

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670010

研究課題名(和文) がんの微小環境を検知するための高分子ミセル型MRI造影剤の開発

研究課題名(英文) Development of smart MRI contrast agents based on polymeric micelles to detect tumor microenvironment

研究代表者

西山 伸宏 (Nishiyama, Nobuhiro)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号：10372385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんのMRIの精度向上のためにはがん特異性に優れたMRI造影剤の開発が必要である。本研究では、腫瘍内の低pH環境に反応して溶解するリン酸カルシウムを主成分とする高分子ミセルにMRI造影能を有するMn²⁺イオンを搭載した。本システムは腫瘍内の低pH環境で選択的にMn²⁺イオンを放出し、Mn²⁺イオンがタンパク質との相互作用によって緩和能が増大する特性を有することが示された。担がんマウスを用いた動物実験において、高分子ミセルは、既存のMRI造影剤よりも顕著に優れた腫瘍特異的コントラストを示し、さらに低酸素領域のイメージングや肝臓における微小転移の検出においても有用であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To improve the accuracy of MR imaging, the development of tumor-specific MRI contrast agents have been strongly demanded. In this study, we have developed polymeric micelles composed of calcium phosphate core, which can exhibit dissolution responding to acidic pH environment in the tumor tissue and incorporated Mn²⁺ ions, an MRI contrast agent, into the micelles. Polymeric micelles could release Mn²⁺ ions selectively under the acidic conditions mimicking the tumor microenvironments, and the released Mn²⁺ ions showed T1 shortening through the interaction with proteins. The in vivo experiments revealed that Mn²⁺ ions-loaded micelles displayed remarkably enhanced tumor-specific contrast enhancement compared with clinically used MRI contrast agents. Also, the Mn²⁺ ions-loaded micelles have been demonstrated to be useful for MR imaging of tumor hypoxia and small metastases in the liver.

研究分野：バイオマテリアル、ドラッグデリバリーシステム

キーワード：高分子ミセル がん イメージング MRI 低酸素領域 微小転移 診断

1. 研究開始当初の背景

MRI は、がんの非侵襲的画像診断法として極めて重要であるが、精度向上のためにはがん組織を選択的に描出できる MRI 造影剤の開発が必要である。酸化鉄微粒子や Gd を内包したりポソーム等のナノ微粒子型造影剤は、腫瘍内の血管壁の透過性亢進と未発達なリンパ系の構築に基づく Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果によって固形がんを選択的に集積することが知られており、固形がんのイメージングのための MRI 造影剤としての研究開発が進められている。しかしながら、がんの MRI の感度・精度の飛躍的向上を達成するためには、より高い S/N 比を実現する必要がある。また、近年、診断情報の高度化の観点から、がんの微小環境を特異的に検出するスマート診断プローブの開発が注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、MRI 造影能を有する Mn^{2+} イオンを搭載したリン酸カルシウム (CaP) 粒子を内核として、表面がポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸 [PEG-P(Glu)] ブロック共重合体で覆われた Mn 搭載 CaP ミセルの開発を行った (図 1)。CaP は酸性環境で溶解する性質があるために、本システムは腫瘍内の低 pH 環境で選択的に Mn^{2+} イオンを放出し、 Mn^{2+} イオンがアルブミン等の血漿タンパク質との相互作用によって緩和能が増大する特性を有するものと考えられる。一般的に、治療抵抗性がん細胞が存在する微小環境 (ニッチ) である低酸素領域 (Hypoxia) は、アシドーシスによって pH が低下していることが知られており、本システムを利用すれば、がんの Hypoxia を検出することが可能であると考えられる。

具体的に、本研究では、Mn 搭載 CaP ミセルを構築し、その pH 応答性を中心とする基本性能を検証した。また、Mn 搭載 CaP ミセルを固形がんの MRI へと展開した。特に、本システムによる Hypoxia のイメージング能を詳細に検討した。これらの検討を通じて、Mn 搭載 CaP ミセルのスマート診断プローブとしての有用性を明らかにすることを目的とした。

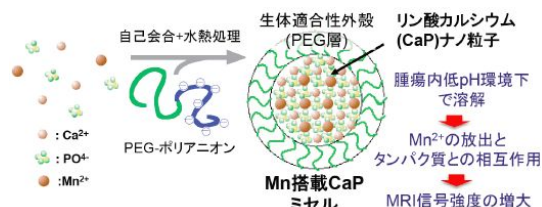


図1. 腫瘍内低 pH 環境を検出する Mn 搭載 CaP ミセル型 MRI 造影剤

3. 研究の方法

(1) Mn 搭載 CaP ミセルの調製と基本特性

250mM の $CaCl_2$ と 20mM の $MnCl_2$ を含有する Tris-HCl 溶液と 6mM Na_2HPO_4 と 7.17mg の

PEG-P(Glu) を含有する HEPES 緩衝液を混合し、120 °C で 20 分間水熱合成を行うことによって Mn 搭載 CaP ミセルを調製した。Mn 搭載 CaP ミセルの基本特性としては、異なる pH 環境下における Mn^{2+} イオンのリリースと T_1 緩和能 (r_1) を評価した。 r_1 に関してはアルブミンの効果についても検討した。

(2) Mn 搭載 CaP ミセルの安全性評価

$MnCl_2$ および Mn 搭載 CaP ミセルをマウスに投与し、半数致死投与量 (LD_{50}) を評価した。

(3) Mn 搭載 CaP ミセルによるマウス大腸がんモデルの MRI

マウス大腸がん C26 細胞の皮下移植モデルマウスに対して Mn 換算で 0.1mmol/kg の Mn 搭載 CaP ミセルを i.v. 投与し、1T MRI (Bruker 社製) により断層イメージングを行った。

(4) Mn 搭載 CaP ミセルによる腫瘍内低酸素領域 (Hypoxia) の MRI

Mn 搭載 CaP ミセルによる MRI を行った固形がんの病理標本を作製し、ピモニダゾールによる Hypoxia の染色を行った。また、Magnetic Spectroscopic Imaging (MRSI) による腫瘍内の乳酸マッピングを行った。

(5) Mn 搭載 CaP ミセルによる大腸がんの微小肝転移の MRI

C26 細胞を脾臓に移植することによって肝転移モデルを作成した。このモデルに Mn 搭載 CaP ミセルを投与し、MRI を行った。

4. 研究成果

(1) Mn 搭載 CaP ミセルの調製と基本特性

調製した Mn 搭載 CaP ミセルの TEM 観察を行った (図 2)。このように粒径 50-70nm の粒径分布の狭い会合体の形成が確認された。

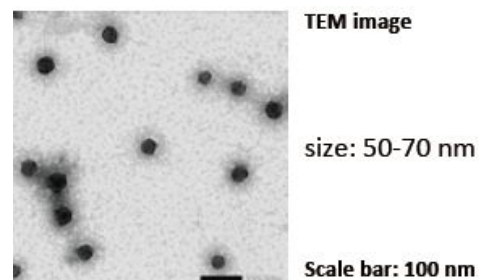


図2. Mn 搭載 CaP ミセルの TEM 観察

次に、異なる pH 環境における Mn 搭載 CaP ミセルからの Mn^{2+} イオンのリリースを評価した (図 3)。この結果より、Mn 搭載 CaP は、腫瘍内の低 pH 環境 (6.5-6.8) に選択的に Mn^{2+} イオンをリリースすることが明らかになった。そこで、異なる pH 環境での Mn 搭載 CaP ミセルの T_1 緩和能 (r_1) を評価したところ (図 4)、pH6.5 および pH6.7 の環境でアルブミン

が存在する場合に r_1 値が増大することが確認された。この結果より、Mn 搭載 CaP は、低 pH 環境で Mn^{2+} イオンをリリースし、 Mn^{2+} イオンがアルブミンと結合することによって、 r_1 値の増大を示すことが示唆され、設計通りの基本性能を有することが確認された。

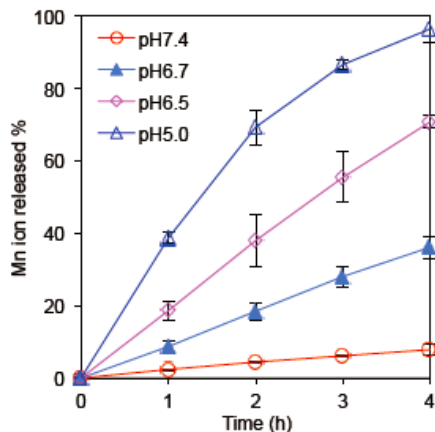


図 3. 異なる pH 環境での Mn 搭載 CaP ミセルからの Mn^{2+} イオンのリリース

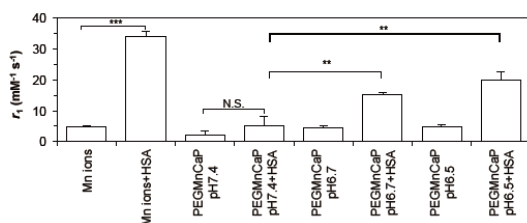


図 4. Mn 搭載 CaP ミセルの T_1 緩和能 (r_1) における pH およびアルブミンの効果

(2) Mn 搭載 CaP ミセルの安全性評価

Mn 搭載 CaP ミセルのマウスにおける半数致死投与量 (LD_{50}) を評価したところ、 $MnCl_2$ の 6 倍の値を示した。承認されている Mn-DPDP は血中で Mn^{2+} イオンを速やかに放出する造影剤であるが、Mn 搭載 CaP ミセルは Mn-DPDP よりも高い安全性を有するものと考えられる。

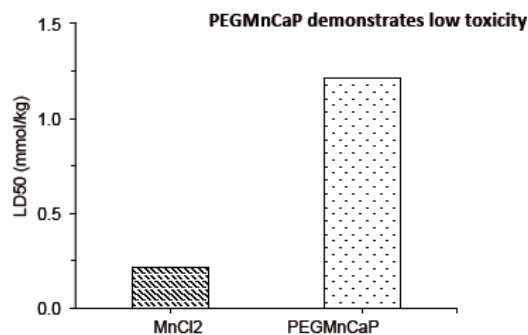


図 5. Mn 搭載 CaP ミセルのマウスにおける半数致死投与量 (LD_{50})

(3) Mn 搭載 CaP ミセルによるマウス大腸がんモデルの MRI

Mn 搭載 CaP ミセルをマウスに全身投与した後に経時的に MRI を行ったところ、がん

の部位で選択的に信号強度が増大することが確認された(図 6)。そこで MRI 信号強度の変化を測定したところ、承認されている Gd-DTPA(マグネビスト)と比較して顕著なコントラスト比(160% vs. 105-110%)を示すことが確認された(図 7)。以上の結果より、Mn 搭載 CaP ミセルは、既存の MRI 造影剤と比較して優れた固形がんに対する造影効果を示すことが明らかになった。

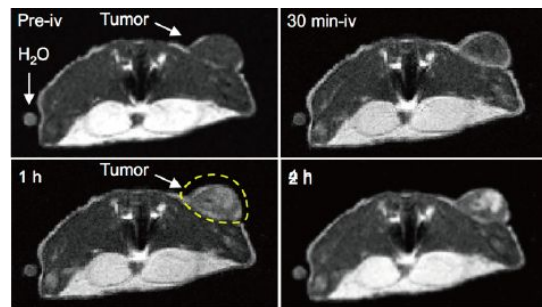


図 6. Mn 搭載 CaP ミセルによるマウス大腸がん C26 の皮下移植モデルの MRI

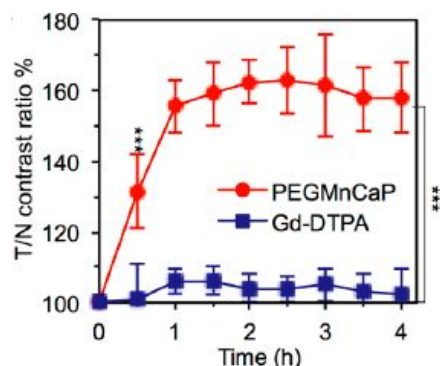


図 7. 腫瘍における MRI 信号強度の変化 (Gd-DTPA との比較)

(4) Mn 搭載 CaP ミセルによる腫瘍内低酸素領域 (Hypoxia) の MRI

Mn 搭載 CaP ミセルは、図 6 に示すように、時間の経過と共に腫瘍の中心部のコントラストが増大することが確認された(図 6 の 2 時間後および図 8 左)。そこでこの腫瘍の病理標本を作成し、ピモニダゾールによる Hypoxia の染色を行ったところ、MRI のコントラストが増大した部位と Hypoxia の領域が一致することが確認された(図 8)。さらに、Magnetic Spectroscopic Imaging (MRSI) による腫瘍内の乳酸マッピングを行ったところ、MRI のコントラストが増大した部位と高濃度の乳酸が存在する部位が一致することも確認された(図 8)。すなわち、Hypoxia では嫌氣的代謝によって乳酸の産生が亢進しており、その結果として pH が下がっている。この結果として低 pH 環境に応答する Mn 搭載 CaP ミセルは、Hypoxia で強いコントラストを示したものと考えられる。以上のように本項目では、Mn 搭載 CaP ミセルを利用することによって腫瘍の Hypoxia

の MRI が可能になることが示された。

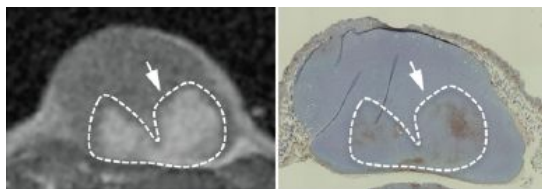


図 8. がんの低酸素領域(Hypoxia)の MRI (ピモニダゾール染色との比較)

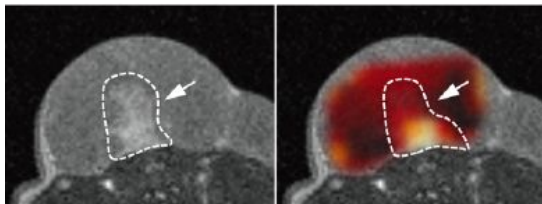


図 9. がんの低酸素領域(Hypoxia)の MRI (MRSI による乳酸マッピング)

(5) Mn 搭載 CaP ミセルによる大腸がんの微小肝転移の MRI

本項目では、Mn 搭載 CaP ミセルを大腸がんの微小肝転移モデルの MRI に応用したところ、2mm の微小転移巣が検出できることが明らかになった。この造影効果は、肝がんの MRI に利用される MRI 造影剤のプリモピストよりも際立っていた(プリモピストの場合、がんの部位で信号強度が約 25%減少したのに対して、Mn 搭載 CaP ミセルの場合、がんの部位で信号強度が約 150%増大した)。原因は不明であるが、Mn 搭載 CaP ミセルでは胆のうにおける信号強度の増大が確認された。以上のように、Mn 搭載 CaP ミセルを利用することによってがんの微小転移の MRI が可能になることが示された。

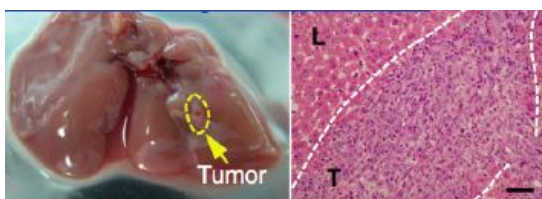


図 10. 大腸がんの微小肝転移モデルと Mn 搭載 CaP ミセルによる微小転移の MRI

本研究で開発された Mn 搭載 CaP ミセルは、上述のように治療抵抗性がん細胞が存在するニッチとして考えられている Hypoxia を検出できるために、治療前にがんの悪性度を評

価でき、さらに治療後の Hypoxia の変化から効果を判定することが可能になるものと考えられる。特に、これらの評価は、ナノキャリアによるがん標的治療の効果の予測や治療効果のモニタリングに有用であると考えられ、臨床的に高い価値を有するものと考えられる。さらに、Mn 搭載 CaP ミセルは、EPR 効果に基づくがん集積効果に加えて、腫瘍内で大幅に MRI 信号強度を増大させることができるために、既存 MRI 造影剤や従来のナノ粒子型造影剤と比較して高い S/N 比を実現することができるものと考えられる。この結果、Mn 搭載 CaP ミセルは、従来の MRI では検知困難であったがんの微小転移をイメージングできることが示された。一方、新規 MRI 造影剤を開発するという観点からは、本研究テーマでは、ナノキャリアに創り込んだ環境応答性を、Mn²⁺イオンのリリースを介して MRI の信号強度の変化へと変換させる新しいナノ粒子型 MRI 造影剤の設計を提案している。このようなナノ粒子型 MRI 造影剤の設計は、腫瘍内低 pH 環境のみならず様々な環境変化を検知できる MRI 造影剤の開発に応用できる可能性を秘めており、関連分野に大きなインパクトを与えるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

P. Mi, D. Kokuryo, H. Cabral, M. Kumagai, T. Nomoto, I. Aoki, Y. Terada, A. Kishimura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Hydrothermally synthesized PEGylated calcium phosphate nanoparticles incorporating Gd-DTPA for contrast enhanced MRI diagnosis of solid tumors. *J. Control. Release* 174 63-71 (2014) 査読有

DOI:10.1016/j.jconrel.2013.10.038

D. Kokuryo, Y. Anraku, A. Kishimura, S. Tanaka, M. R. Kano, J. Kershaw, N. Nishiyama, T. Saga, I. Aoki, K. Kataoka, SPI0-PICsome: Development of a highly sensitive and stealth-capable MRI nano-agent for tumor detection using SPI0-loaded unilamellar polyion complex vesicles (PICsomes). *J. Control. Release* 169 (3) 220-227 (2013) 査読有

DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.03.016

P. Mi, H. Cabral, D. Kokuryo, M. Rafi, Y. Terada, I. Aoki, T. Saga, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Gd-DTPA-loaded polymer-metal complex micelles with high relaxivity for MR cancer imaging. *Biomaterials* 34 (2) 492-500 (2013) 査読有

DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.09.030

[学会発表](計 14 件)

西山伸宏, "高分子ミセル型ナノ医薬品の研究開発", 新製剤技術とエンジニアリングを考える会 第12回技術講演会, 京都国際会館, 京都 2014年7月16日 (招待講演)

西山伸宏, 高分子ナノテクノロジーを基盤とするナノ医薬品の開発, 第10回つくばがん遺伝子治療研究会, ステーションコンファレンス東京, 東京 2014年6月20日 (招待講演)

N. Nishiyama, Development of supramolecular nanocarriers for cancer diagnosis and therapy, Emerging Biomaterials 2014 (23 May), KAIST Institute, Daejeon, Korea, May 23, 2014 (招待講演)

西山伸宏, がんの診断・治療のための高分子ミセル型 DDS の開発, 製剤機械技術学会 第23回大会 (2013年10月10日-11日), ニッショーホール, 東京 2013年10月10日 (特別講演)

N. Nishiyama, Development of polymeric micellar nanocarriers for cancer diagnosis and therapy, The 4th Asian Biomaterials Congress (26-29 June), The Hong Kong University of Science and Technology, Kowloon, Hong Kong, June 29, 2013 (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 高分子ナノ粒子複合体、及びそれを含む MRI 造影用組成物

発明者: 西山伸宏, 片岡一則, オラシオ カブラル, 米鵬, 岸村顕広, 三浦裕, 青木伊知男, 國領大介, 佐賀恒夫

権利者: 東京大学, 放射線医学総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2013-173866

出願年月日: 2013年8月23日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bmw.res.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 伸宏 (NISHIYAMA, Nobuhiro)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号: 10372385

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし