

令和元年6月27日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21130

研究課題名(和文) 診断と治療を行う新規光超音波-磁気共鳴イメージング分子プローブの創製

研究課題名(英文) Preparation of novel molecular probes for photoacoustic-magnetic resonance imaging and disease treatment

研究代表者

木村 祐 (Kimura, Yu)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90566027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身を非侵襲的に観察可能な磁気共鳴イメージングおよび高精細に3次元造影が可能な光音響イメージングを用いて、腫瘍組織の観察を行うための新規分子プローブ分子の合成および in vitro, in vivo における機能評価を実施した。さらに、表面修飾剤として使用したゼラチン分子に官能基導入を行い、効果的に抗腫瘍剤を内包するとともに、その効果を分子プローブでの腫瘍組織の観察を通して確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織を分子プローブにより磁気共鳴イメージングを用いて全身で非侵襲的に観察するとともに、光音響イメージングを用いて高精細に観察することができれば、微小な腫瘍組織の発見や診断確度の向上につながると期待される。さらに抗腫瘍剤を内包することで、腫瘍組織の縮小を行うことができれば、診断と治療を同時に行う新規セラノスティクス分子プローブとしての機能が期待でき、新規観察法および治療法として学術的および社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Novel molecular probes were prepared and their in vitro and in vivo function was evaluated for imaging of tumor tissues with magnetic resonance and photoacoustic dual imaging methods. Magnetic resonance imaging has advantages for noninvasive whole-body imaging and photoacoustic imaging has been developed as a promising three-dimensional imaging modality with high-definition. Through modification of gelatin as a surface modifier of probes, anti-cancer reagent was incorporated into the probes and the biological effect was confirmed by in vivo imaging of cancer tissue with contrast of the probes.

研究分野：生体材料学，有機化学

キーワード：イメージング 抗がん剤 造影剤 分子プローブ 腫瘍組織 磁気共鳴イメージング 光音響イメージング

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者は脂肪・骨組織、血管など、種々の生体組織に関する修復および再生条件の探索およびその評価を行い、効果的に組織再生を行うための足場材料・生体シグナル因子徐放材料合成を行ってきた。加えて最近では、様々な生体イメージング用造影剤の合成に取り組み、高分子デンドリマー型新規高感度 Gd-MRI 造影剤や多重共鳴 MRI 用高選択的分子プローブ (Kondo, T.; Kimura, Y.; Yamada, H.; Aoyama, Y. *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 555–568.), さらにナノ粒子型光音響-MRI デュアルイメージングプローブの合成 (Kimura, Y.; Kondo, T. *et al. Adv. Healthcare Mater.* **2012**, *1*, 657-660) に成功し、特許出願も実施している (特願 2010-202766, 特願 2012-52271)。一連の研究において、生体内での造影剤や薬物、材料の体内動態 (空間的、時間的) 制御、さらにそのモデル動物での評価に関する知見を深め、これらを応用する形で本研究では、ナノ粒子型光音響-MRI デュアルイメージングプローブに対して抗腫瘍分子等の治療薬剤を導入し、「診断」と「治療」を同時に、あるいは複合して行う “セラノスティクス” (Theranostics = 治療 Therapeutics + 診断 Diagnostics) に有効なプローブを合成する着想に至った。

現在までも、診断と治療を同時に行うためのナノ粒子は多く研究が行われている。しかし、二種類の診断方法に使用可能なデュアルイメージングプローブを用いてこのような研究を行った例はなく、申請者らの粒子を用いることで、より高確度な診断と治療を両立させることができる。本研究で用いる光音響イメージング (Photoacoustic Imaging, PAI) は、近年研究が盛んに行われている新しい診断モダリティであり、対象物に対してパルスレーザー光を照射し、熱膨張収縮により発生した光音響波 (超音波) を観測することで高解像度三次元像が得られる。蛍光観察に比べてより深部まで観察できることが特徴で、被爆の恐れもないことから腫瘍組織周辺部の微細構造を観察する手段として適している。一方磁気共鳴イメージング (Magnetic Resonance Imaging, MRI) は、全身を繰り返し撮像できるものの感度が比較的低く、造影剤投与直後の動態を観察することに対して有用であると考えられる。これらを組み合わせることで、双方の欠点を補うことが可能となる。

申請者らのグループで新たに合成した PA-MR デュアルイメージングプローブは、ポリオール法により合成した酸化ガドリニウムナノ粒子が溶媒であるジエチレングリコールを伴って形成されたものであり、水中でゆるやかに凝集するため、任意のタイミングでゼラチン水溶液を添加することで保護コロイドを形成し、サイズ調節された水分散可能なナノ粒子を形成することがわかっている。このため、表面修飾剤であるゼラチンの末端官能基を利用して種々の表面修飾が可能であり、実際に粒径の変化を伴わずに修飾が可能であることを確認している。この表面修飾過程において抗腫瘍剤を同時に存在させることで物理的相互作用を介してナノ粒子への内包が可能であると考えられ、簡便な方法で治療薬物の導入が可能である。

また、上記の凝集中にゼラチンを添加して安定な粒子を形成する際に粒径を任意の大きさに変化させられることも特徴であり、約 10~250 nm の直径をもつ種々の粒子が作製可能であることも明らかにしている。このような手法を用いた粒子形成は他に例がなく、保護コロイドとしてのゼラチンの効果が大きいことを示している。結果として造影剤としての利用、腫瘍集積の検討においても、種々の粒径を有するナノ粒子を用いて実験を行うことで、最適な条件を明らかにするために大きな利点を有していると考えられる。

このような検討のもとに合成された新規ナノ粒子は容易に表面性状、粒径、抗腫瘍剤導入量を変化させることができると考えられ、腫瘍組織への集積性、抗腫瘍効果を検討するために適しており、最適条件を早期に導き出すことができると考えられる。

2. 研究の目的

腫瘍組織の可視化および治療を目的として、申請者らのグループで開発したナノ粒子型新規光音響-磁気共鳴デュアルイメージング (PAI-MRI) 造影剤に対して抗腫瘍剤を導入し、集積率および治療効果を検討する。全身を簡便で非侵襲的に、かつ繰り返し観察が可能な MRI に加えて、高解像度に三次元像を構築可能な PAI を用いることで、全身スクリーニング後の局所詳細観察および治療効果の詳細な経時観察が可能になり、腫瘍組織切除術前に実施される化学療法において画期的なツールとなる診断-治療薬の開発につなげる。

3. 研究の方法

造影剤ナノ粒子への抗腫瘍剤の導入手法を明らかにし、導入効果を検討する。新規 PA-MR デュアルイメージングプローブ造影剤ナノ粒子へ抗腫瘍剤の導入反応を行い、物理的相互作用および化学結合を用いて、どのような種類の分子がどの程度導入可能か明らかにする。

具体的には、ジエチレングリコール (DEG) 中、塩基性条件下でのポリオール法により、水分散した Gd_2O_3 ナノ粒子を合成した。次に、ナノ粒子 (NPs) の水分散液に、別途合成した PEG

- コハク化ゼラチン (PEG: polyethylene glycol, MW_{PEG}: 10,000 , MW_{gelatin}: 5,000) の水分散液を加え, 室温で 12 時間攪拌した後, 未反応の PEG - コハク化ゼラチンを限外濾過 (MWCO: 50,000) により除去し

Gelatin-Gd-NPs を得た. 同様に PEG - コハク化ゼラチンと DOX・HCl との混合水分

散液を用いて Gd₂O₃-DEG NPs の表面被覆を行った後, 未反応の DOX および PEG - コハク化ゼラチンを限外濾過 (MWCO: 50,000) により除去し, DOX-Gd-NPs を得た (スキーム 1, 図 1). この際に, PEG を導入していないコハク化ゼラチン (Mw: 5,000) のみを用いる表面被覆では, 超純水中で凝集, 沈殿する Gd₂O₃ ナノ粒子が生成することがわかった.

得られた粒子への抗腫瘍剤内包量は, トリブシン-EDTA 存在下, DOX-Gd-NPs を 37°C, 1.5 hr 攪拌することでゼラチンを酵素分解したのち, 抽出液を高速液体クロマトグラフ (HPLC: ODS column, H₃PO₄aq (pH3.0): acetonitrile = 15:75 -> 0:100) で分離し, 紫外吸収分光法 (233 nm) にて測定した. また, 合成した DOX-Gd-NPs を生理食塩水に分散させ, 腫瘍細胞から分泌される細胞外マトリクス分解酵素 (MMP-2: Matrix Metalloproteinase-II) 共存下において, ナノ粒子からの DOX の放出挙動について検討した. 具体的には, 30 nM MMP-2 共存下, ナノ粒子生理食塩分散液を 37°C で 72 時間攪拌し, 経時的にサンプリングしたものを限外濾過により粒子および放出された DOX に分離し, HPLC にて定量を行った.

また抗腫瘍剤の効果を培養細胞, 担癌動物を用いて検討した. 具体的には, 作製したナノ粒子を HeLa 細胞へ添加して経時的に細胞増殖抑制効果を確認するとともに, MMP-2 阻害剤である TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2) 共存の有無が, 細胞増殖抑制効果に及ぼす影響も観察した.

さらに, 担癌マウスに対して静脈投与を行ったのち経時的に PAI ((wavelength =710 nm, laser strength = 2.1 mJ/cm²), MRI (7T, 20°C, TR/TE = 200/6.2 ms, FOV = 8 × 4 cm², Matrix = 256 × 128) slice thickness = 2 mm, and NA = 2.) 観察を行い, 腫瘍への集積とその後の腫瘍サイズの変化を観察した.

4. 研究成果

ポリオール法により合成した Gd₂O₃ ナノ粒子に, ゼラチンと DOX・HCl の混合水溶液を加え, 室温 12 時間攪拌することにより, DOX-Gd NPs を得た. 限外濾過による洗浄後, 粒子を分解し, 複合化された DOX を HPLC により定量した結果, 仕込量依存的に DOX 導入量が増加することが明らかになった (図 2). 合成した DOX-Gd-NPs を生理食塩水に分散させ, 腫瘍細胞から分泌される細胞外マトリクス分解酵素 (MMP-2: Matrix Metalloproteinase-II) 共存下において, ナノ粒子からの DOX の放出挙動について検討した. その結果, MMP-2 共存下では約 80% の DOX が放出されたのに対し, MMP-2 が共存しない場合には, DOX の放出は約 10% に留まった (図 3). この結果は, DOX-Gd-NPs では, ナノ粒子の表面被覆に用いたゼ

スキーム 1. DOX-Gd-NPs 合成

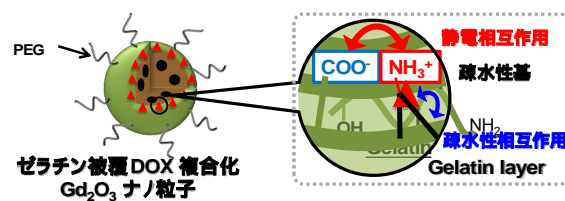
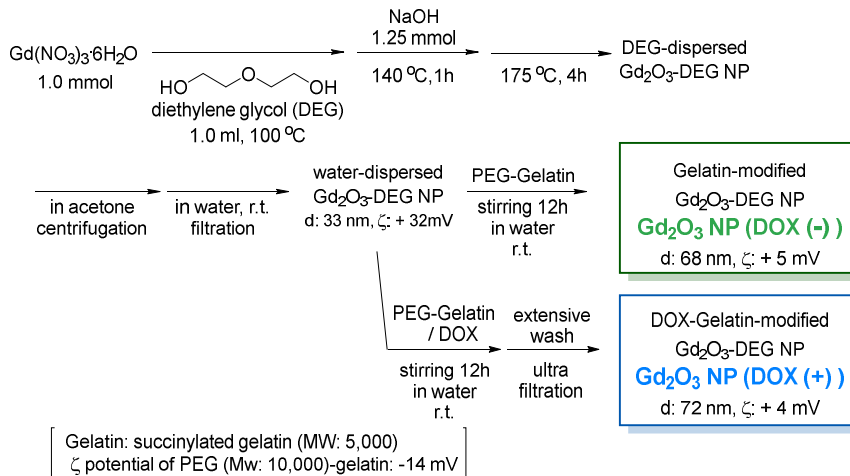


図 1. 合成した DOX-Gd-NPs の模式図

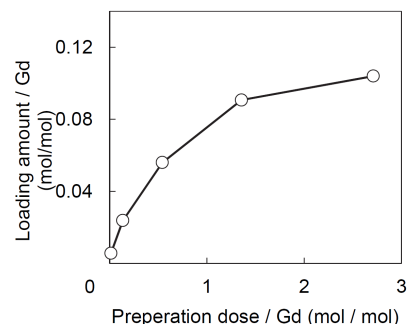


図 2. ナノ粒子への DOX 導入量

ラチンが MMP-2 により分解され DOX が放出されることを示している。従って、粒径を適切に制御した DOX-Gd-NPs を生体内に投与した場合には、EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect) により腫瘍部位に高集積し、腫瘍部位選択的に MMP-2 によるゼラチンの分解と DOX の放出が期待される。

表面修飾剤であるゼラチンに対して種々の官能基導入反応を行った結果、無水コハク酸を結合させた場合に効率よく抗腫瘍剤であるドキソルビシン塩酸塩が相互作用し、造影剤ナノ粒子に導入されることが明らかとなった。このことから、静電相互作用および疎水性相互作用により、抗腫瘍剤が造影剤ナノ粒子表面被覆剤と相互作用し複合化したと考えられる。

次に、DOX-Gd NPs の PAI および MRI 造影剤としての有効性について検討した結果、MRI でのプロトン (^1H) 緩和能を表す r_1 は、臨床用造影剤である Magnevist[®] よりも大きく (図 4)、さらに、近赤外パルスレーザー光 (710 nm, 100 μJ , 10 Hz, $\Delta t \sim 20$ ps) の照射により、光音響信号が観測されたことから、DOX-Gd NPs は PAI および MRI のいずれにも有効な造影剤であることが明らかとなった。また、Hela

細胞を用い、殺細胞効果を検討した結果、DOX-Gd NPs の暴露群では、MMP-2 依存的に Hela 細胞の生存率が顕著に減少し、その殺細胞効果と半数阻害濃度 IC_{50} いずれも DOX 単体の水溶液の暴露群とほぼ同じ値を示したことから、DOX-Gd NPs のセラノスティクスプローブとして有効性が示された (表 1)。

In vivo における効果発現には体内動態の検討およびさらなる向上が必要とされたことから、血中半減期延長を含む腫瘍集積性の向上を目的として、表面修飾剤の検討を行った。その結果、表面修飾剤として使用しているゼラチン分子に対してポリエチレングリコール (PEG) を導入したところ、血中半減期の延長を伴い体内動態が向上することがわかった。

担癌マウスを用いて、粒径を適切に制御した DOX-Gd-NPs を投与し、経時的に MRI および PAI 造影を行ったところ、いずれの造影法においても観察可能であり、さらに腫瘍組織のサイズ計測によって、導入した抗腫瘍剤の効果が発現していることが明らかとなった (図 5)。このことから、複数の画像化法を用いることでより精確な検出が可能となり、さらに造影後に抗腫瘍効果も併せもつ、効果的なセラノスティクス用材料の合成指針を得ることができた。これにより、切除手術前に行う術前化学療法を造影剤による観察とともに行うことができ、さらに切除前に PAI によって腫瘍組織の詳細な構造、サイズが明らかになることから、術前ナビとしての機能も果たし、これまでの方法に替わる新たな手法になりえるものであると考えられる。

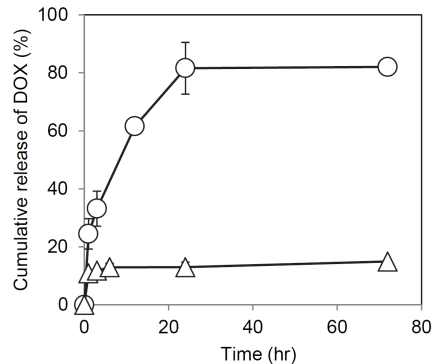


図 3. ナノ粒子からの MMP-2 依存的 DOX 放出挙動 (○: MMP-2(+), △: MMP-2(-))

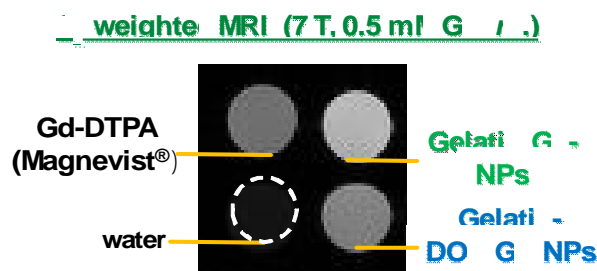
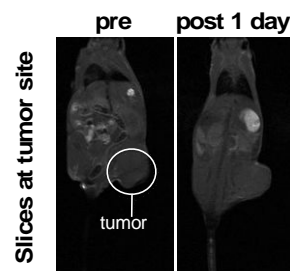


図 4. 造影剤水分散液の T_1 強調 MR 像

表 1. DOX-Gd-NPs の細胞増殖抑制作用

	DOX	Gd ₂ O ₃ NP DOX (+)	Gd ₂ O ₃ NP DOX (-)
IC_{50} (DOX)	0.83 μM	3.5 μM	-
IC_{50} (Gd)	-	0.047 mM	0.35 mM



	Liver	Kidney	Tumor
Gd (% ID) / tissue(g) by AAS	11	1.9	0.96
SI ratio (post 1day / pre) by MRI	0.950	1.12	1.16

AAS: atomic absorption spectrometry

図 5. DOX-Gd-NPs 投与後の T_1 強調 MRI 像および原子吸光度計 (AAS)・MRI での信号強度比による臓器への Gd 集積量測定

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

1. 木村祐・今井悠太・今井宏彦・松田哲也・孫安生・近藤輝幸, セラノスティクスを目指した抗癌剤複合化 酸化ガドリニウムナノ粒子の合成, 日本分子イメージング学会 第 12 回学会総会・学術集会, 2017 年
2. 木村祐・今井悠太・今井宏彦・松田哲也・孫安生・近藤輝幸, ドキソルビシン複合化酸化ガドリニウムナノ粒子の合成と セラノスティクスへの応用, 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 2017 年

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 今井悠太

ローマ字氏名: Yuta Imai

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。