

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09103

研究課題名(和文) MRI・蛍光デュアルイメージングを可能にする高分子ポリマー型造影剤の開発

研究課題名(英文) Development of polymeric contrast agent for MRI and fluorescence dual imaging

研究代表者

貝田 佐知子 (Kaida, Sachiko)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：70710234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Gd-DOTA/IR820ポリマー作成し、N1-H1 hepatoma cell をラットの肝臓に移植して作成した肝癌モデルにおいて、肝動脈より当該ミセルを注入し、MRI 造影効果を確認することが可能であった。当該ポリマーは高分子ポリマーとして約33nm のサイズであり、EPR 効果により血管透過性の亢進した腫瘍組織内部の血管から腫瘍内に選択的に送達でき、長い血中滞留性を有し、またミセル崩壊が徐々に進むことから、内包する薬剤の徐放性をあわせもつことを確認した。さらに、MRI 造影効果の指標である緩和能はGd-DTPAに比べ約8倍を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たなキャリアであるポリマーで製剤することにより、さらに実現可能で既存の造影剤を凌駕する診断薬を作製し、評価する研究である。癌治療において、腫瘍への十分な造影剤の集積を可能にする造影剤を使用した術前・術中・術後のシームレスな画像支援を実現するMR・蛍光デュアルイメージング法の開発は前例がなく、極めて独創的である。

研究成果の概要(英文)：In a hepatocellular carcinoma model in which Gd-DOTA/IR820 polymer was prepared and N1-H1 hepatoma cells were transplanted into rat liver, it was possible to confirm the MRI contrast effect by injecting the micelles through hepatic artery. The polymer has a size of about 33 nm as a polymeric polymer, and can be selectively delivered into the tumor through blood vessels in the tumor tissue with increased vascular permeability due to the EPR effect. Furthermore, the relaxation capacity, an index of MRI contrast enhancement, was about 8 times higher than that of Gd-DTPA (3.4 mM-1S-1). This effect was considered to be due to the immobilization of Gd-DTPA inside the polymer by binding to the hydrophobic groups of the polymer. However, we could not confirm the MRI contrast-enhancing effect of the polymer and did not publish the results in a paper or at a conference.

研究分野：腫瘍学、診断学、ドラッグデリバリー

キーワード：MRI造影剤 ポリマー ドラッグデリバリー 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

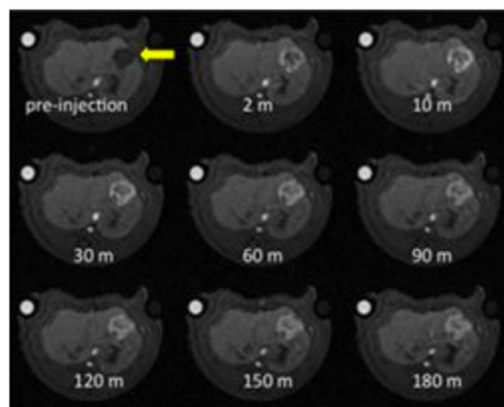
癌の診断・治療における画像支援は、術前の進展度診断、術中の画像ナビゲーションによる正確な手術、術後の治療効果の評価において必須のものとなっている。画像支援のために X 線透視、CT、超音波、MRI などが画像モダリティとして用いられているが、中でも MRI は組織の様々な状態を診断する能力(組織分解能)が高い。MRI 撮像をより鮮明にするための造影剤として世界中で最も普及しているガドリニウム(Gd)造影剤は、1984年に初めて報告されて以来広く使用され、現在ではほとんどの MRI 造影剤に Gd が含まれている。一方で 2016 年には Gd 造影剤による致死的な副作用である腎性全身性線維症(NSF)が引き起こされることが報告され、腎障害患者には使用が制限されることとなった。

このように造影剤の副作用が懸念される中でも、癌の病巣に対する高い画像診断能力も求められることから、薬剤を必要とする場所で必要とする量のみを作用させることを目的としたドラッグデリバリーシステム(DDS)に着目した。DDS は、薬効を高めて副作用を減少させることができる理想的な投薬システムとして注目されている。DDS にはその薬剤を目的の部位に送達させるためのキャリアが必要であるが、その一つとして注目されている高分子ナノキャリアは粒径 20~100nm であり、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 permeability and retention effect) (Matsumura Y, Maeda H. *Cancer Res* 1986)を有しており、薬剤を内包させて腫瘍組織に特異的に送達させることで、より効果が高く副作用の少ない癌治療を実現させる DDS として期待されている(図 1)。申請者は 2007 年より、東京大学工学部カブラ研究室との共同研究で、MR 陽性造影剤である Gd-DTPA と白金系抗癌剤のオキザリプラチンの誘導体である 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、マウス肺癌(MiaPaca)モデル(Kaida S, Cabral H, Kataoka K. et al. *Cancer Res* 2010)、ラット肝癌モデル(Vinh N, Kaida S. et al. *Int J Nanomedicine* 2015)(図 2)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(若手研究(B) 2014-2016 年)。本研究内容は Diagnosis(診断)と Therapeutics(治療)を融合した Theranostics として期待されている。

しかしながら、この Gd-DTPA/DACHPt ナノミセルは抗癌剤を内包しているため、純粋な診断薬として使用することが制限される。また構造上、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。

2. 研究の目的

これまでの研究で明らかになった点として、高分子ミセルは様々な薬剤を目的の部位に送達させることが可能なキャリアである一方、ミセル内に含有できる MRI 造影剤の量が少ないという点があった。これを踏まえて、ミセル作製の前段階である MRI 造影剤と蛍光色素を結合させたポリマーの形態の薬剤を開発することで、既存の造影剤にはないメリットを有し、かつミセルの欠点を克服する新しい診断目的の薬剤を開発することが本研究の目的である。



ラット同所性肝癌モデルにおける Gd-DTPA/DACHPt ナノミセルの集積

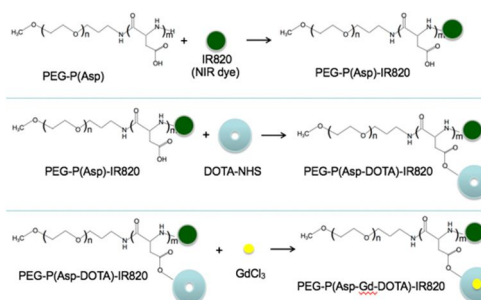


図 3 Gd-DOTA/IR820 含有ポリマーの作製
MRI 造影効果が Gd-DOTA の約 8 倍となる。

先行研究として東京大学工学部カブラル研究室では、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てきた(図 3)。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ており、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。

以上の理由から新たなキャリアであるポリマーで製剤することにより、さらに実現可能で既存の造影剤を凌駕する診断薬を作製し、評価する。癌治療において、腫瘍への十分な造影剤の集積を可能にする造影剤を使用した術前・術中・術後のシームレスな画像支援を実現する MR・蛍光デュアルイメージング法(図 4)の開発は前例がなく、極めて独創的である。

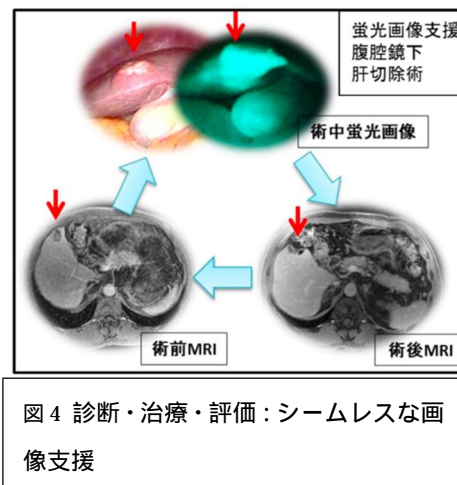


図 4 診断・治療・評価：シームレスな画像支援

3. 研究の方法

本研究では、Gd-DOTA/IR820 ポリマーを作製して薬理的に現存する Gd 造影剤より強い造影効果があることを検証する。その後、実際にラット肝細胞癌モデルに、MRI により経時的に観察しながら経尾静脈的、もしくは経肝動脈的に投与し、ポリマーの腫瘍への集積を評価する。また手術で開腹した際、肝内の腫瘍に対し NIR 蛍光法により腫瘍の蛍光効果を確認する。

Gd-DOTA/IR820 ポリマーの作製と薬剤の検証(東京大学工学部カブラル研究室)

Gd-DOTA/IR820 ポリマーを作製し、薬剤含有量、粒子径、毒性、生体内安定性、MRI 造影効果などの薬理学的特性を検証する。製剤後、フリーズドライしたポリマーを滋賀医科大学 外科学講座に輸送する。

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(滋賀医科大学 外科学講座)

- 1) 使用動物: rat/Winstar-King- Aptekman rat / male / 50 匹/7-9 週齢
- 2) ラット肝癌細胞株(KDH-8)
- 3) 肝腫瘍モデルの作製: ラット肝癌細胞(KDH-8) 0.25ml (5×10⁸ 個/1ml) をラット肝臓実質内に直接移植する。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。

MRI によるラット同所性肝癌モデルの評価(滋賀医科大学 外科学講座) 3 テスラ MRI 装置を用い T1WI にて以下の如く撮像する。

- 1) 尾静脈群 (尾静脈から Gd-DOTA/ IR820 ポリマー投与)
- 2) 動注群 (肝動脈から Gd-DOTA/ IR820 ポリマー投与)
- 3) コントロール群 (尾静脈および肝動脈から同量の生食もしくは MR 造影剤(Gd- DOTA) 投与)

4) 腫瘍評価のための至適な撮像タイミング、方法を決定する。

蛍光法によるラット同所性肝癌モデルの評価(滋賀医科大学 外科学講座)

MRI 撮影評価の後直ちに開腹し NIR 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。

同様の手法を用いて、ラット同所性肝癌モデルだけでなく、これまでに確立したヒト肝癌移植マウスなど、他の種類の動物個体、および他の種類の癌でも造影効果、蛍光効果が確認できるか実証する。

4. 研究成果

Gd-DOTA/IR820 ポリマー作成し、N1-H1 hepatoma cell をラットの肝臓に移植して作成した肝癌モデルにおいて、肝動脈より当該ミセルを注入し、MRI 造影効果を確認する

ことが可能であった。当該ポリマーは高分子ポリマーとして約 33nm のサイズであり、EPR 効果により血管透過性の亢進した腫瘍組織内部の血管から腫瘍内に選択的に送達でき、長い血中滞留性を有し、またミセル崩壊が徐々に進むことから、内包する薬剤の徐放性をあわせもつことを確認した。さらに、MRI 造影効果の指標である緩和能は Gd-DTPA(3.4mM-1S-1)に比べ約 8 倍を示した。これは、ポリマー内部で Gd-DTPA がポリマーの疎水基と結合することで固定化されるためにこのような効果が現れると考えた。ただし、ポリマーの MRI 造影持続効果は確認できず(図 5)、論文および学会発表には至らなかった。

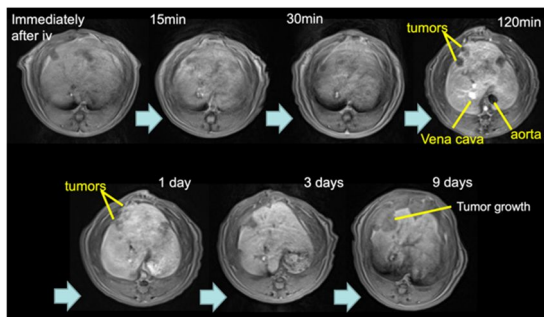


図 5 肝細胞癌が造影される様子を MRI にて撮像するも、腫瘍の造影効果が持続する結果とはならず、腫瘍の増大を認めた。

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
研究分担者	仲 成幸 (Naka Shigeyuki) (10359771)	滋賀医科大学・医学部・非常勤講師 (14202)	
研究分担者	谷 眞至 (Tani Masaji) (60236677)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関