

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25810125

研究課題名(和文) 血中滞留性がABC現象に及ぼす効果およびABC現象回避型がん診断治療薬の開発

研究課題名(英文) Effect of hydrophilic shell of Lactosome on ABC phenomenon and theranostics using Lactosome

研究代表者

上田 一樹 (Ueda, Motoki)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・研究員

研究者番号：10615040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん診断・治療に向けたプローブや薬剤のキャリアの開発において、頻回投与時に著しく血中滞留性が減少するABC現象が問題として報告されている。そこでABC現象回避型高分子ミセル「ラクトソーム」を用いたがん診断・治療薬の開発を目指すとともに回避に必要な表面物性条件の解明を目的とした。ミセル表面を覆う親水相に注目し、親水鎖長の異なる5種のラクトソームを調製し、ABC現象の発現との関係を調査した。結果、親水相は0.07本/nm²以上の密度、5.8 nm以上の厚みがABC現象回避に必須であることが明らかとなった。さらに、¹¹¹Inラベル化してSPECT診断、⁹⁰Yラベル化して治療実験を行った。

研究成果の概要(英文)：Nanocarriers of imaging probe and drug are promising tools for a cancer imaging and therapy. It has been reported, however, that the nanocarrier at the second dose were immediately captured by liver even though they showed a long life time in the blood stream at the first dose. This is called as ABC phenomenon. This work show the clarification of the relationship between the hydrophilic phase on the surface of polymeric micelle "Lactosome" and the induction of ABC phenomenon, and then the application of Lactosome for cancer imaging and therapy. Five kinds of Lactosomes having different length of hydrophilic polymer were prepared and their induction of ABC phenomenon were evaluated from in vivo disposition. As a result, the lactosome having both of more than 0.07 chain/nm² density and more than 5.8 nm thickness of hydrophilic phase could suppress the ABC phenomenon. Furthermore, this Lactosome was used for SPECT/CT diagnostics by ¹¹¹In-labelling and for cancer therapy by ⁹⁰Y-labelling.

研究分野：超分子化学

キーワード：ラクトソーム 高分子ミセル SPECT がん診断 がん治療 ABC現象 サルコシン セラノスティクス

1. 研究開始当初の背景

がんの診断および治療の研究では、薬剤などの分子を輸送するためのキャリア設計が盛んに行われてきた。キャリアを実際に応用する場合には、生体内での安定性、高い血中滞留性、頻回投与における実用性、これら3つの性質が必要となる。忘れがちなのであるが現状、一度の投薬においてがんの完治は不可能であり頻回投与は現状必要不可欠であり、重要な性質である。これまでの研究から、PEGに代表される親水的なポリマー鎖でキャリア表面を覆うことで、免疫系による体外への排出を回避し生体内における高い安定性と、高い血中滞留性を可能にしている。しかしながら、頻回投与における実用性は多くのキャリアにおいて調査されていない。近年、頻回投与については、2回目以降に血中滞留性が著しく減少するという現象について度々報告されている[1]。実用化されているPEG修飾リポソームにおいても実際この現象が起きることが報告され、Accerlate Blood Clearance (ABC) 現象と名付けられ問題視されている[2]。つまり、生体内に用いるキャリアにおいてこのABC現象は回避すべき問題であり、今後のキャリアデザインの指針となる。これまでキャリアにおいて、化学的な構成成分が同一にも関わらずABC現象が発現するものとしなないものが報告されており、キャリア自体の諸性質(粒子系、表面構造、滞留性など)が関わっているとの見方が考えられる。これまでのABC現象に対する研究[3]では、用いたキャリア、粒子サイズ、親水性など多くの条件が異なっており、丁寧にABC現象について検討した例は少ない。

2. 研究の目的

ABC現象発現とキャリアの性質の関係を解明することを目的とし、キャリアの初回投与における血中滞留性、表面を覆う親水鎖相の2つに注目した。これまで申請者のグループはポリ乳酸をベースとした分子集合体ミセル「ラクトソーム」[4]および両親媒性ポリペプチドをベースとした分子集合体「ペプトソーム」を用いた生体イメージングの研究から血中滞留性あるいは表面親水鎖の密度の差によってABC現象の有無が決定されるという結果を報告している[5]。そこで今回サイズを統一した血中滞留性の異なる分子集合体ミセルを調製することで、それを用いてABC現象の発現と血中滞留性との関係を明らかにすることを目指す(テーマ1)。また、親水鎖長の異なる5種の両親媒性分子からそれぞれ同一サイズでありながら異なる親水鎖密度を有する5種のラクトソームを調製することで、ABC現象と親水差密度の関係の解明を目的とする(テーマ2)。これらのABC現象とラクトソーム諸性質の研究で得た知見を元に、ラクトソームを用いてABC現象回避型のがん診断・治療薬の調製を目指すのを最

終の目的としている(テーマ3)。現在、癌の診断と治療は主にそれぞれ別の手法が用いられており、煩雑となっている。そこで、ひとつのキャリアにおいて診断と治療の両方を可能にすることで集積した腫瘍に対する直接的な治療効果の発揮が期待できる。今回、診断用と治療用の2種の放射性同位元素でミセルを標識することでがん診断・治療の両方を目指す。

3. 研究の方法

テーマ1

親水性ブロックにポリサルコシン、疎水性ブロックにポリ乳酸を用いたAB型両親媒性分子は水中に分散させることで30nm程度の分子集合体ミセル「ラクトソーム」(ABラクトソーム)を形成する。また、同様のA3B型両親媒性分子も同様に同程度のサイズのラクトソーム(A3Bラクトソーム)を形成する。これまでの研究からABラクトソームは16時間という非常に長い血中滞留性を示すことが報告されている[6]。一方でA3Bラクトソームは6時間程度であり、滞留性は大きく異なる[6]。また、ABラクトソームはABC現象を引き起こすのに対し、A3BラクトソームはABC現象を引き起こさないことも明らかにしている。これらの結果を踏まえて、AB型両親媒性分子とA3B型両親媒性分子を特定の比率で混合し、混合ラクトソームを調製することで、サイズを一定に保ったままその血中滞留性が異なるラクトソームを調製する。これらの血中滞留性の異なる複数のラクトソームをマウスに投与し、経過時間毎にバイオディストリビューションを行い、その血中滞留性および体内動態を評価する。さらに、頻回投与においても同様の評価をすることでABC現象の有無を確認することが可能であり、キャリアの血中滞留性と頻回投与におけるABC現象との関係を明らかにする。経時毎のバイオディストリビューションにおいては、各ラクトソームに、キレート剤DOTA(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸)を導入した両親媒性分子(DOTA-PDLA)を挿入し、111インジウム標識することで、その存在比率をガンマカウンタにより測定し、組織ごと評価する。

テーマ2

親水性ブロックのサルコシン残基数(11, 23, 33, 55, 85)の異なる5つの両親媒性分子を用いて5種のA3B型ラクトソーム(S10, S23, S33, S55, S85ラクトソーム)を調製し、そのラクトソーム表面を覆うサルコシン鎖の表面密度を動的光散乱(DLS)測定、静的光散乱(SLS)測定から求める。また透過型電子顕微鏡によりそのコアとシェル径を求め、これらの5種のラクトソームについてテーマ1と同様の手法にて111インジウム標識を行い、バイオディストリビューションにて体内動態とABC現象の発現を評価する。

さらに、ABC 現象のメカニズムにおいて IgM 抗体の産生が報告されていることから、各ラクトソームにおける抗サルコシン抗体算出量を ELISA から求め、より精密に ABC 現象との関係性を評価する。

テーマ3

ABC 現象を回避するラクトソームを用いて、テーマ1と同様の手法にて、がん診断用放射性同位元素 111 インジウム、放射線治療用の放射性同位元素 90 イットリウムを標識することでがん腫瘍の診断と治療を両立したキャリアを調製できる。それぞれの金属の標識の定量的評価は ICP 発光分析により行い、実際の診断評価は SPECT/CT による RI イメージング、治療はベータ線による腫瘍のサイズ変化を評価することで行う。

4. 研究成果

テーマ1

1-1. 混合ラクトソームの調製

サルコシン鎖長 23 残基の A3B 型両親媒性分子 (A3B) とサルコシン鎖長 64 残基の AB 型両親媒性分子 (AB) を 100/0, 100/10 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 の混合比でクロロホルムに溶解させ、試験管に移し、減圧留去にて薄膜フィルムを作製した。これに生理食塩水を加え (最終濃度 1 mg/mL) 超音波照射を行い、混合ラクトソームを調製した。

放射性同位元素標識は、DOTA-PDLA の薄膜に、111 インジウム溶液を加えあらかじめ錯体形成させたのち、インジウム標識 DOTA-PDLA をそれぞれのラクトソーム調製時に添加することでインジウム標識ラクトソームを調製した。

1-2. 混合ラクトソームの粒径

100/0, 100/10, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 の混合ラクトソームそれぞれの粒径を DLS にて求めたところ、22, 23, 26, 34, 35, 39 nm であった。

1-3. 体内動態

これらのうち、100/0, 100/10 のラクトソーム (A3B ラクトソーム、A3B+AB ラクトソーム) について血中滞留性の評価を行った。111 インジウム標識し、バイオディストリビューションによって、経時的に血液を回収し、その線量を測定し経時変化曲線を求めることで、ラクトソームの血中半減期を求めた。その結果、A3B ラクトソームでは 6.8 時間、A3B+AB ラクトソームでは 6.7 時間であり差がみられなかった。10% 程度の AB の混合では血中滞留性にほとんど変化が無いことがわかった。

1-4. ABC 現象

次に ABC 現象の発現を調査した。それぞれのラクトソームを初回投与から 1 週間後に再び投与し、初回と 2 回目の体内動態の変化から ABC 現象を評価した。結果、ABC 現象の

有無には違いがみられた。初回と 2 回目、それぞれ投与 3 時間後の血中残存率を比較すると初回投与時は A3B ラクトソームが 41%、A3B+AB ラクトソームが 37% とほぼ同様であったのに対し、2 回目投与においては、A3B ラクトソームは 26%、A3B+AB ラクトソームは 14% と大きく差がみられた。

ICG 標識ラクトソームを用いた in vivo 蛍光イメージングの結果、および ELISA から求めた抗体産出量も同様の結果を示した。

これらの結果から、混合した AB 型両親媒性分子が免疫系に認識された可能性が考えられる。AB 型を 10% 混合させただけではラクトソームのサイズも血中半減期もほとんど変わらないが、抗体産出には大きく影響することを明らかにした。

テーマ2

2-1. ラクトソームの調製

サルコシン鎖長 10, 23, 33, 55, 85 残基の A3B 型両親媒性分子を有機化学的合成およびラクチドの開環重合により合成した。1H NMR 測定でのサルコシンの N-CH₃ のピークの積分比からそれぞれ残基数を同定した。ラクトソームの調製はテーマ1と同様の操作にて行った。

2-1. ラクトソームの物性

DLS 測定を行い、流体力学的直径を求めたところいずれのラクトソームも 20-30 nm であり、大きな差は見られなかった。多分散指数も S85 ラクトソーム以外は 0.1 以下であり単分散を示す値であった。

SLS 測定からラクトソーム 1 個あたりの質量を求め、それを分子量で割ることで構成分子数を求めた。それぞれ S10, S23, S33, S55, S85 ラクトソームは順に、190, 150, 70, 50, 20 個で構成されていることがわかった。さらにこの構成分子数と DLS で求めた粒径から表面におけるサルコシン鎖の密度が概算できる。結果、順に表面サルコシン密度は 0.43, 0.29, 0.10, 0.07, 0.02 本/nm² であった。つまり構成分子のサルコシン鎖長が短いほどラクトソーム表面のサルコシン密度が高いことが明らかとなった。

TEM 観察からラクトソームの形状および疎水性コア部のサイズを求めた。いずれのラクトソームも球状であり、均一なミセルであった。ここで求めたコア部のサイズと DLS から求めた粒径から親水性シェル部の厚みを概算することができる。結果、サルコシン鎖が長くなる順に、シェル部の厚みは 3.7, 5.8, 7.0, 8.3, 9.7 nm であることがわかった。つまり、構成分子のサルコシン鎖が長くなるのに応じて親水性シェル部の厚みも厚くなることが明らかとなった。

2-3. 体内動態

5 種のラクトソームの体内動態をバイオディ

ストリビューションにより評価した。血中半減期はいずれも 6-8 時間程度であり、大きな違いは見られなかった。

2-4. ABC 現象

ABC 現象の誘起を調査した。テーマ 1 と同様の手法にて初回投与時と 2 回目投与時における血中存在比の経時変化の挙動の違いによって ABC 現象を評価した。結果、S10 ラクトソームおよび S85 ラクトソームのみ、2 回目投与後 1 時間で即座に血液からクリアランスされ肝臓に集積していることがわかり、ABC 現象が発現していることが明らかとなった。一方で、S23、S33、S55 ラクトソームにおいては初回と 2 回目で同様の血中存在比を示し、経時的な挙動にも違いは見られなかった。それぞれのラクトソームを ICG で標識し、蛍光イメージングを行った結果も同様であり、S23、S33、S55 ラクトソームは投与回数にかかわらず投与 9 時間後でもマウスの全身が光っており血中を巡っている一方で、S10、S85 ラクトソームは 2 回目には投与 1 時間後において全身の蛍光強度は減少し、肝臓部位の蛍光強度が増大し、肝臓への選択的な集積がみられる結果となった。

ELISA により抗体産生量を求めた結果も、S10 および S85 ラクトソームでは投与後 1 週間で未投与時と比べて 2-4 倍に抗体量が増大した一方で、S33、S55 ラクトソームでは未投与時と比較して抗体産生量に変化は見られず、抗体産生は起きていないことがわかった。

これらの結果から、ラクトソーム表面のサルコシン密度が少なくとも 0.07 本/ nm^2 以上に高いことは重要であるが、同時に親水性シエルの厚みが 5.8 nm 以上必要であることも明らかとなった。これまでも、表面を覆う親水鎖密度を高く保つことが重要であることを予想されており、それを裏付ける結果である。さらにそれだけでなく、厚みもナノメートルオーダーでの差で重要であることを明らかにした。同一サイズでありながら親水性シエルの性質の異なるラクトソームを調製に成功し、それを用いることで詳細な ABC 現象との関係を解明することができた。

テーマ 3

3-1. SPECT/CT 観察

テーマ 1 と同様の操作にて ^{111}In インジウム標識を行い、実際担癌マウスに投与し、臨床で用いられる診断技術である SPECT/CT 画像診断を行った。がん細胞は 4T1 を用い、マウスは BALB/c nude、7 週齢のものをを用い、マウスの右大腿部にがん種を移植した。その担癌マウスの尾静脈より注射で投与し (1 mg/ 0.2 mL/ 3 MBq/ 匹) 経過時間毎の SPECT/CT 画像を行った結果、経時的に EPR 効果によってがん部位に集積する様子が確認できた。実際の臨床においてもがん診断プローブとして使用可能であることが期待出来る結果であ

った。

3-2. 治療実験

^{111}In インジウム標識法と同様の操作にて ^{90}Y イットリウムを標識したラクトソームを調製した。この ^{90}Y イットリウム標識ラクトソーム (0.5 mg/ 0.1 mL/ 4 MBq/ 匹) を移植後 4 日後の担癌マウス (がん細胞: 4T1、移植部位: 胸部皮下、マウス: BALB/c nude, 7 週齢) に尾静脈より投与し、投与後 2 週間経時的に体重と腫瘍サイズを測定することで治療効果を評価した。コントロールとして生理食塩水を同様に投与したものと比較した結果、2 週間のサイズの変化において有意な差が見られ、がん細胞の成長を 7 割程度に抑制できていることがわかった。しかしながら市販の抗癌剤に比べその抗腫瘍効果は十分とは言えないものであり今後更なる改善が求められる。

< 引用文献 >

- [1] ET Dams et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000, 292, 1071-1079.
- [2] T. Ishida et al., Int. J. Pharmaceut. 2003, 255, 167-174.
- [3] A) T. Ishida et al., J. Control. Release 2006, 115, 251-258., B) T. Ishida et al., J. Control. Release 2005, 105, 305-317., C) T. Okuda et al., J. Control. Release 2006, 116, 330-336.
- [4] A) E. Hara et al., Int. Immunopharmacol. 2012, 14, 261-266., B) A. Makino et al., Chem.Lett. 2007, 36, 1220-1221.
- [5] E. Hara et al., J. Pept. Sci., 2014, 20(7), 570-577.
- [6] E. Hara et al., ACS Med. Chem. Lett., 2014, 5(8), 873-977.

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)

原恵理、上田一樹、牧野顕、原功、小関英一、木村俊作、Factors Influencing in vivo Disposition of Polymeric Micelles on Multiple Administrations、ACS Medicinal Chemistry Letters、査読有り、2014、5(8)、873-877.

DOI: 10.1021/ml500112u

[学会発表](計 6 件)

上田一樹、Smart Materials of Molecular Assemblies Prepared from Peptidic Amphiphiles Having Hydrophobic Helices and Application for Cancer Imaging、BIT 's 1st World Annual Congress of Smart Materials、2015 年 3 月 23 日 ~ 25 日、Busan Exhibition & Convention Center

栗原研輔、上田一樹、原功、原恵理、佐野

紘平、牧野顕、小関英一、清水章、佐治英郎、富樫かおり、木村俊作、90Y ラクトソームを用いた PEIT 後の化学内照射療法 ドキシルとドキソルピシンの比較、第 54 回日本核医学会学術総会、2014 年 11 月 6 日～8 日、大阪国際会議場

上田一樹、栗原研輔、原功、富樫かおり、小関英一、木村俊作、Tumor Imaging Using Host-Guest-Type Molecular Assemblies Composed of Dendrimer Template and Amphiphilic Helical Polypeptides.、第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 28 日～30 日、名古屋国際会議場

上田一樹、栗原研輔、原功、佐野紘平、木村博之、小関英一、富樫かおり、佐治英郎、木村俊作、111In 標識 A3B 型ラクトソームの開発と固形癌の SPECT イメージング、第 13 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、2013 年 12 月 14 日、京都ガーデンパレス

上田一樹、栗原研輔、原功、小関英一、富樫かおり、木村俊作、111In 標識 A3B 型ラクトソームの開発と固形癌の SPECT イメージング、第 53 回日本核医学会学術総会、2013 年 11 月 8 日～10 日、福岡国際会議場

上田一樹、富樫かおり、小関英一、木村俊作、In 標識化 A3B 型ラクトソームによる癌の SPECT イメージングとセラノスティックスへの展開、第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 11 日～13 日、金沢大学角間キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 一樹 (UEDA, Motoki)
理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・研究員
研究者番号：10615040

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

栗原 研輔 (KURIHARA, Kensuke)

原 功 (HARA, Isao)

原 恵理 (HARA, Eri)