

カルボン酸修飾に基づく骨ターゲティング型
DDS 開発とパクリタキセルによる
骨転移治療への展開

2017

博士学位論文

山下 修吾

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、論文の転載については出版社より許可を得ている。

- 1) Shugo Yamashita, Hidemasa Katsumi, Nozomi Hibino, Yugo Isobe, Yumiko Yagi, Kosuke Kusamori, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. Development of PEGylated carboxylic acid-modified polyamidoamine dendrimers as bone-targeting carriers for the treatment of bone diseases. *J. Control. Release*, **2017**, 262, 10-17. [第 1 章]

- 2) Shugo Yamashita, Hidemasa Katsumi, Nozomi Hibino, Yugo Isobe, Yumiko Yagi, Yuka Tanaka, Saki Yamada, Chihiro Naito, Akira Yamamoto. Development of PEGylated aspartic acid-modified liposome as a bone-targeting carrier for the delivery of paclitaxel and treatment of bone metastasis. *Biomaterials*, **2018**, 154, 74-85. [第 2 章]

目次

略語一覧	4
序論	6
本論	
第 1 章 カルボン酸修飾を利用した骨標的化樹状高分子の開発	
1-1 緒言	8
1-2 結果	
1-2-1 カルボン酸修飾 dendrimer の合成	
1-a MALDI-TOF MS を用いたカルボン酸修飾 dendrimer の分子量測定	9
1-b カルボン酸修飾 dendrimer の物理化学的特性	10
1-2-2 カルボン酸修飾 dendrimer の骨親和性評価	
2-a ヒドロキシアパタイトへの親和性評価	11
2-b カルシウムイオンに対するキレート結合能評価	12
1-2-3 カルボン酸修飾 dendrimer の体内動態	
3-a 骨移行性に及ぼすカルボン酸及び及びポリエチレングリコール修飾の影響	14
3-b マウス静脈内投与後の血中濃度及び臓器分布の時間的推移の評価	15
3-c 体内動態パラメータ解析	16
1-2-4 アスパラギン酸修飾 dendrimer の骨内分布	
4-a <i>In situ</i> 蛍光イメージングシステムによる臓器分布の観察	17
4-b 共焦点レーザー顕微鏡による骨内分布の観察	18
1-3 考察	19
第 2 章 アスパラギン酸修飾に基づく骨標的化リポソームの開発	
2-1 緒言	22
2-2 結果	
2-2-1 アスパラギン酸修飾リポソームの物理化学的特性	
1-a MALDI-TOF MS を用いた DPPE-Asp の分子量測定	23
1-b アスパラギン酸修飾リポソームの粒度分布と表面電荷	24
2-2-2 アスパラギン酸修飾リポソームの体内動態	
2-a ヒドロキシアパタイトへの親和性に対する DPPE-Asp 及び DSPE-PEG の影響	25
2-b 骨移行性に及ぼす DPPE-Asp 及び DSPE-PEG の影響	26
2-c アスパラギン酸修飾リポソームの体内動態パラメータ解析	29
2-2-3 アスパラギン酸修飾リポソームの骨内分布	
3-a 近赤外蛍光を利用した臓器分布イメージング	28
3-b 骨基質・骨髄質移行性評価	29
3-c アスパラギン酸修飾リポソームの骨内挙動の観察	30
2-2-4 アスパラギン酸修飾リポソームを利用した骨へのパクリタキセル送達	

4-a PEG-Asp-Lipo (PTX) の粒度分布	31
4-b PEG-Asp-Lipo (PTX)の顕微鏡画像	32
4-c PEG-Asp-Lipo (PTX) の体内動態	34
4-d PEG-Asp-Lipo (PTX) の体内動態学的パラメータ	35
2-2-5 骨転移モデルマウスにおけるパクリタキセル封入アスパラギン酸修飾リポソームの 骨転移抑制効果	
5-a 骨転移初期に対する影響	36
5-b 骨転移後期に対する影	36
5-c 破骨細胞に対するアポトーシス誘導	38
2-3 考察	39
結論	42
実験の部	43
謝辞	54
参考文献	55

略語一覽

Aco	<i>cis</i> -Aconitic acid
AFM	Atomic force microscope
Asp	Aspartic acid
AUC	Area under the blood concentration vs. time curve
Boc-Asp(OtBu)-OH	N- α -(<i>t</i> -Butoxycarbonyl)-L-aspartic acid β - <i>t</i> -butyl ester
Boc-Glu(OtBu)-OH	N- α -(<i>t</i> -Butoxycarbonyl)-L-glutamic acid γ - <i>t</i> -butyl ester
BP	Bisphosphonate
CL _{bone}	Bone uptake clearance
CL _{kidney}	Renal uptake clearance
CL _{liver}	Hepatic uptake clearance
CL _{total}	Total uptake clearance
DiR	DiIC18(7) [1, 1'-Dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide]
Glu	Glutamic acid
DPPE-Asp	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine aspartate
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DSPE-PEG	N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DMF	N,N-dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fluorescein DHPE	N-(Fluorescein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt
HAP	Hydroxyapatite
HBTU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3 oxide hexafluorophosphate
HOBt	Anhydrous 1-hydroxybenzotriazole
IL	Interleukin
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser-desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
PAMAM	Polyamidoamine dendrimer with an ethylenediamine core
PBS	Phosphate-buffered saline
PEG	Polyethylene glycol
PEG-NHS	α -Succinimidylsuccinyl- ω -methoxy, polyethylene
PDI	Polydispersity index

PFA	Paraformaldehyde
PI	Propidium iodide
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein-C
PTX	Paclitaxel
QOL	Quality of life
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
Suc	Succinic acid
TEA	Triethylamine
TEM	Transmission electron microscope
TFA	Trifluoroacetic acid
XO	Xylenol orange tetrasodium salt

序 論

近年 nivolumab (Opdivo®) に代表されるヒト型 PD-1 モノクローナル抗体や [1, 2]、tisagenlecleucel (Kymriah®) に代表されるキメラ抗原受容体発現 T 細胞療法の開発に伴い [3, 4]、悪性疾患の生命予後の大幅な改善が期待されるなか、転移病変は、未だ生命予後や quality of life (QOL) を悪化させる最大の要因と言える。中でも、骨転移は肺がん [5]、乳がん [6]、前立腺がん [7] で頻発するだけでなく、腎がん [8]、黒色腫 [9]、小児性神経芽細胞腫 [10] でしばしば転移を誘発し、対応困難な骨痛による QOL の著しい低下に加え、病的骨折、脊髄麻痺など日常生活動作障害の強い骨関連事象を併発するため、二次性に死亡率を高める原因となっていることから、骨転移は進行性がん患者にとって最大の脅威の一つとなっている [11, 12]。加えて、近年の抗がん療法の進歩によるがん患者の生存期間の延長並びにがん患者数の増加に伴い、骨転移は増加の一途を辿ると見込まれ、がんに伴う骨転移の発生機序の解明ならびに予防、治療法の開発は重要な課題となっている。

骨転移は溶骨性、造骨性、溶骨性と造骨性が混在した混合型、及び骨病変を伴わない骨梁間型の 4 種類のタイプに分類される [13]。そのうち乳がん、腎がん、黒色腫は溶骨性及び混合型骨転移を呈し、前述したような骨関連事象を引き起こす悪性度の強い転移性病変を示す。

溶骨性の転移がんにおいては、転移がん細胞と骨芽細胞、破骨細胞間における細胞間コミュニケーションが転移発症の重要なメカニズムであることが知られている [14]。すなわち、がん細胞は間葉上皮移行を経て骨髄に侵入し、骨芽細胞が産生するインテグリン $\alpha v \beta 3$ などの細胞接着因子を介して骨基質であるハイドロキシアパタイト (HAP) に定着する [15]。定着したがん細胞は、破骨細胞が産生するトランスフォーミング増殖成長因子 β (TGF- β) により、副甲状腺ホルモン関連たんぱく質 (PTHrP) やプロスタグランジン E2、インターロイキン (IL)-6、IL-8 及び IL-11 の産生を促進させる。産生された PTHrP などの成長因子は骨芽細胞に作用し、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) の産生を促進し、破骨細胞分化を加速させることで、過剰な骨吸収を誘発し、病的骨折や高カルシウム血症を惹起するだけでなく、HAP に蓄えられている種々の増殖因子を遊離させ、がん細胞の増殖が刺激される悪循環が形成される [16-24]。

従来の骨転移療法は、骨に転移したがん細胞の脊髄圧迫による痛み及び麻痺の緩和を目的とした放射線療法、外科的治療、鎮痛薬の投与などとともに、前述したような骨組織関連細胞とがん細胞の悪循環の是正を目的としたホルモン療法 [25, 26]、ならびにビスホスホネート (BP) やヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体 denosumab に代表される骨の環境を修飾する骨修飾薬が利用されている [27]。しかし、骨修飾薬の単独投与により骨転移の根治に至ることは稀であり、多発性の骨転移が認められるなどの生命危機的状況下では、抗がん剤による化学療法が開始される [28]。しかし、骨は他臓器と比較して血流量が乏しく、血液-骨髄関門により血管腔側から骨基質側への物質の移動が制限されているなど、薬物が移行しにくい組織構造を有するため、抗がん剤の骨移行性は不十分であり、骨転移の進行そのものを抑制

する方法は皆無であった [29, 30]。したがって、骨へ抗がん剤などの薬物を効率的に送達可能なデリバリーシステムの構築による新規治療法の開発が切望される。

その方法の一つとして、骨ターゲティング素子の利用が挙げられる。骨粗鬆症治療薬の **Bisphosphonate (BP)** や、テトラサイクリンに代表されるテトラサイクリン系抗菌薬は **HAP** に対する親和性が高く、これら薬物を高分子ポリマーや微粒子製剤に修飾することで、骨へ薬物を効率よく送達する試みが行われてきた [31-33]。しかしながら、これら薬物の骨ターゲティング素子としての利用は、治療薬物やキャリアの骨移行率の向上に寄与しているものの、薬物やキャリアの骨取り込みクリアランスだけでなく、血中で凝集塊を形成することによる肝臓、腎臓などの標的部位以外の取り込みクリアランスも促進するなど、骨選択性に課題が残る。加えて、腎障害や顎骨壊死症、色素沈着、小児成長阻害といった薬物本来が有する副作用を惹起する恐れがあるため、安全性に対しても留意しなければならず、骨選択性と安全性を兼ね備えた新規骨ターゲティングシステムの開発が重要な課題となっている。

一方、生体内にはオステオカルシン [34] やオステオポンチン [35]、**Dentin Matrix acidic phosphoprotein 1 [36]** などの骨親和性の高い天然タンパク質がいくつか存在しており、これらタンパク質のアミノ酸組成は、酸性アミノ酸である **L-アスパラギン酸 (Asp)** や **L-グルタミン酸 (Glu)** 及び γ -カルボキシグルタミン酸の占める割合が高く、酸性アミノ酸の連続モチーフをタンパク質構造中に有しており、それらの特異的な構造が **HAP** への親和性に寄与していることが報告されている [37, 38]。このような生体由来の酸性アミノ酸及びカルボン酸は安全性に優れることから、カルボン酸修飾の利用は骨選択性が高く、安全性の高い骨ターゲティングシステムへの応用が期待できる。しかし、カルボン酸修飾の骨ターゲティングシステムへの利用に関する研究は各論的であり、薬物動態学的解析を基盤とした分子設計の最適化が不十分である [39-41]。加えて、骨選択性の高いターゲティングシステムを開発する上で、カルボン酸の分子構造と骨親和性、生体内における骨移行性の関連を解明することが不可欠である。

そこで筆者は、効率的に抗がん剤を骨へ送達可能なドラッグデリバリーシステムの構築による骨転移治療の開発を目指して、樹状高分子である **polyamidoamine dendrimer (PAMAM)** に酸性アミノ酸を含む種々のカルボン酸修飾を施し、各種カルボン酸修飾体の負電荷の強度、**HAP** への親和性及びカルシウムイオンとのキレート能の相関性を評価した。次に体内動態の観点から最適な骨ターゲティング素子を系統的に評価するとともに、カルボン酸修飾体の詳細な骨内分布に関する情報を得た。さらに得られた情報を基盤にして、カルボン酸修飾を利用した、抗がん剤の骨ターゲティング型薬物キャリアの製剤設計・開発を行い、骨転移部悪性黒色腫に対する骨転移抑制効果を評価した。

以下、これらの結果について 2 章にわたり論述する。

本論

第 1 章 カルボン酸修飾を利用した骨標的化樹状高分子の開発

1-1 緒言

骨格系は体を支持する重要な構造体であると共に、ミネラル代謝器官及び免疫系細胞の分化増殖の場となる造血器官として機能的に生命基盤を支えている[42]。しかし近年の急速な人口高齢化に伴い、骨粗鬆症に代表される多様な骨代謝異常疾患患者数は増加の一途を辿ることから、骨へ薬物を効率よく送達するための様々な方法論が検討されてきた。例えば薬物または薬物キャリアへの BP 修飾は、BP の高い骨親和性を利用することで、速やかに骨へ薬物を送達可能である [31-33]。しかしながら、BP 修飾は骨以外の臓器、特に肝臓や腎臓といった他臓器への集積も同時に増大させることが明らかとなっており、骨選択性に課題が残る [31]。ほかにも骨親和性の高いタンパク質の構造的特徴を活用した酸性アミノ酸ポリペプチドを骨ターゲティング素子として活用する方法が試みられ、*in vitro* 実験系における本ポリペプチドの高い骨親和性が多数報告されている [39-41]。しかしながら、骨は血流量が乏しく、血液-骨髄関門により物質移動が制限されているなど、薬物が移行しにくい構造的特徴を有しており、これが効率的な骨ターゲティングの大きな障壁となっている。また、*in vivo* 実験系を用いた系統的な骨ターゲティング素子の評価は未だ報告がなく、体内動態を基盤とした薬物キャリアの設計が最適化されていないのが現状である。したがって、効率的な骨ターゲティングシステムの構築には、これら障壁を考慮した体内動態に基づく合理的な骨ターゲティング型薬物キャリアの製剤設計が必要である。また、カルボン酸の分子構造と骨親和性、生体内での骨移行性の関連は不明であることから、エビデンスに基づいた骨ターゲティング素子の最適化が必要である。

薬物キャリアを用いて骨ターゲティング素子の機能性及び有用性を、薬物速度論を用いて正確に評価するためには、分子サイズが均一で、化学修飾により生体内での体内動態を制御可能な薬物キャリアを選択するのが望ましい。薬物キャリアである PAMAM はジエチルアミンをコアとする樹状高分子であり、他の人工高分子と異なり天然タンパク質のように分子量が均一で、体内動態制御を目的とした化学修飾が可能な官能基を多数有する [43]。そこで筆者は、PAMAM に様々なカルボン酸修飾を施し、骨親和性ならびに体内動態の観点から骨ターゲティング素子を系統的に検討することで、骨ターゲティングにおけるカルボン酸の機能性及び有用性を評価した。すなわち、PAMAM に、カルボン酸である Asp、Glu (いずれも L 体)、コハク酸 (Suc)、アコニット酸 (Aco) を修飾した PAMAM 誘導体を作製し、それら物性、骨の成分である HAP への親和性及びカルシウムイオンとのキレート能、マウスにおける体内動態を評価した。

1-2 結果

1-2-1 カルボン酸修飾 dendriマーの合成

1-a MALDI-TOF MS を用いたカルボン酸修飾 dendriマーの分子量測定

得られたカルボン酸修飾 dendriマーは MALDI-TOF MS で分子量を確認した。各種カルボン酸修飾 dendriマーの末端構造を Fig.1 に示した。カルボン酸修飾 dendriマーの分子量分布は PAMAM と比較して高分子領域にシフトしたことが確認され、そのピーク値はそれぞれ約 10,000 MW を示した。

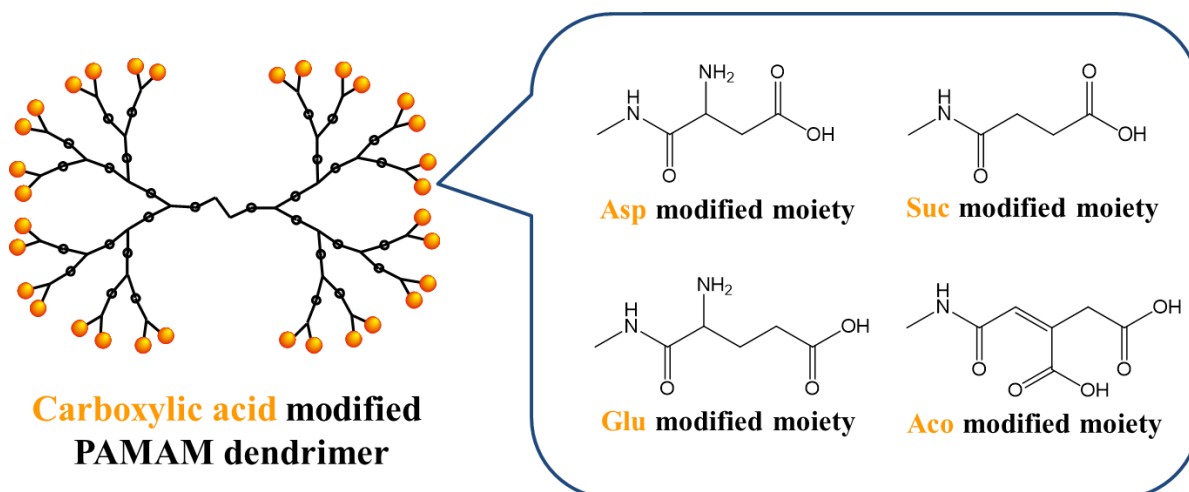


Fig. 1 Structures of carboxylic acid-modified PAMAM dendrimer. Asp: L-Aspartic acid; Glu: L-Glutamic acid; Suc: Succinic acid; Aco: Aconitic acid.

1-b カルボン酸修飾 dendriマーの物理化学的特性

各種カルボン酸修飾 dendriマーの polyethylene glycol (PEG) 修飾率、単位分子あたりのカルボキシ基数、粒子径及び表面電荷を Table 1 に示した。PEG/PAMAM は次節以降に示す PEG の HAP 親和性に対する影響を評価するため 2, 5, 8 mol/mol で作製した。カルボキシ基/PAMAM は Asp 修飾体及び Glu 修飾体で 32 mol/mol、Suc 修飾体で 23 mol/mol から 30 mol/mol、Aco 修飾体で 49 mol/mol から 64 mol/mol を示した。PEG 修飾を施していない各種カルボン酸修飾 dendriマーの粒子径は 36 nm から 86 nm を示した。一方で PEG 修飾を施した各種カルボン酸修飾 dendriマーの粒子径は 8 nm から 18 nm と粒子径の減少が観察された。ほとんどのカルボン酸修飾 dendriマーの表面電荷は -10 mV から -5 mV と中性に近い負電荷を示したが、PEG 未修飾の Suc-PAMAM 及び PEG 未修飾の Aco-PAMAM は カルボン酸修飾 dendriマーのなかで最も強い負電荷を示した。

Table 1 Physicochemical characteristics of carboxylic acid-modified PAMAMs

Dendrimers	Number of PEG ^a (mol/mol)	Number of carboxylic groups ^b	Particle diameter (nm)	Z-potential (mV)
PAMAM	-	-	3.60 ± 0.03	+19.8 ± 1.9
Asp-PAMAM	-	32	38.38 ± 7.19	-5.97 ± 0.53
PEG(2)-Asp-PAMAM	1.95	32	9.53 ± 0.58	-6.44 ± 0.54
PEG(5)-Asp-PAMAM	4.26	32	12.64 ± 2.10	-5.86 ± 1.57
PEG(8)-Asp-PAMAM	7.93	32	18.49 ± 2.83	-5.78 ± 0.44
Glu-PAMAM	-	32	35.52 ± 4.09	-5.98 ± 1.49
PEG(2)-Glu-PAMAM	1.89	32	11.03 ± 2.24	-4.66 ± 0.61
PEG(5)-Glu-PAMAM	4.91	32	12.34 ± 1.35	-7.38 ± 1.05
PEG(8)-Glu-PAMAM	7.44	32	15.06 ± 1.33	-4.91 ± 0.16
Suc-PAMAM	-	32	85.75 ± 19.83	-14.33 ± 1.79
PEG(2)-Suc-PAMAM	1.85	30.15	4.28 ± 0.38	-9.74 ± 0.25
PEG(5)-Suc-PAMAM	4.35	27.65	6.71 ± 0.76	-9.78 ± 1.43
PEG(8)-Suc-PAMAM	8.56	23.44	6.93 ± 0.75	-10.08 ± 1.60
Aco-PAMAM	-	64	40.60 ± 3.30	-15.43 ± 2.42
PEG(2)-Aco-PAMAM	1.37	61.26	6.55 ± 1.37	-10.45 ± 1.72
PEG(5)-Aco-PAMAM	4.41	55.18	8.62 ± 0.46	-10.66 ± 1.51
PEG(8)-Aco-PAMAM	7.31	49.38	11.2 ± 1.68	-10.34 ± 1.20

^a The number of modified PEG was determined using a PEGylated protein ELISA kit that assessed the PEG chain compositions.

^b For PEG-Suc-PAMAM and PEG-Aco-PAMAM, the average number of modified carboxylic groups was estimated by measuring the number of PEG modification. (Yamashita et al., *J. Control. Release*, 2017, 262, 10-17, Table 1)

1-2-2 カルボン酸修飾 dendriマーの骨親和性評価

2-a ヒドロキシアパタイトへの親和性評価

前節で得られた各種カルボン酸修飾 dendriマーの HAP に対する結合率の経時的な変化を Fig. 2 に示した。PEG 未修飾の各種カルボン酸修飾 dendriマーは添加後 120 分の時点で Aco > Suc > Asp > Glu の順に強い親和性を示した。一方で PEG 修飾を施したカルボン酸修飾 dendriマーの HAP 結合率は PEG 修飾率の増大とともに減少することが示された。しかし、PEG 修飾を施した Suc 修飾体 及び Aco 修飾体 は HAP の親和性に対する PEG 修飾の影響が小さく、PEG 化カルボン酸修飾 dendriマーのなかでも PEG-Aco-PAMAM 誘導体が最も高い HAP 親和性を示した。

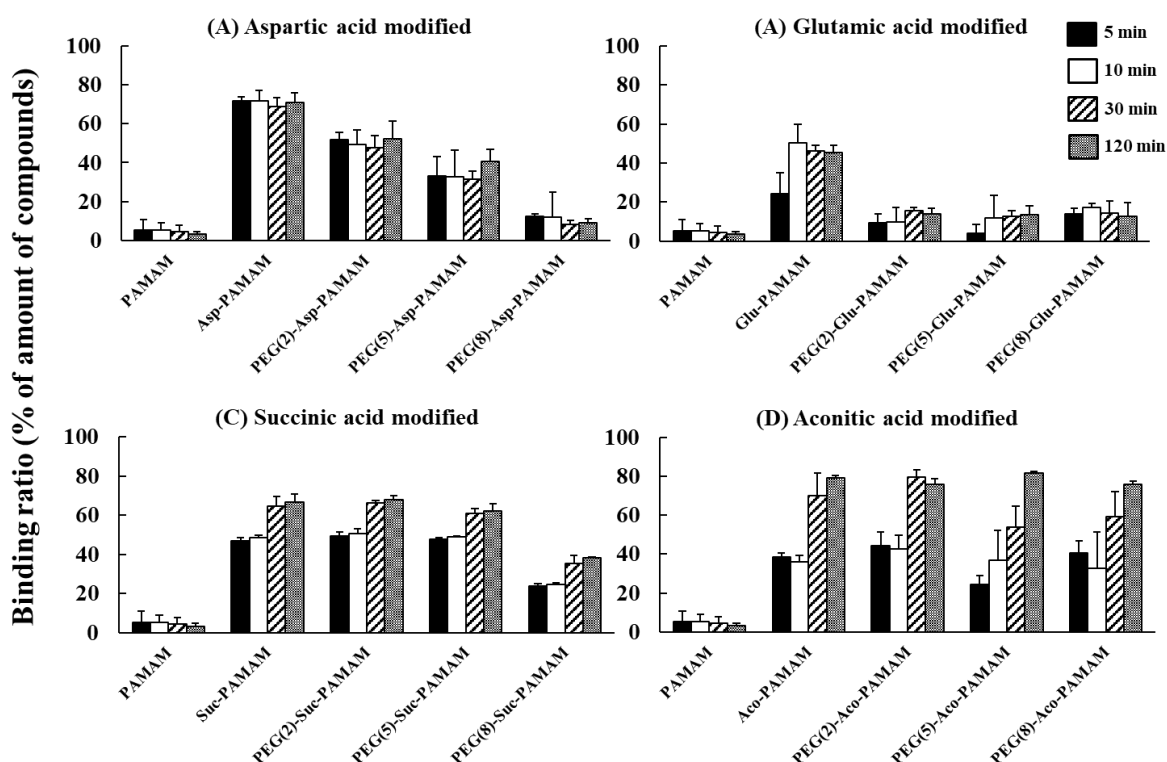


Fig. 2 Affinity of FITC-labeled carboxylic acid-modified PAMAMs to hydroxyapatite. The binding ratios of carboxylic acid-modified PAMAMs to hydroxyapatite were determined by measuring the fluorescence intensities of the supernatants. The results are expressed as means \pm S.D. of three samples. Binding ratio (%) = $100 - ([\text{fluorescence intensity of the supernatant of each sample}] / [\text{fluorescence intensity of the supernatant of each control (without hydroxyapatite)}]) \times 100$. (Yamashita et al., *J. Control. Release*, 2017, 262, 10-17, Fig. 1)

2-b カルシウムイオンに対するキレート結合能評価

HAPはカルシウムイオン、リン酸基、水酸基からなるイオン結晶であり、カルシウムイオンの場合、単位格子中心の水酸基を螺旋状に取り囲む screw axis Ca 及び単位格子を柱状に配置された column Ca の異なるカルシウムイオンサイトが存在し、このうち column Ca が負電荷を有する物質に対する吸着能を担うことが知られている [44]。したがって、カルボン酸修飾 PAMAM の HAP 吸着機構には、PAMAM に修飾したカルボキシ基と HAP の column Ca のキレート形成が関与していると推察される [45]。そこで Fig. 2 で得られたカルボン酸修飾 dendrimer の HAP に対する結合機構を明らかにすることを目的として、各種カルボン酸修飾 dendrimer のカルシウムイオンに対するキレート結合能の時間的推移を Fig. 3 に示した。添加後 120 分の時点で Glu 修飾体は各種カルボン酸修飾 dendrimer の中でも最も低い結合能を示したが、Aco 修飾体、Asp 修飾体及び Suc 修飾体は高いカルシウムイオン結合能を示した。一方で、Aco, Asp, Suc, Glu の単量体は、ほとんどカルシウムイオンに対する結合能を示さなかった。以上のことから、カルボン酸修飾 dendrimer の HAP への親和性にはカルシウムイオンの関与が大きいことが推察された。さらに、カルボン酸修飾 dendrimer の HAP への親和性に及ぼす遊離カルシウムイオンの影響を評価するため、カルシウムイオン共存下におけるカルボン酸修飾 dendrimer の HAP への親和性を検討した (Fig. 4)。1 mM CaCl₂ 及び 20 mM CaCl₂ 共存下における PEG(5)-Asp-PAMAM の HAP 親和性は、CaCl₂ 非存在下における親和性とほぼ同様であったことから、HAP の親和性に溶液中の遊離カルシウムイオンはほとんど影響しないことが示された。

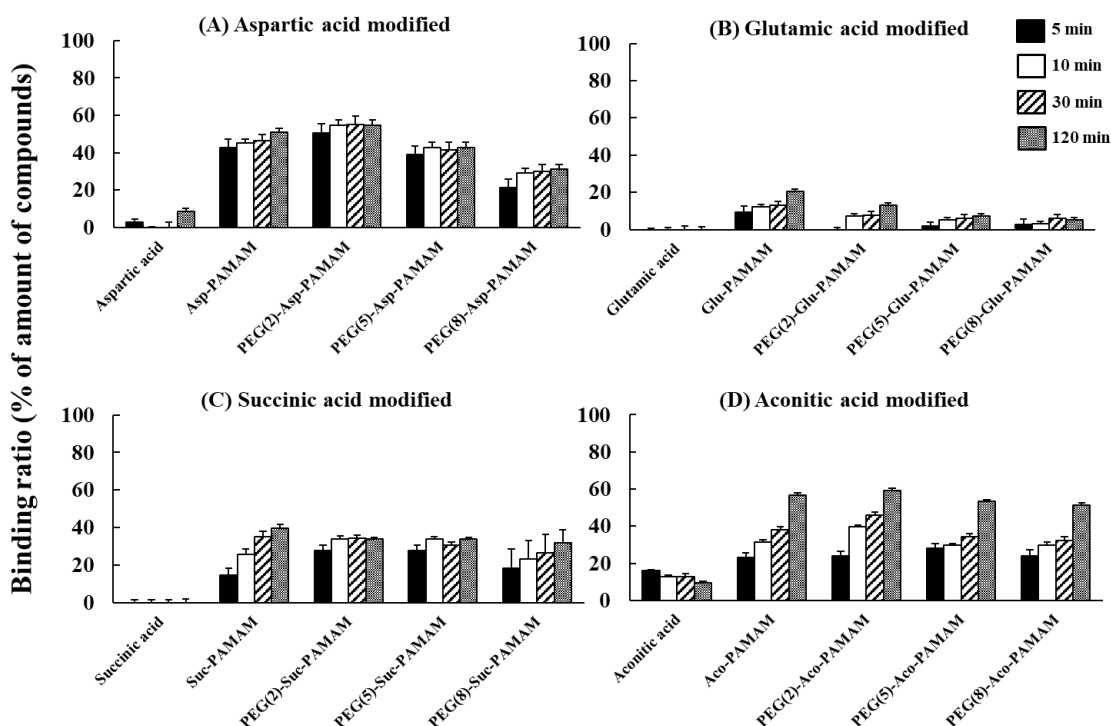


Fig. 3 Chelate binding of carboxylic acid-modified PAMAMs to Ca²⁺. The binding ratios of carboxylic acid-modified PAMAMs to Ca²⁺ were determined by measuring the unbound Ca²⁺ concentrations in the solution. The results are expressed as means ± S.D. of three samples. Binding ratio (%) = 100 –

$([\text{unbound Ca}^{2+} \text{ concentration of each sample}] / [\text{total Ca}^{2+} \text{ concentration of each control}]) \times 100$.
(Yamashita et al., *J. Control. Release*, 2017, 262, 10-17, Fig. 2)

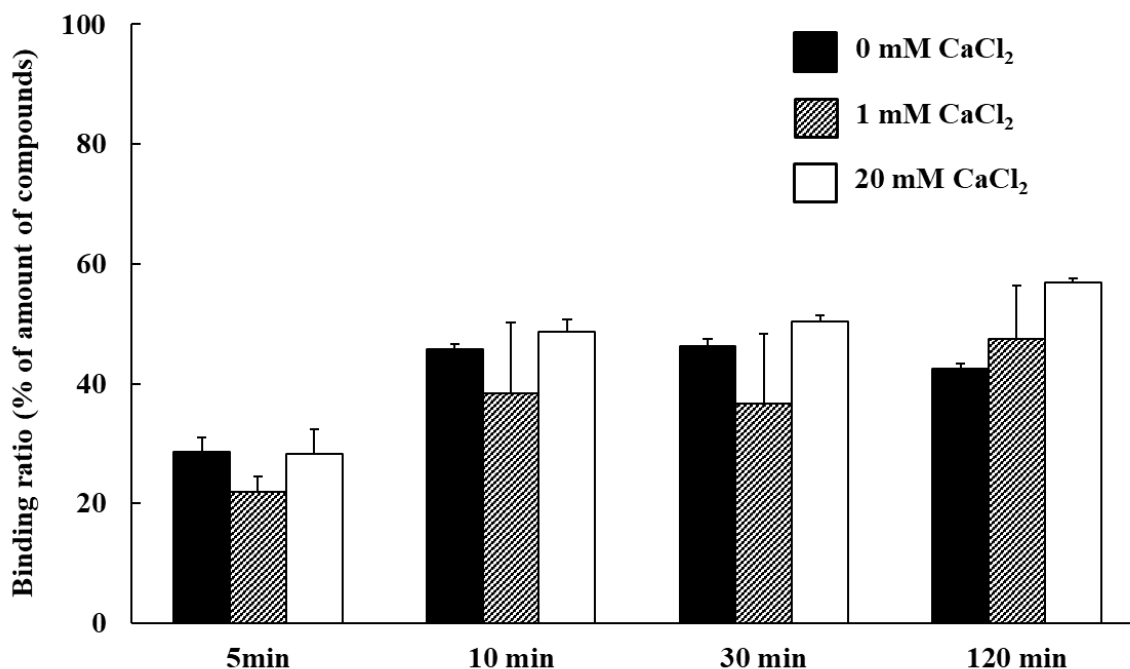


Fig. 4 Affinity of FITC-labeled PEG(5)-Asp-PAMAM to hydroxyapatite in MES buffer containing 1 or 20 mM CaCl₂. The binding ratio of PEG(5)-Asp-PAMAM to hydroxyapatite was determined by measuring the fluorescence intensities of supernatants. Results are expressed as means \pm S.D. of three samples. Binding ratio (%) = $100 - ([\text{fluorescence intensity of the supernatant of each sample}] / [\text{fluorescence intensity of the supernatant of each control (without hydroxyapatite)}]) \times 100$
(Yamashita et al., *J. Control. Release*, 2017, 262, 10-17, Fig. S1)

1-2-3 カルボン酸修飾 dendriマーの体内動態

3-a 骨移行性に及ぼすカルボン酸及び PEG 修飾の影響

前節までにカルボン酸修飾 dendriマーの HAP 親和性及びその結合機構を解明した。そこで、修飾カルボン酸及び PEG の骨移行に対する影響を評価することを目的として、¹¹¹In 標識を施した各種 dendriマーをマウスに尾静脈内投与した 180 分における血漿、骨、肝臓、腎臓への集積率を Fig. 5 に示した。骨移行率は dendriマーの下肢骨移行量からマウス重量の 12% として全身骨量に換算した [46]。HAP への吸着が比較的高かった Aco 修飾体及び Suc 修飾体では肝臓及び腎臓への移行が大きく、骨移行性が低いことが示された。一方で、HAP への吸着が比較的低かった Asp 修飾体の中でも PEG を 5 分子導入した Asp 修飾体が最も高い骨選択性を示した。

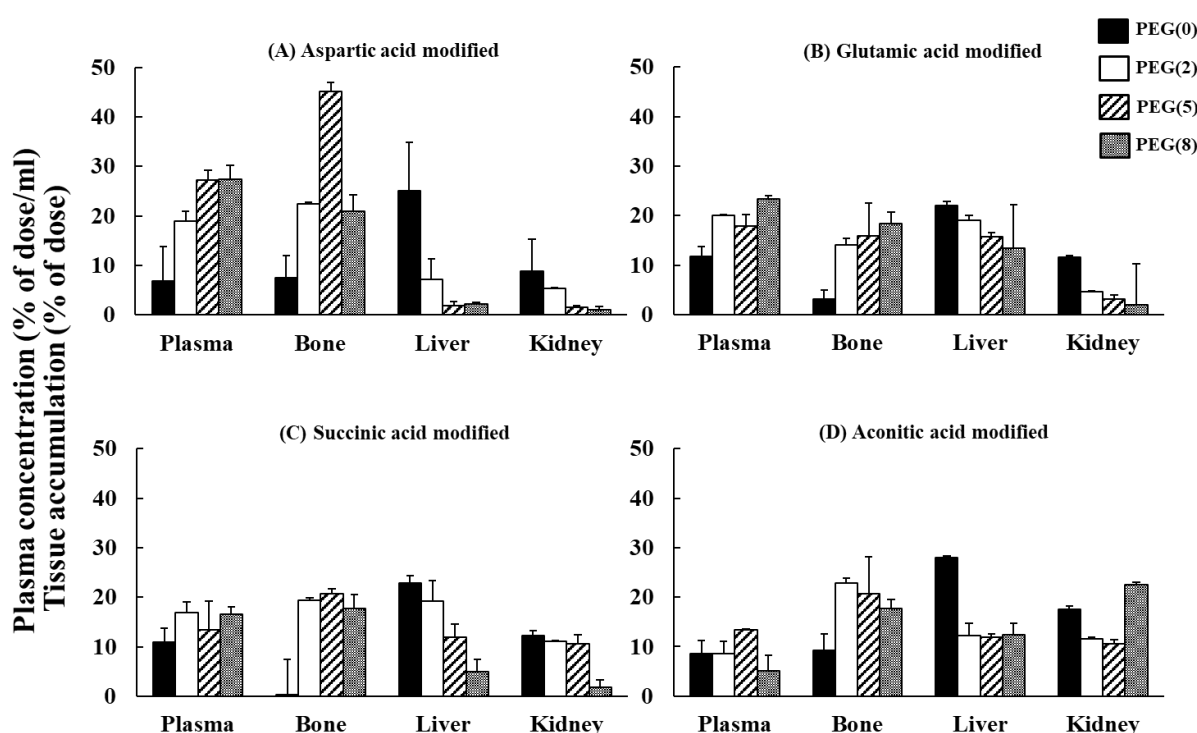


Fig. 5 Effect of degree of PEG modification on the distribution of ¹¹¹In-labeled PAMAM derivatives 180 min after intravenous injection of 1 mg PAMAM/kg in mice. The total wet bone weight was estimated as 12% of body weight, and radioactivity in the bone was based on the activity determined in the tibiae and femurs extrapolated to whole wet bone, as reported previously [46]. The results are expressed as means ± S.D. of three mice.

(Yamashita et al., *J. Control. Release*, 2017, 262, 10-17, Fig. 3)

3-b マウス静脈内投与後の血中濃度及び臓器分布の時間的推移の評価

カルボン酸修飾 dendriマーの PEG 導入量を 5 分子に固定し、各種カルボン酸修飾の体内動態に及ぼす影響を検討した (Fig. 6)。マウス尾静脈内投与後、PEG(5)-Suc-PAMAM、PEG(5)-Aco-PAMAM 及び PEG(5)-Glu-PAMAM は速やかに血中から消失し、肝臓、腎臓へ移行し、それぞれの 180 分の時点における骨移行率は 22.6%、24.5%、15.6% に留まった。一方、PEG(5)-Asp-PAMAM は他の修飾体と比較して高い血中滞留性を示し、また 180 分の時点における骨移行率は 43%を示し、骨に選択的に分布することが明らかとなった。

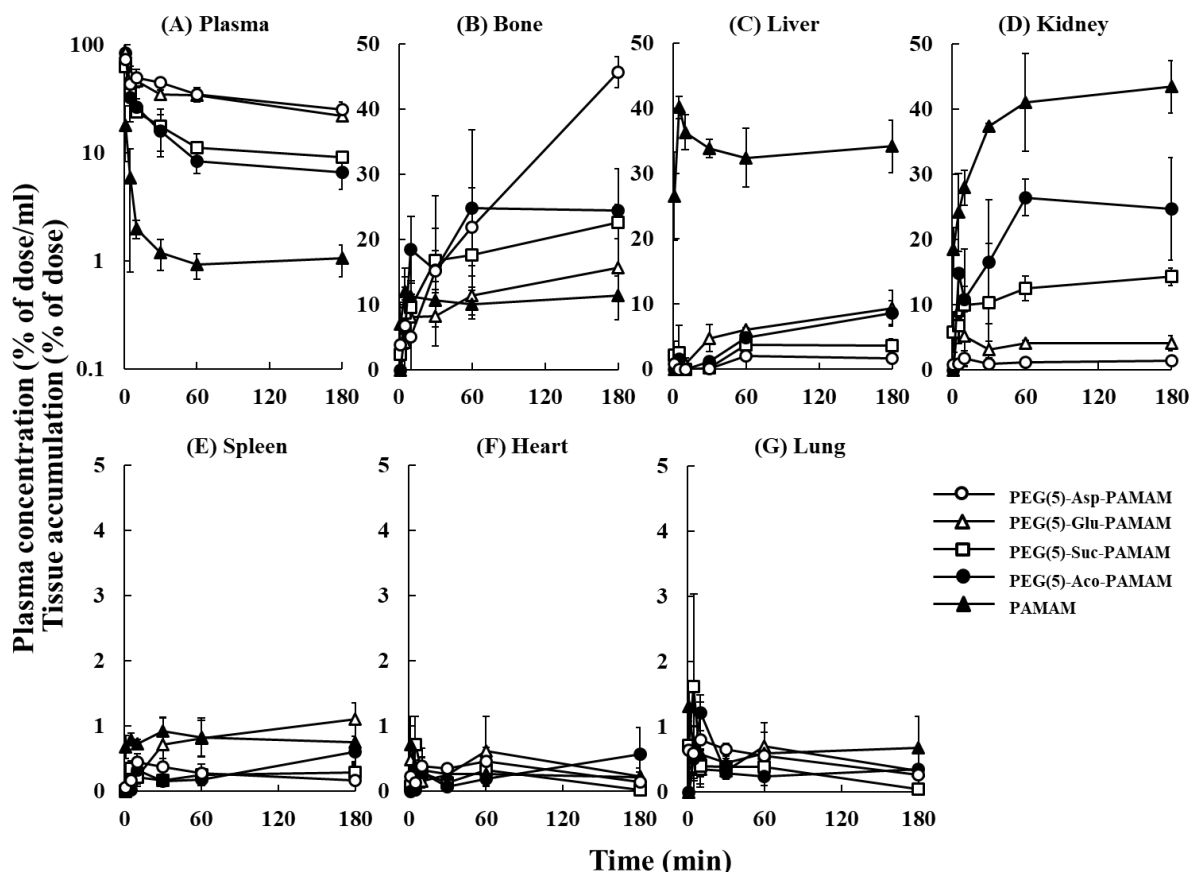


Fig. 6 Plasma concentration and tissue accumulation of ^{111}In -labeled PEGylated carboxylic acid-modified PAMAM after intravenous injection of 1 mg PAMAM/kg in mice. The total wet bone weight was estimated to be 12% of body weight, and radioactivity in the bone was based on the activity determined in the tibiae and femurs extrapolated to the whole wet bone, as reported previously [46]. The results are expressed as means \pm S.D. of three mice; \circ , PEG(5)-Asp-PAMAM; \triangle , PEG(5)-Glu-PAMAM; \square , PEG(5)-Suc-PAMAM; \bullet , PEG(5)-Aco-PAMAM; \blacktriangle , PAMAM. (Yamashita et al., *J. Control. Release*, 2017, 262, 10-17, Fig. 4)

3-c 体内動態パラメータ解析

Fig. 6 で得られた血漿中濃度推移をもとに算出した各種カルボン酸修飾 dendrimer の体内動態パラメータを Table 2 に示した。各種カルボン酸修飾 dendrimer の骨取り込みクリアランス値 (CL_{bone}) は PAMAM G3 と比較して 1.3 倍から 2.7 倍高く、PEG(5)-Aco-PAMAM > PEG(5)-Suc-PAMAM > PEG(5)-Asp-PAMAM > PEG(5)-Glu-PAMAM の順に高い値を示した。一方、PEG(5)-Asp-PAMAM の肝取り込みクリアランス値 (CL_{liver})、腎取り込みクリアランス値 (CL_{kidney}) は最も低い値を示し、また PEG(5)-Asp-PAMAM の全身クリアランス (CL_{total}) に占める CL_{bone} の割合 (骨ターゲティング効率) は 80% を示し最も高かった。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of ^{111}In -labeled carboxylic acid-modified PAMAM

Dendrimers	AUC (% of dose · hr/ml)	Clearance ($\mu\text{L/hr}$)			
		Total	Bone	Liver	Kidney
PAMAM	1.49	67,300	320	22,900	27,000
PEG(5)-Asp-PAMAM	222	450	420	18	12
PEG(5)-Glu-PAMAM	201	498	162	102	42
PEG(5)-Suc-PAMAM	70.4	1,421	522	90	318
PEG(5)-Aco-PAMAM	28.9	3,457	849	306	906

(Yamashita et al., *J. Control. Release*, 2017, 262, 10-17, Table 2)

1-2-4 アスパラギン酸修飾 dendriマーの骨内分布

4-a *In situ* 蛍光イメージングシステムによる臓器分布の観察

次に、最も骨選択性に優れた PEG(5)-Asp-PAMAM の骨への分布を詳細に検討することを目的として、近赤外蛍光プローブで標識した PEG(5)-Asp-PAMAM を、*in situ* 蛍光イメージングシステムによる臓器分布の観察を行った (Fig. 7)。PAMAM 投与群では骨からの蛍光がほとんど観察されず、肝臓、腎臓から強い蛍光が観察された。一方、PEG(5)-Asp-PAMAM 投与群において骨、特に関節付近から強い蛍光が観察されたことから、PEG(5)-Asp-PAMAM は、骨の関節付近に選択的に移行する骨ターゲティング型樹状高分子であることが示された。一般に、骨疾患は骨の関節付近から発症するため、PEG(5)-Asp-PAMAM は骨疾患治療に有利な骨内分布を示すと推察される。

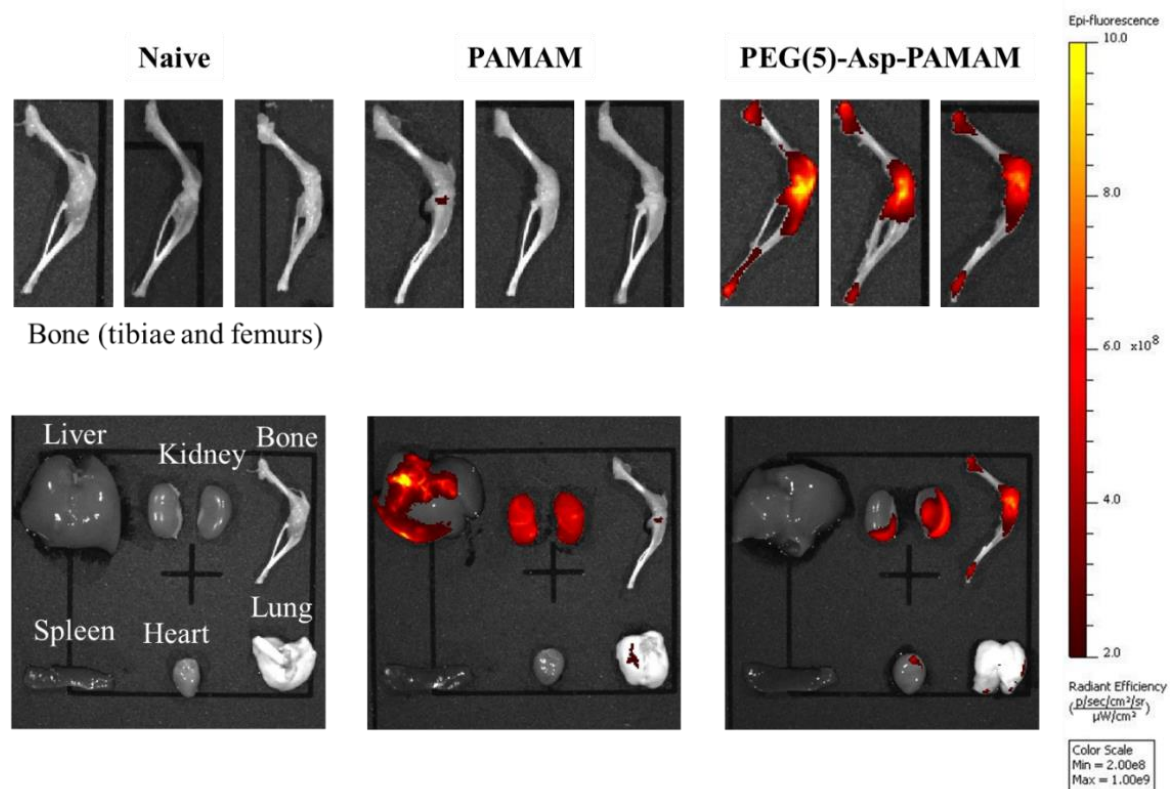


Fig. 7 *In situ* imaging of PEGylated aspartic acid-modified PAMAM. Dye680-labeled PAMAM or PEG(5)-Asp-PAMAM was intravenously injected to mice at 1 mg PAMAM/kg (100 nmol/kg for Dye680). Fluorescence intensity was determined in isolated tibiae and femur (top), liver, kidney, spleen, heart, and lung (bottom) tissues at 180 min after the intravenous injection. (Yamashita et al., *J. Control. Release*, 2017, 262, 10-17, Fig. 5)

4-b 共焦点レーザー顕微鏡による骨内分布の観察

骨は石灰化の程度により骨芽細胞による骨新生の活発な類骨面、破骨細胞による骨吸収の活発な吸収面、及びリモデリングイベントが休止している静止面に分類できる [13]。また各種骨疾患ごとに病態イベントが起きる骨面が異なるため、PEG(5)-Asp-PAMAM の骨内分布に関する情報は、治療上重要である。そこで次に、PEG(5)-Asp-PAMAM の骨内分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した (Fig. 8)。Xylenol orange (XO) は類骨面 (骨形成部位) に特異的に沈着する特徴を有した赤色蛍光物質であり、マウスに投与することで、マウス骨組織の類骨面を染色可能である [47]。この特性を活用し、PEG(5)-Asp-PAMAM の骨内分布を評価した。PAMAM 投与群では骨内に PAMAM 由来の緑色蛍光が観察されなかったのに対して、PEG(5)-Asp-PAMAM 投与群では比較的強い緑色蛍光が観察された。また PEG(5)-Asp-PAMAM と XO との共局在は観察されなかったことから、PEG(5)-Asp-PAMAM は骨形成部位以外の部位、すなわち吸収面に主に分布したと考えられる。

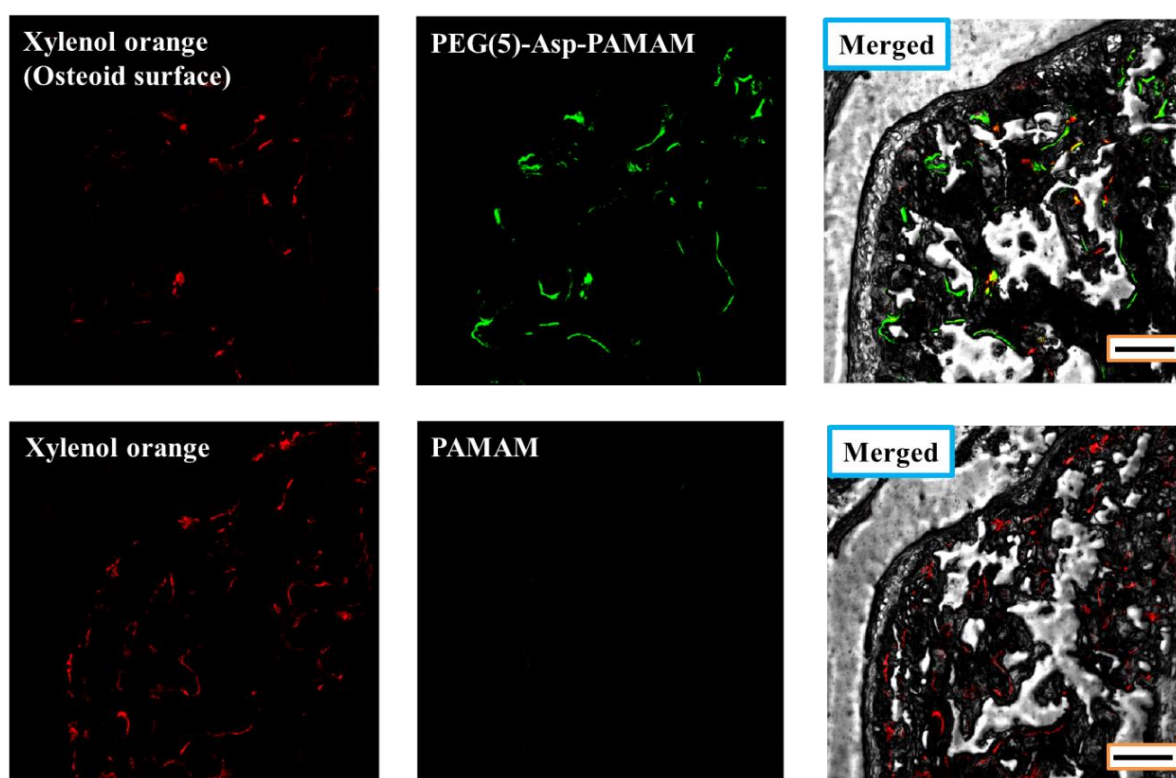


Fig. 8 Intra-bone distribution of PEGylated aspartic acid-modified PAMAM dendrimers in un-decalcified frontal tissue sections from the distal femur and proximal tibia. Osteoid surfaces were stained with xylenol orange (red). FITC-labeled PAMAM (bottom) or FITC-labeled PEG(5)-Asp-PAMAM (top) (PAMAM, green) were intravenously injected to mice at 20 FITC $\mu\text{mol}/\text{kg}$. Fluorescence intensity was observed using a confocal laser scanning microscope; scale bars, 100 μm .

(Yamashita et al., *J. Control. Release*, 2017, 262, 10-17, Fig. 6)

1-3 考察

本章では、樹状高分子である PAMAM をコアとした各種カルボン酸修飾 dendrimer を作製し、薬物速度論を用いて、骨ターゲティング素子に最適な修飾カルボン酸の同定及び、カルボン酸に基づく骨ターゲティングシステムを構築した。

はじめに、作製した各種カルボン酸修飾 dendrimer の物理化学的特性を評価したところ、PEG 修飾を施していないカルボン酸修飾 dendrimer は、PEG 修飾を施したものと比較して、すべて粒子径の増大が認められた (Table 1)。一般にポリアクリル酸に代表されるカルボン酸系ポリマーは、分子内及び分子間でイオン架橋を形成し、保水性ゲルを形成することが知られている [48]。またポリアスパラギン酸やポリグルタミン酸が高分子ミセルの疎水性コアに用いられていることから [49]、これら酸性アミノ酸やカルボン酸の修飾は PAMAM dendrimer の凝集・分散性に大きく影響を及ぼしていると考えられる。一方、PEG は水和層を形成することで、薬物キャリアの分散性や安定性を向上させることが報告されている [50]。したがって、PEG 修飾はこれらカルボン酸修飾 dendrimer の凝集を抑制し分散性を改善したと考えられる。

Aco は分子内に 2 つのカルボキシ基を有することから、Aco-PAMAM は、本章で作製したカルボン酸修飾 dendrimer の中で最もカルボキシ基数の多い誘導体となり、HAP への親和性も最も高い結果となった (Fig. 2)。こうしたことから、このカルボキシ基数は HAP の親和性に関与する重要な因子であると考えられるが、分子内のカルボキシ基が同数の Asp 修飾体と Glu 修飾体を比較した場合、両者の酸性アミノ酸の分子構造で炭素鎖長以外に大きな差がないにも関わらず、HAP の親和性に差がみられた。したがって、骨ターゲティング素子の HAP に対する親和性には、カルボキシ基数のみならずカルボキシ基の炭素鎖長も重要であると考えられる [51]。PEG 修飾を施したカルボン酸修飾 dendrimer に関して、Aco-PAMAM 以外の PEG 化カルボン酸修飾 dendrimer は PEG 修飾を施すことにより、HAP への親和性が減弱した。PEG は直鎖上の分子構造を有しているが、PEG 分子は水和層を形成しコイル型、ブラシ型、ボール型などの立体障害の大きな嵩高い構造で存在する [52]。したがって、カルボン酸修飾 dendrimer に修飾された PEG が HAP への結合を阻害したと推察される。

次に、カルボン酸修飾 dendrimer の HAP 結合機構を明らかにすることを目的に、筆者はカルシウムイオン結合能を調べたところ、各種カルボン酸修飾 dendrimer の HAP 親和性と、カルシウムイオン結合能に強い相関があることが示された (Fig. 3)。HAP はカルシウムイオンを含有する無機結晶で、HAP の単位格子へ柱状に配位されたカルシウムイオンが物質の吸着に関与していると報告されている [44]。したがって、カルボン酸修飾 dendrimer の HAP 結合機構にはカルシウムイオンとの相互作用が寄与していると推察され、カルボン酸修飾 dendrimer の HAP に対する親和性の差は、修飾されたカルボキシ基数及び炭素鎖長の違いが、カルシウムイオンとのコンフォメーション形成、つまりカルシウムイオンとのキレート能に影響した結果と考えられる [37, 53]。さらに、カルボン酸の単量体では、カルシウムイオンとのキレート形成が観察されなかったことから、カルシウムイオンとのキレート形成には、カルボン酸のポリマー構造が重要であると考えられる。一方、血液中には約 2.5 mM のカルシウムイオンが含有されており、これら血中に含まれるカルシウムイオンが拮抗

因子として、カルボン酸修飾 dendrimer の HAP 結合を阻害する恐れがある。筆者はこの点について、HAP と血中濃度より過剰なカルシウムイオンの共存下における、カルボン酸修飾 dendrimer の HAP 親和性を評価し、溶液中の遊離カルシウムイオンは HAP 親和性にほとんど影響しないことを明らかにした (Fig. 4)。

そこで次に ^{111}In 標識体を用いて、マウスにおける dendrimer の体内動態に及ぼすカルボン酸の種類及び PEG の修飾率の影響を評価したところ、*in vitro* 実験系で得られた HAP への親和性と、体内動態から得られた CL_{bone} の間には強い相関がみられたが、HAP への親和性と骨移行率は相関しなかった (Fig. 2, 5, 6, Table 2)。これまでに、カルボキシ基やスルホン基などにより強い負電荷を示す薬物キャリアは、腎臓の近位尿細管上皮細胞へ選択的に集積することが報告されている。Yamasaki らは Suc 及び Aco を修飾したタンパク質が、主にスカベンジャー受容体を介して肝臓や腎臓に取り込まれることを報告している [54]。したがって、PEG(5)-Suc-PAMAM や PEG(5)-Aco-PAMAM のような、強い負電荷を示し HAP 親和性が比較的高いカルボン酸修飾 dendrimer の CL_{bone} は比較的大きいものの、近位尿細管上皮細胞に発現しているスカベンジャー受容体などの異物排除機構が優位に働いた結果、骨移行率が低下したものと推察される [55, 56]。一方で、負電荷が比較的弱く、HAP に対して中程度の親和性を示す PEG(5)-Asp-PAMAM は、他臓器への移行はほとんどみられず、最も高い骨移行率を示した。これは、PEG(5)-Asp-PAMAM の骨親和性は中程度であるものの、他臓器のスカベンジャー受容体による認識が回避され、骨組織への移行機会が高まったことによるものと考えられる。

骨移行率に優れる PEG(5)-Asp-PAMAM の臓器分布の詳細を、イメージングシステムを用いて観察したところ、PEG(5)-Asp-PAMAM は下肢骨の関節近傍に集積することを見出した (Fig. 7)。さらに、予備検討ではあるが、近赤外蛍光によるマウス全身の臓器分布を評価したところ、PEG(5)-Asp-PAMAM が肋骨や前歯へ分布する様子も確認されたことから、PEG(5)-Asp-PAMAM は下肢骨以外の骨へも分布することが示された。一般に、骨は単一構造を繰り返した同一性の高い組織構造を有していることから、PEG(5)-Asp-PAMAM は全身骨へ均一に分布したものと推察される [57]。また、骨の関節近傍は、他の骨組織と比較して毛細血管構造が発達しており、骨組織の中でも血流量に富んだ部位であることから、PEG(5)-Asp-PAMAM の関節付近への集積には血流量が影響すると考えられる [58]。

一般に、骨面は類骨面、吸収面、静止面に分類でき、それぞれの骨面を起点とした骨関連疾患は多岐に亘る [13, 59-61]。したがって、疾患に応じて薬物キャリアの骨内分布を制御することは、治療上重要と考えられる。しかしながら、従来の骨ターゲティング素子である BP の分布は骨面の選択性に乏しく、また骨ターゲティング素子の骨内分布の制御に関する報告は少ない。そこで、PEG(5)-Asp-PAMAM の骨内分布の詳細を、マウス下肢骨の凍結切片を用いて観察したところ、PEG(5)-Asp-PAMAM は吸収面、すなわち、破骨細胞が集積する骨破壊部位へ選択的に集積することが示された (Fig. 8)。吸収面上の HAP に含有されるカルシウム量は、類骨面上の HAP と比較して豊富であることから、PEG(5)-Asp-PAMAM の吸収面への集積はカルシウムイオンに依存するものと考えられる [62, 63]。

以上のように、Asp 修飾を利用することで骨選択性に優れた骨ターゲティング型樹状高分子の開発に成功した。開発した PEG(5)-Asp-PAMAM は骨の関節近傍の破骨細胞が集積する骨破壊部位近傍に集積することを明らかにした。このような動態特性を有する薬物キャリアは、転移がん細胞と破骨細胞との相互活性により増悪する骨転移の治療に有効であると考えられる。

以上のように本章では、カルボン酸修飾樹状高分子の骨親和性と体内動態の評価により、カルボン酸の骨ターゲティング素子としての有用性を明らかにした。すなわち、カルボン酸修飾樹状高分子は、Aco、Suc、Asp、Glu の順に高い骨親和性を有すること、骨親和性にはカルシウムとのキレートが関与していることを明らかにした。なかでも、骨親和性と他臓器へのクリアランスのバランスに優れた Asp 修飾体が骨ターゲティング型高分子キャリアとして最も有望であることが明らかとなった。

第 2 章 アスパラギン酸修飾に基づく骨標的化リポソームの開発

2-1 緒言

第 1 章では、カルボン酸修飾に基づく骨標的化 DDS の構築を目的として、修飾カルボン酸と PEG 修飾率の異なる 16 種の PEG 化カルボン酸修飾樹状高分子を創製し、骨親和性及び体内動態の観点から骨標的化 DDS に最適なターゲティング素子の組み合わせを系統的に評価した。その結果、骨親和性と他臓器へのクリアランスのバランスに優れた Asp 修飾が骨ターゲティング素子として最も有望であることが示された。そこで次に筆者は、Asp 修飾に基づいた汎用性に優れた骨ターゲティングシステムの構築を目的として、様々な薬物を封入可能なリポソームを薬物キャリアと選択し、アスパラギン酸修飾を利用した骨ターゲティング型リポソームの開発ならびに抗がん剤 PTX による骨転移治療への応用を試みた。

リポソームは生体由来のリン脂質から構成され、二分子膜構造を有しており、毒性・抗原性が他の高分子薬物キャリアと比較して低く、用いるリン脂質が生体成分であるため、生体内で代謝される利点を有する [64]。また、リポソームは粒子径や脂質組成を容易に調節可能で、水溶性薬物、脂溶性薬物、ひいては核酸医薬品など、多くの薬物が封入可能で、糖質、抗体、その他受容体リガンドを用いた表面修飾が容易であることから、Asp 修飾に基づきリポソームを骨標的化できれば汎用性に優れた骨ターゲティングシステムが構築できると考えられる [65-67]。

筆者は、アミノ基反応型リン脂質に Asp を修飾することで、リン脂質のアミノ基末端に Asp を結合させた新規骨ターゲティング素子修飾脂質 DPPE-Asp を合成した。Asp 修飾に基づいた骨標的化リポソームの開発を目指して、DPPE-Asp 及び PEG 修飾脂質の組成を、物性及び体内動態の観点から最適化し、抗がん剤 PTX の骨移行性の改善及び骨転移治療に対する新規治療法の開発を試みた (Fig. 9)。

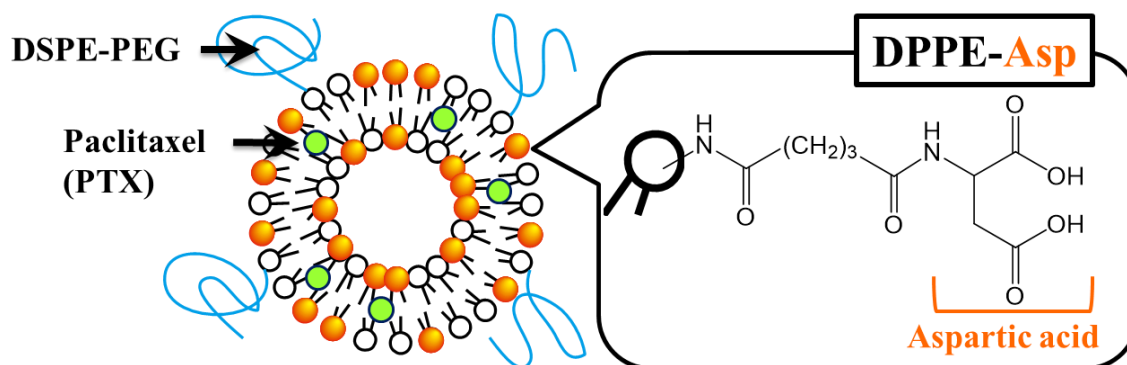


Fig. 9 Structure of paclitaxel encapsulated PEGylated aspartic acid-modified liposome.

DSPC: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DPPE-Asp: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine aspartate; DSPE-PEG: N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, sodium salt.

2-2 結果

2-2-1 アスパラギン酸修飾リポソームの物理化学的特性

1-a MALDI-TOF MS を用いた DPPE-Asp の分子量測定

得られた DPPE-Asp の分子量を MALDI-TOF MS で確認した (Fig. 10)。920.381 m/z に DPPE-Asp (920 ($[M-H]^-$)) の分子ピークが確認された。942.400 m/z のピークは DPPE-Asp のナトリウム塩であると考えられる。

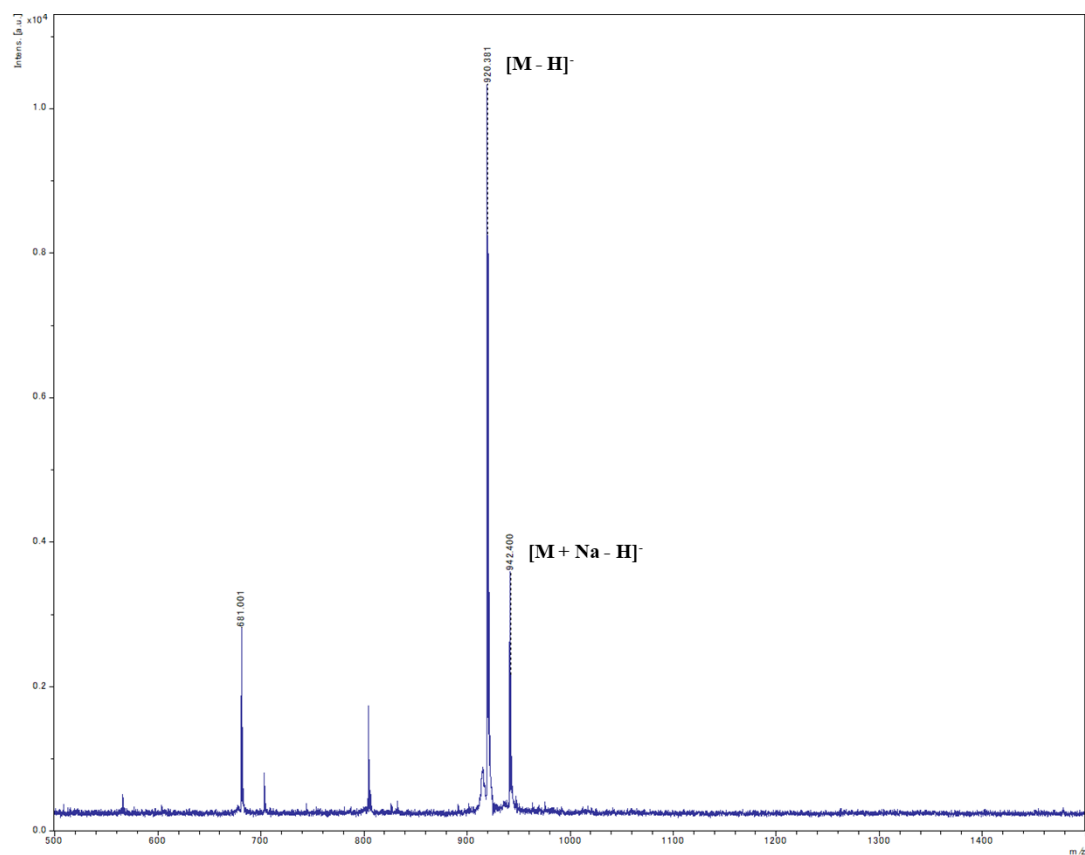


Fig. 10 MALDI-TOF MS spectra of DPPE-Asp (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) in the negative-ion mode using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as the MALDI matrix.

1-b アスパラギン酸修飾リポソームの粒度分布と表面電荷

Table 3 に各種リポソームの脂質組成、粒子径、多分散指数 (PDI; polydispersity index) を示した。リポソームの粒子径は、DSPC と cholesterol からなる Normal Lipo 及び DPPE-Asp を 17% 含有する Asp(17)-Lipo はそれぞれ 175 nm、148 nm と 100 nm 以上の粒子を形成した。それ以外のリポソームは 46 nm から 79 nm を示した。PDI は一様に 0.40 以下を示しており、均一な微粒子が形成されていることが示された。表面電荷は Normal Lipo と Asp(17)-Lipo はそれぞれ 0.36 mV、1.38 mV の正電荷を示した。一方で、PEG(2)-Lipo、DPPE-Asp の含有率を 33% 以上で作製されたリポソームは、一様に負電荷へ変化した。この負電荷への変化は DPPE-Asp のカルボキシ基に起因するものと推察される。

Table 3 Physicochemical characteristics of various liposomes

Liposomes	Composition (molar ratio)				Diameter (nm)	PDI	Z-potential (mV)
	DSPC	Cholesterol	DPPE-Asp	DSPE-PEG			
Normal Lipo	75	25	0	0	175 ± 7.03	0.40 ± 0.01	+0.36 ± 0.77
Asp(17)-Lipo	62.5	25	12.5	0	148 ± 5.42	0.09 ± 0.03	+1.38 ± 0.48
Asp(33)-Lipo	50	25	25	0	79.4 ± 15.0	0.27 ± 0.03	-30.2 ± 0.32
Asp(50)-Lipo	37.5	25	37.5	0	76.2 ± 21.1	0.37 ± 0.01	-32.2 ± 2.10
PEG(2)-Lipo	73.5	24.5	0	2	79.4 ± 2.28	0.32 ± 0.04	-5.12 ± 1.66
PEG(2)-Asp(33)-Lipo	49	24.5	24.5	2	77.7 ± 9.81	0.32 ± 0.01	-10.1 ± 1.97
PEG(4)-Asp(33)-Lipo	48	24	24	4	59.4 ± 6.95	0.25 ± 0.02	-10.3 ± 2.75
PEG(8)-Asp(33)-Lipo	46	23	23	8	46.4 ± 2.75	0.38 ± 0.07	-6.15 ± 4.00

DSPC: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DPPE-Asp: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine aspartate; DSPE-PEG: N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, sodium salt; PDI: polydispersity index (Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Table 1)

2-2-2 アスパラギン酸修飾リポソームの体内動態

2-a ヒドロキシアパタイトへの親和性に対する DPPE-Asp 及び DSPE-PEG の影響

Fig. 11 に HAP 量と各種リポソームの結合率の関係性を示した。PEG 修飾を施していない Asp 修飾リポソームにおいて、HAP への親和性は Asp(50)-Lipo = Asp(33)-Lipo > Asp(17)-Lipo > Normal Lipo の順となり、Asp(50)-Lipo 及び Asp(33)-Lipo が最も高い HAP 親和性を示した。Asp 修飾リポソームの HAP 親和性は DPPE-Asp の含有率 33% 以上で飽和したため、以降の実験は DPPE-Asp 含有率を 33% に固定して実施した。PEG 修飾を施した Asp 修飾リポソームの場合、HAP の親和性は Asp(33)-Lipo > PEG(2)-Asp(33)-Lipo > PEG(4)-Asp(33)-Lipo > PEG(8)-Asp(33)-Lipo の順となり、DSPE-PEG の含有率に依存して HAP への親和性が低下する傾向がみられたものの、PEG 導入率が比較的低い PEG(2)-Asp(33)-Lipo は HAP への高い親和性を維持した。

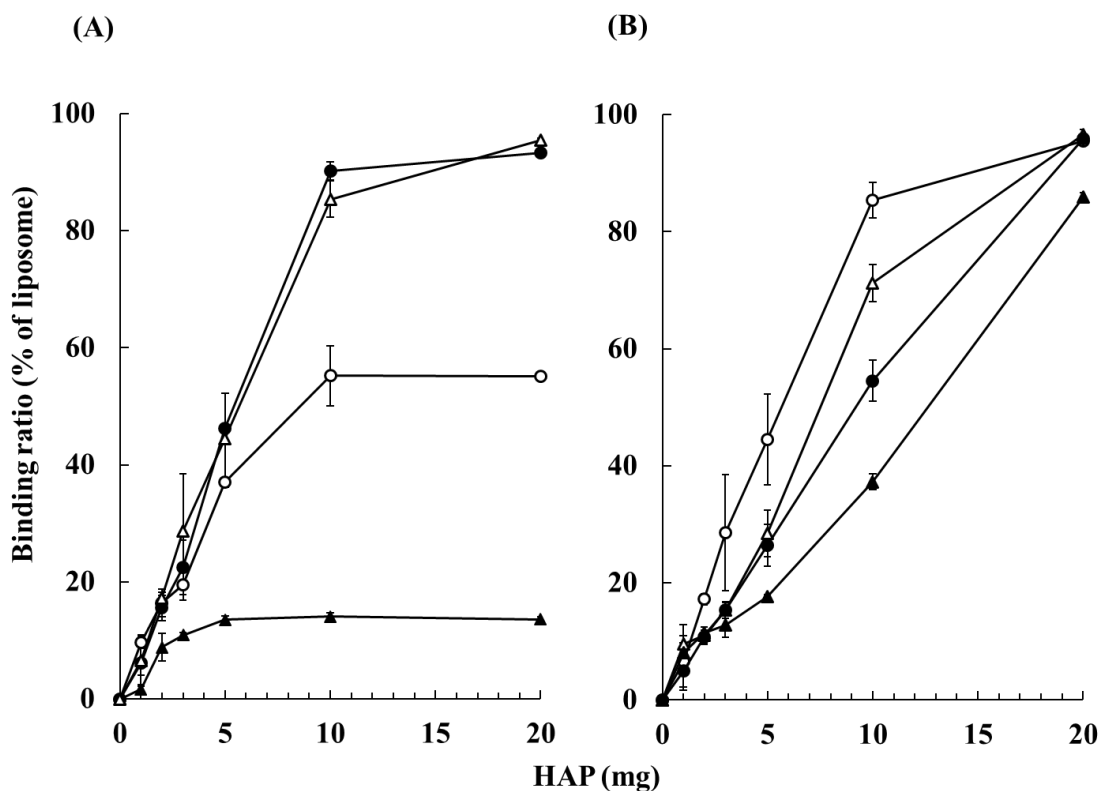


Fig. 11 Affinity of [³H] labeled aspartic acid-modified liposomes (A) or [³H] labeled PEGylated aspartic acid-modified liposomes (B) to HAP. The binding ratio of liposomes to HAP was determined by measuring the radioactivity of the supernatant. Results are expressed as the mean ± S.D. of three samples. Binding ratio (%) = 100 - ([radioactivity of the supernatant of each sample] / [radioactivity of the supernatant of each control (without HAP)]) × 100. (A) ○: Asp(17)-Lipo, △: Asp(33)-Lipo, ●: Asp(50)-Lipo, ▲: Normal Lipo. (B) ○: Asp(33)-Lipo, △: PEG(2)-Asp(33)-Lipo, ●: PEG(4)-Asp(33)-Lipo, ▲: PEG(8)-Asp(33)-Lipo. (Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Fig. 1)

2-b 骨移行性に及ぼす DPPE-Asp 及び DSPE-PEG の影響

次に、DPPE-Asp 及び DSPE-PEG の体内動態に及ぼす影響を検討するため、マウス尾静脈内投与後の Asp 修飾リポソームの血漿中濃度及び臓器分布の時間的推移を評価した (Fig. 12)。骨移行率は、第 1 章同様、リポソームの下肢骨移行量からマウス重量の 12% として全身骨量に換算した [46]。Normal-Lipo は投与後 30 分以内に速やかに血漿中から消失し、投与後 360 分までに投与量の 5.4% が骨へ移行することが示された。一方で、PEG(2)-Lipo は 360 分後も投与液の 41.7% が血漿中に存在し、骨への移行率は 6.7% を示した。一方で、PEG(2)-Asp(33)-Lipo 及び PEG(4)-Asp(33)-Lipo は主に骨及び肝臓に移行した。PEG(2)-Asp(33)-Lipo 及び PEG(4)-Asp(33)-Lipo の骨移行率は 360 分までにそれぞれ 24.6%、15.1% を示した。

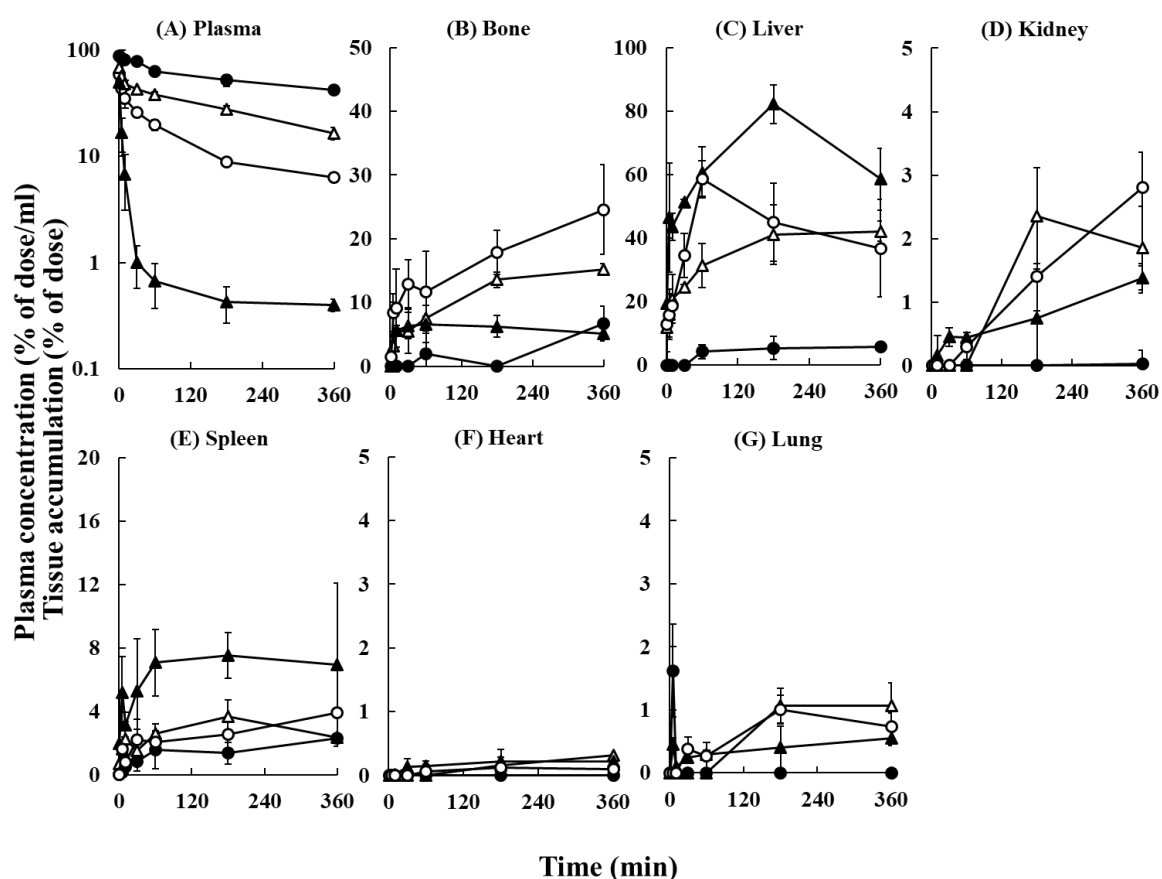


Fig. 12 Time-courses of the plasma concentration, and accumulation of [^3H] labeled PEGylated aspartic acid modified liposomes in the bone, liver, kidney, spleen, heart, and lungs in mice after a 10 μmol total lipids/kg intravenous injection. The total wet bone weight was estimated as 12% of the body weight. The radioactivity in the bone was based on activity determined in the tibia and femur extrapolated to the whole wet bone as reported previously [46]. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three mice. ○: PEG(2)-Asp(33)-Lipo, △: PEG(4)-Asp(33)-Lipo, ●: PEG(2)-Lipo, ▲: Normal Lipo. (Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Fig. 2)

2-c アスパラギン酸修飾リポソームの体内動態パラメータ解析

Asp 修飾リポソームの体内動態パラメータを Fig. 12 で得られた血漿中濃度推移に基づき算出した (Table 4)。PEG(2)-Lipo の AUC は 819 (% of dose h/mL) と最も高く、次いで PEG(4)-Asp(33)-Lipo > PEG(2)-Asp(33)-Lipo > Normal Lipo の順に高い値を示した。CL_{bone} は PEG(2)-Asp(33)-Lipo > PEG(4)-Asp(33)-Lipo > PEG(2)-Lipo の順に高い値を示した。PEG(2)-Asp(33)-Lipo の CL_{bone} 及び骨取り込み指標 (bone uptake index) は PEG(4)-Asp(33)-Lipo 及び PEG(2)-Lipo と比較して、それぞれ 3.4 倍、11.8 倍を示した。また、PEG(2)-Asp(33)-Lipo の CL_{liver} 及び CL_{kidney} は Normal Lipo のそれと比較して低い値を示した。

Table 4 Pharmacokinetic parameters of [³H]PEGylated aspartic acid-modified liposomes

Liposomes	AUC (% of dose · hr/ml)	Clearance (µl/hr)				Tissue uptake rate index (µl/hr/g)		
		Total	Bone	Liver	Kidney	Bone	Liver	Kidney
Normal Lipo	7.07	14,153	1,272	8,628	312	413	6197	937
PEG(2)-Lipo	819	122	24	24	6	7.81	17.2	18.0
PEG(2)-Asp(33)-Lipo	96.3	1,039	282	246	30	91.8	177	90.1
PEG(4)-Asp(33)-Lipo	271	369	84	210	12	27.3	151	36.0

AUC: area under the curve
(Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Table 2)

2-2-3 アスパラギン酸修飾リポソームの骨内分布

3-a 近赤外蛍光を利用した臓器分布イメージング

Fig. 13 では骨ターゲティング効率に優れる PEG(2)-Asp(33)-Lipo の臓器分布を詳細に検討するため、近赤外蛍光標識による臓器分布イメージングを実施した。各種リポソームに DiR を封入することで近赤外蛍光標識を施した。DiR-標識 PEG(2)-Lipo 投与群は、骨から蛍光はほとんど観察されず、主に肝臓、脾臓から強い蛍光が観察された。一方で、DiR-標識 PEG(2)-Asp(33)-lipo 投与群では、肝臓、脾臓からも蛍光は観察されたが、骨から強い蛍光が観察された。また、その蛍光は下肢骨の関節近傍のみならず、骨幹からも検出された。

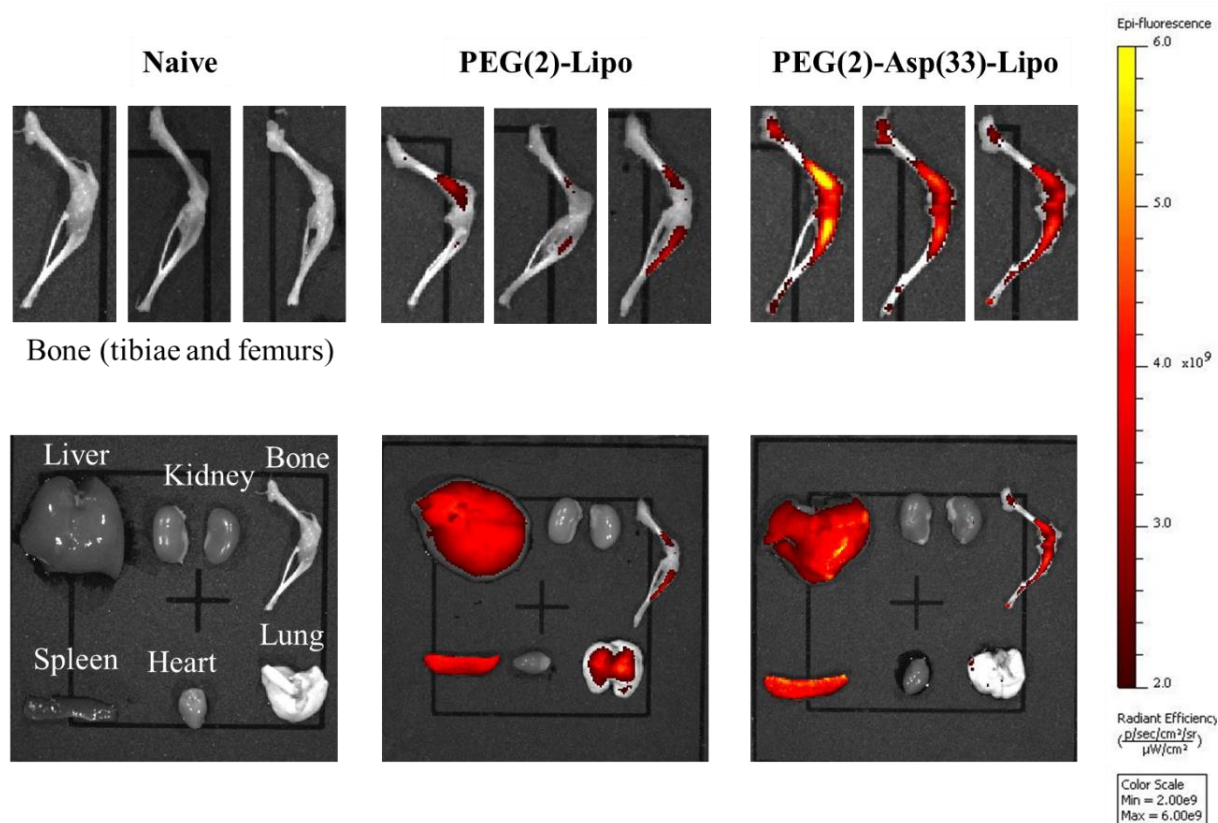


Fig. 13 *In situ* imaging of PEGylated aspartic acid-modified liposomes and PEGylated liposomes. DiR-labeled PEG(2)-Lipo or DiR-labeled PEG(2)-Asp(33)-Lipo was intravenously injected into mice at a dose of 5 mg lipids/kg (1.0 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ for DiR). The fluorescence intensity was determined in an isolated tibia and femur (top), liver, kidneys, spleen, heart, and lungs (bottom) 360 min after intravenous injection.

(Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Fig. 3)

3-b 骨基質・骨髄質移行性評価

蛍光イメージングによる臓器分布の結果より PEG(2)-Asp(33)-Lipo は、関節近傍に加えて骨幹にも一部分布することが明らかとなった。そこで次に、PEG(2)-Asp(33)-Lipo の骨基質及び骨髄移行率を評価した (Fig. 14)。PEG(2)-Asp(33)-Lipo は、マウス尾静脈内投与後に骨へ移行したリポソームのうち、76% が骨基質へ移行した一方で、24% の PEG(2)-Asp(33)-Lipo が骨髄に分布していることが示された。

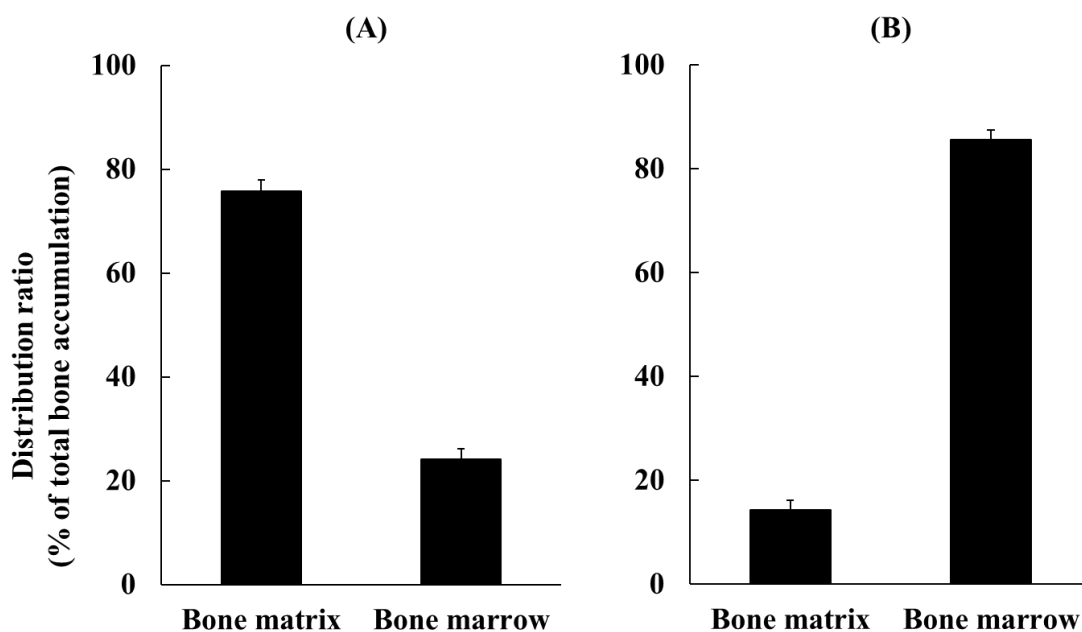


Fig. 14 The bone matrix and marrow distribution ratio of (A) ³H-labeled PEG(2)-Asp(33)-Lipo and (B) ³H-labeled Normal Lipo. The distribution ratio was evaluated based on radioactivity determined in the tibia and femur. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three mice. (Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Fig. S2)

3-c アスパラギン酸修飾リポソームの骨内挙動の観察

Fig. 15 にはマウス下肢骨の凍結切片を用いて、蛍光標識を施した PEG(2)-Asp(33)-Lipo の骨内分布を示した。PEG(2)-Asp(33)-Lipo の蛍光標識は Fluorescein DHPE を脂質組成に追加することで行った。その結果、PEG(2)-Lipo 投与群では骨基質上で、リポソーム由来の蛍光はほとんど観察されなかった。一方で、PEG(2)-Asp(33)-Lipo 投与群は骨基質上で、リポソーム由来の強い緑色蛍光が観察された。また、PEG(2)-Asp(33)-Lipo 由来の緑色蛍光の分布位置と、XO の赤色で染色された類骨面が共局在していないことから、PEG(2)-Asp(33)-Lipo は Asp 修飾デンドリマー同様、骨基質の中でも、特に吸収面に分布することが示された。

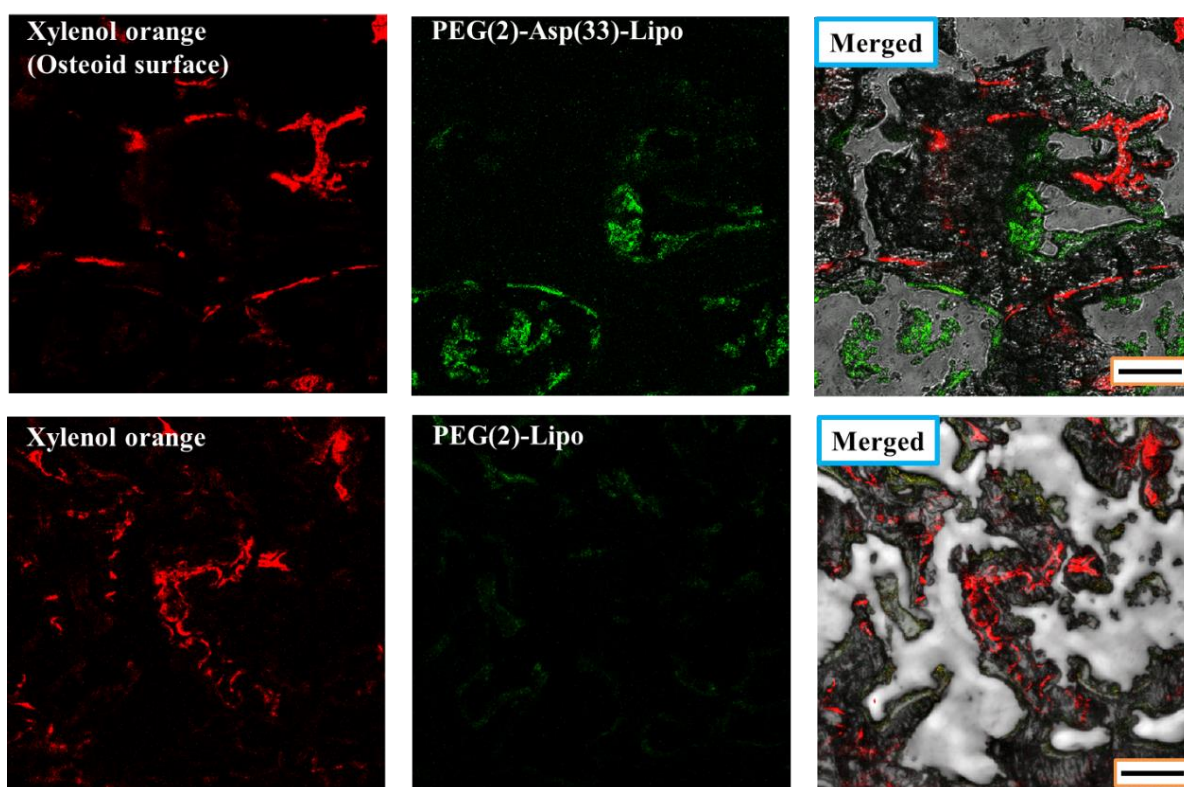


Fig. 15 Intra-bone distribution of PEGylated aspartic acid modified liposomes in frozen sections of a mouse distal femur and proximal tibia. Osteoid surfaces were stained with xylenol orange (red). FITC-labeled PEG(2)-Lipo (bottom) or FITC-labeled PEG(2)-Asp(33)-Lipo (top) (liposome, green) was intravenously injected in mice at a dose of 5.0 $\mu\text{mol/kg}$ FITC. The fluorescence intensity was observed with a confocal laser scanning microscope. Scale bars, 50 μm . (Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Fig. 4)

2-2-4 アスパラギン酸修飾リポソームを利用した骨へのパクリタキセル送達

4-a PEG-Asp-Lipo (PTX) の粒度分布

前節までに骨標的化リポソームに最適化された PEG(2)-Asp(33)-Lipo に PTX を封入した。Table 5 には PTX を封入した各種リポソームの物理化学的特性及び薬物担持率 (loading efficacy) を示した。PTX 未封入の PEG(2)-Lipo 及び PEG(2)-Asp(33)-Lipo の粒子径はそれぞれ 78 nm 及び 79 nm を示した。一方、PTX を封入した PEG(2)-Lipo (PTX) 及び PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) はそれぞれ 95 nm 及び 89 nm であり、PTX 封入により粒子径の若干の増大が観察された。PDI は一様に 0.38 以下を示しており、均一な微粒子を形成していることが推察される。表面電荷は一様に -5.4 mV から -3.6 mV の負電荷を有することが示された。PEG(2)-Lipo 及び PEG(2)-Asp(33)-Lipo の PTX の薬物担持率はそれぞれ 1.8% 及び 2.0% を示した。

Table 5 Physicochemical characteristics of paclitaxel encapsulated liposomes

Liposomes	Composition (molar ratio)					Diameter (nm)	Z-potential (mV)	PDI	Loading efficacy (%)
	DSPC	Cholesterol	DPPE-Asp	DSPE-PEG	PTX				
PEG(2)-Lipo	73.5	24.5	0	2	0	79.4 ± 2.28	-5.12 ± 1.66	0.32 ± 0.04	-
PEG(2)-Asp(33)-Lipo	49	24.5	24.5	2	0	77.7 ± 9.81	-10.1 ± 1.97	0.32 ± 0.01	-
PEG(2)-Lipo (PTX)	73.5	24.5	0	2	8	59.4 ± 6.95	-10.3 ± 2.75	0.30 ± 0.05	2.03
PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX)	49	24.5	24.5	2	8	46.4 ± 2.75	-6.15 ± 4.00	0.34 ± 0.05	1.83

DSPC : 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine;

DPPE-Asp : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine aspartate;

DSPE-PEG : N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, sodium salt;

PDI : polydispersity index;

PTX : paclitaxel

(Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Table 1)

4-b PEG-Asp-Lipo (PTX)の顕微鏡画像

作製した PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) の実像を原子間力顕微鏡 (atomic force microscope; AFM) 及び透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope; TEM) を用いて取得した。Fig. 16 にはそれぞれの典型例を示した。AFM の画像から (Fig. 16A)、約 110 nm の球体の微粒子が観察され (arrow 1, 2)、一部のリポソームが重なり合う様子が観察された (arrow 3, 4)。TEM の画像では多くの PEG(2)-Asp (33)-Lipo が一重膜構造を有しており (Fig. 16B)、一部は多重膜構造で存在している様子が観察された (Fig. 16C)。

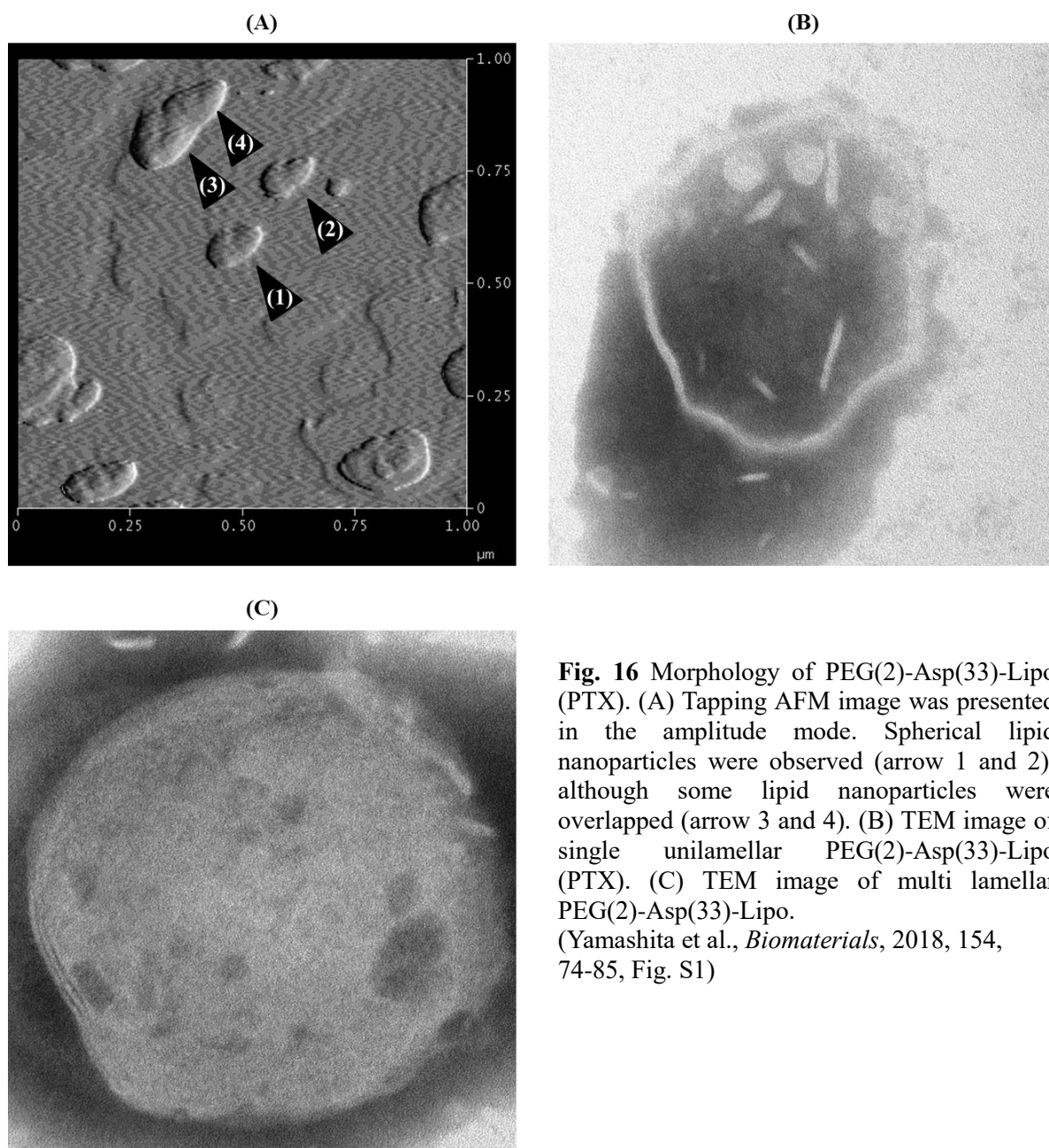


Fig. 16 Morphology of PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX). (A) Tapping AFM image was presented in the amplitude mode. Spherical lipid nanoparticles were observed (arrow 1 and 2), although some lipid nanoparticles were overlapped (arrow 3 and 4). (B) TEM image of single unilamellar PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX). (C) TEM image of multi lamellar PEG(2)-Asp(33)-Lipo. (Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Fig. S1)

4-c PEG-Asp-Lipo (PTX) の体内動態

Fig. 17 には PTX をマウス尾静脈内投与後 180 分における臓器分布を示し、Fig. 18 では PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) のマウス尾静脈内投与後の体内動態を、 ^3H -phosphatidyl choline (^3H -PC) と ^{14}C -PTX でリポソームと PTX を 2 重標識したものをを用いることで、薬物とキャリアの動態を同時に評価した。PTX はマウス尾静脈内投与 180 分の時点で、血漿中から殆ど消失しており、投与液の 49.7% が肝臓へ集積し、骨への移行率は 1.7% を示した。 ^3H -標識 PEG(2)-Lipo (PTX) はマウス尾静脈内投与後 360 分の時点で、投与液の 41.7% が血漿中に残存し、骨への移行率は 4.4% を示した。一方、 ^3H -標識 PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) は投与 360 分後、主に骨及び肝臓に集積し、骨への移行率は 25.0% を示した。

PEG(2)-Lipo (^{14}C -PTX) では、34.2% が 360 分の時点で血漿中に残存し、3.4% が骨へ移行した。一方、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (^{14}C -PTX) は投与 360 分後に骨及び肝臓へそれぞれ 15.4%、36.4% 移行した。

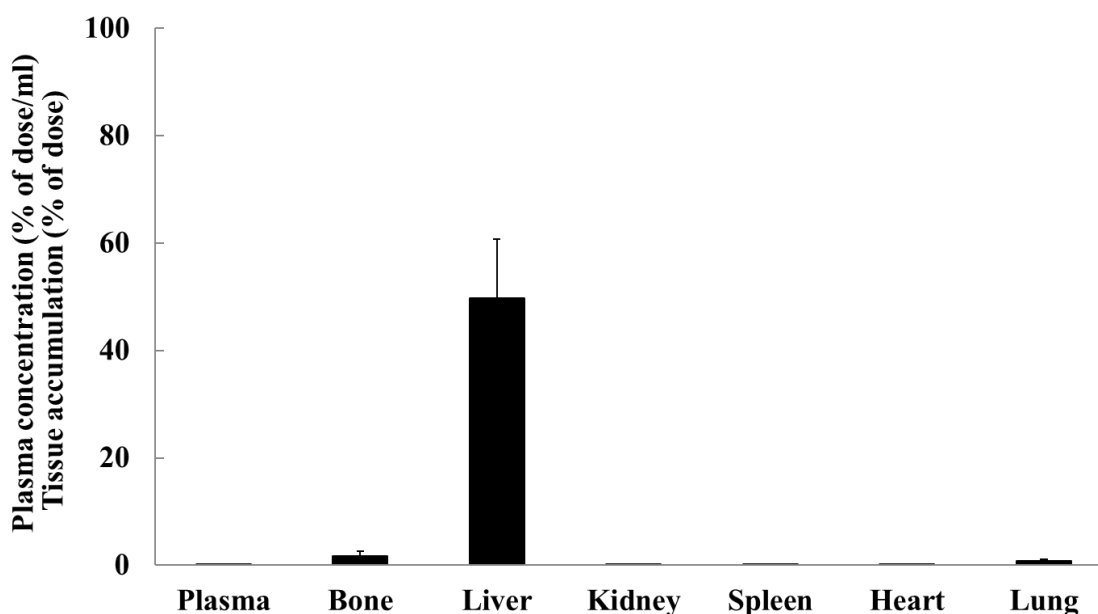


Fig. 17 Plasma concentration and tissue accumulation of [^3H]PTX at 360 min after intravenous injection at a dose of 1 mg PTX/kg in mice. The total wet bone weight was estimated as 12% of body weight, and radioactivity in the bone was based on the activity determined in the tibiae and femurs extrapolated to whole wet bone, as reported previously [46]. The results are expressed as means \pm S.D. of three mice.

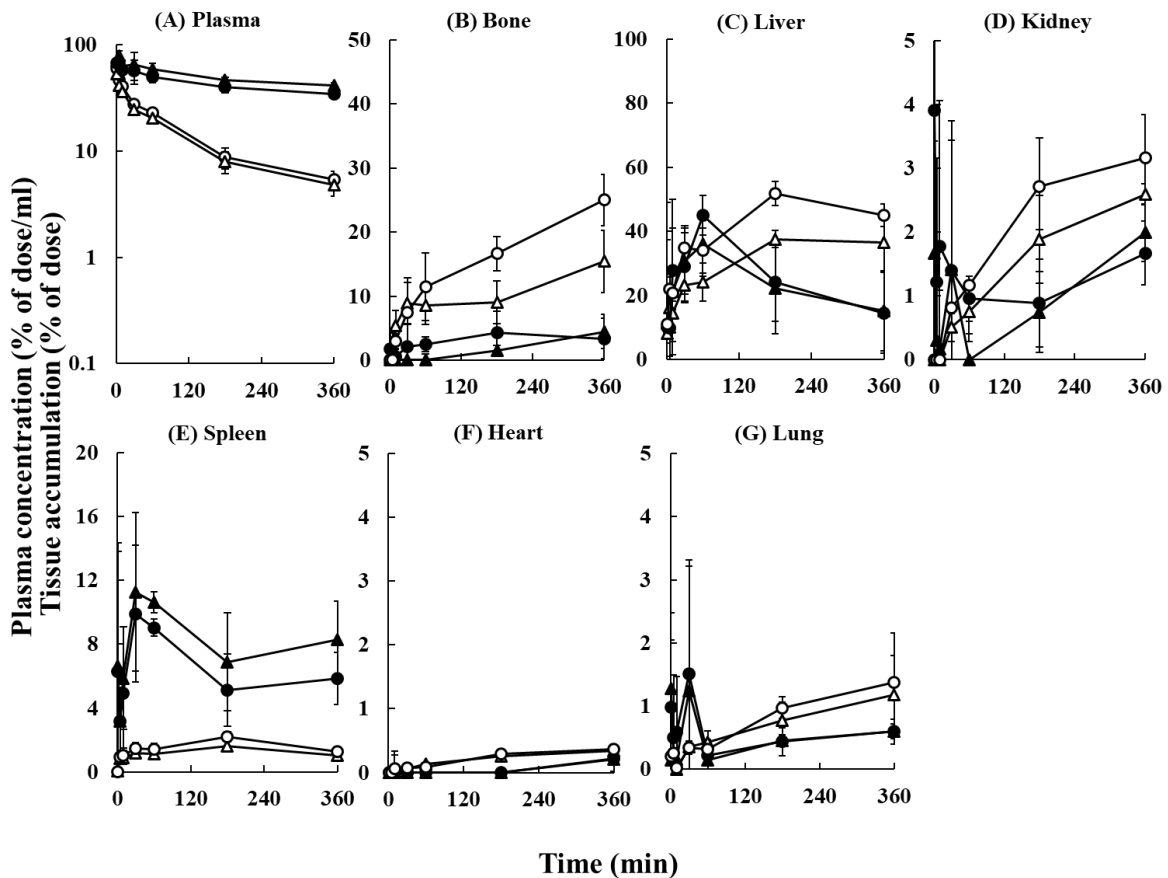


Fig. 18 Time-courses of the plasma concentration and accumulation of $[^{14}\text{C}]$ PTX encapsulated $[^3\text{H}]$ labeled PEGylated aspartic acid-modified liposomes in the bone, liver, kidneys, spleen, heart, and lungs in mice after a $10\ \mu\text{mol}$ total lipids/kg intravenous injection. The total wet bone weight was estimated as 12% of the body weight, and the radioactivity in the bone was based on the activity determined in the tibias and femurs extrapolated to the whole wet bone, as previously reported [46]. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three mice. \circ : $[^3\text{H}]$ PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX), Δ : PEG(2)-Asp(33)-Lipo ($[^{14}\text{C}]$ PTX), \bullet : $[^3\text{H}]$ PEG(2)-Lipo (PTX), \blacktriangle : PEG(2)-Lipo ($[^{14}\text{C}]$ PTX). (Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Fig. 5)

4-d PEG-Asp-Lipo (PTX) の体内動態学的パラメータ

PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) の体内動態パラメータを Fig. 18 で得られた血漿中濃度推移に基づき算出した (Table 6)。³H-標識 PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) の AUC は ³H-標識 PEG(2)-Lipo (PTX) と比較して 1/7 低い値となった。また、³H-標識 PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) の CL_{bone} 及び bone uptake index は ³H-標識 PEG(2)-Lipo (PTX) と比較して 10 倍高い値を示した。同様に、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (¹⁴C-PTX) の AUC は PEG(2)-Lipo (¹⁴C-PTX) のそれと比較して 1/5 低い値を示し、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (¹⁴C-PTX) の CL_{bone} 及び bone uptake index は PEG(2)-Lipo (¹⁴C-PTX) と比較して 6.6 倍高い値を示した。

Table 6 Pharmacokinetic parameters of [¹⁴C]PTX included in [³H]PEGylated aspartic acid-modified liposomes

Liposomes	AUC (% of dose · hr/ml)	Clearance (µl/hr)				Tissue uptake rate index (µl/hr/g)		
		Total	Bone	Liver	Kidney	Bone	Liver	Kidney
³ H PEG(2)-Asp(33)- Lipo (PTX)	93.8	1,066	300	546	42	97.6	392	126
PEG(2)-Asp(33)- Lipo (¹⁴ C PTX)	84.3	1,186	198	486	36	64.4	349	108
³ H PEG(2)-Lipo (PTX)	660	151	30	54	12	9.8	39	36
PEG(2)-Lipo (¹⁴ C PTX)	470	213	30	126	5.4	9.8	90	16

AUC: area under the curve; PTX: paclitaxel
(Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Table 3)

2-2-5 骨転移モデルマウスにおけるパクリタキセル封入アスパラギン酸修飾リポソームの骨転移抑制効果

5-a 骨転移初期に対する影響

前節で PEG(2)-Asp(33)-Lipo を利用した効率的な PTX の骨ターゲティングに成功した。次に、骨標的化リポソームを用いた PTX の骨ターゲティングの有用性を評価することを目的に、骨転移部悪性黒色腫に対する転移抑制効果を、骨転移モデルマウスを用いて評価した。骨転移モデルマウスは 4 週齢の雌性 C57BL/6 マウスの左心室にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を導入したがん細胞株である B16-BL6/Luc 細胞を投与し 2 週間飼育して作成した。本転移モデルでは、B16-BL6/Luc 細胞を投与した日を 0 日目として、がん細胞投与 0 日目から 3 日目にかけてがんの接着が起り、その後の浸潤過程を経て、7 日目以降に増殖過程に入ることが明らかとなっている [68]。そこで、骨転移接着過程及び浸潤過程における抑制効果、及び増殖過程における抑制効果の評価を目的とした PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) 投与後の下肢骨中がん増殖を IVIS イメージングシステムによる下肢骨転移のイメージング、及び下肢骨中の転移がん細胞数を測定することで評価した。はじめに、Fig. 19A では PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) の骨転移接着過程及び浸潤過程に与える影響を評価した。がん細胞接種直後及び 3 日目の骨転移モデルマウスに PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) を投与した群の下肢骨中がん細胞数は 8.5×10^4 cells を示した。一方で、saline 群及び PEG(2)-Lipo (PTX) 投与群の下肢骨中がん細胞数はそれぞれ 8.0×10^5 cells 及び 2.8×10^5 cells を示した。また、イメージング画像の結果より、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) 投与群では saline 群と比較して、関節付近のがん細胞由来のルシフェラーゼ発光が抑制されていることが示された。以上のことから、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) の投与により、下肢骨中のがん増殖を有意に抑制可能であることが示された。

5-b 骨転移後期に対する影響

次に、骨転移増殖過程における抑制効果の評価を目的とした 7 日目、10 日目投与後の下肢骨中がん増殖を IVIS イメージングシステム及び、下骨中ルシフェラーゼ活性を指標に評価した (Fig. 19B)。Saline 群及び PEG(2)-Lipo (PTX) 投与群の下肢骨中がん細胞数はそれぞれ 1.3×10^6 cells、 1.2×10^6 cells であり両群で大きな差は見られなかった。一方、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) 投与群の下肢骨中がん細胞数は 2.9×10^5 cells であり、PEG(2)-Lipo (PTX) 投与群と比較して下肢骨中のがん増殖を 1/5 まで抑制した。加えて、下肢骨中がん細胞の *in vivo* イメージングを実施したところ、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) 投与により、他群と比較してがん細胞由来の発光を顕著に抑制していることが示された。以上のことから、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) は骨転移における接着過程・浸潤過程のみならず、増殖過程を効率よく抑制可能であると推察される。

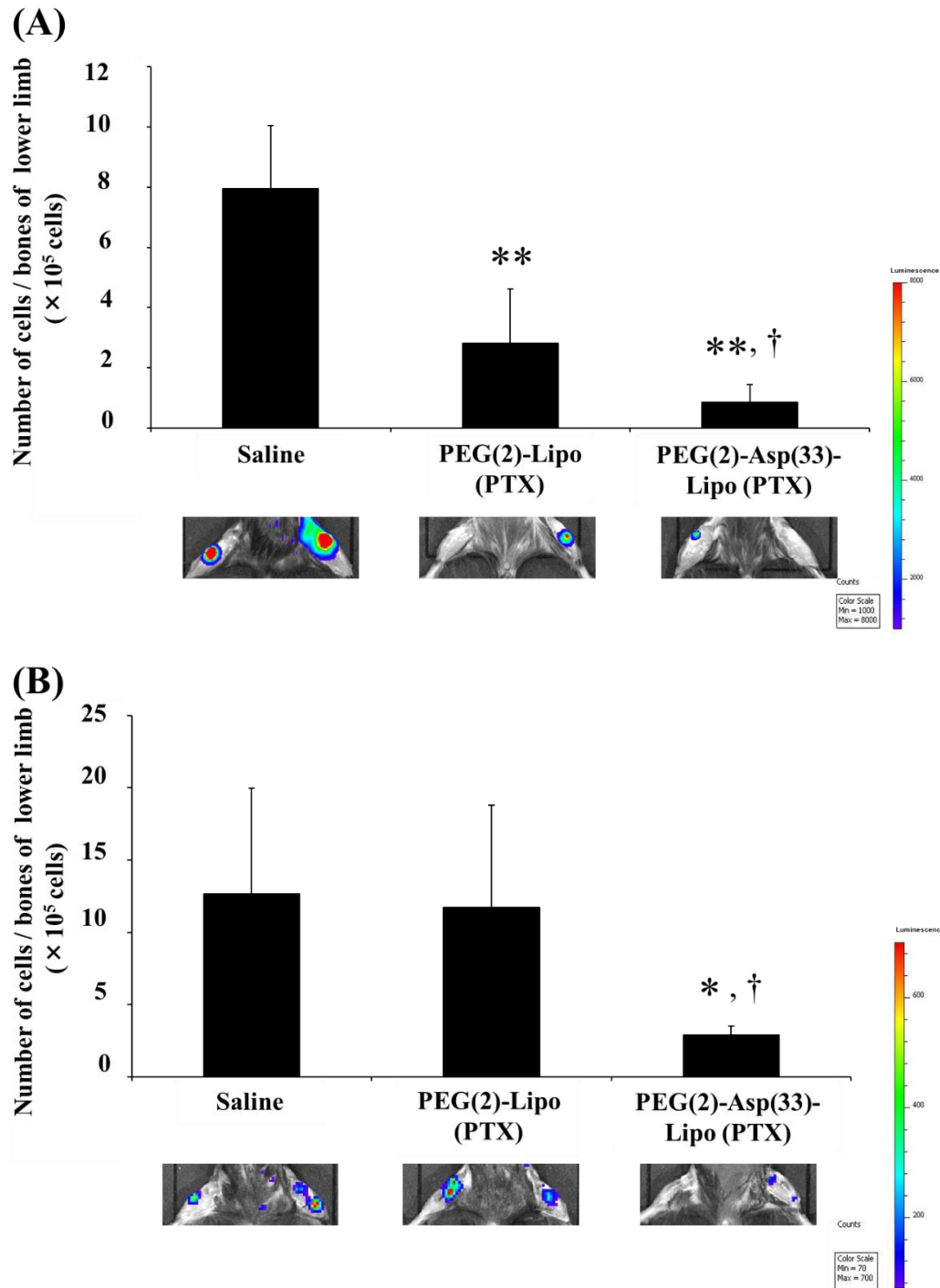


Fig. 19 Effect of PTX encapsulated PEGylated aspartic acid-modified liposomes on bone metastasis of B16BL6/Luc cells in mice. Saline, PEG(2)-Lipo (PTX, 1.5 mg PTX/93 μ mol total lipids/kg), or PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX, 1.5 mg PTX/87 μ mol total lipids/kg) was intravenously injected into mice directly after the tumor inoculation and again 3 days later (a), and 7 days and 10 days after the tumor inoculation (b) by injecting B16-BL6/Luc cells (1×10^5 cells) into the left ventricle. Mice were killed 14 days after the tumor inoculation and luciferase activity in the bone was assayed. Results are expressed as the mean \pm SD of 5 mice. * $P < 0.05$ compared with saline group; ** $P < 0.01$ compared with saline group; † $P < 0.05$ compared with PEG(2)-Lipo (PTX) group. (Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Fig. 6)

5-c 破骨細胞に対するアポトーシス誘導

Fig. 20 には RAW264.7 細胞から分化させた破骨様細胞に対する PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) のアポトーシス誘導能を評価した結果を示した。PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) または PTX 未封入の PEG(2)-Asp(33)-Lipo を破骨様細胞に添加し、4 時間暴露した後に、フローサイトメリーを用いて annexin V-propidium iodide (PI) 染色法によりアポトーシス率を評価した。PTX 未封入の PEG(2)-Asp(33)-Lipo を暴露させた場合、アポトーシス誘導 (FITC-annexin-V (+), PI (-)) された破骨様細胞は、細胞集団のうち 0.6% に留まった。一方、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) を破骨様細胞に暴露させた場合、母集団のうち 45.4% が初期のアポトーシス (FITC-annexin-V (+), PI (-)) を誘導したことが示された。

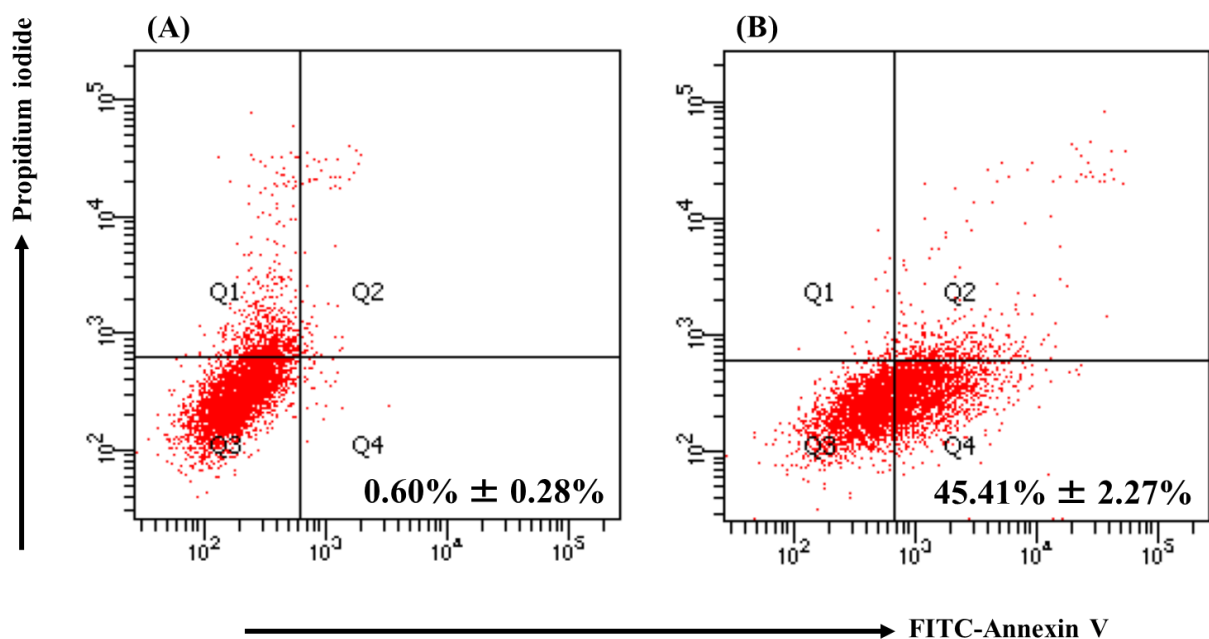


Fig. 20 FACS analysis of the induction of osteoclast-like cells into apoptotic cells. After treatment with PEG(2)-Asp(33)-Lipo (a) or PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) (b), osteoclast-like cells derived from RAW264.7 cells were stained with FITC-annexin V/propidium iodide, and dot plots were acquired using a FACS LSR Fortessa flow cytometry apparatus to observe apoptotic cells. Results are expressed as the mean ± S.D. of three experiments.

(Yamashita et al., *Biomaterials*, 2018, 154, 74-85, Fig. 7)

2-3 考察

本章では、Asp 修飾に基づく骨標的化リポソームの開発を目指し、HAP 親和性及び薬物動態学的観点から、骨ターゲティング効率に優れる Asp 修飾リポソームの脂質組成の最適化を試みた。その結果、PEG(2)-Asp(33)-Lipo が最も骨ターゲティング能に優れること、本リポソームを用いることで、PTX の骨移行性の改善及び効率的な骨転移抑制が可能であることが明らかとなった。

HAP に対するリポソームの親和性の検討では、DPPE-Asp を利用することで HAP への親和性が飛躍的に向上することを明らかにした (Fig. 11)。Asp 修飾リポソームの親和性は、DPPE-Asp の含有率依存的に向上する傾向が見られ、DPPE-Asp が HAP への親和性に大きく寄与することが示された。この HAP への吸着機構は、第 1 章と同様に DPPE-Asp 由来のカルボキシ基と HAP 由来のカルシウムイオン間でのキレート形成によるものであると推察される [59, 60]。一方、DSPE-PEG を用いて PEG 修飾を施したリポソームは、DSPE-PEG の含有率依存的に HAP への親和性が低下するものの、HAP が過剰に存在する環境では、すべての PEG-Asp-Lipo が 80% 以上の HAP 結合率を示した。これは DSPE-PEG 由来の PEG 鎖がリポソームと HAP の吸着サイトを阻害する因子として働くことを示唆していると考えられる [69]。

次に DPPE-Asp 及び DSPE-PEG で修飾したリポソームの体内動態を評価するため、各種リポソームの血中濃度及び臓器分布の時間的推移を検討した。粒子径 175 nm の Normal Lipo は静脈内投与後、速やかに血漿中から消失し、多くは肝臓、脾臓などへ集積し、投与量の 5.4% が骨に移行した。骨組織は、血液-骨髄関門及び骨類洞血管の影響で 150 nm 以上の物質の移動が制限されているが、Porter らは 150 nm の poloxamer 407 で被覆されたポリスチレン微粒子が骨髄の類洞内皮細胞へ集積することを報告している [70]。骨に分布した Normal Lipo の骨基質・骨髄分布を比較したところ、骨に分布した Normal Lipo の 85.7% が骨髄に分布し、上述のポリスチレン微粒子の集積結果と一致した (Fig. 14A)。以上のことから、効率的な骨基質への分布を達成するには、血液-骨髄関門を通過可能な粒子サイズ (< 150 nm) にリポソームを成形する必要があると考えられる [29]。そのため、筆者は、骨ターゲティング型リポソームの調製に際しては、リポソームの粒子径が 150 nm 未満となるように調製した。

粒子径を 150 nm 以下に調製した PEG 化 Asp 修飾リポソームのマウス尾静脈内投与後の体内動態を評価するとともに、DPPE-Asp 及び DSPE-PEG の脂質組成の最適化を行った。その結果、DSPE-PEG 含有率の高い PEG(4)-Asp(33)-Lipo は高い血中滞留性を示し、PEG(2)-Asp(33)-Lipo と比較して AUC は 2.8 倍増大した (Table 4)。一方、静脈内投与後 6 時間における PEG(2)-Asp(33)-Lipo の骨移行率は 25% と最も高値を示し、加えて PEG(2)-Asp(33)-Lipo の CL_{bone} は PEG(4)-Asp(33)-Lipo と比較して 3.4 倍高かったことから、PEG(2)-Asp(33)-Lipo が最も骨ターゲティング能に優れるリポソームであると考えられた (Fig. 12)。一般に、薬物キャリアのターゲティング効率を決定する因子として、全身クリアランスと標的部位への親和性が挙げられ、この両者のバランスを最適化することが、効率的なターゲティングシステムの構築に必要不可欠である。一般に静脈内投与後のリポソームは、細網内皮系に取り込まれやすいため、全身クリアランスが大きいことが知られている [71]。したがって。

本研究では標的部位である骨以外の他臓器クリアランスを低減するため、DSPE-PEG を用いてリポソーム表面に PEG 修飾を施した。PEG は修飾物の血中滞留性を向上させることで、全身クリアランスの増大を抑制可能である [64]。しかしながら、一方で PEG は嵩高い高分子であるため、標的部位（骨）へのカルボン酸の親和性を低減させる要因となり得るため、修飾率を最適化する必要がある。これらの結果は、PEG(2)-Asp(33)-Lipo では、PEG 分子が Asp による標的部位への親和性をある程度維持しつつ、他臓器へのクリアランスを抑制したため、効率的に PEG(2)-Asp(33)-Lipo が骨組織へ分布されたことによるものと推察される。

そこで次に、*in situ* 近赤外蛍光イメージングでは最も骨ターゲティング能が高かった PEG(2)-Asp(33)-Lipo の骨組織における分布の詳細を評価したところ、PEG(2)-Asp(33)-Lipo は第 1 章で評価した PEG(5)-Asp-PAMAM と同様に関節近傍へ集積する一方で、関節近傍のみならず骨幹へ移行している様子が確認された (Fig. 13)。そこで骨幹を骨髄と骨基質に分離し、それぞれの PEG(2)-Asp(33)-Lipo の分布率を算出したところ、骨基質に分布した PEG(2)-Asp(33)-Lipo の割合は骨髄への分布量と比較して約 3 倍高いことが示された (Fig. 14B)。PEG(2)-Asp(33)-Lipo の粒子径は 150 nm 以下であるため、PEG(2)-Asp(33)-Lipo は血液-骨髄関門を通過し、骨髄から骨基質へと移行したと考えられる。さらに、マウス下肢骨の凍結切片を用いた PEG(2)-Asp(33)-Lipo の骨内分布の様子を観察したところ、PEG(5)-Asp-PAMAM と同様に、骨基質面の中でも、吸収面に選択的に分布することが明らかとなった (Fig. 15)。PEG(2)-Asp(33)-Lipo は粒子表面に Asp 及び PEG が露出する構造を有しており、その表面電荷は -10 mV の中性に近い負電荷に帯電している。これらの表面特性は第 1 章で論述した PEG(5)-Asp-PAMAM と類似していることから、PEG(2)-Asp(33)-Lipo は PEG(5)-Asp-PAMAM と同様の骨内分布を示したものと考えられる [57, 58]。

一般的に、リポソームは脂質二重膜構造内へ疎水性薬物を、内水相へ親水性薬物を封入可能である。これまでに、リポソームに様々な薬物を封入し、病巣部位へ送達する試みがなされており、Doxil[®] や AmBisome[®] などの臨床で使用実績のあるリポソーム製剤も存在する [72, 73]。しかしながら、リポソームを用いて骨組織への疎水性薬物の送達を試みた報告例は極めて少なく、また薬物動態学的観点で骨移行性を検討した例はほとんど見当たらない。本章では、Asp 修飾に基づいた骨標的化リポソームに PTX を封入し、PTX の骨移行性向上を試みた (Fig. 18)。PTX は日本では乳がんや胃がんに対して適応を有するが、国外ではそれに加えて前立腺がんや悪性黒色腫などの様々な固形がんに適応を有している [74-76]。乳がんや前立腺がんは高確率で骨転移を誘発する原発腫瘍であるため、PTX の骨への効率的な送達を可能とするドラッグデリバリーシステムの開発は、乳がんや前立腺がんの骨転移に貢献し得る技術であると考えられる。³H-標識 PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) 体内動態特性は、PTX 未封入の ³H-標識 PEG(2)-Asp(33)-Lipo のそれとほぼ同様であったことから (Fig. 12)、PTX の封入はリポソームの物性にほとんど影響しないと考えられる。³H-標識 PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) 及び PEG(2)-Asp(33)-Lipo (¹⁴C-PTX) の体内動態挙動に若干の差が認められたが、これは PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) が投与後、循環血中でリポソームから PTX が一部漏出している可能性を示唆しており、この漏出性を抑制できるよう製剤設計を改良することが、今後の課題である。

骨転移抑制に関する検討では、はじめに骨転移の接着過程及び浸潤過程への影響を検討したところ、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) 投与により、saline 群と比較して下肢骨中のがん増殖が顕著に抑制された (Fig. 19A)。このことから、骨転移の接着過程及び浸潤過程に PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) を投与することで骨転移が抑制可能であることが示された。しかしながら、骨転移は早期に発見されることは稀で、進行がん及び末期がんのステージで診断されることが殆どである [5-13]。また、この状態から抗がん剤を投与することで、骨のような深部体性組織に転移したがんを抑制することは極めて難しいため、進行性の骨転移も抑制可能な治療法の開発が切望される。そこで、骨転移が増殖過程に移行した時期に PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) を投与し、増殖過程に与える影響を検討したところ、saline 群と比較して有意に下肢骨中のがん増殖を抑制可能であることが示された (Fig.19B)。さらに、予備検討ではあるものの、骨転移モデルマウスの 14 日間における体重増減率を評価したところ、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) 投与後の顕著な体重減少は観察されなかった。これは PEG(2)-Asp(33)-Lipo を利用した PTX の効率的な骨ターゲティングにより、通常の投与形態と比較して他臓器への PTX の移行を制御したことで、全身的な副作用を軽減した可能性を示唆している。したがって、PEG(2)-Asp(33)-Lipo を利用した PTX の骨への薬物デリバリーは、有効性と安全性の両面で骨転移に対する新規治療法として有用であると考えられる。

骨転移病態では、破骨細胞が転移がん細胞の接着及び増殖を活性化させることが報告されており、破骨細胞の活性を抑制することは、骨転移治療において有用な治療法の一つであると考えられている [77-79]。一方、PTX を破骨細胞に作用させると、破骨細胞のアポトーシス誘導を介して、骨吸収を抑制されることが報告されている [80]。したがって、高い骨転移抑制効果を示した PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) は、転移がん細胞への直接的な殺細胞効果に加えて、破骨細胞のアポトーシス誘導による相乗的な骨転移抑制効果を誘導している可能性が考えられる。そこで、RAW264.7 細胞から分化させた破骨様細胞を用いて PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) のアポトーシス誘導能を検討したところ、PTX 未封入の PEG(2)-Asp(33)-Lipo はアポトーシス誘導を引き起こさなかった。一方、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) を暴露させた場合、破骨様細胞のアポトーシス誘導が確認された (Fig.20)。このことから、PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) のがん骨転移抑制メカニズムには転移がん細胞への直接的な殺細胞効果に加えて、破骨細胞のアポトーシス誘導による相乗的な骨転移抑制効果を示す可能性が考えられた。

以上、本章では、カルボン酸の一種である Asp 修飾を用いることで骨ターゲティング能に優れたリポソームを設計・開発することに成功した。本リポソームを用いることで PTX の骨標的化、骨転移抑制が可能であることを明らかにした。これらの知見は骨転移治療を目的とした、骨ターゲティング型薬物キャリアの製剤設計ならびに新規治療法の開発に対して有益な情報を提供するものと思われる。

結論

筆者は 2 章にわたり、骨選択性に優れる骨ターゲティングシステムの開発を目的に、カルボン酸修飾に基づく骨ターゲティング型薬物キャリアを設計・開発するとともに、抗がん剤 PTX による骨転移抑制におけるその有用性に関する検討を行い、以下の結論を得た。

第 1 章 カルボン酸修飾を利用した骨標的化樹状高分子の開発

各種カルボン酸修飾樹状高分子の HAP への親和性はカルシウムイオンとのキレート能と相関し Aco>Suc>Asp>Glu 修飾の順に高かった。HAP 親和性及び他臓器へのクリアランスのバランスに優れた Asp 修飾体が骨ターゲティング型高分子キャリアとして最も有望であることを見出した。

第 2 章 アスパラギン酸修飾に基づく骨標的化リポソームの開発

Asp 修飾脂質の利用によりリポソーム及び PTX の効率的な骨標的化に成功した。また、Asp 修飾リポソームは骨転移の病巣部位である吸収面に選択的に集積することを明らかにした。さらに、Asp 修飾リポソームにより骨転移が効率よく抑制されることを明らかにするとともに、その骨転移抑制効果には 破骨細胞のアポトーシス誘導が一部関与する可能性を示した。

以上、筆者は、カルボン酸修飾に基づき骨ターゲティング効率に優れるドラッグデリバリーシステムの開発に成功した。骨親和性と体内動態解析の結果から、Asp が骨ターゲティング素子として最も有望であることを見出すとともに、Asp 修飾を利用した骨標的化薬物キャリアの開発に成功した。さらに、骨標的化薬物キャリアを用いて抗がん剤 PTX の骨標的化ならびに効率的な骨転移抑制を示した。本研究で得られた知見は、骨への薬物送達及び骨転移治療に対して有用な方法論ひいては治療法が提唱できる可能性が高く、骨転移治療に大きく貢献できる研究と考えられる。

実験の部

第 1 章 実験の部

1-2-1 カルボン酸修飾 dendrimer の合成

【試薬】

Boc-Asp(OtBu)-OH と Boc-Glu(OtBu)-OH は渡辺化学工業株式会社より購入した。HOBt と HBTU は株式会社ペプチド研究所より購入した。PAMAM G3 と aconitic anhydride 及び fluorescein isothiocyanate (FITC) は Sigma Aldrich 社から購入した。Succinic anhydride と *trans*-3-indoleacrylic acid 及び hydroxyapatite monoclinic (HAP) は和光純薬工業株式会社から購入した。 α -Succinimidylsuccinyl- ω -methoxy, polyethylene (PEG-NHS) は日油株式会社から購入した。その他の試薬については市販の特級試薬を用いた。

【酸性アミノ酸修飾 PAMAM 誘導体の合成】

Asp-PAMAM 及び Glu-PAMAM の合成は HBTU-HOBt 法に則って行った [81]。すなわち、DMF 中で PAMAM G3 に対して 32.5 当量の HBTU、HOBt、Boc-Asp(OtBu)-OH または Boc-Glu(OtBu)-OH をカップリング反応させた。その際、TEA を適量添加し、反応混合液が pH>9 となるように調整した。室温で 4 時間インキュベートした後、反応混合液を回転式エバポレーターにて溶媒除去し、クロロホルムに再溶解させた。その後、5% 炭酸ナトリウムと飽和食塩水で 3 回ずつ分液した。有機相を回転式エバポレーターにて溶媒除去し、石油エーテルで沈殿させた。沈殿物を室温で真空乾燥させた後、クロロホルムに溶解し、90% TFA で脱保護した。室温で 1 時間攪拌した後、混合物を回転式エバポレーターにて蒸散させ、ジエチルエーテルで沈殿させて Asp-PAMAM、Glu-PAMAM を得た。DMF/TEA (100/1 v/v) に溶解させた Asp-PAMAM、Glu-PAMAM 化合物に対して、同じく DMF/TEA (100/1 v/v) に溶解させたアミノ基反応型活性化 PEG (PEG-NHS) を反応させた。室温で 24 時間インキュベートした後、15,000 MWCO の透析膜にて 1 日以上透析膜ろ過した後に凍結乾燥することで、最終的に PEG 化 Asp-PAMAM または PEG 化 Glu-PAMAM を得た。

【カルボン酸修飾 PAMAM 誘導体の合成】

Suc-PAMAM 及び Aco-PAMAM は以下の手順に従って合成した。すなわち、DMSO 中で PAMAM G3 に対して 32.5 当量の succinic anhydride または *cis*-aconitic anhydride を反応させた。その際、TEA を適量添加し、反応混合液が pH>9 となるように調整した。室温で 4 時間インキュベートした後、1,000 MWCO の透析膜にて 1 日以上透析膜ろ過した後に凍結乾燥することで Suc-PAMAM、Aco-PAMAM を得た。PEG 化 Suc-PAMAM 及び PEG 化 Aco-PAMAM を合成する際は、PEG 化 PAMAM に Suc 修飾または Aco 修飾を施した。すなわち、DMF/TEA (100/1 v/v) に溶解させた PAMAM G3 に対して、同じく DMF/TEA (100/1 v/v) に溶解させた PEG-NHS を反応させた。室温で 24 時間インキュベートした後、15,000 MWCO の透析膜にて 1 日以上透析膜ろ過した後に凍結乾燥することで、PEG 化 PAMAM

を得た。得られた PEG 化 PAMAM を DMSO に溶解させ、32.5 当量 (過剰) の succinic anhydride または 32.5 当量の *cis*-aconitic anhydride を反応させた。その際、TEA を適量添加し、反応混合液が pH>9 となるように調整した。室温で 4 時間インキュベートした後、1,000 MWCO の透析膜にて 1 日以上透析膜ろ過した後に凍結乾燥することで PEG 化 Suc-PAMAM、PEG 化 Aco-PAMAM を得た。得られたカルボン酸修飾 dendrimer 誘導体は MALDAI TOF-MS (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) によって同定した。カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体の粒子径及び表面電荷測定は、Zetasizer Nano (Malvern Instruments) を用いてそれぞれ、動的光散乱法及び電気/レーザー・ドップラー法により測定した。

1-2-2-a HAP への親和性評価

【HAP 結合実験】

カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体への FITC 標識は Kitchens らの方法に準じて行った [82]。10 mg の HAP を 1.5 mL のチューブに秤量し、FITC-標識カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体を 100 µg/mL となるように PBS (pH 7.4) に溶解させた溶液を 400 µL 加え、室温で攪拌した。攪拌後 5, 10, 30, 120 分の時点で 1,500 × g で 3 分間遠心処理を施し、上清のサンプリング (100 µL) を行い、上清中の FITC-標識カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体の蛍光強度を Ex. 485 nm, Em. 528 nm の条件でプレートリーダー (Powerscan® HT, DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) で定量した。

HAP 結合率は、次式 [1] に従って算出した。

$$[\text{PAMAM}]_{\text{bind}} = 100 - ([\text{PAMAM}]_{\text{supernatant}} / [\text{PAMAM}]_{\text{without HAP}}) \times 100 \quad [1]$$

ここで $[\text{PAMAM}]_{\text{bind}}$ (%) は FITC-標識カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体の HAP 結合率であり、 $[\text{PAMAM}]_{\text{supernatant}}$ は遠心後の上清 100 µL 中の蛍光強度を表し、 $[\text{PAMAM}]_{\text{without HAP}}$ は HAP 添加前の FITC-標識カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体溶液 100 µL 中の蛍光強度を表す。

1-2-2-b カルシウムイオンに対するキレート結合能評価

【カルシウム結合実験】

50 mM MES buffer (8.0 mM CaCl₂, pH 6.7) 10 mL にカルボン酸修飾 dendrimer 誘導体を 0.25 mM となるように溶解させ攪拌した。攪拌後 1, 5, 10, 30, 60, 180, 240 分の時点で未結合の Ca²⁺ 濃度を Ca²⁺ 電極 (compact Ca²⁺ meter B-751, Horiba, Kyoto, Japan) にて定量した。

Ca²⁺ 結合率は、次式 [2] に従って算出した。

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bind}} = 100 - ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} / [\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}) \times 100 \quad [2]$$

ここで $[Ca^{2+}]_{bind}$ (%) はカルボン酸修飾 dendrimer 誘導体の Ca^{2+} 結合率であり、 $[Ca^{2+}]_{free}$ は未結合の Ca^{2+} 濃度を表し、 $[Ca^{2+}]_{total}$ はカルボン酸修飾 dendrimer 誘導体添加前の Ca^{2+} 濃度を表す。

1-2-3 カルボン酸修飾 dendrimer の体内動態

【試薬】

Diethylenetriamine-N,N,N',N',N''-pentaacetic acid (DTPA) は株式会社同仁化学研究所から購入した。 ^{111}In chloride ($[^{111}In]InCl_3$) は日本メジフィジックス株式会社より供与されたものを用いた。その他の試薬については市販の特級試薬を用いた。

【実験動物】

ddY 系雄性マウス (5-6 週齢、25 g) は清水実験材料株式会社から購入した。以後すべての動物実験はすべて京都薬科大学動物実験実施規程 [83] に従った。

【静脈内投与後の組織分布実験】

カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体への ^{111}In 標識は Hnatowich らの方法に準じて行った [84]。 ^{111}In -標識カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体の体内動態は、ddY 系雄性マウス (5-6 週齢、25 g) を用いて行った。 ^{111}In -標識カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体の PBS 溶液を、ddY マウスの尾静脈を介して 100 kBq $^{111}In/1.0$ mg PAMAM/kg の投与量で 100 μ L 静脈内投与した。投与後 1, 5, 10, 30, 60, 180 分の時点で、イソフルラン麻酔下でマウス下大静脈より採血を行った後に屠殺するとともに、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺及び右下肢骨を採取した。採取した血液サンプルは 2,000 \times g で 5 分間遠心処理を施し、上清の血漿をカウンティングチューブに 100 μ L 秤取した。その他臓器は各臓器の湿重量を測定した後、放射活性を測定した。

【データ解析】

合成高分子の組織移行性はクリアランスの概念に基づき算出される血漿中濃度に非依存的な組織取り込みクリアランス値を用いることにより、直線的かつ定量的に評価できる [85-87]。一般に、薬物の組織中量の経時変化は次式のように表される。

$$dX(t)/dt = CL_{org} \cdot C(t) - K_{out} \cdot X(t) \quad [3]$$

ここで $X(t)$ (% of dose)、 $C(t)$ (% of dose/mL) はそれぞれ時間 t における高分子の組織中量及び血漿中濃度、 CL_{org} (mL/h) は血漿中から臓器中への臓器取り込みクリアランス、 K_{out} (1/h) は臓器からの efflux 速度定数を表す。組織からの efflux が無視できる場合 ($K_{out} = 0$) には、式 [3] は式 [4] のように表され、

$$dX(t)/dt = CL_{org} \cdot C(t) \quad [4]$$

この式 [4] を積分することにより、

$$X(t) = CL_{org} \cdot AUC_{0-t} \quad [5]$$

$$X(t)/C(t) = CL_{org} \cdot (AUC_{0-t}/C(t)) \quad [6]$$

となり、動物実験から得られた結果から勘弁に CL_{org} を求めることができる。ここで AUC_{0-t} は投与直後から時間 t までの血中濃度-時間曲線下面積を示す。この式に従い、 ^{111}In 標識体の見かけの臓器取り込みクリアランス値を算出した。各時間までの AUC は非線形最小二乗法プログラム MULTI [88] を用いた当てはめ計算により算出した。

1-2-4-a *In situ* 蛍光イメージングシステムによる臓器分布の観察

【試薬】

VivoTag[®]-S 680 (Dye 680) は Perkin-Elmer 社から購入した。その他の試薬については市販の特級試薬を用いた。

【近赤外蛍光標識体を用いた *in situ* 組織分布評価】

カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体への Dye680 標識は Kobayashi らの方法に準じて行った [89]。Dye680-標識カルボン酸修飾 dendrimer 誘導体の *in situ* 組織分布評価は、ddY 系雄性マウス (5-6 週齢、25 g) を用いて行った。Dye680-標識 PEG(5)-Asp-PAMAM の PBS 溶液を、ddY マウスの尾静脈を介して 100 nmol Dye680/1.0 mg PAMAM/kg の投与量で 100 μL 静脈内投与した。投与後 180 分の時点で、イソフルラン麻酔下でマウス下大静脈より採血を行った後に屠殺するとともに、左心室から生理食塩水 10 mL を用いて灌流後、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺及び右下肢骨を採取した。採取した臓器サンプルはサンプルステージに載せ、IVIS Lumina XRMS Series III Multi-Species Optical and X-Ray Imaging System (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) を用いて *in situ* 臓器イメージング画像を取得した。

1-2-4-b 共焦点レーザー顕微鏡による骨内分布の観察

【試薬】

Xylenol orange tetrasodium salt (XO) と paraformaldehyde (PFA) は和光純薬工業株式会社から購入した。その他の試薬については市販の特級試薬を用いた。

【蛍光標識体を用いた骨内分布評価】

PEG 化 Asp 修飾 PAMAM への FITC 標識は前節までの実験方法に準じて行った。FITC-標識 PEG(5)-Asp-PAMAM の骨内分布評価は、ddY 系雄性マウス (5-6 週齢、25 g) を用いて行った。XO の PBS 溶液を、ddY マウスの尾静脈を介して 30 mg/kg の投与量で 100 μL 静脈内投与した。投与後 3 日目の時点で FITC-標識 PEG(5)-Asp-PAMAM の PBS 溶液を、ddY

マウスの尾静脈を介して 20 μmol FITC/kg の投与量で 100 μL 静脈内投与した。投与 24 時間後、イソフルラン麻酔下で屠殺するとともに、両下肢骨を採取した。採取した下肢骨サンプルは生理食塩水で洗浄後、4% PFA で固定し、大腿骨遠位部から脛骨近位端にかけた矢状断面の凍結非脱灰標本を川本法 (テープ法) [90] で作製した。作製された凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡 (A1R+, Nikon Co., Tokyo, Japan) を用いて観察した。

第 2 章 実験の部

2-2-1 アスパラギン修飾リポソームの調製

【試薬】

DSPC (COATCOME MC-8080) と DSPE-PEG (SUNBRIGHT DSPE-020CN) 及び DPPE-NHS (COATSOME FE-6060SU) は日油株式会社から購入した。Di-*tert*-butyl L-aspartate hydrochloride と PTX は東京化成工業株式会社より購入した。Cholesterol と α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CHCA) 及び HAP は和光純薬工業株式会社から購入した。Phosphatidylcholine, L- α -Dipalmitoyl, [Choline-Methyl- 3 H] (3 H-PC) は Perkin-Elmer 社から購入した。その他の試薬については市販の特級試薬を用いた。

【DPPE-Asp の合成】

DMF に適量の TEA を加えた溶液中で DPPE-NHS に対して 1.1 当量の Di-*tert*-butyl L-aspartate hydrochloride をカップリング反応させた。45 °C で 4 時間インキュベートした後、反応混合液を回転式エバポレーターにて溶媒除去し、90% TFA で脱保護した。室温で 1 時間攪拌した後、溶媒を回転式エバポレーターにて蒸散させ、冷水で沈殿させた後、1,000 MWCO の透析膜にて 1 日以上透析膜ろ過した後に凍結乾燥することで、最終的に DPPE-Asp を得た。得られた DPPE-Asp は MALDAI TOF-MS (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) によって同定した。

【リポソームの調製】

PTX 封入アスパラギン酸修飾リポソームは薄膜水和法 (the thin-film hydration method) にて調製した [91]。各種リポソームの構成組成比は Table 3, 5 に示す。すなわち、クロロホルムに溶解させた脂質及び PTX 混合溶液を回転式エバポレーターにて溶媒除去した。その後、室温にて 1 日以上減圧乾燥した。乾燥した PTX 含有脂質フィルムを PBS (pH 7.4) にて水和し、10 分間超音波処理を施した。得られた懸濁液を Mini-Extruder を用いて 200 nm のポリカーボネート膜にて 11 回エクストルージョンした。得られたリポソーム懸濁液を、Sephadex G-25 カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーを施すことで、未封入の PTX を除去した。回収したリポソーム懸濁液を 4 °C で 30 分間 110,000 $\times g$ にて遠心処理を施し、得られたリポソームを PBS にて再懸濁した。得られた懸濁液を再度 Mini-Extruder を用いて 100 nm のポリカーボネート膜にて 11 回エクストルージョンした。粒子サイズの縮小を目的に超音波処理を施すことで各種リポソームを得た。脂質濃度はリン定量を用いて定量した [92]。PTX 封入アスパラギン酸修飾リポソームの粒子径及び表面電荷測定は、Zetasizer Nano (Malvern Instruments) を用いてそれぞれ、動的光散乱法及び電気レーザー・ドップラー法により測定した。

【PTX の定量】

リポソームに封入された PTX は LC-MS を用いて定量した。200 μL のリポソーム懸濁液に 200 μL のクロロホルムを添加し、激しく攪拌した。攪拌後、混合液を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間 1,600 $\times g$ にて遠心処理を施し、クロロホルム相を試験管に 100 μL 分注した。分注液を蒸発乾固後、200 μL の移動相に再溶解し、そのうち 100 μL を測定サンプルとして LC-MS にてサンプル中の PTX を定量した。

<測定条件>

使用機器 : LCMS-2020 system, Shimadzu, Japan
カラム : Shim-pack VP-ODS (150 mm \times 2.0 mm i.d. 5 μm , Shimadzu, Japan)
移動相 : Methanol/0.1% formic acid (80/20 v/v)
流速 : 0.1 mL/min
カラム温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$
検出方法 : Electrospray ionization, positive scan mode
質量電荷比 : 845 m/z

2-2-4-b PEG-Asp-Lipo (PTX) の顕微鏡画像

【AFM によるリポソームの観察】

AFM による観察は Takegami らの方法に準じて行った [93]。すなわち、脂質濃度が 1 mM のリポソーム懸濁液 10 μL をマイカ上に滴下し、室温で 10 分間静置した。蒸留水でマイカを洗浄し、余分な水分をぬぐい取った。マイカを AFM (Nano Scope IIIa, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) に設置し、123- μm の Si_3N_4 probe (oscillation frequency; 350 kHz, spring constant; 42 N/m) を用いて、リポソーム粒子を tapping mode により観察した。

【TEM による観察】

TEM による観察はネガティブ染色法で実施した。すなわち、フォルムバル支持膜がコートされた銅メッシュにリポソームを吸着させ、2%リンタングステン酸溶液 (pH 7.0) で染色した後、TEM (JEM-1440Plus, JEOL Ltd, Tokyo, Japan) で観察した。

2-2-2-a HAP に対する DPPE-Asp 及び DSPE-PEG の影響

【HAP 結合実験】

HAP 結合評価は Anada らの方法に準じて行った [94]。すなわち、脂質濃度が 50 μM の ^3H -標識リポソーム懸濁液を 11.1 kBq (0.3 μCi) ^3H -PC/mL となるよう、PBS (pH 7.4) 中に調製した。1, 2, 5, 10, 20 mg の HAP を 1.5 mL のチューブに秤量し、リポソーム懸濁液を 200 μL 加え、室温で攪拌した。攪拌後 60 分の時点で 1,500 $\times g$ で 3 分間遠心処理を施し、20 μL の上清中の放射活性を定量した。

HAP 結合率は、次式 [1] に従って算出した。

$$[\text{Liposome}]_{\text{bind}} = 100 - ([\text{Liposome}]_{\text{supernatant}} / [\text{Liposome}]_{\text{without HAP}}) \times 100 \quad [1]$$

ここで $[\text{Liposome}]_{\text{bind}}$ (%) は ^3H -標識リポソームの HAP 結合率であり、 $[\text{Liposome}]_{\text{supernatant}}$ は遠心後の上清 100 μL 中の放射活性を表し、 $[\text{Liposome}]_{\text{without HAP}}$ は 1500 $\times g$ で 3 分間の遠心処理を施した HAP 添加前の ^3H -標識リポソーム溶液 20 μL 中の放射活性を表す。

2-2-2-b, c 及び 2-2-4-c, d PEG-Asp-Lipo (PTX) の体内動態

【試薬】

PTX [2-benzoyl ring- ^{14}C (U)] (^{14}C -PTX) は American Radiolabeled Chemicals 社から購入した。その他の試薬については市販の特級試薬を用いた。

【実験動物】

ddY 系雄性マウス (5-6 週齢、25 g) は清水実験材料株式会社から購入した。

【 ^3H 標識及び ^{14}C 標識】

リポソームへの ^3H 標識及び ^{14}C 標識は、クロロホルムに溶解させた脂質溶液または PTX と脂質の混合液に ^3H -PC、 ^{14}C -PTX を添加し【リポソームの調製】と同様の操作で、 ^3H -標識及び ^{14}C -標識リポソームを調製した。

【静脈内投与後の組織分布実験】

各種リポソームの体内動態は、ddY 系雄性マウス (5-6 週齢、25 g) を用いて行った。PTX 単独の投与液は、0.37 MBq (10 μCi) ^{14}C -PTX/0.17 mg PTX/kg の濃度で PBS (pH 7.4)/ethanol /Cremophor[®] EL (1 mL/1 mL/0.527 g) の混合液を用いて作製した。 ^{14}C -PTX を封入した ^3H -標識リポソームの PBS 溶液を、10 μmol total lipids/kg, 1.85 MBq (50 μCi) ^3H -PC/kg, 0.37 MBq (10 μCi) ^{14}C -PTX/kg の投与量で 100 μL 静脈内投与した。投与後 1, 5, 10, 30, 60, 180, 360 分の時点で、イソフルラン麻酔下でマウス下大静脈より採血を行った後に屠殺するとともに、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺及び右下肢骨を採取した。得られた骨以外の各臓器の重量を測定するとともに放射活性を測定し、体内動態を評価した。薬物動態学的パラメータは第 1 章と同様の方法で算出した。

2-2-3-a 近赤外蛍光を利用した臓器分布イメージング

【試薬】

DiR (XenoLight) は Perkin-Elmer 社から購入した。その他の試薬については市販の特級試薬を用いた。

【リポソームへの DiR 標識】

リポソームへの DiR 標識は、クロロホルムに溶解させた脂質溶液に DiR を添加し【リポソームの調製】と同様の操作でリポソームを調製し、15,000 MWCO の透析膜にて 1 日以上透析膜ろ過し、VIVASPIN-2 (10,000 MWCO) を用いた限外濾過により精製した。

【近赤外蛍光標識体を用いた *in situ* 組織分布評価】

第 1 章と同様の方法で行った。投与液は、DiR-標識 PEG(2)-Asp(33)-Lipo の PBS 溶液を、ddY マウスの尾静脈を介して 1.0 μmol DiR/5.0 mg lipids/kg の投与量で 100 μL 静脈内投与した。臓器の採取は、投与後 360 分の時点で行った。

2-2-3-c アスパラギン酸修飾リポソームの骨内挙動の観察

【試薬】

N-(Fluorescein-5-thiocarbonyl)-1,2-dihexadecyl-sn-gycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (fluorescein DHPE) は AAT Bioquest 社から購入した。その他の試薬については市販の特級試薬を用いた。

【リポソームへの fluorescein 標識】

リポソームへの fluorescein 標識は、クロロホルムに溶解させた脂質溶液に fluorescein DHPE を添加し【リポソームの調製】と同様の操作でリポソームを調製し、15,000 MWCO の透析膜にて 1 日以上透析膜ろ過し、VIVASPIN-2 (10,000 MWCO) を用いた限外濾過により精製した。

【蛍光標識体を用いた骨内分布評価】

第 1 章と同様の方法で行った。投与液は、fluorescein-標識 PEG(2)-Asp(33)-Lipo の PBS 溶液を、ddY マウスの尾静脈を介して 5.0 μmol fluorescein/kg の投与量で 100 μL 静脈内投与した。

2-2-5-a, b PEG-Asp-Lipo (PTX) の骨転移抑制効果の評価

【試薬】

Minimum essential medium eagle (MEM) 及び antibiotic-antimycotic mixed stock solution (10,000 IU/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, and 25 mg/mL amphotericin B; AA) はナカライテスク株式会社より購入した。Fetal bovine serum (FBS) は Biosera 社から購入した。以降の細胞実験で用いるすべての FBS は 56°C、30 分間の非働化処理を行った後に使用した。*In vivo* grade, VivoGlo Luciferin 及び Luciferase Assay System は Promega 社より購入した。

【実験動物】

C57BL/6NCrSlc 系雌性マウス (14-18 g, 4 週齢) は清水実験材料株式会社より購入した。

【培養細胞】

B16-BL6/Luc 細胞は、西川元也先生 (京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野) より供与を受け、10% FBS、1% AA 含有 MEM 培地で 37 °C、5% CO₂ 存在下で培養した。

【骨転移モデルマウスの作製】

骨転移モデルマウスは Arguello らの方法に準じて作製した [95, 96]。すなわち、C57BL/6 系雌性マウスをイソフルラン麻酔下において、左側胸部を切開することにより肋骨を露出させ、B16B-L6/Luc 細胞懸濁液を充てんした注射針を挿入し、心臓の拍動を確認した後に、シリンジ内に動脈血が返ってくるのを確認しながら、左心室内に B16B-L6/Luc 細胞 (1×10^5 cells / 100 μ l / mouse) を投与した。

【PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) の投与及び評価】

PEG(2)-Asp(33)-Lipo (PTX) は 1.5 mg PTX/87 μ mol total lipids/kg の投与量で、マウスの尾静脈を介して投与した。投与時期は、癌細胞投与日を day 0 として、がん細胞の接着抑制を目的とした 0 日目及び 3 日目投与、あるいは、増殖の抑制を目的とした 7 日目及び 10 日目投与とした。癌細胞投与 14 日目に、*in vivo* 微弱光イメージングシステム及びルミノメータによるルシフェラーゼ活性を指標に癌増殖を評価した。

【*In vivo* 微弱光イメージングシステムによる評価】

癌細胞投与 14 日目に、*in vivo* 微弱光イメージングシステムで癌増殖を評価した。すなわち、C57BL/6 系雌性マウスをイソフルラン麻酔下で、D-luciferin (2.5 mg / 100 μ l / mouse、Luciferase Assay Reagent) を腹腔内に投与した 10 分後、マウスを IVIS Lumina XRMS Series III Multi-Species Optical and X-Ray Imaging System (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) のサンプルステージに固定し、下肢骨の癌骨転移イメージングを取得した。

【ルシフェラーゼ活性の測定】

イメージング画像取得後の C57BL/6 系雌性マウスから下肢骨を採取し、lysis buffer (2 mM EDTA \cdot 4Na、0.05 % Triton X-100、0.1 M Tris、pH 7.8 を含む) 中にて下肢骨をホモジネートした。ホモジネート液を 3 回凍結融解し、250 \times g で 10 秒間遠心処理を施した。上清 20 μ l をチューブに採取し、D-luciferin (Luciferase Assay Reagent) 100 μ l を添加した 3 秒後、ルミノメータ (Lumat LB 9507, EG&G Berthold, Bad Wildbad, Germany) にて下肢骨中のルシフェラーゼ活性を 10 秒間測定し、検量線を用いて細胞数へと変換した。

【統計学的解析】

多重比較には Tukey-Kramer 法を行った [97]。

2-2-5-c 破骨細胞に対するアポトーシス誘導

【試薬】

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 及び 2.5g/l-Trypsin/1mmol/l-EDTA Solution はナカライテスク社から購入した。Recombinant mouse soluble RANK ligand は Prospect-Tany Technogene 社から購入した。Annexin V binding buffer と FITC annexin V 及び propidium iodide は BioLegend 社から購入した。

【培養細胞】

RAW264.7 細胞は、10% FBS、1% AA 含有 DMEM 培地で 37 °C、5% CO₂ 存在下で培養した。

【破骨細胞の培養】

破骨細胞への分化は Xu らの方法に準じて行った [98]。まず、マウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞を 1×10^5 cells / mL で 12 well cell culture plate に播種し、37 °C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。その後、10% FBS、1% AA、10 ng RANKL/mL 含有 DMEM 培地に置換し 37 °C、5% CO₂ 存在下で 3 日間培養することで、破骨細胞への分化を誘導した。破骨細胞形成は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) 染色により確認した。

【Annexin V によるアポトーシス誘導評価】

RAW264.7 細胞より分化させた破骨様細胞に PEG(2)-Asp(33)-Lipo の DMEM (FBS(-), AA(-)) 溶液を 20 nM PTX/0.99 μM total lipids/well の濃度で 1 mL 添加した。37 °C で 4 時間インキュベートした後、細胞を trypsin/EDTA を用いて回収し、 1×10^6 cells/mL の濃度で annexin V binding buffer に再懸濁した。その後氷冷下で細胞懸濁液を 1.5 mL チューブに 100 μL 分注し、5.0 μL の FITC annexin V 及び 10 μL の propidium iodide を加えた。陰性対照には 5.0 μL の 1% FBS/PBS 及び 10 μL の 1% FBS/PBS を用いた。室温で 15 分間、暗所にてインキュベートした後、400 μL の annexin V binding buffer を加え polystyrene round-bottom tube with cell-strainer cap を用いて濾過処理を施したものをサンプルとし、フローサイトメトリー (BD LSRFortessa Special Order Research, BD Bioscience, NJ, USA) にてアポトーシス細胞を検出した。

謝辞

終わりに望み、本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 山本 昌教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行に当たり、直接の懇切丁寧な御指導、御教導並びに激励を賜りました京都薬科大学 勝見英正准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

さらに、終始御懇切なる御助言と御指導を賜りました京都薬科大学 坂根稔康准教授 (現神戸薬科大学 教授) に深厚なる謝意を表します。

また、種々の貴重な御助言を賜りました京都薬科大学 森下将輝助教、東京理科大学薬学部生物薬剤学西川研究室 草森浩輔助教に深謝致します。さらに、実験の一部に御協力、御助言、御指導を賜りました京都薬科大学 小林和也准教授、服部恭尚講師、濱 進講師に心から感謝の意を表します。

そして、京都薬科大学薬学分野教室員一同、特に実験に御協力頂いた内藤千尋学士、日比野希美学士、磯部友吾氏、矢木夕美子氏、田中佑果氏、山田沙季氏、秋元昂耀氏、網梨緒奈氏、高木千聖氏、山田 碧氏、清水絵里加氏、中尾優斗氏に万謝致します。

最後に、研究に専念できる環境を与えて下さった母に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Gordon J. Freeman, Andrew J. Long, Yoshiko Iwai, Karen Bourque, Tatyana Chernova, Hiroyuki Nishimura, Lori J. Fitz, Nelly Malenkovich, Taku Okazaki, Michael C. Byrne, Heidi F. Horton, Lynette Fouser, Laura Carter, Vincent Ling, Michael R. Bowman, Beatriz M. Carreno, Mary Collins, Clive R. Wood, Tasuku Honjo. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **2000**, 192, 1027-1034.
- 2) Margaret K. Callahan, Harriet Kluger, Michael A. Postow, Neil H. Segal, Alexander Lesokhin, Michael B. Atkins, John M. Kirkwood, Suba Krishnan, Rafia Bhore, Christine Horak, Jedd D. Wolchok, Mario Sznol. Nivolumab plus ipilimumab in patients with advanced melanoma: updated survival, response, and safety data in a phase I dose-escalation study. *J. Clin. Oncol.* **2017**, 36, 391-398.
- 3) Micheal Kalos, Bruce L. Levine, David L. Porter, Sharyn Katz, Stephan A. Grupp, Adam Bagg, Carl H. June. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.* **2011**, 3, 95ra73.
- 4) David L. Porter, Bruce L. Levine, Micheal Kalos, Adam Bagg, Carl H. June. Chimeric antigen receptor–modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 365, 725-733.
- 5) T. Bury, A. Barreto, F. Daenen, N. Barthelemy, B. Ghaye, P. Rigo. Fluorine-18 deoxyglucose positron emission tomography for the detection of bone metastases in patients with non-small cell lung cancer. *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, 9, 1244-1247.
- 6) Yibin Kang, Peter M. Siegel, Weiping Shu, Maria Drobnjak, Sanna M. Kakonen, Carlos Cordón-Cardo, Theresa A. Guise, Joan Massagué. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, **2003**, 6, 537-549.
- 7) George N. Thalmann, Ploutarchos E. Anezinis, Shi-Ming Chang, Haiyen E. Zhau, E. Edmund Kim, Vicki L. Hopwood, Sen Pathak, Aadrew C. von Eschenbach, Leland W. Chung. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res.* **1994**, 54, 2577-2581.
- 8) Narayan. Sundaresan, In Sup Choi, James E. Hughes, Ved Prakash Sachdev, Alex Berenstein. Treatment of spinal metastases from kidney cancer by presurgical embolization and resection. *J. Neurosurg.* **1990**, 73, 548-554.
- 9) Héctor Peinado, Maša Alečković, Simon Lavotshkin, Irina Matei, Bruno Costa-Silva, Gema Moreno-Bueno, Marta Hergueta-Redondo, Caitlin Williams, Guillermo García-Santos, Cyrus M Ghajar, Ayuko Nitadori-Hoshino, Caitlin Hoffman, Karen Badal, Benjamin A Garcia, Margaret K. Callahan, Jianda Yuan, Vilma R. Martins, Johan Skog, Rosandra N. Kaplan, Mary S. Brady, Jedd D. Wolchok, Paul B. Chapman, Yibin Kang, Jacqueline Bromberg, David Lyden. Melanoma

- exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **2012**, 18, 883-891.
- 10) Toshimi Michigami, Miyuki Ihara-Watanabe, Miwa Yamazaki, Keiichi Ozono. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) is a key molecule of osteoclast formation for bone metastasis in a newly developed model of human neuroblastoma. *Cancer Res.* **2001**, 61, 1637-1644.
 - 11) James R. Berenson, Lee S. Rosen, Anthony Howell, Lester Porter, Robert E. Coleman, Walter Morley, Robert Dreicer, Steven A. Kuross, Allan Lipton, John J. Seaman. Zoledronic acid reduces skeletal-related events in patients with osteolytic metastases. *Cancer*, **2001**, 91, 1191–1200.
 - 12) Robert E. Coleman. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 6243–6249.
 - 13) Takehiko Yamaguchi, Kazuya Tamai, Minoru Yamato, Koichi Honma, Yoshihiko Ueda, Koichi Saotome. Intertrabecular pattern of tumors metastatic to bone. *Cancer*, **1996**, 78, 1388-1394.
 - 14) Katherin N. Weilbaecher, Theresa A. Guise, Laurie K. McCauley. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat. Rev. Cancer*, **2011**, 11, 411-425.
 - 15) N.P. McCabe, S. De, A. Vasanji, J. Brainard, T.V. Byzova. Prostate cancer specific integrin $\alpha\beta 3$ modulates bone metastatic growth and tissue remodeling. *Oncogene*. **2007**, 26, 6238–6243.
 - 16) Theresa A. Guise, Khalid S. Mohammad, Gregory Clines, Elizabeth G. Stebbins, Darren H. Wong, Linda S. Higgins, Robert Vessella, Eva Corey, Susan Padalecki, Larry Suva, John M. Chirgwin. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 6213-6216.
 - 17) I.A. Silver, R.J. Murrills, D.J. Etherington. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* **1988**, 175, 266–276.
 - 18) Steven L. Teitelbaum. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, **2000**, 289, 1504–1508.
 - 19) Hiroyuki Takai, Masahiro Kanematsu, Kazuki Yano, Eisuke Tsuda, Kanji Higashio, Kyoji Ikeda, Ken Watanabe, Yoshiji Yamada. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 27091–27096.
 - 20) Y. Ishikawa, T. Ito. Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture. *Eur. J. Haematol.* **1988**, 40, 126–129.
 - 21) Jonathan S. Harrison, Pranela Rameshwar, Victor Chang, Persis Bandari. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*, **2002**, 99, 394.
 - 22) Sarah L. Dallas, Jennifer L. Rosser, Gregory R. Mundy, Lynda F. Bonewald. Proteolysis of latent transforming growth factor- β (TGF- β)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF- β from bone matrix. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 21352–21360.
 - 23) Sendurai A. Mani, Wenjun Guo, Mai-Jing Liao, Elinor Ng, Eaton, Ayyakkannu Ayyanan, Alicia Y. Zhou, Mary Brooks, Ferenc Reinhard, Cheng Cheng Zhang, Michail Shipitsin, Lauren L. Campbell, Kornelia Polyak, Cathrin Brisken, Jing Yang, Robert A. Weinberg. The

- epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, **2008**, 133, 704-715.
- 24) G.D. Roodman. Mechanism of bone metastasis. *N. Engl. J. Med.* **2004**, 350, 1655–1664.
 - 25) V. Craig Jordan, Susan Gapstur, Monica Morrow. Article navigation selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, 93, 1449-1457.
 - 26) Fred Saad, Jonathan D. Adachi, Jacques P. Brown, Leah A. Canning, Karen A. Gelmon, Robert G. Josse, Kathleen I. Pritchard. Cancer treatment-induced bone loss in breast and prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5465-5476.
 - 27) Catherine H. Van Poznak, Sarah Temin, Gary C. Yee, Nora A. Janjan, William E. Barlow, J. Sybil Biermann, Linda D. Bosserman, Cindy Geoghegan, Bruce E. Hillner, Richard L. Theriault, Dan S. Zuckerman, Jamie H. Von Roenn. American Society of Clinical Oncology executive summary of the clinical practice guideline update on the role of bone-modifying agents in metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2011**, 29, 1221–1227.
 - 28) G.N. Hortobagyi, R.L. Theriault, A. Lipton, L. Porter, D. Blayney, C. Sinoff, H. Wheeler, J.F. Simeone, J.J. Seaman, R.D. Knight, M. Heffernan, K. Mellars, D.J. Reitsma. Long-term prevention of skeletal complications of metastatic breast cancer with pamidronate. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* **1998**, 16, 2038-2044.
 - 29) Roy V. Talmage. Morphological and physiological consideration in a new concept of calcium transport in bone. *Am. J. Anat.* **1970**, 129, 467–467.
 - 30) Ian McCarthy. The physiology of bone blood flow: a review. *J. Bone Joint Surg. Am.* **2006**, 88 (Suppl 3), 4–9.
 - 31) Hidemasa Katsumi, Junya Sano, Makiya Nishikawa, Keiko Hanzawa, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. Molecular design of bisphosphonate-modified proteins for efficient bone targeting in vivo. *PLoS One*, **2015**, 10, e0135966.
 - 32) Yunlong Zheng, Makiya Nishikawa, Mai Ikemura, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida. Development of bone-targeted catalase derivatives for inhibition of bone metastasis of tumor cells in mice. *J. Pharm. Sci.* **2012**, 101, 552–557.
 - 33) Melissa J. Karau, Suzannah M. Schmidt-Malan, Kerryl E. Greenwood-Quaintance, Jayawant Mandrekar, Jian Cai, William M. Pierce Jr, Kevyn Merten, Robin Patel. Treatment of methicillin-resistant staphylococcus aureus experimental osteomyelitis with bone-targeted vancomycin. *SpringerPlus*, **2013**, 2, 329.
 - 34) Paul A. Price, James W. Poser, Neerja Raman. Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bovine bone. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **1976**, 73, 1447–1451.
 - 35) Masaki Noda, Robert L. Vogel, Ann M. Craig, Jean Prahl, Hector F. DeLuca, David T. Denhardt. Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1990**, 87, 9995-9999.

- 36) S. Toyosawa, S. Shintani, T. Fujiwara, T. Ooshima, A. Sato, N. Ijuhin, T. Komori. Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **2001**, 16, 2017-2026.
- 37) Quyen Q. Hoang, Frank Sicheri, Andrew J. Howard, Daniel S.C. Yang. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*, **2003**, 425, 977-980.
- 38) Vincent S. Tagliabracci, James L. Engel, Sandra E. Wiley, Junyu Xiao, David J. Gonzalez, Hitesh Nidumanda Appaiah, Antonius Koller, Victor Nizet, Kenneth E. White, Jack E. Dixon. Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2014**, 111, 5520-5525.
- 39) Ryuichi Fujisawa, Yoshiyuki Wada, Yoshinobu Nodasaka, Yoshinori Kuboki. Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals. *Biochim. Biophys. Acta.* **1996**, 1292, 53-60.
- 40) Shohei Kasugai, Ryuichi Fujisawa, Yoshihiro Waki, Ken-Ichi Miyamoto, Keiichi Ohya. Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)₆ conjugation. *J. Bone Miner. Res.* **2000**, 15, 936-943.
- 41) Daniel K. Yarbrough, Elizabeth Hagerman, Randal Eckert, Jian He, Hyewon Choi, Nga Cao, Karen Le, Jennifer Hedger, Fengxia Qi, Maxwell Anderson, Bruce Rutherford, Ben Wu, Sotiris Tetradis, Wenyuan Shi. Specific binding and mineralization of calcified surfaces by small peptides. *Calcif. Tissue Int.* **2010**, 86, 58-66.
- 42) Stephen Mann. Molecular recognition in biomineralization. *Nature*, **1988**, 332, 119-124.
- 43) Roseita Esfand, Donald A. Tomalia. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today*, **2001**, 6, 427-436.
- 44) Periathamby Antony Raj, Mats Johnsson, Michael J. Levine, George H. Nancollas. Salivary statherin. Dependence on sequence, charge, hydrogen bonding potency, and helical conformation for adsorption to hydroxyapatite and inhibition of mineralization. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 5968-5976.
- 45) K. Kandori, A. Masunari, T. Ishikawa. Study on adsorption mechanism of proteins onto synthetic calcium hydroxyapatites through ionic concentration measurements. *Calcif Tissue Int.* **2005**, 76, 194-206.
- 46) Amal El-Mabhouth, Christo Angelov, Alexander McEwan, Guofeng Jia, John Mercer. Preclinical investigations of drug and radionuclide conjugates of bisphosphonates for the treatment of metastatic bone cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2004**, 19, 627-640.
- 47) Motohiro Hirose, Noriko Kotobuki, Hiroko Machida, E. Uchimura, Hajime Ohgushi. Quantitative monitoring of in vitro mineralization process using fluorescent dyes. *Key Engineering Materials*, **2003**, 240, 715-718
- 48) Lifeng Zhang, Adi Eisenberg. Multiple morphologies of "crew-cut" aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) block copolymers. *Science*, **1995**, 268, 1728-1731.
- 49) Kensuke Osada, R. James Christie, Kazunori Kataoka. Polymeric micelles from poly(ethylene

- glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery. *J. R. Soc. Interface*, **2009**, 6 (Suppl 3), S325-S339.
- 50) Paolo Caliceti, Francesco M. Veronese. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, 55, 1261-77.
 - 51) Elisa Boanini, Paolo Torricelli, Massimo Gazzano, Roberto Giardino, Adriana Bigi. Nanocomposites of hydroxyapatite with aspartic acid and glutamic acid and their interaction with osteoblast-like cells. *Biomaterials*, **2006**, 27, 4428–4433.
 - 52) Peter Kingshott, Helmut Thissen, Hans J. Griesser. Effects of cloud-point grafting, chain length, and density of PEG layers on competitive adsorption of ocular proteins. *Biomaterials*, **2002**, 23, 2043–2056.
 - 53) Marina J. Gorbunoff, Serge N. Timasheff. The interaction of proteins with hydroxyapatite: III. Mechanism. *Anal. Biochem.* **1984**, 136, 440–445.
 - 54) Yasuomi Yamasaki, Kazuya Sumimoto, Makiya Nishikawa, Fumiyoshi Yamashita, Kiyoshi Yamaoka, Mitsuru Hashida, Yoshinobu Takakura. Pharmacokinetic analysis of *in vivo* disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger receptors: importance of molecular size and negative charge density for *in vivo* recognition by receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 301, 467-477.
 - 55) Haruhiko Kamada, Yasuo Tsutsumi, Keiko Sato-Kamada, Yoko Yamamoto, Yasuo Yoshioka, Takayuki Okamoto, Shinsaku Nakagawa, Satoshi Nagata, Tadanori Mayumi. Synthesis of a poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic anhydride) co-polymer and its application for renal drug targeting. *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 399–404.
 - 56) Yoko Yamamoto, Yasuo Tsutsumi, Yasuo Yoshioka, Haruhiko Kamada, Keiko Sato-Kamada, Takayuki Okamoto, Yohei Mukai, Hiroko Shibata, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi. Poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic acid) as a novel renal targeting carrier. *J. Control. Release*, **2004**, 95, 229–237.
 - 57) C.R. Howlett. The fine structure of the proximal growth plate of the avian tibia. *J. Anat.* **1979**, 128, 377–399.
 - 58) B.H. Thorp. Vascular pattern of the developing proximal femur in the domestic fowl. *Res. Vet. Sci.* **1986**, 40, 231–235.
 - 59) Ernest H.S. Choy, Gabriel S. Panayi. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 907–916.
 - 60) Hiroyuki Mori, Riko Kitazawa, Shinichi Mizuki, Masato Nose, Sakan Maeda, Sohei Kitazawa. RANK ligand, RANK, and OPG expression in type II collagen-induced arthritis mouse. *Histochem. Cell Biol.* **2002**, 117, 283–292.
 - 61) Nathan Bucay, Ildiko Sarosi, Colin R. Dunstan, Sean Morony, John Tarpley, Casey Capparelli, Sheila Scully, Hong Lin Tan, Weilong Xu, David L. Lacey, William J. Boyle, W. Scott Simonet. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* **1998**, 12, 1260–1268.

- 62) Suwimon Boonrungsiman, Eileen Gentleman, Raffaella Carzaniga, Nicholas D. Evans, David W. McComb, Alexandra E. Porter, Molly M. Stevens. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2012**, 109, 14170–14175.
- 63) H. Follet, G. Boivin, C. Rumelhart, P.J. Meunier. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone*, **2004**, 34, 783–789.
- 64) Nico van Rooijen, Annemarie Sanders. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods*. **1994**, 174, 83-93.
- 65) Alberto Gabizon, Demetrios Papahadjopoulos. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1988**, 85, 6949-6953.
- 66) Xiang Gao, Leaf Huang. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 179, 280-285.
- 67) Ilya Koltover, Tim Salditt, Joachim O. Rädler, Cyrus R. Safinya. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science*, **1998**, 281, 78-81.
- 68) Kazuma Ogawa, Atsushi Ishizaki, Kenichiro Takai, Yoji Kitamura, Tatsuto Kiwada, Kazuhiro Shiba, Akira Odani. Development of novel radiogallium-labeled bone imaging agents using oligo-aspartic acid peptides as carriers. *PLoS One*, **2013**, 8, e84335.
- 69) Kenji Hyoudou, Makiya Nishikawa, Yukari Umeyama, Yuki Kobayashi, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida. Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase: quantitative analysis with firefly luciferase-expressing melanoma cells. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 7685–7691.
- 70) Christopher J.H. Porter, S. Moein Moghimi, Lisbeth Illum, Stanley S. Davis. The polyoxyethylene/polyoxypropylene block co-polymer poloxamer-407 selectively redirects intravenously injected microspheres to sinusoidal endothelial cells of rabbit bone marrow. *FEBS Lett.* **1992**, 305, 62–66.
- 71) T.M. Allen, A. Chonn. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.* **1987**, 223, 42-46.
- 72) Yechezkel Barenholz. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J. Control. Release*, **2012**, 160, 117-134.
- 73) Thomas J. Walsh, Jesse L. Goodman, Peter Pappas, Ihor Bekersky, Donald N. Buell, Maureen Roden, John Barrett, Elias J. Anaissie. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 3487-3496.
- 74) W. ten Bokkel Huinink, M. Gore, J. Carmichael, A. Gordon, J. Malfetano, I. Hudson, C. Broom, C. Scarabelli, N. Davidson, M. Spaczynski, G. Bolis, H. Malmström, R. Coleman, S.C. Fields,

- J.F. Heron. Topotecan versus paclitaxel for the treatment of recurrent epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **1997**, 15, 2183-2193.
- 75) J.M. Nabholz, K. Gelmon, M. Bontenbal, M. Spielmann, G. Catimel, P. Conte, U. Klaassen, M. Namer, J. Bonnetterre, P. Fumoleau, B. Winograd. Multicenter, randomized comparative study of two doses of paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **1996**, 14, 1858-1867.
- 76) A.L. Jones, M. Barlow, P.J. Barrett-Lee, P.A. Canney, I.M. Gilmour, S.D. Robb, C.J. Plummer, A.M. Wardley, M.W. Verrill. Management of cardiac health in trastuzumab-treated patients with breast cancer: updated United Kingdom National Cancer Research Institute recommendations for monitoring. *Br. J. Cancer*, **2009**, 100, 684–692.
- 77) Wende Kozlow, Theresa A. Guise. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **2005**, 10, 169–180.
- 78) Toshiyuki Yoneda, Toru Hiraga. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 328, 679–687.
- 79) Sandrine Boissier, Mercedes Ferreras, Olivier Peyruchaud, Sandrine Magonno, Frank H. Ebetino, Marc Colombel, Pierre Delmas, Jean-Marie Delaissé, Philippe Clézardin. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res.* **2000**, 60, 2949–2954.
- 80) T.J. Hall, H. Jeker, M. Schaubelin. Taxol inhibits osteoclastic bone resorption. *Calcif. Tissue Int.* **1995**, 57, 463–465.
- 81) Hidemasa Katsumi, Makiya Nishikawa, Rikiya Hirosaki, Tatsuya Okuda, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. Development of PEGylated cysteine-modified lysine dendrimers with multiple reduced thiols to prevent hepatic ischemia/reperfusion injury. *Mol. Pharm.* **2016**, 13, 2867–2873.
- 82) Kelly M. Kitchens, Rohit B. Kolhatkar, Peter W. Swaan, Natalie D. Eddington, Hamidreza Ghandehari. Transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers: Influence of size, charge and fluorescent labeling. *Pharm. Res.* **2006**, 23, 2818–2826.
- 83) https://www.kyoto-phu.ac.jp/education_research/animal/pdf/023.pdf
- 84) D.J. Hnatowich, W.W. Layne, R.L. Childs. The preparation and labeling of DTPA-coupled albumin. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1982**, 33, 327–332.
- 85) Mitsuru Hashida, Yoshinobu Takakura. Pharmacokinetics in design of polymeric drug delivery system. *J. Control. Release*, **1994**, 31, 163-171.
- 86) Yoshinobu Takakura, Akira Takagi, Mitsuru Hashida, Hitoshi Sezaki. Disposition and tumor localization of mitomycin C-dextran conjugates in mice. *Pharm. Res.* **1987**, 4, 293-300.
- 87) Yoshinobu Takakura, Mitsuru Hashida. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1995**, 18, 207-231.
- 88) Kiyoshi Yamaoka, Yusuke Tanigawara, Terumichi Nakagawa, Toyozo Uno. A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.* **1981**, 4, 879–885.

- 89) Hisataka Kobayashi, Yoshinori Koyama, Tristan Barrett, Yukihiro Hama, Celeste A.S. Regino, In Soo Shin, Beom-Su Jang, Nhat Le, Chang H. Paik, Peter L. Choyke, Yasuteru Urano. Multimodal nanoprobe for radionuclide and five-color near-infrared optical lymphatic imaging. *ACS Nano*. **2007**, 1, 258–264.
- 90) Tadafumi Kawamoto. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects, and plants. *Arch. Histol. Cytol.* **2003**, 66, 123–143.
- 91) Yuta Yoshizawa, Yusuke Kono, Ken-ichi Ogawara, Toshikiro Kimura, Kazutaka Higaki. PEG liposomalization of paclitaxel improved its *in vivo* disposition and anti-tumor efficacy. *Int. J. Pharm.* **2011**, 412, 132–141.
- 92) Bruce N. Ames. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* **1966**, 8, 115–117.
- 93) Shigehiko Takegami, Keisuke Kitamura, Hiroto Kawada, Yu Matsumoto, Tatsuya Kitade, Hiroharu Ishida, Chieyo Nagata. Preparation and characterization of a new lipid nano-emulsion containing two cosurfactants, sodium palmitate for droplet size reduction and sucrose palmitate for stability enhancement. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, 56, 1097-1102.
- 94) Takahisa Anada, Y. Takeda, Y. Honda, K. Sakurai, O. Suzuki. Synthesis of calcium phosphate-binding liposome for drug delivery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 4148–4150.
- 95) Francisco Arguello, Raymond B. Baggs, Christopher N. Frantz. Amurine model of experimental metastasis to bone and bone marrow. *Cancer Res.* **1988**, 48, 6876-6881.
- 96) Toyokazu Miki, Seiji Yano, Masaki Hanibuchi, Saburo Sone. Bone metastasis model with multiorgan dissemination of human small-cell lung cancer (SBC-5) cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Oncol. Res.* **2000**, 12, 209-217.
- 97) Harvey J. Keselman, Joanne C. Rogan. A comparison of the modified-Tukey and Scheffe methods of multiple comparisons for pairwise contrasts. *J. Am. Stat. Association*, **1978**, 73, 47-51.
- 98) Jiake Xu, Cathy Wang, Renzhi Han, Nathan Pavlos, Tony Phan, James H. Steer, Anthony J. Bakker, David A. Joyce, Ming H. Zheng. Evidence of reciprocal regulation between the high extracellular calcium and RANKL signal transduction pathways in RAW cell derived osteoclasts. *J. Cell Physiol.* **2005**, 202, 554–562.