

博士論文

リガンド搭載ナノ製剤による

難治性頭頸部扁平上皮癌に対する治療効果に関する研究

宮野 一樹

博士論文

論文題目 リガンド搭載ナノ製剤による難治性頭頸部
扁平上皮癌に対する治療効果に関する研究

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻
感覚・運動機能医学講座耳鼻咽喉科学分野

指導教員：山嵜 達也 教授

氏名：宮野 一樹

要旨

近年、頭頸部扁平上皮癌の治療において、放射線化学療法を選択する機会が多くなっているが、本研究ではシスプラチンミセル (CDDP/m)、cRGD 搭載シスプラチンミセル (cRGD-CDDP/m) の開発により、ヒト舌癌マウスモデルにおける舌腫瘍、転移リンパ節への効率的な薬剤送達を試みた。cRGD-CDDP/m 投与時では、薬剤投与早期における舌腫瘍、転移リンパ節への効率的な薬剤集積が認められ、優れた抗腫瘍効果を発揮した。これらの結果から、腫瘍ならびに腫瘍新生血管に発現する $\alpha v \beta 3$ インテグリン、 $\alpha v \beta 5$ インテグリンを能動的に標的可能な cRGD リガンドの高分子ミセルへの応用が効果的である事が示唆された。

目次

1. 序文	6
1.1. 頭頸部扁平上皮癌治療の現状	6
1.2. ドラッグデリバリーシステム	8
1.3. 高分子ミセル型ドラッグデリバリーシステム	10
1.4. アクティブターゲティング型ドラッグデリバリーシステム	13
1.5. cRGD 搭載抗がん剤内包高分子ミセル	14
1.6. がん幹細胞	16
2. 本論文の目的	18
3. 方法	20
3.1. 材料	20
3.2. 細胞と実験動物	22
3.3. CDDP 内包高分子ミセル (CDDP/m) の調製	22
3.4. cRGD 搭載 CDDP 内包高分子ミセル (cRGD-CDDP/m) の調製	23
3.5. CDDP/m、cRGD-CDDP/m の安定性、及び薬剤放出能評価	25

3.6. 頭頸部扁平上皮癌細胞株 (SAS-L1-Luc、HSC-2) におけるインテグリン発現解析.....	26
3.7. 頭頸部扁平上皮癌細胞株 (SAS-L1-Luc、HSC-2) におけるがん幹細胞発現解析	27
3.8. 平面培養系での SAS-L1-Luc 細胞株に対する細胞増殖抑制試験	28
3.9. 三次元培養系での SAS-L1-Luc 細胞株に対する細胞増殖抑制試験	29
3.10. 平面培養系での SAS-L1-Luc 細胞株における CD44v9 陽性細胞に対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m の効果.....	30
3.11. リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデルにおける CDDP/m、cRGD-CDDP/m の血中滞留性及び薬剤集積性	31
3.12. リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデルに対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果	32
3.13. ヒト口腔癌 (HSC-2) 同所移植マウスモデル (リンパ節転移 (-)) に対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果	33
3.14. ヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) リンパ節転移マウスモデル (同所舌腫瘍切除	

後) に対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果	33
3.15. リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデル の同所舌腫瘍、転移リンパ節、正常リンパ節組織におけるインテグリンの発 現解析	34
3.16. リアルタイム生体内共焦点レーザー顕微鏡を用いた同所舌腫瘍、転移 リンパ節における CDDP/m、cRGD-CDDP/m の挙動解析	36
4. 結果	38
4.1. CDDP/m、cRGD-CDDP/m の安定性、及び薬剤放出能評価	38
4.2. 頭頸部扁平上皮癌細胞株 (SAS-L1-Luc、HSC-2) におけるインテグリン ($\alpha\beta3$ 、 $\alpha\beta5$) の発現解析	39
4.3. 頭頸部扁平上皮癌細胞株 (SAS-L1-Luc、HSC-2) における CD44v9 の 発現と $\alpha\beta5$ インテグリン発現との相関関係	41
4.4. 平面培養系での SAS-L1-Luc 細胞株に対する細胞増殖抑制試験	43
4.5. 三次元培養系での SAS-L1-Luc 細胞株に対する細胞増殖抑制試験	44
4.6. 平面培養系での SAS-L1-Luc 細胞株中の CD44v9 陽性細胞に対する	

CDDP/m、cRGD-CDDP/m の効果	45
4.7. リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデル における CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m の血中滞留性及び薬剤集積性 .	47
4.8. リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデル における CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果	52
4.9. ヒト口腔癌 (HSC-2) 同所移植マウスモデル (リンパ節転移 (-)) に おける CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果	54
4.10. ヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) リンパ節転移マウスモデル (同所舌腫瘍切除 後) における CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果	55
4.11. リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデル の同所舌腫瘍、転移リンパ節、正常リンパ節組織におけるインテグリンの発 現解析	58
4.12. リアルタイム生体内共焦点顕微鏡を用いた同所舌腫瘍、転移リンパ節 における CDDP/m、cRGD-CDDP/m の挙動解析	64
5. 考察	70

6. 総括	79
7. 掲載論文	81
8. 引用文献	82
9. 謝辞	99

1. 序文

1.1. 頭頸部扁平上皮癌治療の現状

癌は全世界において主要死因の一つであり、人口増加、高齢化に伴い、今後
も患者数が増加する事が予想される[1,2]。その中でも頭頸部扁平上皮癌は、初
診時における頸部リンパ節転移症例が多く、そのコントロールが困難でかつ予
後に影響してくる事から難治性癌として知られており、手術療法、放射線療法、
化学療法を組み合わせた集学的治療を施行したとしても、治療後の5年生存率
は50%台にとどまっている[3]。また、頭頸部扁平上皮癌は構音・発声・咀嚼・
嚥下といった機能を担う器官に発生するために、その治療にあたっては生命予
後と機能温存の両側面を達成する事が求められる[4]。例えば、これまで喉頭癌、
下咽頭癌においては、生存率を優先するために喉頭機能を犠牲にした手術療法
が選択される機会が多かったが、近年は放射線化学療法の治療成績が向上した
ため、機能温存、転移制御の観点から放射線化学療法が選択される事が増えて
いる[4-10]。また化学療法は、手術や放射線治療の適応のない再発・遠隔転移症
例群に対して、生存期間の延長と quality of life (QOL) の改善を認める事から
同症例群の標準治療となっている[11, 12]。しかし、現在（放射線）化学療法に
使用されているシスプラチン (CDDP) は、抗腫瘍効果が高い薬剤ではあるが、

その反面骨髄抑制、腎機能障害などの副作用が問題となっており(表1)[10, 13]、また放射線化学療法施行中の急性期有害事象である治療部位の粘膜炎、疼痛による摂食障害により、治療の完遂が出来ない場合も少なくない[14]。さらに、放射線化学療法施行後の晩期有害事象である嚥下障害、口腔咽頭粘膜の乾燥に苦しむ事例を、実際の臨床現場でもしばしば経験する[15, 16]。この事から、頭頸部扁平上皮癌治療においては、合併症が少なく、治療効果の高い治療法の開発が求められている。

表1. 頭頸部癌治療薬の毒性 (◎：高頻度、○：中頻度)

薬剤名	腎毒性	血液毒性	嘔吐	下痢	粘膜炎	肺毒性	アレルギー反応	聴力障害
シスプラチン (白金製剤)	◎	○	◎				○	○
5-FU (代謝拮抗薬)			○	◎	○	○		
ドセタキセル (タキサン系)		◎	○		○	○	○	
パクリタキセル (タキサン系)		◎	○		○	○	◎	
セツキシマブ (分子標的薬)					○	○	○	

1.2. ドラッグデリバリーシステム

近年、ナノテクノロジーを利用したドラッグデリバリーシステム (drug delivery system、DDS) の開発研究が医工連携を基盤として盛んに行われている。

DDS とは、薬剤の体内分布を量的、時間的、空間的にコントロールし、標的臓器での薬効を高める一方で、副作用を低減させるシステム (技術) の事で、特に毒性の高い抗がん剤での応用、新規創薬開発が行われている。現在本邦において臨床応用されている DDS 製剤としては、化学療法後に増悪した卵巣癌に対するドキシルビシン内包リポソーム (ドキシル)、C 型慢性肝炎、B 型慢性活動性肝炎に対する PEG インターフェロンなどがあり、いずれも治療の中核を担っている。前述の如く、頭頸部扁平上皮癌の key drug として用いられる CDDP は、効果が高い薬剤である反面、骨髄抑制、腎機能障害、食欲不振 (嘔吐) などの副作用が臨床上的問題となっており (表 1)、感染防御対策、十分な補液、状況によっては胃瘻増設などの様々な対処を要するため、療法中の入院での厳重管理を余儀なくされる。そこで、DDS を抗がん剤へと応用する事により、病巣部であるがん細胞のみに選択的、効果的に薬剤を送達し、正常細胞へダメージを与える事なくがん治療が可能になる事が期待される。その結果、骨髄抑制、腎機能障害、食欲不振などの副作用から解放され、更に入院での厳重管理を必要

1. 序文

とせず、外来での DDS 抗がん剤治療が可能となる時代が到来する事も考えられる。DDS 抗がん剤治療は、頭頸部扁平上皮癌患者の QOL の改善に寄与するだけでなく、働きながら外来にて治療可能になる事で、医療経済、労働生産性の面においても多大なメリットがあると期待されている。

1.3. 高分子ミセル型ドラッグデリバリーシステム

ポリエチレングリコール (PEG) とポリアミノ酸のブロック共重合体を用いて、それらと薬剤が水中で自己集合する事により形成される高分子ミセルは、1980年代後半から東京大学大学院工学系研究科片岡研究室にて研究、開発が進められてきた[17]。これらの高分子ミセルは、疎水性の中核 (コア) に薬剤 (抗がん剤) を内包し、外殻 (シェル) は親水性の PEG で覆われているため、免疫系の異物認識機構を回避する事ができ、高い安定性により優れた血中滞留性が認められている (図 1)。また、数十 nm サイズの高分子ミセルは、腫瘍組織の新生血管の隙間構造、血管透過性を利用した **enhanced permeability and retention (EPR) 効果**[18]を介してがん組織へと効率的に集積する事が知られており、がん組織へと到達した高分子ミセルは、組織内の環境変化に応答して、内包された薬剤を制御放出する事が可能となる事から、**DDS 製剤**として理想的な機能を有している (図 2) [19, 20]。さらに、高分子ミセルのサイズを制御する事も可能であり[21, 22]、様々な担癌マウスモデルを用いたサイズ効果の検証においては、がん組織へのミセルの集積性や浸透性の観点から、ミセルサイズを 30nm 程度へ調節すべきである事が確かめられている[22]。



図1. 高分子ミセル（シスプラチンミセル：CDDP/m）の模式図

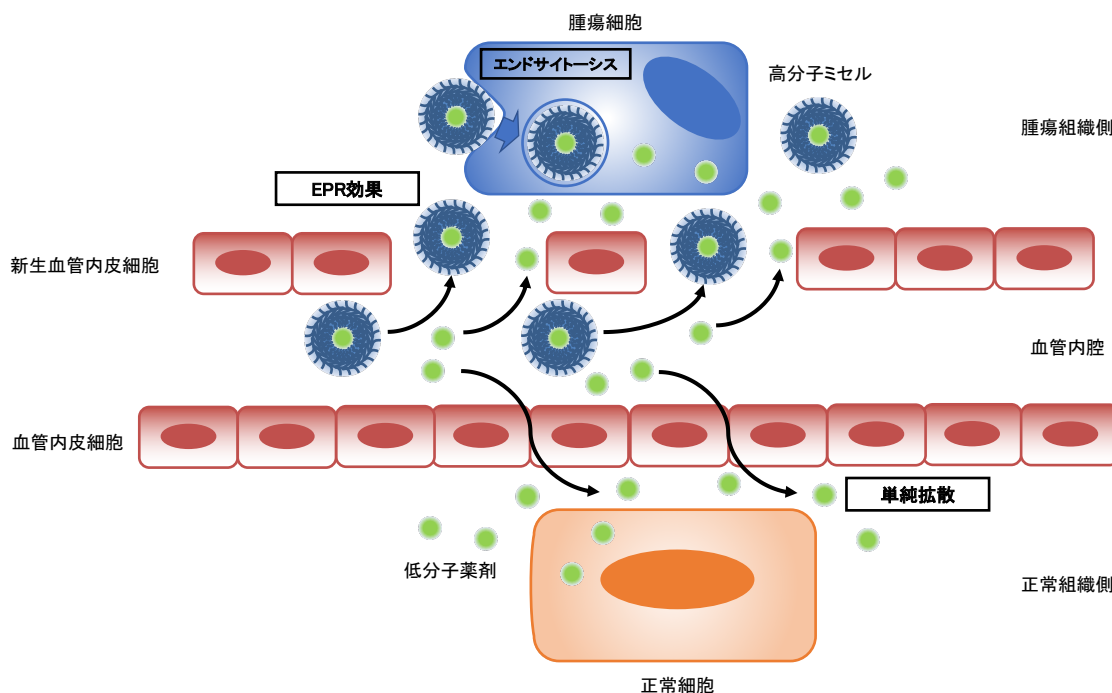


図2. 高分子ミセルの全身投与から標的部局までの薬剤送達経路模式図

1. 序文

現在、シスプラチン内包高分子ミセル（CDDP/m）、パクリタキセル内包高分子ミセルが第Ⅲ相臨床試験、ダハプラチン（オキサリプラチン活性本体）内包高分子ミセル、エピルビシンミセルが第Ⅰ相臨床試験まで進んでおり、早期の臨床応用が期待されている（表2）。

表2. 臨床試験中の抗がん剤内包高分子ミセル

名称	ミセル名称	対象癌腫	臨床試験
NC-6004	シスプラチンミセル	膵癌	第Ⅲ相
NK105	パクリタキセルミセル	乳癌	第Ⅲ相
NC-4016	ダハプラチンミセル	固形癌	第Ⅰ相
NC-6300	エピルビシンミセル	軟部肉腫	第Ⅰ相

1.4. アクティブターゲティング型ドラッグデリバリーシステム

前述の如く、腫瘍組織の新生血管の隙間構造、血管透過性など、その組織が自然な状態で備えている機能を受身に利用するパッシブターゲティング (passive targeting) は、高分子ミセルの粒子径を最適化する事で、EPR 効果を介してがん組織へと特異的に集積するという特徴を有している。一方で、標的とする細胞表面に高い親和性を示すリガンド分子を高分子ミセル表層に搭載するターゲティング手法は、アクティブターゲティング (active targeting) と呼ばれており、高分子ミセルの標的指向性をさらに向上させ、治療効果を改善させる可能性を有している。高分子ミセル表層に搭載するリガンド分子として、腫瘍細胞や腫瘍新生血管に過剰発現している $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ インテグリンに特異的に結合するアルギニン-グリシン-アスパラギン酸から構成される環状ペプチド (cRGD ペプチド) [23-25]、腫瘍細胞に過剰発現しているシアル酸に結合するフェニルボロン酸 (phenylboronic acid, PBA)、腫瘍細胞膜上、腫瘍血管、腫瘍間質に発現している組織因子 (tissue factor) に特異的に結合する抗組織因子抗体 (anti-tissue factor antibody) が挙げられ、抗がん剤内包高分子ミセルの効果を高めたという研究報告がされている[26-28]。

1.5. cRGD 搭載抗がん剤内包高分子ミセル

上述のアクティブターゲティング型ドラッグデリバリーシステムを利用したミセル製剤の中で、腫瘍新生血管に発現している $\alpha\beta3$ インテグリン、腫瘍細胞上に高発現している $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ インテグリンに結合する cRGD ペプチドをミセル表面へと搭載した cRGD 搭載抗がん剤内包高分子ミセルは、腫瘍細胞の標的化に有用であり、CDDP を key drug として使用している頭頸部癌領域においても、その効果が期待される薬剤の一つである。これまで我々の研究室においては、ダハプラチン（オキサリプラチン活性本体）内包高分子ミセル（DACHPt/m）の表層 PEG 末端に cRGD ペプチドを搭載したアクティブターゲティング型のミセル製剤（cRGD-DACHPt/m）を構築しており、悪性度の高い脳腫瘍である膠芽腫に対する高い抗腫瘍効果を確認している。また、cRGD ペプチドの DACHPt/m への導入率を検討した結果、導入率が 20~40% の cRGD-DACHPt/m は、導入率 100% の cRGD-DACHPt/m に比し、担癌マウスにおける尾静脈投与後の腫瘍集積性に優れていたと報告しており、逆に cRGD ペプチドの導入率を上げすぎる事で、 $\alpha\beta3$ インテグリンが発現している肝臓への薬剤集積が高くなり、腫瘍への薬剤集積性が低下してしまう点に関しても言及している[26]。

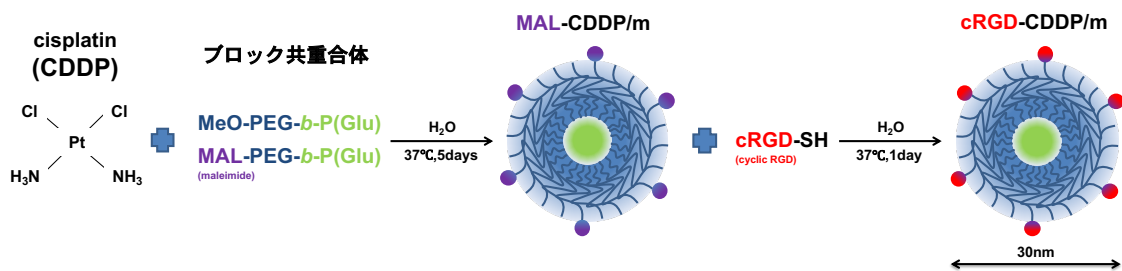


図3. アクティブターゲティング型高分子ミセル（cRGD 搭載シスプラチンミセル：cRGD-CDDP/m）の模式図

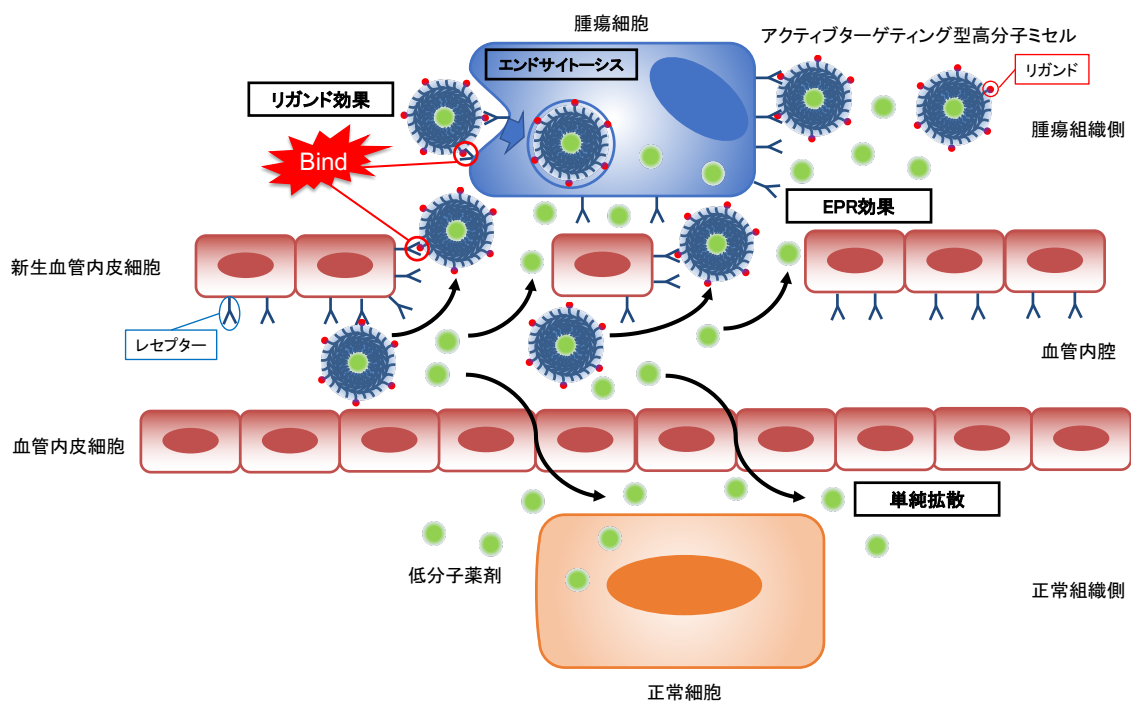


図4. アクティブターゲティング型高分子ミセルの全身投与から標的部までの薬剤送達経路模式図

1.6. がん幹細胞

がん組織の中には、少数ながら自己複製能と多分化能を有するがん幹細胞が存在し、がんの転移、再発、耐性獲得に寄与していると考えられている。非がん幹細胞は放射線化学療法にて駆逐できる可能性が高い一方で、がん幹細胞はがんニッチの制御を受け細胞増殖の静止期にあり、現行の放射線化学療法に対し耐性を示す事から（図5）、がん幹細胞をターゲットとした新規薬剤、治療法の開発が盛んに行われている[29-32]。

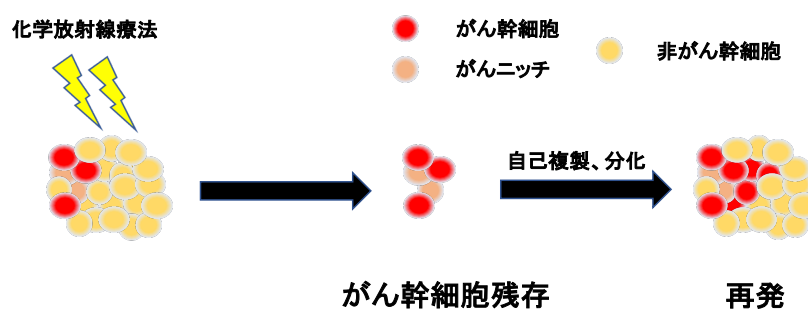


図5. がん幹細胞の治療抵抗性と再発転移様式

頭頸部扁平上皮癌治療においても、しばしば再発、転移が治療上の問題となる事から、がん幹細胞の存在、寄与が考えられており、それらをターゲットとした新規薬剤の開発、治療法の確立が期待されている。頭頸部扁平上皮癌のがん

幹細胞マーカーとしては CD44 が報告されているが[33, 34]、その中でも CD44 のバリエーションアイソフォーム (CD44v) の発現が局所進展、転移、再発、薬剤抵抗性、予後に関連しているという報告がみられ[35-38]、この CD44v をターゲットとした治療法が検討されている[39, 40]。この CD44v は、細胞膜上でシスチントランスポーターのサブユニットである xCT と結合する事でシスチンの取り込みを活性化させ、グルタチオンの生成を促進する事で活性酸素の蓄積に抑制的に作用しており、この事ががん幹細胞の特性の一つである酸化ストレス抵抗性の獲得に関与していると考えられている (図 6) [38]。そこで、がん幹細胞のみならず、非がん幹細胞を含めた双方に対する効果的な新規薬剤の開発により、転移、再発、薬剤耐性などの治療上の問題が克服される事が期待されている。

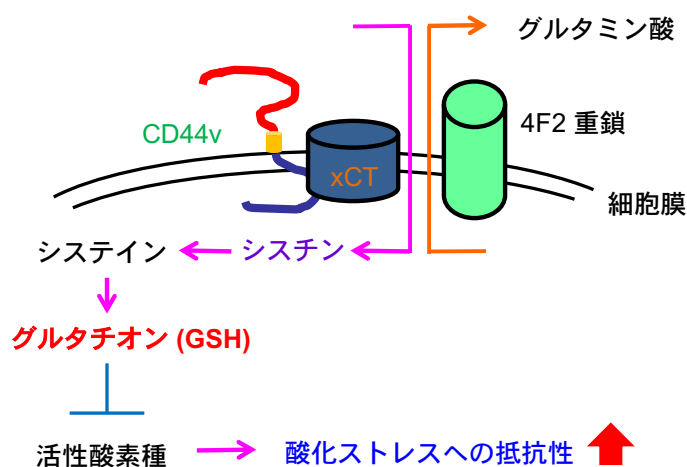


図6. CD44v における酸化ストレス抵抗性獲得機序の模式図

2. 本論文の目的

申請者の所属する研究室では、ナノテクノロジーを応用したドラッグデリバリーシステムの開発を行っている。これまでの研究で、CDDP をミセルに内包（シスプラチンミセル：CDDP/m）することによって、ヒト舌癌同所移植マウスモデルにおける効率的な薬剤送達と高い抗腫瘍効果を確認している[41]。この CDDP/m の有効性は、腫瘍組織の新生血管の隙間構造、血管透過性を利用した EPR 効果に起因しており、ミセルの粒子径を最適化する事で、高い腫瘍組織浸透性を実現している[42]。この CDDP/m は、膵臓癌において国内外で第Ⅲ相臨床試験、頭頸部癌においても海外で第Ⅰ相臨床試験が進行中であり、近い将来、日常診療においての使用が期待されている。

本研究では、CDDP/m をさらに改良し、がん幹細胞への標的指向性を付与したミセルの開発を目的とする。従来の CDDP/m は、EPR 効果を利用したパッシブターゲティング（受動的ターゲティング）に依存するが、標的指向性を付与したアクティブターゲティング（能動的ターゲティング）型のミセルは、さらに効果的な抗腫瘍効果を期待できる。 $\alpha\text{v}\beta 3/\alpha\text{v}\beta 5$ インテグリンは、腫瘍細胞や新生血管において過剰発現しているため、腫瘍、腫瘍新生血管を標的とするには好都合である。よって $\alpha\text{v}\beta 3/\alpha\text{v}\beta 5$ インテグリンと親和性の高い環状

2. 本論文の目的

型 RGD ペプチド (cRGD) をリガンドとして用いた「cRGD 搭載シスプラチンミセル」(cRGD-CDDP/m) を新規合成する。このアクティブターゲティング型の cRGD-CDDP/m が、がん幹細胞マーカーである CD44v に対し効果的に作用するか、また、CD44v が関連している転移癌に対して優れた抗腫瘍効果を示すかについて解析検討をし、DDS による転移、再発、耐性癌の克服を目指す。

3. 方法

3.1. 材料

cis-ジアンミン白金(II)ジクロリド、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-high glucose 培地は、シグマアルドリッチ（アメリカ合衆国、ミズーリ州、セントルイス）より購入した。AlexaFluor 555-succinimidyl ester、Alexa Fluor 647-succinimidyl ester、Minimum Essential Medium (MEM)培地は、サーモフィッシュヤーサイエンティフィック株式会社（アメリカ合衆国、マサチューセッツ州、ウォルサム）より購入した。cyclo[RGDfK(CX-)] (cRGD ペプチド, X = 6-アミノカプロン酸) は、ペプチド研究所（日本、大阪府）より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は、大日本住友製薬株式会社（日本、大阪府）より購入した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) は、和光純薬工業株式会社（日本、東京都）より購入した。Cell Counting Kit-8 は、同仁化学研究所（日本、熊本県）より購入した。CellTiter-Glo 3D cell Viability Assay、ルシフェリンは、プロメガ（アメリカ合衆国、ウィスコンシン州、マディソン）より購入した。Accutase は、イノベーティブセルテクノロジーズ（アメリカ合衆国、カリフォルニア州、サンディエゴ）より購入した。マウス抗ヒト $\alpha\beta 3$ インテグリン抗体、マウス抗ヒト $\alpha\beta 5$ インテグリン抗体は、R&D システムズ社（アメリカ合衆国、ミネソタ州、ミネアポ

3. 方法

リス) より購入した。ウサギ抗マウス $\beta 3$ インテグリン抗体は、Cell Signaling Technology 社 (アメリカ合衆国、マサチューセッツ州、ダンバース) より購入した。ラット抗マウス $\alpha 5\beta 1$ インテグリン抗体は、Merck 社 (ドイツ、ダルムシュタット) より購入した。ラット抗ヒト CD44v9 抗体は、コスモ・バイオ株式会社 (日本、東京都) より購入した。Alexa488 標識ロバ抗ラット IgG (H&L) 抗体、Alexa647 標識ヤギ抗マウス IgG (H&L) 抗体、Alexa488 標識ロバ抗ウサギ IgG (H&L) 抗体、ラット IgG2a アイソタイプコントロール抗体[RTK2758]、マウス IgG1 アイソタイプコントロール抗体[15-6E10A7]は、アブカム社 (イギリス、ケンブリッジ) より購入した。ビオチン標識ウサギ抗ラット IgG 抗体、VECTASTAIN Elite ABC Reagent は、Vector laboratories 社 (アメリカ合衆国、カリフォルニア州、バーリンゲーム) より購入した。ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体は、ニチレイバイオサイエンス株式会社 (日本、東京都) より購入した。TSA Cyanine 3 System は、パーキンエルマー (アメリカ合衆国、マサチューセッツ州、ウォルサム) より購入した。抗 CD31 抗体は、Santa Cruz Biotechnology 社 (アメリカ合衆国、カリフォルニア州、サンタクルーズ) より購入した。イソフルラン吸入麻酔液は、ファイザー株式会社 (アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ニューヨーク) より購入した。Matrigel Matrix は、BD 社 (ア

アメリカ合衆国、ニュージャージー州、フランクリンレイクス) より購入した。

3.2. 細胞と実験動物

リンパ節高転移能を有するヒト舌癌細胞株 (SAS-L1)、ならびにその GFP 発現株 (SAS-L1-GFP) は、昭和大学歯学部口腔外科学講座より譲り受けた。SAS-L1 のルシフェラーゼ発現株 (SAS-L1-Luc) は、東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻分子病理学分野 (宮園研究室) より譲り受けた。ヒト口腔癌細胞株 (HSC-2) は、理化学研究所 (日本、茨城県) より購入した。BALB/c ノードマウス (メス、体重 18-20g、6 週齢) は、日本チャールズリバー (日本、神奈川県) より購入した。全ての動物実験は、東京大学動物実験実施規則に従って行われた。

3.3. CDDP 内包高分子ミセル (CDDP/m) の調製

cis-ジアンミン白金(II)ジクロリドを 70°C の純水に完全に溶解させ、0.22 μm フィルターを用いて精製し CDDP 溶液を得た。先行研究において報告された手法[22, 43, 44]により、ブロック共重合体ポリエチレングリコール-*b*-ポリグルタミン酸 (poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-glutamic acid): MeO-PEG-*b*-P(Glu)) (PEG

3. 方法

分子量($M_{n,PEG}$) = 12,000、P(Glu)重合度($DP_{P(Glu)}$) = 40) を合成し、得られた CDDP 溶液と混合し ([Glu]=5 mM, [CDDP]/[Glu] = 1.0)、37°Cにおいて 120 時間反応させ、その後、純水による 24 時間透析 (Spectra/Pro 6 透析膜、MWCO = 6,000-8,000) と限外濾過 (MWCO = 30,000) による精製を施行し、CDDP/m を調製した。調製された CDDP/m の粒子径分布、ゼータ電位を、Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments、イギリス、マルバーン) による動的光散乱法にて測定した。CDDP/m 溶液中の白金量は、Agilent 7700x ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) (Agilent Technologies、アメリカ合衆国、カリフォルニア州、サンタクララ) による誘導結合プラズマ質量分析法にて測定した。Alexa647 で標識された CDDP/m の調整には、MeO-PEG-*b*-P(Glu) の代わりに MeO-PEG-*b*-P(Glu)-Alexa647 を用い、上記手法を施行する事により CDDP/m-Alexa647 を調製した。調製された CDDP/m-Alexa647 の蛍光強度は、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific、アメリカ合衆国、マサチューセッツ州、ウォルサム) を用いて測定した。

3.4. cRGD 搭載 CDDP 内包高分子ミセル (cRGD-CDDP/m) の調製

ブロック共重合体マレイミドポリエチレングリコール-*b*-ポリグルタミン酸

(maleimide-conjugated poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-glutamic acid): Mal-PEG-*b*-P(Glu)) (PEG 分子量($M_{n,PEG}$) = 12,000、P(Glu)重合度($DP_{P(Glu)}$) = 40) を、先行研究において報告された手法[26, 45]にて合成した。前述の手法にて精製した CDDP 溶液を、ブロック共重合体 MeO-PEG-*b*-P(Glu)とブロック共重合体 Mal-PEG-*b*-P(Glu) のモル比 3:1 の混合物に加え ([Glu]=5 mM, [CDDP]/[Glu] = 1.0, [MeO-PEG-*b*-P(Glu)]/[Mal-PEG-*b*-P(Glu)] = 1.0)、37°Cにおいて 120 時間反応させ、その後、純水による 24 時間透析 (Spectra/Pro 6 透析膜、MWCO = 6,000-8,000) と限外濾過 (MWCO = 30,000) による精製を施行し、Mal-CDDP/m を調製した。得られた Mal-CDDP/m 溶液に、cyclo[RGDfK(CX-)] (0.640 mM)を加え、37°Cにおいて 20 時間反応させ限外濾過 (MWCO = 30,000) による精製を施行し、cRGD-CDDP/m を調製した。ミセル表層への cRGD の導入率は 20%とした。先行研究において、¹H nuclear magnetic resonance (NMR) を用いてミセル表層への cRGD 導入率が 20%である事が確認されており[26, 46]、本研究においても同様の調整方法を用いて cRGD-CDDP/m を調整した。調製された cRGD-CDDP/m の粒子径分布、ゼータ電位を、Zetasizer Nano ZS90 による動的光散乱法にて測定し、cRGD-CDDP/m 溶液中の白金量は、Agilent 7700x ICP-MS による誘導結合プラズマ質量分析法にて測定した。Alexa555 で標識された cRGD-CDDP/m は、

MeO-PEG-*b*-P(Glu)の代わりに MeO-PEG-*b*-P(Glu)-Alexa555 を用い、上記手法を施行する事により cRGD-CDDP/m-Alexa555 を調製した。調製された cRGD-CDDP/m-Alexa555 の蛍光強度は、NanoDrop を用いて測定した。

3.5. CDDP/m、cRGD-CDDP/m の安定性、及び薬剤放出能評価

薬剤安定性については、0.5mg/ml の CDDP/m、或いは cRGD-CDDP/m 溶液 0.5ml と Buffer 溶液 (NaCl:300mM、PBS:20mM) 0.5ml との混合溶液をそれぞれマイクロチューブに注入し、37°Cの条件下でインキュベーションを施行する事で評価した。0、6、24、48 時間後に、マイクロチューブ内のそれぞれの溶液を 75 μ l ずつ採取し、CDDP/m、cRGD-CDDP/m の粒子径分布を、Zetasizer Nano ZS90 による動的光散乱法を用いて測定した。薬剤放出能については、0.5mg/ml の CDDP/m、或いは cRGD-CDDP/m 溶液 0.5ml と Buffer 溶液 (NaCl:300mM、PBS:20mM) 0.5ml との混合溶液をそれぞれ透析膜内へと注入し、ガラス瓶中に用意された 99ml 溶液 (NaCl:150mM、PBS:10mM) において、37°Cの条件下で透析 (Spectra/Pro 6 透析膜、MWCO = 6,000-8,000) を施行し評価した。0、6、24、48 時間後にそれぞれ、透析膜外のガラス瓶中の溶液を 1ml ずつ採取し、採取したサンプルに 90%硝酸を滴下し 180°Cにて処理を施行した。溶液を完全

に蒸発させた後に1%硝酸を加え再び溶液にし、ICP-MSにて分析する事により、透析膜外のPt量を測定した。それぞれの実験にて得られた測定値について、0、6、24、48時間におけるCDDP/m (n = 3) 群とcRGD-CDDP/m (n = 3) 群間の統計学的有意差をANOVA及びスチューデントのt検定を用いて検定し、薬剤安定性、及び薬剤放出能を評価した。

3.6. 頭頸部扁平上皮癌細胞株 (SAS-L1-Luc、HSC-2) におけるインテグリン発現解析

1.0 × 10⁶ cells/ml に調整した SAS-L1-Luc 細胞懸濁液 (DMEM-high glucose + 10% FBS + 100 U/ml penicillin G + 100 µg/ml streptomycin) 、 HSC-2 細胞懸濁液 (MEM media (NEAA, no glutamine) + 10% FBS) を、マイクロチューブに 500µl ずつ分注し、4°C、400g、3min にて遠心し、上澄みの培地 (DMEM-high glucose、MEM) を除去した。その後、0.1% Bovine Serum Albumin (BSA) + 0.1%NaN₃ + PBS 溶液を加え、再度 4°C、400g、3min にて遠心洗浄後、上澄み溶液を除去した。

1 次抗体として、マウス抗ヒト αvβ3 インテグリン抗体、或いはマウス抗ヒト αvβ5 インテグリン抗体のいずれかを 2µl ずつ各サンプルマイクロチューブに加え、また、アイソタイプコントロールとして、マウス IgG1 アイソタイプコン

3. 方法

トロール抗体 1 μ l をアイソタイプコントロールサンプルマイクロチューブに加え、それぞれを氷中にて 30 分間インキュベーションした。0.1%BSA + 0.1%NaN₃ + PBS 溶液を加え、再度 4°C、400g、3min にて遠心洗浄を 2 回施行し、2 次抗体として Alexa647 標識ヤギ抗マウス IgG (H&L) 抗体を 2 μ l ずつ全マイクロチューブに加え、氷中にて 30 分間インキュベーションした。0.1%BSA + 0.1%NaN₃ + PBS 溶液を 500 μ l ずつ全マイクロチューブに加え、4°C、300g、5min にて遠心洗浄を 3 回施行した。0.1%BSA + 2%FBS + PBS 溶液 10ml と 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 5 μ g を加え、DAPI 溶液 (0.5 μ g/ml) を調整し、全マイクロチューブに 1ml ずつ加えた。全マイクロチューブ内の溶液を 35 μ m セルストレーナーに通し不要な凝集細胞を除いた後で、BD LSRFortessa (BD、アメリカ合衆国、ニュージャージー州、フランクリンレイクス) を用いたフローサイトメトリーにて、 α v β 3、 α v β 5 インテグリンの発現解析を施行した。

3.7. 頭頸部扁平上皮癌細胞株 (SAS-L1-Luc、HSC-2) におけるがん幹細胞発現解析

CD44v の中でもそのアイソタイプである CD44v8-10 は、がん幹細胞において高頻度に発現しており [47]、転移や予後と関連するとの報告もある事から [48]、

3. 方法

SAS-L1-Luc、HSC-2 における CD44v9 の発現解析を施行した。3.5 の実験方法の如く、 1.0×10^6 cells/ml に調整した SAS-L1-Luc 細胞懸濁液 (DMEM-high glucose + 10% FBS + 100 U/ml penicillin G + 100 μ g/ml streptomycin)、HSC-2 細胞懸濁液 (MEM media (NEAA, no glutamine) + 10% FBS) を、マイクロチューブに 500 μ l ずつ分注し遠心洗浄後、1 次抗体として、ラット抗ヒト CD44v9 抗体を各サンプルマイクロチューブに 1 μ l ずつ加え、アイソタイプコントロールとして、ラット IgG2a アイソタイプコントロール抗体 1 μ l をアイソタイプコントロールサンプルマイクロチューブに加え、それぞれを氷中にて 45 分間インキュベーションした。0.1%BSA + 0.1%NaN₃ + PBS 溶液を加え、再度 4°C、400g、3min にて遠心洗浄を 2 回施行し、2 次抗体として Alexa488 標識ロバ抗ウサギ IgG (H&L) 抗体を 2 μ l ずつ全マイクロチューブに加え、氷中にて 30 分間インキュベーションした。その後、3.5 の実験方法の如く、遠心洗浄、DAPI 染色の後、BD LSRFortessa を用いたフローサイトメトリーにて CD44v9 の発現解析を施行した。

3.8. 平面培養系での SAS-L1-Luc 細胞株に対する細胞増殖抑制試験

2.0×10^5 cells の SAS-L1-Luc 細胞懸濁液 50 μ l を 96well マルチプレート各 well に播種し、37°C で 24 時間インキュベーションした。培地で 2 倍ずつ希釈

3. 方法

する事で調整した各種濃度の CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m をそれぞれ 50 μ l ずつ各 well に加え、37°C で 24、48 時間インキュベーションした。その後、Cell Counting Kit-8 を各 well に 10 μ l ずつ加え 37°C で 2 時間インキュベーション施行し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad、アメリカ合衆国、カルフォルニア州、ハーキュリーズ) を用いて生成されたホルマザンの 450nm の吸光度を測定する事で、生細胞数を定量化した。それぞれの薬剤濃度に対する各 well の生細胞の割合をグラフ上にプロットし、50%阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。

3.9. 三次元培養系での SAS-L1-Luc 細胞株に対する細胞増殖抑制試験

4.0 × 10³ cells の SAS-L1-Luc 細胞懸濁液 50 μ l を PrimeSurface® 96U 白色プレート (住友ベークライト株式会社、日本、東京都) の各 well に播種し、37°C で 96 時間インキュベーションした。スフェロイドが形成されている事を確認した上で、培地で 2 倍ずつ希釈する事で調整した各種濃度の CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m をそれぞれ 50 μ l ずつ各 well に加え、37°C で 48 時間インキュベーションした。CellTiter-Glo 3D® cell Viability Assay のキット溶液を各 well に 50 μ l ずつ加え、5 分間攪拌振盪させ、37°C で 25 分間インキュベーション施行し、GloMax-Multi Detection System (プロメガ、アメリカ合衆国、ウィスコンシン州、

マディソン) を用いてルシフェラーゼの発光を測定する事で、スフェロイド中の生細胞数を定量化した。それぞれの薬剤濃度に対する各 well の生細胞の割合をグラフ上にプロットし、 IC_{50} を算出した。

3.10. 平面培養系での SAS-L1-Luc 細胞株における CD44v9 陽性細胞に対する

CDDP/m、cRGD-CDDP/m の効果

1.0×10^6 cells の SAS-L1-Luc 細胞懸濁液 5ml を 6well マルチプレート of 各 well に播種し、 $37^{\circ}C$ で 24 時間インキュベーションした。PBS 溶液にて wash 施行後、DMEM-high glucose 培地にて希釈した IC_{50} 濃度、或いは 1mM の CDDP/m、cRGD-CDDP/m をそれぞれ 50 μ l ずつ各 well に加え、 $37^{\circ}C$ で 24 時間インキュベーションした。Accutase を用いて細胞を剥がした後、 1.0×10^6 cells/ml の SAS-L1-Luc 細胞懸濁液を調整し、3.6 の実験方法の如く細胞の免疫蛍光染色をした後、BD LSRFortessa を用いたフローサイトメトリーにて CD44v9 の発現解析を施行した。 IC_{50} 濃度 (低濃度)、或いは 1mM (高濃度) の CDDP/m、cRGD-CDDP/m 投与後における CD44v9 の発現について、cRGD-CDDP/m (n = 3) 群と CDDP/m (n = 3) 群間の統計学的有意差を ANOVA 及びスチューデントの *t* 検定を用いて検定した。

3.11. リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデルに

における CDDP/m、cRGD-CDDP/m の血中滞留性及び薬剤集積性

2.0 × 10⁵ cells の SAS-L1-Luc 細胞懸濁液 25μl と Matrigel Matrix 25μl の混合溶液を、BALB/c ノードマウス (メス、7 週齢) の右舌縁に移植した。移植後 10 日、イソフルラン麻酔下の BALB/c ノードマウスに、150 mg/kg の濃度のルシフェリン 200μl を腹腔内投与し、IVIS imaging system (パーキンエルマー、アメリカ合衆国、マサチューセッツ州、ウォルサム) を用いて、同所舌腫瘍、転移リンパ節の発光を確認する事で、同所舌腫瘍の生着、転移形成を確認した。このリンパ節転移を有するヒト舌癌同所移植マウスを 3 群 (n = 5) に分け、CDDP (5 mg/kg)、CDDP/m (CDDP 基底 5 mg/kg)、cRGD-CDDP/m (CDDP 基底 5 mg/kg) をそれぞれ 1 群ずつマウス尾静脈より投与した。薬剤投与後 1 時間において、同所舌腫瘍、転移リンパ節、反対側正常リンパ節を摘出し、下大静脈からの採血を施行した。薬剤投与後 8 時間、24 時間においても、上述の方法にて同様に採血を施行した。得られた血液は、ヘパリンを添加した後に 4°C、1100rpm、30min にて遠心分離施行し、血漿成分を分離した。摘出された同所腫瘍、転移リンパ節、反対側正常リンパ節、分離された血漿に、90%硝酸を滴下し 180°Cにて分解処理を施行し、溶液を完全に蒸発させた後に、1%硝酸を加え再び溶液にした。

この溶液を ICP-MS にて分析する事により、同所舌腫瘍、転移リンパ節、反対側正常リンパ節、血漿における Pt 量を測定した。薬剤投与後 1、8、24 時間における各群間の統計学的有意差を ANOVA 及びスチューデントの *t* 検定を用いて検定した。

3.12. リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデルに対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果

2.0×10^5 cells の SAS-L1-Luc 細胞懸濁液 15 μ l と Matrigel Matrix 15 μ l の混合溶液を、BALB/c ノードマウス (メス、7 週齢) の右舌縁に移植した。移植後 8 日、イソフルラン麻酔下の BALB/c ノードマウスに、150 mg/kg の濃度のルシフェリン 200 μ l を腹腔内投与し、IVIS imaging system を用いて、同所舌腫瘍、転移リンパ節の発光を確認する事で、同所舌腫瘍の生着、転移形成を確認した。

このリンパ節転移を有するヒト舌癌同所移植マウスを 4 群 (n = 5) に分け、PBS、CDDP (1 mg/kg)、CDDP/m (CDDP 基底 3 mg/kg)、cRGD-CDDP/m (CDDP 基底 3 mg/kg) をそれぞれの群に対して 1 日おき計 3 回 (第 0 日、2 日、4 日)、マウス尾静脈より投与した。同時に IVIS imaging system を用いて、同所舌腫瘍、転移リンパ節における発光強度の推移を測定し、各群間の統計学的有意差を

ANOVA 及びスチューデントの t 検定を用いて検定した。

3.13. ヒト口腔癌 (HSC-2) 同所移植マウスモデル (リンパ節転移 (-)) に対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果

1.0×10^6 cells の HSC-2 細胞懸濁液 $15\mu\text{l}$ と Matrigel Matrix $15\mu\text{l}$ の混合溶液を、BALB/c ノードマウス (メス、7 週齢) の右舌縁に移植した。移植後 4 日、同所舌腫瘍の生着を確認した後、マウスを 4 群 ($n = 5$) に分け、PBS、CDDP (1 mg/kg)、CDDP/m (CDDP 基底 3 mg/kg)、cRGD-CDDP/m (CDDP 基底 3 mg/kg) をそれぞれの群に対して計 4 回 (第 0 日、2 日、4 日、11 日)、マウス尾静脈より投与した。同時に同所舌腫瘍の長径 (a) と短径 (b) をデジタルノギスにて測定し、腫瘍体積 (V) を $V=ab^2/2$ の計算式にて求め、各群間の統計学的有意差を ANOVA 及びスチューデントの t 検定を用いて検定した。

3.14. ヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) リンパ節転移マウスモデル (同所舌腫瘍切除後) に対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果

1.0×10^6 cells の SAS-L1-Luc 細胞懸濁液 $30\mu\text{l}$ を、BALB/c ノードマウス (メス、7 週齢) の右舌縁に移植した。移植後 8 日、イソフルラン麻酔下の BALB/c ノ

ードマウスに、150 mg/kg の濃度のルシフェリン 200 μ l を腹腔内投与し、IVIS imaging system を用いて、同所舌腫瘍、転移リンパ節の発光を確認する事で、同所舌腫瘍の生着、転移形成を確認し、同所舌腫瘍のみを切除した。同所舌腫瘍切除後 3 日、マウスを 4 群 (n = 7) に分け、PBS、CDDP (1 mg/kg)、CDDP/m (CDDP 基底 3 mg/kg)、cRGD-CDDP/m (CDDP 基底 3 mg/kg) をそれぞれの群に対して計 3 回 (第 0 日、4 日、8 日)、CDDP/m と cRGD-CDDP/m の群に対しては追加投与計 2 回 (第 12 日、16 日)、マウス尾静脈より投与した。同時に IVIS imaging system を用いて、転移リンパ節における発光強度の推移を測定し、各群間の統計学的有意差をウィルコクソンの順位和検定を用いて検定した。

3.15. リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデルの

同所舌腫瘍、転移リンパ節、正常リンパ節組織におけるインテグリンの発現解析

1.0×10^6 cells の SAS-L1-GFP 細胞懸濁液 30 μ l を、BALB/c ノードマウス (メス、7 週齢) の右舌縁に移植した。移植後 1 週間にて同所舌腫瘍を切除し、同所舌腫瘍切除後 2 週間にて、転移リンパ節を切除した。正常リンパ節は、BALB/c ノードマウス (メス、10 週齢) より摘出した。これらの摘出組織を 4%パラフ

3. 方法

ホルムアルデヒドにて固定後パラフィン包埋し、免疫組織化学的染色方法により染色した。 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの染色には、一次抗体としてラット抗マウスインテグリン $\alpha 5\beta 1$ 抗体 (1:200) を、二次抗体としてビオチン標識ウサギ抗ラット IgG 抗体を、そして VECTASTAIN Elite ABC Reagent を用いた。腫瘍領域と非腫瘍領域については、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色に基づき定義した。免疫組織化学的に染色された標本は、すべて BZ-X710 蛍光顕微鏡 (株式会社キーエンス、日本、大阪府) を用いて観察した。次に、組織中の血管とインテグリンの共局在を解析するために、免疫組織化学的蛍光染色を施行した。

$\alpha v\beta 3$ インテグリン抗体においては、抗ヒト抗体は存在するものの、抗マウス抗体は存在しなかったため、サブユニット毎の解析とし、抗マウス $\beta 3$ インテグリン抗体を使用した。 $\alpha v\beta 3$ インテグリンが高発現である HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) において、サブユニットである $\beta 3$ インテグリンも高発現である事が確認されており、 $\beta 3$ インテグリンと CD31 との共染色、並びにその発現解析により、 $\alpha v\beta 3$ インテグリンの発現を推測、評価する事とした。 $\beta 3$ インテグリンの染色には、一次抗体としてウサギ抗マウス $\beta 3$ インテグリン抗体 (1:100) を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を、そして蛍光検出に TSA Cyanine 3 System を用いた。 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの染色には、一次

抗体としてラット抗マウスインテグリン $\alpha 5\beta 1$ 抗体 (1:80) を、二次抗体としてビオチン標識ウサギ抗ラット IgG 抗体を、そして VECTASTAIN Elite ABC Reagent と、蛍光検出のために TSA Cyanine 3 System を用いた。組織中の血管の染色には、一次抗体としてウサギ抗 CD31 抗体 (1:300) を、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (H&L) を用いた。免疫組織化学的に蛍光染色された標本は、共焦点レーザー顕微鏡システム Nikon A1R (株式会社ニコンインスティック、日本、東京都) を用いて観察した。同所舌腫瘍、転移リンパ節、正常リンパ節における CD31、 $\beta 3$ インテグリンの共局在相関係数 (ピアソンの相関係数) を算出し、各群間の統計学的有意差を ANOVA 及びスチューデントの t 検定を用いて検定した。また、転移リンパ節腫瘍領域、転移リンパ節正常領域、正常リンパ節における $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの平均蛍光強度を測定し、各群間の統計学的有意差を ANOVA 及びスチューデントの t 検定を用いて検定した。

3.16. リアルタイム生体内共焦点レーザー顕微鏡を用いた同所舌腫瘍、転移リンパ節における CDDP/m、cRGD-CDDP/m の挙動解析

3. 方法

1.0×10^6 cells の SAS-L1-GFP 細胞懸濁液 30 μ l を、BALB/c ノードマウス（メス、7 週齢）の右舌縁に移植した。ヒト舌癌同所移植マウスモデルについては、移植後 1 週間のものを用い、ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルについては、移植後 1 週間にて同所舌腫瘍を切除し、その後 1 週間経過しリンパ節転移が形成されたものを用いた。仰臥位のマウスモデルをイソフルランにて麻酔施行後、同所舌腫瘍を上方へと牽引し、カバーガラス下に固定した。ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルにおいては、頸部皮膚切開を施行した後、繊維性被膜を除去した転移リンパ節を露出し、カバーガラス下に固定した。NanoDrop にて RFU 値 50,000 に調整された CDDP/m-Alexa647（200 μ l）と cRGD-CDDP/m-Alexa555（200 μ l）をマウスモデルの尾静脈より投与し、同所舌腫瘍、転移リンパ節におけるミセルの動態を観察した。観察にはリアルタイム生体内共焦点レーザー顕微鏡 Nikon A1R（株式会社ニコンインスティック、日本、東京都）を用い、cRGD-CDDP/m-Alexa555 と CDDP/m-Alexa647 は、それぞれ 560 nm と 640 nm のレーザーにより励起し、各蛍光はそれぞれ 595/50 と 700/75 の帯域フィルターにより検出した。取得画像に関しては、NIS-Elements AR ver 4.40（株式会社ニコンインスティック、日本、東京都）を用いて解析した。

4. 結果

4.1. CDDP/m、cRGD-CDDP/m の安定性、及び薬剤放出能評価

調整した CDDP/m の粒子径は $33.3 \pm 0.13 \text{ nm}$ 、cRGD-CDDP/m の粒子径は $31.9 \pm 0.35 \text{ nm}$ であり、生理条件下においては 48 時間に亘って粒子径変化はほぼ無く安定であることが確認された (図 7 左)。CDDP/m の薬剤 (CDDP) 放出能は、我々の研究室での先行研究結果と一致する結果であったが[21]、cRGD-CDDP/m は CDDP/m に比し薬剤放出能が低値であり、2 群間に統計学的有意差が認められた (図 7 右)。

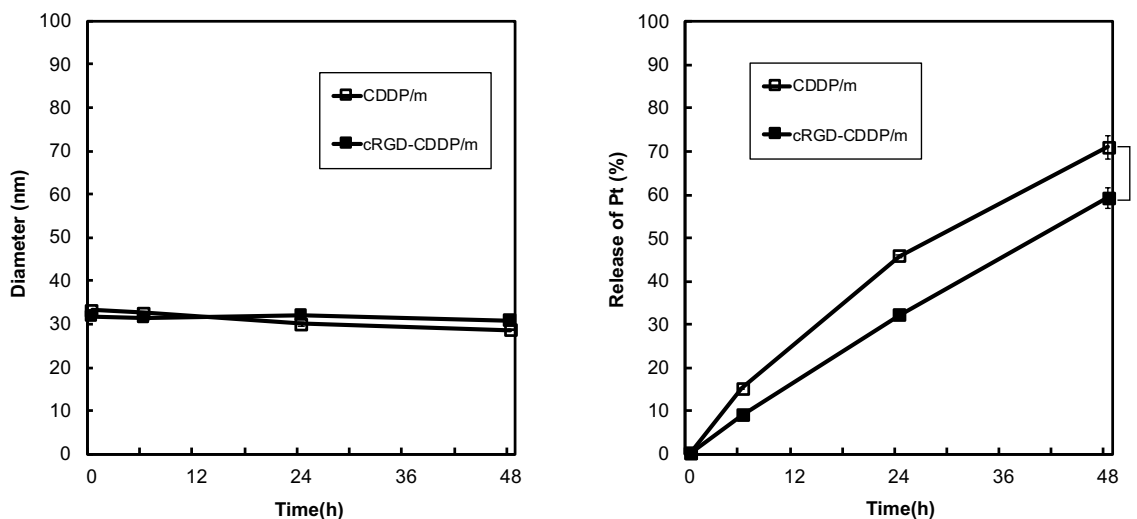


図7. cRGD-CDDP/m、CDDP/m の安定性 (左図)、及び薬剤放出能 (右図)。平均値 \pm SE (n = 3)。* $P < 0.05$ 。

4.2. 頭頸部扁平上皮癌細胞株（SAS-L1-Luc、HSC-2）におけるインテグリン

($\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$) の発現解析

結果は以下のグラフの通りである。

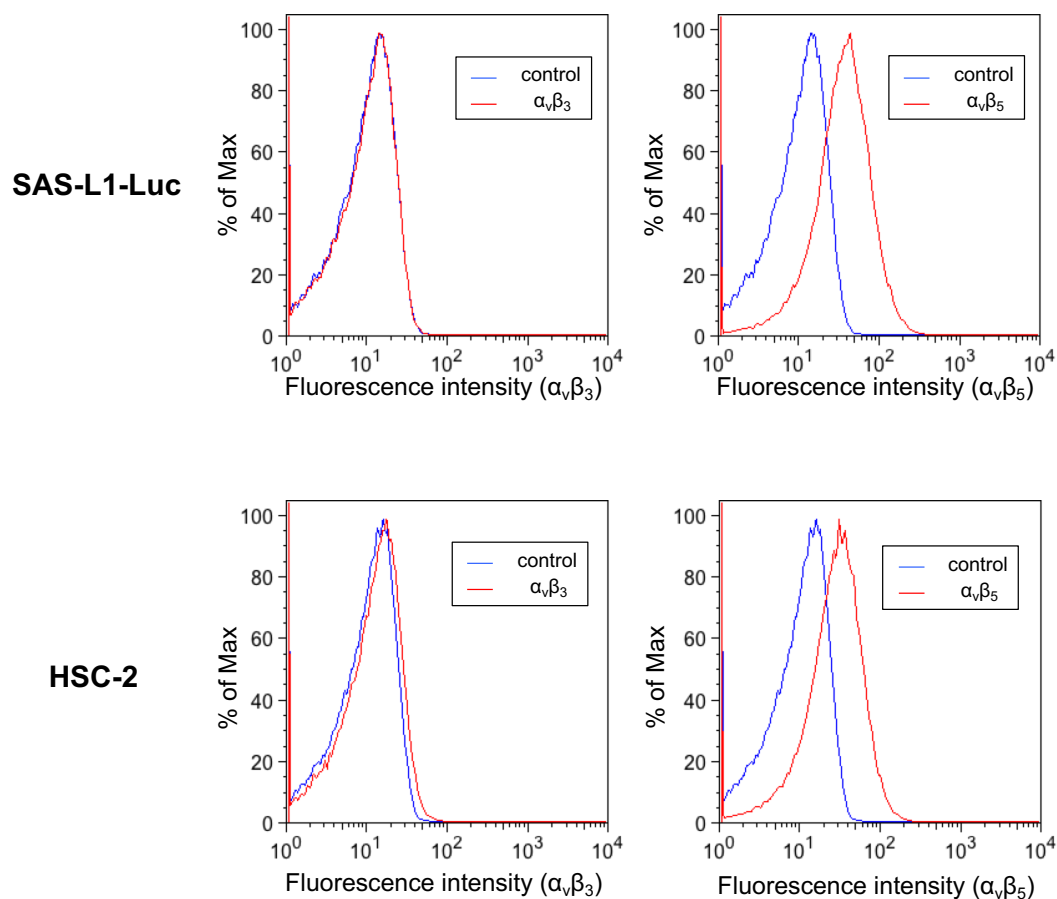


図8. SAS-L1-Luc 細胞株（上段）、HSC-2 細胞株（下段）における $\alpha_v\beta_3$ インテグリン、 $\alpha_v\beta_5$ インテグリンの発現

SAS-L1-Luc、HSC-2 細胞株のいずれにおいても、 $\alpha_v\beta_5$ インテグリンの発現は認められたが、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現はほぼ認められなかった。 $\alpha_v\beta_5$ イ

4. 結果

ンテグリンは、リンパ節転移を高率に來す SAS-L1-Luc 細胞株に発現が多く（平均蛍光強度：44.3）、リンパ節転移を來さない HSC-2 細胞株においては、SAS-L1-Luc 細胞株に比較し発現が少ない結果（平均蛍光強度：32.8）であった（図 8）。上記の結果より cRGD-CDDP/m は、これらの頭頸部扁平上皮癌細胞表面に発現する $\alpha v \beta 5$ インテグリンをターゲットとし、その発現量の違いにより、リンパ節転移を高率に來す SAS-L1-Luc 細胞株に対してより効果的な抗腫瘍効果が期待できると考えられた。

4.3. 頭頸部扁平上皮癌細胞株（SAS-L1-Luc、HSC-2）における CD44v9 の発現

と $\alpha\beta 5$ インテグリン発現との相関関係

腫瘍組織を構成するがん細胞は、ヘテロな細胞集団である事が知られている [49]。頭頸部扁平上皮癌細胞株においても、自己複製能を喪失したがん幹細胞（多分化能を有するがん幹細胞）が、分化傾向を有するがん細胞へと分化増殖する事で、腫瘍組織自体はヘテロな細胞集団を構成する事が考えられる。この知見をもとに、SAS-L1-Luc 細胞株、HSC-2 細胞株におけるがん幹細胞 (CD44v9) の発現解析を施行した。その結果、SAS-L1-Luc 細胞株、HSC-2 細胞株のいずれにおいても CD44v9 の過剰発現が認められ、CD44v9 の発現が高い細胞集団、低い細胞集団（コントロールの波形と重なる部分）が存在し、がん幹細胞と分化傾向を有する細胞が混在して存在する事が確認された（図 9）。次に CD44v9 と $\alpha\beta 5$ インテグリンの発現の相関関係を解析した。SAS-L1-Luc 細胞株、HSC-2 細胞株のいずれにおいても、CD44v9 と $\alpha\beta 5$ インテグリンの双方を発現している細胞集団の割合が多く、CD44v9 陽性細胞集団のうち 96%程度に $\alpha\beta 5$ インテグリンの発現が認められた（図 10）。以上の結果より、cRGD-CDDP/m が $\alpha\beta 5$ インテグリンを介し、CD44v9 を発現するがん幹細胞に作用する事が予想され、その結果、転移、再発、治療抵抗性の克服を期待できると考えられた。

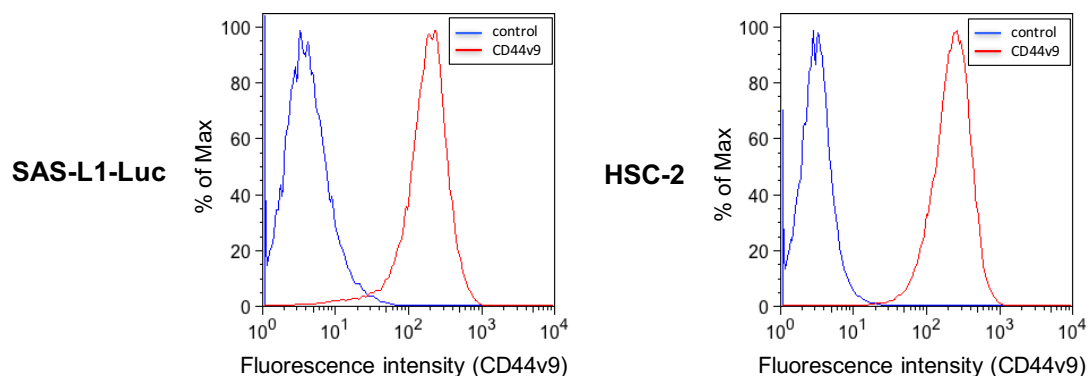


図9. SAS-L1-Luc 細胞株 (左図)、HSC-2 細胞株 (右図) における CD44v9 の発現

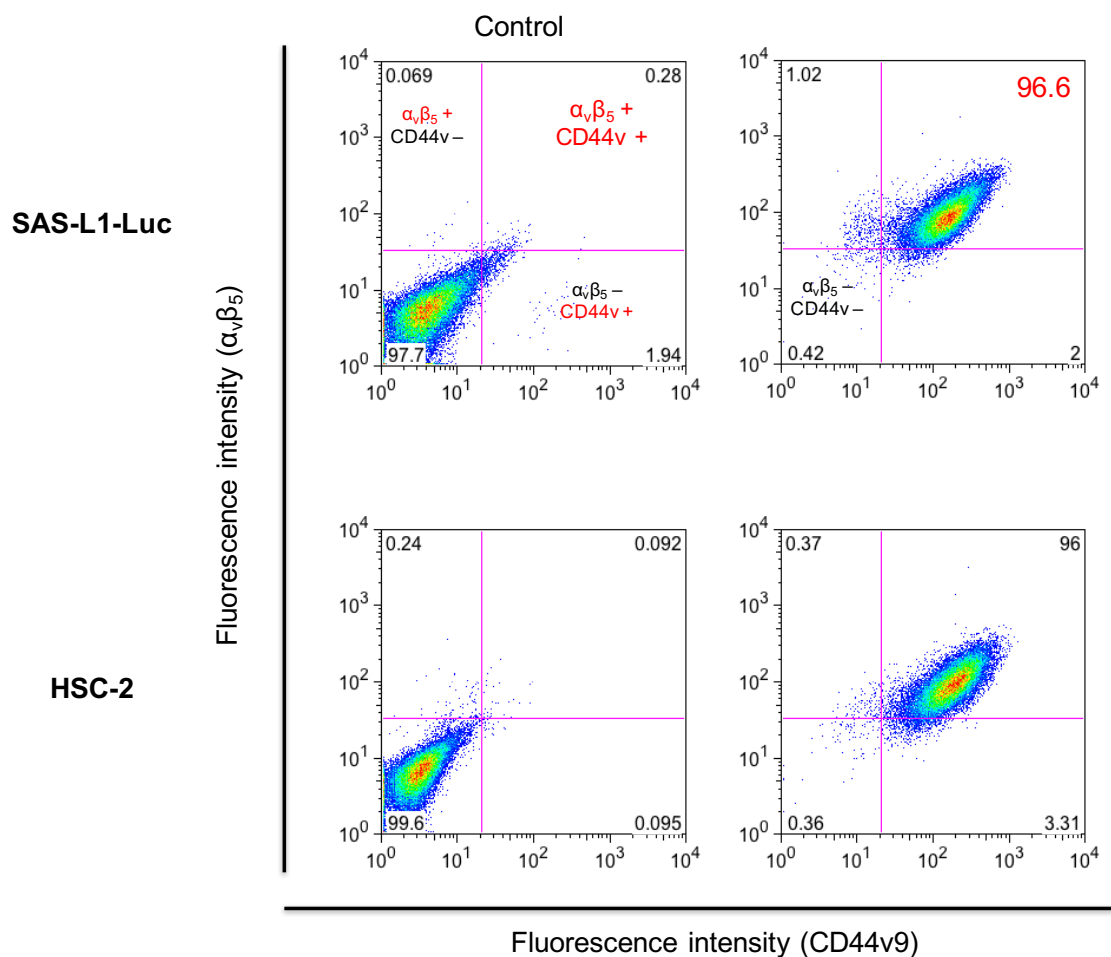


図10. SAS-L1-Luc 細胞株 (上段)、HSC-2 細胞株 (下段) における CD44v9 発現と $\alpha_v\beta_5$ インテグリンの発現の相関関係

4.4. 平面培養系での SAS-L1-Luc 細胞株に対する細胞増殖抑制試験

$\alpha v\beta 5$ インテグリンの発現が多い SAS-L1-Luc 細胞株を選択し、CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m の細胞増殖抑制を評価した。薬剤投与後 24、48 時間時点での SAS-L1-Luc 細胞株における cRGD-CDDP/m と CDDP/m の IC_{50} 値は、ほぼ同値であった。一方で free drug である CDDP の IC_{50} 値は、cRGD-CDDP/m と CDDP/m の IC_{50} 値の約 10 分の 1 程度であり (図 11)、この平面培養実験系においては、単純拡散にて細胞膜を透過し細胞内へと到達する CDDP の特性を裏付ける結果であった。

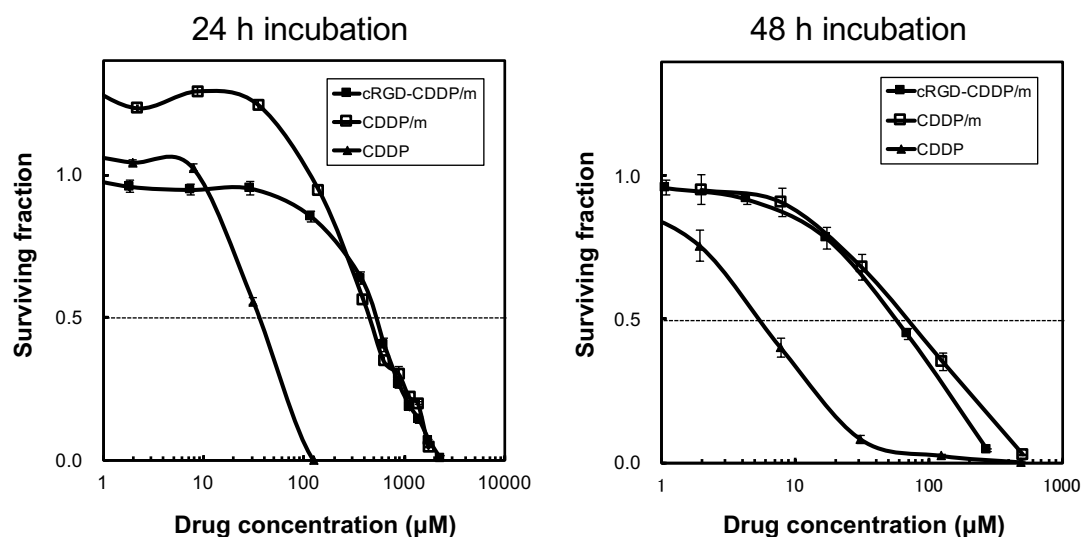


図11. 平面培養系での SAS-L1-Luc 細胞株における CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m 投与後 24 時間後 (左図)、48 時間後 (右図) の細胞増殖抑制。平均値 \pm SE (n = 6)。

4.5. 三次元培養系での SAS-L1-Luc 細胞株に対する細胞増殖抑制試験

平面培養系と比較し、酸素、栄養素、細胞間相互作用の生理学的勾配を含む *in vivo* 微小環境を反映しているとされている三次元培養系（スフェロイド培養系）を用い[50]、SAS-L1-Luc 細胞株スフェロイドに対する細胞増殖抑制試験を施行した。薬剤投与後 48 時間時点での SAS-L1-Luc 細胞株スフェロイドにおいては、cRGD-CDDP/m と CDDP/m の IC_{50} 値はほぼ同値であり、CDDP の IC_{50} 値は、cRGD-CDDP/m と CDDP/m の IC_{50} 値の約 10 分の 1 程度であった（図 12）。これらの結果より、三次元培養系においても CDDP の単純拡散による高い細胞増殖抑制効果が認められ、高分子ミセル製剤である cRGD-CDDP/m と CDDP/m は、SAS-L1-Luc 細胞に対し同等の細胞増殖抑制効果を有する事が示された。

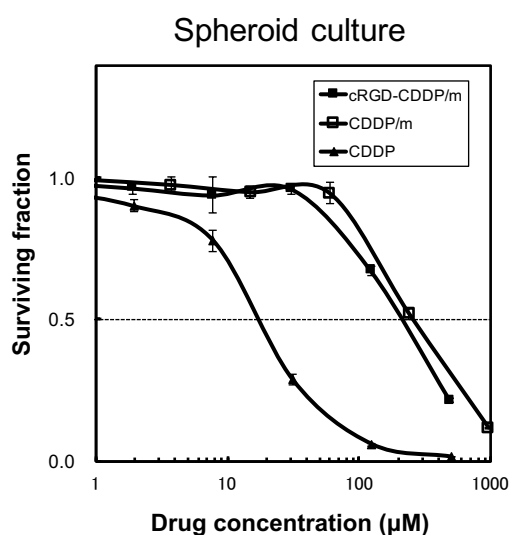


図12. SAS-L1-Luc 細胞株スフェロイドにおける CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m 投与後 48 時間の細胞増殖抑制。平均値±SE (n = 6)。

4.6. 平面培養系での SAS-L1-Luc 細胞株中の CD44v9 陽性細胞に対する

CDDP/m、cRGD-CDDP/m の効果

前述の実験結果の如く、SAS-L1-Luc 細胞株における CDDP/m、cRGD-CDDP/m の細胞毒性は同等であったが、がん幹細胞に対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m の効果を検証するため、薬剤投与後 24 時間の SAS-L1-Luc 生存細胞における CD44v9 の発現解析を施行した。これらの結果によれば、cRGD-CDDP/m は CDDP/m に比較し、SAS-L1-Luc 細胞の CD44v9 の発現を優位に減少させ、薬剤濃度を上げるとその差は顕著であった (図 13)。また、高用量の CDDP/m においても SAS-L1-Luc 細胞の CD44v9 の発現が減少していたが (図 13)、これはがん幹細胞におけるグルタチオン媒介薬剤耐性機構を克服する CDDP/m の有効性を示した我々の先行研究結果と矛盾しない結果であった[41]。

ここで、薬剤非投与群に対する CDDP/m 投与群、cRGD-CDDP/m 投与群の SAS-L1-Luc 細胞株における CD44v9 陽性細胞の蛍光強度比を統計学的に解析した結果、CDDP/m 投与群に比し cRGD-CDDP/m 投与群は、CD44v9 陽性細胞割合が有意に減少し、2 群間に統計学的有意差が認められた (図 14)。

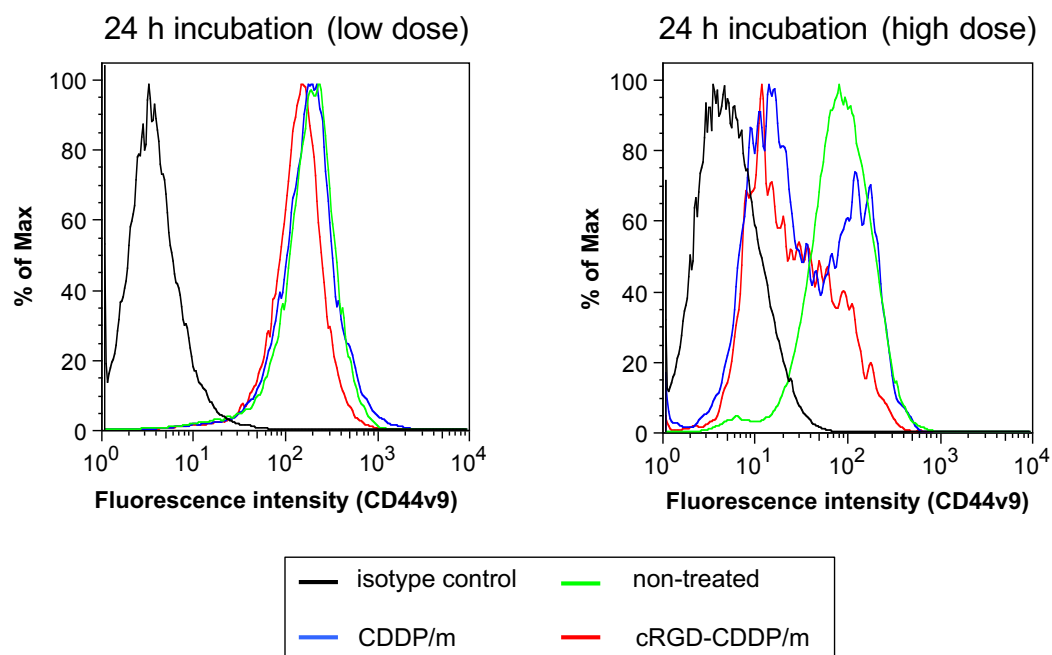


図13. CDDP/m、cRGD-CDDP/m 投与後 24 時間（左図：低濃度、右図：高濃度）における SAS-L1-Luc 細胞株の CD44v9 発現

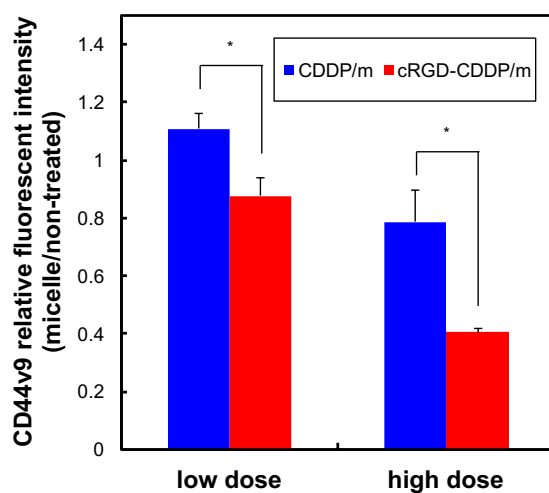


図14. 薬剤非投与群に対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m 投与後 24 時間（低濃度、高濃度）における SAS-L1-Luc 細胞株の CD44v9 蛍光強度比。平均値 \pm SE (n = 3)。* $P < 0.05$ 。

4.7. リンパ節転移を有するヒト舌癌（SAS-L1-Luc）同所移植マウスモデルに

における CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m の血中滞留性及び薬剤集積性

リンパ節転移を有するヒト舌癌（SAS-L1-Luc）同所移植マウスモデルにおける、薬剤投与後の血中及び腫瘍組織内の Pt 量の定量により、CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m の血中滞留性及び腫瘍組織への薬剤集積性を評価した。cRGD-CDDP/m（半減期（ $T_{1/2}$ ）：5.0 時間）と CDDP/m（ $T_{1/2}$ ：5.5 時間）両者の血中滞留性は、CDDP の血中滞留性と比較しはるかに優れていた。薬剤投与後 1 時間では CDDP/m に比し、cRGD-CDDP/m は優れた血中滞留性を示し、2 群間に統計学的有意差が認められた。しかし、薬剤投与後 8 時間以降では CDDP/m の方が cRGD-CDDP/m に比し、統計学的有意差を有する優れた血中滞留性を示し、薬剤投与後 24 時間において CDDP/m は、血漿 1ml あたりに投与量の約 15% 程度が残存していた（図 15）。

そこで、それぞれの薬剤における AUC（area under the blood concentration-time curve）を算出した結果、CDDP/m と cRGD-CDDP/m の AUC_{0-24h} は、CDDP のそれに比し顕著に高値であり、2 群間に統計学的有意差を認めた。また、CDDP/m の AUC_{0-24h} は cRGD-CDDP/m のそれに比し高値であり、2 群間に統計学的有意差が認められた（表 3）。

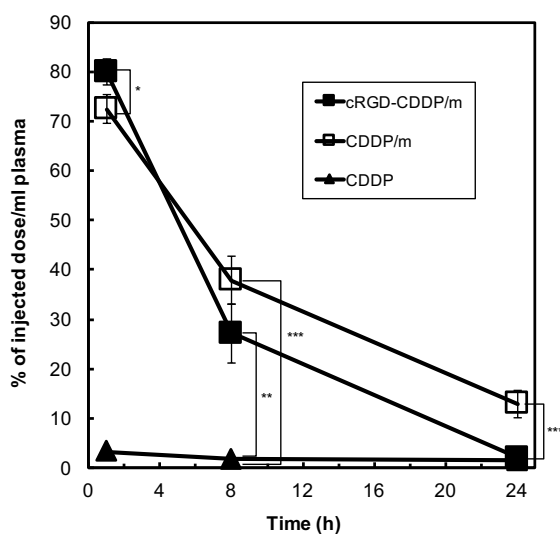


図15. CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m の経静脈投与後における血漿中 Pt 濃度の継時的変化。平均値±SE (n = 5)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

Drugs	AUC _{0-24h} [(%dose/ml)·h]	
	Plasma	
CDDP	45.3 ± 2.28	***
CDDP/m	828 ± 44.3	
cRGD-CDDP/m	648 ± 68.9	

表3. CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m の経静脈投与後 24 時間における AUC。平均値±SE (n = 5)。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

同所舌腫瘍においては、cRGD-CDDP/m は CDDP/m に比し薬剤投与早期より優れた薬剤集積性を示し、薬剤投与後 1 時間では同所舌腫瘍組織 1g あたりに cRGD-CDDP/m 投与量の 3%程度が腫瘍内に集積しており、薬剤投与後 24 時間においてもそれを維持していた。一方で CDDP/m は、徐々に同所舌腫瘍へと集積した結果、薬剤投与後 24 時間において cRGD-CDDP/m と同等の薬剤集積性を認めた。この cRGD-CDDP/m と CDDP/m 両者の同所舌腫瘍への薬剤集積性は、CDDP の薬剤集積性と比較しはるかに優れており、2 群間に統計学的有意差が認められた (図 16)。

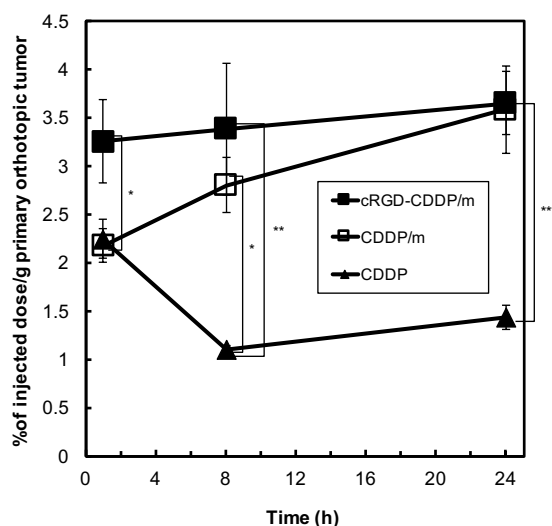


図16. CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m の経静脈投与後における同所舌腫瘍組織中 Pt 濃度の経時的変化。平均値±SE (n = 5)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

転移リンパ節においては、薬剤投与後 1 時間で cRGD-CDDP/m は CDDP/m に
比し転移リンパ節への集積性が顕著に優れており、両者間に統計学的有意差が
認められた。薬剤投与後 8 時間では、cRGD-CDDP/m の転移リンパ節への集積
性の低下が生じる一方で、CDDP/m は徐々に転移リンパ節に集積し、薬剤投与
後 24 時間では、cRGD-CDDP/m と CDDP/m の集積性の差はわずかに留まり、
両群間に統計学的有意差は認められなかった。この cRGD-CDDP/m と CDDP/m
両者の転移リンパ節への薬剤集積性は、いずれの時間においても CDDP の転移
リンパ節への薬剤集積性と比較しはるかに優れており、両者間に統計学的有意
差が認められた (図 17 左)。

対側正常リンパ節においては、薬剤投与後 1、8 時間で CDDP/m、CDDP に比
し cRGD-CDDP/m は正常リンパ節に集積する傾向が認められたが、薬剤投与後
24 時間では、cRGD-CDDP/m の薬剤集積性は低下し CDDP/m と同等の薬剤集積
性であった (図 17 右)。

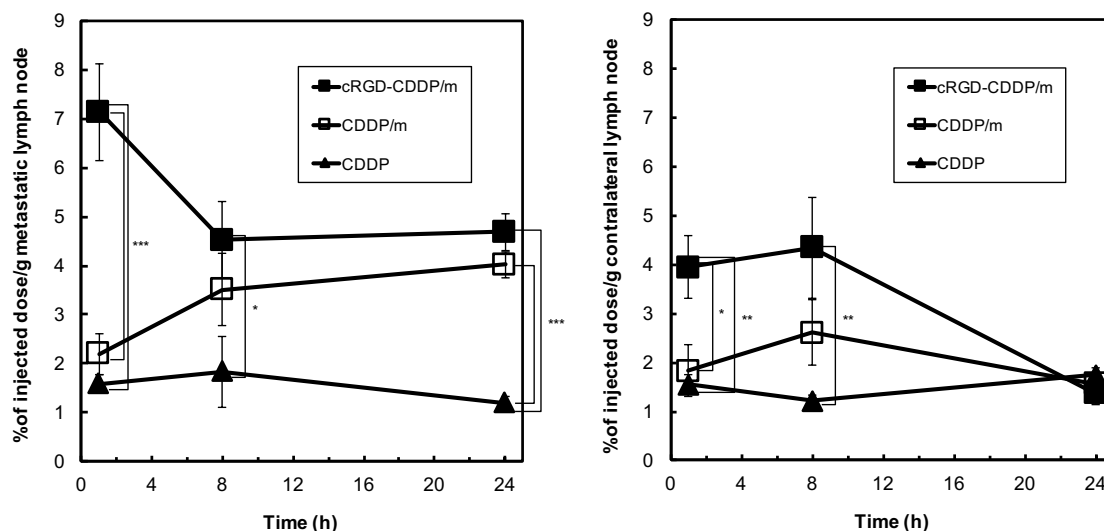


図17. CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m の経静脈投与後における転移リンパ節組織（左図）、対側正常リンパ節組織（右図）中 Pt 濃度の継時的変化。平均値±SE (n = 5)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

ここで、同所舌腫瘍及び転移リンパ節における cRGD-CDDP/m の集積優位性を検証するために、cRGD-CDDP/m と CDDP/m の Pt 集積比を算出した。つまり、Pt 集積比 < 1 の場合、腫瘍組織への集積は EPR 効果 (CDDP/m) 優位であり、Pt 集積比 > 1 の場合、腫瘍組織への集積はリガンド効果 (cRGD-CDDP/m) 優位という事になる。この解析において、薬剤投与後 24 時間までは同所舌腫瘍、転移リンパ節双方においてリガンド効果が優位である事が認められ、特に転移リンパ節においては薬剤投与後 1 時間において劇的なリガンド効果が確認され、薬剤投与後 8 時間、24 時間との間で統計学的優位差が認められた (図 18)。

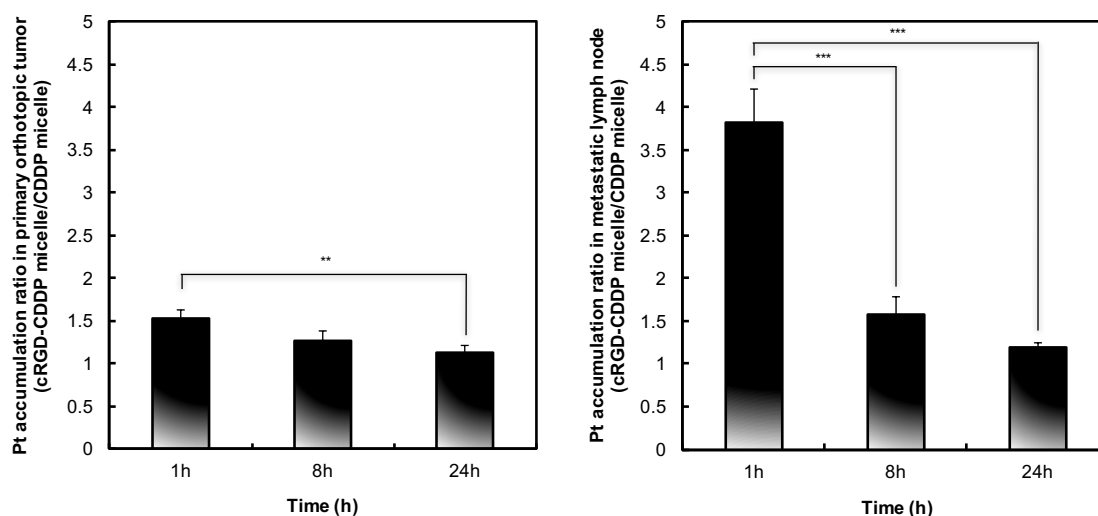


図18. cRGD-CDDP/m、CDDP/m の経静脈投与後における同所舌腫瘍組織（左図）、転移リンパ節組織（右図）の Pt 集積比 $\langle \text{cRGD-CDDP micelle} / \text{CDDP micelle} \rangle$。平均値 \pm SE (n = 5)。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

4.8. リンパ節転移を有するヒト舌癌（SAS-L1-Luc）同所移植マウスモデルにおける CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果

治療開始後 4 日の時点において CDDP/m 及び cRGD-CDDP/m 治療群は、同所舌腫瘍では CDDP 治療群に比し、転移リンパ節では PBS 治療群（コントロール群）に比し、統計学有意差を有した抗腫瘍効果が認められた（図 19）。しかし、転移リンパ節が生じてからの薬剤投与開始となるこの実験系では、既に同所舌腫瘍が増大しており、摂食が困難となる事から著明な体重減少が生じ、長期間の観察が困難であった（図 20）。そこで、同所舌腫瘍マウスモデルとリンパ節転移マウスモデルをそれぞれ作成し、cRGD-CDDP/m、CDDP/m の抗腫瘍効果

を検証する事とした。

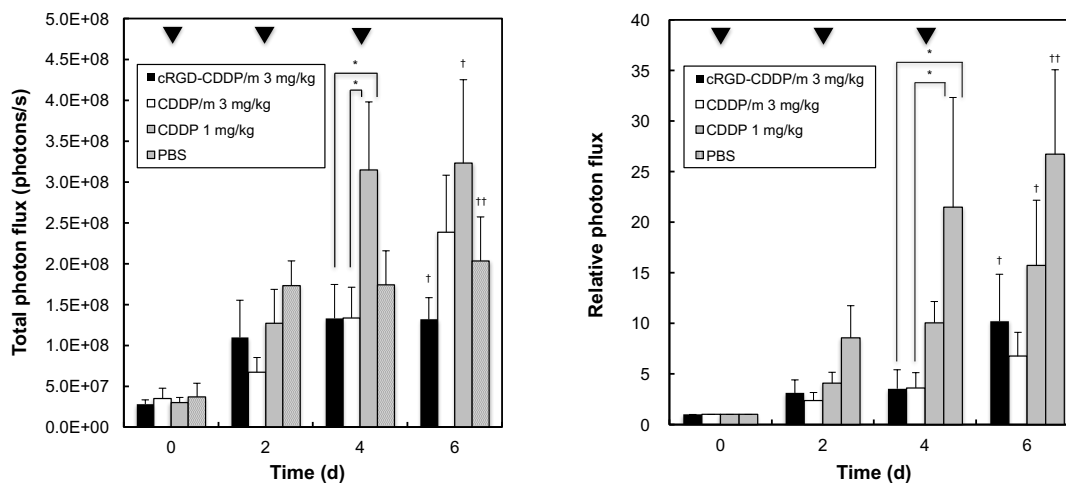


図19. CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m のリンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデルにおける同所舌腫瘍 (左図)、転移リンパ節 (右図) に対する抗腫瘍効果。平均値±SE (n = 5)。* $P < 0.05$ 。†死亡。▼薬剤投与日。

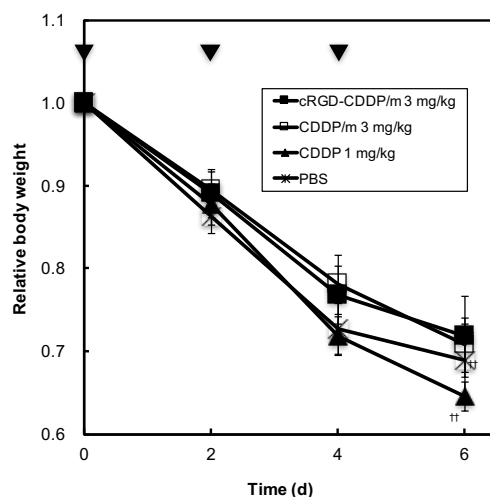


図20. CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m 投与実験 (図 19) におけるリンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデルの継続的体重変化。平均値±SE (n = 5)。†死亡。▼薬剤投与日。

4.9. ヒト口腔癌（HSC-2）同所移植マウスモデル（リンパ節転移（-））における CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果

前述の実験結果をもとに、SAS-L1-Luc 細胞よりも増殖スピードが緩徐な HSC-2 細胞を用い、ヒト口腔癌（HSC-2）同所移植マウスモデルにおける cRGD-CDDP/m、CDDP/m の抗腫瘍効果を検証した。治療開始後 11 日の時点では、CDDP 治療群を比較対照群とした場合、cRGD-CDDP/m 治療群において有意な抗腫瘍効果が認められ ($p = 0.0082$)、CDDP/m 治療群においても有意な抗腫瘍効果を認めた ($p = 0.0191$)。cRGD-CDDP/m 治療群、CDDP/m 治療群間の抗腫瘍効果において統計学的有意差は認められなかったが、腫瘍径の継時的推移より CDDP/m と比較して cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果が高い傾向が示された (図 21 左)。また、継時的体重変化の結果より、CDDP 3mg/kg は生物学的毒性が高く、著しい体重減少が認められたため、この実験系に関しては投与量として適さない事が示唆された (図 21 右)。さらに、cRGD-CDDP/m、CDDP/m 治療群は、PBS 治療群 (コントロール群) の体重推移と同じであった事から、CDDP のミセル製剤 (cRGD-CDDP/m、CDDP/m) は、free drug である CDDP に比し副作用が少なく、かつより多くの薬剤投与量が設定可能となる事で、抗腫瘍効果を期待出来る製剤である事が示唆された。

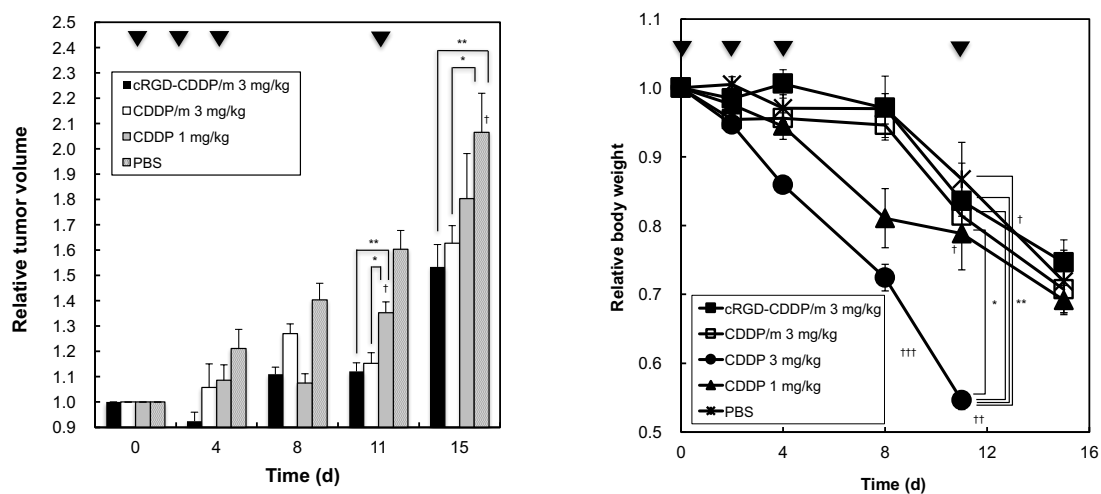


図21. CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m のヒト口腔癌（HSC-2）同所移植マウスモデルに対する抗腫瘍効果（左図）と継時的体重変化（右図）。平均値 \pm SE ($n = 5$)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。† 死亡。▼薬剤投与日。

4.10. ヒト舌癌（SAS-L1-Luc）リンパ節転移マウスモデル（同所舌腫瘍切除後）

における CDDP/m、cRGD-CDDP/m の抗腫瘍効果

続いてヒト舌癌（SAS-L1-Luc）リンパ節転移マウスモデルにおける同所舌腫瘍切除後のリンパ節転移に対する cRGD-CDDP/m、CDDP/m の抗腫瘍効果を検証した。リンパ節転移は、同所舌腫瘍に一番近い顎下部に生じる事が殆どであり、その深さも一定であった。治療開始後 20 日の時点において、cRGD-CDDP/m 治療群は転移リンパ節に対し劇的な抗腫瘍効果を発揮し、CDDP/m 治療群との間に統計学的有意差が認められた ($p = 0.0298$) (図 22 左)。

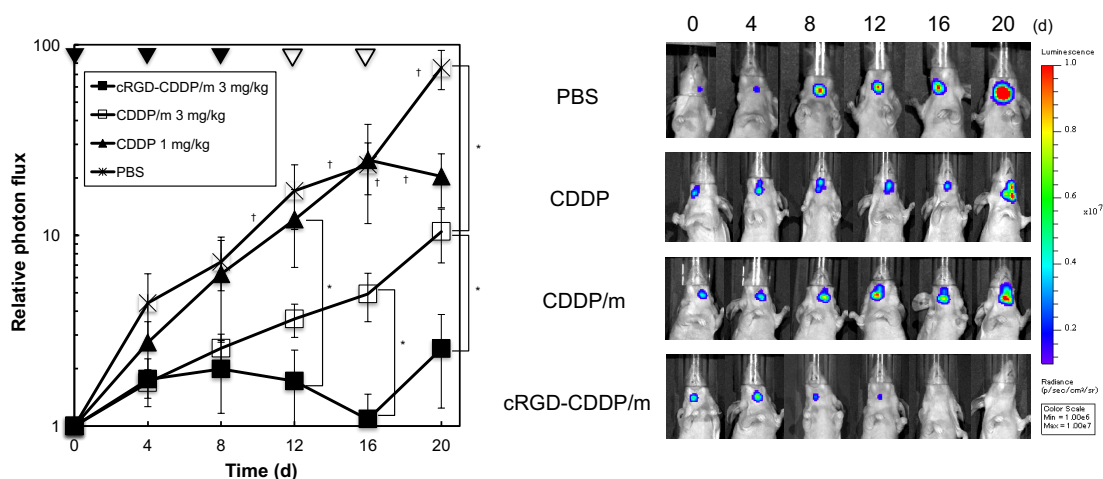


図22. CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m のヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) リンパ節転移マウスモデルに対する抗腫瘍効果。転移リンパ節における相対発光強度の継時的推移 (左図) と IVIS imaging system による評価画像 (右図)。平均値 \pm SE ($n = 7$)。* $P < 0.05$ 。† 死亡。▼薬剤投与日、▽薬剤投与日 (CDDPを除く)。

また、継時的体重変化の結果より CDDP 1mg/kg 治療群では、薬剤投与開始後 12 日の時点において、治療開始時と比較し 15%程度の体重減少が認められ、cRGD-CDDP/m、CDDP/m 治療群との間に統計学的有意差が認められた (図 23 左)。ヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) リンパ節転移マウスモデルにおいては、CDDP 1mg/kg の低容量であったとしても生物学的毒性が高く、かつ PBS 治療群 (コントロール群) と比較し抗腫瘍効果が認められなかった事より、これらの双方の観点から CDDP 1mg/kg は投与量として適さない事が示唆され、薬剤投与 12 日目からは CDDP 1mg/kg の投与を中止し、その後の経過を追跡する事とした。

治療終了後 30 日目の予後比較検討においては、cRGD-CDDP/m 治療群は他の治療群と比較し、ヒト舌癌（SAS-L1-Luc）リンパ節転移マウスモデルの生存率が
 高く（図 23 右）、転移リンパ節への抗腫瘍効果、転移抑制効果に優れたリガン
 ド搭載型の高分子ミセル製剤である可能性が示唆された。

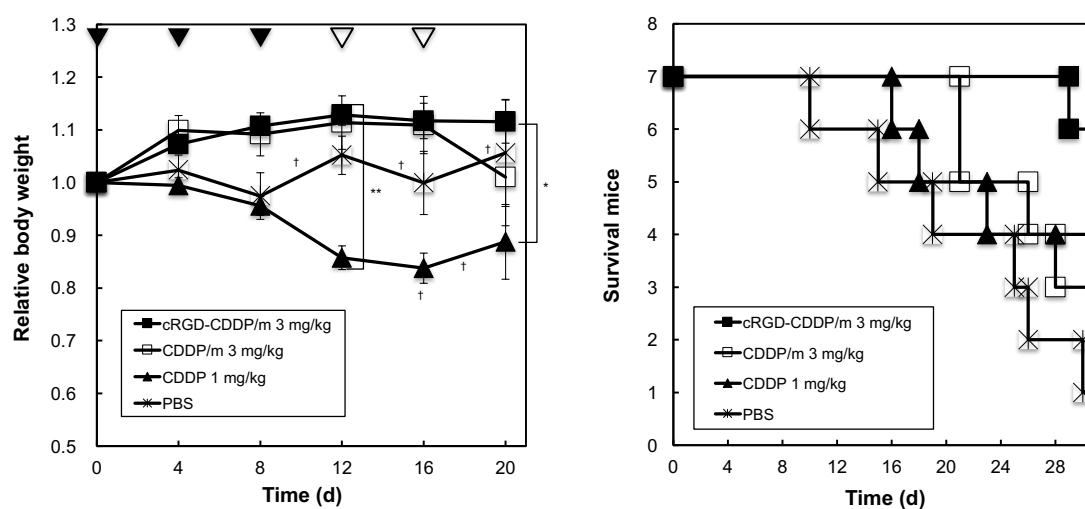


図23. CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m 投与実験におけるヒト舌癌（SAS-L1-Luc）リンパ節転移マウスモデルの継時的体重変化（左図）と生存曲線（右図）。平均値±SE（n = 7）。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。†死亡。▼薬剤投与日、▽薬剤投与日（CDDPを除く）。

4.11. リンパ節転移を有するヒト舌癌（SAS-L1-Luc）同所移植マウスモデルの

同所舌腫瘍、転移リンパ節、正常リンパ節組織におけるインテグリンの発現解析

cRGD-CDDP/m が発揮する優れた抗腫瘍効果の解明のために、リンパ節転移を有するヒト舌癌（SAS-L1-Luc）同所移植マウスモデルの同所舌腫瘍、転移リンパ節、正常リンパ節を摘出後、免疫組織化学的蛍光染色を施行し共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて、それら摘出組織のインテグリン発現を解析した。

まず腫瘍組織（同所舌腫瘍、転移リンパ節）、正常リンパ節における $\beta 3$ インテグリンの発現を解析した。その結果 $\beta 3$ インテグリンは、同所舌腫瘍、転移リンパ節腫瘍領域に高発現しており、転移リンパ節の非腫瘍領域、正常リンパ節においては、同所舌腫瘍、転移リンパ節腫瘍領域に比し、 $\beta 3$ インテグリンの発現はわずかであった。特に同所舌腫瘍においては、血管内皮細胞に特異的に発現する CD31 領域に一致した $\beta 3$ インテグリンの発現が高頻度に認められ、腫瘍新生血管が豊富である事が示唆された（図 24）。また、転移リンパ節の拡大観察による同部位の詳細検討を施行した結果、転移リンパ節の腫瘍領域から正常領域へと移行するにつれ、 $\beta 3$ インテグリンの発現ならびに CD31 領域に一致した $\beta 3$ インテグリンの発現が乏しくなる傾向にあり、腫瘍新生血管が疎になる

事が示唆された (図 25)。

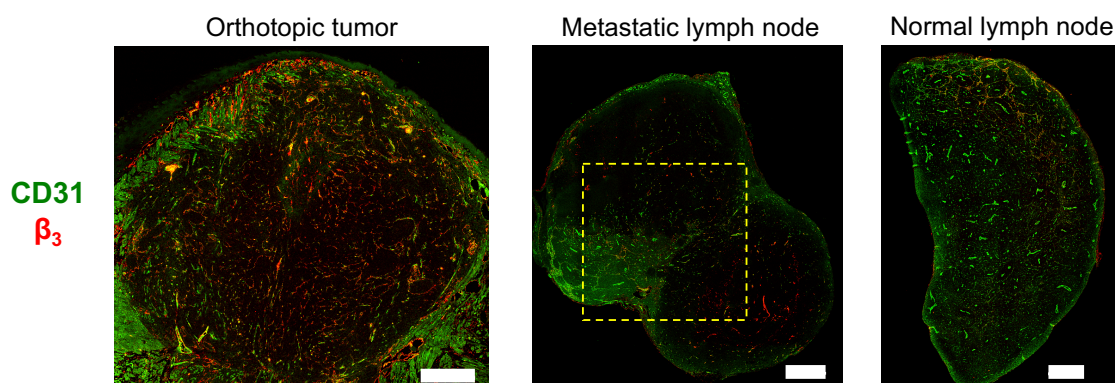


図24. リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデルの同所舌腫瘍 (左図)、転移リンパ節 (中図)、正常リンパ節 (右図) における免疫組織化学的蛍光染色を用いた CD31 (緑色)、 β 3 インテグリン (赤色) の発現解析。黄色領域 : CD31 と β 3 インテグリンの共発現領域。White scale bar = 500 μ m。

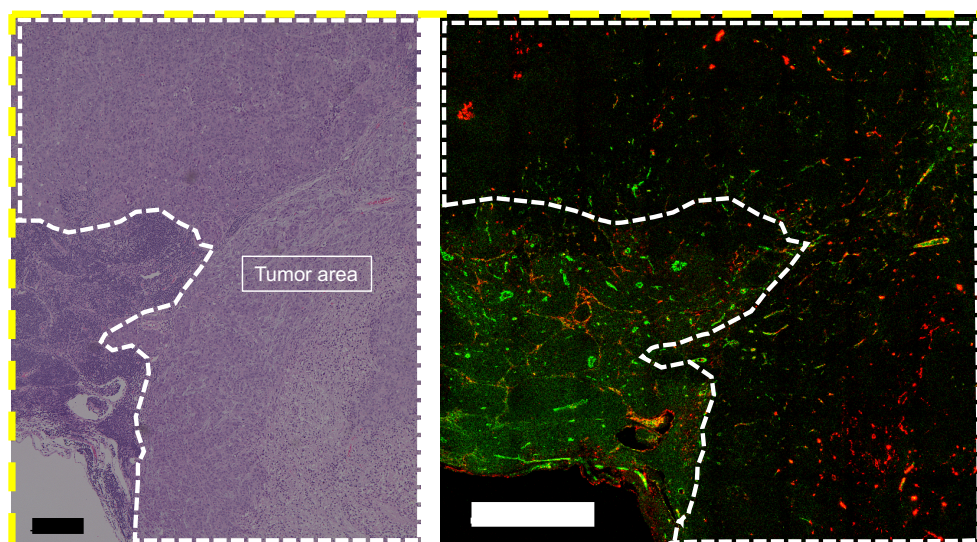


図25. 転移リンパ節境界領域 (腫瘍領域、正常領域) < 図 24 黄色点線内領域 > の拡大観察による詳細検討。左図 : H&E 染色、Black scale bar = 200 μ m。右図 : 免疫組織化学的蛍光染色、CD31 (緑色)、 β 3 インテグリン (赤色)、CD31 & β 3 インテグリン共発現 (黄色)、White scale bar = 500 μ m。

ここで、同所舌腫瘍、転移リンパ節、正常リンパ節における血管内皮細胞に特異的に発現する CD31 と腫瘍新生血管、腫瘍組織自体に発現する $\beta 3$ インテグリンの共局在相関係数（ピアソンの相関係数）を算出し[51, 52]、腫瘍新生血管の発現を解析した結果、同所舌腫瘍における CD31 陽性血管に一致した $\beta 3$ インテグリンの発現が、転移リンパ節 ($p = 0.0491$)、正常リンパ節 ($p = 0.0202$) に比し高く、各群間に統計学的有意差が認められた（図 26）。以上の実験結果より、同所舌腫瘍には、転移リンパ節、正常リンパ節に比し、腫瘍新生血管が豊富である事が示唆され、 $\beta 3$ インテグリンを標的とした cRGD-CDDP/m のアクティブターゲティング能により、速やかな同所舌腫瘍組織への薬剤送達が可能となり、高い抗腫瘍効果が得られたと考えられた。

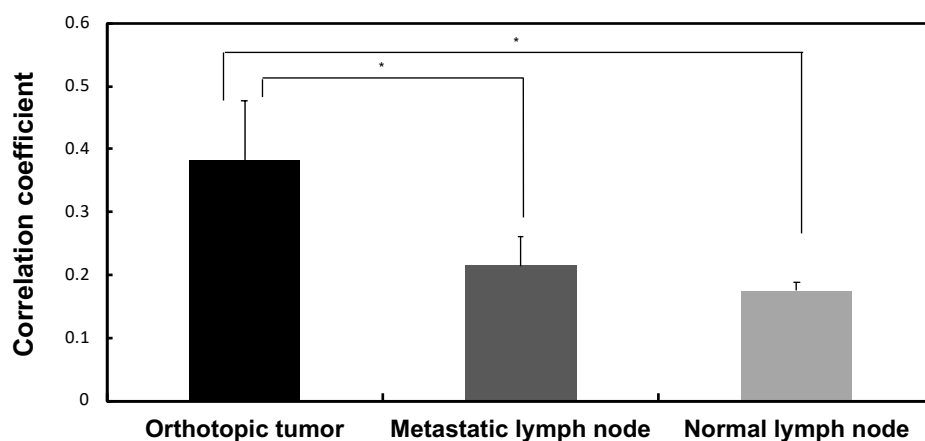


図26. 同所舌腫瘍、転移リンパ節、正常リンパ節組織における CD31、 $\beta 3$ インテグリンの共局在相関係数。平均値 \pm SE ($n = 3$)。* $P < 0.05$ 。

次にリンパ節（正常リンパ節、転移リンパ節）における $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの発現を解析した結果、正常リンパ節の全領域、転移リンパ節の正常領域において発現が高い傾向が認められた（図 27）。 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンは、RGD 配列を認識するインテグリンとして知られており [53, 54]、よって我々の研究室にて開発された cRGD 搭載 CDDP/m が、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンをターゲットとする事が可能であると考えられた。

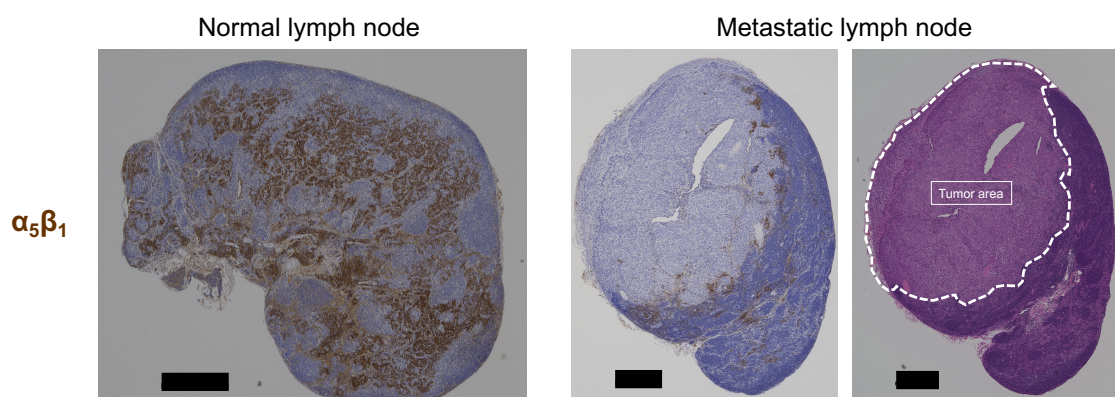


図27. 正常リンパ節（左図）、転移リンパ節（中図、右図）における $\alpha 5\beta 1$ インテグリン（茶色）の発現解析。左図、中図：免疫組織化学的染色。右図：H&E 染色。Black scale bar = 500 μ m。

また、CD31 と $\alpha 5\beta 1$ インテグリンとの免疫組織化学的蛍光共染色により、正常リンパ節における $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの発現領域を検討した。その結果、CD31 陽性血管周囲間質領域に $\alpha 5\beta 1$ インテグリンが高発現である事が確認された（図 28）。ここで、転移リンパ節腫瘍領域、転移リンパ節正常領域、正常リンパ節全

領域における $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの平均蛍光強度を算出し比較した結果、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンは、転移リンパ節の腫瘍領域と比較して、正常リンパ節全領域 ($p = 0.0018$)、転移リンパ節の正常領域 ($p = 0.0063$) に高発現である傾向が認められ、各群間に統計学的有意差が認められた (図 29)。

これらの結果より、cRGD-CDDP/m は、転移リンパ節の正常領域、正常リンパ節に発現する $\alpha 5\beta 1$ インテグリンをターゲットとし得る事が考えられ、特に転移リンパ節においては、腫瘍組織自体に発現している $\alpha v\beta 5$ インテグリンに加えて、 $\beta 3$ インテグリンと $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの双方がターゲット可能となる事で、迅速かつ多量の薬剤送達が可能となり、劇的な抗腫瘍効果を発揮したものと考えられた。

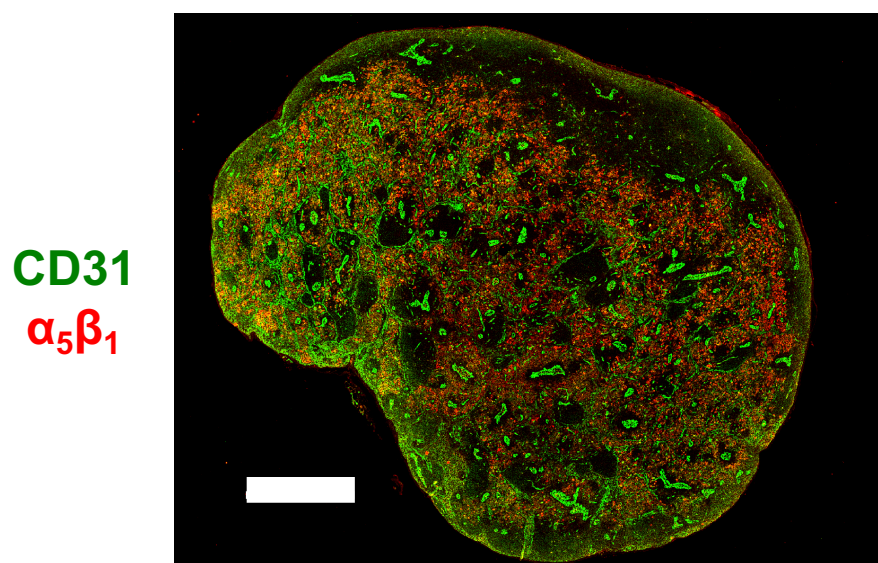


図28. 正常リンパ節における CD31 (緑色)、α₅β₁ インテグリン (赤色) の発現解析。免疫組織化学的蛍光染色、White scale bar = 500μm。

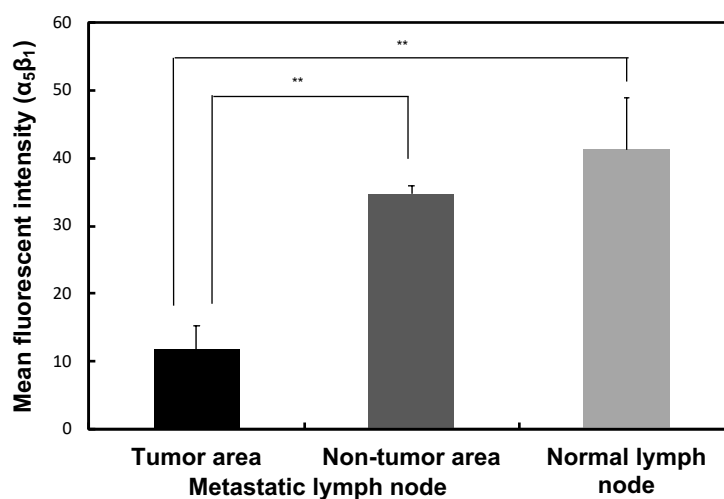


図29. 転移リンパ節腫瘍領域、転移リンパ節正常領域、正常リンパ節全領域における α₅β₁ インテグリン (赤色) の平均蛍光強度。平均値±SE (n = 3)。
**P < 0.01。

4.12. リアルタイム生体内共焦点顕微鏡を用いた同所舌腫瘍、転移リンパ節にお

ける CDDP/m、cRGD-CDDP/m の挙動解析

これまでの実験において、腫瘍新生血管、腫瘍組織、リンパ節に発現するインテグリンを介した cRGD-CDDP/m の効率的な薬剤送達、並びに高い抗腫瘍効果が明らかとなった。ここで、経静脈的に投与されたミセル製剤 (cRGD-CDDP/m、CDDP/m) が腫瘍組織内でどのような挙動をとるかを検証するために、SAS-L1-GFP 同所舌腫瘍マウスモデル、SAS-L1-GFP リンパ節転移マウスモデルを作成し、リアルタイム共焦点顕微鏡を用いて評価した (図 30)。

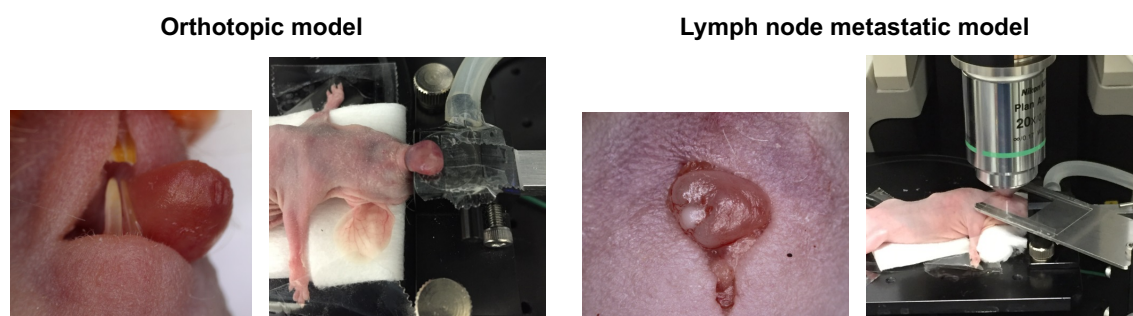


図30. SAS-L1-GFP 同所舌腫瘍マウスモデル (左図)、SAS-L1-GFP リンパ節転移マウスモデル (中央右寄り図) の作成と *in vivo* confocal laser scanning microscopy (IVCLSM) による観察セッティング方法 (中央左寄り図: SAS-L1-GFP 同所舌腫瘍マウスモデルのセッティング。右図: SAS-L1-GFP リンパ節転移マウスモデルのセッティング)。

SAS-L1-GFP 同所舌腫瘍モデルにおいては、薬剤投与後 3 時間においては、Alexa555 にて蛍光標識された cRGD-CDDP/m、Alexa647 にて蛍光標識された CDDP/m のほとんどが腫瘍血管内、腫瘍血管周囲に存在していたが、時間経過と共に両ミセル製剤が徐々に腫瘍間質組織へと集積していく様子が確認された (図 31)。

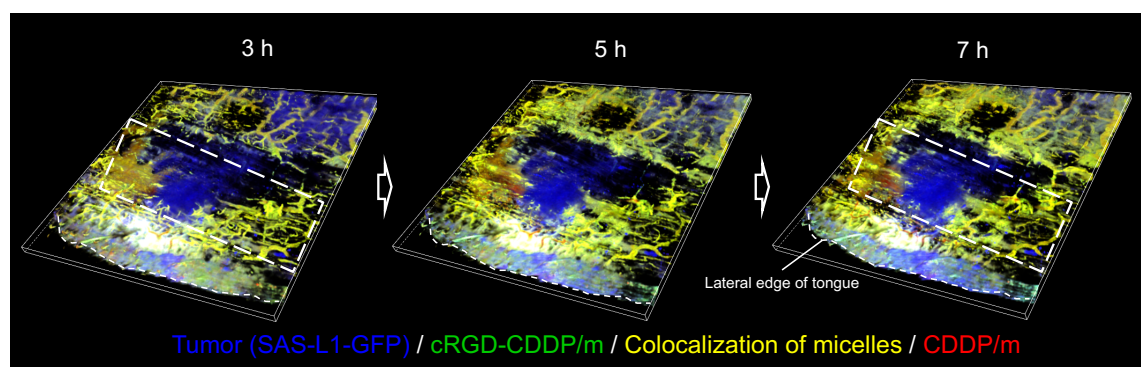


図31. SAS-L1-GFP 同所舌腫瘍領域 (青色) における cRGD-CDDP/m-Alexa555 (緑色)、CDDP/m-Alexa647 (赤色) の継時的挙動解析。黄色領域は、cRGD-CDDP/m-Alexa555 と CDDP/m-Alexa647 の共局在領域。Z 軸の 10 μ m 毎に撮影された XY フレーム画像 6 枚を再構成し、3 次元画像を構築。

また、腫瘍中心領域を詳細に検討した結果、同領域は腫瘍血管が疎である事が確認され、その為、薬剤送達が困難な領域と予想されたが、薬剤投与後 7 時間において腫瘍間質組織へと集積している様子が確認された (図 32 上段)。加えて、同領域における薬剤投与直後の最高血管内蛍光強度に対する血管周囲の蛍光強度を解析した結果、薬剤投与後 7 時間において Alexa555 にて蛍光標識され

た cRGD-CDDP/m は Alexa647 にて蛍光標識された CDDP/m に比し、優れた腫瘍間質組織への集積性を示していた (図 32 下段)。

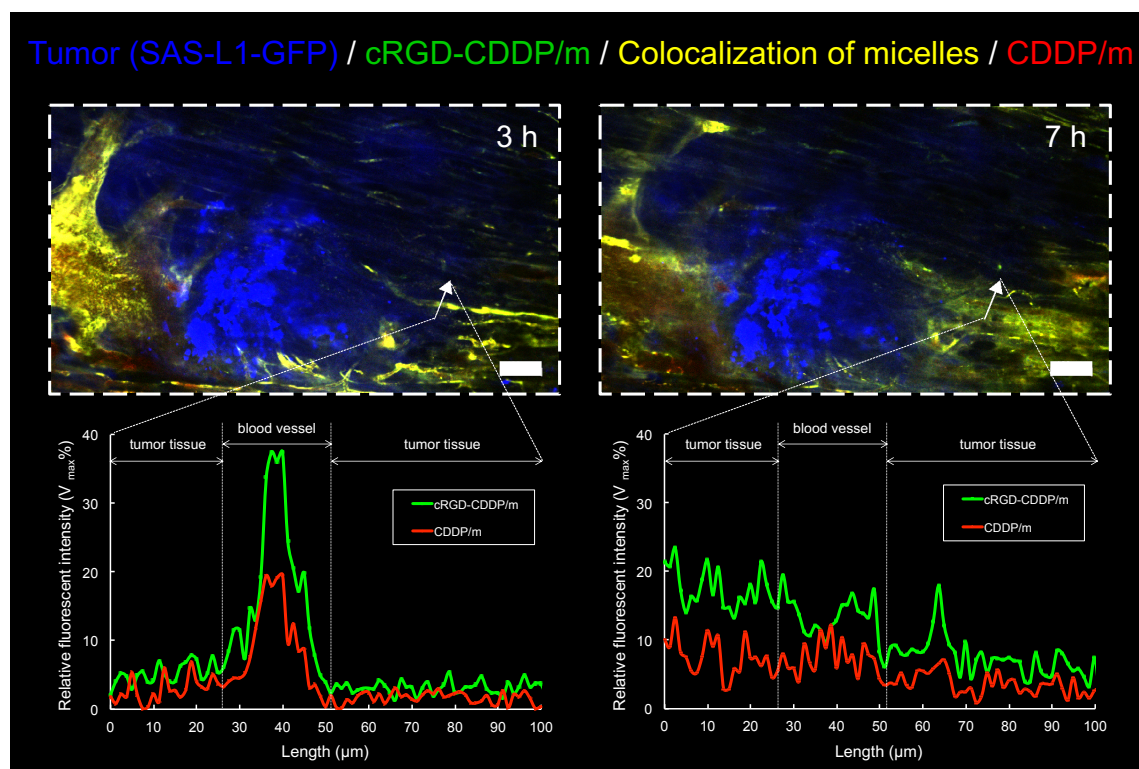


図32. 上段：SAS-L1-GFP 同所舌腫瘍（青色）中心領域（図 31 白色点線内領域）における cRGD-CDDP/m-Alexa555（緑色）、CDDP/m-Alexa647（赤色）の集積性評価。黄色領域は、cRGD-CDDP/m-Alexa555 と CDDP/m-Alexa647 の共局在領域。White scale bar = 100μm。下段：cRGD-CDDP/m-Alexa555、CDDP/m-Alexa647 の投与直後最高血管内蛍光強度 (V_{max}) に対する腫瘍血管周囲（図 32 上段白矢印）蛍光強度の継時的変化。

次に、転移リンパ節における cRGD-CDDP/m、CDDP/m の挙動を評価した。薬剤投与早期（30min～180min）において、Alexa555 にて蛍光標識された cRGD-CDDP/m は、Alexa647 にて蛍光標識された CDDP/m に比し、転移リンパ

節の全領域の脈管系を循環している薬剤量が多い傾向が認められた (図 33、34)。更に転移が進展していないリンパ節領域においても、Alexa555 にて蛍光標識された cRGD-CDDP/m が集積していく傾向が認められ、その傾向は Alexa647 にて蛍光標識された CDDP/m においては確認されなかった (図 34)。これらの事象を定量的に比較するために、薬剤投与直後 1 分の腫瘍領域血管内蛍光強度に対する各観測時点での腫瘍領域血管内蛍光強度比を比較した結果、Alexa555 にて蛍光標識された cRGD-CDDP/m は、Alexa647 にて蛍光標識された CDDP/m に比し、優れた転移リンパ節腫瘍領域内血管への薬剤集積性を示し、特に薬剤投与後 60 分までではそれが顕著であった (図 35)。

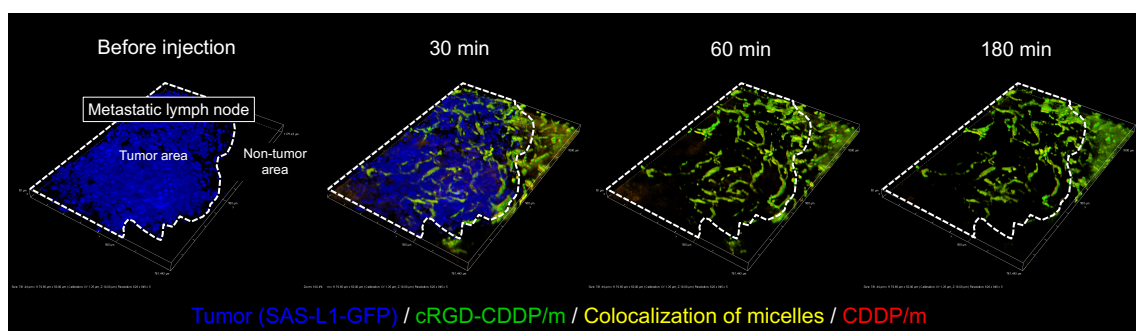


図33. SAS-L1-GFP 転移リンパ節 (青色) における cRGD-CDDP/m-Alexa555 (緑色)、CDDP/m-Alexa647 (赤色) の継時的挙動解析。黄色領域は、cRGD-CDDP/m-Alexa555 と CDDP/m-Alexa647 の共局在領域。白色点線内：腫瘍領域。Z 軸の 10 μ m 毎に撮影された XY フレーム画像 6 枚を再構成し、3 次元画像を構築。

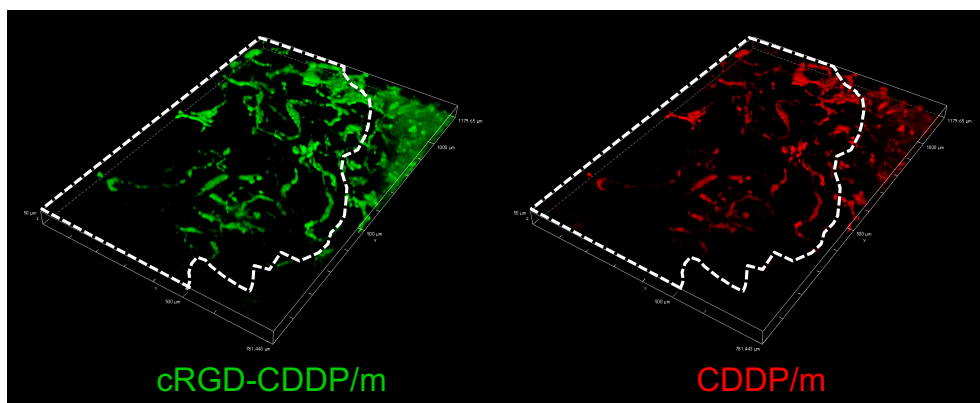


図34. 薬剤投与後 180 分（図 33 右側）における転移リンパ節内の cRGD-CDDP/m-Alexa555（緑）、CDDP/m-Alexa647（赤）の単剤での挙動解析。白色点線内：腫瘍領域。Z 軸の 10 μ m 毎に撮影された XY フレーム画像 6 枚を再構成し、3 次元画像を構築。

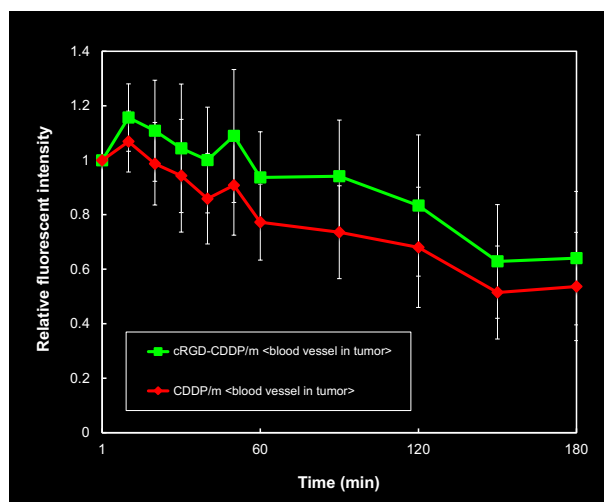


図35. cRGD-CDDP/m-Alexa555（緑）、CDDP/m-Alexa647（赤）の投与直後（1分）腫瘍領域血管内蛍光強度に対する各観測時点での腫瘍領域血管内蛍光強度比の継時的変化。

上述のリアルタイム生体内共焦点顕微鏡を用いた同所舌腫瘍、転移リンパ節における cRGD-CDDP/m、CDDP/m の継時的挙動解析結果は、4.7 腫瘍組織内の Pt 量の定量実験結果と同様の結果であった。つまり、cRGD-CDDP/m は薬剤投与早期より優れた同所舌腫瘍、転移リンパ節への薬剤集積性を発揮し、特に転移リンパ節への cRGD-CDDP/m の集積性が顕著であった。これまでの実験結果から、CDDP/m にリガンドとして cRGD を搭載する事により、転移リンパ節において腫瘍組織自体に発現している $\alpha v\beta 5$ インテグリン、腫瘍新生血管内皮細胞に発現している $\alpha v\beta 3$ インテグリン、リンパ節組織に発現している $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの3つのインテグリンがターゲット可能となった結果、cRGD-CDDP/m の転移リンパ節への迅速かつ多量の薬剤送達が認められ、劇的な抗腫瘍効果を発揮したものと考えられた。

5. 考察

我々の新規合成した cRGD-CDDP/m が、腫瘍新生血管上の $\alpha v\beta 3$ インテグリン、腫瘍組織に発現している $\alpha v\beta 5$ インテグリンをターゲットとする事で、臨床現場で治療に難渋する転移性がんに対し優れた抗腫瘍効果を発揮できるかどうか、また、転移や耐性に関与していると言われているがん幹細胞に対しても効果が発揮できるかについて、主に *in vitro*、*in vivo* の 2 つの実験系を通してその有効性を検証してきた。

まず、*in vitro* 実験系においては、SAS-L1-Luc 細胞に対する cRGD-CDDP/m と CDDP/m の細胞毒性は同等であり、free の CDDP と比較するとミセル製剤 (cRGD-CDDP/m、CDDP/m) の細胞毒性は 1/10 未満であった。この結果は、free の CDDP は単純拡散にて細胞膜を透過し細胞内へと到達するプロセスであるのに対し、ミセル製剤は基本的にエンドサイトーシスにより細胞に侵入した後、CDDP がミセルから徐々に放出され (図 2)、核内に送達されるプロセスを取る事に起因すると考えられた [55]。 *in vivo* 実験結果にもあるように、cRGD-CDDP/m は薬剤投与早期における腫瘍集積性に優れる点から、高い抗腫瘍効果を発揮している。本研究での細胞増殖抑制試験では、インキュベーション時間を 24 時間、48 時間と設定したため、cRGD-CDDP/m と CDDP/m の各ミ

セル製剤を用いた細胞増殖抑制試験に有意差が出なかったと考えられる。より cRGD のリガンド効果を捉えるためには、細胞とミセル製剤の接触時間を短縮させたインキュベーションを行うなどの実験条件の最適化が必要になると考えている。また、*in vitro* 実験系においては、cRGD-CDDP/m は CDDP/m と比較して、がん幹細胞である CD44v9 の発現を有意に減少させる傾向が示されている (図 13、14)。SAS-L1-Luc 細胞には、 $\alpha\beta5$ インテグリンと CD44v9 が共発現しているが (図 10)、cRGD-CDDP/m は $\alpha\beta5$ インテグリンをターゲットとして能動的に薬剤を細胞内へと送達させる事が可能である。一方、腫瘍がヘテロな細胞の集団であるように、SAS-L1-Luc 細胞個々の $\alpha\beta5$ インテグリンと CD44v9 の発現量も不均一である。このような系においては、cRGD-CDDP/m がより多くの $\alpha\beta5$ を発現している SAS-L1-Luc 細胞を選択的かつ速やかに認識して、細胞毒性を示していると考えられる[46]。その結果、本研究における細胞増殖抑制実験では、cRGD-CDDP/m 播種群が CDDP/m 播種群と比べて相対的に SAS-L1-Luc 細胞の CD44v9 発現量を減少させたのだと推察している。がん幹細胞の発現率は、以後の転移、再発、耐性に関わっていると考えられており、このがん幹細胞の発現をいかに減少させるかが、難治性がん、転移がんに対する治療戦略において重要なポイントとなってくる事が予想される。前述の *in vitro*

実験結果からは、これまで我々の研究室において抗腫瘍効果が検証されてきた CDDP/m に[19, 21, 41, 56-58]、リガンド (cRGD) を搭載する事で、インテグリンを介したがん幹細胞に対するアクティブターゲティングが可能となる事が示唆され、その結果、特にがん幹細胞が関連する難治性がん、転移がんにおける有効性が期待できると考えられた。

in vivo 実験系においては、cRGD-CDDP/m は CDDP/m に比し、薬剤投与早期における腫瘍組織への集積性に優れていた (図 16、17、18)。これらの結果は、腫瘍新生血管上の $\alpha v\beta 3$ インテグリン、腫瘍組織 (SAS-L1-Luc) に発現している $\alpha v\beta 5$ インテグリンの双方を介して、cRGD-CDDP/m が腫瘍組織へと送達された結果と考えられ、CDDP/m へのリガンド (cRGD) 搭載効果として期待された結果が得られた。その一方で、薬剤投与後 8~24 時間における血中滞留性は、CDDP/m が cRGD-CDDP/m に比し優れていた。この結果が得られた理由としては、cRGD-CDDP/m が薬剤投与早期に腫瘍組織へと集積する事に加え、同様の白金系抗がん剤内包高分子ミセル製剤である cRGD 搭載ダハプラチン ((1,2-diaminocyclohexane) platinum (II) DACHPt) 内包高分子ミセル (cRGD-DACHPt/m) が、速やかに肝臓に集積し、薬剤投与後 8 時間でピークを迎え、その後速やかに肝臓で代謝され胆汁中へと排泄される事が先行研究に

より明らかとなっており[26]、cRGD-CDDP/m も cRGD-DACHPt/m 同様の生体内挙動を呈する事が予想され、血中滞留性が CDDP/m に比し劣る結果になったと考えられる。この cRGD-CDDP/m は、特筆すべき事にリンパ節に早期に集積する傾向が認められ、特に転移リンパ節においてはその傾向が顕著であった(図 17、18)。ここで、転移リンパ節に集積した Pt 量のプロファイルに着目してみると、cRGD-CDDP/m 投与後 1 時間から 8 時間にかけては、転移リンパ節へと集積した Pt 量が減少する結果であった。cRGD-CDDP/m 投与後 1 時間では、転移リンパ節へと流入する腫瘍新生血管、転移リンパ節の腫瘍領域、転移リンパ節の正常領域に集積した Pt 量が反映された結果と考えられ、cRGD-CDDP/m 投与後 8 時間においては、血中滞留性の低下、転移リンパ節正常領域のリンパ管による薬剤排泄機構により Pt 集積量が低下し、cRGD-CDDP/m 投与後 24 時間までは、cRGD-CDDP/m が併せ持つ EPR 効果にて、Pt 集積量を維持したと考えられた。転移リンパ節と定義されたものの中にも、病理組織学的に詳細に検討をしていくと、リンパ節の全領域が腫瘍組織に置換されたリンパ節、腫瘍組織に置換された領域が多く正常領域が少ないリンパ節 (図 27)、腫瘍組織に置換された領域が少なく正常領域が多いリンパ節、そして腫瘍組織と壊死組織領域が存在するリンパ節など、様々な状態の転移リンパ節が同時にかつ複数存在す

る事が少なくない。cRGD-CDDP/m は、転移リンパ節においても同所舌腫瘍と同様に、腫瘍新生血管上の $\alpha v\beta 3$ インテグリン、腫瘍組織 (SAS-L1-Luc) に発現している $\alpha v\beta 5$ インテグリンの双方を介した薬剤送達により、優れた腫瘍集積性を発揮したと考えられたが、同所舌腫瘍における腫瘍集積性と比較しその差は顕著であったため (図 16、17)、cRGD-CDDP/m がターゲットとし得る他のインテグリンが発現している可能性も考え、病理組織学的に検索した結果、転移リンパ節の正常領域組織、そして正常リンパ節組織には、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの発現が確認された (図 27、28)。 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンは、RGD 配列を認識するインテグリンとして分類されており、腫瘍血管新生において必要不可欠なメディエーターとしても報告されている[59,60]。これらの実験結果より、転移リンパ節においては、腫瘍新生血管上の $\alpha v\beta 3$ インテグリン、腫瘍組織に発現している $\alpha v\beta 5$ インテグリン、転移リンパ節正常領域に発現している $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの3つをターゲットとした結果、cRGD-CDDP/m の投与早期における著明な腫瘍集積によって、腫瘍組織におけるがん幹細胞の発現を低下させる事で、転移リンパ節への優れた抗腫瘍効果を発揮したものと考えられた。また、腫瘍特異的 (選択的) な薬剤送達を目指す DDS 製剤の開発においては、正常臓器に対する薬剤集積はあまり好ましくないと考えられているが、リンパ節の場

合はたとえ正常リンパ節であったとしても、ある程度の薬剤集積はあった方が
良いと考えている。なぜなら、cRGD-CDDP/m が投与早期に正常リンパ節に集
積し、リンパ管、そして血管を還流している微量ながん細胞を駆逐する事で、
正常リンパ節への転移成立阻止を期待できるためである。頭頸部癌の原発巣評
価、転移リンパ節検索には、標準的な画像診断法として造影 CT
(Contrast-Enhanced Computed Tomography : CECT) 検査を用いて評価する事が
多いが[61-64]、リンパ節における微小転移については、CECT 検査にて検出で
きない場合もしばしば認められ、更には、手術摘出検体において病理組織学的
に転移陰性と診断されたリンパ節のうち、21%に p53 の変異が検出されたと報
告している[65]。この事から、特に早期舌癌のハイリスク群においては、生存
率の向上に寄与するとの理由から、CECT 検査にて頸部リンパ節転移が認めら
れない場合においても予防的頸部郭清術が施行されている[66-68]。この予防的
頸部郭清術の施行によって、術後の郭清領域におけるリンパ節転移の可能性は
無くなるが、郭清領域範囲外の潜在的転移が 9~10%程度認められる事が報告
されており[69-71]、加えて、術後機能障害や合併症の可能性もある事から[72]、
その施行については一定した見解は得られていない。そこで、リンパ節への集
積性（転移リンパ節>正常リンパ節）に優れた cRGD-CDDP/m の全身投与によ

り、転移リンパ節における抗腫瘍効果のみならず、正常リンパ節におけるがん細胞の駆逐により転移成立を阻止する効果があると考えられ、将来的に cRGD-CDDP/m が臨床現場で使用される事になれば、早期舌癌の治療戦略において予防的頸部郭清術と同等の効果が得られるのでは無いかと期待される。

これまで我々の研究室では、主にパッシブターゲティング型のミセル製剤の難治性がんに対する効果を検証してきた。CDDP/m は、エンドサイトーシスにより腫瘍細胞内に取り込まれ、核近傍で高濃度の薬剤を放出する事により、細胞膜表面における膜輸送タンパク質の薬剤排出機構（薬剤耐性機構）を回避できる事が示されており [73-75]、また、CDDP 投与によりインテグリンや matrix metalloproteinases (MMPs) などのがん細胞の浸潤や転移に関連する遺伝子群が過剰発現するのに対し、CDDP/m 投与ではそれらの発現が抑制される事も知られている [57]。したがって、抗がん剤内包高分子ミセル製剤により耐性、転移を克服できる可能性も期待できるが、悪性度の高い脳腫瘍（膠芽腫）においては、それ自身の持つ悪性度に加え血液脳関門による薬剤移行制御機構により、十分な抗腫瘍効果が得られていないのが現状であった。そこで、膠芽腫組織に過剰発現が確認されている $\alpha v \beta 3$ インテグリン、 $\alpha v \beta 5$ インテグリンをターゲットとする事で血液脳関門の薬剤通過効率を向上させる目的から、cRGD 搭載抗

がん剤内包高分子ミセルの開発が行われ、cRGD-DACHPt/m、cRGD 搭載エピル
ビシン内包高分子ミセル (cRGD-Epi/m) の膠芽腫に対する高い抗腫瘍効果が確
認されている[26, 76]。これら cRGD 非搭載型の DACHPt/m、Epi/m については、
現在第 I 相臨床試験まで進んでおり、悪性度の高い脳腫瘍治療薬として、
cRGD-DACHPt/m、cRGD-Epi/m の早期の臨床応用が期待される。頭頸部扁平上
皮癌治療においては、現在も CDDP が key drug として使用されているが、
CDDP/m は、粒径が 30nm に制御されており腎糸球体では濾過されない事から、
急性腎不全をもたらす CDDP 量と同量の CDDP/m を投与したとしても、腎機能
が正常である事が明らかとなっている[58]。その結果、CDDP/m 治療の際には
腎保護のため水負荷をする必要が無く、外来にて安全にかつ高用量の CDDP/m
を投与する事が可能となり[77]、社会生活を継続しながらがん治療をする事で、
患者本人の経済的負担、並びに副作用対策医療費の軽減が期待され、患者の
QOL、医療経済の側面においても多大なメリットがもたらされると考えている。
その一方で CDDP/m は、free drug である CDDP と比較し薬剤投与後よりゆっく
りと肝臓に集積する傾向が認められており[56]、同様の白金系抗がん剤内包高
分子ミセルである DACHPt/m においても、同じような緩徐な肝臓集積性が確認
されている[26]。この DACHPt/m に cRGD を搭載した cRGD-DACHPt/m は、速

やかに肝臓に集積し、薬剤投与後 8 時間でピークを迎え、その後速やかに肝臓から排出される事が明らかとなっている[26]。cRGD-CDDP/m の肝臓への集積性については、本研究において検討はしていないが、cRGD-DACHPt/m と同様の生体内挙動を取る事が考えられ、cRGD リガンド搭載によるアクティブターゲティングにより、正常組織への蓄積が減少する効果が期待できると推察される。この EPR 効果とリガンド効果を併せ持つ cRGD-CDDP/m の頭頸部扁平上皮癌の臨床応用により、有害事象が少なくかつ腫瘍選択的な薬剤投与が可能となる事で、社会生活を継続しながらも高い治療効果を享受できると考えている。

cRGD 非搭載型の CDDP/m については、現在第Ⅲ相臨床試験まで進んでいる事から、DACHPt/m、Epi/m と比較し一番臨床応用に近い薬剤であり、特に転移に対する効果が期待される cRGD-CDDP/m が製剤化され臨床応用される日はそう遠くは無いと考えている。

6. 総括

本研究では、従来型の EPR 効果を利用したパッシブターゲティング（受動的ターゲティング）型の抗がん剤内包高分子ミセルをさらに改良し、腫瘍細胞や新生血管において過剰発現している $\alpha v\beta 3$ インテグリン、 $\alpha v\beta 5$ インテグリンをターゲットとするアクティブターゲティング（能動的ターゲティング）型の抗がん剤内包シスプラチンミセルを開発し、難治性頭頸部扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果を検証した。リンパ節高転移能を有するヒト舌癌細胞株である SAS-L1-Luc 細胞株には、 $\alpha v\beta 5$ インテグリンと CD44v9 が共発現しており、cRGD-CDDP/m が $\alpha v\beta 5$ インテグリンを介し、CD44v9 の発現を有意に減少させる事が明らかとなり、転移、再発に関係するがん幹細胞マーカーの一つである CD44v9 に効果的に作用する事が示された。また、同所舌腫瘍、転移リンパ節における cRGD-CDDP/m と CDDP/m の薬剤集積性は、CDDP の薬剤集積性と比較しはるかに優れており、特に cRGD-CDDP/m は CDDP/m に比し薬剤投与早期より優れた腫瘍組織への薬剤集積性を示した。特に転移リンパ節においては、薬剤投与早期における cRGD-CDDP/m の劇的な薬剤集積性が認められており、その結果、転移リンパ節に対する抗腫瘍効果、転移抑制効果に優れており、ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルの生存期間の延長が認められた。

アクティブターゲティング型の抗がん剤内包高分子ミセルは、ミセルに搭載するリガンド分子の種類により、多種多様な標的志向性を付与する事が可能となる。本研究では、CDDP/m に cRGD をリガンドとして搭載する事で、SAS-L1-Luc 細胞株に発現する $\alpha\beta 5$ インテグリン、腫瘍新生血管内皮細胞に発現する $\alpha\beta 3$ インテグリン、転移リンパ節の正常領域に発現する $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの3つがターゲット可能となり、特にリンパ節転移に対する治療効果が向上する事を立証した。現在頭頸部扁平上皮癌治療において、リンパ節への微小転移については、術前画像検査にて検出できない場合もしばしば認められ、早期舌癌のハイリスク群においては予防的頸部郭清術が施行されている。今後 cRGD-CDDP/m が臨床応用される場合には、転移リンパ節における抗腫瘍効果のみならず、微小転移の可能性のあるリンパ節における転移成立阻止効果により、頭頸部扁平上皮癌の治療戦略において既存の予防的頸部郭清術に取って代わる革新的な DDS 製剤となる事が期待される。

7. 掲載論文

1. K. Miyano, H. Cabral, Y. Miura, Y. Matsumoto, Y. Mochida, H. Kinoh, C. Iwata, O. Nagano, H. Saya, N. Nishiyama, K. Kataoka, T. Yamasoba, cRGD peptide installation on cisplatin-loaded nanomedicines enhances efficacy against locally advanced head and neck squamous cell carcinoma bearing cancer stem-like cells, J Control Release, 261, 275-286, 2017.

8. 引用文献

- [1] C. Fitzmaurice, D. Dicker, A. Pain, H. Hamavid, M. Moradi-Lakeh, M.F. MacIntyre, C. Allen, G. Hansen, R. Woodbrook, C. Wolfe, R.R. Hamadeh, A. Moore, A. Werdecker, B.D. Gessner, B. Te Ao, B. McMahon, C. Karimkhani, C. Yu, G.S. Cooke, D.C. Schwebel, D.O. Carpenter, D.M. Pereira, D. Nash, D.S. Kazi, D. De Leo, D. Plass, K.N. Ukwaja, G.D. Thurston, K. Yun Jin, E.P. Simard, E. Mills, E.K. Park, F. Catalá-López, G. deVeber, C. Gotay, G. Khan, H.D. Hosgood, I.S. Santos, J.L. Leasher, J. Singh, J. Leigh, J. Jonas, J. Sanabria, J. Beardsley, K.H. Jacobsen, K. Takahashi, R.C. Franklin, L. Ronfani, M. Montico, L. Naldi, M. Tonelli, J. Geleijnse, M. Petzold, M.G. Shrimme, M. Younis, N. Yonemoto, N. Breitborde, P. Yip, F. Pourmalek, P.A. Lotufo, A. Esteghamati, G.J. Hankey, R. Ali, R. Lunevicius, R. Malekzadeh, R. Dellavalle, R. Weintraub, R. Lucas, R. Hay, D. Rojas-Rueda, R. Westerman, S.G. Sepanlou, S. Nolte, S. Patten, S. Weichenthal, S.F. Abera, S.M. Fereshtehnejad, I. Shiue, T. Driscoll, T. Vasankari, U. Alsharif, V. Rahimi-Movaghar, V.V. Vlassov, W.S. Marcenes, W. Mekonnen, Y.A. Melaku, Y. Yano, A. Artaman, I. Campos, J. MacLachlan, U. Mueller, D. Kim, M. Trillini, B. Eshrati, H.C. Williams, K. Shibuya, R. Dandona, K. Murthy, B. Cowie, A.T. Amare, C.A. Antonio, C. Castañeda-Orjuela, C.H. van Gool, F. Violante,

I.H. Oh, K. Deribe, K. Soreide, L. Knibbs, M. Kereselidze, M. Green, R. Cardenas, N. Roy, T. Tillman, Y. Li, H. Krueger, L. Monasta, S. Dey, S. Sheikhabaei, N. Hafezi-Nejad, G.A. Kumar, C.T. Sreeramareddy, L. Dandona, H. Wang, S.E. Vollset, A. Mokdad, J.A. Salomon, R. Lozano, T. Vos, M. Forouzanfar, A. Lopez, C. Murray, M. Naghavi, G.B.o.D.C. Collaboration, The Global Burden of Cancer 2013, *JAMA Oncol*, 1, 505-527, 2015.

[2] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int J Cancer*, 136, E359-386, 2015.

[3] S. Warnakulasuriya, Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer, *Oral Oncol*, 45, 309-316, 2009.

[4] A.A. Forastiere, H. Goepfert, M. Maor, T.F. Pajak, R. Weber, W. Morrison, B. Glisson, A. Trotti, J.A. Ridge, C. Chao, G. Peters, D.J. Lee, A. Leaf, J. Ensley, J. Cooper, Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer, *N Engl J Med*, 349, 2091-2098, 2003.

[5] G. Calais, M. Alfonsi, E. Bardet, C. Sire, T. Germain, P. Bergerot, B. Rhein, J. Tortochaux, P. Oudinot, P. Bertrand, Randomized trial of radiation therapy versus

concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma, *J Natl Cancer Inst*, 91, 2081-2086, 1999.

[6] S. Kano, A. Homma, R. Hayashi, K. Kawabata, K. Yoshino, S. Iwae, Y. Hasegawa, K. Nibu, T. Kato, K. Shiga, K. Matsuura, N. Monden, M. Fujii, Matched-pair analysis in patients with advanced oropharyngeal cancer: surgery versus concurrent chemoradiotherapy, *Oncology*, 84, 290-298, 2013.

[7] A.A. Forastiere, Q. Zhang, R.S. Weber, M.H. Maor, H. Goepfert, T.F. Pajak, W. Morrison, B. Glisson, A. Trotti, J.A. Ridge, W. Thorstad, H. Wagner, J.F. Ensley, J.S. Cooper, Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer, *J Clin Oncol*, 31, 845-852, 2013.

[8] K.K. Ang, Q. Zhang, D.I. Rosenthal, P.F. Nguyen-Tan, E.J. Sherman, R.S. Weber, J.M. Galvin, J.A. Bonner, J. Harris, A.K. El-Naggar, M.L. Gillison, R.C. Jordan, A.A. Kanski, W.L. Thorstad, A. Trotti, J.J. Beitler, A.S. Garden, W.J. Spanos, S.S. Yom, R.S. Axelrod, Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522, *J Clin Oncol*, 32, 2940-2950, 2014.

[9] J.P. Pignon, A. le Maître, E. Maillard, J. Bourhis, M.-N.C. Group, Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients, *Radiother Oncol*, 92, 4-14, 2009.

[10] D.J. Adelstein, Y. Li, G.L. Adams, H. Wagner, J.A. Kish, J.F. Ensley, D.E. Schuller, A.A. Forastiere, An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer, *J Clin Oncol*, 21, 92-98, 2003.

[11] J.B. Vermorken, R. Mesia, F. Rivera, E. Remenar, A. Kawecki, S. Rottey, J. Erfan, D. Zabolotnyy, H.R. Kienzer, D. Cupissol, F. Peyrade, M. Benasso, I. Vynnychenko, D. De Raucourt, C. Bokemeyer, A. Schueler, N. Amellal, R. Hitt, Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer, *N Engl J Med*, 359, 1116-1127, 2008.

[12] R. Mesía, F. Rivera, A. Kawecki, S. Rottey, R. Hitt, H. Kienzer, D. Cupissol, D. De Raucourt, M. Benasso, P. Koralewski, J.P. Delord, C. Bokemeyer, D. Curran, A. Gross, J.B. Vermorken, Quality of life of patients receiving platinum-based chemotherapy plus cetuximab first line for recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck, *Ann Oncol*, 21, 1967-1973, 2010.

[13] 伸. 折館, 薬力学の知識とドラッグデリバリーシステム がん治療薬の投与と副作用 頭頸部がん治療薬の使い方と副作用, 日本耳鼻咽喉科学会会報, 120, 866-872, 2017.

[14] A.M. Chen, B.Q. Li, D.H. Lau, D.G. Farwell, Q. Luu, K. Stuart, K. Newman, J.A. Purdy, S. Vijayakumar, Evaluating the role of prophylactic gastrostomy tube placement prior to definitive chemoradiotherapy for head and neck cancer, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 78, 1026-1032, 2010.

[15] M. Machtay, J. Moughan, A. Trotti, A.S. Garden, R.S. Weber, J.S. Cooper, A. Forastiere, K.K. Ang, Factors associated with severe late toxicity after concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer: an RTOG analysis, *J Clin Oncol*, 26, 3582-3589, 2008.

[16] M. Machtay, J. Moughan, A. Farach, E. Martin-O'Meara, J. Galvin, A.S. Garden, R.S. Weber, J.S. Cooper, A. Forastiere, K.K. Ang, Hypopharyngeal dose is associated with severe late toxicity in locally advanced head-and-neck cancer: an RTOG analysis, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 84, 983-989, 2012.

[17] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance, *Adv Drug Deliv Rev*, 47, 113-131,

2001.

[18] Y. Matsumura, H. Maeda, A NEW CONCEPT FOR MACROMOLECULAR THERAPEUTICS IN CANCER-CHEMOTHERAPY - MECHANISM OF TUMORITROPIC ACCUMULATION OF PROTEINS AND THE ANTITUMOR AGENT SMANCS, *Cancer Research*, 46, 6387-6392, 1986.

[19] N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Cabral, M. Miyamoto, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Nishio, Y. Matsumura, K. Kataoka, Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice, *Cancer Res*, 63, 8977-8983, 2003.

[20] H. Cabral, N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Koyama, K. Kataoka, Preparation and biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt)-loaded polymeric micelles, *J Control Release*, 101, 223-232, 2005.

[21] N. Nishiyama, K. Kataoka, Preparation and characterization of size-controlled polymeric micelle containing cis-dichlorodiammineplatinum(II) in the core, *J Control Release*, 74, 83-94, 2001.

[22] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M.R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends

on size, *Nat Nanotechnol*, 6, 815-823, 2011.

[23] F. Danhier, A. Le Breton, V. Preat, RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis, *Molecular Pharmaceutics*, 9, 2961-2973, 2012.

[24] G.C. Tucker, Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy, *Curr Opin Investig Drugs*, 4, 722-731, 2003.

[25] R.O. Hynes, A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis, *Nature Medicine*, 8, 918-921, 2002.

[26] Y. Miura, T. Takenaka, K. Toh, S.R. Wu, H. Nishihara, M.R. Kano, Y. Ino, T. Nomoto, Y. Matsumoto, H. Koyama, H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Cyclic RGD-Linked Polymeric Micelles for Targeted Delivery of Platinum Anticancer Drugs to Glioblastoma through the Blood-Brain Tumor Barrier, *Acs Nano*, 7, 8583-8592, 2013.

[27] S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors, *J Am Chem Soc*, 135, 15501-15507, 2013.

[28] J. Ahn, Y. Miura, N. Yamada, T. Chida, X. Liu, A. Kim, R. Sato, R. Tsumura, Y. Koga, M. Yasunaga, N. Nishiyama, Y. Matsumura, H. Cabral, K. Kataoka, Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer, *Biomaterials*, 39, 23-30, 2015.

[29] E.E. Bar, A. Chaudhry, A. Lin, X. Fan, K. Schreck, W. Matsui, S. Piccirillo, A.L. Vescovi, F. DiMeco, A. Olivi, C.G. Eberhart, Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma, *Stem Cells*, 25, 2524-2533, 2007.

[30] O.H. Yilmaz, R. Valdez, B.K. Theisen, W. Guo, D.O. Ferguson, H. Wu, S.J. Morrison, Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells, *Nature*, 441, 475-482, 2006.

[31] A. Soeda, A. Inagaki, N. Oka, Y. Ikegame, H. Aoki, S. Yoshimura, S. Nakashima, T. Kunisada, T. Iwama, Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells, *J Biol Chem*, 283, 10958-10966, 2008.

[32] A. Dubrovskaya, S. Kim, R.J. Salamone, J.R. Walker, S.M. Maira, C. García-Echeverría, P.G. Schultz, V.A. Reddy, The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations, *Proc Natl*

Acad Sci U S A, 106, 268-273, 2009.

[33] L.J. Harper, K. Piper, J. Common, F. Fortune, I.C. Mackenzie, Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma, *J Oral Pathol Med*, 36, 594-603, 2007.

[34] M.E. Prince, R. Sivanandan, A. Kaczorowski, G.T. Wolf, M.J. Kaplan, P. Dalerba, I.L. Weissman, M.F. Clarke, L.E. Ailles, Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 973-978, 2007.

[35] K.K. Tanabe, L.M. Ellis, H. Saya, Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases, *Lancet*, 341, 725-726, 1993.

[36] T. Gotoda, Y. Matsumura, H. Kondo, H. Ono, A. Kanamoto, H. Kato, H. Watanabe, Y. Tachimori, Y. Nakanishi, T. Kakizoe, Expression of CD44 variants and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma, *Gut*, 46, 14-19, 2000.

[37] S. Wang, G. Wong, A. de Heer, W. Xia, L. Bourguignon, CD44 Variant Isoforms in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression, *Laryngoscope*, 119, 1518-1530, 2009.

[38] T. Ishimoto, O. Nagano, T. Yae, M. Tamada, T. Motohara, H. Oshima, M. Oshima,

T. Ikeda, R. Asaba, H. Yagi, T. Masuko, T. Shimizu, T. Ishikawa, K. Kai, E. Takahashi, Y. Imamura, Y. Baba, M. Ohmura, M. Suematsu, H. Baba, H. Saya, CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth, *Cancer Cell*, 19, 387-400, 2011.

[39] M. Yoshikawa, K. Tsuchihashi, T. Ishimoto, T. Yae, T. Motohara, E. Sugihara, N. Onishi, T. Masuko, K. Yoshizawa, S. Kawashiri, M. Mukai, S. Asoda, H. Kawana, T. Nakagawa, H. Saya, O. Nagano, xCT Inhibition Depletes CD44v-Expressing Tumor Cells That Are Resistant to EGFR-Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *Cancer Research*, 73, 1855-1866, 2013.

[40] T. Yae, K. Tsuchihashi, T. Ishimoto, T. Motohara, M. Yoshikawa, G.J. Yoshida, T. Wada, T. Masuko, K. Mogushi, H. Tanaka, T. Osawa, Y. Kanki, T. Minami, H. Aburatani, M. Ohmura, A. Kubo, M. Suematsu, K. Takahashi, H. Saya, O. Nagano, Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell, *Nat Commun*, 3, 883, 2012.

[41] M. Wang, Y. Miura, K. Tsuchihashi, K. Miyano, O. Nagano, M. Yoshikawa, A. Tanabe, J. Makino, Y. Mochida, N. Nishiyama, H. Saya, H. Cabral, K. Kataoka, Eradication of CD44-variant positive population in head and neck tumors through

controlled intracellular navigation of cisplatin-loaded nanomedicines, *Journal of Controlled Release*, 230, 26-33, 2016.

[42] H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Supramolecular Nanodevices: From Design Validation to Theranostic Nanomedicine*, *Accounts of Chemical Research*, 44, 999-1008, 2011.

[43] H. Cabral, M. Murakami, H. Hojo, Y. Terada, M.R. Kano, U. Chung, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted therapy of spontaneous murine pancreatic tumors by polymeric micelles prolongs survival and prevents peritoneal metastasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 11397-11402, 2013.

[44] H. Cabral, J. Makino, Y. Matsumoto, P. Mi, H.L. Wu, T. Nomoto, K. Toh, N. Yamada, Y. Higuchi, S. Konishi, M.R. Kano, H. Nishihara, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Systemic Targeting of Lymph Node Metastasis through the Blood Vascular System by Using Size-Controlled Nano carriers, *Acs Nano*, 9, 4957-4967, 2015.

[45] J. Makino, H. Cabral, Y. Miura, Y. Matsumoto, M. Wang, H. Kinoh, Y. Mochida, N. Nishiyama, K. Kataoka, cRGD-installed polymeric micelles loading platinum anticancer drugs enable cooperative treatment against lymph node metastasis, *J*

Control Release, 220, 783-791, 2015.

[46] W. Kawamura, Y. Miura, D. Kokuryo, K. Toh, N. Yamada, T. Nomoto, Y. Matsumoto, D. Sueyoshi, X. Liu, I. Aoki, M.R. Kano, N. Nishiyama, T. Saga, A. Kishimura, K. Kataoka, Density-tunable conjugation of cyclic RGD ligands with polyion complex vesicles for the neovascular imaging of orthotopic glioblastomas, *Sci Technol Adv Mater*, 16, 035004, 2015.

[47] W.M. Lau, E. Teng, H.S. Chong, K.A. Lopez, A.Y. Tay, M. Salto-Tellez, A. Shabbir, J.B. So, S.L. Chan, CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells, *Cancer Res*, 74, 2630-2641, 2014.

[48] A. Yamaguchi, T. Urano, T. Goi, M. Saito, K. Takeuchi, K. Hirose, G. Nakagawara, H. Shiku, K. Furukawa, Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients, *J Clin Oncol*, 14, 1122-1127, 1996.

[49] P.R. Prasetyanti, J.P. Medema, Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective, *Mol Cancer*, 16, 41, 2017.

[50] F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, L.A. Kunz-Schughart, Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up

again, *J Biotechnol*, 148, 3-15, 2010.

[51] T. Nomoto, Y. Matsumoto, K. Toh, R.J. Christie, K. Miyata, M. Oba, H. Cabral, M. Murakami, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Kataoka, [Evaluation of the dynamics of drug delivery systems (DDS) using intravital real-time confocal laser scanning microscopy], *Yakugaku Zasshi*, 132, 1347-1354, 2012.

[52] L.M. Salazar-Peláez, T. Abraham, A.M. Herrera, M.A. Correa, J.E. Ortega, P.D. Paré, C.Y. Seow, Vitronectin expression in the airways of subjects with asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *PLoS One*, 10, e0119717, 2015.

[53] J. Takagi, Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins, *Biochem Soc Trans*, 32, 403-406, 2004.

[54] J. Takagi, K. Strokovich, T.A. Springer, T. Walz, Structure of integrin $\alpha 5 \beta 1$ in complex with fibronectin, *EMBO J*, 22, 4607-4615, 2003.

[55] K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses, *Chemical Society Reviews*, 41, 2562-2574, 2012.

[56] N. Nishiyama, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Kataoka, Cisplatin-loaded polymer-metal complex micelle with time-modulated decaying property as a novel drug delivery

system, *Pharm Res*, 18, 1035-1041, 2001.

[57] N. Nishiyama, F. Koizumi, S. Okazaki, Y. Matsumura, K. Nishio, K. Kataoka, Differential gene expression profile between PC-14 cells treated with free cisplatin and cisplatin-incorporated polymeric micelles, *Bioconjug Chem*, 14, 449-457, 2003.

[58] H. Uchino, Y. Matsumura, T. Negishi, F. Koizumi, T. Hayashi, T. Honda, N. Nishiyama, K. Kataoka, S. Naito, T. Kakizoe, Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats, *Br J Cancer*, 93, 678-687, 2005.

[59] J.S. Desgrosellier, D.A. Cheresh, Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities, *Nature Reviews Cancer*, 10, 9-22, 2010.

[60] D. Cox, M. Brennan, N. Moran, Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 804-820, 2010.

[61] H.D. Curtin, H. Ishwaran, A.A. Mancuso, R.W. Dalley, D.J. Caudry, B.J. McNeil, Comparison of CT and MR imaging in staging of neck metastases, *Radiology*, 207, 123-130, 1998.

[62] A.D. King, G.M. Tse, A.T. Ahuja, E.H. Yuen, A.C. Vlantis, E.W. To, A.C. van Hasselt, Necrosis in metastatic neck nodes: diagnostic accuracy of CT, MR imaging,

and US, *Radiology*, 230, 720-726, 2004.

[63] A.D. King, G.M. Tse, E.H. Yuen, E.W. To, A.C. Vlantis, B. Zee, A.B. Chan, A.C. van Hasselt, A.T. Ahuja, Comparison of CT and MR imaging for the detection of extranodal neoplastic spread in metastatic neck nodes, *Eur J Radiol*, 52, 264-270, 2004.

[64] D.M. Yousem, P.M. Som, D.B. Hackney, F. Schwaibold, R.A. Hendrix, Central nodal necrosis and extracapsular neoplastic spread in cervical lymph nodes: MR imaging versus CT, *Radiology*, 182, 753-759, 1992.

[65] J.A. Brennan, L. Mao, R.H. Hruban, J.O. Boyle, Y.J. Eby, W.M. Koch, S.N. Goodman, D. Sidransky, Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck, *N Engl J Med*, 332, 429-435, 1995.

[66] T. Song, N. Bi, L. Gui, Z. Peng, Elective neck dissection or "watchful waiting": optimal management strategy for early stage N0 tongue carcinoma using decision analysis techniques, *Chin Med J (Engl)*, 121, 1646-1650, 2008.

[67] A.J. Fasunla, B.H. Greene, N. Timmesfeld, S. Wiegand, J.A. Werner, A.M. Sesterhenn, A meta-analysis of the randomized controlled trials on elective neck dissection versus therapeutic neck dissection in oral cavity cancers with clinically

node-negative neck, *Oral Oncol*, 47, 320-324, 2011.

[68] A.K. D'Cruz, R. Vaish, N. Kapre, M. Dandekar, S. Gupta, R. Hawaldar, J.P. Agarwal, G. Pantvaitya, D. Chaukar, A. Deshmukh, S. Kane, S. Arya, S. Ghosh-Laskar, P. Chaturvedi, P. Pai, S. Nair, D. Nair, R. Badwe, H.a.N.D.M. Group, Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer, *N Engl J Med*, 373, 521-529, 2015.

[69] J.P. Shah, Patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinomas of the upper aerodigestive tract, *Am J Surg*, 160, 405-409, 1990.

[70] R.M. Byers, R.S. Weber, T. Andrews, D. McGill, R. Kare, P. Wolf, Frequency and therapeutic implications of "skip metastases" in the neck from squamous carcinoma of the oral tongue, *Head Neck*, 19, 14-19, 1997.

[71] S.J. Crean, A. Hoffman, J. Potts, M.J. Fardy, Reduction of occult metastatic disease by extension of the supraomohyoid neck dissection to include level IV, *Head Neck*, 25, 758-762, 2003.

[72] H. Inoue, K. Nibu, M. Saito, N. Otsuki, H. Ishida, T. Onitsuka, T. Fujii, K. Kawabata, M. Saikawa, Quality of life after neck dissection, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 132, 662-666, 2006.

[73] T. Minko, P. Kopecková, J. Kopecek, Comparison of the anticancer effect of free and HPMA copolymer-bound adriamycin in human ovarian carcinoma cells, *Pharm Res*, 16, 986-996, 1999.

[74] T. Minko, P. Kopecková, J. Kopecek, Efficacy of the chemotherapeutic action of HPMA copolymer-bound doxorubicin in a solid tumor model of ovarian carcinoma, *Int J Cancer*, 86, 108-117, 2000.

[75] Y. Miyamoto, T. Oda, H. Maeda, Comparison of the cytotoxic effects of the high- and low-molecular-weight anticancer agents on multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells in vitro, *Cancer Res*, 50, 1571-1575, 1990.

[76] S. Quader, X. Liu, Y. Chen, P. Mi, T. Chida, T. Ishii, Y. Miura, N. Nishiyama, H. Cabral, K. Kataoka, cRGD peptide-installed epirubicin-loaded polymeric micelles for effective targeted therapy against brain tumors, *J Control Release*, 258, 56-66, 2017.

[77] R. Plummer, R.H. Wilson, H. Calvert, A.V. Boddy, M. Griffin, J. Sludden, M.J. Tilby, M. Eatock, D.G. Pearson, C.J. Ottley, Y. Matsumura, K. Kataoka, T. Nishiya, A Phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours, *Br J Cancer*, 104, 593-598, 2011.

9. 謝辞

この研究を遂行するにあたり、沢山の方々からご指導とご鞭撻を頂き、大変感謝しております。山唄達也教授（東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚・運動機能医学講座耳鼻咽喉科学分野）には、ドラッグデリバリーシステムをテーマとした研究の機会を与えて頂き、本研究の全ての過程においてご助言を賜ることが出来ました。心より感謝致します。片岡一則名誉教授（東京大学大学院工学系研究科）には、ディスカッションの際に的確なご助言を賜り、常に私の研究をより良い研究にすべく、情熱的にご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。Horacio Cabral 准教授（東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻）、三浦裕助教（東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター臨床医工学部門）には、高分子ミセル、バイオ研究の基礎から研究手法、データ解析、論文執筆に至るまで、非常に細部まで丁寧にご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。西山伸宏教授（東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所）、松本有特任講師（東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚・運動機能医学講座耳鼻咽喉科学分野）、岩田要助教（東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻分子病理学分野）、喜納宏昭主幹研究員（ナノ医療イノベーションセンター片岡・喜納ラボ）、持田祐希主任研究員（ナノ医療

イノベーションセンター片岡・喜納ラボ)には、本研究を遂行するにあたり、
様々なご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。椋代義樹助教(昭和大学
歯学部口腔外科学講座)には、本研究の遂行に必要な不可欠な SAS-L1 細胞株、
SAS-L1-GFP 細胞株を分与して頂きました。心より感謝申し上げます。白鳥玲
子女史(ナノ医療イノベーションセンター企画・技術支援チーム)、小山宏子女
史(東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻カブラル研究室)
には、本研究を円滑に遂行するために、様々なご支援、ご配慮を頂きました。
心より感謝申し上げます。最後に、陰ながら本研学生活を支えてくれた家族に
心より感謝致します。