

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20122

研究課題名(和文)がん集積/クリアランス多段階制御システムによる革新的核医学セラノスティックス創成

研究課題名(英文) Innovative radio-theranostics by multi-step control system of tumor accumulation and background clearance

研究代表者

梅田 泉 (Umeda, Izumi O.)

東京大学・カブリ数物連携宇宙研究機構・特任研究員

研究者番号：40160791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：核医学セラノスティックスの実現には標的組織に治療十分量の放射性核種(RI)の集積と正常組織集積の極力低減が重要であるが、その両立は難しい。本研究では迅速クリアランス能を持つRI-配位子錯体を見出し、これを標的指向性をもつリポソームに封入し、リポソームとして標的である腫瘍に集積させる一方で、肝臓などでリポソームが壊されることを利用して、放出後のRI-配位子錯体を迅速に排泄に導くという多段階制御システムを構築した。実際に核医学治療用核種であるCu-64/67を用いて、腫瘍への高集積と正常組織からの迅速クリアランスの両立を実現できた。新しい核医学セラノスティックスの実現に向け、大きな一歩と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最終目的は浸潤や転移に至った進行がんをも治療可能な革新的がん治療法の創出である。近年早期がんの治癒率は大きく向上したが、浸潤や転移を来した進行がんは未だ根治は難しい。放射性核種を含む化合物を患者に投与し、標的である腫瘍に集中して集積させ、放出放射線の強い殺細胞効果で直接癌細胞を死滅させる内用療法、さらに診断と治療を融合させた核医学セラノスティックスは次世代がん治療として期待されている。本研究の成果は核医学セラノスティックス実現を強力に推進するものであり、がん治療成績向上に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：The successful radio-theranostics requires to accumulate radionuclides (RI) in the target tissues with therapeutically enough amounts and to reduce normal tissue accumulation as much as possible, but it is hard to achieve both at the same time. In this study, we created RI-ligand complexes with rapid clearance ability, encapsulated them in liposomes with targeting property, and accumulated them as liposomes in the target tumors. On the other hand, we also succeeded to prompt the RI-ligand complexes clearance, by utilizing that liposomes were taken up and broken by the liver rapidly. RI-ligand complexes were released from liposomes and excreted to the urine. In this way, we constructed a multi-step control system of tumor accumulation and background clearance. Using Cu-64/67, which are used in radionuclide therapy, we were able to achieve both high accumulation in tumor and rapid clearance from normal tissues. The new radio-theranostics are promising.

研究分野：核医学

キーワード：セラノスティックス がん 核医学治療 核医学画像診断 クリアランス 放射性核種

## 1. 研究開始当初の背景

がんは本邦の死因第1位の疾病であり、日本人の3人に1人ががんで死亡している。多くの取り組みが功を奏し、早期がんの治癒率は大きく向上したが、浸潤や転移を来した進行がんの治療成績は現在も不良である。根治的手術や放射線治療は困難で、現在では化学療法(抗がん剤)が主となるが、根治は難しい。また化学療法は副作用が強く、体力が落ちた患者や高齢患者は治療に耐えられないことも多い。

医療において放射性核種(RI)あるいはRI標識薬剤を患者に投与し、放出される放射線を利用して診断や治療を行う領域が核医学である。ガンマ線は透過性が高く、体内分布を体外から検出可能で、画像診断に汎用される。一方、 $\alpha$ 線や $\beta$ 線は、RIの分布位置から極く短い距離(<1 mm)にのみ届き、強い殺細胞効果を示す(RI内用療法)。がん病巣のみにRIを集中させることができれば、上述のような全身転移に至った患者にも適用可能な理想的ながん治療薬となり得る。さらに、両者を巧みに利用すれば、薬剤の分布を画像として捉えながら治療を行うことが可能になる。薬剤の病巣到達や治療応答性、正常組織分布による副作用の恐れなどを迅速かつ確実に評価出来る。現在抗がん剤の薬効はがんの縮小で評価され、評価確定には長時間を要すが、この手法により短期間評価が可能となる。進行がんの患者にとって極めて有用である。この手法は治療(therapy)と診断(diagnos tics)の融合、セラノスティックス(theranostics)と呼ばれ、次世代のがん治療として大きな期待が寄せられている。しかしながら現時点では、内用療法・核医学セラノスティックスの臨床導入はごく僅かに留まる。治療を可能にするには、癌細胞を完全に死滅させる十分量のRNを標的的病巣に集中させる一方で、無用の被ばくを避けるため、正常組織への集積をできる限り低減する必要があるが、両者はトレードオフの関係にあり、両立させることは極めて難しい。この難問を解決する新しい手法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は浸潤や転移に至った進行がんをも治療可能な、革新的がん治療法の創出である。上述の2つの課題を両立できる新しい核医学内用療法・核医学セラノスティックス手法の開発によって目的達成を目指す。核医学で用いられる従来の薬剤は標的指向性分子と核種を一体化しており、そのためにその体内動態は標的指向性分子の性質のみに依存する。本研究では、核医学で用いる多くの核種が金属元素であることを利用し、核種と錯体を形成する配位子を工夫するなどして、薬剤に核種の体内動態を制御するシステムを複数組み込み、核種の腫瘍集積と正常組織からのクリアランスを多段階的に制御するシステムの構築を企画した。

また、治療用核種はこれまで世界的なレベルで製造がわずかであり、入手困難であったために、化学的反応性など基礎的な検討がほとんどなされていない。錯体の形成や安定性は元素によって大きく異なる可能性があるため、安定同位体の利用も含め、実際に治療用核種を用いての知見を収集することも大きな目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 安定同位体とHPLCを用いての金属イオン-配位子錯体形成・安定性評価システムの構築

HPLCシステム(島津 Prominence)とエアロゾルベース検出器(資生堂NQAD)およびガンマ線検出器(Raytest Gabi)を用いた。試薬は特級以上、溶媒はLC/MSグレードのものを用いた。

(2) 放射性核種体内動態の多段階制御システムの構築

リポソームはDSPCとコレステロール(モル比2:1)を構成脂質として薄膜法で調製し、エクストルーダーで粒子径を100-120 nmとした。担がんマウスモデルはSarcoma180細胞をddYマウス大腿部皮下に移植して作成した。 $^{64}\text{Cu}$ は短寿命RI供給プラットフォームより供給を受けた。

## 4. 研究成果

(1) 安定同位体とHPLCを用いての金属イオン-配位子錯体形成・安定性評価システムの構築

従来の核医学プローブ開発では、標的指向性分子に二官能キレート試薬と呼ばれる架橋剤を用いて直接放射性核種を結合させることが一般的で、その場合、核種の動態は標的指向分子に依存する。本研究では、この結合に幾つかの工夫を挟むことで核種の動態を多段階に調節することを企画した。この目的のためには最終的には治療用核種である $^{64/67}\text{Cu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ などでの検討が必要であるが、これらの核種の入手が難しいことから、まずこれらの安定同位体を用いて、DOTAやNOTA、およびその誘導体などの配位子との錯体形成能や安定性を評価出来る系の構築を試みた。

配位子およびその金属錯体は水溶性が高いことが多く、通常のODSカラムでは分析が難しい。またUV吸収がない場合は検出も難しい。そこで本研究ではエアロゾルベース高感度検出器を用い、金属イオン、配位子、その配位錯体の三者を検出する分析法の開発を行った。種々の検討の結果、高極性化合物を保持できるODSカラム(ADME)とイオン交換カラムを組み合わせ、溶出液を最適化することで三者の分離検出に成功した。ピーク位置はLC/MS および $^{111}\text{In}$ 放射活性で

検証した。ピーク面積による定量も可能であった(検出 0.5-5 nmole/5  $\mu$ L)。さらにこの条件を基に検討を加え、DOTA、 $Y^{3+}$ 、Y-DOTA および NOTA、 $Cu^{2+}$ 、Cu-NOTA の分析条件なども確立した。

## (2) 放射性核種体内動態の多段階制御システムの構築

核医学治療のためには、第一に標的部位への治療十分量の RI 集積が必須である。そこでまず、抗体に RI を繋ぐ系とナノキャリアであるリポソームに RI を封入する系を比較検討した結果、腫瘍への集積率は同等もしくは抗体の方が優れていたが、1度に投与できる RI 総量はリポソームの方が大きく、治療にはリポソームの方が望ましいと考えられた。

次に、腫瘍への高い集積性と正常組織からの迅速なクリアランスを両立させるため、第一段階でリポソームの腫瘍集積性を利用して腫瘍に RI を集積させ、次段階で RI-配位子錯体の性質で正常組織からのクリアランスを向上させることを検討した。治療用核種は入手が困難であったが、研究期間中に短寿命 RI 供給プラットフォームより  $^{64}Cu$  の供給を受けることができたため、Cu を中心に検討を進めた。

### Cu-配位子錯体のリポソームへの封入方法の検討

まず Cu の安定同位体を用いてリポソーム封入条件を検討した。リポソーム内に予め水溶性配位子を封入しておき、一方で RI-脂溶性配位子錯体を形成させて、それらをインキュベーションすることで、錯体交換反応によって Cu をリポソーム内に水溶性錯体として封入することを試みた(リモートローディング法)。脂溶性配位子としてはこれまで In などに用いていたオキシンが使用可能であることが明らかになった。水溶性配位子として DOTA を用いた場合、室温 30 分のインキュベーションでリポソーム内に Cu-DOTA が形成されており、In より緩和な条件であった。次に安定同位体で決定した条件をもとに放射性同位体  $^{64}Cu$  を用いての検討を実施した。実際の核医学治療を視野に入れ、安定同位体をキャリアとして添加することで、治療に十分量の  $^{64/67}Cu$  のリポソーム封入について検討を加えた。リモートローディング封入条件を検討した結果、リポソーム内部に DOTA、TETA、NOTA および EC (ethylenedicysteine) を含むリポソームに対して、40-30 分のインキュベーションで、いずれも 90%以上の封入が可能となり、核医学治療に適用可能と考えられた。得られた  $^{64}Cu$  封入リポソームを分解して HPLC 分析の結果、リポソーム内に  $^{64}Cu$ -DOTA、 $^{64}Cu$ -TETA などの錯体として封入されていることが確認できた。

### $^{64}Cu$ 封入リポソームの担がんマウスにおける体内動態の検討

上記で得られた種々の  $^{64}Cu$  封入リポソームを担がんマウスに投与し、投与後の体内分布を検討した。腫瘍集積はいずれの  $^{64}Cu$  リポソームでも 5-10%投与量/g と良好であった。一方、投与 24 時間後の肝臓や脾臓の集積は用いた配位子によって影響を受けることが明らかとなった。 $^{64}Cu$ -EC リポソーム投与群において他より有意に低い結果を得た。結果として、高い腫瘍集積と正常組織集積低減の両立が実現できた。肝臓などでリポソームが壊されたのちに、放出された  $^{64}Cu$ -EC が迅速にクリアランスされた結果と推定している。EC の  $^{99m}Tc$  錯体は腎臓から速やかに排泄され、腎機能診断薬として開発された経緯があり、EC は種々の RI を迅速に体外に排泄する性質をもつと推察された。

## (3) 結論

核医学治療にも十分な量の  $^{64/67}Cu$  をリポソームに封入する方法を確立し、配位子錯体との組み合わせによって、腫瘍への十分量の集積と正常組織集積低減の両立を可能にした。これらの結果より、本システムによる核医学治療、核医学セラノスティックス実現は大いに期待できると考える。

## 謝辞

$^{64}Cu$  は新学術領域研究リソース支援プログラム「短寿命 RI 供給プラットフォーム」の採択課題として供給されたものであり、関係各位に深謝いたします。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梅田泉、浜根友仁子、山盛智子、海老原未知子、大貫和信、藤井博史
2. 発表標題 Radiotheranostics製剤としての <sup>64</sup> Cu封入リポソームの調製と体内動態の検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田泉、山盛（森田）智子、浜根友仁子、海老原未知子、大貫和信、藤井博史
2. 発表標題 放射化学錯体とDDS技術を融合したradio-theranosticsシステムの構築
3. 学会等名 第14回日本分子イメージング学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田泉
2. 発表標題 分子イメージングとDDS
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 I. O. Umeda, T. Morita, Y. Hamane, K. Ohnuki, H. Fujii
2. 発表標題 Cu-64-carrying liposomes for radio-theranostics.
3. 学会等名 World Molecular Imaging Congress 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Izumi O. Umeda and Hirofumi Fujii
2. 発表標題 Development of unique liposomal agents as a radio-theranostic platform
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田 泉、森田智子、浜根友仁子、大貫和信、柳下淳、武田伸一郎、高橋忠幸、藤井博史
2. 発表標題 ラジオセラノスティック製剤を目指した放射性リポソーム
3. 学会等名 第59回日本核医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田 泉
2. 発表標題 放射錯体化学とDDSを応用した 核医学分子イメージングとradio-theranostics
3. 学会等名 日本分子イメージング学会第13回学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅田 泉、濱根友仁子、白石俊介、藤井博史
2. 発表標題 Radio-theranosticsプラットフォームとしての 放射性核種-配位子錯体封入リポソーム
3. 学会等名 日本分子イメージング学会第13回学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白石俊介、福原武志、濱道修生、瀬田康生、梅田泉、藤井博史
2. 発表標題 DDS指向性抗体を修飾した高濃度RI充填リポソームの設計と評価
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 I. O. Umeda, Y. Hamane, H. Fujii
2. 発表標題 Efficient encapsulation of therapeutic radionuclides in liposomes based on analysis of radionuclide- chelating ligand complex formation
3. 学会等名 Annual Congress of European Association of Nuclear Medicine 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅田 泉
2. 発表標題 がん集積ノクリアランス多段階制御システムによる 腫瘍イメージングと核医学セラノスティクス
3. 学会等名 10th バイオメディカルインターフェース・ワークショップ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田 泉、藤井 博史
2. 発表標題 放射錯体化学とDDS先端技術を駆使した新規核医学治療法 / radio- theranosticsの開発
3. 学会等名 Biomedical Interface Workshop2018 バイオメディカルインタフェース・ワークショップ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅田 泉、瀧根 友仁子、白石 俊介、藤井 博史
2. 発表標題 金属イオンとコンプレクサンおよびそれらの錯体の分離・定量解析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	花岡 健二郎 (Hanaoka Kenjiro)  (70451854)	東京大学・薬学研究科・准教授  (12601)	
連携研究者	福原 武志 (Fukuhara Takeshi)  (20359673)	順天堂大学・医学部・准教授  (32620)	
連携研究者	藤井 博史 (Fujii Hirofumi)  (80218982)	国立がん研究センター・先端医療開発センター・分野長  (82606)	