

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：37401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590052  
 研究課題名（和文） 迅速な癌の光力学的治療を目指した酸素分圧診断と治療の融合型多機能製剤の開発  
 研究課題名（英文） Development of contrast agents having multi-function of diagnosis and therapy for effective photodynamic therapy of cancers  
 研究代表者  
 竹下 啓蔵（TAKESHITA KEIZO）  
 崇城大学・薬学部・教授  
 研究者番号：70175438

研究成果の概要（和文）：酸素分圧プローブ疎水性過クロロトリフェニルメチルラジカルは、DDS の担体として用いるリポソームの磁気共鳴法による体内トレースに応用できることがわかった。一方、薬物担体として加水分解したスチレン-無水マレイン酸共重合体あるいはデキストランを用いた検出法を検討した。デキストランにガドリニウムを結合させる方法で MRI によりマウス血管を描画でき、本研究目的にふさわしいことがわかった。併せて、ガドリニウムの簡便定量法も開発できた。

研究成果の概要（英文）：It was found that perchlorotriphenylmethyl triethylester radical, an oxygen probe, could be utilized for a tracer of DDS carrier liposomes by magnetic resonance technique. On the other hand, detection method was examined for dextran and hydrolyzed styrene-maleic anhydride copolymer. Binding of gadolinium to dextran was found to be suitable for the purpose of this study, because MRI image showed blood vessels of mouse after injection of this compound. Convenient method was also developed for quantitative analysis of gadolinium.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：MRI、DDS、造影剤

## 1. 研究開始当初の背景

PDT は外科的手術に頼らないがん治療法として注目されており、がん組織での血管透過性の亢進（EPR 効果）を利用した光増感剤のがんへの標的化も進められている。しかし、PDT によるがんの殺傷は活性酸素を介するも

のであるため、治療効果は酸素分圧により大きく左右される。そのため、PDT を適用できるか否かを早期に見極めることが重要である。それにも係わらず、治療効果の予測に必須な情報である酸素分圧を同時に測定できる光増感剤の開発は、現在のところ全く手が

付けられていない。

## 2. 研究の目的

がんの光学的治療法 (PDT) は体を傷つけずに行える利点をもつが、その治療効果はがん組織内の酸素分圧に大きく依存する。がん組織内の酸素分圧は、個々に異なりまた分布も一様ではない。そのため、個々のがんにおいて光増感剤が酸素分圧の十分なところに分布していることを確認することは PDT を選択できるか否かの判断に必須となる。本研究の全体構想は、酸素分圧プローブと光増感剤を一体化し、磁気共鳴法により構築する酸素分圧の描画システムと合わせて、酸素分圧を診断してから即座に PDT を行える診断・治療の融合技術を開発することである。その中で本研究では光増感剤と酸素分圧プローブとを共に含有するがん組織集積性製剤を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 酸素プローブ含有リポソーム

- ① 酸素プローブ PTM-TE の合成：既報 (Dang V et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 4062-4065, 2007) を参考に perchlorotriphenylmethyl triethylester ラジカルを合成した。
- ② PTM-TE 含有リポソームの調製：PTM-TE を含む卵黄レシチン卵黄レシチン/ジセチルリン酸 (DCP) (1.5:0.1) あるいは卵黄レシチン/コレステロール/DCP (1:0.5:0.1) を等張リン酸緩衝液 (PBS) に懸濁して多重層リポソームを調製した。

### (2) ニトロキシルラジカルを結合したスチレン-マレイン酸共重合体

- ① ニトロキシルラジカルを結合したスチレン-マレイン酸共重合体の合成：スチレン-無水マレイン酸共重合体と 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (4-hydroxy-TEMPO) あるいは 3-hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (3-hydroxymethyl-PROXYL) をピリジン (脱水) に溶かし 65°C で 17 時間反応させ、TEMPO-SMA あるいは PROXYL-SMA を合成した。
- ② 安定性評価：TEMPO-SMA あるいは PROXYL-SMA の PBS に溶かし、アスコルビン酸溶液と混和して ESR を測定した。

### (3) ニトロキシルラジカルを結合したデキストラン

- ① ニトロキシルラジカルを結合したデキストランの合成：ヨードアセタミド化した

TEMPO をデキストラン (分子量 40,000) と反応させ、TEMPO-デキストランを合成した。  
② 安定性評価：ラット肝実質細胞を調製し、TEMPO-デキストランを混和して ESR を測定した。

(4) ガドリニウム (Gd) 結合デキストラン  
ジメチルスルホキシド中で無水 diethylenetriamine-*N,N,N',N',N''*-pentaacetic acid (無水 DTPA) をデキストラン (分子量 40,000) と反応させ、続いて塩化ガドリニウムをキレートさせて Gd-デキストランを合成した。

(5) 光増感剤結合デキストラン  
デキストラン (分子量 40,000) に *N,N'*-carbonyldiimidazole を用いてエチレンジアミンを結合させ、続いてクロリン e6 をアミド結合させた。

### (6) Gd 定量法

Gd を含む試料を 0.05 mM ~ 0.2 mM 4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPONE) あるいは 4-hydroxy-TEMPO の存在下 ESR を測定した。

### (7) 分析方法

ESR は、100 kHz の磁場変調で、9.4 GHz で測定した。MRI は、小動物用コンパクト MRI により、グラジェントエコー法で測定した。粒子径は、光散乱法により測定した。

### (8) 動物実験

マウスを用いた実験は、崇城大学の動物実験倫理委員会の審査のもと、イソフルランの吸入麻酔下で行なった。

## 4. 研究成果

### (1) PTM-TE のリポソーム膜内分散状態と酸素応答性

卵黄レシチンリポソームあるいは卵黄レシチンとコレステロールから成るリポソーム膜に PTM-TE (図 1) を存在させ、存在状態を ESR で解析した。PTM-TE は卵黄レシチンリポソーム中では分散状態を示すシャープなシグナル以外に凝集状態を示すブロードなシグナルが現れた (図 2)。凝集の割合は膜にコレステロールが含まれるとさらに多くなった。卵黄レシチンリポソームでは、卵黄レシチンに対する PTM-TE のモル比が約 0.017 以下では凝集状態が見られなかった。

PTM-TE のミネラルオイル溶液 (脂質膜の粘度と同等) について酸素濃度応答性を調べたところ、生体内の酸素分圧測定を行なうに十分な応答性が得られなかった。

### (2) ニトロキシルラジカルを結合したスチ

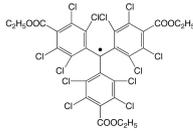


図 1 PTM-TE



図 2 卵黄レシチンリポソーム膜中の PTM-TE の ESR スペクトル

### レン-マレイン酸共重合体の合成と性質

癌への DDS 担体として用いられているスチレン-マレイン酸共重合体 (SMA) の体内動態を磁気共鳴画像化法で解析できるようにするため、ニトロキシラジカルで標識した。TEMPO-SMA、PROXYL-SMA における各ニトロキシラジカルの結合率は 350-420 mmol/g であった。

PBS 中で未標識の SMA の平均粒子径は約 171 nm であったのに対し、PROXYL-SMA では約 46 nm、TEMPO-SMA ではさらに小さかった。TEMPO-SMA、PROXYL-SMA のいずれも ESR シグナルは遊離の TEMPO、PROXYL に比べてブロードであった。ESR スペクトルから解析した回転相関時間は、TEMPO-SMA で約 70 ns、PROXYL-SMA で約 45 ns であり、遊離の 4-hydroxy-TEMPO、3-hydroxymethyl=PROXYL (いずれの 3 ns) より大きかった。

生体内での安定性を予測するために、TEMPO-SMA および PROXYL-SMA のアスコルビン酸による還元抵抗性を調べた。還元速度は、PROXYL-SMA はもともと還元速度の遅い 3-hydroxymethyl=PROXYL と同程度であり、TEMPO-SMA では半減期が 4-hydroxy-TEMPO の約 2 倍に延長された。SMA の粒子内に結合したニトロキシラジカルが、立体障害でアスコルビン酸に対して抵抗性を示したものと思われる。血漿中での安定性を調べるために、TEMPO-SMA および PROXYL-SMA をマウス血漿と混和した。いずれの標識 SMA の ESR シグナルも非常にブロードとなり、これら標識 SMA が血清蛋白質と強固に結合して、ESR による検出を妨げることがわかった。

### (3) ニトロキシラジカルを結合したデキストランの合成と性質

SMA が生体分子と強固に結合し磁気共鳴法による検出を妨げることがわかったので、担体をデキストランに変更した。TEMPO-デキストランにおける TEMPO 結合率は、グルコース残基 : TEMPO=57:1 であった。生体内での安定性を予測するために、TEMPO-デキストランをラット肝実質細胞と混和した。遊離の 4-hydroxy-TEMPO が半減期約 1.7 分で還元されたのに対し、TEMPO-デキストランは少なくとも 3 分間で全く還元されなかった。TEMPO は体内で還元されて常磁性を失うが、デキス

トランに結合させることで安定性が図れることがわかった。

MRI での検出を検討するため、ファントムに濃度を変えて TEMPO-デキストランの PBS 溶液をとり、同濃度の 4-hydroxy-TEMPO 溶液と MRI の信号強度を比較した (図 3)。TEMPO-デキストランでは濃度依存的に強調効果が見られ、その程度は 4-hydroxy-TEMPO の場合と同程度であった。そこで、マウスに投与して MRI を撮像したが、強調効果は見られなかった。

### (4) Gd 結合デキストランの合成と性質

標識としてニトロキシラジカルでは不十分であることがわかったため、MRI で実績のある Gd による標識を検討した。デキストランに対する無水 DTPA の比率を変えてデキストランへの Gd の結合率を制御することを試みたが、予想より多くのガドリニウムが結合する傾向にあった。この理由は現在のところ不明である。結合率は、グルコース残基 : Gd=1 : 0.5 から 1 : 1 であった。

ファントムにて MRI 増強効果を調べたところ、市販のマグネvist (Gd-DTPA) と比較して造影効果は 1/4 程度であることがわかつ

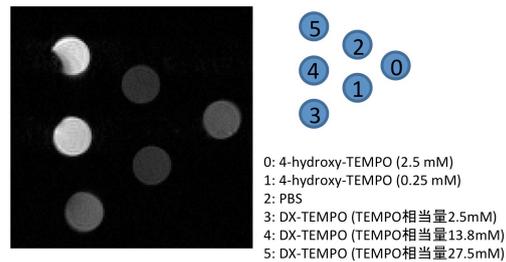


図 3 TEMPO-デキストランと 4-hydroxy-TEMPO の MRI 造影効果の比較



図 4 Gd-デキストランによるマウスの左足血管の描画

た。マウスに投与してMRIを撮像したところ、血管が描画され、造影剤が血管内に留まっている様子が確認された(図4)。

#### (5) クロリン e6 結合デキストランの合成

デキストランにエチレンジアミンをスペーサーとしてクロリン e6 を結合させた。しかし、結合後クロリン結合デキストランは水に不溶性となった。ポルフィリンあるいはその類似体が PDT の光増感剤として用いられるが、それらはもともと疎水性である。光増感剤結合デキストランの可溶化にはポリエチレングリコール化などの処置をとらざるを得ないことがわかった。

#### (6) 簡便な Gd 定量法の開発

Gd は通常 ICP により測定されるが、他の装置により簡便に測定できれば造影剤開発の作業性が向上する。ニトロキシルラジカルの ESR シグナルが、近傍に Gd などの常磁性物質が存在するとブロードとなることを利用して、ESR による Gd の測定法を検討した。4-hydroxy-TEMPO と 4-oxo-TEMPO で、Gd によるシグナルのブロード化の程度を比較したところ、4-oxo-TEMPO の方がより鋭敏に Gd 濃度に対して応答した。4-oxo-TEMPO の ESR シグナルの線幅と Gd 濃度の間には、Gd 濃度が少なくとも 60 mM まで直線性が得られた。

#### 結論と意義

生体分子との相互作用から担体としてデキストランのような多糖類を用いるべきであることがわかった。酸素分圧プローブとしてトリフェニルメチルラジカルを選択したが、合成が比較的容易な疎水性の PTM-TE は酸素応答性が低く、一方水溶性トリアリルメチルラジカルは合成が困難であった。ESR あるいは MRI での検出に主眼をおいてニトロキシルラジカルや Gd を検討したところ Gd を用いた MRI 検出が有望であることがわかった。ニトロキシルラジカルにおいても PROXYL タイプのものにすることで MRI あるいは生体計測用 ESR での検出が可能になるものと考えられる。一方、光増感剤の結合は、クロリン e6 自身の疎水性のため、結合後の可溶化が困難であったことから、ポリエチレングリコールなどの親水基の導入が必須であった。

本研究では、酸素プローブや光増感剤の結合には至らなかった。しかし、リボソーム内で PTM-TE が分散して存在し、シャープな ESR シグナルを与えたことや、Gd を結合させたデキストランを投与したマウスで MRI により血管が描画できたことは、これら担体に結合した薬物の体内動態を解析する方法を提供したことで非常に意味のある結果である。また、派生して開発できた ESR による Gd の簡便測定法は、MRI 造影剤の開発や検定に利用できる

ものである。

#### 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Tadatoshi Yamaguchi, Sigenobu Matsumoto, Toshiki Masumizu, Shinji Takechi, Takumi Ishida, Keizo Takeshita, Hisao Kansui, Takehisa Kunieda; Generation of radical species from dihydropyrazines having DNA strand-breakage activity and other characteristics. *Chem. Pharm. Bull.* 60(5), 639-646 (2012). 査読有り  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/60/5/60\\_5\\_639/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/60/5/60_5_639/_article)
- ② Daisuke Iohara, Masaaki Hiratsuka, Fumitoshi Hirayama, Keizo Takeshita, Keiichi Motoyama, Hidetoshi Arima, Kaneto Uekama; Evaluation of photodynamic activity of C<sub>60</sub>/2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin Nanoparticles. *J. Pharm. Sci.*, 101(9), 3390-3397 (2012). 査読有り doi: 10.1002/jps.23045
- ③ Keizo Takeshita, Shota Kinoshita, Shoko Okazaki; Simple method for quantification of gadolinium magnetic resonance imaging contrast agents using ESR spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.* 60(1), 31-36 (2012). 査読有り  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/60/1/60\\_1\\_31/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/60/1/60_1_31/_article)
- ④ Keizo Takeshita, Shoko Okazaki, and Hisao Kansui; Effect of cholesterol on distribution of stable, hydrophobic perchlorotriphenylmethyl triethylester radical incorporated in lecithin liposomal membranes. *Chem. Pharm. Bull.* 59(5) 624-628 (2011). 査読有り  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/59/5/59\\_5\\_624/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/59/5/59_5_624/_article)
- ⑤ Keizo Takeshita, Kumiko Kawaguchi, Kaori Fujii-Aikawa, Megumi Ueno, Shoko Okazaki, Mitsuhiro Ono, Murali C. Krishna, Periannan Kuppusamy, Toshihiko Ozawa, and Nobuo Ikota; Heterogeneity of regional redox status and relation of the redox status to oxygenation in a tumor model, evaluated using electron paramagnetic resonance imaging. *Cancer Res.*, 70(10) 4133-4140 (2010). 査読有り doi: 10.1158/0008-5472

[学会発表] (計 19 件)

- ① 岡崎祥子 ら; アシル保護ヒドロキシルアミンプローブを用いた in vivo ESR法による生体内レドックス測定-敗血症モデルマウスにおける検討-, 第25回バイオメディカ

- ル分析科学シンポジウム, 2012年8月8日～10日, 東京
- ② 岡崎祥子 ら; 敗血症モデルマウスにおける経時的レドックス変化の非侵襲的測定, 第65回酸化ストレス学会学術集会, 2012年6月7日～8日, 徳島
- ③ 岡崎祥子 ら; In vivo ESR法による敗血症モデルマウスにおける生体内レドックスの時間変化の測定, 日本薬学会第132年会 2012年3月28日～31日, 札幌
- ④ 竹下啓蔵 ら; ガドリニウムMRI造影剤のESRによる簡易定量法の検討, 日本薬学会第132年会, 2012年3月28日～31日, 札幌
- ⑤ Shoko Okazaki et al.; Study on redox evaluation in sepsis model mice by in vivo ESR using acyl-protected hydroxylamine probes. 20<sup>th</sup> JSPS Core-to-Core Seminar: International Redox Core Symposium on In Vivo Magnetic Resonance Imaging, February 5<sup>th</sup>-6<sup>th</sup>, 2012, Fukuoka
- ⑥ 木下翔太 ら; ESRを用いたガドリニウム含有MRI造影剤の簡易定量法の検討, 第28回日本薬学会九州支部大会, 2011年12月10日～11日, 福岡
- ⑦ 岡崎祥子 ら; 薬物キャリアのスピン標識による体内動態イメージングへ向けた疎水性トリチルラジカルのリポソーム膜内における分布解析, 第50回電子スピンサイエンス学会年会, 2011年11月16日～18日, 仙台
- ⑧ 竹下啓蔵 ら; ニトロキシラジカルのESRシグナルの広幅化を利用したガドリニウムMRI造影剤定量法の検討, 第50回電子スピンサイエンス学会年会, 2011年11月16日～18日, 仙台
- ⑨ Shoko Okazaki et al.; Non-invasive measurement of the redox status in the mouse whole body by in vivo EPR spectroscopy using acyl-protected hydroxylamine probes, 5<sup>th</sup> Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia), 8<sup>th</sup> Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), 11<sup>th</sup> Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit). August 31-September 4, 2011, Kagoshima
- ⑩ 岡崎祥子 ら; スピン標識薬物キャリアの体内動態イメージングに向けたトリチルラジカルのリポソーム膜内における分布解析, 第64回日本酸化ストレス学会学術集会, 2011年7月2日～3日, 北海道
- ⑪ 岡崎祥子 ら; リポソーム体内動態イメージングへ向けた安定な疎水性トリチルラジカルのリポソーム膜内における分布解析, 日本薬学会第131年会, 2011年3月28日～31日, 静岡
- ⑫ 岡崎祥子 ら; ヒドロキシルアミンの酸化還元反応を利用した敗血症モデルマウスの

生体内レドックス測定, 第63回日本酸化ストレス学会学術集会, 2010年6月24日～25日, 横浜

- ⑬ M. Hiratsuka et al.; Hydrophilic C<sub>60</sub>/Hydroxypropyl-β-cyclodextrin Nanoparticles: Superior Generation of Reactive Oxygen Species, The 15th International Cyclodextrin Symposium, May 10, 2010, Vienna, Austria

[その他]

ホームページ等

<http://pharm.ph.sojou-u.ac.jp/lab/bunsekikagaku/Top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹下 啓蔵 (TAKESHITA KEIZO)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：70175438

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

岡崎 祥子 (OKAZAKI SHOKO)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号：40435152