

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25460053

研究課題名(和文) 癌の光線力学療法の効果を十分発揮させるためのトレーサブル光増感剤の開発

研究課題名(英文) Development of traceable photosensitizer to produce enough effect of photodynamic therapy

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：光増感剤のトレーサをMRIで行うための担体として、ガドリニウムキレートと結合させたデキストラン(Gd-Dex)を合成した。Gd-Dexは静脈内投与後すぐにS180マウス腫瘍に集積した一方、健常マウスでは60分以上に亘り血管内に滞留した。腫瘍への体積当たりの蓄積量は、投与60分後では腫瘍サイズ500-3000 mm³の間でほぼ同程度となった。血中のGd-Dexは加水分解後速やかに腎排泄されたが、一部は肝臓に集積した。一方、デキストランへの光増感剤chlorin e6 (Ce6)の結合はシアノ化デキストランをエチレンジアミン結合Ce6と反応させることで合成できた。

研究成果の概要(英文)：Gadolinium chelate-conjugated dextran (Gd-Dex) was synthesized as a carrier to trace photosensitizer for photodynamic therapy of tumor. Gd-Dex accumulated in a tumor immediately after intravenous injection to a S180 tumor model mouse, whereas it remained in a blood compartment of healthy mouse for more than 60 min. Amount of Gd-Dex accumulation per tumor volume was almost constant in a tumor size 500-3000 mm³ 60 min after its intravenous administration. Although Gd-Dex circulated in the blood was excreted from the kidney after receiving hydrolysis, some of Gd-Dex accumulated in the liver. On the other hand, photosensitizer-conjugated dextran was successfully synthesized by the reaction of ethylenediamine-derived chlorin e6 and cyano-derivatives of dextran. These results are important data for MRI-guided photodynamic therapy of tumor.

研究分野：物理系薬学

キーワード：MRI デキストラン クロリンe6 腫瘍 光線力学療法 体内動態

1. 研究開始当初の背景

がんの光線力学療法 (PDT) は全国で 30 カ所余りの病院で実施されており、体の機能を温存できる治療法の一つとして定着しつつある。しかし、現在そのための光増感剤として認可されているフォトフリン等は、正常組織にも分布して少なからず光過敏症などの副作用をもたらす。また、現在のところ、光増感剤ががん中に十分分布して効果を発揮するか否かは治療効果を待って判断せざるを得ない。すなわち、光増感剤側から見た光線力学療法の治療効果を左右するキーは、(i) 光増感剤を選択的にがん組織に送達すること、そして(ii) 光増感剤のがんへの蓄積が臨床現場で確認できることの2つと考えられる。がんへの送達に関しては、EPR 効果 (がんにおいて血管が漏れやすく漏れたものが排除されにくい効果) を利用したポルフィリン類がようやく報告されだしたばかりである。一方、送達の確認については、McCarthy が総説内で光増感剤のターゲティング・イメージングによるがんへの蓄積確認・治療一体化の必要性を述べ、実際に MRI 造影剤であるデキストラン被覆超常磁性鉄粒子にテトラフェニルポルフィリンを結合させたが、PDT による治療効果や MRI 画像を示すには至っていない。

以上のように、PDT において投与後、その分布を追跡できるトレーサブルな光増感剤の必要性は認識されているが、その研究は始まったばかりであり、その成果はほとんど無いに等しい。

2. 研究の目的

がんの PDT において治療効果を十分発揮させるために、光増感剤と MRI 造影剤の機能を併せ持つトレーサブルなナノ粒子製剤を、多糖を基幹高分子に用いて開発する。そのために、MRI 造影剤を結合させた基幹分子多糖を合成する。基幹分子にはデキストランを、MRI 造影剤には diethylenetriamine-*N,N,N'*,*N'',N'''*-pentaacetic acid gadolinium chelate (Gd-DTPA) をそれぞれ選択し、Gd-DTPA 結合デキストラン (Gd-Dex) を合成する。Gd-Dex について、血管透過性、がん集積性、および生体内残留性を調べ、がんをターゲットとした製剤の基幹分子としての有効性を確認する。さらに、これに光増感剤 chlorin e6 (Ce6) を結合させ、本研究課題にあるトレーサブルな光増感剤を創成する。

3. 研究の方法

(1) Gd-Dex の合成

デキストラン (平均分子量 40,000 Da) と diethylenetriamine-*N,N,N'*,*N'',N'''*-pentaacetic acid, dianhydride (無水 DTPA) を *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine の存在下、dimethylsulfoxide 中で 2 時間 40 °C で反応させ、半透膜透析後、凍結乾燥して、DTPA 結合

デキストランを得た。DTPA 結合デキストランを水に溶かし、GdCl₃ 水溶液を滴下し、一晚反応させた。半透膜透析し、凍結乾燥して、Gd-Dex を得た。糖はフェノール-硫酸法で、Gd は ICP 発光法でそれぞれ定量し、Gd 結合率を算出した。

(2) Gd-Dex の血管滞留性の確認

Gd-Dex の生理食塩水溶液 (28mg/mL) を 50 μL イソフルラン麻酔下でマウス (ddY) 尾静脈内に投与し、小動物用 MRI 装置 (1.5 T) により頭部の T1 強調 3 次元画像 (グラジエントエコー法) を得た。画像は最大値投影 (MIP) 処理を行い、血管像を描画した。比較のため、同じ Gd 相当量の Gd-DTPA をマウスに静脈内投与し同様に MRI 撮像した。

(3) Gd-Dex の腫瘍への集積性の確認

マウス (ddY) 背部に S180 肉腫細胞を移植して腫瘍マウスを作製した。イソフルラン麻酔下でマウスを 0.5 mmol/L GdCl₃ 水溶液と純水をそれぞれ封入したファントムと共に MRI 装置に挿入した。腫瘍部位について腫瘍体積測定のため T2 強調マルチスライス画像 (グラジエントエコー法) を撮り、続いて造影剤投与前の画像として T1 強調マルチスライス画像 (グラジエントエコー法) を撮った。続いて、尾静脈より Gd-Dex の生理食塩水溶液 (56 mg/mL) を 100 μL 投与し、同部位について経時的に T1 強調マルチスライス画像 (グラジエントエコー法) を撮った。

腫瘍体積は、腫瘍部位のピクセル数とスライス厚から算出した。また、Gd の集積量は腫瘍部位の輝度増加率を 0.5 mmol/L GdCl₃ 水溶液の輝度増加率と比較して算出した。

(4) Gd-Dex の血中濃度推移

Gd-Dex の生理食塩水溶液 (28 mg/mL) を 350 μL イソフルラン麻酔下でラット (Wistar) に尾静脈より投与した。投与後、経時的に反対側の尾静脈より 150 μL ずつ採血した。血漿を分離後、一部は限外ろ過後、残りはそのまま ICP 発光分析により Gd 濃度を測定した。比較のため、同じ Gd 相当量の Gd-DTPA をラットに静脈内投与し同様に血中濃度を測定した。

(5) Gd-Dex の体内残留性の確認

12 匹のマウス (ddY) にイソフルラン麻酔下で尾部より Gd-Dex の生理食塩水溶液 (14mg/mL) を 100 μL 投与し、時間を追って安楽死させ、肝臓を摘出し、そのホモジネートについて ICP 発光法により Gd を定量した。

(6) デキストランへの Ce6 の結合

Chlorin e6 と ethylenediamine を *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide の存在下、tetrahydrofuran 中で 4 時間反応させ、溶媒を留去してシリカゲルカラムクロマトグラフィーで ethylenediamine 結合 chlorin e6

(Ed-Ce6) を精製した。

デキストラン (平均分子量 40,000 Da) を水溶液中で triethylamin の存在下 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate で活性化し、Ce6 の炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。2 時間反応後、ethanolamine を加えて反応を終結し、エタノール沈殿により Ce6 結合デキストラン (Ce6-Dex) を得た。蛍光測定により Ce6 結合率を求めた。

4. 研究成果

(1) Gd-Dex の合成

デキストランのグルコース単位に対する無水 DTPA のモル比を 0.1~2 の間で変化させて合成したところ、モル比が 2 において最終的な Gd の結合率がグルコース単位に対して約 0.5 となった。モル比 1 以下ではガドリニウムの結合率がきわめて低かった。一方、グルコース単位に対する無水 DTPA のモル比を増やし Gd 結合率が 0.5 を上回ると最終生成物が水中で沈殿し、Gd/グルコース単位の比 0.5 が最適であることがわかった。

また、DTPA 結合デキストランへのガドリニウムのキレート操作で、溶液の pH が約 9 を超えると、ガドリニウムがデキストランに非特異的に結合して不溶性の沈殿を生じることがわかった。デキストラン中に存在する酸性基が Gd をキレートした結果ではないかと考えられる。

(2) Gd-Dex の血管滞留性の確認

結合率 (Gd/グルコース単位) が約 0.5 の Gd-Dex を健常マウスに静脈内投与し、頭部において MRI の 3 次元画像を撮った。投与直後から鮮明な血管像が描画され、血管像は投与後少なくとも 1 時間は鮮明であった (図 1)。一方、同じ Gd 相当量の市販のマグネビスト (Gd-DTPA) では血管を描画することができなかった (図 1)。これは、合成した Gd 結合デキストランが正常組織では血管から漏れることが無いことを意味し、造影剤をがんのような血管透過性が亢進している組織のみ

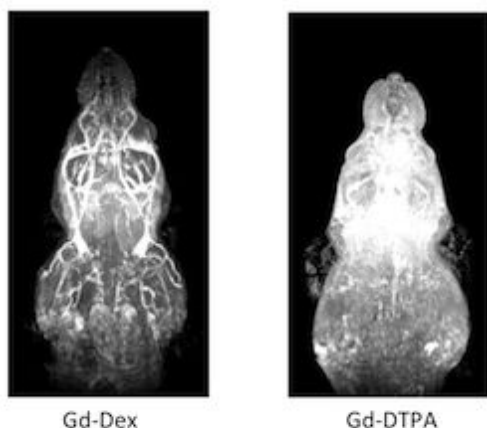


図1 MRI造影剤を投与したマウスの頭部MRI画像
投与直後の3次元MRI画像 (MIP処理)

へ送達できる可能性を示唆する。

(3) Gd-Dex の腫瘍への集積

マウスの腫瘍が直径 12-13 mm になったところで、イソフルラン麻酔下、Gd-Dex あるいは Gd-DTPA を静脈内投与し、投与前から時間を追って MRI 撮像した。Gd-Dex 投与時では投与後 1 分より腫瘍辺縁部の輝度が増加し、腫瘍における Gd-Dex の蓄積が確認された。輝度は投与 60 分後においても増加したままであった (図 2)。一方、マグネビストでは、投与 1 分後に腫瘍辺縁部の輝度が増加したが 22 分後では減少し、45 分後では他の組織と同程度にまでなった。より定量的な解析を行うため、3 匹の腫瘍マウスに Gd-Dex を静脈内投与し、各マウスにおいて MRI 画像より腫瘍辺縁部、腫瘍中心部、そして背部筋肉に設定した各領域で輝度変化率を算出し、投与後の時間に対してプロットした結果、いずれのマウスにおいても腫瘍辺縁部の輝度は投与 1 分後から筋肉に比較して明らかに高かった。さらに、腫瘍中心部においても投与 22 分以降筋肉より輝度が徐々に高くなった。

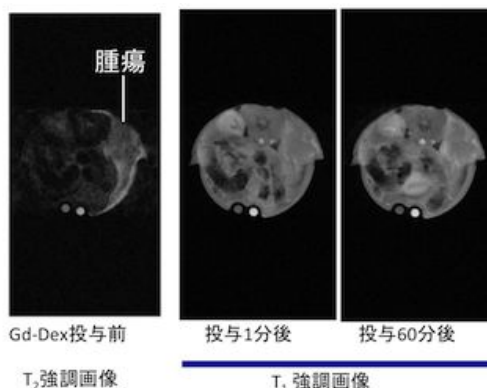


図2 Gd-Dexのマウス腫瘍(S180)への集積
T2強調画像は腫瘍の位置を確認するためにGd-Dex投与前に撮像した。
Gd-Dex投与後T1強調画像を撮った。

腫瘍に分布した光増感剤が細胞殺傷効果を現すためには光増感剤の分布量が十分であることが必要である。腫瘍が大きくなると中心部へ到達する光増感剤が減り、十分な効果が得られない可能性がある。腫瘍の大きさと光増感剤のキャリアとする Gd-Dex 集積量との関係を調べるために、腫瘍の体積が約 500 mm³ から約 3000 mm³ までの腫瘍を持つマウスに Gd-Dex を静脈内投与し、腫瘍の大きさと腫瘍への集積量との関係を経時的に調べた。投与 1 分後では、腫瘍が約 1000 mm³ 以上になると分布しにくかったが、60 分後にかけて体積と Gd-Dex 集積量との間に相関性が見られるようになった (図 3)。このことより、分布に時間のかかる比較的大きな腫瘍であっても時間をかければ、腫瘍体積当たりの集積量が比較的小さな腫瘍の場合と同等になることがわかった。

これらのことより、Gd-Dex はがんに対する

PDT のための光増感剤のキャリアとして有望であることが確認された。

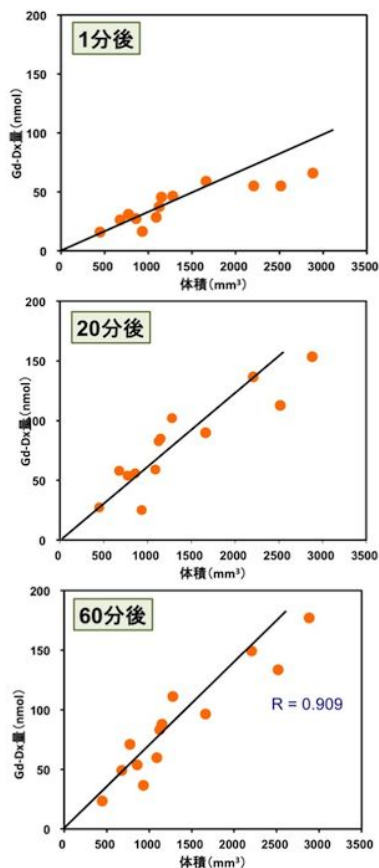


図3 腫瘍体積とGd-Dex集積量の相関

(4) Gd-Dex の体内動態と残留性

Gd-Dex の体内動態を知るために、ラットで Gd の血中濃度推移を調べた。Gd-Dex は投与後血中の消失は二相性を示した。比較的速い消失の速度定数は $0.058 \pm 0.012 \text{ min}^{-1}$ 、遅い消失では $0.010 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ であった (平均 \pm SD, $n=4$)。初期分布容積 (V_i) は $59 \pm 8 \text{ mL kg}^{-1}$ 、第二相の外挿による分布容積 (V_{ext}) は 122 mL kg^{-1} であった (平均 \pm SD, $n=4$)。 V_i がラットの血漿量の報告値 (40 mL kg^{-1}) と近く V_{ext} は血漿量の約 3 倍となることから、速い方の相は一部の Gd-Dex が組織へ分布することによる消失と考えられる。

Gd-Dex の血中での安定性を推定するため、*in vitro* で血漿中での分解を調べた。Gd-Dex はラット血漿中で小分子へと分解され、その速度定数は 0.0094 min^{-1} だった。Gd-DTPA とデキストランとの結合はエステル結合であるため、Gd-Dex が Gd-DTPA へと加水分解されるものと考えられる。そこで、ラットに Gd-DTPA を静脈内投与して、血中消失を調べたところ、消失はほぼ一相であり、消失速度定数は 0.041 min^{-1} であった (平均 \pm SD, $n=4$)。また、Gd-DTPA について、マウスにおける体内分布を MRI で経時的に調べたところ、投与直後に腎臓の輝度が高く、輝度の高い場所は時間と共に膀胱へと移行した (図 4)。これらのことから、Gd-Dex は血中で加水分解を受け

て Gd-DTPA となれば、速やかに腎臓から排出されることがわかった。

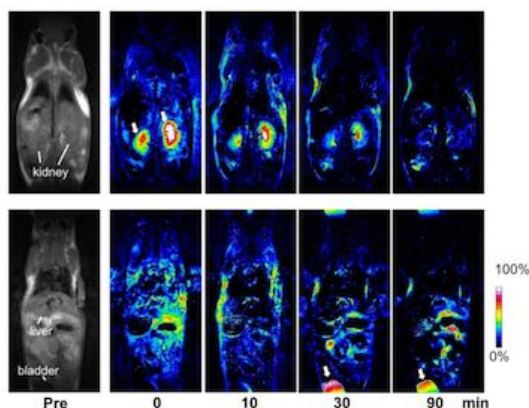


図4 Gd-DTPAの体内分布の経時変化

Gd-Dex について MRI 画像より体内分布を調べた (図 5)。Gd-Dex を投与後、腎臓と肝臓の輝度が増加した。腎臓の輝度は時間の経過と共に減少し、血中濃度推移と似ていた。それに対し、肝臓では 80 分の撮像時間の間ほとんど変化無いかむしろ増加傾向であり、一部の Gd-Dex は肝臓に蓄積するものと考えられる。

肝臓での輝度の増加はマクロファージ不活化剤 GdCl_3 で処理したところ見られなくなったことから、肝臓への Gd-Dex の蓄積には細網内皮系が関与していることがわかった (図 5)。

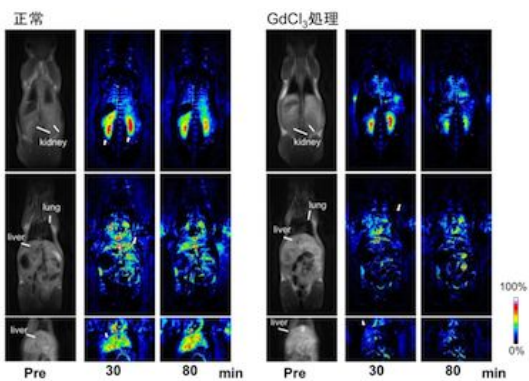


図5 Gd-Dexの体内分布に及ぼすGdCl₃前処理の影響

光増感剤も MRI 造影剤も、役目を終えた後は速やかに排泄される必要がある。Gd-Dex 投与後長時間に亘り肝臓における Gd 量を測定したところ、投与約 1 日後まで増加し、4 日目にはその約半分に減少した。4 日目の蓄積量は、投与量の約 20% であった。

(5) デキストランへの Ce6 の結合

デキストランに ethylenediamine を導入し、N-hydroxysuccimide (NHS) 化した Ce6 を結合させることを考えて実験を行ったが、デキストランに満足のいく比率で ethylenediamine を結合させることができなかった。そこで、デキストランにシアノ基を導入して

活性化し、ethylenediamine 結合 Ce6 を結合させる方法を検討したところ、比較的効率よく Ce6 結合デキストランを得ることができた。

<引用文献>

Park, S.Y. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 1644-1647 (2011).

McCarthy, J. R. *Nanomedicine* 4, 693-695 (2009).

McCarthy J. R. et al. *Org. Biomol. Chem.* 7, 3430-3436 (2009).

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4件)

Keizo Takeshita, Shoko Okazaki, Kyosuke Shinada, Yuma Shibamoto, Application of a Compact Magnetic Resonance Imaging System with 1.5 T Permanent Magnets to Visualize Release from and the Disintegration of Capsule Formulations *In Vitro* and *In Vivo*. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有り 40, 1268-1274 (2017)

DOI: 10.1248/bpb.b17-00154

Keizo Takeshita, Shoko Okazaki, Yuriko Hirose, Pharmacokinetics of lipophilically different 3-substituted 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl radicals frequently used as redox probes in *in vivo* magnetic resonance studies. *Free Radic. Biol. Med.* 査読有り 97, 263-273 (2016)

DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.008

[学会発表](計21件)

中村綾菜、中川陽平、横山英華、石坂浩太郎、赤星晶子、金井春菜、方 軍、岡崎祥子、竹下啓蔵、薬物キャリアを想定した MRI 造影剤 Gd-デキストランの腫瘍への集積量と腫瘍サイズの関係、日本薬学会第 138 年会 (2018)

金井春菜、大山真奈、赤星晶子、中村綾菜、西田正志、岡崎祥子、竹下啓蔵、血管および腫瘍の描画を目的とした MRI 造影剤 Gd-デキストランの体内動態、日本薬学会第 138 年会 (2018)

赤星晶子、大山真奈、金井春菜、中村綾菜、西田正志、岡崎祥子、竹下啓蔵、血管内滞留性 MRI 造影剤 Gd-デキストランの体内動態、第 34 回日本薬学会九州支部大会 (2017)

竹下啓蔵、岡崎祥子、廣瀬友吏子、柴本

悠磨、平原 匡、脂溶性の異なる 4 種の生体レドックス測定用 5 員環ニトロキシルスピンプローブの体内動態、日本薬学会第 136 年会 (2016)

岡崎祥子、永田拓郎、竹元めぐみ、庄籠優佑、平田紋子、竹下啓蔵、紫外線照射によりケトプロフェンが惹起するリポソーム膜内のラジカル反応の検討、第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (2015)

[その他]

ホームページ等

<http://pharm.ph.sojo-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・講師

研究者番号：40435152