

博士論文

ドラッグデリバリーシステムにおける TGF- β 阻害薬とクロロ
キンによる腫瘍血管の動的透過現象(Nano-eruption)の制御

井 上 雄 太

論文題目 ドラッグデリバリーシステムにおける TGF- β 阻
害薬とクロロキンによる腫瘍血管の動的透過現象
(Nano-eruption) の制御

所 属 外科学専攻

指導教員 山嵜 達也 教授

氏 名 井上雄太

目次

1. 要旨.....	4
2. 用語の説明と略語一覧.....	5
3. 序文.....	6
4. 本研究の目的.....	9
5. 方法.....	11
5. 1. 試薬.....	11
5. 2. 細胞および動物.....	11
5. 3. 腫瘍モデル (TGF- β 阻害薬、クロロキン)	12
5. 4. DACHPt/m の組成および異なるサイズの調整.....	13
5. 5. in vivo リアルタイム共焦点レーザー走査顕微鏡 (IVRT-CLSM)	14
5. 6. 腫瘍血管の面積比 (tumor vessel area ratio) の同定および解析.....	15
5. 7. Nano-eruption の同定.....	15
5. 8. Nano-eruption の測定評価項目.....	16
5. 9. 統計解析法.....	20
6. 結果.....	21
6. 1. 30-nm と 70-nm 高分子ミセルの特性評価.....	21
6. 2. Tumor vessel area ratio の変化.....	23
6. 3. 70-nm 高分子ミセルにおける Nano-eruptions の比較.....	25

6. 3. 1. TGF- β 阻害薬.....	25
6. 3. 2. クロロキン.....	28
6. 4. 30-nm 高分子ミセルにおける Nano-eruptions の比較.....	31
6. 4. 1. TGF- β 阻害薬.....	31
6. 4. 2. クロロキン.....	33
6. 5. 70-nm と 30-nm 高分子ミセルの Nano-eruption 比較.....	35
6. 5. 1. 併用薬なしの場合.....	35
6. 5. 2. TGF- β 阻害薬を併用した場合.....	37
6. 5. 3. クロロキンを併用した場合.....	38
7. 考察.....	40
8. 結論.....	50
9. 謝辞.....	51
10. 掲載論文.....	52
11. 引用文献.....	53

1. 要旨

Nano-eruption は 腫瘍血管で不規則に開閉する穴を介し高分子ミセルを含む成分が腫瘍組織へ送達される現象である。薬物による腫瘍微小環境変化が Nano-eruption に及ぼす影響を検討した。TGF- β 阻害薬とクロロキンを担癌マウスに投与し 30-nm と 70-nm の蛍光標識高分子ミセルを用い生体共焦点顕微鏡で Nano-eruption の変化を画像解析した。TGF- β 阻害薬は Nano-eruption の頻度と持続時間が亢進し、クロロキンは Nano-eruption の最大面積、最大半径増大量と血管径が増加した。いずれの薬物も 70-nm の方が Nano-eruption の変化は増大した。

2. 用語の説明と略語一覧表

DACHPt/m : ダハプラチン内包高分子ミセル

DDS : ドラッグデリバリーシステム

DLS : 動的光散乱法

Dynamic vent : 腫瘍血管で不規則に開閉する動的な穴

EPR 効果 : 腫瘍では高分子薬剤に対する血管透過性が亢進しさらにリンパ毛細管による排泄機能が未熟なため、高分子薬剤が腫瘍へ集積する特性

ICP-MS : 誘導結合プラズマ質量分析

IFP : 間質液圧

IVRT-CLSM : in vivo リアルタイム共焦点レーザー走査顕微鏡

Nano-eruption : Dynamic vent から高分子ミセルを含む成分が腫瘍組織へ送達される現象

Normalization : 腫瘍血管の正常化

Static pore : 腫瘍血管にある固有の静的な穴

3. 序文

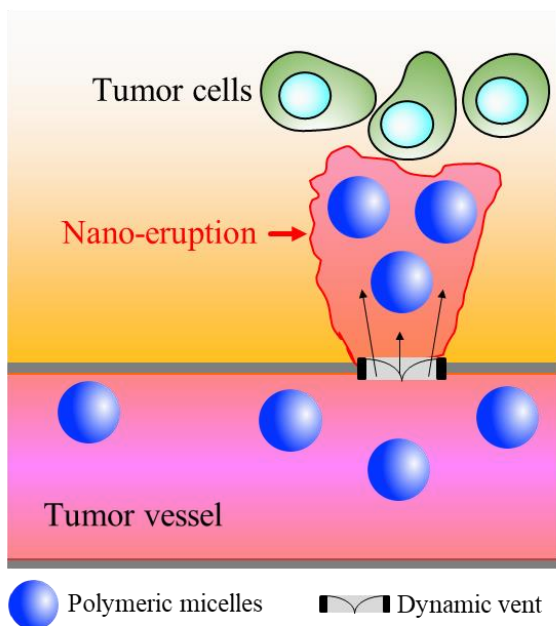
がんは依然として重大な公衆衛生に対する脅威であり、2015 年時点世界中で 1750 万人のがん患者と 870 万人の死者が発生している[1]。

がんの治療において、抗がん剤をがん細胞にのみ選択的、効果的に送達することが理想的であるが、その開発に有望な戦略がドラッグデリバリーシステム (DDS) である。DDS とは、薬剤の体内分布を時間、空間および量的に制御し、標的臓器での効果を高める一方で副作用を低減させるシステムのことである。近年、ナノテクノロジーを用いた DDS の研究開発が盛んに行われている。高分子ミセル[2]は、ポリエチレングリコール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ことにより形成されるが、組織内の環境変化に応答して内包された薬剤の制御放出が可能となることから、DDS 製剤として理想的な機能を有している[3, 4]。腫瘍内での高分子ミセルの選択的蓄積は、腫瘍血管の高い透過性と腫瘍微小環境の未熟リンパ系に基づく enhanced permeability and retention (EPR) 効果に依存しており[5]、高分子ミセルは EPR 効果を介して腫瘍組織に保持される。しかし、EPR 効果は臨床現場で不均一であることが実証されており、患者間、同じ患者の異なる病変内、さらには同じ腫瘍内でさえ、腫瘍の間質および血管特性の影響を受け[6-7]、腫瘍に無効な量の抗がん剤の送達と抗がん剤耐性腫瘍の発生をもたらさうる[8]。したがって、DDS の構築に EPR 効果の効率を改善することが強く求められる。

筆者の所属する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（研究室）では最近、EPR 効果の中に腫瘍血管の不規則に開閉する動的な穴（dynamic vent）から高分子ミセルを含む成分が腫瘍組織へ送達される現象（Nano-eruption）があることを実証した[9]（図 1A）。腫瘍血管の透過性には、dynamic vent からの血管外噴出とそれに続く腫瘍組織への Nano-eruption を特徴とする動的現象が含まれることが示されている（図 1B）。血管外噴出は他の文献でも報告されている[10, 11]。腫瘍血管壁の構造的障害により、腫瘍間質腔への高分子ミセルの圧力駆動型血管外噴出が急速に起こる。Nano-eruption の性質に影響を与えているのは、腫瘍の間質液圧（IFP）、dynamic vent のサイズ、および組織の多孔性である。シミュレーションの結果は、流体力学的圧力勾配と dynamic vent のサイズに関して様々な条件下で Nano-eruption が発生する可能性があることを示している[9]。EPR 効果の効率向上についての研究はこれまで報告されているが[12-14]、Nano-eruption というこの動的現象は、適切に操作すれば EPR 効果を高め、腫瘍内への高分子ミセルの蓄積を増加させるこれまでにない有望なメカニズムである。

図 1

A



B

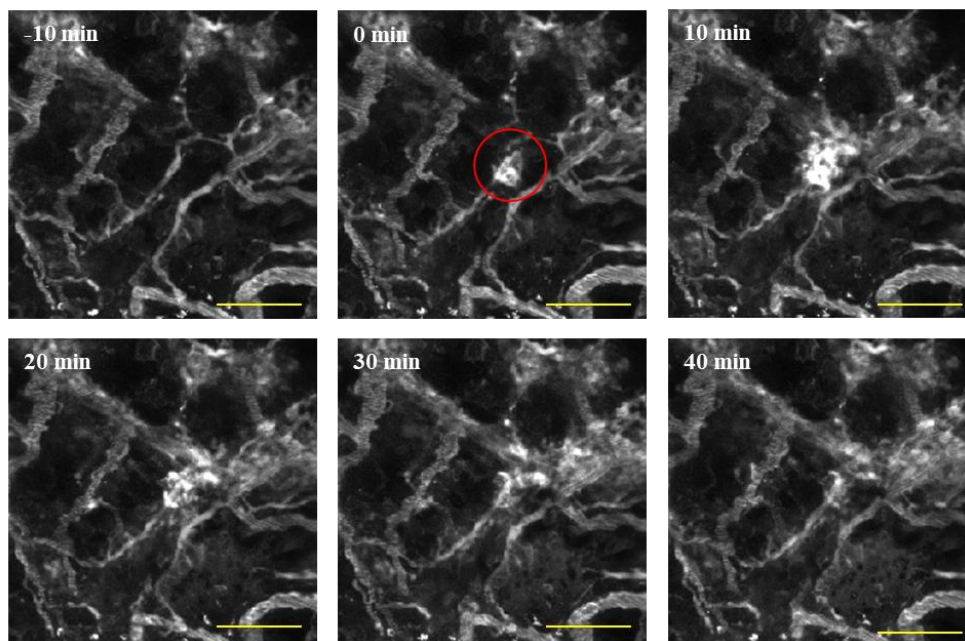


図 1. (A) Dynamic vent と Nano-eruption を示す模式図。Dynamic vent が形成されると、循環血液と血管外液との間の小さな圧力勾配が 70-nm の高分子ミセルを腫瘍に運ぶ流れ（黒い矢印）を引き起こし、一過性の噴出を形成する。(B) 高分子ミセルによる Nano-eruption の経過時間ごとの低速度撮影画像。Nano-eruption の開始を 0 分と定義して、前 (-10 分) の画像はコントロールのために表示している。スケールバーは 100 μm である。

4. 本研究の目的

筆者及び筆者が所属する研究室は、Nano-eruption の制御について研究を行うにあたり、腫瘍の調節薬と高分子ミセルのサイズの違いに着目した。

腫瘍の調節薬は腫瘍の血管構造と微小環境に影響を与えるが、100-nm 以下の高分子ミセルが腫瘍への選択的送達の際に利点を示す。たとえば、腫瘍血管を「正常化する (normalization)」薬物は、小さな高分子ミセルの蓄積を促進するが、大きな剤型の薬物送達は促進しない[15-17]。そこで、以下の薬と Nano-eruption の関連について着目した。

- 1 腫瘍血管の周皮細胞の形成を阻害することにより血管透過性を促進し、固形腫瘍の圧力を低減することが可能な TGF- β 阻害薬[15, 18]。
- 2 内皮細胞の Notch 1 シグナルを介して腫瘍血管を normalization し、腫瘍低酸素を回復させる抗マラリア薬のクロロキン[19]。

Nano-eruption は高分子ミセルのサイズに関係なく 100-nm 以下の高分子ミセルの蓄積に役立つが、サイズによって Nano-eruption の様式が異なる[9]。30-nm は腫瘍血管外へ噴出後拡散するが、70-nm は血管外へ噴出後あまり拡散しない。血管に乏しく間質に富むヒト膵がん由来 BxPC3 腫瘍モデルでは、30-nm の高分子ミセルが腫瘍の深部に蓄積し、抗腫瘍効果を示した。ただし、70-nm の高分子ミセルは血管系の近くに留まり、抗腫瘍効果は見られなかった[9, 15]。Nano-eruption の制御には高分子ミセルのサイズの違いも重要な因子と考えた。

本研究では、腫瘍の血管構造と微小環境に影響を与える薬物を用いた腫瘍の調節と2つの高分子ミセル、すなわち直径30-nm および70-nm のダハプラチン内包高分子ミセル(DACHPt/m)を用いて Nano-eruption への作用を検討し、Nano-eruption の制御および Nano-eruption の制御を介した DDS の構築を目的とする。

5. 方法

5.1. 試薬

γ -Benzyl-L-glutamate は Sigma Chemical Co., Inc. (St. Louis, MO) から、Bis (trichloromethyl) carbonate (triphosgene) は Tokyo Kasei Kogyo Co., Inc. (Tokyo, Japan) から購入した。N,N-Dimethylformamide、dimethyl sulfoxide と 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide は Wako Pure Chemical Co., Inc. (Osaka, Japan) から購入した。Dichloro (1,2-diaminocyclohexane) platinum (II) (DACHPtCl₂) は Heraeus (Hanau, Germany) から、AgNO₃ は Aldrich Chemical Co., Inc. (Milwaukee, WI) から購入した。 α -Methoxy- ω -aminopoly (ethylene glycol) (CH₃O-PEG-NH₂; MW = 12,000) は NOF Co., Inc. (Tokyo, Japan) から購入した。高分子ミセル投与時に併用した TGF- β 阻害薬 (LY364947; catalogue no. 616451) は CalbioChem (San Diego, CA) から、クロロキンは Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO) から購入した。高分子ミセルを標識する Alexa 555-, Alexa647-succinimydyl esters は Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR) より購入した。

5.2. 細胞および動物

ヒト膀胱がん由来細胞である BxPC3 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) に安定的に緑色蛍光タンパク質 (GFP) が発現した BxPC3-GFP 細胞を Anticancer 社 (San Diego, CA) より入手した[9]。GFP は細胞核で発現する。

細胞は各細胞培養フラスコ (225cm²) に 1.0×10⁶ cells ずつ播き培養液には 10% fetal bovine serum (FBS) および RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co. Inc.) を用い、37°C の加湿された 5%CO₂ を含む大気圧のインキュベーターで培養した。

Balb/c nu/nu マウス (female; age, 6-8weeks) を Charles River Japan 社(Kanagawa, Japan)より購入して使用した。全ての動物実験は、動物実験委員会の審査と承認(承認番号: 医-P16-054)を受け、「東京大学動物実験実施規則」並びに「東京大学動物実験実施マニュアル」に沿って行った。

5.3. 腫瘍モデル (TGF-β 阻害薬、クロロキン)

培養した 1.0×10⁶ cells の BXPC3-GFP 細胞をマウス背部皮下に局注し、腫瘍サイズが 100mm³ 以上に成長した後、Dorsal skinfold chamber (DSFC) [9, 20] 装着マウスのカバーガラス下に腫瘍を移植し、2-3 週間後生着したのを確認後、顕微鏡下に観察した。

TGF-β 阻害薬とクロロキンは、既報に倣い以下へ示すように投与した。TGF-β 阻害薬併用群は 1mg/kg になるよう希釈調製し、高分子ミセルを投与する 1 時間前に腹腔内投与した[15]。コントロール群は同量の溶媒を同じく高分子ミセル投与 1 時間前に皮下投与した。クロロキン併用群は、高分子ミセルを投与する前日まで計 5 日間 100mg/kg/day に調製して 1 日 1 回腹腔内投与した[19]。コントロール群は同量の溶媒のみを同じように投与した。

5.4. DACHPt/m の組成および異なるサイズの調整

生体適合性ブロック共重合体であるポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸 [PEG-*b*-P(Glu)] と白金錯体制がん剤ダハプラチン (DACHPt) を反応させてダハプラチン内包高分子ミセル (DACHPt/m) を調製した[15]。まず、DACHPtCl₂ (5 mM) を蒸留水に懸濁し、硝酸銀 [(AgNO₃) / (DACHPt) = 1] と混合して、水性複合体を形成した。次に、その溶液を暗所に 25°C で 24 時間保持した。反応後に検出された AgCl 沈殿物を遠心分離で除去し、上清を 0.22 μm フィルターに通して精製した。その後、PEG-*b*-P (Glu) [(Glu) = 5 mmol / L] および p (Glu) (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mM の [Glu]) を DACHPt 溶液に追加した [(DACHPt) / (Glu) = 1.0]。そして 120 時間反応させて、様々な量の P (Glu) ホモポリマーを用いて DACHPt/m を調製した。調製したミセルを限外濾過により精製した (MWCO=100,000)。今回は動態が異なる 30-nm と 70-nm の DACHPt/m を調製した。DACHPt/m の粒子径分布は Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, UK) による動的光散乱法 (DLS) にて Z-average (d.nm) と多分散指数を測定した。ミセルの白金含有量は、[Pt]/[COO] (mol/mol)、Pt/polymer (wt/wt%) を誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) によって分析して求めた。蛍光標識された DACHPt/m は、Alexa 555 または Alexa 674 で標識された PEG-*b*-P(Glu) を用いて調製した。Alexa 555 標識 DACHPt/m と Alexa 674 標識 DACHPt/m の蛍光スペクトルを、37°C で 10% FBS を添加した細

胞培養培地[Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)]と水で評価した。異なるサイズの DACHPt/m の安定性を DLS で測定した。37°Cの条件下でのミセルの放出速度を、透析法を使用して測定した。その方法は、0.5 ml の DACHPt/m と 10%FBS を添加した 0.5 ml の DMEM との混合溶液を透析バッグ (MWCO=2,000) に入れ、10%FBS を添加した 99 ml の DMEM で 37°Cインキュベートし透析を施行した。透析バッグの外側の溶液のサンプリングを行った。

5. 5. *in vivo* リアルタイム共焦点レーザー走査顕微鏡 (IVRT-CLSM)

既報に倣い、Nikon A1R スキャンユニットと正立顕微鏡 ECLIPSE Ni-E を組み合わせた *in vivo* リアルタイム共焦点レーザー走査顕微鏡 (IVRT-CLSM) を採用した [9, 21]。IVRT-CLSM は電動 XY ステージには小動物を固定する器具を装着し 37°C を保持できるよう保温付きパッドを備えている。イソフルラン 1-1.5%を用いることで長時間安定した維持麻酔が可能となり、周辺機器に酸素飽和度と心拍数を測定可能なパルスオキシメーターを揃えている。使用したレーザーの波長と強度は、それぞれ GFP 腫瘍細胞が 488 nm で 0.5% (レーザー光源で 0.1 mW 未満)、Alexa 555 標識高分子ミセルが 560 nm で 15% (レーザー光源で 3.75 mW 未満)、Alexa 647 標識高分子ミセルが 640 nm で 20% (レーザー光源で 2 mW 未満) である。マウス 1 匹あたり高分子ミセル溶液を 150 μ l、30 秒以上かけて静注した。高分子ミセル投与 10 分前から 10 分ごとに観察した画像を記録し、それを最低 10 時間 (600

分) 継続して行った。撮影範囲は共焦点面内の腫瘍を包含するように設定し、面積は 5~10 mm²であった。IVRT-CLSM により高分子ミセルの動的事象を可視化して Nano-eruption の発現変化を観察および検討した。

5. 6. 腫瘍血管の面積比 (tumor vessel area ratio) の同定および解析

血管径による腫瘍血管の面積比 (tumor vessel area ratio) は、高分子ミセル投与から 10 分後の生体内蛍光画像で測定された。すべての腫瘍血管の血管径を測定し、血管径が細い (<20 μm)、中間 (20-40 μm)、太い (> 40 μm) 領域にそれぞれ分けて腫瘍血管の血管径ごとの面積を求めた。各領域の腫瘍血管面積を加えてすべての腫瘍血管面積を求め、面積比は、各領域の腫瘍血管面積をすべての腫瘍血管面積で割ることにより決定した。血管径を 3 つに分けたのは後述する nano-eruption 発生部位の血管径の測定方法と同じにするためである。

5. 7. Nano-eruption の同定

Nano-eruption の同定について、Nano-eruption の同定における画像解析にあたって人間のバイアスの影響を最小限に抑えるため、既報に倣った画像処理の過程の自動化[9]を用いた。この過程は ImageJ ソフトウェア (NIH) [22]を使用した。最初に、画像を安定させるために一連の記録画像データをセットして画像の位置合わせを実行して画像を登録した。次に、画像登録の後に背景画像を差し引いて、変更

を分離できるようにした。こうして記録した一連の画像の二値化 (threshold) を行い、さらに差分解析 (subtract) を行って分析した。最後に、差分解析後の画像にフィルターを適用 (remove outliers) して Nano-eruption 候補のリストを作成した。リストを作成した後、視覚的走査を実施して、どの候補が Nano-eruption を表しているかを判断した。こうして半自動的に検出した Nano-eruption を最後にオリジナルの画像と比較して偽陽性のものを除外して同定した。

5. 8. Nano-eruption の測定評価項目

既報[9]に倣い、Nano-eruption の頻度 (frequency)、最大 Nano-eruption 面積 (maximum area)、最大 Nano-eruption 半径増大量 (maximum radial increase)、Nano-eruption の持続時間 (duration time)、および各 Nano-eruption の最も近い腫瘍細胞までの距離 (eruption-tumor distance) を測定した。最大 Nano-eruption の発生時間 (maximum eruption time) と Nano-eruption 発生部位の血管径 (vessel diameter) も測定した。Frequency は、1 画像における Nano-eruption の回数の和を総腫瘍面積で割って 1mm^2 あたりの回数を算出した (図 2A)。観察時間は 600 分で、100 分ごとに分けた比較と 600 分合計した比較は既報と同様の方法で行った[9]。Maximum area は、XY 平面で測定された単一の Nano-eruption の最大の面積として定義した。Radial increase は最大半径の 1 分間当たりの増大量と定義した (図 2B)。Maximum eruption time は Maximum area の発生時間と定義した。Duration time は、Nano-eruption

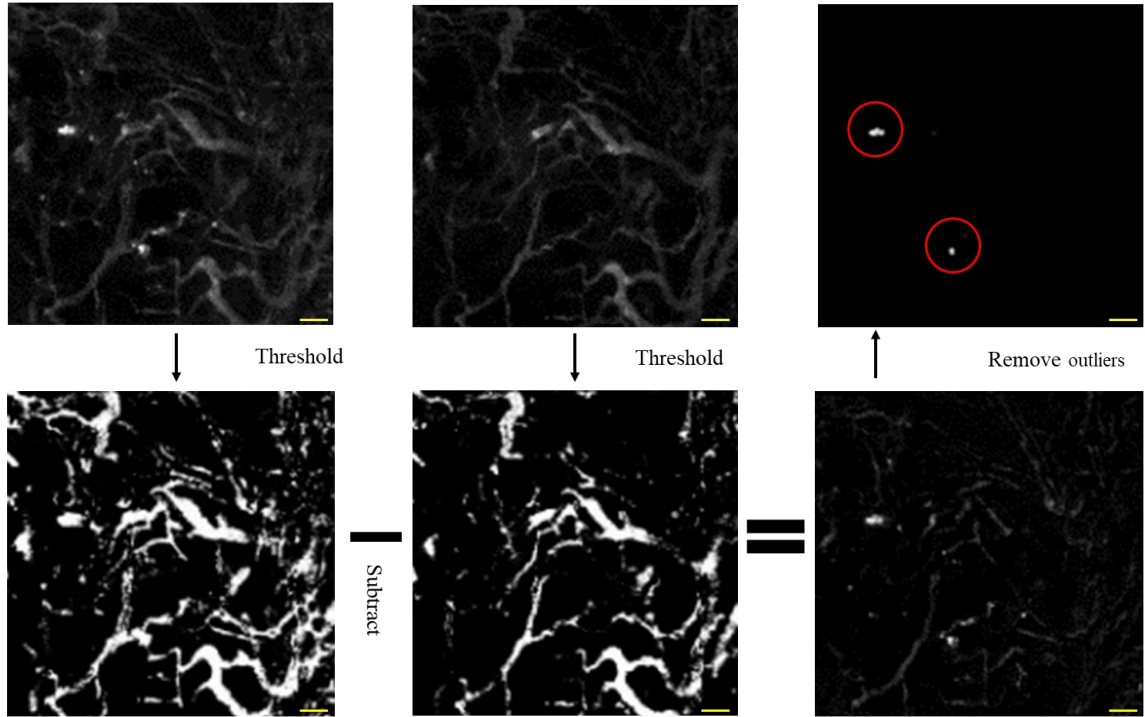
ごとに発生した時間と消失した時間を求め、発生から消失までの時間とした (図 2C)。120 分未満を短い、120-240 分を中間、240 分を超えるものを長いと定義した。

Eruption-tumor distance は、各 Nano-eruption から最も近い腫瘍細胞までの距離と定義して測定した。腫瘍細胞と Nano-eruption が接する場合 eruption-tumor distance は $0\ \mu\text{m}$ とした。 $0\ \mu\text{m}$ を隣接、 $60\ \mu\text{m}$ 以下を近い、 $60\ \mu\text{m}$ を超えるものを遠いと定義した。Vessel diameter は Nano-eruption が発生した血管の直径を測定した (図 2D)。血管径の区分は tumor vessel area ratio と同様に行った。

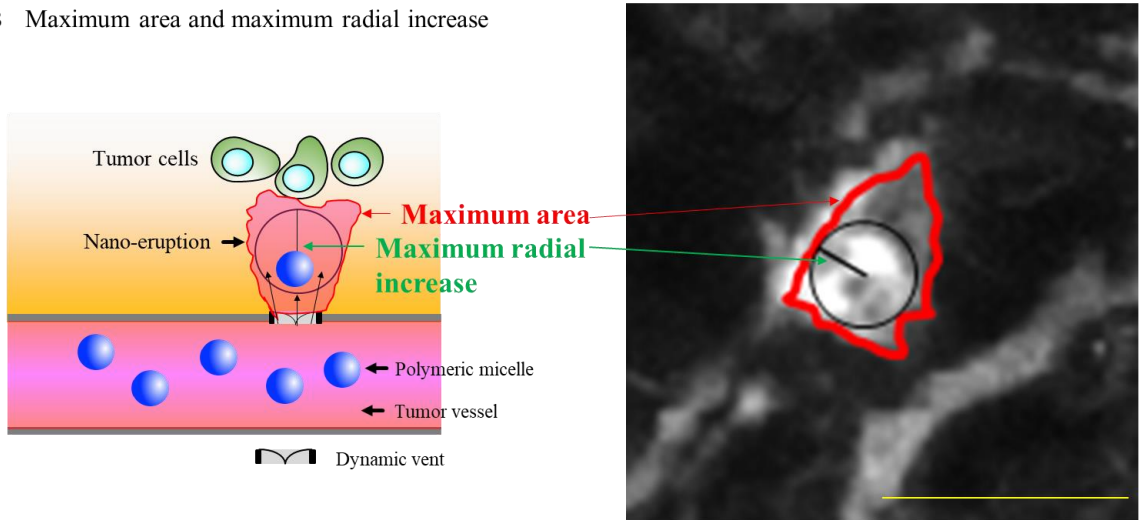
Frequency (counts/10 min*mm²) と duration time (min) は、腫瘍血管壁から腫瘍組織への血管外噴出の割合の指標として使用した (図 2A、C)。Maximum area (μm^2)、maximum radial increase ($\mu\text{m}/\text{min}$)、および eruption-tumor distance (μm) は、間質を貫通して腫瘍細胞の近くに到達する可能性の指標として使用した (図 2B、D)。TGF- β 阻害薬とクロロキンの投与後の作用発現が異なるかどうかを評価するために、maximum eruption time (min) を測定した。TGF- β 阻害薬またはクロロキンは Nano-eruption を発生する腫瘍血管の部位に影響を与えるかどうかを評価するために、vessel diameter (μm) を測定した。

图 2

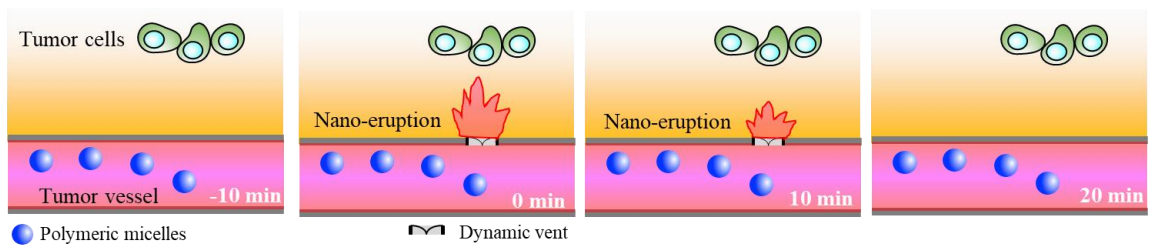
A Frequency of nano-eruptions



B Maximum area and maximum radial increase



C Duration time



D Eruption-tumor distance and vessel diameter

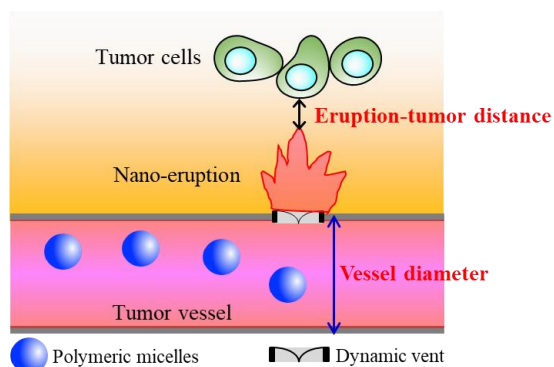


図 2. (A) Nano-eruption の frequency。赤い丸は代表的な Nano-eruption である。Frequency は、Nano-eruption の回数を総腫瘍面積で割ることによって計算した。(B) Maximum area と maximum radial increase を示す模式図。Maximum area は、赤で囲まれた面積である。黒い矢印は血管外への流れを示す。Maximum radial increase (緑の矢印) は、Maximum area の最大円の半径の増大量として測定した(黒い円と線)。右のパネルは、Maximum area と Maximum radial increase の生体内画像を示している。(C) 赤い線で囲まれた部分が Nano-eruption。この Nano-eruption は 0 分に発生し、20 分に消失を認めた。よって duration time は 20 分である。(D) Nano-eruption と最も近い腫瘍細胞 (緑色の細胞) との間の eruption-tumor distance (黒色の矢印) と vessel diameter (青色の矢印)。スケールバー (黄色) はいずれも $50 \mu\text{m}$ である。

5.9. 統計解析法

統計解析は Stat Flex ソフトウェア (Version 6; Artech Co. Ltd., Osaka, Japan) を使用して frequency、maximum area、maximum radial increase と maximum eruption time については F 検定の上 Student's t 検定もしくは Mann-Whitney U 検定で評価した。Tumor vessel area ratio、duration time、eruption-tumor distance と vessel diameter はそれぞれ χ^2 検定を用いた。これらの検定は、先行研究に倣い既報で用いられた方法と同様に行った[9]。

p 値が 0.05 未満の差を統計学的に有意なものとして扱った。

6. 結果

6.1. 30-nm と 70-nm 高分子ミセルの特性評価

30-nm と 70-nm 高分子ミセルの特性を表 1 に示した。Z-average は高分子ミセルの粒子径の平均値を示し、多分散指数は高分子ミセルの粒子径分布の幅を評価している。多分散指数 0.1 以下は単分散と呼ばれ、サイズが良くそろった均一な粒子であると言える。高分子ミセルのサイズ分布を DLS で評価した (図 3)。30-nm と 70-nm の高分子ミセルのサイズ分布の重なりは最小限であった。30-nm と 70-nm の高分子ミセルは DACHPt を既報[15]と同様の速度で放出し、時間が経過してもいずれもミセルのサイズを維持した。

表 1. 30-nm と 70-nm 高分子ミセルの特性評価

ミセルの直径 (nm)	Z-average (d.nm)	多分散指数	[Pt]/[COO] (mol/mol) ^a	Pt/polymer (wt/wt%)
30	32.76	0.107	0.56	34
70	67.78	0.035	0.57	54

^aICP-MS (プラチナ濃度) とミセルの重量により求めた。Cabral et al. [15]より引用。

図 3

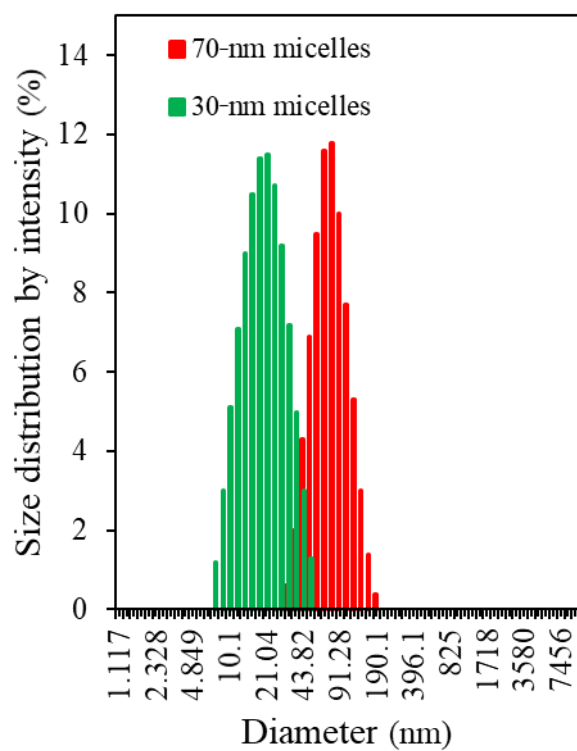


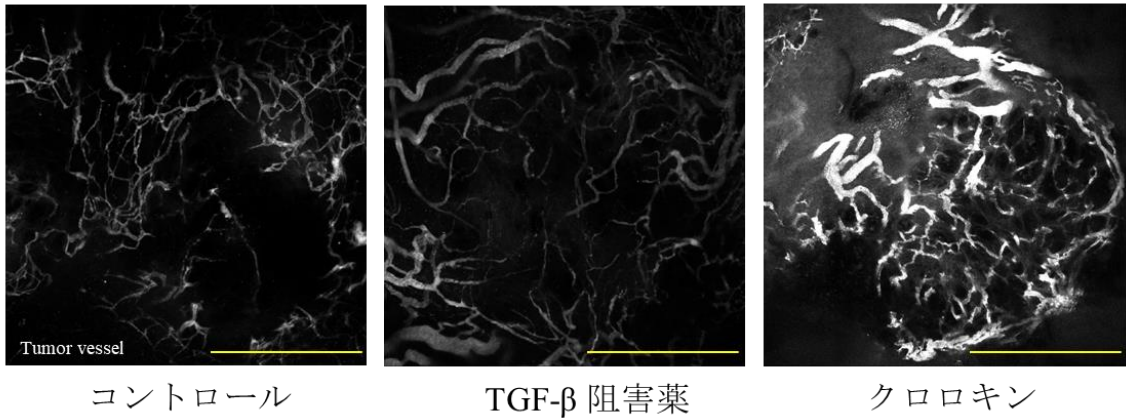
図 3. 30-nm と 70-nm 高分子ミセルのサイズ分布。サイズ分布の重なりは最小限である。

6. 2. Tumor vessel area ratio の変化

BxPC3-GFP 腫瘍モデルマウスに生体内蛍光イメージングを行った。最初に、腫瘍の血管構造が TGF- β 阻害薬またはクロロキンの投与によって影響を受けるかどうかを評価した。Tumor vessel area ratio は、高分子ミセル投与の直後に生体内蛍光画像で測定した (図 4A)。70-nm 高分子ミセルのみのコントロール群と 70-nm 高分子ミセルと TGF- β 阻害薬併用群との間で腫瘍血管の面積比に有意差は認めなかった ($p > 0.05$) (図 4B)。70-nm 高分子ミセルとクロロキン併用群は、70-nm 高分子ミセルのみのコントロール群と比べてより太い腫瘍血管領域の有意な増加を示した ($p < 0.01$) (図 4B)。Tumor vessel area ratio は、クロロキンの同時投与により変化した。これらの結果は、クロロキンが腫瘍血管密度と屈曲度を低下させ[23]、血管分化を促進した[19]ことを示す以前の報告と一致していた。

図 4

A



B

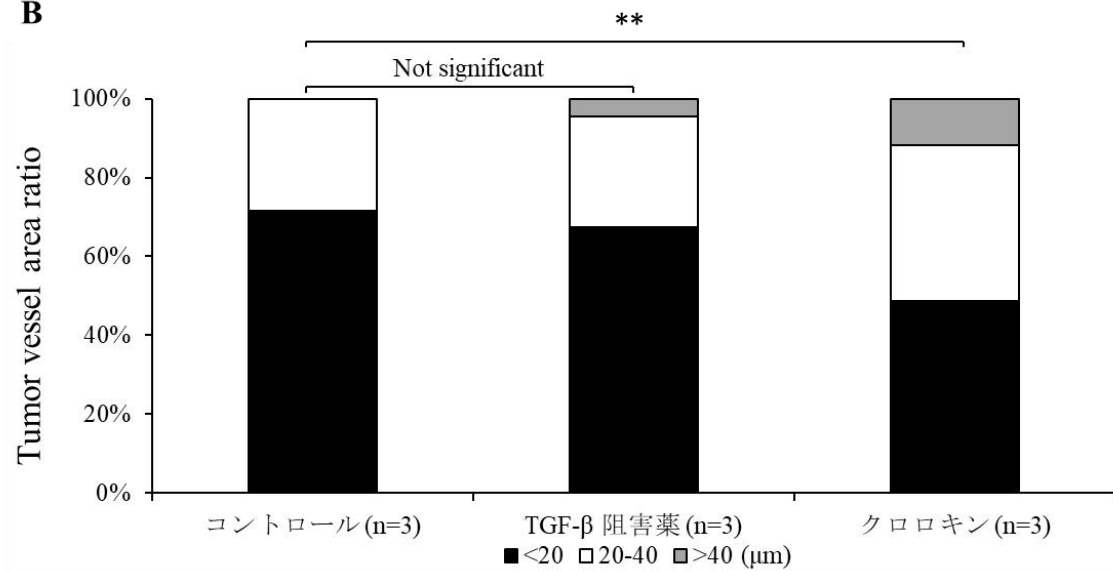


図 4. TGF- β 阻害薬やクロロキンの投与による Tumor vessel area ratio の変化
(A) コントロール (左)、TGF- β 阻害薬併用 (中央)、クロロキン併用 (右) による画像変化。スケールバーは 500 μm である。(B) Tumor vessel area ratio の変化の比較。100%は総腫瘍血管面積であり、黒、白、および灰色は、それぞれ細い (<20 μm)、中間 (20-40 μm)、太い (>40 μm) の血管面積比を示す。** $p < 0.01$ 。コントロール群 vs TGF- β 阻害薬併用群、コントロール群 vs クロロキン併用群、 $n=3$ 。

6.3. 70-nm 高分子ミセルにおける Nano-eruptions の比較

6.3.1. TGF- β 阻害薬

TGF- β は、腫瘍の微小環境における線維化、血管新生、転移、免疫といった様々な現象に広く関与している[24]。本研究の目的は TGF- β 阻害薬がどのように Nano-eruption へ影響を及ぼすかであり、画像での変化を観察した。TGF- β 阻害薬は、固形腫瘍における特定の高分子ミセルの蓄積を増加させることが知られているが、これは血管透過性の増加と IFP の低下によって説明できる[15, 25]。従って、TGF- β 阻害薬の使用は Nano-eruption の有効性を増大する効果を期待して BxPC3-GFP 腫瘍モデルで評価した。

10-100、210-300、および 310-400 分の期間と全観察時間の frequency は、TGF- β 阻害薬群 (n = 9) がコントロール群 (n=6) よりも有意に高かった (p <0.05) (図 5A)。Maximum area と maximum radial increase は、TGF- β 阻害薬で処理した群 (図 5B、C) はコントロール群よりも有意に増加した (p <0.01、p <0.01)。TGF- β 阻害薬群では、maximum eruption time がコントロール群より有意に遅くなった (p <0.05) (図 5D)。Duration time はコントロール群と比較して TGF- β 阻害薬群が有意に延長した (p <0.05) (図 5E)。Eruption-tumor distance と vessel diameter は、2つの群の間で有意差は認めなかった (図 5F、G)。本結果は、TGF- β 阻害薬の注入が Nano-eruption の効果を増加させたことを示している。これらの結果は、TGF- β 阻害薬の併用による抗腫瘍薬の使用による腫瘍の有効性と蓄積の改善を示す以前の報告と

一致している[15、18、25-27]。つまり、TGF- β 阻害薬によって引き起こされる血管透過性の増加および IFP の減少の結果である可能性がある[15、25]。TGF- β 阻害薬は、腫瘍血管における血管壁細胞の形成を抑制し、これらの細胞の内皮への接着不全につながる[18]。実際、TGF- β 阻害薬の使用により、dynamic vent の数が増加し、maximum area が拡大し、maximum radial increase が加速し、duration time が延長した (図 5A、B、C、E)。Maximum eruption time は、コントロール群で実験開始から 0~2 時間に検出されたのに対し、TGF- β 阻害薬群では 3~4 時間で検出された (図 5D)。この違いは、TGF- β 阻害薬の効果発現にかかる時間と関連する可能性がある。TGF- β 阻害薬の効果は投与後 1 時間で明らかになることが知られており、24 時間以上その効果を維持する[18, 28]。TGF- β 阻害薬群の Maximum eruption time が開始から 3~4 時間後であった本結果から TGF- β 阻害薬の効果が最も強くなるのが投与から 4~5 時間後である可能性が示唆された。Eruption-tumor distance に有意な変化がないことを示す本結果 (図 5F) は、70-nm 高分子ミセルと併用した TGF- β 阻害薬が腫瘍細胞から離れた場所での Nano-eruption にほとんど影響を及ぼさないことを示唆している。

図 5

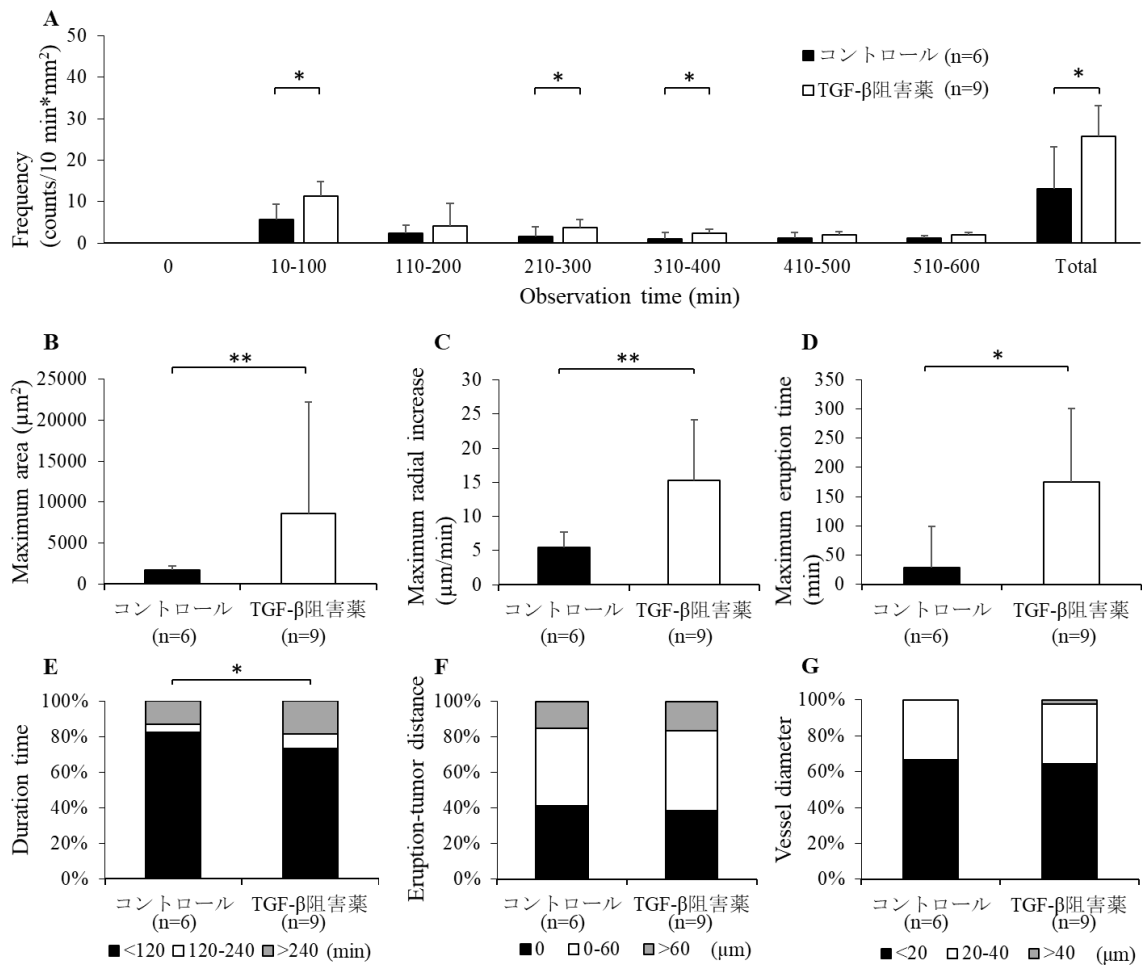


図 5. 70-nm 高分子ミセルに TGF-β 阻害薬を併用した Nano-eruption の変化

(A) TGF-β 阻害薬と 70-nm 高分子ミセルを投与した群と 70-nm 高分子ミセルのみ投与した群の frequency の比較。(B) Maximum area の比較。(C) Maximum radial increase の比較。(D) Maximum eruption time の比較。(E) Duration time の比較。100%は Nano-eruption 総数に対応し、黒、白、および灰色はそれぞれ、短い、中間、および長い duration time の計数比を示す。(F) Eruption-tumor distance の比較。100%は Nano-eruption 総数に相当し、黒、白、灰色はそれぞれ、腫瘍細胞に隣接、近く、遠くに位置する Nano-eruption の計数比を示す。(G) Vessel diameter の比較。100%は Nano-eruption 総数に対応し、黒、白、および灰色は、それぞれ細い、中間、および太い腫瘍血管で発生した nano-eruption の計数比を示す。データは平均値±標準偏差で示した。N=6-9 *: P<0.05; **P<0.01

6.3.2. クロロキン

クロロキンは、腫瘍組織の低酸素状態を変えることにより、抗腫瘍効果を誘発することが知られている[29]。また、非オートファジー依存メカニズムを介して内皮細胞の Notch 1 シグナルを介して未成熟腫瘍血管の成熟を促進することにより、腫瘍血管を normalization することにより治療薬の効果を高める[19]。クロロキンは、低酸素症、がん細胞浸潤、および転移を減らし、化学療法の送達と反応を改善する。したがって、クロロキンの投与により Nano-eruption の作用が増大することを期待して BxPC3-GFP 腫瘍モデルで評価した。

Nano-eruption の frequency はクロロキン群 (n=5) とコントロール群 (n=3) の間で有意差は示さなかった ($p > 0.05$) (図 6A)。クロロキン群は、コントロール群よりも有意に大きな maximum area ($p < 0.05$) と maximum radial increase ($p < 0.05$) を示した (図 6B、C)。Maximum eruption time は、2つの群の間に有意差を示さなかった ($p > 0.05$) (図 6D)。クロロキン群は、コントロール群よりも有意に長い duration time を示した ($p < 0.05$) (図 6E)。Eruption-tumor distance は、2つの群の間で有意差を示さなかった ($p > 0.05$) (図 6F)。クロロキン群は、コントロール群よりも太い腫瘍血管でより多く Nano-eruption の発生を示した ($p < 0.01$) (図 6G)。クロロキンの注入により、血管外腫瘍組織への 70-nm 高分子ミセルのより広くより速い拡散が可能になった (図 6B、C)。このように各 Nano-eruption が増強された理由は、腫瘍血管の normalization 後の血圧の上昇と IFP の低下によると考えられた

[27]。クロロキンによって引き起こされた **duration time** の延長 (図 6E) およびより太い血管での **Nano-eruption** の増加 (図 6G) は、この仮説をさらに裏付けている。クロロキンは、**Nano-eruption** の回数に影響を与えていないことから、新しい **dynamic vent** を誘発することはできないように推定される (図 6A)。**Eruption-tumor distance** に有意な変化がないことを示す本結果 (図 6F) は、70-nm 高分子ミセルと併用したクロロキンが腫瘍細胞から離れた場所での **Nano-eruption** にほとんど影響を及ぼさないことを示唆している。

図 6

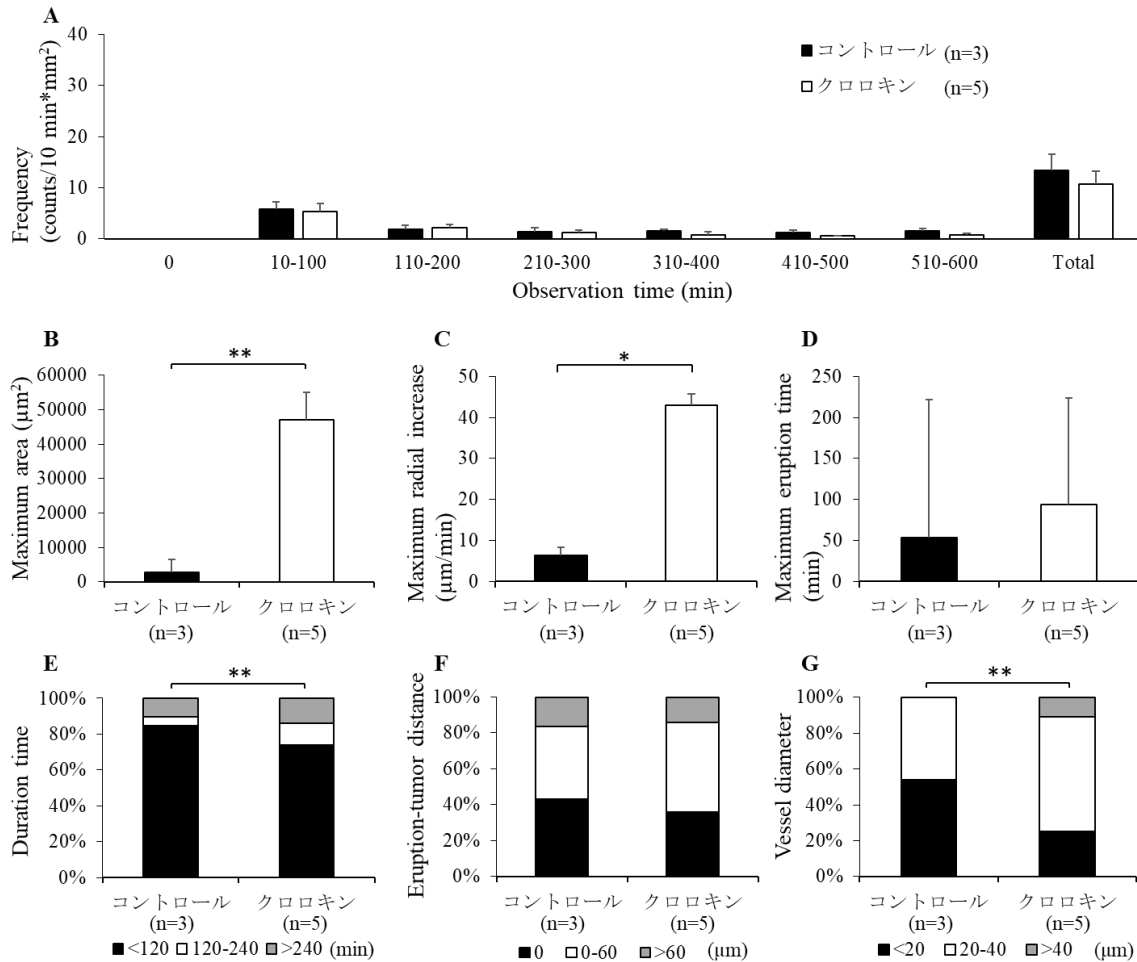


図 6. 70-nm 高分子ミセルにクロロキンを併用した Nano-eruption の変化

(A) クロロキンと 70-nm 高分子ミセルを投与した群と 70-nm 高分子ミセルのみ投与した群の Nano-eruption の frequency の比較。(B) Maximum area の比較。(C) Maximum radial increase の比較。(D) Maximum eruption time の比較。(E) Duration time の比較。(F) Eruption-tumor distance の比較。(G) Vessel diameter の比較。データは平均値±標準偏差で示した。N=3-5 *: $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

6. 4. 30-nm 高分子ミセルにおける Nano-eruption の比較

6. 4. 1. TGF- β 阻害薬

30-nm 高分子ミセルにおける Nano-eruption の変化は、コントロール群 ($n = 4$) と比較して TGF- β 阻害薬群 ($n = 4$) では frequency は増加を認めなかった ($p > 0.05$) (図 7A)。 Maximum area は、コントロール群よりも TGF- β 阻害薬群で有意に大きかった ($p < 0.05$) (図 7B)。 Maximum radial increase は 2 つの群の間で有意差はなく ($p > 0.05$) (図 7C)、 Maximum eruption time も 2 つの群の間で有意差は認めなかった ($p > 0.05$) (図 7D)。 TGF- β 阻害薬群では 3~4 時間後で検出されたが、コントロール群で実験開始から 6~7 時間後であった (図 7D)。 Maximum eruption time の発現にはミセルのサイズも影響している可能性がある。 Duration time も、2 つの群の間に有意差は認めなかった ($p > 0.05$) (図 7E)。 ただし、次の 2 つの注目すべき点が観察された。 TGF- β 阻害薬群はコントロール群と比較して (1) Eruption-tumor distance について、腫瘍細胞から離れた場所で Nano-eruption が多くなり (図 7F)、 (2) Vessel diameter について、より太い腫瘍血管での Nano-eruption が多くなった (図 7G) (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$)。 これらのポイントについては後ほど詳述する。

図 7

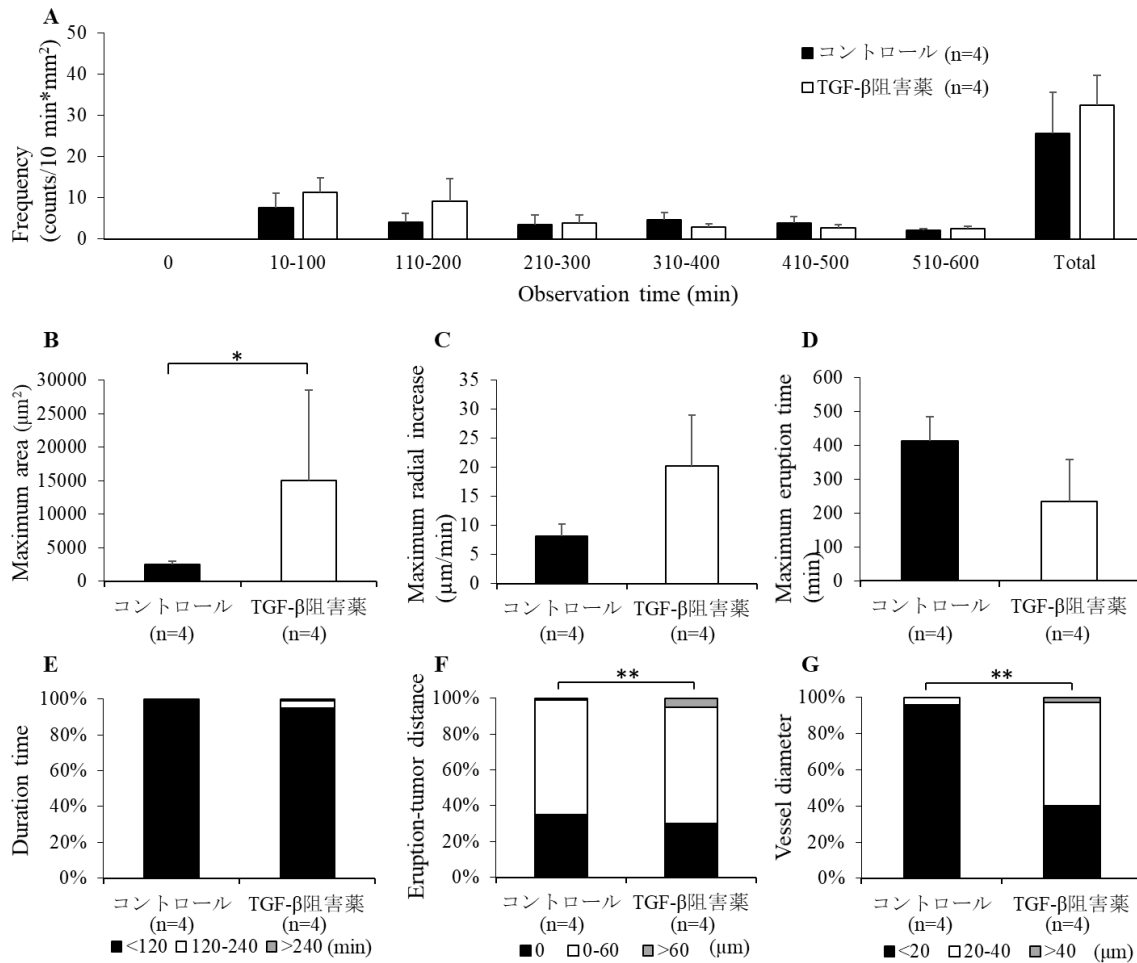


図 7. 30-nm 高分子ミセルに TGF-β 阻害薬を併用した Nano-eruption の変化

(A) TGF-β 阻害薬と 30-nm 高分子ミセルを投与した群と 30-nm 高分子ミセルのみ投与した群の Nano-eruption の frequency の比較。(B) Maximum area の比較。(C) Maximum radial increase の比較。(D) Maximum eruption time の比較。(E) Duration time の比較。(F) Eruption-tumor distance の比較。(G) Vessel diameter の比較。データは平均値±標準偏差で示した。N=4 *: P<0.05; **P<0.01

6.4.2.クロロキン

クロロキン群 (n=6) は、110-200 分 ($p < 0.05$) と 410-500 分 ($p < 0.05$) の期間で frequency はコントロール群 (n=5) よりも有意に少なかったが、全観察時間での frequency は、コントロール群と有意な変化を認めなかった ($p > 0.05$) (図 8A)。

Maximum area 及び maximum radial increase は、コントロール群よりもクロロキン群の方が有意に増加していた (それぞれ $p < 0.05$) (図 8B、C)。Maximum eruption time ($p > 0.05$) (図 8D)、duration time ($p > 0.05$) (図 8E)、および eruption-tumor distance ($p > 0.05$) (図 8F) はそれぞれ有意な変化を示さなかった。クロロキンを使用した場合、Nano-eruption がコントロール群よりも有意に太い腫瘍血管で発生した ($p < 0.01$) (図 8G)。また、クロロキンは 30-nm 高分子ミセルよりも 70-nm 高分子ミセルと併用した方が duration time の有意な延長を認め、Nano-eruption の有効性により大きな影響を与えた。

図 8

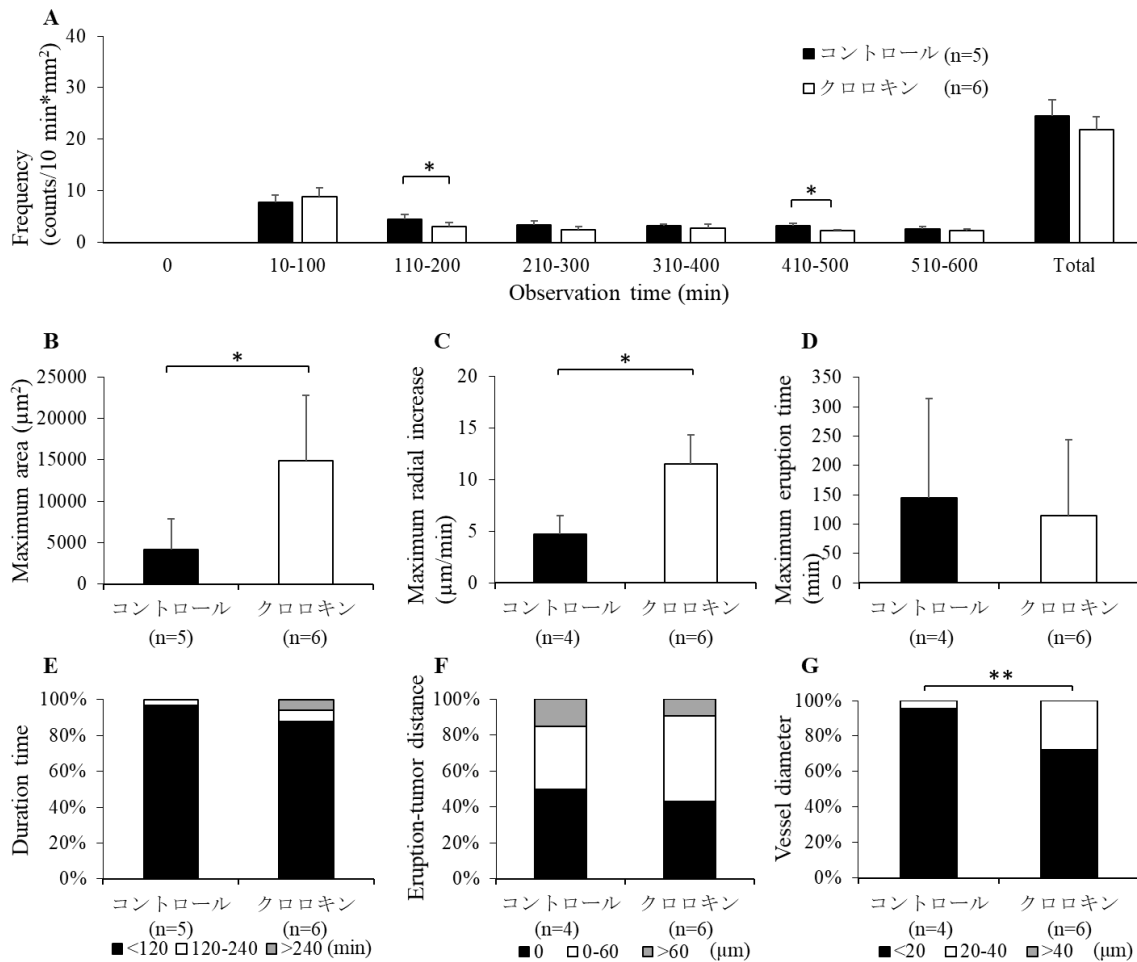


図 8. 30-nm 高分子ミセルにクロロキンを併用した Nano-eruption の変化

(A) クロロキンと 30-nm 高分子ミセルを投与した群と 30-nm 高分子ミセルのみ投与した群との Nano-eruption の frequency の比較。(B) Maximum area の比較。(C) Maximum radial increase の比較。(D) Maximum eruption time の比較。(E) Duration time の比較。(F) Eruption-tumor distance の比較。(G) Vessel diameter の比較。データは平均値±標準偏差で示した。N=5-6 *: P<0.05; **P<0.01

6.5. 70-nm と 30-nm 高分子ミセルの Nano-eruption 比較

6.5.1. 併用薬なしの場合

Nano-eruption の frequency は、70-nm と 30-nm の高分子ミセルの間で有意差は認めなかった ($p > 0.05$) (図 9A)。Duration time は、70-nm 高分子ミセルの方が 30-nm 高分子ミセルよりも有意に長かった ($p < 0.01$) (図 9E)。これらの結果は、以前の報告と一致していた[9]。Maximum eruption area、maximum radial increase、maximum eruption time と eruption-tumor distance は、70-nm と 30-nm の高分子ミセルの間で有意差は認めなかった (いずれも $p > 0.05$) (図 9B、C、D、F)。Vessel diameter について、70-nm 高分子ミセルの方がより太い腫瘍血管での Nano-eruption が多くなった (図 9G) ($p < 0.01$)。

まとめると、70-nm 高分子ミセルの方で Nano-eruption の duration time が増加し、高分子ミセルのサイズによって Nano-eruption が発生する血管に違いがあることが分かった。

図 9

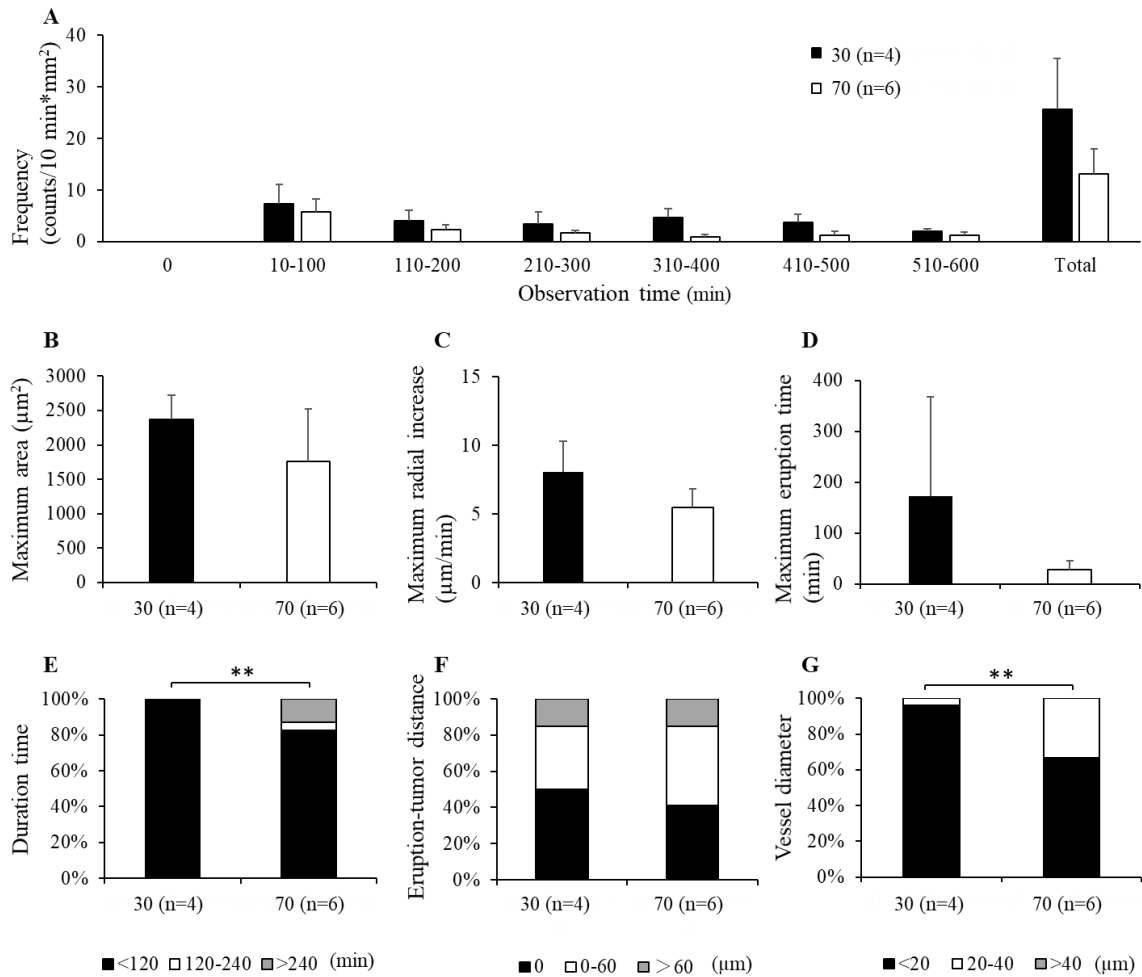


図 9. 併用薬なしの 30-nm と 70-nm 高分子ミセルの Nano-eruption の変化

(A) 30-nm 高分子ミセルのみ投与した群と 70-nm 高分子ミセルのみ投与した群との Nano-eruption の frequency の比較。(B) Maximum area の比較。(C) Maximum radial increase の比較。(D) Maximum eruption time の比較。(E) Duration time の比較。(F) Eruption-tumor distance の比較。(G) Vessel diameter の比較。データは平均値±標準偏差で示した。N=4-6 *: P<0.05; **P<0.01

6. 5. 2. TGF- β 阻害薬を併用した場合

70-nm および 30-nm の高分子ミセルに対する TGF- β 阻害薬の効果をそれぞれ表 2 で比較する。Nano-eruption の frequency、maximum radial increase、maximum eruption time、および duration time は 70-nm の高分子ミセルでは増加したが、30-nm の高分子ミセルでは増加を認めなかった (表 2)。Maximum area は、70-nm と 30-nm の両方の高分子ミセルでいずれも増加した (表 2)。Eruption-tumor distance と vessel diameter は、30-nm の高分子ミセルでは増加したが、70-nm の高分子ミセルでは増加を認めなかった (表 2)。

これらの結果から TGF- β 阻害薬は腫瘍血管径そのものを変化させないが、腫瘍新生血管系の内皮細胞の被覆を減少する作用[18]は太い血管や腫瘍細胞から離れた血管でも認められ、それが 30-nm 高分子ミセルを用いた時明らかになった。

まとめると、TGF- β 阻害薬の使用により血管壁細胞と内皮細胞の形成が阻害されることによって、Nano-eruption の frequency と duration time が増加したことが示された。

6.5.3. クロロキンを併用した場合

70-nm および 30-nm の高分子ミセルに対するクロロキンの効果をそれぞれ表 2 で比較する。全観察時間における frequency、Maximum eruption time、および eruption-tumor distance は、70-nm 高分子ミセルまたは 30-nm 高分子ミセルのいずれでも増加を認めなかった (表 2)。Maximum area、maximum radial increase、および vessel diameter は、70-nm と 30-nm の両方の高分子ミセルでいずれも増加を認めた (表 2)。Duration time は 70-nm の高分子ミセルで増加したが、30-nm の高分子ミセルでは増加を認めなかった (表 2)。

まとめると、これらの結果はクロロキンの使用が、血管の normalization を通じて各 Nano-eruption の高分子ミセル送達量を高めることにより、Nano-eruption の有効性を増加させたことを示している。高分子ミセルとクロロキンの併用は、新しい dynamic vent の形成を増強しなかったが、腫瘍組織へのより深くより速い分布を可能にした。

図 5 から図 8 までの結果を表 2 にまとめた。

表 2. 併用薬と高分子ミセルのサイズに関する比較のまとめ

	TGF- β 阻害薬		クロロキン	
	70-nm ミセル	30-nm ミセル	70-nm ミセル	30-nm ミセル
Frequency	↑	Not significant	Not significant	Partial ↓, total not significant
Maximum area	↑	↑	↑	↑
Maximum radial increase	↑	Not significant	↑	↑
Maximum eruption time	↑	Not significant	Not significant	Not significant
Duration time	↑	Not significant	↑	Not significant
Eruption-tumor distance	Not significant	↑	Not significant	Not significant
Vessel diameter	Not significant	↑	↑	↑

7. 考察

2016年に筆者が所属する研究室より Nano-eruption という現象が最初に報告[9]されて以降、他の研究グループから Nano-eruption の追加の証拠を示すいくつかの報告がなされた。Miller らは生体顕微鏡とコンピュータによる数理モデルを使用して、放射線治療が血管容積と腫瘍関連マクロファージの数を拡大することによって Nano-eruption を誘発できることを示した[10, 11, 30]。また、Peng らは生体顕微鏡とナノミセルを使用して、in vivo での乳がん細胞の血管内侵入と血管外遊出が内皮漏出を誘発することを示した[31]。Suzuki らは、腫瘍組織に対する生体顕微鏡を用いてグルコースを導入していないミセルと比較してグルコースを導入したシスプラチン高分子ミセルの頭頸部腫瘍における急速な血管外漏出および浸透を示した[32]。現在、生体顕微鏡は、Nano-eruption を検出するために利用できる唯一の方法である。これらの報告は、腫瘍をあらかじめ刺激して調節することでナノメディシンの送達を強化できること、言い換えれば Nano-eruption を操作できることを示唆している。

筆者及び筆者が所属する研究室は、腫瘍微小環境の変化が Nano-eruption に影響を与えると仮定した。シグナル伝達経路を阻害しながら腫瘍微小環境を操作することは、DDS の効果的な戦略となる可能性がある[33]。腫瘍微小環境の修飾因子として、TGF- β 阻害薬とクロロキンの2つの候補を選択した。TGF- β 阻害薬とクロロキンは、腫瘍微小環境を変化させる薬物である[18, 19, 26, 34]。

TGF- β 阻害薬とクロロキンドちらも 30-nm の高分子ミセルよりも 70-nm の高分

子ミセルの方が、Nano-eruption の反応に大きな影響を与えた。したがって、Nano-eruption の反応は、使用されている併用薬だけでなく、高分子ミセルのサイズにも依存している。これは、70-nm および 30-nm の高分子ミセルが腫瘍血管壁を透過するときの様々なメカニズムによって説明できる。より小さな高分子ミセルは、腫瘍血管壁にある程度の固有の静的透過性があることが観察されている。これらの穴は static pore と呼ばれる[9]。Static pore は、70-nm のような大きな高分子ミセルは通過できないが、30-nm のような小さな高分子ミセルに対して長期間にわたる血管外遊出を可能にする。一方、dynamic vent は 70-nm および 30-nm 両方の高分子ミセルが短期間の血管外へ噴出することが可能になる。Nano-eruption は、dynamic vent からの血管外噴出によって特徴付けられる。30-nm のような小さな高分子ミセルは Nano-eruption と静的透過性の両方が利用できるが、70-nm のような大きな高分子ミセルは主に Nano-eruption に依存する。したがって、より大きな高分子ミセルは、TGF- β 阻害薬またはクロロキンのいずれでも Nano-eruption の変化が増大した。これまでの研究では、血管透過性を調節して高分子ミセルの送達を改善する可能性が強調されており、その有効性に影響を与える重要な要因は粒子サイズと投与量と報告されている[30, 35]。他の研究では、血管外噴出に高分子ミセルの直径への依存度が比較的低いことが報告されている[10, 30]。腫瘍血管系の機能的および解剖学的特性は、腫瘍全体および経時的に変化する[30]。高分子ミセルの直径と腫瘍組織への送達との関連は、まだ完全には解明されていない。腫瘍組織

への高分子ミセルの最適な送達のためには、異なる粒子サイズ間の透過経路と効率を考慮する必要がある。

TGF- β 阻害薬を 30-nm 高分子ミセル投与前に使用した場合、Nano-eruption は腫瘍細胞からより遠く太い血管で発生した (図 7F、G)。逆に、Nano-eruption は TGF- β 阻害薬を 70-nm 高分子ミセルと併用した場合、有意な影響を受けなかった (図 5F、G)。30-nm と 70-nm の高分子ミセルのこの違いは、30-nm の高分子ミセルのみが通過できる小さな dynamic vent があることを示唆している。TGF- β 阻害薬によって生成される dynamic vent は、TGF- β 阻害薬を投与せずに自然に生成される dynamic vent よりもサイズの幅が広くなると考えられた。

ナノメディシンをトレーサーとして使用した研究報告では、腫瘍血管の細孔径が各組織で不均一であるだけでなく、同じ組織内でも不均一であることが示された[36-38]。電子顕微鏡と光学顕微鏡を使用した報告では、腫瘍血管の細孔の直径には最大で 700-nm と一定の範囲があることが示されている[39]。以前の研究報告におけるこれらの腫瘍血管の穴には、static pore と dynamic vent の両方が含まれていると推測される。Nano-eruption の以前の報告と併せて、流体噴出シミュレーションで生成されたすべての vent のサイズで Nano-eruption が理論的に発生する可能性があることが示された[9]。これらの研究は、Nano-eruption にサイズの幅があるという仮説を裏付けている。腫瘍血管の穴のサイズは、Nano-eruption のサイズと密度に最大の影響を与えることが示された[9, 10, 30]。穴のサイズの幅を拡大すると

いうことは、血管外遊出量を一貫して増加させるための有望なメカニズムであると思われる。

腫瘍細胞から遠い血管の上皮は、腫瘍細胞の近くのものよりも、VEGF などの腫瘍分泌物による影響が少ない。したがって、大きな **dynamic vent** を作成できなかった。太い血管でも同様の結果が見られた。太い血管は細い血管よりも成熟しており、大きな **dynamic vent** の形成を妨げる堅牢な上皮を持っている。TGF- β 阻害薬を併用した 30-nm の高分子ミセルは腫瘍細胞からより離れた場所とより太い血管からの **Nano-eruption** を増加させたが、これらの数は非常に少なく、数と頻度の全体的な結果に影響しなかった。この結果は、腫瘍内の高分子ミセルの分布が不均一であることを示している。

より大きなサイズの高分子ミセルは、厚い腫瘍間質を介して腫瘍細胞に到達するのがより困難であると報告されている[17, 40]。本研究では、TGF- β 阻害薬とクロロキンを使用して、腫瘍間質への大きな高分子ミセルのより深い浸透が達成された。腫瘍の IFP は TGF- β 阻害薬によって低下するため[25]、高分子ミセルは容易に拡散すると推測される。クロロキンによる血管の **normalization** もまた腫瘍内の IFP を低下させ[41]、それによって血液から腫瘍間質への抗がん剤の流出を促進する[42]。IFP は **Nano-eruption** 活動に影響を与えることが明らかになっている[9, 10, 30]。IFP の変化および腫瘍血管の穴のサイズと血管径は **Nano-eruption** を促進すると予測された[10, 30]。

次の模式図は、薬物の併用と高分子ミセルのサイズの違いによって引き起こされる Nano-eruption の発生変化と血管構造の変化との関連を示している (図 10)。

図 10A-C は 70-nm 高分子ミセルを用いた場合である。正常血管は Nano-eruption を発生させることなくその構造を維持する。腫瘍血管は未成熟で正常な血管よりも細く、内皮細胞は結合が弱く未成熟である (図 10A)。TGF- β 阻害薬の投与は、内皮細胞の形成を阻害し、これらの細胞の血管壁への接着不全を誘発することにより、Nano-eruption の frequency と duration time を増加させた (図 10B)。クロロキンの投与は、Nano-eruption の maximum area と maximum radial increase を増加させた (図 10C)。クロロキンによる腫瘍血管 normalization の効果は、腫瘍内で不均一である。Normalization されている部分は IFP すなわち血管外の圧が低下して血管内外の圧力勾配の増加に寄与し、normalization されていない部分は Nano-eruption の原因となる。その結果クロロキンは腫瘍血管機能を改善し、Nano-eruption の駆出力が増加した。図 10D-F は 30-nm 高分子ミセルを用いた場合である。30-nm 高分子ミセル投与でも Nano-eruption は発生した (図 10D)。30-nm 高分子ミセルと TGF- β 阻害薬を用いると腫瘍細胞から遠い血管や太い血管でも Nano-eruption が増加したことが確認された (図 10E)。この結果は、TGF- β 阻害薬がそれらの場所にも影響を与えることを示した。TGF- β 阻害薬は 30-nm 高分子ミセルのみが通過できるような小さな vent を含めて dynamic vent のサイズの幅を拡げることが示唆された。30-nm 高分子ミセルとクロロキンの併用 (図 10F) でも 70-nm 高分子ミセルと同様

の結果が得られたが、表 2 で示すように 70-nm 高分子ミセルの方が duration time の増大を認めた。

図 10

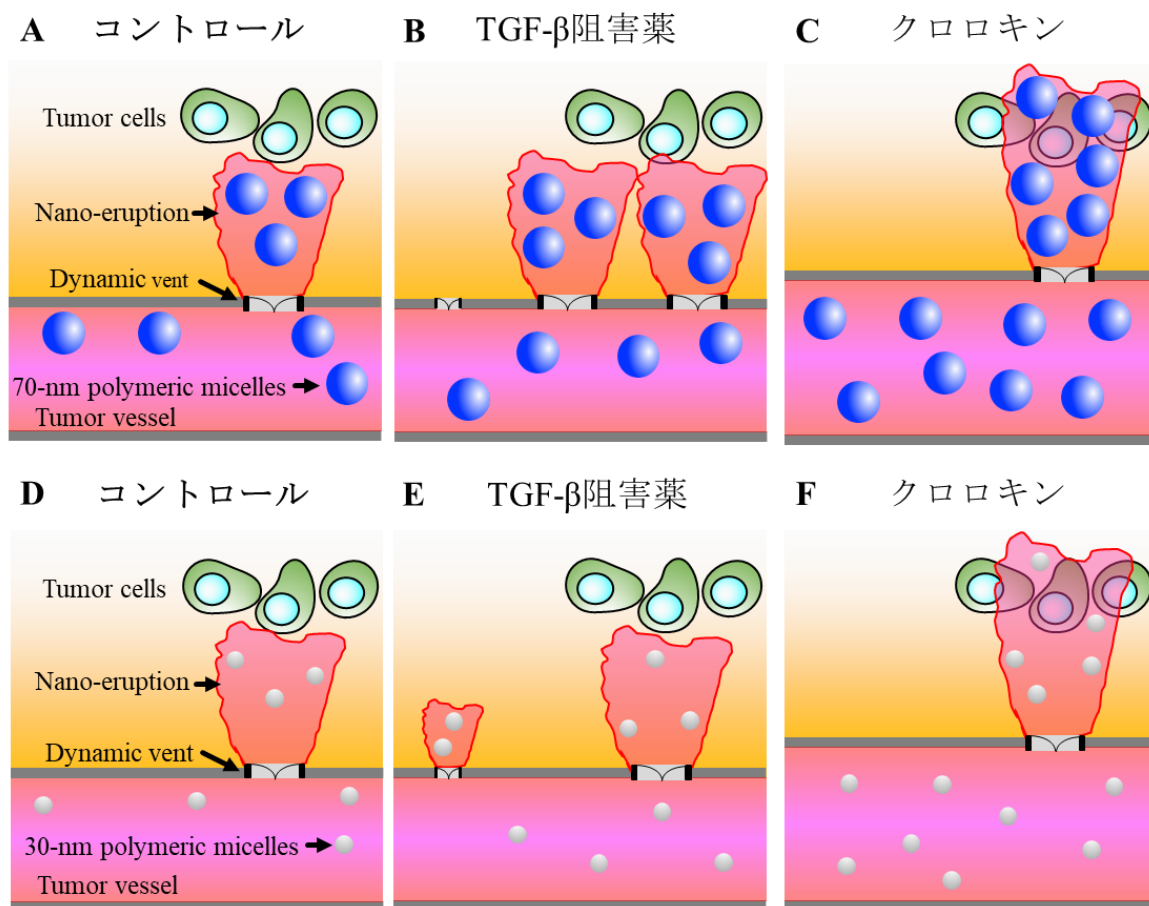


図 10. TGF- β 阻害薬又はクロロキンを併用時の Nano-eruption 変化の模式図。
A-C は 70-nm 高分子ミセルを用い、D-F は 30-nm 高分子ミセルを用いた場合。(A) 腫瘍血管は正常血管に比べて未熟で結合が弱い。そこに dynamic vent が生じて Nano-eruption が発生する。(B) TGF- β 阻害薬は、Nano-eruption の frequency と duration time を増加させる。(C) クロロキンは、Nano-eruption の maximum area と maximum radial increase を増加させる。(D) Nano-eruption は 30-nm 高分子ミセル投与でも発生する。(E) 30-nm 高分子ミセルと TGF- β 阻害薬を用いると腫瘍細胞から遠い血管や太い血管で Nano-eruption が増加したことが確認された。(F) 30-nm 高分子ミセルとクロロキンの併用でも 70-nm 高分子ミセルと同様の結果が得られたが、表 2 で示すように 70-nm 高分子ミセルの方が duration time の増大を認めた。

Nano-eruption 現象は高分子ミセルを効果的に腫瘍に送達する新しい経路として DDS で注目を集めている。本研究結果から、70-nm 高分子ミセルと TGF- β 阻害薬の併用は、Nano-eruption の frequency や duration time を増加させたため (図 5A、E)、DDS において腫瘍へ高分子ミセルが到達しやすくなるよう高分子ミセル投与の初期段階に用いると良いと考えた。30-nm 高分子ミセルと TGF- β 阻害薬を併用した場合は、腫瘍細胞から離れた血管で Nano-eruption が増加したことから (図 7F)、腫瘍から離れた場所へ高分子ミセルを送達させる目的で DDS に用いると良いと考えた。クロロキンと併用する高分子ミセルのサイズは、30-nm で duration time の増加を認めなかったが、70-nm で増加を認めた (表 2) ことから、70-nm の方が併用効果は高いと考えた。70-nm 高分子ミセルとクロロキンの併用で Maximum eruption area と Maximum radial increase が増加したことから (図 6B、C)、腫瘍の深部に高分子ミセルが送達しやすくなると考えた。投与目的に応じて高分子ミセルのサイズと併用薬を選択することが、Nano-eruption による DDS 制御にとって重要と思われる。

ヒトでのがん治療において、TGF- β 阻害薬とクロロキンは両方とも併用薬として使用されている。TGF- β 阻害薬は、進行した肝細胞がんの治療においてソラフェニブ治療を受けた患者または進行して標準治療を受けられないものに使用され、生存期間の延長が期待されている[43, 44]。クロロキンは、すでにヒトで使用されている一般的な薬物であり、がん細胞のオートファジーを阻害することにより抗

腫瘍効果を強化することが明らかになっている[45, 46]。クロロキンの併用による抗腫瘍効果増強について、ヒトの口腔扁平上皮がんにおいて既に報告がある[45]。口腔は構音、摂食、嚥下などの機能に関与しており、機能障害を引き起こさない治療方法が望まれる。その他にも TGF- β 阻害薬やクロロキンを治療薬と併用すると、治療効果の改善が期待される報告がある[47, 48]。

しかしながら、TGF- β は腫瘍の微小環境における線維化、血管新生、転移、免疫といった様々な現象に関与している[24]。本結果の画像データからは線維化、転移、免疫に及ぼす効果は測定できないため、見落とされる可能性がある。DDS における TGF- β 阻害薬と治療薬併用の臨床応用を目指すにはさらなる検討が必要である。本研究で使用されたクロロキンの用量は、以前に報告されたマウスでの実験に基づいている[19]。ゆえに、ヒトの臨床現場でクロロキンと治療薬を併用するには用量について慎重に検討する必要がある。

この研究にはいくつかの限界がある。まず、画像解析には以下の困難があった。高分子ミセルは、サイズに関係なく、投与直後に最高の血中濃度を示す。投与後時間の経過とともに高分子ミセルが血管外へ拡散し、バックグラウンド蛍光が増加して Nano-eruption の検出が困難になる。また、30-nm 高分子ミセルは腫瘍組織全体に拡散しやすく、70-nm 高分子ミセルよりも高いバックグラウンド蛍光を示すため、30-nm 高分子ミセルによる Nano-eruption は 70-nm 高分子ミセルによるものよりも識別が困難である。したがって、30-nm 高分子ミセルの Nano-eruption の数

は過小評価される可能性が高くなる。これについては、今回単回投与で 10 時間の継続観察としたが、ミセルを標識する色素を変更して複数回投与することで Nano-eruption を検出しやすくできる可能性がある。第二に、Nano-eruption の連続性について、腫瘍間質における高分子ミセルの蓄積により、1 つの Nano-eruption が発生した部位で後続の Nano-eruption が隠される可能性があるため特定が困難である。言い換えれば腫瘍間質における高分子ミセル、特に 70-nm 高分子ミセルの保持期間は 30-nm と比較して長いため、Nano-eruption が発生した部位で続けて Nano-eruption が発生しているか区別することは困難である。これについては、今回 2 次元画像で解析したが、3 次元画像を取得して解析できるようになれば後続の Nano-eruption が隠れにくくなる可能性がある。第三に、BXPC3-GFP 腫瘍からの強い蛍光のため、1 つの色素で標識された 30-nm および 70-nm の高分子ミセルしか検出できず、異なる色素で標識された高分子ミセルの同時投与が行えなかった。同時投与を行う場合は、高分子ミセルの蛍光色素と波長が重ならない GFP 以外の蛍光タンパク質を導入した腫瘍細胞に変更したほうがよいと考えられる。第四にサンプル数が少ないことが挙げられる。研究の中で 1 群あたりサンプル数が 3 と少ないものがあり、図 6D のように error bar が大きく type 2 error の可能性が否定できないものもあった。

8. 結論

本研究は、高分子ミセルと腫瘍の微小環境に影響を与える薬物の同時注入により、Nano-eruption が変化することを示した。TGF- β 阻害薬は、腫瘍血管の内皮細胞の被覆作用を減少する作用から Nano-eruption における frequency を増やし、duration time を延長し、幅広いサイズの dynamic vent を生成すると考えられた。クロロキンは、腫瘍血管の normalization 作用から Nano-eruption の vessel diameter、maximum area および maximum radial increase を増加させた。TGF- β 阻害薬とクロロキンはそれぞれ異なるメカニズムで Nano-eruption を増大させた。高分子ミセルのサイズの違いについて、TGF- β 阻害薬とクロロキンいずれも Nano-eruption への影響は 30-nm より 70-nm 高分子ミセルの方が大きかった。腫瘍の微小環境の調節する薬物と高分子ミセルのサイズを介した Nano-eruption の制御は、腫瘍における DDS の効果をさらに促進することが示唆された。

9. 謝辞

本研究全般にわたり御指導および御協力を頂きました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 松本有講師、名古屋市立大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野 岩崎真一教授、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 Cabral Horacio 准教授、公益財団法人川崎市産業振興財団 ナノ医療イノベーションセンター 片岡一則センター長に御礼申し上げます。

最後に本研究に従事する機会を与えてくださり、遂行を御支援および御指導頂きました指導教官である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 山嵜達也教授に謹んで深謝致します。

10. 掲載論文

1. Y. Inoue, Y. Matsumoto, K. Toh, K. Miyano, H. Cabral, K. Igarashi, S. Iwasaki, K.

Kataoka, T. Yamasoba, Manipulating dynamic tumor vessel permeability to enhance polymeric micelle accumulation, *J Control Release*, 329, 63-75, 2021.

11. 引用文献

- [1] C. Global Burden of Disease Cancer, C. Fitzmaurice, C. Allen, R.M. Barber, L. Barregard, Z.A. Bhutta, H. Brenner, D.J. Dicker, O. Chimed-Orchir, R. Dandona, L. Dandona, T. Fleming, M.H. Forouzanfar, J. Hancock, R.J. Hay, R. Hunter-Merrill, C. Huynh, H.D. Hosgood, C.O. Johnson, J.B. Jonas, J. Khubchandani, G.A. Kumar, M. Kutz, Q. Lan, H.J. Larson, X. Liang, S.S. Lim, A.D. Lopez, M.F. MacIntyre, L. Marczak, N. Marquez, A.H. Mokdad, C. Pinho, F. Pourmalek, J.A. Salomon, J.R. Sanabria, L. Sandar, B. Sartorius, S.M. Schwartz, K.A. Shackelford, K. Shibuya, J. Stanaway, C. Steiner, J. Sun, K. Takahashi, S.E. Vollset, T. Vos, J.A. Wagner, H. Wang, R. Westerman, H. Zeeb, L. Zoeckler, F. Abd-Allah, M.B. Ahmed, S. Alabed, N.K. Alam, S.F. Aldhahri, G. Alem, M.A. Alemayohu, R. Ali, R. Al-Raddadi, A. Amare, Y. Amoako, A. Artaman, H. Asayesh, N. Atnaфу, A. Awasthi, H.B. Saleem, A. Barac, N. Bedi, I. Bensenor, A. Berhane, E. Bernabe, B. Betsu, A. Binagwaho, D. Boneya, I. Campos-Nonato, C. Castaneda-Orjuela, F. Catala-Lopez, P. Chiang, C. Chibueze, A. Chittheer, J.Y. Choi, B. Cowie, S. Damtew, J. das Neves, S. Dey, S. Dharmaratne, P. Dhillon, E. Ding, T. Driscoll, D. Ekwueme, A.Y. Endries, M. Farvid, F. Farzadfar, J. Fernandes, F. Fischer, G.H. TT, A. Gebru, S. Gopalani, A. Hailu, M. Horino, N. Horita, A. Hussein, I. Huybrechts, M. Inoue, F. Islami, M. Jakovljevic, S. James, M. Javanbakht, S.H. Jee, A. Kasaeian, M.S. Kedir, Y.S. Khader, Y.H. Khang, D. Kim, J. Leigh, S. Linn, R. Lunevicius, H.M.A. El Razek, R. Malekzadeh, D.C. Malta, W. Marcenes, D.

Markos, Y.A. Melaku, K.G. Meles, W. Mendoza, D.T. Mengiste, T.J. Meretoja, T.R. Miller, K.A. Mohammad, A. Mohammadi, S. Mohammed, M. Moradi-Lakeh, G. Nagel, D. Nand, Q. Le Nguyen, S. Nolte, F.A. Ogbo, K.E. Oladimeji, E. Oren, M. Pa, E.K. Park, D.M. Pereira, D. Plass, M. Qorbani, A. Radfar, A. Rafay, M. Rahman, S.M. Rana, K. Soreide, M. Satpathy, M. Sawhney, S.G. Sepanlou, M.A. Shaikh, J. She, I. Shiue, H.R. Shore, M.G. Shrimel, S. So, S. Soneji, V. Stathopoulou, K. Stroumpoulis, M.B. Sufiyan, B.L. Sykes, R. Tabares-Seisdedos, F. Tadese, B.A. Tedla, G.A. Tessema, J.S. Thakur, B.X. Tran, K.N. Ukwaja, B.S.C. Uzochukwu, V.V. Vlassov, E. Weiderpass, M. Wubshet Terefe, H.G. Yebyo, H.H. Yimam, N. Yonemoto, M.Z. Younis, C. Yu, Z. Zaidi, M.E.S. Zaki, Z.M. Zenebe, C.J.L. Murray, M. Naghavi, Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study, *JAMA Oncol*, 3, 524-548, 2017.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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 Res*, 46, 6387-6392, 1986.

[6] J. Shi, P.W. Kantoff, R. Wooster, O.C. Farokhzad, Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities, *Nat Rev Cancer*, 17, 20-37, 2017.

[7] S.K. Golombek, J.N. May, B. Theek, L. Appold, N. Drude, F. Kiessling, T. Lammers, Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses, *Adv Drug Deliv Rev*, 130, 17-38, 2018.

[8] R.X. Zhang, H.L. Wong, H.Y. Xue, J.Y. Eoh, X.Y. Wu, Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy - Strategies and perspectives, *J Control Release*, 240, 489-503, 2016.

[9] Y. Matsumoto, J.W. Nichols, K. Toh, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Miura, R.J. Christie, N. Yamada, T. Ogura, M.R. Kano, Y. Matsumura, N. Nishiyama, T. Yamasoba, Y.H. Bae, K. Kataoka, Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery, *Nat Nanotechnol*, 11, 533-538, 2016.

[10] M.A. Miller, R. Chandra, M.F. Cuccarese, C. Pfirschke, C. Engblom, S. Stapleton, U. Adhikary, R.H. Kohler, J.F. Mohan, M.J. Pittet, R. Weissleder, Radiation therapy primes

tumors for nanotherapeutic delivery via macrophage-mediated vascular bursts, *Sci Transl Med*, 9, eaal0225, 2017.

[11] A.S. Harney, E.N. Arwert, D. Entenberg, Y. Wang, P. Guo, B.Z. Qian, M.H. Oktay, J.W. Pollard, J.G. Jones, J.S. Condeelis, Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2^{hi} Macrophage-Derived VEGFA, *Cancer Discov*, 5, 932-943, 2015.

[12] A. Khalid, S. Persano, H. Shen, Y. Zhao, E. Blanco, M. Ferrari, J. Wolfram, Strategies for improving drug delivery: nanocarriers and microenvironmental priming, *Expert Opin Drug Deliv*, 14, 865-877, 2017.

[13] M.A. Miller, R. Weissleder, Imaging the pharmacology of nanomaterials by intravital microscopy: Toward understanding their biological behavior, *Adv Drug Deliv Rev*, 113, 61-86, 2017.

[14] S. Quader, K. Kataoka, Nanomaterial-Enabled Cancer Therapy, *Mol Ther*, 25, 1501-1513, 2017.

[15] 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.

[16] R.K. Jain, T. Stylianopoulos, Delivering nanomedicine to solid tumors, *Nat Rev Clin*

Oncol, 7, 653-664, 2010.

[17] H. Lee, H. Fonge, B. Hoang, R.M. Reilly, C. Allen, The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles, *Mol Pharm*, 7, 1195-1208, 2010.

[18] M.R. Kano, Y. Bae, C. Iwata, Y. Morishita, M. Yashiro, M. Oka, T. Fujii, A. Komuro, K. Kiyono, M. Kaminishi, K. Hirakawa, Y. Ouchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Miyazono, Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3460-3465, 2007.

[19] H. Maes, A. Kuchnio, A. Peric, S. Moens, K. Nys, K. De Bock, A. Quaegebeur, S. Schoors, M. Georgiadou, J. Wouters, S. Vinckier, H. Vankelecom, M. Garmyn, A.C. Vion, F. Radtke, C. Boulanger, H. Gerhardt, E. Dejana, M. Dewerchin, B. Ghesquiere, W. Annaert, P. Agostinis, P. Carmeliet, Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy, *Cancer Cell*, 26, 190-206, 2014.

[20] V.T. Baron, J. Welsh, P. Abedinpour, P. Borgstrom, Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors, *Am J Cancer Res*, 1 (2011) 674-686.

[21] Y. Matsumoto, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Watanabe, R.J. Christie, K. Miyata, M. Oba, T. Ogura, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography, *Biomed Opt Express*, 1, 1209-1216, 2010.

- [22] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature Methods*, 9, 671-675, 2012.
- [23] J. Pelt, S. Busatto, M. Ferrari, E.A. Thompson, K. Mody, J. Wolfram, Chloroquine and nanoparticle drug delivery: A promising combination, *Pharmacol Ther*, 191, 43-49, 2018.
- [24] C. Neuzillet, A. Tijeras-Raballand, R. Cohen, J. Cros, S. Faivre, E. Raymond, A. de Gramont, Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy, *Pharmacol Ther*, 147, 22-31, 2015.
- [25] E. Lammerts, P. Roswall, C. Sundberg, P.J. Gotwals, V.E. Koteliansky, R.K. Reed, N.E. Heldin, K. Rubin, Interference with TGF-beta1 and -beta3 in tumor stroma lowers tumor interstitial fluid pressure independently of growth in experimental carcinoma, *Int J Cancer*, 102, 453-462, 2002.
- [26] J. Liu, S. Liao, B. Diop-Frimpong, W. Chen, S. Goel, K. Naxerova, M. Ancukiewicz, Y. Boucher, R.K. Jain, L. Xu, TGF-beta blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma by normalizing the tumor stroma, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 16618-16623, 2012.
- [27] Y. Taniguchi, K. Kawano, T. Minowa, T. Sugino, Y. Shimojo, Y. Maitani, Enhanced antitumor efficacy of folate-linked liposomal doxorubicin with TGF-beta type I receptor inhibitor, *Cancer Sci*, 101, 2207-2213, 2010.
- [28] M. Oka, C. Iwata, H.I. Suzuki, K. Kiyono, Y. Morishita, T. Watabe, A. Komuro, M.R.

Kano, K. Miyazono, Inhibition of endogenous TGF-beta signaling enhances lymphangiogenesis, *Blood*, 111, 4571-4579, 2008.

[29] P. Carmeliet, R.K. Jain, Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases, *Nat Rev Drug Discov*, 10, 417-427, 2011.

[30] T.S.C. Ng, M.A. Garlin, R. Weissleder, M.A. Miller, Improving nanotherapy delivery and action through image-guided systems pharmacology, *Theranostics*, 10, 968-997, 2020.

[31] F. Peng, M.I. Setyawati, J.K. Tee, X. Ding, J. Wang, M.E. Nga, H.K. Ho, D.T. Leong, Nanoparticles promote in vivo breast cancer cell intravasation and extravasation by inducing endothelial leakiness, *Nat Nanotechnol*, 14, 279-286, 2019.

[32] K. Suzuki, Y. Miura, Y. Mochida, T. Miyazaki, K. Toh, Y. Anraku, V. Melo, X. Liu, T. Ishii, O. Nagano, H. Saya, H. Cabral, K. Kataoka, Glucose transporter 1-mediated vascular translocation of nanomedicines enhances accumulation and efficacy in solid tumors, *J Control Release*, 301, 28-41, 2019.

[33] H. Kinoh, H. Shibasaki, X. Liu, T. Yamasoba, H. Cabral, K. Kataoka, Nanomedicines blocking adaptive signals in cancer cells overcome tumor TKI resistance, *J Control Release*, 321, 132-144, 2020.

[34] J. Pelt, S. Busatto, M. Ferrari, E.A. Thompson, K. Mody, J. Wolfram, Chloroquine and nanoparticle drug delivery: A promising combination, *Pharmacol Ther*, 191, 43-49, 2018.

[35] H.E. Daldrup-Link, S. Mohanty, C. Ansari, O. Lenkov, A. Shaw, K. Ito, S.H. Hong, M.

Hoffmann, L. Pisani, N. Boudreau, S.S. Gambhir, L.M. Coussens, Alk5 inhibition increases delivery of macromolecular and protein-bound contrast agents to tumors, *JCI Insight*, 1, e85608, 2016.

[36] F. Yuan, M. Leunig, S.K. Huang, D.A. Berk, D. Papahadjopoulos, R.K. Jain, Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft, *Cancer Res*, 54, 3352-3356, 1994.

[37] S.K. Hobbs, W.L. Monsky, F. Yuan, W.G. Roberts, L. Griffith, V.P. Torchilin, R.K. Jain, Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 4607-4612, 1998.

[38] W.L. Monsky, D. Fukumura, T. Gohongi, M. Ancukiewicz, H.A. Weich, V.P. Torchilin, F. Yuan, R.K. Jain, Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor, *Cancer Res*, 59, 4129-4135, 1999.

[39] H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa, J.W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R.K. Jain, D.M. McDonald, Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness, *Am J Pathol*, 156, 1363-1380, 2000.

[40] C. Wong, T. Stylianopoulos, J. Cui, J. Martin, V.P. Chauhan, W. Jiang, Z. Popovic, R.K. Jain, M.G. Bawendi, D. Fukumura, Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 2426-2431, 2011.

- [41] R.K. Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy, *Science (New York, N.Y.)*, 307, 58-62, 2005.
- [42] R. Leite de Oliveira, S. Deschoemaeker, A.T. Henze, K. Debackere, V. Finisguerra, Y. Takeda, C. Roncal, D. Dettori, E. Tack, Y. Jonsson, L. Veschini, A. Peeters, A. Anisimov, M. Hofmann, K. Alitalo, M. Baes, J. D'Hooge, P. Carmeliet, M. Mazzone, Gene-targeting of Phd2 improves tumor response to chemotherapy and prevents side-toxicity, *Cancer Cell*, 22, 263-277, 2012.
- [43] G. Giannelli, E. Villa, M. Lahn, Transforming growth factor-beta as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma, *Cancer Res*, 74, 1890-1894, 2014.
- [44] S. Faivre, A. Santoro, R.K. Kelley, E. Gane, C.E. Costentin, I. Gueorguieva, C. Smith, A. Cleverly, M.M. Lahn, E. Raymond, K.A. Benhadji, G. Giannelli, Novel Transforming Growth Factor Beta Receptor I Kinase Inhibitor Galunisertib (LY2157299) in Advanced Hepatocellular Carcinoma, *Liver Int*, 39, 1468-1477, 2019.
- [45] N. Mizushima, B. Levine, A.M. Cuervo, D.J. Klionsky, Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature*, 451, 1069-1075, 2008.
- [46] L. Jia, J. Wang, T. Wu, J. Wu, J. Ling, B. Cheng, In vitro and in vivo antitumor effects of chloroquine on oral squamous cell carcinoma, *Mol Med Rep*, 16, 5779-5786, 2017.
- [47] R.J. Molenaar, R.J.S. Coelen, M. Khurshed, E. Roos, M.W.A. Caan, M.E. van Linde, M. Kouwenhoven, J.A.M. Bramer, J. Bovee, R.A. Mathot, H.J. Klumpen, H.W.M. van

Laarhoven, C.J.F. van Noorden, W.P. Vandertop, H. Gelderblom, T.M. van Gulik, J.W. Wilmink, Study protocol of a phase IB/II clinical trial of metformin and chloroquine in patients with IDH1-mutated or IDH2-mutated solid tumours, *BMJ Open*, 7, e014961, 2017.

[48] B.M. Wolpin, D.A. Rubinson, X. Wang, J.A. Chan, J.M. Cleary, P.C. Enzinger, C.S. Fuchs, N.J. McCleary, J.A. Meyerhardt, K. Ng, D. Schrag, A.L. Sikora, B.A. Spicer, L. Killian, H. Mamon, A.C. Kimmelman, Phase II and pharmacodynamic study of autophagy inhibition using hydroxychloroquine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma, *Oncologist*, 19, 637-638, 2014.