

博士論文

大腸癌肝転移に対する
ダハプラチン内包ミセル製剤の効果と副作用

仁禮 貴子

目次

要旨	P4
序文	P5
1. 大腸癌；疫学および全身化学療法	P5
2. 大腸癌治療におけるオキサリプラチンの重要性と問題点	P6
3. ナノ粒子化抗癌剤	P11
4. ダハプラチンミセルの特徴	P16
方法	P19
1. 材料	P19
2. ダハプラチンミセルの合成	P19
3. 細胞培養	P21
4. 実験動物	P22
5. ダハプラチンミセルの副作用および抗腫瘍効果についての検討	P22
5-1 マウスにおける肝転移モデルの作成	P22
5-2 ダハプラチンミセルの副作用についての検討	P26
5-3 ダハプラチンミセルの大腸癌肝転移に対する抗腫瘍効果の検討	P26
6. ダハプラチンミセルの腫瘍組織への集積についての検討	P27

6-1 実験プロトコール	P27
6-2 肝臓内 Pt 濃度測定方法	P29
7. 統計解析	P31
結果	P32
1. マウスにおける肝転移モデルの作成	P32
2. ダハプラチンミセルの副作用についての検討	P33
3. ダハプラチンミセルの大腸癌肝転移に対する抗腫瘍効果の検討	P38
4. ダハプラチンミセルの腫瘍組織への集積についての検討	P43
考察	P45
1. ダハプラチンミセルの副作用についての検討	P45
2. ダハプラチンミセルの大腸癌肝転移に対する抗腫瘍効果の検討	P46
3. ダハプラチンミセルの腫瘍組織への集積についての検討	P47
総括および今後の課題	P49
結論	P50
謝辞	P51
参考文献	P52

略語表 (アルファベット順)

略語	内容
AUC	Area Under the blood concentration-time Curve
Bv	Bevacizumab
CDDP	cisplatin
CPT-11	irinotecan
DACHPt	Dichloro(1,2-diamminocyclohexane) platinum(II)
DACHPt/m	DACHPt-loading micelle
DDS	drug delivery system
DMF	N,N-Dimethylformamide
EPR	enhanced permeability and retention
5-FU	5-fluorouracil
GOT	glutamic oxaloacetic transaminase
GPT	glutamic pyruvic transaminase
LV	leucovorin
PEG	poly(ethylene glycol)
PEG- <i>b</i> -PBLG	poly(ethylene glycol)- <i>b</i> -poly(γ -benzyl-L-glutamate)
PEG- <i>b</i> -p(Glu)	poly(ethylene glycol)- <i>b</i> -poly(glutamine)
PS	performance status
Pt	Platinum
QOL	quality of life

要旨

オキサリプラチンは大腸癌に対する抗癌剤として広く知られている一方で、さまざまな副作用がある。近年、抗癌剤をナノ粒子化することで、固形癌へ選択的に集積させる技術の臨床応用が進んでいる。本研究では、オキサリプラチンの活性錯体であるダハプラチンをナノ粒子化したダハプラチンミセルが、マウス大腸癌肝転移に対して、高い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。また、ダハプラチンミセル投与では、オキサリプラチン投与に比べて腎機能低下が少ないことを示した。従って、ダハプラチンミセルは、今後臨床に応用できる可能性がある。

序文

1. 大腸癌；疫学および全身化学療法

大腸癌は世界的な腫瘍統計の罹患率と死亡率の上位を占めており[1, 2]、我が国の厚生労働省ホームページの統計[3]でも、大腸癌は罹患数第1位であり、死亡数では肺癌について第2位となっている(表1)。大腸癌の治療方法には、主として外科療法、放射線療法、全身化学療法があるが、医師は患者一人一人の癌の進行度や合併症に合わせて最善の治療方法を選択することが重要である。根治切除が可能な大腸癌に対しては手術治療が第一選択となるが、切除不能・転移再発大腸癌に対しては全身化学療法や放射線治療を含む集学的治療がおこなわれる。切除不能・転移再発大腸癌の生存期間中央値は、現在約2年半まで延長してきたが[4]、十分な治療成績が得られていない症例も多い。大腸癌の有効な治療法を開発することは重要な課題である。

切除不能大腸癌に対する全身化学療法の歴史は、5-フルオロウラシル(5-FU)の投与により、大腸癌患者の生存期間延長が認められたことに始まった[5]。また、葉酸製剤ホリナート(ロイコボリン(LV))は、それ自体は抗腫瘍効果を持たないものの、5-FUと併用することで5-FUの抗腫瘍効果を増強することが示され、5-FUとLVとの併用が一般的となっている。切除不能大腸癌に対する化学

療法の変遷を図1に示した。1990年代後半に、大腸癌におけるイリノテカンの有効性が証明されると[6]、Douillardらは、FOLFIRI療法と呼ばれる5-FU+LV+イリノテカンの3剤併用療法を考案し、その有効性を証明した[7]。また2000年代には、イリノテカンの代わりにオキサリプラチンを用いた5-FU+LV+オキサリプラチンの3剤併用療法 (FOLFOX療法) の大腸癌に対する抗腫瘍効果が示された[8, 9]。

2. 大腸癌治療におけるオキサリプラチンの重要性と問題点

オキサリプラチンは白金系の抗癌剤であり1978年に本邦で開発され[10]、その後フランスで臨床応用された[11]。白金(Pt)は細胞内のDNA鎖と共有結合し、DNA内にPt-DNA架橋を形成することで、DNAの複製および転写を阻害する(図2)。オキサリプラチンは、単独では大腸癌に対する奏効率や生存期間の延長効果は高くないが[12, 13]、FOLFOX療法やFOLFIRI療法は分子標的薬との併用が、現在切除不能・転移再発大腸癌に対する第一選択薬としてNational Comprehensive Cancer Network (NCCN) や、ガイドラインや我が国の大腸癌治療ガイドラインで推奨されている[14- 17]。

表 1. 大腸癌の疫学

順位	罹患者数	順位	死亡者数
1位 大腸癌	135,800	1位 肺癌	77,200
2位 肺癌	133,500	2位 大腸癌	50,600
3位 胃癌	133,000	3位 胃癌	49,400
4位 前立腺癌	98,400	4位 膵癌	32,800
5位 乳癌	89,400	5位 肝臓癌	28,900

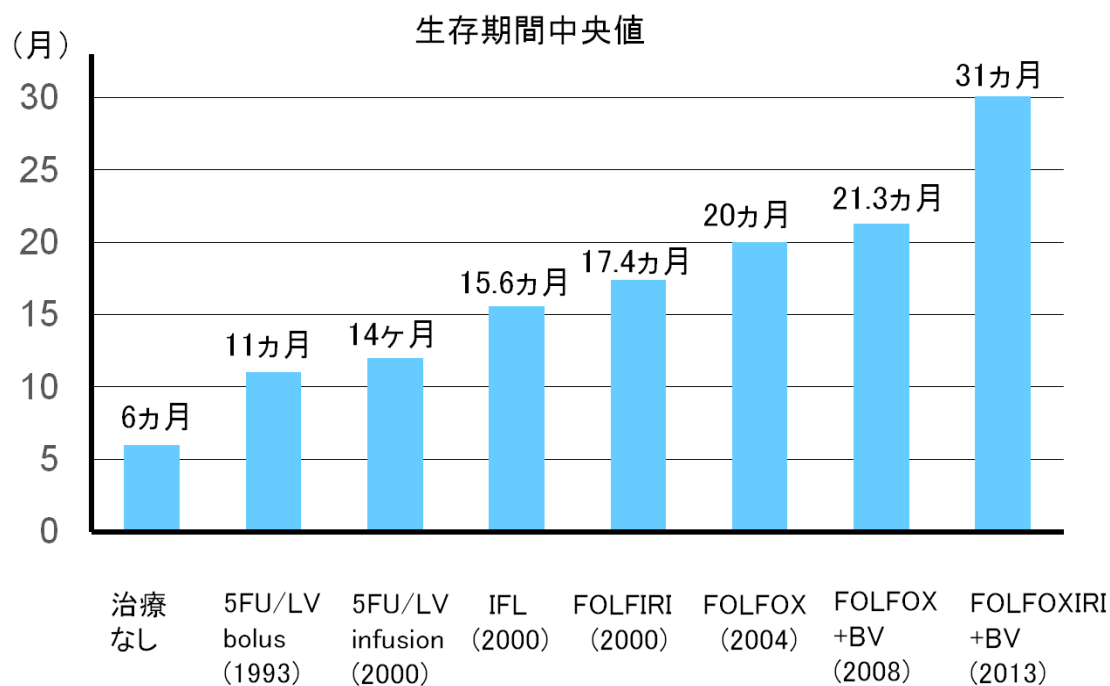


図 1. 切除不能大腸癌に対する化学療法の変遷

LV: ロイコボリン

IFL: 5-FU+イリノテカン

FOLFIRI: 5-FU+LV+イリノテカン

FOLFOX: 5-FU+LV+オキサリプラチン

BV: bevacizumab

FOLFOXIRI: 5-FU+LV+イリノテカン+オキサリプラチン

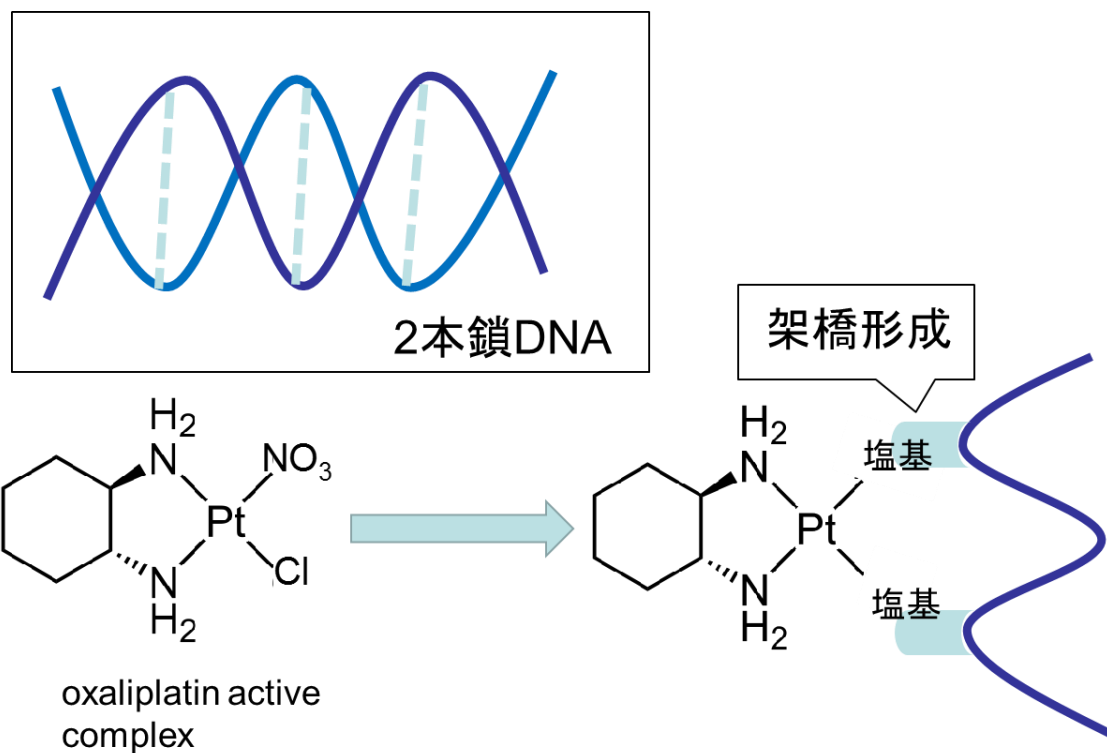


図2. オキサリプラチンによるDNA合成阻害

細胞分裂の際、細胞内で2本鎖DNAがほどけてそれぞれ複製されるが、オキサリプラチンの活性体 (oxaliplatin active complex) のPtが、DNAの塩基と結合しPt-DNA架橋構造を作ることによって、DNAの複製が阻害される。

切除不能大腸癌の遠隔転移臓器の内訳では肝臓が最多であるが[17]、FOLFOX療法に加えて分子標的治療薬の登場により、切除不能であった肝転移が化学療法後に切除可能となる報告が増加した[18]。一方で、全身化学療法には副作用があるため、Performance Status (PS) スコア(表2)においてPS 0～1以外の患者では、初めから全身化学療法の適応外となる場合がある。またPSが良好でも、治療中の副作用により患者のQuality of lifeの低下を招く事があり、十分な治療効果が得られない原因となっている。オキサリプラチンに特徴的な副作用としては、末梢神経毒性や、アナフィラキシー反応、ブルーリバー症候群などが知られている。特に、ブルーリバー症候群は、肝転移術前にFOLFOX療法を施行した患者の肝臓に肝類洞の異常拡張が起こる症候群であり、肝転移切除術の周術期リスクを増加させることが知られている[18]。

表2. Performance Status (PS) の日本語訳 (抜粋)

Score 定義

- 0 全く問題なく活動できる。
発病前と同じ日常生活が制限なく行える。
- 1 肉体的に激しい活動は制限されるが、歩行可能で、軽作業や座っての作業は行うことができる。
例：軽い家事、事務作業
- 2 歩行可能で自分の身の回りのことはすべて可能だが作業はできない。
日中の50%以上はベッド外で過ごす。
- 3 限られた自分の身の回りのことしかできない。日中の50%以上をベッドか椅子で過ごす。
- 4 全く動けない。
自分の身の回りのことは全くできない。
完全にベッドか椅子で過ごす。
-

3. ナノ粒子化抗癌剤

癌治療研究において、近年ナノテクノロジーが注目されている。従来の多くの抗癌剤は、体内で腫瘍組織と正常組織とに非選択的に拡散することで、癌細胞だけでなく全身の正常細胞にも毒性を示すため、さまざまな副作用を引き起こす。しかしドラッグデリバリーシステム(drug delivery system, DDS)により抗癌剤を腫瘍組織に選択的に輸送することができれば、副作用は軽減し、より効果的な抗腫瘍効果が期待できる。松村らは、固形癌に見られる新生血管が正常組織の血管とは異なり、血管内皮に広い間隙を持つため、粒径200 nm以下のナノ粒子に対して透過性が高いこと、また腫瘍組織ではリンパ系が未発達であるためナノ粒子が組織外へ排泄されにくい状態であることを示しenhanced permeability and retention effect (EPR効果) として報告した(図3) [19, 20]。特に粒径100 nm以下で親水性の表面をもつナノ粒子は、マクロファージによるクリアランスから逃れられ長期に血中を滞留し、EPR効果を利用したDDSに適していると報告された [21-23]。現在、リポソーム、高分子-薬剤複合体、ナノ粒子、デンドリマー、高分子ミセルなどがナノキャリアとして開発されており、中でも親水性のポリエチレングリコール (PEG) の外殻をもつ高分子ミセルは、EPR 効果を利用できるだけでなく、PEG鎖の運動性によって血中で酵素分解や免疫系細胞

からの食食を回避しやすいため、血液中を長く循環することができる[24, 25]。

現在、固形癌に対していくつかのポリエチレングリコール-ポリアミノ酸高分子ミセルを用いた抗癌剤の臨床試験が進行中である[26] (表3)。

オキサリプラチンは、生体内でシュウ酸基 ($-\text{COOH}$)² 基をクロライドイオン (Cl) に置換され、活性錯体であるダハプラチンとなる(図 4)。ダハプラチンは単独では水溶性が低く臨床の扱いが難しいとされているが[27, 28]、ポリエチレングリコール - ポリアミノ酸高分子ミセルの内包することでミセル化が可能となり、ダハプラチンミセルが開発された。

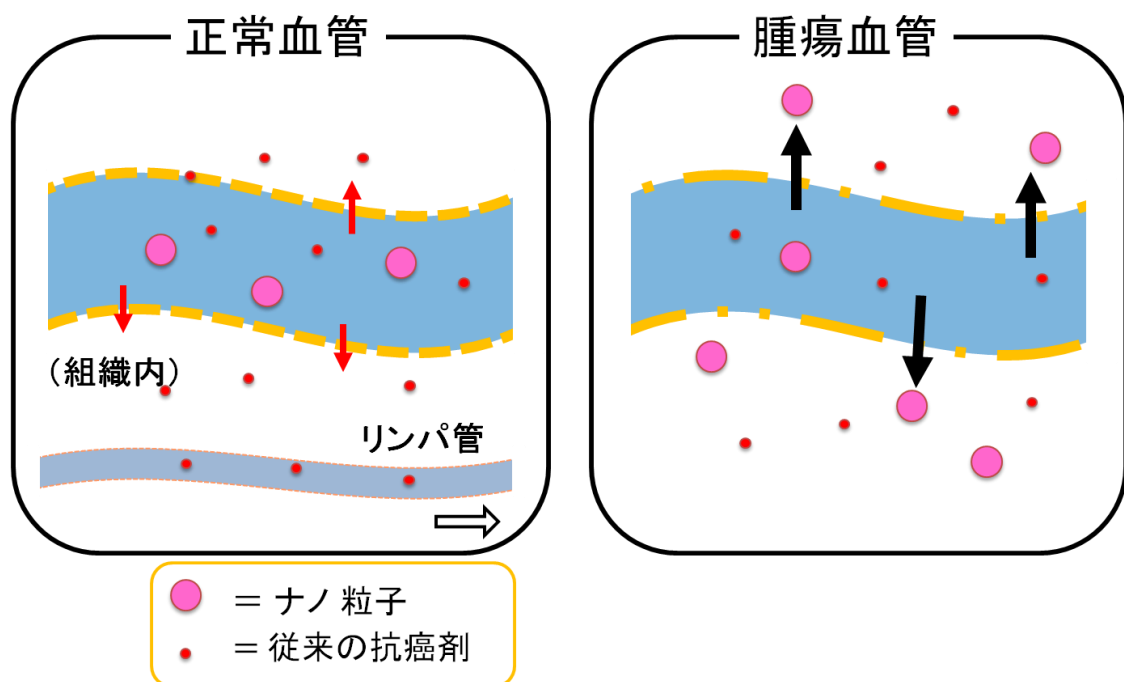


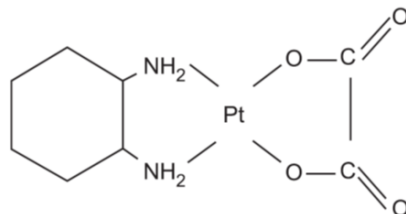
図 3. 正常血管と腫瘍血管の透過性の違い

腫瘍組織に存在する新生血管の血管壁は、正常組織血管にくらべ浸透性が高く、200 nm 以下の粒子は腫瘍組織に移行しやすい。また、リンパ系が未成熟であり、ナノ粒子は腫瘍組織にとどまりやすい。この性質を利用して、高分子ミセルに抗癌剤を内包し、腫瘍組織に選択的に輸送する方法が考案されている。

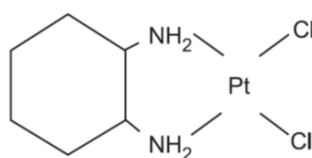
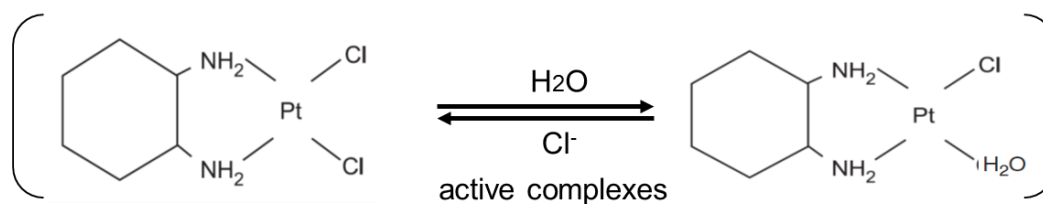
表 3. ポリエチレングリコール - ポリアミノ酸高分子ミセル

内包抗癌剤を用いた臨床試験

内包抗癌剤	ミセル化薬剤名	対象臓器	臨床試験
ドキソルビシン	NK911	転移性膵癌	第Ⅱ相試験
パクリタキセル	NK105	胃癌、乳癌	第Ⅲ相試験
SN-38	NK012	乳癌	第Ⅰ相試験
シスプラチン	NC-6004	膵癌	第Ⅱ相試験
ダハプラチン	NC-4016	多種の固形癌	第Ⅰ相試験
エピルビシン	NC-6300	多種の固形癌	



Trans-I DACH oxalato platinum(II): オキサリプラチン



Dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II): ダハプラチン

図 4. オキサリプラチンとダハプラチンの化学構造

および活性錯体

オキサリプラチンは体内でシュウ酸基(-COOH)₂ を放出して活性錯体 (active platinum complex) であるダハプラチンに変化する。

4. ダハプラチンミセルの特徴

今回ダハプラチンを内包するキャリアは、ポリエチレングリコール (PEG) とポリグルタミン酸からなる両親媒性のポリマーからなる PEG-P(Glu) block copolymer である。親水性の PEG ポリマーが外殻、疎水性のダハプラチンとポリグルタミン酸ポリマーが内核となり水に溶解する。ダハプラチンミセル (DACHPt/m) の構造を図 5 に示す。

血中投与後のミセル崩壊は時間依存性で徐々にすすみ、最終的にすべてのミセルが分解される。このとき、PEG の分解代謝産物は、polylactic acid と polyglycolic acid に分解され、生体内で代謝排泄される[29-31]。

ダハプラチンミセルの効果および薬物動態については、これまでさまざまな動物モデルで検討されているが、大腸癌、メラノーマ、膵臓癌の動物実験では、オキサリプラチンと比較しその優れた抗腫瘍効果が示された[32-37]。

蛍光標識を利用したミセルの細胞内動態の評価した報告では、ダハプラチンミセルはミセルの形状を維持したままエンドサイトーシスにより取り込まれ、細胞内 DNA の近くで後期エンドソームによりミセルから Pt が放出されるため、細胞質内の解毒酵素 MT1Q (metallothionein Q1)や MTR (metallothionein response) からの失活作用を受けにくいことが示唆された[32]。

これまで大腸癌に対するダハプラチンミセルの抗腫瘍効果の検討には、主にマウス大腸癌の皮下腫瘍モデルが使われてきた。しかし、抗癌剤の薬理作用は、原発巣と転移巣とではそれぞれ異なっており[38, 39]、ダハプラチンの臨床応用を考える上では、大腸癌の好発転移臓器である肝転移モデルでの実験が必要と考えられた。

本研究では、大腸癌肝転移に対するダハプラチンミセルの抗腫瘍効果および副作用について検討を行うことを目的として、マウス大腸癌肝転移モデルを確立し、ダハプラチンミセル投与の *in vivo* の効果、ならびにダハプラチンミセル投与後の Pt の肝臓内分布を、オキサリプラチン投与との比較し検討した。

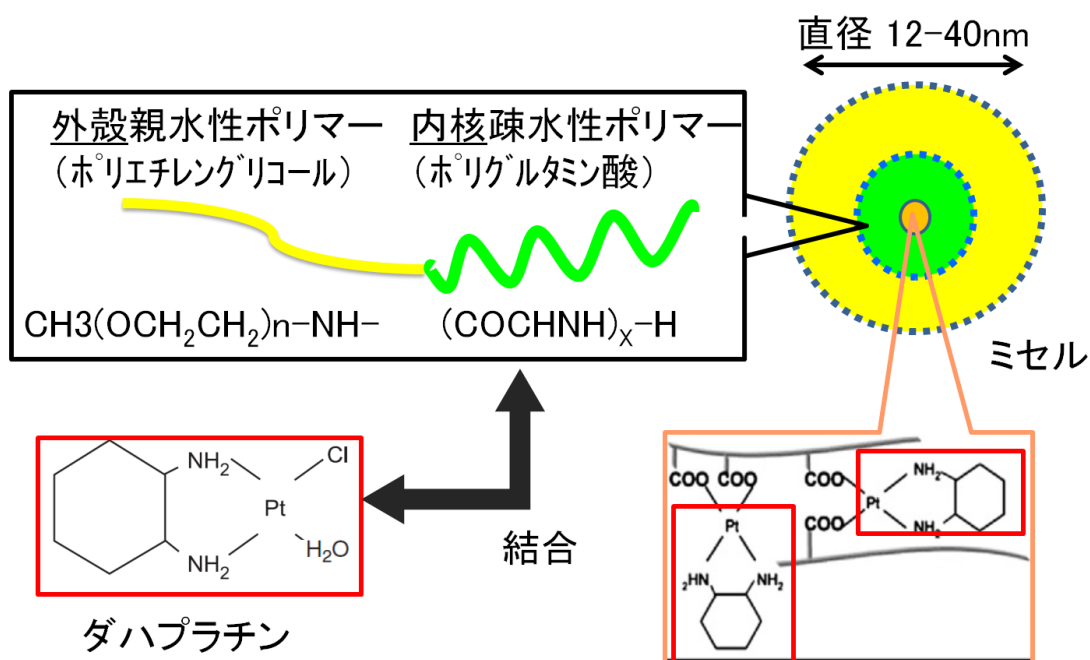


図 5. ダハプラチンミセルの構造

ダハプラチンはもともと疎水性であるため、グルタミン酸に結合して安定する。また、ミセルが血中内で安定して循環するためには、親水基の存在が必要であるが、グルタミン酸は親水性のエチレングリコールに結合している。

この単位が共重合して、ポリエチレングリコール (PEG) でできた親水性ポリマーがミセルの外壁に位置し、ポリグルタミン酸でできた疎水性の内核構成ポリマーが内核に位置するようなミセルが形成される。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(Lglutamic acid); PEG-*b*-P(Glu)) は、重合度を調整することで、ミセルの直径をある程度調整することが出来る。

方法

1. 材料

Oxaliplatin: (trans-1,2-cyclohexanediamine) oxalatoplatinum (II) は、東京化成工業株式会社（東京）から購入した。Dichloro (1,2-diamminocyclohexane) platinum (II) (DACHPt) ダハプラチンおよびAgNO₃は、Aldrich Chemical (Milwaukee, WI) より購入した。h-Benzyl l-glutamate は Sigma Chemical (St. Louis, MO) より購入した。Bis (trichloromethyl) carbonate (triphsogene) は東京化成工業株式会社から購入した。N,N-Dimethylformamide (DMF)は 和光純薬工業株式会社（東京）から購入した。a-Methoxy-N-aminopoly (ethylene glycol) (CH₃O-PEG-NH₂; Mw=12,000) は日本油脂株式会社(東京)から購入した。

2. ダハプラチンミセルの合成

先行研究において報告された手法[22]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(ethyleneglycol)-*b*-poly(Lglutamicacid) ;PEG-*b*-P(Glu))、PEG の分子量 12,000、P(Glu) の重合度 40、を合成した。ベンジル-L-グルタミン酸-N-カルボン酸無水物 (*N*-carboxyanhydride of -benzyl L-glutamate, BLG-NCA) をCH₃O-PEG-NH₂ の

アミノ基を開始剤としてDMF 中で重合し、ブロック共重合体 PEG-*b*-poly(γ -benzyl-L-glutamate) (PEG-*b*-PBLG) を合成した。PEG-*b*-PBLG の分子量分布を、カラムTSKgel G3000HHR, TSKgelG4000HHR (Tosoh) を用いたゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography, GPC) で調べたところ、およそ 1.16 となった。JEOL EX270 (日本電子株式会社、東京) を用いた、 ^1H NMR スペクトル (温度70°C、溶媒DMSO(dimethyldioxirane)-d6) において、ブロック共重合体のPEG のメチレンユニット(-CH₂CH₂-: $d = 3.7$ ppm) と、PBLG のフェニル基 (-CH₂C₆H₅: $d = 7.3$ ppm) のプロトン比を比較することにより、PEG-*b*-PBLG 中のPBLG の重合度は40 と確認された。重合体は室温下で0.5 N NaOH と混合することで脱保護し、ブロック共重合体PEG-*b*-P(Glu) が得られた。脱保護が完了したことは、 ^1H NMR により確かめた。

ダハプラチンミセルは、先行研究において報告された手法を用いて調製した [37]。ダハプラチンとジクロロ塩 (5 mM) を蒸留水中で懸濁し、硝酸銀と混合し ([AgNO₃]/[DACHPt]= 1)、25°C にて 24 時間反応させることでダハプラチンクロライドナイトレートを得た。生じた塩化銀沈殿は遠心により除いた。上澄みはさらに 0.22 μm フィルターに通すことにより精製した。その後、ダハプラチンクロライドナイトレート水溶液をブロック共重合体 PEG-*b*-P(Glu) と混合し

([Glu]= 5 mM、[DACHPt]/[Glu] = 1.0) 、120 時間反応させることによりダハプラチンミセルが得られた。ミセルは限外濾過(MWCO = 30,000 Da) により精製した。こうして調製したミセルは、Zetasizer NanoZS90 (Malvern、Worcs、英国) を用いた動的光散乱法により粒径分布を測定した。PEG-P(Glu) block copolymer micelles は、そのミセルサイズを生成の過程で調整できるが、マウス大腸癌皮下腫瘍モデルを用いた過去の文献では[36]、ダハプラチンミセルの粒子径平均が 40 nm (range: 12-40 nm)のものは他のサイズよりも皮下腫瘍組織へ集積が高い傾向であったと報告されていたため、本実験でも同じ 40 nm を用意した。また本研究では、ダハプラチンミセルの抗腫瘍効果を検討するにあたって、オキサリプラチンを対照群として用いたが、白金製抗癌剤の DNA 合成阻害は、Pt 量に比例することから、ダハプラチンミセルに内在する Pt 量と、オキサリプラチンに内在する Pt 量を同等になるよう調整し、プラチナベースで濃度 4 mg/ml として調整した。

3. 細胞培養

マウス大腸腺癌細胞株である Colon 26 を用いた。Colon 26 は、American Type Culture Collection (Denver, CO, USA) より購入した。これを 10% FCS, 100

units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 培養液で、37°C、5% CO₂ 気相下で培養し、subconfluence に達したのち EDTA とトリプシンにて剥離し、実験に使用した。

4. 実験動物

生後 6 週のマウス BALB/c マウス (specific pathogen free [SPF]/ virus antibody free)は、日本チャールズ・リバー株式会社(横浜)から購入した。マウスは恒温環境 (22 ± 1 °C)、SPF 条件下で、12 時間昼・12 時間夜の照明サイクルのもと、餌と水を自由に摂取できる環境で飼育した。全ての動物実験は東京大学の承認のもと、東京大学動物実験規則および東京大学動物実験実施マニュアルに基づき実施した。

5. ダハプラチンミセルの副作用および抗腫瘍効果についての検討

5-1. マウスにおける肝転移モデルの作成

マウスを用いた肝転移モデルは脾注モデルによって作成した。予備実験によって、脾臓に残った癌細胞が脾腫をおこしマウスが死亡したため、注入する癌細胞溶液を希釈し、かつ脾注 5 分後に脾摘を行うことにより、高率に安定し

たモデルが確立できた。

6週齢のメスの BALB/c マウスに、0.05 mL/body のペントバルビタール:0.9 % 生理食塩水 1:1 液を皮下注して全身麻酔を行い、左季肋下を 5 mm 切開して開腹し colon 26 マウス大腸癌細胞株を 1×10^4 個、約 200 μ l の PBS に攪拌して脾臓に直接 30G 針で緩徐に注射し、その後すばやく脾門部を 5-0 ナイロン糸で結紮して脾摘後閉腹した。前実験として、サンプル用のマウスを用意し、マウス大腸癌細胞株を注射し 14 日後に、マウスから肝臓を摘出して肝転移があることを肉眼的に確認した。肝転移個数のバラツキを考慮して、対照群、オキサリプラチン投与群、ダハプラチンミセル投与群の各群 20 匹ずつとした。対照群について、ダハプラチンをミセルの核に含まない状態ではミセルが安定化されず外殻のポリマーのみの投与は不可能であったため、生理食塩水投与を対照群とした。1 回投与量については、過去の文献から 6 mg/kg、8 mg/kg が over dose と考えられたため[35]、4 mg/kg の投与量で抗腫瘍効果が期待でき、かつ毒性が低いと考えられた。しかし過去の文献に基づいた予備実験において 2 日間隔に 4 mg/kg を投与した結果、マウスの多くが数日で死滅した。よって本実験ではミセルの崩壊速度と血液循環時間を参考に[35]、Colon26 細胞株脾注後、14 日目と 21 日目に、4 mg/kg の Pt を含む各薬剤を 200 μ l 尾静注で投与するスケジュール

とした。対照群では同じスケジュールで 200 μ l の生理食塩水を投与した。実験 28 日目にマウスを吸入麻酔下の心臓採血により犠牲死させ、肝臓や血液サンプルを採取した(図 6)。血液はヘパリン化し 15 分室温に静置した後、700g \times 5 分、4℃にて遠心し上清を分離した。

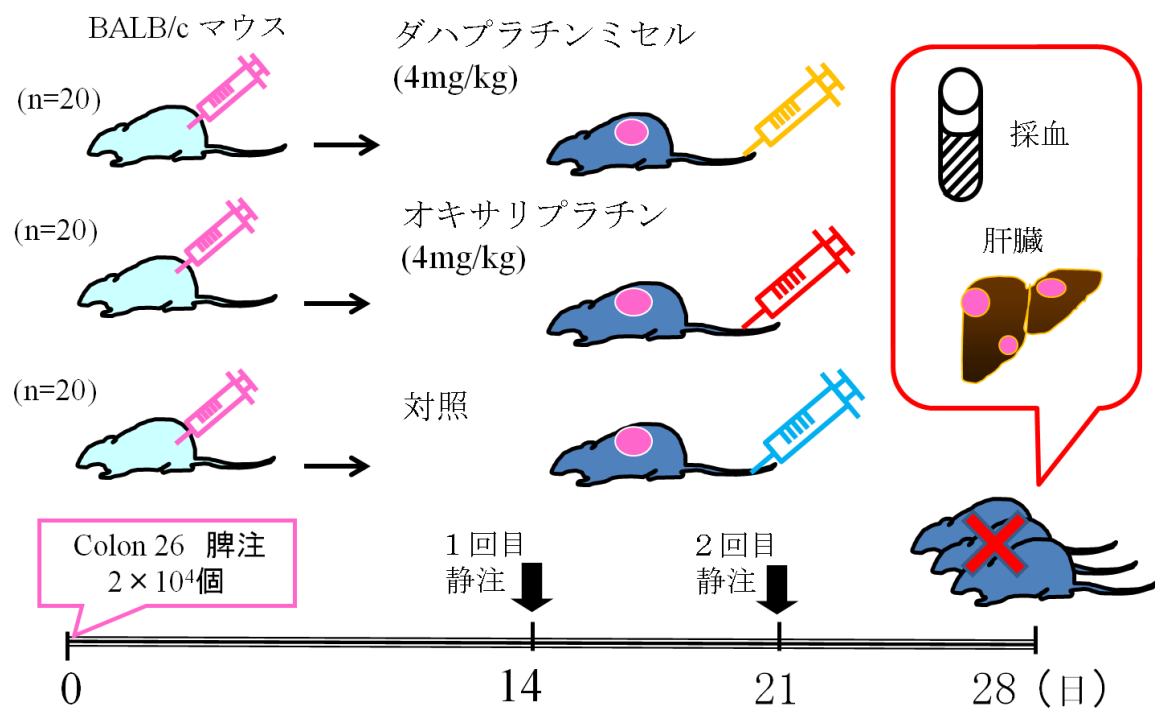


図 6. 大腸癌肝転移マウス実験の抗癌剤投与プロトコール

マウス脾臓にマウス大腸癌細胞株 Colon 26 を脾臓注射で投与したのち、脾摘を行った。14 日目と 21 日目に尾静注により各薬剤を投与した。第 28 日目にすべてのマウスを犠牲死させて、心臓採血と肝臓摘出を行った。

5-2 ダハプラチンミセルの副作用についての検討

実験中 1 週間ごとにマウスの体重を測定し、各群で比較した。

犠牲死時の血液サンプルから、紫外線吸光法 (LaboAssay™ Creatinine (和光純薬工業株式会社)を使用) にて Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT) , glutamic pyruvic transaminase (GPT) を測定した。また、酵素法 (Transaminase CII-Test (和光純薬工業株式会社)を使用) にて血清クレアチニン値を測定した。

5-3 ダハプラチンミセルの大腸癌肝転移に対する抗腫瘍効果の検討

実験 28 日目に肝臓表面から確認できる限りの肝臓腫瘍個数を記録し各群間で比較した。肝転移のある肝臓では、腫瘍が増大するほど、正常肝よりも重くなる傾向が強い。したがって、肝表面から計測できない転移結節を含めた腫瘍量の評価を考慮し、肝重量を各群間で比較した。

6. ダハプラチンミセルの腫瘍組織への集積についての検討

ダハプラチンミセルがマウス肝転移に対して高い抗腫瘍効果を発現するメカニズムを、薬剤投与後の薬効動態の観点から明らかにする目的で、正常肝臓マウス群と肝転移マウス群を新たに用意し、それぞれにオキサリプラチンまたはダハプラチンミセルを投与し解析を行った。詳細を以下に述べる。

6-1 実験プロトコール

生後 6 週のメス BALB/c マウスを準備し、10 匹に対しては Colon 26 細胞株をマウス 1 個体当たり、 1×10^5 個脾注したのち脾摘を行い、マウス肝転移モデルを作成した。残りの 10 匹は対照群として脾摘のみ行った。肝転移モデル 10 匹をランダムに 2 群に分けて、14 日目に Pt 換算で 4 mg/kg のオキサリプラチンまたはダハプラチンミセルを 1 回尾静注した。脾摘のみ行ったマウスも同様に 5 匹ずつ 2 群に分けて各薬剤を投与した。薬剤投与 24 時間後にマウスを犠牲死させ、肝臓を摘出し肝臓全体の Pt 含有量を肝重量で除したものを比較した。実験プロトコールを図 7 に示す。

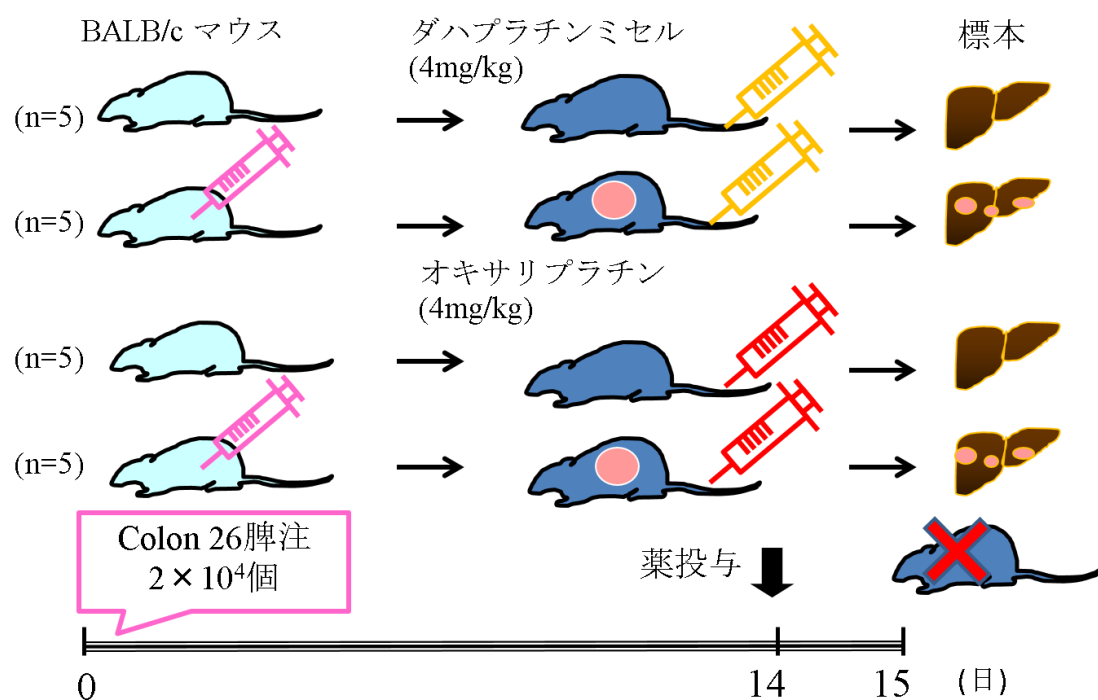


図 7. ダハプラチンミセルの腫瘍組織集積の

実験プロトコール

マウス脾臓にマウス大腸癌細胞株 Colon 26 を脾注で投与し第 14 日目に抗癌剤投与を 1 回行い、24 時間後に肝臓を摘出した。

6-2 肝臓内 Pt 濃度測定方法

Pt 含有量の測定方法は、同量の肝臓サンプルを抽出し、90%硝酸で加熱して分解し、乾燥後に 1%硝酸に再び溶解した。溶液の Pt 濃度は、誘導結合プラズマ質量分析法 (inductively-coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS, 4500 ICP-MS, ヒューレット・パッカード, CA, USA) により測定した (図 8)。

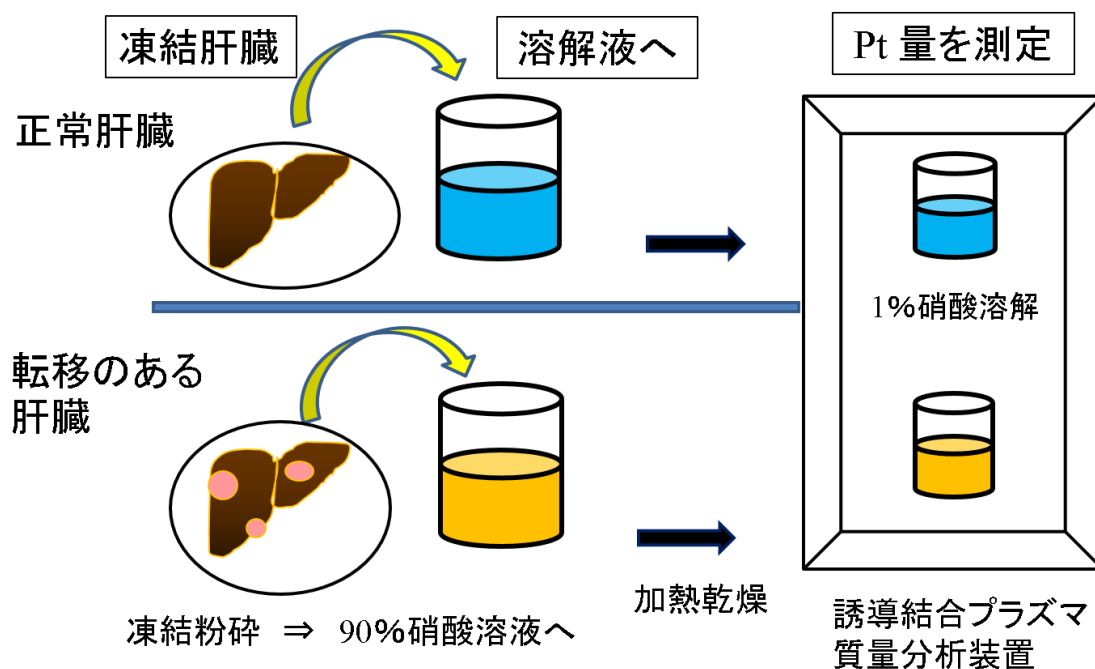


図 8. 肝臓内の Pt 濃度測定方法

各肝臓からそれぞれ同質量のサンプルを抽出し、90%硝酸で分解処理し、乾燥後に 1%硝酸に再び溶解した。溶液の Pt 濃度は、誘導結合プラズマ質量分析法 (inductively-coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS, 4500 ICP-MS, ヒューレット・パッカード, CA, USA) により測定した。

7. 統計解析

血液生化学・肝臓内薬物濃度の各値については、Student の t 検定を用いた。

結果は、平均±標準誤差で表示した。肝転移結節の数・肝重量については、Kruskal-Wallis 検定を用いた。マウスの生存日数比較については、Kaplan-Meier 法を用いた。解析ソフトは JMP ver. 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を使用し、 p 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

結果

1. マウス肝転移モデルの作成

予備実験として、マウス肝転移モデルを作成し、14 日目に肉眼で肝臓に転移結節があることを確認した。マウスから摘出した肝臓の写真を示す(図 9)。肝臓表面に転移巣結節が肉眼的に確認できる。



図 9. 脾注後 14 日目における肝転移の肉眼的所見

Colon26 細胞株を脾注後、14 日目にマウスから摘出した肝臓。肝表面に肉眼的に白色結節が認められる。

2. ダハプラチンミセルの副作用についての検討

マウスの体重を 1 週間ごとに測定し実験中各群で比較した結果、3 群間に有意差を認めなかった(図 10)。

また、実験 28 日目、マウスの心臓から採血した血清成分を用いて、GOT・GPT を測定し、各群で比較した結果、ダハプラチンミセル投与群とオキサリプラチン投与群の間に有意差はなく (GOT: 19.0 IU/L vs 29.9 IU/L, $p=0.53$ 、GPT: 93.3 IU/L vs 72.0 IU/L, $p=0.57$)、対照群とも有意差を認めなかった (GOT: 19.0 IU/L vs 30.4 IU/L, $p=0.15$ 、GPT: 93.3 IU/L vs 39.9 IU/L, $p=0.13$) (図 11)。

血清クレアチニン値の比較では、ダハプラチンミセル投与群は対照群との間に有意差を認めなかったものの (0.52 mg/dl vs 0.49 mg/dl, $p=0.26$)、ダハプラチンミセル投与群はオキサリプラチン投与群よりも有意に血清クレアチニン値が低かった (0.52 mg/dl vs 0.72 mg/dl, $p=0.0087$) (図 12)。

実験 28 日目に犠牲死させたマウスの肝臓を顕微鏡で観察した。オキサリプラチン投与群とダハプラチンミセル投与群のどちらの肝臓にも、腫瘍組織が認められるが、明らかな肝類洞の異常拡張所見 (blue liver syndrome) は認められなかった(図 13)。

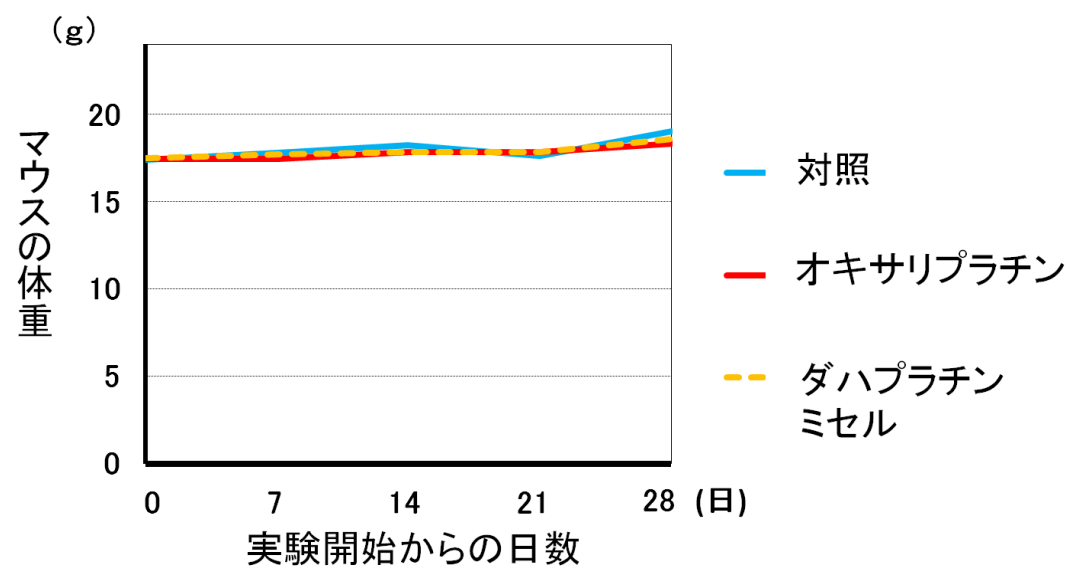
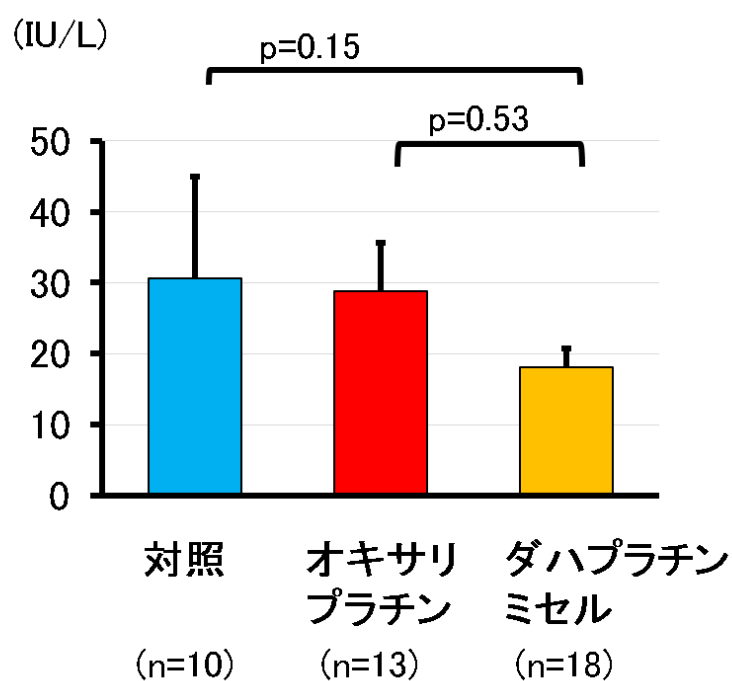


図 10. 実験中の各群のマウスの体重推移

血清GOT値



血清GPT値

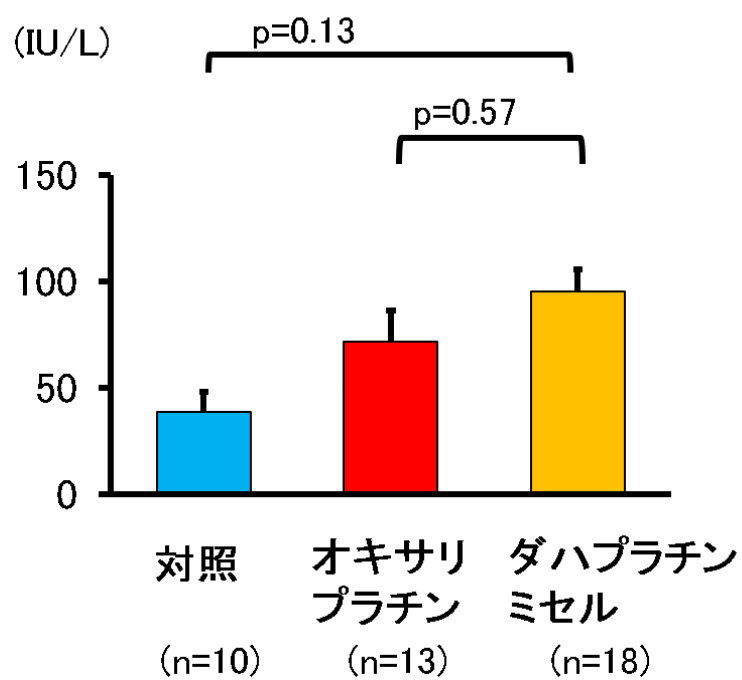


図 11. 肝機能評価 (28 日目)

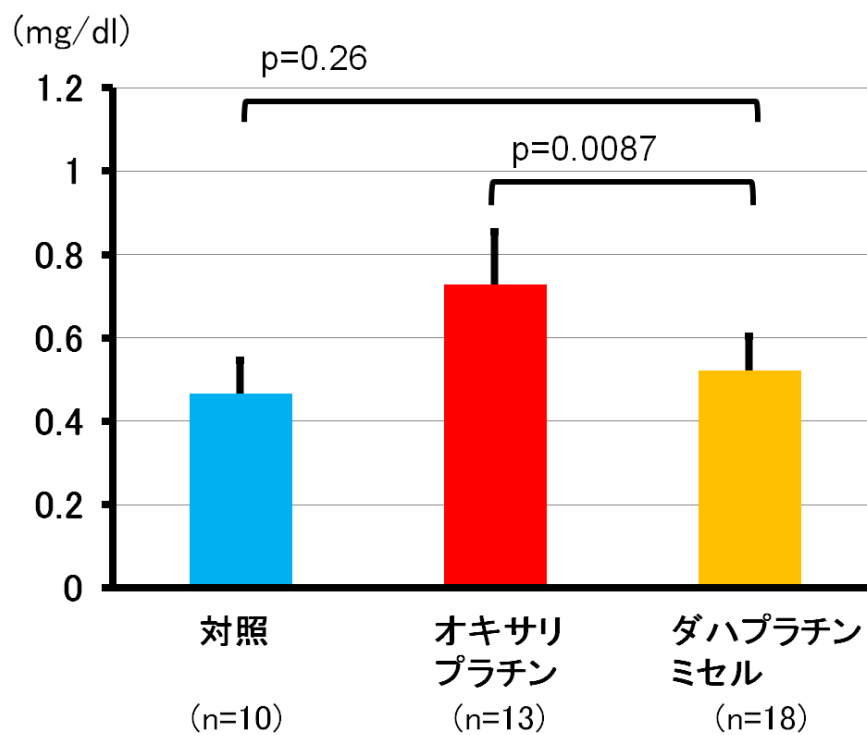
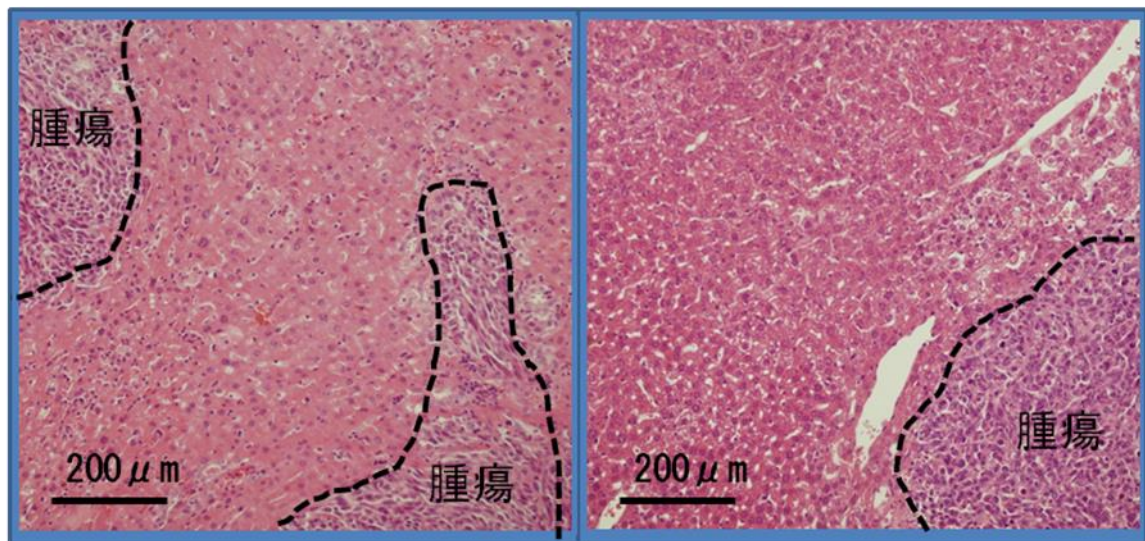


図 12. 血清クレアチニン値 (28 日目)



オキサリプラチン

ダハプラチンミセル

図 13. 肝類洞の評価 (H.E.染色)

実験終了時 28 日目に犠牲死させたマウスの肝臓を顕微鏡で観察した。A：オキサリプラチン投与群、B：ダハプラチンミセル投与群。どちらの肝臓にも、腫瘍組織が認められるが、明らかな肝類洞の異常拡張所見 (blue liver syndrome) は認められなかった。

3. ダハプラチンミセルの大腸癌肝転移に対する抗腫瘍効果の検討

実験 28 日目までに、対照群では 20 匹中 10 匹が死亡した。オキサリプラチン投与群では 20 匹中 7 匹が死亡した。ダハプラチンミセル投与群では 20 匹中 3 匹が死亡した。実験中の各群別のマウスの生存曲線を図 14 に示した。ダハプラチンミセル群は対照群よりも有意に生存期間を延長した($p=0.008$)。オキサリプラチン群との比較ではダハプラチンミセル群の方が長い傾向にあるものの、有意差は認められなかった ($p=0.16$)。28 日目には、すべてのマウスを犠牲死させているため、その後の生存日数は評価していない。また、実験中に死亡したマウスは、肉眼的解剖の結果多くの肝転移がみられ、肝転移による死亡と考えられた。マウスから摘出した肝臓の代表的な写真を示す (図 15)。

実験終了時、対照群やオキサリプラチン投与群のマウスの腹部には、腹水やリンパ節腫大を認めたが、ダハプラチン投与群では、明らかな腹水貯留を認めなかった。

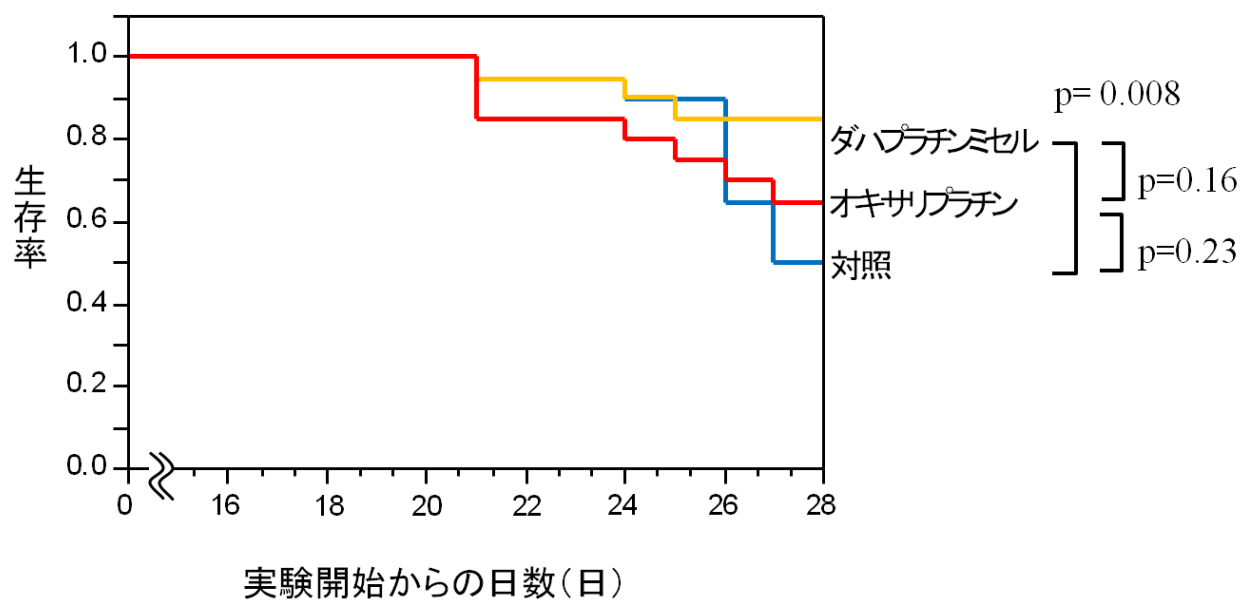


図 14. マウス生存曲線



図 15. 各群マウスの肝臓 (28 日目)

肉眼的に、肝臓表面に白色結節がみえ (丸で示す)、組織学的に肝転移結節であった。

肉眼的に肝転移の個数を比較したところ、オキサリプラチン投与群に比べて、ダハプラチン投与群で有意に肝転移が少なかった(14.8 個 vs. 4.9 個, $p=0.038$)。対照群と比較してもダハプラチン投与群は有意に肝転移が少なかった (14.9 個 vs. 4.9 個, $p=0.0041$) (図 16)。また、肝重量を比較したところ、重い方から順に対照群、オキサリプラチン投与群、ダハプラチンミセル投与群であった。ダハプラチンミセル投与群は対照群よりも有意に肝重量が軽く (1394 mg vs. 2215 mg, $p=0.0047$)。オキサリプラチン投与群と比べても有意に肝重量が軽かった (1872 mg vs. 1394 mg, $p=0.038$) (図 17)。

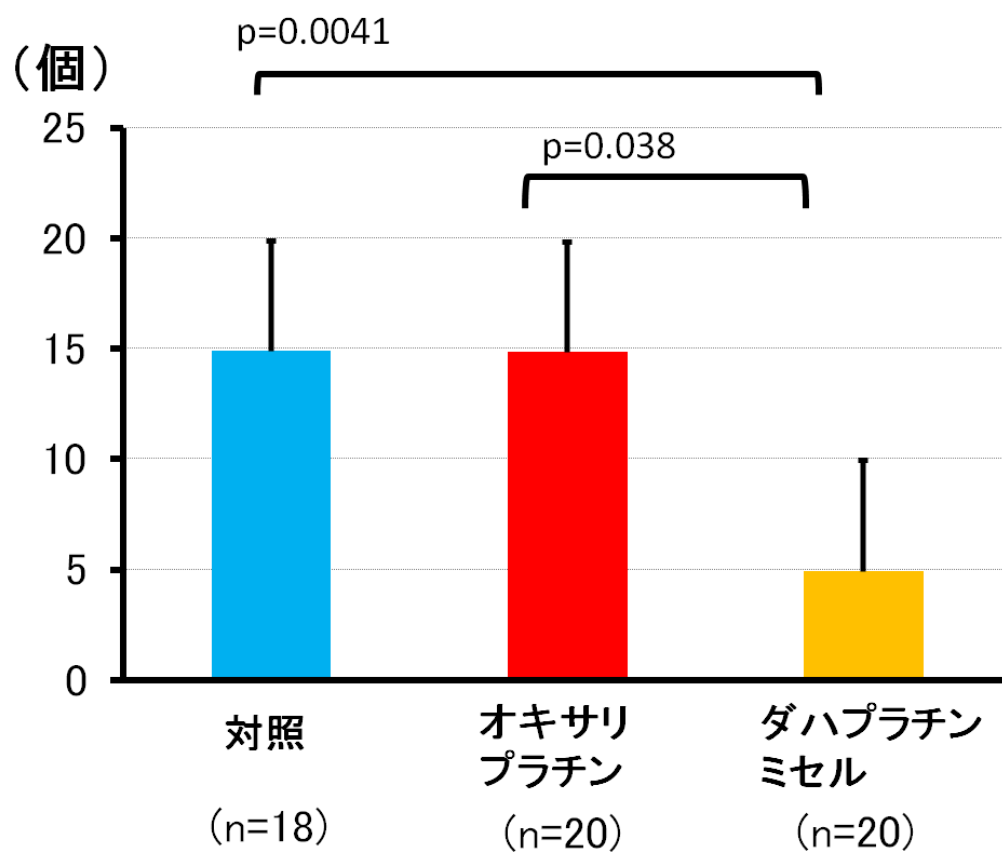


図 16. 肝転移結節数 (28 日目)

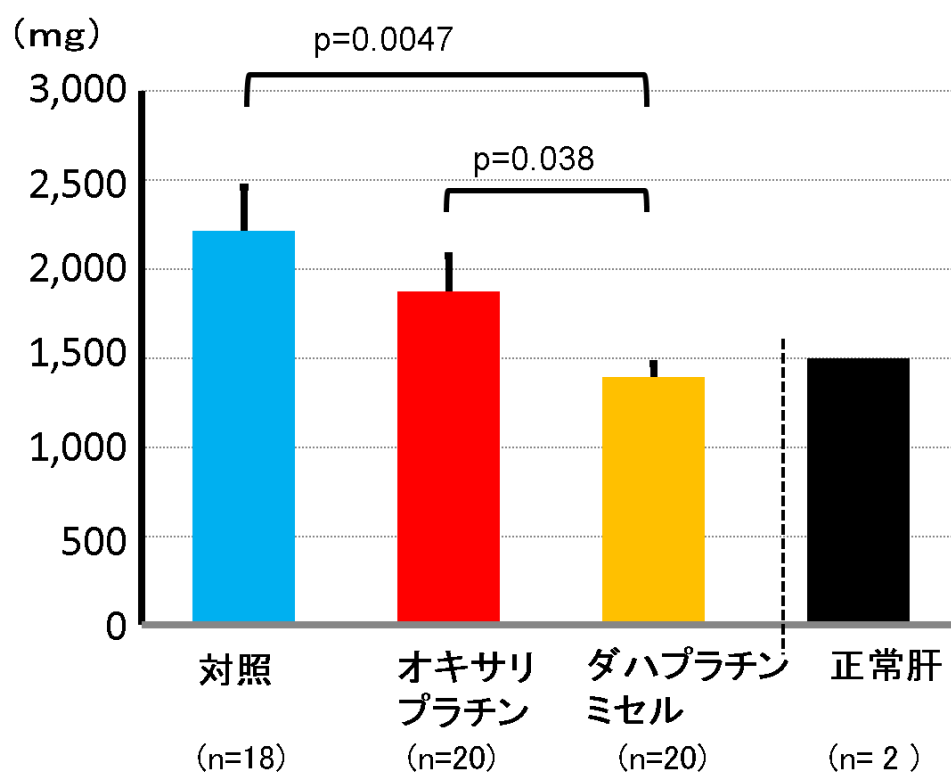


図 17. 肝重量 (28 日目)

4. ダハプラチンミセルの腫瘍組織への集積についての検討

薬剤投与 24 時間後に、正常肝臓内および転移を有する肝臓内の Pt 濃度を測定比較した。図 18 に示すように、オキサリプラチン投与群では、正常肝に対しても転移を有する肝臓に対しても、Pt 濃度は有意差がなかった。(1.7 % 投与量/組織 (g) vs. 1.7 % 投与量/組織 (g), $p=0.83$)。一方ダハプラチンミセルは、正常肝よりも有意差を持って転移のある肝臓に多く蓄積していた(16.5 % 投与量/組織 (g) vs. 21.9 % 投与量/組織 (g), $p=0.0039$)。また、転移のある肝臓において、ダハプラチンミセルはオキサリプラチンよりも有意に多く蓄積していた(21.9 % 投与量/組織 (g) vs. 1.7 % 投与量/組織 (g), $p<0.0001$)。

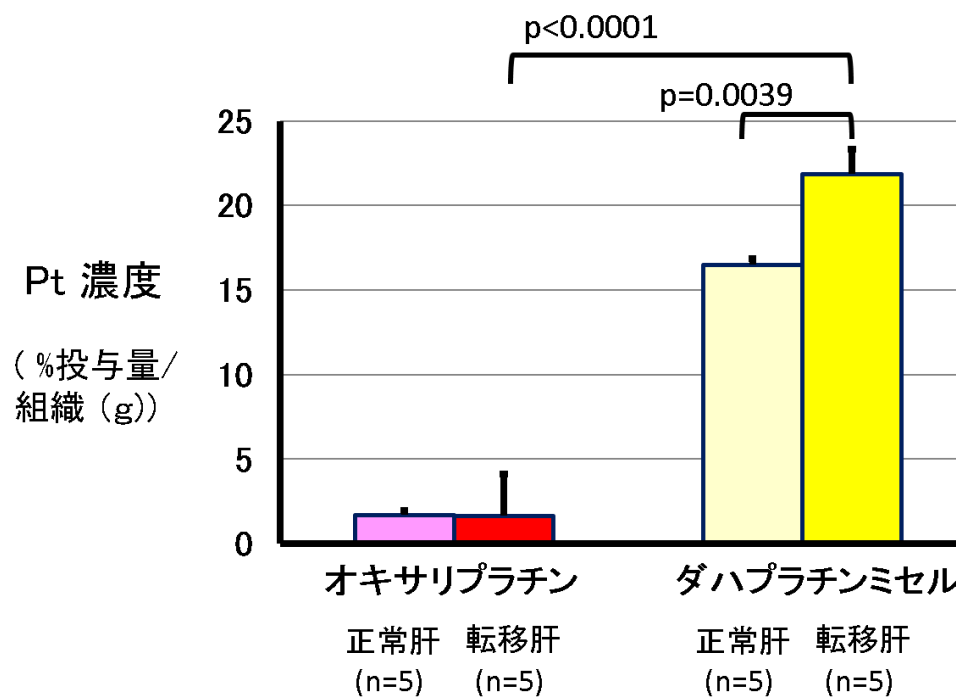


図 18. 正常肝と転移肝に対する、オキサリプラチン
ダハプラチンミセルの集積

考察

本実験では、マウス大腸癌肝転移モデルにおいて、ダハプラチンミセルがオキサリプラチンに比べ高い抗腫瘍効果を有すること、および対照群よりも有意に長い生存期間をもたらすことを初めて示した。過去の文献とは異なり、肉眼的な肝転移結節数および肝重量で抗腫瘍効果を解析しており、より直接的な評価方法と言える。抗腫瘍効果のメカニズムとして、ダハプラチンミセルが正常肝よりも肝転移に有意に多く集積したことは既報とも矛盾しなかった。また副作用の評価では、ダハプラチンミセルはオキサリプラチンよりも腎機能に負荷を与えにくく、安全性に優れていると考えられた。

1. ダハプラチンミセルの副作用についての検討

実験中、ダハプラチンミセル投与群は、対照群やオキサリプラチン投与群と比較して有意な体重減少をみとめず、全身毒性は少ないと考えられた。

肝機能評価について、マウス大腸癌肝転移モデルでは、ダハプラチンミセル投与後、2日毎に GOT、GPT を計測し、投与4日後までは正常範囲で6日後から徐々に増加したと報告されている[33]。臨床でも抗癌剤投与後一過性の肝機能増加は見られることであり、その後回復すれば抗癌剤投与は継続することが多

い。本実験では最終投与から7日目の採血で評価したが、3群に有意な肝機能の差は認められなかった。ただし対照群やオキサリプラチン群に比べダハプラチンミセル群でGPT値が若干高い傾向にあり、オキサリプラチンと同量のダハプラチンミセルはover doseとなる可能性が示唆された。

腎機能については、ダハプラチンミセル群の方がオキサリプラチン群よりもダハプラチンミセル群で有意に血清クレアチニン値が低かった。過去のシスプラチンとそのミセル化製剤（NC-6004）を使用した実験では、投与14日目に血清クレアチニン値を評価し、ミセル化製剤で有意にクレアチニン値が低い結果が得られており、ミセル化製剤が従来の抗癌剤よりも、徐放的に抗癌剤を放出するため、腎負荷が少ないと考察されている[40]。本実験結果に関しても、同様の理由で、ダハプラチンミセルはオキサリプラチンよりも腎機能に関して安全性が高いと推測された。

2. ダハプラチンミセルの抗腫瘍効果についての検討

生存曲線の解析において、オキサリプラチン投与ではオキサリプラチン群よりもやや良好である傾向を示したが有意ではなかった。一方で、ダハプラチンミセル群と対照群との比較では、有意にダハプラチンミセル群で生存日数が長

かったという結果が初めて示された。

大腸癌に対するダハプラチンミセルの抗腫瘍効果については、過去に細胞実験、皮下腫瘍モデル、肝転移モデルが報告されている[32-36]。マウス大腸癌肝転移モデルに対するダハプラチンミセルの実験報告では[20]、蛍光マーカーでラベルした細胞株 colon26 を脾注し大腸癌肝転移を作成している。脾注後、9 日目からオキサリプラチン、ダハプラチンミセルをそれぞれの群のマウスに 3 日おきに計 3 回投与し、最終投与から 10 日後まで、生体発光イメージングシステムにより全体を撮像する方法で評価している。マウスを生かしたまま経時的な抗腫瘍効果を評価するひとつの手段と考えられるが、肝転移以外の腫瘍量にも影響される可能性がある。本研究では、抗腫瘍効果の判定を肝転移のみに絞って解析した点が、過去の報告にはない試みである。まず肉眼で転移結節の個数を評価し、有意に少ないことを示した。また、ダハプラチンミセル群は有意な体重減少がなく生存日数の延長がみとめられ、全身毒性は少ないと考えられるため、肝重量が軽い結果は肝転移が他群よりも少ない結果を反映していると考えられる。以上よりダハプラチンミセル投与群はオキサリプラチン投与群よりも、有意に抗腫瘍効果が高いことが示された。

3. ダハプラチンミセルの腫瘍組織への集積についての検討

マウス皮下腫瘍モデルの実験において、ダハプラチンミセル投与 24 時間後の Pt の分布を皮下腫瘍、肝臓、腎臓、脾臓とで比較した報告があるが、ダハプラチンミセルは、皮下腫瘍に最も多く分布しており、EPR 効果による選択的集積と考察されている[36]。本実験における腫瘍組織への集積結果でも、オキサリプラチンは肝臓への集積は少なく、正常肝と転移を有する肝臓で集積は同等であった。一方で、ダハプラチンミセルはオキサリプラチンに比べて効率良く肝臓へ集積し、かつ正常肝よりも転移肝に多くの集積を認めたため、本実験のマウス大腸癌肝転移モデルにおいても、ダハプラチンミセルは肝転移巣に対する EPR 効果によって腫瘍組織特異的に集積したと考えられる。しかし、腫瘍の有無によらず、肝臓へのダハプラチンミセルの高い集積性を認めた。ダハプラチンミセルが、肝臓、腎臓、脾臓にオキサリプラチンよりも多く分布することは、過去の文献と合致する[36]。要因のひとつとして、ダハプラチンミセルが、オキサリプラチンよりも長く血液循環中に留まるためであるとされている。また、ダハプラチンミセルのサイズが、肝臓や脾臓において、マクロファージ等の免疫細胞や肝臓のクッパー細胞からの貪食作用を受けやすいのではないかと推測されるが[41-43]、はっきりとした原因は不明である。

総括および今後の課題

今回実験に使用したPEG-P(Glu) block copolymer micellesは、抗癌剤との化学的な相性がさまざまであり、すべての抗癌剤をミセル化し臨床応用するには至っていない。また、PEGを外殻にもつ他の高分子ミセル化製剤で、臨床試験に進んでいるものがあり[26]、例えばNK105、NC6004、NC6300といったミセル化製剤は、前臨床試験や第Ⅰ相試験で、既存の抗癌剤と比較して高いAUCを示すが、第Ⅲ相臨床試験の抗腫瘍効果については、非劣性を示すに留まっている[44-46]。しかし、これらの臨床試験すべてで既存の抗癌剤よりもミセル化製剤の方が、有意に副作用が少ないと報告されており、ダハプラチンミセルも臨床に十分貢献できると考えられる。

結論

ダハプラチンミセルはオキサリプラチンに比べて、大腸癌肝転移に対する抗腫瘍効果に優れ、腎機能への副作用が少なく、今後、臨床に応用できる可能性がある。

謝辞

本研究をすすめるにあたり、本学大学院医学系研究科腫瘍外科学教室：渡邊
聡明教授、本学大学院医学系研究科腫瘍外科学教室：名川弘一名誉教授には終
始にわたり全面的な御支援を賜りました。東京大学大学院工学研究科バイオエ
ンジニアリング専攻：カブラル オラシオ准教授、東京工業大学科学技術創成研
究所化学生命科学研究所：西山伸宏教授、川崎市産業振興財団ナノ医療イノベー
ションセンター：片岡一則所長には、化学材料の取り扱い、手技、データの解
析方針において多大なるご協力とご示唆をいただきました。本学大学院医学系
研究科腫瘍外科学教室：石原聡一郎先生、野澤宏彰先生には、研究のまとめ方
から発表に至るまで終始熱心な御指導を頂きました。同教室：網谷かほる女史
には動物標本の取り扱い、病理実験の遂行にあたり多大なる御協力を頂きまし
た。ここに多大なる謝意を表します。

参考文献

1. Ferlay J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, and F. Bray, *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, **136**, E359-86, 2015.
2. Isobe Y., A. Nashimoto, K. Akazawa, I. Oda, K. Hayashi, I. Miyashiro, H. Katai, S. Tsujitani, Y. Koda, Y. Seto, and M. Kaminishi, *Gastric cancer treatment in Japan: 2008 annual report of the JGCA nationwide registry*. Gastric Cancer, **14**, 301-16, 2011.
3. 厚生労働省, 平成 26 年人口動態統計の年間推計, <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikei14/dl/honbun.pdf>, January 1, 2015
4. Tournigand C., T. Andre, E. Achille, G. Lledo, M. Flesh, D. Mery-Mignard, E. Quinaux, C. Couteau, M. Buyse, G. Ganem, B. Landi, P. Colin, C. Louvet, and A. de Gramont, *FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study*. J Clin Oncol, **22**, 229-37, 2004.
5. Scheithauer W., H. Rosen, G.V. Kornek, C. Sebesta, and D. Depisch, *Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer*. BMJ, **306**, 752-5, 1993.
6. Rougier P., E. Van Cutsem, E. Bajetta, N. Niederle, K. Possinger, R. Labianca, M.

Navarro, R. Morant, H. Bleiberg, J. Wils, L. Awad, P. Herait, and C. Jacques, *Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer*. Lancet, **352**, 1407-12, 1998.

7. Douillard J.Y., D. Cunningham, A.D. Roth, M. Navarro, R.D. James, P. Karasek, P. Jandik, T. Iveson, J. Carmichael, M. Alakl, G. Gruia, L. Awad, and P. Rougier, *Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial*. Lancet, **355**, 1041-7, 2000.

8. Raymond E., S.G. Chaney, A. Taamma, and E. Cvitkovic, *Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies*. Ann Oncol, **9**, 1053-71, 1998.

9. de Gramont A., A. Figer, M. Seymour, M. Homerin, A. Hmissi, J. Cassidy, C. Boni, H. Cortes-Funes, A. Cervantes, G. Freyer, D. Papamichael, N. Le Bail, C. Louvet, D. Hendler, F. de Braud, C. Wilson, F. Morvan, and A. Bonetti, *Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer*. J Clin Oncol, **18**, 2938-47, 2000.

10. Kidani Y., K. Inagaki, M. Iigo, A. Hoshi, and K. Kuretani, *Antitumor activity of*

1,2-diaminocyclohexane--platinum complexes against sarcoma-180 ascites form. J Med Chem, **21**, 1315-8, 1978.

11. Mathe G., Y. Kidani, M. Segiguchi, M. Eriguchi, G. Fredj, G. Peytavin, J.L. Misset, S. Brienza, F. de Vassals, E. Chenu, and et al., *Oxalato-platinum or 1-OHP, a third-generation platinum complex: an experimental and clinical appraisal and preliminary comparison with cis-platinum and carboplatinum.* Biomed Pharmacother, **43**, 237-50, 1989.

12. Diaz-Rubio E., J. Sastre, A. Zaniboni, R. Labianca, H. Cortes-Funes, F. de Braud, C. Boni, M. Benavides, G. Dallavalle, and M. Homerin, *Oxaliplatin as single agent in previously untreated colorectal carcinoma patients: a phase II multicentric study.* Ann Oncol, **9**, 105-8, 1998.

13. Becouarn Y., M. Ychou, M. Ducreux, C. Borel, F. Bertheault-Cvitkovic, J.F. Seitz, S. Nasca, T.D. Nguyen, B. Paillot, J.L. Raoul, J. Duffour, A. Fandi, G. Dupont-Andre, and P. Rougier, *Phase II trial of oxaliplatin as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. Digestive Group of French Federation of Cancer Centers.* J Clin Oncol, **16**, 2739-44, 1998.

14. National Comprehensive Cancer Network. *Clinical Practice Guidelines in Oncology, Colon Cancer;version 2, 2017*, <https://www.nccn.org/professionals/guidelines/colon.pdf>
15. National Comprehensive Cancer Network. *Clinical Practice Guidelines in Oncology, Rectal Cancer;version 3, 2017*, <https://www.nccn.org/professionals/guidelines/rectal.pdf>
16. Schmoll H.J., E. Van Cutsem, A. Stein, V. Valentini, B. Glimelius, K. Haustermans, B. Nordlinger, C.J. van de Velde, J. Balmana, J. Regula, I.D. Nagtegaal, R.G. Beets-Tan, D. Arnold, F. Ciardiello, P. Hoff, D. Kerr, C.H. Kohne, R. Labianca, T. Price, W. Scheithauer, A. Sobrero, J. Tabernero, D. Aderka, S. Barroso, G. Bodoky, J.Y. Douillard, H. El Ghazaly, J. Gallardo, A. Garin, R. Glynne-Jones, K. Jordan, A. Meshcheryakov, D. Papamichail, P. Pfeiffer, I. Souglakos, S. Turhal, and A. Cervantes, *ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making*. Ann Oncol, **23**, 2479-516, 2012.
17. 大腸癌研究会編、大腸癌治療ガイドライン医師用 2016 年版、金原出版株式会社、2016.
18. Nordlinger B., H. Sorbye, B. Glimelius, G.J. Poston, P.M. Schlag, P. Rougier, W.O. Bechstein, J.N. Primrose, E.T. Walpole, M. Finch-Jones, D. Jaeck, D. Mirza, R.W. Parks, L. Collette, M. Praet, U. Bethe, E. Van Cutsem, W. Scheithauer, and T.

Gruenberger, *Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial*. Lancet, **371**, 1007-16, 2008.

19. Matsumura Y. and H. Maeda, *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.

20. Hobbs S.K., W.L. Monsky, F. Yuan, W.G. Roberts, L. Griffith, V.P. Torchilin, and R.K. Jain, *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proc Natl Acad Sci U S A, **95**, 4607-12, 1998.

21. Faraji A.H. and P. Wipf, *Nanoparticles in cellular drug delivery*. Bioorg Med Chem, **17**, 2950-62, 2009.

22. Albanese A., P.S. Tang, and W.C. Chan, *The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems*. Annu Rev Biomed Eng, **14**, 1-16, 2012.

23. Brannon-Peppas L. and J.O. Blanchette, *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. Adv Drug Deliv Rev, **56**, 1649-59, 2004.

24. R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R.H. Müller, J.M. Verbavatz, and R. Langer. *The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically*

stabilized nanospheres. *Adv Drug Deliv Rev*, **64**, 316-26, 2012.

25. Greenwald R.B., Y.H. Choe, J. McGuire, and C.D. Conover, *Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates*. *Adv Drug Deliv Rev*, **55**, 217-50, 2003.
26. Nishiyama N., Y. Matsumura, and K. Kataoka, *Development of polymeric micelles for targeting intractable cancers*. *Cancer Sci*, **107**, 867-74, 2016.
27. Y. Kidani, K. Inagaki, R. Saito, S. Tsukagoshi, *Synthesis and anti-tumor activities of platinum(II) complexes of 1,2-diaminocyclohexane isomers and their related derivatives*. *J Clin Hematol Oncol*, **7**, 197–209, 1977.
28. Kidani Y., K. Inagaki, M. Iigo, A. Hoshi, and K. Kureitani, *Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexane--platinum complexes against sarcoma-180 ascites form*. *J Med Chem*, **21**, 1315-8, 1978.
29. Chi S.C., D.I. Yeom, S.C. Kim, and E.S. Park, *A polymeric micellar carrier for the solubilization of biphenyl dimethyl dicarboxylate*. *Arch Pharm Res*, **26**, 173-81, 2003.
30. Zhang Y., T. Jin, and R.X. Zhuo, *Methotrexate-loaded biodegradable polymeric micelles: preparation, physicochemical properties and in vitro drug release*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **44**, 104-9, 2005.

31. Choi S.W. and J.H. Kim, *Design of surface-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone*. J Control Release, **122**, 24-30, 2007.
32. Murakami M., H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M.R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama, and K. Kataoka, *Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting*. Sci Transl Med, **3**, 64ra2, 2011.
33. Wu H., H. Cabral, K. Toh, P. Mi, Y.C. Chen, Y. Matsumoto, N. Yamada, X. Liu, H. Kinoh, Y. Miura, M.R. Kano, H. Nishihara, N. Nishiyama, and K. Kataoka, *Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation*. J Control Release, **189**, 1-10, 2014.
34. Cabral H., J. Makino, Y. Matsumoto, P. Mi, H. Wu, T. Nomoto, K. Toh, N. Yamada, Y. Higuchi, S. Konishi, M.R. Kano, H. Nishihara, Y. Miura, N. Nishiyama, and K. Kataoka, *Systemic Targeting of Lymph Node Metastasis through the Blood Vascular System by Using Size-Controlled Nanocarriers*. ACS Nano, **9**, 4957-67, 2015.

35. Cabral H., N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Koyama, and K. Kataoka, *Preparation and biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt)-loaded polymeric micelles*. J Control Release, **101**, 223-32, 2005.
36. Cabral H., N. Nishiyama, and K. Kataoka, *Optimization of (1,2-diamino-cyclohexane)platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity*. J Control Release, **121**, 146-55, 2007.
37. Cabral H., M. Murakami, H. Hojo, Y. Terada, M.R. Kano, U.I. Chung, N. Nishiyama, and K. Kataoka, *Targeted therapy of spontaneous murine pancreatic tumors by polymeric micelles prolongs survival and prevents peritoneal metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, **110**, 11397-402, 2013.
38. Quail D.F. and J.A. Joyce, *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis*. Nat Med, **19**, 1423-37, 2013.
39. Joyce J.A., *Therapeutic targeting of the tumor microenvironment*. Cancer Cell, **7**, 513-20, 2005.
40. Uchino H., Y. Matsumura, T. Negishi, F. Koizumi, T. Hayashi, T. Honda, N. Nishiyama, K. Kataoka, S. Naito, and T. Kakizoe, *Cisplatin-incorporating polymeric*

micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. Br J Cancer, **93**, 678-87, 2005.

41. Mantovani A., T. Schioppa, C. Porta, P. Allavena, and A. Sica, *Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion.* Cancer Metastasis Rev, **25**, 315-22, 2006.

42. Erreni M., A. Mantovani, and P. Allavena, *Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer.* Cancer Microenviron, **4**, 141-54, 2011.

43. Ishida T., H. Harashima, and H. Kiwada, *Liposome clearance.* Biosci Rep, **22**, 197-224, 2002.

44. Plummer R., 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, and T. Nishiya, *A Phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours.* Br J Cancer, **104**, 593-8, 2011.

45. Kato K., K. Chin, T. Yoshikawa, K. Yamaguchi, Y. Tsuji, T. Esaki, K. Sakai, M. Kimura, T. Hamaguchi, Y. Shimada, Y. Matsumura, and R. Ikeda, *Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer.* Invest New Drugs, **30**, 1621-7, 2012.

46. Takahashi A., Y. Yamamoto, M. Yasunaga, Y. Koga, J. Kuroda, M. Takigahira, M. Harada, H. Saito, T. Hayashi, Y. Kato, T. Kinoshita, N. Ohkohchi, I. Hyodo, and Y. Matsumura, *NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, extends the antitumor effect and reduces the cardiotoxicity of epirubicin*. *Cancer Sci*, **104**, 920-5, 2013.