

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791401
 研究課題名（和文） 革新的癌診断治療システムの開発研究－骨腫瘍診断治療から DDS へ
 研究課題名（英文） Development of an innovative system for cancer diagnosis and therapy;
 from diagnosis and therapy for bone metastases to DDS
 研究代表者
 小川 数馬（OGAWA KAZUMA）
 金沢大学・薬学系・准教授
 研究者番号：30347471

研究成果の概要（和文）：

癌治療において、抗癌剤を効率良く癌組織に運ぶことにより、癌治療効果を高め、副作用を軽減する drug delivery system (DDS) は非常に重要である。本研究では骨の無機質の主な構成成分であるハイドロキシアパタイトをナノ粒子輸送担体として用いた DDS 薬剤の開発を目的に、骨親和性放射性薬剤をハイドロキシアパタイトに結合させた新規癌診断・治療 DDS の構築・評価を行った。

研究成果の概要（英文）：

Drug delivery system (DDS), which is for delivery of anticancer drugs to cancer tissue, is very important because it enhances the therapeutic effects and reduces the side effects. The aim of this study is development of a DDS using hydroxyapatite as a nanoparticle carrier. A novel cancer diagnosis and therapy DDS, which is a conjugation between a radiolabeled compound with high bone affinity and hydroxyapatite, was synthesized and evaluated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

研究分野：核医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：DDS、ナノパーティクル、セラノスティクス、PET

1. 研究開始当初の背景

癌治療において、抗癌剤を効率良く癌組織に運ぶことにより、癌治療効果を高め、副作用を軽減する drug delivery system (DDS) は非常に重要である。一方、癌組織では、正常組織に比べ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、リンパ系が発達していないために癌組織に到達した物質は蓄積しやすい。このような特性を EPR (enhanced permeability and

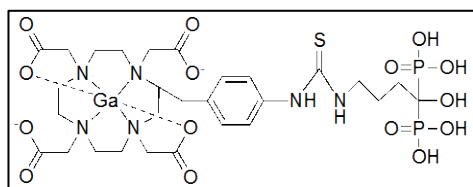
retention) 効果といい、ある範囲のサイズのナノ分子がこの EPR 効果を受けるサイズであることが報告されており、これまでに、EPR 効果を意図した高分子ミセル、リポソームなどを輸送担体とした抗癌剤内包ナノパーティクル DDS 薬剤が開発され、成果をあげている。

2. 研究の目的

本研究では、治療効果を予め PET によって

予測(診断)し、癌治療を行う、セラノスティクス (Theranostics = Therapy + Diagnostics) DDS 放射性薬剤の開発を目的に、骨の無機質の主な構成成分であるハイドロキシアパタイトのナノ粒子を癌への輸送担体として選択し、研究を進めることとした。ここで、放射性核種としては、ジェネレータ産生 PET 核種であることから、高価なサイクロトロンを有さない施設でも容易に利用可能な臨床的に汎用性の高い Ga-68 を用いることとし、まず、ナノ粒子 DDS 製剤作製の前段階として、輸送担体として選択したハイドロキシアパタイトに放射性核種を導入するために、ハイドロキシアパタイトに高親和性の放射性化合物の評価を行うこととした。我々はこれまでに骨指向性放射性薬剤として、放射性金属錯体と骨親和性化合物であるビスホスホネートを結合した化合物を設計、合成し、その有用性を評価してきた。本研究では、酸性アミノ酸ペプチドがハイドロキシアパタイトに高い親和性を有するとの報告があることから、酸性アミノ酸ペプチドを用いた放射性 Ga 標識化合物の開発を行うことを第一の目的とした。

次いで、がんへの輸送担体として EPR 効果を意図し、ハイドロキシアパタイトナノ粒子と、我々が開発した骨親和性放射性トレーサー ^{67}Ga -DOTA-Bn-SCN-HBP (図 1) (K. Ogawa et al. Nucl Med Biol 2011, 38, 631-636) とを結合した化合物を作製し、評価を行った。



(図 1)

3. 研究の方法

L-アスパラギン酸もしくはD-アスパラギン酸を繰り返し Fmoc 固相合成法により結合させ、最後に Fmoc 脱保護後の N 末端に錯体形成部位となる DOTA の誘導体 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-tris(t-butyl acetate) (Macrocyclics, Dallas, TX, USA) を結合した。その後、トリフルオロ酢酸により保護基の脱保護と樹脂からの切り出しを同時に行い、HPLC にて精製することにより、様々な鎖長の DOTA 結合アスパラギン酸ペプチド [DOTA-(L-Asp)_n or DOTA-(D-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, or 14)] を合成した。放射標識は Ga-68 の代替核種として半減期の長い Ga-67 を用いて行い、同時に非放射性 Ga を用いた錯体合成も行った。

本研究の輸送担体として用いるハイドロキシアパタイトと [Ga-67]-DOTA-Bn-SCN-HBP もしくは、[Ga-67]-DOTA-(Asp)_n との結合親和性を評価するために、ハイドロキシアパタイト (Bio-Gel; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を緩衝液に懸濁させ、その懸濁液に標識体を加え、1 時間振とうした後、遠心分離し、上清の放射能を測定することによりハイドロキシアパタイトに結合した放射能の割合を以下の式により求めた。

$$\text{Hydroxyapatite binding (\%)} = (1 - [\text{radioactivity of supernatant of each sample}] / [\text{radioactivity of supernatant in the respective control}]) \times 100$$

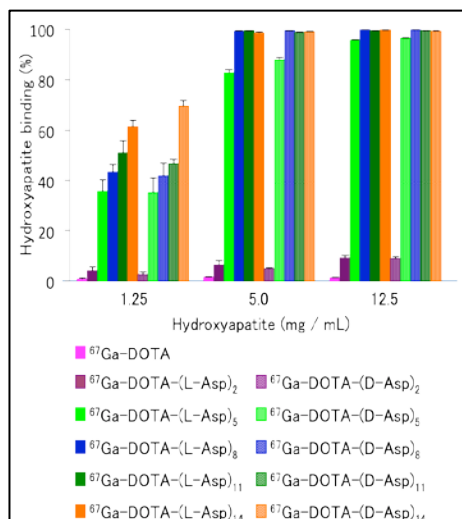
放射標識ハイドロキシアパタイトナノ粒子を作製するため市販のハイドロキシアパタイト粒子 (nano-SHAp, 40 nm ; SofSera, Tokyo, Japan) と DOTA-Bn-SCN-HBP を混和し、遠心後、上清に含まれている化合物の粒子径を動的光散乱法 (DLS) により測定した。同様の方法で、放射性ガリウムで標識した [Ga-67]-DOTA-Bn-SCN-HBP を用いて、[Ga-67]-DOTA-Bn-SCN-HBP 結合ハイドロキシアパタイトナノ粒子を作製した。

[Ga-67]-DOTA-Bn-SCN-HBP 結合ハイドロキシアパタイトナノ粒子を Balb/c マウスに Colon-26 細胞 (Mouse colorectal cancer cell line) を皮下移植することにより作製した担癌マウスに投与し、屠殺後、主要組織の重量と放射能を測定することにより体内放射能分布を評価した。

4. 研究成果

[Ga-67]-DOTA-(L-Asp)_n と [Ga-67]-DOTA-(D-Asp)_n (n=2, 5, 8, 11, 14) を放射化学的収率 15-76%、放射化学的純度 95% 以上で合成した。

これら標識体の in vitro におけるハイドロキシアパタイトへの結合親和性を評価した結果、[Ga-67]-DOTA-(L-Asp)_n と [Ga-67]-DOTA-(D-Asp)_n はハイドロキシアパタイトの濃度に依存した結合親和性の増加を示した。また、ハイドロキシアパタイトへの結合親和性はペプチド鎖長の伸張に従って増加し、L-アスパラギン酸ペプチドと D-アスパラギン酸ペプチドでは、ハイドロキシアパタイトへの結合親和性は、顕著な差は観察されなかった (図 2)。以上の結果、放射性ガリウム標識アスパラギン酸ペプチドがハイドロキシアパタイトナノ粒子の標識部位として有用である可能性が示された。しかしながら、申請者らが開発した Ga-DOTA 結合ビスホスホネートである骨親和性放射性トレーサー [Ga-67]-DOTA-Bn-SCN-HBP の方が、放射



(図 2)

性ガリウム標識アスパラギン酸ペプチドに対してハイドロキシアパタイトへの結合親和性は高かったため、まず、[Ga-67]-DOTA-Bn-SCN-HBP を用いて放射標識ハイドロキシアパタイトナノ粒子の作製、評価を行うこととした。

DOTA-Bn-SCN-HBP 結合ハイドロキシアパタイトナノ粒子を作製し、粒子径測定したその結果、粒子径平均 62.6 nm と EPR 効果の条件を満たす数 10 - 100 nm の粒子サイズであった。

セルロースアセテート膜電気泳動と限外濾過を用いて [Ga-67]-DOTA-Bn-SCN-HBP 結合ハイドロキシアパタイトナノ粒子として存在している放射能の割合を定量した。その結果、放射化学的純度は約 80% であった。

[Ga-67]-DOTA-Bn-SCN-HBP 結合ハイドロキシアパタイトナノ粒子の担癌マウス体内放射能分布を評価した結果、血液からは時間経過と共に放射能消失を示し、腫瘍への放射能集積は滞留した。しかしながら、骨への放射能集積も高く、これは化合物の放射化学的純度が低いこと、もしくは、生体内で骨親和性放射性化合物がハイドロキシアパタイトナノ粒子から解離したことが考えられる。現在、[Ga-67]-DOTA-Bn-SCN-HBP 結合ハイドロキシアパタイトナノ粒子の純度を向上させる精製作業を検討中である。また、将来的には、Y-90、Lu-177 といった治療核種を用いた内用放射線治療に応用することにより、診断と治療を組み合わせた包括的システムの構築を試みる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① K. Ogawa and K. Washiyama: Bone target radiotracers for palliative therapy of bone metastases. *Current Medicinal Chemistry*, 査読有, **19**, 3290-3300 (2012)
DOI: 10.2174/092986712801215865
- ② K. Ogawa and H. Saji: Advances in Drug Design of Radiometal-Based Imaging Agents for Bone Disorders. *International Journal of Molecular Imaging*, 査読有, 2011:537687. Epub 2011 Dec 15. (2011)
DOI: 10.1155/2011/537687.

[学会発表] (計 4 件)

- ① K. Ogawa : Recent basic researches in radionuclide therapy in Japan. *The 5th Japna-Korea-China Conference on Nuclear Medicine*. 2011.10.27, International Congress Center (Ibaragi)
- ② K. Wahiyama, K. Ogawa, S. Kinuya, R. Amano: Comparative study of biodistribution of alpha-emitting bone-seeking radiopharmaceuticals. *The 5th Japna-Korea-China Conference on Nuclear Medicine*. 2011.10.27, International Congress Center (Ibaragi)
- ③ K. Takai, K. Ogawa, T. Kiwada, Y. Kitamura, K. Shiba, A. Odani: "Preparation and evaluation of radiogallium-DOTA complex conjugated acidic oligopeptide as bone imaging agents." *The 5th Japan-Korea-China Conference on Nuclear Medicine*. 2011.10.27, International Congress Center (Ibaragi)
- ④ 高井健一郎、小川数馬、黄檜達人、北村陽二、柴和弘、小谷明: 転移性骨腫瘍の診断を目的とした放射性ガリウム標識薬剤の開発 第9回次世代を担う若手のフィジカル・ファーマフォーラム, 2011.9.12 ホテル箱根アカデミー (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 数馬 (OGAWA KAZUMA)

金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号：30347471

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし