

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82502  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24510321  
研究課題名(和文)腫瘍DDSイメージングのための量子ドット・ニトロキシド結合新規センサーの開発

研究課題名(英文)Quantum dot/nitroxide-based sensing platform for image-guided drug delivery in cancer

研究代表者  
Rumiana Bakalova (Rumiana, Bakalova)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：30469936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：DDSにおける新しいセンサーとして、量子ドットと疎水性ニトロキシラジカルでラベル化した抗がん剤を内包するナノ粒子を2種類開発した。これらの2つの化合物がナノ粒子中に共存する時には、蛍光を示さないが抗がん剤が放出されることで量子ドットが蛍光するようになる。このナノ粒子を用いて、担がんマウスを用いて、腫瘍の視覚化・リンパ節のマッピングを行った。腫瘍とリンパ節から、非常に強い蛍光が確認された。血中半減期は $6\pm 2$ 時間で、腫瘍中には $8\pm 2$ 時間、リンパ節には $11\pm 3$ 時間残留した。このことからサイズを制御した血中滞留性の高いポリマーソームはセラノスティクスナノキャリアとして有望であると言える。

研究成果の概要(英文)：We developed polymersomes, embedding with quantum dots (QDs) and hydrophobic nitroxide-labeled anticancer drug, as a new sensing platform for imaging of drug delivery in cancer. If both substances are retained into the polymersome, there is no fluorescence of QDs. If nitroxide-labeled drug is released from polymersomes, the fluorescence of QDs appeared. On experimental cancer-bearing animals, using optical imaging, we established that these nanoparticles were appropriate for imaging of cancer, lymph node mapping, as well as for imaging of drug delivery. A strong fluorescent signal, corresponding to QD705 fluorescence, was detected in the tumor, as well as into the lymph nodes. The half-life of QD/nitroxide-embedding polymersomes was  $6\pm 2$  hours in the bloodstream,  $8\pm 2$  hours into the tumor and  $11\pm 3$  hours in the lymph nodes. The data suggests these size-controlled long-circulating polymersomes are useful matrix for development of nano-formulations with theranostic capabilities.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：Polymersomes Quantum dots Nitroxides Drug delivery systems Cancer

1. 研究開始当初の背景

本研究は我々が過去に行った量子ドット (QD)・スピン化抗がん剤・多機能 DDS キャリアの研究に基づくものである。過去の研究から、ニトロキシラジカルが、QD に近接するときに QD を消光させ、この消光は、ニトロキシラジカルの還元によって回復するという知見を得ている。他の研究者によっても、特に小径のナノ粒子において、ニトロキシラジカルのような常磁性の分子によって消光が生じることが知られている。[Laferriere et al. *Chem. Commun.*, 2006, 257] (Fig.1)。

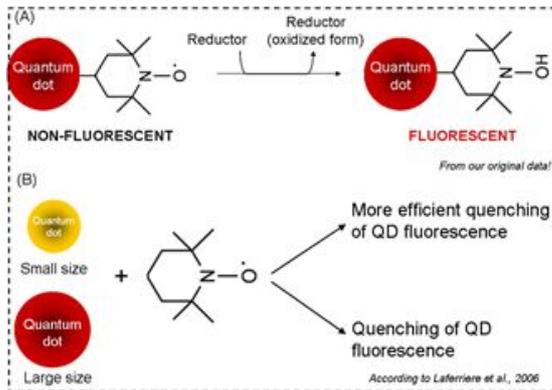


Fig. 1. Quantum dot-nitroxide sensor.

このような背景に基づいて、QD と、ニトロキシラジカルラベル化抗がん剤を含むポリマーソームを、DDS におけるイメージングのセンサーとして有望なナノ粒子として開発した。(Fig2)

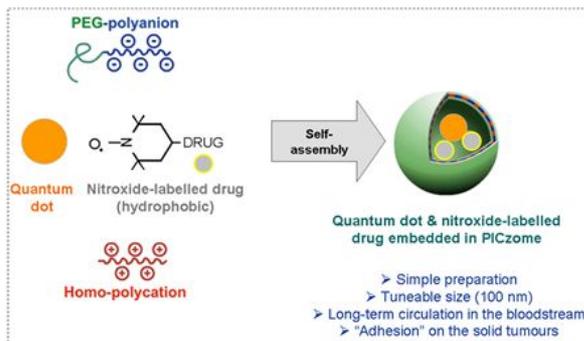


Fig. 2. Polmersomes, embedded with QDs and nitroxide-labeled anticancer drug.

我々の優位点。

- ・ 粒径範囲が整っており (d~140 nm)、血中半減期の長い安定なナノ粒子を作れる。
- ・ QD の合成法に優れる。
- ・ ニトロキシ化合物の合成とラベル化に優れる。
- ・ 担がんマウス等の生物実験につなげやすい。

2. 研究の目的

腫瘍 DDS イメージングのためのセンサーとなりうる量子ドット・ニトロキシド結合ポ

リマーソームを開発する。

このようなナノ粒子は、*In Vivo Optical Imaging Systems* によって、担がんマウスの *in vivo* レドックスイメージングに用いることができる。

3. 研究の方法

・ 量子ドットを合成、精製し、水への溶解性や、その他の物性を測定する。(UV/VIS、蛍光、DLS、TEM 等)

・ ニトロキシドでラベル化した抗がん剤を合成、精製し、物性を調べる。(HPLC、TLC、電子スピン共鳴等)

・ QD、ニトロキシドラベル化抗がん剤 (SLENU, SLCNUgly, NitroDox); 存在下、ポリマーソームを自己集合させることで、それらを含むナノ粒子とする。ナノ粒子の生成は、DLS、電子スピン共鳴、蛍光等で確認する。

・ ポリマーソームの生理条件 (緩衝液、細胞培養液、血清) での安定性、非特異的な内包物漏出は、蛍光、電子スピン共鳴等で確認する。

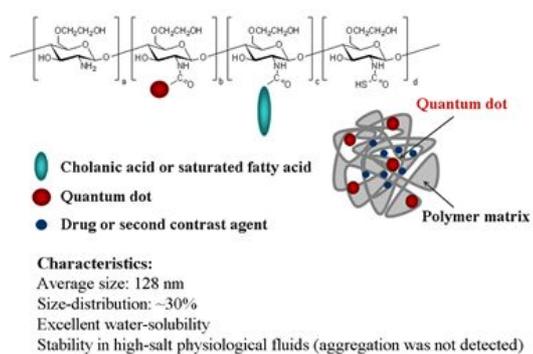
・ ノードマウスに大腸がんを植え、担がんマウスを作成し生体モデルとする。

・ QD-ポリマーソームを担がんマウスに尾静注し、血中半減と受動的ながんへの集積を蛍光イメージングで調べた。

・ QD-ニトロキシド-ポリマーソームを尾静注が腫瘍に直接投与し、腫瘍組織でのレドックス活性を蛍光イメージングで調べた。

4. 研究成果

本研究において、我々は化学修飾したキトサンに量子ドット QD705 と疎水性のニトロキシドラベル化抗がん剤 (Lomustine or Doxorubicin) を内包したポリマーソームを開発した (Scheme. 1)。このポリマーソームを、組織のレドックス活性を測定するセンサーのプラットフォームとして用いて DDS の可視化を行った。



Scheme 1. Scheme and physicochemical characteristics of QD-labeled polymersomes, based on chemically modified chitosan.

二つの内包物が包含された状態では、QD

は消光状態にあるが、ニトロキシドラベル化抗がん剤の放出によって QD の蛍光が回復する。

実際に、この消光・蛍光機構を、培養細胞や生体内の固形がんにおいて確認することに成功している (Fig.3)

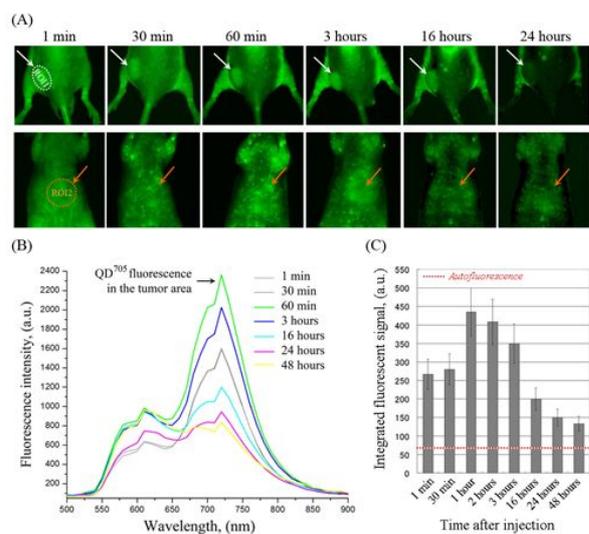


Figure 3. (A) Representative fluorescent images of colon cancer-grafted mouse, obtained at different times (within 24 hours) after i.v. injection of QD<sup>705</sup>-labelled polymersomes. Regions-of-interest (ROI): ROI-1 – tumor area; ROI-2 – liver area. (B) Dynamics of fluorescent spectra in tumor area (ROI-1), overlapped with autofluorescence spectra of mouse body, obtained within 1-24 hours after i.v. injection of QD<sup>705</sup>-labelled polymersomes. The fluorescent spectra were extracted from the images in (A). (C) Kinetic curve of QD<sup>705</sup> fluorescence decay in ROI-1 within 48 h after injection, calculated at  $\lambda_{em}=705$  nm. The data are means $\pm$ SD from 4 animals.

## 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. Bakalova R., Z. Zhelev, B. Nikolova, S. Murayama, I. Tsoneva, I. Aoki, T. Saga. – Lymph

node mapping using quantum dot-labeled polymersomes. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2015 [in Press].

2. Bakalova R., D. Lazarova, B. Nikolova, S. Atanasova, G. Zlateva, Z. Zhelev, and I. Aoki. – Delivery of size-controlled long-circulating polymersomes in solid tumors, visualized by quantum dots and optical imaging in vivo, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 2014 (E-pub: November 30).

3. Atanasova S., D. Lazarova, B. Nikolova, Z. Zhelev, T. Tsoneva, I. Aoki, and R. Bakalova. – In vivo visualization of electro-assisted delivery of nanoparticles in cancer using optical imaging, *Anticancer Res.*, 2014, 34, 5819-5821.

4. Bakalova R.\*, Z. Zhelev, I. Aoki, and T. Saga. – Tissue redox activity as a hallmark of carcinogenesis: from early to terminal stages of cancer, *Clinical Cancer Research*, 2013, 19(9), 2503-2517.

5. Zhelev Z., I. Aoki, V. Gadjeva, B. Nikolova, R. Bakalova\*, and S. Saga. – Tissue redox activity as a sensing platform for imaging of cancer based on nitroxide redox cycle, *Eur. J. Cancer*, 2013, 49(6), 1467-1478.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Atanasova S., D. Lazarova, B. Nikolova, Z. Zhelev, Y. Tsoneva, L. Spasov, and R. Bakalova. – Electro-assisted drug delivery in cancer using size-controlled long-circulating polymer nanoparticles, 24<sup>th</sup> International Conference of the Society of Bulgarian Scientists, Stara Zagora, Bulgaria, June 6-7, 2014.

2. Atanasova S., D. Lazarova, B. Nikolova, Z. Zhelev, T. Tsoneva, I. Aoki, and R. Bakalova. – In vivo visualization of electro-assisted delivery of nanoparticles in cancer using optical imaging, 9<sup>th</sup> International Conference of Anticancer Research, Sithonia, Greece, October 6-10, 2014.

3. Georgieva E., D. Ivanova, D. Lazarova, R. Bakalova, I. Aoki, and Z. Zhelev. – In vitro analysis of redox status of normal and tumor cells using nitroxide radicals and EPR spectroscopy, 9<sup>th</sup> International Conference of Anticancer Research, Sithonia, Greece, October 6-10, 2014.

4. Ivanova D., D. Lazarova, E. Georgieva, I. Aoki, Z. Zhelev, and R. Bakalova. – Systematic study on the cytotoxic and/or cytostatic effects of over twenty anticancer drugs: The crucial importance of the analytical approach and data processing, 9<sup>th</sup> International Conference of Anticancer Research, Sithonia, Greece, October 6-10, 2014.

5. Bakalova R. – Tissue redox activity as a hallmark of carcinogenesis. International Free Radical Winter School, March 10-13, 2013, Muikamachi, Nagano, Japan.

6. Zhelev Z. – Redox status as a target for cancer therapy. International Free Radical Winter School,

March 10-13, 2013, Muikamachi, Nagano, Japan.  
7. Bakalova R., Z. Zhelev, I. Aoki, D. Kokuryo,  
V. Gadjeva, and T. Saga. – Tissue redox activity  
as a sensing platform for imaging of cancer,  
based on nitroxide redox cycle. ISMRM 21<sup>st</sup>  
Annual Meeting and Exhibition, Salt Lake, Utah,  
US, April 20-26, 2013.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 1件)

名称：CdSe量子ドット及びその製造方法  
発明者：Bakalova Rumiana, 菅野巖  
権利者：独立行政法人放射線医学総合研究所  
種類：特許登録  
番号：特許第5019052号  
出願年月日：平成19年12月28日(2007.12.28)  
取得年月日：平成24年6月22日(2012.6.22)  
国内外の別：国内

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

ルミアナ バカロバ (RUMIANA  
BAKALOVA)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子  
イメージング研究センター・主任研究員  
研究者番号：30469936

### (2)研究分担者

青木 伊知夫 (AOKI ICHIO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子  
イメージング研究センター・チームリーダ  
ー

研究者番号：10319519

ジェレフ ジフコ (ZHIVKO ZHELEV)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子  
イメージング研究センター・主任研究員  
研究者番号：10319519

### (3)連携研究者