

## 総合報告

# DEAE-デキストラン-MMA グラフト共重合体をホストとして 用い、ゲストのパクリタキセルと成る、超分子複合体: その人工酵素、抗癌メカニズム

大西 靖彦\*, 江下 優樹†, 紀 瑞成‡, 小林隆志†, 大西 政康\*, 水野 正明§,  
吉田 純¶, 石川雄一||, 久保田 直治\*\*

## Anti-cancer facility by nano-particle using supramolecular complex by DEAE-dextran-MMA graft copolymer/paclitxel as an artificial enzyme

Yasuhiko Onishi, Yuki Eshita, Rui-Cheng Ji, Takashi Kobayashi, Masayasu Onishi,  
Masaaki Mizuno, Jun Yoshida, Yuichi Ishikawa, and Naoji Kubota

The supramolecular complex by DDMC/PTX which paclitxel (PTX) as guest is included to DEAE-dextran-MMA copolymer (DDMC) as host formed a nano-particle of 50-300 nm size. It was very useful as DDS for anti-cancer because of a stable polymeric micelle in vivo. MDR (multi-drug resistance) of melanoma cells B16F10 to PTX has been clearly shown in survival maximal curve. However, DDMC/PTX complex showed a superior anti-cancer efficacy following the Michaelis-Mentene kinetic, which may promote to tublin polymerization by allosteric reaction like enzyme reaction. It was also confirmed that the DDMC/PTX complex shows a very superior anti-cancer activity to PTX alone in mouse skin. The MST (median survival time) of DDMC/PTX groups [328 hours(T/C, 2.73)] was twice as long as PTX of 176 hours(T/C, 1.46)( $p < 0.03$ ). DDMC/PTX complex will be considered to be not degraded in cells, and represents the efficacy as supramolecular intact different from other prodrug of PTX.

Key words: supramolecular complex, paclitxel, cancer cells, DEAE-dextran-MMA graft copolymer, MDR, artificial enzyme

## 1. 緒言

目標とする患部に、薬物を効果的かつ集中的に送り込む技術として、高分子 DDS (Drug Delivery System) は、EPR (Enhanced permeation and retention) 効果<sup>1)</sup>や RES (reticuloendothelial system) 回避<sup>2,3)</sup>を可能とし、優れたデリバリー運搬体として考えられてきた。しかし最近の研究により、高分子 DDS の細胞内分布や薬

効に関する新しい知見、たとえば共焦点レーザー顕微鏡による蛍光標識化高分子ミセルの詳細な細胞内分布に関する研究などにより、薬物/高分子ミセルは一体化してエンドソーム、リソソームのみならずゴルジ体やミトコンドリアにも局在し作用することが明らかにされた<sup>4)</sup>。このような高分子 DDS と DNA や薬物との一体化の現象はそれが超分子体として作用している可能性を示していると言えよう。超分子の概念は、ジャ

ン・マリー・レーンらによって提唱され<sup>5)</sup>、クラウンエーテル、シクロデキストリンなど、分子間相互作用を利用して、分子やイオンを内包する「ホスト・ゲスト」化合物である。タンパク質やLB膜、自己組織化膜、液晶などが超分子として研究されている。また酵素の様に高選択的に構造特異的な相互作用をする分子である人工酵素など新たな超分子のバイオミメティック高分子の開発が期待される。しかし、酵素は一般の触媒と異なり高分子量の担体と低分子量の活性基からなり、同様にこの様な超分子体も基質と中間体の構造変化に応じて機能発現に有利になるように、自己構造変化などフレキシブルな特性を有することが考えられている(配座柔軟性)。生体内での酵素基質反応は、リガンドが活性中心と異なる部位との結合により活性が変化するアロステリック調節により制御されている。今回、アロステリック調節により耐薬剤性を抑えたと見られる、新しいタイプの超分子 DDMC/PTX 複合体の抗癌剤を開発したので報告する。

「抗ガン剤を投与しても、ガン細胞はすぐに反抗ガン剤遺伝子 (Anti Drug Gene: ADG) を変化させ、抗ガン剤を無力化してしまう (multi-drug resistance: MDR)。」

<sup>6)</sup> とはアメリカ国立がん研究所デヴィタ所長 Vincent T. devita, Jr. の 1985 年アメリカ議会公聴会での有名な証言である。この抗ガン剤に対する癌細胞の宿命的な耐薬剤性は抗ガン剤の癌細胞に対する作用が一連の生体反応である基質と酵素の一対一の酵素反応モデルに従い、アロステリック促進 (正) を発現できれば解決できると想像する。一方、遺伝子工学分野における遺伝子デリバリーシステムの開発は重要な領域となっている<sup>7)</sup>。DEAE-デキストランにメタクリル酸メチルエステル (MMA) をグラフト重合させた共重合体は親水-疎水領域を有する高分子ミセルを形成し、その形質変換効率は高く非ウイルス性ベクターとして有望であることがわかった<sup>8-19)</sup>。このように DEAE-デキストランを改質した DEAE-デキストラン-MMA グラフト共重合体 (2-diethyl aminoethyl-dextran-methyl

methacrylate graft copolymer: DDMC) と DNA との複合体は、種々の細胞を使用した形質変換効率の点で DEAE-デキストランに比較して 50 倍以上優れていると報告されている<sup>13)</sup>。今回、この DDMC をホストとして用い、ゲストとして PTX を用いて、DDMC/PTX 超分子複合体を合成した。アロステリック促進 (正) を発現し、基質選択性の所有が期待される。その DDMC/PTX 複合体は PTX 耐性メラノーマ細胞に低濃度から著しい薬効をしめすことが解った<sup>20)</sup>。期待どおりに超分子 DDMC/PTX 複合体はそのエントロピー弾性=スライディング弾性により構造上の配座柔軟性を生じ、MDR を生じず、その為にアロステリック促進 (正) を発現して、基質選択性を所有し、低濃度から著しい薬効を示したと考えられる<sup>21)</sup>。これは、超分子体を用いた基質特異性をもつ人工酵素と位置づけられ、その人工酵素としての抗癌メカニズムを報告する。

## 2. DEAE-デキストラン-MMA グラフト共重合体とその特性

DEAE-デキストラン-MMA グラフト共重合体 (2-diethyl aminoethyl-dextran-methyl methacrylate graft copolymer: DDMC) は、DEAE-デキストランに 4 価のセリウム塩を使用し、メタクリル酸メチルエステル (MMA) をグラフト重合して成る<sup>10)</sup>、DEAE-デキストランを幹ポリマーに PMMA を枝ポリマーとする共重合体である。DEAE-デキストラン部を親水ドメイン、枝ポリマー PMMA 部を疎水ドメインとする親水-疎水ミクロ相分離構造を形成する高分子ミセルである。Fig. 1 に示される様に、DEAE-デキストラン (グラフト率 0 %) と DDMC とのトランスフェクション (transfection) 率の比較を行うと、HEK293 細胞を用いたレポーター遺伝子である  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を導入したトランスフェクションの実験では DDMC (グラフト率 130%) の方に顕著な効果があった<sup>11)</sup>。その安定化の効果は DNase 保護作用の差等で理解できる。即ち Fig. 2 より DEAE-デキストラン/DNA は初期から DNA の分解が促進して遊離するトルイジン青は多くその吸光度変化は大きく<sup>11)</sup>、一方 DDMC/DNA では DNA の分解がほとんどすすまず、その吸光度変化は非常に小さく、両者には大きな差があった。これで

平成 25 年 12 月 30 日受理

\* 株式会社リュージュサイエンス [yasu-onishi@ryuju-science.com]

† 大分大学医学部感染予防医学講座

‡ 大分大学医学部生体構造医学講座

§ 名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター

¶ 独立行政法人労働者健康福祉機構中部労災病院

|| 大分大学工学部応用化学科機能物質化学講座

\*\* 大分大学医学部化学講座

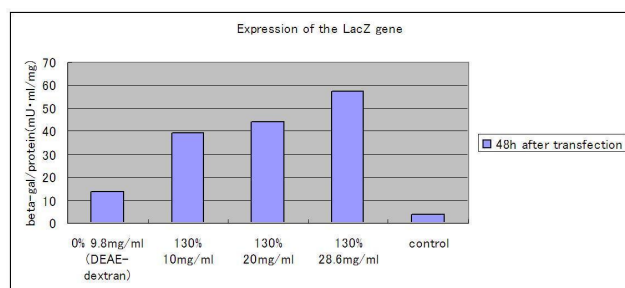


Fig. 1: HEK293 細胞を用いた DEAE-dextran (グラフト率 0 %) と DDMC (グラフト率 130%) とのトランスフェクション。DEAE-dextran サンプル 1 : 10mg/mL, DDMC サンプル 2 : 10 mg/mL, DDMC サンプル 3 : 20 mg/mL, DDMC サンプル 4 : 28.6 mg/mL。

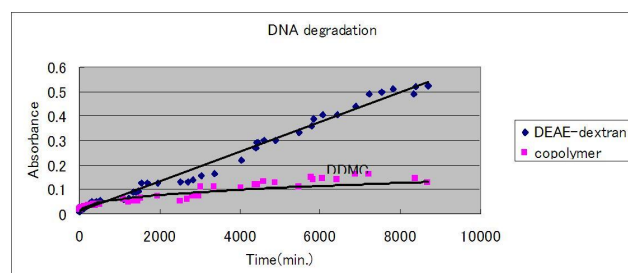


Fig. 2: DNA と複合体を形成させた DDMC/DNA のデオキシリボヌクレアーゼ (DNase) 分解。各サンプルは水 4ml に溶解された DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) の 10  $\mu$ g と 10x 緩衝液 (400mM Tris-HCl, 100mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>, pH8) の 0.1ml で 37 °C インキュベートした。分離 DNA はトルイジン青により 633nm の波長で測定。

DNase 分解に対する保護作用は、DEAE-デキストランに比較して DDMC では格段に大きく、これがトランスフェクション効率を大きくしていると考えられる。故に DNA は凝縮してエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、細胞内で分解から保護され、さらに一部、核にいたる核膜の透過を容易にすると考えられる<sup>7)</sup>。細胞内での分解からの保護は細胞内での DNA 分解酵素の DNase や更にデキストラン分解酵素であるデキストランスクラーゼ (Dextranucrase) の作用からの保護を意味しており、DDMC は DEAE-デキストランよりもはるかに安定的で優れていると考えられる。そこでは DDMC の高分子ミセルと DNA が錯体形成して、エンドサイトーシスを行い、一部は細胞核に至る。さらに細胞分裂時以外では DDMC /DNA での遺伝子発現がいずれも核内ではなく、大部分は核外で

発現しており、治療効果としては理想的なトランジット (transit) での遺伝子導入と考えられる。この様に DDMC の安定性には親水-疎水ミクロ相分離構造が大きく寄与していると思われる。以上より、DDS 用途に超分子体として DDMC を応用した場合、薬剤分離せず一体として作用する事が期待される。

### 3. DDMC/PTX 超分子複合体のキャラクタリゼーション

#### 3.1. DDMC/PTX 超分子複合体の熱分析 (DSC 分析)

Fig. 3 は DDMC/ PTX 超分子複合体及び PTX の DSC 測定結果を示す。上から順に、①DDMC (グラフト率 102 %), ②DDMC/PTX 複合体 (DDMC 9.6 mg/PTX 0.385 mg), ③DDMC/PTX 複合体 (DDMC 9.6 mg/PTX 0.709 mg), ④PTX である。④には特徴的な以下の 3 つの吸熱ピークと 1 つの発熱ピークがある (Table 1)<sup>22)</sup>。

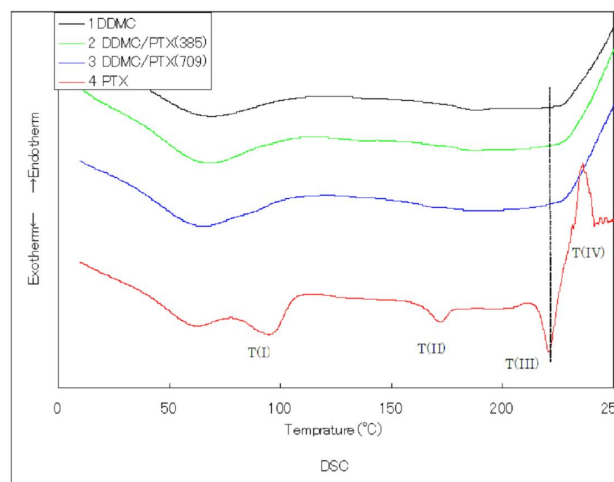


Fig. 3: DDMC/PTX 超分子複合体及びパクリタキセル (PTX) の熱分析 (DSC 分析)。①DDMC、②DDMC/PTX 複合体 (DDMC 9.6mg/PTX 0.385mg)、③DDMC/PTX 複合体 (DDMC 9.6mg/PTX 0.709mg)、④PTX。

I サンプルに吸着されている非構造水の脱離 (94.9 °C) II パクリタキセル二水和物からの脱水 (171.8 °C) III パクリタキセルの融点 (220.8 °C)  $\Delta H_m =$

20.6mJ/mg IV 分解温度 (236 °C)。一方、②および③のDDMC/PTX 複合体には、縦軸スケールをPTX 含量で規格化しているにもかかわらず、いずれも220.8 °Cの融点に相当する吸熱ピークが現れなかった。このことから、DDMC/PTX 複合体中には、PTX がナノレベルでゲスト分散しているものと考えられる。

### 3.2. DDMC/PTX 超分子複合体の赤外吸収スペクトル

Fig. 4(a) は DDMC (グラフト率 102%)、PTX、および DDMC/PTX 複合体の波数 ( $4,000 - 400\text{cm}^{-1}$ ) 近辺の赤外吸収スペクトルであり、Fig. 4(b) はそれぞれの X-H 伸縮振動領域である波数  $3,550 - 3,250\text{cm}^{-1}$  近辺の赤外吸収スペクトルである。PTX は  $3,500\text{cm}^{-1}$  付近に結晶水の吸収があり、DDMC 及び DDMC/PTX 複合体は  $3,400\text{cm}^{-1}$  付近にブロードな水素結合した N-H、O-H、NH-O の伸縮振動による吸収が観察される。さらにまた DDMC/PTX 複合体では、結晶水の吸収が消失し、N-H、O-H の吸収が高エネルギー側にシフトしている。これは、PTX の結晶水がとれるとともに DDMC と複合体を形成し、それらの複合体が超分子再集合している事を示唆しており、PTX の結合した DDMC はそれが結合していない状態よりもエントロピーが減少していると考えられ (エントロピー・エントロピー補償則)、生成した複合体はエントロピー弾性により超分子ストレスに対して十分に柔軟である事が期待される<sup>21)</sup>。これらの事はそれぞれに超分子的立体構造変化が起きているためであると考えられる。しかるにその高エネルギー側へのシフトは DDMC/PTX 複合体で著明である。このことが、DDMC/PTX 複合体がきちんとした立体構造へ折り畳まれていく時の推進力になっており、それには PTX の芳香環と DDMC の炭化水素骨格部分との疎水結合も寄与しているものと考えられる。Fig. 4(a) はまた DDMC において  $3,000\text{cm}^{-1}$  付近に C-H の伸縮振動による吸収を示すが、この分子間相互作用が起これば波数シフトが起こるため、吸収バンドは一般的にブロードな形となる。この分子間相互作用による疎水的な雰囲気は、その DDMC/PTX 複合体ではよりブロードな吸収となっている事からも推測される。以上のことより Fig. 4(a)、Fig. 4(b) は超

Table 1: DSC による PTX の吸熱ピークと発熱ピーク  
吸熱ピーク T(I)、T(II)、T(III) と発熱ピーク (IV)。

| T(I) | T(II) | $\Delta H(\text{II})$ | T(III) | $\Delta H(\text{III})$ | T(IV) |
|------|-------|-----------------------|--------|------------------------|-------|
| °C   | °C    | mJ/mg                 | °C     | mJ/mg                  | °C    |
| 94.9 | 171.8 | 9.605                 | 220.8  | 20.6056                | 236   |

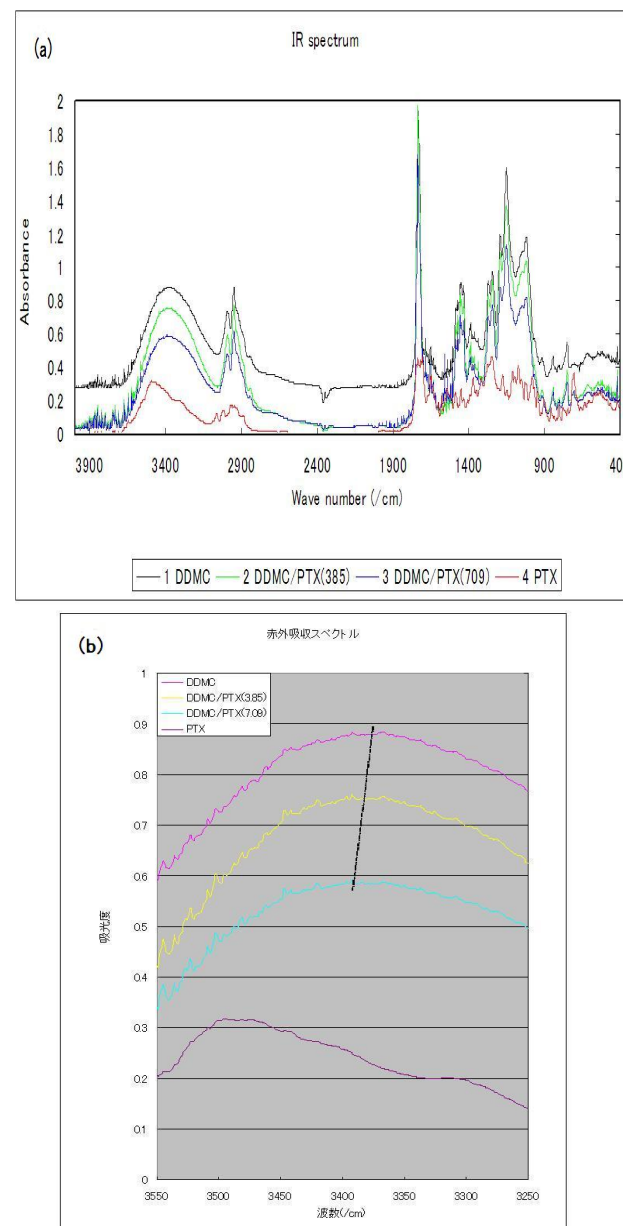


Fig. 4: DDMC/PTX 超分子複合体の赤外吸収スペクトル。  
(a) 中赤外領域 ( $4,000 - 400\text{cm}^{-1}$ )、(b) X-H 伸縮振動領域、①DDMC、②DDMC/PTX 複合体 (DDMC 9.6mg/PTX 0.385mg)、③DDMC/PTX 複合体 (DDMC 9.6mg/PTX 0.709mg)、④PTX。

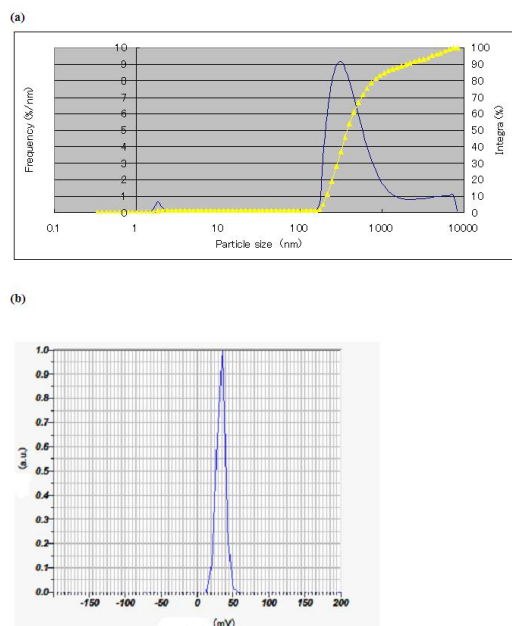


Fig. 5: DDMC/PTX 複合体の粒径分布とゼータ電位。(a) 粒径分布 (b)、ゼータ電位。

分子形成の為の DDMC/PTX 複合体の大きな疎水結合の存在を示している。

### 3.3. 粒径分布及びゼータ電位

レーザ光散乱 (ナノ粒子解析装置 nano Partica SZ-100 シリーズ) により DDMC/PTX 複合体の粒径分布とゼータ電位測定した。また DDMC/PTX 複合体の粒子を凍結乾燥して走査電顕で観察した。

Fig. 5(a)、Fig. 5(b) のように粒径分布は 200-300 nm、ゼータ電位 [電気泳動光散乱法 (レーザ ドップラー法)] はかなり大きい +36 mV くらいであった。Fig. 6 の SEM 写真ではかなり大きな均一な球粒子が観察され、会合して粒径 500 nm であるが、粒径 200-300 nm とほぼ同じレベルの大きさであった。しかしながら使用した DDMC の粒径は大きな会合により 1,200 nm 前後でありゼータ電位は +24 mV くらいであったがその一次粒径は 25nm 前後であると考えられる。DDMC/PTX 複合体は疎水結合により超分子再集合がおこり、分子間水素結合が解離し、その粒径は 1/4 に細分化されたが、いまだ水素結合による大きな会合が存在して安定ミセル化しているのではないかと考えられる。更にゼータ電位は電気二重層の最外面であるすべり面における電位であるので、粒径に比較してかなり大きい +36 mV

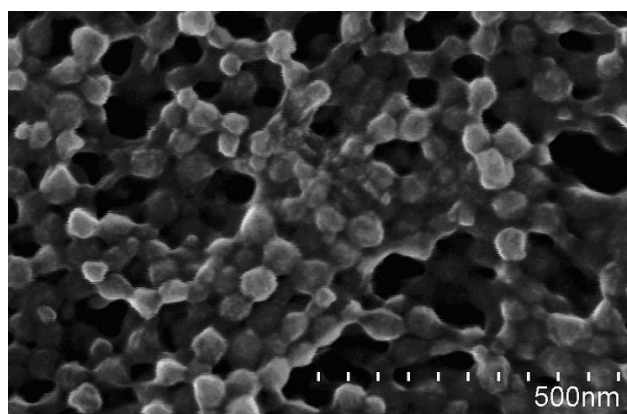


Fig. 6: DDMC/PTX 複合体の SEM 像。凍結乾燥された DDMC/PTX 複合体を走査電子顕微鏡 (HITACHI S-4800) により加速電圧 5kV で測定された。

のゼータ電位は DDMC/PTX 複合体粒子の分散の安定性に大いに寄与し、基質の包接に必要な疎水ポケットと思われるその表面の安定した空孔 (空洞) の存在を示していると考えられる。

## 4. メラノーマ B16F10 細胞を用いた DDMC/PTX 超分子複合体の in-vitro 抗癌作用

酵素の本体を本格的に研究したのは、ドイツのウィルシュテッター (R.Willstätter) <sup>26)</sup> で、サッカラーゼなどを精製し、酵素は高分子量の担体と低分子量の活性基からなると考えた (1920 年代)。アメリカのサマナー (J.B.Sumner) <sup>27)</sup> はウレアーゼを結晶化し、酵素はタンパク質であることを示し、酵素がタンパク質という巨大分子であることによって可能となる事に注目した。酵素が一般の触媒と異なり、高分子量の担体と低分子量の活性基からなることは、高分子超分子 (Supramolecular Polymer) の低分子量のゲスト抱接の概念に一致するものであり、バイオミメティックな超分子体が大きな分子量を有し、基質と中間体の構造変化に応じて機能発現に有利になるように、自己構造変化などエントロピー弾性によるフレキシブルな特性を有している (配座柔軟性)。Fig. 7 は WST8 テスト法による細胞生存率試験であり、パクリタキセル (PTX) 耐性のメラノーマ B16F10 細胞を用いた。ここでメラノーマ細胞の PTX に対する耐性は、Fig. 7 上に凸生存



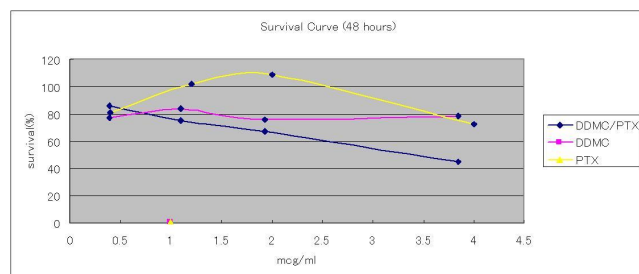


Fig. 7: メラノーマ細胞 B16F10 の対パクリタキセル生存率。パクリタキセル (PTX)、DDMC-パクリタキセル (DDMC/PTX) 複合体の MTT (WST8) 測定法開始後 48 時間。

率の曲線で明らかに成っている。凸生存率の曲線は反対事象どうしが合成されたものであり、ここでは PTX 濃度に対して、低濃度では PTX 濃度に生存率正に依存する遺伝子発現の因子 (事象 A) と、高濃度では PTX 濃度に生存率負に依存する因子 (事象 B) とによるものと考えられる。事象 A とはメラノーマ細胞の有する耐薬剤性の発現、事象 B とはパクリタキセルの薬効の発現とそれぞれ考えられる。ここで生存率の確率は生存率正に依存する遺伝子発現の因子確率  $P(A)$  と高濃度では PTX 濃度に生存率負に依存する因子確率  $P(B)$  の積事象の確率となる。この積事象の確率  $A \cap B$  とは、事象 A、B において「事象 A かつ B が起こる」という事象のことであり、事象 A、B が互いに独立なとき、積事象の起こる確率  $P(A \cap B)$  は下式で表される。

$$P(A \cap B) = P(A) \cdot P(B)$$

$P(A \cap B)$ : 事象 A または B が起こる確率

$P(A)$ : 事象 A が起きる確率

$P(B)$ : 事象 B が起きる確率

ゆえに Fig. 7 に示す積事象の起こる確率  $P(A \cap B)$  は  $P(A)$  と  $P(B)$  を漸近線とする凸曲線となる。

坂井<sup>25)</sup>は抗癌薬に対する耐性メカニズムの分類は①薬剤の細胞内取込みの抑制および排出の亢進によるもの、②薬剤代謝系の変化 (活性化酵素の減少、不活性化酵素の亢進) によるもの、③薬剤の標的分子の量的・質的变化によるもの、④癌微小環境によるもの、⑤ DNA 修復系に関わるもの、⑥抗アポトーシス/抗プレアポトーシスシグナルの亢進によるものなどに分類できると説明している。実際にはこれらの複雑因子を時系列的な遺伝子発現の因子で考える必要があ

ろう。その為にはシステム工学の考え方や解析手法を用いた「システム生物学」の手法が必要となる。東京大学の宮野<sup>29)</sup>等のシステム生物学によるタキソール (PTX) に対するメラノーマ細胞の薬剤耐性研究によれば PTX 濃度に逆らって生存する (生存率正) 遺伝子発現の因子 (事象 A: メラノーマ細胞の有する耐薬剤性) をうまく説明できる。タキサン系抗癌剤においてもその耐性遺伝子 TRAG-3 などが癌細胞で同定され多くの固形癌で高率に発現していることがわかっていて、宮野<sup>29)</sup>等の耐性研究はメラノーマ細胞に抗がん剤 PTX を投与して、24 時間にわたって時系列で遺伝子発現データを計測し、メラノーマの細胞内で時間を追って、どの遺伝子からどの遺伝子群に指令がでているかを見ようとしたものである。数理モデリングの方法はダイナミックベイジアンネットワークに非線形回帰を組み合わせた方法で、スパコンは 1024 コアを使って計算している。時間を追って記述すると、PTX を投与して 1 時間後、PTX の標的遺伝子の 1 つである TUBA4A (Tubulin alpha-4A chain) 遺伝子とタンパク質相互作用することが知られている RBM23 という遺伝子が大きなハブになって影響を与えはじめた。2 時間後、乳癌において既に PTX が効かないことの鍵となっている遺伝子として知られている TXNIP がハブになった。4 時間後、この TXNIP や EGR1 からたくさんの遺伝子に指令が出ている様子が見えてきた。6 時間後、乳がんにおいて既に PTX の耐性遺伝子として知られている CYR61 が活発になっていることがわかる。EGR1 も影響を与え続ける。宮野<sup>29)</sup>によれば、このように抗がん剤という「国難」に遭遇したがん細胞において、時間とともに変化する「がんの政局」が見えてくるといふ。メラノーマ細胞が自らの遺伝子制御システムを変化させて、いかに PTX に抵抗をしているか理解できる。この解析により、PTX 単体の本実験の不可思議な現象、即ち PTX 単体においては PTX 低濃度では反対にメラノーマ細胞の生存率が PTX 濃度に比例する (生存率正に依存する) 事情を、この経時的遺伝子発現の因子を用い旨く説明できる。しかしながら、高濃度では PTX 濃度に反比例する。さすがに高濃度では PTX の薬効が勝ち、PTX 濃度に生存率負に依存する因子、元来の PTX のチューブリン重合促進が発現してメラノーマの細胞は死滅す

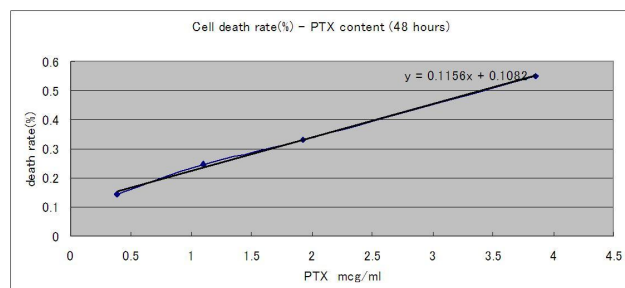


Fig. 8: メラノーマ細胞 B16F10 の死亡率 (対 DDMC-パクリタキセル (PTX) 複合体中パクリタキセル)。DDMC-パクリタキセル (DDMC/PTX) 複合体の MTT (WST8) 測定法開始後 48 時間。

るのであろう。すなわち PTX 濃度に生存率負に依存する因子 (事象 B) が支配的になり、メラノーマ細胞に対する PTX の薬効は顕著となる。この現象は言い換えれば、PTX が条件的にメラノーマ細胞のタキソールの耐性遺伝子と言うポテンシャル障壁を乗り越えなければ、薬効は顕著とならない事を意味する即ち、反応体分子が乗り越えなければならないポテンシャル障壁の高さを活性化エネルギーという。化学速度論で知られている様に、この過程で大きなエネルギーの障壁を越えるために高濃度の PTX 濃度が必要な事がわかる。一方、DDMC/PTX 複合体の挙動はある意味で特異的である。時間とともに変化する「がんの政局」に影響をうけず、Fig. 8 のごとく PTX 初濃度と生存率変化 (負) に直線依存する。そこではメラノーマ細胞の PTX に対する耐性は見られず、まるで細胞内の一連の酵素反応のようであり、アロステリック環境での酵素反応のミカエリス・メンテンの式にあてはまる。またチェン・プルソフ (Cheng-Prusoff) 式<sup>30)</sup>より細胞死% (Cell death(%)) (Cd) は  $C_1$  を定数として PTX の基質のチューブリンの重合速度 (dp/dt) つぎの関係になる。

$$Cd/dt = adp/dt + C_1 \quad (1)$$

基質と酵素の一対一の酵素反応モデルを仮定したミカエリス・メンテンの式では

$$v = k_{cat} [E]_0 [S]_0^n / ([S]_0^n + K_m) \quad (2)$$

ここで  $K_m$  はミカエリス定数で、 $n \geq 1$ 、いま、 $[S] \gg K_m$  の条件 (アロステリック環境) を考え、本実験の結果は次式 (3) で与えられるので<sup>30)</sup>、ミカエリス・メンテンの式 (2) が以下なりたつ事が解る。

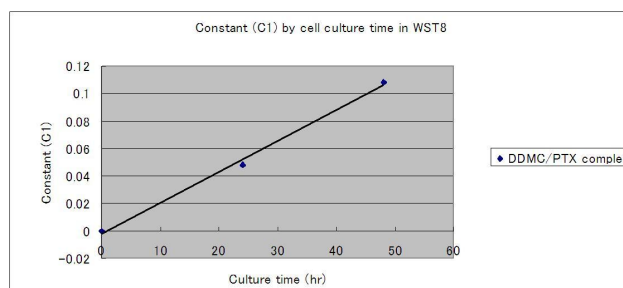


Fig. 9: デバイス定数と WST8 法の細胞反応 (培養) 時間の関係。

$$v = k_{cat} [E]_0 \quad (3)$$

ここでは細胞死速度 (Cell death(%) rate) は酵素反応速度  $v$  であり、PTX の濃度は酵素初濃度で  $[E]_0$  となるので、細胞死% (Cell death(%)) (Cd) は  $C_1$  を定数として、(1) 式より、

$$Cd = k_{cat} [E]_0 t + C_1 t \quad (4)$$

24 時間の反応では

$$Cd = 0.1062 [E]_0 + 0.0481 \quad (5)$$

48 時間の反応では

$$Cd = 0.1156 [E]_0 + 0.1082 \quad (6)$$

となり、0.0481 及び 0.1082 は酵素初濃度  $[E]_0$  の装置 (デバイス) 定数と考えられ、0 時間では 0 となることによる化学工学的手法により (Fig.9)、これらの式が成り立つ事がわかる。ここでアロステリック環境下のミカエリス・メンテンの式に適用する事で、DDMC/PTX 超分子複合体の系ではアロステリック効果で基質と酵素の一対一の酵素反応モデルの適用が証明される。以上より DDMC/PTX 複合体の系では式 (2) のごとく超分子性を反映したアロステリック促進の可能性のある「鍵と鍵穴」モデルを反映した酵素反応と同じ選択的触媒反応と考えて良い。DDMC/PTX 複合体の系では  $\beta$ -チューブリンに DDMC/PTX が一対一の酵素反応モデルで反応していると考えられる。これは、「DDMC をホストとし、PTX ゲストとする」包接化合物により、その超分子特性が人工的な酵素・基質特異性を示してい

るのである。この基質特異性が PTX の標的分子であるチューブリン蛋白との反応を低濃度から持続し、PTX 単体では起こる低濃度での各種の妨害シグナル（生存率正に依存する遺伝子発現の因子）を排除し、上記のメラノーマの細胞の PTX の耐性に影響されずチューブリン蛋白と反応、メラノーマ細胞に自然死 [アポトーシス (apoptosis)] 至らしめていると想像できる。既存の PTX の DDS 製剤 (DDS 担体と PTX の複合体)、即ち PTX とアルブミンの複合体 (アブラキサシ)、陽イオンの電荷を帯びたリポソームに PTX を内包化させた製剤 (EndoTAG-1)、あるいは PTX を有するポリグルタミン酸複合体等は、いずれも細胞内で不安定で複合体が細胞内で分解されて PTX が放出され薬効を表している。一方、DDMC/PTX 複合体は細胞内で安定に存在して分解されず、そのまま超分子として薬効を表すと考えたほうがよい。以上より DDMC/PTX 複合体によるチューブリン重合反応はその活性点 (PTX) に基質が配位、重合する事により促進されると考えられる。非ウイルス性ベクターを使ったトランスフェクションの場合、核移行しにくいという難点があり、細胞分裂時以外では DDMC/DNA 複合体での遺伝子発現がエンドサイトーシスによりいずれも核内ではなく、大部分は核外で発現しており、DDMC/PTX 複合体による薬剤の効果としてもトランジットな導入と考えられる。その高分子の大きな分子量を考えれば、それだけで ABC トランスポーターである ABCB5 抗がん剤排出トランスポーター等を排除無力化出来ると言う考えもあるが<sup>31)</sup>、他の担体とパクリタキセルの複合体と同じようにもし核内で分解すれば、メラノーマ細胞の PTX の耐性として当然 ABCB5 トランスポーター等で PTX は細胞外に排除される運命である。しかし DDMC/PTX 複合体はみごとにこれを排除している様に見受けられる。今、これらの現象を酵素-基質反応による細胞死速度として熱力学的に考えてみよう。遷移理論 (transition-state theory) によれば、酵素分子認識に伴うエントロピー低下 (エントロピートラップ) や、アロステリックな歪み (ひずみ又はゆがみ) ができると、基質は遷移状態になりやすく、活性化エネルギーを下げる。一方、酵素-基質反応では吸着基質が酵素界面に束縛され自由度が低下するため、一般的にエントロピーは低下する。したがって、酵素-基質反

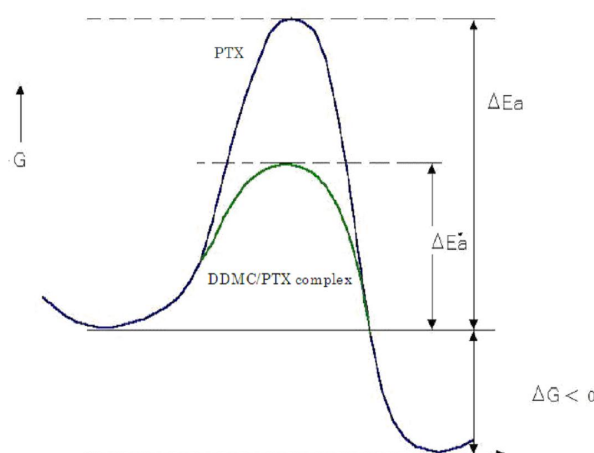


Fig. 10: 活性化エネルギー  $\Delta E_a$  とパクリタキセル (PTX)、DDMC-パクリタキセル (PTX) 複合体によるメラノーマ細胞死反応。  $E_a$ : パクリタキセル (PTX) の活性化エネルギー、  $E_a'$ : DDMC-パクリタキセル (PTX) 複合体の活性化エネルギー。

応が自発的に進行するためには、自由エネルギー変化  $\Delta G = \Delta H - T \Delta S < 0$  となる必要があり、エンタルピー変化  $\Delta H$  も大きく低下しなければならない (エンタルピー・エントロピー補償則)。事実、基質吸着のためエンタルピー変化  $\Delta H^*$  はその界面の減少により大きく低下する。エンタルピー変化  $\Delta H^*$  は Fig. 10 の活性化エネルギー  $\Delta E_a$  とほぼ等しく、その減少により DDMC/PTX 複合体はチューブリン重合反応を促進、これが細胞死速度  $R \propto e^{-\Delta H^*/RT}$  に直接反映する事により DDMC/PTX 複合体によるメラノーマ細胞死の促進につながる。他方、PTX 単独では大きなエンタルピー、即ち大きな活性化エネルギー  $\Delta E_a$  が必要なので、その為 PTX 量を増加させないとメラノーマ細胞は死に至らないと考えられる。

## 5. メラノーマ B16F10 細胞を用いた DDMC/ PTX 超分子複合体の in-vivo 抗癌作用

検液として 1 PTX、2DDMC/PTX4 (粒径 50nm)、3 DDMC/PTX5 (粒径 290nm)、4 生理食塩水を、癌細胞として in-vitro 試験と同じマウス C57BL/6J 由来の極めて悪性度の高いメラノーマ細胞 (Melanoma Cells B16F10) を用い、実験動物として マウス (C57BL/6



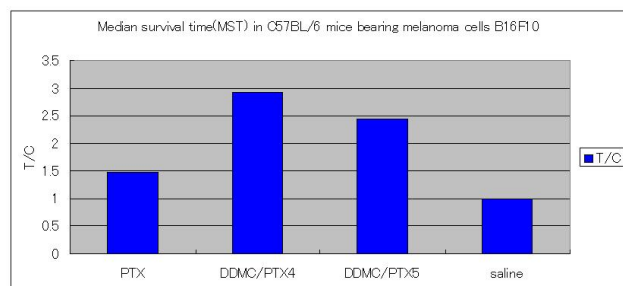


Fig. 11: 50%生存期間による相対的生存期間の中央値 (MST; T/C; 治療群/C; 対照群)。メラノーマ B16F10 細胞を用い、実験動物としてマウス (C57BL/6 系の 6 週齢の雌性マウス) (一群 3 匹)、生理食塩水、PTX、DDMC/PTX4 (粒径 50nm)、DDMC/PTX5 (粒径 290nm)。

系の 6 週齢の雌性マウス) (一群 3 匹) を使用して、大分大学動物実験の倫理に関する規定 (許可番号 N009001) により in-vivo 試験を行った。実験 7 日前より飼育、接種後 12 日後、マウスの背中皮膚に注入し ( $2.0 \times 10^6$  cells/mouse)、実際の効果を把握する為に腫瘍の体積がかなり過酷な  $1885\text{mm}^3$  前後に達した、肺などの転移が疑われる時点から実験を開始した。開始 12 日後及び 14 日、16 日に、10mg PTX/kg 換算で腹腔内に注射投与して 50% 生存期間による相対的生存期間の中央値 T/C (MST; % T; 治療群/C; 対照群) を求めその薬剤効果を評価した。その薬剤効果は Fig. 11 が示す様に、生理食塩水、PTX、DDMC/PTX4 (粒径 50nm)、DDMC/PTX5 (粒径 290nm) 群でそれぞれ 120 hours (T/C, 1.0), 176 hours (T/C, 1.46), 352 hours (T/C, 2.93), 292 hours (T/C, 2.43) であり、超分子体 (DDMC/PTX) はゲスト役のパクリタキセル (PTX) の 2 倍の大きな奏効性を示した ( $p < 0.03$ )。同じく、投与後 24 時間くらいから PTX4 あるいは PTX5 の DDMC/PTX 群のマウスでは腫瘍の形状が円から楕円へと変化した。それに比較して PTX 単体や生理食塩水の対照は腫瘍の形状は依然円に近く変化しなかった。これは DDMC/PTX 群のマウスでは微小管  $\alpha$ ,  $\beta$  チューブリンの重合促進による細胞分裂阻害の内皮に生じる細胞骨格ストレス変化や腫瘍近辺に新生血管阻止などの腫瘍の形態的な発育阻止が裏付けられ、DDMC/PTX 複合体の薬剤効果が著効性の可能性があり注目される。この PTX のグループと DDMC/PTX のグループとの差は顕著であり、肺などの転移が疑われる過酷な条件での DDMC/PTX 複合体の有効性が明ら

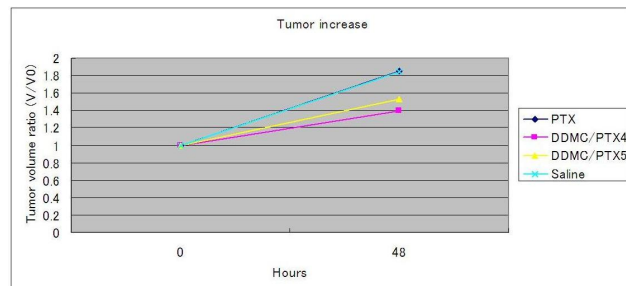


Fig. 12: 腫瘍増加率 (投与 48 時間後)。メラノーマ B16F10 細胞を用い、実験動物としてマウス (C57BL/6 系の 6 週齢の雌性マウス) (一群 3 匹)、生理食塩水、PTX、DDMC/PTX4 (粒径 50nm)、DDMC/PTX5 (粒径 290nm)。

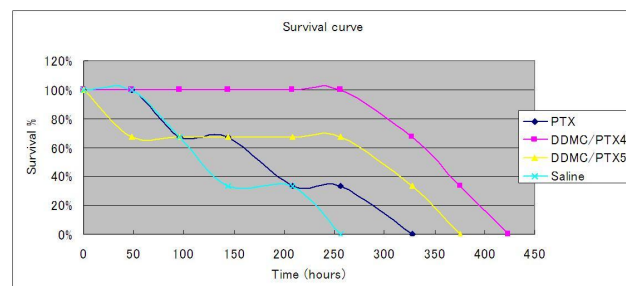


Fig. 13: 生存率曲線。メラノーマ B16F10 細胞を用い、実験動物としてマウス (C57BL/6 系の 6 週齢の雌性マウス) (一群 3 匹)、生理食塩水、PTX、DDMC/PTX4 (粒径 50nm)、DDMC/PTX5 (粒径 290nm)。

かになった。Fig. 12 は投与から 48 時間後の腫瘍増加率を示す。PTX は殆んど効果ないが、DDMC/PTX4 は 46%に、DDMC/PTX5 は 63%にそれぞれ低下させている ( $p < 0.3$ )。Fig. 13 は MST を求めたマウスの生存率曲線を示す。PTX・生理食塩水群と DDMC/PTX4・DDMC/PTX5 群とは明らかな違いが観察される。PTX・生理食塩水群は酷な条件での投与初期から生存率変化 (低下) をしめすが、一方 DDMC/PTX4・DDMC/PTX5 群では酷な条件でも投与初期からの生存率変化 (低下) は少なく、256 時間までは変化は殆んどなくプラトーに推移している。これは DDMC/PTX 群は PTX・生理食塩水群とは異なり、がんの肺転移モデルとして知られるマウス B16F10 メラノーマ細胞に対して肺などの致死的転移抑制あるいは転移癌の増殖抑制により生存率を維持していると考えられる。これらにより新生血管阻止、増殖抑制、致死的転移抑制など DDMC/PTX 複合体が有効なのは明らかである。なお Fig. 14 は PTX 群と DDMC/PTX4 群の投与 208 時間後のマウスを示

Two mice of PTX group and DDMC/PTX4 group after 208 hours from I.P.



Fig. 14: PTX 群 (左) と DDMC/PTX4 群 (右) の投与後 208 時間マウス。

している。ここでも DDMC/PTX4 群のマウスは生存して、腫瘍サイズも縮小している。皮膚出血、治癒しつつある状態である。これはマクロファージの腫瘍壊死因子「TNF- $\alpha$ 」サイトカインの放出と思われる腫瘍の出血性壊死の症状であった（後日、この DDMC/PTX4 群のマウスの RT-PCR 産物を泳動した結果により「TNF- $\alpha$ 」の個体内増加は確認されている）。いま腫瘍内 M1 マクロファージの「TLR3/TICAM-1」経路が TNF- $\alpha$  産生のカギになることが知られている<sup>32)</sup>。パクリタキセルは先天的あるいは後天的免疫反応に影響を与える事が報告されており、PTX は M1 マクロファージを誘導して IL1  $\beta$ 、GM-CSF、TNF  $\alpha$  のような炎症誘発性サイトカインおよび NO を分泌させる<sup>33)</sup>。近年がん治癒にとってマクロファージの M1、M2 は重要な因子 (Important Components) だと考えられてきたが<sup>34)</sup>、最近 M2 マクロファージが多いと悪性度が高いと報告され注目されている。これはマクロファージ M2 が悪玉癌細胞の血管新生やリンパ管新生に強く関与しているからである。志馬らはこの悪玉癌細胞が自然免疫のアジュバント、二重鎖 RNA の作用によって、その M2 マクロファージを癌傷害性の M1 型に変換し癌が治癒することを報告している<sup>32)</sup>。菰原らはインスリンと同じような血糖値の上昇を抑える働きをするグルコーストランスポーターを活性化するリンゴ由来の CA (コロリン酸 Corosolic acid) などトリテルペノイド化合物が NF-kB と Stat3 などの M2 への分化に関わるシグナル伝達因子を阻害し癌が縮小治癒することを示している<sup>35)</sup>。この様に癌転移に関する血管新生やリンパ管新生に対するマクロファージ M2 の役割の重要性が強く認識され始めている。M2 への分化に関し

ては DDMC/PTX 複合体自身がもともとステルス性を有し、分解されにくい事から異物認識されにくく、*in vitro* 試験で基質と酵素の一対一の多酵素反応モデルにおけるミハエルメンテン式に一致する事から推測される様に、酵素反応モデルでは無駄な炎症シグナルを受ける事が極めて少ないと思われるので、M2 マクロファージ分化への原因になる炎症誘発性サイトカインは極めて少ない筈であり、腫瘍由来因子の刺激により stat3 が活性化され M2 マクロファージに分化される可能性は低いと考えられる。また菌体の細胞壁構造多糖には稀な  $\alpha$ -1,6 グリコシド結合をその糖鎖の大部分に含む DDMC は寄生虫、昆虫や糸状菌などの体に含まれている成分であるキトサン等 ( $\beta$ -1,4) とは異なり、ヒストン脱メチル化酵素 Jmjd3 経路<sup>36)</sup> による M1 マクロファージの M2 マクロファージ分化が起きにくいと想像する。即ち結果的に DDMC/PTX 複合体の薬理作用は M2 マクロファージの腫瘍補助作用を抑えて、癌の増殖を抑制する方向に向かうであろう<sup>32)</sup>。

## 6. 超分子のアロステリック効果

パクリタキセル (PTX) は、イチイの皮から分離された抗腫瘍剤であり、 $\beta$ チューブリン (tubulin) に結合して会合を促進 (脱重合を阻害) する。そのがん細胞の MDR は例えばチューブリン変異の存在によるか、またはグルタチオン仲介機構による。超分子のアロステリック促進は酸素分子がヘモグロビンに結合する時のように、リガンドの結合が基質分子と他の結合サイト (活性点) の反応性を高める現象である。ヘモグロビンの例では、酸素は基質であると同時にエフェクターとして、効率的に働いている。アロステリックサイトは、隣のサブユニットの結合部位である。一つのサブユニットに基質が結合すると、構造が変化し、生じる残留ストレスが残りの結合部位の親和性を高める。超分子体も酵素のような基質特異性をもつと同時にエフェクターとして働く事が出来る。DDMC/PTX 複合体は疎水結合により超分子再集合して、配座柔軟性のため最終的には 50-270 nm 近い凝集体になる。最初、DDMC/PTX 複合体は基質チューブリンとの疎水的相互作用により、基質チューブリンのいわゆる DDMC の疎水性ポケットに

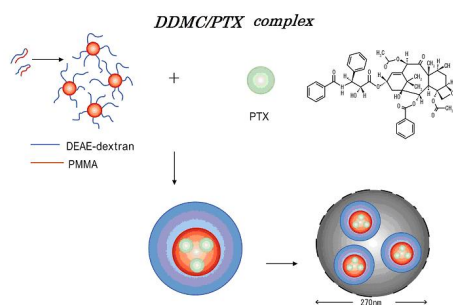
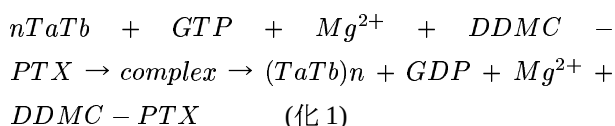


Fig. 15: DDMC/PTX 超分子複合体の模式図。

よる  $\beta$  チューブリン配位より DDMC 活性点 PTX と  $\alpha, \beta$  チューブリン 2 量体との酵素 (DDMC/PTX) - 基質 (nTaTb) 複合体 (Michaelis complex) が生じると思われる。酵素-基質複合体の安定性は  $1/K_m$  の大きさでしめされるがこの場合はかなり小さいであろう<sup>37)</sup>。この  $\alpha, \beta$  チューブリン 2 量体と DDMC/PTX 複合体は (+) 成長端に  $Mg^{2+}$  と GTP を有して



となる。nTaTb を基質  $\alpha, \beta$  チューブリン 2 量体、DDMC-PTX を触媒酵素とする。  $\beta$  チューブリン側をプラス端 (伸長端),  $\alpha$  チューブリン側をマイナス端とよぶ。微小管のほとんどの部分は GDP 結合型チューブリンである。細胞内では多くの微小管がマイナス端を微小管形成中心 (動物細胞では中心体、ここでは DDMC/PTX 複合体) に配置し、伸長端を細胞の各所に伸ばす<sup>38)</sup>。1 つの態様において、チューブリン結合剤は微小管安定化剤である。通常は微小管  $\alpha, \beta$  チューブリンのヘテロ二量体よりなる繊維が 13 本集まって形成された中空の管で重合は停止し細胞分裂が開始されるが、DDMC/PTX 複合体により微小管  $\alpha, \beta$  チューブリンは極度に安定化されるであろう。重合は停止せず、続いて細胞のアポトーシスを生じるであろう<sup>39)</sup>。模式図 Fig. 15, Fig. 16 においてはチューブリン重合反応がチューブリンの DDMC/PTX 複合体の配位、内部への拡散、チューブリンの伸長端の DDMC/PTX 複合体の配位と言うように、チュー

## Allosterical enzymatic reactions

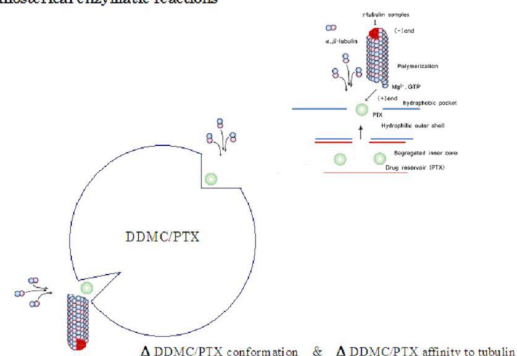


Fig. 16: DDMC/PTX 超分子複合体とチューブリン 2 量体との酵素-基質関係、アロステリックな重合促進反応の模式図。

ブリン成長反応が DDMC/PTX 複合体により制御されている。チューブリンの DDMC/PTX 複合体内部への拡散は疎水結合的な DDMC/PTX 複合体の PTX 部分の表面への配向がありさらに成長反応を加速させて細胞のアポトーシスを生じる。まるで一連の酵素反応を想像させる、この配位重合 (coordinated polymerization) の特徴はチューブリン 2 量体とチューブリン成長末端の両方が超分子体に配位して進行する事である。これが大きなチューブリン基質選択性になり、耐性出現を阻害するであろう。一般的な微小管作用薬においては、タキソール (PTX) 類と発現している  $\beta$ -チューブリンサブタイプ (class I, II, III, IVa, IVb, VI) の組成変化により基質との親和性に変化を生じ、反応促進の為に薬剤-基質複合体形成が不可能となり耐性が出現することが報告されている。即ち通常のタキソール類は、重合した  $\beta$ -チューブリンポリマーに作用するため、ポリマーの不安定な Class III, IV タイプの発現増加により、それらポリマーに作用出来ず耐性が亢進すると報告されている<sup>40)</sup>。そこで  $\beta$ -チューブリンサブタイプのコンフォメーション変化はパクリタキセルにとつて  $\beta$ -チューブリンがもはや基質としての特性を失い、 $\alpha, \beta$  チューブリンの重合反応に関与できず。それ故、通常のタキソール類は細胞分裂を阻止する薬効を失うであろう。それが超分子体でエントロピー弾性により構造上配座柔軟性をもつ場合は酵素のような基質特異性を持つので、組成変化による基質との親和性変化はアロステリック効果に特有のシグモイダルな反応性を持ち、安定で大きな  $K_m$  の僅かな変動で補う。それ故、それ

ら人工酵素化された DDMC/PTX 超分子複合体は Fig. 16 に示すようにアロステリック作用とその基質選択性を持つことから  $\beta$ -チューブリンサブタイプのコンフォメーション変化に素早く対応して反応し、薬効を持続して失わないと想像する<sup>41)</sup>。以上この様に大きなチューブリン基質選択性とアロステリック作用でこれらチューブリン変異の存在やグルタチオン仲介機構による癌細胞の耐薬剤性 (MDR) に超分子複合体 (DDMC/PTX) は十分対抗できると信じる根拠があるようである。

## 7. おわりに

癌メカニズムの解明は、近年、遺伝学・免疫部門での分子生物学手法で大きな成果を上げてきた。今回、本著ではそれらとの切り口とはまた違う生物工学的観点からの制癌メカニズム解明を提案している。考えるに、我が国の戦後経済の担い手である、モノづくりの工学的手法は複雑システムをいかに単純化する事にあり、複雑な問題点を単純モデル化して迅速に解決する事にあった。制癌メカニズムの複雑さを生体内シグナルによる分子生物学手法による解決だけによらず、逆に薬剤の機能を切り口として単純化して考える、この様な薬・工学的手法で容易に解決できるのではないかと考えている。(本稿は著者等の最近の研究報告<sup>12,20,41)</sup>を中心にいままでの DDMC の研究を整理まとめたものである事を申し添える。)

## 8. 要 約

DEAE-デキストラン- MMA グラフト共重合体 (DDMC) をホストとして用い、パクリタキセル (PTX) をゲストとして超分子複合体を合成した。メラノーマ癌細胞内で DDMC/PTX 複合体が超分子性をしめし、極めて効果的な薬剤効果がみられた。薬剤耐性メラノーマ細胞の PTX に対する耐性は、凸生存率の曲線で明らかに成っているが、ほとんど DDMC/PTX 複合体では耐薬剤性 (MDR) を示さず、ここでは細胞死滅率と PTX 濃度の関係が Michaelis-Menten 型を示し、PTX 低濃度でも有効であり、アロステリック促進の可能性のある酵素反応と同じ選択的触媒反応であること

が観察された。既存の担体とパクリタキセルの複合体を用いる DDS などとは異なり、DDMC/PTX 複合体は細胞内で分解されず、そのまま超分子として薬効を表していると考えられ、DDMC/PTX 超分子複合体はゲスト役のパクリタキセル (PTX) の 2 倍もの大きな奏効性を示した ( $p<0.03$ )。

## 9. 謝 辞

日本文理大学名誉教授 故菊池康男先生 (元大分大学教授) に感謝いたします。菊池先生没後、早いもので 7 年も経ちました。菊池先生は日本での多糖類 PIC (polyion complex) 研究の先駆けとして知られ、その多くの研究期間が大分大学工学部によるものでした。本総合報告は菊池先生の PIC 研究からの進化発展によるものです。又著者の 1 人が在籍した住友電装株式会社において、本研究にいたる PIC 研究を理解支援していただいた故小松改造氏 (元社長、会長)、故志賀徹也氏 (元専務取締役) に感謝いたします。本報の一部は、平成 24 年度厚生労働科学研究費 (H23-Shinko-Ippan-015) および文部科学省科学研究費 (Basic C23590803) により実施した。

## 参考文献

- 1) Matsumura, Y. and Maeda, H.: Cancer Research, 46 (12 Pt1), 6387-6392 (1986).
- 2) Allen, T. M. and Chonn, A.: FEBS Lett., 223, 42-46 (1987).
- 3) Oku, N., Namba, Y., and Okada, S.: Biochim. Biophys. Acta., 1126, 255-260 (1992).
- 4) Savic, R., Luo, L., Eisenberg, A., and Maysinger, D.: Science, 300, 615-618 (2003).
- 5) Lehn, J.-M.: Angew. Chem., 100, 91-116(1988).
- 6) DeVita, V. T.: Principles of Cancer Management: Chemotherapy. In: Cancer. Principles and Practice of Oncology, (DeVita V. T. et al.), 5, 333-347, Lippincott-Raven (1977).
- 7) 佐藤智典: 高分子, 51, 837-840 (2002) .

- 8) 大西靖彦, 菊地康男: 高分子論文集, 60, 359-364(2003).
- 9) 大西靖彦, 菊地康男: 高分子論文集, 61, 139-143(2004).
- 10) Onishi, Y., Eshita, Y., Murashita, A., Mizuno, M., and Yoshida, J.: J. Appl. Polym. Sci., 98, 9-14(2005).
- 11) Onishi, Y., Eshita, Y., Murashita, A., Mizuno, M., and Yoshida, J.: Bull. Research Center Environ. Sci. Tech., Nippon Bunri Univ., 5,8-13(2006).
- 12) Onishi, Y., Eshita, Y., Murashita, A., Mizuno, M., and Yoshida, J.: Nanomedicine: Nanotech., Biol. Med., 3, 184-191(2007).
- 13) Onishi, Y., Eshita, Y., Murashita, A., Mizuno, M., and Yoshida, J.: J.Gene Med.,10, 472(2008).
- 14) Eshita, Y, Onishi, M., Mizuno, M., Yoshida, J., Kubota, N. and Onishi, Y.: Molecules, 14, 2669-2683(2009).
- 15) Onishi, Y., Eshita, Y., and Mizuno, M.: Delivery Technologies for Biopharmaceuticals, (Jorgenson, L. and Nielson, H.M.), 339-355, John Wiley & Sons (2009).
- 16) Onishi, Y., Eshita, Y., and Mizuno, M.: Advances in Nanotechnology, (Bartul, Z. and Trenor, J.), 3, 409-447, Nova Science Publishers (2009).
- 17) 江下優樹、東原絢子、大西政康、水野正明、吉田純、住吉秀明、吉岡秀克、高崎智彦、石川雄一、久保田直治、大西靖彦:大分大学工学部研究報告, 57, 1-8(2010).
- 18) Onishi, Y., Eshita, Y., and Mizuno, M.: Polysaccharide Based Graft Copolymers,( Kalia, S. and Sabaa, M.W. ), 205-269, Springer-Verlag (2013).
- 19) Eshita, Y., Onishi, M., Mizuno, M., Yoshida, J., Kubota, N., and Onishi, Y.: J Nanomedic. Nanotechnol., 2,1-8(2011).
- 20) Eshita, Y, Ji, R.C., Onishi, M., Mizuno, M., Yoshida, J., Kubota, N., and Onishi, Y.:J. Nanomed. Nanotechol., S5:002 (2012).
- 21) Okumura, Y. and Ito, K.:J. Adv. Mater., 13, 485-487(2001).
- 22) Dhanikula, A.B. and Panchgnula, R.:AAPS Journal, 6 (3), Article 27,12(2004).
- 23) 大屋 章二 等、特願 2 0 0 6 - 3 2 6 6 4 1
- 24) Auzenne,E., Ghosh, C.S., Khodadadian, M., Rivera, B., Farquhar, D., Price, R.E., Ravoori, M., Kundra,V., Freedman,R.S., and Klostergaard,J.: Neoplasia, 9, 479-486(2007).
- 25) Merck Index, 12 edition, (1996).
- 26) Willstatter, R. and Pfannenstiel, A. I.: Justus Liebigs Ann. Chem., 422, 1-15(1920).
- 27) Sumner, J.B. and Dounce, A.L.: J. Biol. Chem., 121, 417-424(1937).
- 28) 坂井 隆之: 日薬理誌, 127, 342-347(2006).
- 29) Miyano, S.: CICSJ Bulletin, 29, 42-48(2011).
- 30) Cheng, Y. and Prusoff, W. H.: Biochem. Pharmacol., 22, 3099-3108(1973).
- 31) Zhang, P., Ling, G., Pan, X., Sun, J., Zhang, T., Pu, X., Yin,S., and He,Z.: Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8, Issue 2, 185-193(2012).
- 32) Shime, H., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Tanaka, S., Nakane, A., Iwakura, Y., Tahara, H., Inoue, N., and Seya, T.: PNAS, 109 no. 6, 2066-2071(2012).
- 33) Lanni, J.S., Lowe, S.W., Licitra, E.J., Liu, JO., and Jacks, T.: PNAS, 94, 9679-9683(1997).
- 34) Ji R.C. : Cell Mol. Life Sci., 69(6),897-914(2012).
- 35) Horlad, H., Fujiwara, Y., Takemura, K., Ohnishi, K., Ikeda, T.,Tsukamoto, H., Mizuta, H., Nishimura, Y., Takeya, M., and Komohara, Y.: Mol. Nutr. Food. Res., 57(6),1046-1054(2013).



- 
- 36) . Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley D M, Nakanishi K, Nakai K, Akira S. : Nature Immunology, 11, 936-944(2010).
- 37) Hill, A.V.:J. Physiol., 40 (Suppl) iv-vii. Retrieved , 03-18(2009).
- 38) Wadsworth P. and Khodjakov A. : Trends Cell Biol., 14,413-419(2004).
- 39) Xiao, H., Verdier-Pinard, P., Fernandez-Fuentes, N., Burd, B., Angeletti, R., Fiser, A., Horwitz, S. B., and Orr, G. A.: PNAS, 103, 10166-10173(2006).
- 40) Liu, B., Staren, E.D., Iwamura, T., Appert, H.E., and Howard, J.M.:J Surg Res., 99, 179-186(2001).
- 41) Eshita, Y., Ji, R.C., Onishi, M., Runtuwene, R.L., Noguchi, K., Kobayashi, T., Mizuno, M., Yoshida, J., Kubota, N., and Onishi, Y.: J Nanomed. Biotherapeut Discov., 2:109(2012).