

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07653

研究課題名（和文）臨床利用を目指した腫瘍指向性ナノ粒子のラジオセラノスティクス創薬戦略

研究課題名（英文）Radioceranostics Drug Design Strategy for Tumor-Targeting Nanoparticles for Clinical Use

研究代表者

山本 文彦（YAMAMOTO, Fumihiko）

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40253471

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）：ラジオセラノスティクスの創製を目指し、腫瘍への特異的集積性だけでなくステルス特性を保持したままAccelerated Blood Clearance（ABC）現象を回避する「ラクトソーム」実現のための新たなドラッグデザインの妥当性を検討した。高い腫瘍集積性と予想されたAB型ラクトソームを母核とし、90Yにも置換可能な<sup>111</sup>In標識体を新たに開発し腫瘍モデルマウスへの生体内分布や腫瘍集積性について評価し新たな知見を得たほか、ABC現象を回避すると予想されるポリグリセロール官能基を有する新たなデザインのラクトソームを開発、投与後の産生する血中抗体量がラクトソームより低減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PEGリボソームなど化学療法のDDS基材としてナノキャリアが多く開発され、EPR効果を利用した腫瘍治療薬剤として上市されたものもあるが、分子イメージング基材やセラノスティクス基剤として確立するには解決すべき課題がある。

本研究によりラクトソーム構成ポリマーに機能付加を行うことで、血中抗体量を低減させることが可能になった。評価にはインビボでのABC現象回避や腫瘍集積性の検討がさらに必要だが、今後ナノ粒子機能付の妥当性が明らかとなれば、がん診断だけでなく治療精度の向上にも寄与できるセラノスティクス製剤としてのナノ粒子開発に道を拓くものと期待される。

研究成果の概要（英文）：I investigated the validity of a new drug design for the realization of "lactosomes," which evade the Accelerated Blood Clearance (ABC) phenomenon while keeping not only specific tumor accumulation but also stealth properties, with the aim of creating radio-theranostics. I developed a new <sup>111</sup>In-labeled lactosome, which can be substituted for <sup>90</sup>Y, using AB-type lactosomes as the nucleus, and evaluated its biodistribution in tumor model mice and tumor accumulation, and obtained new findings. In addition, a newly designed lactosome with a polyglycerol functional group, which is expected to evade the ABC phenomenon, was developed, and the amount of antibody produced in blood after administration was reduced compared to that of lactosomes.

研究分野：放射薬学、放射性薬品科学、分子イメージング薬学

キーワード：ラジオセラノスティクス 分子イメージング 放射性標識合成 腫瘍 ナノ粒子

### 1. 研究開始当初の背景

がん診療は早期の段階で腫瘍を発見し悪性度や進行度の診断を的確に行い治療を行うことが重要で、特に分子イメージング技術はがんの早期診断・治療につながる有効な手段として注目される。血中に投与したナノ粒子は、Enhanced Permeation Retention (EPR) 効果によって、特異的に初期の腫瘍組織に蓄積しやすいことが知られる(図1)。ナノ粒子をドラッグデリバリーシステム基材として用いることは、内包薬剤を酵素分解などから保護し標的部位に効率よく到達する利点があるだけでなく、内包薬剤を変えるだけで診断と治療が同じ基材で行うセラノスティクスとしての利用が可能で、患者の病状に合わせた効果的な個別化がん治療が提供できる薬剤として期待される。

研究代表者らが開発したナノ粒子「ラクトソーム」は、疎水性部位としてポリL-乳酸(PLLA)、親水性部位としてポリサルコシン(PSar)から構成される両親媒性ポリマー(PSar-PLLA)が自己組織化により形成されたミセルである。合成化学的に粒径を制御することが可能で、生体適合性が高いので毒性が低い。これまでに近赤外蛍光剤や短半減期核種  $^{18}\text{F}$  や放射性ヨウ素等で標識した粒径約 20 ~ 30nm のラクトソームの効率的な合成法を確立し、細網内皮系に集積しにくいステルス特性を利用して肝臓同所移植がんの近赤外蛍光イメージングに世界で初めて成功したほか、脳腫瘍への特異的集積性が高いことを見出した。さらに小動物 PET などを用いたマウス移植実験腫瘍のイメージングにも成功した(図2)。また  $^{111}\text{In}$  /  $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソームが診断 (Diagnosis) と治療 (Therapy) の両方を放射線で行える薬剤「ラジオセラノスティクス (Radio-theranostics)」としての可能性を有することも明らかにした(図3)。

ラクトソームをセラノスティクス製剤として広く臨床応用に繋ぐためには、ステルス特性や腫瘍集積性などの長所を活かすつつ後述する Accelerated Blood Clearance (ABC) 現象発現などの短所をどう解決するかが課題である。

### 2. 研究の目的

直鎖型両親媒性ポリマーからなる AB 型ラクトソームは肝臓など細網内皮系に集積しにくいステルス特性に優れているが、複数回投与するとステルス特性を失い細網内皮系に集積してしまう ABC 現象が現れ、腫瘍への集積性が著しく低下する欠点を有することを研究代表者らの先行研究で明らかにし、親水性部分が 3 つに分岐した両親媒性ポリマーにすることで合成化学的に粒径を 70% ほど小さくした粒径がやや小さい  $\text{A}_3\text{B}$  型ラクトソームであれば、ABC 現象軽減に一定の効果が期待できることを見出していた。しかし、放射性ヨウ素で標識したラクトソームの開発の過程で予  $\text{A}_3\text{B}$  型ラクトソームは AB 型ラクトソームよりも腫瘍集積量が小さいことが示唆された。このことは治療を目的とするならば腫瘍集積量の大きい AB 型ラクトソームの方が優位であることを意味した。

そこで本研究では、AB 型ラクトソームのステルス特性や腫瘍集積性を保持しつつ、ABC 現象回避するラジオセラノスティクス創製を実現するために、機能性官能基を修飾するドラッグデザインの妥当性を評価することを目的とした。

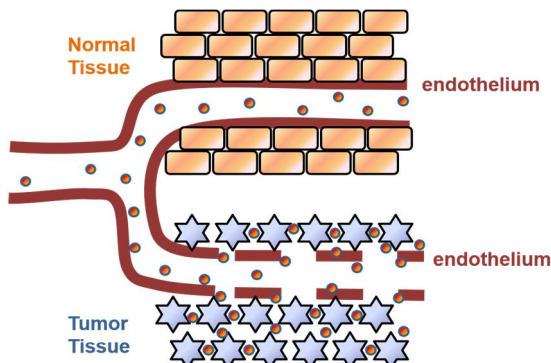


図1 EPR効果

ナノキャリアは増殖の速い腫瘍組織の間質腔に透過性が異常亢進した毛細血管系より漏出し、リンパ管排出系が未発達なために蓄積する。

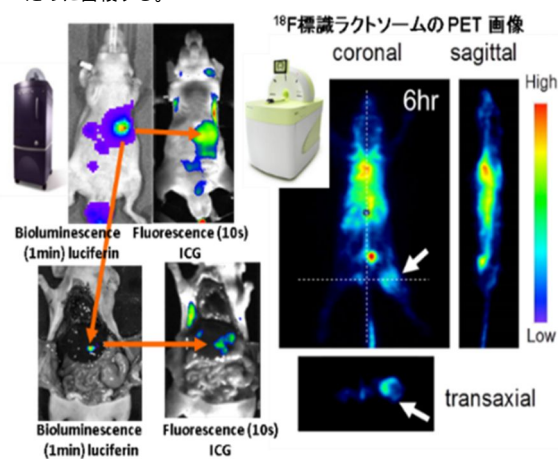


図2 マウス肝臓がん (HepG2) の ICG 標識ラクトソーム近赤外イメージングや、皮下腫瘍 (clon26) の F-18 標識ラクトソームの PET 描画に成功。(木村ら *Biomaterials*, 30,5156,2009, 山本ら *Nucl. Med. Biol.*, 40,387,2013)

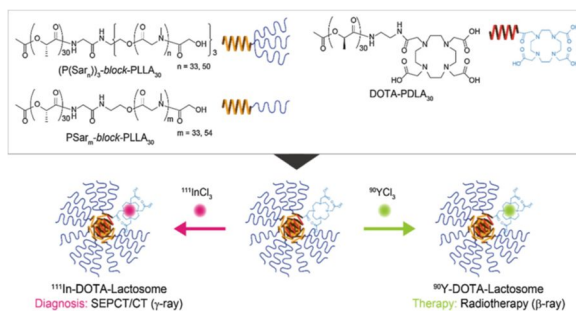


図3  $^{111}\text{In}$  標識ラクトソームと  $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソーム (栗原,山本ら *J.NanopartRes.*,18,137,2016)

### 3. 研究の方法

AB型ラクトソームを母核とするラジオセラノスティクス開発のため、腫瘍集積性を保持しつつラクトソームの表面への機能性官能基を付加してABC現象を回避するドラッグデザイン戦略の妥当性評価を行うとともに、治療薬としての適用も目指した基礎検討を行った。

#### (1) <sup>111</sup>In 標識 AB 型ラクトソームの開発と腫瘍集積性評価

先行研究において <sup>125</sup>I 標識体では、ABC現象を軽減可能な A<sub>3</sub>B 型よりも、ABC現象を発現するものの AB 型の方が単回投与時の腫瘍集積量が高かったことから、核医学治療目的には AB 型を採用した方が優位であると予想した。そこで核医学治療やセラノスティクスとしての可能性を調べるために <sup>111</sup>In 標識体の A<sub>3</sub>B 型ミセルと AB 型ミセルの腫瘍集積量の比較を計画した。

すでに確立した <sup>111</sup>In 標識 A<sub>3</sub>B 型ラクトソームの合成と同様の基本的手法で、<sup>111</sup>In 標識 AB ラクトソームを新規デザインし効率的合成を検討した。具体的には、A<sub>3</sub>B 型で用いた方法に準じ DOTA ポリ乳酸を、AB 型両親媒性ポリマーとともに自己集合化を粒子化した。粒子化にはフィルム法を試み、30nm 程度のミセル体が効率よくできているか評価した。<sup>111</sup>In 標識は、<sup>111</sup>In 標識 A<sub>3</sub>B 型ラクトソームで採用したように先に調製したミセル粒子を <sup>111</sup>In 標識することで精製も簡素化し、高収率で安定的な効率的合成を目指した。<sup>111</sup>In 標識 AB 型ラクトソームの腫瘍集積性を調べ、A<sub>3</sub>B 型ラクトソームのそれと比較し、治療用核種 <sup>90</sup>Y に置きかえた場合の優位性を予測した。モデル動物は皮下腫瘍マウスを用いた。

また腫瘍集積性を向上させるための構造修飾のアプローチとして、ラクトソームに多様な機能性ペプチドやリガンドを導入することができるようポリサルコシン末端にマレイミドを有する両親媒性ポリマーのデザインも検討した。

#### (2) ABC 現象を回避するポリグリセロール修飾ラクトソーム開発

直鎖型ポリグリセロール(lin-PG) - ポリ乳酸から構成される両親媒性ポリマーを合成し、PSar-PLLA 両親媒性ポリマーとともに 30nm のミセルを生成する最適な重合度を検討した。その放射性標識体を作成し、正常マウスを用いた動物生体内分布を調べる。特に複数回投与による ABC 現象が消失または軽減されるかどうか、粒子のステルス性を保持しているかを評価した。ラクトソームの PSar 鎖長密度がステルス特性保持と密接に関係するため、lin-PG 修飾ポリマーと PSar-PLLA の割合を変えながら、ステルス性と ABC 現象回避の両方ができる最適比すなわち粒子表面の lin-PG 修飾率について、正常マウス等を用いた生体内分布や抗体発現量を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) <sup>111</sup>In 標識 AB 型ラクトソームの開発と腫瘍集積性評価

腫瘍集積 (%dose/g) は 24 h 後において <sup>111</sup>In 標識 AB 型ラクトソームは 2.1、<sup>111</sup>In 標識 A<sub>3</sub>B 型ラクトソームは 9.5 であり、<sup>125</sup>I 標識体と異なり A<sub>3</sub>B 型の集積量が多かった。また放射線感受性が高いことが知られる骨髄への集積は <sup>111</sup>In 標識 A<sub>3</sub>B 型ラクトソームが 24 h 後において 11.8 に対し、<sup>111</sup>In 標識 AB 型ラクトソームは 1.0 と低く、<sup>111</sup>In 標識 AB 型ラクトソームに対し <sup>111</sup>In 標識 A<sub>3</sub>B 型ラクトソームが不安定であることが示唆された。骨髄への放射能集積はした標識 A<sub>3</sub>B 型ラクトソームでの性質であり、治療用核種 <sup>90</sup>Y に置きかえても骨髄への集積が予想される。核医学治療の観点からは、骨髄集積量の少ない AB 型ラクトソームを利用する方が優位であると考えられた (図 4)。

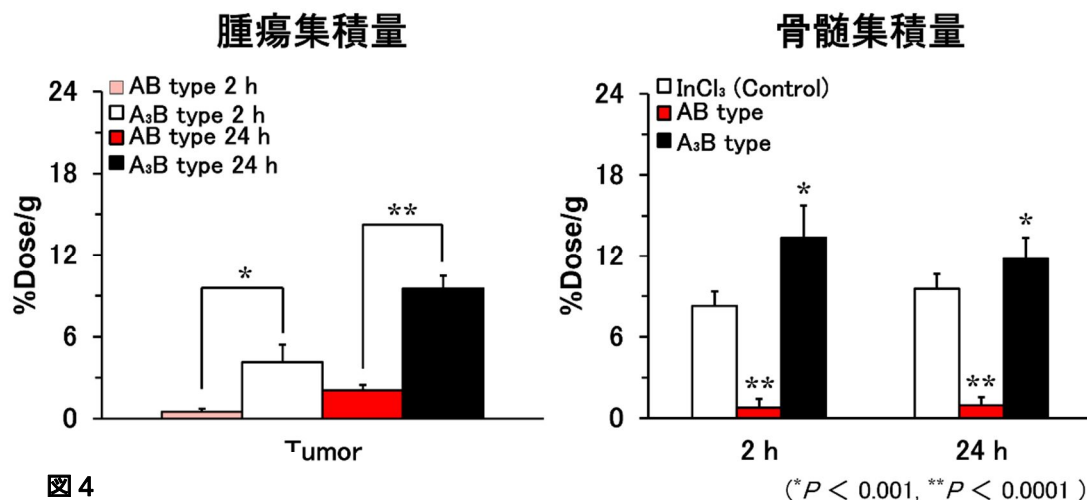


図 4

(\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.0001$ )

ポリサルコシン末端にマレイミドを有する両親媒性ポリマーの検討では、HN-PSar-PLLA に、DMF 中室温で 3-マレイミドプロピオン酸 N-スクシンイミドを反応させることで、マレイミドを導入可能であることを確認した。今後マレイミド両親媒性ポリマーの効率的合成条件を探っていく必要がある。それとともに、SH 基を有する各機能性官能基の導入やラクトソーム本体への I-125 標識体も検討する。

## (2) ABC 現象を回避するポリグリセロール修飾ラクトソーム開発

ABC 現象を回避する官能基をラクトソームに導入する構造変換を目指し、Cbz アミノプロパノールを出発原料として lin-PG を導入したのちにアミノプロパノール側の NH<sub>2</sub> 基に PLLA を伸長する方法と、2-メトキシエタノールを出発原料として導入した lin-PG の 2 級 OH に PLLA を伸長する方法の 2 通りの PLLA (30mer) - lin-PG (10mer) の合成について種々検討を行った結果、前者の方法ではエトキシエチル基の脱保護がほとんど進行せずさらなる検討を要したが、後者の方法は、酸を用いた効率の良い脱保護法を見出すことができ、目的とする両親媒性ポリマーが得られることが明らかとなった。さらなる検討の結果、PLLA (30mer) -O-lin-PG (10mer) の安定した生成条件を見出した。ナノ粒子への導入を検討した結果、lin-PG 表面修飾ラクトソームの調製が可能であった。10%lin-PG 修飾体は粒子径が 52nm、50%lin-PG 修飾体は粒子径が 130nm であった (図 5)。

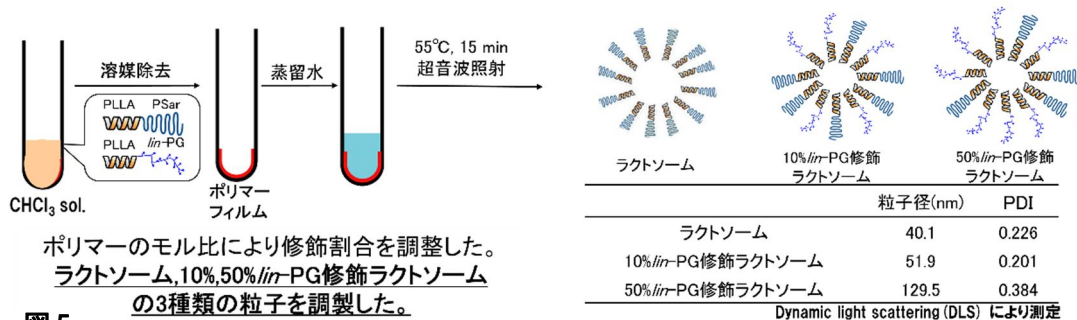


図 5

腫瘍集積性や ABC 現象の軽減を放射性標識体で行うための候補化合物選別法として、ABC 現象の原因と考えられる血中抗ラクトソーム抗体量を、ELISA 法を用いて評価する方法の開発を行った。ラクトソームを投与して 5 日後以降の ABC 現象を発現する条件のマウス血清を用いて、血清中の IgM 抗体のうちラクトソームを認識する抗体を 2 次抗体を用いて定量した。この ELISA 法を用いた評価実験では、マウス投与後の血中抗ラクトソーム IgM 抗体量は 10%修飾体では有意に減少したが、50%修飾体では抗体量の変化を認めなかった (図 6)。10%修飾体の <sup>125</sup>I 標識体調製は、用事調製が必要な標識試薬である <sup>125</sup>I-SIB の精製に課題が残った。正常マウスを用いたインビボ放射能分布を予備的に調べた結果、10%lin-PG 修飾体は ABC 現象を軽減していることが強く示唆された。このことは腫瘍モデルを用いて再度詳細を検討する必要がある (図 7)。

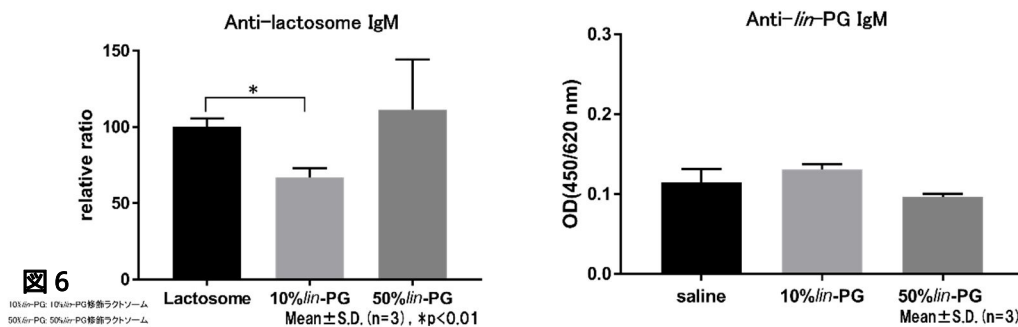


図 6

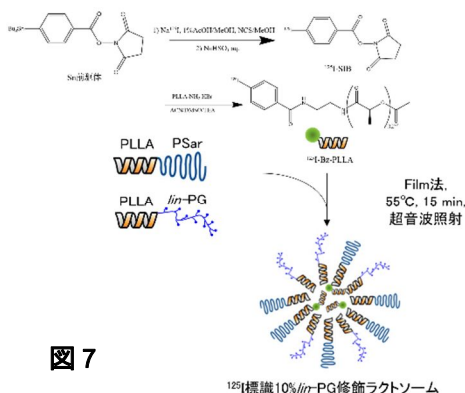
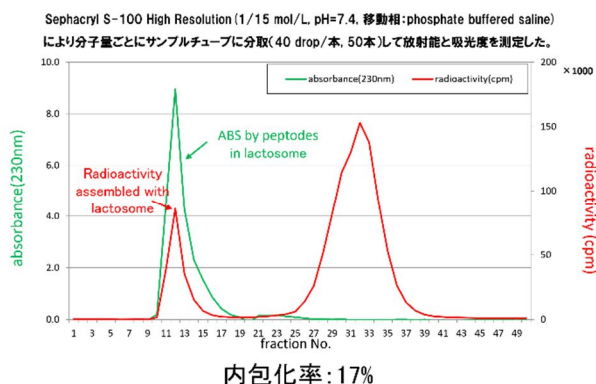


図 7



内包化率: 17%

また、lin-PG 以外の ABC 現象軽減機能性ポリマーとして、ポリカルボキシベタイン (PCB) ポリマーおよびポリビニルピロリドン (PVP) ポリマーの合成を検討した。PCB ポリマーは合成が可能であること明らかになり、今後、ラクトソームへの修飾と抗体量、ABC 現象の軽減を評価していく予定である。PVP ポリマーは合成条件をさらに改善する必要があるが、マレイミド PLLA を用いたモデル実験の結果、PVP-PLLA ポリマーの合成は可能であることが示唆された。今後、さらに条件検討が必要である。

以上、ABC 現象軽減のため構造変化の妥当性は、今後、補体産生量の評価やがん集積性も合わせて評価していく予定である。また PVP 基導入に用いる予定のマレイミド-チオール反応は、ラクトソームに他の機能性官能基を導入したり直接放射標識する手法としても応用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mitsuharu Kimura, Ibuki Onishi, Yumi Yamamoto, Yohei Saito, Hiroshi Fukuda, Akira Makino, Yasushi Kiyono, Hideo Saji, Eiichi Ozeki, Shunsaku Kimura, Fumihiko Yamamoto	4. 巻 72
2. 論文標題 Synthesis of radioiodine-labeled nanocarrier composed of poly(L-lactic acid)-block-poly(sarcosine) amphiphilic polydepsipeptide and its biodistribution in tumor-bearing and inflammation model mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Radioisotopes	6. 最初と最後の頁 149-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3769/radioisotopes.72.149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井 健太郎、小野 夏実、柴田 達郎、佐々木 遼、山本 由美、齋藤 陽平、牧野 顕、清野 泰、山本 文彦
2. 発表標題 In-111標識AB型ラクトソームの腫瘍集積評価の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 怜央、遠藤 成珠、安齋 虎太郎、田中 優市朗、山本 由美、齋藤 陽平、牧野 顕、清野 泰、山本 文彦
2. 発表標題 ABC現象回避に向けた機能性ナノ粒子の開発と初期評価
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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
研究協力者	高橋 怜央  (Takahashi Reo)		
研究協力者	今井 健太郎  (Imai Kentaro)		
研究協力者	牧野 顕  (Makino Akira)		
研究協力者	遠藤 成珠  (Endo Narumi)		
研究協力者	安齋 虎太郎  (Anzai Kotaro)		
研究協力者	田中 優市朗  (Tanaka Yuichiro)		
研究協力者	山本 由美  (Yamamoto Yumi)		
研究協力者	齋藤 陽平  (Saito Yohei)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	清野 泰  (Kiyono Yasushi)		
研究協力者	小関 英一  (Ozeki Eiichi)		
研究協力者	木村 俊作  (Kimura Shunsaku)		

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