

ハイブリッドリポソームを用いた大腸がんの肝転移抑制に関する基礎研究

船本幸太, 市原英明, 松下 琢, 松本陽子, 上岡龍一*

Marked Therapeutic Effects of Hybrid Liposomes on the Hepatic Metastasis of Colon Carcinoma

Kota FUNAMOTO, Hideaki ICHIHARA, Taku MATSUSHITA,
Yoko MATSUMOTO, and Ryuichi UEOKA*Division of Applied Life Science, Graduate School of Engineering, Sojo University,
4-22-1 Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan

(Received October 31, 2008; Accepted December 4, 2008)

Hybrid liposomes (HLs) composed of vesicular and micellar surfactants have inhibitory effects on the growth of tumor cells *in vitro* and *in vivo*. Successful clinical chemotherapy with drug-free HLs to patient with lymphoma has been reported after approval by the Committee of Bioethics. However, the therapeutic effects of HLs on the metastasis of colon carcinoma cells have not yet been elucidated. In this study, the therapeutic effects of HLs composed of L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and polyoxyethylene (23) dodecyl ether [C₁₂(EO)₂₃] on the metastasis of colon carcinoma (Colon26) cells were examined *in vivo*. Marked high therapeutic effects were obtained in the hepatic metastasis mice model after the treatment with HLs. Furthermore, optical microscopic analysis indicated that HLs could induce the apoptosis of colon carcinoma cells *in vivo*. No toxicity was observed in the hepatic metastasis mice model after intravenously injecting HLs. Therapeutic effects along with the induction of apoptosis by HLs without any drugs on hepatic metastasis were revealed on the basis of optical microscopic analysis for the first time *in vivo*.

Key words—hybrid liposomes; chemotherapy; hepatic metastasis

緒 言

大腸がんは、近年日本人にも増加傾向が著しく、2015年頃には罹患数が第1位である胃がんを越えると予測されている。大腸がんによる死亡率は、男性では肺がん、肝臓がんについて3番目、女性では最も多くなると推定されている。

がんの転移を制御することは、がん治療において最も重要な戦略の1つである。転移の過程には、転移性がん細胞と種々の宿主細胞（血小板、リンパ球、内皮細胞）と細胞外マトリックスや基底膜との相互作用が関与していることが知られている。肝臓は一般的に消化器系がんの転移、特に大腸がんの血行性転移の標的となる臓器であり、しかも肝転移を伴う大腸がんの予後は非常に悪い。¹⁻⁴⁾

大腸がんの肝転移において、患部を切除したのちの抗がん剤での補助化学療法の有効性が報告されて

いる。⁵⁻⁷⁾したがって、大腸がんの肝転移メカニズムを明らかにすることは、大腸がんにおける生存率の向上に重要であると考えられる。化学療法は術後の予後を改善すると言われていたにも関わらず、大腸がんの肝転移に関する有効的な化学治療は現在までに確立されていない。このため、1980年代に Fidler らによって開発された大腸がん細胞を脾内移植することによる肝転移モデルマウス⁸⁾を用いた実験は、がんの転移メカニズムを明確にする上で必要不可欠である。⁹⁾

ところで、細胞死は、真核細胞生長と細胞ホメオスターシスのために厳密に調節されている。細胞死には一般的にアポトーシスとネクローシスがあり、ネクローシスが毒物、外傷などの外的環境要因による細胞死であるのに対し、アポトーシスは真核生物の細胞において遺伝的に制御されたプログラム細胞死である。腫瘍細胞は、このアポトーシス経路が崩壊しているため永久に増殖し続ける。したがって、がん治療においてアポトーシスを制御することは、

重要になる。 *In vivo* におけるアポトーシス誘導の研究には、治療後のがん組織切片の顕微鏡での観察がよく用いられる。

さて、筆者らが創製したハイブリッドリポソーム (HL) は、緩衝溶液中でベシクルとミセル分子を超音波照射するだけで調製でき、有機溶媒の混入がなく長期的に安定であるという特徴がある。^{10,11)} 現在までの HL の研究において、1) 膜酵素モデルの研究において、素材や組成を変えることで、HL のサイズ、流動性、相転移温度などを制御できること。^{10,11)} 2) ドラッグキャリアーとして、抗がん剤、¹²⁾ 糖系界面活性剤¹³⁾ 及び多価不飽和脂肪酸¹⁴⁾ を含有した HL が *in vitro* 及び *in vivo* において抗腫瘍効果を示すこと。3) *In vitro* において、従来の抗がん剤を封入せず HL のみで、がん細胞 (白血病、¹⁵⁾ 肺がん、¹⁶⁾ ヒト乳がん細胞¹⁷⁾) に対し、アポトーシスを誘導し、高い抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。一方、4) HL の膜流動性が高くなると、ヒト大腸がん細胞膜に蓄積し、抗腫瘍効果が増大することが明らかになった。¹⁸⁾

本研究では、まず、*in vitro* においてマウス大腸がん (Colon26) 細胞に対する DMPC と C₁₂(EO)₂₃ からなる HL の抗腫瘍効果を検討した。次に、蛍光染色した Colon26 細胞の肝臓への転移を *in vivo* で確認し、HL の肝転移モデルマウスに対する治療効果を検討した。また、HL の肝転移モデルマウスに対する治療効果のメカニズムについて光学顕微鏡を用いて検討した。さらに、肝転移モデルマウスに対する HL の安全性を検討した。

実験方法

1. 試料 L- α ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) は市販品 (日本油脂) をそのまま使用した。ポリオキシエチレン (23) ドデシルエーテル [C₁₂(EO)₂₃] は市販品 (Sigma) を、Elworthy らの方法に従い精製したものを使用した。¹⁹⁾ 蛍光プローブの 1-パルミトイル-2-[12-[(7-ニトロ-2-1,3-ベンゾキシアジアゾール-4-イル)アミノ]ドデカノイル]-sn-グリセロ-3-ホスフォコリン (NBDPC) は市販品 (Avanti) をそのまま使用した。

2. 細胞 マウス大腸がん (Colon26, 東京医科大学より寄贈) 細胞を Dulbecco's Modified Eagle

Medium (D-MEM: Gibco) を用い、10%ウシ胎児血清及びペニシリン-ストレプトマイシン液を加え 37°C、5%CO₂ の条件下で継代培養した。

3. 動物 動物実験は、崇城大学動物実験委員会及び崇城大学における動物実験に関する指針の下、動物の愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼養及び保管等に関する基準を遵守して行った。マウス (BALB/c, 日本クレア) は、室温 25±1°C、湿度 50±10%、12 時間毎の照明サイクル、1 時間毎に 14 回の 100%新鮮換気条件で飼育した。

4. ハイブリッドリポソームの調製 HL は 90 mol% のリン脂質 (DMPC) と 10 mol% の PEG 系界面活性剤 [C₁₂(EO)₂₃] を 5%ブドウ糖溶液中に溶解後、45°C、窒素雰囲気下で超音波照射することにより調製した。孔径 0.20 μ m フィルターでろ過滅菌し試験溶液とした。

5. HL のサイズの測定 HL のサイズ (d_{hy}) は、光散乱光度計 (ELS-8000, Otsuka Electronics) を用い、動的光散乱法により 25°C で測定した。光源として He-Ne レーザーの 633 nm の発振線を出力 35 mW で用い、散乱角 90°で測定し、得られた拡散係数 (D) から Eq. (1) (Stokes-Einstein 式) に従い d_{hy} を求めた。

$$d_{hy} = \kappa T / 3\pi \eta D \quad (1)$$

ここで、 κ は Boltzmann 定数、 T は絶対温度、 η は溶媒の粘度である。

6. 細胞増殖抑制効果の評価 Colon26 細胞に対する 50%増殖抑制濃度 (IC₅₀) は、酵素活性測定法である WST-1 assay (Cell Counting Kit, Dojindo Laboratories) により評価し、²⁰⁾ 96 穴マルチプレートに細胞懸濁液 (初期細胞数: 2.0×10⁴ cells/ml) を 0.1 ml 播種し、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 24 時間培養した。試料溶液 10 μ l/well 添加して 48 時間後に WST-1 を添加、2 時間後に分光光度計 (Molecular Device) を用いて励起波長 450 nm における吸光度を測定した。生存率を $A_{Mean}/A_{Control} \times 100$ より算出し、生存率の試料濃度依存性より IC₅₀ を求めた。ここで、 A_{Mean} は、HL 添加後の、 $A_{Control}$ は HL 未添加の吸光度を示す。

7. ハイブリッドリポソームのがん細胞膜への蓄積の観察 蛍光プローブとして、NBDPC を用い、NBDPC を含有した HL/NBDPC の Colon26 細胞への蓄積を共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP, Leica)

を用いて観察した。2 ml の細胞懸濁液 (1.0×10^5 cells/ml) をガラスボトムディッシュ (MatTek) に播種し、24 時間 37°C で $5\% \text{CO}_2$ インキュベータ中で培養後、HL/NBDPC を添加し、観察した。レーザーは、Ar (excitation: 488 nm, detection: 505–555 nm) を用いた。

8. フローサイトメーターを用いた DNA 断片化率の測定 HL の Colon26 細胞に対する DNA 断片化率の測定をフローサイトメーターを用いて DNA のヨウ化プロピジウム (PI) 染色により行った。2 ml の細胞懸濁液 (7.0×10^4 cells/ml) をディッシュ (BD Falcon) に播種し、24 時間 37°C で $5\% \text{CO}_2$ インキュベータ中で培養した。試料を添加後 48 時間培養した。なお、各試料の最終濃度は、細胞当たりの HL における IC_{50} 値と同一である。試料添加後の細胞は、ナイロンメッシュを通過させたのち、PI を加え、氷中・暗所において 10 分間静置し DNA の染色を行いフローサイトメーター (Epics XL system II, Beckman Coulter) を用いて測定した。光源には 488 nm の Ar レーザーを出力 15 mW で使用し、FL3 (605–635 nm) センサーを用いて蛍光検出を行った。

9. 肝転移モデルマウスの作成 培養した Colon26 細胞を遠心分離によって集め、 $-\text{PBS}$ に懸濁し、 5.0×10^4 cells/body の条件で、マウス脾臓内に移植し、肝転移モデルマウスを作成した。肝転移の確認のために、移植前の Colon26 細胞を無血清培地で懸濁し、Cell Tracker Red²¹⁾ (CMTPX; Molecular Probes) を最終濃度 $25 \mu\text{M}$ になるように加え、45 分間染色した。この染色した細胞を同じ条件で脾臓内に移植し、24 時間後に肝臓を摘出した。摘出した肝臓を OTC コンパウンドに包埋して凍結切片を作成後、核染色のための YO-PRO-1 (Molecular Probes) を含んだ退色防止剤 [$5\% \text{DABCO}$ ($-\text{PBS}/\text{Glycerol}=1:1$)] を滴下し、カバーガラスで封入後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Cell Tracker Red 検出には、He-Ne レーザー (excitation: 543 nm, detection: 600–724 nm) を用い、YO-PRO-1 検出には、Ar レーザー (excitation: 488 nm, detection: 495–535 nm) を用いた。

10. 肝転移モデルマウスの治療実験 マウスは、当日の体重を基に層別連続無作為化法で正常群 (Normal)、未治療群 (Control)、HL 処理群 (Dose

136 mg/kg, 203 mg/kg) の 4 群、各群 6 匹に分けた。Colon26 細胞は 5.0×10^4 Cells/body の条件でマウスの脾臓内に移植した。HL は Colon26 細胞移植翌日から 14 日間、1 日 1 回尾静脈内に投与した。HL を投与した肝転移モデルマウスの肝臓と脾臓の重量を測定し、体重比器官重量を算出した。

11. HE 染色による肝臓組織切片の観察 投与終了後、麻酔下でマウスから肝臓を摘出し、 10% ホルマリン溶液で固定した。パラフィンに包埋し切片を切り出し、ヘマトキシリン液で核を染色したのち、光学顕微鏡を用いて観察した。

12. TUNEL 法による肝臓組織切片の観察 パラフィンに包埋した組織切片は、脱パラフィン処理を行い、段階的にエタノールを通して水和し、内因性のペルオキシダーゼを $2\% \text{H}_2\text{O}_2$ を含む PBS でブロックした。TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出は、*in situ* アポトーシス検出キット (Apop-Tag Plus Peroxidase, Intergen) を使用した。

13. 肝転移モデルマウスに対するハイブリッドリポソームの安全性試験 マウスは、当日の体重を基に層別連続無作為化法で正常群 (Normal)、未治療群 (Control)、HL 処理群 (Dose 136 mg/kg, 203 mg/kg) の 4 群、各群 6 匹に分けた。Colon26 細胞は 5.0×10^4 Cells/body の条件でマウスの脾臓内に移植した。HL は Colon26 細胞移植翌日から 14 日間、1 日 1 回静脈内に投与した。実験期間中マウスの体重測定を行った。投与終了後、ジエチルエーテル麻酔下で心臓から採血を行い、白血球数及び赤血球数を自動血球測定装置で測定した。

結果と考察

1. ハイブリッドリポソームの安定性 HL のサイズ (d_{hy}) を動的光散乱法により測定した。結果を Fig. 1 に示す。HL のサイズは調製直後から、肝臓や脾臓といった、細網内皮系組織に捕捉されるのを回避できる 100 nm 以下のサイズ²²⁾ を 1 ヶ月以上維持した。また、臨床応用を目指し 37°C の血清中で HL の安定性を検討した結果、約 100 nm のサイズを 24 時間維持することが明らかになった。

2. Colon26 細胞に対するハイブリッドリポソームの増殖抑制効果 DMPC 単一リポソーム及び HL の Colon26 細胞に対する増殖抑制効果を検討し、結果を Fig. 2 に示す。 IC_{50} 値は HL が 257 ± 12

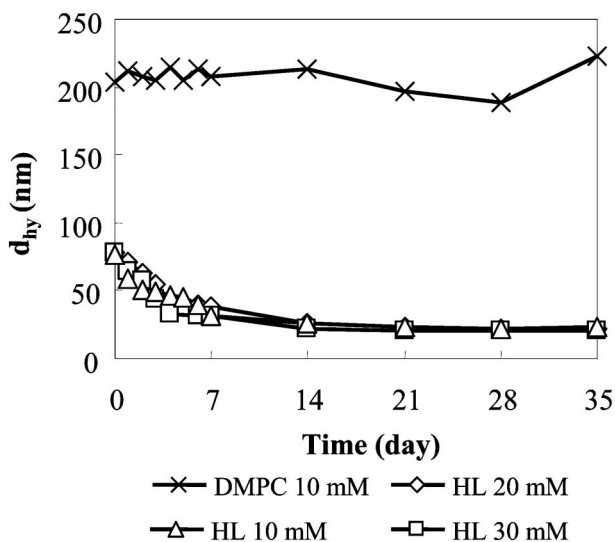


Fig. 1. Time Courses of d_{hy} Change for Hybrid Liposomes Composed of 90 mol% DMPC and 10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$ (HL) at 25°C

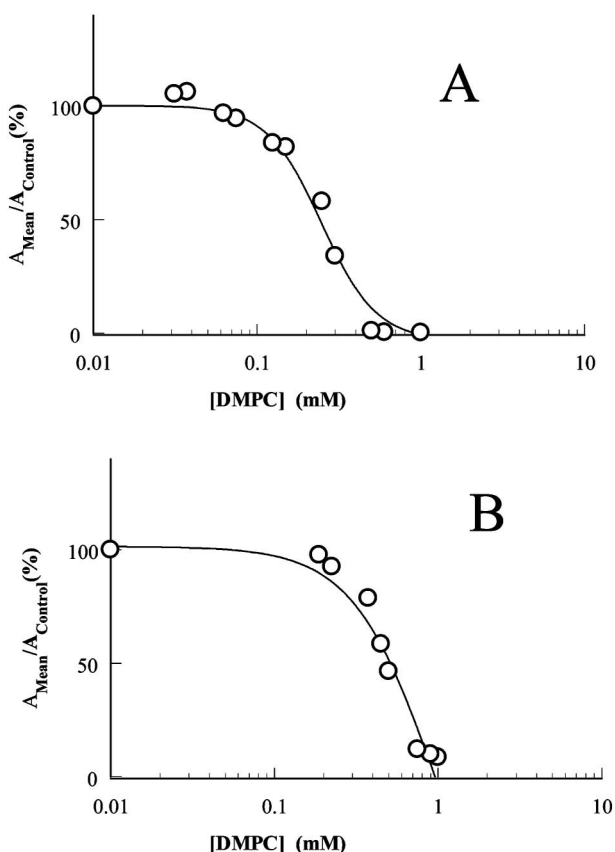


Fig. 2. DMPC Concentration Dependence of $A_{Mean}/A_{Control}$ on the Growth of Colon26 Cells after the Treatment with HL (A) and DMPC Liposomes (B)

μM , DMPC 単一リポソームが $517 \pm 32 \mu\text{M}$ であった。HL の IC_{50} 値は DMPC 単一リポソームの約 1/2 であり、HL の Colon26 細胞に対する増殖抑制効果が明らかになった。

3. Colon26 細胞へのハイブリッドリポソームの蓄積 蛍光物質 (NBDPC) を含有した HL (HL/NBDPC) を用いて、Colon26 細胞への蓄積を観察した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて 2 時間観察した結果を Fig. 3 に示す。HL/NBDPC 添加 30 分後から経時的に蛍光蓄積量の増大が観察され、HL/NBDPC が Colon26 細胞膜に蓄積することが明らかになった。蛍光標識した HL をヒト正常大腸細胞及びヒト大腸がん細胞に添加し、全反射顕微鏡を用いて観察したところ、正常細胞ではほとんど変化がないのに対し、がん細胞では細胞膜の蛍光強度が増加することが報告されている。¹⁸⁾ 正常細胞に比べがん細胞膜は流動性が大きいことが知られており、このため、流動性の大きい HL ががん細胞に対して選択的に蓄積し、抑制効果を示したと考えられる。

4. ハイブリッドリポソームによる DNA の断片化 フローサイトメーターを用いて Colon26 細胞に対する DNA 断片化率を測定した。結果を Fig. 4 に示す。HL で処理した Colon26 細胞 (DNA 断片化率: 44.5%) は DMPC 単一リポソームで処理したもの (DNA 断片化率: 29.8%) に比べ 1.5 倍の DNA 断片化率を示した。このことから、HL の Colon26 細胞に対する増殖抑制効果は、DNA の断片化によるものであることが示唆された。

5. モデルマウスにおける肝転移の確認 初めに、Colon26 細胞の肝転移の確認を行った。Figure 5 (A) に示したように、Cell Tracker Red で染色した Colon26 細胞は、赤い蛍光を発した。この細胞を脾臓に移植し、24 時間後に摘出した肝臓の組織切片観察を行ったところ、Fig. 5 (B) に示したように、蛍光染色された Colon26 細胞が確認でき、肝転移モデルマウスの作成が証明された。

6. 肝転移モデルマウスの治療効果 肝転移モデルマウスを用いて HL の治療効果を検討した。治療効果のスクリーニングは、一般にがん細胞を移植したマウスで行われる。解剖後に摘出した肝臓及び脾臓の写真を Fig. 6 に示し、臓器重量を Fig. 7 にまとめた。肝臓の体重比器官重量は、Control 群で $5.31 \pm 1.55 \text{ g}$, Normal 群で $4.17 \pm 0.02 \text{ g}$, HL 投

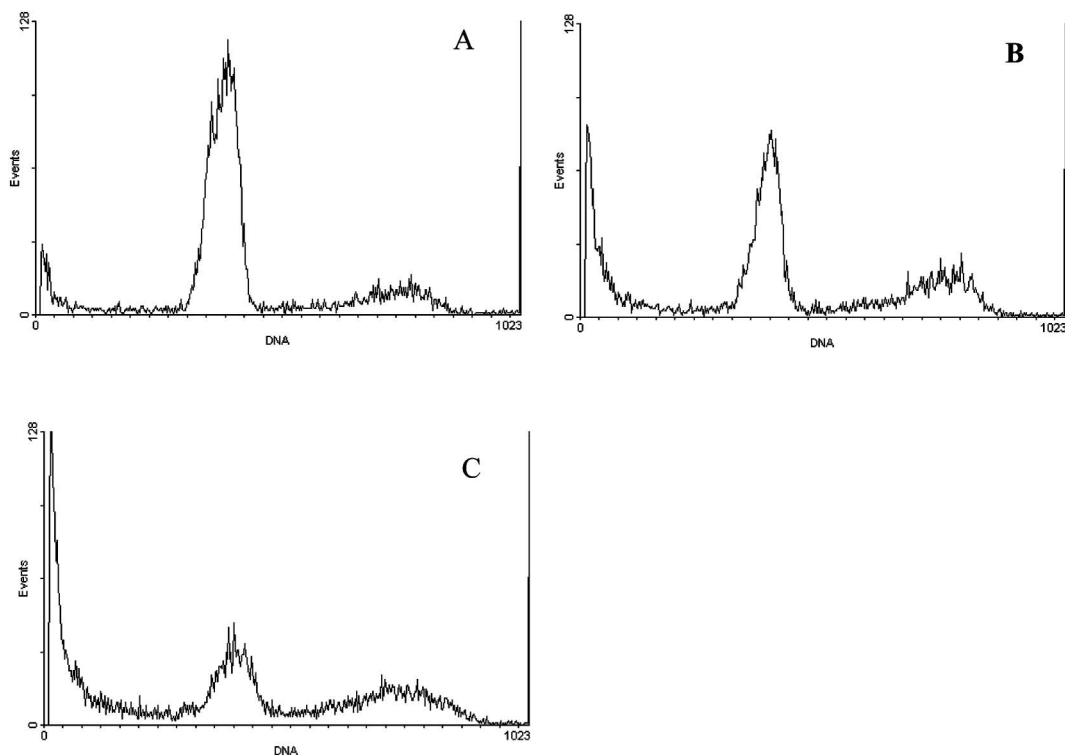


Fig. 4. Apoptotic DNA Rate for Colon26 Cells after the Treatment with Hybrid Liposomes and DMPC Liposomes (A): Control, (B): Treatment with DMPC Liposomes, (C): Treatment with HL.

与 (Dose 203 mg/kg) 群で 4.39 ± 0.09 g であった。脾臓の体重比器官重量は、Control 群で 3.28 ± 1.55 g, Normal 群で 0.43 ± 0.16 g, HL 投与 (Dose 203 mg/kg) 群で 0.81 ± 0.04 g であった。HL 投与 (Dose 203 mg/kg) 群は、Control 群と統計的有意差がみられ、HL 投与により臓器肥大が抑制された。また、剖検においても、Control 群では、肝転移及び脾臓肥大が確認されたが、HL 投与 (Dose 203 mg/kg) 群においては、Normal 群の臓器と同様であった。以上のことから、HL の肝転移モデルマウスに対する治療効果が明らかになった。

一方、HL の肝転移モデルマウスに対する治療効果を組織切片の HE 染色によって評価した。結果を Fig. 8 に示す。Control 群において、核と細胞の腫脹、多核化、肝細胞索の破壊を伴っている著しく異常な所見が認められた。しかしながら、HL 投与 (Dose 203 mg/kg) 群では異常な所見は認められず、正常肝臓と同様の結果が得られた。このことから HL の *in vivo* における肝転移抑制効果が示唆された。

7. ハイブリッドリポソームによるアポトーシス誘導 *In vivo* における HL の肝転移大腸がん

に対する治療メカニズムを TUNEL 法で検討した。結果を Fig. 9 に示す。HL 投与 (Dose 136 mg/kg, 203 mg/kg) 群において茶色に染色されたアポトーシス細胞が観察された。HL 投与 (Dose 203 mg/kg) 群におけるアポトーシス細胞の減少は、肝臓組織の治療過程におけるアポトーシス小体のマクロファージによる貪食が原因だと思われる。Control 群においては、アポトーシス細胞は確認されなかった。これらの結果から、*in vivo* における肝転移大腸がん細胞に対する HL の治療効果は、アポトーシス誘導によることが確認された。

8. 肝転移モデルマウスに対するハイブリッドリポソームの安全性 肝転移モデルマウスを用いて HL の安全性を検討した。実験期間中、肝転移モデルマウスや Normal 群に体重の減少や異常はみられなかった (Fig. 10)。血液検査の結果を Fig. 11 に示す。Control 群において、白血球数の増加、赤血球数の減少がみられた。一方、HL 投与群においては、白血球数、赤血球数ともに Normal 群と同様の正常値を示した。以上の結果から、HL は肝転移モデルマウスに対して血液毒性を示さないことが示唆された。

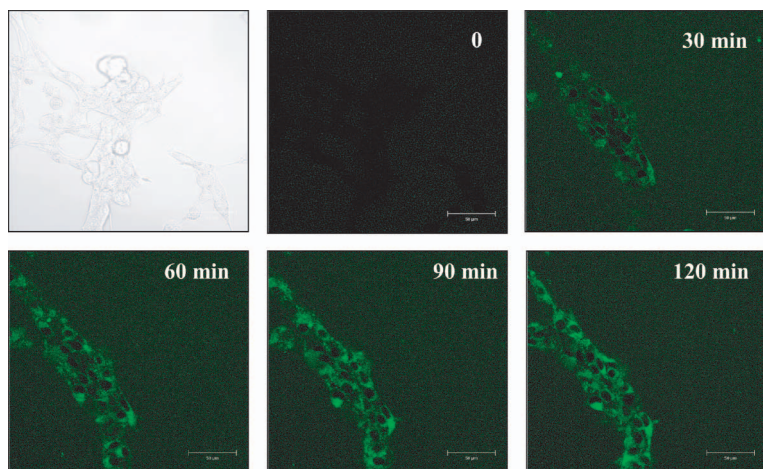


Fig. 3. Specific Accumulation of Hybrid Liposomes Including for Colon26 Cells

HL: [DMPC] = 50 μM , [$\text{C}_{12}(\text{EO})_{23}$] = 5.81 μM , [NBDPC] = 2.33 μM , Magnification: 40, Scale bar: 50 μm .

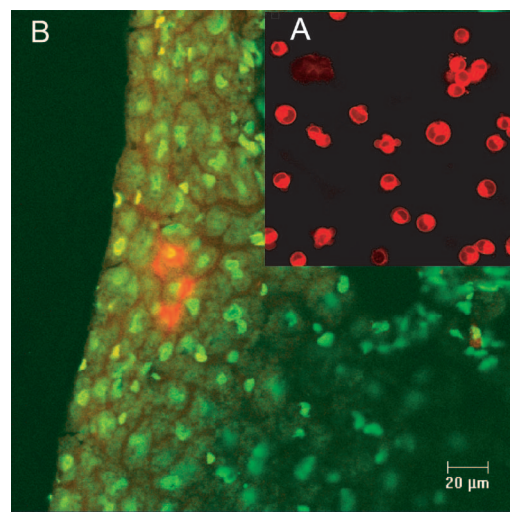


Fig. 5. Cell Tracker-labeled Colon26 Cells Observed by a Confocal Laser Microscope

A (inset): Labeled Colon26 cells (red) in culture medium. B: Labeled Colon26 cells (red) in a liver cryosection of hepatic metastasis model mice at 24 hours after the intrasplenic inoculation of the cells. Nuclei in the section were stained with YO-PRO-1 (green). Magnification: 40, Scale bar: 20 μm .

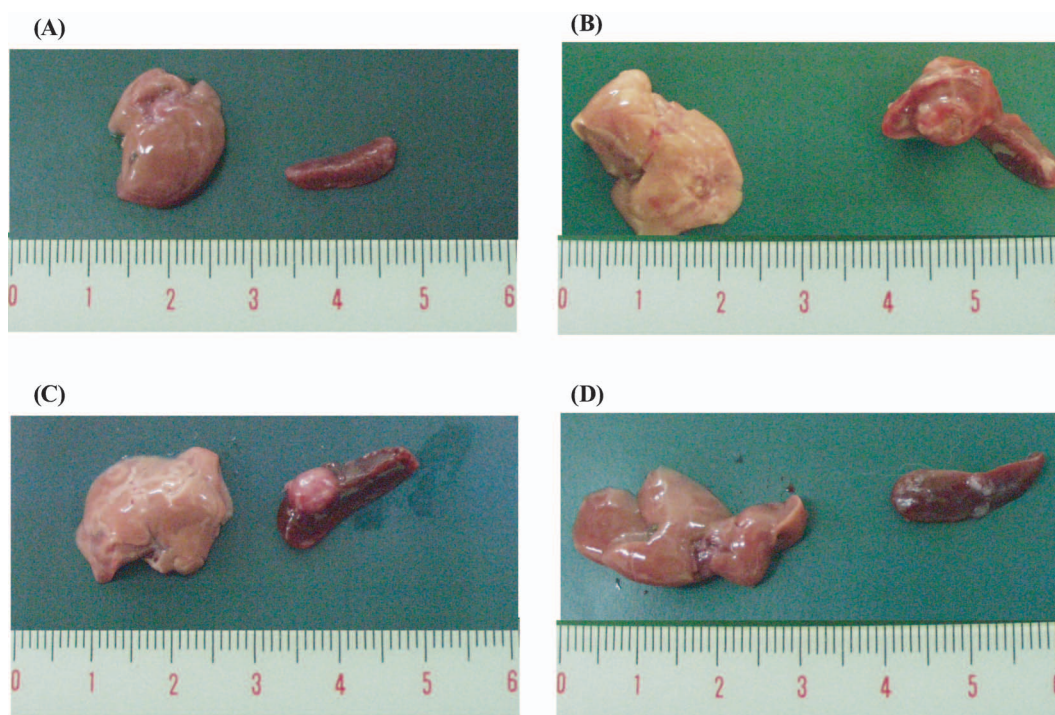


Fig. 6. Liver and Spleen in Mice Treated with Hybrid Liposomes after the Inoculation of Colon26 Cells (A): Normal, (B): Control, (C): Treatment with HL (Dose 136 mg/kg), (D): Treatment with HL (Dose 203 mg/kg).

結 言

本研究で、HLが大腸がん肝転移モデルマウスに対してアポトーシスを誘導し治療効果を示すことを

明らかにした。今回の実験から以下のような興味深い知見が得られた。

In vitro

(a) HLの膜直径は調製直後から1ヵ月以上100

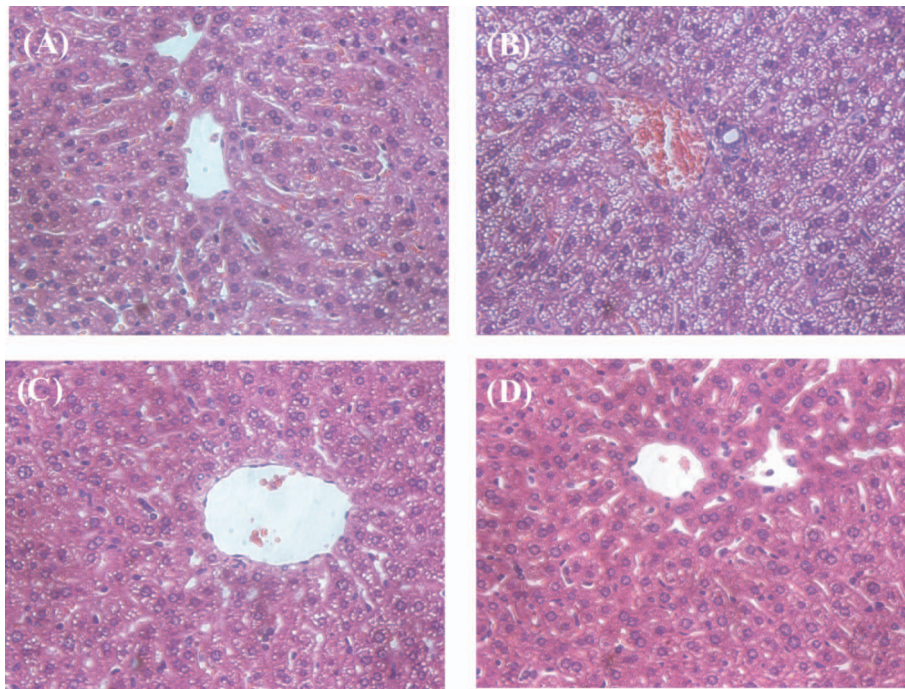


Fig. 8. Micrograph of Tumor Treated with Hybrid Liposomes after the Intrasplenic Inoculation of Colon26 Cells Using HE Staining (A): Normal, (B): Control, (C): Treatment with HL (Dose 136 mg/kg), (D): Treatment with HL (Dose 203 mg/kg), Magnification: 40.

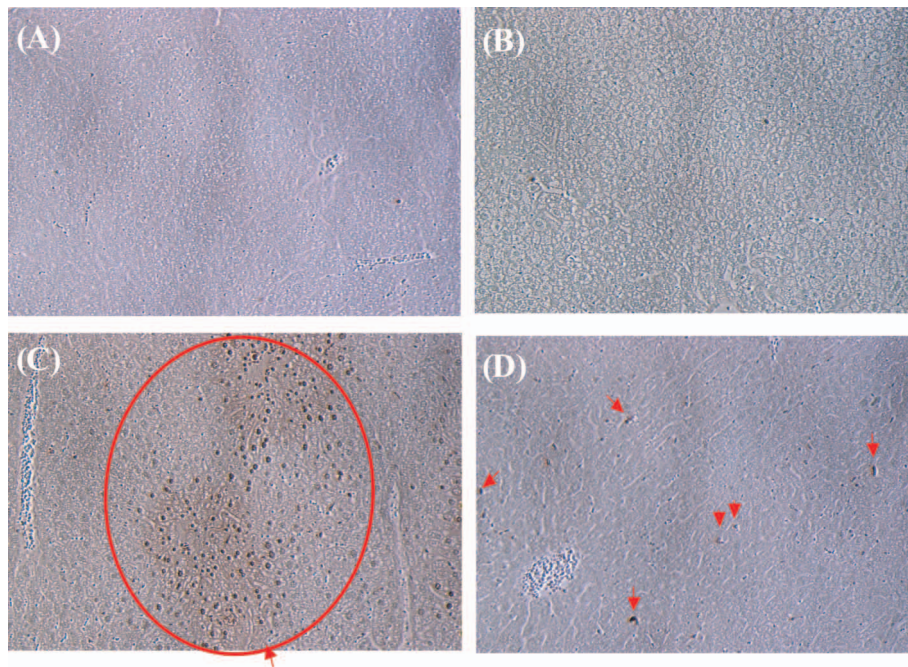


Fig. 9. Micrograph of Tumor Using TUNEL Method Treated with Hybrid Liposomes after the Inoculation of Colon26 Cells (A): Normal, (B): Control, (C): Treatment with HL (Dose 136 mg/kg), (D): Treatment with HL (Dose 203 mg/kg). Magnification: 20, Arrows: apoptotic cells.

nm 以下を維持した。

(b) HL は、Colon26 細胞に対し増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

(c) HL が Colon26 細胞膜に対し、蓄積すること

を明らかにした。

(d) HL の Colon26 細胞に対する増殖抑制効果は、DNA の断片化によるものであることが示唆された。

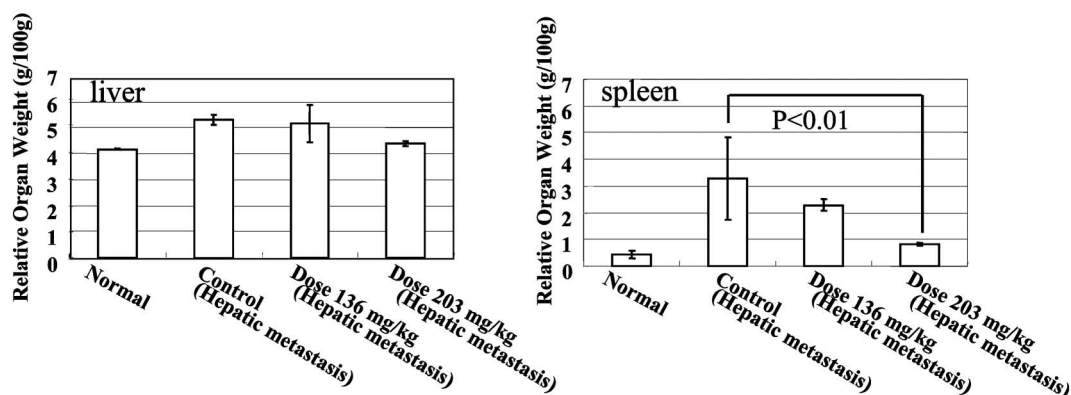


Fig. 7. Relative Organ Weight of Mice Treated with Hybrid Liposomes after the Matastasis of Colon 26 Cells
Values are indicated as mean \pm S.D.

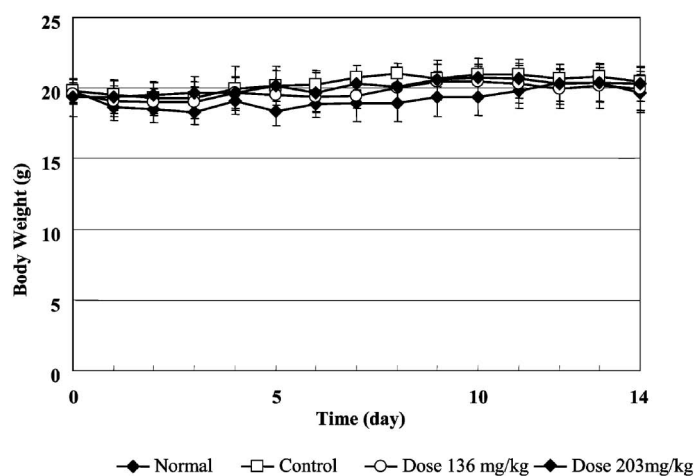


Fig. 10. Body Weight Change for Mice Treated with Hybrid Liposomes after Inoculation of Colon26 Cells for Two Weeks
Values are indicated as mean \pm S.D.

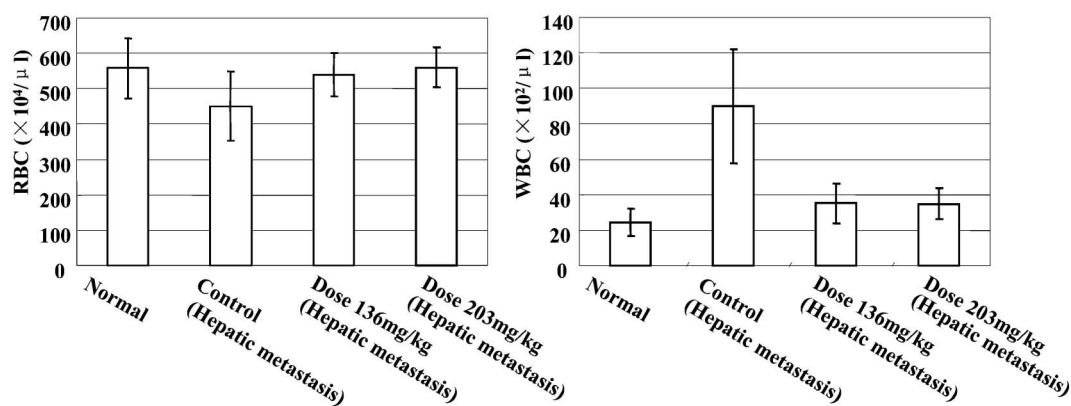


Fig. 11. Hematological Findings for Mice Treated with Hybrid Liposomes after the Inoculation of Colon26 Cells
Values are indicated as mean \pm S.D.

In vivo

(e) 蛍光染色した Colon26 細胞の肝転移を視覚的に確認した。

(f) HL 投与 (Dose 203 mg/kg) 群において、肝臓及び脾臓の体重比器官重量の減少が確認された。

- (g) HE 染色による切片観察より, HL 投与 (Dose 203 mg/kg) 群が正常群と同様の組織の状態に回復した.
- (h) TUNEL 法による観察より, HL 投与 (Dose 203 mg/kg) 群においてアポトーシス誘導が確認された.
- (i) HL を静脈投与した肝転移モデルマウスにおいて血液毒性がなく, 高い安全性が示唆された. 薬剤を含まない HL は, 大腸がん肝転移モデルマウスに対して, 特に *in vivo* での結果より, 主にアポトーシス誘導により治療効果を示すことが示唆され, 臨床への応用が期待できる.

REFERENCES

- 1) Nicolson G. L., *Cancer Res.*, **47**, 1473-1487 (1987).
- 2) Terranova V. P., Hujanen E. S., Martin G. R., *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 311-316 (1986).
- 3) Fidler I. J., *Cancer Res.*, **50**, 6130-6138 (1990).
- 4) Fidler I. J., *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 453-458 (2003).
- 5) Moertel C. G., Fleming T. R., Macdonald J. S., Haller D. G., Laurie J. A., Goodman P. J., Ungerleider J. S., Emerson W. A., Tormey D. C., Glick J. H., *N. Engl. J. Med.*, **322**, 352-358 (1990).
- 6) Koraira S., Kikuchi K., Yasuromi M., Takahashi T., Hojo K., Kato T., Tominaga T., Kunii Y., *Int. J. Clin. Oncol.*, **3**, 357-364 (1998).
- 7) Ito K., Wang L., Ye C., Ando H., Hibi K., Hidemura K., Akiyama S., Kasai Y., Nakao A., *Anticancer Res.*, **21**, 899-904 (2001).
- 8) Giavazzi R., Jessup J. M., Campbell D. E., Walker S. M., Fidler I. J., *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 1303-1308 (1986).
- 9) Ishizu K., Sunose N., Yamazaki K., Tsuruo T., Sadahiro S., Makuuchi H., Yamori T., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1779-1783 (2007).
- 10) Ueoka R., Matsumoto Y., Moss R. A., Swarup S., Straus G., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185-2186 (1985).
- 11) Ueoka R., Matsumoto Y., Moss R. A., Swarup S., Sugii A., Harada K., Kikuchi J., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988).
- 12) Kitamura I., Kochi M., Matsumoto Y., Ueoka R., Kuratsu J., Ushio Y., *Cancer Res.*, **56**, 3986-3992 (1996).
- 13) Matsumoto Y., Kato T., Suzuki H., Hirose S., Naiki Y., Hirashima M., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2617-2619 (2000).
- 14) Goto K., Tanaka Y., Matsumoto Y., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 1880-1883 (2008).
- 15) Matsumoto Y., Iwamoto Y., Matsushita T., Ueoka R., *J. Cancer*, **115**, 377-382 (2005).
- 16) Iwamoto Y., Matsumoto Y., Ueoka R., *Int. J. Pharm.*, **292**, 231-239 (2005).
- 17) Nagami H., Matsumoto Y., Ueoka R., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 380-381 (2006).
- 18) Komizu Y., Matsumoto Y., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131-6134 (2006).
- 19) Elworthy P. H., Macfarlane C. B., *J. Chem. Soc.*, **1962**, 537-541.
- 20) Ishiyama M., Shiga M., Sasamoto K., Mizoguchi M., Pin-gang H. E., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118-1122 (1993).
- 21) Acuff H. B., Carter K. J., Fingleton B., Gordon D. L., Matrisian L. M., *Cancer Res.*, **66**, 259-266 (2006).
- 22) Allen T. M., Hansen C. J., Martin F., Redemann C., Yan Y. A., *Biochem. Biophys. Acta*, **1066**, 29-36 (1991).