

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15609

研究課題名（和文）転移性がんの核医学診断・治療を可能とするCD36標的リポソーム製剤の開発

研究課題名（英文）Development of CD36-targeted liposomes for nuclear medicine diagnosis and treatment of metastatic cancer

研究代表者

宗兼 将之（Munekane, Masayuki）

神戸薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：80804806

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：転移性がんの核医学診断（Diagnostics）と薬物治療（Therapeutics）を同時に可能とするセラノステイクス（Theranostics）ナノ粒子を構築した。すなわち、がんの転移に必須の分子であることが明らかにされたCD36に高親和性を示す酸化リン脂質を含有するリポソームを作製し、核医学診断用放射性同位元素であるIn-111による標識、低分子抗がん剤であるドキソルビシンの封入を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国のがん罹患者数、死亡者数が増え続けている大きな要因として、がん細胞の発生臓器から遠隔臓器への移動（がん転移）が挙げられ、本研究ではがん転移において重要な役割を果たすCD36を標的としたセラノステイクスナノ粒子の構築を行った。転移性がんの診断・治療法の開発は、わが国の医療福祉に大きく貢献するものであり、本研究で得られた基礎的なデータは、転移性がんの診断・治療を志向した新規セラノステイクスナノ粒子の開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The nanoparticles for theranostics of metastatic cancer were constructed, that enables both nuclear medical imaging and drug therapy. In particular, the liposomes comprising oxidized phospholipids, which possess high affinity for CD36, were successfully prepared, radiolabeled with In-111 in high radiochemical yields and purities, and encapsulated low-molecular cancer drug doxorubicin with high encapsulation efficiency.

研究分野：分子イメージング

キーワード：CD36 リポソーム セラノステイクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん治療は目覚ましい進歩を遂げているが、わが国のがんの罹患者数、死亡者数は増え続けている。この要因として、がん細胞の発生臓器から遠隔臓器への移動(がん転移)が挙げられる。しかしながら、ほとんどのがんにおいて、転移の引き金となる細胞が同定されておらず、そのために転移抑制治療薬の開発が難題となっていた。それに対し近年、長鎖脂肪酸や酸化LDLの受容体であるCD36を高発現する細胞群の転移能が高く、担癌マウスに対して脂肪酸を投与することでがんの転移が促進され、抗CD36抗体を投与してCD36を遮断することでがんの転移が抑制されることが見出された(*Nature*, 2017, 541, 41)。また臨床における様々ながんにおいて、CD36の発現ががんの転移能や予後不良と相関していることが報告されている(*Sci. Rep.*, 2016, 6, 18669)。そのため、がん細胞におけるCD36の発現変化を観察できれば、多種のがんに対して転移能や転移箇所の評価が可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、生体分子の発現量を生物が生きたままの状態で見える分子イメージング技術に着目し、全身をスクリーニングできる核医学診断技術を用いてがんの位置を特定するとともに、CD36の発現量からがんの転移能を評価できる手法の開発を行う。具体的には、CD36に高親和性を有することが報告されている酸化リン脂質(*J. Biol. Chem.*, 2002, 277(41), 38503)を用いてリポソームを作製し、放射性同位元素で標識することで、CD36の発現量に応じた集積を示す新たな診断薬を作製する。さらに、リポソーム内に抗がん剤を封入することで、がんの診断(Diagnostics)と治療(Therapeutics)を同時に行えるセラノスティック(Theranostics)ナノ粒子の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) CD36および蛍光タンパク質強制発現細胞の樹立

酸化リン脂質含有リポソームのCD36への特異的な取込みを評価するためにCD36を強制発現させた細胞株(CD36+細胞)をトランスフェクション法により樹立した。その際、転移がんの位置を評価するために蛍光タンパク質も同時に発現させた。具体的には、24 well plateにヒト乳癌細胞MDA-MB-231細胞を1 wellあたり 1×10^5 個播種し、一晚インキュベート後、CD36及びOFPSpark(蛍光タンパク質)をコードするDNAと遺伝子導入試薬を添加し、37°C5%CO₂下でインキュベートした。3-4日インキュベート後、蛍光タンパク質の蛍光を指標として無限希釈法により遺伝子導入細胞を選別した。選別した細胞は免疫蛍光染色によりCD36の高発現を確認した。ネガティブコントロールとして、蛍光タンパク質のみを強制発現させたCD36細胞も併せて樹立した。

樹立した細胞をヌードマウスに皮下移植して担がんマウスを作製し、がん由来の蛍光をマルチスペクトルCCDカメラで検出した。

(2) 酸化リン脂質含有リポソームの作製

有機溶媒に溶解した脂質(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)または1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC)とコレステロールに一定割合の1-(palmitoyl)-2-(5-keto-6-octene-diyl)phosphatidylcholine(KODiA-PC:酸化リン脂質))を混合し、有機溶媒を減圧留去した後、水溶液により水和した。水和後に凍結融解、100 nmのポリカーボネート膜を用いたエクストルージョンを行うことで、~100 nmの一枚膜のリポソームを作製した。In-111(¹¹¹In)の標識には、脂質膜に1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-diethylenetriaminepentaacetic acid(DTPA-PE)を組み込む方法と、内水層に¹¹¹In-DTPAを内封させる方法があり、前者の場合は脂質を混合させる際にDTPA-PEも併せて混合した。後者の場合は、リポソームを水和する際に10 mM DTPA溶液を用い、リポソーム作製後にゲルろ過カラムにより精製することで、内水層のみに¹¹¹Inのキレート剤であるDTPAが封入されたリポソームを作製した。また、ゼータサイザーにて、作製したリポソームの粒子径や膜表面の電位を表すゼータ電位の測定を行った。

(3) 酸化リン脂質含有リポソームの¹¹¹In標識

リポソーム膜の¹¹¹In標識

酢酸バッファーに溶解した¹¹¹InCl₃溶液にDTPA-PEを含有するリポソームを加えて、室温で5分インキュベートした。標識できなかった¹¹¹Inを取り除くため、DTPA-PEの100等量のethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)を加えて室温で5分インキュベートした後、ゲルろ過カラムにて精製を行い、放射化学的収率と放射化学的純度を確認した。

内水層への ^{111}In -DTPA の封入

酢酸バッファーに溶解した $^{111}\text{InCl}_3$ 溶液に脂溶性キレート剤である oxine を混合し 40°C で 10 分インキュベートした後、DTPA 内封リポソームを添加し、再度 40°C で 10 分インキュベートした。(リポソーム膜を通過できる ^{111}In -oxine 錯体が内水層に移行し、安定度定数の高い DTPA に ^{111}In を受け渡すことで内水層に ^{111}In -DTPA を封入) EDTA 溶液を加えて室温で 5 分インキュベートした後、ゲルろ過カラムにて精製を行い、放射化学的収率と放射化学的純度を確認した。

(4) 酸化リン脂質含有リポソームへのドキソルピシン封入

(2) と同様の方法で酸化リン脂質含有リポソームを作製した。ドキソルピシンの封入は pH 勾配を利用したリモートローディング法を用いたため、リポソームの内水層を硫酸アンモニウム溶液とした。酸化リン脂質含有リポソームとドキソルピシン溶液を混合し、37 (POPC リポソーム) または 65 (DSPC リポソーム) で 1 時間インキュベートした後、ゲルろ過カラムにて精製した。リポソーム画分に終濃度 1% となるように TritonX-100 を加えたサンプルの蛍光強度を測定した (Ex: 490 nm, Em: 595 nm)。

(5) 酸化リン脂質含有リポソームの細胞内取込み

(1) で樹立した細胞株を用いて、(3) で標識した酸化リン脂質含有リポソームの細胞内取込みを評価した。具体的には、24 well plate に 1 well あたり 2×10^5 個の CD36⁺ または CD36 細胞を播種し、一晚インキュベートした後、 ^{111}In 標識酸化リン脂質含有リポソームを添加し、37 5% CO₂ 下でインキュベートした。24 時間インキュベート後、0.2 M NaOH で細胞を溶解し細胞内に取込まれた放射能をガンマカウンタで測定した。タンパク量を BCA 法により定量し、単位タンパク質あたりの取込量 (%dose/mg) を算出した。

4. 研究成果

(1) CD36 および蛍光タンパク質強制発現細胞の樹立

トランスフェクションにより CD36 及び蛍光タンパク質を導入したところ、蛍光タンパク質由来の蛍光を発する細胞が観察された。蛍光強度の高い細胞をピックアップして増殖させていき、高い蛍光強度を示す細胞群を抽出・増殖した。CD36 強制発現細胞に関しては、CD36 の発現を蛍光免疫染色法により確認したところ、CD36 細胞と比較して CD36⁺ 細胞の CD36 の発現が顕著に高いことが確認された。また、樹立した細胞を用いて作製した担がんマウスにおけるがん由来の蛍光をマルチスペクトル CCD カメラで検出したところ、がん部位の描出に成功し、がん転移の検出に利用可能であると考えられた。

(2) 酸化リン脂質含有リポソームの作製

作製したリポソームの粒子径及びゼータ電位を測定したところ、粒子径は酸化リン脂質含有割合により変化したが、ゼータ電位は変化しなかった。粒子径は、酸化リン脂質含有割合に応じて徐々に小さくなった。酸化リン脂質は親水性基が大きくなっているため、含有割合の増加に伴い、小さな粒子径となった可能性がある。

(3) 酸化リン脂質含有リポソームの ^{111}In 標識

いずれの組成、いずれの標識方法においても、放射化学的収率は 90% 以上、放射化学的純度 95% 以上で標識が可能であった。

(4) 酸化リン脂質含有リポソームへのドキソルピシン封入

リモートローディング法により、ドキソルピシンの内封を行ったところ、酸化リン脂質含有率が 20-50% と高いリポソームにおいても、60-80% と高い封入率を示した。

(5) 酸化リン脂質含有リポソームの細胞内取込み

酸化リン脂質含有リポソームの CD36⁺ 細胞及び CD36 細胞への細胞内取込みを評価したところ、両者の細胞への取込量に有意な差は観察されなかった。一方で、いずれの細胞においても、酸化リン脂質含有率が高いほど、細胞内取込み量は高くなっていった。酸化リン脂質含有率が高いほど粒子径が小さくなっていったことから、粒子径の大きさが細胞内取込み量に影響を与えている可能性が考えられた。粒子径の細胞内取込みへの影響が、CD36 による特異的な取込みよりも大きく、CD36 による特異的な取込みが観察されていない可能性を視野に入れ、現在、脂質組成やリポソームの作製方法の検討を行っている。

現時点では、酸化リン脂質が入っていないリポソームを作製、 ^{111}In 標識し、 ^{111}In 標識リポソームに酸化リン脂質を後から組込むポストインサーション法で作製した場合に、酸化リン脂質割合の増大に伴う粒子径の減少が見られないことを見出している。また、内水層への ^{111}In -DTPA の封入による標識方法の場合はポストインサーションにより、 ^{111}In -DTPA の漏出が認められている。そのため、リポソーム膜の ^{111}In 標識により作製・標識したリポソームを用いて細胞内取込み評価を検討している。

以上、本研究では、がんの転移に必須の分子であることが明らかにされた CD36 に高親和性を示す酸化リン脂質を含有するリポソームを作製し、核医学診断用放射性同位元素である In-111 による標識、低分子抗がん剤であるドキソルビシンの封入を達成した。今後、CD36 に対する特異的な取込みが最大限に発揮される脂質組成・作製方法を精査し、セラノスティックスナノ粒子としての有用性を評価していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----