

平成23年 3月31日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2011

課題番号：21890179

研究課題名（和文） マルチモダリティ対応型分子イメージングプローブの開発

研究課題名（英文） Development of molecular imaging probes applied for multimodality

研究代表者

佐野 紘平 (SANO KOHEI)

京都大学・薬学研究科・特定助教

研究者番号：00546476

研究成果の概要（和文）：

ナノ粒子タイプのマルチモダリティ対応型分子プローブの開発を目的とし、SPECT用核種である¹¹¹Inによる放射性標識γ-ポリグルタミン酸（γ-PGA）複合体を作製した。標的組織には数十nmの粒子径を有する粒子型プローブの利用が適するセンチネルリンパ節（SLN）を選択した。本プローブは全く毒性を示すことなく細胞に高く取り込まれた。また、SPECT/CT撮像において明瞭にSLNを描出した。以上より¹¹¹In標識γ-PGA複合体は、低毒性かつ高感度にSLNを描出可能な核医学診断用ナノ粒子として有用である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

We established a radiolabeled γ-polyglutamic acid (γ-PGA) complex as a nanocarrier for molecular imaging with high cell uptake and low toxicity. This ¹¹¹In labeled PGA complex with strong anionic surface showed low cytotoxicity, indicating the high biocompatibility. ¹¹¹In-PGA complex exhibited the high uptake by macrophage. Moreover, ¹¹¹In-PGA complex clearly visualized the sentinel lymph node (SLN) with single photon emission computed tomography (SPECT), suggesting that ¹¹¹In-PGA complex is useful as a SLN imaging probe with low cytotoxicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	820,000	246,000	1,066,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,870,000	561,000	2,431,000

研究分野：分子イメージング、放射線科学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：放射線、分子認識、薬学

1. 研究開始当初の背景

リポソームやミセル、デンドリマーなどのナノ粒子は、高い生体適合性を示すだけでなく、粒子を抗がん剤や分子イメージングプローブのキャリアとして利用することで悪性

腫瘍の治療や診断を達成するなど、バイオメディカル分野の領域において広く研究が推進されている。近年、プラスミドDNA (pDNA)、ポリエチレンイミン (PEI)、γ-ポリグルタミン酸 (γ-PGA) より構成されるア

ニオン性複合体のナノ粒子が遺伝子ベクターとして開発され、高い細胞内移行性と、低い生体毒性を両立しうることが報告された。本研究では、この複合体を生体安全性の高い分子イメージングプローブのナノキャリアとして展開することとした。

2. 研究の目的

核医学イメージング、磁気共鳴画像 (MRI)、光イメージングに対応可能なシグナル分子を容易に導入できるポリアミドアミン dendrimer (PAMAM dendrimer, generation 4th; G4) をコアとして選択し、そこにシグナル放出金属を導入するためのキレート剤 (DTPA) を導入後、PEI、 γ -PGA と反応させることで分子イメージング用ナノ粒子である γ -PGA/PEI/G4-DTPA を開発することを計画した。

本研究の最終的な目的は、Radioisotope (RI)、MRI、蛍光でのマルチモダリティイメージングが可能な γ -PGA 複合体の開発であるが、まずは SPECT 用核種である ¹¹¹In を用いて RI 標識 γ -PGA 複合体を作製し、細胞、小動物を用いた基礎的な評価を行うことにより核医学イメージング用ナノ粒子としての有用性を検討した。標的組織には、数十 nm の粒子径を有する粒子型プローブの利用が適しているセンチネルリンパ節を選択した。

3. 研究の方法

(1) 粒子型イメージングプローブの合成

PAMAM G4 dendrimer に計 128 等量の *p*-SCN-Bz-DTPA (以下 DTPA) を反応させ、pH9.0 の条件下、室温にて計 48 時間攪拌した後、限外濾過法を用いて未反応の DTPA を除去した。凍結乾燥により G4-DTPA を白色スポンジ状個体として得た。G4 一分子あたりにおける DTPA の導入数は、未精製の G4-DTPA 反応液を ¹¹¹In と反応させ、限外濾過法により高分子と低分子画分を分離した後、全放射能に占める高分子画分の放射能に DTPA の反応等量数 (128) を乗じるにより算出した。続いて、G4-DTPA のカルボキシル基 : PEI のアミノ基 : γ -PGA または ALG のカルボキシル基の電荷比が 1:8:16 となるように混和することで、PEI/G4-DTPA (PEI 体)、 γ -PGA/PEI/G4-DTPA (PGA 体)、ALG/PEI/G4-DTPA (ALG 体) を得た (Fig. 1)。複合体粒子の粒子径 (Number) と表面電荷測定には Zetasizer Nano ZS (Malvern 社) を使い、5% グルコース溶液中で測定した。¹¹¹In 標識複合体粒子は、¹¹¹In-DTPA-G4 を用いて上記の方法に従い合成した。放射化学的純度はセルローズアセテート膜電気泳動法により算出した。

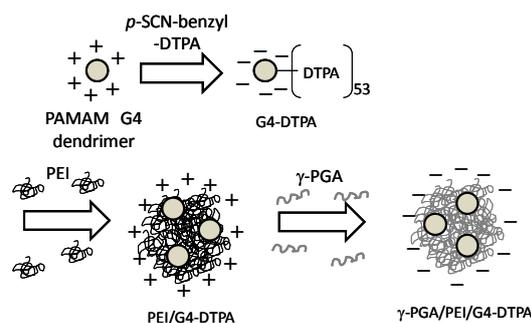


Fig. 1 γ -PGA 粒子複合体核医学イメージングプローブの設計

(2) 細胞内取り込み量評価

RAW264 細胞を 3×10^5 cell (0.5 ml D-MEM (10% FBS)) ずつ 24 well plate に播種し、その 18 時間後に取り込み実験を実施した。各粒子は、培地中の G4-DTPA 濃度が 0.4 μ g/ml となるように調製した。なお、温度依存的細胞内取り込み評価においては、HEPES (25 mM) で調製した D-MEM (10% FBS) を培地として用いた。

各ウェルの培地を除去し、G4-DTPA-¹¹¹In、¹¹¹In-PEI 体、¹¹¹In-PGA 体、¹¹¹In-ALG 体を含む培地 (18.5 kBq/ml) を 0.5 ml ずつ各ウェルに加えた後、0.5、1、3、6 時間、37°C、5% CO₂ の条件にて培養した。培地を除去し、0.5 ml の PBS (-) で洗浄した後、0.5 ml の 0.2 N NaOH で溶解し、溶解液の放射能を γ カウンタにより測定した。また、可溶物中のタンパク質量は BSA protein assay kit を用いて測定し、細胞内取り込み量を %dose/mg protein として算出した。また、4°C においても同様の検討を行った。

次に、細胞内への取り込み機構を詳細に調べるために、各 ¹¹¹In 標識複合体と同時にエンドサイトーシス阻害剤である、CPZ (14 μ M)、amiloride (2 mM)、genistein (200 μ M)、または cytochalasin D (5 μ M) を添加し (全ての阻害剤は 0.3% DMSO 含有 D-MEM に溶解)、細胞内取り込み量を評価した。また、 γ -PGA 特異的な取り込み機構の関与を調べるために、標識体と同時に種々の濃度の γ -PGA を添加し、取り込み量の変化を調べた。

(3) 細胞障害性、血液毒性評価

① 細胞障害性評価

RAW264 細胞 (3×10^5 cell/ml DMEM (10% FBS)) を 96 well plate に 0.1 ml ずつ播種し、18 時間前培養した。G4-DTPA 濃度が 6 μ g/ml となるように培地 (40 μ l) で希釈した PEI 体、PGA 体または ALG 体 (60 μ l) を細胞に添加し、3、6、24 時間インキュベートした。培地交換後、10 μ l の WST-8 試験液を加えてさら

に2時間培養した。450 nmの吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。コントロールには5%グルコース溶液を60%含む培地を用いた。なお、細胞生存率は、コントロールの値を100%として算出した。

②赤血球凝集能の評価

マウスより採取した赤血球は氷冷したPBSで3回洗浄した後、2%赤血球溶液(v/v)を作製した。そこに、各種複合体粒子を混合し、15分間室温でインキュベートした後、凝集を顕微鏡観察し、二値化により赤色凝集塊を抽出し、その面積率を求めた。なお、コントロールには5%グルコース溶液を用いた。

③溶血能の評価

5%赤血球溶液(v/v)と各種粒子を混合し、24時間室温でインキュベートした後、5000 rpmにて5分間遠心し、上清を採取した。得られた上清に含まれるヘモグロビンの540 nmの吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。また、コントロールには5%グルコース溶液を用い、lysis bufferを用いて完全に溶解させたサンプルの吸光度を100%として溶血を評価した。

(4) インビボでの体内分布評価

ソムノペンチル麻酔下、ラット(SD系、雄性、5週齢)に¹¹¹In-PEI体、¹¹¹In-PGA体、¹¹¹In-ALG体(200 µl、18.5 kBq)をfoot padから投与し、1、6、24時間後に、麻酔下にて安楽死させた。脾臓、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉組織、膝窩リンパ節、腰部リンパ節、投与部位を摘出し、それぞれの湿重量測定、γカウンタによる放射能測定を行った。実験期間中、水・餌は自由に与えた。放射能集積は、組織1g当たりの投与量に対する割合%ID/g(% injected dose/g)と、組織当たりの投与量に対する割合%ID/organとして算出した。

さらに、イソフルラン(2%、air 2.0 L/min、O₂ 1.0 L/min)麻酔下、ラットに¹¹¹In-PEI体、¹¹¹In-PGA体、¹¹¹In-ALG体(200 µl、それぞれ1.71、1.02、1.51 MBq)をfoot padから投与し、24時間後にPET/SPECT/CT装置(Gamma Media Ideas)にて、60分間(64 projections、120 sec/projection、シングルピンホールコリメータ)、SPECT撮像を行った。またCT撮像も併せて行い、形態画像を得た。

4. 研究成果

(1) 粒子型イメージングプローブの合成

PAMAM G4-dendrimer(G4)とDTPAを反応させることでG4 1分子に約53個のDTPAを導入したG4-DTPAを合成した。これをPEIと混合させることでPEI体とした後、γ-PGA

あるいはALGと混合しPGA体あるいはALG体を作製した。粒子径とゼータ電位を測定したところ、膜電位47.7±6.0 mV、粒子径30.2±3.2 nmのPEI体と膜電位-48.9±1.6 mV、粒子径24.8±3.7 nmのPGA体、および、膜電位-43.7±1.7 mV、粒子径45.6±1.6 nmのALG体の生成を確認した。なお、¹¹¹In標識体はG4-DTPA-¹¹¹Inを用いて同様の方法で作製し、全ての粒子を放射化学的純度91%以上に合成した。

(2) 細胞内取り込み量評価

マウスマクロファージ様細胞であるRAW264を用いて*in vitro*評価を行った。その結果、¹¹¹In-PGA体は¹¹¹In-ALG体と比較し有意に高い細胞内取り込みを示した一方で¹¹¹In-PEI体とは同程度の細胞内取り込みを示した(Fig.2)。¹¹¹In-PGA体の細胞内への取り込みは低温条件で有意に抑制されることから、取り込み機構の温度依存性が示唆された。また、phagocytosis阻害薬であるcytochalasin D共存下において取り込みが有意に抑制されたことから取り込み機構の一部にphagocytosisが関与していることが示唆された。一方、γ-PGA共存下で¹¹¹In-PGA体の細胞内取り込みは、添加するγ-PGAの濃度に依存して抑制されることから、この取り込みにはγ-PGAに特異的な輸送経路も関与している可能性が示された。

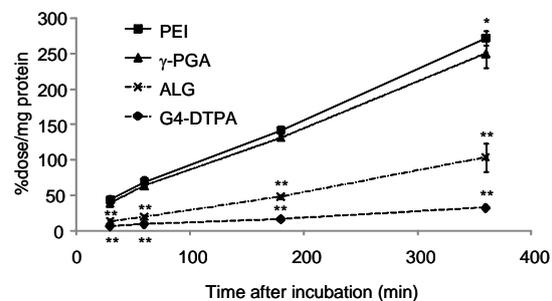


Fig. 2 RAW264 細胞への各複合体の取込み
*P<0.05、**P<0.01 vs ¹¹¹In-PGA 体

(3) 細胞障害性、血液毒性評価

RAW264にPEI体、PGA体、ALG体を添加し、細胞障害性を評価した結果、PEI体では非常に強い細胞障害性を示したが、PGA体、ALG体では細胞障害性が認められなかった(Fig.3)。また、マウス赤血球を用いて各複合体の赤血球凝集能、溶血性を評価した結果、PEI体では赤血球の著しい凝集とわずかな溶血が確認されたが、PGA体、ALG体では赤血球の凝集、溶血は認められなかった。

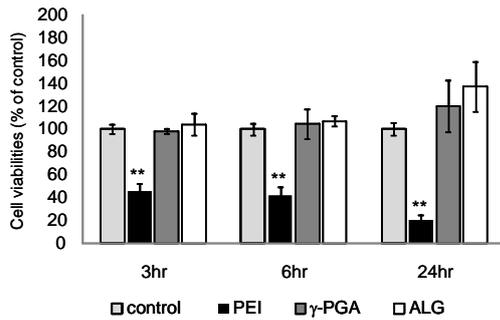


Fig.3 各複合体粒子の細胞障害性
**P<0.01 vs control

(4) インビボでの体内分布評価

各複合体を雄性ラットの foot pad から投与し、経時的に各臓器での放射能を測定することにより各粒子の生体内分布を評価した (Fig.4)。その結果、¹¹¹In-PGA 体の投与 24 時間後におけるセンチネルリンパ節への集積は、他の複合体よりも有意に高いものであった。また、いずれの複合体でもセンチネルリンパ節、投与部位以外の臓器への取り込みは非常に低い値を示し、各複合体のリンパ管から血管への漏出は起こりにくいことが示された。

また、SPECT/CT 撮像においても、¹¹¹In-PGA 体は他の複合体に比べてセンチネルリンパ節へ高く集積し、明瞭なイメージングに成功した (Fig.5)。

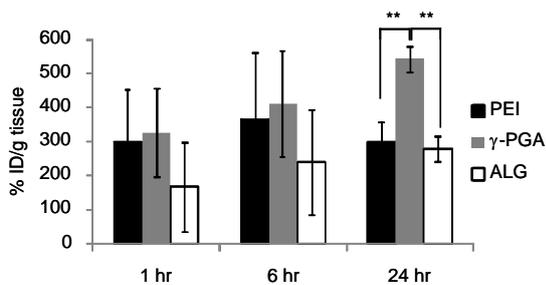


Fig. 4 各複合体の膝窩リンパ節への集積
**P<0.01 vs ¹¹¹In-PGA 体

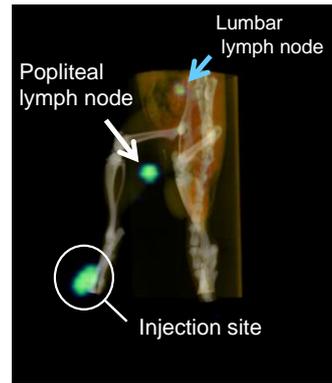


Fig. 5 ¹¹¹In-PGA 体投与 (Foot Pad)
24 時間後の SPECT/CT 画像

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)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗原または薬物送達複合体

発明者: 佐々木均、黒崎友亮、北原隆志、藤秀人、由井克之、平山謙二、森田公一、向高弘、間賀田泰寛、小川美香子、佐野紘平

権利者: 国立大学法人 長崎大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/054195

出願年月日: 2011 年 2 月 24 日

国内外の別: 国際出願

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 紘平 (SANO KOHEI)

京都大学・薬学研究科・特定助教

研究者番号: 0 0 5 4 6 4 7 6