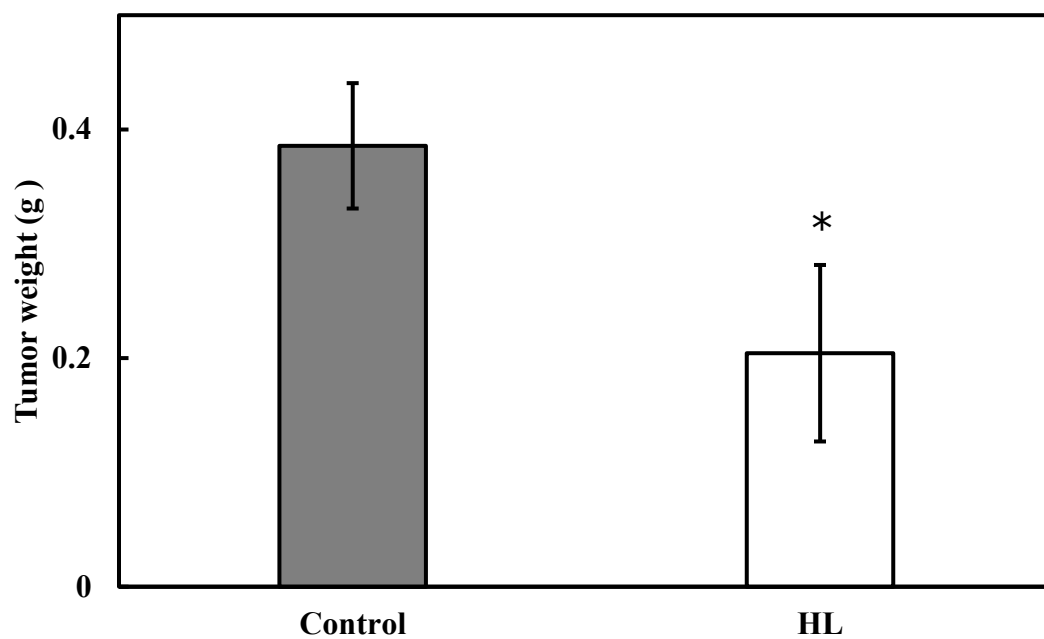


Fig. 3-9 Suppression of tumor weight in xenograft model mice topically treated with HL after the subcutaneous inoculation of WiDr cells. Data represent the mean (n=7) \pm S.E. * p <0.05.

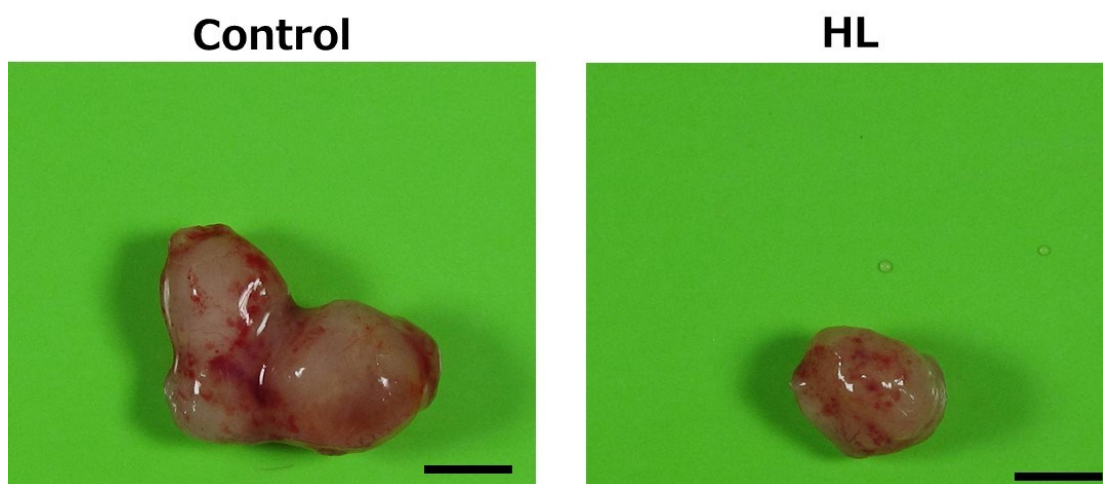
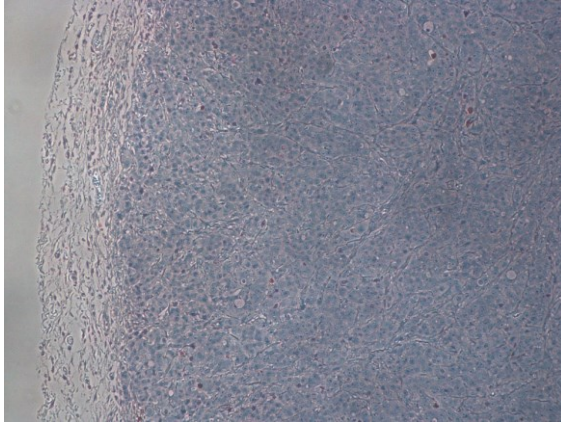


Fig. 3-10 Photographs of tumor in mice topically treated with HL after the subcutaneous inoculation of WiDr cells.
Scale bar: 5 mm.

Control



HL



Fig. 3-11 Micrographs of tumor in xenograft model mice after the treatment with HL using TUNEL method.

Arrows : apoptotic cells.

3-3-5 大腸がん同所移植モデルマウスに対するハイブリッドリポソームの 治療効果

3-3-4 において *in vivo* での大腸がん(WiDr)皮下移植モデルマウスに対する HL のアポトーシス誘導による治療効果が明らかになったため、大腸がん(HCT116)同所移植モデルマウスに対する HL の静脈投与による治療効果について検討した。HL を 4 週間投与し、翌日剖検によって摘出した盲腸の重量を測定し、治療効果の評価を行った。結果を Fig. 3-12 に示す。Control 群では相対盲腸重量の増加が確認されたのに対し、HL 投与群において有意に減少しており、Normal と同等の重量であった。摘出した盲腸組織の写真(Fig. 3-13)においても、HL 投与群ではわずかな腫瘍しか確認できなかったことから、HL 投与による腫瘍の顕著な縮小が明らかになった。

摘出した盲腸組織をホルマリン固定し、パラフィン切片化後に HE 染色および TUNEL 染色を行い観察した。HE 染色の観察結果を Fig. 3-14 に示す。HE 染色では、相対盲腸重量と同様に、HL 投与群において腫瘍面積の顕著な縮小が確認された。また、TUNEL 染色では、HL 投与群においてアポトーシス陽性細胞が多数確認された(Fig. 3-15)。

以上の結果から、HL の大腸がん(HCT116)同所移植モデルマウスに対する静脈投与によるアポトーシス誘導を伴う治療効果が明らかになった

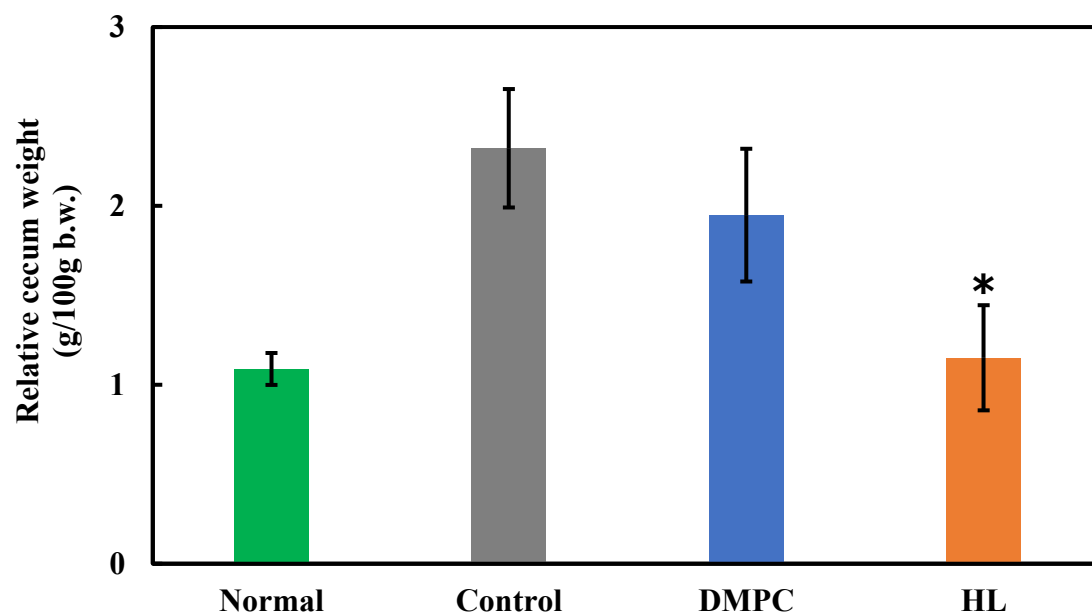


Fig. 3-12 Relative cecum weight of orthotopic graft model mice treated with HL after the inoculation HCT116 cells to the cecum.

Data represent the mean (n=5) \pm S.D.

* $p < 0.05$ (vs. Control).

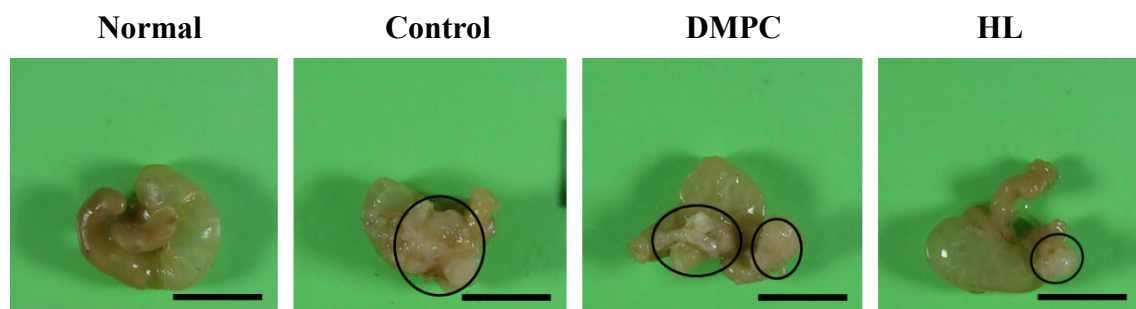


Fig. 3-13 Photographs of tumor in orthotopic graft model mice treated with HL after the inoculation of HCH116 cells to the cecum.

Circle : tumor.

Scale bar : 1 cm.

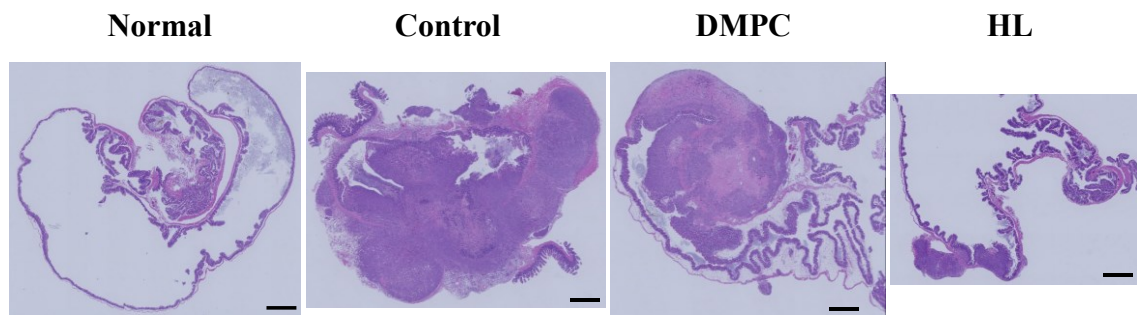


Fig. 3-14 Micrographs of the tissue section of tumor in cecum of orthotopic graft model mice after the treatment with HL using HE stain.
Scale bar : 1 mm.

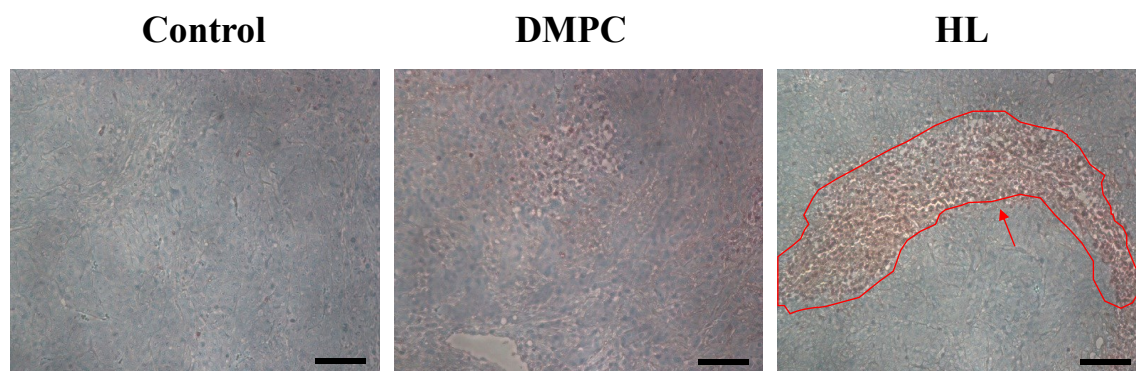


Fig. 3-15 Micrographs of the tissue section of tumor in cecum of orthotopic graft model mice after the treatment with HL using TUNEL method.

Arrows : apoptotic cells.

Scale bar : 100 μ m

3-4 総括

本章では双性リン脂質 (DMPC)と PEG 系界面活性剤($C_{12}(EO)_{25}$)を素材とする 90 mol% DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{25}$ ハイブリッドリポソームの大腸がん(WiDr, HCT116)細胞に対する *in vitro* および *in vivo* でのアポトーシス誘導による抗腫瘍効果を検討し、以下のような興味深い知見が得られた。

1. DMPC の WiDr 細胞に対する IC_{50} は 205 μM であり HL の IC_{50} は 110 μM だった。このことより、HL は DMPC の約半分の濃度で WiDr 細胞の増殖を抑制する顕著な抗腫瘍効果が明らかとなった。
2. DMPC の HCT116 細胞に対する IC_{50} は 648 μM であり HL の IC_{50} は 272 μM であった。また、HL の正常大腸細胞に対する IC_{50} は 522 μM であった。このことから、HL は DMPC の約半分の濃度で大腸がん(WiDr, HCT116)細胞の増殖を抑制し、正常大腸細胞に対しては低毒性であることが明らかになった。
3. WiDr 細胞に対する HL のアポトーシス誘導について TUNEL 染色で観察したところ、HL で処理した細胞では TUNEL 陽性細胞が多数観察されたのに対して、DMPC ではほとんど見られなかった。このことから、HL は WiDr 細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。
4. HL で処理した HCT116 細胞の DNA 断片化率を測定したところ、濃度依存的に DNA 断片化率は増加した。一方、DMPC では高濃度で処理を行っても DNA 断片化率の増加は見られなかった。このことから、HL は HCT116 細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。
5. HL による HCT116 細胞の膜流動性に与える影響について検討したところ、HL の添加直後から HCT116 細胞の膜流動性の増加が観察された。
6. 大腸がん(WiDr)皮下移植モデルマウスに対する HL の局所投与による治療効果について検討したところ、腫瘍体積は Control に比べ 64%縮小した。また、摘出した腫瘍重量においても 50%減少した。このことから、HL の大腸がん皮下移植モデルマウスに対する治療効果が明らかとなった。

7. 大腸がん皮下移植モデルマウスの腫瘍組織を TUNEL 染色し観察した結果、HL 投与群において TUNEL 陽性細胞が多数観察され、HL の局所投与によるアポトーシス誘導が明らかとなった。
8. 大腸がん(HCT116)同所移植モデルマウスに対する HL の静脈投与による治療効果について検討したところ、HL を投与したマウスの盲腸組織の重量は Control 群と比較すると有意に小さく Normal 群と同様であった。このことから、HL の大腸がん(HCT116)同所移植モデルマウスに対する静脈投与による顕著な治療効果が明らかとなった。
9. 大腸がん(HCT116)同所移植モデルマウスの盲腸組織を HE 染色して観察したところ、Control 群、DMPC 投与群の盲腸組織では腫瘍の増大が確認された。一方、HL 投与群では腫瘍面積が顕著に縮小していた。
10. 大腸がん(HCT116)同所移植モデルマウスの盲腸組織を TUNEL 染色して観察したところ、Control 群、DMPC 投与群では TUNEL 陽性細胞は観察されなかったが、HL 投与群では多数の TUNEL 陽性細胞が観察された。

以上の結果から、90 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅ ハイブリッドリポソームは、*in vitro* および *in vivo* において大腸がんに対するアポトーシス誘導による高い抗腫瘍効果を示し、がん治療薬としての有用性が明らかとなった。

第4章 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 大腸がんに対する特異的蓄積

4-1 序

現在用いられているがんの診断方法には、問診・触診、血液検査、画像健診、生検がある。問診・触診は医師による問診によって行われる。血液検査は、患者の血液を採取し、がんの特異的なタンパク質や抗原を検出する。がんの特異的なタンパク質や抗原を腫瘍マーカーと呼び、がん細胞に多く発現する物質が特定されている。しかし、腫瘍マーカーによる診断では異常がなくとも陽性に反応することや、がん組織が大きくなると反応しない場合など、確定的な診断が行えるほど精度が高くないことに注意すべきである。画像健診は、CT(Computerized tomography)やMRI(Magnetic resonance imaging)がある。CTではX線を照射し、体内の詳細ながん病変を検出する診断方法で、MRIは強力な磁気によって体内の水素原子を映し出す診断である。CTは骨などを透過することが出来ないため、MRIでは脳内や脊髄を撮影するのに適している。また、MRIでは放射線を使用していないため被爆の危険性は無いが、乳がんなどカルシウムが沈着した組織を検出できない欠点がある。近年ではPET(Positron emission tomography) 検診に注目が集まっている。PET検診は、陽電子をグルコースなどに結合させたものを静脈より投与し、様々な角度から撮影する技術である。がんは正常な細胞より多くの栄養分を必要とするため、糖やアミノ酸を多量に消費する。そのため、陽電子化された栄養成分がよりがん集まることになり、PETによって可視化される。PETは従来の画像健診より高精度で、1cm未満の初期がん組織をも検出できる。しかし、栄養分を多く消費する脳や炎症組織もPETは検出してしまうため、他の画像健診と併用しなければならない可能性もあり、微量ながら被爆もするため注意が必要である。また、CTやMRI、PETの診断には高価な設備を必要とし、結果として健診費用が高額になるため健診者への経済的負担も無視できない。生検はがんと疑われる組織から細胞を少量摘出し、組織学的に検査を行う。そのため、がん組織と疑われる可能性がある場所を特定し、体内から細胞を摘出する必要があるため、患者の身体への負担がかかってしまう。以上のような診断が行われているが、精度や経済的、身体的な負担が大きいため、より高精度で簡便ながん診断方法が必要となる。

これまで、ハイブリッドリポソーム(HL)に蛍光試薬(NBDPC)を含有させたHL/NBDPCのがん細胞への特異的な蓄積が明らかになっている^{49,67)}。しかし、NBDPCの蛍光特性は生体深部の観察には適さないため、生体透過性に優れた近赤外蛍光試薬を用い、HLの特徴を生かしたセラノスティクスへの応用を目指し

た。本章では HL に近赤外蛍光試薬であるインドシアニンググリーン (ICG)を含有させた HL (HL/ICG)の大腸がん細胞への蓄積について *in vitro* および *in vivo* において検討した。

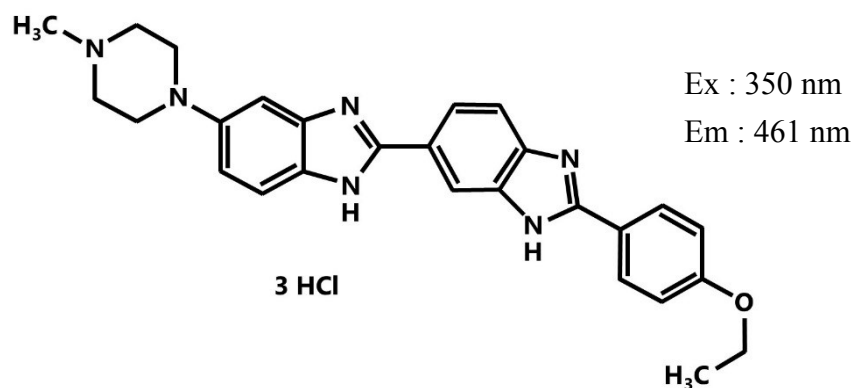
4-2 実験

4-2-1 試薬

リン脂質(DMPC)、界面活性剤($C_{12}(EO)_{25}$)および近赤外蛍光試薬(ICG)は 2-2-1 と同様のものを使用した。

【核染色剤】

2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazole, trihydrochloride, solution, (Hoechst 33342 Solution)は同仁化学より購入したものをそのまま使用した。以下に構造式を示す。



4-2-2 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの調製

インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームは 2-2-3 と同様の方法で調製を行った。

4-2-3 使用細胞

使用細胞は 3-2-3 と同様の細胞を使用した。

4-2-4 使用動物

使用動物は 3-2-4 と同様のマウスを使用した。

4-2-5 マウス正常大腸細胞の分離

マウス正常大腸細胞は 3-2-5 と同様に BALB/c-R/J マウスから分離したものを使用した。

4-2-6 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの大腸がん細胞への特異的蓄積

in vitro における HL/ICG の大腸がん(WiDr, HCT116)細胞への蓄積は蛍光顕微鏡(EVOS®FL Cell Imaging System)を用いて観察した。また、HL/ICG のがん細胞への特異性を確認するため、マウス正常大腸細胞を用いて同様に実験を行った。実験手順を以下に示す。

〈実験手順〉

- 1) 初期細胞数を 5.0×10^4 cells/mL に調整した細胞懸濁液を 2 mL ガラスボトムカルチャーディッシュ(MatTec)に播種し、37 °C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。
- 2) 上澄みを除去し、試料溶液を加えた培地を添加し、150 分間のインキュベーションを行った。
- 3) Hoechst 33342 Solution (17.6 μM)を添加し 30 分間のインキュベーションを行った。
- 4) 上澄みを除去後、血清入り培地を加え、蛍光顕微鏡で観察を行った。蛍光検出は EVOS Light Cube Cy7 (Ex : 710/40 nm, Em : 775/46 nm)を用いて行った。

4-2-7 大腸がん皮下および同所移植モデルマウスの作製

大腸がん皮下および同所移植モデルマウスの作製は 3-2-10 と同様の方法で行った。

4-2-8 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの大腸がん皮下および同所移植モデルマウスの腫瘍への蓄積の観察

in vivo における大腸がん(WiDr, HCT116)皮下および同所移植モデルマウスに対する HL の治療効果が 3-3-5 で明らかになった。そこで、本節では HL/ICG のがん診断能力を検証するために、大腸がん(WiDr, HCT116)皮下および同所移植モデルマウスに対する HL/ICG の蓄積を *in vivo* イメージングシステム(AEQUORIA; 浜松ホトニクス)を用いて観察した。

実験に使用したモデルマウスは 3-2-10 と同様の方法で作製を行った。WiDr 細胞皮下移植モデルマウスに対する HL/ICG の蓄積は、WiDr 細胞を後背部皮下に移植後 12 日目に HL/4 mol% ICG を腫瘍近傍に 0.05 mL/body で局所投与した。投与後、経時的に *in vivo* イメージングシステムを用いて励起光 775 nm、蛍光波長 845 nm の条件で観察を行った。

次に、HCT116 細胞同所移植モデルマウスに対する HL/1 mol% ICG の蓄積は、HCT116 細胞を盲腸組織に移植後 28 日目に HL/1 mol% ICG を 10 mL/kg で尾静脈投与した。投与後、経時的に *in vivo* イメージングシステムを用いて励起光 775 nm、蛍光波長 845 nm の条件で観察を行った。

4-3 結果と考察

4-3-1 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの大腸がん細胞への特異的な蓄積

HL/4 mol% ICG (86 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅/4 mol% ICG)の WiDr 細胞への蓄積を蛍光顕微鏡を用いて観察した。結果を Fig. 4-1 に示す。ICG 単体では WiDr 細胞への蓄積は確認されなかった。DMPC/ICG および HL/ICG において ICG の蛍光が観察された。特に HL/ICG では顕著に蛍光量が多いことから、HL/ICG は大腸がん細胞に蓄積することが明らかとなった。

ICG を 4 mol%含有させた場合、膜粒径の分布のばらつきが大きく膜の安定性に問題があった。そのため、ICG の含有量を 1 mol%に変更し、HCT116 細胞への蓄積について検討を行った。HL/1 mol% ICG (89 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅/1 mol% ICG)の HCT116 細胞への蓄積を観察した結果を Fig. 4-2 に示す。ICG 単一のものでは HCT116 細胞への蓄積は確認されなかったが、DMPC/ICG、C₁₂(EO)₂₅/ICG、HL/ICG において蓄積が確認された。特に HL/ICG で顕著な蓄積が観察された。また、HCT116 細胞と同じ試料、撮影条件で正常大腸細胞への蓄積を観察したところ、すべてのサンプルで正常大腸細胞への ICG の蓄積は観察されなかった(Fig. 4-3)。

以上の結果から、*in vitro* における HL/ICG の大腸がん(WiDr, HCT116)細胞への蓄積が明らかとなった。

HL のアポトーシス誘導による治療効果が明らかになっており、高い安全性を有する HL は、大腸がん細胞へ選択的に蓄積することから診断薬として最適であると考えられ、がんに対する治療と診断を同時に行うために HL/ICG のセラノステイクスへの応用が期待される。

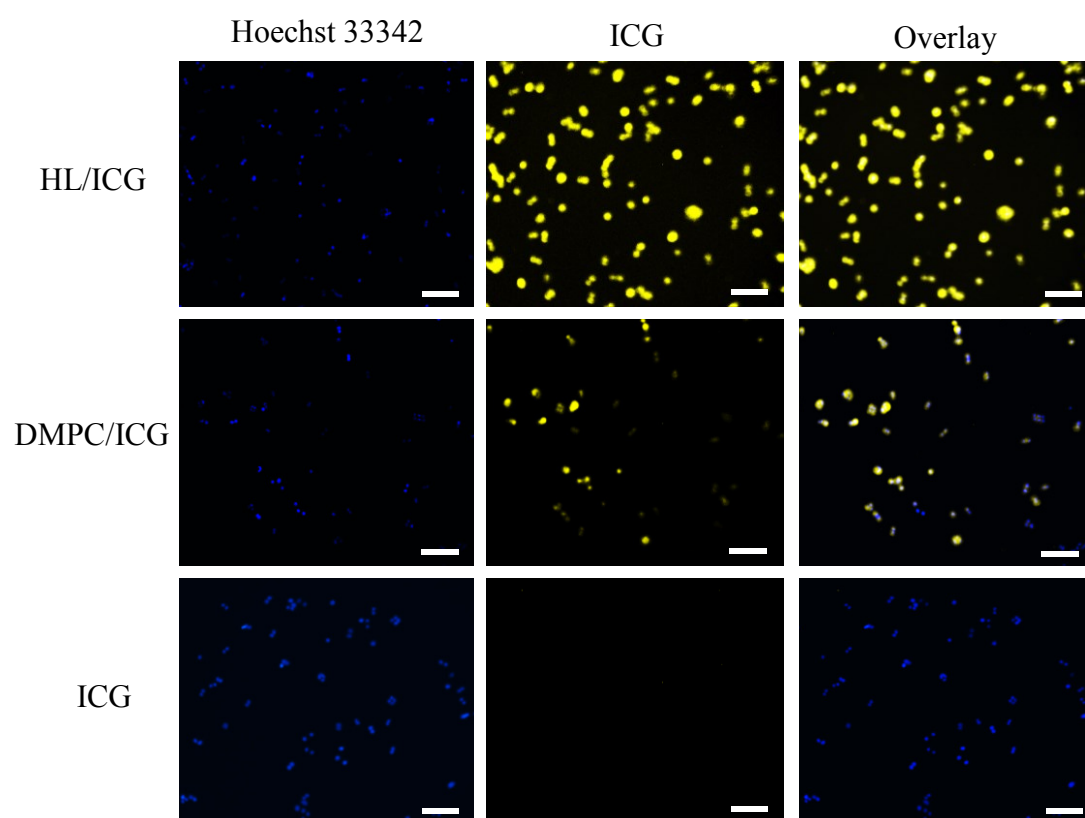


Fig. 4-1 Fluorescence micrographs of colon carcinoma (WiDr) cells after the treatment with HL/4 mol% ICG for 3h.

Scale bar : 50 μ m.

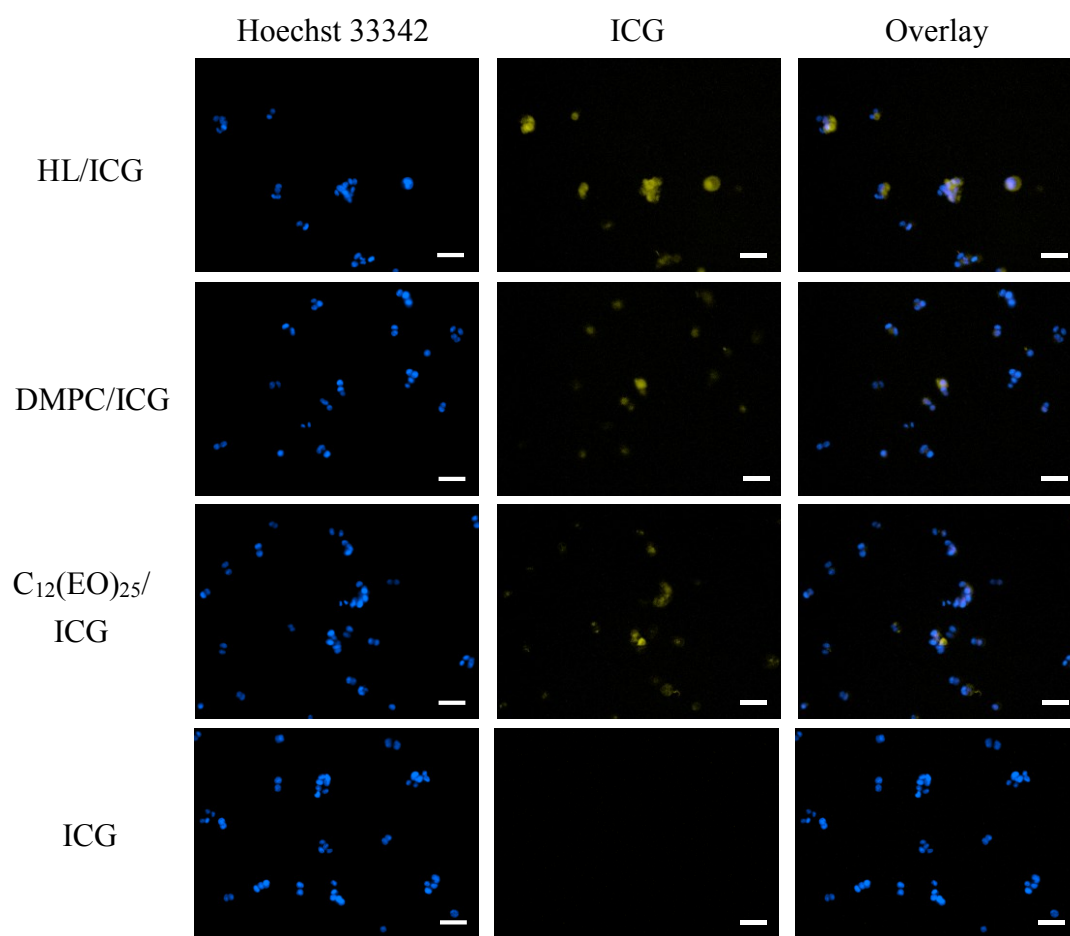


Fig. 4-2 Fluorescence micrographs of colon carcinoma (HCT116) cells after the treatment with HL/1 mol% ICG for 3h.
Scale bar : 50 μ m.

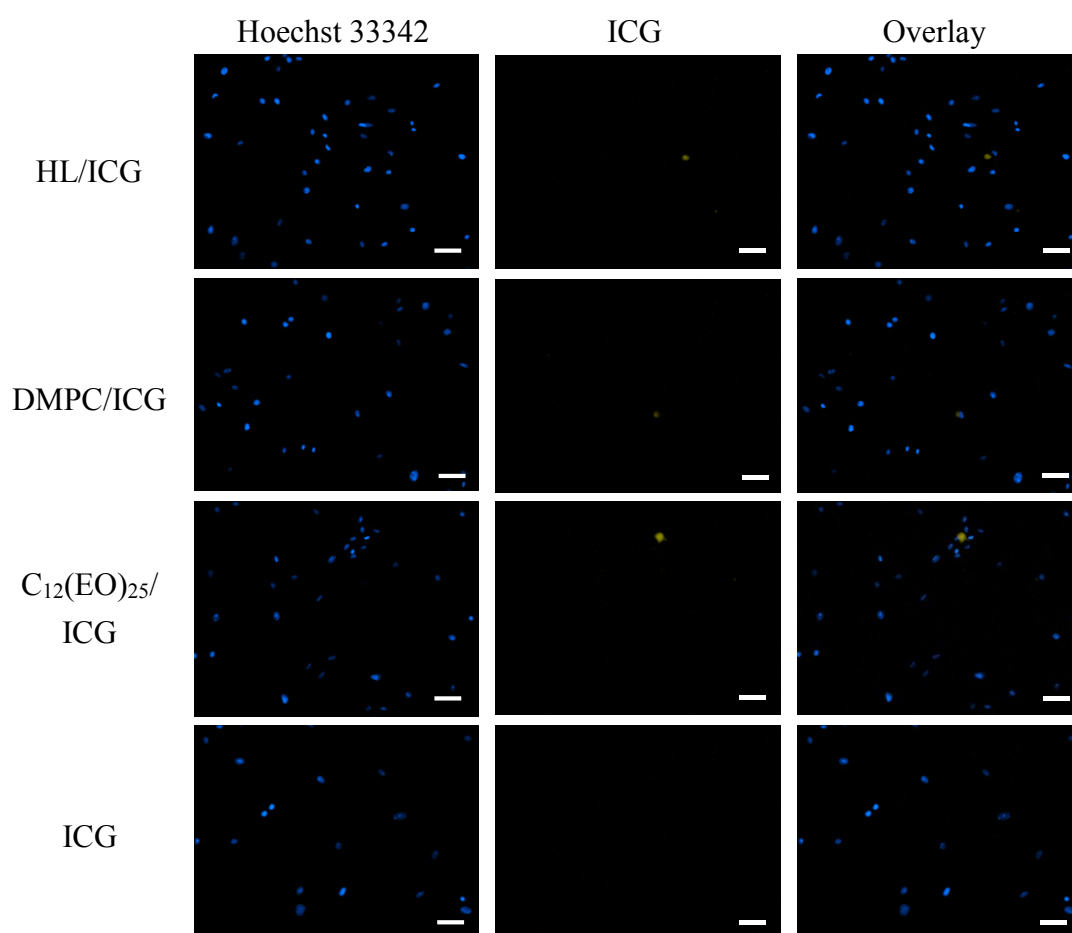


Fig. 4-3 Fluorescence micrographs of normal colon cells after the treatment with HL/1 mol% ICG for 3h.
Scale bar : 50 μ m.

4-3-2 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 大腸がん皮下移植モデルマウスの腫瘍への蓄積

HL/4 mol% ICG (86 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅/4 mol% ICG)の大腸がん皮下移植モデルマウスの腫瘍への蓄積を *in vivo* イメージングシステムを用いて観察した。結果を Fig. 4-4 に示す。投与後 30 分で投与部位において強い蛍光が観察された。ICG では 48 時間後において蛍光が見られなかったが、HL/ICG, DMPC/ICG では 48 時間後においても腫瘍近辺に強い蛍光が観察された。特に HL/ICG では 97 時間後でも蛍光が確認された。

以上の結果から、HL/ICG の大腸がん皮下移植モデルマウスの腫瘍への長時間の蓄積が明らかとなった。

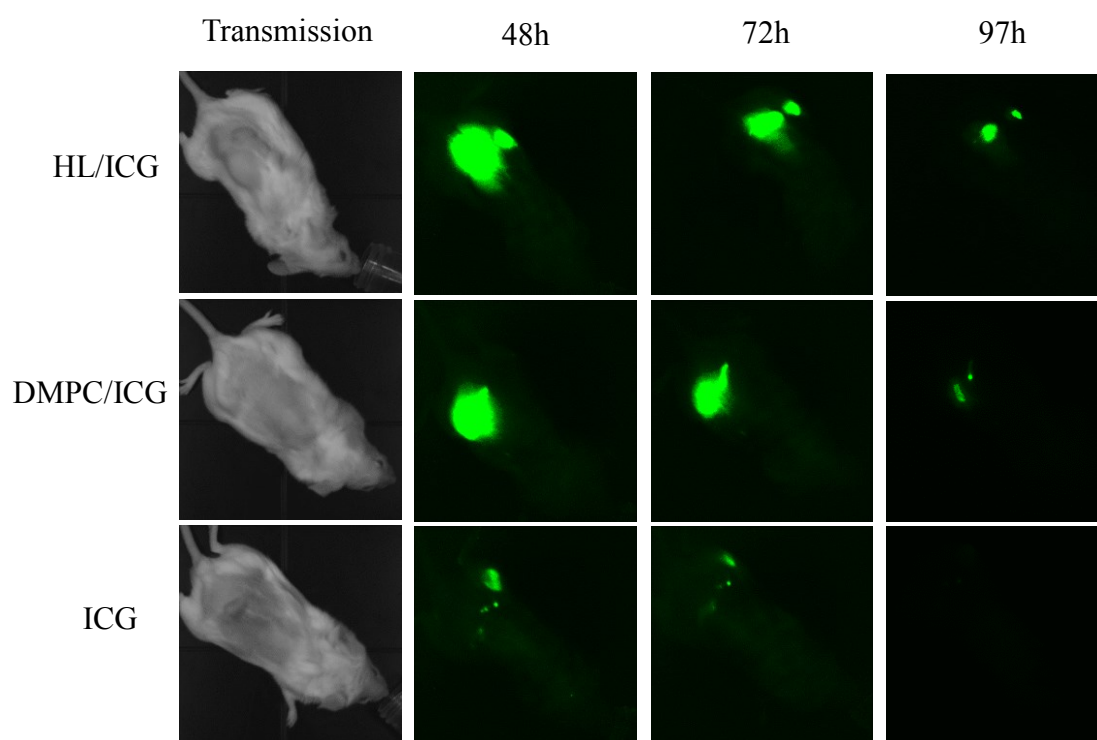


Fig. 4-4 Long term accumulation of HL including ICG into the tumor of the xenograft model mice at 12 days after the subcutaneously inoculation of WiDr cells.

4-3-3 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 大腸がん同所移植モデルマウスの腫瘍への蓄積

HL/1 mol% ICG (89 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅/1 mol% ICG)の大腸がん同所移植モデルマウスの腫瘍への蓄積を *in vivo* イメージングシステムを用いて観察した。結果を Fig. 4-5 に示す。HL/ICG を投与したマウスにおいて、投与後 48 時間まで外部から非侵襲的に ICG の蛍光が観察された。しかし、他の試料では投与後 24 時間以降に外部からの蛍光は観察できなかった。また、摘出した腫瘍が生着している盲腸組織においても HL/ICG を投与したマウスにおいて ICG の強い蛍光が明らかとなった。

以上の結果から、HL/ICG の大腸がん同所移植モデルマウスの腫瘍に対する蓄積が明らかとなった。

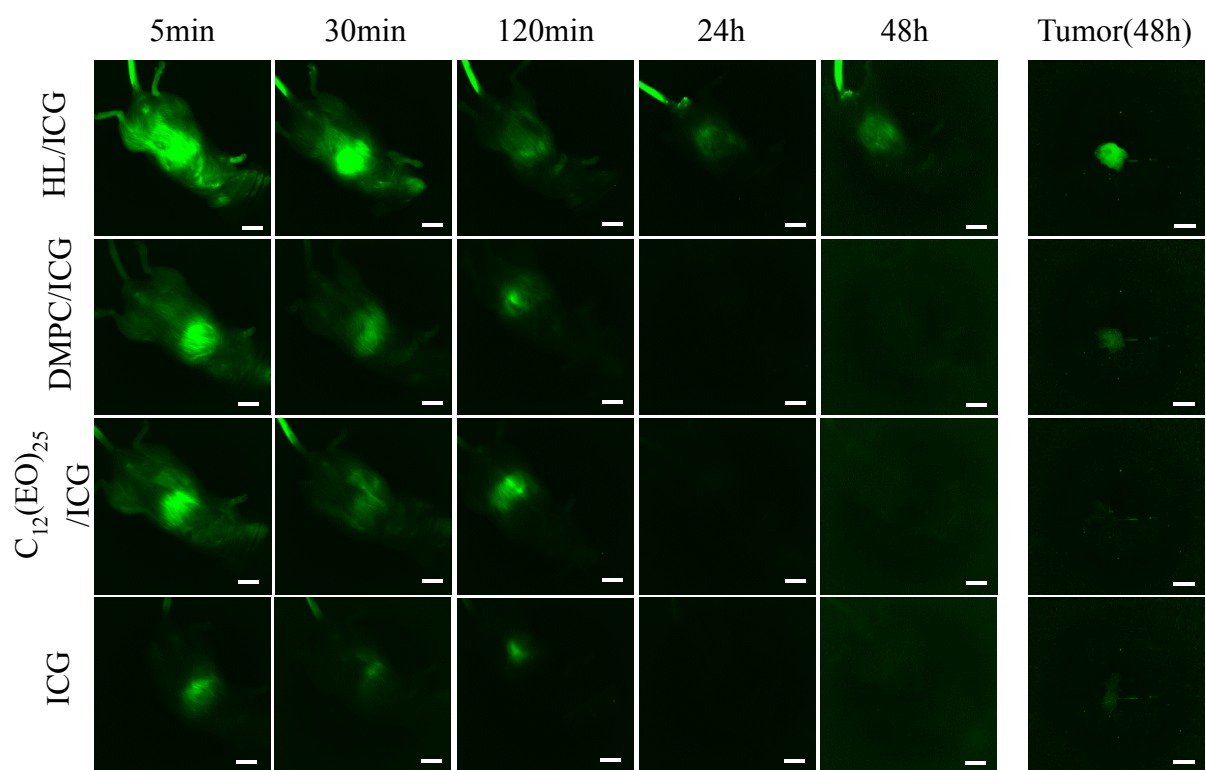


Fig. 4-5 Long term accumulation of HL including ICG into the tumor of the orthotopic graft model mice at 4weeks after the inoculation of HCT116 cells.

Scale bar : 1 cm.

4-4 総括

インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームのセラノスティクス薬剤（診断）としてがん検出能を検討するために、大腸がんに対する *in vitro* および *in vivo* への蓄積の観察を行った結果、以下のような興味深い知見が得られた。

1. *in vitro* において WiDr 細胞に対する HL/4 mol% ICG の蓄積を観察した結果、DMPC/ICG および HL/ICG で処理した細胞において ICG の蛍光が観察された。また、DMPC/ICG と HL/ICG を比較したとき、HL/ICG がより多くがん細胞に蓄積していることが観察され、HL/ICG は大腸がん細胞に蓄積することが明らかとなった。
2. HCT116 細胞に対する HL/1 mol% ICG の蓄積を観察した結果、DMPC/ICG, C₁₂(EO)₂₅/ICG, HL/ICG において ICG の蓄積が観察された。また、HCT116 細胞と同一条件で正常大腸細胞への蓄積を観察した結果、正常大腸細胞への蓄積は観察されなかった。
3. WiDr 細胞皮下移植モデルマウスの腫瘍に対する HL/4 mol% ICG の蓄積を観察した結果、HL/ICG において腫瘍近傍に ICG の強い蛍光が長時間観察された。
4. HCT116 細胞同所移植モデルマウスの腫瘍に対する HL/1 mol% ICG の蓄積を観察した結果、HL/ICG を静脈投与したマウスにおいて長時間の ICG の蛍光が観察された。一方、DMPC/ICG, C₁₂(EO)₂₅/ICG, ICG を投与したマウスでは 24 時間以降は外部から ICG の蛍光は観察されなかった。

以上の結果から、HL/ICG の *in vitro* および *in vivo* における大腸がんに対する蓄積が観察された。特に *in vivo* の観察結果から、HL/ICG は腫瘍に対して他の試料よりも長時間蓄積しており、HL/ICG はセラノスティクス薬剤として大腸がん診断薬への応用が期待できる。

第5章 乳がん同所移植モデルマウスに対するハイブリッドリポソームのセラノスティクス

5-1 序

乳がんは日本人女性の罹患率は1位であり、死亡者数では第5位のがんである¹⁾。つまり、乳がんは罹患する可能性は高いが、早期発見することで完治可能ながんであるということである。乳がんは体の表面に近い部位に位置しているため、患者や配偶者などがしこりとして発見する機会が多いといわれる。しかし、しこりを感じる大きさの乳がんはすでに進行している場合があり、早期発見には定期的な乳がん検診が必要である。

乳がんの診断にはマンモグラフィーが頻繁に用いられる。乳房のみにX線を照射するため、低被曝で簡便という特徴を持つが患者の中には抵抗を感じる人もおり、受診率が低いことが問題とされている。さらに、日本人女性に多くいるとされる高濃度乳腺(デンスブレスト)はマンモグラフィー診断において、乳がんを発見する妨げとなっている。デンスブレストのためマンモグラフィーによる検査が難しい患者は、超音波診断を行うことで診断の精度を上げることができる。しかし、超音波診断は施術者の技量に精度が大きく左右されるという問題点がある。そのため、簡便で精度が高い診断方法の開発が望まれている。

乳がん検診でがんが発見されると進行ステージ分類(Table 5-1)¹⁰⁰⁾により治療方針を決めていく。乳がんは発見されたときにはすでに浸潤がん(ステージⅡ以上)である割合が80%と高く、多くの治療で乳房切除術が行われる。しかし、乳房を失うことは多くの女性にとって精神的苦痛を伴う。近年では乳房再建手術が広く行われるようになったが、手術に抵抗のある女性が多く、低侵襲で患者のQOLに配慮した画期的な治療方法の開発が望まれている。

乳がんの治療における化学療法は、主に補助療法として用いられる。用いられる抗がん剤の種類はがんのサブタイプ(Table 5-2)によって分類されている。乳がんのサブタイプの分類にはエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2、がん細胞の増殖活性(Ki67値)の4つの指標がある。最も多いサブタイプはルミナルA型で、乳がん患者の60%程度であるといわれている。このサブタイプの中で近年問題となっているのが、トリプルネガティブである。ルミナルA型と異なり、乳がん細胞に特徴的な薬に対する受容体が少ないため、治療が難しくなる。トリプルネガティブ乳がんは全体の10%程度と言われているが、比較的予後が良いとされるホルモン療法や分子標的薬が効きにくいいため、抗がん剤での治療が行われる。しかし、トリプルネガティブ乳がんに対して効果的な抗がん剤の確立はできていないため、効果の高い抗がん剤を選定するために長い時間を

要し、乳がん治療における今後の課題となっている。

Table 5-1 乳がんの病期分類¹⁰⁰⁾.

| 病期 | | しこりの大きさや転移の状況 |
|-------|---------|--|
| 0 期 | | 非浸潤がん |
| I 期 | | しこりの大きさが 2cm 以下でリンパ節転移なし |
| II 期 | II A 期 | しこりの大きさが 2~5cm 以下でリンパ節転移なし しこりの大きさが 2cm 以下で同側腋窩リンパ節レベル I, II 転移あり |
| | II B 期 | しこりの大きさが 5cm を超えて、リンパ節転移なし しこりの大きさが 2~5cm 以下で同側腋窩リンパ節レベル I, II 転移あり |
| III 期 | III A 期 | しこりの大きさが 5cm を超えて、同側腋窩リンパ節レベル I, II 転移あり しこりの大きさは問わず、同側腋窩リンパ節レベル I, II が周囲組織に固定されている。または胸骨傍リンパ節のみに転移あり |
| | III B 期 | しこりの大きさは問わず、しこりが胸壁に固定されていたり、皮膚に浮腫や潰瘍を形成しているもの(炎症性乳がんを含む)で、リンパ節転移なし、または同側腋窩リンパ節レベル I, II 転移あり、または胸骨傍リンパ節のみに転移あり |
| | III C 期 | しこりの大きさは問わず、同側腋窩リンパ節レベル III あるいは鎖骨上のリンパ節転移あり、また、胸骨傍リンパ節と同側腋窩リンパ節レベル I, II 両方に転移あり |
| IV 期 | | しこりの大きさやリンパ節転移の状況にかかわらず、他の臓器への転移あり |

Table 5-2 乳がんのサブタイプに合わせた薬物療法¹⁰⁰⁾.

| サブタイプ分類 | ホルモン受容体 | | HER2 | Ki67 | 薬物療法 |
|--------------------|----------|-----------|------|------|---------------------|
| | ER | PgR | | | |
| ルミナルA型 | 陽性 | 陽性 | 陰性 | 低 | ホルモン療法 |
| ルミナルB型 (HER2陽性) | 陽性 | 陽性あるいは陰性 | 陽性 | 低～高 | ホルモン療法、化学療法、抗HER2療法 |
| ルミナルB型 (HER2陰性) | 陽性あるいは陰性 | 弱陽性あるいは陰性 | 陰性 | 高 | ホルモン療法、化学療法 |
| HER2型 | 陰性 | 陰性 | 陽性 | — | 化学療法、抗HER2療法 |
| トリプルネガティブ | 陰性 | 陰性 | 陰性 | — | 化学療法 |

第3章と第4章において、大腸がんに対するハイブリッドリポソーム(HL)の治療効果およびインドシアニングリーン含有 HL(HL/ICG)の腫瘍への特異的蓄積について検討してきた。本章では、HLを用いた乳がんのセラノスティクス(治療と診断)薬剤の開発を目的とし、HLの乳がんに対する *in vitro* および *in vivo* での治療効果および HL/ICG の乳がんへの蓄積について検討した。

5-2 実験

5-2-1 試料

リン脂質(DMPC)、界面活性剤($C_{12}(EO)_{25}$)および蛍光試薬は、2-2-1 と同様のものを使用した。

5-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

ハイブリッドリポソームは2-2-2 と同様の調製方法で作製した。濃度は20 mM、保存は25 °Cで行った。

5-2-3 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの調製

インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームは 2-2-3 と同様の調製方法で作製した。濃度は20 mM、保存は4 °Cで行った。

5-2-4 使用細胞

使用細胞は、ヒト乳がん細胞株である MDA-MB-453 細胞(理化学研究所)を用いた。培地には Leibovitz's L-15 (Gibco BRL)+10% Fetal bovine serum (FBS; HyClone Laboratories Inc.)を用い、37 °C、湿度 95%でインキュベーションした。

5-2-5 使用動物

使用動物は、3-2-4 と同様に BALB/c-R/J マウスを用いた。本節では乳がん細胞を用いるため、マウスは雌性の 7~10 週齢を用いた。

5-2-6 マウス正常乳腺細胞の分離

マウス正常乳腺細胞は、BALB/c-R/J マウスから乳腺組織を摘出し、コラゲナーゼ法⁹⁾を用いて分離を行った。実験手順を以下に示す。

〈試薬〉

0.2% コラゲナーゼ培地

DMEM/10% FBS 培地にコラゲナーゼ(和光純薬 : 038-22361)を 0.2%溶解し、メンブレンフィルター(孔径 : 0.20 μm , DISMIC-13P, ADVANTEC)でろ過滅菌したものを使用した。

〈実験手順〉

- 1) 安楽死後のマウスから乳腺組織を摘出し、PBS(-)中で手術用ハサミを用いて細切した。
- 2) 0.2% コラゲナーゼ培地に乳腺組織を入れ、振盪培養(100 rpm, 37 °C, 60 min)を行った。
- 3) 1500 rpm, 25 °C, 10 min で遠心を行い、上清を除去し、無血清 DMEM 培地で懸濁を行った。この工程を 2 度繰り返し、コラゲナーゼを除去した。
- 4) 細胞を DMEM/10% FBS 培地で再懸濁し、60 mm Dish に播種した。

5-2-7 WST-8 assay を用いた細胞増殖抑制試験

HL の乳がん(MDA-MB-453)細胞に対する増殖抑制効果は酵素活性測定法である WST-8 assay により評価した。実験手順を以下に示す。

〈実験手順〉

- 1) MDA-MB-453 細胞を 1.5×10^5 cells/mL に調整し、96 well plate (Nunc)に 0.1 mL 播種し、インキュベーター内で 24 時間培養を行った。
- 2) 10~500 μM に調整した HL を 10 μL /well 添加し、48 時間培養を行った。
- 3) WST-8 溶液を添加し、3 時間後に分光光度計を用いて波長 450 nm における WST-8 formazan の吸光度を測定した。得られた吸光度(A_{mean})とコントロールの吸光度(A_{control})から細胞生存率($A_{\text{mean}}/A_{\text{control}} \times 100$)を算出し、さらに各試料濃度依存の増殖抑制曲線から、 IC_{50} を算出した。

5-2-8 PI assay による DNA 断片化率の測定

HL の乳がん(MDA-MB-453)細胞に対する DNA 断片化率を PI assay により測定した。実験手順を以下に示す。

〈実験方法〉

- 1) 乳がん(MDA-MB-453)細胞を 1.5×10^5 cells/mL に調整し 60 mm Dish (Falcon)に 4 mL 播種後、インキュベーター内で 24 時間培養を行った。
- 2) 上澄みを除去後、HL の濃度が 100~500 μ M となるように調整した完全培地を加え、48 時間培養を行った。
- 3) 細胞を回収し、3000 rpm/3 min で遠心を行い、上清を除去した。
- 4) PBS(-)で懸濁し細胞数を $0.1 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL になるようにエッペンに移した。
- 5) エッペンを 3000 rpm, 2 min で遠心し、上清を除去した。
- 6) エッペンに浸透化溶液を 500 μ L、RNase を 250 μ L、PBS(-)を 250 μ L 加えた。
- 7) 細胞懸濁液 900 μ L をナイロンメッシュを通してテストチューブに加えた(暗所、氷冷)。
- 8) テストチューブに PI を 100 μ L 加え、氷冷(暗所)で 10 分間染色し、フローサイトメトリー(CytoFLEX, Beckman Coulter)で解析を行った。

5-2-9 細胞膜流動性の測定

HL の乳がん(MDA-MB-453)細胞の膜流動性に与える影響については蛍光分光光度計(F-7100, HITACHI)を用いて蛍光偏光解消法に基づき測定した。蛍光プローブには、膜内部の流動性を反映させるといわれている 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH, ナカライテスク)を使用した。実験手順を以下に示す。

〈実験方法〉

- 1) 100 mm Dish(Falcon)でサブコンフルエントまで培養した乳がん(MDA-MB-453)細胞を遠心管に回収した。
- 2) 1000 rpm/5 min で遠心後、上澄みを除去し、HBSS で細胞数を 1.0×10^6 cells/mL に調整した。
- 3) DPH(2.0 mM)を 1 μ L/mL 添加(最終濃度 2.0 μ M)し、37 °C 暗所条件で 35 分間染色した。
- 4) 3000 rpm/5 min で遠心し、上清除去後に HBSS(10 mL)を加えた。この工程を合計 3 度繰り返し、未挿入の DPH を除去した。
- 5) HBSS で懸濁し細胞数を 2.5×10^5 cells/mL に調整した。
- 6) 石英セルに細胞懸濁液を 2.5 mL 入れ、F-7100 を用いて 37 °C 条件下で細胞の膜流動性を測定した。
- 7) HL の膜流動性に与える影響は、測定開始 60 秒後に HL を最終濃度 100 μ M となるように添加し、すぐに測定を開始し合計 300 秒まで変化の観察を行った。

5-2-10 乳がん同所移植モデルマウスの作製

乳がん(MDA-MB-453)細胞を回収後、PBS(-)とマトリゲル(BD Bioscience)を 1 : 9 の割合となるように加え、移植用細胞懸濁液(1.0×10^8 cells/mL)を調整した。麻酔下で BALB/c-R/J マウスの乳頭部から 29G ツベルクリンシリンジを用いて移植用細胞懸濁液を 0.05 mL(5.0×10^6 cells/body)移植し、乳がん同所移植モデルマウスの作製を行った。マトリゲルは 10 °C 以上でゲル化し始めるため、移植の際に使用するシリンジ、針、移植用細胞懸濁液は氷冷したものを使用した。

5-2-11 乳がん同所移植モデルマウスに対するハイブリッドリポソームの治療実験

MDA-MB-453 細胞を 5-2-10 の方法で同所移植して 2 週間後にキャリパーを用い、腫瘍の大きさを(4-1)式に基づいて測定し、腫瘍体積を元に層別連続無作為化法により Control 群、DMPC 投与群、HL 投与群の 3 群に分けた。群分け後から HL を 10 mL/kg (DMPC Dose : 136 mg/kg)で静脈投与した。投与は 1 日 1 回、21 日間行った。投与終了翌日に麻酔下で解剖し、乳腺組織の重量の測定を行った。

5-2-12 TUNEL 法によるアポトーシス誘導の観察

5-2-11 で摘出した乳腺組織は、10% 中性緩衝ホルマリン溶液(Wako)中で 4 °C 条件で固定した。その後、乳腺組織をバイオ病理研究所に TUNEL 染色切片の作成を依頼した。TUNEL 切片の観察には、培養倒立顕微鏡(TS100, Nikon)を用い、デジタル顕微鏡カメラヘッド(DS-Fi1, Nikon)とデジタルイメージングコントローラー(DS-L2, Nikon)で撮影を行った。

5-2-13 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの *in vitro* での乳がん細胞および正常乳腺細胞への蓄積の比較

in vitro における HL/1 mol% ICG の乳がん(MDA-MB-453)細胞への蓄積は蛍光顕微鏡(EVOS ®FL Cell Imaging System)を用いて観察した。また、HL/ICG のがん細胞への特異性を確認するため、マウス正常乳腺細胞を用いて同様に実験を行った。実験手順を以下に示す。

〈実験手順〉

- 1) MDA-MB-453 細胞 (2.0×10^5 cells/mL)および正常乳腺細胞 (1.0×10^5 cells/mL)を 2 mL ガラスボトムカルチャーディッシュ(MatTec)に播種し、MDA-MB-453 細胞は 37 °C, 湿度 95%、正常乳腺細胞は 37 °C, CO₂ 5%, 湿度 95%の条件下で 24 時間培養した。
- 2) 試料溶液を培地に添加(100 μM)し、150 分間のインキュベーションを行った。
- 3) Hoechst 33342 Solution (17.6 μM)を添加し 30 分間のインキュベーションを行った。
- 4) 上澄みを除去後、血清入り培地を加え、蛍光顕微鏡で観察を行った。蛍光検出は EVOS Light Cube Cy7 (Ex : 710/40 nm, Em : 775/46 nm)を用いて行った。

5-2-14 インドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソームの 乳がん同所移植モデルマウスの腫瘍への蓄積の観察

HL の乳がん診断能を検討するために、乳がん同所移植モデルマウスに対する HL/1 mol% ICG の蓄積を *in vivo* イメージングシステム(AEQUORIA ; 浜松ホトニクス)を用いて観察した。

実験に使用した乳がん同所移植モデルマウスは 5-2-10 と同様の方法で作製を行った。MDA-MB-453 細胞同所移植モデルマウスに対する HL/1 mol% ICG の蓄積は、MDA-MB-453 細胞を乳腺組織に移植後 28 日目に HL/1 mol% ICG を 10 mL/kg で尾静脈投与した。投与後、経時的に *in vivo* イメージングシステムを用いて励起光 775/50 nm、蛍光波長 845/55 nm の条件で観察を行った。

5-3 結果と考察

5-3-1 ハイブリッドリポソームの乳がん細胞に対するアポトーシス誘導による増殖抑制効果

ハイブリッドリポソーム(90 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅)を用いて乳がん(MDA-MB-453)細胞に対する増殖抑制効果について検討を行った。結果を Fig. 5-1 に示す。HL の乳がん (MDA-MB-453)細胞に対する IC₅₀ 値は 169 μ M、DMPC の IC₅₀ 値は 413 μ M であり、HL は DMPC の半分以下の濃度で MDA-MB-453 細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

次に、HL の MDA-MB-453 細胞に対するアポトーシス誘導について、PI assay による DNA 断片化率の測定で評価した。結果を Fig. 5-2 に示す。HL で処理した MDA-MB-453 細胞の DNA 断片化率は濃度依存的に増加していき、500 μ M では 70%であった。一方、DMPC で処理した MDA-MB-453 細胞では、DNA 断片化は見られず、500 μ M では 4%の断片化率であった。

以上の結果から、HL の乳がん(MDA-MB-453)細胞に対するアポトーシス誘導による顕著な増殖抑制効果が明らかとなった。

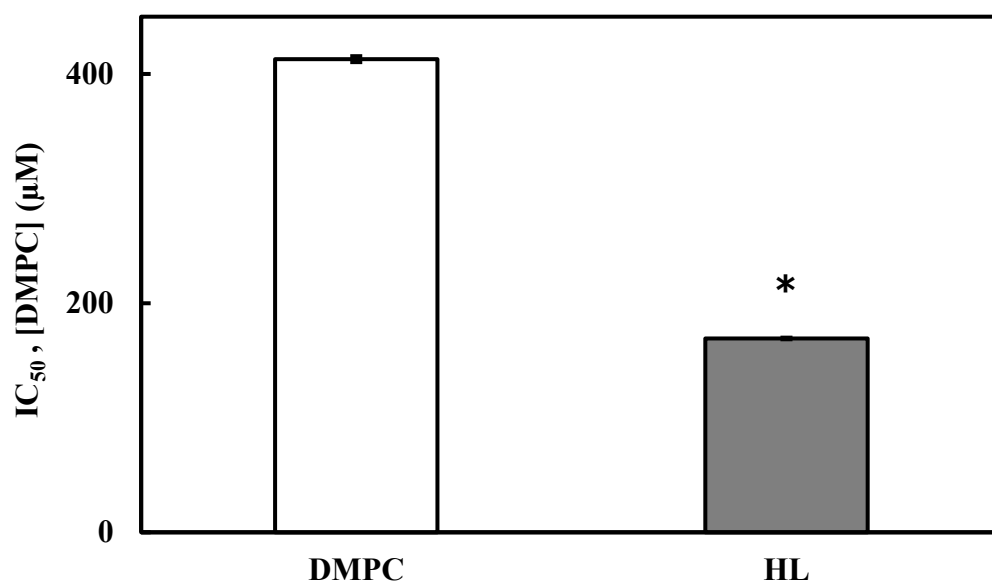


Fig. 5-1 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of HL on the growth of MDA-MB-453 cells for 48 h.

Data represent the mean (n=4) ±S.E.

* $p < 0.05$ (vs. DMPC).

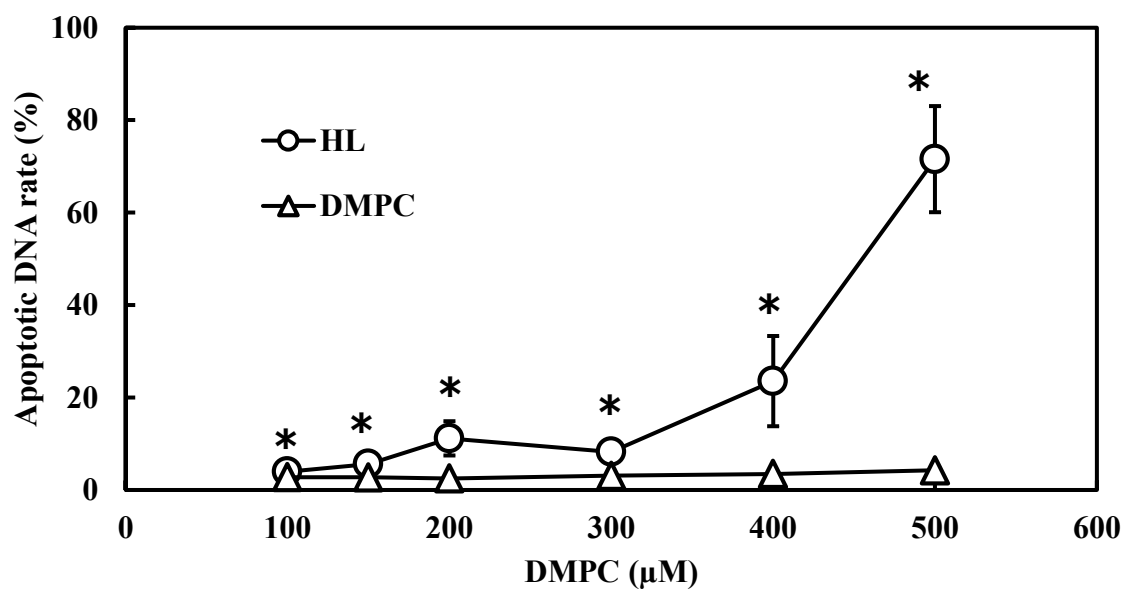


Fig. 5-2 Apoptotic DNA rate of MDA-MB-453 cells treated with HL for 48h.
Data represent mean (n=4) \pm S.E. * $p < 0.05$.

5-3-2 ハイブリッドリポソームの乳がん細胞の膜流動性に与える影響

5-3-1 において HL の乳がん(MDA-MB-453)細胞に対するアポトーシス誘導による増殖抑制効果が明らかになった。そこで、本節では HL の抗腫瘍効果と相関性が報告されている細胞膜流動性の変化について観察を行った。

HL の MDA-MB-453 細胞の膜流動性に与える影響について検討した結果を Fig. 5-3 に示す。また、250-300 秒間に測定した結果を平均化し Fig. 5-4 に示す。DMPC および HL で処理した MDA-MB-453 細胞において蛍光偏光度(P)が減少し、細胞膜の流動性が増大したことが明らかとなった。MDA-MB-453 細胞(Control)の P 値は 0.183 であり、DMPC で処理した細胞は 0.133、HL で処理した細胞は 0.113 であり、HL で処理した細胞はより膜流動性が増大していることが明らかとなった(Fig. 5-4)。

以上の結果から、HL は MDA-MB-453 細胞の膜流動性を顕著に増大させることが明らかとなった。

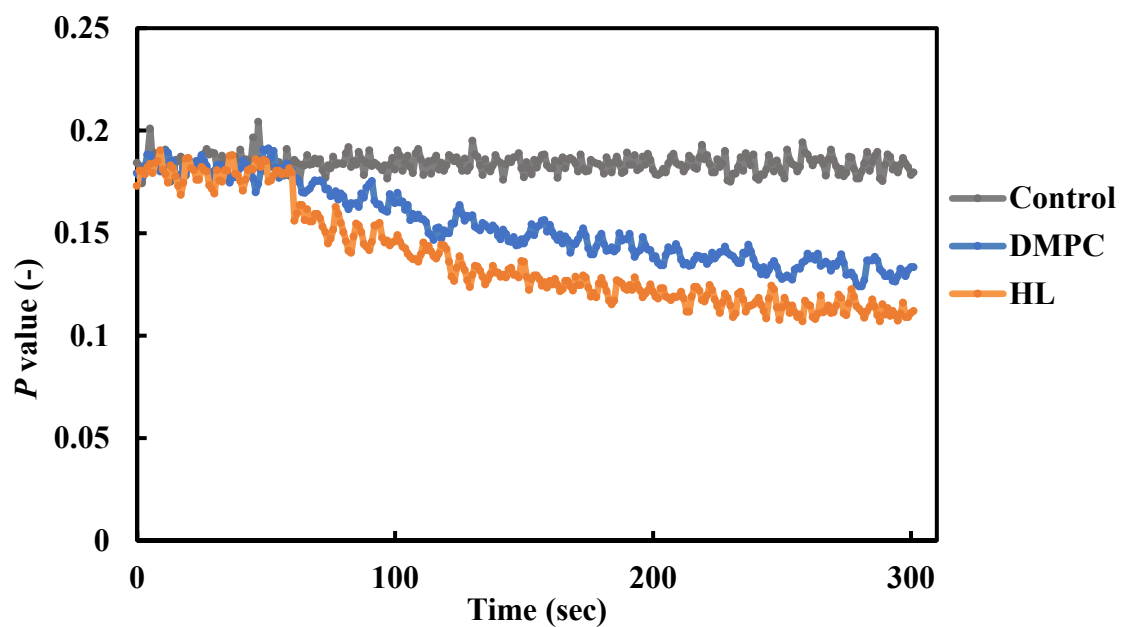


Fig. 5-3 Time course of fluorescence polarization (P value) change for DPH-labeled MDA-MB-453 cells after the treatment with HL.
[DMPC]=100 μ M.

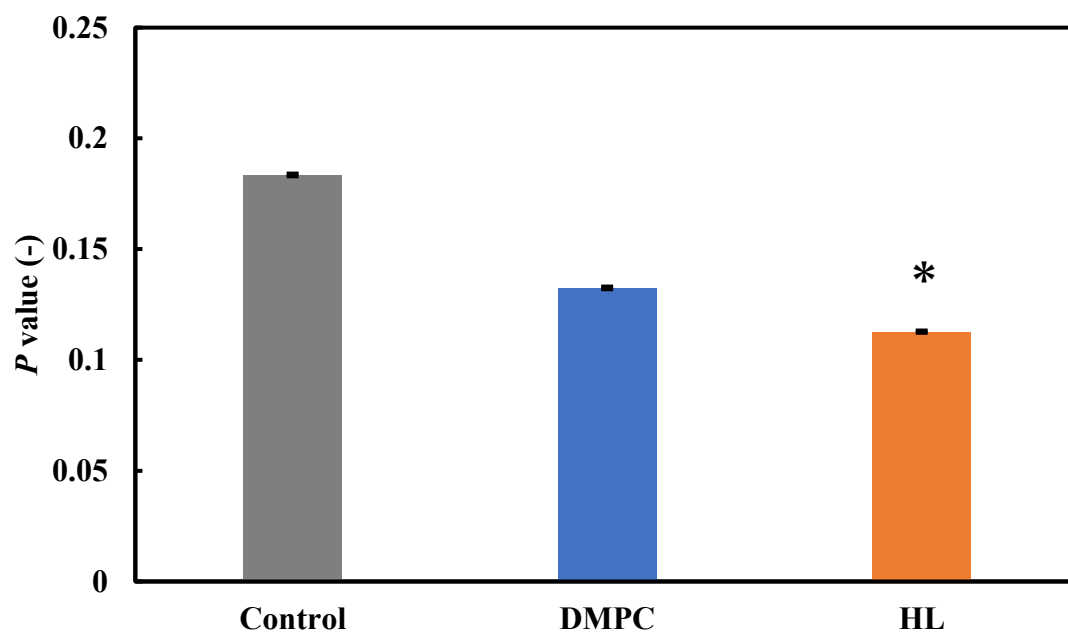


Fig. 5-4 Increase in membrane fluidity of MDA-MB-453 cells after the treatment with HL.

Data represent the mean (n=3) \pm S.E. * $p < 0.05$ (vs. Control, DMPC)
[DMPC]=100 μ M.

5-3-3 乳がん同所移植モデルマウスに対するハイブリッドリポソームのアポトーシス誘導による治療効果

5-3-1 で *in vitro* における HL の乳がん細胞に対するアポトーシス誘導による増殖抑制効果が明らかとなったため、本節では乳がん同所移植モデルマウスに対する HL の静脈投与による治療効果について検討した。

マウスに MDA-MB-453 細胞を乳腺部位に同所移植し、2 週間後から HL の投与を 3 週間行った。投与期間中のマウス腫瘍体積の測定結果を Fig. 5-5 に示す。Control 群、DMPC 投与群では、腫瘍体積は経過日数とともに増大しており、最終日では Control 群では 145 mm^3 、DMPC 投与群では 122 mm^3 であった。一方、HL 投与群では腫瘍体積の増大が抑制され、最終日では腫瘍体積は 92 mm^3 ($p < 0.05$) であった。

投与終了後の翌日に剖検によって摘出した乳腺組織の重量を測定し、治療効果の評価を行った。結果を Fig. 5-6 に示す。Control 群、DMPC 投与群では相対臓器重量の増加が確認されたのに対し、HL 投与群では有意に減少しており、HL による乳がん同所移植モデルマウスに対する治療効果が明らかとなった。また、摘出した乳腺組織の写真(Fig. 5-7)においても、HL 投与群の腫瘍の縮小が確認された。

摘出した乳腺組織をホルマリン固定し、パラフィン切片の作成後、TUNEL 染色による観察を行った。結果を Fig. 5-8 に示す。DMPC 投与群、HL 投与群でアポトーシス陽性細胞が観察でき、HL 投与群ではアポトーシス陽性細胞が多数確認された。

以上の結果から、HL の乳がん(MDA-MB-453)同所移植モデルマウスに対する静脈投与によるアポトーシスを伴う治療効果が明らかになった。

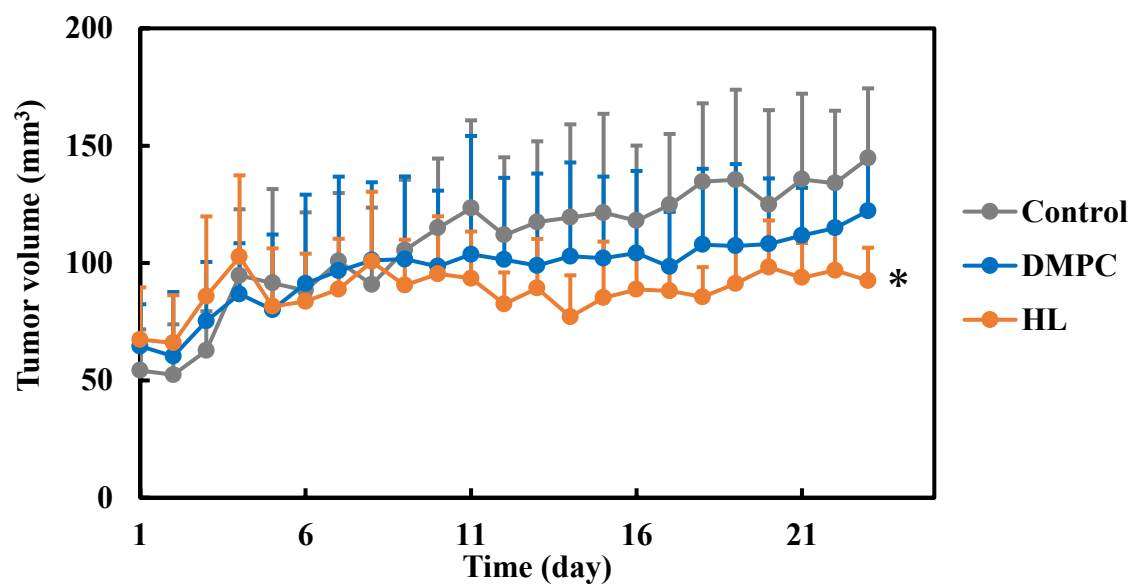


Fig. 5-5 Tumor volume change of xenograft model mice treated with HL after inoculation of MDA-MB-453 cells to the mammary gland.
Data presented are mean (n=6) \pm S.D., * $p < 0.05$ (vs. Control, DMPC).

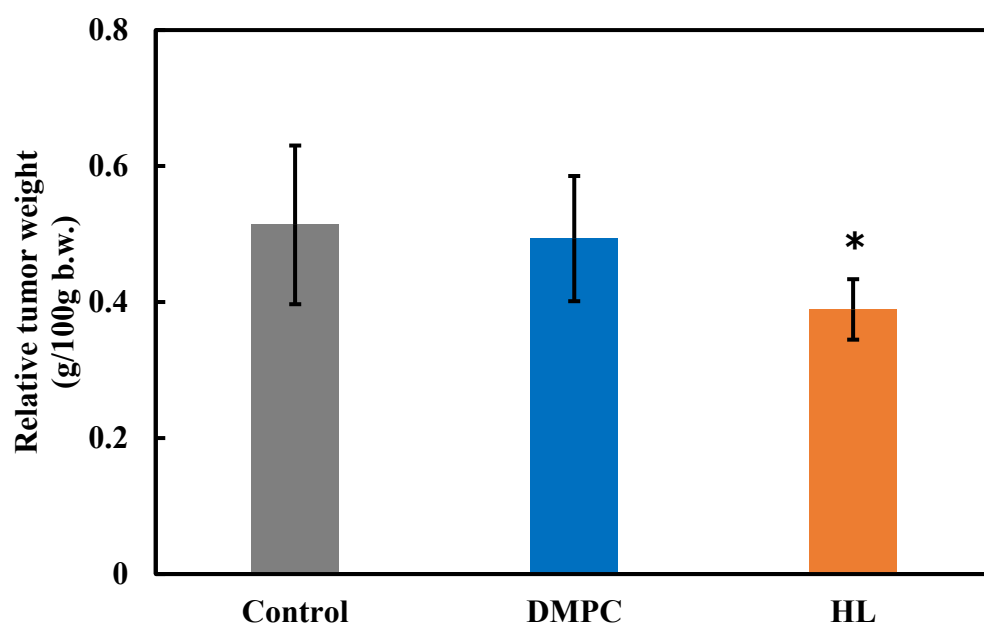


Fig. 5-6 Relative tumor weight of xenograft model mice treated with HL after inoculation of MDA-MB-453 cells to the mammary gland.

Data presented are mean (n=6) \pm S.D., * $p < 0.05$ (vs. Control, DMPC).

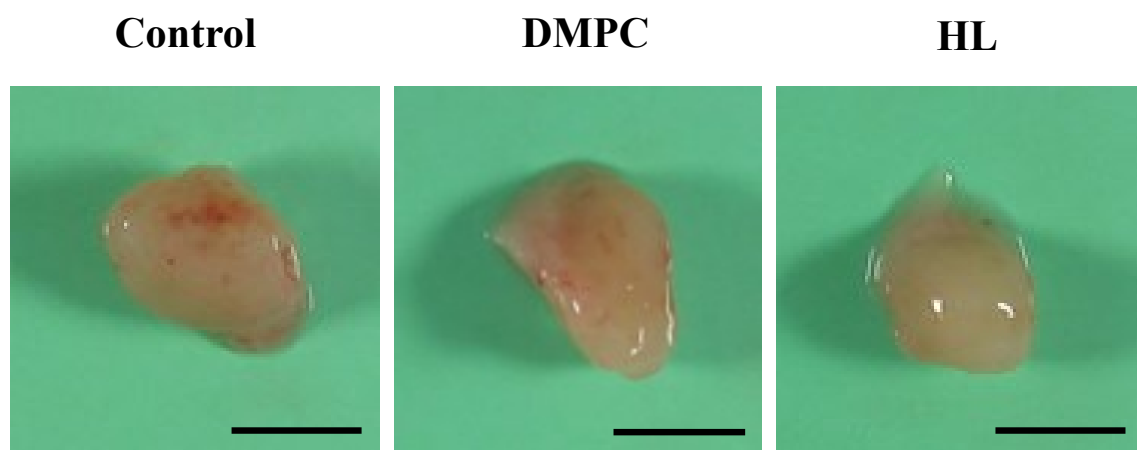


Fig. 5-7 Photographs of tumor in orthotopic graft model mice treated with HL after inoculation of MDA-MB-453 cells to the mammary gland.
Scale bar : 0.5 cm.

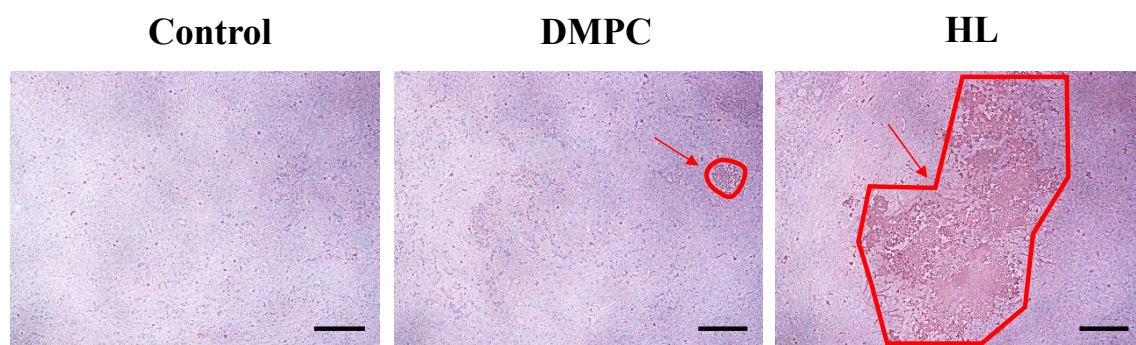


Fig. 5-8 Micrographs of tumor section of mammary gland in orthotopic graft model mice after the treatment with HL using TUNEL method.
Arrows : apoptotic cells, Scale bar : 100 μ m.

5-3-4 インドシアニングリーン含有ハイブリッドリポソームの乳がん細胞への特異的な蓄積

HL/1 mol% ICG (89 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅/1 mol% ICG)の MDA-MB-453 細胞への蓄積を観察した結果を Fig. 5-9 に示す。すべての試料で ICG の蛍光が観察された。特に HL/ICG で処理した MDA-MB-453 細胞では強い ICG の蛍光が観察された。

また、正常乳腺細胞への蓄積を観察したところ、すべての試料で ICG の蓄積は観察されなかった(Fig. 5-10)。

以上の結果から、*in vitro* における HL/ICG の乳がん(MDA-MB-453)細胞への選択的な蓄積が明らかとなった。

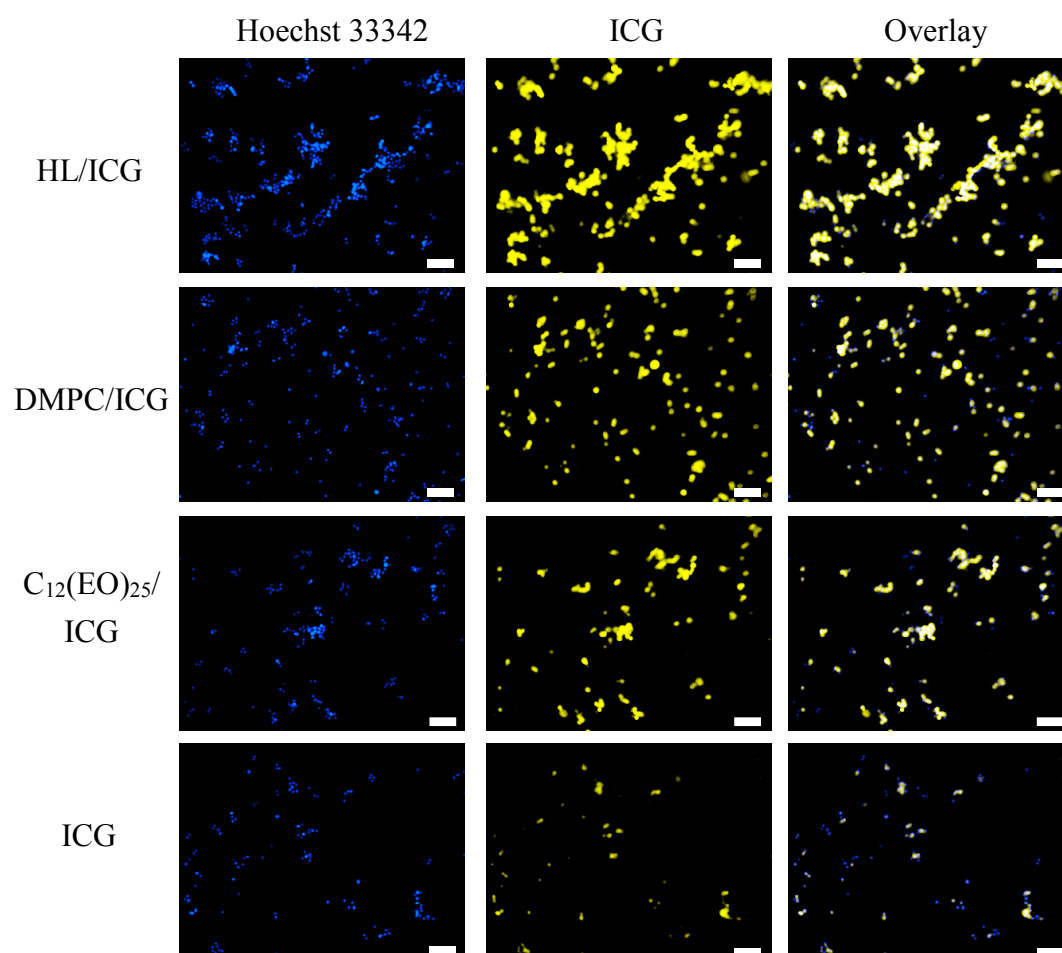


Fig. 5-9 Fluorescence micrographs of MDA-MB-453 cells after the treatment with HL/ICG for 3h.

Scale bar : 100 μ m, [DMPC]=100 μ M.

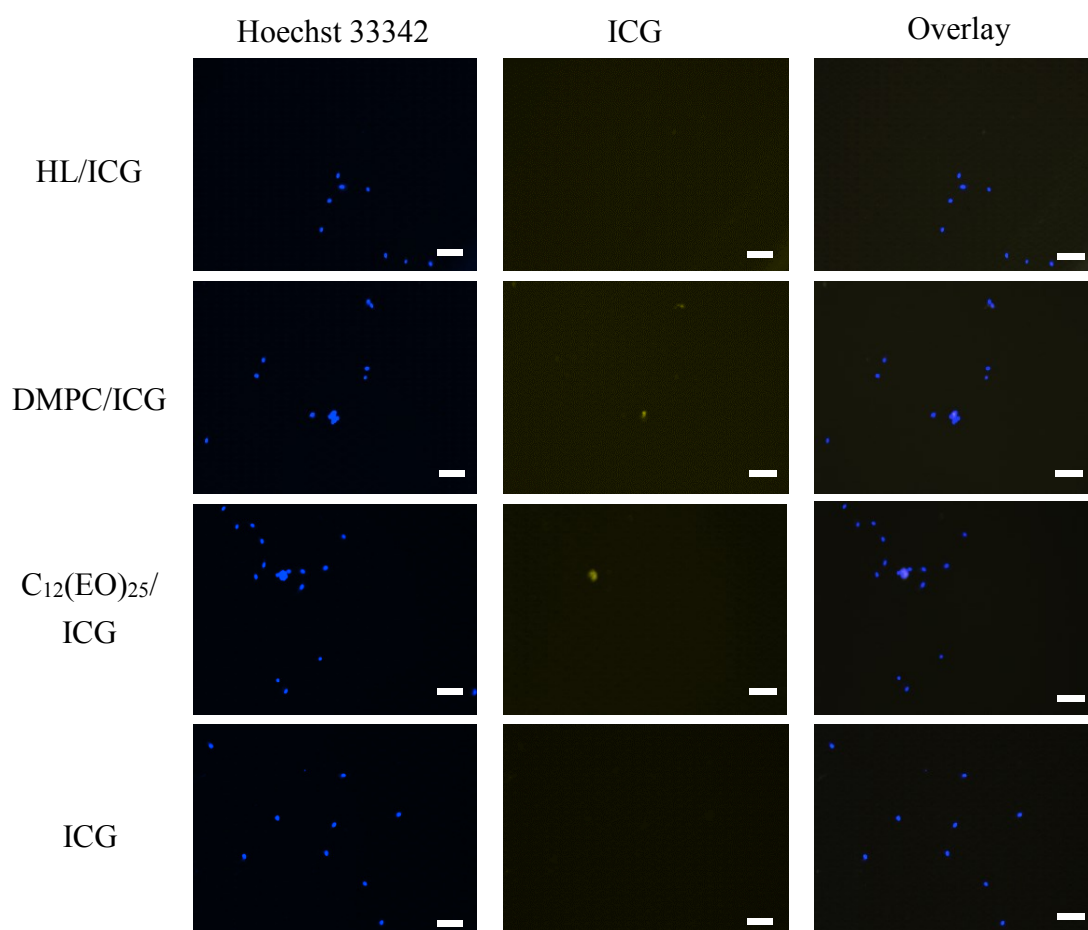


Fig. 5-10 Fluorescence micrographs of normal breast cells after the treatment with HL/ICG for 3h.
Scale bar : 100 μ m [DMPC]=100 μ M.

5-3-5 インドシアニングリーン含有ハイブリッドリポソームの 乳がん同所移植モデルマウスの腫瘍への蓄積

HL/1 mol% ICG (89 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅/1 mol% ICG)の乳がん同所移植モデルマウスの腫瘍への蓄積を *in vivo* イメージングシステムを用いて観察した。結果を Fig. 5-11 に示す。HL/ICG を投与したマウスにおいて、投与後 24 時間まで外部から非侵襲的に ICG の蛍光が観察された。また、摘出した腫瘍が生着した乳腺組織においても HL/ICG を投与したマウスにおいて ICG の強い蛍光が明らかとなった。

以上の結果から、HL/ICG の乳がん同所移植モデルマウスの腫瘍に対する蓄積が明らかとなった。

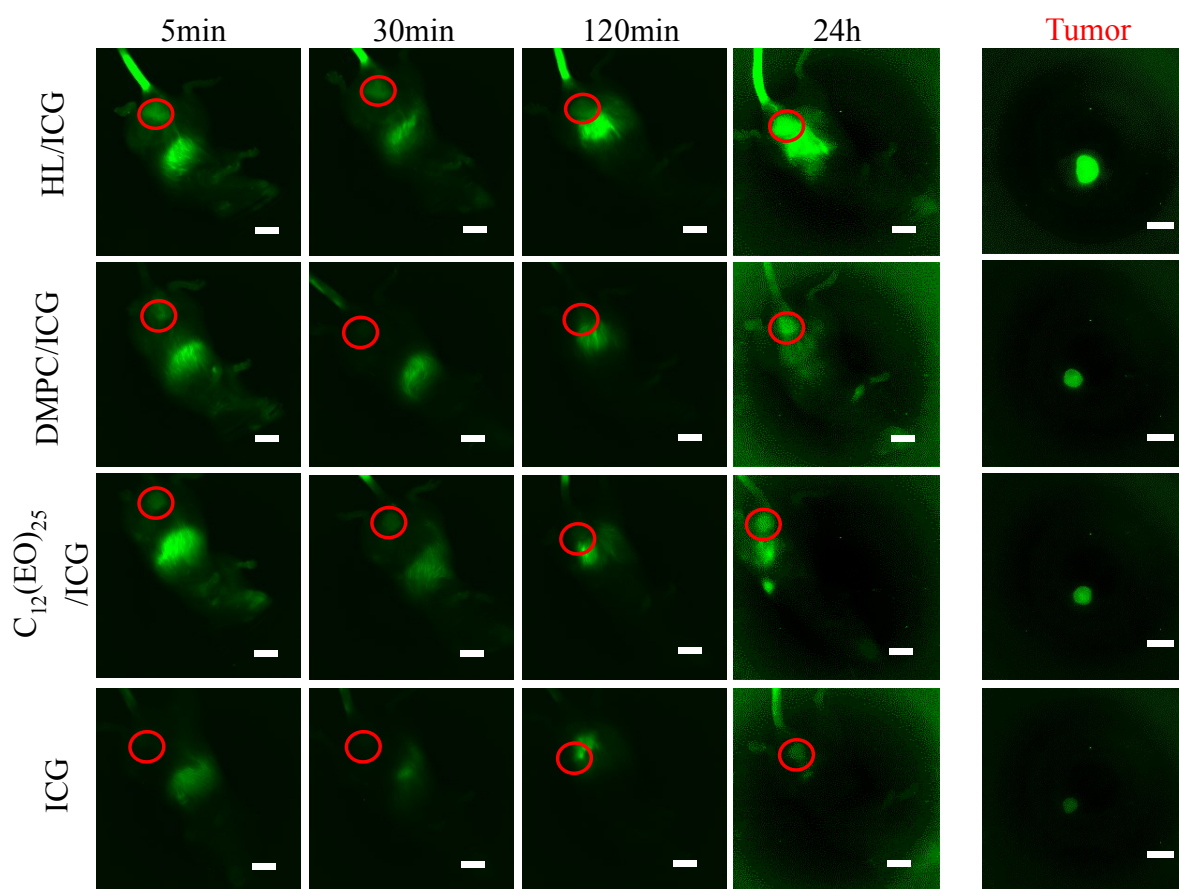


Fig. 5-11 Fluorescence photographs of orthotopic graft model mice treated with HL/ICG at 4weeks after inoculation of MDA-MB-453 cells to the mammary gland.
Circle : tumors, Scale bar : 1 cm.

5-4 総括

本章ではインドシアニンググリーン含有ハイブリッドリポソーム(HL/ICG)のセラノスティクス薬剤への応用として、HL の乳がん(MDA-MB-453)細胞に対する *in vitro* および *in vivo* でのアポトーシス誘導による抗腫瘍効果および HL/ICG の乳がん細胞への蓄積を検討し、以下のような興味深い知見が得られた。

1. HL の乳がん (MDA-MB-453)細胞に対する IC₅₀ 値は 169 μ M、DMPC の IC₅₀ 値は 413 μ M であり、HL は DMPC の半分以下の濃度で MDA-MB-453 細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。
2. HL で処理した MDA-MB-453 細胞の DNA 断片化率は濃度依存的に増加し、500 μ M では 70%であった。一方、DMPC で処理した MDA-MB-453 細胞では、DNA 断片化は見られず、500 μ M では 4%の断片化率であった。
3. HL による MDA-MB-453 細胞の膜流動性に与える影響について検討したところ、DMPC および HL で処理した MDA-MB-453 細胞において蛍光偏光度(*P*)が減少し、細胞膜の流動性が増大したことが明らかとなった。MDA-MB-453 細胞(Control)の *P* 値は 0.183 であり、DMPC で処理した細胞は 0.133、HL で処理した細胞は 0.113 であり、HL で処理した細胞はより膜流動性が増大していることが明らかとなった。
4. 乳がん(MDA-MB-453)同所移植モデルマウスに対する HL の静脈投与による治療効果について検討したところ、Control 群、DMPC 投与群では、腫瘍体積は経過日数とともに増大したが、HL 投与群では腫瘍体積の増大が抑制された。また、摘出した乳腺組織の重量を測定した結果、Control 群、DMPC 投与群では相対臓器重量の増加が確認されたのに対し、HL 投与群では有意に減少しており、HL による乳がん同所移植モデルマウスに対する治療効果が明らかとなった。
5. 摘出した乳腺組織の TUNEL 染色による観察を行った結果、DMPC 投与群、HL 投与群でアポトーシス陽性細胞が観察できた。特に、HL 投与群ではアポトーシス陽性細胞が多数確認され、HL 投与による乳がん同所移植モデルマウスの腫瘍に対するアポトーシス誘導が明らかとなった。

6. *in vitro* において MDA-MB-453 細胞に対する HL/1 mol% ICG の蓄積を観察した結果、HL/ICG で処理した細胞において顕著な ICG の蛍光が観察された。また、正常乳腺細胞への HL/ICG の蓄積を観察した結果、HL/ICG は正常乳腺細胞には蓄積しなかった。
7. MDA-MB-453 細胞同所移植モデルマウスの腫瘍に対する HL1 mol% ICG の蓄積を観察した結果、HL/ICG を静脈投与したマウスの腫瘍付近に外部から非侵襲的に ICG の蛍光が観察された。一方、DMPC/ICG, C₁₂(EO)₂₅/ICG, ICG を投与したマウスでは投与後 24 時間後ではわずかな ICG の蛍光しか観察されなかった。

以上の結果から、HL/ICG の *in vitro* および *in vivo* における乳がんに対する治療効果および蓄積が明らかとなった。HL/ICG の乳がんへのセラノステイクス薬剤としての可能性が期待できる。

第 6 章 総論

日本人の死因 1 位ががんとなって長い時間が経過しているが、がんの画期的な治療法は確立されておらず、未だに多くの人を苦しめている。がん治療において外科手術で摘出できるものは、切除が好ましいとされており、術後の再発防止や微小転移巣の消失を目的とした化学療法(術後化学療法)がある。しかし、大腸がんのように自覚症状がないことで発見が遅れたがんは、リンパ節転移など全身転移の可能性が疑われるため、精密な画像診断を用いた診断が必要である。診断によって転移が起きていなければ、切除可能な大きさになるまで抗がん剤を用いた治療が行われる(術前化学療法)。また、全身転移してしまったがんには外科手術による切除は不可能であり、全身のがん病巣に対して治療を行う必要がある。このような場合、全身のがんをターゲットとする化学療法剤は最適な治療法であると言える。

腫瘍は遺伝子の傷から始まり、異常増殖により生体を蝕むことで生物を死に至らしめる。そのため、通常の組織のように秩序を持った機能細胞の配置はなく、様々な細胞集団が不均一に腫瘍を形成している。この腫瘍特異的な構造は腫瘍微小環境と呼ばれており、がん治療を困難にする要因でもある。がん細胞はある程度進行すると細胞極性や細胞接着機能を失う上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition ; EMT)が起こる。EMT 後のがん細胞は間葉系幹細胞(MSC)、がん間質線維芽細胞(CAF)の増殖を促進し、免疫抑制効果のある骨髄由来抑制細胞(MDSC)や制御性 T 細胞(Treg)を誘導することで、がん微小環境を整え、宿主の免疫機構から逃れる術を得る。がんを排除するための免疫機構が、逆にがんの進行を助ける役割を担うことが明らかになり、がん微小環境の解明は根治に向けた大きな手がかりとなる。

がん微小環境の解明には、近年開発された二光子励起顕微鏡や *in vivo* イメージングシステムを用いたマウスモデルの腫瘍観察が行われてきた。しかし、臨床においては患者の腫瘍をそれぞれ観察していくことは時間的、経済的、身体的に負担が大きいため行うことができない。そのため、患者個々の腫瘍微小環境を把握するため、何らかの指標が必要である。そこで注目を集めるのが、リキッドバイオプシーなどの低侵襲に患者の腫瘍由来の情報を得ようとする試みである。リキッドバイオプシーは、尿や血液などの体液からがんの情報を得る検査のことである。生体内を流れる Circulating tumor cell (CTC)やがん細胞または正常細胞由来の DNA(Cell free DNA ; cfDNA)やエクソソームが研究対象とされており、これらの分離や解析を行うことで治療効果の予測や再発の指標とすることを目的としている。リキッドバイオプシーと実際の生検との相関性については、未だに多くの議論がなされているが、一部のがんにおいては CTC の数が一定以上を

示すと、予後不良であるなどの統計結果も明らかになっており、今後さらに注目の集まる分野になると考えられる。

上岡らが開発したハイブリッドリポソームは、ベシクル分子とミセル分子を緩衝溶液中で超音波照射することで得られ、従来のリポソーム調製法と比べ安全で簡便な手法で調製できる。また、HL に薬物を内包させ DDS キャリアーとして用いる他に、HL 単剤でのアポトーシス誘導によるがん治療効果が明らかとなっている。*in vivo* における担がんモデルマウスを用いた実験においても、HL による治療効果が明らかとなっている。安全性試験において、正常動物に対する長期間の反復投与毒性試験および体内動態試験で毒性は確認されなかった。さらに、生命倫理委員会の承認を経て、悪性リンパ腫の患者に対する延命効果および顕著な固形リンパ腫の縮小が確認され、従来の副作用の大きな抗がん剤に変わる新たな化学療法剤として期待される。

本研究では、ハイブリッドリポソームによるがん治療と診断を同時に行える(セラノスティクス)薬剤の開発を目的としている。今回は、内視鏡を用いてがんの検出が可能な大腸がんと表層に近く蛍光による検出が可能な乳がんに対する HL の治療および検出について検討した。90 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅ ハイブリッドリポソームの治療効果を確認するために、ヒト結腸腺がん(WiDr, HCT116)細胞およびヒト乳がん(MDA-MB-453)細胞に対する *in vitro* でのアポトーシス誘導による増殖抑制効果を検討した。また、*in vivo* においては HL の大腸がん皮下および同所移植モデルマウスや乳がん同所移植モデルマウスに対する治療効果の検討を行った。次に、HL のがん診断能について検討するために、近赤外蛍光試薬である Indocyanine green (ICG)含有 HL(HL/ICG)の大腸がん細胞および乳がん細胞への蓄積を *in vitro* および *in vivo* において観察した。以下、各章ごとに得られた興味ある知見について述べる。

第2章では、リン脂質(DMPC)と PEG 系界面活性剤(C₁₂(EO)₂₅)を用いて 90 mol% DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₅ ハイブリッドリポソーム(HL)を創製し、膜の安定性について検討した。また、近赤外蛍光試薬(ICG)含有 HL も HL と同様の方法で調製を行い膜の安定性について検討した。HL は調製直後から RES 回避可能な膜直径を 1 ヶ月以上安定して維持した。HL/4 および 1 mol% ICG は調製直後から 100 nm 以下の膜直径を 1 ヶ月以上維持していた。これらの結果は、HL および HL/ICG は RES 回避可能な 100 nm 以下の膜直径であり、室温や冷蔵といった容易な条件で長期間安定であることから臨床応用可能な膜物性を有していると考えられる。

第3章では、*in vitro* および *in vivo* において HL のセラノスティクス薬剤への応用(治療)として、大腸がん(WiDr, HCT116)細胞に対するアポトーシス誘導による増殖抑制効果について検討した。*in vitro* における増殖抑制試験の結果、HL

は WiDr, HCT116 細胞に対して顕著な増殖抑制効果を示した。次に、HL の WiDr 細胞に対するアポトーシス誘導について TUNEL 法による観察を行ったところ、HL で処理した細胞で顕著なアポトーシス誘導が観察された。また、HL の HCT116 細胞に対するアポトーシス誘導について PI assay による DNA 断片化率の測定で評価したところ、HL で処理した細胞では濃度依存的に DNA 断片化率が増加していた。次に、HCT116 細胞に対する HL の膜流動性に与える影響について検討したところ、HL は HCT116 細胞の膜流動性を顕著に増大させることが明らかとなった。*in vivo* における HL の WiDr 細胞皮下移植モデルマウスに対する局所投与による治療効果について検討を行ったところ、HL 投与群の腫瘍体積の増大は抑制され、摘出した腫瘍重量も減少していた。腫瘍組織を切片化し TUNEL 染色による観察を行ったところ、HL 投与群においてアポトーシス陽性細胞が多数観察された。また、HL の HCT116 細胞同所移植モデルマウスに対する静脈投与での治療効果について検討したところ、HL 投与群のマウスの相対盲腸重量は Control に比べ有意に小さかった。盲腸組織を切片化し、HE 染色および TUNEL 染色による観察を行ったところ、HE 染色では HL 投与群において腫瘍の増大が抑制されていることが明らかとなった。また TUNEL 染色の観察の結果、HL 投与群において多数のアポトーシス細胞が観察された。以上の結果から、HL の *in vitro* および *in vivo* における大腸がんに対するアポトーシス誘導による治療効果が明らかとなった。特に、大腸がん同所移植モデルマウスに対する治療効果は、原発巣の腫瘍に対する HL の有用性について示しており、臨床への応用が十分に可能であることを明らかにした。

第 4 章では、HL のセラノスティクス薬剤への応用(診断)として、大腸がん検出能について検討するために、HL/ICG の蓄積の観察を行った。*in vitro* においては WiDr 細胞に対する HL/4 mol% ICG の蓄積および HCT116 細胞に対する HL/1 mol% ICG の蓄積が明らかとなった。さらに、HCT116 細胞と同一条件で観察を行った正常大腸細胞においては HL/1 mol% ICG の蓄積は見られなかった。次に、WiDr 細胞皮下移植モデルマウスに対して HL/4 mol% ICG を腫瘍近傍に局所投与したところ、96 時間後も ICG の蛍光が観察された。さらに、HCT116 細胞同所移植モデルマウスに対して HL/1 mol% ICG を静脈内投与したところ、48 時間後においても ICG の蛍光が外部から非侵襲的に観察可能であった。48 時間後に腫瘍を摘出し、蛍光観察を行ったところ、HL/1 mol% ICG を投与したマウスの盲腸組織において強い ICG の蛍光が観察されたことから、HL/1 mol% ICG の腫瘍への蓄積が明らかとなった。以上の結果は、HL/ICG の高い腫瘍選択性を示しており、ICG の高い生体透過性を生かしたがん診断薬に HL/ICG が応用できる可能性を示した。

第5章では、乳がんに対する HL のセラノスティクス薬剤としての有用性を検討するため、HL の治療と HL/ICG のがん検出能について検討した。HL の乳がん(MDA-MB-453)細胞に対する増殖抑制効果について検討したところ、HL は MDA-MB-453 細胞の増殖を顕著に抑制し、濃度依存的に DNA 断片化率を増大させた。さらに、HL の MDA-MB-453 細胞の膜流動性に与える影響について検討したところ、HL で処理した MDA-MB-453 細胞の膜流動性は顕著に増大した。次に、MDA-MB-453 細胞同所移植モデルマウスに対する HL の治療効果について検討したところ、HL 投与群において腫瘍体積の増大が抑制されていることが明らかとなった。乳腺組織の相対臓器重量による評価では、HL 投与群の腫瘍は有意に減少した。摘出した乳腺組織を切片化し、TUNEL 染色による観察を行ったところ、HL 投与群において多数のアポトーシス細胞が観察された。さらに、HL/1 mol% ICG の乳がん診断薬への応用のために、MDA-MB-453 細胞に対する HL/1 mol% ICG の蓄積を観察した。*in vitro* において HL/ICG は MDA-MB-453 細胞に蓄積したが、正常乳腺細胞には蓄積しないことが明らかとなった。次に、MDA-MB-453 細胞同所移植モデルマウスの腫瘍に対する HL/ICG の蓄積を観察したところ、HL/ICG を投与したマウスの腫瘍において 24 時間後に ICG の強い蛍光が観察された。摘出した乳腺組織でも ICG の強い蛍光が観察されたことから、HL/ICG の乳がんに対する選択的な蓄積が明らかになった。

以上の結果から、HL は RES 回避可能な膜直径を 1 ヶ月以上維持する優れた膜物性を有しており、大腸がん(WiDr, HCT116)細胞や乳がん(MDA-MB-453)細胞に対してアポトーシスを誘導することで抗腫瘍効果を示した。また、大腸がん皮下および同所移植モデルマウスや乳がん同所移植モデルマウスに対して、局所投与や静脈投与によるアポトーシスを伴う顕著な治療効果を示した。また、HL/ICG は大腸がん細胞や乳がん細胞には蓄積するが、正常細胞には蓄積しないという高い腫瘍選択性を有していることが明らかとなった。さらに、大腸がん皮下および同所移植モデルマウスや乳がん同所移植モデルマウスの腫瘍に対して、蓄積することが明らかになった。

このように、HL の大腸がん、乳がんの原発腫瘍に対する治療効果や HL/ICG のがん検出能が明らかになったことは有意義な研究成果だと言える。今後の展望としては、HL/ICG を用いたがん治療効果を検討し、セラノスティクス薬剤としての可能性を評価していくことが考えられる。HL/ICG は光温熱療法(PTT)や光線力学的療法(PDT)への応用が期待できるため、HL が持つ治療効果に加えて、PTT/PDT による治療が行えるという画期的な薬剤となる可能性は十分にある (Fig. 6-1)。さらに、二光子励起顕微鏡や *in vivo* イメージングシステムを用いて高解像度に腫瘍内局在を観察することで HL の治療メカニズムの解明や腫瘍への選択的な蓄積を利用したリキッドバイオプシーへの応用が考えられる。本

論文が HL をセラノスティクス製剤へ応用するための端緒となり、今後の研究において多くの知見を蓄積し、がんと闘う人々の一助になることを切に願う。

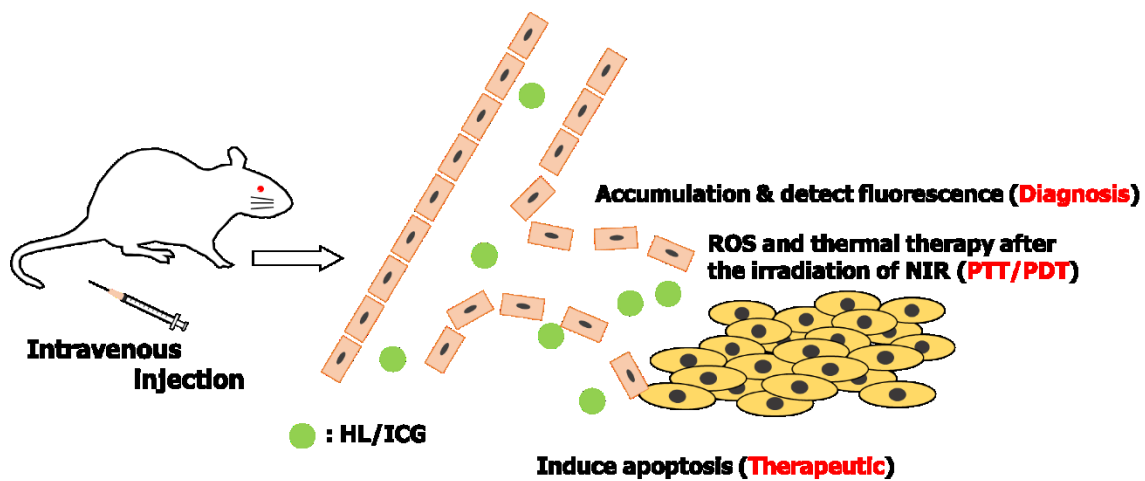


Fig. 6-1 Schematic representation of HL/ICG as theranostic agents.

参考文献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部, 「人口動態統計」 (2017).
- 2) 矢沢サイエンスオフィス, 「最新 もっともくわしいガンの本」 学研 (2005).
- 3) D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, L. Norton, *N. Engl. J. Med.*, **344**, 783 (2001).
- 4) JG. Paez, PA. Jänne, JC. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, FJ. Kaye, N. Lindeman, TJ. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, MJ. Eck, WR. Sellers, BE. Johnson, M. Meyerson., *Science*, **304**, 1497 (2004).
- 5) W. D. Roock, DJ. Jonker, F. D. Nicolantonio, A. Sarto-Bianchi, D. Tu, S. Siena, S. Lamba, S. Arena, M. Frattini, H. Piessevaux, E. V. Cutsem, CJ. O'Callaghan, S. Khambata-Ford, JR. Zalcberg, J. Simes, CS. Karapetis, A. Bardelli, S. Tejpar, *JAMA*, **304**, 1812 (2010).
- 6) B. J. Druker, C. L. Sawyers, H. Kantarjian, D. J. Resta, S. F. Reese, J. M. Ford, R. Capdeville, M. Talpaz, *N. Engl. J. Med.*, **344**, 1038 (2001).
- 7) 木下文雄, 慶應医学, **32**, 379 (1955).
- 8) D. Antoine, M. Evelien, J. Hilde, V. V. Greetje, S. Tim, D. V. Pol, H. Uwe, L. Liesbet, *Int. J. Nanomedicine.*, **11**, 3703 (2016).
- 9) F. M. Andrew, Y. Hsiangkuo, Vo-D. Tuan, *Langmuir*, **27**, 12186 (2011).
- 10) N. Kato, M. Takahashi, T. Tsuji, S. Ihara, M. Brautigam, T. Miyazawa., *Invest Radiol.*, **34**, 551 (1999).
- 11) AA. Ali, FT. Hsu, CL. Hsieh, CY. Shiau, CH. Chiang, ZH. Wei, CY. Chen, HS. Huang, *Sci. Rep.*, **6**, 36650 (2016).
- 12) TL. Kalber, KL. Ordidge, P. Southern, MR. Loebinger, PG. Kyrattos, QA. Pankhurst, MF. Lythgoe, SM. Janes, *Int. J. Nanomedicine*, **11**, 1973 (2016).
- 13) I. Diamond, S. G. Granelli, A. F. McDonagh, S. Nielsen, C. B. Wilson, R. Jaenicke, *The Lancet*, **300**, 1175 (1972).
- 14) W. R. Chen, R. L. Adams, A.K. Higgins, K. E. Bartels, R. E. Nordquist, *Cancer Lett.*, **98**, 169 (1996).
- 15) M. Triesscheijn, P. Baas, J. H. M. Schellens, F. A. Stewart, *The Oncologist*, **11**, 1034 (2006).
- 16) T. Yano, M. Muto, K. Minashi, A. Ohtsu, S. Yoshida, *Gastrointest Endosc.*, **62**, 31 (2005).
- 17) T. Yano, M. Muto, K. Minashi, M. Onozawa, K. Nihei, S. Ishikura, K. Kaneko, A. Ohtsu, *Endoscopy.*, **43**, 657 (2011).

- 18) T. Yano, M. Muto, K. Minashi, J. Iwasaki, T. Kojima, N. Fuse, T. Doi, K. Kaneko, A. Ohtsu, *Int. J. Cancer.*, **131**, 1228 (2012).
- 19) Y. Muragaki, J. Akimoto, T. Maruyama, H. Iseki, S. Ikuta, M. Nitta, K. Maebayashi, T. Saito, Y. Okada, S. Kaneko, A. Matsumura, T. Kuroiwa, K. Karasawa, Y. Nakazato, T. Kayama, *J. Neurosurg.*, **119**, 845 (2013).
- 20) K. Saito, N. Mikuniya, K. Aizawa, *Jpn. J. Cancer Res.*, **91**, 560 (2000).
- 21) M. Mitsunaga, M. Ogawa, N. Kosaka, LT. Rosenblum, PL. Choyke, H. Kobayashi, *Nat. Med.*, **17**, 1685 (2011).
- 22) M. Ogawa, Y. Tomita, Y. Nakamura, M. J. Lee, S. Lee, S. Tomita, T. Nagaya, K. Sato, T. Yamauchi, H. Iwai, A. Kumar, T. Haystead, H. Shroff, P. L. Choyke, J. B. Trepel, H. Kobayashi, *Oncotarget*, **8**, 10425 (2017).
- 23) S. Yoneya, T. Saito, Y. Komatsu, I. Koyama, K. Takabashi, J. D. Young, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**, 1286 (1998).
- 24) 小暮広行, 渋谷崇男, 窪田健二, *日本バイオレオロジー学会誌*, **18**, 163 (2004).
- 25) John C. Kraft, Rodney J. Y. Ho, *Biochemistry*, **53**, 1275 (2014).
- 26) T. Guan, W. Shang, H. Li, X. Yang, C. Fang, J. Tian, K. Wang, *Bioconjug. Chem.*, **28**, 1221 (2017).
- 27) D. Hu, C. Liu, L. Song, H. Cui, G. Gao, P. Liu, Z. Sheng, L. Cai, *Nanoscale*, **8**, 17150 (2016).
- 28) C. Shirata, J. Kaneko, Y. Inagaki, T. Kokudo, M. Sato, S. Kiritani, N. Akamatsu, J. Arita, Y. Sakamoto, K. Hasegawa, N. Kokudo, *Sci. Rep.*, **7**, 13958-1 (2017).
- 29) R. Ueoka, R. A. Moss, S. Swarup, Y. Matsumoto, G. Strauss, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185 (1985).
- 30) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R. A. Moss, S. Swarup, A. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988).
- 31) Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **55**, 5797 (1990).
- 32) R. Ueoka, H. Dozono, Y. Matsumoto, M. Cho, K. Kitahara, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 219 (1990).
- 33) R. Ueoka, E. Yamada, O. Yamashita, Y. Matsumoto, Y. Kato, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6597 (1991).
- 34) K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **60**, 3342 (1995).
- 35) 松本陽子, 上岡龍一, *日化*, **1983**, 901 (1987).
- 36) R. Ueoka, Y. Matsumoto, T. Nagamatsu, S. Hirohata, *Chem. Lett.*, **13**, 583 (1984).
- 37) R. Ueoka, Y. Matsumoto, T. Yoshino, N. Watanabe, K. Omura, Y. Murakami, *Chem. Lett.*, **15**, 1743 (1986).
- 38) 上岡龍一, 吉野公繁, 松本陽子, *日化*, **1987**, 378 (1987).

- 39) R. Ueoka, Y. Matsumoto, N. Takemiya, Y. Ihara, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2263 (1989).
- 40) R. Ueoka, M. Cho, Y. Matsumoto, K. Goto, K. Harada, A. Sugii, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5355 (1990).
- 41) R. Ueoka, S. Mori, R. A. Moss, *Langmuir*, **10**, 2892 (1994).
- 42) K. Goto, C. Imamura, S. Yamamoto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2081 (1994).
- 43) C. Imamura, A. Kannno, C. Mitsuoka, S. Kitajima, H. Inoue, M. Iwahara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *薬学雑誌*, **116**, 962 (1996).
- 44) O. Tanoue, M. Baba, Y. Tokumura, K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2129 (1999).
- 45) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Oyama, H. Takekura, M. Iio, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4640 (1988).
- 46) Y. Matsumoto, E. Yamada, J. Hitano, M. Iwahara, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 213 (1993).
- 47) I. Kitamura, M. Kochi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, J. Kuratsu, Y. Ushio, *Cancer Res.*, **56**, 3986 (1996).
- 48) M. Yukihiro, K. Ito, O. Tanoue, K. Goto, T. Matsushita, Y. Matsumoto, M. Masuda, S. Kimura, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 712 (2011).
- 49) R. Ueoka, Y. Matsumoto, *Bio Industry*, **10**, 221 (1993).
- 50) Y. Matsumoto, C. Imamura, T. Ito, C. Taniguchi, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1456 (1996).
- 51) Y. Matsumoto, T. Kato, S. Iseki, H. Sugii, K. Nakano, M. Iwahara, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1937 (1999).
- 52) 松本陽子, 加藤俊博, 井関伸至, 鈴木仁士, 中野浩司, 上岡龍一, *薬学雑誌*, **119**, 280 (1999).
- 53) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 380 (2006).
- 54) H. Nagami, K. Nakano, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 782 (2006).
- 55) T. Towata, Y. Komizu, S. Suzu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, S. Okada, *Leuk. Res.*, **34**, 906 (2010).
- 56) T. Towata, Y. Komizu, S. Suzu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, S. Okada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 445 (2010).
- 57) T. Towata, Y. Komizu, R. Kiriya, S. Suzu, Y. Matsumoto, N. Kobayashi, C. Wongkham, S. Wongkham, R. Ueoka, S. Okada, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 3680 (2010).
- 58) Y. Komizu, H. Ueoka, K. Goto, R. Ueoka, *Int. J. Nanomed.*, **6**, 1913 (2011).

- 59) H. Kitajima, Y. Komizu, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 1784 (2012).
- 60) Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biorg. Chem. Lett.*, **16**, 6131 (2006).
- 61) C. Imamura, Y. Kemura, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 1119 (1997).
- 62) Y. Matsumoto, T. Kato, Y. Kemura, M. Tsuchiya, M. Yamamoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **28**, 53 (1999).
- 63) Y. Iwamoto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **292**, 231 (2005).
- 64) Y. Matsumoto, Y. Iwamoto, T. Matsushita, R. Ueoka, *Int J. Cancer.*, **115**, 337 (2005).
- 65) Y. Komizu, S. Nakata, K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *ACS med. Chem. Lett.*, **2**, 275 (2011).
- 66) K. Nakano, Y. Iwamoto, W. Tanaka, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3251 (2002).
- 67) Y. Komizu, S. Nakata, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **39**, 1291 (2010).
- 68) Y. Komizu, H. Ueoka, R. Ueoka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **418**, 81 (2012).
- 69) A. Kanno, K. Tsuzaki, M. Miyagi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1013 (1999).
- 70) A. Kanno, K. Tsuzaki, M. Miyagi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Drug Delivery System*, **14**, 37 (1999).
- 71) R. Ueoka, Y. Matsumoto, A. Kanno, K. Tsuzaki, H. Ichihara, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1262 (2000).
- 72) 根岸由香, 吉沢譲治, 山崎洋次, 松本陽子, 上岡龍一, *日本小児外科学会雑誌*, **41**, 930 (2005).
- 73) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **315**, 167 (2006).
- 74) H. Ichihara, H. Nagami, K. Yamamoto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *薬学雑誌*, **123**, 25 (2003).
- 75) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Ichihara, T. Kiyokawa, *Am. Chem. Soc. Books*, **830**, 177 (2002).
- 76) H. Ichihara, H. Nagami, T. Kiyokawa, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2008).
- 77) S. Shimoda, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **372**, 162 (2009).
- 78) S. Shimoda, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **38**, 134 (2009).
- 79) H. Ichihara, K. Funamoto, T. Matsushita, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **394**, 174 (2010).
- 80) H. Ichihara, M. Hino, M. Umebayashi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Euro. J. Med. Chem.*, **57**, 143 (2012).
- 81) J. Yoshizawa, Y. Negishi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, T. Ohki, *Pediatr. Surg. Int.*, **27**, 379 (2011).

- 82) H. Ichihara, J. Ueno, M. Umebayashi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **406**, 173 (2011).
- 83) Y. Komizu, M. Yukihiro, R. Kiriya, K. Goto, S. Okada, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 3962 (2011).
- 84) Y. Komizu, M. Yukihiro, T. Ueoka, H. Ichihara, Y. Matsumoto, S. Okada, R. Ueoka, *Nano Bulletin*, **1**, 120105 (2012).
- 85) H. Kitajima, Y. Komizu, H. Ichihara, K. Goto, R. Ueoka, *Cancer Med.*, **2**, 267 (2013).
- 86) A. D. Bangham, M. N. Sandish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965).
- 87) G. Gregoriadis, E. J. Wills, C. P. Swain, A. S. Tavill, *Lancet*, **29**, 1313 (1974).
- 88) R. T. Proffitt, L. E. Williams, C. A. Presant, G. W. Tin, J. A. Uliana, R. C. Gramble, J. D. Bladeschwiler, *Science*, **220**, 502 (1983).
- 89) T. M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann, A. Yau-Young, *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 29 (1991).
- 90) A. L. Kiblanov, K. Maruyama, P. V. Torchilin, L. Huang, *FEBS Lett.*, **268**, 235 (1990).
- 91) G. Blum, G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta*, **1092**, 91 (1990).
- 92) A. A. Gabizon, *Clin. Cancer Res.*, **7**, 223 (2001).
- 93) 高井義美、秋山徹, 「がん細胞の生物学」 東京大学出版会 (2006).
- 94) H. Ichihara; S. Nakagawa, Y. Matsuoka, K. Yoshida; Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **34**, 4701 (2014).
- 95) A. Ono, S. Hattori, R. Kariya, S. Iwanaga, M. Taura, H. Harada, S. Suzu, S. Okada, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, (2011).
- 96) 三井洋司、高木良三郎、市原明、関口守正、松村外志張, 「機能細胞の分離と培養 第3版」, pp.262-266, 丸善株式会社 (1990).
- 97) M. Inaba, S. Sato, T. Yamori, T. Tashiroo, Y. Ohnishi, K. Maruo, Y. Ueyama, T. Tsuruo, *Anticancer Res.*, **12**, 1953 (1992).
- 98) T. Tsuruo, M. Inaba, T. Tashiroo, T. Yamori, Y. Ohnishi, T. Ashizawa, T. Sakai, S. Kobayashi, K. Gomi, *Anti-Cancer Drugs*, **5**, 634 (1994).
- 99) M. Banciu, J. M. Metselaar, R. M. Schiffelers, G. Storm, *Neoplasia*, **10**, 108 (2008).
- 100) 日本乳癌学会, 「患者さんのための乳癌診療ガイドライン 2016年版」

謝辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、終始御懇切な御指導ならびに御鞭撻を賜りました松本陽子教授に深く感謝致します。

また、実験の遂行や学位論文のまとめに関して丁寧な御指導ならびに御鞭撻を賜りました市原英明教授に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、松下琢教授には貴重な御教示ならびに御助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、三枝敬明教授には貴重なご意見を賜りました。ここに深く御礼申し上げます。

本研究を行う上で貴重な御助言を頂きました後藤浩一教授、古水雄志准教授に心より感謝申し上げます。

さらに、大学院セミナー等を通じて、本学応用生命科学専攻の諸先生方には多大な御教示と御助言を頂きましたことを謹んで御礼申し上げます。

また、優れた研究成果を残していかれた諸先輩方をはじめ、苦楽を共にしてきた桑原啓司博士研究員ならびに本学医用生体工学講座の学生諸氏、特に実験面で協力して頂いた稲村恒亮氏、桑野将好氏、元村宗誠氏、菊本ありささん、吉村かず江さん、仲谷翔耶氏、小嶋千晴さん、辻村健太氏、江村愛美さん、吉田光さん、園田真由莉さん、糸山愛菜さん、黒田昂陽氏、緒方里佳さん、山崎瞳さん、川畑和也氏に深く感謝申し上げます。

最後に勉学の機会と多大なる経済的支援を与えてくれた家族に心より感謝の意を表します。