

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 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791192

研究課題名（和文） ラクトソーム蛍光・PET イメージングにおける癌の描出能改善法の研究

研究課題名（英文） Study of improvement depiction of carcinoma in Lactosome fluorescence / PET imaging

研究代表者 栗原 研輔 (Kurihara Kensuke)
京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90531997

研究成果の概要（和文）：本研究では癌診断可能なナノキャリア開発を目指し、ICG や ^{18}F 、 ^{123}I 標識ラクトソームを用いて癌描出能に関する研究を行った。ABC 現象 (20-100nm のナノ粒子特有の 2 回目投与時における網内系への集積現象) に対する回避方法も探求した。結果、各種標識体合成、小動物 PET イメージング条件確立、体内動態調査等は施行できた。数種の ABC 現象減弱法を確認したが ABC 現象を完全に回避するには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：We aimed at a development of the nanocarrier who is able to diagnose carcinoma. By using the Lactosome labeled by ICG, or ^{18}F , or ^{123}I , this study was performed to improve depiction of carcinoma. We searched the methods how to avoid an Accelerated Blood Clearance (ABC) phenomenon, which peculiarly appeared when the 20-100nm nanocarrier was administered at the second time. As a result, we were able to compose Lactosome labeled by ICG, or ^{18}F , or ^{123}I etc. And we confirmed small animal PET imaging condition, and performed biodistribution. Besides, we found out some methods to let an ABC phenomenon diminish. However, we were not able to let an ABC phenomenon completely disappear.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線化学

キーワード：核医学、分子イメージング、ナノキャリア、ミセル、SPECT、PET、EPR 効果、腫瘍イメージング、転移モデル

1. 研究開始当初の背景

現在まで様々な薬剤伝達システム (DDS) が開発されているが、その基盤の 1 つにナノキャリアを用いる分子搬送システムがあり、薬剤を酵素分解などから保護し、尿排泄を回避し、標的部位に効率よく送達して副作用を抑制できる等の特長が知られている。また、蛍光剤や放射性同位元素等のシグナル剤を標識することで、分子イメージングプローブの基盤としても有用であり、さらには治療薬としてリポソーム化ドキシソルビシン (商品名: ドキシル) も上市されている。

申請者らは生体適合性を有し、がん組織のイメージングや DDS に利用できる新規ナノキャリアシステム (ラクトソーム) を開発した。これは、疎水性部位にポリ L-乳酸、親水性部位にポリサルコシンを用いた両親媒性ポリデブシペプチドであり、自己組織化により形成される。さらに、その疎水部や親水部の鎖長を変化させることで、形状や粒径 (20 -100 nm) の制御も可能となる。

このラクトソームでは、腫瘍組織では正常組織に比して血管透過性が著しく亢進しているために高分子や微粒子が血管より流出しやすく、またリンパ系が発達していないために腫瘍組織に到達した物質が蓄積する性質 (EPR 効果) を利用できる。

このラクトソームは血中で安定した粒子を形成させ (血中半減期 10-20 時間)、近赤外蛍光剤 (インドシアニングリーン) で標識した 30nm の粒子を、担癌マウスの腫瘍組織に選択的に集積させつつ、肝臓などの内臓への集積を軽減することで、がん組織のイメージングに成功していた。さらにはラクトソームの ^{18}F 標識合成技術も確立させ、 ^{18}F 標識ラクトソームを用いた担がんマウスでの小動物 PET イメージング実験も開始していた。

2. 研究の目的

本研究では、このラクトソームを DDS として臨床応用する橋渡しとして、GLP 基準での非臨床試験 (安全性薬理試験および毒性試験) および第 I 相臨床試験を目標としているが、蛍光・PET/SPECT

イメージングにおいてさらなるがん組織の描出能向上を目的として探索研究を行った。

3. 研究の方法

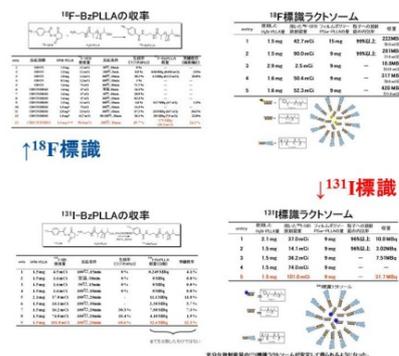
^{18}F 標識ラクトソーム等の標識合成は、京都大学探索医療センター・ラクトソームプロジェクトの木村俊作教授、山本文彦准教授、島津製作所基盤技術研究所の技術協力を得た。蛍光イメージングや分析は、京都大学大学院医学研究科・分子腫瘍学の近藤科江教授の技術協力を得た。 ^{18}F および小動物用 PET を用いた実験は、京都大学医学部附属病院内や京大薬学部内の RI 実験施設で行われた。

4. 研究成果

a) ^{18}F 標識ラクトソームの改良

b) ^{131}I 標識ラクトソーム合成技術の確立

^{18}F を内包してラクトソームに標識するには、 ^{18}F 標識 PLLA の効率的な調整法開発が必要であった。SFB を用いて温度や濃度条件等を検討したところ、収率が向上し安定した。この合成手法はフッ素の同族元素であるヨウ素にも応用可能で、 ^{131}I 標識/ ^{123}I 標識/ ^{125}I 標識ラクトソームはいずれも同様の SIB を用いる手法により合成技術が確立された。



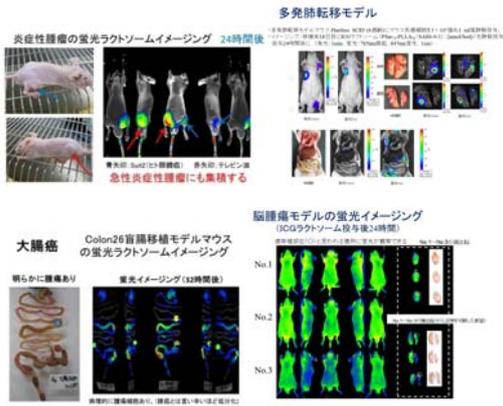
^{18}F 標識での合成条件の検討実験が活きて ^{131}I 標識での収率向上が進んだ

また、20nm とより小径化を可能にした A3B 型のラクトソームの粒子化にも成功し、F-18 などの放射性薬剤での標識化にも成功した。



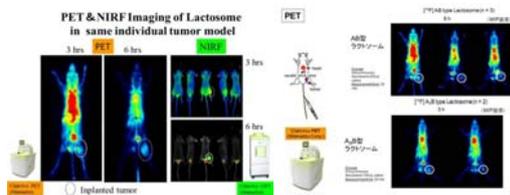
c) 担がん/急性炎症モデルマウスの作成

長期間観察を必要とするマウスモデルはテレピン油皮下注による急性炎症マウスを用いた。蛍光イメージングは、大腿部下移植マウスのほか、細胞株の尾静注による多発肺転移マウス、盲腸同所移植による大腸がんマウス、脳腫瘍同所移植マウスなどを作成した。¹⁸F イメージングは、皮下腫瘍マウスを使用した。



d1) 小動物 PET イメージング条件の確立

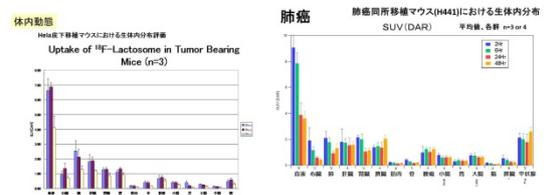
大腿部下腫瘍モデルマウスにおいて、¹⁸F 標識ラクトソーム PET の条件検討を行った。ICG 標識ラクトソームの同時投与も行い、体内動態が一致することを確認した。しかしラクトソームは集積に 24 時間以上を要するため半減期の短い¹⁸F 標識では高い血中滞留性から十分なコントラストが得られなかった。しかし粒径が小さく 6 時間程度で集積を始める A3B 型ラクトソームでは腫瘍の描出は幾分改善された。



d2) biodistribution によるデータ収集

上記 PET イメージングにおいて、撮像終了後に biodistribution を行い、体内動態を検討した。また、膵臓癌同所移植モデルマウス、肺癌同所移

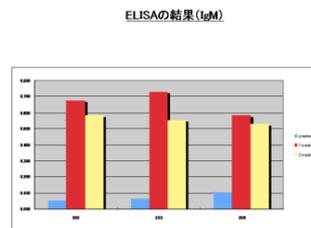
植マウス、大腸癌同所移植マウス、脳腫瘍同所移植マウスについても ¹³¹I 標識ラクトソームを用いた biodistribution を行い腫瘍集積性を調べた。



e) ABC (accelerated blood clearance) 現象回避

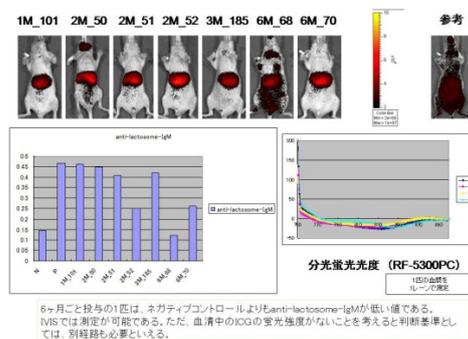
1) ELISA 法による IgM 量の測定法確立

ラクトソーム投与後に血清採取して ELISA 法による解析を行った結果、IgM がラクトソームの抗体産生に強く関与していることが明らかとなった。



2) 長期投与による ABC 現象抑制実験

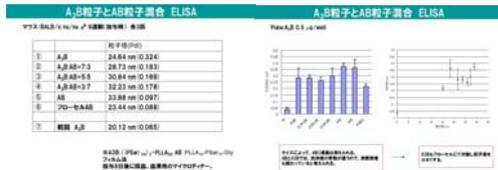
初回のラクトソーム注射後 6 ヶ月間飼育し、その間、1、2、3、6 か月間隔で ICG ラクトソームでの蛍光イメージングを行い、6 ヶ月後の画像を比較した。前三者には ABC 現象を強く認めたのに対し、6 か月間隔のマウスでは、肝臓への集積亢進は残存するものの、炎症性腫瘍の良好な描出を認めた。これは一定の投与間隔を空ければ ABC 現象が回避できる可能性を示唆している。



6ヶ月ごと投与の1匹は、ネガティブコントロールよりもanti-lactosome-IgMが低い値である。IVISでは測定が可能である。ただ、血清中のICGの蛍光強度がないことを考えると判断基準としては、別経路も必要といえる。

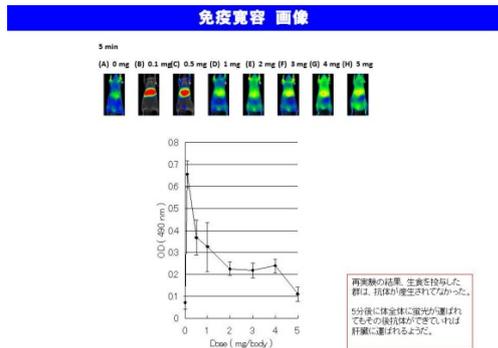
3) A₃B+AB 混合粒子による ABC 現象抑制

A₃B+AB 混合粒子による ABC 現象誘起実験を行った。A₃B が 100%、70%、50%、30%、0%のものを使用した。粒子径は 24.6~33.9nm とほぼ連続的に推移した。これを BALB/c nu/nu マウス各 3 匹に投与し、投与 8 日後に採血を行い、ELISA 法で検証した。その結果、粒子サイズによって、ABC 現象はある程度抑えられることが示唆された。また AB と A3B では、抗体値の挙動が違うので、表面密度も関わっていると考えられた。



4) 免疫寛容を利用した ABC 現象抑制

AB 型ラクトソーム大量投与による ABC 現象抑制実験を行った。0 mg~5 mg/body と用量を変えたラクトソームを BALB/c nu/nu マウス各 3 匹に投与し、投与 8 日後に採血を行い、ELISA 法で検証した。その結果、1 mg/body と 5 mg/body の 2 段階で Anti-Lactosome-IgM 抗体産生が抑えられていることが分かった。また、これを担癌モデルマウスに対する ICG 標識ラクトソーム大量投与の再実験を行うことでイメージングの違いとしても確認することに成功した。

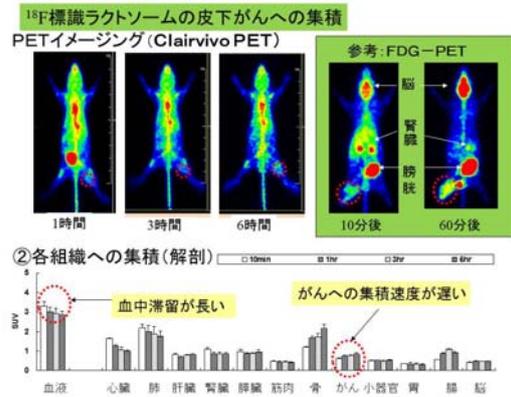


f) 他のがん診断用プローブとの比較実験

1) ¹⁸F -FDG-PET との比較

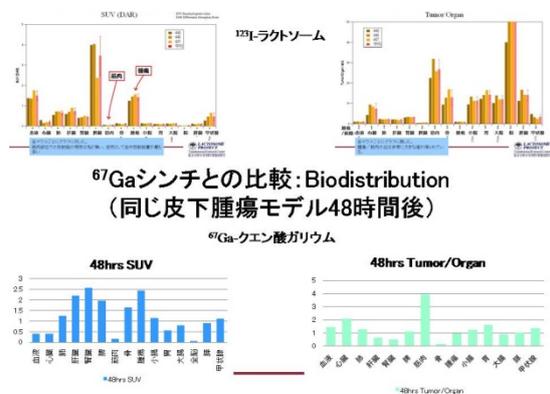
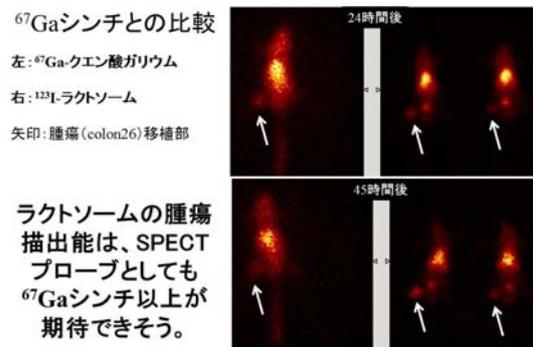
大腿部皮下腫瘍モデルマウスにおいて、¹⁸F

-FDG-PET と ¹⁸F 標識ラクトソーム PET の比較を行った。FDG-PET との比較ではラクトソームの腫瘍への集積性は弱く認められた。これは血中滞留性が良く、集積速度が遅いことに因ると考えられた。



2) ⁶⁷Ga シンチとの比較

大腿部皮下腫瘍モデルマウスにおいて、⁶⁷Ga シンチと ¹²³I 標識ラクトソームの比較を行った。その結果、⁶⁷Ga シンチに比しては良好な腫瘍描出が認められた。



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)

[学会発表] (計 13 件)

・ 国際学会

① [Poster Presentation]

Escape from the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon of “Lactosome” by control of micelle size and surface

A. Makino, E.Takeuchi, I.Hara, R.Yamahara, E.Ozeki, K.Kurihara, F.Yamamoto, S.Kimura

the World Molecular Imaging Congress 2011, September 7-10, 2011, USA

② [Poster Presentation]

“Lactosome” a Potential Nano-Ordered Carrier Composed of a Poly(L-lactic acid)-

block-Poly(sarcosine) Amphiphilic Polydepsipeptide and Poly(lactic acid) Derivatives

A.Makino, R.Yamahara, I.Hara, E.Takeuchi, E.Ozeki, K.Kurihara, S.Kizaka-Kondoh,

F.Yamamoto, A.Shimizu, S.Kimura

International Symposium of Nanomaterials, 2010.12.1, Nara

③-⑧ [Poster Presentation]

③ A fluorescent imaging of the murine orthotopic brain tumor, using new nanocarrier “Lactosome”

K.Kurihara, F.Yamamoto, M.Yamaguchi, Y.Arakawa, I.Hara, E.Ozeki, A.Makino, K.Togashi, A.Shimizu, S.Kimura

④ “Lactosome” a potential nano-ordered carrier for molecular imaging composed of a poly(l-lactic acid)-*block*-poly(sarcosine) amphiphilic polydepsipeptide and poly(lactic

acid) derivatives

A.Makino, R.Yamahara, I.Hara, E.Takeuchi, E.Ozeki, K.Kurihara, S.Kizaka-Kondoh, F.Yamamoto, A.Shimizu, S.Kimura

⑤ Development of a novel radioisotope labeled tumor imaging probe for PET “¹⁸F-Lactosome”

R.Yamahara, F.Yamamoto, K.Kurihara, H.Tsukada, E.Takeuchi, I.Hara, A.Makino, A.Shimizu, S.Kizaka-Kondoh, E.Ozeki, S.Kimura

⑥ Development of Near-Infrared Fluorescence Probes for *In Vivo* Tumor Imaging with Using an Amphiphilic Polydepsipeptide Micelle “Lactosome”

I.Hara, R.Yamahara, E.Takeuchi, A.Makino, K.Kurihara, F.Yamamoto, S.Kizaka-Kondoh, A.Shimizu, E.Ozeki, S.Kimura

⑦ ABC phenomenon with lactosome studied by *in vivo* NIRF imaging

E.Takeuchi, I.Hara, R.Yamahara, A.Makino, K.Kurihara, F.Yamamoto, S.Kizaka-Kondoh, A.Shimizu, E.Ozeki, S.Kimura

⑧ Development of novel radioiodine-labeled nanocarrier “Lactosome” and initial evaluation as a tumor imaging probe

F.Yamamoto, R.Yamahara, I.Hara, A.Makino, K.Kurihara, E.Takeuchi, S.Kizaka-Kondoh, A.Shimizu, E.Ozeki, S.Kimura

③-⑧ the World Molecular Imaging Congress 2010, September 8-11, 2010 in Kyoto, Japan

⑨ [Poster Presentation]

Development and initial evaluation of novel fluorine-18 labeled nanocarrier “Lactosome” as

a tumor imaging probe for PET

F.Yamamoto, R.Yamahara, K.Kurihara, H. Tsukada, E.Takeuchi, I.Hara, M.Akira, H.Saiki, S.Kizaka-Kondoh, E.Ozeki, S.Kimura
Society of Nuclear Medicine Annual Meeting
2010, 2010.6.5-9 Salt Lake City, USA

・国内学会

⑩ [ポスター発表]

高分子ミセル”ラクトソーム”の構造制御と体内動態解析

牧野顕、山原亮、原功、竹内恵、小関英一、栗原研輔、塚田秀夫、山本文彦、佐治英郎、清水章、木村俊作

第51回日本核医学会学術総会
2011.10.27-29 つくば

⑪ [ポスター発表]

I-131 標識ラクトソームを用いた内用療法

竹内恵理、原功、山原亮、山原亮、栗原研輔、木村光晴、山本文彦、清水章、小関英一、木村俊作
第51回日本核医学会学術総会

2011.10.27-29 つくば

⑫ [口頭発表]

新規ナノキャリア「ラクトソーム」を用いた脳腫瘍同所移植モデルマウスにおける蛍光イメージングおよび病理組織との比較

栗原研輔、山本文彦、山口真、荒川芳輝、原功、牧野顕、小関英一、富樫かおり、清水章、木村俊作

第26回日本DDS学会総会・学術集会
2010.6.17-18 大阪

⑬ [ポスター発表]

ABC 現象の可視化とその抑制方法の探究…近赤外蛍光剤標識された高分子ミセル型ナノキャリア「ICGラクトソーム」を用いて

栗原研輔、山本文彦、竹内恵理、原功、山原亮、小関英一、牧野顕、富樫かおり、清水章、木村俊作
第5回日本分子イメージング学会総会・学術集会
2010.5.22-23 滋賀

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

①名称：病変部位の治療システム

発明者：栗原研輔、竹内恵理、原功、山原亮、小関英一、木村俊作

権利者：京都大学(50%)、島津製作所(50%)

番号：2011-203725

出願年月日：2011年9月16日

国内外の別：国内

[その他]

【講演】(計1件)

・「両親媒性ナノキャリア「ラクトソーム」開発の現状と展望」

栗原研輔 第37回滋賀成人病センター研究所セミナー 2010.5.14 (滋賀)

【ホームページ】

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1333/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

- ・栗原 研輔 (Kurihara Kensuke)
- ・京都大学・医学研究科・助教
- ・研究者番号：90631997