

超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用した腫瘍関連マクロファージ

選択的核酸医薬送達に基づくがん治療に関する研究

2013

河野 裕 允



# 目次

## 総論の部

|    |   |
|----|---|
| 緒言 | 1 |
|----|---|

|   |   |
|---|---|
| 第1章 NF- $\kappa$ Bの活性を抑制するオリゴ核酸医薬の導入によるマクロファージの表現型転換の検証 | 2 |
|---|---|

|  |   |
|--|---|
| 第1節 NF- $\kappa$ B (p50) siRNAの導入によるM2様マクロファージの表現型変化 | 3 |
|--|---|

- 1-a colon-26細胞培養上清によるマクロファージのM2型への誘導
- 1-b NF- $\kappa$ B p50サブユニットに対するsiRNAのノックダウン効果
- 1-c サイトカイン産生の変化
- 1-d 増殖因子およびマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の発現量の変化
- 1-e 一酸化窒素産生の変化
- 1-f 受容体発現量の変化
- 1-g B16BL6細胞培養上清を用いて誘導したM2様マクロファージにおける検討
- 1-h PAN-02細胞培養上清を用いて誘導したM2様マクロファージにおける検討

|  |   |
|--|---|
| 第2節 NF- $\kappa$ B decoyの導入によるM2様マクロファージの表現型変化 | 9 |
|--|---|

- 2-a サイトカイン産生の変化
- 2-b 増殖因子、MMPおよびアルギナーゼの発現量の変化
- 2-c B16BL6細胞およびPAN-02細胞培養上清を用いて誘導したM2様マクロファージに対するNF- $\kappa$ B decoyの効果
- 2-d NF- $\kappa$ B decoyの効果の持続性

|        |    |
|--------|----|
| 第3節 考察 | 13 |
|--------|----|

|  |    |
|--|----|
| 第2章 超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用したNF- $\kappa$ B decoyの腫瘍関連マクロファージへのターゲティングと固形がん治療効果の評価 | 17 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| 第1節 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/NF- $\kappa$ B decoy複合体(Man-PEG bubble lipoplex)の開発 | 17 |
|--|----|

- 1-a Man-PEG bubble lipoplexの作製と物理化学的性質
- 1-b 腫瘍関連マクロファージ(TAM)へのNF- $\kappa$ B decoy送達に関するin vitroにおける基礎的検討

|  |    |
|--|----|
| 第2節 colon-26固形がんモデルマウスにおけるTAM選択的NF- $\kappa$ B decoy導入 | 19 |
|--|----|

- 2-a Man-PEG bubble lipoplex静脈内投与後のNF- $\kappa$ B decoyの体内分布特性
- 2-b Man-PEG bubble lipoplexの腫瘍組織内への注入によるTAMへのNF- $\kappa$ B decoy送達

|  |    |
|--|----|
| 2-c TAM の核内 NF- $\kappa$ B 量の変化                                      |    |
| 第 3 節 in vivo NF- $\kappa$ B decoy 導入による TAM 表現型転換とがん治療              | 22 |
| 3-a 腫瘍組織中サイトカイン濃度の変化   |    |
| 3-b TAM のサイトカイン産生能の変化  |    |
| 3-c TAM の増殖因子および MMP の発現特性の変化  |    |
| 3-d TAM の一酸化窒素産生能の変化   |    |
| 3-e 腫瘍増殖抑制効果および延命効果  |    |
| 第 4 節 考察   | 25 |
| 第 3 章 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/NF- $\kappa$ B decoy 複合体の<br>がん性腹膜炎治療への応用   | 29 |
| 第 1 節 Ehrlich 腹水がんモデルマウスにおける TAM 選択的 NF- $\kappa$ B decoy 導入         | 29 |
| 1-a Man-PEG bubble lipoplex の腹腔内投与による TAM への NF- $\kappa$ B decoy 送達 |    |
| 1-b TAM の核内 NF- $\kappa$ B 量の変化                                      |    |
| 第 2 節 TAM の表現型転換およびがん性腹膜炎治療  | 31 |
| 2-a TAM のサイトカイン遺伝子発現パターンの変化  |    |
| 2-b 増殖因子の発現および血管新生の抑制効果  |    |
| 2-c がん性腹膜炎治療効果   |    |
| 第 3 節 考察   | 34 |
| 結論   | 37 |
| 謝辞   | 39 |
| 実験の部   | 40 |
| 第 1 章 実験の部   | 40 |
| 第 2 章 実験の部   | 44 |
| 第 3 章 実験の部   | 49 |
| 引用文献   | 52 |

# 総論の部

## 緒言

がんの患者数は先進諸国、発展途上国を問わず増加の一途をたどっており、今後もがんによる死亡者が増加し続けることが予想されている。そういった背景のもと、世界中でがん治療、特に治療薬に関する研究が盛んに行われ、これまでに実に多種多様な作用機序を有する抗がん剤が開発され、臨床応用されてきた。しかしながら、それら抗がん剤は、そのほとんどががん細胞を標的とした薬物である。一方、近年では、がん細胞を取り巻く周囲環境ががんの成長や転移において極めて重要な役割を果たしていることが明らかにされており<sup>1-4)</sup>、がん微小環境を治療の標的とするという新たなパラダイムが構築されている。

がん微小環境は、血管やリンパ管、免疫細胞、間質細胞などから構成されているが、最初にごん治療における標的として注目を集めたのは腫瘍血管である。がんに対する栄養分や酸素の供給路である腫瘍血管を遮断することでがんの成長を抑制できるというコンセプトのもと、腫瘍の血管新生阻害に関する研究は1990年頃から加速し<sup>5-8)</sup>、現在では血管新生阻害剤ががん治療薬として実用化されている<sup>9-11)</sup>。さらに最近では、腫瘍組織に存在する免疫細胞、特に腫瘍組織へ遊走してきたマクロファージ(腫瘍関連マクロファージ: TAM)ががん細胞の増殖や血管新生に深く関与していることが明らかにされ<sup>12-15)</sup>、TAM ががん細胞、腫瘍血管に続く、新たな標的になると考えられている。

TAM による腫瘍増殖促進効果は、M2 表現型の TAM が産生する種々のサイトカインや増殖因子の作用に起因する<sup>12-15)</sup>。そのため、TAM の表現型を M2 型から抗腫瘍活性を有する M1 型へ転換する手法は、効果的ながん治療法となることが期待されている<sup>16-20)</sup>。マクロファージの表現型の変化には種々の転写因子の発現量やその活性が関与していることが示唆されてきたが<sup>21)</sup>、最近の研究において、転写因子 Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)の p50 サブユニットを欠損させたマウスにごん細胞を移植しても TAM は M2 型ではなく、M1 表現型に分化することが示された<sup>22,23)</sup>。本知見を基に著者は、TAM の NF- $\kappa$ B の機能を抑制することにより、その表現型を M2 型から M1 型へ転換できるという仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証するため、まず TAM の *in vitro* における実験モデル(M2 様マクロファージ)を構築し、オリゴ核酸医薬の導入により M2 様マクロファージの NF- $\kappa$ B の機能を抑制した際の表現型転換について検討を行った。次に、*in vivo* において仮説の検証を行うため、Unらが開発した超音波応答性マンノース修飾リポソーム<sup>24-28)</sup>を TAM 選択的核酸導入技術として発展させ、本システムを用いたオリゴ核酸医薬の導入による固形がんモデルおよび腹水がんモデルにおける TAM の表現型転換およびそのがん治療効果を評価した。

以下、三章にわたり得られた知見を論述する。

## 第1章 NF- $\kappa$ Bの活性を抑制するオリゴ核酸医薬の導入によるマクロファージの表現型転換の検証

腫瘍関連マクロファージ(Tumor-associated macrophage: TAM)は、非小細胞肺癌、胃癌、結腸がん、卵巣がんなど、様々な腫瘍組織中にその存在が確認されているマクロファージである<sup>12-15)</sup>。TAMは、多種多様なサイトカインや増殖因子の産生を通してがん細胞の増殖、血管新生、さらにはがん転移をも促進することが知られており、臨床においてはTAMの存在量が多いほど予後が悪いことも確認されている<sup>29-31)</sup>。

TAMを標的としたがん治療法としては、マクロファージに対する選択的な毒性を有するクロドロネートを用いてTAMを枯渇させる方法が報告されている<sup>32,33)</sup>。本手法は高い腫瘍増殖抑制効果を発揮するものの、腫瘍組織以外のマクロファージ、とりわけ生体の免疫応答を担う肝臓および脾臓中のマクロファージをも傷害してしまうことが問題とされている。

こういった背景のもと近年では、TAMの機能のみを制御するための治療戦略として、マクロファージの表現型に着目した新しいアプローチが考案されている。マクロファージは2種類の表現型を示すことが確認されており、M1型マクロファージは炎症性サイトカインや一酸化窒素(NO)などの産生を通して免疫反応や炎症反応を促進し、抗腫瘍作用を示す<sup>34,35)</sup>。一方で、M2型マクロファージは抗炎症性サイトカイン、増殖因子などを産生することにより腫瘍増殖を促進する<sup>35,36)</sup>。TAMはそのほとんどがM2表現型をとって腫瘍増殖を促進するため、M2型のTAMの表現型をM1型へ転換するアプローチは、M2型の腫瘍増殖促進作用を抑制できることに加え、M1型に由来する抗腫瘍作用も得ることができると考えられる<sup>16-20)</sup>。また本手法は、通常M1表現型を示している肝臓および脾臓中のマクロファージに対しては顕著な作用を及ぼさないと考えられるため、副作用の低減も期待できる。

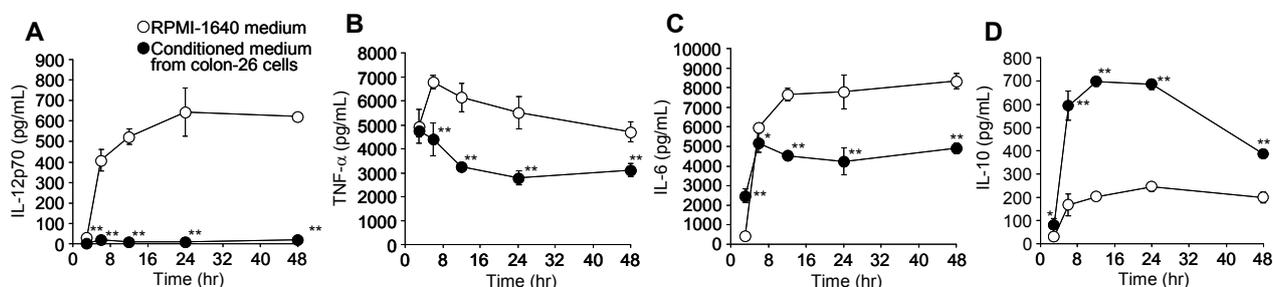
これまでに、マクロファージの表現型に影響を及ぼす因子としてIL-4やIL-10、IL-13、インターフェロン- $\gamma$ 、LPSなど様々な液性因子が見出されてきたが<sup>34,35,37,38)</sup>、実際にマクロファージの表現型の分化を制御しているのは、マクロファージがこれらの因子による刺激を受けた際に活性化するNF- $\kappa$ B<sup>16,22,23,39-42)</sup>やSignal Transducers and Activation of Transcription (STAT)<sup>42-44)</sup>、Hypoxia inducible factor<sup>45,46)</sup>といった転写因子であることがノックアウトマウスを用いた研究により明らかにされている<sup>47)</sup>。中でも、NF- $\kappa$ Bはその中心的役割を果たすと考えられている。最近の報告によると、NF- $\kappa$ Bの活性化を司る酵素であるI $\kappa$ B kinaseをノックアウトしたマクロファージは腫瘍組織中においてもM1表現型を示すことが明らかにされている<sup>16)</sup>。また、NF- $\kappa$ Bのサブユニットであるp50をノックアウトしたマウスにがん細胞を移植しても、誘導されたTAMはM2型に分化せず、M1表現型をとってTh1型サイトカインの産生を通して腫瘍増殖を抑制することも確認されている<sup>22,23)</sup>。これらの知見を基に著者は、TAMにおけるNF- $\kappa$ Bの機能を抑制することにより、その表現型をM2型からM1型へ転換できるという仮説を立てた。本仮説を検証するため、本章では、TAMのin vitroにおける実験モデル(M2様マクロファージ)の構築を行い、NF- $\kappa$ Bの活性を抑制するオリゴ核酸医薬をM2様マクロファージに導入した際の、マクロファージの表現型の変化について評価を行った。

## 第1節 NF-κB (p50) siRNA の導入による M2 様マクロファージの表現型変化

本節では、NF-κB の活性を抑制するオリゴ核酸医薬として、NF-κB の p50 サブユニットに対する siRNA (NF-κB (p50) siRNA) を用いて検討を行うこととした。まず、in vitro における TAM 実験モデルを確立し、本実験系を用いて NF-κB (p50) siRNA を導入した際のマクロファージの表現型変化を、Th1 型および Th2 型サイトカインや増殖因子、酵素、受容体、一酸化窒素の発現量を指標として評価した。

### 1-a colon-26 細胞培養上清によるマクロファージの M2 型への誘導

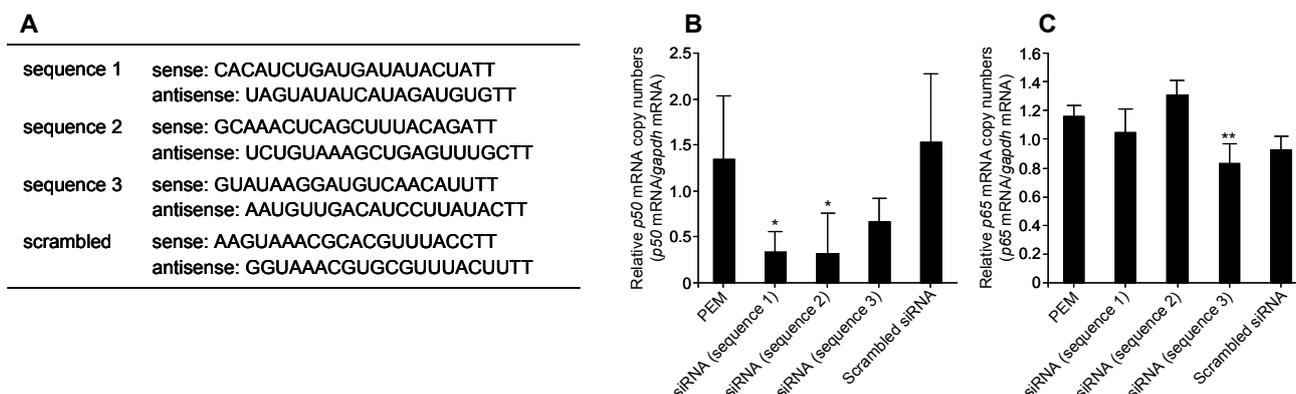
まず、TAM の in vitro における実験モデルの確立を行った。マクロファージの表現型は周囲の微小環境に応答して変化し、TAM はがん細胞が産生する IL-4 や IL-10、IL-13、VEGF などの因子に応答して M2 型の性質を獲得することが知られている<sup>34,35,37,38</sup>。そこで、初代培養マウス腹腔マクロファージを colon-26 マウス結腸がん細胞の培養上清中で培養することにより、マウス腹腔マクロファージの M2 型への分化誘導を行った。本検討では、LPS 刺激によりマクロファージから産生されるサイトカイン量を表現型の指標として評価した。M1 型マクロファージは IL-12、TNF-α、IL-6 といった Th1 型サイトカインを多く産生する一方で、Th2 型サイトカインである IL-10 の産生量は少ない。対照的に、M2 型マクロファージでは Th1 型サイトカイン産生が抑制されているが、Th2 型サイトカインの産生能は高い<sup>34-36</sup>。マウス腹腔マクロファージをがん細胞培養上清中で培養した際の、マクロファージより産生される Th1 型サイトカイン(IL-12、TNF-α、IL-6)、および Th2 型サイトカイン(IL-10)量を経時的に測定した結果、IL-12、TNF-α、ならびに IL-6 産生量がいずれも有意に減少することが確認された (Fig. 1A-C)。また、IL-10 の産生量が顕著に増大することも併せて確認された (Fig. 1D)。これらの結果より、マウス腹腔マクロファージを colon-26 細胞培養上清中で培養することにより、マクロファージの表現型を TAM と類似した M2 様型に誘導できることが示された。以降の検討では、TAM の in vitro における実験モデルとして本 M2 様マクロファージを用いることとした。



**Figure 1.** Alterations in the cytokine secretion profiles of peritoneal elicited macrophages (PEM) cultured in conditioned medium from colon-26 cells. The concentrations of IL-12p70 (A), TNF-α (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) in culture supernatants of macrophages was measured at 3, 6, 12, 24 and 48 h after LPS stimulation (100 ng/mL). Data represent the means ± S.D. ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with PEM cultured in RPMI-1640 medium.

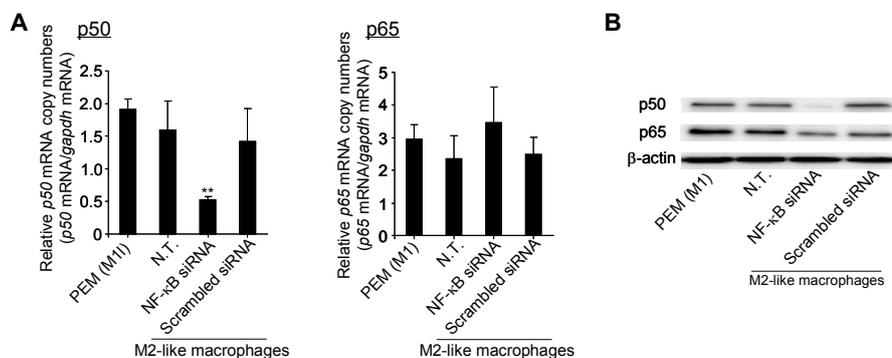
## 1-b NF-κB p50 サブユニットに対する siRNA のノックダウン効果

NF-κB (p50) siRNA 導入に伴う M2 様マクロファージの表現型変化に関する検討に先立ち、標的遺伝子の発現抑制効果が最も高い siRNA の配列の選択、および off-target 効果の有無の確認を行った。初代培養マウス腹腔マクロファージを用いて、3 種類の NF-κB (p50) siRNA ならびに scrambled siRNA による p50 サブユニット mRNA の発現抑制効果を評価した。遺伝子導入試薬である Lipofectamine® 2000 の推奨プロトコルに従い、各 siRNA をマクロファージに導入した結果、いずれの NF-κB (p50) siRNA を用いた場合でも p50 mRNA の発現抑制が認められ、特に sequence 1 による発現抑制効果が最も高かった (Fig. 2B)。一方で、p65 mRNA については、sequence 3 の siRNA を導入した場合にのみ発現量のわずかな減少が認められた (Fig. 2C)。また、scrambled siRNA による p50 mRNA 発現抑制効果は認められなかったことから、off-target 効果による p50 mRNA の発現抑制の可能性は低いことが確認できた。以上より、本研究においては最も高い p50 mRNA 発現抑制効果を示した sequence 1 の siRNA を用いて検討を行うこととした。



**Figure 2. Suppressive effects of 3 types of NF-κB (p50) siRNA on p50 subunit expression in PEM.** (A) The siRNA sequences used in this study. The expression level of p50 (B) and p65 (C) mRNA in PEM was measured at 24 h after transfection of NF-κB (p50) siRNA (0.1 μM). Data represent the means + S.D. ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with PEM.

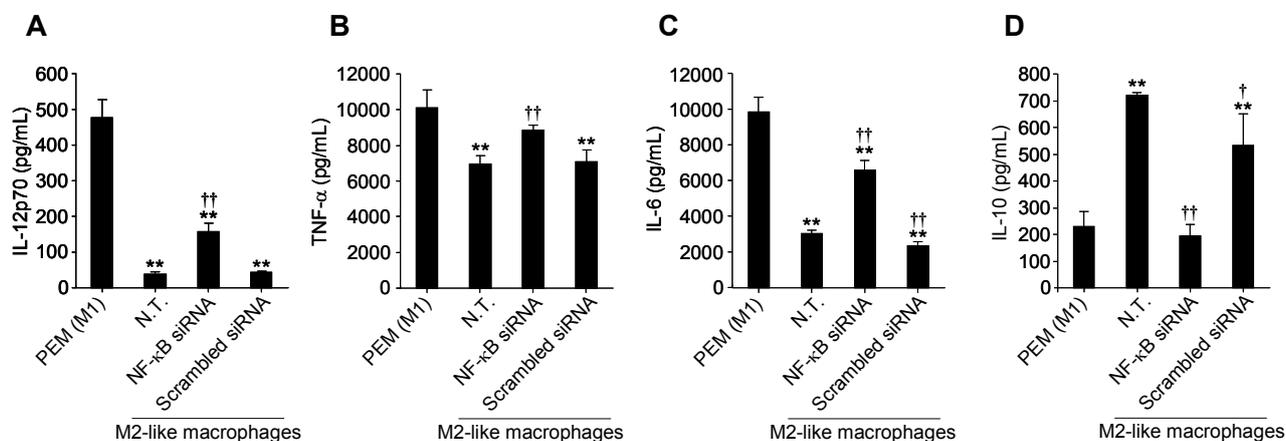
検討に用いる siRNA の配列が決定したため、本 NF-κB (p50) siRNA の M2 様マクロファージに対する効果を評価した。その結果、NF-κB (p50) siRNA の導入により、M2 様マクロファージ内 p50 mRNA 発現量、および核内 p50 量が共に顕著に減少することが確認された (Fig. 3)。



**Figure 3. Suppressive effects of NF-κB (p50) siRNA on p50 subunit expression in M2-like macrophages.** Expression levels of p50 and p65 mRNA (A) and intranuclear p50 and p65 levels (B) in macrophages were measured at 24 h after transfection of NF-κB (p50) siRNA (0.1 μM). \*\* $p < 0.01$ , compared with PEM (M1)

### 1-c サイトカイン産生の変化

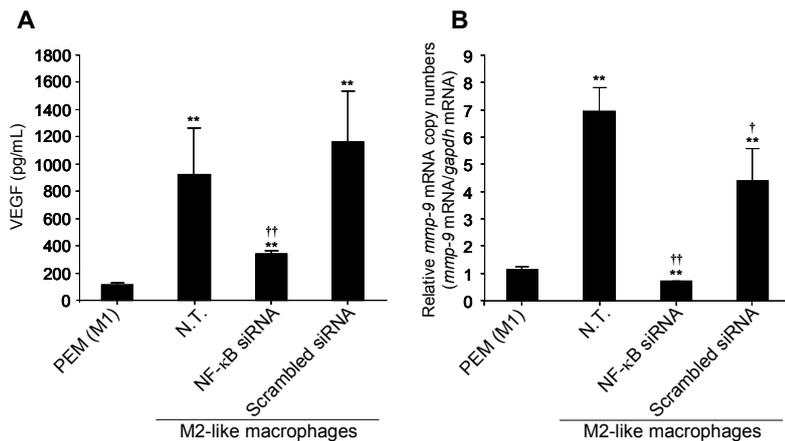
M2 様マクロファージの表現型転換を検証するため、まずサイトカイン産生量の変化について評価を行った。Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 を用いて NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を M2 様マクロファージに導入し、その 24 時間後に LPS 刺激により M2 様マクロファージより産生される Th1 型サイトカイン、および Th2 型サイトカイン量を測定した。その結果、IL-12、TNF- $\alpha$  ならびに IL-6 産生量がいずれも有意に増大することが明らかとなった (Fig. 4A-C)。さらに、NF- $\kappa$ B (p50) siRNA の導入により、M2 様マクロファージより産生される IL-10 量が通常培地で培養したマウス腹腔マクロファージ (Peritoneal elicited macrophages: PEM)からの産生量と同程度まで減少することも併せて示された (Fig. 4D)。本結果より、M2 様マクロファージに NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を導入し、核内 p50 量を減少させることで、M2 様マクロファージの表現型を M1 型へ転換できることが示唆された。



**Figure 4. Effect of NF- $\kappa$ B siRNA transfection on cytokine production from M2-like macrophages.** The concentrations of IL-12p70 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) in culture supernatants were measured following transfection of NF- $\kappa$ B (p50) siRNA (0.1  $\mu$ M) at 24 h after LPS stimulation. Data represent the means + S.D. ( $n = 4$ ). \*\* $p < 0.01$ , compared with PEM (Conventional). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T.: non-treated cells.

### 1-d 増殖因子およびマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の発現量の変化

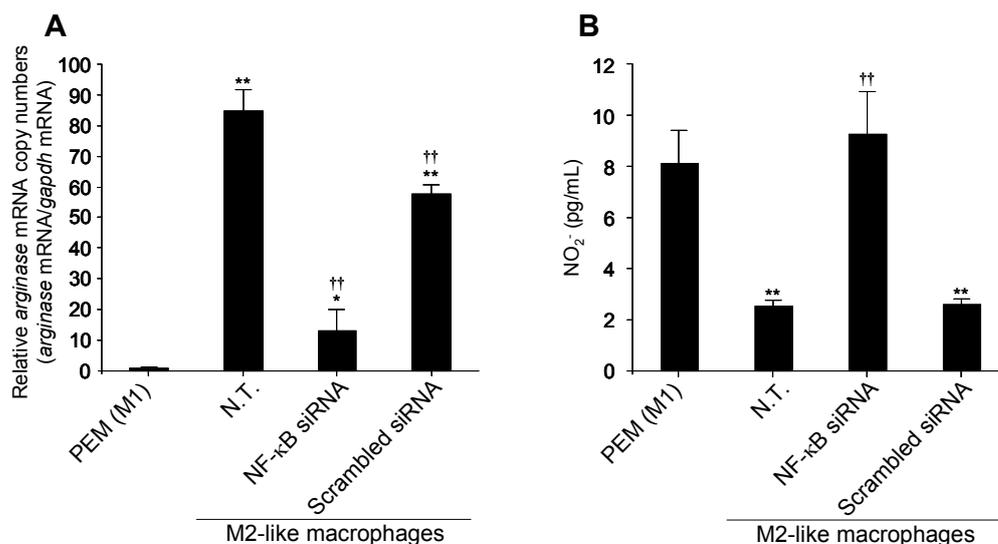
次に、血管新生、がん転移において中心的役割を果たす血管内皮細胞増殖因子(VEGF)およびマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9 の発現量の変化について検討を行った。両因子共に M2 型マクロファージから有意に産生される因子であり、M2 型マクロファージの指標として用いられる<sup>48-51</sup>)。NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を M2 様マクロファージに導入した後、M2 様マクロファージから産生される VEGF 量、ならびに M2 様マクロファージ内 MMP-9 mRNA 発現量を測定した結果、VEGF 産生量および MMP-9 mRNA 発現量が共に有意に減少することが明らかとなった (Fig. 5)。



**Figure 5. Suppressive effect of NF-κB siRNA transfection on VEGF and MMP-9 expression.** (A) VEGF concentrations in culture supernatants were measured following transfection of NF-κB (p50) siRNA (0.1 μM) at 24 h after LPS stimulation. (B) The expression level of MMP-9 mRNA in macrophages was measured at 24 h after transfection of NF-κB (p50) siRNA (0.1 μM). Data represent the means + S.D. (*n* = 4). \*\**p* < 0.01 compared with PEM (Conventional). †*p* < 0.05; ††*p* < 0.01, compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T.: non-treated cells.

### 1-e 一酸化窒素産生の変化

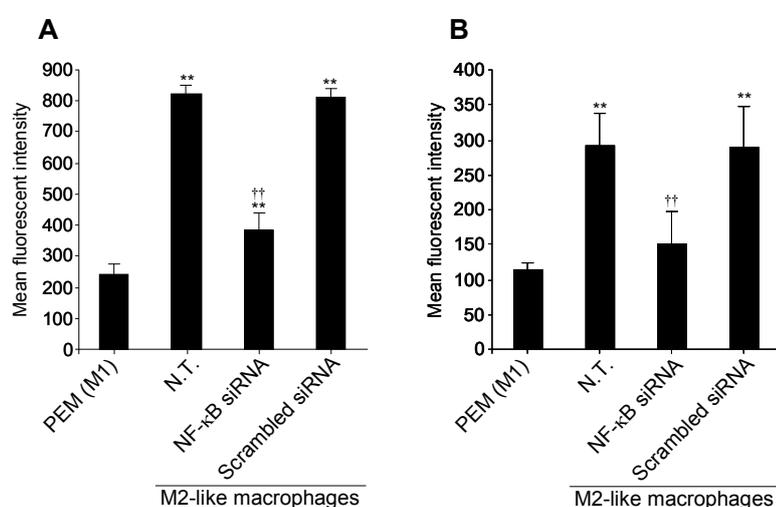
続いて、NF-κB (p50) siRNA 導入による M2 様マクロファージの NO 産生能の変化について検討を行った。NO は高い細胞傷害活性を有しており、M1 型マクロファージが示す抗腫瘍活性の中心的役割を担う分子である。M1 型マクロファージは誘導性 NO シンターゼ(iNOS)を高発現していることに加え、NO 産生時に基質として利用されるアルギニン分解酵素、アルギナーゼの発現が低いため、効率的に NO を産生することができる<sup>43)</sup>。対照的に、M2 型マクロファージでは両酵素の発現が M1 型マクロファージと逆のパターン(低 iNOS 発現、高アルギナーゼ発現)を示すため、NO 産生は抑制されている<sup>43,52,53)</sup>。M2 様マクロファージに NF-κB (p50) siRNA を導入後、M2 様マクロファージ内アルギナーゼ mRNA 発現量、ならびに培養上清中 NO 濃度を測定した結果、アルギナーゼ mRNA 発現量が顕著に減少し、上清中 NO 量が PEM と同程度まで増大することが示された (Fig. 6)。



**Figure 6. Effect of NF-κB siRNA transfection on NO production from M2-like macrophages.** (A) The expression level of arginase mRNA in macrophages was measured at 24 h after transfection of NF-κB (p50) siRNA (0.1 μM). (B) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentrations in culture supernatants were measured following transfection of NF-κB (p50) siRNA (0.1 μM) at 24 h after LPS stimulation. Data represent the means + S.D. (*n* = 4). \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01, compared with PEM (Conventional). ††*p* < 0.01, compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T.: non-treated cells.

## 1-f 受容体発現量の変化

マクロファージは、その表現型の違いにより発現する受容体の種類が異なることが報告されている<sup>12)</sup>。M1 型マクロファージには炎症反応に関わる CD80、CD86、および Toll 様受容体(TLR)、特に TLR2 および TLR4 が高発現しているが、M2 型マクロファージにおいてはこれらの受容体の発現レベルは低い<sup>15,34-36)</sup>。一方で、M2 型マクロファージには CD14、CD163、マンノース受容体<sup>54,55)</sup> およびスカベンジャー受容体<sup>56)</sup>などが高発現している。そこで、M2 様マクロファージに NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を導入した際のマンノース受容体およびスカベンジャー受容体発現量の変化について評価した結果、NF- $\kappa$ B (p50) siRNA の導入により、M2 様マクロファージ表面のマンノース受容体およびスカベンジャー受容体の発現量が共に有意に減少することが確認された (Fig. 7)。



**Figure 7. Effect of NF- $\kappa$ B siRNA transfection on surface receptors expression on M2-like macrophages.** The expression levels of mannose receptor (A) and scavenger receptor (B) on the surface of macrophages were measured by using fluorescent-labeled antibody at 24 h after transfection of NF- $\kappa$ B (p50) siRNA (0.1  $\mu$ M). Mean fluorescence intensity was calculated by dividing the total fluorescence intensity by the number of cells (10,000 cells). Data represent the means + S.D. ( $n = 4$ ). \*\* $p < 0.01$ , compared with PEM (Conventional). †† $p < 0.01$ , compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T.: non-treated cells.

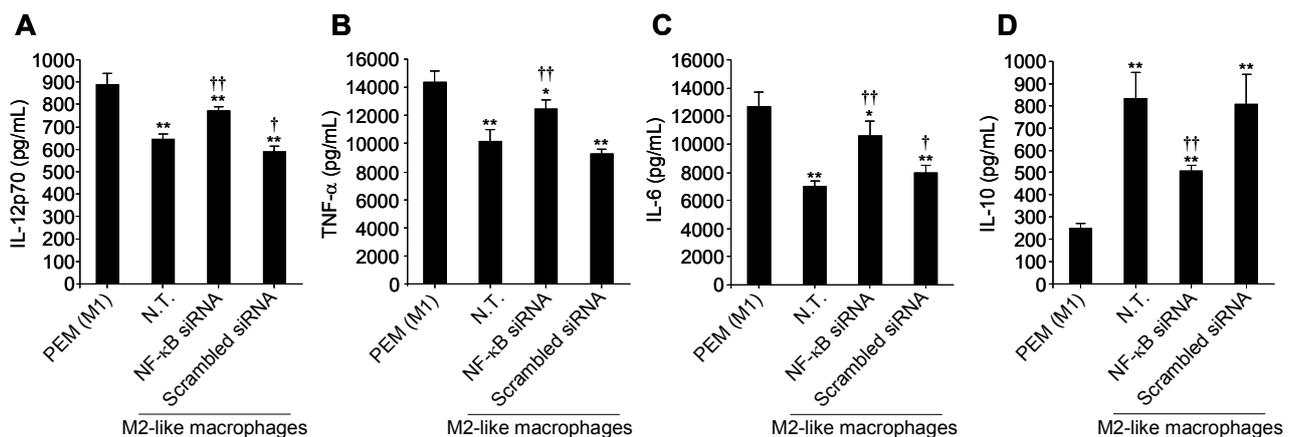
## 1-g B16BL6 細胞培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージにおける検討

前項までの検討により、NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を M2 様マクロファージに導入し、p50 発現量を減少させることで、M2 様マクロファージの表現型を M1 型へ転換できることが示された。しかしながら、上記の結果は全て colon-26 細胞培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージにおける検討のみから得られたものである。一方で、マクロファージの表現型は非常に可塑性が高いことが知られているため、がん種が異なれば TAM の性質も異なることが予想される。それ故、TAM に対する NF- $\kappa$ B (p50) siRNA の効果の程度ががん種ごとに異なる可能性が考えられる。

そこで本項では、colon-26 細胞とは異なるがん種である B16BL6 マウス悪性黒色腫細胞の培養上清を用いてマウス腹腔マクロファージの M2 型への誘導を行い、本 M2 様マクロファージに NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を導入した際のサイトカイン産生量の変化について検討を行った。まず、B16BL6 細胞の培養上清中で培養したマウス腹腔マクロファージより産生されるサイトカイン量を測定した結果、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IL-6 産生量の減少、ならびに IL-10 産生量の有意な増大が認められた (Fig. 8)。本結果より、B16BL6 細胞の培養上清を用いた場合でもマウス腹腔マクロファージを M2 様型に誘

導できることが示された。一方で、B16BL6 細胞培養上清を用いてマクロファージを M2 様型に誘導した場合、Th1 型サイトカイン産生量の減少割合が colon-26 細胞培養上清を用いた場合(Fig. 1)と比較して小さいことが確認された。このことは、用いるがん細胞の種類によって、誘導される M2 様マクロファージの性質が若干異なることを示唆している。

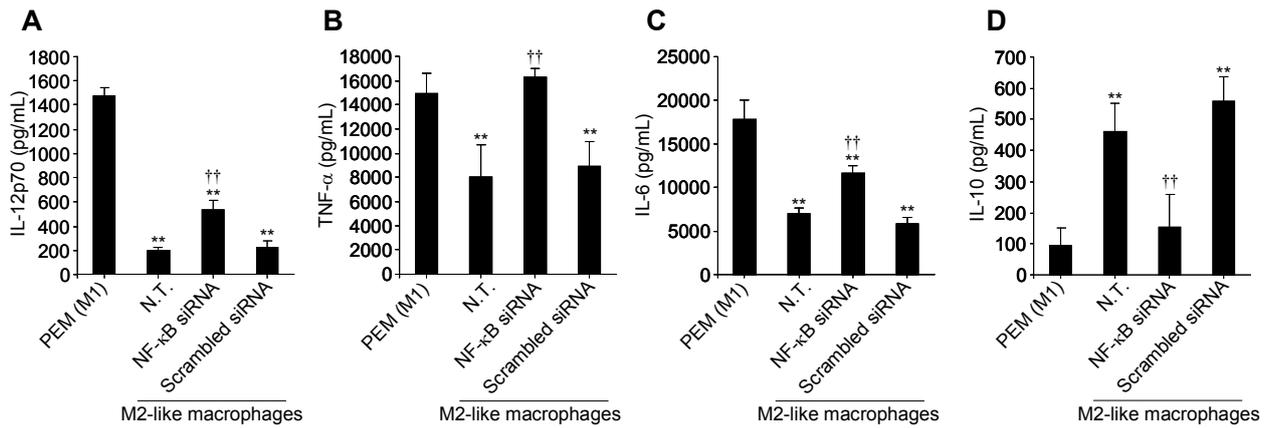
次に、B16BL6 細胞培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージに NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を導入し、その 24 時間後に LPS 刺激によるサイトカイン産生量を測定した結果、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IL-6 産生量の増大、ならびに IL-10 産生量の有意な減少が示された (Fig. 8)。本結果は、1-c における colon-26 細胞培養上清を用いた検討結果 (Fig. 4)と一致するものであった。



**Figure 8.** Effect of NF- $\kappa$ B expression inhibition on cytokine production by PEM cultured in conditioned medium from B16BL6 cells. Concentrations of IL-12p70 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) in culture supernatants were measured following transfection of NF- $\kappa$ B (p50) siRNA (0.1  $\mu$ M) at 24 h after LPS stimulation. Data represent the means + S.D. ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with PEM (Conventional). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T.: non-treated cells.

### 1-h PAN-02 細胞培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージにおける検討

さらに、PAN-02 マウス膵臓がん細胞の培養上清を用いた検討も行った。PAN-02 細胞培養上清中で培養したマウス腹腔マクロファージから産生されるサイトカイン量を測定した結果、colon-26 細胞の培養上清を用いた場合と同様のサイトカイン産生プロファイルが得られ、マクロファージが M2 様型の性質を獲得していることが確認された (Fig. 9)。本 M2 様マクロファージに NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を導入したところ、炎症性サイトカイン産生量の有意な増大、および IL-10 産生量の減少が認められた (Fig. 9)。本結果は、1-c および 1-g における検討結果 (Figs. 4,8)と一致する。

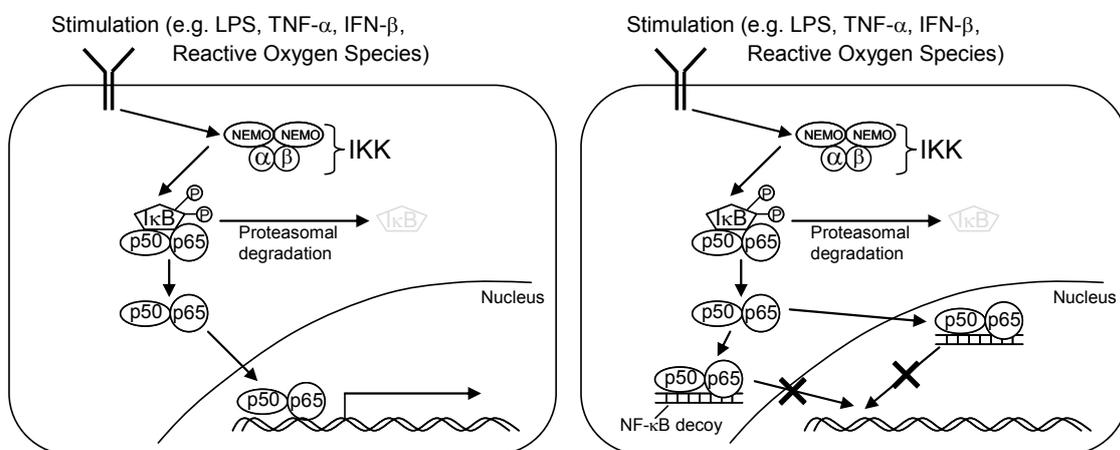


**Figure 9. Effect of NF-κB expression inhibition on cytokine production by macrophages cultured in conditioned medium from PAN-02 cells.** Concentrations of IL-12p70 (A), TNF-α (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) in culture supernatants were measured following transfection of NF-κB (p50) siRNA (0.1 μM) at 24 h after LPS stimulation. Data represent the means + S.D. (n = 4). \*\*p < 0.01, compared with PEM (Conventional). ††p < 0.01, compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T.: non-treated cells.

## 第 2 節 NF-κB decoy の導入による M2 様マクロファージの表現型変化

前節の検討により、NF-κB (p50) siRNA を用いて M2 様マクロファージにおける NF-κB の発現を抑制することで、その表現型を M1 型へ転換できることが確認された。本結果は、本研究における実験仮説を強く支持するものである。本節では、前節の検討結果をさらに裏づけるため、siRNA とは異なる作用機序で NF-κB の機能を抑制するオリゴ核酸医薬である NF-κB decoy を M2 様マクロファージに導入した際の、M2 様マクロファージの表現型変化について評価を行った。

NF-κB decoy は、DNA 上の NF-κB が結合する部分と同じ配列を含む二本鎖オリゴ核酸であり、DNA の「おとり」として NF-κB の p50 サブユニットと結合するため、NF-κB は DNA へ結合できず、結果として NF-κB による転写活性化が特異的に抑制される<sup>57,58)</sup> (Fig. 10)。すなわち、NF-κB の発現を抑制する NF-κB (p50) siRNA とは異なり、NF-κB decoy は NF-κB に直接結合することで活性を抑制する。本研究では、Table 1 に示す配列の NF-κB decoy を用いて検討を行った。



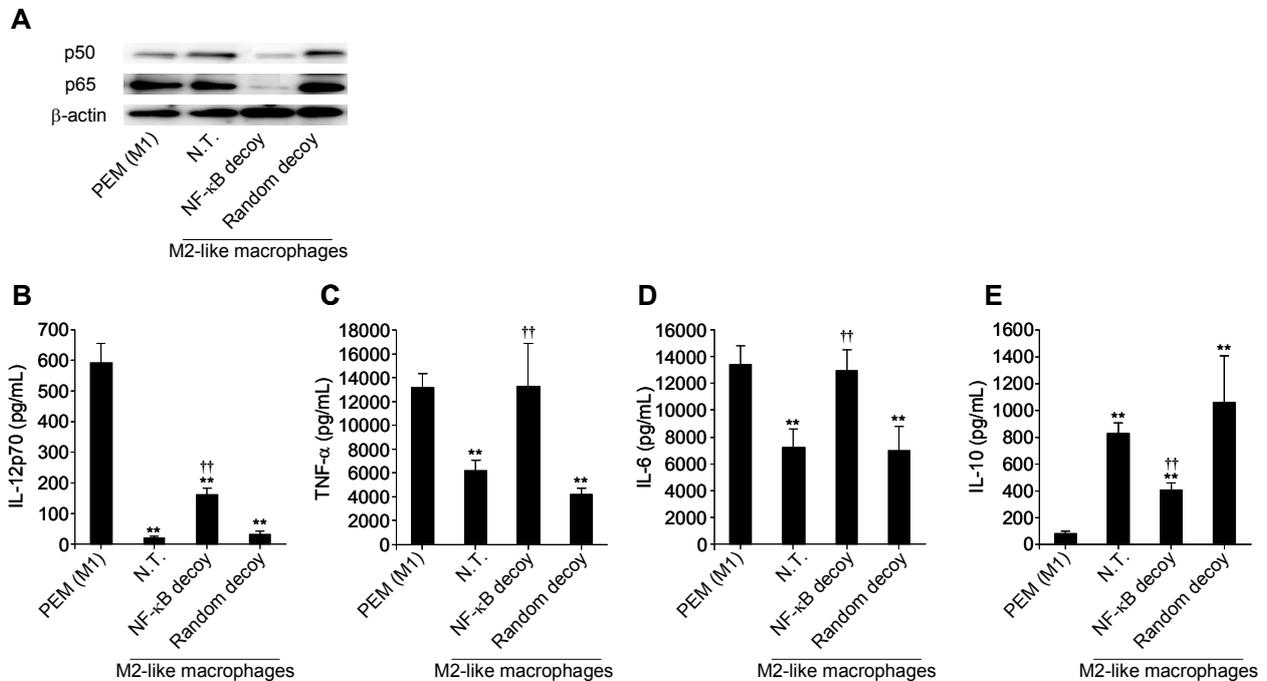
**Figure 10. Schematic representation of the mechanism of NF-κB decoy for inhibition of NF-κB activity.**

Table 1. Sequences of NF-κB decoy

|              |  |
|--------------|--|
| NF-κB decoy  | sense: GGAGGGAAATCCCTTCAAGG<br>antisense: CCTCCCTTTAGGGAAGTTCC |
| Random decoy | sense: TTGCCGTACCTGACTTAGCC<br>antisense: AACGGCATGGACTGAATCGG |

## 2-a サイトカイン産生の変化

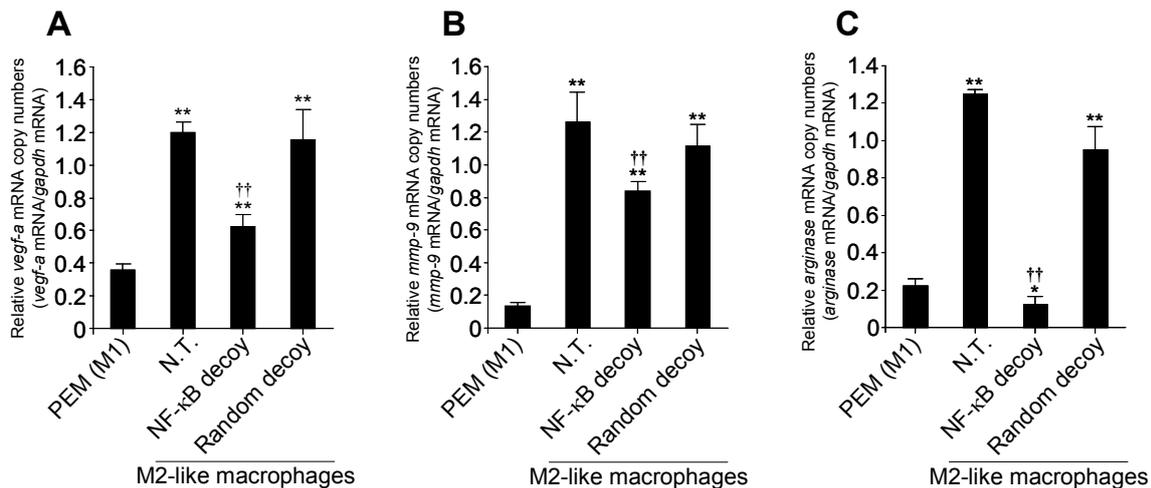
まず、colon-26 細胞培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージに NF-κB decoy を導入した際のサイトカイン産生量の変化について検討を行った。NF-κB decoy が細胞質中で NF-κB と結合すると NF-κB の核内移行量が減少することが報告されているため<sup>59,60</sup>、サイトカイン産生量の評価に先立ち、まず NF-κB decoy 導入による M2 様マクロファージの核内 NF-κB 量の変化を評価した。その結果、NF-κB decoy の導入により核内 p50 タンパク量が顕著に減少することが確認された (Fig. 11A)。次に、NF-κB decoy 導入 24 時間後に LPS 刺激により M2 様マクロファージから産生されるサイトカイン量を測定した結果、IL-12 産生量の有意な増大が認められると共に、TNF-α および IL-6 に関しては PEM と同程度まで産生量が増大することが明らかとなった (Fig. 11B-D)。また、IL-10 産生量が有意に減少することも示された (Fig. 11E)。本結果は、前節 1-c の NF-κB (p50) siRNA を用いた検討結果 (Fig. 4) と一致し、NF-κB decoy の導入によっても M2 様マクロファージの表現型を M1 型へ転換できることを示唆するものであった。



**Figure 11. Effect of NF-κB inhibition by NF-κB decoy on cytokine production from M2-like macrophages.** (A) The intranuclear p50 and p65 levels in macrophages were measured at 24 h after transfection of NF-κB decoy (0.2 μM). The concentrations of IL-12p70 (B), TNF-α (C) IL-6 (D), and IL-10 (E) in culture supernatants were measured following transfection of NF-κB decoy (0.2 μM) at 24 h after LPS stimulation. Data represent the means + S.D. (n = 4). \*\*p < 0.01, compared with PEM (Conventional). ††p < 0.01, compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T.: non-treated cells.

## 2-b 増殖因子、MMP およびアルギナーゼの発現量の変化

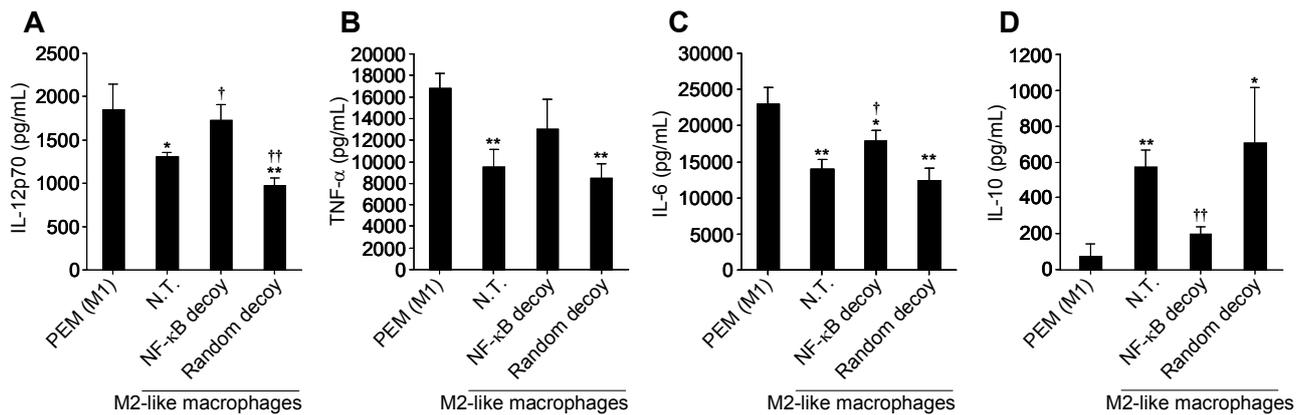
次に、M2 様マクロファージに NF- $\kappa$ B decoy を導入した際の VEGF、MMP-9、ならびにアルギナーゼの mRNA 発現量の変化について評価を行った。NF- $\kappa$ B decoy 導入後、M2 様マクロファージ内に発現する各因子の mRNA 量を測定した結果、前節 1-d, 1-e における検討結果と同様に、いずれの因子もその mRNA 発現量が有意に減少することが確認された (Fig. 12)。



**Figure 12. Suppressive effect of NF- $\kappa$ B inhibition by NF- $\kappa$ B decoy on VEGF, MMP-9, and arginase mRNA expression.** The expression levels of VEGF-A (A), MMP-9 (B), and arginase (C) mRNA in macrophages were measured at 24 h after transfection of NF- $\kappa$ B decoy (0.2  $\mu$ M). Data represent the means + S.D. ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with PEM (Conventional). † $p < 0.01$ , compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T: non-treated cells

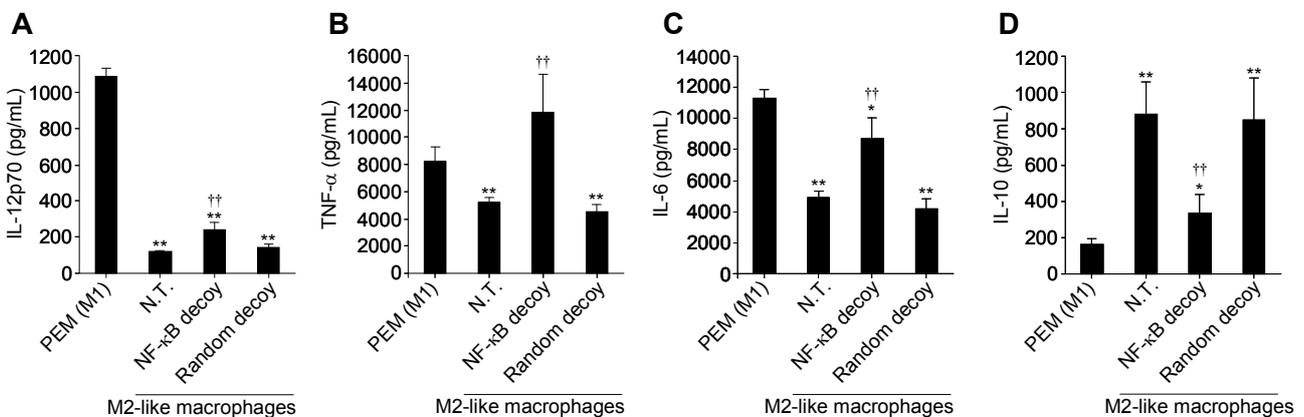
## 2-c B16BL6 細胞および PAN-02 細胞培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージに対する NF- $\kappa$ B decoy の効果

NF- $\kappa$ B (p50) siRNA と同様に NF- $\kappa$ B decoy に関しても、異なるがん細胞の培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージに対する効果の違いについて検討する必要がある。そこで本項では、B16BL6 細胞、および PAN-02 細胞の培養上清を用いて誘導した各 M2 様マクロファージに NF- $\kappa$ B decoy を導入した際の、M2 様マクロファージのサイトカイン産生能の変化について評価した。まず、B16BL6 細胞培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージに対して NF- $\kappa$ B decoy を導入した結果、M2 様マクロファージより産生される IL-12、TNF- $\alpha$ 、IL-6 量が增大すると共に、IL-10 産生量が有意に減少することが示された (Fig. 13)。



**Figure 13. Effect of NF-κB inhibition by NF-κB decoy on cytokine production in macrophages cultured with conditioned medium from B16BL6 cells.** Concentrations of IL-12p70 (A), TNF-α (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) in culture supernatants were measured following transfection of NF-κB decoy (0.2 μM) at 24 h after LPS stimulation. Data represent the means + S.D. ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with PEM (Conventional). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T.: non-treated cells.

さらに、PAN-02 細胞培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージを用いた検討においても、NF-κB decoy の導入により、Th1 型サイトカイン産生量の増大、ならびに Th2 型サイトカイン産生量の顕著な減少が認められた (Fig. 14)。これらの結果は、前節 1-g, 1-h における NF-κB (p50) siRNA を用いた検討結果 (Figs. 8,9)、および本節 2-a における colon-26 細胞培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージにおける検討結果 (Fig. 11)と一致する。

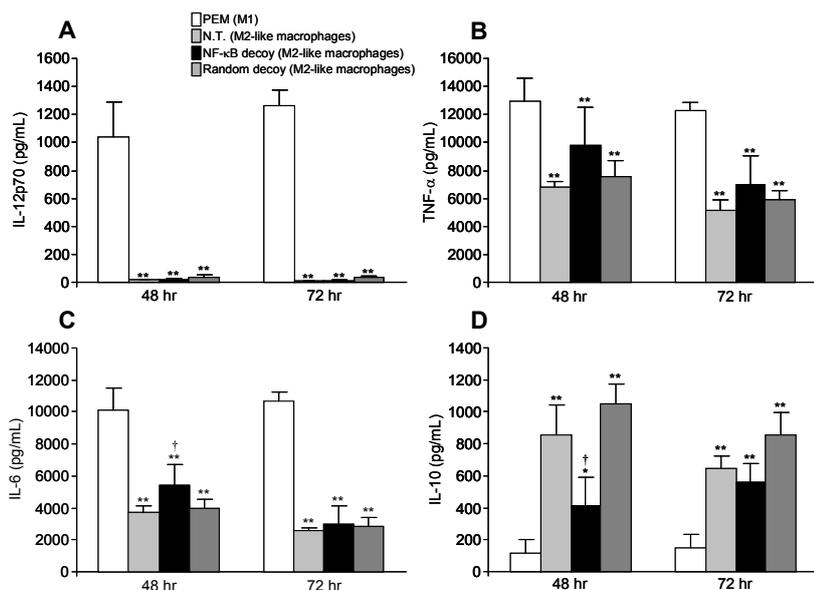


**Figure 14. Effect of NF-κB inhibition by NF-κB decoy on cytokine production in macrophages cultured with conditioned medium from PAN-02 cells.** Concentrations of IL-12p70 (A), TNF-α (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) in culture supernatants were measured following transfection of NF-κB decoy (0.2 μM) at 24 h after LPS stimulation. Data represent the means + S.D. ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with PEM (Conventional). †† $p < 0.01$ , compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T.: non-treated cells.

## 2-d NF-κB decoy の効果の持続性

前項までの検討により、NF-κB decoy の導入により M2 様マクロファージの表現型を M1 型へ転換できることが確認された。しかしながら、前項までの結果はいずれも NF-κB decoy 導入 24 時間後における検討のみから得られたものであるため、NF-κB decoy の効果の持続性については明らかにできていない。そこで本項では、NF-κB decoy 導入 48 時間後、ならびに 72 時間後に M2 様マクロファージから産生されるサイトカイン量を測定することにより、M2 様マクロファージの表現型

に対する NF- $\kappa$ B decoy の効果の持続性について評価を行った。colon-26 細胞培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージに NF- $\kappa$ B decoy を導入し、48 時間後における LPS 刺激によるサイトカイン産生量を測定した結果、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IL-6 産生量の増大、および IL-10 産生量の減少が認められたものの、その変化の割合は NF- $\kappa$ B decoy 導入 24 時間後に LPS 刺激をした場合と比較して小さいものであった。さらに、NF- $\kappa$ B decoy 導入 72 時間後においては、NF- $\kappa$ B decoy 導入によるサイトカイン産生量の変化は認められなかった (Fig. 15)。これらの結果より、NF- $\kappa$ B decoy によるマクロファージの表現型転換効果は、48~72 時間で消失することが示唆された。



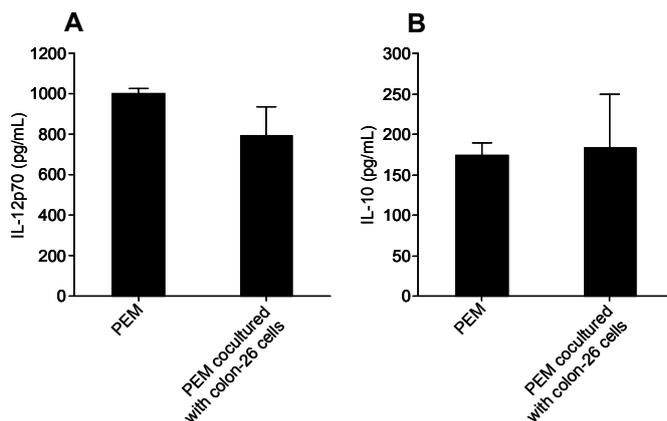
**Figure 15. Effect of NF- $\kappa$ B inhibition by NF- $\kappa$ B decoy on the duration of the shift of cytokine production pattern of M2-like macrophages.** Concentrations of IL-12p70 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) in culture supernatants were measured following transfection of NF- $\kappa$ B decoy (0.2  $\mu$ M) at 24 h after LPS stimulation. Data represent the means + S.D. ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with PEM (Conventional). † $p < 0.01$ , compared with N.T. of M2-like macrophages. N.T.: non-treated cells.

### 第3節 考察

本章では、NF- $\kappa$ B の活性を抑制するオリゴ核酸医薬が TAM の表現型に及ぼす作用を直接的に評価するため、*in vitro* で TAM 実験モデルに対してオリゴ核酸医薬を導入した際の、マクロファージの特性変化について検討を行った。

*in vitro* において TAM の表現型変化に関する検討を行うためには、TAM を腫瘍組織から単離し、*in vitro* において培養する技術、もしくは *in vitro* において腹腔あるいは骨髄由来マクロファージなどを TAM と類似した M2 表現型に誘導する技術が必要である。マウス固形腫瘍より TAM を単離する手法は過去にいくつか報告されているが<sup>37,61-63</sup>、マクロファージの表現型は非常に可塑性が高く、TAM は単離した後、通常培養条件下で培養すると 24~72 時間で M2 型の性質を失うことが報告されている<sup>22</sup>。そのため、固形腫瘍から単離した TAM を *in vitro* におけるオリゴ核酸の導入実験に用いることは非常に困難である。そこで著者は、*in vitro* における TAM 実験モデルを構築するため、マウス腹腔マクロファージを M2 型へ分化誘導する手法の確立を試みた。Hagemann らは、transwell を用いてマウス骨髄由来マクロファージをがん細胞と共培養することにより、マクロファージの表

現型を TAM と類似した M2 型に誘導できることを報告している<sup>64)</sup>。本手法は非常に簡便なマクロファージの分化誘導法であり、本手法により誘導した M2 型マクロファージは TAM の *in vitro* における実験モデルとして妥当であると考えられる。そこで実際に、transwell を用いてマウス腹腔マクロファージと colon-26 細胞の共培養を行って見たところ、期待に反して、共培養によるマクロファージのサイトカイン産生量の変化は認められなかった (Fig. 16)。この理由として、transwell 中で培養できる colon-26 細胞の数はマウス腹腔マクロファージの数に対して約 3 分の 1 程度であるため、マクロファージを M2 型へ誘導するために必要なだけの量の IL-4 や IL-13 といった液性因子が colon-26 細胞から産生されなかったことが考えられた。そこで、がん細胞から産生される液性因子を十分量確保しマクロファージに暴露させるため、がん細胞の培養上清を回収し、それを用いてマウス腹腔マクロファージを培養する手段を試みた。がん細胞培養上清中で培養したマウス腹腔マクロファージより産生されるサイトカイン量を測定した結果、IL-12、TNF- $\alpha$ 、ならびに IL-6 産生量がいずれも有意に減少すると共に、IL-10 産生量が顕著に増大することが示され (Fig. 1)、マウス腹腔マクロファージが TAM と類似した性質(M2 様)を獲得していることが確認された。そこで、以降の *in vitro* 実験は本手法により誘導した M2 様マクロファージを用いて行うこととした。



**Figure 16. Effect of coculture of PEM with colon-26 cells on cytokine secretion.** The concentrations of IL-12p70 (A), and IL-10 (B) in culture supernatants of macrophages was measured at 24 h after LPS stimulation (100 ng/mL). Data represent the means + S.D. ( $n = 3$ ).

次に、NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を導入した際の M2 様マクロファージの表現型転換を検証するため、まず NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を導入した後の M2 様マクロファージから産生されるサイトカイン量を測定した。その結果、Th1 型サイトカイン産生量が有意に増大すると共に、Th2 型サイトカイン産生量が PEM と同程度まで減少することが明らかとなった (Fig. 4)。本結果は、異なるアプローチで M2 型マクロファージの表現型転換を図った過去の研究報告の結果とほぼ一致し<sup>16,37)</sup>、M2 様マクロファージの表現型が M1 型へ転換したことを示唆している。続いて、サイトカインとは異なるマクロファージの表現型の指標として、増殖因子および MMP の発現量、一酸化窒素産生能、ならびに受容体発現量についても検討を行ったところ、NF- $\kappa$ B (p50) siRNA の導入により VEGF、MMP-9 発現量が共に顕著に減少することに加え (Fig. 5)、NO 産生量が PEM と同程度まで増大することが確認された (Fig. 6)。さらに、マンノース受容体およびスカベンジャー受容体発現量が有意に減少することも併せて示された (Fig. 7)。以上より、NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を導入し、M2 様マクロファージ

の核内 p50 量を減少させることで、M2 様マクロファージの表現型が M1 型へ転換することが確認された。

一方、上述した検討は全て colon-26 細胞培養上清により誘導した M2 様マクロファージを用いて行ったものであるが、がん細胞はその種類ごとに産生する液性因子の種類および量が異なることが確認されている<sup>65,66</sup>。そのため、異なるがん細胞種の培養上清を用いて誘導した M2 様マクロファージはそれぞれ性質が異なることが予想され、それ故、M2 様マクロファージに対する NF-κB (p50) siRNA の効果の程度も用いるがん細胞種により異なる可能性が考えられる。そこで、colon-26 細胞に加え、B16BL6 細胞、PAN-02 細胞の培養上清を用いてそれぞれ M2 様マクロファージを誘導し、それらに対する NF-κB (p50) siRNA の効果を評価した。まず、それぞれの培養上清を用いて培養したマウス腹腔マクロファージより産生されるサイトカイン量を測定した結果、いずれのがん細胞培養上清を用いた場合においてもマクロファージが TAM と類似した M2 様のサイトカイン産生パターンを示すことが確認された (Figs. 8,9)。ただし、そのサイトカイン産生パターンはがん細胞種により若干異なっており、特に、B16BL6 細胞培養上清を用いてマクロファージを培養した際の Th1 型サイトカイン産生量の変化は、他のがん細胞培養上清を用いた場合と比較して小さかった。本結果は、がん細胞から産生される液性因子の種類、および量の違いによりマクロファージの M2 型への分化の程度が異なることを示唆している。続いて、各 M2 様マクロファージに対して NF-κB (p50) siRNA を導入した際のサイトカイン産生量の変化について評価した結果、いずれの M2 様マクロファージにおいても、Th1 型サイトカイン産生量の増大、ならびに Th2 型サイトカイン産生量の有意な減少が認められた (Figs. 8,9)。これらの結果より、本検討で用いた 3 種のがん細胞種によって誘導した M2 様マクロファージ全てにおいて、NF-κB (p50) siRNA の導入により NF-κB の発現を抑制することで、その表現型が M1 型へ転換することが示された。

NF-κB の発現および活性化がマクロファージの表現型に及ぼす影響については、これまでの研究において、NF-κB の p50 サブユニットがマクロファージの M2 型への分化に深く関与している可能性が報告されている<sup>22,23,67,68</sup>。M1 型マクロファージ内では p50 は p65 とヘテロ二量体(NF-κB)を形成しており、このヘテロ二量体は核内へ移行後、DNA 上の特定の配列(κB サイト)に結合することで種々の遺伝子の転写を活性化する。この NF-κB による転写活性化は、M1 型マクロファージの Th1 型免疫応答に必須のプロセスである<sup>39-41</sup>。一方で、TAM においては p50 がホモ二量体を形成しており、核内に蓄積していることが確認されている。p50 ホモ二量体は κB サイトへの結合能は有するが、転写活性化能は有していないため、κB サイトへの結合を介して NF-κB による転写活性化を競合的に阻害する。すなわち、TAM 内では p50 ホモ二量体が NF-κB による Th1 型免疫応答を阻害しており、これにより STAT3 や STAT6 を中心とした Th2 型免疫応答が優位となっているため、TAM は M2 型の性質を示すと考えられている<sup>21</sup>。さらに、p50 ホモ二量体は、Th1 型免疫応答において重要な役割を担うもう一つの転写因子である STAT1 のリン酸化を阻害し、STAT1 による炎症性免疫反応を抑制することも報告されている<sup>23</sup>。これらの知見より、本検討において得られた NF-κB (p50) siRNA 導入による M2 様マクロファージの M1 型への転換効果は、NF-κB (p50) siRNA の作用により M2 様マクロファージ内の p50 ホモ二量体が減少し、それにより NF-κB の DNA への結合、

あるいは STAT1 のリン酸化が増大したことに起因する可能性が考えられる。

上述の通り、p50 サブユニットを標的とした siRNA を用いることにより、M2 様マクロファージの表現型を M1 型に転換できることが確認されたが、本結果をさらに裏付けるためには、siRNA とは異なる作用機序で p50 サブユニットの機能を制御するオリゴ核酸医薬を用いた検討が必要である。そこで次に、p50 サブユニットと特異的に結合することにより NF- $\kappa$ B の活性を抑制する NF- $\kappa$ B decoy を用いて、siRNA と同様の検討を行った。まず、NF- $\kappa$ B decoy を M2 様マクロファージに導入した際の核内 NF- $\kappa$ B 量の変化を評価した結果、核内 p50 タンパク量が顕著に減少することが確認された (Fig. 11A)。NF- $\kappa$ B decoy の導入により細胞質中に存在する NF- $\kappa$ B の核内移行が抑制されるメカニズムについては明らかにされていないが、NF- $\kappa$ B decoy の p50 サブユニットへの結合が p50 サブユニットに含まれる核移行シグナルの機能に対して抑制的な影響を及ぼしている可能性が考えられる。続いて、NF- $\kappa$ B decoy の導入による M2 様マクロファージの表現型変化を検討した結果、NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を用いた検討結果と同様、サイトカインや増殖因子の発現パターンが M2 型のものから M1 型のものへシフトすることが示された (Figs. 11,12)。また、その効果は 3 種の M2 様マクロファージ全てにおいて認められた (Figs. 11,13,14)。これらの結果より、NF- $\kappa$ B decoy の導入によっても M2 様マクロファージの表現型を M1 型へ転換できることが確認された。

以上、本章では、がん細胞培養上清中でマウス腹腔マクロファージを培養することにより、M2 様マクロファージを誘導することに成功した。また、本 M2 様マクロファージに NF- $\kappa$ B の活性を抑制するオリゴ核酸医薬(NF- $\kappa$ B (p50) siRNA、および NF- $\kappa$ B decoy)を導入し、核内 p50 量を減少させることで、M2 様マクロファージの表現型を M1 型へ転換できることを確認した。特に、NF- $\kappa$ B decoy は、アトピー性皮膚炎やリウマチなどの炎症性疾患に対する臨床試験が現在実施されており、実用化が目前となっている製剤である<sup>69-71)</sup>。そのため、NF- $\kappa$ B decoy を用いた TAM の表現型転換に基づくがん治療法を構築することができれば、本手法は近い将来に臨床応用も可能であると考えられる。そこで、次章以降の検討では NF- $\kappa$ B の活性を抑制するオリゴ核酸医薬として NF- $\kappa$ B decoy を選択して評価を行うこととした。

## 第2章 超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用したNF-κB decoyの腫瘍関連マクロファージへのターゲティングと固形がん治療効果の評価

前章では、*in vitro*において、NF-κB p50 サブユニットの機能を抑制するオリゴ核酸医薬を導入し、M2 様マクロファージの核内 p50 量を減少させることで、その表現型を M1 型へ転換できることを確認した。本事象を腫瘍組織中に実際に存在する TAM においても確認することができれば、オリゴ核酸医薬を用いた TAM の表現型転換に基づく新たながん治療法の構築に繋げることができる。しかしながら、腫瘍組織にはがん細胞を始め、血管内皮細胞、幹細胞、間質細胞など様々な細胞が混在しているため、*in vivo*においてオリゴ核酸医薬の導入による TAM の表現型転換を実現するためには、TAM 選択的かつ高効率にオリゴ核酸医薬を導入する技術の開発が不可欠である。

生体内に存在するマクロファージにはマンノース受容体が発現していることが報告されており<sup>72,73</sup>、マンノース受容体を利用したマクロファージ選択的 DDS 技術に関する研究は広く行われている<sup>74-77</sup>。Kawakami らは、マンノース修飾カチオンリポソーム/遺伝子複合体(Man-lipoplex)を開発し、マンノース受容体を介したエンドサイトーシスに基づき、肝クッパー細胞や肺泡マクロファージに対して選択的に遺伝子や核酸を送達できることを報告している<sup>78-81</sup>。さらに、本技術とソノポレーション法<sup>82-84</sup>を融合した超音波応答性マンノース修飾カチオンリポソーム/遺伝子複合体(Man-polyethylene glycol (PEG) bubble lipoplex)の開発も行われており、マクロファージ選択的かつ高効率な遺伝子送達が可能になっている<sup>24-28</sup>。超音波造影ガス(パーフルオロプロパン)の微小気泡を内封し、表面をマンノースで修飾した Man-PEG bubble lipoplex は、従来の Man-lipoplex と同様、マンノース受容体発現細胞への標的指向性を有していることに加え、外部からの超音波照射によりガスの気泡が崩壊する際に発生するキャビテーションにより細胞膜に一過性の小孔を開け、それを介して大量の遺伝子を細胞質内に直接導入する機能も兼ね備えている。TAM にはマンノース受容体が高発現していることから<sup>54,55</sup>、Man-PEG bubble lipoplex を利用することにより TAM への選択的な NF-κB decoy 導入が達成できると考えられる。

そこで本章では、colon-26 固形がんモデルマウスを用いて、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用による *in vivo*における TAM への NF-κB decoy 導入効率を評価し、本技術を用いた NF-κB decoy 導入による TAM の表現型転換について検討を行った。さらに、がん治療効果に関する検討も行い、TAM 選択的 NF-κB decoy 導入法のがん治療への応用を試みた。

### 第1節 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/NF-κB decoy 複合体(Man-PEG bubble lipoplex)の開発

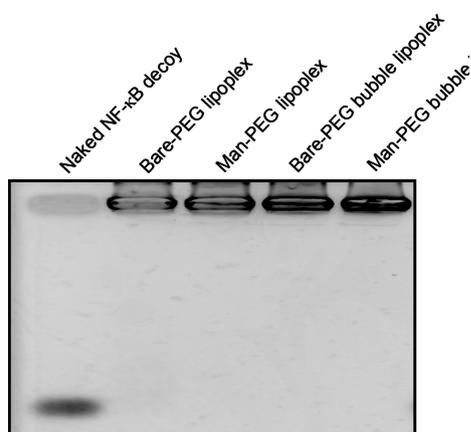
#### 1-a Man-PEG bubble lipoplex の作製と物理化学的性質

リポソーム内部にパーフルオロプロパンを安定に封入するためには、リポソーム表面への PEG

修飾が必要なことが報告されているが<sup>85)</sup>、Unらはさらに、リポソームが飽和脂肪酸のみから成る相転移温度の高いリン脂質で構成されていなければならないことを見出し、飽和脂肪酸のみで構成されるカチオン性リン脂質の DSTAP、中性リン脂質の DSPC、および Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE を構成脂質として用いることにより Man-PEG bubble lipoplex を構築することに成功した<sup>24-28)</sup>。一方で、Negishiらは、三級アミンを有する DSTAP を構成脂質として含むバブルリポソームよりも、四級アミンを有する DSDAP を構成脂質として含むバブルリポソームの方が遺伝子導入効率が高いことを報告している<sup>86)</sup>。これらの知見を基に著者は、Unらの調製法に改良を加え、DSDAP: DSPC: NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE = 7:2:1 (mol) で構成される Bare-PEG bubble liposome、および DSDAP: DSPC: Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE = 7:2:1 (mol) で構成される Man-PEG bubble liposome を調製し、それぞれをチャージ比 1.0:2.3(-:+) で NF-κB decoy と混合することにより bubble lipoplex を作製した。尚、Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE は Unらの合成法に従い、PEG 末端にアミノ基を有する市販の NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE を IME-thiomannoside と反応させることで合成した<sup>23)</sup>。Bubble liposome および bubble lipoplex の物理化学的性質(粒子径および表面電荷)を評価した結果、Bare-PEG bubble lipoplex および Man-PEG bubble lipoplex の粒子径および表面電荷はそれぞれ 553.6±8.1 nm、20.3±2.4 mV および 567.1±6.3 nm、21.1±2.4 mV であり (Table 2)、これらの結果は過去に報告されているプラスミド DNA や siRNA を用いて作製した bubble lipoplex における測定結果と一致するものであった<sup>24-28)</sup>。また、bubble liposome と比較して、bubble lipoplex の表面電荷が低いことが確認されたことから、NF-κB decoy が bubble liposome 表面で静電的に相互作用していることが示唆された。さらに、電気泳動による検討結果からも、安定に lipoplex が形成されていることが確認された (Fig. 17)。

**Table 2. Particle sizes and zeta potentials of liposomes and lipoplexes.** Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

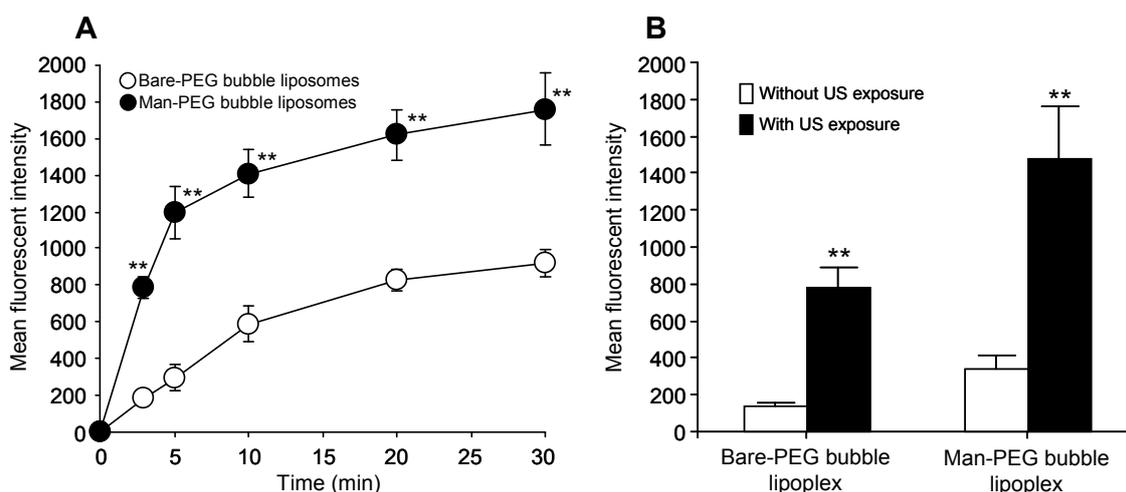
|  | Particle size (nm) | Zeta-potential (mV) |
|--|--------------------|---------------------|
| Bare-PEG bubble liposome (DSDAP: DSPC: NH <sub>2</sub> -PEG <sub>2000</sub> -DSPE = 7:2:1 (mol)) | 538.8 ± 5.9        | 38.6 ± 2.1          |
| Man-PEG bubble liposome (DSDAP: DSPC: Man-PEG <sub>2000</sub> -DSPE = 7:2:1 (mol))               | 551.4 ± 4.7        | 36.4 ± 1.6          |
| Bare-PEG bubble lipoplex (DSDAP: DSPC: NH <sub>2</sub> -PEG <sub>2000</sub> -DSPE = 7:2:1 (mol)) | 553.6 ± 8.1        | 20.3 ± 2.4          |
| Man-PEG bubble lipoplex (DSDAP: DSPC: Man-PEG <sub>2000</sub> -DSPE = 7:2:1 (mol))               | 567.1 ± 6.3        | 21.1 ± 2.4          |



**Figure 17. Confirmation of NF-κB decoy complexes by gel-retardation assay.** Lipoplexes and bubble lipoplexes were run on a 1%-TAE agarose gel.

## 1-b 腫瘍関連マクロファージ(TAM)への NF-κB decoy 送達に関する in vitro における基礎的検討

続いて、colon-26 固形がんモデルマウスの腫瘍組織より単離した TAM を用いて、in vitro における Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用による TAM への NF-κB decoy 送達効率を評価した。まず、TAM による bubble liposome の取り込み効率について評価するため、蛍光標識脂質によりラベル化した Bare-PEG bubble liposome および Man-PEG bubble liposome を TAM に暴露させ、その取り込み量を経時的に測定した。その結果、TAM による Man-PEG bubble liposome の取り込み量は、Bare-PEG bubble liposome の取り込み量と比較して有意に高く、bubble liposome 暴露 5 分後において既に約 4 倍多い取り込みが認められた (Fig. 18A)。本結果より、bubble liposome 表面にマンノース修飾を施すことで、TAM への標的指向性を付与できることが示唆された。次に、bubble lipoplex と超音波照射の併用により得られる TAM への NF-κB decoy 送達量を蛍光標識 NF-κB decoy を用いて測定した。その結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用により得られる NF-κB decoy 送達量は、Man-PEG bubble lipoplex 単独と比較して約 4.3 倍多く、また Bare-PEG bubble lipoplex と超音波照射を組み合わせた場合と比較しても約 2 倍多いことが示された (Fig. 18B)。



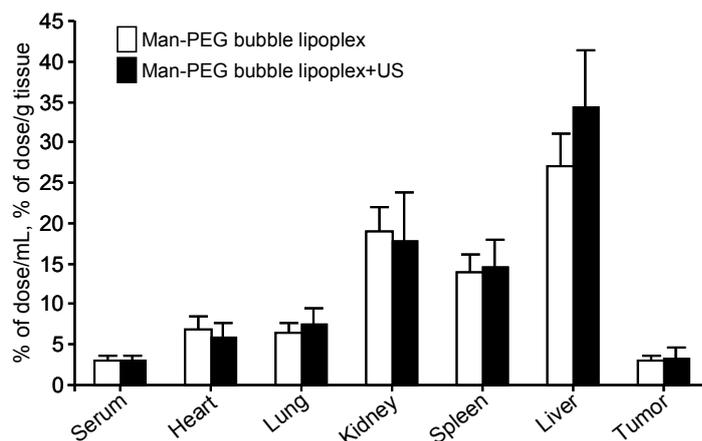
**Figure 18. In vitro cellular association of bubble liposomes and NF-κB decoy in cultured TAM isolated from colon-26 solid tumor.** (A) In vitro time-course for bubble liposomes cellular association. Data are represented as mean values  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\* $p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble liposomes. (B) Amount of internalized FAM-labelled NF-κB decoy oligonucleotides obtained with Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplexes with or without US exposure in isolated TAM 1 h after the addition of bubble lipoplexes. Mean fluorescence intensity was calculated by dividing the total fluorescence intensity by the number of cells (10,000 cells). Data are represented as mean values  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\* $p < 0.01$ , compared with corresponding groups without US exposure.

## 第 2 節 colon-26 固形がんモデルマウスにおける TAM 選択的 NF-κB decoy 導入

前節では、NF-κB decoy を用いて作製した Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用することにより、in vitro において TAM に効率的に NF-κB decoy を送達できることが示された。そこで次に、本システムを利用した in vivo における TAM 選択的 NF-κB decoy 導入法を確立するため、本節では、Man-PEG bubble lipoplex の適切な投与経路の選択を行い、in vivo における Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用による TAM への NF-κB decoy 導入効率の評価を行った。

## 2-a Man-PEG bubble lipoplex 静脈内投与後の NF- $\kappa$ B decoy の体内分布特性

In vivo において TAM 選択的かつ効率的に NF- $\kappa$ B decoy を送達するためには、Man-PEG bubble lipoplex の適切な投与経路の選択が重要である。そこで、colon-26 固形がんモデルマウスに対して Man-PEG bubble lipoplex を静脈内投与した際の NF- $\kappa$ B decoy の体内分布特性について評価を行った。<sup>32</sup>P 標識した NF- $\kappa$ B decoy を用いて作製した Man-PEG bubble lipoplex を colon-26 固形がんモデルマウスに静脈内投与し、投与 30 分後における各臓器中の NF- $\kappa$ B decoy 量を測定した。その結果、大部分の NF- $\kappa$ B decoy が肝臓に分布し、次いで腎臓、脾臓に蓄積する一方で、腫瘍組織への移行量は極めて少ないことが示された (Fig. 19)。また、Man-PEG bubble lipoplex 投与 5 分後に腫瘍組織に対して超音波照射を施した際の NF- $\kappa$ B decoy の体内分布特性についても同様に評価を行ったが、超音波照射に伴う NF- $\kappa$ B decoy の臓器移行性の変化は認められなかった (Fig. 19)。これらの結果より、Man-PEG bubble lipoplex を静脈内投与した場合には TAM に対する十分な NF- $\kappa$ B decoy 導入量が得られないと考えられるため、以降の検討では、Man-PEG bubble lipoplex は固形腫瘍組織内へ直接投与することとした。

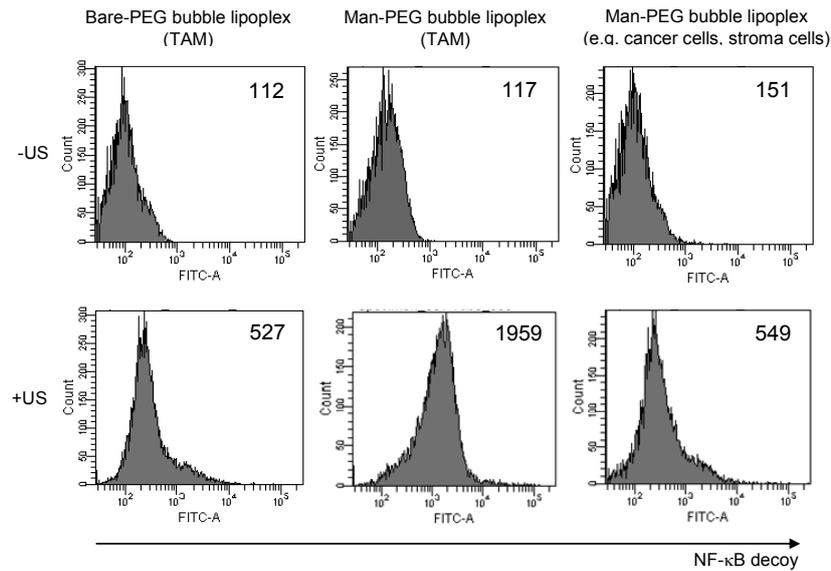


**Figure 19. Tissue distribution of NF- $\kappa$ B decoy oligonucleotides by Man-PEG bubble lipoplexes and US exposure.** Tissue distribution after intravenous administration of Man-PEG bubble lipoplexes (10  $\mu$ g NF- $\kappa$ B decoy) with or without US exposure in colon-26 tumor bearing mice. Data are represented as mean values + SD ( $n = 3$ ).

## 2-b Man-PEG bubble lipoplex の腫瘍組織内への注入による TAM への NF- $\kappa$ B decoy 送達

Man-PEG bubble lipoplex の腫瘍組織内への注入と超音波照射を組み合わせた際の in vivo における TAM への NF- $\kappa$ B decoy 送達量は、fluorochrome (FAM) を結合させた蛍光標識 NF- $\kappa$ B decoy (FAM 標識 NF- $\kappa$ B decoy) を用いることにより評価した。本手法による FAM 標識 NF- $\kappa$ B decoy 送達後、腫瘍組織から TAM を単離し、TAM 内の蛍光強度を測定した。また、蛍光強度の測定値から単位細胞数あたりの平均蛍光強度を算出した。その結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用により得られる TAM への NF- $\kappa$ B decoy 送達量は、超音波未照射の場合と比較して約 16.7 倍多いことが明らかとなった (Fig. 20)。また、Bare-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した場合と比較しても、約 3.7 倍の送達量が得られた。さらに、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用により得られる TAM への NF- $\kappa$ B decoy 送達量は、TAM 以外の細胞 (がん細胞や間質細胞など) への送達量と比較して約 3.6 倍多いことが示された。これらの結果より、Man-PEG bubble lipoplex の腫瘍組織内への注入と腫瘍組織への超音波照射を併用することで、固形腫瘍中の TAM に対して選択的かつ効率的に

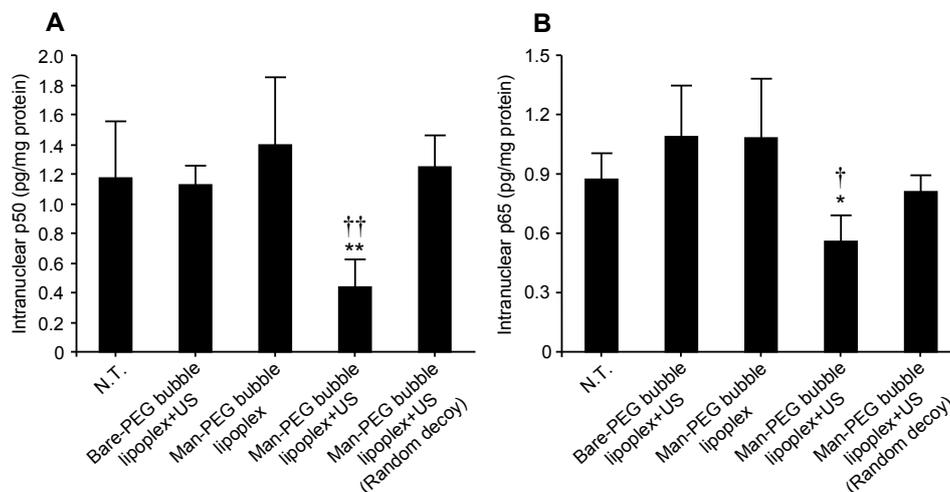
NF- $\kappa$ B decoy を送達できることが示された。



**Figure 20.** *In vivo* transfection efficiency of fluorochrome (FAM)-labelled NF- $\kappa$ B decoy oligonucleotides into TAM by Bare-PEG and Man-PEG bubble lipoplexes, with or without US exposure. The fluorescent intensity of FAM-labelled NF- $\kappa$ B decoy oligonucleotides in TAM 1 h after the addition of bubble lipoplexes. Mean fluorescence intensity was calculated by dividing the total fluorescence intensity by the number of cells (10,000 cells).

## 2-c TAM の核内 NF- $\kappa$ B 量の変化

次に、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射により *in vivo* において NF- $\kappa$ B decoy を導入した際の、TAM の核内 NF- $\kappa$ B 量の変化を評価した。その結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した場合においてのみ、TAM の核内 p50 および p65 量の有意な減少が認められた (Fig. 21)。本結果は、前項の *in vivo* における NF- $\kappa$ B decoy の TAM 内移行に関する検討結果 (Fig. 20)と同様であり、Man-PEG bubble lipoplex の腫瘍組織内への注入と超音波照射を併用する手法が、TAM 選択的 NF- $\kappa$ B decoy 導入技術として有用であることを示すものであった。



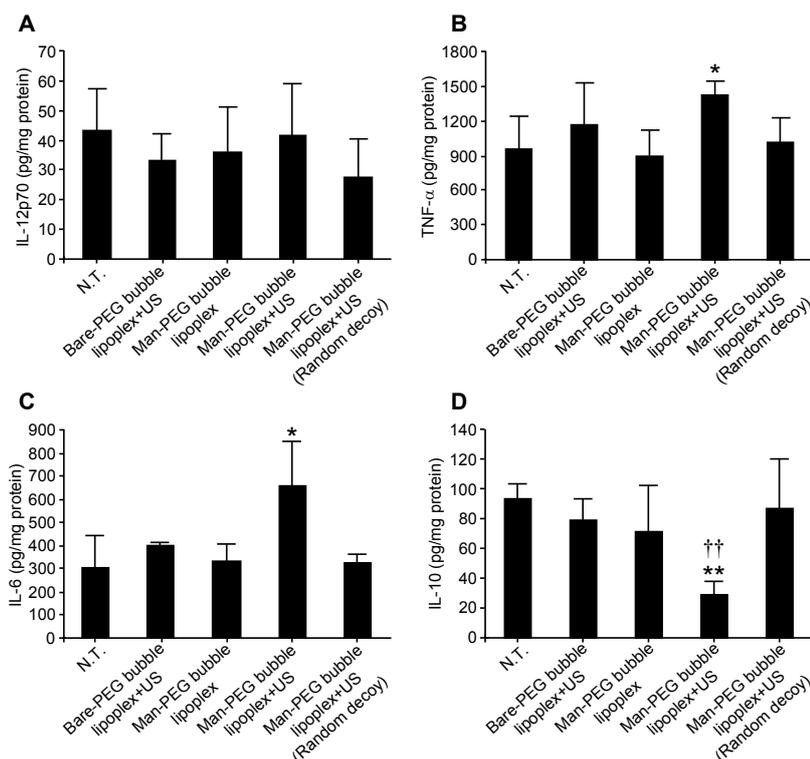
**Figure 21.** Amounts of TAM nucleic p50 (A) and p65 (B) following *in vivo* NF- $\kappa$ B decoy transfection with Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplexes, with or without US exposure 12 h post-transfection. Data are represented as mean values + SD ( $n = 3$ ).  $^*p < 0.05$ ;  $^{**}p < 0.01$ , compared with N.T. (5% glucose).  $^{\dagger}p < 0.05$ ;  $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US. N.T., no treatment.

### 第3節 in vivo NF-κB decoy 導入による TAM 表現型転換とがん治療

前節までの検討において、Man-PEG bubble lipoplex の腫瘍組織内への注入と超音波照射を組み合わせることで TAM へ効率的に NF-κB decoy を送達でき、それにより TAM の核内 p50 量が有意に減少することが確認された。本知見と第一章第二節における NF-κB decoy 導入によるマクロファージの表現型転換に関する検討結果を考慮すると、Man-PEG bubble lipoplex を利用した TAM への NF-κB decoy 導入により、colon-26 固形がんモデルマウスにおける TAM 表現型の M2 型から M1 型への転換が実現可能であると考えられる。そこで本節では、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用して TAM に NF-κB decoy を導入した際の TAM の表現型の変化を、サイトカイン産生量、増殖因子および MMP 発現量、ならびに NO 産生量を指標として評価した。さらに、本手法が固形がん治療に有効であることを証明するため、固形がん治療効果を colon-26 固形がんモデルマウスの腫瘍径および生存日数を計測することにより評価した。

#### 3-a 腫瘍組織中サイトカイン濃度の変化

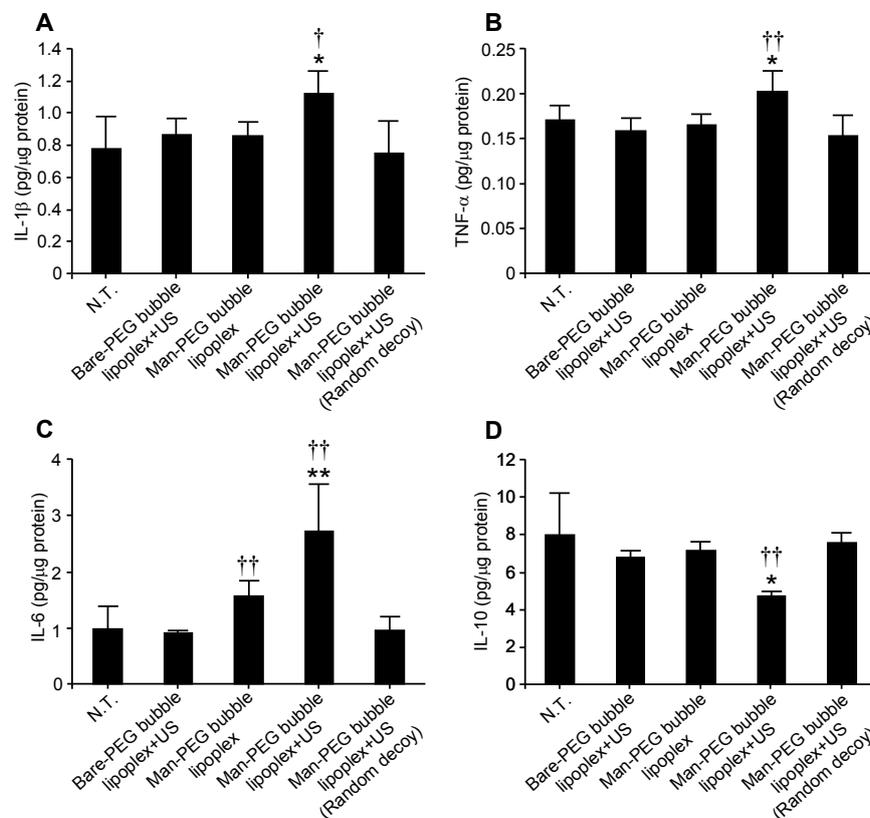
まず、TAM に NF-κB decoy を導入した際の腫瘍組織中サイトカイン濃度の変化について評価した。NF-κB decoy 導入後に腫瘍組織を摘出し、腫瘍組織中サイトカイン濃度を測定した結果、いずれの導入方法においても IL-12 濃度に有意な変化は認められなかったものの、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した場合にのみ TNF-α および IL-6 の腫瘍組織中濃度が有意に増大することが明らかとなった (Fig. 22A-C)。また、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用した NF-κB decoy 導入により腫瘍組織中 IL-10 濃度が有意に減少することも併せて示された (Fig. 22D)。



**Figure 22. Effect of NF-κB decoy/Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplex transfection on cytokine concentrations in tumor tissue.** Concentrations of IL-12p70 (A), TNF-α (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) 24 h post-transfection. Data are represented as mean values + SD ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with N.T. (5% glucose). †† $p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US. N.T., no treatment.

### 3-b TAM のサイトカイン産生能の変化

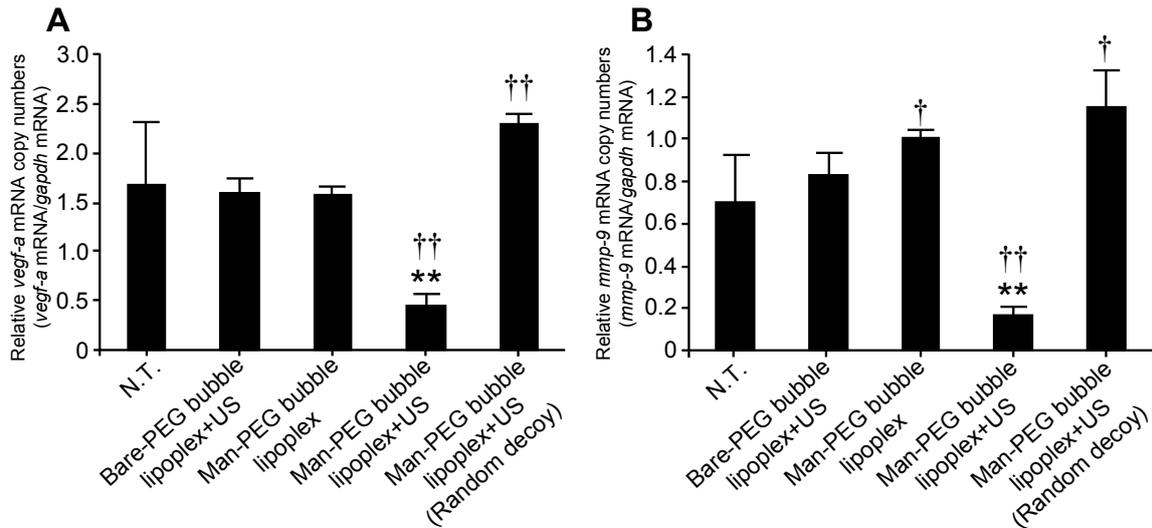
前項の検討において確認された腫瘍組織中サイトカイン濃度の変化は、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入により、固形腫瘍中の TAM の表現型が M2 型から M1 型へ転換したことに起因すると推察される。そこで、NF- $\kappa$ B decoy 導入後に腫瘍組織中から TAM を単離し、その TAM を *in vitro* において培養することにより、LPS 刺激による TAM 自体のサイトカイン産生能の変化を評価した。その結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用して NF- $\kappa$ B decoy を導入した TAM において、Th1 型サイトカインである IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  および IL-6 の産生が有意に亢進していることが確認された (Fig. 23A-C)。また、IL-10 の産生が抑制されていることも併せて確認された (Fig. 23D)。本結果は、前項の検討結果 (Fig. 22)と一致するものであった。



**Figure 23.** Effect of NF- $\kappa$ B decoy/Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplex transfection on TAM cytokine production *in vivo*. Concentration of IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) in culture supernatants from TAM collected 24 h post-transfection. Data are represented as mean values + SD ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with N.T. (5% glucose). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US. N.T., no treatment.

### 3-c TAM の増殖因子および MMP の発現特性の変化

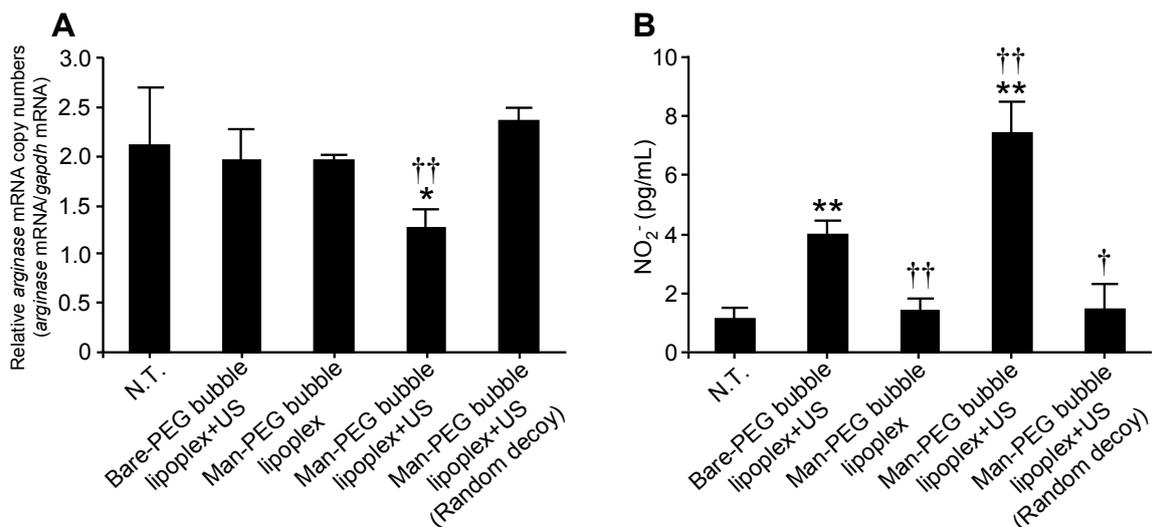
サイトカイン産生能の変化に加え、NF- $\kappa$ B decoy 導入による VEGF および MMP-9 の mRNA 発現量の変化についても評価を行った。その結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用により NF- $\kappa$ B decoy を導入した TAM においてのみ、VEGF、および MMP-9 mRNA 発現量の顕著な減少が認められた (Fig. 24)。



**Figure 24. Effect of NF- $\kappa$ B decoy/Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplex transfection on mRNA levels of VEGF and MMP-9 *in vivo*.** mRNA levels of VEGF (A), MMP-9 (B) in TAM collected 24 h post-transfection. Data are represented as mean values + SD ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with N.T. (5% glucose). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US. N.T., no treatment.

### 3-d TAMの一酸化窒素産生能の変化

さらに、TAMのNO産生能の変化について評価するため、NF- $\kappa$ B decoy 導入後に腫瘍組織より TAM を単離し、TAM 内アルギナーゼ mRNA 発現量、および TAM より産生される NO 量を測定した。その結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用した NF- $\kappa$ B decoy 導入により、TAM 内アルギナーゼ mRNA 発現量が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 25A)。さらに、TAM 培養上清中 NO 濃度が顕著に増大することも併せて示された (Fig. 25B)。



**Figure 25. Effect of NF- $\kappa$ B decoy/Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplex transfection on NO production from TAM *in vivo*.** (A) The expression level of arginase mRNA in TAM collected 24 h post-transfection. (B) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentration in culture supernatants from TAM collected 24 h post-transfection. Data are represented as mean values + SD ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with N.T. (5% glucose). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US. N.T., no treatment.

### 3-e 腫瘍増殖抑制効果および延命効果

最後に、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入による抗腫瘍効果の評価を行った。Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用して TAM に NF- $\kappa$ B decoy を隔日に 5 回導入した結果、顕著に高い腫瘍増殖抑制効果、並びに延命効果が認められた (Fig. 26)。

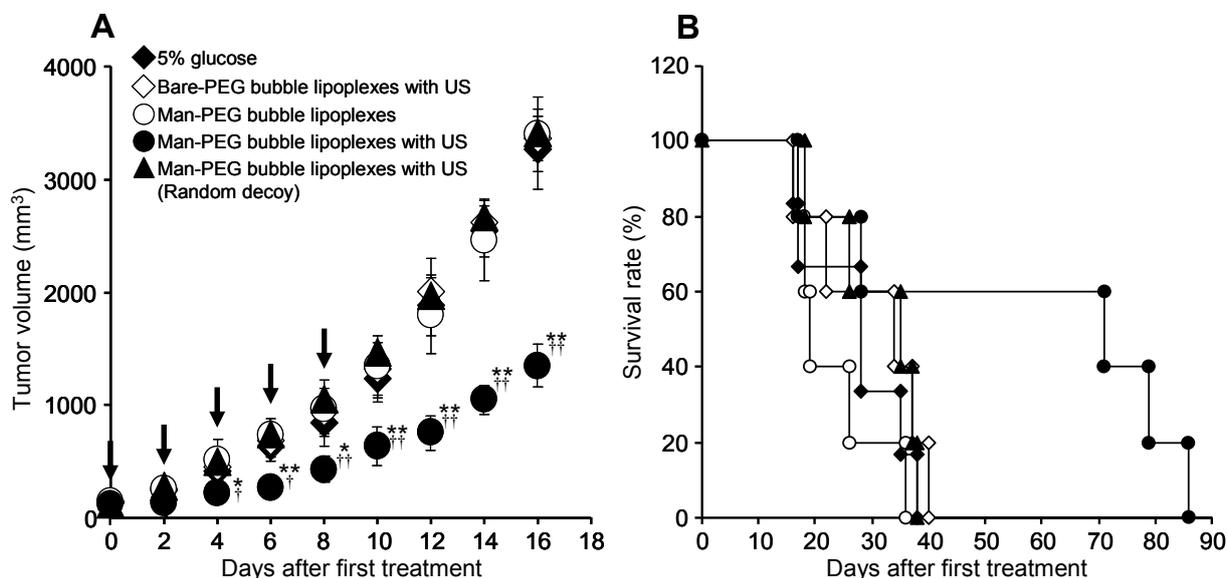


Figure 26. Effect of NF- $\kappa$ B decoy/Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplex transfection on tumor growth and survival. (A) Tumor growth in colon-26 tumor-bearing mice after transfection. (B) survival of colon-26 tumor-bearing mice post-transfection. Data are represented as mean values  $\pm$  SD ( $n = 5-6$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with the control group (5% glucose). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US.

## 第4節 考察

TAM を標的としたがん治療法を構築するためには、医薬品を TAM 選択的かつ効率的に送達する技術の開発が不可欠である。しかしながら、TAM 選択的 DDS 技術に関する研究報告はいまだ少なく<sup>87-89</sup>、特に核酸医薬品を送達するための技術はほとんど開発されていない<sup>90</sup>。そこで本章ではまず、TAM 選択的 NF- $\kappa$ B decoy 送達技術の開発を行った。TAM にはマンノース受容体が高発現していることが知られていることから<sup>12</sup>、著者は、Un らが開発した超音波応答性マンノース修飾カチオンリポソームと超音波照射を利用した遺伝子導入システムを改良することにより、TAM 選択的 NF- $\kappa$ B decoy 送達が達成できると考えた。超音波応答性マンノース修飾カチオンリポソームと NF- $\kappa$ B decoy の複合体(Man-PEG bubble lipoplex)を作製し、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 送達効率を *in vitro* において検討した結果、本複合体と超音波照射の併用により TAM へ効率的に NF- $\kappa$ B decoy を送達できることが示された (Fig. 18)。続いて、*in vivo* における NF- $\kappa$ B decoy 導入効率に関する検討を行った。*In vivo* において TAM への高い NF- $\kappa$ B decoy 導入効率を得るためには、Man-PEG bubble lipoplex の投与経路の選択が重要である。そこで、colon-26 固形がんモデルマウスに対して Man-PEG bubble lipoplex を静脈内投与した際の NF- $\kappa$ B decoy の体内分布特性について評価した結果、Man-PEG

bubble lipoplex を静脈内投与した場合には、NF- $\kappa$ B decoy は腫瘍組織へほとんど移行しないことが示された (Fig. 19)。この NF- $\kappa$ B decoy の低い腫瘍組織移行性は、Man-PEG bubble lipoplex が有する粒子径に起因するものと考えられる。マウス固形腫瘍組織では、新生される血管の構造が脆弱なために血管内皮細胞間に約 100-300 nm 程度の間隙が認められる上、組織中のリンパ回収系が未発達であることが確認されている。そのため、正常血管では漏出しにくい高分子が腫瘍新生血管からは漏出し、長期間滞留するという Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect が固形腫瘍に広く認められる<sup>91-93</sup>)。EPR Effect に従うと、粒子径の大きい粒子は正常組織への分布が抑制される一方で、腫瘍組織には効率的に蓄積する<sup>94-96</sup>)。しかしながら、血管内皮細胞間隙(約 100~300 nm 程度)以上の粒子径を有する微粒子製剤は EPR Effect を利用することができない<sup>97,98</sup>)。Man-PEG bubble lipoplex は一般的に腫瘍血管に認められる間隙よりも大きな粒子径(約 550 nm)を有しているため、EPR Effect による腫瘍組織への効率的な蓄積が認められなかったものと推察される。これらの結果・考察を考慮して、TAM に対する高い NF- $\kappa$ B decoy 導入効率を得るため、Man-PEG bubble lipoplex は固形がんモデルマウスの腫瘍組織へ直接注入することとした<sup>99-101</sup>)。Man-PEG bubble lipoplex の腫瘍組織内への注入と超音波照射の併用による in vivo における TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入効率について評価した結果、本手法により NF- $\kappa$ B decoy が TAM に高い比率で分布し、それにより TAM の核内 p50 量が顕著に減少することが明らかとなった (Figs. 20,21)。これらの結果より、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用した本システムは、マンノース修飾による TAM への標的指向能とソノポレーション法に基づく核酸を細胞質内へ効率的に導入する機能を併せ持つ、有用な TAM 選択的 NF- $\kappa$ B decoy 送達技術であることが示された。

次に、本システムを利用した NF- $\kappa$ B decoy 導入による TAM の表現型転換に関する検証を行った。まず、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用した TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入に伴う腫瘍組織中サイトカイン濃度の変化について評価した結果、腫瘍組織中 TNF- $\alpha$  および IL-6 濃度の増大、ならびに IL-10 濃度の有意な減少が認められた (Fig. 22)。この腫瘍組織中サイトカイン濃度の変化は、NF- $\kappa$ B decoy の導入により TAM の表現型が M2 型から M1 型へ転換したことに起因するものであると推察された。そこでより詳細な検討として、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用により TAM に対して NF- $\kappa$ B decoy 導入を行った後、腫瘍組織中から TAM を単離し in vitro において培養することで、TAM 自体のサイトカイン産生能の変化について評価した。その結果、NF- $\kappa$ B decoy を導入することにより、LPS 刺激により TAM から産生される炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6)量が有意に増大すると共に、IL-10 産生量が減少することが確認された (Fig. 23)。さらに、VEGF、MMP-9 mRNA 発現量、および NO 産生量の変化についても検討を行った結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入により、TAM における VEGF および MMP-9 mRNA 発現量が有意に減少し、さらに NO 産生量が顕著に増大することが明らかとなった (Figs. 24,25)。これらの結果は、NF- $\kappa$ B decoy の導入により TAM の表現型が M2 型から M1 型へ転換したことを示唆するものである。ただし、IL-12 に関しては、NF- $\kappa$ B decoy 導入による腫瘍組織中濃度および TAM からの産生量に有意な変化は認められなかった。この理由として、TNF- $\alpha$ 、IL-6 はマクロファージの表現型が M1 型へ傾くと産生量が増大するのに対し、IL-12 はマクロファージ

が完全に M1 型へ分化しないと産生が亢進しないというように、サイトカインごとにマクロファージの表現型の変化に対する感受性が異なる可能性が考えられる。NF- $\kappa$ B decoy を導入した際に IL-12 の産生量が他の炎症性サイトカインと比較して増大しにくいことは、第 1 章の M2 様マクロファージにおける検討結果からも確認できる (Figs. 11,13-15)。これらの結果・考察より、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した NF- $\kappa$ B decoy 導入により TAM の表現型が M2 型から M1 型へシフトすることが示されたが、TAM が完全な M1 型へは転換していないことも示唆された。TAM を IL-12 産生能を有する M1 型へ転換させるためには、NF- $\kappa$ B decoy の投与量の最適化、あるいは Man-PEG bubble lipoplex の投与方法のさらなる検討が必要であると考えられる。

これまでの検討により、固形腫瘍組織における Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入により、TAM の表現型の存在比が M1 型優位なものへシフトすることが示唆された。そこで次に、本手法が固形がん治療に有効であることを証明するため、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入による固形がん治療効果の評価を行った。第 1 章第 3 節でも述べたとおり、マクロファージの表現型はその存在する微小環境にตอบสนองして容易に変化することが知られているため<sup>34,36</sup>、本手法により高いがん治療効果を得るためには、NF- $\kappa$ B decoy の導入スケジュールを厳密に設計し、NF- $\kappa$ B decoy 導入による TAM の表現型転換効果を持続させることが必要である。過去の報告では、マクロファージの表現型はその培養条件により 24~72 時間で変化することが示されている<sup>22</sup>。また、第 1 章第 2 節 2-c における *in vitro* 実験の検討結果から、NF- $\kappa$ B decoy 導入によるマクロファージ表現型の M1 型への転換効果は、NF- $\kappa$ B decoy 導入 72 時間後には完全に消失することが確認されている (Fig. 15)。これらの知見を基に、治療効果に関する検討では、colon-26 固形がんモデルマウスに対して NF- $\kappa$ B decoy を隔日に計 5 回導入することとした。本スケジュールに従い、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入を行った結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した場合においてのみ、顕著に高い腫瘍増殖抑制効果、ならびに延命効果が認められた (Fig. 26)。本結果は、NF- $\kappa$ B decoy の導入により TAM の表現型を転換する手法が高いがん治療効果を発揮することを示唆している。ただし、本手法により得られたがん治療効果が本当に TAM の表現型転換に由来するものであることを証明するためには、がん細胞に対する NF- $\kappa$ B decoy 導入が腫瘍増殖抑制効果を示さないことを明らかにする必要がある。固形腫瘍組織中のがん細胞は恒常的に NF- $\kappa$ B が活性化していることが報告されており、この異常な NF- $\kappa$ B の活性化は、がん細胞の増殖促進やアポトーシスの抑制、抗がん剤耐性の獲得などがん細胞が生存する上で有利な現象に関与している<sup>102-104</sup>。そのため、がん細胞内の NF- $\kappa$ B はがん治療における標的の 1 つとされており、実際に NF- $\kappa$ B 阻害剤を固形がんモデルマウスに投与することにより高い抗腫瘍効果が得られることが報告されている<sup>105,106</sup>。本検討では、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した場合、TAM に送達された NF- $\kappa$ B decoy 量の約 4 分の 1 ががん細胞(F4/80 陰性細胞)に対しても送達されることが確認されているため (Fig. 20)、本手法により得られた腫瘍増殖抑制効果は、colon-26 細胞への NF- $\kappa$ B decoy 導入により colon-26 細胞中の NF- $\kappa$ B 活性が抑制されたことに起因する可能性が考えられる。ここで、Bare-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用して NF- $\kappa$ B decoy を導入した場合に着目すると、がん細胞に対する NF- $\kappa$ B decoy 送達量は Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した場合とほぼ同等であるにも

関わらず、腫瘍増殖抑制効果は認められなかった (Figs. 20,26)。本結果は、bubble lipoplex と超音波照射の併用により得られるがん細胞に対する NF- $\kappa$ B decoy 送達量では、固形腫瘍に対する増殖抑制効果は得られないことを示している。さらに、過去の研究において、colon-26 固形がんモデルマウスに対して NF- $\kappa$ B decoy とカチオン性リポソームの複合体を腫瘍組織内へ直接投与した場合、がん性悪液質は抑制できるものの、固形腫瘍の増殖そのものは抑制できないことが確認されている<sup>107)</sup>。これらの知見より、本検討において得られたがん抑制効果は、がん細胞への NF- $\kappa$ B decoy 導入に基づくものではなく、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入による TAM の表現型転換に基づくものであると考えられる。以上、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用した TAM への効率的な NF- $\kappa$ B decoy 導入により TAM 表現型を M1 型へ転換する手法は、固形腫瘍に対して高い治療効果を発揮する新規がん治療法と成り得ることが示唆された。

以上、本章では、Man-PEG bubble lipoplex の腫瘍組織内への注入と超音波照射を併用することにより、in vivo において TAM 選択的かつ効率的に NF- $\kappa$ B decoy を導入できることを示した。また、本システムを利用した NF- $\kappa$ B decoy 導入により、colon-26 固形腫瘍における TAM の表現型の存在比が M1 型優位なものへと転換することが示唆され、これにより高いがん治療効果が得られることを明らかにした。

### 第3章 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/NF-κB decoy 複合体のがん性腹膜炎治療への応用

TAM は主として固形腫瘍組織においてその存在が確認されてきたため、これまでの TAM を標的としたがん治療に関する研究は、固形がんモデル動物あるいは固形がん患者のサンプルを用いたものが大半を占めている。一方、近年、がん性腹膜炎に伴うがん性腹水中においても TAM の存在が確認され、TAM ががん性腹膜炎の進行に関与していることが報告されている<sup>108,109)</sup>。

がん性腹膜炎とは、腹腔内臓器に発生したがんが末期状態まで進行した際に、がん細胞が原発巣の臓器漿膜から腹腔内へ脱落することにより腹膜の全面にわたってがんの小結節が形成された状態を指す<sup>110-112)</sup>。がん性腹膜炎は卵巣がん患者に最も多く認められ、膵臓がん、胃がん、子宮がんがそれに続く。がん性腹膜炎の主症状は腹水貯留(がん性腹水)であり、腹部の痛みや呼吸困難、悪心、浮腫などを伴い、がん患者の Quality of Life (QOL)を著しく低下させる原因となる。現在まで、がん性腹膜炎、ならびにがん性腹水に対する様々な治療法が講じられてきたが、十分な効果が得られる治療法はいまだ確立しておらず、そのため、新規がん性腹膜炎治療法の開発が望まれている。

がん性腹水中にはがん細胞はもちろんのこと、免疫細胞、線維芽細胞、間葉系幹細胞など様々な細胞が存在していることが確認されており、腹腔内においてがん微小環境を形成している<sup>108,109)</sup>。マクロファージはがん性腹膜炎の進行に伴い腹腔内へ遊走し、がん性腹水中においてがん細胞との相互作用により M2 型の性質を獲得し、がん性腹膜炎を悪化させることが報告されている<sup>54,113,114)</sup>。これらの知見より、がん性腹水中の TAM はがん性腹膜炎治療における新たな標的となると考えられ、がん性腹水中の TAM に対して NF-κB decoy を導入し、その表現型を M1 型へ転換する手法は、効果的な新規がん性腹膜炎治療法と成り得ることが期待される。

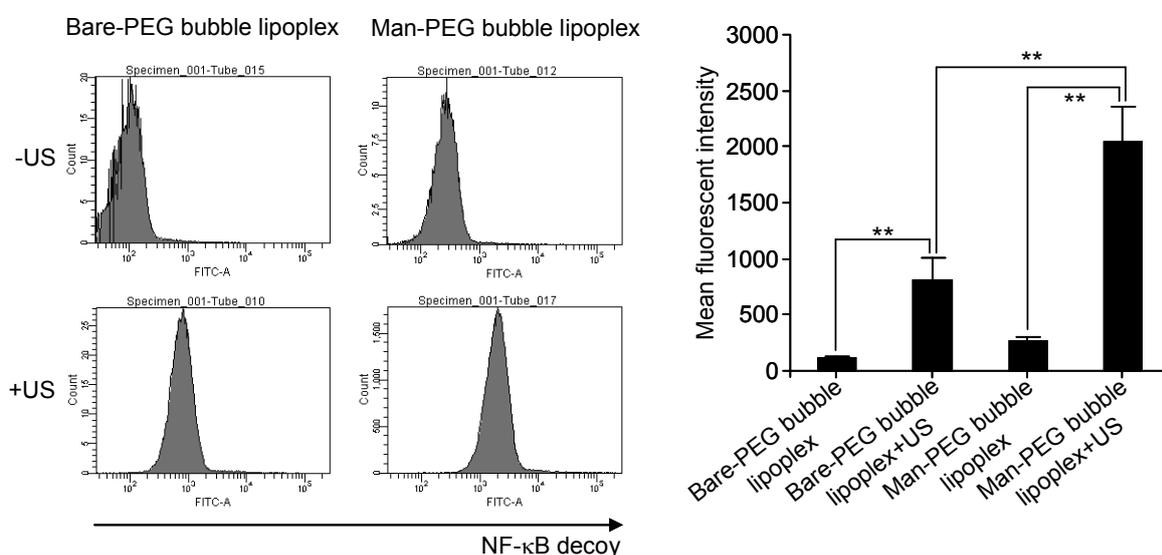
そこで本章では、Ehrlich マウス腹水がん細胞を移植した腹水がんモデルマウスを用いて、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用による腹水中 TAM への NF-κB decoy 導入効率を評価し、さらに NF-κB decoy 導入による TAM の表現型転換効果、およびがん性腹膜炎治療効果について検討を行った。

#### 第1節 Ehrlich 腹水がんモデルマウスにおける TAM 選択的 NF-κB decoy 導入

前章の検討において、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用することにより NF-κB decoy を固形腫瘍中の TAM に対して効率的に送達できることを明らかにしたが、がん性腹水中では TAM が大きなボリュームに広がって存在しているため、TAM への NF-κB decoy 送達効率が固形腫瘍の場合と異なる可能性が考えられる。そこで本節では、腹水がんモデルマウスにおける Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用したがん性腹水中の TAM への NF-κB decoy 導入効率について評価した。

## 1-a Man-PEG bubble lipoplex の腹腔内投与による TAM への NF-κB decoy 送達

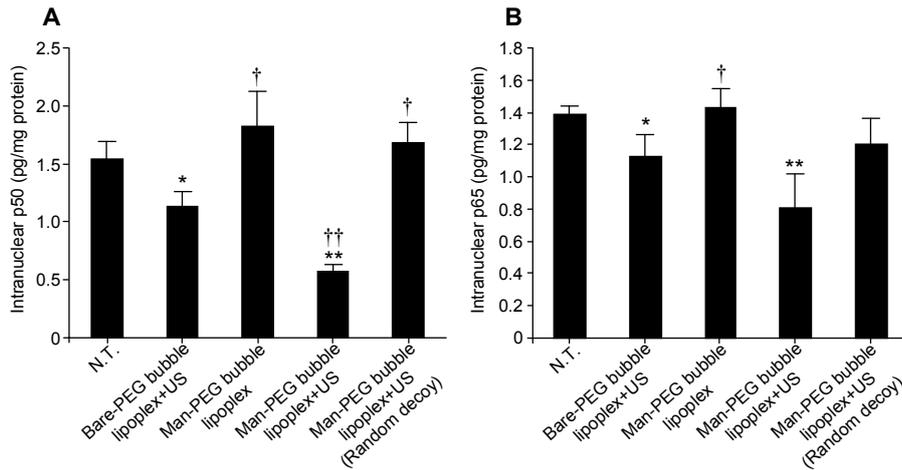
まず、がん性腹水中の TAM への NF-κB decoy 送達効率を評価した。腹水中の TAM に対する NF-κB decoy 送達は、Man-PEG bubble lipoplex の腹腔内投与と腹部への超音波照射を組み合わせることにより行った。蛍光標識 NF-κB decoy を用いて TAM への NF-κB decoy 送達量を測定した結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用により得られる TAM への NF-κB decoy 送達量は、超音波未照射の場合と比較して約 7.9 倍多いことが示された。また、Bare-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した場合と比較しても、約 2.5 倍多い NF-κB decoy 送達量が得られた (Fig. 27)。本結果より、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用することにより、がん性腹水中の TAM に対して効率的に NF-κB decoy を送達できることが示された。



**Figure 27.** *In vivo* transfection efficiency of FAM-labelled NF-κB decoy oligonucleotides into TAM by Bare-PEG and Man-PEG bubble lipoplexes, with or without US exposure in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. The fluorescent intensity of FAM-labelled NF-κB decoy oligonucleotides in TAM 1 h after the addition of bubble lipoplexes. Mean fluorescence intensity was calculated by dividing the total fluorescence intensity by the number of cells (10,000 cells). Significant difference; \*\* $p < 0.01$ .

## 1-b TAM の核内 NF-κB 量の変化

次に、TAM への NF-κB decoy 送達による、TAM の核内 NF-κB 量の変化について評価した。その結果、Bare-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用により NF-κB decoy を送達した TAM において、核内 p50 および p65 量の有意な減少が認められた。また、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した場合に、最も高い TAM の核内 p50 量の減少効果が認められた (Fig. 28)。



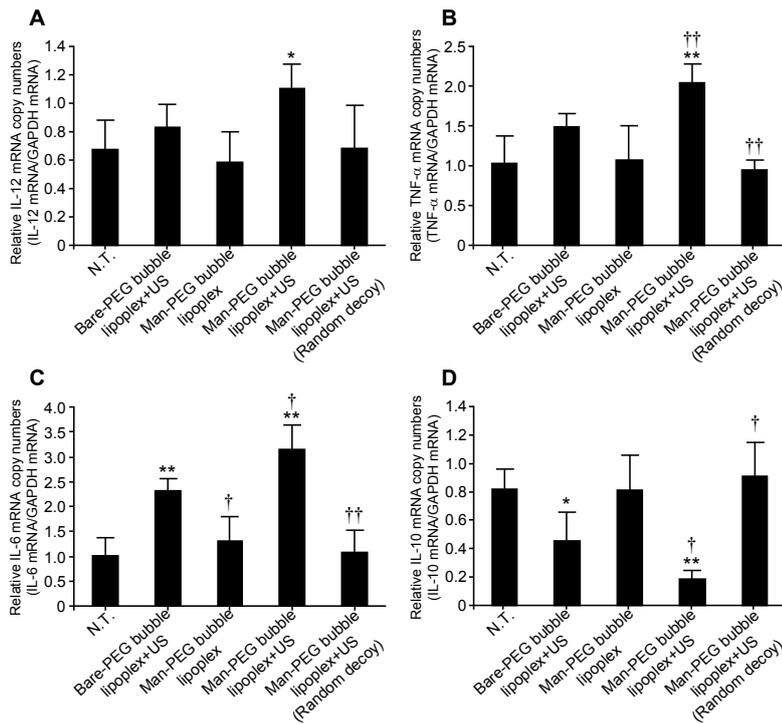
**Figure 28.** Amounts of TAM nucleic p50 (A) and p65 (B) following *in vivo* NF- $\kappa$ B decoy transfection with Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplexes, with or without US exposure 12 h post-transfection. Data are represented as mean values + SD ( $n = 3$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with N.T. (5% glucose). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US. N.T., no treatment.

## 第 2 節 TAM の表現型転換およびがん性腹膜炎治療

前節の検討により、Man-PEG bubble lipoplex の腹腔内投与と超音波照射を併用することにより、がん性腹水中の TAM に対して効率的に NF- $\kappa$ B decoy を導入できることが確認された。そこで本節では、本手法を用いてマウスがん性腹水中の TAM に対して NF- $\kappa$ B decoy を導入した際の TAM の表現型転換について、サイトカイン mRNA 発現量を指標として評価を行った。さらに、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入によるがん性腹膜炎に対する治療効果についても検討を行った。

### 2-a TAM のサイトカイン遺伝子発現パターンの変化

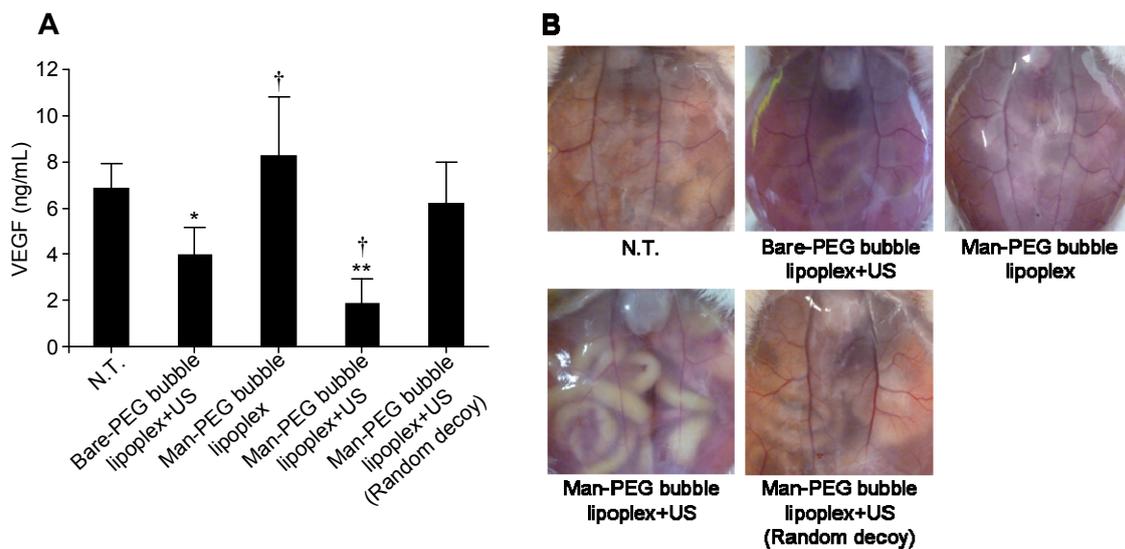
まず、NF- $\kappa$ B decoy 導入によるがん性腹水中の TAM の表現型転換を検証するため、NF- $\kappa$ B decoy 導入後の TAM 内サイトカイン mRNA 発現量の変化について評価した。その結果、IL-12、TNF- $\alpha$  および IL-6 の mRNA 発現量が、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用した NF- $\kappa$ B decoy 導入によりいずれも有意に増大することが確認された (Fig. 29A-C)。さらに、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用して NF- $\kappa$ B decoy を導入した TAM において、IL-10 mRNA の発現が最も抑制されていることも併せて確認された (Fig. 29D)。これらの結果は、第二章の colon-26 固形がんモデルマウスにおけるサイトカイン分泌量に関する検討結果 (Fig. 23)と同様であり、NF- $\kappa$ B decoy の導入によりがん性腹水中の TAM の表現型が M1 型へ転換したことを示唆するものであった。



**Figure 29. Effect of NF-κB decoy/Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplex transfection on cytokine mRNA expression in TAM in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice.** mRNA levels of IL-12 (A), TNF-α (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) in TAM collected at 24 h post-transfection. Data are represented as mean values + SD ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with N.T. (5% glucose). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US. N.T., no treatment.

## 2-b 増殖因子の発現および血管新生の抑制効果

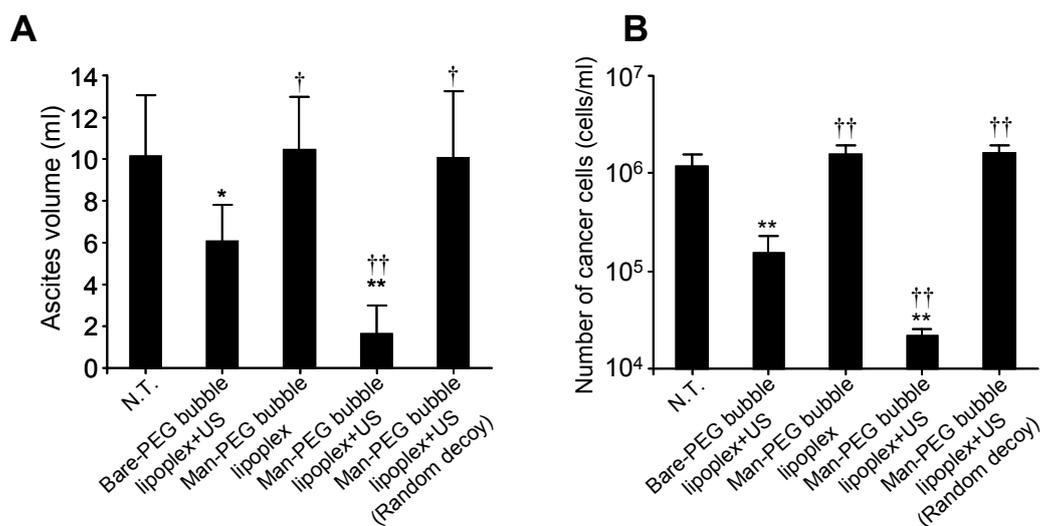
TAM は血管新生を促進することが知られており、腹膜中の血管新生はがん性腹膜炎の進行に深く関与している<sup>115)</sup>。そこで、TAM への NF-κB decoy 導入に伴うがん性腹水中 VEGF 濃度、ならびに腹膜中の血管分布の変化について評価を行った。その結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用して TAM に NF-κB decoy を導入したマウスにおいて、がん性腹水中 VEGF 濃度が最も低く (Fig. 30A)、また腹膜中血管新生も抑制されていることが明らかとなった (Fig. 30B)。



**Figure 30. Effect of NF-κB decoy/Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplex transfection on tumor angiogenesis in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice.** (A) VEGF concentration in ascites collected at 10 days after Ehrlich cells inoculation into mice. Data are represented as mean values + SD ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with N.T. (5% glucose). † $p < 0.05$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US. N.T., no treatment. (B) Peritoneal angiogenesis at 10 days after Ehrlich cells inoculation into mice. The peritoneum was cut open and the inner lining of the peritoneal cavity was photographed.

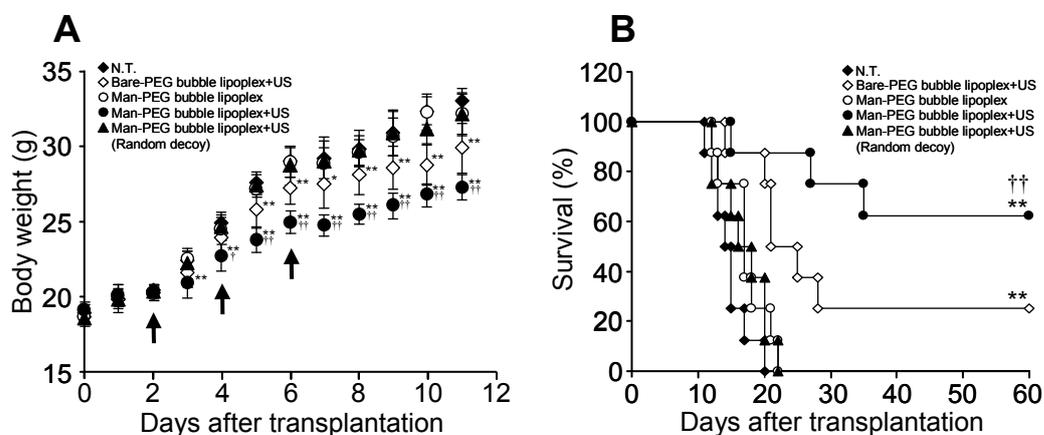
## 2-c がん性腹膜炎治療効果

最後に、がん性腹水中の TAM に対する NF- $\kappa$ B decoy 導入によるがん性腹膜炎治療効果について検討を行った。ホタルルシフェラーゼを安定発現する Ehrlich 細胞(Ehrlich/Luc 細胞)を移植することにより作製した腹水がんモデルマウスを用いて、NF- $\kappa$ B decoy の導入による腹水量、ならびに腹水中がん細胞数の変化を評価した結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した NF- $\kappa$ B decoy 導入により、腹水の貯留が有意に抑制され (Fig. 31A)、さらに、単位腹水量当たりのがん細胞数も顕著に減少することが示された (Fig. 31B)。



**Figure 31. Effect of NF- $\kappa$ B decoy/Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplex transfection on cancer cells proliferation and ascites volume in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice.** The volume of ascites (A) and the number of Ehrlich cells in ascites (B) at 10 days after Ehrlich cells inoculation into mice. Data are represented as mean values  $\pm$  SD ( $n = 5-6$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared with N.T. (5% glucose). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US. N.T., no treatment.

また、マウスの腹水貯留に伴う体重増加、および生存日数についてもそれぞれモニターした結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用して NF- $\kappa$ B decoy を導入したマウスにおいて、最も高い体重増加抑制効果 (Fig. 32A)、ならびに延命効果が認められた (Fig. 32B)。



**Figure 32. Effect of NF- $\kappa$ B decoy/Bare-PEG or Man-PEG bubble lipoplex transfection on body weight and survival in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice.** The body weight (A) and survival (B) of Ehrlich cells-inoculated mice post-transfection. Data are represented as mean values  $\pm$  SD ( $n = 5-6$ ). \*\* $p < 0.01$ , compared with N.T. (5% glucose). † $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$ , compared with Bare-PEG bubble lipoplex+US. N.T., no treatment.

### 第3節 考察

がん性腹膜炎の治療は非常に困難であり、抗がん剤を腹腔内投与した場合でも十分な治療効果が得られる患者は全体の50%以下である。また、抗がん剤を使用したとしても全てのがん細胞を完全に除去することは不可能であるため、再発のリスクを免れることができない。そのため、末期がん患者ががん性腹膜炎を発症した場合には、がん性腹膜炎に対する根治療法よりもむしろ、QOLの向上を目的として、がん性腹膜炎に付随する腹水貯留に対する対症療法が主として施されているのが現状である。しかしながら、現在行われている腹水貯留に対する治療も多くの問題点を抱えている。がん性腹水の治療は利尿薬を第一選択として用い、症状や全身状態によって腹腔穿刺術が施されるが、これらの治療は腹水の一時的な排出に過ぎず、腹水が貯留する度に施術が必要となるため、患者への負担が非常に大きい。さらに、利尿薬による腹水排出効果はがん性腹膜炎患者の約40%のみにしか認められず、臨床的にもその有効性は十分に実証されていない。このように、がん性腹膜炎に対する有効な治療法は現段階では存在せず、がん性腹水の治療でさえ標準的治療プロトコルが確立されていない。そのため、がん性腹膜炎に対する効果的な新規治療法を開発することは、がん治療分野における急務の課題である。

TAMは固形腫瘍のみならず、がん性腹水中にもその存在が確認されており、がん性腹膜炎の進行に深く関与していることが報告されている<sup>108,109</sup>。そのため、がん性腹水中のTAMの機能を制御することにより、がん性腹膜炎の進行を抑制できると考えられる。実際に近年の研究において、マウスがん性腹水中のTAMからの抗炎症性物質の産生を抑制することにより、腹水貯留やがん細胞の増殖を顕著に抑制できることが示されている<sup>109,116</sup>。これらの知見より、NF- $\kappa$ B decoyの導入により、がん性腹水中のTAMの表現型をM2型からM1型へ転換する手法により、がん性腹膜炎に対する治療効果が得られることが期待できる。そこで本章では、Man-PEG bubble lipoplexと超音波照射を利用したがん性腹水中のTAMに対するNF- $\kappa$ B decoy導入を行い、本手法のがん性腹膜炎治療への応用を試みた。

まず、Ehrlich腹水がんモデルマウスにおける、Man-PEG bubble lipoplexと超音波照射の併用によるTAMへのNF- $\kappa$ B decoy導入効率を評価した。その結果、Man-PEG bubble lipoplexの腹腔内投与と超音波照射を併用することにより効率的にNF- $\kappa$ B decoyをTAMに送達でき、それによりTAMの核内p50量が顕著に減少することが明らかとなった(Figs. 27, 28)。本結果は、第2章第2節2-bの固形がんモデルマウスにおける検討結果(Fig. 20)と一致する。一方で、腹水がんモデルマウスにおいては、Bare-PEG bubble lipoplexと超音波照射の併用によって比較的高いTAMへのNF- $\kappa$ B decoy導入効率を得られた(Figs. 27, 28)。これは、固形腫瘍中とがん性腹水中の環境の違いに起因するものであると推察される。固形腫瘍内は細胞が密に存在しているため、bubble lipoplexが投与部位から腫瘍組織全体へ拡散することは困難であるが、がん性腹水中ではbubble lipoplexは腹水に乗って組織内を比較的自由に移動できると考えられる。そのため、がん性腹水中の方がbubble lipoplexがより多くのTAMの近傍へ移行しやすいと推察される。また、がん性腹水を伴う腹腔内は液体で満たされているため、固形腫瘍と比較して、超音波が組織全体に伝播しやすいと考えられる。これら

の理由により、がん性腹水中においては、Bare-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用によっても TAM に対するある程度の NF- $\kappa$ B decoy 導入が認められたものと推察される。さらに、bubble lipoplex の腹腔内投与により得られた TAM への高い NF- $\kappa$ B decoy 導入効率、bubble lipoplex が約 550 nm の粒子径を有することにも一部起因していると考えられる。抗がん剤や核酸医薬の腹腔内滞留性は、その分子量に依存することが知られており、分子量 50000 以下の医薬品は単独で腹腔内へ投与された場合、速やかに血中に移行するため、腹腔内滞留性が極めて低いことが報告されている<sup>117,118</sup>)。これらの医薬品の腹腔内滞留性を改善するアプローチとしてリポソームの応用が検討されており、これまでに、抗がん剤や核酸医薬をリポソーム製剤化することにより血中への漏出を抑制でき、医薬品を長時間腹腔内に滞留させることができることが報告されている<sup>119,120</sup>)。さらに、その腹腔内滞留性改善効果はリポソームの粒子径に依存し、粒子径 100 nm 程度のリポソームよりも 500 nm 以上のリポソームの方が滞留性に優れることが明らかにされている<sup>121,122</sup>)。本検討に用いた bubble lipoplex は約 550 nm の粒子径を有しているため、腹腔内投与後も血中へはあまり漏出せず、その大部分が超音波照射を施すまでの間、腹腔内に滞留していたと考えられ、これが TAM への高い NF- $\kappa$ B decoy 導入効率に繋がったものと推察される。以上より、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を組み合わせた NF- $\kappa$ B decoy 導入法は、固形腫瘍のみならず、がん性腹水中の TAM に対しても有効であることが示された。

次に、NF- $\kappa$ B decoy の導入によるがん性腹水中の TAM の表現型転換を検証するため、NF- $\kappa$ B decoy 導入後の TAM 内サイトカイン mRNA 発現量の変化を評価した。その結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用により NF- $\kappa$ B decoy を導入した TAM においてのみ、IL-12、TNF- $\alpha$  および IL-6 全ての Th1 型サイトカインの mRNA 発現量の有意な増大が確認された (Fig. 29A-C)。また、Th2 型サイトカインに関しても、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した場合に最も顕著な mRNA の発現抑制が認められた (Fig. 29D)。これらの結果より、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用による TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入により、がん性腹水中に存在する M2 型の TAM の表現型を M1 型へ転換できることが示唆された。

続いて、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入による血管新生抑制効果について評価を行った。血管新生はがん性腹膜炎の増悪に密接に関与しており、腹膜中の血管新生を抑制することにより、がん性腹水の進行を顕著に抑制できることが過去に報告されている<sup>123-126</sup>)。そのため、NF- $\kappa$ B decoy 導入による血管新生抑制効果を明らかにすることは、TAM の表現型が M1 型へ転換したことを示す 1 つの根拠となるのみでなく、本手法によるがん性腹膜炎治療効果を評価する上でも非常に重要である。TAM は VEGF の産生を通して血管新生を助長することが知られているため<sup>48,49</sup>)、TAM に NF- $\kappa$ B decoy を導入した際のがん性腹水中 VEGF 濃度、ならびに腹膜中血管新生の変化について評価を行った結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用して TAM に NF- $\kappa$ B decoy を導入したマウスにおいて、腹水中 VEGF 濃度の有意な減少、ならびに腹膜中血管新生の抑制が認められた (Fig. 30)。本結果は、腹水中の TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入により、M2 型の TAM の表現型が M1 型へ転換したことを裏付けるものであり、併せて、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入により、がん性腹膜炎に伴うがん性腹水の進行を抑制できる可能性も示している。そこで、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入に

よるがん性腹膜炎治療効果の評価を行った。その結果、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用した TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入により、腹水貯留に加え、腹水中がん細胞数の増加も有意に抑制できることが明らかとなった (Fig. 31)。さらに本手法により、腹水がんモデルマウスの腹水貯留に伴う体重増加を低減できると共に、高い延命効果が得られることも示された (Fig. 32)。これらの結果より、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用した TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入により M2 型の TAM の表現型を M1 型へ転換することで、がん性腹膜炎に対する総合的な治療効果が得られることが示唆された。

以上、本章では、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を併用することにより、がん性腹水中の TAM に対して効率的に NF- $\kappa$ B decoy を導入できることを示した。また、本方法による TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入により、がん性腹水中の M2 型の TAM の表現型を M1 型へ転換できることを確認した。さらに、本手法により腹腔内のがん細胞の増殖、血管新生に加え、腹水貯留まで有意に抑制でき、高い延命効果が得られることを明らかにした。

## 結論

著者は、NF- $\kappa$ B の活性を抑制するオリゴ核酸医薬の導入による TAM の表現型転換に基づくがん治療法を構築することを目的として、*in vitro* におけるマクロファージの表現型転換に関する検討に加え、超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用した固形がんモデルおよび腹水がんモデルにおける TAM 選択的核酸送達に基づく TAM の表現型転換、ならびにがん治療効果に関する検討を行い、以下の結論を得た。

### 第1章 NF- $\kappa$ B の活性を抑制するオリゴ核酸医薬の導入によるマクロファージの表現型転換の検証

オリゴ核酸医薬の導入による NF- $\kappa$ B の活性抑制によりマクロファージの表現型が転換することを *in vitro* において検証した。*in vitro* における TAM 実験モデルとして、マウス腹腔マクロファージをがん細胞培養上清中で培養することにより M2 様マクロファージを誘導し、検討に用いた。M2 様マクロファージに Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 を用いて NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を導入した結果、M2 様マクロファージから産生される Th1 型サイトカイン量が有意に増大すると共に、Th2 型サイトカイン産生量が減少することが示された。また、VEGF、MMP-9 発現量の有意な減少、NO 産生能の亢進、およびマンノース受容体、スカベンジャー受容体発現の抑制も併せて確認された。さらに、NF- $\kappa$ B (p50) siRNA とは異なる作用機序で NF- $\kappa$ B の活性を抑制するオリゴ核酸医薬である NF- $\kappa$ B decoy を用いた検討においても、NF- $\kappa$ B (p50) siRNA を用いた検討と同様の結果が得られた。以上、オリゴ核酸医薬の導入により M2 様マクロファージの NF- $\kappa$ B 活性を抑制することで、その表現型を M1 型へ転換できることを確認した。

### 第2章 超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用した NF- $\kappa$ B decoy の腫瘍関連マクロファージへのターゲティングと固形がん治療効果の評価

colon-26 固形がんモデルマウスにおいて、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用により TAM に NF- $\kappa$ B decoy を導入した際の、TAM の表現型転換および固形がん治療効果について評価を行った。Man-PEG bubble lipoplex の腫瘍組織内投与と超音波照射を組み合わせることにより、*in vivo* において TAM 選択的に NF- $\kappa$ B decoy を導入できることが明らかとなった。本手法による NF- $\kappa$ B decoy 導入により、TAM から産生される Th1 型サイトカイン量が増大し、Th2 型サイトカイン産生量が有意に減少することが示された。併せて、VEGF、MMP-9 発現量の有意な減少、および NO 産生能の亢進も認められた。さらに、本手法により有意に高い腫瘍増殖抑制効果、ならびに延命効果が得られることが明らかとなった。以上より、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を組み合わせた TAM 選択的 NF- $\kappa$ B decoy 導入により、固形腫瘍中の TAM の表現型の存在比を M1 型優位なものへシフトでき、高い固形がん治療効果が得られることが示された。

### 第3章 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/NF- $\kappa$ B decoy 複合体のがん性腹膜炎治療への応用

Ehlich 腹水がんモデルマウスを用いて、TAM への NF- $\kappa$ B decoy 導入に基づくがん性腹膜炎治療効果について評価を行った。Man-PEG bubble lipoplex の腹腔内投与と超音波照射を併用することにより、がん性腹水中の TAM に対して効率的に NF- $\kappa$ B decoy を導入できることが示された。また、本手法により NF- $\kappa$ B decoy を導入した TAM において、Th2 型サイトカイン mRNA 発現量の有意な減少、および Th1 型サイトカイン発現量の増大が認められた。さらに、本手法により腹腔内における血管新生およびがん細胞の増殖に加え、腹水貯留まで顕著に抑制できることが明らかとなり、高い延命効果が得られることも示された。以上より、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射の併用によりがん性腹水中の TAM に対して NF- $\kappa$ B decoy を導入することで、TAM の表現型を M1 型へ転換できることが示され、本手法ががん性腹膜炎治療に有効であることが示唆された。

以上、著者は、in vitro における TAM の実験モデルを構築し、本モデルを用いて、NF- $\kappa$ B の活性を抑制するオリゴ核酸の導入により TAM の表現を M2 型から M1 型へ転換できることを確認した。また、Man-PEG bubble lipoplex と超音波照射を利用した TAM 選択的 NF- $\kappa$ B decoy 導入により、マウス固形腫瘍およびがん性腹水中の TAM の表現型を M1 型へ転換でき、高いがん治療効果が得られることを明らかにした。本研究で得られた知見は、NF- $\kappa$ B を標的とした TAM の表現型制御に基づく新規がん治療法を構築する上で有益な基礎的情報を提供するものとする。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の実施にあたり終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 橋田 充教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、多くの有益なる御助言並びに御指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科 山下 富義准教授、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 川上 茂教授に衷心より感謝致します。

併せて共同研究者として貴重な御助言並びに御指導を賜りました帝京大学薬学部 丸山 一雄教授に心から感謝の意を表します。

さらに、種々の御助言を賜りました京都大学学際融合教育研究推進センター 樋口 ゆり子特定講師、国立医薬品食品衛生研究所 運 敬太博士、並びに京都大学大学院薬学研究科 薬品動態制御学分野教室員一同に深謝致します。

最後に、研究に専心できる環境を与えて下さった父 慎一、母 恵美子に深く感謝致します。

## 実験の部

### 第1章第1節 実験の部

#### 【1】 試薬および実験動物

試薬は市販の特級品を用いた。実験動物には4週齢のICR系雌性マウスを用いた。

#### 【2】 siRNA

siRNAはsigma社より購入し、以下の配列を有するものを用いた。NF- $\kappa$ B (p50) siRNA (sequence 1): 5'-CAC AUC UGA UGA UAU ACU ATT-3'(センス鎖), 5'-UAG UAU AUC AUC AGA UGU GTT-3'(アンチセンス鎖); NF- $\kappa$ B (p50) siRNA (sequence 2): 5'-GCA AAC UCA GCU UUA CAG ATT-3'(センス鎖), 5'-UCU GUA AAG CUG AGU UUG CTT-3'(アンチセンス鎖); NF- $\kappa$ B (p50) siRNA (sequence 3): 5'-GUA UAA GGA UGU CAA CAU UTT-3'(センス鎖), 5'-AAU GUU GAC AUC CUU AUA CTT-3'(アンチセンス鎖); scrambled siRNA: 5'-AAG UAA ACG CAC GUU UAC CTT-3'(センス鎖), 5'-GGU AAA CGU GCG UUU ACU UTT-3'(アンチセンス鎖)。

#### 【3】 マウス腹腔内マクロファージの単離および培養<sup>127)</sup>

ICR系雌性マウス(4週齢)に2.9%チオグリコレート培地(日水製薬株式会社)を1 mL腹腔内投与し、4日後にPRMI-1640培地(日水製薬株式会社)を用いてマウス腹腔より回収した。回収したマクロファージは、10%牛血清胎児血清(FBS)、100 U/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycin、2 mM L-glutamine添加PRMI-1640培地に $1.0 \times 10^6$ 個/mLで懸濁後、24穴マイクロプレートに500  $\mu$ Lずつ播種した。播種2時間後に培地交換をすることで非接着細胞を除去して実験に用いた。

#### 【4】 M2様マクロファージの誘導

がん細胞培養上清は、colon-26マウス結腸がん細胞、B16BL6マウスメラノーマ細胞、あるいはPAN-02マウス膵臓がん細胞を10 cmディッシュに $5 \times 10^5$ 個播き、80%コンフルエントに到達した時点で培養上清を回収し、0.45  $\mu$ mの孔径を有するメンブランフィルター(日本ミリポア社)を通すことで得た。M2様マクロファージは、siRNA導入24時間前に、第1章第1節実験の部【3】に準じて回収したマウス腹腔内マクロファージをがん細胞培養上清中で培養することで誘導した。

#### 【5】 M2様マクロファージに対するin vitro siRNA-導入

M2様マクロファージの培地をOpti-MEM<sup>®</sup> I(Gibco社)に交換し、siRNA/Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen社)複合体を添加した。複合体調製は、Lipofectamine<sup>®</sup> 2000の添付プロトコルに従い、最終siRNA濃度が0.1  $\mu$ Mとなるように調製した。siRNA添加6時間後、培地をがん細胞培養上清に交換し、さらに18時間培養した。

#### 【6】 サイトカイン分泌量評価

第1章第1節実験の部【4】に準じてM2様マクロファージを誘導した後、培地中にリポポリサッカライド(LPS) (Sigma社)を100 ng/mLで添加し、一定時間後に培養上清を回収した。また、M2様マクロファージに第1章第1節実験の部【5】に準じてsiRNAを導入した後、培地中にLPSを100 ng/mLで添加し、24時間培養後、上清を回収した。上清中のIL-10、IL-12p70、TNF- $\alpha$ およびIL-6量はmouse ELISA Kit(Bay bioscience社)を用いて定量した。また、上清中のVEGF量はMurine VEGF ELISA Kit(PeproTech社)を用いて定量した。

#### 【7】 遺伝子発現量評価

第1章第1節実験の部【5】に準じてM2様マクロファージにsiRNAを導入した後、GenElute<sup>®</sup> Mammalian Total RNA Miniprep Kit(Sigma社)を用いて、マクロファージ中の全RNAを抽出し、PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit(タカラバイオ社)により逆転写反応を行った。各mRNA量はSYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq(タカラバイオ社)を利用し、Lightcycler<sup>®</sup> 2.0(Roche diagnostics社)による定量的PCRにより測定した。尚、定量的PCRにおける各プライマーは次の配列を用いた。p50 cDNAに対するプライマー: 5'-CCT GGA TGA CTC TTG GGA AA-3' (forward), 5'-TCA GCC AGC TGT TTC ATG TC-3' (reverse); p65に対するプライマー: 5'-TAG CAC CTG ATG GCT GAC TG-3' (forward), 5'-CGT TCC ACC ACA TCT GTG TC-3' (reverse); MMP-9に対するプライマー: 5'-GAA GGC AAA CCC TGT GTG TT-3' (forward), 5'-AGA GTA CTG CTT GCC CAG GA-3' (reverse); arginaseに対するプライマー: 5'-GTG AAG AAC CCA CGG TCT GT-3' (forward), 5'-CTG GTT GTC AGG GGA GTG TT-3' (reverse); GAPDHに対するプライマー: 5'-TCT CCT GCG ACT TCA ACA-3' (forward), 5'-GCT GTA GCC GTA TTC ATT GT-3' (reverse) (Invitrogen社)。

#### 【8】 ウェスタンブロッティング

第1章第1節実験の部【5】に準じてM2様マクロファージにsiRNAを導入した後、マクロファージを回収し、Nuclear Extract Kit(Active Motif社)を用いて核タンパク質を抽出した。タンパク質量は、タンパク質量定量キット(Dojindo Molecular Technologies社)により測定した。最終濃度が50  $\mu$ g/10  $\mu$ Lになるように核タンパク質と2 $\times$ sample buffer(0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 12% 2-mercaptoethanol, 20% Glycerol, 0.04% Bromophenol blue)を3:1の割合で混合し、90 $^{\circ}$ Cで10分間加熱処理した後、10%ポリアクリルアミドゲル(SuperSep<sup>®</sup> Ace; Wako Pure Chemical Industries社)を用いたSDS-PAGEにより100Vで2時間電気泳動を行った。その後ゲルを回収し、Transblot SD (Bio-Rad社)を用いたセミドライブロッティングにより、PVDF膜(Hybond<sup>®</sup>-P, GE Healthcare社)に泳動タンパクを転写した。得られたPVDF膜は3% BSA含有TBS(250 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 M NaCl, 0.1% Tween-20)で1時間、室温で処理した後、1次抗体としてウサギ抗マウス p105/p50抗体(Abcam社)、ウサギ抗マウス p65抗体(Abcam社)、ウサギ抗マウス  $\beta$ -actin抗体(Santa Cruz Biotechnology社)を、それぞれ1% BSA含有TBSの1/400、1/400および1/2000(v/v)量加え60分間処理した。洗浄後、二次抗体として Peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG抗体(Santa Cruz Biotechnology社)を1% BSA含有TBSの1/2000(v/v)量加え60分間処理した。洗浄後、Luminata 検出試薬(Millipore社)で処理し、LAS-4000 imaging system(FUJIFILM社)により検出した。

### 【9】一酸化窒素産生量評価

第1章第1節実験の部【5】に準じてM2様マクロファージにsiRNAを導入した後、培地中にLPSを100 ng/mLで添加し、24時間培養後、上清を回収した。上清中の一酸化窒素量を Griess Reagent System(Promega 社)を用いてグリース法により定量した。

### 【10】マクロファージ表面の受容体発現量評価

第1章第1節実験の部【5】に準じてM2様マクロファージにsiRNAを導入した後、マクロファージを冷 Phosphate Buffered Saline (PBS)で2回洗浄し、5% FBS 含有 PBS 中に懸濁した。その後 FITC 標識ラット抗マウス CD206(マンノース受容体)抗体(Serotec 社)あるいは FITC 標識ラット抗マウス CD204(スカベンジャー受容体)抗体(AbD Serotec 社)を最終濃度が 10 µg/mL となるように添加し、氷上で30分間静置した。マクロファージ表面に結合した抗体量は、FACSCanto™ II(日本 BD 社)により測定した。

### 【11】統計学的解析

有意差検定では、二群間の比較にはスチューデント *t* 検定を用いた。また多群間比較においては、Analysis of variance (ANOVA)を行い、Dunnett's 法又は Tukey-Kramer 法により検定した。全 *p* 値は両側であり、*p* < 0.05 を統計学的に有意であるとした。

## 第1章第2節 実験の部

### 【1】試薬および実験動物

試薬は市販の特級品を用いた。実験動物には4週齢のICR系雌性マウスを用いた。

### 【2】NF-κB decoy

NF-κB decoy は AnGes MG 社より頂いた、以下の配列を有するものを用いた。NF-κB decoy: 5'-GGA GGG AAA TCC CTT CAA GG-3' (センス鎖), 5'-CCT TGA AGG GAT TTC CCT CC-3' (アンチセンス鎖); random decoy: 5'-TTG CCG TAC CTG ACT TAG CC-3' (センス鎖), 5'-GGC TAA GTC AGG TAC GGC AA-3' (アンチセンス鎖)。

### 【3】M2様マクロファージの誘導

M2様マクロファージは、第1章第1節実験の部【4】に準じて誘導した。

### 【4】M2様マクロファージに対する in vitro NF-κB decoy 導入

M2様マクロファージの培地を Opti-MEM® I に交換し、NF-κB decoy /Lipofectamine® 2000 複合体を添加した。複合体調製は、Lipofectamine® 2000 の添付プロトコルに従い、最終 siRNA 濃度が 0.2 µM となるように調製した。NF-κB decoy 添加6時間後、培地をがん細胞培養上清に交換し、さらに18時間培養

した。

#### 【5】 サイトカイン分泌量評価

サイトカイン分泌量は、第1章第1節実験の部【6】に準じて測定した。

#### 【6】 ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、第1章第1節実験の部【8】に準じて行った。

#### 【7】 遺伝子発現量評価

遺伝子発現評価は、第1章第1節実験の部【7】に準じて行った。尚、定量的PCRにおける各プライマーは次の配列を用いた。VEGF-A cDNA に対するプライマー: 5'- AGC ACA GCA GAT GTG AAT GC-3' (forward), 5'- AAT GCT TTC TCC GCT CTG AA-3' (reverse) (Invitrogen 社)。

#### 【8】 統計学的解析

統計学的解析は、第1章第1節実験の部【11】と同様の方法で行った。

### 第1章第3節 実験の部

#### 【1】 試薬および実験動物

試薬は市販の特級品を用いた。実験動物には4週齢のICR系雌性マウスを用いた。

#### 【2】 マウス腹腔内マクロファージと colon-26 細胞の共培養

$2.0 \times 10^4$  個の colon-26 細胞を transwell insert (直径 6.5 mm) (Corning 社) に播種した。24 時間後、第1章第1節実験の部【3】に準じて回収したマウス腹腔内マクロファージを 24 穴マイクロプレートに  $5.0 \times 10^6$  個/well で播種し、各ウェルに transwell insert を挿入した。

#### 【3】 サイトカイン分泌量評価

第1章第3節実験の部【2】に準じてマウス腹腔マクロファージと colon-26 細胞を共培養した 48 時間後に培地中に LPS を 100 ng/mL で添加した。24 時間培養後、上清を回収し、第1章第1節実験の部【6】に準じてサイトカイン分泌量を測定した。

## 第 2 章第 1 節 実験の部

### 【1】 試薬および実験動物

1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-dimethylammoniumpropane(DSDAP),1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC)は Avanti Polar Lipids 社より、1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine -N-[amino(polyethylene glycol) -2000](NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE) は、日本油脂株式会社よりそれぞれ購入した。N-(fluorescein-5-thiocarbonyl)- 1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (fluorescein-DHPE)は、Molecular Probes 社より購入した。他の試薬は市販の特級品を用いた。実験動物には 6 週齢の BALB/c 系雌性マウスを用いた。

### 【2】 NF-κB decoy

NF-κB decoy は第 1 章第 2 節実験の部【2】と同じものを用いた。FAM 標識 NF-κB decoy は AnGes MG 社に合成して頂いたものを用いた。

### 【3】 マンノース修飾 PEG 脂質誘導体(Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE)の合成<sup>23)</sup>

#### (1)2-Imino-2-methoxyethyl-1-thiomannoside(IME-thiomannoside)の合成

Cyanomethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thiomannoside(CME-thiomannoside)は Lee らの方法に従い合成した<sup>128)</sup>。Mannose 7.5 g を acetic anhydride 10 mL 中室温で 3 時間攪拌後、30% HBr/AcOH 20 mL 中冷所で一晩反応させ、アセトハロ糖を調製した。次に、これを thiourea と 1:1 のモル比で acetone に溶解後 15 分間灌流し、反応生成物 4.5 g と ClCH<sub>2</sub>CN 3.33 g、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.49 g、NaHSO<sub>3</sub> 1.95 g を水/acetone(1:1) 20 mL 中で 2 時間氷冷下において反応させ、CME-thiomannoside を合成した。得られた CME-thiomannoside を MeOH 中で 0.01 M CH<sub>3</sub>ONa と室温で一晩反応させ、IME-thiomannoside を合成した。

#### (2) Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE の合成

IME-thiomannoside と NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE を 1:10 のモル比で triethylamine を含有する pyridine 液中、室温で 24 時間反応させた。Pyridine を減圧留去後、精製水を加えて生成物を分散させ、透析膜(12 kDa cut-off)を用いて透析を行った。得られた分散液を凍結乾燥後、結晶を diethyl ether に 3 回分散させ、Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE を合成した。

### 【4】 超音波応答性リポプレックスの調製

DSDAP、DSPC および NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE 又は Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE をモル比で 7:2:1 の比率でクロロホルム中に溶解し、ナス型フラスコに分取した。その後ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を減圧留去して脂質薄膜とし、減圧下で 3 時間以上乾燥した。これに 5%グルコース水溶液を加え、振盪機を用いた攪拌後、バス型ソニケーターにより 10 分間超音波処理した。さらに窒素置換下チップ型ソニケーターを用いた 3 分間の超音波処理後、0.45 μm の孔径を有するポリカーボネート膜を用いて滅菌濾過を行った。脂質濃度は、モリブデン酸アンモニウムおよびアミノナフトールスルホン酸を用いたモリブデ

ン酸法により測定した。リポプレックスは、NF- $\kappa$ B decoy と作製したカチオン性 PEG 修飾リポソーム (DSDAP/DSPC/Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE 又は DSDAP/DSPC/NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE)を混合比 1.0:2.3(-:+)として 5% グルコース水溶液中で混合し作製した。また、リポソーム内への超音波造影ガスの充填は、5 mL 滅菌バイアルに 2 mL リポプレックスを添加し、パーフルオロプロパン加圧下でバス型ソニケーターにより 5 分間超音波処理することにより行った。調製したリポソームおよびリポプレックスの粒子径、ならびにゼータ電位は Zetasizer Nano ZS(Malvern 社)を用いて測定した。

#### 【5】ゲル電気泳動

電気泳動は、NF- $\kappa$ B decoy、および第 2 章第 1 節実験の部【4】に準じて作製したリポプレックスおよび超音波応答性リポプレックス(1.5  $\mu$ g/10  $\mu$ L)を 1  $\times$  TAE buffer で調製した 1%アガロースゲルに添加し、100 V で 30 分間通電させることにより行った。NF- $\kappa$ B decoy のバンドはエチジウムブロマイドで検出し、LAS-4000 imaging system により可視化した。

#### 【6】固形がんモデルマウスの作製

Colon-26 細胞を BALB/c 系雌性マウス背部皮下に  $1.0 \times 10^6$  個/100  $\mu$ L 注入することで作製した。

#### 【7】腫瘍組織からの TAM の単離および培養

第 2 章第 1 節実験の部【6】に準じて作製した固形がんモデルマウスから固形腫瘍を摘出し、生理食塩水により洗浄した。摘出した腫瘍を 2 mm 四方に分割した後、コラゲナーゼ含有培地(0.05% (w/v) collagenase type I(Sigma 社)添加 PRMI-1640 培地)中で 30 分間培養した。その後、PE 標識抗マウス F4/80 抗体(Bay bioscience 社)および PE-positive selection kit(VERITAS 社)を用い、RoboSep(VERITAS 社)の推奨プロトコルに準じた磁気細胞分離法により F4/80 陽性細胞を TAM として単離した。単離した TAM は、FBS、100 U/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycin、2 mM L-glutamine 添加 PRMI-1640 培地に  $1.0 \times 10^6$  個/mL で懸濁後、24 穴マイクロプレートに 500  $\mu$ L ずつ播種した。播種 2 時間後に培地交換して実験に用いた。

#### 【8】TAM を用いた in vitro 取り込み実験

蛍光標識超音波応答性リポソームは、DSTAP、DSPC、fluorescein-DHPE、NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE 又は Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE をモル比で 7:1.5:0.5:1 の比率でクロロホルム中に溶解し、第 2 章第 1 節実験の部【4】に準じて調製した。第 2 章第 1 節実験の部【7】に準じて単離・培養した TAM の培地を超音波応答性リポプレックス含有 Opti-MEM<sup>®</sup> I(Gibco 社) (10  $\mu$ g lipid/well)に交換し、一定時間後に TAM を冷 Hanks' balanced salt solutions(HBSS)で 5 回洗浄を行い、冷 PBS 中に再懸濁させた。リポソーム取り込み量は、FACSCanto<sup>™</sup> II(日本 BD 社)を用いて測定した。

#### 【9】TAM を用いた in vitro NF- $\kappa$ B decoy 送達効率評価

FAM 標識 NF- $\kappa$ B decoy を用いて、第 3 章第 1 節実験の部【4】に準じて超音波応答性リポプレックス

を調製した後、第2章第1節実験の部【7】に準じて単離・培養した TAM の培地を超音波応答性リポプレックス(FAM 標識 NF-κB decoy)含有 Opti-MEM<sup>®</sup> I(Gibco 社) (2 μg NF-κB decoy/well)に交換した。培地交換 5 分後に各ウェルに対して 20 秒間超音波照射を施した。超音波強度は(frequency, 2.062 MHz; duty, 50%; burst rate, 10 Hz; intensity 4.0 W/cm<sup>2</sup>)で、Sonopore-4000 sonicator および 6 mm プローブを用いて照射した。培地交換 1 時間後に TAM を冷 HBSS で 5 回洗浄し、冷 PBS 中に再懸濁させた。FAM 標識 NF-κB decoy 導入量は、FACSCanto<sup>™</sup> II(日本 BD 社)により測定した。

#### 【10】統計学的解析

統計学的解析は第1章第1節実験の部【11】と同様の方法で行った。

## 第2章第2節 実験の部

#### 【1】試薬および実験動物

各種脂質は第2章第1節と同じものを用い、他の試薬は市販の特級品を用いた。実験動物には6週齢の BALB/c 系雌性マウスを用いた。

#### 【2】NF-κB decoy

NF-κB decoy および FAM 標識 NF-κB decoy は、第2章第1節と同じものを用いた。また、<sup>32</sup>P 標識 NF-κB decoy は、NF-κB decoy、Adenosine 5'-triphosphate, tetra (triethyl ammonium) salt, [alpha-<sup>32</sup>P]-(パーキンエルマー社)、MEGALABEL DNA5'末端標識キット(タカラバイオ社)を用いて作製した。

#### 【3】NF-κB decoy の体内分布特性評価

第2章第1節実験の部【6】に準じて作製した固形がんモデルマウスの腫瘍組織が 300 mm<sup>3</sup> に到達した時点で、第2章第1節実験の部【2】に従い作製した <sup>32</sup>P 標識 NF-κB decoy を用いて調製した超音波応答性リポプレックス(10 μg NF-κB decoy/200 μL)を静脈内投与した。リポプレックス投与 5 分後に Sonopore-4000 sonicator および 6 mm プローブを用いて腫瘍組織に対して超音波(frequency, 2.062 MHz; duty, 50%; burst rate, 10 Hz; intensity 4.0 W/cm<sup>2</sup>)を 2 分間照射した。リポプレックス投与 30 分後にペントバルビタール麻酔下でマウス下大静脈より採血し、また各臓器を摘出して生理食塩水による洗浄後に秤量した。各臓器(20~30 mg)に可溶化剤 Solvable<sup>®</sup> を 800 μL 添加して組織を完全に溶解した後、isopropanol 200 μL と 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μL を加え脱色した。さらに 5 N HCl 100 μL を加えて中和し、Clear-sol<sup>®</sup> I 5 mL を添加して液体シンチレーションカウンターで <sup>32</sup>P の放射活性を測定した。得られた放射活性(dpm)は臓器重量(g)で標準化して評価した。

#### 【4】固形がんモデルマウスへの in vivo NF-κB decoy 送達効率評価

固形がんモデルマウスの腫瘍組織が 300 mm<sup>3</sup> に到達した時点で、第2章第1節実験の部【8】に準じ

て調製した蛍光標識超音波応答性リポプレックス(5 µg NF-κB decoy/100 µL)を固形がんモデルマウスの腫瘍組織に直接投与した。リポプレックス投与 5 分後に Sonopore-4000 sonicator および 6 mm プローブを用いて腫瘍組織に対して超音波(frequency, 2.062 MHz; duty, 50%; burst rate, 10 Hz; intensity 4.0 W/cm<sup>2</sup>)を 2 分間照射した。リポプレックス投与 1 時間後、第 2 章第 1 節実験の部【7】に準じて腫瘍組織から TAM を単離し、TAM 内の NF-κB decoy 量を第 2 章第 1 節実験の部【9】に準じて測定した。

#### 【5】核内 NF-κB 量評価

腫瘍組織が 300 mm<sup>3</sup>に到達した時点で、第 2 章第 2 節実験の部【4】に準じて固形がんモデルマウスに対して in vivo NF-κB decoy 送達を行った後、12 時間後に第 2 章第 1 節実験の部【7】に準じて腫瘍組織から TAM を単離した。その後、第 1 章第 1 節実験の部【8】に準じて核タンパク質を抽出し、タンパク質量測定を行った。NF-κB の構成因子である p50 および p65 の核抽出物中含量は、TransAM<sup>®</sup> NFκB Family Kit(Active Motif 社)を用いて測定した。

#### 【6】統計学的解析

統計学的解析は第 1 章第 1 節実験の部【11】と同様の方法で行った。

## 第 2 章第 3 節 実験の部

#### 【1】試薬および実験動物

各種脂質は第 2 章第 1 節と同じものを用い、他の試薬は市販の特級品を用いた。実験動物には 6 週齢の BALB/c 系雌性マウスを用いた。

#### 【2】NF-κB decoy

NF-κB decoy および FAM 標識 NF-κB decoy は、第 2 章第 1 節と同じものを用いた。

#### 【3】固形がんモデルマウスへの in vivo NF-κB decoy 導入

第 2 章第 1 節実験の部【4】に準じて FAM 標識 NF-κB decoy を用いて調製した超音波応答性リポプレックス(5 µg FAM 標識 NF-κB decoy/100 µL)を固形がんモデルマウスの腫瘍組織に直接注入した。リポプレックス注入 5 分後に Sonopore-4000 sonicator および 6 mm プローブを用いて腫瘍組織に対して超音波(frequency, 2.062 MHz; duty, 50%; burst rate, 10 Hz; intensity 4.0 W/cm<sup>2</sup>)を 2 分間照射した。

#### 【4】固形がんモデルマウスの腫瘍組織中サイトカイン濃度評価

固形がんモデルマウスの腫瘍組織が 300 mm<sup>3</sup>に到達した時点で、第 2 章第 3 節実験の部【3】に準じて固形がんモデルマウスに対して in vivo NF-κB decoy 導入を行った。NF-κB decoy 導入 24 時間後に腫瘍組織を摘出し、生理食塩水で 2 回洗浄した後、冷 PBS を 200 µL 添加し、ホモジナイザーで破碎した。

作製した組織破砕液を遠心分離(10,000×g, 4°C, 10 min)し、得られた上清中の IL-10、IL-12p70、TNF- $\alpha$  および IL-6 濃度を Mouse Quantikine ELISA Kit(R&D Systems 社)を用いて定量した。タンパク質量は、タンパク質定量キット(Dojindo Molecular Technologies 社)により測定した。

#### 【5】 固形がんモデルマウスより単離した TAM のサイトカイン分泌量評価

固形がんモデルマウスの腫瘍組織が 300 mm<sup>3</sup> に到達した時点で、第 2 章第 3 節実験の部【3】に準じて固形がんモデルマウスに対して in vivo NF- $\kappa$ B decoy 導入を行い、24 時間後に腫瘍組織を摘出し、第 2 章第 1 節実験の部【7】に準じて TAM を単離・培養した。培養した TAM に LPS を 100 ng/mL で添加し、6 時間培養後、上清を回収した。上清中の IL-10、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  および IL-6 量は mouse ELISA Kit(Bay bioscience 社)を用いて定量した。

#### 【6】 固形がんモデルマウスより単離した TAM における遺伝子発現量評価

固形がんモデルマウスの腫瘍組織が 300 mm<sup>3</sup> に到達した時点で、第 2 章第 3 節実験の部【3】に準じて固形がんモデルマウスに対して in vivo NF- $\kappa$ B decoy 導入を行い、24 時間後に腫瘍組織を摘出し、第 2 章第 1 節実験の部【7】に準じて TAM を単離した。単離した TAM 内 VEGF、MMP-9、arginase mRNA 発現量を第 1 章第 1 節実験の部【7】に準じた定量的 PCR により測定した。

#### 【7】 固形がんモデルマウスにおける in vivo 抗腫瘍効果の評価

固形がんモデルマウスの腫瘍組織が 100 mm<sup>3</sup> に到達した時点から、固形がんモデルマウスに対して第 2 章第 3 節実験の部【3】に準じて in vivo NF- $\kappa$ B decoy 導入を隔日に 5 回行った。腫瘍体積は 1 回目の NF- $\kappa$ B decoy 導入を行った日から経日的に測定した。また、マウスの生存期間も併せて記録した。腫瘍体積は以下の式に従って算出した。

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = \pi/6 \times \text{longer diameter} \times (\text{shorter diameter})^2$$

#### 【8】 統計学的解析

統計学的解析は第 1 章第 1 節実験の部【11】と同様の方法で行った。

### 第3章第1節 実験の部

#### 【1】 試薬および実験動物

各種脂質は第2章第1節と同じものを用い、他の試薬は市販の特級品を用いた。実験動物には4週齢の ddY 系雌性マウスを用いた。

#### 【2】 NF-κB decoy

NF-κB decoy および FAM 標識 NF-κB decoy は、第2章第1節と同じものを用いた。

#### 【3】 腹水がんモデルマウスの作製

Ehrlich マウス腹水がん細胞を ddY 系雌性マウス腹腔内に  $1.0 \times 10^6$  個/100 μL 注入することで作製した。

#### 【4】 腹水中からの TAM の単離

第3章第1節実験の部【3】に準じて作製した腹水がんモデルマウスから腹水を回収し、PE 標識抗マウス F4/80 抗体(Bay bioscience 社)および PE-positive selection kit(VERITAS 社)を用い、RoboSep(VERITAS 社)の推奨プロトコルに準じた磁気細胞分離法により腹水中から F4/80 陽性細胞を TAM として単離した。

#### 【5】 腹水がんモデルマウスへの in vivo NF-κB decoy 送達効率評価

ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した4日後、第2章第1節実験の部【9】に準じて FAM 標識 NF-κB decoy を用いて調製した標識超音波応答性リポプレックス(10 μg FAM 標識 NF-κB decoy/200 μL)を腹水がんモデルマウスに腹腔内投与した。リポプレックス(FAM 標識 NF-κB decoy)投与 5 分後に Sonopore-4000 sonicator および 20 mm プローブを用いてマウス腹部に対して超音波(frequency, 1.056 MHz; duty, 50%; burst rate, 10 Hz; intensity  $1.0 \text{ W/cm}^2$ )を2分間照射した。リポプレックス投与1時間後、第3章第1節実験の部【4】に準じて腹水中から TAM を単離し、TAM 内の NF-κB decoy 量を第2章第1節実験の部【9】に準じて測定した。

#### 【6】 核内 NF-κB 量評価

ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した4日後、第3章第1節実験の部【5】に準じて in vivo NF-κB decoy 送達を行い、12時間後に第3章第1節実験の部【4】に準じて腹水中から TAM を単離した。その後、第1章第1節実験の部【8】に準じて核タンパク質を抽出、タンパク質量測定を行った。NF-κB の構成因子である p50 および p65 の核抽出物中含量は、TransAM<sup>®</sup> NFκB Family Kit(Active Motif 社)を用いて測定した。

#### 【7】 統計学的解析

統計学的解析は第1章第1節実験の部【11】と同様の方法で行った。

## 第3章第2節 実験の部

### 【1】 試薬および実験動物

各種脂質は第2章第1節と同じものを用い、他の試薬は市販の特級品を用いた。実験動物には4週齢の ddY 系雌性マウスを用いた。

### 【2】 NF-κB decoy

NF-κB decoy および FAM 標識 NF-κB decoy は、第2章第1節と同じものを用いた。

### 【3】 腹水がんモデルマウスへの in vivo NF-κB decoy 導入

第3章第1節実験の部【3】に準じて作製した腹水がんモデルマウスに、第2章第1節実験の部【4】に準じて調製した超音波応答性リポプレックス(10 μg NF-κB decoy/200 μL)を腹腔内投与した。リポプレックス投与5分後に Sonopore-4000 sonicator および 20 mm プローブを用いてマウス腹部に対して超音波 (frequency, 1.056 MHz; duty, 50%; burst rate, 10 Hz; intensity 1.0 W/cm<sup>2</sup>)を2分間照射した。

### 【4】 腹水がんモデルマウスより単離した TAM におけるサイトカイン遺伝子発現量評価

ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した4日後、第3章第2節実験の部【3】に準じて in vivo NF-κB decoy 導入を行い、24時間後に第3章第1節実験の部【4】に準じて腹水中から TAM を単離した。TAM 内 IL-10、IL-12、TNF-α、IL-6 mRNA 発現量は、第1章第1節実験の部【7】に準じた定量的 PCR により測定した。尚、定量的 PCR における各プライマーは次の配列を用いた。IL-10 cDNA に対するプライマー: 5'-GCT CTT ACT GAC TGG CAT GAG-3' (forward), 5'-CGC AGC TCT AGG AGC ATG TG-3' (reverse); IL-12 に対するプライマー: 5'-ACT CTG CGC CAG AAA CCT C-3' (forward), 5'-CAC CCT GTT GAT GGT CAC GAC-3' (reverse); TNF-α に対するプライマー: 5'-CCT CCC TCT CAT CAG TTC TA-3' (forward), 5'-ACT TGG TGG TTT GCT ACG AC-3' (reverse); IL-6 に対するプライマー: 5'-TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC-3' (forward), 5'-TTG GTC CTT AGC CAC TCC TTC-3' (reverse) (Invitrogen 社)。

### 【5】 腹水中 VEGF 濃度評価

ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した2日後から、第3章第2節実験の部【3】に準じて in vivo NF-κB decoy 導入を隔日に3回行った。ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した10日後に腹水を回収し、遠心分離(10,000×g, 4°C, 10 min)した後、得られた上清中の VEGF 量を Murine VEGF ELISA Kit(PeproTech 社)を用いて測定した。

### 【6】 腹膜血管新生の評価

ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した2日後から、第3章第2節実験の部【3】に準じて in vivo NF-κB decoy 導入を隔日に3回行った。腹膜中の血管の観察は Saraswati らの報告に基づき<sup>126)</sup>、ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した10日後、イソフルラン麻酔下で腹膜を露出させ血管を撮影した。

#### 【7】腹水量の評価

ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した 2 日後から、第 3 章第 2 節実験の部【3】に準じて in vivo NF- $\kappa$ B decoy 導入を隔日に 3 回行った。ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した 10 日後、ブロモフェノールブルー水溶液(1 mg/mL)を 200  $\mu$ L 腹腔内に投与した。腹部をマッサージ後、腹水を回収し、遠心分離(10,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min)を行い、得られた上清の 450 nm の吸光度を測定した。吸光度は検量線により腹水量に変換した。

#### 【8】腹水中がん細胞数の評価

Ehrlich 細胞に対してホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミド DNA(pCMV-Luc)を導入することで Ehrlich/Luc 細胞を作成した<sup>129)</sup>。作成した細胞を用いて第 3 章第 1 節実験の部【3】に準じて腹水がんモデルマウスを作製し、ddY マウスに Ehrlich/Luc 細胞を移植した 2 日後から、第 3 章第 2 節実験の部【3】に準じて in vivo NF- $\kappa$ B decoy 導入を隔日に 3 回行った。ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した 10 日後に腹水を回収し、Lysis buffer (0.05% Triton X-100, 2 mM EDTA, 0.1M Tris-HCl, pH7.8)と混合後、遠心分離(10,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min)し、得られた上清 20  $\mu$ L 中のルシフェラーゼ活性をピッカジーン(東洋インキ社)とルミノメーターLumat LB 9507 (EG&G Berthold 社)を用いて測定した。得られたルシフェラーゼ活性は検量線により細胞数に変換した。

#### 【9】体重変化および生存日数の評価

ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植した 2 日後から、第 3 章第 2 節実験の部【3】に準じて in vivo NF- $\kappa$ B decoy 導入を隔日に 3 回行った。ddY マウスに Ehrlich 細胞を移植後、経日的にマウスの体重を測定し、併せて生存期間も記録した。

#### 【10】統計学的解析

統計学的解析は第 1 章第 1 節実験の部【11】と同様の方法で行った。

## 引用文献

- [1] Fang H, Declerck YA. Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. *Cancer Res*; 73: 7965-77 (2013).
- [2] Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*; 4: 66-83 (2013).
- [3] Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*; 2: 163-75 (2004).
- [4] De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*; 200: 429-47 (2003).
- [5] Vajkoczy P, Menger MD, Vollmar B, Schilling L, Schmiedek P, Hirth KP, Ullrich A, Fong TA. Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia*; 1: 31-41 (1999).
- [6] Chaplin DJ, Hill SA. The development of combretastatin A4 phosphate as a vascular targeting agent. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 54: 1491-6 (2002).
- [7] Lu H, Lin C, Zheng Z, Li S, Guo S, Zhang X, Fu M, Liang X, Wu M. Angiogenesis inhibitor Z24 induces endothelial cell apoptosis and suppresses tumor growth and metastasis. *J Pharmacol Sci*; 97: 433-40 (2005).
- [8] Nakamura T, Ozawa S, Kitagawa S, Ueda M, Kubota T, Kitajima M. Antiangiogenic agent SU6668 suppresses the tumor growth of xenografted A-431 cells. *Oncol Rep*; 15: 79-83 (2006).
- [9] Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*; 3: 391-400 (2004).
- [10] Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*; 5: 835-44 (2006).
- [11] Motzer RJ, Hoosen S, Bello CL, Christensen JG. Sunitinib malate for the treatment of solid tumours: a review of current clinical data. *Expert Opin Investig Drugs*; 15: 553-61 (2006).
- [12] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*; 23: 549-55 (2002).
- [13] Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*; 4: 71-8 (2004).
- [14] Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev*; 25: 315-22 (2006).
- [15] Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol*; 33: 119-26 (2012).
- [16] Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, Charles KA, Kulbe H, Thompson RG, Robinson SC, Balkwill FR. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF- $\kappa$ B. *J Exp Med*; 205: 1261-8 (2008).
- [17] Coscia M, Quaglino E, Iezzi M, Curcio C, Pantaleoni F, Riganti C, Holen I, Mönkkönen H, Boccadoro M, Forni

- G, Musiani P, Bosia A, Cavallo F, Massaia M. Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J Cell Mol Med*; 14: 2803-15 (2010).
- [18] Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, Squadrito ML, Segura I, Li X, Knevels E, Costa S, Vinckier S, Dresselaer T, Åkerud P, De Mol M, Salomäki H, Phillipson M, Wyns S, Larsson E, Buyschaert I, Botling J, Himmelreich U, Van Ginderachter JA, De Palma M, Dewerchin M, Claesson-Welsh L, Carmeliet P. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PIGF. *Cancer Cell*; 19: 31-44 (2011).
- [19] Nakanishi Y, Nakatsuji M, Seno H, Ishizu S, Akitake-Kawano R, Kanda K, Ueo T, Komekado H, Kawada M, Minami M, Chiba T. COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/+ mouse polyps. *Carcinogenesis*; 32: 1333-9 (2011).
- [20] Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, Tahara H, Inoue N, Seya T. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 109: 2066-71 (2012).
- [21] Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A, Sica A. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- $\kappa$ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*; 107: 2112-22 (2005).
- [22] Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, Bottazzi B, Colombo MP, Mantovani A, Sica A. P50 nuclear factor- $\kappa$ B overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res*; 66: 11432-40 (2006).
- [23] Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, Dieli F, Ghisletti S, Natoli G, De Baetselier P, Mantovani A, Sica A. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor  $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106: 14978-83 (2009).
- [24] Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy. *Biomaterials*; 31: 7813-26 (2010).
- [25] Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Suppression of melanoma growth and metastasis by DNA vaccination using an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier. *Mol Pharm*; 8: 543-54 (2011).
- [26] Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. The elucidation of gene transferring mechanism by ultrasound-responsive unmodified and mannose-modified lipoplexes. *Biomaterials*; 32: 4659-69 (2011).
- [27] Un K, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure. *J Control Release*; 156: 355-63 (2011).
- [28] Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Efficient suppression of murine intracellular adhesion molecule-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified

- lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation. *Hepatology*; 56: 259-69 (2012).
- [29] Bronkhorst IH, Ly LV, Jordanova ES, Vrolijk J, Versluis M, Luyten GP, Jager MJ. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 52: 643-50 (2011).
- [30] Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J Clin Pathol*; 65: 159-63 (2012).
- [31] Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW, Wei YQ. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*; 7: e50946 (2012).
- [32] Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AH, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer*; 95: 272-81 (2006).
- [33] Banciu M, Metselaar JM, Schiffelers RM, Storm G. Antitumor activity of liposomal prednisolone phosphate depends on the presence of functional tumor-associated macrophages in tumor tissue. *Neoplasia*; 10: 108-17 (2008).
- [34] Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*; 73: 209-12 (2003).
- [35] Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*; 3: 23-35 (2003).
- [36] Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*; 229: 176-85 (2013).
- [37] Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, van Damme J, Mantovani A. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF- $\kappa$ B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol*; 164: 762-7 (2000).
- [38] De Palma M. Partners in crime: VEGF and IL-4 conscript tumour-promoting macrophages. *J Pathol*; 227: 4-7 (2012).
- [39] Hagemann T, Biswas SK, Lawrence T, Sica A, Lewis CE. Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF- $\kappa$ B. *Blood*; 113: 3139-46 (2009).
- [40] Mancino A, Lawrence T. Nuclear factor- $\kappa$ B and tumor-associated macrophages. *Clin Cancer Res*; 16: 784-9 (2010).
- [41] Biswas SK, Lewis CE. NF- $\kappa$ B as a central regulator of macrophage function in tumors. *J Leukoc Biol*; 88: 877-84 (2010).
- [42] Kusmartsev S, Gabrilovich DI. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol*; 174: 4880-91 (2005).
- [43] Sinha P, Clements VK, Miller S, Ostrand-Rosenberg S. Tumor immunity: a balancing act between T cell activation, macrophage activation and tumor-induced immune suppression. *Cancer Immunol Immunother*; 54: 1137-42 (2005).
- [44] Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Oda Y. Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Pathobiology*; 80: 146-54 (2013).

- [45] Werno C, Menrad H, Weigert A, Dehne N, Goerdts S, Schledzewski K, Kzhyshkowska J, Brüne B. Knockout of HIF-1 $\alpha$  in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-angiogenic responses. *Carcinogenesis*; 31: 1863-71 (2010).
- [46] Roda JM, Wang Y, Sumner LA, Phillips GS, Marsh CB, Eubank TD. Stabilization of HIF-2 $\alpha$  induces sVEGFR-1 production from tumor-associated macrophages and decreases tumor growth in a murine melanoma model. *J Immunol*; 189: 3168-77 (2012).
- [47] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*; 122: 787-95 (2012).
- [48] Gonzalez FJ, Vicioso L, Alvarez M, Sevilla I, Margues E, Gallego E, Alonso L, Matilla A, Alba E. Association between VEGF expression in tumour-associated macrophages and elevated serum VEGF levels in primary colorectal cancer patients. *Cancer Biomark*; 3: 325-33 (2007).
- [49] Wu H, Xu JB, He YL, Peng JJ, Zhang XH, Chen CQ, Li W, Cai SR. Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer. *J Surg Oncol*; 106: 462-8 (2012).
- [50] Kang JC, Chen JS, Lee CH, Chang JJ, Shieh YS. Intratumoral macrophage counts correlate with tumor progression in colorectal cancer. *J Surg Oncol*; 102: 242-8 (2010).
- [51] Pettersen JS, Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Pierson KC, Pitts-Kiefer A, Fan L, Belkin DA, Wang CQ, Bhuvanendran S, Johnson-Huang LM, Bluth MJ, Krueger JG, Lowes MA, Carucci JA. Tumor-associated macrophages in the cutaneous SCC microenvironment are heterogeneously activated. *J Invest Dermatol*; 131: 1322-30 (2011).
- [52] Massi D, Marconi C, Franchi A, Bianchini F, Paglierani M, Ketabchi S, Miracco C, Santucci M, Calorini L. Arginine metabolism in tumor-associated macrophages in cutaneous malignant melanoma: evidence from human and experimental tumors. *Hum Pathol*; 38: 1516-25 (2007).
- [53] Sharda DR, Yu S, Ray M, Squadrito ML, De Palma M, Wynn TA, Morris SM Jr, Hankey PA. Regulation of macrophage arginase expression and tumor growth by the Ron receptor tyrosine kinase. *J Immunol*; 187: 2181-92 (2011).
- [54] Hagemann T, Wilson J, Burke F, Kulbe H, Li NF, Plüddemann A, Charles K, Gordon S, Balkwill FR. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol*; 176: 5023-32 (2006).
- [55] Dangaj D, Abbott KL, Mookerjee A, Zhao A, Kirby PS, Sandaltzopoulos R, Powell DJ Jr, Lamazière A, Siegel DL, Wolf C, Scholler N. Mannose receptor (MR) engagement by mesothelin GPI anchor polarizes tumor-associated macrophages and is blocked by anti-MR human antibody. *PLoS One*; 6: e28386 (2011).
- [56] Shigeoka M, Urakawa N, Nakamura T, Nishio M, Watajima T, Kuroda D, Komori T, Kakeji Y, Semba S, Yokozaki H. Tumor associated macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*; 104: 1112-9 (2013).
- [57] Morishita R, Tomita N, Kaneda Y, Ogihara T. Molecular therapy to inhibit NF $\kappa$ B activation by transcription factor decoy oligonucleotides. *Curr Opin Pharmacol*; 4: 139-46 (2004).
- [58] De Stefano D. Oligonucleotides decoy to NF- $\kappa$ B: becoming a reality? *Discov Med*; 12: 97-105 (2011).
- [59] Shibuya T, Takei Y, Hirose M, Ikejima K, Enomoto N, Maruyama A, Sato N. A double-strand decoy DNA

oligomer for NF- $\kappa$ B inhibits TNF $\alpha$ -induced ICAM-1 expression in sinusoidal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 298: 10-16 (2002).

- [60] De Rosa G, Maiuri MC, Ungaro F, De Stefano D, Quaglia F, La Rotonda MI, Carnuccio R. Enhanced intracellular uptake and inhibition of NF- $\kappa$ B activation by decoy oligonucleotide released from PLGA microspheres. *J Gene Med*; 7: 771-81 (2005).
- [61] Peri G, Rossi V, Taraboletti G, Erroi A, Mantovani A. Ia antigen expression and IL-1 activity in murine tumour-associated macrophages. *Immunology*; 59: 527-33 (1986).
- [62] Bottazzi B, Nobili N, Mantovani A. Expression of c-fos proto-oncogene in tumor-associated macrophages. *J Immunol*; 144: 4878-82 (1990).
- [63] Takahashi T, Ibata M, Yu Z, Shikama Y, Endo Y, Miyauchi Y, Nakamura M, Tashiro-Yamaji J, Miura-Takeda S, Shimizu T, Okada M, Ueda K, Kubota T, Yoshida R. Rejection of intradermally injected syngeneic tumor cells from mice by specific elimination of tumor-associated macrophages with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate, followed by induction of CD11b(+)/CCR3(-)/Gr-1(-) cells cytotoxic against the tumor cells. *Cancer Immunol Immunother*; 58: 2011-23 (2009).
- [64] Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- $\alpha$  dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*; 25: 1543-9 (2004).
- [65] Graff BA, Bjørnaes I, Rofstad EK. Microvascular permeability of human melanoma xenografts to macromolecules: relationships to tumor volumetric growth rate, tumor angiogenesis, and VEGF expression. *Microvasc Res*; 61: 187-98 (2001).
- [66] Ogawara K, Un K, Minato K, Tanaka K, Higaki K, Kimura T. Determinants for in vivo anti-tumor effects of PEG liposomal doxorubicin: importance of vascular permeability within tumors. *Int J Pharm*; 359: 234-40 (2008).
- [67] Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC, Erlich JH, Gerondakis S, Mackman N, Ulevitch RJ. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF- $\kappa$ B. *J Clin Invest*; 102: 1645-52 (1998).
- [68] Kastenbauer S, Ziegler-Heitbrock HW. NF- $\kappa$ B1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infect Immun*; 67: 1553-9 (1999).
- [69] De Stefano D. Oligonucleotides decoy to NF- $\kappa$ B: becoming a reality? *Discov Med*; 12: 97-105 (2011).
- [70] Egashira K, Suzuki J, Ito H, Aoki M, Isobe M, Morishita R. Long-term follow up of initial clinical cases with NF- $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotide transfection at the site of coronary stenting. *J Gene Med*; 10: 805-9 (2008).
- [71] Suzuki J, Tezuka D, Morishita R, Isobe M. An initial case of suppressed restenosis with nuclear factor- $\kappa$  B decoy transfection after percutaneous coronary intervention. *J Gene Med*; 11: 89-91 (2009).
- [72] Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*; 111: 927-30 (2002).
- [73] Gazi U, Martinez-Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*; 214: 554-61 (2009).
- [74] Liang WW, Shi X, Deshpande D, Malanga CJ, Rojanasakul Y. Oligonucleotide targeting to alveolar macrophages by mannose receptor-mediated endocytosis. *Biochim Biophys Acta*; 1279: 227-34 (1996).

- [75] Jiang HL, Kang ML, Quan JS, Kang SG, Akaike T, Yoo HS, Cho CS. The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization. *Biomaterials*; 29: 1931-9 (2008).
- [76] Chono S, Kaneko K, Yamamoto E, Togami K, Morimoto K. Effect of surface-mannose modification on aerosolized liposomal delivery to alveolar macrophages. *Drug Dev Ind Pharm*; 36: 102-7 (2010).
- [77] Matsui M, Shimizu Y, Kodera Y, Kondo E, Ikehara Y, Nakanishi H. Targeted delivery of oligomannose-coated liposome to the omental micrometastasis by peritoneal macrophages from patients with gastric cancer. *Cancer Sci*; 101: 1670-7 (2010).
- [78] Kawakami S, Sato A, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes. *Gene Ther*; 7: 292-9 (2000).
- [79] Higuchi Y, Kawakami S, Oka M, Yabe Y, Yamashita F, Hashida M. Intravenous administration of mannosylated cationic liposome/ NF $\kappa$ B decoy complexes effectively prevent LPS-induced cytokine production in a murine liver failure model. *FEBS Lett*; 580: 3706-14 (2006).
- [80] Kuramoto Y, Kawakami S, Zhou S, Fukuda K, Yamashita F, Hashida M. Use of mannosylated cationic liposomes/ immunostimulatory CpG DNA complex for effective inhibition of peritoneal dissemination in mice. *J Gene Med*; 10: 392-9 (2008).
- [81] Wijagkanalan W, Kawakami S, Takenaga M, Igarashi R, Yamashita F, Hashida M. Efficient targeting to alveolar macrophages by intracheal administration of mannosylated liposomes in rats. *J Control Release*; 125: 121-30 (2008).
- [82] van Wamel A, Kooiman K, Harteveld M, Emmer M, ten Cate FJ, Versluis M, de Jong N. Vibrating microbubbles poking individual cells: drug transfer into cells via sonoporation. *J Control Release*; 112: 149-55 (2006).
- [83] Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, Hagsawa K, Tanaka K, Sawamura K, Utoguchi N, Nishioka T, Maruyama K. Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound. *J Control Release*; 117: 130-6 (2007).
- [84] Zhao YZ, Luo YK, Lu CT, Xu JF, Tang J, Zhang M, Zhang Y, Liang HD. Phospholipids-based microbubbles sonoporation pore size and reseal of cell membrane cultured in vitro. *J Drug Target*; 16: 18-25 (2008).
- [85] Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, Utoguchi N, Maruyama K. Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology. *Int J Pharm*; 354: 49-55 (2008).
- [86] Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Nakamura A, Suzuki D, Ukai S, Sugimoto K, Moriyasu F, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y. pDNA-loaded bubble liposomes as potential ultrasound imaging and gene delivery agents. *Biomaterials*; 34: 2807-13 (2013).
- [87] Movahedi K, Schoonooghe S, Laoui D, Houbracken I, Waelput W, Breckpot K, Bouwens L, Lahoutte T, De Baetselier P, Raes G, Devoogdt N, Van Ginderachter JA. Nanobody-based targeting of the macrophage mannose receptor for effective in vivo imaging of tumor-associated macrophages. *Cancer Res*; 72: 4165-77 (2012).
- [88] Cieslewicz M, Tang J, Yu JL, Cao H, Zavaljevski M, Motoyama K, Lieber A, Raines EW, Pun SH. Targeted delivery of proapoptotic peptides to tumor-associated macrophages improves survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*;

110: 15919-24 (2013).

- [89] Zhu S, Niu M, O'Mary H, Cui Z. Targeting of tumor-associated macrophages made possible by PEG-sheddable, mannose-modified nanoparticles. *Mol Pharm*; in press (2013).
- [90] Huang Z, Zhang Z, Jiang Y, Zhang D, Chen J, Dong L, Zhang J. Targeted delivery of oligonucleotides into tumor-associated macrophages for cancer immunotherapy. *J Control Release*; 158: 286-92 (2012).
- [91] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*; 46: 6387-92 (1986).
- [92] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*; 65: 271-84 (2000).
- [93] Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol Biol*; 624: 25-37 (2010).
- [94] Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur J Pharm Biopharm*; 71: 409-19 (2009).
- [95] Osada K, Christie RJ, Kataoka K. Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery. *J R Soc Interface*; 6: S325-39 (2009).
- [96] Ogawara K, Yoshizawa Y, Un K, Araki T, Kimura T, Higaki K. Nanoparticle-based passive drug targeting to tumors: considerations and implications for optimization. *Biol Pharm Bull*; 36: 698-702 (2013).
- [97] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95: 4607-12 (1998).
- [98] Ishida O, Maruyama K, Sasaki K, Iwatsuru M. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. *Int J Pharm*; 190: 49-56 (1999).
- [99] Suzuki R, Namai E, Oda Y, Nishiie N, Otake S, Koshima R, Hirata K, Taira Y, Utoguchi N, Negishi Y, Nakagawa S, Maruyama K. Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *J Control Release*; 142: 245-50 (2010).
- [100] Zhao YZ, Lu CT, Zhou ZC, Jin Z, Zhang L, Sun CZ, Xu YY, Gao HS, Tian JL, Gao FH, Tang QQ, Li W, Xiang Q, Li XK, Li WF. Enhancing chemotherapeutic drug inhibition on tumor growth by ultrasound: an in vivo experiment. *J Drug Target*; 19: 154-60 (2011).
- [101] Lu CT, Zhao YZ, Wu Y, Tian XQ, Li WF, Huang PT, Li XK, Sun CZ, Zhang L. Experiment on enhancing antitumor effect of intravenous epirubicin hydrochloride by acoustic cavitation in situ combined with phospholipid-based microbubbles. *Cancer Chemother Pharmacol*; 68: 343-8 (2011).
- [102] Rayet B, G elinas C. Aberrant *rel/nfkb* genes and activity in human cancer. *Oncogene*; 18: 6938-47 (1999).
- [103] Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*; 2: 301-10 (2002).
- [104] NF- $\kappa$ B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ*; 13: 738-47 (2006).
- [105] Scaife CL, Kuang J, Wills JC, Trowbridge DB, Gray P, Manning BM, Eichwald EJ, Daynes RA, Kuwada SK.

Nuclear factor  $\kappa$ B inhibitors induce adhesion-dependent colon cancer apoptosis: implications for metastasis. *Cancer Res*; 62: 6870-8 (2002).

- [106] Johanson V, Arvidsson Y, K lby L, Bernhardt P, Sw rd C, Nilsson O, Ahlman H. Antitumoural effects of the pyridyl cyanoguanidine CHS 828 on three different types of neuroendocrine tumours xenografted to nude mice. *Neuroendocrinology*; 82: 171-6 (2005).
- [107] Kawamura I, Morishita R, Tomita N, Lacey E, Aketa M, Tsujimoto S, Manda T, Tomoi M, Kida I, Higaki J, Kaneda Y, Shimomura K. Intratumoral injection of oligonucleotides to the NF  $\kappa$ B binding site inhibits cachexia in a mouse tumor model. *Gene Ther*; 6: 91-7 (1999).
- [108] Wang X, Deavers M, Patenia R, Bassett RL Jr, Mueller P, Ma Q, Wang E, Freedman RS. Monocyte/macrophage and T-cell infiltrates in peritoneum of patients with ovarian cancer or benign pelvic disease. *J Transl Med*; 4: 30 (2006).
- [109] Robinson-Smith TM, Isaacsohn I, Mercer CA, Zhou M, Van Rooijen N, Husseinzadeh N, McFarland-Mancini MM, Drew AF. Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer Res*; 67: 5708-16 (2007).
- [110] Becker G, Galandi D, Blum HE. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment. *Eur J Cancer*; 42: 589-97 (2006).
- [111] Sangisetty SL, Miner TJ. Malignant ascites: A review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. *World J Gastrointest Surg*; 4: 87-95 (2012).
- [112] Cavazzoni E, Bugiantella W, Graziosi L, Franceschini MS, Donini A. Malignant ascites: pathophysiology and treatment. *Int J Clin Oncol*; 18: 1-9 (2013).
- [113] Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, Preisser L, Anegon I, Catala L, Ifrah N, Descamps P, Gamelin E, Gascan H, Hebbar M, Jeannin P. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*; 110: 4319-30 (2007).
- [114] Takaishi K, Komohara Y, Tashiro H, Ohtake H, Nakagawa T, Katabuchi H, Takeya M. Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation. *Cancer Sci*; 101: 2128-36 (2010).
- [115] Masoumi Moghaddam S, Amini A, Morris DL, Pourgholami MH. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev*; 31: 143-62 (2012).
- [116] Majumder B, Biswas R, Chattopadhyay U. Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. *Int J Cancer*; 97: 493-500 (2002).
- [117] Hirano K, Hunt CA. Lymphatic transport of liposome-encapsulated agents: effects of liposome size following intraperitoneal administration. *J Pharm Sci*; 74: 915-21 (1985).
- [118] Agrawal S, Tamsamani J, Tang JY. Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88: 7595-9 (1991).
- [119] Sadzuka Y, Hirota S, Sonobe T. Intraperitoneal administration of doxorubicin encapsulating liposomes against peritoneal dissemination. *Toxicol Lett*; 116: 51-9 (2000).

- [120] Phillips WT, Medina LA, Klipper R, Goins B. A novel approach for the increased delivery of pharmaceutical agents to peritoneum and associated lymph nodes. *J Pharmacol Exp Ther*; 303: 11-6 (2002).
- [121] Mirahmadi N, Babaei MH, Vali AM, Dadashzadeh S. Effect of liposome size on peritoneal retention and organ distribution after intraperitoneal injection in mice. *Int J Pharm*; 383: 7-13 (2010).
- [122] Dadashzadeh S, Mirahmadi N, Babaei MH, Vali AM. Peritoneal retention of liposomes: Effects of lipid composition, PEG coating and liposome charge. *J Control Release*; 148: 177-86 (2010).
- [123] El-Azab M, Hishe H, Moustafa Y, El-Awady el-S. Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Eur J Pharmacol*; 652: 7-14 (2011).
- [124] Agrawal SS, Saraswati S, Mathur R, Pandey M. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. *Life Sci*; 89: 147-58 (2011).
- [125] Saraswati S, Agrawal SS, Alhaider AA. Ursolic acid inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in Ehrlich ascites carcinoma tumor. *Chem Biol Interact*; 206: 153-65 (2013).
- [126] Saraswati S, Alhaider AA, Agrawal SS. Punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa* exhibits anti-angiogenic activity via downregulation of VEGF in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact*; 206: 204-13 (2013).
- [127] Hattori Y, Kawakami S, Nakamura K, Yamashita F, Hashida M. Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by in vivo gene delivery with mannosylated lipoplex via the intraperitoneal route. *J Pharmacol Exp Ther*; 318: 828-34 (2006).
- [128] Lee YC, Stowell CP, Krantz MJ. 2-Imino-2-methoxyethyl 1-thioglycosides: new reagents for attaching sugars to proteins. *Biochemistry*; 15: 3956-63 (1976).
- [129] Hyoudou K, Nishikawa M, Umeyama Y, Kobayashi Y, Yamashita F, Hashida M. Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase: quantitative analysis with firefly luciferase-expressing melanoma cells. *Clin Cancer Res*; 10: 7685-91 (2004).