

博士学位論文 2018（平成30）年度

アミノ酸トランスポーターを標的とした
温度応答性蛍光プローブ及び薬物キャリアの開発

要約版

慶應義塾大学大学院薬学研究科

松浦 みなみ

目次

第 1 章 序論.....	3
1.1. 研究背景.....	4
1.2. 既往研究と本研究の目的.....	11
第 2 章 がん細胞イメージングを目的とした LAT1 標的型温度応答性蛍光プローブ.....	13
2.1. 緒言.....	14
2.2. 実験.....	14
2.2.1. 試薬及び機器.....	14
2.2.2. 温度応答性ポリマーの合成.....	15
2.2.2.1. Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide- <i>co</i> - <i>N,N</i> -dimethylacrylamide) (P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm)).....	15
2.2.2.2. L-Phenylalanine-P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm) (Phe-P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm)).....	15
2.2.2.3. L-Tyrosine-P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm) (Tyr-P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm)).....	16
2.2.3. 温度応答性ポリマーの物性評価.....	16
2.2.3.1. NMR 測定.....	16
2.2.3.2. ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) 測定.....	16
2.2.3.3. 相転移挙動測定.....	16
2.2.3.4. サイズ測定.....	17
2.2.3.5. ゼータ電位測定.....	17
2.2.4. 細胞培養.....	17
2.2.5. 細胞の LAT1 発現確認.....	17
2.2.5.1. ウェスタンブロッティング.....	17
2.2.5.2. 免疫染色.....	18
2.2.6. L-[³ H]-Leucine 細胞内取り込み阻害.....	18
2.2.7. 蛍光ポリマープローブの合成.....	19
2.2.8. 蛍光ポリマープローブの物理化学的評価.....	19
2.2.9. 蛍光ポリマープローブの細胞内取り込み.....	19
2.2.9.1. 共焦点レーザー走査顕微鏡による観察.....	19
2.2.9.2. フローサイトメトリー分析.....	19
2.2.9.3. アミノ酸による蛍光ポリマープローブの細胞内取り込み阻害.....	20
2.3. 結果及び考察.....	20
2.3.1. 蛍光封入温度応答性ポリマーの合成及び物理化学的評価.....	20
2.3.2. 細胞の LAT1 発現確認.....	26
2.3.3. L-[³ H]-Leucine 細胞内取り込み阻害.....	27
2.3.4. 温度応答性蛍光ポリマープローブの合成及び物理化学的評価.....	28
2.3.5. 蛍光ポリマープローブの細胞内取り込み.....	31

2.4. 結論.....	35
第3章 がん治療を目的とした LAT1 標的型温度応答性薬物キャリア.....	36
3.1. 緒言.....	37
3.2. 実験.....	37
3.2.1. 試薬及び機器.....	37
3.2.2. DOPE 修飾ポリマーの合成.....	37
3.2.3. DOPE 修飾ポリマーの物性評価.....	37
3.2.3.1. NMR.....	37
3.2.3.2. 示差走査熱量 (DSC) 測定.....	38
3.2.4. 蛍光封入温度応答性リポソームの作製.....	38
3.2.5. 蛍光封入温度応答性リポソームの物性評価.....	38
3.2.5.1. 相転移挙動測定.....	38
3.2.5.2. 粒子径測定.....	38
3.2.5.3. ゼータ電位測定.....	38
3.2.6. 細胞培養.....	39
3.2.7. 蛍光封入リポソームの細胞内取り込み.....	39
3.2.7.1. 共焦点レーザー走査顕微鏡による観察.....	39
3.2.7.2. フローサイトメトリー分析.....	39
3.2.8. 薬剤封入温度応答性リポソームの作製.....	39
3.2.9. 薬剤封入温度応答性リポソームの物性評価.....	40
3.2.10. 薬剤封入リポソームの細胞内取り込み.....	40
3.3. 結果及び考察.....	40
3.3.1. 温度応答性リポソームの合成及び物理化学的評価.....	40
3.3.2. 蛍光封入リポソームの細胞内取り込み.....	41
3.3.3. 薬剤封入リポソームの作製及び評価.....	43
3.4. 結論.....	43
第4章 結語.....	45
参考文献.....	47
研究業績.....	61
謝辞.....	63

第 1 章

序論

1.1. 研究背景

近年、個別化医療の進歩を背景に、診断 (diagnostics) と治療 (therapeutics) の融合を意味するセラノスティクス (theranostics) という概念が注目されている^{1,4}。

分子イメージングは、生体内の細胞・組織・分子間相互作用、生物学・生化学的なプロセスの空間的・時間的分布を *in vivo* で観察できるため、がんの診断方法として欠かすことができない^{5,6}。

分子イメージングにおける代表的な診断法は、陽電子放出断層撮影法 (positron emission tomography, PET) や単一光子放出断層撮影法 (single photon emission computed tomography, SPECT) などの、核医学検査法である。放射性同位元素で標識された化合物を、分子プローブとして投与し、放出される放射線を体外から検出、画像化することで、プローブの体内動態や体内分布を可視化する。PET は、核種の β^+ 崩壊により放出されたポジトロンが、反物質である電子と衝突した際に反対方向に2本同時に放射される対消滅 γ 線を検出しており、ポジトロン放出核種として ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F などが汎用されている。いずれも半減期が短く、病院内にポジトロン放出核種を用時製造するために、サイクロトロンや自動合成・無菌製剤化装置が必要という課題があった。現在では、放射性医薬品としての承認・供給が開始されたことで、PETカメラのみで診断が可能となり、主に2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose (^{18}F -FDG) を用いたPET診断が普及している⁷⁻⁹。がん細胞においては、酵素が十分に供給されている状態でも、嫌氣的解糖系が顕著な増加により (Warburg 効果^{10,11})、グルコースの必要量が増加するため、グルコーストランスポーター1 (GLUT1) の発現が上昇している¹²。この性質を利用して、GLUT1によりがん細胞内へ取り込まれた ^{18}F -FDGは、 ^{18}F -FDG-6-リン酸で代謝が止まり、細胞内に集積する。グルコース利用率の高い脳組織の正常細胞や炎症細胞にも取り込まれることから^{13,14}、心疾患やてんかんの診断にも保険適用されている。

SPECT は、核種から放出される γ 線を直接測定しており、主に、 ^{67}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I などが用いられている。PET核種に比べて半減期が長い、定量性には劣る。がん全般に集積するプローブとして、主に ^{67}Ga クエン酸ガリウムが用いられており¹⁵、血清中のトランスフェリンとの反応で発生する ^{67}Ga トランスフェリンが、がん細胞表面のトランスフェリン受容体を介して、細胞内へ取り込まれるという集積機序が想定されている。骨、心筋や脳などの組織や、抗体で特異的発現を標的とするプローブも用いられている。

磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging, MRI) 検査は、磁場中の原子核や電子が特定の周波数のエネルギーを吸収する核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance, NMR) 現象を利用して、組織の性状を可視化する画像診断技術である。臨床で用いられているMRIは、体内の水分子中の水素原子核 (^1H) の信号を画像化している。腫瘍組織中の水の ^1H 緩和時間は、正常組織に比べて延長する¹⁶。特定の臓器や、より高コントラストの画像を得るために用いられるMRI造影剤は、ガドリニウムイオン (Gd^{3+}) 錯体

や超常磁性酸化鉄粒子 (SPIO) で、核医学検査と同様に標的分子へ特異的に結合するプローブを使用することもできる。しかし、低感度であることから微量分子を標的としたイメージングは難しいとされている。

PET、SPECT や MRI と比較して、光イメージングは、特別な施設が必要なく、測定装置も小型かつ安価であるため、基礎研究では幅広く用いられている。光イメージングに用いられる蛍光プローブとしては、蛍光タンパク質や有機合成低分子が主に開発されてきた。蛍光タンパク質プローブは、2 つの蛍光タンパク質間のエネルギー移動 (FRET) による蛍光波長の変化を検出原理としており、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) が汎用されている。遺伝子導入で細胞に発現させることによって、簡便に可視化できるという利点がある反面、検出対象分子の少なさ、細胞内のプローブ発現量の制御の難しさ、蛍光タンパク質中で蛍光団の生成に時間を要すること等が課題として挙げられる。一方、有機合成低分子プローブは、Ca²⁺ 蛍光プローブ 1-[6-amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, pentapotassium salt (fura-2)¹⁷ のように、元々は無蛍光であるが、検出対象分子と結合することで蛍光を発するようになる分子内電荷移動 (intramolecular charge transfer, ICT) を検出原理として用いていることが多い。励起された蛍光分子と近傍分子との間や、独立した共役系を有する同一分子内で電子が移動する光誘起電子移動 (photoinduced electron transfer, PeT) を原理とした、腫瘍部位でのみ蛍光が ON となる *activatable probe* の開発も進められている^{18,19}。

臨床においては、インドシアニンググリーン (ICG) や 5-aminolevuloic acid (5-ALA) などが応用されている。従来、眼底検査に用いられてきた近赤外蛍光色素の ICG²⁰ は、センチネルリンパ節²¹ の同定に用いられている。センチネルリンパ節とは、腫瘍内からがん細胞が最初に辿り着くリンパ節と定義されており、ICG を皮下または皮内に投与し、体外からセンチネルリンパ節を同定、摘出して転移の有無を判断する、センチネルリンパ節生検という診断手技が実施されている。センチネルリンパ節に転移がないと判断された場合には、リンパ節郭清を省略できるため、浮腫等の合併症を避けられるという患者の QOL 向上に繋がる。現状、保険適用は乳癌と悪性黒色腫のみであるが、胃癌等の他の癌種にも用いられている。

5-ALA は、光線力学診断 (photodynamic diagnosis, PDD) や光線力学療法 (photodynamic therapy, PDT) において、フォトフィリン²²、ポルフィリン系誘導体 (レザフィリン²³、ATX-S10(Na)²⁴) に次ぐ第3世代光感受性物質として登場した。PDD 及び PDT では、皮膚に集積した光増感剤に起因する光線過敏症が課題とされていたが、5-ALA は生体内に含まれるアミノ酸であるため、その副作用を軽減することができる^{25,26}。5-ALA は、正常細胞においては、プロトポルフィリン IX (PpIX) を経てへムに変換されるが、がん細胞では、へムの代謝が阻害されており、PpIX が蓄積する。PpIX は、光感受性を有しており、レーザー光の照射によって励起状態から基底状態に戻る際に励起一重項酸素 (¹O₂) を生成し、腫瘍細胞を壊死させることができる²⁷。術前に

経口投与することで、術中の観察及び治療が可能であり²⁸、現在では、脂溶性で組織浸透性が向上した5-ALA誘導体のhexyler hexaaminolevulinic acid (Hexvie®)も販売されている²⁹。しかし、がんの再発に深く関わるがん幹細胞の5-ALAによる検出を免れる特性が発見され、併用療法も提案され始めている³⁰。

光イメージングは、比較的感度が高いものの、いずれの蛍光物質も深部の観察が難しいことから、現時点では体表面や体腔鏡を用いた観察、術中検査に限られている。今後、PET/CTのように他のモダリティの診断技術との併用や、蛍光プローブの多様な分子設計により、深部における高次の観察が可能となることが期待される。

Table 1.1 Imaging systems^{5,6}.

Technique	Clinical use	Resolution	Depth	Time for image acquisition	Quantitative	Cost
MRI	Yes	10-100 μm	No limit	Minutes to hours	Yes	>US\$300,000
CT	Yes	50 μm	No limit	Minutes	Yes	US\$100,000-300,000
Ultrasound	Yes	50 μm	cm	Seconds to minutes	Yes	US\$100,000-300,000
PET	Yes	1-2 mm	No limit	Minutes to hours	Yes	>US\$300,000
SPECT	Yes	1-2 mm	No limit	Minutes to hours	Yes	US\$100,000-300,000
Fluorescence reflectance imaging	Yes	2-3 mm	<1 cm	Seconds to minutes	No	<US\$100,000
FMT	In development	1 mm	<10 cm	Minutes to hours	Yes	US\$100,000-300,000
Bioluminescence imaging	No	Several mm	cm	No	No	US\$100,000-300,000
Intravital microscopy	In development	1 μm	<400-800 μm	No	No	>US\$300,000

ドラッグデリバリーシステム (drug delivery system, DDS) は、体内の薬剤分布における量、空間、時間を制御する薬剤運搬技術であり、その目的は、放出制御、吸収改善、標的指向化に大別される。がん治療においては、生体内における薬剤の不活化や目的部位以外への移行による副作用を防ぐために、キャリアを利用したターゲティング法は、最も一般的で有用性が高い。これらは、薬物に化学結合させて制御する方法と、粒子に薬物を封入または吸着させて制御する方法に大別される。前者は、プロドラッグをはじめ、薬物へ抗体、リガンド、細胞膜透過性ペプチド、糖鎖やポリエチレングリコール (PEG) などを結合させる方法である。なかでも、PEG は、アルブミンに共有結合させると抗原性が低下することや、血中滞留性が向上することが報告されて以来^{31,32}、多くの PEG 化医薬品が上市された^{33,34}。後者は、高分子ミセル、高分子スフィアやリポソームなどの粒子の機能によって、標的化や薬物の放出制御を行う。このうち、リポソームは、1964年の発見以来³⁵、様々な研究がなされてきた。リン脂質

から構成されるリポソームは、生体内に投与されると異物として認識され、肝臓や脾臓などの細網内皮系 (reticuloendothelial system, RES) に取り込まれ、血中より消失してしまう³⁶⁻³⁹。そこで、RESを回避するリポソーム⁴⁰として、PEGを用いたリポソームが開発された⁴¹⁻⁴⁴。血中においては、RESによるリポソームの捕獲に先立って、血清タンパク質(オプソニン)がリポソーム表面に結合すると⁴⁵、組織に存在する単核食細胞系が、異物として認識したリポソームを貪食するが、PEG修飾によりリポソーム表面が水和層で覆われることや、PEG鎖自体の立体障害により、オプソニン結合が回避できる⁴⁶⁻⁵¹。また、血液中を循環するリポソームは、腫瘍組織へ受動的に集積する。これは、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果と呼ばれており⁵²、固型腫瘍組織では正常細胞に対して血管透過性が約3~10倍亢進し⁵³⁻⁵⁶、さらにリンパ毛細管による排泄機能が欠如しているため、高分子が長く保持される現象である。また、EPR効果を示すためには、粒子径のサイズが200 nm以下⁵⁷⁻⁶⁰であることも必要である。現在では、放出制御(局所作用、全身作用)やパッシブターゲティングを目的とした数々のリポソーム製剤が上市されている。

Table 1.2 Launched of liposomes⁶¹.

Product name	Component	Lipid composition	Indication	Launch
AmBisome	Amphotericin B	HSPC/cholesterol/ DSPG/ α -tocopherol	Fungal infection, leishmaniasis	1990
Amphotec / Amphocil	Amphotericin B	cholesteryl sulfate	Fungal infection, leishmaniasis	1993
Epaxal/ HAVpur/ VIROHEP-A	Inactivated hepatitis A virus (strain RG-SB)	DOPC/DOPE/HA & NA glycoproteins	Hepatitis A	1994
Abelcet2)	Amphotericin B	DMPC/DMPG	Fungal infection, leishmaniasis	1995
DaunoXome	Daunorubicin	DSPC/cholesterol	AIDS-related Kaposi's sarcoma	1995
Doxil/ Caelyx	Doxorubicin	HSPC/cholesterol/ MPEG-DSPE	Ovarian cancer, breast cancer, AIDS-related Kaposi's sarcoma	1995
Inflexal V	Influenza virus surface antigens	lecithin	Influenza	1997
DepoCy (t e) / Savedar	AraC	DOPC/cholesterol/ DPPG/triolein	Lymphatic meningitis	1999
Visudyne	Verteporfin	eggPG/DMPC	Age-related macular degeneration	1999
Myocet	Doxorubicin	eggPC/cholesterol	Metastatic breast cancer	2001
Lipo-Dox	Doxorubicin	DSPC/cholesterol/MPEG-DSPE	Ovarian cancer, breast cancer, AIDS-related Kaposi's sarcoma	2002
DepoDur/ DepoMorphine	Morphine	DOPC/cholesterol/DPPG/triolein	Anesthetic	2004
Lipusu	Paclitaxel	eggPC/cholesterol	Breast cancer, metastatic breast cancer	2004
Marqibo	Vincristine	SM/cholesterol	Acute lymphocytic leukemia	2012
Exparel	Bupivacaine	DPPG/cholesterol/tricaprylin/DEPC	Local anesthetic	2012

一方、EPR 効果による標的腫瘍組織への集積後、標的細胞内へ選択的に作用するために、葉酸^{62,63}、糖鎖^{64,65}、上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF)⁶⁶、RGD ペプチド⁶⁷、トランスフェリン^{68,69} のような特定の受容体に対するリガンドや抗体⁷⁰ などのアクティブターゲティング能の付与⁷¹ が重要である。細胞内への取り込みにおいてクラスリン依存性エンドサイトーシスの場合には、形成される被覆小胞は、およそ 120 nm であるため、リガンド修飾語のリポソームのサイズは考慮する必要がある⁷²。また、特定の刺激に応答した薬物放出として、温度⁷³⁻⁷⁷、光⁷⁸⁻⁸¹、磁気、超音波^{82,83} などの物理的方法や、pH⁸⁴⁻⁸⁸、イオン組成、グルコース濃度などの化学刺激を用いた方法が研究されている⁸⁹。このうち、温度による外部刺激は、最も簡便な手法である。温度制御能を有するリポソームの最初の報告は、リポソーム膜のゲル-液晶相転移によるものであったが⁷³、その後、高分子を複合化した⁹⁰ 機能性リポソームが検討された。両親媒性の分子構造を持つ高分子は、下限臨界溶解温度 (lower critical solution temperature, LCST) を境に、水和-脱水和を可逆的に引き起こすことが知られている。これは、LCST 以下では高分子は水分子と水和しているが、LCST 以上では温度上昇に伴って水分子の運動性が増し、高分子鎖から脱水和することで不溶性を示すためである。LCST 型相転移を起こす高分子は、ポリ (N-アルキル置換アミド)⁹¹、ポリ (N-ビニルアクリルアミド置換アミド)⁹²、ポリ (ビニルアルキル置換エーテル)⁹³、ポリエチレングリコール/ポリプロピレングリコールブロック共重合体⁹⁴ などである。特に、Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)^{95,96} は、体温付近の 32°C に LCST を有することから、DDS^{97,98}をはじめ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁹⁹⁻¹⁰⁴ や再生医療用材料¹⁰⁵⁻¹¹¹ など、様々な研究に用いられている¹¹²。ポリマーの LCST は、共重合に使用するモノマーによっても、特定の温度に調整することが可能であり¹¹³⁻¹¹⁶、温度応答性ポリマーを修飾したリポソームは、それらの優れた安定性ならびに薬物及び遺伝子デリバリー能を有することが報告されている^{75-77,117-125}。

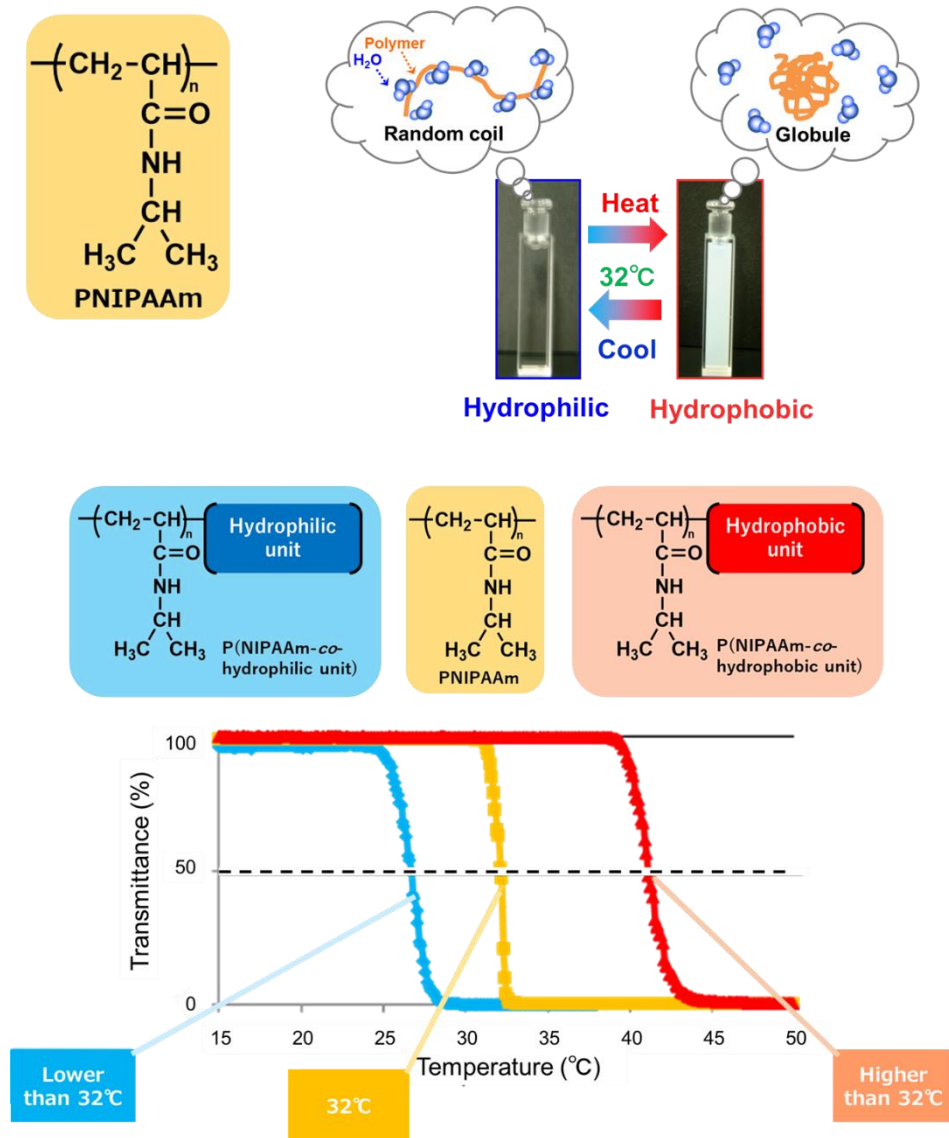


Figure 1.1 Characterization of PNIPAAm.

がん細胞の代謝は、悪性度の維持のためにリプログラミングされており^{10,11}、診断・治療には、がん細胞特異的な様々なターゲットが検討されている。前述した GLUT1 以外のトランスポーターの発現が変化していることも知られており^{126,127}、L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1)¹²⁸、L 型アミノ酸トランスポーター3 (LAT3)¹²⁹、ASC トランスポーター2 (ASCT2)¹³⁰、アミノ酸トランスポーターシステム B^{0,+} (ATB^{0,+})¹³¹、及び system x_c⁻ transporter-related protein (xCT)¹³² は、発現の増加が報告されているアミノ酸トランスポーターである。これらの発現の増加に伴い、腫瘍組織内は近接する非腫瘍組織に比べて、アミノ酸の組織含量の増加が報告されている¹³³。

LAT1 は、leucine、isoleucine、valine、phenylalanine、tyrosine、tryptophan、methionine 及び histidine といった分岐アミノ酸や芳香族アミノ酸などの嵩高い側鎖をもつ中性アミノ酸を Na⁺非依存的に輸送するトランスポーターであり、1 回膜貫通型の II 型膜タンパク質 4F2hc とジスルフィド結合により連結している¹³⁴。LAT1 の基質認識の機序として、 α -アミノ基と α -カルボキシル基による正電荷と負電荷が認識され¹³⁵、N-メチル化やエステル化されたアミノ酸は、基質としての活性を失うことが知られている。さらに、疎水性の嵩高い側鎖を持つアミノ酸を好むことから、基質認識には、側鎖の疎水性が重要と考えられている。また、LAT1 は、リンパ球の活性化、ホルモンによる刺激などにより、高度に発現が誘導される。正常細胞においては、脳、骨髄、胎盤、精巣などにその mRNA が検出される^{136,137} が、タンパク質として存在している臓器は限られており、胎盤関門と血液脳関門にその存在が確認されている^{138,139}。腫瘍組織においては、脳、肺、結腸、乳房、グリア細胞、前立腺および膵臓などで高発現しており¹⁴⁰⁻¹⁴⁵、過剰発現は転移の予後因子でもある¹⁴⁶。LAT1 は、mTOR 経路などを活性化することにより、細胞増殖のための栄養素である必須アミノ酸を供給している¹⁴⁷。

Table 1.3 LAT1 expression of human tumors¹⁴⁸.

Link to disease	Expression
Uterine cervical carcinoma	Higher in invasive squamous cell carcinoma than in cervical intraepithelial neoplasia
Non-small cekk lung cancer	Higher in patients with mediastinal lymph node metastases than in those without
Oral cancer	High
Breast cancer	High
Renal cell carcinoma	High
Esophageal squamous cell carcinoma	High
Leukemic	High
Cholangiocarcinoma	High, associated with increased proliferation
Multiple myeloma	Higher in infiltrating glioma cells than in cells located in the center of the tumor
Malignant gliomas	High
Gastric cancer	High
Thymic carcinomas	High

LAT1 をターゲットとした診断法として、LAT1 選択的な PET プローブである L-[3-¹⁸F]- α -methyltyrosine (¹⁸F-FAMT)¹⁴⁹⁻¹⁵¹、L-p-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-phenylalanine)¹⁵²、5-(2-¹⁸F-fluoroethoxy)-L-tryptophan)¹⁵³ や s-(3-[¹⁸F]fluoropropyl)-D-homocysteine)¹⁵⁴ が開発され、特に ¹⁸F-FAMT では ¹⁸F-FDG よりも正常組織でのバックグラウンドが低く、非腫瘍部位に取り込まれない腫瘍選択性の高い PET 診断の可能性が示唆されている¹⁵⁵。また、SPECT において用いられる L-3-[¹²³I]- α -methyl tyrosine¹⁵⁵ や、ホウ素中性子補足療法 (BNCT) で用いられる L-p-boronophenylalanine (BPA) も腫瘍部位への集積において LAT1 が関与している^{156,157} ほか、LAT1 を阻害することで抗腫瘍効果が得られることも報告されている¹⁵⁸。LAT1 を標的とした薬物キャリア¹⁵⁹ も報告されているが、LAT1 が発現している一部の正常細胞にも識別されるため、がん細胞特異的な放出制御が望まれる。

1.2. 既往研究と本研究の目的

がん細胞を診断及び治療するために、がん細胞で過剰発現しているトランスポーター、LAT1 を標的とした診断プローブや薬物キャリアが報告されている¹⁴⁹⁻¹⁵¹。しかし、それらのプローブや薬物キャリアは、認識される血液脳関門や胎盤関門などの一部の正常細胞や炎症細胞に発現する LAT1 にも認識されるため、誤診断やがんの発見が遅れる可能性があり、標的腫瘍組織へターゲティングされた後に標的がん細胞のみへ作用する制御の付与が必要と考えられる。そこで、制御因子として温度を用いた、LAT1 を標的とした温度応答性蛍光プローブ及び薬物キャリアの開発を行うこととした。

温度応答性ポリマーである PNIPAAm は、ポリマー鎖の末端に蛍光基 (FL) を修飾した PNIPAAm-FL が、LCST 以下では細胞内へ取り込まれないのに対し、LCST 以上で細胞内への取り込みを示し、温度による細胞内取り込み制御が可能であることが報告されている¹⁶⁰。また、細胞内への取り込み温度は、PNIPAAm 鎖へ共重合するモノマーにより、体温付近へ調節可能なことや、LCST を pH によって変化させることで、低 pH 環境下のみで細胞内取り込みが可能となることも報告されている¹⁶¹。さらに、膜融合脂質である L- α -phosphatidylethanolamine, dioleoyl (DOPE) を PNIPAAm の末端に修飾したポリマーは、DOPE 非修飾ポリマーに比べて、より迅速に細胞内へ取り込まれることも報告されている¹⁶²。また、温度応答性ポリマーを修飾したリポソームも、温度による細胞内への取り込みが制御可能であり^{124,125}、ポリマーヘカチオン性のモノマーを共重合することにより、遺伝子デリバリーへの可能性も報告されている^{124,125}。

そこで本研究では、がん細胞に過剰発現している LAT1 標的部位としてアミノ酸、温度による細胞内取り込み制御能として温度応答性ポリマーを有する、2 つの要素を組み合わせた効果的な蛍光プローブ及び薬物キャリアを設計することとした。まず、

アミノ酸を修飾した温度応答性ポリマーに蛍光基を修飾し、がん細胞イメージングを目的とした LAT1 標的型温度応答性蛍光プローブの検討を行った。次に、アミノ酸修飾温度応答性ポリマーに脂質を結合、リポソームへ修飾し、がん治療を目的とした LAT1 標的型温度応答性薬物キャリアの検討を行った。

第 2 章

がん細胞イメージングを目的とした
LAT1 標的型温度応答性蛍光プローブ

2.1. 緒言

がん細胞で過剰発現しているトランスポーターを標的として、低分子の PET 診断薬が臨床で使用されている^{155,163}。近年、がん細胞のトランスポーターを標的とした蛍光プローブの研究が盛んに行われており、標的能を有するポリマーのプローブへの応用が検討されている。例えば、ASCT2 に対する複数のリガンド部を有する蛍光ポリマーは、既存のリガンドより高い親和性を有することが報告されている¹⁶⁴。しかし、これらのプローブは、正常細胞で発現するトランスポーターによっても認識されるので、標的細胞に対する選択性が改善されたプローブの開発が必要である。がん細胞及びその周辺的环境は、正常細胞のそれらとは異なる（例えば、高温¹¹ や低 pH^{165,166}）ため、これらの条件を利用してプローブの反応挙動を誘発することが、有用と考えられる。本技術の応用により、腫瘍組織近傍での投与による術中診断への可能性が期待される。

本検討では、外部環境の温度による細胞内取り込みを制御可能な温度応答性ポリマーを基とした LAT1 標的蛍光ポリマープローブを開発し、ポリマープローブと LAT1 との親和性を評価した (Figure 2.1)。

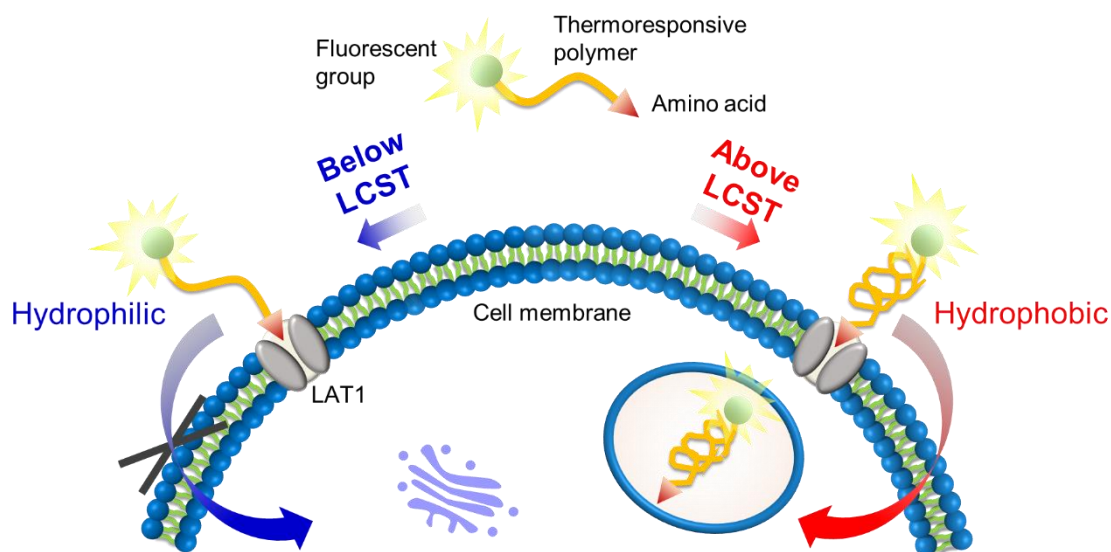


Figure 2.1. The concept of LAT1-targeting thermoresponsive fluorescent polymer probes.

2.2. 実験

2.2.1. 試薬及び機器

N-Isopropylacrylamide (NIPAAm) は、KJケミカルズ株式会社より供与されたものを、*n*-hexane で再結晶し精製した。*N,N*-Dimethylacrylamide (DMAAm) 及び 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) は、富士フイルム和光純薬より入手し、それぞれ蒸留

と再結晶で精製した。4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid、*N*-hydroxysuccinimide (NHS) 及び fluorescein-5-maleimide (FL) は、Merck KGaA (Darmstadt, Germany) より入手した。L-Phenylalanine 及び L-tyrosine は、ペプチド研究所より入手した。*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) は、関東化学より入手した。4-Dimethylaminopyridine (DMAP) は、東京化成より入手した。水は PURELAB FLEX (オルガノ) で精製した。

2.2.2. 温度応答性ポリマーの合成

2.2.2.1. Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N,N*-dimethylacrylamide)

(P(NIPAAm-*co*-DMAAm))

NIPAAm (5.0 g, 44 mmol) 及び DMAAm (0.6 g, 6.1 mmol) を DMF (15 mL) に溶解した。ラジカル開始剤として AIBN (31 mg, 19 mmol)、RAFT 剤として 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid (105 mg, 0.6 mmol) を溶液に添加した。窒素ガスによる 20 分間のバブリングで反応溶液中の酸素を除去し、70°C で 24 時間重合させた。重合後、溶液をジエチルエーテルに滴下し、合成したポリマーを析出させた。沈殿物をアセトンに溶解し、ジエチルエーテルを用いた沈殿により精製し、濾過、真空乾燥後、P(NIPAAm-*co*-DMAAm12.5%) (2.5 g) を白色固体として得た。同様の手順で、NIPAAm (5.0 g, 44 mmol)、DMAAm (1.1 g, 11 mmol)、AIBN (33 mg, 20 mmol) 及び 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid (114 mg, 0.7 mmol) から P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%) (2.9 g) を得た。また、NIPAAm (5.0 g, 44 mmol)、DMAAm (2.4 g, 24 mmol)、AIBN (40 mg, 25 mmol) 及び 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid (137 mg, 0.8 mmol) から P(NIPAAm-*co*-DMAAm35%) (3.0 g) を得た。

2.2.2.2. L-Phenylalanine-P(NIPAAm-*co*-DMAAm) (Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm))

P(NIPAAm-*co*-DMAAm12.5%) (1.0 g, 0.07 mmol) をジクロロメタン (7 mL) に溶解した。NHS (19.2 mg, 0.17 mmol) 及び DCC (34.4 mg, 0.17 mmol) をポリマー溶液に添加し、室温で 24 時間反応させた。沈殿したジシクロヘキシル尿素を濾過により除去した後、ジエチルエーテルを用いて粗生成物をさらに精製し、濾過、乾燥後、NHS-P(NIPAAm-*co*-DMAAm12.5%) を白色固体として得た。L-Phenylalanine (27.5 mg, 0.17 mmol) 及び Na₂CO₃ (17.7 mg, 0.17 mmol) を精製水 (3 mL) に溶解し、NHS-P(NIPAAm-*co*-DMAAm12.5%) を添加し、溶解した。次いで、アセトン (7.5 mL) を溶液に添加し、25°C で 24 時間反応させた。反応後、アセトンを揮発させ、残留物を濾過により除去し、透析膜 (分画分子量: 3,500; Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) で濾液を精製した。ポリマー溶液の精製後、Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm12.5%) (600 mg) を白色固体として得た。同様の手順で、

P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%) から Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%) (545 mg) 、
P(NIPAAm-*co*-DMAAm35%)から Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm35%) (588 mg) を得た。

2.2.2.3. L-Tyrosine-P(NIPAAm-*co*-DMAAm) (Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm))

既報の方法¹⁶⁷に従い、L-tyrosine 及び *tert*-butyl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-tyrosine のアミノ基及びカルボキシル基の保護を行った。P(NIPAAm-*co*-DMAAm12.5%) (1.0 g、0.07 mmol) をジクロロメタン (4 mL) に溶解した。ポリマー溶液に *tert*-butyl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-tyrosine (40 mg、0.13 mmol) 、DMAP (16 mg、0.13 mmol) 及び DCC (69 mg、0.33 mmol) を添加し、室温で 24 時間反応させた。反応後、ジエチルエーテル中でポリマーを沈殿させ、*tert*-butyl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-tyrosine-P(NIPAAm-*co*-DMAAm12.5%) (880 mg) を黄色固体として得た。次いで、*tert*-butyl 及び *tert*-butoxycarbonyl の脱保護を行った。*tert*-Butyl (*tert*-butoxycarbonyl)-L-tyrosine-P(NIPAAm-*co*-DMAAm12.5%)をジクロロメタン (3 mL) に溶解し、トリフルオロ酢酸 (2 mL) を溶液に加えた。室温で 24 時間反応後、透析膜 (分画分子量：3,500) を用いて溶液を精製した。粗生成物をヘキサン (300 mL) で沈殿させて精製し、濾過、乾燥後に Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm12.5%) (477 mg) を得た。同様の手順で、P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)から Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%) (491 mg) 、P(NIPAAm-*co*-DMAAm35%)から Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm35%) (462 mg) を得た。

2.2.3. 温度応答性ポリマーの物性評価

2.2.3.1. NMR 測定

¹H-NMR スペクトルは、400 MHz 超伝導フーリエ変換核磁気共鳴装置 (Agilent Technologies、California、USA) で測定した。

2.2.3.2. ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) 測定

分子量は、GPC システム (GPC-8020、東ソー) を用いて測定した。TSK ガードカラム及び 2 本の TSK GEL α -M カラムを使用した。移動相は、10 mM LiCl/DMF 溶液で、流速は、1.0 mL/min とした。試料は、移動相に溶解し (0.5 mg/mL) 、カラム温度は、40°C とした。キャリブレーションは、ポリエチレングリコール標準品 (東ソー) を用いて行った。

2.2.3.3. 相転移挙動測定

ポリマーの LCST は、UV-VIS 分光光度計 (V-630、Jasco) を用いて、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) 溶液 (0.5 w/v%) 中の温度変化による光透過率を測定することにより決定した。溶液の透過率は、500 nm で測定した。PT-31 ペル

チェシステム (Krüss, Hamburg, Germany) 及び ETC-717 コントローラ (Jasco) で温度制御を行い、加熱速度は、 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ とした。LCST は、溶液の 50% 透過率時の温度とした。

2.2.3.4. サイズ測定

ポリマーのサイズは、粒子径・ゼータ電位・分子量測定装置 (Zetasizer Nano ZS、Malvern Panalytical、Grovedwood Road、Malvern、UK) を用いて、動的光散乱 (DLS) により測定した。PBS 溶液 ($200\ \mu\text{g}/\text{mL}$) を 25°C から 55°C の間で評価した。

2.2.3.5. ゼータ電位測定

ポリマーのゼータ電位は、ゼータ電位・粒径・分子量測定システム (ELS-Z2、大塚電子) を用いて、光散乱電気泳動法 (ELS) により測定した。PBS 溶液 ($200\ \mu\text{g}/\text{mL}$) を 25°C から 55°C の間で評価した。

2.2.4. 細胞培養

HeLa 細胞 (ヒト子宮頸部癌細胞) 及び HEK 293 細胞 (ヒト胎児腎細胞由来) (RIKEN BRC Cell Bank) は、10% ウシ胎児血清 (FBS; Bioserum, Victoria, Australia) 、50 units/mL penicillin、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin 及び 146 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-glutamine 含有 MEM 培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で 37°C 、5% CO_2 下でインキュベートした。

2.2.5. 細胞の LAT1 発現確認

2.2.5.1. ウェスタンブロッティング

HeLa 細胞及び HEK 293 細胞を lysis buffer (1 M Tris-HCl (pH 7.4)、5 N NaCl、500 nM EDTA、20% TritonX-100 及び complete mini-EDTA-free) に溶解し、氷中で超音波破碎した。溶解液を 4°C 、 $16,000\times\text{g}$ で 10 分間遠心分離し、Pierce BCA protein assay reagent kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、マイクロプレートリーダーでタンパク質濃度を測定した。溶解液を緩衝液に再懸濁し、5 \times SDS-sample buffer (10% sodium dodecyl sulfate、25% 2-mercaptoethanol、250 mM Tris-HCl (pH 7.4) 及び 50% glycerol) で処理した。タンパク質サンプルを 98°C で 5 分間加熱し、次いで SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を 45 分間行った。分離したタンパク質を Immobilon-P PVDF 膜 (Merck KGaA) に転写し、膜を 5% 乾燥スキムミルクに浸漬し、 4°C で一晩ブロッキングした。ブロッキング後、膜は抗ヒト L 型アミノ酸トランスポーター (LAT1) ポリクローナル抗体 (1:500; トランスジェニック) または抗 β -actin antibody rabbit (1:1000; Merck KGaA) を一次抗体として、室温で 1.5 時間反応させた。インキュベーション後、膜を TBST 緩衝液 (Tris-HCl (pH 7.4) 、5 N NaCl、Tween20 及び H_2O) で洗浄し、ECL anti-rabbit IgG HRP-linked whole antibody donkey (1:10,000; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を二次抗体として、60

分間インキュベートした。TBST 緩衝液及び TBS 緩衝液 (1 M Tris-HCl (pH 7.4)、5 N NaCl 及び H₂O) で洗浄した後、膜を ECL prime western blotting detection reagent (GE Healthcare) に浸漬した。タンパク質発現は、Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare) を用いて検出した。

2.2.5.2. 免疫染色

HeLa 細胞 (2.5×10^4 cells/well/mL) 及び HEK 293 細胞 (1×10^5 cells/well/mL) を BioCoat™ Collagen I Cellware 4 ウェル培養スライド (Corning, Corning, NY, USA) に播種した。インキュベーション後 (HeLa 細胞 : 1 日、HEK 293 細胞 : 2 日)、細胞を PBS で 1 回リンスし、4%パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS 溶液で 30 分間固定した。固定後、細胞を PBS でリンスし、 -20°C のメタノールで 30 分間浸透圧処理し、ブロッキングとして PBS で希釈したヒト血清アルブミン (1:100; Merck KGaA) で 30 分間インキュベートした。細胞を PBS で 3 回リンスし、一次抗体として PBS で希釈した抗 hLAT1 ポリクローナル抗体ウサギ (1:100; Merck KGaA) を添加し、 4°C でオーバーナイトした。細胞を PBS で 3 回リンスし、二次抗体として PBS で希釈した Alexa Fluor® 488-labeled donkey anti-rabbit IgG antibodies (1:1000; Thermo Fisher Scientific) を室温で 60 分間反応させた。細胞を PBS で 3 回リンス後、DAPI 含有 VECTORSHIELD® Hard Set™ Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で封入した。次いで、細胞を FV1000D 共焦点レーザー走査顕微鏡 (オリンパス) で観察した。

2.2.6. L-[³H]-Leucine 細胞内取り込み阻害

HeLa 細胞は 24 ウェルプレート (1.0×10^5 cells/well/mL) で 37°C 、5%CO₂ 濃度環境下で培養した。インキュベーション後、 34°C 、 37°C または 40°C の dry bath incubator (Nippon Genetics Europe, Dueren, Germany) 上にプレートを設置した。培地を除去した後、細胞を温緩衝液 (125 mM NaCl、4.8 mM KCl、5.6 mM D-(+)-glucose、1.2 mM CaCl₂·H₂O、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgSO₄ 及び 25 mM HEPES) でリンスし、同バッファーで 10 分間プレインキュベートした。1 μCi/mL L-[³H]-leucine (Moravek Biochemicals, Richland, WA, US) 及び 2 mM のポリマーまたは 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH; Merck KGaA) と共に 10 分間インキュベートした。細胞を冷緩衝液でリンスし、0.1 M NaOH (250 μL) を添加し、 4°C でオーバーナイトした。オーバーナイト後、0.1 M HCl (250 μL) を加え、液体シンチレーション溶媒 (3 mL; Clear-sol I、ナカライテスク) にサンプル溶液 (400 μL) を溶解した。Packard Tri-Carb 3170 TR/SL 液体シンチレーションアナライザー (パーキンエルマー・ジャパン) を用いて L-[³H]-leucine を検出した。サンプル中のタンパク質濃度は、Pierce BCA protein assay reagent kit を使用し、マイクロプレートリーダーで測定した。

2.2.7. 蛍光ポリマープローブの合成

P(NIPAAm-co-DMAAm20%) (50 mg、 3.3×10^{-3} mmol) を tetrahydrofuran (THF; 2 mL) に溶解した。次いで、THF (1 mL) に溶解した 2-aminoethanol (2.0 μ L、 3.3×10^{-2} mmol) を滴下して加え、30 分間窒素置換した。溶液が無色になったことを確認後、THF (1 mL) に溶解した FL (2.9 mg、 6.7×10^{-3} mmol) を加え、窒素雰囲気下で 24 時間反応させた。透析膜 (分画分子量: 3,500) を用いて、得られた残渣を 4°C で 3 日間透析し、精製した。溶媒を揮発させ、ジエチルエーテルを用いた沈殿により精製し、濾過、真空乾燥後、P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL (41.8 mg) を淡黄色固体として得た。同様の手順で、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%) から Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL (57.2 mg) を合成した。ポリマーへの蛍光基の修飾率は、吸光度により決定した。

2.2.8. 蛍光ポリマープローブの物理化学的評価

FP-6300 分光蛍光光度計 (Jasco) を用いて、蛍光スペクトルを測定した。温度制御は、ETC-273T コントローラ (Jasco) 及び PT-31 ペルチェシステム (Krüss) を用いた。PBS 溶液 (1 mg/mL) の励起波長 (λ_{ex}) 及び発光波長 (λ_{em}) の最大値を測定した後、蛍光ポリマープローブの蛍光強度を 25°C から 45°C の間で評価した。

2.2.9. 蛍光ポリマープローブの細胞内取り込み

2.2.9.1. 共焦点レーザー走査顕微鏡による観察

HeLa 細胞を 1.0×10^5 cells/well/0.5 mL で、BioCoat™ Collagen I Cellware 4 ウェル培養スライドに播種した。オーバーナイト後、蛍光ポリマープローブ (1.6×10^{-2} mM) を添加し、5% CO₂ 中、34°C または 40°C で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を吸引し、細胞を 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) /PBS 溶液で 2 回リンスした。50 μ M LysoTracker® Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific) /MEM 溶液を添加し、細胞を 37°C で 30 分間インキュベートした。細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液で 2 回リンスし、4% PFA/PBS 溶液で 20 分間固定した。細胞を PBS で 2 回リンス後、DAPI 含有 VECTORSHIELD® Hard Set™ Mounting Medium で封入し、FV1000D 共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

2.2.9.2. フローサイトメトリー分析

HeLa 細胞を、 2.0×10^5 cells/well/2 mL で、6 ウェルプレートに播種した。オーバーナイト後、蛍光ポリマープローブ (1.6×10^{-2} mM) を添加し、5% CO₂ 中、34°C または 40°C で 0.5、1、2 または 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を吸引し、細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液で 2 回リンスした。次いで、細胞をトリプシン処理し、10% FBS 含有 MEM 培地でリンスした。細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液でリンス、次いで PBS で 2 回リンスし、35 μ m ナイロンメッシュ (Falcon® セルストレーナー ;

Corning) で濾過し、LSR II フローサイトメーター (Becton-Dickinson Biosciences、San Jose、CA、USA) で測定した。蛍光ヒストグラム及びドットプロットは、Cell Quest ソフトウェアを用いて生成した。図は FACSDiVa ソフトウェアを用いて、ヒストグラムを再現した。各蛍光ポリマープローブを 37°C で 0.5 時間インキュベートした際の蛍光強度を 1.0 とした。

2.2.9.3. アミノ酸による蛍光ポリマープローブの細胞内取り込み阻害

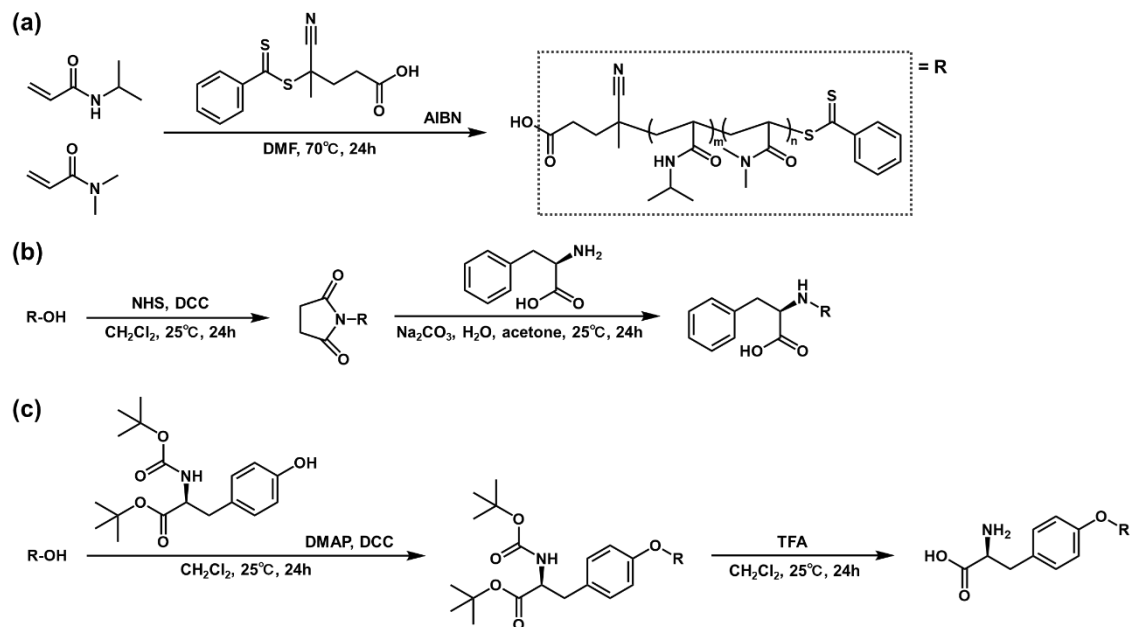
HeLa 細胞を、 2.0×10^5 cells/ well/2 mL で、6 ウェルプレートに播種した。オーバーナイト後、細胞を 5% CO₂ 中、34°C または 40°C で蛍光ポリマープローブ (1.6×10^{-2} mM) 及び L-leucine または L-phenylalanine (30 mM) と共に 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を吸引し、細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液で 2 回リンスした。次いで、細胞をトリプシン処理し、10% FBS 含有 MEM 培地でリンスした。細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液でリンス、次いで PBS で 2 回リンスし、35 μ m ナイロンメッシュで濾過し、LSR II フローサイトメーターで測定した。蛍光ヒストグラム及びドットプロットは、Cell Quest ソフトウェアを用いて生成した。

2.3. 結果及び考察

2.3.1. 蛍光封入温度応答性ポリマーの合成及び物理化学的評価

温度応答性ポリマーである P(NIPAAm-co-DMAAm) は、可逆的付加-開裂連鎖移動 (reversible addition-fragmentation chain transfer, RAFT) 重合によって合成した (Scheme 2.1 (a))。合成したポリマーは、¹H-NMR で PNIPAAm 及び DMAAm 由来のピークを確認し (Figure 2.3, 2.4, 2.5)、GPC、ポリマー溶液の相転移挙動 (Figure 2.5 (a))、サイズ測定 (Figure 2.5 (b)) 及びゼータ電位 (Figure 2.5 (c)) によって物性評価を行った。GPC は、ポリエチレングリコールを検量標準として使用した (Figure 2.6)。ポリマーの平均分子量 (Mn) は、14,200~17,700 の範囲であり、NIPAAm に対する DMAAm のモル組成が増加するにつれて減少した (Table 2.1)。これは、重合反応におけるラジカル開始剤及び RAFT 剤の仕込み量が、DMAAm のモル組成と共に増加するためと考えられる。合成したポリマーの LCST は、DMAAm 組成の増加に伴って上昇した。これは、DMAAm 組成の増加により、ポリマーの親水性が上昇するためである。L-Phenylalanine または L-tyrosine のポリマーへの末端修飾により、Phe-P(NIPAAm-co-DMAAm) 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) を得た (Scheme 2.1 (b), (c))。アミノ酸の修飾により、LCST はわずかに変化した。すべてのアミノ酸修飾ポリマーは LCST を有し、PBS 中で温度応答性の溶解度変化を示した (Figure 2.5 (a))。ポリマーのゼータ電位測定においては (Figure 2.5 (b))、全てのポリマーは負電荷を有し、その大きさは Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) < P(NIPAAm-co-DMAAm) < Phe-P(NIPAAm-co-DMAAm) であった。これは、ポリマーの末端基の性質に起因と考えられる。P(NIPAAm-co-DMAAm)

及び Phe-P(NIPAAm-co-DMAAm)は、末端基にカルボキシル基を有する一方、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)は、アミノ基及びカルボキシル基を有する。これらの官能基の差異が、異なるゼータ電位をもたらすと考えられる。



Scheme 2.1. The synthesis of polymers (a) P(NIPAAm-co-DMAAm); (b) Phe-P(NIPAAm-co-DMAAm); and (c) Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm).

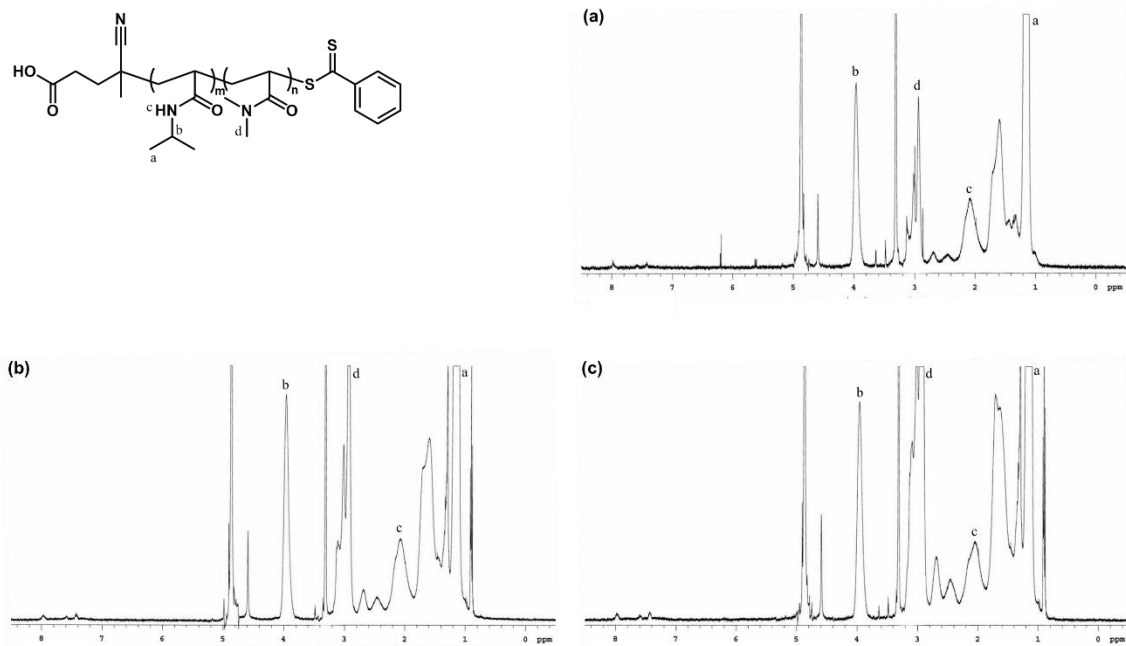


Figure 2.2. ¹H-NMR of P(NIPAAm-co-DMAAm) (400 MHz, CD₃OD); (a) P(NIPAAm-co-DMAAm)12.5%: the integrated proton signals derived from NIPAAm methine (1H, 3.99 ppm), DMAAm methyl (6H, 3.05 ppm), (b) P(NIPAAm-co-DMAAm)20%: the integrated proton signals derived from NIPAAm methine (1H, 3.97 ppm), DMAAm methyl (6H, 3.09 ppm), (c) P(NIPAAm-co-DMAAm)35%: the integrated proton signals derived from NIPAAm methine (1H, 3.97 ppm), DMAAm methyl (6H, 3.03 ppm).

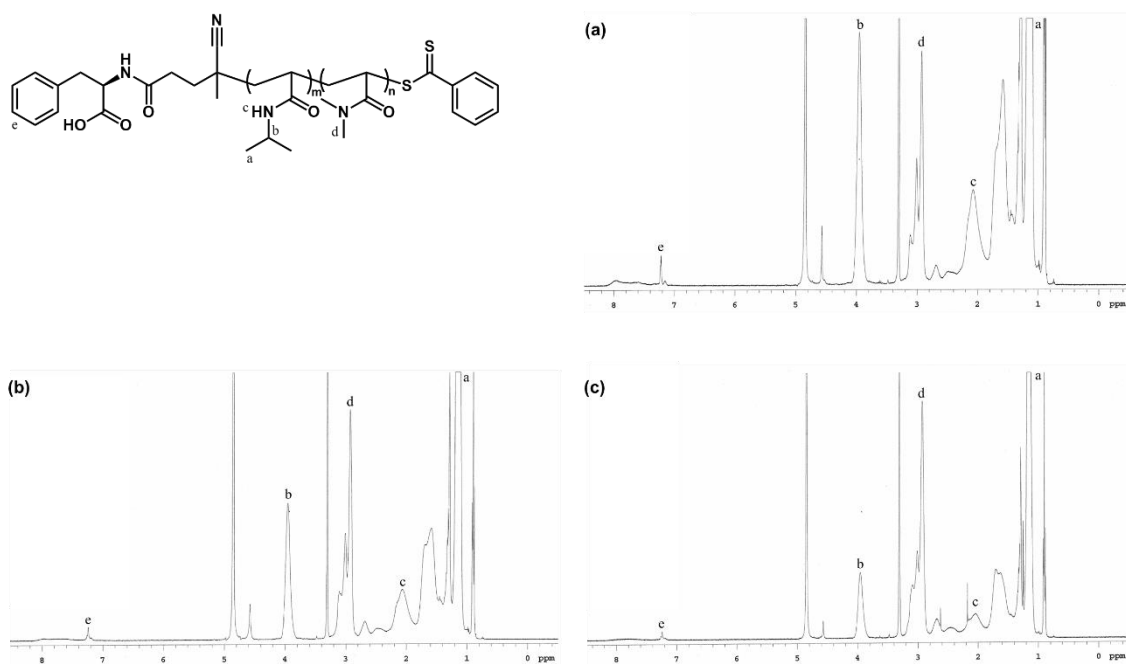


Figure 2.3. $^1\text{H-NMR}$ of Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm) (400 MHz, CD_3OD); (a) Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm12.5%): the integrated proton signals derived from NIPAAm methine (1H, 3.96 ppm), DMAAm methyl (6H, 3.02 ppm), L-phenylalanine benzene (5H, 7.22 ppm), (b) Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%): the integrated proton signals derived from NIPAAm methine (1H, 3.96 ppm), DMAAm methyl (6H, 3.02 ppm), L-phenylalanine benzene (5H, 7.24 ppm), (c) Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm35%): the integrated proton signals derived from NIPAAm methine (1H, 3.96 ppm), DMAAm methyl (6H, 3.02 ppm), L-phenylalanine benzene (5H, 7.24 ppm).

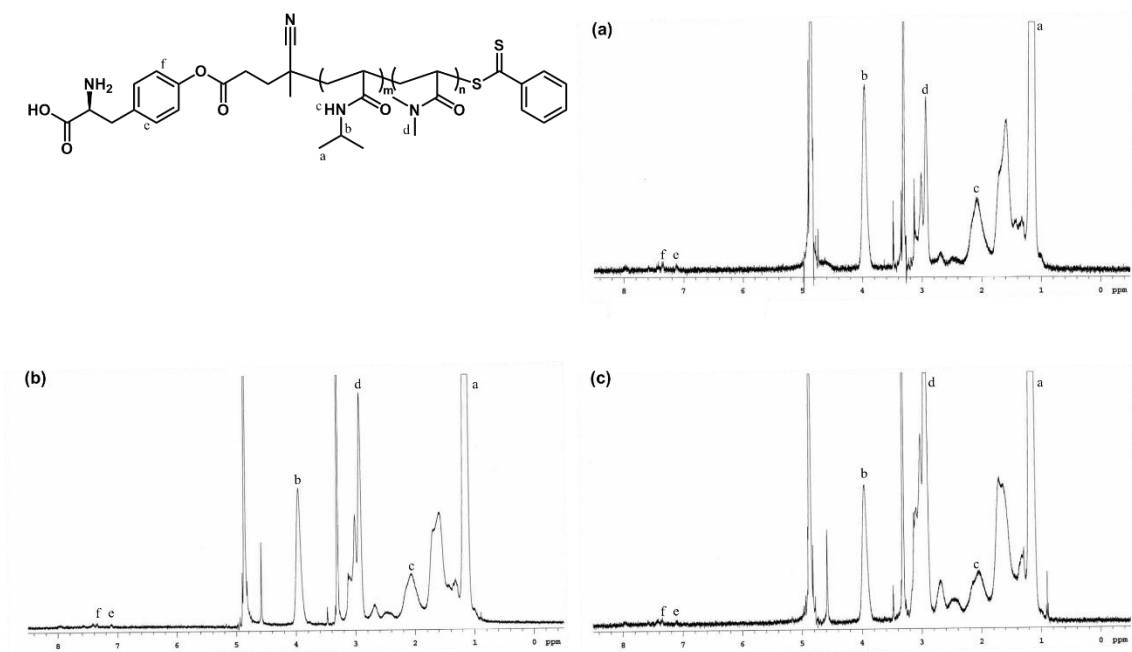


Figure 2.4. $^1\text{H-NMR}$ of Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) (400 MHz, CD_3OD); (a) Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm12.5%): the integrated proton signals derived from NIPAAm methine (1H, 3.96 ppm), DMAAm methyl (6H, 3.02 ppm), L-tyrosine benzene (2H, 7.13 ppm), (2H, 7.35 ppm), (b) Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%): the integrated proton signals derived from NIPAAm methane (1H, 3.96 ppm), DMAAm methyl (6H, 3.02 ppm), L-tyrosine benzene (2H, 7.11ppm), (2H, 7.35 ppm), (c) Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm35%): the integrated proton signals derived from NIPAAm methine (1H, 3.95 ppm), DMAAm methyl (6H, 3.01 ppm), L-tyrosine benzene (2H, 7.10 ppm), (2H, 7.35 ppm).

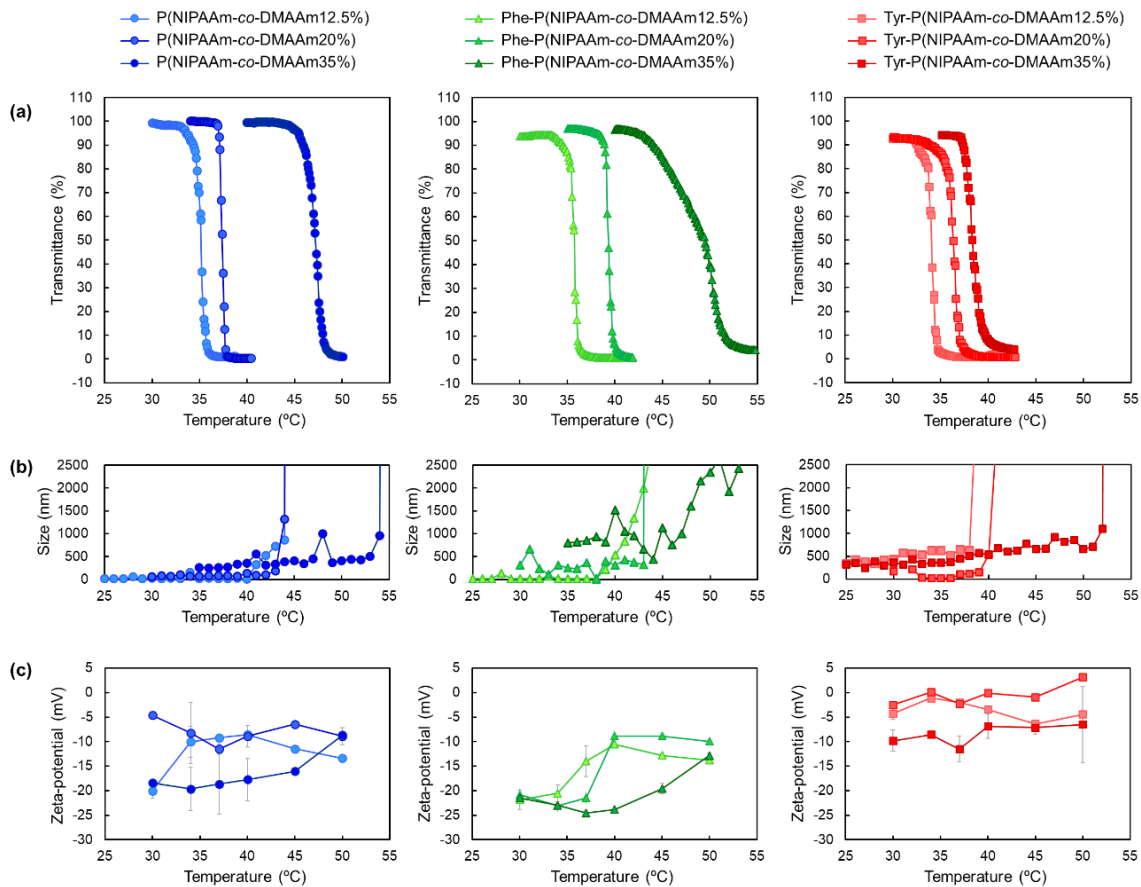


Figure 2.5. Physical properties of the prepared polymers (a) Phase transition profiles, (b) Size profiles (c) Zeta potential profiles.

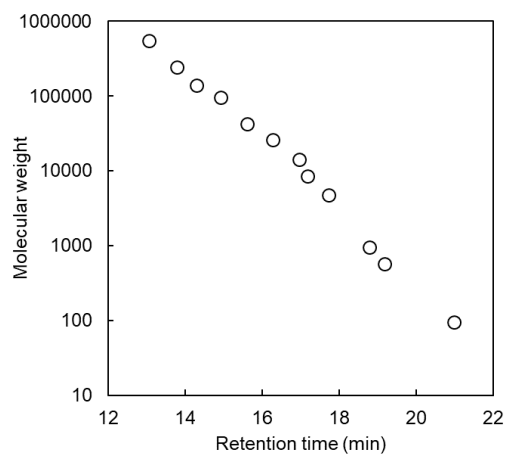
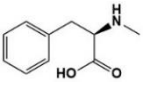
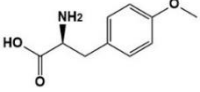


Figure 2.6. GPC calibration curve using polyethylene glycol standard.

Table 2.1. Polymer characterization.

	Terminal Group	M_n^a	M_w^a	M_w/M_n^a	LCST (°C) ^b
P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm12.5%)	HO—	17,700	22,100	1.25	35.1
P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm20%)		16,700	19,500	1.17	37.3
P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm35%)		14,200	16,400	1.15	47.1
Phe-P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm12.5%)		18,500	21,800	1.18	35.7
Phe-P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm20%)		18,200	22,400	1.23	39.3
Phe-P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm35%)		16,600	19,500	1.17	49.4
Tyr-P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm12.5%)		13,400	16,100	1.20	34.1
Tyr-P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm20%)		12,100	15,600	1.29	36.3
Tyr-P(NIPAAm- <i>co</i> -DMAAm35%)		12,700	14,500	1.14	46.2

^a Determined by GPC. ^b Determined by temperature dependent optical transmittance change.

2.3.2. 細胞の LAT1 発現確認

HeLa 細胞及び HEK 293 細胞の LAT1 発現を、ウェスタンブロッティング及び免疫染色で確認した。抗 β -アクチン抗体は、ローディング・コントロールとして使用した。HeLa 細胞では、LAT1 に起因する 38kDa のバンドが検出された。また、125kDa に検出されたバンドは、LAT1 と 4F2hc の二量体と考えられる¹⁶⁸。一方、HEK 293 細胞では、いずれのバンドも検出されなかった (Figure 2.7 (a))。さらに、抗 LAT1 ポリクローナル抗体で処理した後の顕微鏡画像において、HeLa 細胞は膜上に抗体由来の蛍光を示したが、HEK 293 細胞では、観察されなかった (Figure 2.7 (b))。以上の結果から、HeLa 細胞をモデルがん細胞として選択した。

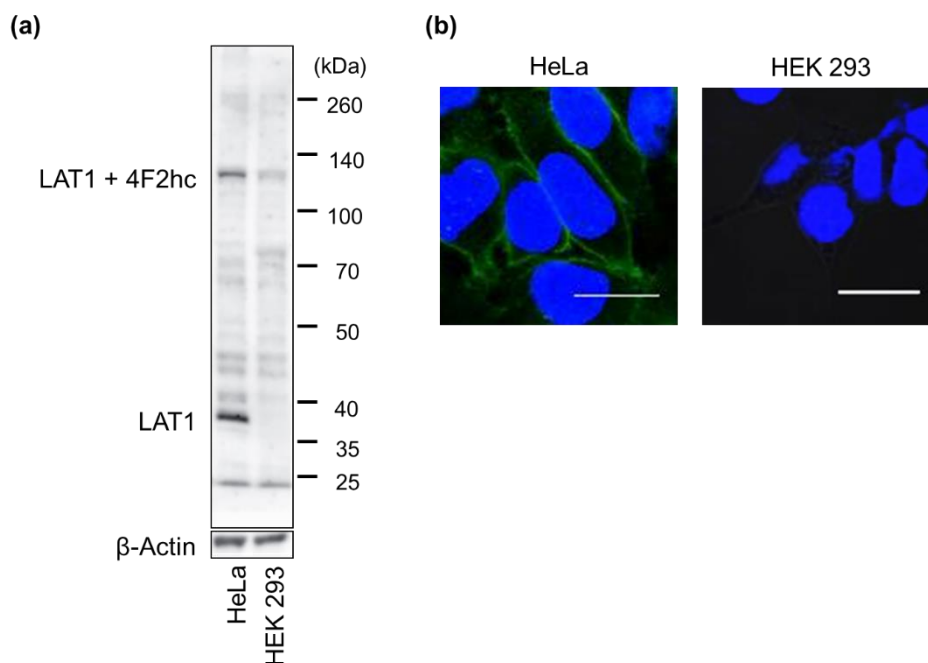


Figure 2.7. Western blot analysis was performed on the membrane fraction prepared from HeLa and HEK 293 cells using an anti-hLAT1 antibody (a). For HeLa cells, the 38-kDa-protein band was detected. An anti- β -actin antibody was used as a loading control. Microscopy images of HeLa and HEK 293 cells after treatment with an anti-LAT1 polyclonal antibody (b). LAT1 appears green and the nuclei were stained blue (DAPI). Magnification is 60 \times ; scale bar represents 20 μ m.

2.3.3. L-[³H]-Leucine 細胞内取り込み阻害

合成したポリマーとがん細胞における LAT1 との相互作用を調べるために、ポリマーまたは LAT1 阻害剤である BCH の存在下で、LAT1 の基質である L-[³H]-leucine の取り込み量を測定した (Figure 2.8)。モデルがん細胞として、LAT1 発現を確認した HeLa 細胞を用いた (Figure 2.7)¹³⁸。本研究では、LAT2 や LAT3 のような HeLa 細胞における他のタイプの L 型アミノ酸トランスポーターの発現を確認しなかったが、LAT2 および LAT3 の発現は、LAT1 の発現と比較して低いため^{169,170}、他のタイプのトランスポーターと比較して、LAT1 が L-[³H]-leucine を優位に取り込むと考えた。温度変化によるポリマーの物理的性質変化による阻害効果の差を確認するために、34 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 及び 40 $^{\circ}$ C で測定を行った。P(NIPAAm-co-DMAAm20%) とインキュベートした HeLa 細胞は、すべての温度で L-[³H]-leucine の取り込みを示した。この結果は、アミノ酸が修飾されていない P(NIPAAm-co-DMAAm20%) が、LAT1 を介したロイシン取り込み輸送を阻害しないことが示された。さらに、L-phenylalanine を修飾した Phe-P(NIPAAm-co-DMAAm20%) は、L-[³H]-leucine の取り込み輸送を阻害しなかった。対照的に、L-tyrosine を修飾した Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%) は、L-[³H]-leucine の取

り込み輸送を阻害した。L-Phenylalanine を修飾したポリマーでは、 α -カルボキシル基のみが存在し、L-tyrosine を修飾したポリマーは α -アミノ基と α -カルボキシル基を有する。 α -アミノ基の正電荷と α -カルボキシル基の負電荷が、LAT1 の基質認識に関与していることが報告されており¹³⁵、本結果と一致した。また、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)の阻害効果は、温度によって大きく変化しなかった。従って、ポリマーの親水性/疎水性の物性変化に関わらず、LAT1 はポリマー末端の L-tyrosine を認識すると考えられる。

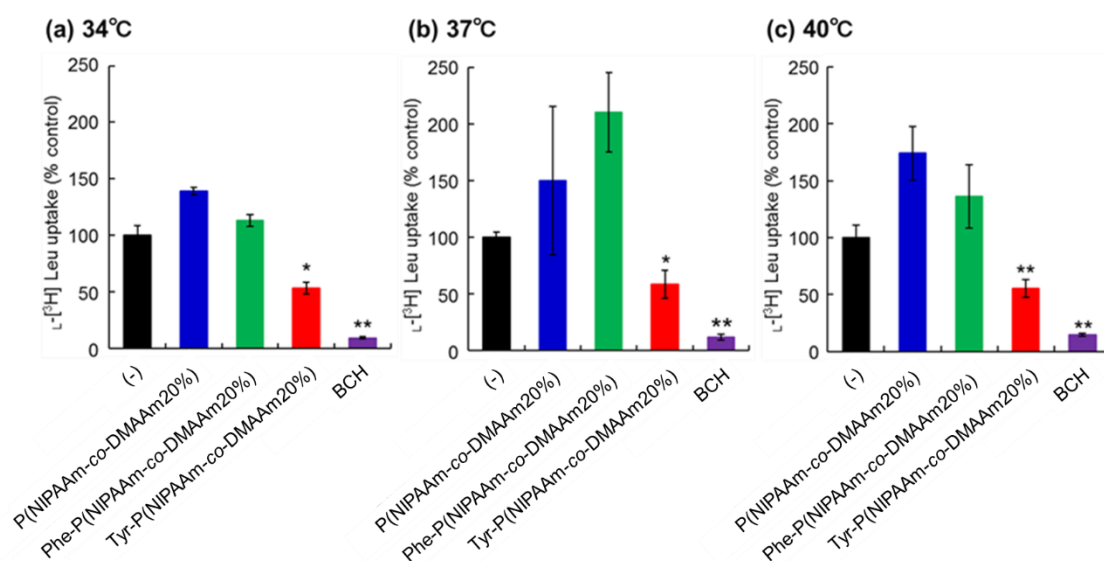
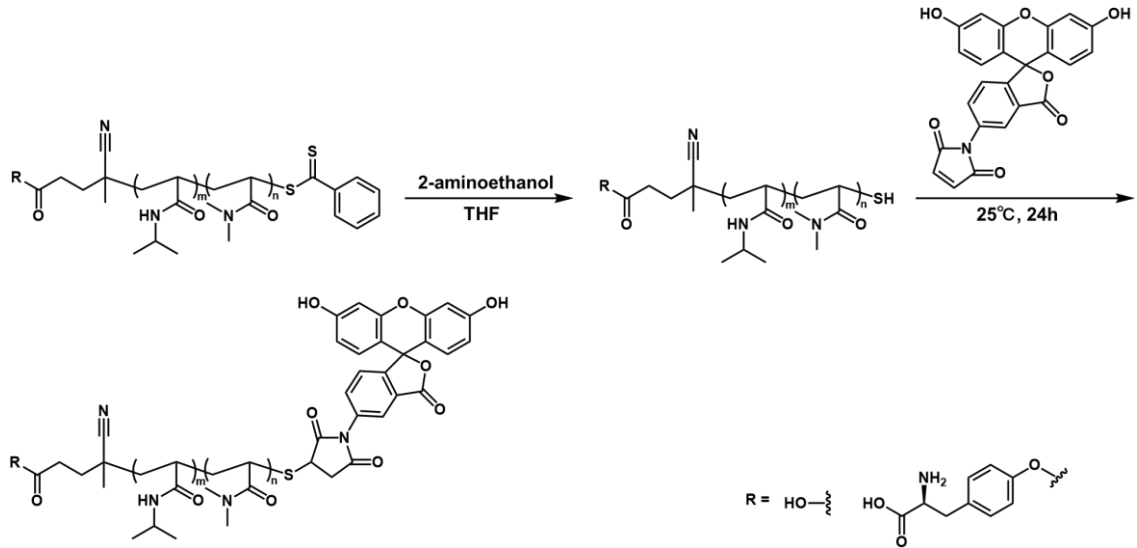


Figure 2.8. Inhibition of L-[³H]-leucine uptake in HeLa cells at (a) 34 °C; (b) 37 °C and (c) 40 °C. The concentration of inhibitors P(NIPAAm-co-DMAAm20%), Phe-P(NIPAAm-co-DMAAm20%), and Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%), and system L specific inhibitor, BCH was 2 mM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control ($n = 3$).

2.3.4. 温度応答性蛍光ポリマープローブの合成及び物理化学的評価

FL をポリマーの末端基に結合し、蛍光ポリマープローブを合成した (Scheme 2.2)。プローブへの FL 修飾率は、FL の吸収スペクトル及び校正曲線 (Figure 2.9)、P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL の最大吸収波長値 (Figure 2.10) より決定した。P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL の λ_{ex} は、いずれも 492 nm、 λ_{em} は、それぞれ 516 nm 及び 517 nm であった (Figure 2.11)。FL は、蛍光基本来の特性を維持したままポリマーの末端へ修飾された。また、温度変化による蛍光プローブの蛍光強度の変化が観察された。LCST 以下では、蛍光ポリマープローブは親水性で伸長しているため、蛍光強度は維持されていると推定される。一方、LCST よりも 2~3°C 上昇すると、蛍光強

度は徐々に低下した。蛍光ポリマープローブは LCST 以上で疎水性となり、さらに温度を上げることによって、凝集が進行すると考えられる (Figure 2.12)。



Scheme 2.2. Synthesis of fluorescent polymer probes.

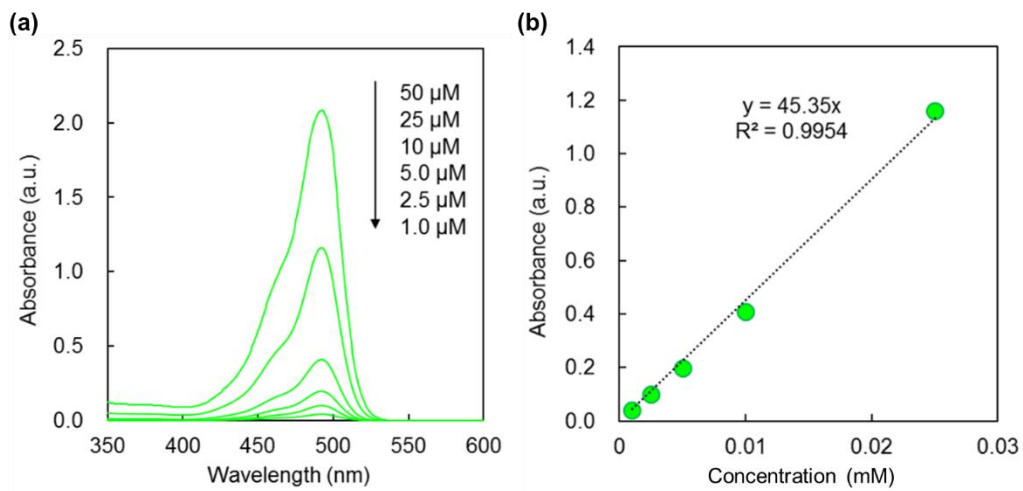


Figure 2.9. Absorption spectrum (a) and calibration curve (b) of fluorescein-5-maleimide.

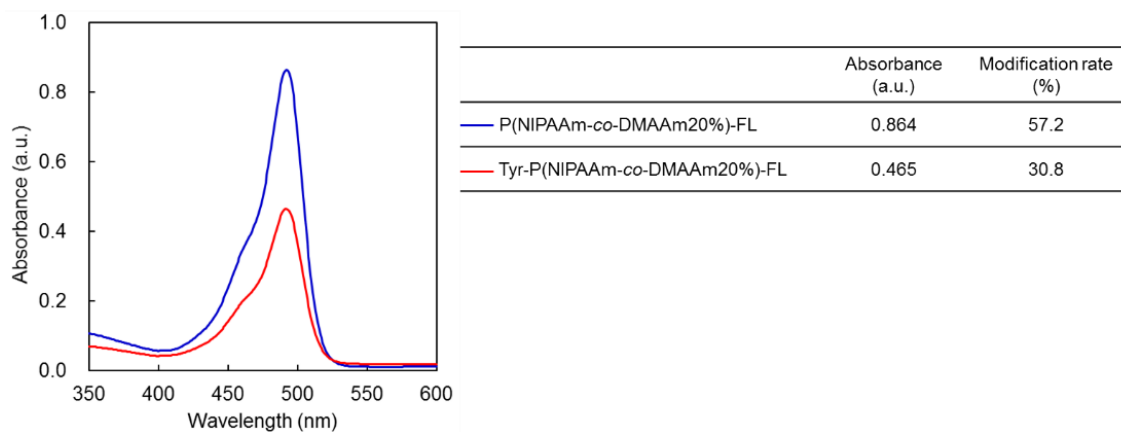


Figure 2.10. Absorption spectra and modification rate of fluorescein-5-maleimide for P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL and Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL.

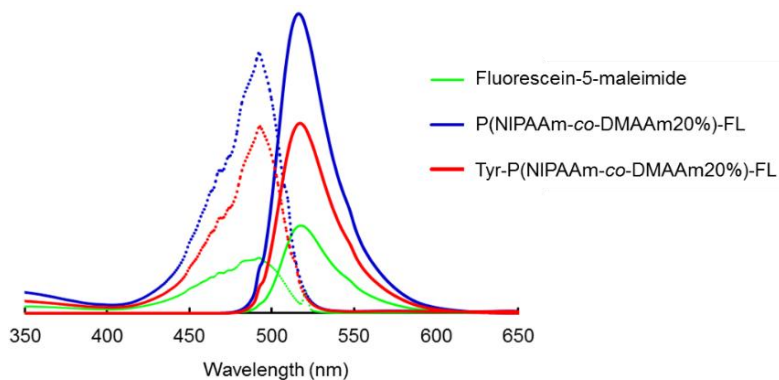


Figure 2.11. Excitation and emission spectra of fluorescent polymers and fluorescein-5-maleimide. Solid line: emission spectra, dotted line: excitation spectra.

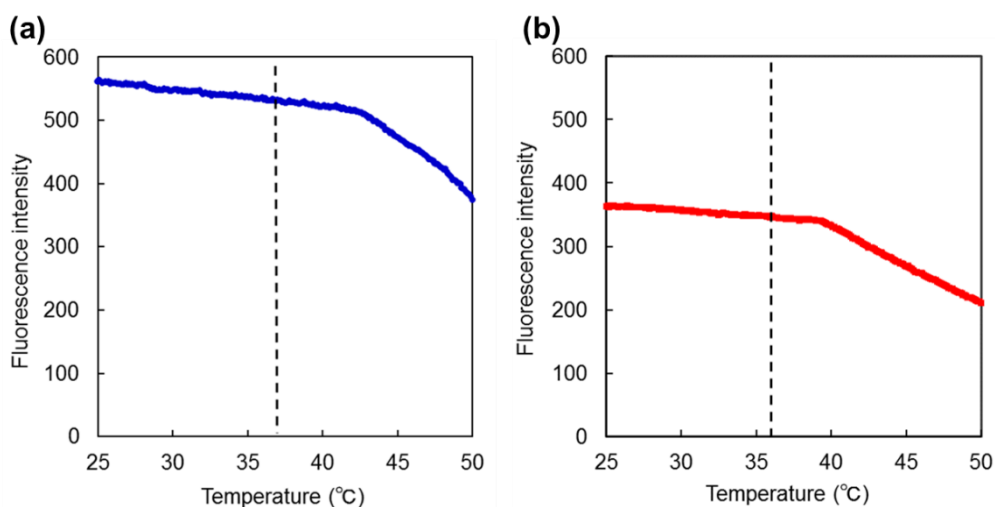


Figure 2.12. Temperature-responsive change of fluorescence intensity (a) P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL and (b) Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL.

2.3.5. 蛍光ポリマープローブの細胞内取り込み

インキュベーション温度及び LAT1 認識が、蛍光ポリマープローブの細胞内取り込みに及ぼす影響を調べた。P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL または Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL を HeLa 細胞に添加し、LCST 以下 (34°C) または LCST 以上 (40°C) で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、蛍光顕微鏡での観察及びフローサイトメトリーを行った。共焦点顕微鏡画像において、LCST 以下では、蛍光ポリマープローブの細胞内取り込みは確認されず、細胞膜への吸着が観察された (Figure 2.13)。対照的に、LCST 以上では、蛍光ポリマープローブの細胞内取り込みが確認された。これは、蛍光ポリマープローブの親水性/疎水性の物性変化に起因する。LCST 以下では、ポリマーは親水性であり、細胞膜との親和性は低い。従って、蛍光ポリマープローブは細胞によって取り込まれなかった。一方、LCST 以上でポリマーが疎水性になると、細胞膜との親和性が強くなり、細胞内取り込みが増加した。また、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL は、P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL よりも、LCST 以上で細胞内へ均一に取り込まれていることが確認された。細胞内における蛍光ポリマープローブの局在を確認するために、LysoTracker Red DND-99 を用いてライソソーム染色を行った (Figure 2.14)。共焦点顕微鏡画像において、蛍光ポリマープローブのライソソームとの共局在が観察された。これらの結果より、蛍光ポリマープローブが疎水性になり、細胞膜と相互作用することによって、蛍光ポリマープローブのエンドサイトーシスが起った可能性が示唆された。

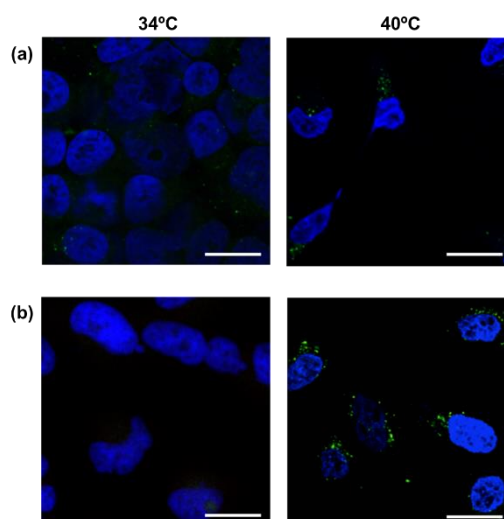


Figure 2.13. Confocal laser scanning microscopy images of HeLa cells after 4 h treatment with (a) P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)-FL and (b) Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)-FL at 34 °C and 40 °C. The fluorescent probes appear green and the nuclei were stained blue (DAPI). Magnification is 40×; the scale bar represents 20 μ m.

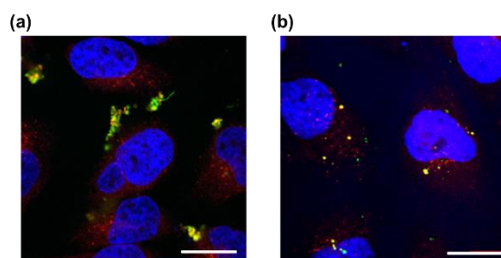


Figure 2.14. Confocal laser scanning microscopy images of HeLa cells after 4 h treatment with (a) P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)-FL and (b) Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)-FL at 40 °C. Fluorescent probes appear green, lysosomes are stained red (LysoTracker Red DND-99), and the nuclei are stained blue (DAPI). Magnification is 40×; the scale bar represents 20 μ m.

蛍光ポリマープローブの経時的な細胞内取り込み挙動を調べるために、34°C及び40°Cでプローブとインキュベーション後の HeLa 細胞の蛍光強度を、フローサイトメトリーで測定した (Figure 2.15)。P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)-FL の両方で、LCST 以下で一定の蛍光強度が検出された。これは、細胞膜上への蛍光ポリマープローブの吸着によるものと考えられる。4時間後、LCST 以上で Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)-FL をインキュベートした細胞は、P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)-FL をインキュベートした細胞と比較して、蛍光強度の著しい増加を示した。これは、蛍光ポリマープローブ末端の L-tyrosine と HeLa 細胞

膜上の LAT1 との間の親和性に依存する。さらに、蛍光ポリマープローブの時間依存的な細胞内取り込みを調べるために、HeLa 細胞の蛍光強度を経時的に測定した (Figure 2.16)。P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL の場合、LCST 以上でインキュベートした細胞の蛍光強度は、LCST 以下でインキュベートした細胞の蛍光強度よりわずかに高かったが、LCST 以上及び以下でインキュベートした細胞間における蛍光強度の有意差は、観察されなかった (Figure 2.16 (a))。よって、蛍光ポリマープローブの疎水性変化は、細胞内へのプローブの取り込みを誘導するには不十分であったことが示唆された。対照的に、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL の場合、LCST 以下でインキュベートした細胞と比較して、LCST 以上でインキュベートした細胞は、30 分後に 2 倍の蛍光強度が観察された (Figure 2.16 (b))。さらに、4 時間のインキュベーション後、LCST 以上でインキュベートした細胞の蛍光強度は、LCST 以下でインキュベートした細胞の蛍光強度と比較して、3 倍であった。この結果により、ポリマープローブの疎水性と、LAT1 とポリマー末端の L-tyrosine との間の親和性の相乗効果が、ポリマープローブの細胞内取り込みを促進することが示唆された。

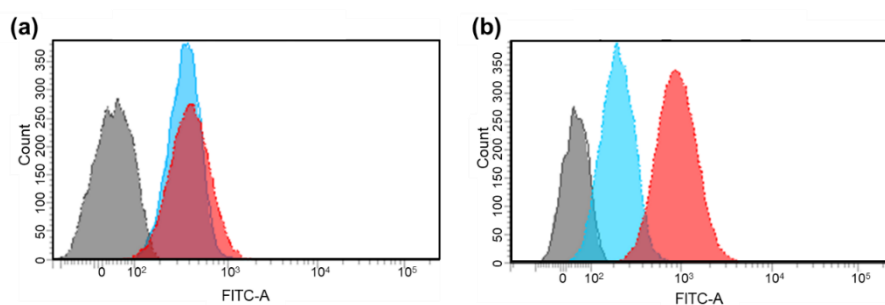


Figure 2.15. Representative flow cytometry histograms of fluorescence intensity of HeLa cells after 4 h incubation with (a) P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL and (b) Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL at 34 °C (blue) and 40 °C (red).

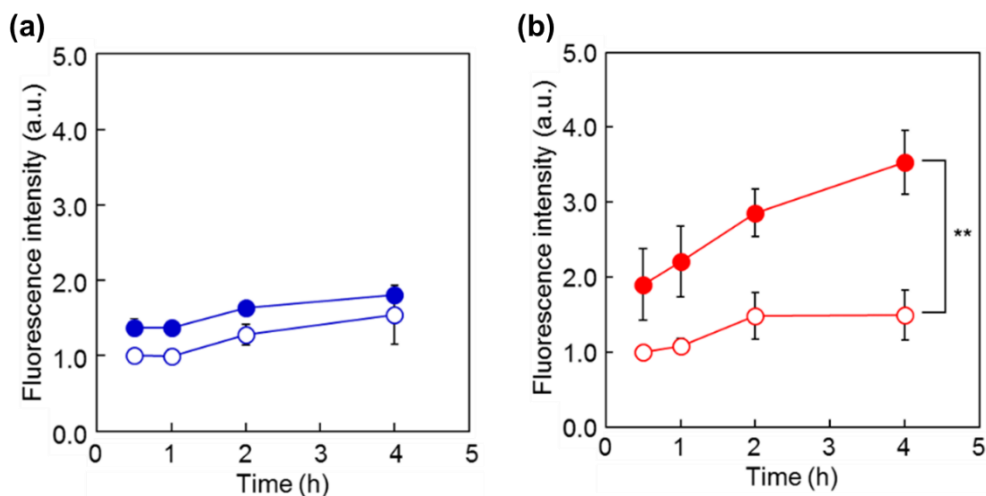


Figure 2.16. Fluorescence intensity of HeLa cells at various time points following incubation with polymer probes. Cells were incubated with the probes for 0.5, 1, 2, or 4 h ((a) P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL; (b) Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL) at either 40 °C (close circles) or 34 °C (open circles). Data are the mean \pm S.D. ($n = 3$) ** $p < 0.01$.

Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL の細胞内取り込みにおける LAT1 の関与を確認するために、LAT1 基質の L-phenylalanine 存在下でのインキュベーション後の HeLa 細胞の蛍光強度を測定した (Figure 2.17)。L-phenylalanine を阻害剤に選択したのは、ポリマー末端基との結合時に L-tyrosine のヒドロキシル基が使用され、結合後の化学構造が L-tyrosine よりも L-phenylalanine に類似するためである。L-Phenylalanine の濃度は、既往の報告¹⁵⁹に基づいて 5 mg/mL に設定した。L-Phenylalanine 存在下における HeLa 細胞の蛍光強度は、L-phenylalanine を添加していない蛍光ポリマープローブのみの場合よりも低く、LAT1 が Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL の細胞内取り込みに関与していることが示唆された。

合成した蛍光ポリマープローブは、LAT1 との親和性及び温度依存的な細胞内取り込みを示した。従って、蛍光ポリマープローブは、LAT1 発現に関与する悪性腫瘍及びがん細胞の環境に応答するがん細胞イメージングに有用であることが示唆された。

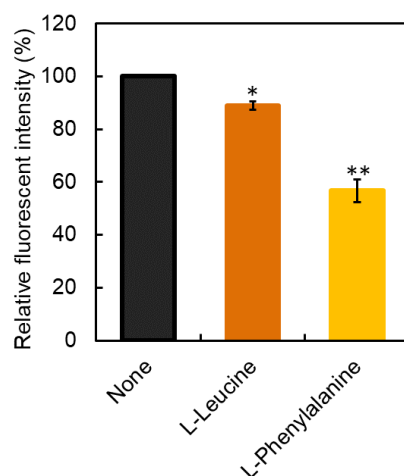


Figure 2.17. Comparison of fluorescence intensity with/without L-leucine and L-phenylalanine (30 mM). Data are the mean \pm S.D. ($n = 3$) ** $p < 0.01$.

2.4. 結論

本検討では、LAT1 によって認識され、温度に応答して細胞に取り込まれ、がん細胞に対して高い親和性を有する蛍光ポリマープローブを開発した。HeLa 細胞における L-[³H]-leucine の細胞内取り込み阻害実験は、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) が L-[³H]-leucine の取り込み輸送を阻害することを示した。ポリマー末端に存在する α -アミノ基と α -カルボキシル基により、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) が、LAT1 によって認識されることが示唆された。蛍光ポリマープローブである Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL は、fluorescein-5-maleimide をポリマーの末端基に結合させることによって合成し、HeLa 細胞による共焦点顕微鏡観察およびフローサイトメトリー測定を行った。LCST 以下では、蛍光ポリマープローブは細胞膜に吸着し、細胞内取り込みは確認されなかった。対照的に、LCST 以上では、蛍光ポリマープローブの細胞内取り込みが確認された。フローサイトメトリー測定において、LCST 以上で Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-FL をインキュベートした細胞の蛍光強度は、LCST 以下でインキュベートした細胞の蛍光強度よりも大きいことを示した。これらの結果は、蛍光ポリマープローブが疎水性になり、細胞膜と相互作用するとエンドサイトーシスが生じる可能性が示唆された。

LAT1 標的型の温度応答性蛍光ポリマープローブは、温度による親水性/疎水性の変化により、細胞内取り込みを調節することが可能であり、LAT1 親和性による高いがん細胞選択性が期待される。

第3章

がん治療を目的とした

LAT1 標的型温度応答性薬物キャリア

3.1. 緒言

前検討において、LAT1 を標的とする温度応答性蛍光ポリマープローブの HeLa 細胞への細胞内取り込みが、LAT1 を標的とするアミノ酸部位をもたない場合と比較して増強されていることを報告した¹⁷¹。従って、LAT1 標的アミノ酸を温度応答性リポソームに修飾することによって、がん細胞への標的能を有するより機能的な温度応答性リポソームが開発できると考えた。本技術により、患者の副作用低減による QOL の向上が期待される。

本検討では、3-*sn*-phosphatidylcholine, from egg yolk (EPC) 及び DOPE からなるリポソームに LAT1 親和性部位を有する温度応答性ポリマーを修飾し、リポソームの温度依存性及び LAT1 認識による細胞内取り込み能を評価した。

3.2. 実験

3.2.1. 試薬及び機器

N-(3-Maleimide-1-oxopropyl)-*L*- α -phosphatidylethanolamine, dioleoyl (DOPE-maleimide) は、日油（東京）より入手した。EPC 及び DOPE は、富士フイルム和光純薬工業より入手した。5(6)-Carboxyfluorescein (CF) は、Merck KGaA より入手した。1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (DSPE-PEG) は、Avanti Polar Lipids より入手した。

3.2.2. DOPE 修飾ポリマーの合成

20 mol% の DMAAm を含有する P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%) 及び Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%) は、二章と同様の方法で合成した。P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%) (100 mg、 6.7×10^{-3} mmol) を THF (4 mL) に溶解した。次いで、THF (2 mL) に溶解した 2-aminoethanol (4.0 μ L、 6.7×10^{-2} mmol) を滴下して加え、30 分間窒素置換した。THF (2 mL) に溶解した DOPE-Maleimide (12.2 mg、 6.7×10^{-3} mmol) を加え、窒素雰囲気下で 24 時間反応させた。得られた残渣を、透析膜（分画分子量 = 3,500）を用いて透析することにより精製した。真空中で乾燥させ、P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)-DOPE (94 mg) を白色固体として得た。同様の手順で、Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%) (100mg) から Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm20%)-DOPE (96 mg) を得た。

3.2.3. DOPE 修飾ポリマーの物性評価

3.2.3.1. NMR

¹H-NMR スペクトルは、400 MHz 超伝導フーリエ変換核磁気共鳴装置で測定した。

3.2.3.2. 示差走査熱量 (DSC) 測定

DSC は、示差走査熱量計 (DSC-60 Plus、島津製作所) を用いて、PBS 溶液 (30 w/v%) 中の温度変化による熱量変化を測定した。FC-60A (島津製作所) で雰囲気制御を行い、加熱速度は 2.5 °C/min とした。

3.2.4. 蛍光封入温度応答性リポソームの作製

EPC (7.5 mg、47.5 mol%)、DOPE (7.5 mg、47.5 mol%) 及び P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-DOPE (19.6 mg、5 mol%) を CHCl₃ (2.5 mL) に溶解後、溶媒を揮発させ、リピッドフィルムを得た。窒素置換後、3.0mM CF/PBS 溶液 (1 mL) を加え、リピッドフィルムを剥離させた。超音波破碎を 30 分間行った後、溶液を 0.2 µm ポリカーボネート膜でサイズを均一化し、PD-10 カラム (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) で精製した後、P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-DOPE 修飾リポソーム (6.48 mg/mL) を得た。同様の手順で、EPC (7.5 mg、47.5 mol%) 及び DOPE (7.5 mg、47.5 mol%)、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-DOPE (14.4 mg、5 mol%) から Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-DOPE 修飾リポソーム (6.23 mg/mL) を得た。対照群として、EPC (7.5 mg、50 mol%)、DOPE (7.5 mg、50 mol%) から未修飾リポソーム (7.02 mg/mL)、EPC (7.5 mg、47.5 mol%)、DOPE (7.5 mg、47.5 mol%) 及び DSPE-PEG (3.2 mg、5 mol%) から PEG 修飾リポソーム (7.42 mg/mL) を得た。脂質濃度は、ラボアッセイ™ りん脂質 (富士フィルム和光純薬) を用いて決定した。

3.2.5. 蛍光封入温度応答性リポソームの物性評価

3.2.5.1. 相転移挙動測定

相転移挙動は、UV-VIS 分光光度計 (V-630) を用いて、PBS 溶液 (脂質濃度 : 0.5 mg/mL) 中の温度変化による光透過率を測定した。溶液の透過率は、500 nm で測定した。PT-31 ペルチェシシステム及び ETC-717 コントローラで温度制御を行い、加熱速度は 0.1°C/min とした。

3.2.5.2. 粒子径測定

粒子径は、Zetasizer Nano ZS を用いて、DLS により測定した。リポソーム懸濁液を PBS 中に分散させ (脂質濃度 : 0.1 mg/mL)、25°C から 50°C の間で評価した。

3.2.5.3. ゼータ電位測定

ゼータ電位は、Zetasizer Nano ZS を用いて、リポソーム懸濁液を PBS 中に分散させ (脂質濃度 : 0.5 mg/mL)、25°C で測定した。

3.2.6. 細胞培養

HeLa 細胞は、10%FBS、50 units/mL penicillin、50 µg/mL streptomycin 及び 146 µg/mL L-glutamine 含有 MEM 培地で 37°C、5% CO₂ 下でインキュベートした。

3.2.7. 蛍光封入リポソームの細胞内取り込み

3.2.7.1. 共焦点レーザー走査顕微鏡による観察

HeLa 細胞を 1.0×10^5 cells/well/0.5mL で、Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System 4 ウェル培養スライド (Thermo Fisher Scientific) に播種した。オーバーナイト後、CF 封入リポソーム (50 µg) を添加し、5% CO₂ 中、37°C または 42°C で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を吸引し、細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液で 2 回リンスした。50 µM LysoTracker® Red DND-99/MEM 溶液を添加し、細胞を 37°C で 30 分間インキュベートした。細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液で 2 回リンスし、4%PFA/PBS 溶液で 20 分間固定した。細胞を PBS で 2 回リンス後、DAPI 含有 VECTORSHIELD® Hard Set™ Mounting Medium で封入し、FV1000D 共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

3.2.7.2. フローサイトメトリー分析

HeLa 細胞を、 2.0×10^5 cells/well/2mL で、6 ウェルプレートに播種した。オーバーナイト後、CF 封入リポソーム (100 µg) を添加し、5% CO₂ 中、37°C または 42°C で 0.5、1、2 または 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を吸引し、細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液で 2 回リンスした。次いで、細胞をトリプシン処理し、10%FBS 含有 MEM 培地でリンスした。細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液でリンス、次いで PBS で 2 回リンスし、35 µm ナイロンメッシュで濾過し、LSR II フローサイトメーターで測定した。蛍光ヒストグラム及びドットプロットを Cell Quest ソフトウェアを用いて生成した。図は FACSDiVa ソフトウェアを用いて、ヒストグラムを再現した。各リポソームを 37°C で 0.5 時間インキュベートした際の蛍光強度を 1.0 とした。

3.2.8. 薬剤封入温度応答性リポソームの作製

EPC (7.5 mg、47.5 mol%)、DOPE (7.5 mg、47.5 mol%) 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-DOPE (14.4 mg、5 mol%) を CHCl₃ (2.5 mL) に溶解後、溶媒を揮発させ、リピッドフィルムを得た。0.3 M 硫酸アンモニウム及び 60 mM クエン酸緩衝液 (1 mL) を加え、リピッドフィルムを剥離させた。超音波破碎を 30 分間行った後、溶液を 0.2 µm ポリカーボネート膜でサイズを均一化し、PD-10 カラム (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) で精製し、未封入の Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-DOPE 修飾リポソーム (5.75 mg/mL) を得た。脂質濃度は、ラボアッセイ™ りん脂質 (富士フィルム和光純薬) を用いて決定した。doxorubicin (DOX; 187µg) を加えた後、35°C で 18 時間、4°C で 1 時間インキュベーションした。

PD-10 カラムで精製後、DOX 封入 Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm20%)-DOPE 修飾リポソームを得た。

3.2.9. 薬剤封入温度応答性リポソームの物性評価

粒子径は、Zetasizer Nano ZS を用いて、DLS により測定した。リポソーム懸濁液を PBS 中に分散させ（脂質濃度：0.1 mg/mL）、25°C で評価した。

3.2.10. 薬剤封入リポソームの細胞内取り込み

HeLa 細胞を 1.0×10^5 cells/well/0.5mL で、Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System 4 ウェル培養スライド (Thermo Fisher Scientific) に播種した。オーバーナイト後、DOX 封入リポソーム (50 μg) を添加し、5% CO₂ 中、37°C または 42°C で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を吸引し、細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液で 2 回リンスした。50 μM LysoTracker® Green DND-26 (Thermo Fisher Scientific) /MEM 溶液を添加し、細胞を 37°C で 30 分間インキュベートした。細胞を 1 mM EDTA/PBS 溶液で 2 回リンスし、4%PFA/PBS 溶液で 20 分間固定した。細胞を PBS で 2 回リンス後、DAPI 含有 VECTORSHIELD® Hard Set™ Mounting Medium で封入し、FV1000D 共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

3.3. 結果及び考察

3.3.1. 温度応答性リポソームの合成及び物理化学的評価

20 mol% の DMAAm を含む温度応答性ポリマーとして P(NIPAAm-co-DMAAm) 及び LAT1 標的部を有する温度応答性ポリマーとして Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) を二章と同様の方法で合成した。P(NIPAAm-co-DMAAm) 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) の平均分子量は、それぞれ 16,700 及び 12,100 であった¹⁷¹。P(NIPAAm-co-DMAAm) 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) の末端に DOPE を修飾し、¹H-NMR で確認した。

温度応答性に対する L-tyrosine と DOPE の温度応答性ポリマーへの結合の影響を調べるために、ポリマーの相転移挙動を DSC で評価した。いずれのポリマーも相転移に伴う吸熱ピークが観察され、P(NIPAAm-co-DMAAm) 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) の吸熱ピーク温度は、それぞれ 37.9°C 及び 37.1°C であった。よって、L-tyrosine の温度応答性ポリマーへの結合は、それらの温度応答性に影響を及ぼさないことが示された。さらに、DOPE 修飾後のポリマーでも吸熱ピーク値が観察され、P(NIPAAm-co-DMAAm)-DOPE 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-DOPE の吸熱ピーク温度は、それぞれ 37.6°C 及び 38.0°C であった。DOPE 修飾前後の吸熱ピーク温度の差は、1°C 以内であり、温度応答性ポリマーへの DOPE 修飾も温度応答性に影響を及ぼさないことが示された。

蛍光封入温度応答性ポリマーとして P(NIPAAm-co-DMAAm)-DOPE または Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-DOPE、EPC 及び DOPE からなる温度応答性リポソームをバンガム法¹⁷² で作製した。対照群として、未修飾リポソーム及び PEG 修飾リポソームを作製した。リポソームを構成する脂質の組成は、EPC:DOPE=1:1 (mol/mol) とした。リポソームは、相転移挙動、サイズ測定及びゼータ電位によって物性評価を行った。

リポソーム懸濁液の透過率測定において、未修飾リポソーム及び PEG 修飾リポソームは、透過率の変化を示さなかった。対して、温度応答性ポリマー修飾リポソームは、40℃付近で透過率の劇的な減少を示した。これは、リポソームに修飾された温度応答性ポリマーが、脱水和し、38℃付近で相転移して疎水性となったためである。次いで、疎水性相互作用によりリポソームが互いに凝集し、沈殿したことで、リポソーム懸濁液中の透過率の低下が引き起こされた。この結果より、温度応答性ポリマー修飾リポソームが、体温付近で疎水性へ変化することが示された。

作製したリポソームの粒子径は、25℃で 130.5~145.1 nm の範囲であり、既往の報告より¹⁷³、*in vivo*での細胞内取り込み及び体内循環に適した粒子径であった。PDI 値は、0.12 以下であり、作製したリポソームは、均一であった。また、温度応答性ポリマー修飾リポソームは、ポリマーの LCST 以上で温度上昇に伴い、粒子径が増大した。一方、未修飾リポソーム及び PEG 修飾リポソームは、それらの粒子径を維持した。これは、リポソーム上に修飾された温度応答性ポリマーが、LCST 以上で疎水性になるため、温度応答性ポリマー修飾リポソームが、疎水性相互作用を介して互いに凝集するためである。従って、リポソームの見かけの粒子径は、LCST 以上の温度において温度上昇と共に増大した。

リポソームの温度応答性の再現性を確認するために、温度を繰り返し変化させながらリポソームのサイズ変化を観察した。連続サイクルで温度を 45℃ (LCST 以上) から 37℃ (LCST 以下) の間で変化させると、温度応答性リポソームの粒子径は、LCST 以上で増加し、そして LCST 以下で減少する可逆的変化を示した。この結果より、調製したリポソームが、再現可能な温度応答性を有することが明らかとなった。

調製したリポソームのゼータ電位を測定し、リポソームの静電的特性を調べた。ゼータ電位は、脂質のリン酸基のアニオン特性に起因して、全てのリポソームで負電荷となった。リポソーム上に修飾されたポリマーは、リポソームのアニオン性を遮蔽するので、PEG または温度応答性ポリマーをリポソームに修飾することにより、リポソームのアニオン性は減少したと考えられる。

3.3.2. 蛍光封入リポソームの細胞内取り込み

インキュベーション温度及び LAT1 認識が、CF 封入リポソームの細胞内取り込みに及ぼす影響を調べた。未修飾リポソーム、PEG 修飾リポソーム、P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソーム、または Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームを HeLa 細胞に添

加し、37°C (LCST 以下) または 42°C (LCST 以上) で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、共焦点顕微鏡での観察及びフローサイトメトリーにより測定した。共焦点顕微鏡画像において、37°C では、PEG 修飾リポソームと P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームでわずかに蛍光が観察された。42°C では、全てのリポソームの細胞内取り込みが確認された。特に、他のリポソームよりも Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームでは、より多くの蛍光が観察された。

細胞内におけるリポソームの局在を確認するために、ライソソームを染色し、37°C 及び 42°C でインキュベートした後のリポソームの局在を共焦点顕微鏡で観察した。42°C では、ライソソーム近傍にリポソームが観察されたが、37°C では、ライソソーム近傍にリポソームは観察されなかった。また、リポソームの細胞内取り込みが、外部温度変化によって促進されたことが示唆された。ライソソーム中の PEG 修飾リポソーム及び P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームは、未修飾リポソームよりも多く観察された。しかし、PEG 修飾リポソーム及び P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームでは、ライソソームへ局在しない内封由来の蛍光も観察された。一方、LCST 以上における Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームは、多くがライソソームに局在していた。この結果より、P (NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームを用いた場合と比較して、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームは、効率的に細胞内へ取り込まれることが示唆された。

リポソームの細胞内取り込み挙動を調べるために、37°C 及び 42°C でのインキュベーション後、フローサイトメトリーによって HeLa 細胞の蛍光強度を測定した。未修飾リポソーム及び PEG 修飾リポソームは、蛍光強度に有意な差を示さなかった。これらのリポソームのほとんどは、細胞内に取り込まれず、蛍光強度が低いことが示唆された。未修飾リポソーム及び PEG 修飾リポソームと比較して、P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームは、蛍光強度の増加を示し、細胞内へ取り込まれる傾向が示された。また、P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームと比較して、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームは、37°C と 42°C の間で蛍光強度の明らかな差が観察された。Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) の末端の L-tyrosine が、LCST 以上で細胞内取り込みを誘導したことが示唆された。

さらに、リポソームの時間依存的な細胞内取り込みを調べるために、HeLa 細胞の蛍光強度を経時的に測定した。未修飾リポソーム及び PEG 修飾リポソームでは、37°C 及び 42°C でインキュベートした細胞間における蛍光強度の有意差は、観察されなかった。温度応答性 P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームの蛍光強度は、37°C 及び 42°C の間で差を示し、その差は、インキュベーション時間の増加と共に増大した。P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームの細胞内取り込みは、インキュベーション時間の延長と共に促進されることが示唆された。また、PEG 修飾リポソーム及び P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームの結果を考慮すると、顕微鏡画像で観察された

ライソソームに局在しない蛍光は、非特異的な吸着であった可能性が示唆された。対照的に、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームの蛍光強度は、インキュベーション時間の延長と共に、42°Cでは著しく増加した。また、P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームと比較して、インキュベーション温度による蛍光強度のより大きな差が、インキュベーションの早期から観察された。以上の結果より、修飾された温度応答性ポリマーの疎水性及びLAT1とポリマー末端のL-tyrosineとの親和性によって、リポソームの細胞内取り込みが促進されることが示唆された。

3.3.3. 薬剤封入りリポソームの作製及び評価

抗がん剤のDOXを封入したチロシン結合温度応答性ポリマー修飾リポソームをリモートローディング法により作製した。作製したリポソームの粒子径は、蛍光封入りリポソームと同様に *in vivo* 細胞内取り込み及び体内循環に適した均一な粒子径であった。

インキュベーション温度におけるDOX封入りリポソームの細胞内取り込みへの影響及び細胞内におけるリポソームの局在を確認するために、リポソームをHeLa細胞に添加し、37°C (LCST以下) または42°C (LCST以上) で4時間インキュベートした後、LysoTracker Green DND-26を用いてライソソームを染色し、共焦点顕微鏡で観察した。Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームは、LCST以上のみでの取り込みを示し、また、LCST以上におけるリポソームのライソソームとの共局在が観察された。よって、作製したDOX内封温度応答性ポリマー修飾リポソームは、温度依存的な細胞内取り込みを示し、温度制御によりDOXの抗腫瘍活性を制御可能な薬物キャリアである可能性が示唆された。

合成した温度応答性ポリマーを修飾したリポソームは、LAT1との親和性及び温度依存的な細胞内取り込みを示した。従って、LAT1ターゲティング温度応答性ポリマー修飾リポソームは、LAT1発現に関与する悪性腫瘍に高いターゲティング能力を有し、がん細胞の環境に応答する、温度調節イメージングおよび薬物デリバリーに有用であることが示唆された。

3.4. 結論

本検討では、LAT1によって認識され、がん細胞に対して高い親和性を有し、温度に応じて細胞内へ取り込まれるリポソームの開発に成功した。共焦点顕微鏡及びフローサイトメトリーによって、HeLa細胞におけるL-tyrosine結合P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームの細胞内取り込み評価を行った。細胞内へ取り込まれたリポソームは、ライソソーム内に局在しており、修飾した温度応答性ポリマーが疎水性になり、細胞膜との相互作用の向上によってエンドサイトーシスが生じた可能性が示唆された。

フローサイトメトリー測定では、LCST以上において、L-tyrosine-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームとインキュベートした細胞の蛍光強度は、他のL-tyrosine部位を有さないリポソームとインキュベートした細胞よりも高く、

ポリマーの疎水性に加え、LAT1 とポリマー末端の L-tyrosine との親和性によって、リポソームの細胞内取り込みが促進されることが示唆された。

開発した LAT1 標的型温度応答性ポリマー修飾リポソームは、LAT1 親和性により高いがん選択性を示し、温度に依存した親水性／疎水性の変化により、細胞内取り込みが調節可能であるため、セラノスティックスのための薬物担体として期待される。

第 4 章

結語

本研究では、LAT1 によって認識、温度に応答して細胞に取り込まれ、がん細胞に対して高い親和性を有する、温度応答性蛍光ポリマープローブ及び温度応答性ポリマー修飾リポソームを開発した。

HeLa 細胞における L-[³H]-leucine の細胞内取り込み阻害実験は、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)が、L-[³H]-leucine の取り込み輸送を阻害した。ポリマー末端に修飾した L-tyrosine の α -アミノ基と α -カルボキシル基により、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)が LAT1 によって認識されることが示唆された。

ポリマーの末端に FL を修飾した蛍光ポリマープローブ、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)ポリマー修飾リポソームは、LCST 以下での細胞内取り込みは確認されなかったが、LCST 以上では、細胞内取り込みが確認された。フローサイトメトリー測定においては、LAT1 認識部位を有さない蛍光プローブやリポソームに対して、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)ポリマー修飾リポソームは、高い蛍光強度を示した。また、LCST 以上でインキュベートした際の蛍光強度は、LCST 以下に対して有意差を示し、ポリマーの疎水性及び LAT1 とポリマー末端の L-tyrosine との親和性の相乗効果が、細胞内取り込みを促進することが示唆された。これは、LAT1 と同様にがん細胞で過剰発現しているトランスポーターASCT2 とポリマーの相互認識に関する報告と一致した¹⁶⁴。

開発した LAT1 標的型の温度応答性蛍光ポリマープローブや薬物キャリアは、LAT1 との親和性及び温度依存的な細胞内取り込みを示し、LAT1 発現に関与する悪性腫瘍及びがん細胞の環境に応答するイメージングや薬物デリバリーに有用であることが示唆された。

参考文献

- 1) Lee, D. Y.; Li, K. C., Molecular theranostics: a primer for the imaging professional. *AJR Am J Roentgenol* **2011**, *197*, 318.
- 2) Kelkar, S. S.; Reineke, T. M., Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjug Chem* **2011**, *22*, 1879.
- 3) Abdoul, H.; Perrey, C.; Amiel, P.; Tubach, F.; Gottot, S.; Durand-Zaleski, I.; Alberti, C., Peer review of grant applications: criteria used and qualitative study of reviewer practices. *PloS one* **2012**, *7*, e46054.
- 4) Svenson, S., Theranostics: are we there yet? *Mol Pharm* **2013**, *10*, 848.
- 5) Massoud, T. F.; Gambhir, S. S., Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* **2003**, *17*, 545.
- 6) Weissleder, R.; Pittet, M. J., Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **2008**, *452*, 580.
- 7) Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stocklin, G., Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med* **1986**, *27*, 235.
- 8) Füchtner, F.; Steinbach, J.; Mäding, P.; Johannsen, B., Basic hydrolysis of 2-[¹⁸F]fluoro-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-d-glucose in the preparation of 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-d-glucose. *Appl. Radiat. Isot.* **1996**, *47*, 61.
- 9) Mankoff, D. A.; Eary, J. F.; Link, J. M.; Muzi, M.; Rajendran, J. G.; Spence, A. M.; Krohn, K. A., Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [¹⁸F] fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin Cancer Res* **2007**, *13*, 3460.
- 10) Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E., The metabolism of tumors in the body. *Journal of General Physiology* **1927**, *8*, 519.
- 11) Warburg, O., On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309.
- 12) Szablewski, L., Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1835*, 164.
- 13) Kubota, R.; Kubota, K.; Yamada, S.; Tada, M.; Ido, T.; Tamahashi, N., Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *J Nucl Med* **1994**, *35*, 104.
- 14) Sugiyama, M.; Sakahara, H.; Sato, K.; Harada, N.; Fukumoto, D.; Kakiuchi, T.; Hirano, T.; Kohno, E.; Tsukada, H., Evaluation of 3'-deoxy-3'-¹⁸F-fluorothymidine for monitoring tumor response to radiotherapy and photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med* **2004**, *45*, 1754.
- 15) Edwards, C. L.; Hayes, R. L., Tumor scanning with ⁶⁷Ga citrate. *J Nucl Med* **1969**, *10*, 103.
- 16) Damadian, R., Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science* **1971**, *171*, 1151.

- 17) Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y., A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **1985**, *260*, 3440.
- 18) Urano, Y.; Asanuma, D.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Barrett, T.; Kamiya, M.; Nagano, T.; Watanabe, T.; Hasegawa, A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nature medicine* **2009**, *15*, 104.
- 19) Urano, Y.; Sakabe, M.; Kosaka, N.; Ogawa, M.; Mitsunaga, M.; Asanuma, D.; Kamiya, M.; Young, M. R.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., Rapid cancer detection by topically spraying a gamma-glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci Transl Med* **2011**, *3*, 110ra119.
- 20) Guyer, D. R.; Mukai, S.; Egan, K. M.; Seddon, J. M.; Walsh, S. M.; Gragoudas, E. S., Radiation maculopathy after proton beam irradiation for choroidal melanoma. *Ophthalmology* **1992**, *99*, 1278.
- 21) Cabanas, R. M., An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* **1977**, *39*, 456.
- 22) Dougherty, T. J.; Kaufman, J. E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D.; Mittleman, A., Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* **1978**, *38*, 2628.
- 23) Kato, H.; Furukawa, K.; Sato, M.; Okunaka, T.; Kusunoki, Y.; Kawahara, M.; Fukuoka, M.; Miyazawa, T.; Yana, T.; Matsui, K.; Shiraishi, T.; Horinouchi, H., Phase II clinical study of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 and diode laser for early superficial squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* **2003**, *42*, 103.
- 24) Yamamoto, J.; Hirano, T.; Li, S.; Koide, M.; Kohno, E.; Inenaga, C.; Tokuyama, T.; Yokota, N.; Yamamoto, S.; Terakawa, S.; Namba, H., Selective accumulation and strong photodynamic effects of a new photosensitizer, ATX-S10.Na (II), in experimental malignant glioma. *Int J Oncol* **2005**, *27*, 1207.
- 25) Regula, J.; MacRobert, A. J.; Gorchein, A.; Buonaccorsi, G. A.; Thorpe, S. M.; Spencer, G. M.; Hatfield, A. R.; Bown, S. G., Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5 aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX--a pilot study. *Gut* **1995**, *36*, 67.
- 26) Webber, J.; Kessel, D.; Fromm, D., Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. *Journal of Surgical Research* **1997**, *68*, 31.
- 27) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2004**, *1*, 279.
- 28) Stummer, W.; Pichlmeier, U.; Meinel, T.; Wiestler, O. D.; Zanella, F.; Reulen, H.-J., Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology* **2006**, *7*, 392.
- 29) Fotinos, N.; Campo, M. A.; Popowycz, F.; Gurny, R.; Lange, N., 5-aminolevulinic acid

derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. *Photochem Photobiol* **2006**, *82*, 994.

30) Wang, W. Q.; Tabu, K.; Hagiya, Y.; Sugiyama, Y.; Kokubu, Y.; Murota, Y.; Ogura, S.; Taga, T., Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation. *Sci Rep* **2017**, *7*.

31) Abuchowski, A.; Vanes, T.; Palczuk, N. C.; Chen, R.; Davis, F. F., Effect of Covalently Attached Polyethylene-Glycol on Immunogenicity of Enzymes. *Federation Proceedings* **1977**, *36*, 867.

32) Abuchowski, A.; Vanes, T.; Palczuk, N. C.; Davis, F. F., Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum-Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene-Glycol. *Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252*, 3578.

33) Harris, J. M.; Chess, R. B., Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 214.

34) Veronese, F. M.; Pasut, G., PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1451.

35) Bangham, A. D.; Horne, R. W., Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J Mol Biol* **1964**, *8*, 660.

36) Gregoriadis, G.; Neerunjun, D. E., Control of the rate of hepatic uptake and catabolism of liposome-entrapped proteins injected into rats. Possible therapeutic applications. *Eur J Biochem* **1974**, *47*, 179.

37) Pirson, P.; Steiger, R.; Trouet, A., The disposition of free and liposomally encapsulated antimalarial primaquine in mice. *Biochem Pharmacol* **1982**, *31*, 3501.

38) Scherphof, G.; Van Leeuwen, B.; Wilschut, J.; Damen, J., Exchange of phosphatidylcholine between small unilamellar liposomes and human plasma high-density lipoprotein involves exclusively the phospholipid in the outer monolayer of the liposomal membrane. *Biochim Biophys Acta* **1983**, *732*, 595.

39) Devine, D. V.; Marjan, J. M., The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1997**, *14*, 105.

40) Allen, T. M.; Chonn, A., Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett* **1987**, *223*, 42.

41) Klibanov, A. L.; Maruyama, K.; Torchilin, V. P.; Huang, L., Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* **1990**, *268*, 235.

42) Blume, G.; Cevc, G., Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1990**, *1029*, 91.

43) Papahadjopoulos, D.; Allen, T. M.; Gabizon, A.; Mayhew, E.; Matthay, K.; Huang, S. K.;

- Lee, K. D.; Woodle, M. C.; Lasic, D. D.; Redemann, C.; et al., Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 11460.
- 44) Woodle, M. C.; Lasic, D. D., Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* **1992**, *1113*, 171.
- 45) Bonte, F.; Juliano, R. L., Interactions of liposomes with serum proteins. *Chem Phys Lipids* **1986**, *40*, 359.
- 46) Allen, T. M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redemann, C.; Yau-Young, A., Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1991**, *1066*, 29.
- 47) Senior, J.; Delgado, C.; Fisher, D.; Tilcock, C.; Gregoriadis, G., Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1991**, *1062*, 77.
- 48) Lasic, D. D.; Martin, F. J.; Gabizon, A.; Huang, S. K.; Papahadjopoulos, D., Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim Biophys Acta* **1991**, *1070*, 187.
- 49) Lee, K. D.; Hong, K.; Papahadjopoulos, D., Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochim Biophys Acta* **1992**, *1103*, 185.
- 50) Needham, D.; McIntosh, T. J.; Lasic, D. D., Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1992**, *1108*, 40.
- 51) Kenworthy, A. K.; Hristova, K.; Needham, D.; McIntosh, T. J., Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol). *Biophysical Journal* **1995**, *68*, 1921.
- 52) Matsumura, Y.; Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research* **1986**, *46*, 6387.
- 53) Jain, R. K., Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev* **1987**, *6*, 559.
- 54) Dvorak, H. F.; Nagy, J. A.; Dvorak, J. T.; Dvorak, A. M., Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* **1988**, *133*, 95.
- 55) Kohn, S.; Nagy, J. A.; Dvorak, H. F.; Dvorak, A. M., Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Laboratory Investigation* **1992**, *67*, 596.
- 56) Dvorak, H. F.; Brown, L. F.; Detmar, M.; Dvorak, A. M., Vascular permeability

factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* **1995**, *146*, 1029.

57) Senior, J.; Crawley, J. C.; Gregoriadis, G., Tissue distribution of liposomes exhibiting long half-lives in the circulation after intravenous injection. *Biochim Biophys Acta* **1985**, *839*, 1.

58) Ishida, O.; Maruyama, K.; Sasaki, K.; Iwatsuru, M., Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. *International Journal of Pharmaceutics* **1999**, *190*, 49.

59) Liu, D.; Mori, A.; Huang, L., Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1992**, *1104*, 95.

60) Charrois, G. J. R.; Allen, T. M., Rate of biodistribution of STEALTH® liposomes to tumor and skin: influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2003**, *1609*, 102.

61) 菊池, 寛., 企業の観点から見た DDS 技術の将来展望. *Drug Delivery System* **2014**, *29*, 51.

62) Lee, R. J.; Huang, L., Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 8481.

63) Lu, Y.; Low, P. S., Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev* **2002**, *54*, 675.

64) Hashida, M.; Nishikawa, M.; Yamashita, F.; Takakura, Y., Cell-specific delivery of genes with glycosylated carriers. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *52*, 187.

65) Hashida, M.; Kawakami, S.; Yamashita, F., Lipid carrier systems for targeted drug and gene delivery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2005**, *53*, 871.

66) Kullberg, E. B.; Nestor, M.; Gedda, L., Tumor-cell targeted epidermal growth factor liposomes loaded with boronated acridine: uptake and processing. *Pharm Res* **2003**, *20*, 229.

67) Schiffelers, R. M.; Koning, G. A.; ten Hagen, T. L.; Fens, M. H.; Schraa, A. J.; Janssen, A. P.; Kok, R. J.; Molema, G.; Storm, G., Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J Control Release* **2003**, *91*, 115.

68) Kovar, M.; Strohalm, J.; Ulbrich, K.; Rihova, B., In vitro and in vivo effect of HPMA copolymer-bound doxorubicin targeted to transferrin receptor of B-cell lymphoma 38C13. *Journal of Drug Targeting* **2002**, *10*, 23.

69) Kakudo, T.; Chaki, S.; Futaki, S.; Nakase, I.; Akaji, K.; Kawakami, T.; Maruyama, K.; Kamiya, H.; Harashima, H., Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5618.

70) Park, J. W.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Colbern, G.; Shalaby, R.; Baselga, J.; Shao, Y.; Nielsen, U. B.; Marks, J. D.; Moore, D.; Papahadjopoulos, D.; Benz, C. C., Anti-HER2

- immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res* **2002**, 8, 1172.
- 71) Torchilin, V. P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, 4, 145.
- 72) Conner, S. D.; Schmid, S. L., Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **2003**, 422, 37.
- 73) Yatvin, M. B.; Weinstein, J. N.; Dennis, W. H.; Blumenthal, R., Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* **1978**, 202, 1290.
- 74) Weinstein, J. N.; Magin, R. L.; Yatvin, M. B.; Zaharko, D. S., Liposomes and local hyperthermia: selective delivery of methotrexate to heated tumors. *Science* **1979**, 204, 188.
- 75) Hayashi, H.; Kono, K.; Takagishi, T., Temperature-controlled release property of phospholipid vesicles bearing a thermo-sensitive polymer. *Biochim Biophys Acta* **1996**, 1280, 127.
- 76) Kim, J.-C.; Bae, S. K.; Kim, J.-D., Temperature-Sensitivity of Liposomal Lipid Bilayers Mixed with Poly(N-Isopropylacrylamide-co-acrylic Acid). *The Journal of Biochemistry* **1997**, 121, 15.
- 77) Kono, K.; Nakai, R.; Morimoto, K.; Takagishi, T., Temperature-dependent interaction of thermo-sensitive polymer-modified liposomes with CV1 cells. *FEBS Lett* **1999**, 456, 306.
- 78) Pidgeon, C.; Schreiber, R. D.; Schultz, R. M., Macrophage activation: synergism between hybridoma MAF and poly(I). Poly(C) delivered by liposomes. *Journal of Immunology* **1983**, 131, 311.
- 79) Frankel, D. A.; Lamparski, H.; Liman, U.; O'Brien, D. F., Photoinduced Destabilization of Bilayer Vesicles. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, 9262.
- 80) Anderson, V. C.; Thompson, D. H., Triggered Release of Hydrophilic Agents from Plasmalogen Liposomes Using Visible-Light or Acid. *Biochim Biophys Acta* **1992**, 1109, 33.
- 81) Bisby, R. H.; Mead, C.; Morgan, C. G., Wavelength-programmed solute release from photosensitive liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, 276, 169.
- 82) Ignee, A.; Atkinson, N. S.; Schuessler, G.; Dietrich, C. F., Ultrasound contrast agents. *Endosc Ultrasound* **2016**, 5, 355.
- 83) Ibsen, S.; Schutt, C. E.; Esener, S., Microbubble-mediated ultrasound therapy: a review of its potential in cancer treatment. *Drug Des Devel Ther* **2013**, 7, 375.
- 84) Yatvin, M. B.; Kreutz, W.; Horwitz, B. A.; Shinitzky, M., Ph-Sensitive Liposomes - Possible Clinical Implications. *Science* **1980**, 210, 1253.
- 85) Nayar, R.; Schroit, A. J., Generation of Ph-Sensitive Liposomes - Use of Large Unilamellar Vesicles Containing N-Succinyldioleoylphosphatidylethanolamine. *Biochemistry* **1985**, 24, 5967.
- 86) Maeda, M.; Kumano, A.; Tirrell, D. A., H⁺-Induced Release of Contents of

Phosphatidylcholine Vesicles Bearing Surface-Bound Poly-Electrolyte Chains. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 7455.

87) Kitano, H.; Akatsuka, Y.; Ise, N., Ph-Responsive Liposomes Which Contain Amphiphiles Prepared by Using Lipophilic Radical Initiator. *Macromolecules* **1991**, *24*, 42.

88) Choi, M.-J.; Han, H.-S.; Kim, H., pH-Sensitive Liposomes Containing Polymerized Phosphatidylethanolamine and Fatty Acid1. *The Journal of Biochemistry* **1992**, *112*, 694.

89) Kauscher, U.; N.Holme, M.; Björnalm, M.; Stevens, M., Physical stimuli-responsive vesicles in drug delivery: Beyond liposomes and polymersomes. *Adv Drug Deliv Rev* **2018**, *In press*.

90) Ringsdorf, H.; Schlarb, B.; Venzmer, J., Molecular Architecture and Function of Polymeric Oriented Systems - Models for the Study of Organization, Surface Recognition, and Dynamics of Biomembranes. *Angewandte Chemie-International Edition* **1988**, *27*, 113.

91) Bae, Y. H.; Okano, T.; Kim, S. W., Temperature Dependence of Swelling of Crosslinked Poly(N,N'-alkyl substituted acrylamides) in Water. *J Polym Sci B Polym Phys* **1990**, *28*, 923.

92) Suwa, K.; Morishita, K.; Kishida, A.; Akashi, M., Synthesis and Functionalities of Poly(N-Vinylalkylamide) . V. Control of a Lower Critical Solution Temperature of Poly(N-Vinylalkylamide). *J Polym Sci A Polym Chem* **1997**, *35*, 3087.

93) Horne, R. A.; Almeida, J. P.; Day, A. F.; Yu, N. T., Macromolecule hydration and the effect of solutes on the cloud point of aqueous solutions of polyvinyl methyl ether: a possible model for protein denaturation and temperature control in homeothermic animals. *J Colloid Interface Sci* **1971**, *35*, 77.

94) Schmolka, I. R., Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res* **1972**, *6*, 571.

95) Scarpa, J. S.; Mueller, D. D.; Klotz, I. M., Slow Hydrogen-Deuterium Exchange in a Non-Alpha-Helical Polyamide. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 6024.

96) Heskins, M.; Guillet, J. E., Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* **1968**, *2*, 1441.

97) Nakayama, M.; Akimoto, J.; Okano, T., Polymeric micelles with stimuli-triggering systems for advanced cancer drug targeting. *J Drug Target* **2014**, *22*, 584.

98) Akimoto, J.; Nakayama, M.; Okano, T., Temperature-responsive polymeric micelles for optimizing drug targeting to solid tumors. *Journal of Controlled Release* **2014**, *193*, 2.

99) Kanazawa, H.; Yamamoto, K.; Matsushima, Y.; Takai, N.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T., Temperature-Responsive Chromatography Using Poly(N-isopropylacrylamide)-Modified Silica. *Anal Chem* **1996**, *68*, 100.

100) Kanazawa, H.; Kashiwase, Y.; Yamamoto, K.; Matsushima, Y.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T., Temperature-responsive liquid chromatography. 2. Effects of hydrophobic groups in N-isopropylacrylamide copolymer-modified silica. *Anal Chem* **1997**, *69*, 823.

- 101) Ayano, E.; Kanazawa, H., Development of temperature-responsive chromatography using functional polymers. *Bunseki Kagaku* **2005**, *54*, 593.
- 102) Akimaru, M.; Okubo, K.; Hiruta, Y.; Kanazawa, H., Temperature-responsive Solid-phase Extraction Column for Biological Sample Pretreatment. *Anal Sci* **2015**, *31*, 881.
- 103) Nagase, K.; Okano, T., Thermoresponsive-polymer-based materials for temperature-modulated bioanalysis and bioseparations. *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, *4*, 6381.
- 104) Mikuma, T.; Kuroki, T.; Yoshikawa, M.; Uchida, R.; Hiruta, Y.; Kanazawa, H., Analysis of Psychoactive Drugs by Temperature-Responsive Chromatography. *Chromatography* **2017**, *38*, 115.
- 105) Yamada, N.; Okano, T.; Sakai, H.; Karikusa, F.; Sawasaki, Y.; Sakurai, Y., Thermoresponsive Polymeric Surfaces - Control of Attachment and Detachment of Cultured-Cells. *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications* **1990**, *11*, 571.
- 106) Ebara, M.; Yamato, M.; Aoyagi, T.; Kikuchi, A.; Sakai, K.; Okano, T., A novel approach to observing synergy effects of PHSRN on integrin-RGD binding using intelligent surfaces. *Advanced Materials* **2008**, *20*, 3034.
- 107) Mizutani, A.; Kikuchi, A.; Yamato, M.; Kanazawa, H.; Okano, T., Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2073.
- 108) Nagase, K.; Kobayashi, J.; Okano, T., Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering. *J R Soc Interface* **2009**, *6 Suppl 3*, S293.
- 109) Nagase, K.; Nagumo, Y.; Kim, M.; Kim, H. J.; Kyung, H. W.; Chung, H. J.; Sekine, H.; Shimizu, T.; Kanazawa, H.; Okano, T.; Lee, S. J.; Yamato, M., Local Release of VEGF Using Fiber Mats Enables Effective Transplantation of Layered Cardiomyocyte Sheets. *Macromol Biosci* **2017**, *17*.
- 110) Nagase, K.; Okano, T.; Kanazawa, H., Poly(N-isopropylacrylamide) based thermoresponsive polymer brushes for bioseparation, cellular tissue fabrication, and nano actuators. *Nano-Structures and Nano-Objects* **2018**, *16*, 9.
- 111) Nagase, K.; Yamato, M.; Kanazawa, H.; Okano, T., Poly(N-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications. *Biomaterials* **2018**, *153*, 27.
- 112) Gil, E. S.; Hudson, S. M., Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymer Science* **2004**, *29*, 1173.
- 113) Feil, H.; Bae, Y. H.; Feijen, J.; Kim, S. W., Effect of Comonomer Hydrophilicity and Ionization on the Lower Critical Solution Temperature of N-Isopropylacrylamide Copolymers. *Macromolecules* **1993**, *26*, 2496.
- 114) Takei, Y. G.; Aoki, T.; Sanui, K.; Ogata, N.; Okano, T.; Sakurai, Y.,

Temperature-Responsive Bioconjugates .2. Molecular Design for Temperature-Modulated Bioseparations. *Bioconjug Chem* **1993**, *4*, 341.

115) Liu, H. Y.; Zhu, X. X., Lower critical solution temperatures of N-substituted acrylamide copolymers in aqueous solutions. *Polymer* **1999**, *40*, 6985.

116) Yin, X.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S., Poly(N-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) copolymers that respond sharply to temperature and pH. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1381.

117) Ringsdorf, H.; Venzmer, J.; Winnik, F. M., Interaction of Hydrophobically-Modified Poly-N-Isopropylacrylamides with Model Membranes - or Playing a Molecular Accordion. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1991**, *30*, 315.

118) Wu, W. S.; Hoffman, A. S.; Yager, P., Conjugation of phosphatidylethanolamine to poly(N-isopropylacrylamide) for potential use in liposomal drug delivery systems. *Polymer* **1992**, *33*, 4659.

119) Kono, K.; Hayashi, H.; Takagishi, T., Temperature-Sensitive Liposomes - Liposomes Bearing Poly(N-Isopropylacrylamide). *Journal of Controlled Release* **1994**, *30*, 69.

120) Kitano, H.; Maeda, Y.; Takeuchi, S.; Ieda, K.; Aizu, Y., Liposomes Containing Amphiphiles Prepared by Using a Lipophilic Chain Transfer Reagent - Responsiveness to External Stimuli. *Langmuir* **1994**, *10*, 403.

121) Kono, K., Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *53*, 307.

122) Ta, T.; Convertine, A. J.; Reyes, C. R.; Stayton, P. S.; Porter, T. M., Thermosensitive liposomes modified with poly(N-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) copolymers for triggered release of doxorubicin. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1915.

123) Wang, J.; Ayano, E.; Maitani, Y.; Kanazawa, H., Tunable Surface Properties of Temperature-Responsive Polymer-Modified Liposomes Induce Faster Cellular Uptake. *Acs Omega* **2017**, *2*, 316.

124) Wang, J.; Ayano, E.; Maitani, Y.; Kanazawa, H., Enhanced cellular uptake and gene silencing activity of siRNA using temperature-responsive polymer-modified liposome. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *523*, 217.

125) Nemoto, R.; Fujieda, K.; Hiruta, Y.; Hishida, M.; Ayano, E.; Maitani, Y.; Nagase, K.; Kanazawa, H., Liposomes with Temperature-Responsive Reversible Surface Properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**.

126) Ganapathy, V.; Thangaraju, M.; Prasad, P. D., Nutrient transporters in cancer: Relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacology & Therapeutics* **2009**, *121*, 29.

127) Bhutia, Y. D.; Ganapathy, V., Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1863*, 2531.

128) Kanai, Y.; Segawa, H.; Miyamoto, K.; Uchino, H.; Takeda, E.; Endou, H., Expression

cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* **1998**, *273*, 23629.

129) Babu, E.; Kanai, Y.; Chairoungdua, A.; Kim, D. K.; Iribe, Y.; Tangtrongsup, S.; Jutabha, P.; Li, Y.; Ahmed, N.; Sakamoto, S.; Anzai, N.; Nagamori, S.; Endou, H., Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 43838.

130) Utsunomiya-Tate, N.; Endou, H.; Kanai, Y., Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 14883.

131) Sloan, J. L.; Mager, S., Cloning and functional expression of a human Na⁽⁺⁾ and Cl⁽⁻⁾-dependent neutral and cationic amino acid transporter B⁽⁰⁺⁾. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 23740.

132) Sato, H.; Tamba, M.; Ishii, T.; Bannai, S., Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 11455.

133) Hirayama, A.; Kami, K.; Sugimoto, M.; Sugawara, M.; Toki, N.; Onozuka, H.; Kinoshita, T.; Saito, N.; Ochiai, A.; Tomita, M.; Esumi, H.; Soga, T., Quantitative Metabolome Profiling of Colon and Stomach Cancer Microenvironment by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Cancer Res* **2009**, *69*, 4918.

134) Verrey, F.; Closs, E. I.; Wagner, C. A.; Palacin, M.; Endou, H.; Kanai, Y., CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* **2004**, *447*, 532.

135) Uchino, H.; Kanai, Y.; Kim, D. K.; Wempe, M. F.; Chairoungdua, A.; Morimoto, E.; Anders, M. W.; Endou, H., Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol Pharmacol* **2002**, *61*, 729.

136) Prasad, P. D.; Wang, H. P.; Huang, W.; Kekuda, R.; Rajan, D. P.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V., Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: Molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *255*, 283.

137) Fotiadis, D.; Kanai, Y.; Palacin, M., The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med* **2013**, *34*, 139.

138) Ritchie, J. W.; Taylor, P. M., Role of the System L permease LAT1 in amino acid and iodothyronine transport in placenta. *Biochem J* **2001**, *356*, 719.

139) Kageyama, T.; Nakamura, M.; Matsuo, A.; Yamasaki, Y.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Kanai, Y.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Minato, N.; Shimohama, S., The 4F2hc/LAT1 complex transports l-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Research* **2000**, *879*, 115.

140) Nawashiro, H.; Otani, N.; Shinomiya, N.; Fukui, S.; Ooigawa, H.; Shima, K.; Matsuo, H.; Kanai, Y.; Endou, H., L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in

- human astrocytic tumors. *Int J Cancer* **2006**, *119*, 484.
- 141) Kaira, K.; Oriuchi, N.; Imai, H.; Shimizu, K.; Yanagitani, N.; Sunaga, N.; Hisada, T.; Tanaka, S.; Ishizuka, T.; Kanai, Y.; Endou, H.; Nakajima, T.; Mori, M., Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 expression in resectable stage I-III nonsmall cell lung cancer. *Br J Cancer* **2008**, *98*, 742.
- 142) Kaira, K.; Oriuchi, N.; Imai, H.; Shimizu, K.; Yanagitani, N.; Sunaga, N.; Hisada, T.; Ishizuka, T.; Kanai, Y.; Endou, H.; Nakajima, T.; Mori, M., L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is frequently expressed in thymic carcinomas but is absent in thymomas. *J Surg Oncol* **2009**, *99*, 433.
- 143) Sakata, T.; Ferdous, G.; Tsuruta, T.; Satoh, T.; Baba, S.; Muto, T.; Ueno, A.; Kanai, Y.; Endou, H.; Okayasu, I., L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathol Int* **2009**, *59*, 7.
- 144) Furuya, M.; Horiguchi, J.; Nakajima, H.; Kanai, Y.; Oyama, T., Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci* **2012**, *103*, 382.
- 145) Kaira, K.; Sunose, Y.; Arakawa, K.; Ogawa, T.; Sunaga, N.; Shimizu, K.; Tominaga, H.; Oriuchi, N.; Itoh, H.; Nagamori, S.; Kanai, Y.; Segawa, A.; Furuya, M.; Mori, M.; Oyama, T.; Takeyoshi, I., Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer. *Br J Cancer* **2012**, *107*, 632.
- 146) Hayashi, K.; Anzai, N., Novel therapeutic approaches targeting L-type amino acid transporters for cancer treatment. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* **2017**, *9*, 21.
- 147) Nicklin, P.; Bergman, P.; Zhang, B.; Triantafellow, E.; Wang, H.; Nyfeler, B.; Yang, H.; Hild, M.; Kung, C.; Wilson, C.; Myer, V. E.; MacKeigan, J. P.; Porter, J. A.; Wang, Y. K.; Cantley, L. C.; Finan, P. M.; Murphy, L. O., Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **2009**, *136*, 521.
- 148) Zhao, Y.; Wang, L.; Pan, J., The role of L-type amino acid transporter 1 in human tumors. *Intractable & rare diseases research* **2015**, *4*, 165.
- 149) Kaira, K.; Oriuchi, N.; Otani, Y.; Shimizu, K.; Tanaka, S.; Imai, H.; Yanagitani, N.; Sunaga, N.; Hisada, T.; Ishizuka, T.; Dobashi, K.; Kanai, Y.; Endou, H.; Nakajima, T.; Endo, K.; Mori, M., Fluorine-18-alpha-methyltyrosine positron emission tomography for diagnosis and staging of lung cancer: a clinicopathologic study. *Clin Cancer Res* **2007**, *13*, 6369.
- 150) Kaira, K.; Oriuchi, N.; Shimizu, K.; Ishikita, T.; Higuchi, T.; Imai, H.; Yanagitani, N.; Sunaga, N.; Hisada, T.; Ishizuka, T.; Kanai, Y.; Endou, H.; Nakajima, T.; Endo, K.; Mori, M., Correlation of angiogenesis with 18F-FMT and 18F-FDG uptake in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* **2009**, *100*, 753.
- 151) Kaira, K.; Oriuchi, N.; Shimizu, K.; Imai, H.; Tominaga, H.; Yanagitani, N.; Sunaga, N.; Hisada, T.; Ishizuka, T.; Kanai, Y.; Oyama, T.; Mori, M.; Endo, K., Comparison of L-type

- amino acid transporter 1 expression and L-[3-18F]-alpha-methyl tyrosine uptake in outcome of non-small cell lung cancer. *Nucl Med Biol* **2010**, *37*, 911.
- 152) Wang, L.; Lieberman, B. P.; Plossl, K.; Qu, W.; Kung, H. F., Synthesis and comparative biological evaluation of L- and D-isomers of 18F-labeled fluoroalkyl phenylalanine derivatives as tumor imaging agents. *Nucl Med Biol* **2011**, *38*, 301.
- 153) Kramer, S. D.; Mu, L.; Muller, A.; Keller, C.; Kuznetsova, O. F.; Schweinsberg, C.; Franck, D.; Muller, C.; Ross, T. L.; Schibli, R.; Ametamey, S. M., 5-(2-18F-fluoroethoxy)-L-tryptophan as a substrate of system L transport for tumor imaging by PET. *J Nucl Med* **2012**, *53*, 434.
- 154) Denoyer, D.; Kirby, L.; Waldeck, K.; Roselt, P.; Neels, O. C.; Bourdier, T.; Shepherd, R.; Katsifis, A.; Hicks, R. J., Preclinical characterization of 18F-D-FPHCys, a new amino acid-based PET tracer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2012**, *39*, 703.
- 155) Wiriyasermkul, P.; Nagamori, S.; Tominaga, H.; Oriuchi, N.; Kaira, K.; Nakao, H.; Kitashoji, T.; Ohgaki, R.; Tanaka, H.; Endou, H.; Endo, K.; Sakurai, H.; Kanai, Y., Transport of 3-fluoro-L-alpha-methyl-tyrosine by tumor-upregulated L-type amino acid transporter 1: a cause of the tumor uptake in PET. *J Nucl Med* **2012**, *53*, 1253.
- 156) Detta, A.; Cruickshank, G. S., L-amino acid transporter-1 and boronophenylalanine-based boron neutron capture therapy of human brain tumors. *Cancer Res* **2009**, *69*, 2126.
- 157) Wongthai, P.; Hagiwara, K.; Miyoshi, Y.; Wiriyasermkul, P.; Wei, L.; Ohgaki, R.; Kato, I.; Hamase, K.; Nagamori, S.; Kanai, Y., Boronophenylalanine, a boron delivery agent for boron neutron capture therapy, is transported by ATB0+, LAT1 and LAT2. *Cancer Sci* **2015**, *106*, 279.
- 158) Oda, K.; Hosoda, N.; Endo, H.; Saito, K.; Tsujihara, K.; Yamamura, M.; Sakata, T.; Anzai, N.; Wempe, M. F.; Kanai, Y.; Endou, H., L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci* **2010**, *101*, 173.
- 159) Li, L.; Di, X.; Zhang, S.; Kan, Q.; Liu, H.; Lu, T.; Wang, Y.; Fu, Q.; Sun, J.; He, Z., Large amino acid transporter 1 mediated glutamate modified docetaxel-loaded liposomes for glioma targeting. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2016**, *141*, 260.
- 160) Hiruta, Y.; Shimamura, M.; Matsuura, M.; Maekawa, Y.; Funatsu, T.; Suzuki, Y.; Ayano, E.; Okano, T.; Kanazawa, H., Temperature-Responsive Fluorescence Polymer Probes with Accurate Thermally Controlled Cellular Uptakes. *Acs Macro Letters* **2014**, *3*, 281.
- 161) Hiruta, Y.; Funatsu, T.; Matsuura, M.; Wang, J.; Ayano, E.; Kanazawa, H., pH/temperature-responsive fluorescence polymer probe with pH-controlled cellular uptake. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2015**, *207*, 724.
- 162) Yamada, A.; Hiruta, Y.; Wang, J.; Ayano, E.; Kanazawa, H., Design of Environmentally Responsive Fluorescent Polymer Probes for Cellular Imaging. *Biomacromolecules* **2015**, *16*,

2356.

163) Mann, A.; Semenenko, I.; Meir, M.; Eyal, S., Molecular Imaging of Membrane Transporters' Activity in Cancer: a Picture is Worth a Thousand Tubes. *AAPS J* **2015**, *17*, 788.

164) Yamada, N.; Honda, Y.; Takemoto, H.; Nomoto, T.; Matsui, M.; Tomoda, K.; Konno, M.; Ishii, H.; Mori, M.; Nishiyama, N., Engineering Tumour Cell-Binding Synthetic Polymers with Sensing Dense Transporters Associated with Aberrant Glutamine Metabolism. *Sci Rep* **2017**, *7*, 6077.

165) Volk, T.; Jahde, E.; Fortmeyer, H. P.; Glusenka, K. H.; Rajewsky, M. F., pH in human tumour xenografts: effect of intravenous administration of glucose. *Br J Cancer* **1993**, *68*, 492.

166) Izumi, H.; Torigoe, T.; Ishiguchi, H.; Uramoto, H.; Yoshida, Y.; Tanabe, M.; Ise, T.; Murakami, T.; Yoshida, T.; Nomoto, M.; Kohno, K., Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* **2003**, *29*, 541.

167) Akizawa, H.; Imajima, M.; Hanaoka, H.; Uehara, T.; Satake, S.; Arano, Y., Renal brush border enzyme-cleavable linkages for low renal radioactivity levels of radiolabeled antibody fragments. *Bioconjug Chem* **2013**, *24*, 291.

168) Yanagida, O.; Kanai, Y.; Chairoungdua, A.; Kim, D. K.; Segawa, H.; Nii, T.; Cha, S. H.; Matsuo, H.; Fukushima, J.; Fukasawa, Y.; Tani, Y.; Taketani, Y.; Uchino, H.; Kim, J. Y.; Inatomi, J.; Okayasu, I.; Miyamoto, K.; Takeda, E.; Goya, T.; Endou, H., Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1514*, 291.

169) Fuchs, B. C.; Bode, B. P., Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin Cancer Biol* **2005**, *15*, 254.

170) Khunweeraphong, N.; Nagamori, S.; Wiriyasermku, P.; Nishinaka, Y.; Wongthai, P.; Ohgaki, R.; Tanaka, H.; Tominaga, H.; Sakurai, H.; Kanai, Y., Establishment of Stable Cell Lines With High Expression of Heterodimers of Human 4F2hc and Human Amino Acid Transporter LAT1 or LAT2 and Delineation of Their Differential Interaction With alpha-Alkyl Moieties. *Journal of Pharmacological Sciences* **2012**, *119*, 368.

171) Matsuura, M.; Ohshima, M.; Hiruta, Y.; Nishimura, T.; Nagase, K.; Kanazawa, H., LAT1-Targeting Thermoresponsive Fluorescent Polymer Probes for Cancer Cell Imaging. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*.

172) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* **1965**, *13*, 238.

173) Nagayasu, A.; Uchiyama, K.; Kiwada, H., The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, *40*, 75.

研究業績

主論文

1. Matsuura M.; Ohshima M.; Hiruta, Y.; Nishimura, T.; Nagase, K.; Kanazawa, H., LAT1-Targeting Thermoresponsive Fluorescent Polymer Probes for Cancer Cell Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*(6) 1646, doi:10.3390/ijms19061646
2. Maekawa-Matsuura. M.; Fujieda K.; Maekawa, Y.; Nishimura, T.; Nagase, K.; Kanazawa, H. LAT1-targeting thermoresponsive liposome for effective cellular uptake of cancer cells. *ACS Omega* submitted.

参考論文

1. Hiruta, Y.; Shimamura, M.; Matsuura, M.; Maekawa, Y.; Funatsu, T.; Suzuki, Y.; Ayano, E.; Okano, T.; Kanazawa, H. Temperature-Responsive Fluorescence Polymer Probes with Accurate Thermally Controlled Cellular Uptakes. *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 281–285, doi:10.1021/mz5000569.
2. Hiruta, Y.; Funatsu, T.; Matsuura, M.; Wang, J.; Ayano, E.; Kanazawa, H. pH/temperature-responsive fluorescence polymer probe with pH-controlled cellular uptake. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *207*, 724–731, doi:10.1016/j.snb.2014.10.065.

学会発表

1. Design of LAT1-targeting fluorescent polymer probes
Minami Matsuura, Mariko Ohshima, Hitomi Yoshioka, Yuki Hiruta, and Hideko Kanazawa
3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (東京)、2016年11月28日～30日
2. がんの可視化を目指した新規温度応答性蛍光プローブの開発
大島麻理子、松浦みなみ、吉岡仁美、蛭田勇樹、金澤秀子
日本薬学会第137年会(宮城)、2017年3月24日～27日
3. がん細胞選択的な新規蛍光プローブの開発
大島麻理子、松浦みなみ、吉岡仁美、蛭田勇樹、金澤秀子
日本分析化学会第66年会(東京)、2017年9月9日～12日

謝辭

本研究の遂行にあたり、終始、懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました本学創薬物理化学講座の金澤秀子教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の総括にあたり、多くの専門的なご指導とご協力を賜りました長瀬健一准教授に心より感謝致します。

本研究の実施にあたり、ご協力を賜りました大島麻理子さん、藤條恵さん、前川祐太郎さんに深く感謝致します。

各方面にわたり、常に温かいご配慮を賜りました伊藤佳子講師、綾野絵里研究員、研究室生活を明るく活気づけてくれた皆さまに感謝致します。

また、多くの専門的なご助言を賜りました本学理工学部の蛭田勇樹専任講師、薬剤学講座の西村友宏准教授、本研究の副査として丁寧なご指導と多くの専門的なご助言を賜りました薬物治療学講座の齋藤義正准教授、化学療法学講座の野口耕司准教授に心より感謝致します。

最後に常に温かく見守り、励まし、支えてくれた家族・友人・職場の皆さまに深く御礼申し上げます。

2019年2月
松浦 みなみ