

静電的相互作用による自己組織化に基づく
がん標的ナノ粒子型セラノステイクス薬剤の開発研究

2023

薬品物理化学

田中 寿枝

目次

略語表

序論-----	1
本論-----	3

第1章 肺転移メラノーマの核医学診断を目的とする

γ -ポリグルタミン酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発-----	3
1-1 緒言-----	3
1-2 結果-----	5
1-2-1 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA の作製-----	5
1-2-2 B16-F10 細胞への各ナノ粒子の集積性評価-----	7
1-2-3 健常マウスにおける各ナノ粒子の生体内分布評価-----	8
1-2-4 肺転移メラノーマモデルマウスにおける ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA の生体内分布評価-----	11
1-3 考察-----	13
1-4 小括-----	15

第2章 CD44 高発現がんの核医学診断を目的とする

ヒアルロン酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発-----	16
2-1 緒言-----	16
2-2 結果-----	17
2-2-1 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA の作製-----	17
2-2-2 細胞取り込み評価-----	19

2-2-3	健常マウスにおける生体内分布評価-----	20
2-2-4	担がんマウスにおける生体内分布評価-----	21
2-2-5	^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA のがん組織内局在評価-----	22
2-3	考察-----	23
2-4	小括-----	24
第3章	CD44 高発現がんの光温熱治療を目的とする	
	ヒアルロン酸誘導体被覆自己組織化ナノ粒子の開発-----	25
3-1	緒言-----	25
3-2	結果-----	27
3-2-1	硫酸化ヒアルロン酸 (sHA) の合成-----	27
3-2-2	GNR/HA の作製-----	28
3-2-3	GNR/sHA の作製-----	29
3-2-4	GNR/HA および GNR/sHA の生理食塩水中における安定性評価-----	30
3-2-5	GNR の ^{125}I 標識-----	31
3-2-6	細胞集積性評価-----	32
3-2-7	細胞集積後の発熱評価-----	33
3-2-8	細胞傷害性評価-----	34
3-2-9	健常マウスにおける生体内分布評価-----	35
3-2-10	担がんマウスにおける生体内分布評価-----	37
3-3	考察-----	38
3-4	小括-----	40
総括	-----	41
謝辞	-----	43

実験の部	45
第 1 章 実験の部	47
第 2 章 実験の部	50
第 3 章 実験の部	52
参考文献	57

略語表

本文において以下の略語を用いた。

Abs: absorbance

ANOVA: analysis of variance

CD44: cluster of differentiation 44

CS: chondroitin sulfate

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF: *N, N*-dimethylformamide

DMSO: dimethyl sulfoxide

DTPA: diethylenetriaminepentaacetic acid

EPR: enhanced permeability and retention

γ -PGA: gamma polyglutamic acid

GNR: gold nanorod

HA: hyaluronic acid

HPLC: high performance liquid chromatography

¹¹¹In: indium-111

¹²⁵I: iodine-125

NMR: nuclear magnetic resonance spectroscopy

PAMAM dendrimer (G4): polyamidoamine dendrimer (generation 4th)

PBS: phosphate-buffered saline

pDNA: plasmid deoxyribonucleic acid

PEI: polyethylenimine

% dose/g: percentage of dose per gram

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

S.D.: standard deviation

sHA: sulfated hyaluronic acid

SIB: *N*-succinimidyl 3-iodobenzoate

SPECT: single photon emission computed tomography

TBA: tetrabutylammonium hydroxide

UV: ultraviolet

⁹⁰Y: yttrium-90

序論

がんは日本人の死因の第 1 位であり、がんに対する施策である「がん対策推進基本計画」において、その早期発見や治療法の更なる充実等が求められている[1]。がん治療を効果的に推進するにあたり、正確ながんの局在・性状鑑別診断とその情報に基づく治療方針の決定ならびに治療の実施が極めて重要となる。それゆえ、がんの診断と治療をシームレスに実施しうるセラノスティクス（Theranostics = therapeutics（治療） + diagnostics（診断））の重要性が強く提唱されている[2–4]。がんのセラノスティクスに資する薬剤を開発するためには、核医学診断や磁気共鳴画像、蛍光イメージングをはじめとする種々のモダリティに適用可能な診断薬とともに、化学療法、核医学治療、光温熱療法、遺伝子治療など多様な治療に貢献しうる治療薬を一つの薬剤に搭載できることが好ましい。セラノスティクスの実現に向けて、がん標的性を示す低分子化合物に診断薬や治療薬を導入した場合、化学的な構造修飾により、化合物が本来示すがん細胞に対する結合親和性や生体内における薬物動態に大きな影響を及ぼすことが予想される。一方で、ナノ粒子を用いた場合、薬物の搭載がその物理化学的特性に与える影響は小さい場合が多い[5–7]。

リポソームをはじめとする数十 nm から数百 nm のサイズのナノ粒子は、enhanced permeability and retention（EPR）効果[8]を介してがん組織へ集積して滞留することから、がんへの薬物送達キャリアとして有効であり、実際ドキソルビシン封入リポソーム（Doxil®）などが臨床で使用されている[9–11]。しかしながら、これらのナノ粒子型薬剤の治療効果は十分であるとは言えず、その薬物送達量を改善するために、ナノ粒子表面にがん特異的抗原を認識しうる抗体やペプチドなどを化学的に修飾するケースが多い[12–14]。しかし、がん指向性分子をナノ粒子表面に共有結合させるのに一般的に半日から 1 日の時間を要する[15–17]など、合成および精製過程は煩雑であるため、臨床への展開を考えて、より簡便かつ安全な創薬基盤の構築が希求されている。

交互吸着法（Layer-by-Layer 法）は、積層型の薄膜作製方法の 1 つである。アニオン性あるいはカチオン性高分子を修飾した基板を、反対の電荷をもつ高分子の水溶液に浸漬すると、高分子間の静電的相互作用に基づく吸着が起こるが、この吸着は電荷の中和点で止まらず過剰に進行して電荷の反転が生じる。この電荷の反転を繰り返しながらポリマーを交互に吸着させることで、煩雑な化学反応を介することなく高分子を多層化することができる[18–20]。この静電的相互作用を利用して自己組織化させたナノ粒子の代表例としては、アニオン性のプラスミド DNA（pDNA）とカチオン性ポリマーであるポリエチレンイミン

(PEI) の複合体が挙げられる[21]。また Kurosaki らは、pDNA/PEI をアニオン性ポリマーである γ -ポリグルタミン酸 (γ -PGA) で被覆した pDNA/PEI/ γ -PGA を開発し、本アニオン性ナノ粒子がメラノーマ細胞へ取り込まれて、高い遺伝子発現効果を示すことを報告した[22]。さらに、最近では、カチオン性リポソームの膜表面にがん標的ポリマーであるヒアルロン酸 (HA) を被覆させた薬剤について、その高いがん治療効果が報告されているなど[23]、静電的相互作用に基づくがん標的ナノ粒子の開発が盛んに行われつつある。

以上の背景により、著者は、静電的相互作用により自己組織化するがん標的ナノ粒子型セラノスティクス薬剤の開発を着想した。まず、第 1 章では、診断薬や治療薬などの化合物を化学的に修飾可能なデンドリマーをコアとして、PEI および γ -PGA を順次被覆させた自己組織化ナノ粒子について、メラノーマを標的とするセラノスティクス薬剤としての可能性を評価した。第 2 章では、第 1 章で構築した三成分系ナノ粒子の開発手法を他のがん種を標的とするセラノスティクス薬剤開発に適用することを考え、最外被覆成分として HA を用いてナノ粒子を開発し、がんの CD44 を標的とするセラノスティクス薬剤としての有効性について検証した。さらに第 3 章では、がんの光温熱治療および光音響イメージングへの展開が可能な金ナノロッド (GNR) をコアとして用いて、HA 誘導体で被覆したナノ粒子を開発し、セラノスティクス薬剤としての有効性を評価した。

本論

第1章 肺転移メラノーマの核医学診断を目的とする

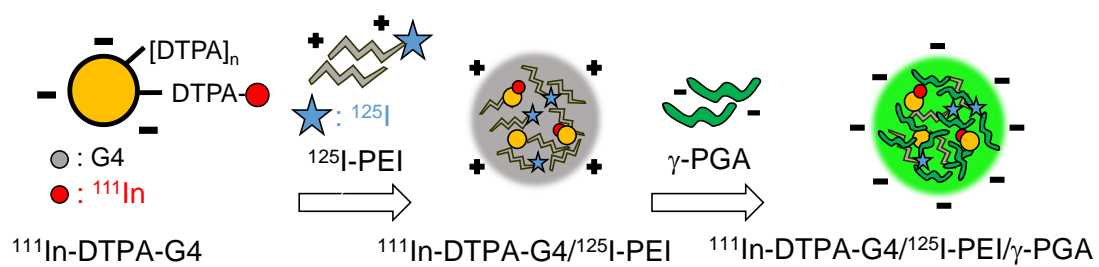
γ -ポリグルタミン酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発

1-1. 緒言

メラノーマは、皮膚がんの一種であり、その患者数は年々増加している。メラノーマは転移能が高く、肺や骨、脳などへ転移することが知られている[24-26]。そのため、転移病巣の生体内局在を正確に診断することができれば、適切な治療方針を決定することができると考えられる。

Kurosaki らが報告したプラスミド DNA (pDNA) とカチオン性ポリマーであるポリエチレンジアミン (PEI)、アニオン性ポリマーである γ -ポリグルタミン酸 (γ -PGA) を順次、静電的に自己組織化させたナノ粒子は、血球細胞に対する毒性が低く、細胞接着に対する影響が少ないなど、良好な生体適合性を示すとともに、マウスメラノーマ細胞 B16-F10 に高く取り込まれることが報告された[22]。

そこで本研究では、pDNA の代わりに様々な化学的修飾が容易な第 4 世代ポリアミドアミン dendrimer (G4) [27] をコアとして用いた。核医学診断や核医学治療だけでなく磁気共鳴画像や蛍光イメージングへの適用も考慮し、キレート剤として十分量の diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) 誘導体を G4 のアミノ基に導入し、DTPA-G4 を作製した。これにより、G4 の表面電荷は負に帯電するが、この誘導体に PEI、 γ -PGA を順次被覆することでメラノーマを標的とする粒子を作製した。今回は、がんの非侵襲的スクリーニングに有効な単一光子放射断層撮影 (SPECT) への適用を考慮し、放射性インジウム (インジウム-111 ; ^{111}In) にて標識した DTPA-G4 を用いることとした。また、粒子の *in vitro* および *in vivo* 評価を実施するにあたり、粒子の安定性を評価する必要がある。そこで放射性ヨウ素 (ヨウ素-125 ; ^{125}I) で標識した PEI を併せて合成し、これらを静電的相互作用により自己組織化させたナノ粒子 (^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA) (Scheme 1-1) について、メラノーマ細胞に対する集積性評価および健常マウス、肺転移メラノーマモデルマウスにおける体内動態評価を実施した。



Scheme 1-1. Preparation scheme of $^{111}\text{In-DTPA-G4}/^{125}\text{I-PEI}/\gamma\text{-PGA}$.

1-2. 結果

1-2-1. ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA の作製

既報[28]に基づき G4 に 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-diethylenetriaminepentaacetic acid (*p*-SCN-Bn-DTPA) を導入し、DTPA-G4 を合成した。G4 1 分子あたりに導入された DTPA は 61 分子であった。

^{111}In -DTPA-G4 は、 $^{111}\text{InCl}_3$ と DTPA-G4 を酢酸緩衝液 (0.1 M、pH6.0) 中で反応させ、限外濾過により精製することで合成した。 ^{125}I -PEI は、既報[29]に基づき合成した *N*-succinimidyl 3- ^{125}I iodobenzoate (^{125}I -SIB) と PEI をリン酸緩衝液 (0.1 M、pH9.0) 中で反応させ、限外濾過により精製することで合成した。

セルロースアセテート膜電気泳動を用いた分析により、 ^{111}In -DTPA-G4 および ^{125}I -PEI は、それぞれ陽極および陰極側に単一のピークとして検出された (Figure 1-1A, B)。 ^{111}In -DTPA-G4 の放射化学的収率は $94.9 \pm 2.1\%$ 、放射化学的純度は 96% 以上であった。また、 ^{125}I -PEI の放射化学的収率は $53.6 \pm 2.0\%$ 、放射化学的純度は 95% 以上であった。

続いて、5% グルコース溶液中、 ^{111}In -DTPA-G4 のカルボキシ基、 ^{125}I -PEI のアミノ基および γ -PGA のカルボキシ基の電荷比が 1:8:16 となるように各成分を順次反応させることで ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA を作製した。得られたナノ粒子の粒子サイズは約 30 nm、ゼータ電位は約 -30 mV であった (Table 1-1)。同様の方法で作製した非標識 DTPA-G4/PEI/ γ -PGA の粒子サイズは約 40 nm、ゼータ電位は約 -30 mV であった (Table 1-1)。セルロースアセテート膜電気泳動を用いた分析の結果、 ^{111}In (^{111}In -DTPA-G4) と ^{125}I (^{125}I -PEI) のいずれを解析した場合においても、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA は原点付近に単一のピークとして検出され、放射化学的純度は 90% 以上であることが示された (Figure 1-1C)。

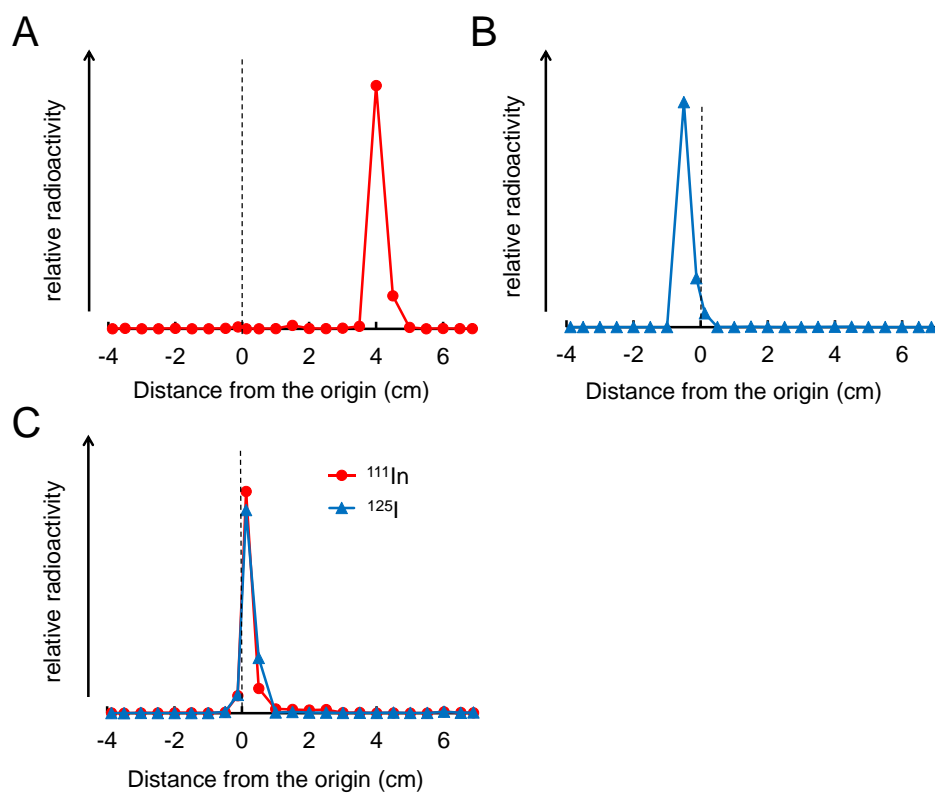


Figure 1-1. Cellulose acetate electrophoresis analyses. (A) ^{111}In -DTPA-G4, (B) ^{125}I -PEI, and (C) ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA. The symbols ● and ▲ present ^{111}In and ^{125}I , respectively.

Table 1-1. Particle size and ζ -potential of complexes prepared in 5% glucose.

Complex	Size (d.nm)	ζ -potential (mV)
G4-DTPA/PEI/ γ -PGA	36.7 \pm 4.0	-28.6 \pm 1.8
G4-DTPA/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA	25.5 \pm 3.5	-42.0 \pm 5.7
^{111}In -G4-DTPA/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA	29.3 \pm 8.7	-32.6 \pm 3.8

1-2-2. B16-F10 細胞への各ナノ粒子の集積性評価

^{111}In -DTPA-G4、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI、および ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA について、B16-F10 細胞を用いた集積性評価を行った (Figure 1-2)。

まず、 ^{111}In の細胞への集積について比較検討した結果、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA は経時的に細胞に高く集積し、その集積率はカチオン性の ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI と同程度であった一方、アニオン性の ^{111}In -DTPA-G4 と比べて有意に高く集積した (Figure 1-2A)。

また、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI および ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA について、 ^{111}In (^{111}In -DTPA-G4) と ^{125}I (^{125}I -PEI) の集積を比較した結果、いずれのタイムポイントにおいても ^{111}In と比べて ^{125}I の集積が有意に高かった (Figures 1-2B and 1-2C)。

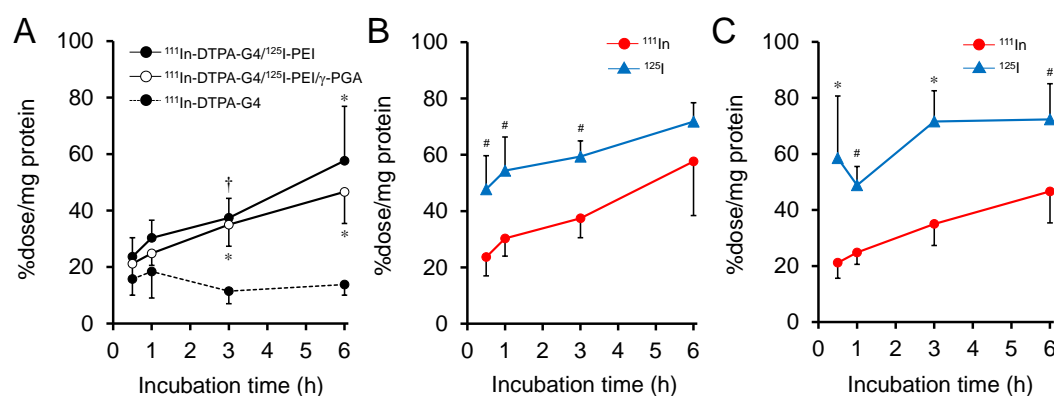


Figure 1-2. *In vitro* cellular accumulation of complexes in B16-F10 melanoma cells. (A) Time-dependent cellular accumulation of ^{111}In -DTPA-G4, ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI, and ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA. $^{\dagger}p < 0.01$ and $*p < 0.001$ vs. ^{111}In -DTPA-G4. (B, C) Cellular accumulation of ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI (B) and ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA (C). Circle and triangle symbols represent ^{111}In and ^{125}I , respectively. $^{\#}p < 0.05$ and $*p < 0.001$ vs. ^{111}In . Results are expressed as means \pm S.D. (n=4).

1-2-3. 健常マウスにおける各ナノ粒子の生体内分布評価

^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA あるいは ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI を健常マウス (ddY マウス) の静脈内に投与し、各臓器における放射能集積を調べることで、各ナノ粒子の生体内分布を評価した (Table 1-2、Table 1-3)。 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA は、投与 10 分後にはマクロファージが豊富に存在している脾臓や肝臓、肺に高く集積した。脾臓および肝臓においては、投与 6 時間後まで高い集積レベルを維持した一方で、肺からは経時的に消失した。多くの臓器において ^{111}In と ^{125}I は同等の集積を示したが、血液中においては、 ^{111}In と比較して ^{125}I 由来の放射能が速やかに消失した。また、腎臓においては、 ^{111}In と比較して ^{125}I 由来の放射能が約 2 倍高く集積した (Table 1-2)。肺においては、 ^{111}In と比較して ^{125}I の消失が遅延した。膵臓や胃、小腸、筋肉、甲状腺への集積は低値を示した。

^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI についても、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA と同様に脾臓や腎臓、肝臓、肺へ集積したものの、その集積レベルは ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA と比較して有意に低かった (Table 1-3)。

また、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA について、投与 6 時間後には投与放射能の約 5%dose が尿中に排泄され、糞便中への排泄は低値を示した。

Table 1-2. Biodistribution of radioactivity after injection of ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA into normal mice (ddY mice).

^{111}In	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
blood	$15.4 \pm 1.6^*$	$14.4 \pm 5.9^*$	3.0 ± 1.2	1.7 ± 0.6	1.1 ± 0.5
spleen	51.0 ± 11.9	87.0 ± 37.1	86.5 ± 8.0	76.5 ± 14.1	82.5 ± 24.5
pancreas	2.1 ± 0.7	$1.8 \pm 0.2^\#$	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.4
stomach	$1.0 \pm 0.5^\dagger$	$0.8 \pm 0.2^*$	$0.3 \pm 0.1^\#$	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1
intestine	$1.0 \pm 0.1^*$	$1.0 \pm 0.2^*$	$0.6 \pm 0.1^*$	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2
kidney	$14.1 \pm 2.1^*$	$13.8 \pm 2.0^*$	$13.6 \pm 1.1^*$	11.6 ± 1.7	12.2 ± 1.6
liver	60.3 ± 11.4	64.3 ± 13.3	74.8 ± 14.1	71.2 ± 14.3	61.6 ± 8.5
heart	$12.6 \pm 3.3^\#$	$9.9 \pm 0.4^\#$	6.0 ± 1.6	4.2 ± 1.3	4.4 ± 0.2
lung	51.9 ± 11.2	42.7 ± 6.4	24.2 ± 2.9	13.4 ± 1.0	10.9 ± 1.6
muscle	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2
thyroid ^a	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
feces ^a					0.8 ± 0.8
urine ^a					$5.3 \pm 0.7^\#$
^{125}I	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
blood	7.7 ± 1.3	4.3 ± 1.4	2.1 ± 0.6	0.5 ± 0.3	0.1 ± 0.1
spleen	51.2 ± 11.5	109.5 ± 42.2	113.6 ± 20.6	95.0 ± 25.5	104.9 ± 36.2
pancreas	2.6 ± 0.9	2.7 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.3
stomach	1.8 ± 0.6	1.6 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.2
intestine	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2
kidney	28.9 ± 6.0	29.2 ± 2.4	24.4 ± 3.3	15.3 ± 3.3	15.3 ± 0.8
liver	53.8 ± 9.4	63.9 ± 6.1	59.7 ± 6.3	62.4 ± 8.8	57.6 ± 8.7
heart	17.8 ± 5.6	15.6 ± 2.0	10.5 ± 1.9	6.8 ± 2.3	6.8 ± 1.0
lung	56.4 ± 10.5	52.1 ± 6.5	34.2 ± 4.4	19.8 ± 1.4	16.5 ± 2.7
muscle	0.9 ± 0.5	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.3
thyroid ^a	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
feces ^a					0.6 ± 0.2
urine ^a					4.1 ± 0.9

Data are expressed as the average percentage of dose per gram of tissues.

Each value represents mean \pm S.D. (n = 4).

^a Expressed as % dose. [#] $p < 0.05$, [†] $p < 0.01$, and ^{*} $p < 0.001$ vs. ^{125}I .

Table 1-3. Biodistribution of radioactivity after injection of ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI into normal mice (ddY mice).

^{111}In	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
blood	$5.3 \pm 1.2^*$	$2.7 \pm 0.6^*$	3.2 ± 0.8	0.7 ± 0.5	0.1 ± 0.1
spleen	$13.1 \pm 6.0^\dagger$	$20.7 \pm 3.6^*$	$14.2 \pm 3.1^*$	$16.1 \pm 2.9^*$	$21.1 \pm 0.6^*$
pancreas	$0.8 \pm 0.2^*$	$0.7 \pm 0.2^*$	$0.5 \pm 0.0^\#$	$0.4 \pm 0.1^\#$	$0.4 \pm 0.0^\#$
stomach	$0.4 \pm 0.1^*$	$0.2 \pm 0.1^*$	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	$0.2 \pm 0.1^\#$
intestine	$0.4 \pm 0.1^*$	$0.3 \pm 0.1^*$	$0.3 \pm 0.1^*$	$0.2 \pm 0.0^*$	$0.2 \pm 0.0^*$
kidney	$4.3 \pm 0.7^*$	$4.7 \pm 0.3^*$	$4.3 \pm 0.4^*$	$3.8 \pm 0.8^*$	$3.6 \pm 0.3^*$
liver	$18.2 \pm 2.1^*$	$21.7 \pm 2.1^*$	$21.3 \pm 1.9^*$	$20.6 \pm 5.9^*$	$21.0 \pm 0.7^*$
heart	$4.5 \pm 0.9^*$	$3.3 \pm 0.5^*$	$2.6 \pm 0.3^\dagger$	$1.3 \pm 0.3^\#$	$1.2 \pm 0.1^\dagger$
lung	$28.8 \pm 3.5^*$	$22.8 \pm 6.2^*$	$11.5 \pm 0.6^\dagger$	9.7 ± 3.1	6.4 ± 0.3
muscle	$0.7 \pm 0.1^*$	$0.6 \pm 0.1^*$	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2
thyroid ^a	$0.0 \pm 0.0^\dagger$	$0.0 \pm 0.0^*$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
^{125}I	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
blood	$1.8 \pm 0.7^*$	$1.0 \pm 0.2^*$	$0.5 \pm 0.2^\#$	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0
spleen	16.7 ± 8.2	$25.1 \pm 4.1^*$	$18.2 \pm 4.7^*$	$20.5 \pm 5.1^*$	$27.5 \pm 3.1^*$
pancreas	$1.4 \pm 0.2^*$	$1.4 \pm 0.3^*$	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3
stomach	$0.8 \pm 0.2^*$	$0.6 \pm 0.2^*$	0.5 ± 0.2	$0.3 \pm 0.0^\dagger$	0.5 ± 0.2
intestine	$0.7 \pm 0.1^*$	$0.7 \pm 0.1^*$	$0.5 \pm 0.1^*$	$0.4 \pm 0.1^*$	$0.4 \pm 0.1^*$
kidney	$10.9 \pm 2.0^*$	$10.8 \pm 0.9^*$	$10.8 \pm 0.9^*$	$8.1 \pm 2.3^\dagger$	$8.2 \pm 0.9^\dagger$
liver	$14.9 \pm 2.4^*$	$17.2 \pm 1.4^*$	$17.9 \pm 2.2^*$	$16.3 \pm 4.0^*$	$16.2 \pm 0.5^*$
heart	$5.2 \pm 0.8^*$	$4.6 \pm 0.5^*$	$4.8 \pm 0.4^\dagger$	2.8 ± 0.8	2.7 ± 0.4
lung	$39.9 \pm 3.0^*$	$29.3 \pm 7.2^*$	$19.7 \pm 1.4^\dagger$	18.4 ± 6.2	11.7 ± 0.8
muscle	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1
thyroid ^a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	$0.0 \pm 0.0^\#$	0.1 ± 0.0

Data are expressed as the average percentage of dose per gram of tissues.

Each value represents mean \pm S.D. (n = 4).

^a Expressed as % dose.

[#] $p < 0.05$, [†] $p < 0.01$, and ^{*} $p < 0.001$ vs. tissues of normal mice injected with ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA.

1-2-4. 肺転移メラノーマモデルマウスにおける ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA の生体内分布評価

肺転移メラノーマモデルマウスは、マウスの静脈より B16-F10 細胞を投与することにより作製した。 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA を本モデルマウスの静脈内へ投与し、投与 3 時間後におけるナノ粒子の生体内放射能分布を調べるとともに、健常マウス (Balb/c マウス) のデータと比較した (Table 1-4)。また、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA の主要な集積臓器である、脾臓や腎臓、肝臓、肺への集積について Figure 1-3 に示した。

^{111}In の放射能分布を比較した結果、正常肺と比較してメラノーマが転移した肺へ高く集積する傾向を認めた (それぞれ 25.1%dose/g および 33.7%dose/g)。 ^{125}I については、正常肺とメラノーマが転移した肺で同等の集積を認めた (それぞれ 40.8%dose/g および 42.0%dose/g)。一方で、血液中の放射能濃度に対するメラノーマが転移した肺における放射能濃度の比 (^{111}In : 22.4、 ^{125}I : 121.1) は、血液中の放射能濃度に対する正常肺での放射能濃度の比 (^{111}In : 6.6、 ^{125}I : 44.4) と比較して、有意に高い値を示した。

さらに、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA を過剰量の γ -PGA とともに投与し、各臓器への放射能集積を評価した結果、メラノーマが転移した肺における放射能集積は顕著に抑制された (^{111}In : 3.8%dose/g、 ^{125}I : 5.5%dose/g)。一方で、本ナノ粒子の肝臓への集積は γ -PGA 同時投与による影響をほとんど受けなかったが、 ^{125}I の腎臓への集積は有意に減少した。

Table 1-4. Biodistribution of radioactivity after injection of ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA into normal mice (Balb/c mice) and mice with metastatic melanoma with or without co-injection of excess γ -PGA.

	^{111}In			^{125}I		
	Normal mice (Balb/c)	Mice with metastatic melanoma	Blocking (Mice with metastatic melanoma)	Normal mice (Balb/c)	Mice with metastatic melanoma	Blocking (Mice with metastatic melanoma)
blood	4.1 \pm 1.3	1.8 \pm 1.0	1.6 \pm 1.2	0.9 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0
spleen	85.0 \pm 6.9	42.3 \pm 8.2	47.8 \pm 3.1	131.4 \pm 12.3	44.2 \pm 6.1	39.2 \pm 2.6
pancreas	1.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2	2.9 \pm 0.2	0.4 \pm 0.0
stomach	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	0.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1
intestine	0.7 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0
kidney	13.4 \pm 0.5	8.6 \pm 1.0	13.1 \pm 0.7	13.4 \pm 0.5	14.1 \pm 0.9	2.9 \pm 0.3
liver	53.3 \pm 4.0	48.4 \pm 2.6	56.3 \pm 5.7	44.1 \pm 2.5	39.3 \pm 1.9	57.0 \pm 8.6
heart	7.0 \pm 0.6	8.3 \pm 1.9	2.0 \pm 0.3	12.7 \pm 1.2	11.3 \pm 2.7	2.8 \pm 0.1
lung	25.1 \pm 3.0	33.7 \pm 8.8	3.8 \pm 0.6	40.8 \pm 4.5	42.0 \pm 10.3	5.5 \pm 0.9
muscle	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.0	0.2 \pm 0.1
thyroid ^a	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Data are expressed as the average percentage of dose per gram of tissues.

Each value represents mean \pm S.D. (n = 4–5). ^a Expressed as %dose.

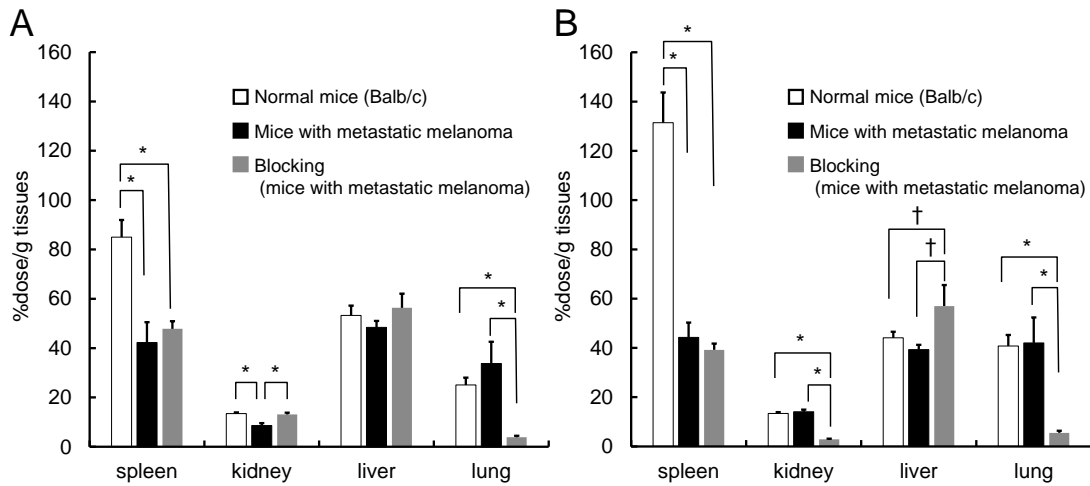


Figure 1-3. Biodistribution of ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA (DTPA-G4 :1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, ^{111}In and ^{125}I 18.5 kBq/100 $\mu\text{L}/\text{mouse}$) in normal mice (Balb/c mice), and mice with metastatic melanoma with or without co-injection of excess γ -PGA (blocking). (A) and (B) represent the biodistribution of ^{111}In and ^{125}I , respectively. † $p < 0.01$ and * $p < 0.001$.

1-3. 考察

本章では、キレート剤である DTPA 誘導体を導入したアニオン性 G4 をコアとして、カチオン性 PEI およびアニオン性 γ -PGA との静電的相互作用により自己組織化させたナノ粒子が、肺転移メラノーマを標的とした核医学診断薬として有効であるか評価した。ナノ粒子の構成成分である DTPA-G4 と PEI を異なる放射性核種で標識し、*in vitro* および *in vivo* において各成分の挙動を追跡するとともに、メラノーマが転移した肺へのナノ粒子の集積性を評価した。

Table 1-1 に示されるように、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA は非標識 DTPA-G4/PEI/ γ -PGA と同程度の粒子サイズおよび負のゼータ電位を示したことから、構成成分の放射性標識が、静電的相互作用に基づき形成されるナノ粒子の物理化学的特性に影響を与えないことが示された。

細胞集積性評価において、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA は B16-F10 細胞へ経時的に高く集積したが、 ^{111}In と比較して ^{125}I の方が有意に高く細胞に集積した。また、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI についても同様の現象が確認された。これは、細胞への集積過程においてナノ粒子の構成成分が一部解離し、カチオン性の ^{125}I -PEI が負に帯電した細胞膜との静電的相互作用により強固に保持された一方で、アニオン性 ^{111}In -DTPA-G4 の集積は制限されたことが原因であると推察された。

健常マウスにおける ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA の生体内分布評価では、投与後早期に脾臓や肝臓、肺に高く集積し、また、これらの臓器における ^{111}In と ^{125}I の放射能集積が同程度であったことから、生体内においてナノ粒子が比較的安定に存在し、臓器へ分布した可能性が示された。一方で、血液中においては、 ^{111}In と比較して ^{125}I 由来の放射能が速やかに消失した。また、腎臓においては、 ^{111}In と比較して ^{125}I 由来の放射能が約 2 倍高く集積した。PEI は腎臓へ高く集積することが報告されていることから[30]、ナノ粒子の構成成分が血液中ですぐに解離し、生じた ^{125}I -PEI が腎臓に集積したことに起因するものと考えられた。肺においては、投与後早期における ^{111}In と ^{125}I の放射能集積は同程度であったが、 ^{125}I の方がより長時間滞留した。これも、肺組織内でナノ粒子の構成成分が部分的に解離し、カチオン性の PEI が細胞に強く保持されたためだと考えられた。 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA は、マクロファージが豊富に存在している脾臓へ高く集積したが、これは、過去に報告された γ -PGA 被覆ナノ粒子 (pDNA/poly-L-alanine/ γ -PGA) が脾臓での高い遺伝子発現効率を示す結果と一致している[31]。さらに、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA の主要な集積臓器への集積パターンは ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI と大きく異なったことから、最外被覆

成分である γ -PGA による影響が示唆された。

肺転移メラノーマモデルマウスにおける $^{111}\text{In-DTPA-G4}/^{125}\text{I-PEI}/\gamma\text{-PGA}$ の生体内分布評価では、メラノーマが転移した肺における放射能集積は正常肺と比較して高い傾向を認め、また血液中の放射能濃度に対するメラノーマが転移した肺における放射能濃度の比は、正常肺/血液比と比べて約 3 倍高い値を示したことから、 $^{111}\text{In-DTPA-G4}/^{125}\text{I-PEI}/\gamma\text{-PGA}$ が B16-F10 細胞によって取り込まれたものと考えられた。ここで、肺に流入する血液量は多いため、血液中に放射能が高く残存した場合、バックグラウンドシグナルが高くなり、肺転移メラノーマの診断が困難となる。しかし、 $^{111}\text{In-DTPA-G4}/^{125}\text{I-PEI}/\gamma\text{-PGA}$ の血液からの消失は速く、肺転移メラノーマモデルマウスにおいて高い肺対血液放射能比を示したことから、肺転移メラノーマの核医学診断用薬剤として有効である可能性が示された。さらに、過剰量の γ -PGA を同時投与することで、メラノーマが転移した肺における $^{111}\text{In-DTPA-G4}/^{125}\text{I-PEI}/\gamma\text{-PGA}$ の集積が有意に抑制されたことから、本ナノ粒子は一部 γ -PGA 特異的な経路で B16-F10 細胞や肺胞マクロファージに取り込まれた可能性が考えられた。一方で、肺の近傍臓器である肝臓への $^{111}\text{In-DTPA-G4}/^{125}\text{I-PEI}/\gamma\text{-PGA}$ の高い取り込みは、肺転移メラノーマの診断においてアーチファクトとなりうる[32]。そのため今後、肺転移メラノーマの核医学診断用薬剤として、肝臓への取り込みを抑制する薬剤設計を行う必要がある。

本章においては、放射性標識 γ -PGA ナノ粒子がメラノーマ標的核医学診断薬として有効である可能性を示した。また、磁気共鳴画像や蛍光イメージングに適用可能なランタノイド等を DTPA-G4 へ導入可能であることから、本ナノ粒子をマルチモダリティイメージング剤として展開できる可能性がある。さらに、がんへの比較的高い薬剤集積を認めたことから、治療用放射性同位元素である β 線放出核種イットリウム-90 (^{90}Y) などを用いることで、治療薬として適用できる可能性が考えられ、本ナノ粒子をセラノスティクス薬剤として展開できるものと期待される。

1-4. 小括

- ・ 静電的相互作用に基づき、アニオン性 ^{111}In 標識ポリアミドアミンデンドリマー ($^{111}\text{In-DTPA-G4}$) にカチオン性 ^{125}I 標識 PEI およびアニオン性 γ -PGA を順次被覆した自己組織化ナノ粒子 ($^{111}\text{In-DTPA-G4}/^{125}\text{I-PEI}/\gamma\text{-PGA}$) を設計・作製した。
- ・ 健常マウスを用いた検討において、投与後早期に、脾臓や肝臓、肺に高く集積した。また、 ^{111}In と ^{125}I は同等の生体内挙動を示したことから、生体内での安定性が示唆された。
- ・ 肺転移メラノーマモデルマウスを用いた検討により、 $^{111}\text{In-DTPA-G4}/^{125}\text{I-PEI}/\gamma\text{-PGA}$ の血液中の放射能濃度に対するメラノーマが転移した肺における放射能濃度の比は良好な値を示した。

以上より、本研究で作製した放射性標識 γ -PGA 被覆自己組織化ナノ粒子が肺転移メラノーマの核医学診断に有効である可能性が示された。

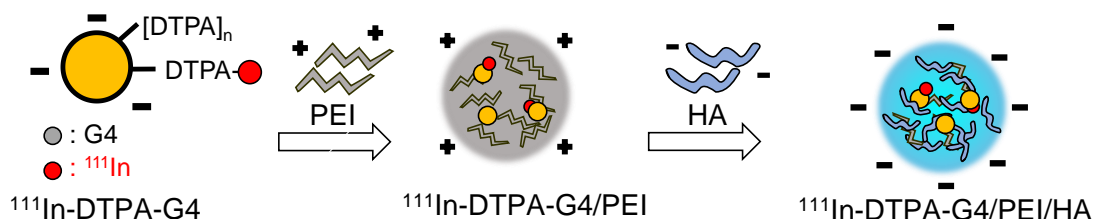
第 2 章 CD44 高発現がんの核医学診断を目的とするヒアルロン酸

被覆自己組織化ナノ粒子の開発

2-1. 緒言

第 1 章では、静電的相互作用に基づき構築した自己組織化ナノ粒子 $^{111}\text{In-DTPA-G4}/^{125}\text{I-PEI}/\gamma\text{-PGA}$ が、生体内で比較的安定に存在し、メラノーマを標的とする核医学診断用薬剤として有効である可能性を示した。本章では、この三成分系ナノ粒子の作製手法を他のがん種を標的とする核医学診断用薬剤へ適用することを考え、 $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI}$ を母体として、最外被覆成分をがんを高発現する分子に認識されうるアニオン性ポリマーに置換した、新たな自己組織化ナノ粒子の開発を行った。

アニオン性ポリマーとしては、HA を選択した。HA は、D-グルクロン酸と *N*-アセチル-D-グルコサミンの繰り返しユニット構造を持つ、生体適合性の高いポリマーであり、CD44 に対して特異的に結合することが知られている[33,34]。CD44 は、膜タンパク質であり、正常組織においてはリンパ球や線維芽細胞に発現し、細胞のローリングや接着に関与する一方で、がん細胞においては、がんの転移、増殖、浸潤に関与している[35,36]。また、CD44 の発現量は、がんの悪性度と密接に関連することが報告されている[37,38]。それゆえ、CD44 を標的としたがんの画像診断薬の開発は、がんの悪性度評価に有益な情報をもたらすものと考えられる。そこで本章では、 $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI}$ を HA で被覆した $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$ を作製し (Scheme 2-1)、がんの CD44 を標的とした核医学診断用薬剤として有効であるか評価した。具体的には、各構成成分の最適な反応比について検討した後、CD44 の発現量が異なるがん細胞への取り込みについて評価した。また、健常マウスおよび担がんマウスを用いて $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$ の体内放射能分布を調べた。



Scheme 2-1. Preparation scheme of $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$.

2-2. 結果

2-2-1. ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA の作製

第 1 章と同様の方法で、 ^{111}In -DTPA-G4 を合成した。続いて、5%グルコース溶液中、 ^{111}In -DTPA-G4 のカルボキシ基、PEI のアミノ基および HA のカルボキシ基の電荷比が 1:8:8、1:8:16、1:8:24、1:8:32 となるように各成分を反応させることで、 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA を作製した。Table 2-1 に示されるように、1:8:16、1:8:24 あるいは 1:8:32 の電荷比で作製した ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA が、粒子サイズおよびゼータ電位について HA の電荷比にかかわらず一定の値を示したことから、以降の実験では 1:8:16 あるいは 1:8:32 の電荷比で作製したナノ粒子を使用した。セルロースアセテート膜電気泳動を用いた分析の結果、 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) は陽極側に単一のピークとして検出され、放射化学的純度は 90%以上であった (Figure 2-1)。

Table 2-1. Particle size and ζ -potential of complexes prepared in 5% glucose.

Complex	Size (d.nm)	ζ -potential (mV)
^{111}In -DTPA-G4/PEI	21.7 \pm 2.89	+22.7 \pm 0.40
^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:8)	33.1 \pm 2.28	-25.3 \pm 1.11
^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:16)	37.6 \pm 3.36	-35.7 \pm 1.46
^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:24)	38.1 \pm 4.10	-32.9 \pm 2.53
^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32)	38.6 \pm 1.34	-31.6 \pm 0.69

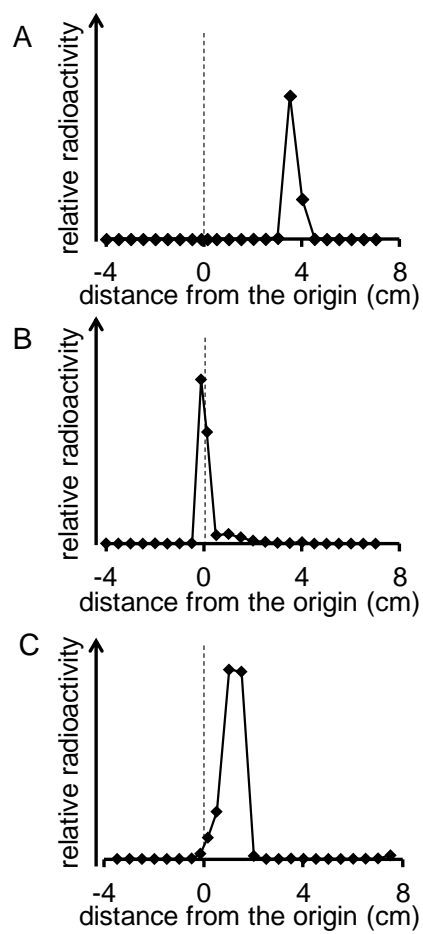


Figure 2-1. Cellulose acetate electrophoresis analyses. (A) ^{111}In -DTPA-G4, (B) ^{111}In -DTPA-G4/PEI, and (C) ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32).

2-2-2. 細胞取り込み評価

ヒト膀胱がん細胞 T24 を CD44 高発現細胞[39]、ヒト乳がん細胞 MCF-7 を CD44 低発現細胞[40,41]として、細胞取り込み評価に使用した。

^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:16) および ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) について評価した結果、 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:16) については、T24 と MCF-7 で同程度の取り込みを認めた (Figure 2-2A)。一方で、 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) の取り込み率は経時的に増加し、インキュベート 3 時間後および 6 時間後に MCF-7 に比べて T24 に有意に高く取り込まれた (Figure 2-2B)。

また、 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) の細胞内への取り込み機構を調べるために、過剰量の HA (50 μM) 共存下での細胞取り込みを評価した結果、MCF-7 への取り込みは抑制されなかった一方で、T24 への取り込みは有意に抑制された (Figure 2-3)。

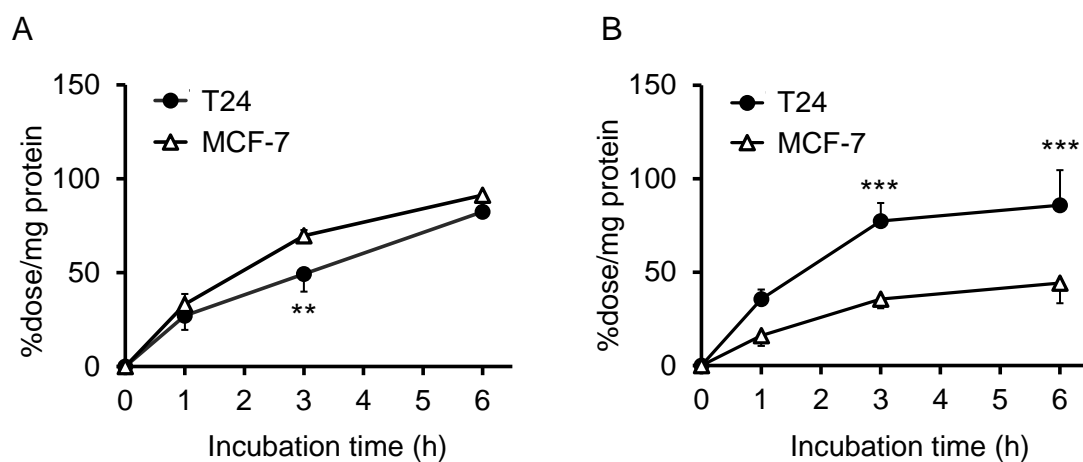


Figure 2-2. *In vitro* cellular uptake of ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA by T24 and MCF-7 cells. The charge ratios of ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA are 1:8:16 (A) and 1:8:32 (B). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. MCF-7.

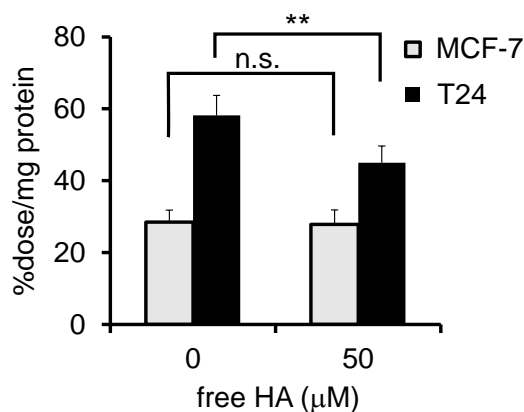


Figure 2-3. *In vitro* cellular uptake of ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) to T24 or MCF-7 cells at 3 h after incubation with or without co-treatment of excess HA (50 μM). ** $p < 0.01$, n.s.: not significant.

2-2-3. 健常マウスにおける生体内分布評価

^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA（電荷比 1:8:32）を健常マウス（ddY マウス）の静脈内に投与し、各臓器における放射能集積を調べることにより、ナノ粒子の生体内分布を評価した（Table 2-2）。

^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA は血液中から徐々に消失し、マクロファージが豊富に存在している脾臓や肝臓に高く集積した。投与後早期に、腎臓や肺への比較的高い集積が認められたが、時間経過とともに減少した。膵臓や胃、腸、心臓、筋肉への集積は低かった。投与 24 時間後に尿中に約 8%dose、糞便中に約 2%dose が排泄された。

Table 2-2. Biodistribution of radioactivity after injection of ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) into normal (ddY) mice.

	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h	24 h
blood	7.6 ± 0.5	6.2 ± 0.9	5.3 ± 1.0	4.2 ± 0.5	3.3 ± 0.7	0.3 ± 0.2
spleen	19.9 ± 3.0	15.6 ± 1.6	20.5 ± 3.8	25.3 ± 4.9	22.3 ± 8.2	22.6 ± 4.4
pancreas	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
stomach	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2
intestine	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1
kidney	5.6 ± 1.1	4.5 ± 1.1	4.9 ± 0.4	4.5 ± 0.9	4.2 ± 0.4	2.9 ± 0.6
liver	25.8 ± 2.7	23.2 ± 2.6	28.4 ± 1.7	33.2 ± 9.4	34.5 ± 2.6	27.7 ± 2.8
heart	2.4 ± 0.3	1.5 ± 0.6	1.7 ± 0.4	1.7 ± 0.3	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1
lung	7.4 ± 1.7	4.7 ± 1.1	4.0 ± 0.6	3.2 ± 0.2	2.5 ± 0.5	1.8 ± 0.3
muscle	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
feces ^a						1.5 ± 0.8
urine ^a						8.3 ± 1.7

Data are expressed as the average percentage of dose per gram of tissues.

Each value represents the mean \pm S.D. (n=5). ^a Expressed as %dose.

2-2-4. 担がんマウスにおける生体内分布評価

SCID マウスの腰部皮下に T24 および MCF-7 を移植することで、担がんモデルマウスを作製した。担がんマウスに ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) を投与し、投与 6 時間後における生体内放射能分布を調べた (Table 2-3)。 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA は脾臓や肝臓へ高く集積した。がんへの集積は低いレベルであったものの、CD44 低発現 MCF-7 と比較して CD44 高発現 T24 へ有意に高く集積した。また、筋肉あるいは血液中における放射能濃度に対する T24 での放射能濃度の比は、それぞれ 2.5 ± 2.2 と 1.2 ± 1.1 であった。一方、筋肉あるいは血液中における放射能濃度に対する MCF-7 での放射能濃度の比は、それぞれ 0.7 ± 0.7 と 1.4 ± 0.9 であった。

Table 2-3. Biodistribution of radioactivity after injection of ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) into T24 and MCF-7 tumors-bearing mice at 6 h post-injection.

	6 h		
blood	1.8	±	1.8
spleen	28.3	±	9.4
pancreas	0.7	±	0.3
stomach	0.4	±	0.3
intestine	0.5	±	0.2
kidney	8.2	±	2.2
liver	62.8	±	13.3
heart	3.5	±	1.4
lung	5.5	±	2.7
muscle	0.4	±	0.2
T24	0.7	±	0.2**
MCF-7	0.4	±	0.1

Data are expressed as the average percentage of dose per gram of tissues. Each value represents the mean±S.D. (n=9). ** $p < 0.01$ vs. MCF-7.

2-2-5. ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA のがん組織内局在評価

担がんマウスに ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) を投与し、その 6 時間後に T24 がん組織を摘出し、凍結切片を作製した。オートラジオグラフィにより ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA の T24 がん組織内の局在を評価するとともに、抗 CD44 抗体を用いて免疫組織化学染色し、CD44 の発現分布と比較した。T24 組織内に ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA は不均一に分布したが、これは CD44 の組織内分布と概ね一致していた (Figure 2-4)。

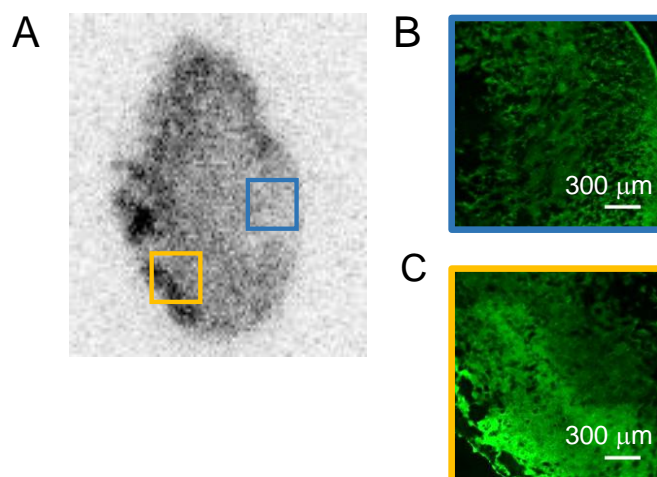


Figure 2-4. Autoradiography using ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) and CD44 immunostaining on T24 tumor sections. Panel (A) shows an autoradiogram of a T24 tumor section. The blue square indicates low accumulation of radioactivity and the yellow square indicates high accumulation of radioactivity. Panel (B) and (C) are the results of the CD44 immunostaining and correspond to blue and yellow squares in panel (A), respectively.

2-3. 考察

本章では、カチオン性コアとなる $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI}$ を CD44 への結合性を示す HA で被覆した $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$ を設計し、作製した。まず、第 1 章の $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI}/\gamma\text{-PGA}$ の作製方法を参照し、 $^{111}\text{In-DTPA-G4}$ のカルボキシ基、PEI のアミノ基、HA のカルボキシ基の電荷比が 1:8:16 となるように混和して粒子を作製したが、1:8:16 の電荷比で作製したナノ粒子は、CD44 特異的な細胞取り込みを示さなかった (Figure 2-2A)。Banerji や Bhattacharya らは、HA のカルボキシ基が CD44 との強固な結合に重要であることを報告している[42,43]。それゆえ、 $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$ (電荷比 1:8:16) の取り込みが低いレベルであったのは、HA 分子中の大部分のカルボキシ基がカチオン性 PEI との静電的相互作用に消費され、CD44 に対する結合親和性の低下を招いたからではないかと推察された。一方、 $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$ (1:8:32) は、MCF-7 と比較して T24 へ有意に高く取り込まれた (Figure 2-2B)。今回、静電的相互作用に関与していない遊離 HA の存在量を正確に測定するにはならず、今後詳細な検討が必要だと考えられるが、T24 への取り込みが別に添加した過剰量の HA 共存下で有意に抑制されたことから、 $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$ (1:8:32) は、一部 CD44 特異的な経路を介して取り込まれることが示唆された (Figure 2-3)。これらの結果より、 $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$ (1:8:32) は、自己組織化ナノ粒子の形成と CD44 に対する標的性を両立できることを明らかにした。

これまでに、ドキシソルビシンを含む soybean oil にアニオン性 HA を静電的相互作用により反応させて構築した HA 複合体が、CD44 高発現の H22 マウス肝がん組織に 0.85%dose/g 集積したと報告されている [44]。 $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$ (1:8:32) の T24 への集積は 0.7%dose/g であり、同程度の集積量を示した。さらに、 $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$ は良好ながん対筋肉比およびがん対血液比を示すだけでなく、がん組織内へ CD44 の発現分布に応じて集積した。今後、より感度良く CD44 高発現がんを検出するためには、 $^{111}\text{In-DTPA-G4/PEI/HA}$ のがん集積性を改善する必要があるが、CD44 特異的ながんの核医学診断を達成できる可能性が示された。また、第 1 章の考察でも述べた通り、治療用放射性同位元素を用いることにより、がん治療への展開も期待されることから、本薬剤はセラノスティクス薬剤として適用できるものと考えられる。

2-4. 小括

- CD44 への結合性を有するアニオン性ポリマーHA を用いて、カチオン性 ^{111}In -DTPA-G4/PEI との静電的相互作用により自己組織化させた ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA を設計・作製した。

- ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA は、*in vitro* において、CD44 低発現 MCF-7 細胞と比較して、CD44 高発現 T24 細胞に有意に高く集積し、その取り込みは一部 CD44 特異的であることを示した。

- ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA は、*in vivo* においても CD44 低発現の MCF-7 と比較して、CD44 高発現の T24 に有意に高く集積し、T24 における良好ながん対血液比・筋肉比を示した。

以上の結果より、 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA が CD44 高発現がんの核医学診断に有効である可能性が示された。

第3章 CD44 高発現がんの光温熱治療を目的とする

ヒアルロン酸誘導体被覆自己組織化ナノ粒子の開発

3-1. 緒言

第2章では、静電的相互作用に基づき構築した自己組織化ナノ粒子 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA が、CD44 を高発現するがんを標的とする核医学診断用薬剤として有効である可能性を示した。

本章では、治療薬およびイメージング素子としての活用が期待される金ナノロッド (Gold nanorod ; GNR) をコアとした、がんを発現する CD44 に認識されうる新たな自己組織化ナノ粒子の開発を着想した。GNR は桿状の金属ナノ粒子であり、生体透過性の高い近赤外領域 (800–900 nm) に波長を有する光を吸収してプラズモン共鳴効果により発熱する性質を持つため、がんの光温熱治療への応用が期待されている[45–48]。また、発熱効果に伴って光音響シグナルを発生することから、がん診断への適用も期待される[46–48]。著者は、GNR を基盤とする薬剤を効率良く創出するために、第1章および第2章と同様に静電的相互作用を利用することとした。これまでに、所属研究室の過去の検討[49]において、カチオン性の GNR をアニオン性のコンドロイチン硫酸 (CS) で被覆した GNR/CS が、CS 特異的な経路でメラノーマ細胞に高く取り込まれ、メラノーマを標的とした光温熱治療用薬剤として有効である可能性を示してきた。そこで、本研究では、GNR にアニオン性の HA を被覆させたナノ粒子 (GNR/HA) を作製し (Scheme 3-1)、CD44 を標的とするがんの光温熱治療用薬剤としての有効性について評価することとした。

また一般に、金ナノ粒子は塩の影響により凝集が促進することが報告されている[50–52]。近年、静電的相互作用に基づき作製されたナノ粒子として、カルボキシ基を含有するポリマー (ポリ-L-グルタミン酸) よりも硫酸基を含有するポリマー (デキストラン硫酸) を用いて形成させた粒子の方が、塩を含む溶液中において安定であるという結果が示された[53]。そこで本研究では、ナノ粒子の安定性の向上を期待して硫酸化 HA (sulfated HA ; sHA) (Figure 3-1) を用いて GNR/sHA を作製し

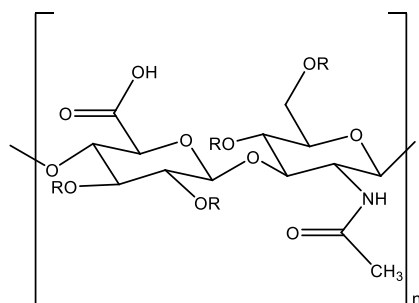
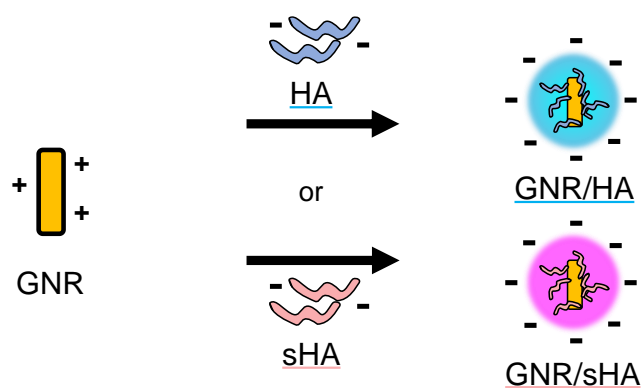


Figure 3-1. Chemical structure of sulfated hyaluronic acid. R=H or SO_3^- .

(Scheme 3-1)、GNR/HA と併せて評価した。具体的には、硫酸化割合の異なる sHA を合成し、GNR/sHA を作製した。また、塩を含む溶液中でのナノ粒子の安定性については、GNR の吸収スペクトルが、凝集に伴って変化するため[47,54,55]、GNR/HA および GNR/sHA の吸収スペクトルおよび粒子サイズを測定することにより評価した。次に、CD44 の発現量が異なるがん細胞への集積性について評価した。さらに、健常マウスおよび担がんマウスを用いて各粒子の体内動態について評価した。

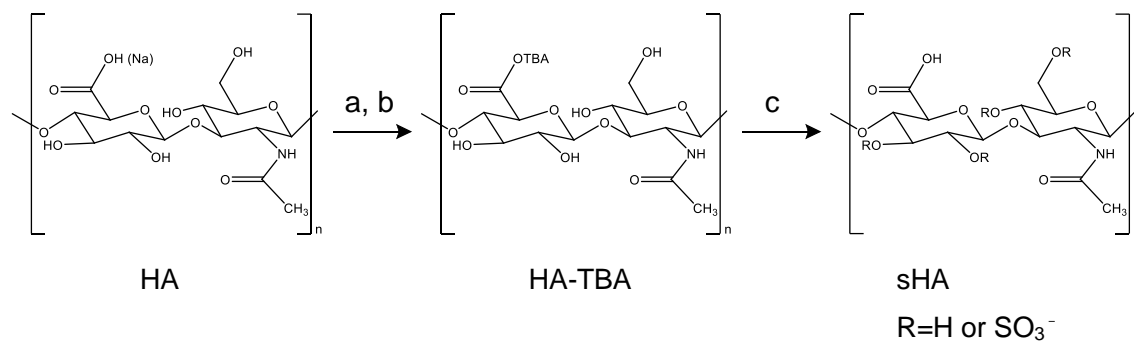


Scheme 3-1. Preparation scheme of GNR/HA or GNR/sHA.

3-2. 結果

3-2-1. 硫酸化ヒアルロン酸 (sHA) の合成

sHA は、既報[56,57]に従って合成した (Scheme 3-2)。得られた sHA について、1 ユニットあたりの硫酸基の導入数は、0.03、0.22、1.22、1.88 であることを元素分析により確認した。それぞれ、sHAa、sHAb、sHAc、sHAd と表記する。



Scheme 3-2. Synthesis of the sulfated hyaluronic acid.

- a) Tetrabutylammonium (TBA) hydroxide in H₂O; b) Dowex-ion exchange resin;
c) Sulfur trioxide pyridine complex, DMF, 0°C or 40°C, 1.5 h

3-2-2. GNR/HA の作製

GNR のトリメチルアンモニウム基と HA のカルボキシ基の電荷比が、1:1、1:3、1:10、1:30、1:90 となるように各成分を超純水中で反応させることで GNR/HA を作製した。各条件で得られた GNR/HA について吸収スペクトルを測定した結果 (Figure 3-2)、いずれも近赤外領域 (約 808 nm) に吸収ピークを認めた。ただし、電荷比が 1:1 から 1:30 の間では GNR 由来の吸収ピークの減弱が示され、安定性の低下が示唆された。1:30 の電荷比で作製した GNR/HA の粒子サイズは 11.5 ± 0.4 nm、ゼータ電位は -26.6 ± 4.0 mV であった。

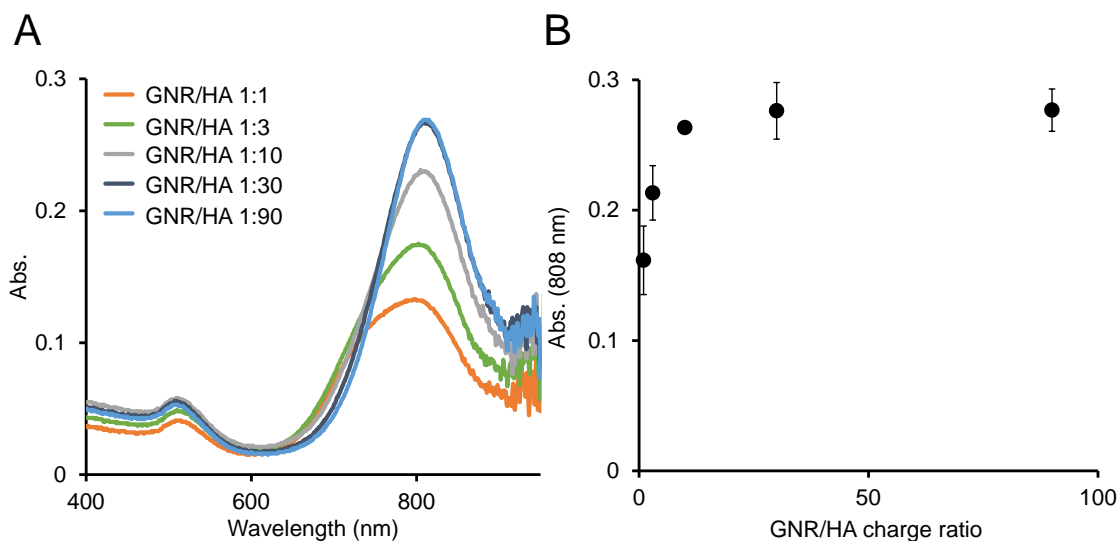


Figure 3-2. (A) UV-vis absorbance spectra of GNR/HA prepared with different charge ratios between trimethylammonium group of GNR and carboxylic acid group of HA in water.

(B) Absorbance of GNR/HA prepared at various charge ratio between GNR and HA at 808 nm.

3-2-3. GNR/sHA の作製

3-2-2 と同様の方法で、電荷比 1:30 で作製した GNR/HA に含有される HA と同じ物質量の sHA を用いて、超純水中で GNR/sHA を作製した。いずれの sHA を用いた場合においても、粒子サイズは約 10 nm、ゼータ電位は約−40 mV であった (Table 3-1)。また、GNR/sHA は近赤外領域に GNR/HA と同等の吸収ピークを認めた (Figure 3-3)。

Table 3-1. Particle size and ζ -potential of GNR/sHA complexes in water.

Complex	Size (d.nm)	ζ -potential (mV)
GNR/sHAa	8.3 \pm 2.0	−33.8 \pm 1.4
GNR/sHAb	9.3 \pm 1.4	−40.1 \pm 1.8
GNR/sHAc	13.3 \pm 5.0	−42.1 \pm 1.7
GNR/sHAd	8.4 \pm 1.4	−38.8 \pm 5.7

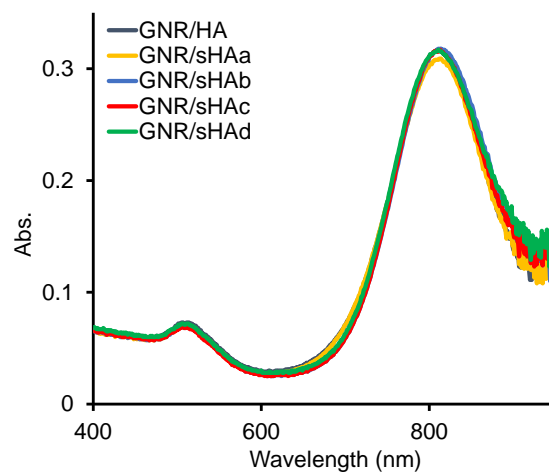


Figure 3-3. UV-vis absorbance spectra of GNR/HA and GNR/sHA in water.

3-2-4. GNR/HA および GNR/sHA の生理食塩水中における安定性評価

作製した GNR/HA および GNR/sHA を生理食塩水で希釈し、希釈した 5 分後に、粒子サイズおよび吸収スペクトルを測定した (Table 3-2、Figure 3-4A)。sHAb、sHAc、sHAd により被覆した GNR/sHA と比較して、GNR/HA および GNR/sHAa では粒子サイズが大きく、また、近赤外領域における吸収ピークが減弱した。生理食塩水で希釈した 6 時間後には、GNR/sHAc と比べて GNR/sHAb と GNR/sHAd の近赤外領域における吸収ピークが減弱した (Figure 3-4B)。このことから、生理的塩濃度条件下において sHAc が最も安定に GNR を被覆できる可能性が示された。

Table 3-2. Particle size of GNA/HA and GNR/sHA complexes in saline.

Complex	Size (d.nm)
GNR/HA	145.3±29.4
GNR/sHAa	186.6±37.1
GNR/sHAb	64.0±42.3
GNR/sHAc	25.1±13.7
GNR/sHAd	57.9±33.6

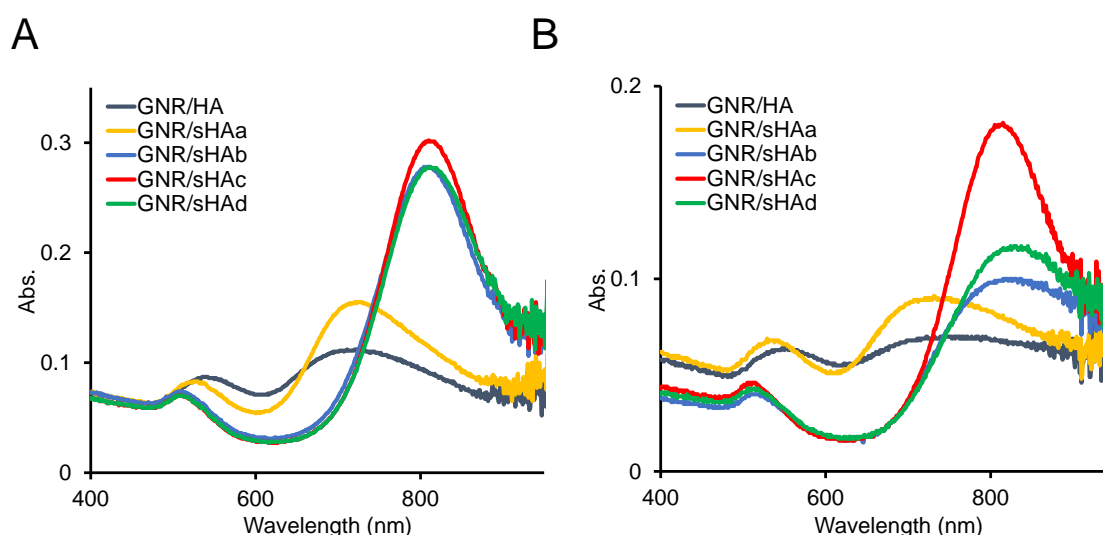


Figure 3-4. UV-vis absorbance spectra of GNR/HA or GNR/sHA complexes in saline.

These complexes were incubated in saline at room temperature for 5 min (A) and 6 h (B).

3-2-5. GNR の ^{125}I 標識

粒子の細胞内取り込みおよび体内動態を定量的に評価するために、Agarwal と Shao らの方法[58–60]に従い、放射性ヨウ素 (^{125}I) で標識した GNR (^{125}I -GNR) を合成した。 ^{125}I -GNR の放射化学的収率は 87%、ペーパークロマトグラフィによる分析から算出した放射化学的純度は 97% 以上であった。また、Table 3-3 に示されるように、得られた ^{125}I -GNR の粒子サイズおよびゼータ電位は、非標識 GNR と同等であった。また、 ^{125}I による標識前後で吸収スペクトルに大きな違いは認められなかった (Figure 3-5)。

Table 3-3. Particle size and ζ -potential of GNR and ^{125}I -GNR in water.

nanoparticle	Size (d.nm)	ζ -potential (mV)
GNR	15.7 \pm 11.7	36.7 \pm 12.5
^{125}I -GNR	14.3 \pm 5.8	25.8 \pm 6.2

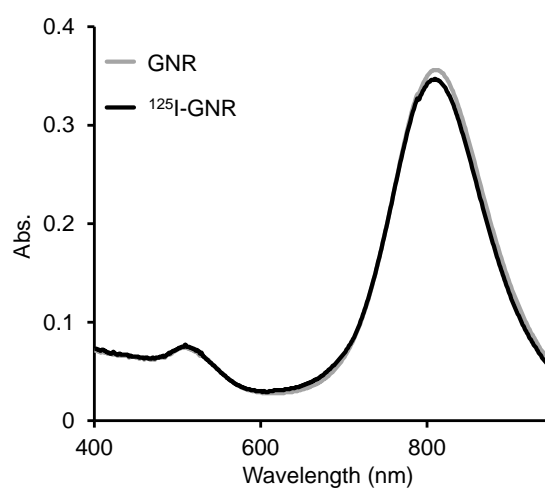


Figure 3-5. UV-vis absorbance spectra of GNR and ^{125}I -GNR in water.

3-2-6. 細胞集積性評価

第2章と同様にヒト膀胱がん細胞 T24 とヒト乳がん細胞 MCF-7 をそれぞれ CD44 高発現細胞、低発現細胞として使用した。 ^{125}I -GNR、 ^{125}I -GNR/HA、 ^{125}I -GNR/sHA (sHA ; sHAa、sHAb、sHAc、sHAd) について細胞への集積を評価した結果、 ^{125}I -GNR/sHAc および ^{125}I -GNR/sHAd については、MCF-7 と比べて T24 へ有意に高く集積した (Figure 3-6)。

続いて、過剰量の HA (50 μM) 共存下で T24 を用いて集積を評価した結果、 ^{125}I -GNR/sHAd とは異なり、 ^{125}I -GNR/sHAc の集積が有意に抑制された (Figure 3-7)。

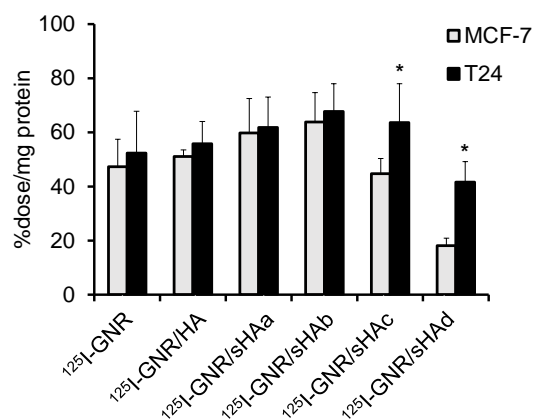


Figure 3-6. *In vitro* cellular accumulation of ^{125}I -GNR, ^{125}I -GNR/HA, and ^{125}I -GNR/sHA (sHAa, sHAb, sHAc, or sHAd) in T24 or MCF-7 cells at 1 h after incubation. * $p < 0.05$ vs. MCF-7.

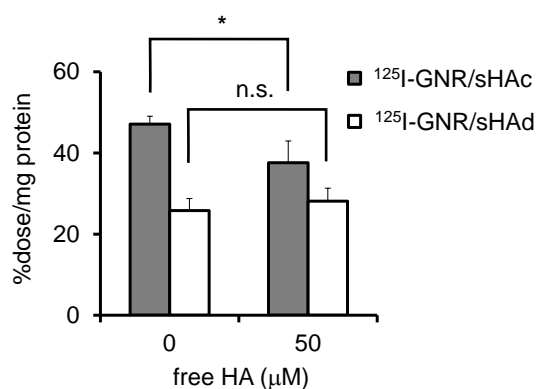


Figure 3-7. *In vitro* cellular accumulation of ^{125}I -GNR/sHAc and ^{125}I -GNR/sHAd in T24 cells at 1 h after incubation with or without co-treatment of excess HA (50 μM). * $p < 0.05$, n.s.: not significant.

3-2-7. 細胞集積後の発熱評価

GNR/sHAc を光温熱治療に用いるために、GNR/sHAc を T24 に集積させた後、近赤外レーザー光を照射し、発熱評価を行った (Figure 3-8)。近赤外レーザー光照射の単独処置群 (Control) と比較して、GNR/sHAc の添加と近赤外光照射を組み合わせた群では、顕著な温度上昇が見られた。

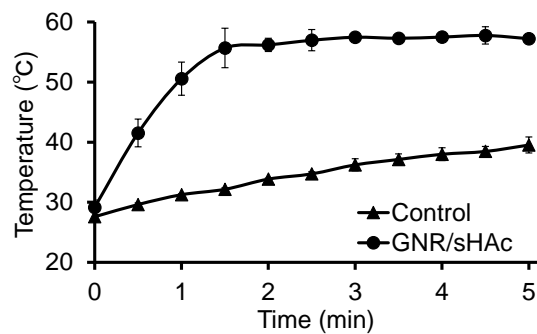


Figure 3-8. Photothermal effect of GNR/sHAc against T24 cells. Time-dependent changes in the temperature of cells treated with GNR/sHAc or 5% glucose upon near-infrared light irradiation.

3-2-8. 細胞傷害性評価

T24 に GNR/sHAc を集積させた後、近赤外レーザー光を照射し、細胞傷害性について calcein-AM および propidium iodide を用いる細胞染色法により評価した (Figure 3-9)。

GNR/sHAc の添加、あるいは、近赤外レーザー光照射の単独処置は細胞生存率に大きな影響を与えなかったのに対し、GNR/sHAc の添加とレーザー光照射を組み合わせた群でのみ高い傷害性を認めた。

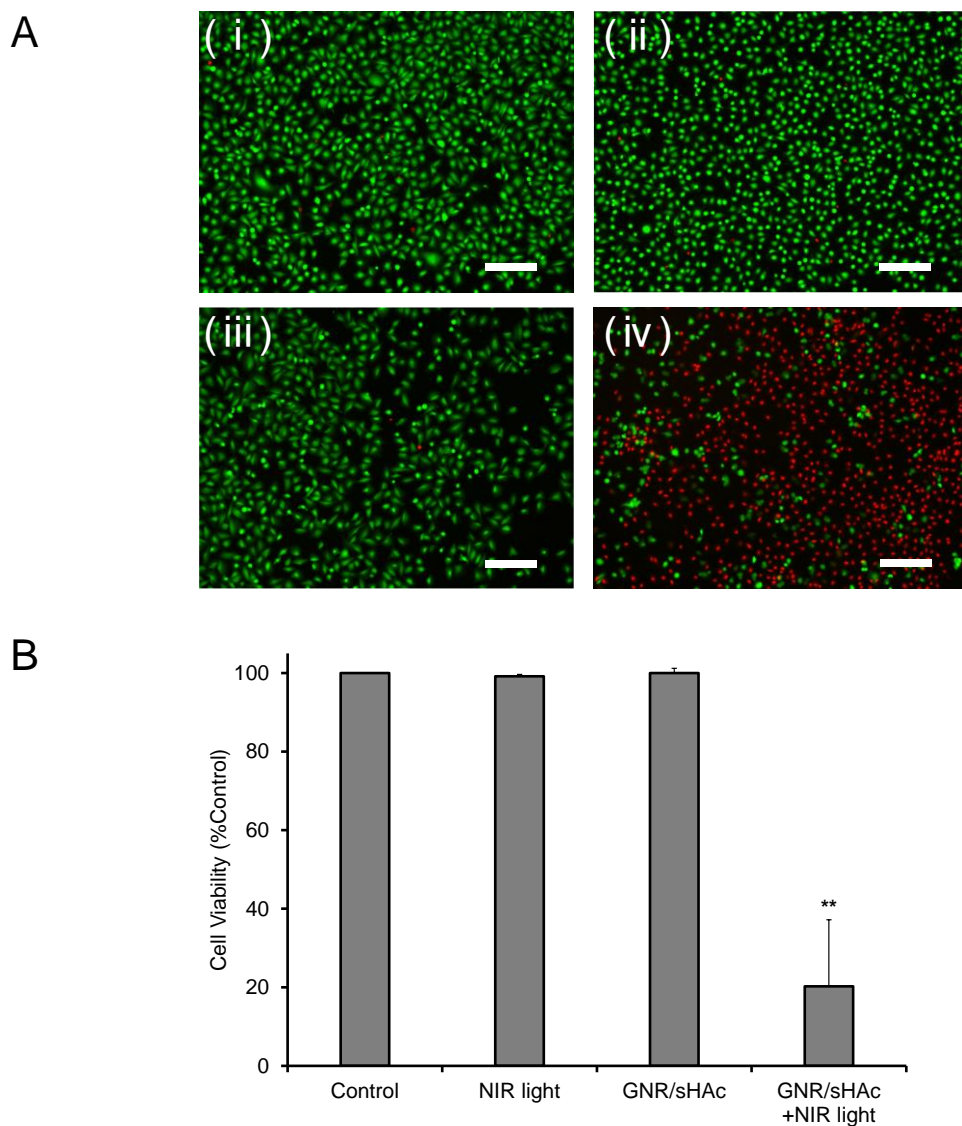


Figure 3-9. Photothermal therapeutic effect of GNR/sHAc against T24 cells.

(A) Fluorescence images of cells treated with (i) 5% glucose solution, (ii) near-infrared (NIR) light (4 W/cm²), (iii) GNR/sHAc (50 μg GNR/mL), or (iv) near-infrared light-irradiated GNR/sHAc (4 W/cm², 50 μg GNR/mL) using calcein-AM (green) and propidium iodide (red) staining. Scale bar: 200 μm. (B) Cell viability (%) calculated based on the images in (A). ** $p < 0.001$ for Control.

3-2-9. 健常マウスにおける生体内分布評価

^{125}I -GNR、 ^{125}I -GNR/HA、 ^{125}I -GNR/sHAc を健常マウス（ddY マウス）の静脈内に投与し、各臓器における放射能集積を調べることで、各ナノ粒子の生体内分布を評価した（Table 3-4）。 ^{125}I -GNR および ^{125}I -GNR/HA は、 ^{125}I -GNR/sHAc と比較して血液中に長く滞留した。また、投与後早期から脾臓、肝臓、肺に高く集積し、滞留した。脱離したヨウ素の集積部位である甲状腺への集積は低いレベルであった。一方で、 ^{125}I -GNR/sHAc は投与後早期から血液中より速やかに消失し、肝臓選択的に高く集積した。次いで脾臓や肺に高く集積した。

Table 3-4. Biodistribution of radioactivity after injection of ^{125}I -GNR, ^{125}I -GNR/HA, and ^{125}I -GNR/sHAc (10 μg GNR/18.5 kBq/100 μL /mouse) into normal mice.

^{125}I -GNR	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
blood	20.6 \pm 4.0	16.3 \pm 6.1	7.4 \pm 1.8	4.7 \pm 0.9	1.3 \pm 0.5
spleen	44.1 \pm 6.8	73.8 \pm 7.6	75.2 \pm 18.7	108.5 \pm 20.8	134.1 \pm 20.1
pancreas	2.7 \pm 0.8	4.3 \pm 0.5	7.4 \pm 1.8	7.6 \pm 2.3	5.5 \pm 2.5
stomach	3.2 \pm 0.7	6.3 \pm 1.4	5.8 \pm 1.5	3.3 \pm 0.7	2.0 \pm 0.6
intestine	0.8 \pm 0.2	1.1 \pm 0.4	0.7 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1
kidney	3.0 \pm 0.7	3.6 \pm 0.8	3.2 \pm 0.9	2.1 \pm 0.4	1.9 \pm 0.3
liver	10.6 \pm 2.8	8.4 \pm 0.8	8.7 \pm 2.3	8.8 \pm 1.3	8.3 \pm 0.9
heart	4.9 \pm 2.4	4.4 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2	2.2 \pm 0.4	1.6 \pm 0.5
lung	59.8 \pm 18.9	63.0 \pm 6.3	44.9 \pm 15.1	38.5 \pm 7.0	36.4 \pm 6.5
muscle	0.7 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1
thyroid ^a	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	1.2 \pm 0.4	1.7 \pm 0.6
^{125}I -GNR/HA	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
blood	24.7 \pm 2.7	15.3 \pm 4.1	9.0 \pm 3.1	2.9 \pm 0.4	0.9 \pm 0.1
spleen	51.9 \pm 13.1	76.7 \pm 9.6	74.5 \pm 31.4	118.0 \pm 10.3	115.7 \pm 46.9
pancreas	2.9 \pm 0.5	4.3 \pm 0.4	9.0 \pm 2.8	5.2 \pm 0.5	1.6 \pm 0.3
stomach	3.7 \pm 0.7	7.0 \pm 0.9	5.3 \pm 2.0	3.9 \pm 0.6	2.7 \pm 1.2
intestine	0.7 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	1.0 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
kidney	3.1 \pm 0.2	4.0 \pm 0.7	3.5 \pm 0.3	3.0 \pm 0.6	1.2 \pm 0.4
liver	7.7 \pm 1.6	9.6 \pm 1.7	9.1 \pm 3.2	9.6 \pm 1.5	7.3 \pm 1.5
heart	5.5 \pm 1.0	5.2 \pm 0.9	4.9 \pm 0.9	2.9 \pm 0.4	1.4 \pm 0.6
lung	49.5 \pm 14.5	55.6 \pm 14.6	33.1 \pm 8.0	34.9 \pm 7.5	21.5 \pm 7.0
muscle	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1
thyroid ^a	0.1 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.3	1.2 \pm 0.3	2.2 \pm 0.4

¹²⁵ I-GNR/sHAc	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
blood	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0
spleen	7.1 ± 1.7	6.3 ± 2.7	5.5 ± 0.2	5.3 ± 1.6	5.4 ± 1.9
pancreas	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.6 ± 0.7	0.9 ± 0.8	0.3 ± 0.2
stomach	1.7 ± 0.2	2.8 ± 1.4	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.3
intestine	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.0
kidney	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.6	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.3	0.8 ± 0.2
liver	49.9 ± 7.3	50.1 ± 15.3	40.6 ± 1.5	34.7 ± 5.2	32.2 ± 3.5
heart	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1
lung	2.6 ± 0.3	2.4 ± 0.5	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.5	1.5 ± 0.3
muscle	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.4	0.1 ± 0.0
thyroid ^a	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.3

Data are expressed as the average percentage of dose per gram of tissues.

Each value represents the mean±S.D. (n=3-4). ^aExpressed as %dose.

3-2-10. 担がんマウスにおける生体内分布評価

第 2 章と同様の方法で、T24、MCF-7 担がんモデルマウスを作製した。担がんマウスに ^{125}I -GNR/sHAc を投与し、投与 10 分、3、6 時間後における生体内放射能分布を調べた (Table 3-5)。健常マウスにおける生体内放射能分布と同様に、肝臓、脾臓、肺へ高く集積した。がんへの集積は低いレベルであったものの、CD44 低発現 MCF-7 と比較して CD44 高発現 T24 へ有意に高く集積した。

Table 3-5. Biodistribution of ^{125}I -GNR/sHAc (10 μg GNR/18.5 kBq/100 μL /mouse) into T24 and MCF-7 tumor-bearing mice.

^{125}I -GNR/sHAc	10 min	3 h	6 h
blood	0.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0
spleen	4.5 \pm 1.2	5.1 \pm 2.2	7.8 \pm 1.6
pancreas	0.7 \pm 0.2	0.3 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1
stomach	2.0 \pm 0.5	1.0 \pm 0.4	0.7 \pm 0.4
intestine	0.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1
kidney	1.5 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3	0.7 \pm 0.1
liver	65.4 \pm 14.5	62.4 \pm 23.3	59.9 \pm 14.0
heart	0.7 \pm 0.2	0.4 \pm 0.3	0.4 \pm 0.3
lung	4.3 \pm 1.4	3.6 \pm 2.0	3.1 \pm 1.6
muscle	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0
thyroid ^a	0.0 \pm 0.0	0.3 \pm 0.2	0.4 \pm 0.3
T24	0.6 \pm 0.2*	0.4 \pm 0.3*	0.6 \pm 0.4*
MCF-7	0.4 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1

Data are expressed as the average percentage of dose per gram of tissue.

Each value represents the mean \pm S.D. (n=8-11).

^a Expressed as % dose. * $p < 0.05$ vs. MCF-7.

3-3. 考察

本章では、第 2 章の ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA の作製方法を参照し、GNR のトリメチルアンモニウム基と HA のカルボキシ基の電荷比を変えて反応させ、GNR/HA を作製した。一般的に金ナノ粒子は凝集しやすいことから、より安定な自己組織化ナノ粒子を形成するために HA への硫酸基の導入が有効ではないかと考え、硫酸化割合の異なる 4 種類の sHA を合成し、sHA で被覆した GNR (GNR/sHA) を設計、作製した。

GNR は、その表面修飾により吸収スペクトルが遷移することが報告されており [54]、GNR 表面が修飾基により飽和した場合、吸光度は一定値を示す。本研究においては、電荷比が 1:30 以上の条件において、GNR/HA が安定な値を示したことから、十分量の HA を導入することができたと考えられた。GNR/sHA は、GNR/HA との比較のために、電荷比 1:30 で作製した GNR/HA に含有される HA と同じ物質量の sHA を用いて作製した。作製した GNR/HA および GNR/sHA について、生体への適用を考えて生理食塩水中での安定性を評価した結果、HA および sHAa で被覆したナノ粒子に関しては、GNR 由来の吸収ピークが著しく減弱した。これは、生理的塩濃度の条件において、GNR から HA および sHAa が解離して GNR が凝集し、桿状構造を維持できなかったことが原因ではないかと考えられた。一方で、sHAb、sHAc、sHAd を用いた場合、GNR を安定に被覆できたが、特に sHAc が最も安定に GNR を被覆した。これにより、HA に導入される硫酸基の割合が、sHA による GNR の被覆に影響し、安定性の差異を生じると考えられた。

細胞集積性評価において、 ^{125}I -GNR、 ^{125}I -GNR/HA、 ^{125}I -GNR/sHAa、 ^{125}I -GNR/sHAb については、T24 細胞選択的な集積を認めなかった。これらのナノ粒子は生理的塩濃度条件下において不安定であったことから、いずれも GNR が凝集し、CD44 に対する結合性を消失したものと推察された。一方、 ^{125}I -GNR/sHAc と ^{125}I -GNR/sHAd は、MCF-7 と比較して T24 へ有意に高く集積した。ただし、過剰量の HA 共存下においては、 ^{125}I -GNR/sHAc の集積のみが有意に抑制された。Bhattacharya の報告 [56] により、HA は、導入される硫酸基の割合が増加するにつれて CD44 への標的性が低下することが明らかにされている。そのため、今回合成した ^{125}I -GNR/sHAd は、硫酸基の割合が高く、CD44 に対する結合とは異なる経路によって T24 に集積したと考えられた。

健常マウスにおけるナノ粒子の生体内分布評価では、いずれの粒子も甲状腺への集積が低く、生体内での脱ヨウ素反応に対して安定であることが示唆された。 ^{125}I -GNR の生体内分布評価では、脾臓や肺に高く集積した。 ^{125}I -GNR/HA は、 ^{125}I -GNR とほぼ同等の体内挙

動を示した。これは、生体内においても ^{125}I -GNR/HA から HA が解離したことに起因するものと考えられる。一方で、 ^{125}I -GNR/sHAc は、投与後早期に肝臓へと高く集積し、血液中から速やかに消失した。肝臓には HA 受容体が存在することが報告されており[61–63]、 ^{125}I -GNR/sHAc が生体内で粒子を形成した状態で、複合体が解離することなく循環し、HA 受容体に認識されて肝臓へ高く集積したと考えられた。担がんモデルマウスを用いた ^{125}I -GNR/sHAc の生体内分布評価では、MCF-7 と比較して T24 に有意に高く集積した。今後、がんの光温熱治療へ応用していくためには、ナノ粒子の血中滞留性を改善してがんへの集積量を増加させる必要があるが、本研究においては、sHAc が GNR を安定に被覆し、CD44 高発現がんへの集積を達成できることを明らかにした。今後、がんへの集積の改善を達成することができれば、がんの光音響イメージングにも適用し、セラノスティクス薬剤として展開できるものと期待される。

3-4. 小括

- 種々の硫酸化割合を示す sHA を作製し、静電的相互作用に基づき、カチオン性の GNR にアニオン性 sHA を被覆した自己組織化ナノ粒子 GNR/sHA を設計・作製した。
- 生理食塩水中におけるナノ粒子の吸収スペクトルおよび粒子サイズの評価により、一定の硫酸化割合を示す HA を用いた場合、GNR を安定に被覆できる可能性が示された。
- 細胞集積性評価の検討により、sHAc 被覆 GNR が一部 CD44 特異的にがん細胞に集積する可能性が示された。
- sHAc 被覆 GNR の添加と近赤外レーザー光照射を組み合わせた場合、CD44 高発現細胞において高い細胞傷害性が示された。
- 健常マウスを用いた検討において、 ^{125}I -GNR/sHAc は投与後早期に、肝臓に高く集積した。また、 ^{125}I -GNR と異なる生体内挙動を示した。
- ^{125}I -GNR/sHAc は、*in vivo* においても CD44 低発現 MCF-7 と比較して、CD44 高発現 T24 に有意に高く集積した。

以上より、本研究で作製した GNR/sHAc が CD44 高発現がんの光温熱治療用薬剤として有効である可能性が示された。

総括

本研究では、静電的相互作用による自己組織化に基づくがん標的ナノ粒子型セラノステイクス薬剤の開発を目的に、1. 肺転移メラノーマの核医学診断を目的とする γ -ポリグルタミン酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発、2. CD44 高発現がんの核医学診断を目的とするヒアルロン酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発、3. CD44 高発現がんの光温熱治療を目的とするヒアルロン酸誘導体被覆自己組織化ナノ粒子の開発について検討し、以下の知見を得た。

1. 肺転移メラノーマの核医学診断を目的とする γ -ポリグルタミン酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発

静電的相互作用に基づき、放射性標識アニオン性 dendrimer に放射性標識カチオン性ポリエチレンジアミンおよびアニオン性 γ -ポリグルタミン酸を順次被覆した、自己組織化ナノ粒子の合成に成功した。また、健常マウスおよび肺転移メラノーマモデルマウスを用いた検討により、本ナノ粒子は生体内で比較的安定に存在するとともに、血液中の放射能濃度に比べてメラノーマが転移した肺の放射能濃度が高い値を示したことから、肺に転移したメラノーマの核医学診断に有効である可能性が示された。

2. CD44 高発現がんの核医学診断を目的とするヒアルロン酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発

第 1 章で構築した、三成分系ナノ粒子の開発手法を他のがん種を標的とするセラノステイクス薬剤開発に適用することを考慮し、最外被覆成分としてヒアルロン酸を用いてナノ粒子を作製した。また、細胞取り込み評価および担がんモデルマウスを用いた検討により、本章で開発したナノ粒子が、ヒアルロン酸受容体である CD44 を高発現するがん細胞およびがん組織への集積を認めたことから、CD44 高発現がんの核医学診断に有効である可能性が示された。

3. CD44 高発現がんの光温熱治療を目的とするヒアルロン酸誘導体被覆自己組織化ナノ粒子の開発

金ナノロッドをコアとする自己組織化ナノ粒子の開発を目的として、硫酸化ヒアルロン酸で被覆したナノ粒子を作製した。一定の硫酸化割合を示すヒアルロン酸を用いた場合、金ナノロッドを安定に被覆することができ、また CD44 高発現のがん細胞に高く集積する

ことを示した。さらに、近赤外レーザー光照射との組み合わせにより高いがん細胞傷害効果が示された。担がんモデルマウスを用いた検討においても、**CD44** 高発現がん組織への集積を認めたことから、**CD44** 高発現がんの光温熱治療用薬剤として有効である可能性が示された。

以上、本研究で得られた知見が、新たながん標的ナノ粒子型セラノスティクス医薬品開発に有益な情報を提供するものとする。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました本学薬品物理化学講座教授・向高弘先生に深く感謝の意を表します。

本研究論文の審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました本学薬剤学講座教授・大河原賢一先生、製剤学講座教授・坂根稔康先生、機能性分子化学講座教授・田中将史先生に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、研究内容への適切な御助言・御教示を賜りました本学薬品物理化学講座准教授・佐野紘平先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、有機化学や分子イメージング手法をはじめとした多くの技術を御教示して頂くと共に、日頃から活発な議論をして頂きました、本学薬品物理化学講座講師・山崎俊栄先生、金沢大学臨床分析科学研究室助教・宗兼将之先生、千葉大学分子画像薬品学研究室助教・甘中健登先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、有益なる御助言と深い御理解を頂きました本学放射線管理室准教授・安岡由美先生に深く感謝致します。

第 1 章の研究に際しまして、有益な御助言を賜りました長崎大学熱帯医学研究所特命教授・佐々木均先生に深く感謝致します。

第 2 章の研究に際しまして、有益な御助言および御助力を賜りました同志社女子大学病態分子制御学研究室教授・尾崎恵一先生、武庫川女子大学薬品分析学研究室教授・萩森政頼先生に深く感謝致します。

第 3 章の硫酸化ヒアルロン酸の元素分析につきまして、御助力を賜りました鳥取大学技術部・丹松美由紀氏に感謝致します。

本研究を履行するにあたり、終始実験にご協力いただきました本学薬品物理化学講座山本梓学士、森山理央学士、東里沙学士、宗村真美亜学士、河上琳氏、田中志歩氏をはじめとする薬品物理化学講座の諸先輩、後輩の皆様に感謝致します。

これまでの研究生生活において、励まし続けてくれた原武芳江学士、原史子学士をはじめとする友人に心から感謝致します。

最後に、これまで終始温かく見守り、支えてくれた家族に心から感謝致します。

実験の部

研究全般に関する項目

本研究に用いた主要な試薬、機器などについて以下に一括する。動物実験は、神戸薬科大学動物実験委員会の承認を得たのち、神戸薬科大学動物実験実施規定を遵守し、動物に不必要な苦痛を与えぬよう十分に配慮して行った。

使用動物・試薬・機材

ddY マウスおよび Balb/c マウスは、日本エスエルシー社から購入した。C.B-17/Icr-scid/scidJcl マウスは、日本クレア社から購入した。

マウスメラノーマ細胞 B16-F10 細胞株、ヒト膀胱がん細胞 T24 細胞株、ヒト乳がん細胞 MCF-7 細胞株は、理化学研究所より購入した。

2-(4-isothiocyanatobenzyl)-diethylenetriaminepentaacetic acid (*p*-SCN-Bn-DTPA) は、Macrocyclics 社から購入した。G4、PEI、TBA、Sulfur trioxide pyridine complex は、Sigma Aldrich 社から購入した。 γ -PGA は、ヤクルト薬品工業より提供を受けた。第 2 章で使用した HA (平均分子量：20,000) は、Sigma Aldrich 社から購入し、第 3 章で使用した HA (平均分子量：40,000) はブルーメイジバイオテクノロジージャパン株式会社より提供を受けた。BCA protein assay kit、Alexa 488-labeled chicken anti-rabbit IgG は、Thermo Fisher Scientific 社から購入した。Amicon Ultra-4 (10 kDa) は、Merck 社から購入した。calcein-AM、propidium iodide は同仁化学研究所から購入した。17 β -Estradiol は、Innovative Research of America 社より購入した。Matrigel®は、Corning 社から購入した。VitreGel®は、The Well Bioscience 社から購入した。抗 CD44 抗体 (ab157107) は、Abcam 社より購入した。PBS(-)、DMEM、RPMI1640 およびペロナール緩衝液 (pH 8.6、I = 0.06) は、ナカライテスク社から購入した。¹¹¹InCl₃ は、日本メジフィジックス株式会社より提供を受けた。Na¹²⁵I は、PerkinElmer 社より購入した。

核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance, NMR) 測定には、Agilent Technologies 社製の Varian Mercury 300 あるいは日本電子株式会社の JNM-ECZ400S FT-NMR を用い、重水素化溶媒中の残留溶媒を内標準物質として測定した。赤外スペクトルの測定は、日本分光株式会社の FT/IR-4200 を使用した。元素分析の測定には、エレメンター・ジャパン株式会社の vario EL cube を使用した。ミクロトームは、Leica Microsystems 社製のクリオスタット CM1850 を使用した。逆相 HPLC には、GL Sciences 社製の UV 検出器 GL-7540、ポンプ

GL-7410 を使用し、ナカライテスク社の Cosmosil 5C18-AR-II column 4.6 mmI.D.×250 mm を装着した。オートラジオグラフィには、GE Healthcare 社製の Typhoon FLA 7000 Imager を使用した。放射能の測定には、PerkinElmer 社製の Wizard 1480 および Aloka 社製の CURIEMETER IGC-3 を用いた。吸収スペクトルの測定には、島津製作所製の UV-2450 UV-Visible Spectrophotometer と日立製作所の U-2810 Spectrophotometer を使用した。プレートリーダーには、Thermo Fisher Scientific 社の MULTISKAN FC を使用した。セルロースアセテート膜電気泳動には、ADVANTEC 社製の EPS053AA、セルロースアセテート膜として、ADVANTEC 社製の SELECA®-V を使用した。ペーパークロマトグラフィには、ADVANTEC 社製の Filter Paper Grade 1 を使用した。ナノ粒子の粒子径とゼータ電位は、Malvern 社製の Zetasizer Nano ZS により測定した。蛍光画像の取得には、キーエンス製の BZ-X710 All-in-one Fluorescence Microscope を使用した。LD 照射光源は、浜松ホトニクス社製の LE0842SPOLD を使用した。赤外線サーモグラフィカメラは、FLIR 社の FLIR E4 を使用した。統計解析ソフトは、GraphPad Software 社の GraphPad Prism 6 を使用した。

第 1 章 実験の部

【1】 DTPA-G4 の合成

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer (generation 4th, G4) への *p*-SCN-Bn-DTPA の導入は、既報に基づき行った[28]。

【2】 G4 への DTPA 導入数の算出

酢酸緩衝液 (0.1 M、pH=6.0) と ¹¹¹InCl₃ を体積比 1:1 で混合し、室温で 5 分間静置した。

【1】の未精製サンプル (10 μL) と混合し、室温で 1 時間静置した。その後、Amicon Ultra-4 (10 kDa) を用いた限外濾過により ¹¹¹In-DTPA-G4 と ¹¹¹In-DTPA に分離した。それぞれの放射能 (cpm) を用いて、以下の式に従い G4 1 分子あたりの DTPA 導入数を算出した。

$$\text{DTPA の導入数} = 128 \times \frac{{}^{111}\text{In-DTPA-G4 の放射能}}{{}^{111}\text{In-DTPA-G4 の放射能} + {}^{111}\text{In-DTPA の放射能}}$$

【3】 DTPA-G4 の ¹¹¹In 標識

酢酸緩衝液 (0.1 M、pH=6.0) と ¹¹¹InCl₃ を体積比 1:1 で混合し、室温で 5 分間静置した。酢酸緩衝液 (0.1 M、pH=6.0) に溶解させた DTPA-G4 100 μg と混合し、室温で 1 時間静置した。その後、Amicon Ultra-4 (10 kDa) を用いて限外濾過を 2 回行い、溶媒を 5% グルコース溶液に置換した。放射化学的純度の評価は、セルロースアセテート膜電気泳動を用いて行った。すなわち、セルロースアセテート膜として SELECA[®]-V を使用し、veronal buffer (pH=8.6) 中、0.8 mA/cm の条件で 45 分間泳動することにより行った。

【4】 PEI の ¹²⁵I 標識

N-Succinimidyl 3- [¹²⁵I]iodobenzoate (¹²⁵I-SIB) は、既報に基づき合成した[29]。作製した ¹²⁵I-SIB にリン酸緩衝液 (0.1 M、pH9.0) 200 μL を加えた。リン酸緩衝液 (0.1 M、pH9.0) 200 μL に溶解させた PEI 200 μg を混合し、室温で 1 時間反応させた。その後、Amicon Ultra-4 (10 kDa) を用いて限外濾過を 2 回行い、溶媒を 5% グルコース溶液に置換した。放射化学的純度の評価は、セルロースアセテート膜電気泳動 (条件は【3】と同様) を用いて行った。

【5】 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA の作製

^{111}In -DTPA-G4 (10 μg /200 μL 5% グルコース溶液) に ^{125}I -PEI (23 μg /300 μL 5% グルコース溶液) を加えて混合し、室温で 15 分間静置することで ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI を作製した。さらに、 γ -PGA (138 μg /500 μL 5% グルコース溶液) と混合し、室温で 15 分間静置することで ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA を作製した。放射化学的純度評価は、セルロースアセテート膜電気泳動 (条件は【3】と同様) を用いて行った。

【6】細胞培養

マウスメラノーマ細胞 B16-F10 細胞株は、DMEM (10% ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含む) を用いて 37°C、5% CO_2 環境下で培養した。

【7】B16-F10 細胞への各ナノ粒子の集積性評価

B16-F10 細胞を 3.0×10^5 cells/0.5 mL DMEM となるように 24-well plate の各ウェルに播種し、37°C、5% CO_2 環境下で一晩インキュベートした。各ウェルの培地を除去し、 ^{111}In -DTPA-G4、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI あるいは ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA (0.2 μg DTPA-G4、 ^{111}In 7.4 kBq、 ^{125}I 3.7 kBq) を含む培地を 0.5 mL ずつ加え、0.5、1、3、6 時間 CO_2 インキュベーターで培養した。培地を除去し、PBS (-) 0.5 mL を用いて洗浄した後、0.5 M NaOH を 0.5 mL 加えて細胞を溶解させ、回収した。さらに PBS (-) 0.5 mL を追加し、細胞溶解液を回収した。細胞溶解液の放射能は γ カウンタにより測定した。また、タンパク質量は BCA protein assay kit を用いて測定し、細胞集積量は %dose/mg protein として算出した。

【8】健常マウスにおける生体内分布評価

ddY マウス (6 週齢、雄性) に ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI あるいは ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA (1 μg DTPA-G4/100 μL 5% グルコース溶液、 ^{111}In 、 ^{125}I とともに 18.5 kBq) を静脈内に投与し、10、30 分、1、3、6 時間後に屠殺し、血液、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉、甲状腺を摘出した。また、投与 6 時間後に尿と糞を採取した。それぞれの臓器重量と放射能を測定し、臓器への放射能集積は %dose あるいは %dose/g として算出した。

同様に、 ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA (1 μg DTPA-G4/100 μL 5% グルコース溶液、 ^{111}In と ^{125}I とともに 18.5 kBq) を Balb/c マウス (8 週齢、雄性) の静脈内に投与し、3 時間後に各臓器を摘出して、放射能集積を評価した。

【9】肺転移メラノーマモデルマウスにおける生体内分布評価

B16-F10 細胞を 1.0×10^5 cells/100 μ L となるよう PBS (-) で懸濁し、Balb/c マウス (5 週齢、雄性) の静脈内に投与した。投与 3 週間後に以下の生体内分布評価に使用した。

^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA (1 μ g DTPA-G4/100 μ L 5% グルコース溶液、 ^{111}In と ^{125}I ともに 18.5 kBq) を静脈内に投与し、3 時間後に【8】と同様の方法で放射能集積を評価した。

さらに阻害実験としては、肺転移メラノーマモデルマウスに γ -PGA (692.5 μ g/100 μ L 5% グルコース溶液) を投与した 30 分後に ^{111}In -DTPA-G4/ ^{125}I -PEI/ γ -PGA (1 μ g DTPA-G4/100 μ L 5% グルコース溶液、 ^{111}In と ^{125}I ともに 18.5 kBq) を投与し、その 3 時間後に【8】と同様の方法で放射能集積を評価した。

【10】統計解析

データは、平均 \pm 標準偏差 (S.D.) で示した。細胞集積性評価では、二元配置分散分析 (two-way ANOVA) の後、Tukey 法により比較した。ddY マウスの各臓器における ^{111}In と ^{125}I の放射能集積の比較は、two-way ANOVA の後、Bonferroni 法を用いて行った。尿と糞における ^{111}In と ^{125}I の放射能集積の比較は、Paired t 検定により比較した。また、Balb/c マウスおよび肺転移メラノーマモデルマウス (阻害剤投与ありなし) における生体内分布の比較には、Tukey 法を用いた。さらに、血液中の放射能濃度に対する肺における放射能濃度の比較には Unpaired t 検定を用いた。統計学的有意差の基準として $p < 0.05$ を採用した。

第2章 実験の部

【1】 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA の作製

^{111}In -DTPA-G4 は、第1章【3】と同様の方法で合成した。 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA は、DTPA-G4 のカルボキシ基、PEI のアミノ基および HA のカルボキシ基の電荷比が、1:8:8、1:8:16、1:8:24、1:8:32 となるように各成分を混和することで作製した。すなわち、 ^{111}In -DTPA-G4 (10 μg /200 μL 5% グルコース溶液) と PEI (23 μg /300 μL 5% グルコース溶液) を混合し、30 分間静置した後、HA (216、432、648、865 μg /500 μL 5% グルコース溶液) を加えて混合し、さらに 30 分間静置することで ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA を作製した。放射化学的純度の評価は、第1章【3】と同様の条件でセルロースアセテート膜電気泳動を用いて行った。

【2】細胞培養

ヒト膀胱がん細胞 T24 細胞株とヒト乳がん細胞 MCF-7 細胞株は、RPMI1640 培地 (10% ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン、100 μg /mL ストレプトマイシンを含む) を用いて 37°C、5%CO₂ 環境下で培養した。

【3】細胞取り込み評価

T24 細胞と MCF-7 細胞を 3.0×10^5 cells/0.5 mL RPMI1640 となるように 24-well plate の各ウェルに播種し、37°C、5%CO₂ 環境下で一晩インキュベートした。各ウェルの培地を除去し、 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (1:8:32) (0.1 μg DTPA-G4) を含む培地を 0.5 mL ずつ加え、0.5、1、3、6 時間 CO₂ インキュベーターで培養した。その後、培地を除去し、PBS (-) 0.5 mL を用いて洗浄した後、0.5 M NaOH を 0.5 mL 加えて細胞溶解液を回収し、第1章【7】と同様の方法で評価した。

【4】細胞取り込み機構の評価

各ウェルの培地を除去し、HA (50 μM) を含む培地 0.48 mL を各ウェルに加え、30 分間培養した後、 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA (0.1 μg DTPA-G4) 20 μL を加え、各薬剤の共存下で 3 時間、CO₂ インキュベーターにて培養した。その後、第2章【3】と同様の方法で細胞取り込み評価を行った。なお、各種薬剤を含まない群をコントロールとした。

【5】 健常マウスにおける生体内分布評価

ddY マウス（6 週齢、雄性）に ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA（1 μg DTPA-G4 /100 μL 5% グルコース溶液、18.5 kBq）を静脈内に投与し、10、30 分、1、3、6、24 時間後に屠殺し、血液、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉を摘出した。また、投与後 24 時間に尿と糞を採取した。その後、第 1 章【8】と同様の方法で評価した。

【6】 担がんマウスの作製

C.B-17/Icr-scid/scidJcl マウス（5 週齢、雌性）の背部に 17 β -Estradiol（1.25 mg）を皮下投与した。同日に、T24 細胞（ 3.5×10^6 cells）を Matrigel[®]と PBS を 1:1 で混合した溶液 100 μL に懸濁し、右腰部に皮下移植した。さらに 1 週間後、MCF-7 細胞（ 2.5×10^6 cells）を左腰部に皮下移植した。MCF-7 細胞を移植した 9~10 週間後に以下に示す動物実験に使用した。

【7】 担がんマウスにおける生体内分布評価

作製した担がんマウスの静脈内に ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA（1 μg DTPA-G4/100 μL 5% グルコース溶液、18.5 kBq）を投与した。投与 6 時間後に屠殺し、血液、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉、T24 および MCF-7 がん組織を摘出した。その後、第 1 章【8】と同様の方法で評価した。

【8】 ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA のがん組織内局在評価

T24 移植マウスに ^{111}In -DTPA-G4/PEI/HA（1 μg DTPA-G4/100 μL 5% グルコース溶液、1.85 MBq）を投与し、6 時間後に T24 がん組織を摘出した。摘出した T24 がん組織を凍結し、20 μm 厚の切片を作製した後、BAS-SR2040 イメージングプレートに露光し、 ^{111}In のオートラジオグラムを得た。また、同一切片について、抗 CD44 抗体（ab157107）と 2 次抗体（Alexa 488-labeled chicken anti-rabbit IgG）を用いて CD44 の免疫組織化学染色を実施した。

【9】 統計解析

データは、平均 \pm 標準偏差（S.D.）で示した。細胞取り込み評価は、two-way ANOVA の後、Bonferroni 法により比較した。HA 添加による細胞取り込み機構の評価は、Unpaired t 検定を用いた。担がんマウスの生体内分布評価は、Paired t 検定により比較した。統計学的有意差の基準として $p < 0.05$ を採用した。

第3章 実験の部

【1】HA-TBA の合成

HA-TBA は、既報[56,57]に基づき合成した。DOWEX (Amber chrom® 50WX8 hydrogen form) 5 g に TBA (40 wt% in water) 10 mL を加え、室温で一晩浸漬した。HA (500 mg/100 mL 超純水) を加え室温で 3 時間攪拌した。反応溶液を吸引濾過し、ろ液を回収後、凍結乾燥することで、HA-TBA を収量 519 mg で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[56,57]。

【2】sHA の合成

以下の表に示す条件で合成を実施した。DMF100 mL に溶解させた HA-TBA に、DMF 20 mL に溶解させた sulfur trioxide pyridine complex (SO₃-Py) を加え、アルゴンガス雰囲気下、氷冷しながら 1 時間攪拌した。1.0 M HCl を加えて pH を 3 に調整した後、30 分間攪拌した。さらに、1.0 M NaOH を加え、pH を 9 に調整し、30 分間攪拌した。氷冷アセトンを加えて析出させた固体について、分画分子量が 3500 の透析膜を使用し、外液として 50% エタノールを用いて 1 日間、超純水を用いて 6 日間透析した。その後、凍結乾燥により sHAa、sHAb、sHAc を得た。

なお、sHAd は、DMF30 mL に溶解させた HA-TBA に sulfur trioxide pyridine complex を加え、アルゴンガス雰囲気下、室温で 15 分間攪拌した後、40°C で 1.5 時間攪拌した。以降の操作は、sHAa、sHAb、sHAc の合成と同様の方法で行った。sHAd は収量 97 mg で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[56,57]。

Reaction conditions for preparation of sHAs.

Sample	HA-TBA (mg)	SO ₃ -Py (mg)	収量 (mg)
sHAa	507	213	109
sHAb	512	644	88.1
sHAc	502	4215	109
sHAd	300	1007	97

【3】 HA 1 ユニットあたりの硫酸基の導入数の算出

HA 1 ユニットあたりの硫酸基の導入数を n とすると、sHA の 1 ユニットあたりの式量は、 $C_{14}H_{20}NO_{11}Na + n(SO_3) - nH$ より $401.3 + 79.1n$ となる。元素分析により測定された各 sHA に含有される硫黄の質量%を x (%) とすると、

$$x = \frac{32.1n}{401.3 + 79.1n} \times 100$$

となるので

$$n = \frac{401.3x}{3210 - 79.1x}$$

と変形できる。この式を用いて元素分析の結果から硫酸基の導入数を算出した。

【4】 GNR/HA の作製

GNR/HA は、GNR の トリメチルアンモニウム基と HA のカルボキシ基の電荷比が、1:1、1:3、1:10、1:30、1:90 となるように各成分を混和することで作製した。すなわち、GNR (10 μ g/50 μ L 超純水) と HA (0.44、1.3、4.4、13、40 μ g/50 μ L 超純水) を加えて混合し、15 分間静置することで GNR/HA を作製した。作製した GNR/HA を超純水で希釈し、GNR/HA (10 μ g/mL 超純水) の吸収スペクトルを分光光度計を用いて測定した。

【5】 GNR/sHA の作製

第 3 章【4】と同様に、電荷比 1:30 で作製した GNR/HA に含有される HA と同じ物質量の sHA を用いて、GNR/sHA を作製した。

【6】 GNR/HA および GNR/sHA の生理食塩水中における安定性評価

作製した GNR/HA および GNR/sHA (10 μ g/950 μ L 超純水) に NaCl (9 mg/50 μ L 超純水) を加えて混合し、5 分後と 6 時間後に分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定した。また、混合した 5 分後に粒子サイズを測定した。

【7】 GNR の ^{125}I 標識および ^{125}I -GNR/sHA の作製

^{125}I 標識 GNR は、既報[58–60]に基づき合成した。GNR (25 μ g/100 μ L 超純水) に $Na^{125}I$ (100 μ L 超純水、1.1~2.2 MBq) を加えて混合し、5 分間静置した。3000 \times g、15 分間の遠心分離を 2 回行い、上清を取り除いた後、15 分間超音波処理を行った。放射化学的純度の評価は、ペーパークロマトグラフィ (展開溶媒: 超純水) により行った。

【8】細胞培養

ヒト膀胱がん細胞 T24 細胞株とヒト乳がん細胞 MCF-7 細胞株は第 2 章の【2】と同様の方法で培養した。

【9】細胞集積性評価

T24 細胞と MCF-7 細胞を 2.0×10^5 cells/0.5 mL RPMI1640 となるように 24-well plate の各ウェルに播種し、37°C、5%CO₂ 環境下で一晩インキュベートした。各ウェルの培地を除去し、¹²⁵I-GNR、¹²⁵I-GNR/HA、¹²⁵I-GNR/sHA (sHA ; sHAa、sHAb、sHAc、sHAd) (1 µg GNR/50 µL 5%グルコース溶液) を含む培地を 0.5 mL ずつ加え、1 時間 CO₂ インキュベーターで培養した。その後、培地を除去し、PBS (-) 0.5 mL を用いて洗浄した後、0.5 M NaOH 250 µL と PBS (-) 250 µL を混合した溶液を加えて細胞溶解液を回収し、第 1 章【7】と同様の方法で評価した。

【10】細胞集積機構の評価

各ウェルの培地を除去し、HA (50 µM) を含む培地 0.4 mL を各ウェルに加え、1 時間培養した。その後、¹²⁵I-GNR/sHAc あるいは ¹²⁵I-GNR/sHAd (0.1 µg GNR/10 µL 5%グルコース溶液) を含む培地 0.1 mL を加え、HA 共存下で 1 時間 CO₂ インキュベーターにて培養した。その後、第 3 章【9】と同様の方法で評価した。なお、HA を含まない群をコントロールとした。

【11】細胞集積後の発熱評価

T24 細胞を 2.0×10^5 cells/0.5 mL RPMI1640 となるように 24-well plate の各ウェルに播種し、37°C、5%CO₂ 環境下で一晩インキュベートした。各ウェルの培地を除去し、GNR/sHAc (25 µg GNR/50 µL 5%グルコース溶液) を含む培地を 0.5 mL ずつ加え、1 時間 CO₂ インキュベーターで培養した。その後、各ウェルの培地を除去し、PBS (-) 0.5 mL を用いて洗浄した後、PBS (-) 0.1 mL を加え、セルスクレーパーを用いて細胞を回収した。回収した細胞懸濁液を 1.5 mL チューブに移し、近赤外レーザー光 (2 W/cm²) を 5 分間照射した。照射開始後 30 秒毎に、温度上昇を赤外線サーマルカメラ (FLIR E4) にて撮影し、発熱を評価した。

【12】細胞傷害性評価

T24 細胞を 2.0×10^4 cells/0.1 mL RPMI1640 となるように 96-well plate の各ウェルに播種し、 37°C 、5% CO_2 環境下で一晩インキュベートした。各ウェルの培地を除去し、GNR/sHAc (5 μg GNR/10 μL 5%グルコース溶液) を含む培地を 0.1 mL ずつ加え、1 時間 CO_2 インキュベーターで培養した。その後、各ウェルの培地を除去し、PBS (-) 0.1 mL を用いて洗浄した後、ナノ粒子を含まない培地に交換した。近赤外レーザー光 (4 W/cm^2) を 10 分間照射し、その後 1.5 時間インキュベートした。PBS (-) にて洗浄後、calcein-AM および propidium iodide を用いて生細胞と死細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察することで、生存率を算出した。比較対照として、GNR/sHAc を添加した群および近赤外レーザー光照射のみを実施した群を設けた。

【13】健常マウスにおける生体内分布評価

ddY マウス (5 週齢、雄性) に ^{125}I -GNR、 ^{125}I -GNR/HA、 ^{125}I -GNR/sHAc (10 μg GNR/100 μL 5%グルコース溶液、18.5 kBq) を静脈内に投与し、10、30 分、1、3、6 時間後に屠殺し、血液、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉、甲状腺を摘出した。その後、第 1 章【8】と同様の方法で評価した。

【14】担がんマウスの作製

C.B-17/Icr-scid/scidJcl マウス (5 週齢、雌性) の背部に 17β -Estradiol (1.25 mg) を皮下投与した。1~2 週間後に、T24 細胞 ($5.5 \sim 6.0 \times 10^6$ cells) および MCF-7 細胞 ($5.5 \sim 6.0 \times 10^6$ cells) を VitroGel® と 40% ウシ胎児血清を体積比 2:1 で混合した溶液 75~90 μL に懸濁し、それぞれ右腰部および左腰部に皮下移植した。がん細胞を移植した 6~8 週間後に以降の動物実験に使用した。

【15】担がんマウスにおける生体内分布評価

作製した担がんマウスに ^{125}I -GNR/sHAc (10 μg GNR/100 μL 5%グルコース溶液、18.5 kBq) を投与した。投与 10 分、3、6 時間後に屠殺し、血液、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉、甲状腺、T24 および MCF-7 がん組織を摘出した。その後、第 1 章【8】と同様の方法で評価した。

【16】統計解析

データは、平均±標準偏差（S.D.）で示した。細胞集積性評価および HA 添加による細胞集積機構の評価は、Unpaired t 検定を用いた。細胞傷害性評価は、one-way ANOVA の後、Dunnett's 検定を行った。担がんマウスの生体内分布評価は、two-way ANOVA の後、Paired t 検定により比較した。統計学的有意差の基準として $p < 0.05$ を採用した。

参考文献

- [1] 厚生労働省, 「がん対策推進基本計画」, がん対策推進基本計画, 1-77 (2018).
- [2] Kelkar S.S., Reineke T.M., Theranostics: Combining imaging and therapy. *Bioconjugate Chem.*, **22**, 1879-903 (2011).
- [3] Janib S.M., Moses A.S., MacKay J.A., Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 1052-63 (2010).
- [4] Lammers T., Aime S., Hennink W.E., Storm G., Kiessling F., Theranostic nanomedicine. *Acc. Chem. Res.*, **44**, 1029-38 (2011).
- [5] Silva C.O., Pinho J.O., Lopes J.M., Almeida A.J., Gaspar M.M., Reis C., Current trends in cancer nanotheranostics: Metallic, polymeric, and lipid-based systems, *Pharmaceutics*, **11**, 22, (2019).
- [6] Fan Z., Fu P.P., Yu H., Ray P.C., Theranostic nanomedicine for cancer detection and treatment, *J. Food Drug Anal.*, **22**, 3-17 (2014).
- [7] Azevedo A., Farinha D., Geraldes C., Faneca H., Combining gene therapy with other therapeutic strategies and imaging agents for cancer theranostics, *Int. J. Pharm.*, **606**, 120905 (2021).
- [8] Matsumura Y., Maeda H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.*, **46**, 6387-92 (1986).
- [9] Barenholz Y., Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J. Control. Release*, **160**, 117-34 (2012).
- [10] Jain R.K., Stylianopoulos T., Delivering nanomedicine to solid tumors, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **7**, 653-64 (2010).
- [11] Dadpour S., Mehrabian A., Arabsalmani M., Mirhadi E., Askarizadeh A., Mashreghi M., Jaafari M.R., The role of size in PEGylated liposomal doxorubicin biodistribution and anti-tumour activity. *IET Nanobiotechnol.*, **16**, 259-72 (2022).
- [12] Byrne J.D., Betancourt T., Brannon-Peppas L., Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 1615-26 (2008).
- [13] Zhang Y.R., Lin R., Li H.J., He W. ling, Du J.Z., Wang J., Strategies to improve tumor penetration of nanomedicines through nanoparticle design, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed., Nanobiotechnol.*, **11**, e1519 (2019).
- [14] Chamundeeswari M., Jeslin J., Verma M.L., Nanocarriers for drug delivery applications, *Environ. Chem. Lett.*, **17**, 849-65 (2019).
- [15] van der Heide S., Russell D.A., Optimisation of immuno-gold nanoparticle complexes for antigen detection. *J. Colloid Interface Sci.*, **471**, 127-35 (2016).

- [16] Xu W., Qian J., Hou G., Wang Y., Wang J., Sun T., Ji L., Suo A., Yao Y., A dual-targeted hyaluronic acid-gold nanorod platform with triple-stimuli responsiveness for photodynamic/photothermal therapy of breast cancer. *Acta Biomater.*, **83**, 400-13 (2019).
- [17] Lin X., O'Reilly Beringhs A., Lu X., Applications of nanoparticle-antibody conjugates in immunoassays and tumor imaging, *AAPS J.*, **23**, 43 (2021).
- [18] Ariga K., Ahn E., Park M., Kim B.S., Layer-by-layer assembly: Recent progress from layered assemblies to layered nanoarchitectonics, *Chem. Asian J.*, **14**, 2553-66 (2019).
- [19] Polomska A., Leroux J.C., Brambilla D., Layer-by-layer coating of solid drug cores: A versatile method to improve stability, control release and tune surface properties, *Macromol. Biosci.*, **17**, 1600228 (2017).
- [20] Campbell J., Vikulina A.S., Layer-by-layer assemblies of biopolymers: Build-up, mechanical stability and molecular dynamics, *Polymers (Basel)*, **12**, 1949 (2020).
- [21] Kircheis R., Wightman L., Wagner E., Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **53**, 341-58 (2001).
- [22] Kurosaki T., Kitahara T., Fumoto S., Nishida K., Nakamura J., Niidome T., Kodama Y., Nakagawa H., To H., Sasaki H., Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and γ -polyglutamic acid for gene delivery systems. *Biomaterials*, **30**, 2846-53 (2009).
- [23] Qian Y., Liang X., Yang J., Zhao C., Nie W., Liu L., Yi T., Jiang Y., Geng J., Zhao X., Wei X., Hyaluronan reduces cationic liposome-induced toxicity and enhances the antitumor effect of targeted gene delivery in mice. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **10**, 32006-16 (2018).
- [24] Xiong K., Qi M., Stoeger T., Zhang J., Chen S., The role of tumor-associated macrophages and soluble mediators in pulmonary metastatic melanoma, *Front. Immunol.*, **13**, 1000927 (2022).
- [25] Zhang K.S., Pelleg T., Campbell S., Rubio C., Loschner A.L., Ie S., Pulmonary metastatic melanoma: Current state of diagnostic imaging and treatments, *Melanoma Manag.*, **8**, MMT58 (2021).
- [26] O'Neill C.H., Scoggins C.R., Melanoma, *J. Surg. Oncol.*, **120**, 873-81 (2019).
- [27] Shcharbin D., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., Ziemba B., Dzmitruk V., Halets I., Loznikova S., Shcharbina N., Milowska K., Ionov M., Shakhbazau A., Bryszewska M., How to study dendrimers and dendriplexes III. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity in vivo, *J. Control. Release*, **181**, 40-52 (2014).
- [28] Sano K., Iwamiya Y., Kurosaki T., Ogawa M., Magata Y., Sasaki H., Ohsima T., Maeda M., Mukai T., Radiolabeled γ -polyglutamic acid complex as a nano-platform for sentinel lymph node imaging. *J. Control. Release*, **194**, 310-5 (2014).
- [29] Vaidyanathan G. and Zalutsky M.R., Preparation of *N*-succinimidyl 3-[*I]iodobenzoate:

- an agent for the indirect radioiodination of proteins. *Nat. Protoc.*, **1**, 707-13 (2006).
- [30] Nichol C.A., Yang D., Humphrey W., Ilgan S., Tansey W., Higuchi T., Zarenzeyrzi F., Wallace S., Podoloff D.A., Biodistribution and imaging of polyethyleneimine-A gene delivery agent. *Drug Deliv.*, **6**, 187-94 (1999).
 - [31] Kurosaki T., Kitahara T., Kawakami S., Higuchi Y., Yamaguchi A., Nakagawa H., Kodama Y., Hamamoto T., Hashida M., Sasaki H., γ -Polyglutamic acid-coated vectors for effective and safe gene therapy. *J. Control. Release*, **142**, 404-10 (2010).
 - [32] Germano G., Chua T., Kiat H., Areeda J. S., Berman D. S., A quantitative phantom analysis of artifacts due to hepatic activity in technetium-99m myocardial perfusion SPECT studies. *J. Nucl. Med.*, **35**, 356-9 (1994).
 - [33] Naor D., Nedvetzki S., Golan I., Melnik L., Faitelson Y., CD44 in cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **39**, 527-79 (2002).
 - [34] Kim J.H., Moon M.J., Kim D.Y., Heo S.H., Jeong Y.Y., Hyaluronic acid-based nanomaterials for cancer therapy. *Polymers*, **10**, 1133, (2018).
 - [35] Bourguignon L.Y.W., Zhu H., Shao L., Chen Y.W., CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J. Biol. Chem.*, **275**, 1829-38 (2000).
 - [36] Nagano O. and Saya H., Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci.*, **95**, 930-5 (2004).
 - [37] Mesrati H.M., Syafruddin S.E., Mohtar M.A., Syahir A., CD44: A multifunctional mediator of cancer progression. *Biomolecules*, **11**, 1850 (2021).
 - [38] Huang X., Li D., Li T., Zhao B.O., Chen X., Prognostic value of the expression of phosphatase and tensin homolog and CD44 in elderly patients with refractory acute myeloid leukemia. *Oncol. Lett.*, **10**, 64 (2015).
 - [39] Liang Y., Wang Y., Wang L., Liang Z., Li D., Xu X., Chen Y., Yang X., Zhang H., Niu H., Self-crosslinkable chitosan-hyaluronic acid dialdehyde nanoparticles for CD44-targeted siRNA delivery to treat bladder cancer. *Bioact. Mater.*, **6**, 433-46 (2021).
 - [40] Qhattal H.S.S., Liu X., Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes. *Mol. Pharm.*, **8**, 1233-46 (2011).
 - [41] Lee T., Lim E.K., Lee J., Kang B., Choi J., Park H. S., Suh J.S., Huh Y.M., Haam S., Efficient CD44-targeted magnetic resonanceimaging (MRI) of breast cancer cells using hyaluronic acid (HA)-modified MnFe₂O₄ nanocrystals. *Nanoscale Res. Lett.*, **8**, 149 (2013).
 - [42] Banerji S., Wright A.J., Noble M., Mahoney D.J., Campbell L.D., Day A.J., Jackson D.G., Structures of the CD44–hyaluronan complex provide insight into a fundamental

- carbohydrate-protein interaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 234-9 (2007).
- [43] Bhattacharya D.S., Svehkarev D., Soucek J. J., Hill T. K, Tatlor M.A., Natarajan A., Mohs A. M., Impact of structurally modifying hyaluronic acid on CD44 interaction. *J. Mater. Chem. B.*, **5**, 8183-92 (2017).
 - [44] Li W., Yi X., Liu X., Zhang Z., Fu Y., Gong T., Hyaluronic acid ion-pairing nanoparticles for targeted tumor therapy. *J. Control. Release.*, **225**, 170-82 (2016).
 - [45] Huang X., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed M.A., Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2115-20 (2006).
 - [46] Khan N.U., Lin J., Younas M.R., Liu X., Shen L., Synthesis of gold nanorods and their performance in the field of cancer cell imaging and photothermal therapy. *Cancer Nano.*, **12**, 20 (2021).
 - [47] Choi W. I., Sahu A., Kim Y.H., Tae G., Photothermal cancer therapy and imaging based on gold nanorods. *Ann. Biomed. Eng.*, **40**, 534-46 (2012).
 - [48] Zhou J., Cao Z., Panwar N., Hu R., Wang X., Qu J., Tjin S.C., Xu G., Yong K.T., Functionalized gold nanorods for nanomedicine: Past, present and future, *Coord. Chem. Rev.*, **352**, 15-66 (2017).
 - [49] Sano K., Miki M., Tanaka T., Munemura M., Munekane M., Yamasaki T., Mukai T., Electrostatically self-assembled gold nanorods with chondroitin sulfate for targeted photothermal therapy for melanoma. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **35**, 102402 (2021).
 - [50] Wang Y., Quinsaat J.E.Q., Ono T., Maeki M., Tokeshi M., Isono T., Tajima K., Satoh T., Sato S.I., Miura Y., Yamamoto T., Enhanced dispersion stability of gold nanoparticles by the physisorption of cyclic poly(ethylene glycol). *Nat. Commun.*, **11**, 6089 (2020).
 - [51] Boisselier E., Astruc D., Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 1759-82 (2009).
 - [52] Sun M., Liu F., Zhu Y., Wang W., Hu J., Liu J., Dai Z., Wang K., Wei Y., Bai J., Gao W., Salt-induced aggregation of gold nanoparticles for photoacoustic imaging and photothermal therapy of cancer. *Nanoscale*, **8**, 4452-7 (2016).
 - [53] Boehnke N., Dolph K.J., Juarez V.M., Lanoha J.M., Hammond P.T., Electrostatic conjugation of nanoparticle surfaces with functional peptide motifs. *Bioconjugate Chem.*, **31**, 2211-9 (2020).
 - [54] Gole A., Orendorff C.J., Murphy C.J., Immobilization of gold nanorods onto acid-terminated self-assembled monolayers via electrostatic interactions. *Langmuir*, **20**, 7117-22 (2004).
 - [55] Qiu Y., Liu Y., Wang L., Xu L., Bai R., Ji Y., Wu X., Zhao Y., Li Y., Chen C., Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, **31**,

7606-19 (2010).

- [56] Bhattacharya D.S., Svehkarev D., Bapat A., Patil P., Hollingsworth M.A., Mohs A.M., Sulfation modulates the targeting properties of hyaluronic acid to P-selectin and CD44. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **6**, 3585-98 (2020).
- [57] Lim D.K., Wylie R.G., Langer R., Kohane D.S., Selective binding of C-6 OH sulfated hyaluronic acid to the angiogenic isoform of VEGF165. *Biomaterials*, **77**, 130-8 (2016).
- [58] Shao X., Agarwal A., Rajian J.R., Kotov N.A., Wang X., Synthesis and bioevaluation of ¹²⁵I-labeled gold nanorods. *Nanotechnology*, **22**, 135102 (2011).
- [59] Agarwal A., Shao X., Rajian J.R., Zhang H., Chamberland D.L., Kotov N.A., Wang X., Dual-mode imaging with radiolabeled gold nanorods. *J. Biomed. Opt.*, **16**, 051307 (2011).
- [60] Shao X., Agarwal A., Rajian J.R., Kotov N.A., Wang X., Photoacoustic and nuclear imaging of [¹²⁵I]-labeled gold nanorod agent. *SPIE BiOS*, **7899**, 789924 (2011).
- [61] Choi K.Y., Min K.H., Na J.H., Choi K., Kim K., Park J.H., Kwon I.C., Jeong S.Y., Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: Synthesis, characterization, and in vivo biodistribution. *J. Mater. Chem.*, **19**, 4102-7 (2009).
- [62] Yang Y., Zhao Y., Lan J., Kang Y., Zhang T., Ding Y., Zhang X., Lu L., Reduction-sensitive CD44 receptor-targeted hyaluronic acid derivative micelles for doxorubicin delivery. *Int. J. Nanomedicine*, **13**, 4361-78 (2018).
- [63] Svanovsky E., Velebny V., Laznikova A., Laznicek M., The effect of molecular weight on the biodistribution of hyaluronic acid. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **33**, 149-57 (2008).