

令和元年6月11日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10570

研究課題名(和文) Gd-DTPA-蛍光色素内包高分子ミセルによるMR蛍光イメージによる治療法開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic method by MR fluorescence image by Gd-DTPA-fluorescent dye loading polymeric micelle

研究代表者

貝田 佐知子 (Kaida, Sachiko)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：70710234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：Gd-DOTA/IR-820 polymerをMRI陽性造影剤のGd-DOTAと蛍光色素IR-820を結合させて作製し、特性を評価した。直径約30nmで生体内で安定しており、Gd-DOTAより約8倍のT1短縮効果を有していた。ラット肝細胞癌(N1S1)モデルを作成し、尾静脈に留置したカテーテルより同polymerを投与しMRIにより腫瘍への集積を経時的に測定するとともに、各臓器への蛍光色素の集積をPhotodynamic Eye(浜松ホトニクス社製)にて確認した。Gd-DOTA/IR-820 polymerはラット肝細胞癌モデルでは同濃度のGd-DOTA投与群に比べ有意な腫瘍造影効果を有した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織では新生血管の透過性亢進と不十分なリンパ系ドレナージのためにナノサイズの高分子薬物が集積しやすくなっている(Enhance Permeability and Retention: EPR効果)。この性質を用いた高分子ドラッグによるDrug Delivery System(DDS)が期待されているが、体内での薬物分布が不明であり副作用の懸念も大きい。今回の研究は、癌に対する安全で効果的な診断薬開発を目的とし、MRI造影剤と蛍光色素を含有した高分子ポリマーを独自に開発しvisible-DDSを可能とした。本技術を応用することで、今後さらに診断能力の高く無害な薬剤の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：Gd-DOTA / IR-820 polymer was prepared by combining the MRI positive contrast agent Gd-DOTA with the fluorochrome IR-820 and characterized. It was stable in vivo with a diameter of about 30 nm, and had an T1 shortening effect of about 8 times that of Gd-DOTA. A rat hepatocellular carcinoma (N1S1) model was prepared, the same polymer was administered from a catheter placed in the tail vein, and accumulation in the tumor was measured over time by MRI, and accumulation of fluorescent dye in each organ was determined by Photodynamic Eye (Hamamatsu Photonics). Gd-DOTA / IR-820 polymer had a significant tumor imaging effect in a rat hepatocellular carcinoma model compared with the Gd-DOTA administration group at the same concentration.

研究分野：消化器外科

キーワード：MRI造影剤 蛍光色素 drug delivery system polymer

1. 研究開始当初の背景

高分子ナノミセルは血管透過性が亢進した腫瘍組織に特異的に集積するEPR効果(Enhanced permeation and retention effect) 1)を有しており、癌治療に対するDDSとして期待されている。

滋賀医科大学外科学講座と東京大学工学部片岡-カブラル研究室は、過去の研究において、MR陽性造影剤であるGd-DTPA(ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸)と白金系抗癌剤のオキザリプラチンの誘導体であるダハプラチン(DACHPt)を同時に内包させた高分子ナノミセル(Gd-DTPA/DACHPt ナノミセル)を開発し、マウス膵癌(MiaPaca)モデル、ラット肝癌モデルにおいてMRI画像により高分子ミセルの腫瘍への集積とその治療効果を確認した。

このGd-DTPA/DACHPt ナノミセルはしかし、抗癌剤を内包する必要があり、DACHPtの薬剤単価が高額であること、および生体に及ぼす毒性から、ミセルに内包できる量が限られており、同じ比率で内包できるMRI造影剤の量も限定されてしまうという欠点があった。そこで、従来のDACHPtのスペースに疎水性を有するVitamin A(Retinol)を内包させることで、より高濃度かつ低毒性の高分子ミセルを作成する。本ミセルは分子構造上、MRI造影剤はGd-DOTA(ガドレル酸メグルミン)を使用するが、従来通り直径50nm程度となることが予想され、このサイズはEPR効果により腫瘍内に留まる大きさであり、腫瘍内に特異的に送達されたナノミセルをMRIにより確認することが可能である。さらにIR820(Near-infrared(NIR)蛍光色素)をポリマー親水基の最外側に付加することで、外殻に蛍光色素を有する高分子ミセルを作成する。これにより、従来は困難であった肝細胞癌の診断を、術前にはMRIで、術中には蛍光イメージにより肉眼による確認が可能になり、手術による切除もより安全に行うことが可能となる。

以上より、本助成研究による、ラット肝細胞癌モデルに対するGd-DOTA/IR820 ナノミセルの投与による診断効果の検討は、高度進行肝細胞癌に対するMR-Fluorescence Imageによる新規Drug Delivery System(DDS)診断法を開発するためには極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、従来のMRI造影剤を内包するミセルの核の部分に従来の抗癌剤ではなく無毒なVitamin Aを置換することで診断に特化した高分子ナノミセルを作成する。さらのその外殻に蛍光色素を付加して手術中にも腫瘍のナビゲーションとして使用しうる、すなわちMR画像と蛍光イメージによるMR-Fluorescence Imageによる新規Drug Delivery System(DDS)診断法を開発し、高度進行肝細胞癌への診断効果を検討するものである。

3. 研究の方法

【1. Gd-DTPA/IR820 内包高分子ナノミセルの作製】

Gd-DTPA/IR820 内包高分子ナノミセルを作製し、ナノミセルの基本的な特性を測定した。

【2. ラット同所性肝癌モデルおよび門脈腫瘍栓モデルの作製】

肝腫瘍モデルの作製:ラット肝癌細胞(KDH-8) 0.25ml(5×10⁸ 個/1ml)をラット(Wistar-King-Aptekman rat/male/50 匹/7-9 週齢)肝臓実質内に直接移植する、または、門脈内にラット肝癌細胞を直接投与する。移植後9日前後経過し、腫瘍が肝内にて1cm前後に発育させたものを使用する。

【3. MRI によるラット同所性肝癌モデルの評価】

3テスラMRI装置を用いT1WIにて以下の如く撮像する。

1. 尾静脈からのMR造影剤(Gd-DTPA)投与群
2. 動注群(肝動脈からMR造影剤(Gd-DTPA)投与)
3. コントロール群(尾静脈および肝動脈から同量の生食投与)
4. 以上の群それぞれの薬剤注射後、MRIを以下のスケジュールで撮像する。

薬剤注射前

薬剤注射後

Dynamic:30秒後、120秒後、5分後、10分後、30分後、

1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、24時間後、3日後、7日後、14日後

【4. 蛍光法によるラット同所性肝癌モデルの評価】

上記のうちMRI撮影評価の後、直ちに開腹し、蛍光イメージによる観察を行う。その後、肝臓を摘出し、組織学的評価を行う。

4. 研究成果

当初はGd-DTPA/IR820 ナノミセルを作成するも、構造上、ミセル内に内包できるMRI造影剤の量が限られてしまうという制限があった。さらに高分子ミセルは水溶液中で安定化するため、製剤化が難しいことも課題であった。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

そこで東京大学工学部カブラル研究室との共同研究で、MRI 造影剤である Gd-DOTA と蛍光色素である IR820 を含有する Gd-DOTA/IR820 ポリマーを独自に開発し、滋賀医科大学でその特性を評価した(図1)。その結果、以下の特徴を有する薬剤であることが判明した。

1. Gd がポリマーに結合することで分子量が大きくなり、MRI 造影剤としての造影効果を示す緩和能が約 8 倍に増加することが判明し、より少ない薬剤の投与量でより強い造影効果を有する画期的な造影剤として期待できる。
2. 血中で安定しており、血中滞留時間が長い。
3. 作製過程が容易であり(製剤化しやすい) 同型の薬剤を再現しやすい。
4. 製剤後フリーズドライ保存可能であり、輸送も容易で、溶解して使用できる。
5. ミセルは 20nm より小さいものは作製できないが、ポリマーであれば 20nm 以下のサイズも作製可能で PEG 鎖の長さを調整することで大きさを自由に調整できる。

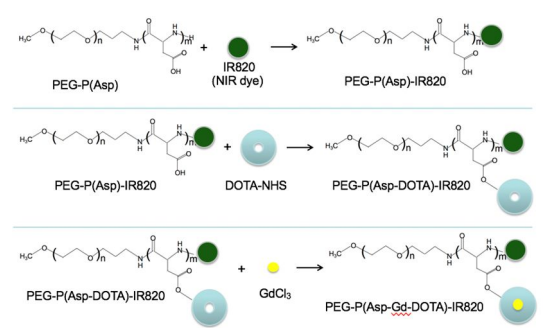


図1 Gd-DOTA/IR820 含有ポリマーの作製
MRI 造影効果が Gd-DOTA の約 8 倍となる。

以上の特性を有する Gd-DOTA/IR820 ポリマーを東京大学工学部 カブラル研究室で作成し、以下の動物モデルに投与して評価した。

ラット肝癌細胞(KDH-8) 0.25ml(5×10⁸ 個/1ml)をラット(Winstar-King-Aptekman rat/male/50匹/7-9 週齢)肝臓実質内に直接移植する、または、門脈内にラット肝癌細胞を直接投与する。移植後 9 日前後経過し、腫瘍が肝内にて 1cm 前後に発育させたものを使用した。

Gd-DOTA/IR820 ポリマーを投与したラットの MRI 撮像結果。

薬剤投与後もラットは長期生存した。また肝転移は徐々に造影され、造影効果は投与後 1 日で最強となり、その後 1 週間以上持続した。下大静脈内にも 1 週間以上の造影効果を認めた。

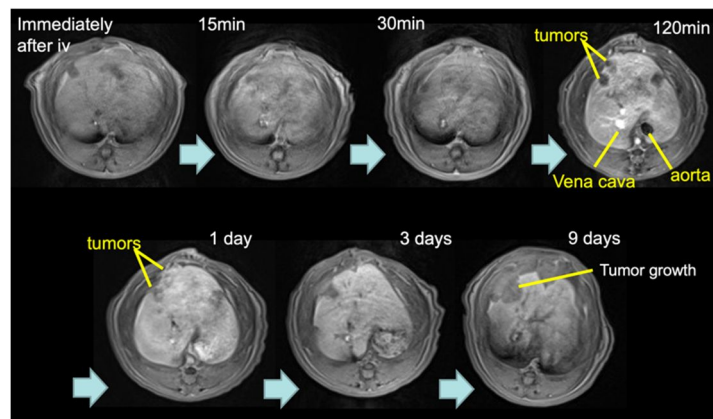


図2 Gd-DOTA/IR820 含有ポリマーを担癌ラットに投与した後の MRI 画像。投与後 1 日まで腫瘍の造影効果を認めた。

(参考文献)

1. 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 1986;46:6387-92.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 56 回 日本癌治療学会 (2018 年)

発表標題: 抗癌剤・MRI 造影剤内包高分子ミセル作成とその造影効果、制癌作用の検証

発表者名: 貝田佐知子

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：仲 成幸
ローマ字氏名：NAKA Shigeyuki
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：非常勤講師
研究者番号 (8桁)：10359771

研究分担者氏名：谷 眞至
ローマ字氏名：TANI Masaji
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号 (8桁)：60236677

(2)研究協力者

研究協力者氏名：オラシオ カブラル
ローマ字氏名：Horacio Cabral
所属研究機関名：東京大学
部局名：工学部
職名：准教授
研究者番号 (8桁)：10533911

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。