

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19877

研究課題名(和文)細胞機能調整技術を活用した放射性核種封入リポソームによる固形癌内用療法の最適化

研究課題名(英文) Optimization of Cellular Function Modifying Techniques for Therapy of Solid Tumor by using Radiolabeled Liposomes

研究代表者

濱道 修生 (Hamamichi, Shusei)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：60721686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍と正常組織におけるIn-111 ECやIn-111 DTPAを封入したリポソームの集積量を比較し、より腫瘍内集積を高める工夫を試みた。これらリポソームを複数のヒト腫瘍皮下移植マウスに投与し、体内動態を検討した。In-111 ECの網内系クリアランスには、網内系組織におけるリポソームの分解が極めて重要であった。また、In-111 EC DSPGリポソームを貪食させたRAW264細胞にトランスポーター阻害剤を添加し、どのトランスポーターがクリアランスに関与しているのかを検討した。さらに、エリブリンを前投与することにより、高分子であるリポソームの腫瘍内集積の増加が確認された。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study was to compare accumulation levels of radiolabeled liposomes (i.e., In-111 EC, In-111 DTPA, etc.) in the tumor and other major tissues, and determine a technique that allowed increased tumor accumulation. Through analyzing radiolabeled liposomes by using multiple human cancer xenograft mice, we determined their biodistribution patterns, as well as necessity of these liposomes to be properly degraded in the RES for subsequent release of RI-ligand complexes. We also examined which transporter might be involved in the clearance of In-111 EC from the RES by treating RAW264 cells with various transporter inhibitors after phagocytosis of In-111 EC DSPG liposome. In addition, we determined that anti-cancer agent eribulin possessed a capacity to increase microvessel density in the tumor, as well as enhance tumor accumulation of radiolabeled liposome and anti-tumor effect of Doxil (liposomal anti-cancer agent).

研究分野：核医学

キーワード：放射性核種封入リポソーム 放射性核種 リポソーム 固形がん 内用療法

## 1. 研究開始当初の背景

ラジオアイソトープ(RI)内用療法の治療効果は、RIのターゲット部位への高い集積量と正常組織への低い集積量により決定される。従来、RI治療薬は、RI固有の性質を活用し、ターゲット部位に特異的集積を示すRI(甲状腺がんに対するI-131等)を用いて、がん治療の開発が進められてきた。しかし、これらRIの薬物動態・薬物代謝は、RI自体の性質によるため、RI内用療法への利用には限界があった。このことから、標的指向性を持つペプチドやタンパク質などにRIを結合させ、RIをよりターゲット部位に効率よく集める方法が検討されてきた。

その著例のひとつがB細胞非ホジキンリンパ腫に対して有用性を示すゼヴァリン®である。この手法は、抗CD20抗体に、In-111(診断用RI)やY-90(治療用RI)を結合させ、In-111標識ゼヴァリン®の集積を画像として把握しつつ、Y-90標識ゼヴァリン®を用いて治療を進めるという診断治療一体型(theranostics)医療として注目されている。しかし、ゼヴァリン®対象となるリンパ腫は放射線感受性が高い一方、固形がんは一般的にリンパ腫より感受性が低い。

そこで、我々は固形がんを対象とするRI内用療法を成功させるためには、以下の条件が極めて重要と考えた。

RIの高い腫瘍内集積  
正常組織内における非特異的集積の低減

さらに、腫瘍と正常組織において、RI集積量の差が大きい程、RI内用療法による、より良い治療成績が期待できる。

## 2. 研究の目的

ナノキャリアのひとつであるリポソームは、主にリン脂質とコレステロールにより作製されており、毒性が低いことで知られている。さらに、enhanced permeability and retention (EPR)効果による高い腫瘍集積やリポソーム化による内包された抗がん剤の動態変化は、ドキシル®等に代表されるように、リポソーム化抗がん剤の実用化に向けて、極めて重要な要因であった。

我々は、これらリポソームの利点に着目し、リポソームに診断用RIを高率に封入する技術を開発した。次のステップとして、診断用RIから治療用RIに応用することで、治療用RIの高い腫瘍集積を試みている。

EPR効果による高い腫瘍集積が確認されている一方、ナノキャリアの特性として、リポソームは網内系組織(肝臓・脾臓)への非特異的集積も観察される。そこで、我々は、正常組織への非特異的集積の低減を目指し、リポソームの性質を制御するのではなく、リポソームに封入されたRI-リガンド錯体の性質に注目した。すなわち、我々が報告しているIn-111 ethylenedicysteine (EC)に代表されるように、リポソームが正常細胞に取り込ま

れ、リポソームが分解されてもRI-リガンド錯体は蓄積することなく、細胞外、並びに体外へと排出される新規リガンドの開発を進めている。

本研究では、腫瘍と正常組織におけるRI封入リポソームの集積量を比較し、より腫瘍内集積を高める工夫を試みた。例えば、腫瘍内血管を増加する因子の検討、あるいは遺伝子工学技術を用いて、腫瘍内リポソームの分解に關与するマクロファージ(Mφ)等の細胞機能の調整に着目した。

## 3. 研究の方法

まず、In-111 EC やコントロールとしてIn-111 diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)を封入したpolyethylene glycol (PEG)リポソームを作製した。ヒト腫瘍を用いた治療実験を想定し、ヒト腫瘍皮下移植マウスにPEGリポソーム(リン脂質量: 0.1-2 μmol)を投与し、γ-カウンターや*in vivo* SPECT/CT装置を用いて、PEGリポソームの体内動態を検討した。さらに、HPLC (gel permeation chromatography)を用いて、リポソーム(径100 nm)と低分子を分離することにより、腫瘍及び肝臓でのPEGリポソームの分解能を評価した。

ECによる網内系クリアランスの機序を検討するため、蛍光標識されたリポソームを投与した後、腫瘍並びに肝臓の組織学的解析を行った。また、ECクリアランスに、どのトランスポーターが關与しているか知られていない。そこで、トランスポーター阻害剤をRAW264細胞に添加し、In-111 EC DSPGリポソームを貪食させた後、細胞内In-111 ECの放射活性を測定することにより、In-111 ECクリアランスとの關連を検討した。

さらに、抗がん剤であるエリブリンを投与することにより、腫瘍内血管の増加を確認した。そこで、エリブリンを前投与した後、In-111 DTPA PEGリポソームを投与し、腫瘍内放射活性を測定した結果、放射活性の上昇が認められた。また、エリブリンを前投与した後、リポソーム化抗がん剤であるドキシル®を投与し、ドキシル®の薬効を評価した。

## 4. 研究成果

従来、リポソームの表面を抗体などで修飾することにより、高い腫瘍集積を試みた研究が報告されてきたが、これだけではRIの非特異的集積の改善には繋がない。我々は、細胞内に取り込まれたリポソームが分解され、リポソーム内に封入されていたRI-リガンド錯体が速やかに細胞外、並びに体外へと放出されることに注目し、リガンドの性質が重要な役割を果たすと考えた。さらに、腫瘍内と正常組織内のRI集積量の差を高めるため、リポソームの腫瘍内集積を高める工夫を試みた。

ヒト腫瘍を皮下移植した複数のマウスに、In-111標識されたECやDTPA等を封入した

PEG リポソームを投与し、体内動態を検討した。In-111 EC では網内系組織からの排出が確認された一方、In-111 DTPA では排出が見られなかった。また、新規リガンドの開発も進めており、In-111 EC のような網内系クリアランスを評価した。

HPLC (gel permeation chromatography) を用いて、PEG リポソームと低分子を分離し、腫瘍及び肝臓での PEG リポソームの分解能を検討した。網内系クリアランスが確認されている In-111 EC の場合、肝臓内における PEG リポソームの分解が In-111 EC の網内系クリアランスに重要な要素であることが分かった。

In-111 EC による網内系クリアランスの機序を検討するため、蛍光標識リポソームを投与した後、腫瘍や肝臓の組織学的解析を行った。リポソームは Mφ系細胞により貪食されていることが分かった。

また、RAW264 細胞に In-111 EC DSPG リポソームを貪食させ、細胞内に残る In-111 EC の放射活性を測定した。In-111 DTPA DSPG リポソームと比較して、In-111 EC DSPG リポソームを貪食した RAW264 細胞では放射活性の集積の低下が確認された。そこで、10 種類のトランスポーター阻害剤を添加し、どのトランスポーターが In-111 EC クリアランスに関与しているのかを検討した。これらの結果は、遺伝子工学技術を用いて、腫瘍内リポソームの分解に関与する Mφ等の細胞機能を調整する上で、極めて重要な知見であると考えている。

さらに、抗がん剤であるエリブリンを投与することにより、腫瘍内血管(CD31<sup>+</sup>血管)の増加を確認した。そこで、エリブリンを前投与した後、In-111 DTPA PEG リポソームを投与し、リポソームの腫瘍内集積を検討した。通常では約 3%AD/g の集積が見られた一方、エリブリン前投与により、約 6%AD/g まで集積の上昇が確認された。そこで、エリブリンを前投与した後、ドキシル®を投与し、ドキシル®の薬効を評価した結果、薬効の増強が認められた。これらの結果は、エリブリンが高分子であるリポソームの腫瘍内集積を増加させ、且つリポソーム化抗がん剤の薬効を増強させる因子であることを示している。

#### 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1件)

Ito K, Hamamichi S, Abe T, Akagi T, Shirota H, Kawano S, Asano M, Asano O, Yokoi A, Matsui J, Umeda IO, Fujii H. Anti-tumor effects of eribulin depend on the modulation of tumor microenvironment by vascular remodeling in mouse models. **Cancer Sci.** 2017 Sep 4. doi: 10.1111/cas.13392. Peer-reviewed.

[学会発表](計4件)

Umeda IO, Hamamichi S, Fujii H. Preferential tumor accumulation in mice bearing human head and neck cancer by using radionuclide-carrying liposomes aiming for radiotheranostics. **The 30<sup>th</sup> Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine**, Oct. 21-25 2017, Austria Center Vienna (Vienna, Austria).

Umeda IO, Hamamichi S, Fujii H. High tumor accumulation and rapid background clearance by using radionuclide-carrying liposome for targeted radionuclide therapy and theranostics. **Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Annual Meeting**, June 10-14 2017, Colorado Convention Center (Denver, USA).

濱道修生、梅田泉、藤井博史、伊藤憲、浅野誠、堀優作、岩田正夫、松井順二、船橋泰博. 放射性核種封入リポソームを用いたリポソーム化抗がん剤の薬効予測技術の開発 **第 86 回日本核医学会関東甲信越地方会**、2017年1月28日、富士フイルム(株)西麻布本社講堂(東京).

Hamamichi S, Matsuura Y, Ohnuki K, Umeda IO, Fujii H. SPECT/CT Imaging of <sup>111</sup>In-ethylenedicycysteine liposome demonstrates high tumor accumulation and rapid background clearance in a human cancer xenograft model. **World Molecular Imaging Congress**, Sept. 7-10 2016, The Javits Center (New York City, USA).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

国立がん研究センター・先端医療開発センター・機能診断開発分野

<http://epoc.ncc.go.jp/division/functional-imaging/>

6．研究組織

(1)研究代表者

濱道 修生 (HAMAMICHI, Shusei)

国立がん研究センター・先端医療開発センター・機能診断開発分野・研究員

研究者番号：60721686

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )