

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670546

研究課題名(和文) ナノキャリアと放射錯体化学を駆使したがん超選択的内用療法の開発

研究課題名(英文) Novel radionuclide-ligand complexes encapsulated in liposomes for tumor-selective radionuclide therapy

研究代表者

梅田 泉 (UMEDA, Izumi, O.)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・ユニット長

研究者番号：40160791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射性核種封入リポソームは、高い腫瘍集積性を持つことから内用療法への応用が期待される。しかし、肝臓などの正常組織にも放射性核種が停留し、無用の被曝原因となる。本研究では、リポソームから放出された後に、正常組織から放射性核種を迅速にクリアランスさせるべく、リポソーム封入金属イオン核種とそれに対する配位子に新たな工夫を加えた。

研究成果の概要(英文)：Application of radionuclide-carrying liposomes to radionuclide therapy for cancer is promising as liposomes are able to deliver large amount of radionuclides to the tumor. However, radionuclides also accumulate in normal tissues such as the liver non-specifically, and cause abdominal radiation exposure. In this study, we devised a strategy whereby radionuclides with the property of metal ions and various chelating ligands to them were encapsulated in liposomes to promote the radionuclide clearance from the normal tissues.

研究分野：放射性医薬品化学

キーワード：内用療法 リポソーム 放射性核種 錯体化学 がん In-111 Y-90

1. 研究開始当初の背景

DDS (薬物送達システム) キャリアのひとつであるリポソームは、大量の放射性核種を封入でき、かつ高い腫瘍集積性を持つことから内用療法への応用が期待される。しかし従来の放射性核種錯体封入リポソームでは、放射性核種は腫瘍のみでなく、肝臓や脾臓などの網内系にも非特異的に停留し、その結果、腹部正常組織の被曝が問題となる。リポソームなどのナノキャリアは一般的に網内系で捕捉されやすく、これを低減するためにポリエチレングリコールなどで表面を被覆する工夫が行われている。しかし、網内系での捕捉を完全に抑えることは難しい。

我々は他に先駆けて核医学に DDS の概念を導入し、ナノキャリアのひとつであるリポソームを用いて、放射性核種を高濃度に腫瘍に送達する方法やがんの *in vivo* イメージングに関する研究を展開してきた。また SPECT 診断の主要な核種である ^{111}In や $^{99\text{m}}\text{Tc}$ などにつき、これらが金属イオンであることを利用して、錯体化学の観点から核種の体内動態を制御することも手掛けてきた。本研究ではこれまで得てきた知見を活かし、錯体の工夫によって、腫瘍のみに放射性核種を集積させる手法の開発を企画した。

2. 研究の目的

我々が最終的に目指しているのは、がん病巣のみに放射性核種を集積させ、転移などを来した進行がんをも治療に導き得る新しい内用療法の開発である。そのためには、腫瘍病巣に大量の放射性核種を集積させると同時に、正常組織の被曝を最小限に抑えることが必要と考えられる。本研究では、この正常組織被曝低減のため、網内系への集積を回避させるのではなく、網内系に捕捉された放射性核種を能動的に細胞外に運び出し、迅速な尿排泄に誘導できるシステムを新規に開発することを目的とした。これは発想の転換であり、従来にない新しい試みである。具体的には、放射性核種に結合する配位子に着目し、まず核種の排出を可能にする新規配位子を設計、合成した。この新規配位子と放射性核種、リポソームとを組合せ、それらの性質を巧みに利用することで、がん病巣への選択的かつ大量の放射性核種集積を目指した。

3. 研究の方法

(1) 用いた試薬など

配位子分子として、nitrilotriacetic acid (NTA, 和光純薬)、diethylenetriamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid (DTPA, 和光純薬)、1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA, Strem Chemicals)、ethylenedicycysteine (EC) を用いた。EC は既報に従って合成した。

(2) 放射性核種-配位子錯体の分析

ODS カラム (Cosmosil 5C₁₈ MS-II, 4.6 ×

150 mm, 5 μm, Nacalai) を用い、アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム(5/95)を溶媒として、流速 0.5 mL/min で溶出した。検出にはガンマ線検出器と UV 検出器を用いた。

(3) リポソームの調製と放射性核種の封入

Distearoylphosphatidylcholine (DSPC) とコレステロール (モル比 2:1) を用いて、薄膜法でリポソームを調製し、孔径 0.1 μm のヌクレオポアメンブラン 2 枚を装着したエクストリュージダを用いて、粒子径を平均 100 nm とした。active loading 法を用いて放射性核種を封入する場合には、リポソーム調製時に配位子溶液を加え、予め配位子をリポソームに封入した。

(4) 担がん動物を用いた体内動態の検討

雄性 ddY マウスの下肢皮下に sarcoma 180 細胞 1×10^6 個を移植し、7-10 日後に実験に供した。放射性核種封入リポソームを尾静脈投与し、一定時間後に動物を屠殺して、臓器を摘出した。摘出臓器の重量と放射活性を測定し、組織分布を評価した。

4. 研究成果

(1) 放射性核種-配位子錯体の形成確認とリポソームへの封入

網内系からのクリアランス促進を目的として、リポソーム封入核種に対する配位子の検討を行った。内用療法には ^{90}Y を用いる予定であるが、初期検討として、 ^{90}Y と化学的性質が類似する ^{111}In を用いて緒検討を進めた。配位子として NTA、DTPA、DOTA および EC を用いた。

まず、 ^{111}In とこれらの配位子の錯体形成を ODS カラムを用いた HPLC で検討した。DTPA と DOTA では安定な錯体が形成された。NTA では錯体は形成されるようであったが、HPLC のピークとして検出することは難しかった。EC と ^{111}In の錯体は、pH を塩基性側に置くことで形成可能となった。

次に、リポソームへの高濃度封入を試みた。我々は既に錯体交換反応を利用した active loading 法という手法で放射性核種をリポソームに封入する方法を開発しており、それを利用した。脂溶性配位子として 8-hydroxyquinoline (oxine) を用い、まず ^{111}In と oxine との錯体を形成させる。一方で上述の配位子 (水溶性) を予め封入したリポソームを用意し、これと ^{111}In -oxine 錯体をインキュベーションすることで、 ^{111}In -oxine がリポソーム膜に移行し、そこで配位子の交換が起こり、 ^{111}In はリポソーム内部の水溶性配位子と錯体を形成して、結果としてリポソーム内部に封入される。リポソームへの封入を確認するため、オクタノール/水での抽出を行い、水層への放射活性の移行を検討した。いずれの配位子でも、ほぼ 100% 水層に放射活性が存在し、配位子交換が完了していることが確認さ

れた。さらに、水層を ODS-HPLC で分析し、それぞれの錯体が形成されていることを確認した。EC は一般に ^{99m}Tc の配位子として知られているが、 ^{111}In と錯体を形成し、active loading 法によってリポソームに封入することも可能であることを明らかにした。リポソームへの放射性核種の最終的な封入率はいずれの配位子を用いても 85-95%であった。

(2) 担がん動物における体内動態

次に、これら錯体封入リポソームを sarcoma180 担がんマウスに投与して、体内動態を比較した。投与 24 時間後の体内分布を比較した結果、 ^{111}In -DTPA、 ^{111}In -DOTA、 ^{111}In -NTA を封入したリポソームでは、体内に未だ投与した放射活性の 50%以上が残存していたのに対して、 ^{111}In -EC 封入リポソーム投与群では、20%以下まで減少していた。肝臓への集積は、前の 3 種のリポソーム投与群では、1g あたり投与量の 12-14%(%AD/g)であったのに対して、 ^{111}In -EC 封入リポソーム投与群では 3.5%AD/g と大きな低下が認められた。一方腫瘍への集積は、前者の 3 種では 8-10%AD/g であるのに対して、 ^{111}In -EC リポソーム群では 6%AD/g と若干の低下は見られたものの、集積を維持していた。糞尿を回収し、放射活性を測定した結果、 ^{111}In -EC リポソーム投与群では、大半が尿中に排泄されていた。さらに、HPLC で尿中の放射活性の化学形を分析した結果より、 ^{111}In -EC 錯体の形を保ったまま尿中に排泄されることが明らかになった。これらの結果より、EC 錯体を用いることで、正常組織からのクリアランスを促進できることが明らかになった。他の 3 種の配位子ではこのような効果は認められず、EC の優れた特性と考えられた。

(3) ^{90}Y を用いた検討

EC の優れた特性が認められたことから、次に ^{90}Y を用いた実験を行った。まず、 ^{90}Y と EC とが錯体を作るかどうかを ODS-HPLC で検討した結果、錯体の形成は確認できたものの、クロマトグラフのピーク形はシャープではなく、テーリングしたり、2 つに割れるなどが観察され、錯体の不安定さが示唆された。さらに、脂溶性錯体としてトロポロンあるいはオキシシンを用い、active loading 法によってリポソームへの封入を試みた。反応後、オクタノール/水分配法で水相の放射活性を測定した結果、放射活性は水相に分布していたことから、錯体交換反応は進行していると考えられた。ただし、水相を HPLC や TLC で分析した結果、単一のピークを得ることはできず、

この結果も、 ^{90}Y -EC の錯体としての不安定さを示唆するものと考えられた。さらに、担がんマウスで体内動態を検討した結果、 ^{111}In -EC 封入リポソームで観察されたような顕著なクリアランスは認められなかった。原因としてリポソーム内で ^{90}Y と EC の錯体が形成されないか、不安定であることが推定された。

(4) 新しい配位子の設計と合成

前項で ^{90}Y と EC の錯体の不安定さが示唆されたことから、EC に変わりうる新規配位子として *L,L*-Propylenedicysteine (以下 PC と略) 並びに ethoxybenzyl diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA-EOB) を設計、合成した。Y は In より原子半径が大きいことが錯体の不安定さに影響していると考え、PC は EC の 2 つの N の間のメチレン基をひとつ増やすことで環を大きくした。また、DTPA-EOB では脂溶性側鎖であるエトキシベンジル基の導入によって DTPA の脂溶性を上げ、細胞膜を透過させることを意図した。まず ^{111}In を用いて錯体形成能およびリポソームへの封入を検討した。その結果、 ^{111}In は両者と錯体を形成し、リポソームへの active loading も可能であった。次に得られたそれぞれのリポソームを正常マウスに静脈内投与し、体内分布を検討した。その結果、 ^{111}In -PC-封入リポソームの肝臓・脾臓からのクリアランスと尿中への排泄は ^{111}In -EC 封入リポソームとほぼ同等であった。一方、 ^{111}In -DTPA-EOB-封入リポソームでは EC や PC を用いたときよりも肝臓・脾臓からのクリアランスと尿中への排泄は遅くなった。 ^{111}In -PC 封入リポソームの内容物を分析した結果、 ^{111}In -PC 錯体が確認された。ただし、 ^{111}In -PC としての単一ピークを得ることはできず、複数のピークが観察された。このピークの不安定さは、反応中の窒素灌流などである程度低減できたことから、分子内にある SH 基の酸化や分子内、分子間結合などが起きている可能性も示唆された。 ^{90}Y と PC との錯体形成およびリポソーム封入は今後の検討となるが、安定な錯体を形成できれば、優れた網内系クリアランスが得られると期待される。今後、 ^{90}Y -PC 錯体の検討を進めるとともに、 ^{90}Y に適した配位子設計と合成を継続することで、目的とする腫瘍のみへの放射性核種集積を実現し、進行癌の治療を可能にする内用療法の開発に繋げたい。

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 2 件)

Mikako Ogawa, Izumi O. Umeda, Mutsumi Kosugi, Ayumi Kawai, Yuka Hamaya, Misato Takashima, Hongxia Yin, Takayuki Kudoh, Masaharu Seno, Yasuhiro Magata, Development of ¹¹¹In-labeled liposomes for vulnerable atherosclerotic plaque imaging, J Nucl Med, 査読有, 55 巻, 2014, 115-120
DOI:10.2967/jnumed.113.123158.

梅田 泉、藤井 博史、臨床応用を目指した分子イメージング研究の現状と今後の展望、日本耳鼻咽喉科学会会報、査読有、116 巻、2013、933-940
<http://doi.org/10.3950/jibiinkoka.116.933>

〔学会発表〕(計 8 件)

藤井 博史、梅田 泉、濱道 修生、放射性核種を利用した診断治療一体化がん診療(シンポジウム)、第 10 回日本分子イメージング学会・学術集会、2015 年 5 月 21 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

Shusei Hamamichi, Yuki Matsuura, Kazunobu Ohnuki, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, ¹¹¹In-ethylenedicysteine liposomes with high tumor accumulation and rapid background clearance in a human cancer xenograft model, 第 10 回日本分子イメージング学会・学術集会、2015 年 5 月 20-21 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

梅田 泉、小池 悠介、濱道 修生、藤井 博史、リポソームと放射錯体化学を駆使したがん選択的 theranostic 製剤の開発、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸学院大学(兵庫県神戸市)

Shusei Hamamichi, Yuki Matsuura, Kazunobu Ohnuki, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, Biodistribution patterns of radionuclides through altering chelating ligands in radiolabeled liposomes, 第 54 回日本核医学会学術総会、2014 年 11 月 6-8 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

Izumi O. Umeda, Yusuke Koike, Shusei Hamamichi, Hirofumi Fujii, Novel radionuclide-carrying liposomes with excellent RES clearance for the theranostic application, XI Congress of World Federation of Nuclear Medicine and Biology, 2014 年 8 月 27-31 日, Cancun (Mexico)

Shusei Hamamichi, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, Development of radiolabeled liposomes for theranostic application toward cancer diagnosis and treatment, 第 9 回日本分子イメージング学会学術集会、2014 年 5 月 22-23 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

梅田 泉、内用放射線治療への応用を視野に入れた放射性核種封入リポソームの開発：迅速な網内系クリアランスの実現、5th バイオメディカルインタフェース・ワークショップ、2014 年 3 月 2 日、石垣市商工会館(沖縄県石垣市)

梅田 泉、藤井 博史、臨床応用を目指した分子イメージング研究の現状と今後の展望(教育講演)、第 878 回放射線診療研究会、2013 年 11 月 18 日、新宿住友ビル(東京都新宿区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 泉 (UMEDA, Izumi, O.)
独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・ユニット長
研究者番号：4 0 1 6 0 7 9 1

(3) 連携研究者

木村 禎亮 (KIMURA, Sadaaki)
独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・研究員
研究者番号：1 0 5 8 5 0 2 9