

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09903

研究課題名(和文) 生体内安定性及び腫瘍認識能の向上を目指した放射性ヨウ素標識ナノ粒子キャリアの開発

研究課題名(英文) Development of radioiodine-labeled nanoparticle carrier with in vivo stability and tumor recognition ability for nuclear medicine

研究代表者

山本 文彦 (YAMAMOTO, Fumihiko)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40253471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラクトソームはすぐれたステルス性と腫瘍認識能を有するナノキャリアであり、小動物PETやSPECTによるマウス腫瘍イメージングが可能である。一方で腫瘍集積速度は遅く、また放射性標識部位によってはラクトソームの体内動態を正確に反映しないことが懸念されるなどの問題点が明らかとなった。生体内でより安定な放射性標識ラクトソームを見出すとともに、短時間イメージングを達成するために腫瘍認識能を向上させるなど、ドラッグデザインに改善の余地があると考え、本研究では、生体内における安定なヨウ素標識ラクトソームの選定や表面に葉酸受容体リガンドを導入した放射性ラクトソーム合成と基礎評価を行った。

研究成果の概要(英文)：Lactosome is nanocarrier with stealth and tumor recognition ability. We reported previously a successful in vivo imaging of mouse tumor of radio-labeled Lactosome as the preliminary study with using small animal PET or SPECT. However, its tumor uptake rate was slow and there was a suspicion that the biodistribution of radioactivity did not reflect that of Lactosomes. As well as finding more stable radiolabeled lactosomes in vivo, improvement of drug design, such as high tumor recognition ability, is necessary in order to shorten the imaging time. In this study, we tried to find stable iodine-labeled lactosomes in vivo and synthesized radioactive lactosomes incorporating folate receptor ligand on its surface.

研究分野：放射性薬品化学、分子イメージング薬学

キーワード：分子イメージング 腫瘍 放射性標識 SPECT 創薬

1. 研究開始当初の背景

血中に投与した粒径数十~100nm のナノキャリアは増殖の速い腫瘍組織において、透過性が亢進した毛細血管系より漏出しさらにリンパ管排出系が未発達なことも手伝って、間質腔に蓄積することが知られる (EPR 効果)。放射性同位元素などのシグナル剤でナノキャリアを標識すれば、分子イメージングプローブとして有用性が期待でき、特に腫瘍の診断や治療精度の向上に寄与できると考えられる。しかしながら、在までに、分子イメージングのプラットフォームとして具体的に確立されているナノキャリアはない。

申請者らが開発中の新規ナノキャリア「ラクトソーム」は、疎水性部位としてポリ L-乳酸(PLLA)、親水性部位としてポリサルコシン(PSar)から構成される両親媒性ポリデンプペプチドの自己組織化により形成されるミセル粒子である。そのポリマー鎖長を変化させることにより粒径を制御でき、また生体内代謝機構により分解・代謝し毒性が低いと期待される。申請者らの先行研究において、ラクトソームは血中で安定した滞留性を示すことが明らかとなり(血中半減期 10~20 時間)、近赤外蛍光剤や短半減期核種 ^{18}F および ^{123}I 等で標識した 30nm の粒子の効率的合成法を確立するとともに、マウスの移植腫瘍組織に選択的に集積させ、肝臓同所移植がんの近赤外蛍光イメージングに世界で初めて成功し、小動物 PET および SPECT を用いたマウス実験腫瘍のイメージングにも成功した (Fig.1)。

さらに、ラクトソームは炎症病変部位にも集積したことから、腫瘍と炎症部位の画像診断識別法の可能性が期待された他、 ^{131}I 標識ラクトソームの炎症集積性の効果により、経皮的エタノール注入療法との併用が腫瘍治療効果を増大させることを動物実験により見いだした。

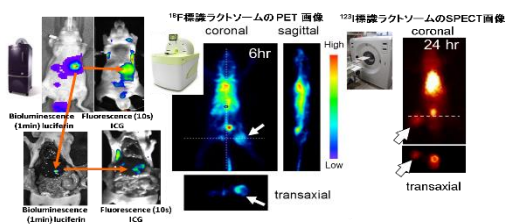


Fig.1 マウス腫瘍イメージング

その一方で、これまでの検討の結果、放射性ヨウ素標識ラクトソームは ^{18}F 標識ラクトソームの場合と異なり、投与後短時間において脾臓や甲状腺への放射能が集積することが認められた。詳細は検討中であるが、p-iodoBzPLLA を内包した放射性ヨウ素標識ラクトソームは、ラクトソームとしての体内動態を正確に反映していないことが懸念された。またラクトソームは腫瘍選択性は高いが、EPR 効果に由来する受動的輸送のため集積速度は遅いことがわかった。放射性ヨウ素標識ラクトソームは、 ^{18}F 標識ラクトソーム(p-

^{18}F -BzPLLA 内包)の代替化合物として開発された経緯があるため、生体内安定性の評価は検討したことがない。また細胞膜を透過する機能は付加していないため、腫瘍細胞内への移行はしないと予想される。このことから、生体内でより安定な放射性ヨウ素標識ラクトソームを見出すとともに、短時間でイメージングを達成させるために腫瘍認識能をさらに向上させるなど、ドラッグデザインに改善の余地があると考えている。

以上のことから、ラクトソームに導入する生体内安定性の高い放射性ヨウ素標識子を検討したり、ラクトソームに新たな機能を持たせるために、本体を構成する両親媒性ポリマーに放射性標識子や腫瘍認識能を有する官能基を導入する表面修飾型ラクトソームの新たなドラッグデザインが必要との着想に至った。

両親媒性ポリマーの PSar 末端に蛍光剤を標識した成功例があり、また申請者らの最近の予備検討により PSar への p-iodoBz 基の導入は原理的に可能であったことから、同様の手法で標識子、機能性ペプチド、官能基等のラクトソーム表面への導入は達成可能と考えられる。

2. 研究の目的

下記の 2 項目を実施し、生体内安定性及び腫瘍認識能を向上させたラクトソーム改良デザインについて分子イメージングプローブとしての可能性を明らかにすることを目的とした。

(1) 内包型標識ラクトソームにおける安定な放射性標識子の検討を行い、生体内における最も安定な最適構造を決定する。具体的には現在採用している p-iodo 標識子の構造異性体である o-iodoPLLA、m-iodoPLLA、さらに Bolton-Hunter 試薬やその類似標識子の放射化学を完成し、病態モデル等を用いた in vitro、in vivo 安定性を評価する。また本体を構成する両親媒性ポリマーの PSar 末端への放射性標識子を導入するための新たな改良型ラクトソームの放射化学を完成し、物性評価、動物生体内分布実験による安定性評価などを行う。

(2) ラクトソーム本体を構成する両親媒性ポリマーの PSar 末端への放射性標識子を導入の合成化学法を応用し、ラクトソーム表面への機能性ペプチド、受容体リガンドなどの導入を検討し、さらには放射性標識体を用いた基礎評価を行う。

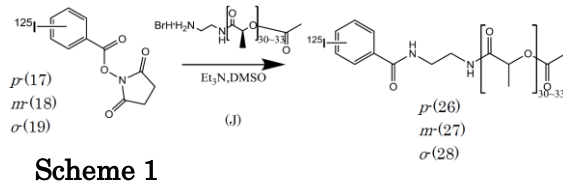
3. 研究の方法

基礎検討として ^{125}I を用いて検討した。内包型 ^{125}I 標識ラクトソームに組み込む ^{125}I 標識 PLLA について、3- ^{125}I -Bz 基、2- ^{125}I -Bz 基、Bolton-Hunter 試薬や用いた標識 PLLA を合成し、安定性評価を行った。表面修飾型 ^{125}I 標識ラクトソームとして両親媒性ポリマー PSar 末端に ^{125}I -Bz 基を導入する手法を検討

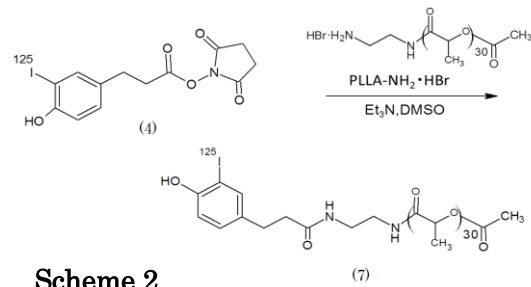
した。さらに機能性付加ラクトソームとして、両親媒性ポリマーPSar 末端に葉酸受容体リガンドの付加を行った。さらにその ^{125}I 標識を達成し、剖検法による *in vivo* 腫瘍認識能の基礎評価を行った。

(1) 標識位置が異なる内包型ヨウ素標識ラクトソームの合成と安定性評価

既に確立している 4- ^{125}I -BzPLLA 合成法に準じ、3- ^{125}I -BzPLLA、2- ^{125}I -BzPLLA の標識合成を行った。具体的には m-SIB, o-SIB の Sn 前駆体および ^{125}I 標識合成を達成し、それを用いて末端アミノ基を有する PLLA へ導入した (Scheme 1)。内包型標識ラクトソームは標識した PLLA と両親媒性ポリマーとをフィルム法によって行い、加温下において超音波照射 (42kHz, 50°C) して粒子化した。各標識ラクトソームについて *in vitro* および *in vivo* 安定性の違いを比較した。



タンパク質の放射性ヨウ素標識試薬である Bolton-Hunter 試薬など類似化合物を用いた標識 PLLA についても検討し (Scheme 2)、ラクトソームに内包して同様に安定性を評価した。以上の検討により最も脱ヨウ素代謝を受けにくい ^{125}I 標識位置を選定し、ラクトソーム標識子としての最適構造を検討した。

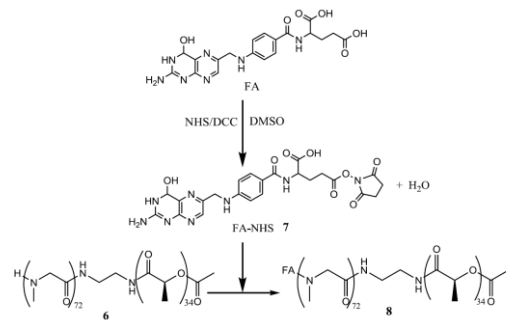


(2) 表面修飾型ヨウ素 ^{125}I 標識ラクトソームの合成法確立と機能性評価

両親媒性ポリマーの PSar 末端への ^{125}I -Bz 基導入の検討を行った。評価実験に十分な収率を得るために、温度、時間などとともに最適反応条件を確立した。用いる標識試薬は p-I-SIB をまず計画した。Cold 体では反応は進行していたにもかかわらず、標識合成スケールでは PSar 末端 NH への官能基導入は計画通りに進行しなかったため、最末端にグリシン NCA モノマー導入を行い、末端を NH₂ 基として導入を検討した。標識した両親媒性ポリマーについてはフィルム法により粒子化し、標識効率やラクトソームとしての物理化学的安定性を検討した。

(3) ラクトソーム表面への folate 基導入の検討と、腫瘍認識能の評価

多くの腫瘍細胞には葉酸受容体が過剰発現していることが知られており、葉酸で表面修飾したナノ粒子製剤が、がん標的リガンドとして期待されている。葉酸をラクトソーム表面に付加すれば、腫瘍表面に積極的に結合することが予想され、イメージング達成時間の短縮につながると期待される。PSar 末端へ葉酸基の導入について、葉酸の COOH 基を活性エステル化し、PSar 末端 NH 基に導入する方法を検討し達成した (Scheme 3)。また、 ^{125}I 標識 PLLA を folate 導入両親媒性ポリマーとともに粒子化して内包させ、腫瘍移植マウスにおける腫瘍認識能の評価を検討した。



Scheme 3

4. 研究成果

(1) 標識位置が異なる内包型ヨウ素標識ラクトソームの合成と安定性評価

ラクトソームに内包する標識子として、既存の 4- ^{125}I -BzPLLA (p 体) の他、3- ^{125}I -BzPLLA (m 体) および 2- ^{125}I -BzPLLA (o 体) の標識合成を達成した。それぞれの放射化学的収率は 27%、29%、29%であった。これらの標識子はどれも、95%以上がラクトソームに内包されることを確認した。

安定性評価としてマウスにおける 2 時間後の生体内分布を調べた結果、脱ヨウ素代謝の指標となる甲状腺への放射能集積が、p 体内包ラクトソームで 0.4%ID、m 体で 0.7%ID、o 体で 4%ID であった。この結果、p 体内包ラクトソームが最も脱ヨウ素代謝を受けにくいと示唆され、三つのうちではこれまで採用して

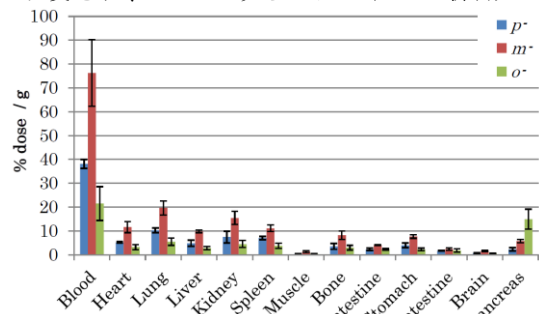


Fig.2 正常マウス(n=3-4)における ^{125}I -BzPLLA 内包ラクトソーム投与 2 時間の放射能分布

いた4-¹²⁵I-BzPLLA内包型ラクトソームが最も安定であることが示された (Fig. 2)。

また、Bolton-Hunter 試薬を用いた PLLA の放射性ヨウ素標識を検討した。その結果、放射化学的収率 66%で、ラクトソームに内包可能な ¹²⁵I 標識 HpPLLA を合成する方法を見出した。¹²⁵I 標識 HpPLLA は 95%以上がラクトソームへ内包されることを確認した。安定性評価としてマウスにおける 2 時間後の生体内分布を調べた結果、脱ヨウ素代謝の指標となる甲状腺への放射能集積が 15%IDであった。また同様に脱ヨウ素代謝の指標となる胃への分布も 44%dose/g と極めて高かった。このことから、生体内安定性は低いと考えられた (Fig. 3)。

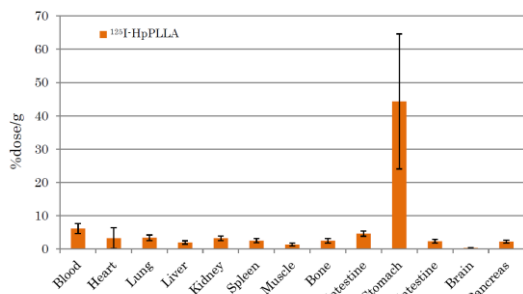


Fig.3 正常マウス (n=4) における ¹²⁵I-HpPLLA 内包ラクトソーム投与 2 時間の放射能分布

(2) 表面修飾型ヨウ素 ¹²⁵I 標識ラクトソームの合成法確立と機能性評価

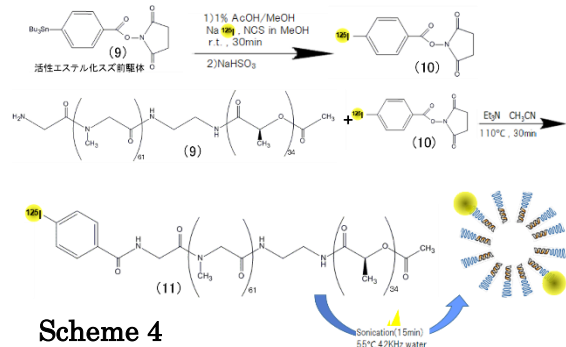
生体内安定性向上を期待して、従来の標識物内包型ではなく、ラクトソームを構成する両親媒性ポリマーへの放射性標識子の効率的導入を検討した。CoId 体では成功していた PSar 末端 NH 基への SIB の導入は、¹²⁵I-SIB を用いた標識合成のトレーサスケールでは反応の進行を認めなかった (放射化学的収率 0%)。そのため、親水性部末端を立体障害が少なくより反応性の高いと予想される一級アミン基である NH₂ 基にするために、PLLA₃₄-PSar₆₁ の PSar 末端 NH 基に 1 分子のグリシンを導入した。¹²⁵I-SIB と末端 NH₂ 両親媒性ポリマーとの反応は、アセトニトリル中 100°C で 30 分間反応させた条件で、溶媒流去後に水を加えて加温下で超音波照射を行い粒子化した (Scheme 4)。サイズ排除カラムを用いたフラクション解析の結果、UV 吸光度によりラクトソーム粒子の存在を示す同じフラクションに放射能を認めたことから、ラクトソームを構成する両親媒性ポリマーに ¹²⁵I 標識することに初めて成功した (Fig. 4)。標識率は 12%であった。

今後は、十分な量を得るためにより効率的な標識反応条件を詰め、精製方法を確立した上で、生体内安定性の評価を行う必要がある。

(3) ラクトソーム表面への folate 基導入の検討と、腫瘍認識能の評価

腫瘍認識性を目的としたナノ粒子への葉酸基導入は、最適な長さのスペーサーを紹介する

方法が報告されているが、本研究ではまずはスペーサーを介さずに直接両親媒性ポリマー末端への導入を目指した。PLLA₃₄-PSar₆₁ の



Scheme 4

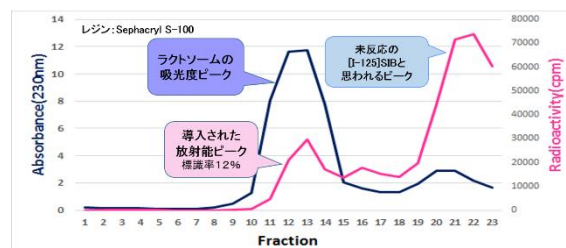
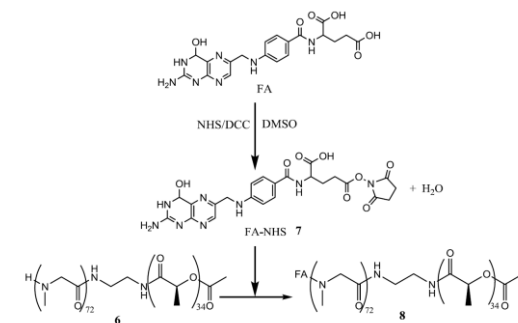


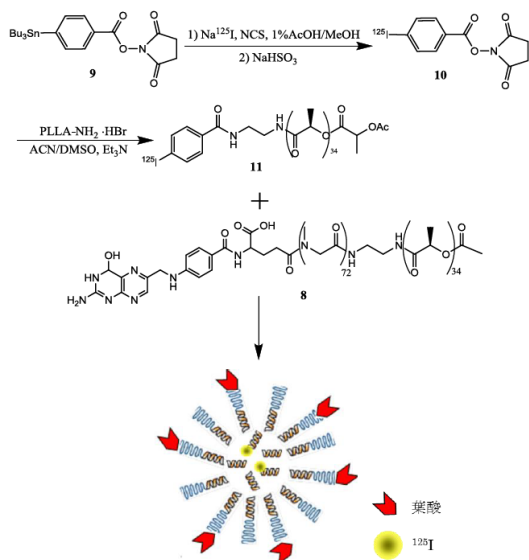
Fig.4 表面修飾型 ¹²⁵I 標識ラクトソームのサイズ排除カラムクロマトグラム

PSar 末端 NH 基に、別に合成した葉酸 N-ヒドロスクシミドを過剰量加え、DMSO 溶液中で反応させた。NMR 解析の結果、94%の修飾率で両親媒性ポリマーに葉酸基を導入した (Scheme 5)。さらに葉酸修飾ラクトソームに要時調製した ¹²⁵I 標識 PLLA を内包させる RI 標識化を検討した結果、放射化学的収率 6%で標識が可能であった (Scheme 6)。サイズ排除カラム解析の結果ラクトソーム粒子と同じフラクションに放射能を認め、葉酸標識ラクトソームの ¹²⁵I 標識体合成を達成した。再現性も高い条件であった。

得られた葉酸修飾ラクトソームについて、生体内における腫瘍認識能を調べた。葉酸受容体発現細胞として知られる KB 腫瘍を皮下に移植したマウスと、通常の腫瘍モデルとして colon26 腫瘍を移植したマウスを用い、要時調製した ¹²⁵I 標識葉酸ラクトソームを 5kBq ずつそれぞれ投与した。投与後、24 時間後の各組織への放射能分布を調べた結果、両腫瘍モデルとも肝臓と脾臓への放射能分布が最も高く、腫瘍への集積は低かった。従来のラクトソームであれば、colon26 皮下腫瘍に分布す



Scheme 5



Scheme 6

る一方で肝臓への集積は低いことから、ラクトソーム表面に葉酸を配することによりステルス性を失ったことが示唆された。KB 腫瘍と colon26 腫瘍への分布の差については、集積放射能の絶対値が低いこともあり、比較ができなかった。

これらの知見から、本創薬戦略の妥当性評価のためには *in vitro* 評価系を確立することが重要で、さらにステルス性を失わずに腫瘍認識能を向上させるためのラクトソーム表面への葉酸導入率の最適化の検討が今後必要となることが明らかとなった。

ラクトソームは SPECT 腫瘍イメージングを目的とした診断薬としての開発に加え、治療も行える「ラジオセラノスティクス」の可能性が期待できる基材でもある。今後、腫瘍への集積メカニズムの解明のほか、治療薬として開発するための *in vivo* 評価などを検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 山本文彦, 一腫瘍指向性ポリマーナノ粒子ラクトソーム— 核医学分子イメージングプローブとしての開発と展望, 東北医科薬科大学研究誌, 63, 21-43 (2016) 査読有

2. K. Kurihara, M. Ueda, I. Hara, E. Hara, K. Sano, A. Makino, E. Ozeki, F. Yamamoto, H. Saji, K. Togashi, S. Kimura, Inflammation-Induced Synergetic Enhancement of Nanoparticle Treatments with DOXIL® and ⁹⁰Y-Lactosome for Orthotopic Mammary Tumor, J. Nanopart. Res., 18, 137(2016), 査読有, DOI 10.1007/s11051-016-3448-4

他 3 件

[学会発表] (計 13 件)

1. 山本文彦, 新しいナノ粒子の腫瘍指向性 DDS 基材としての可能性 ~放射性分子イメージング剤開発とセラノスティクスへの展開~, 平成 29 年度佐賀県薬剤師会生涯学習 (佐賀市, 2017 年 6 月 24 日)

2. 山本文彦, ナノ粒子の特性を活かした核医学画像診断薬開発とセラノスティクスへの展開, 第 31 回東北医科薬科大学生涯教育講演会、要旨集 1-2 (仙台, 2017 年 3 月 4 日)

他 11 件

[図書] (計 2 件)

1. 山本文彦, サイエンスアイ新書シリーズ 知っておきたい化学物質の常識 8 4 , 左巻健男・一色健司編著 SB クリエイティブ(2016) ISBN978-4-7973-5689-2

2. 山本文彦, サイエンスアイ新書シリーズ 知っているとお心できる成分表示の知識, 左巻健男・池田恵一編著 SB クリエイティブ(2016), ISBN 978-4-7973-5690-8

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本文彦 (YAMAMOTO, Fumihiko)
東北医科薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 4025347

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

木村俊作 (KIMURA, Shunsaku)
京都大学・工学研究科・教授
研究者番号: 80150324

牧野 顕 (MAKINO, Akira)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・
准教授
研究者番号: 00566226

(4) 研究協力者

小関 英一 (OZEKI, Ei-ichi)
株式会社島津製作所・基盤技術研究所