

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410227

研究課題名(和文) オールイン型デンドリマーを用いた癌の「見張り」リンパ節のイメージング・薬物送達

研究課題名(英文) Imaging and Drug Delivery to Sentinel Lymph Node by Using All-In-One Dendrimers

研究代表者

児島 千恵 (Kojima, Chie)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50405346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本の死因の第一位である癌の克服のため、本研究では、転移性癌細胞の最初の通り道であるリンパ節の正確なイメージングと薬物送達を行うことを目的とした。まず、サイズや構造を制御でき、かつデリバリー機能をもつデンドリマーとよばれる合成高分子の構造最適化を行い、リンパ節へ多く移行するデンドリマーを得た。そして、このデンドリマーにイメージング剤を付与し、リンパ節の検出に成功した。さらに、癌細胞集積性と抗腫瘍活性を併せ持つデンドリマーを作製し、癌細胞に選択的な殺傷効果を示すデンドリマーを作製することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：Because cancer is a leading cause of death in Japan, development of imaging technology for cancer diagnosis and drug delivery systems for cancer therapy are crucial. Dendrimers are synthetic macromolecules with highly controllable structures, which are potent multifunctional imaging agents and drug carriers. The detection of the sentinel lymph node (SLN), the first lymph node draining tumor cells, is important in cancer diagnosis and therapy. First, the optimal dendrimer structure for SLN imaging was investigated. Carboxyl-terminal dendrimers of greater than G4 were mostly located in the SLN. SLN detection was successfully performed by nuclear medicinal imaging and fluorescent imaging using these dendrimers. Finally, triply functional dendrimers with tumor targeting activities, antitumor effects and detectable probes were prepared.

研究分野：高分子材料、ナノメディシン

キーワード：イメージング デンドリマー リンパ節 ガン治療

### 1. 研究開始当初の背景

日本の死因の第一位である癌の治療法の確立・発展は非常に重要な研究テーマである。癌細胞は原発巣に発生し、局所的に異常増殖するだけでなく、全身へと転移してヒトを死に至らしめる。このように、転移という性質が癌治療の大きな障壁となっているため、転移性癌細胞を検出・治療することができれば、癌の克服への大きな一歩となる。

癌細胞はリンパ節を通して転移することが知られているため、癌の外科療法では癌組織を摘出する際に、予防的にその周辺にあるリンパ節も合わせて切除し、癌細胞が全身へ移行する可能性を排除する。しかし、リンパ節を除去すると、副作用として浮腫(むくみ)が生じてしまう。患者さんの生活の質の向上を考えると、転移性癌細胞が存在するリンパ節を正確に検出し、必要最小限のリンパ節切除にとどめることが重要である。近年、転移性癌細胞が最初に通過するリンパ節であるセンチネルリンパ節(「見張り」リンパ節)を同定し、術中にこれを摘出して、癌細胞が存在するか否かを病理学的に検査する手法(センチネルリンパ節生検)が発展してきた。この検査では、センチネルリンパ節の同定と癌細胞の有無の判別が肝となる。センチネルリンパ節を正確にかつ簡便に同定するためには、1つの薬剤で様々なイメージング手法で検出可能なマルチモダルイメージング剤の作製が求められている。また、センチネルリンパ節に存在する転移性癌細胞を検出し、薬物を送達することができる薬物運搬体は、癌転移を抑制できる極めて有用な材料となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、サイズや構造を制御することができる合成高分子である dendrimer を用いて、複数のイメージング手法で正確にセンチネルリンパ節を検出できるイメージング剤の作製と、センチネルリンパ節に存在する転移性癌細胞のイメージングと薬物送達を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、以下の3項目について検討した。

#### センチネルリンパ節への移行のための dendrimer の最適構造の解明

dendrimer のサイズは世代数(G)によって調節することができる。市販の G2, G4, G6, G8 の PAMAM dendrimer のアミノ末端に 7-17 当量のイソチオシアネートベンジル基を有するキレート剤(p-SCN-Bn-DTPA)を反応させ、アミノ末端の dendrimer を得た(Gx-NH<sub>2</sub> (x は世代数))。続いて、アルカリ水溶液中(pH9-10)で過剰量の無水コハク酸もしくは無水酢酸を反応させ、キレートを結合したカルボキシ末端 dendrimer もしくはアセチル末端 dendrimer を得た(Gx-COOH, Gx-Ac)。これらに放射性の塩化イ

ンジウムを配位させて、放射性標識した dendrimer を得た。ラットの右足背に各種 dendrimer (10 $\mu$ Ci/100 $\mu$ L)を皮内投与し、1, 6, 24 時間後に安楽死させ、各臓器を摘出して、放射線量を測定した。

#### 核医学イメージングおよび蛍光イメージングによるセンチネルリンパ節の検出

上記のとおり放射性標識した dendrimer (200 $\mu$ Ci/100 $\mu$ L)を投与して、1, 6, 24 時間後にセンチネルリンパ節の核医学(SPECT)イメージングを行った。一方、キレート剤の代わりに HiLyte Fluor680 のスクシンイミドエステルを2分子結合させ、同様の反応を行うことで、蛍光ラベルした dendrimer 各種を合成した。この dendrimer (1mg/100 $\mu$ L)を上記と同様に投与したラットのセンチネルリンパ節を摘出し、凍結切片を作製した。DAPI によって細胞核を、抗 CD68 抗体によってマクロファージを、抗 CD3 抗体によって T 細胞を免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 蛍光色素、抗腫瘍ペプチドおよび癌標的ペプチドを結合させたオールイン型 dendrimer の作製

連携研究者の近藤らは腫瘍標的能をもつ細胞透過ペプチドを同定するとともに、癌細胞で発現が抑制されている癌抑制遺伝子(p16<sup>INK4a</sup>や p14<sup>ARF</sup>など)に相当するペプチドが抗ガン活性を示すことを報告している(Kondo et al, Nature Commun., 2012 など)。また、細胞透過ペプチドと抗腫瘍活性ペプチドの間に癌細胞で発現しているカテプシン B の基質となる配列を挿入することで、抗腫瘍活性が向上することも明らかにしている(Saito et al, Cancer Sci., 2016)。そこで、腫瘍標的能をもつ細胞透過ペプチド(CPP44)と抗腫瘍ペプチド(p16<sup>INK4a</sup>)、さらに蛍光色素(FITC)を結合した dendrimer を作製した。CPP44 ペプチドと p16<sup>INK4a</sup> ペプチドを連結させたペプチドを、dendrimer に結合させる方法(直列型)とそれぞれのペプチドを別々に dendrimer に結合させる方法(並列型)によって、dendrimer を作製し、モデル癌細胞(AML3639 細胞)への取り込み能と抗ガン活性について比較検討した。

### 4. 研究成果

#### センチネルリンパ節への移行のための dendrimer の最適構造の解明

放射性標識したアミノ末端、アセチル末端、カルボキシ末端の G2, G4, G6, G8 dendrimer (12 種類)の体内動態を検討したところ、G2 dendrimer は末端官能基に関わらず、腎臓に移行することがわかった。一方、G4 以上の dendrimer では、末端官能基によってその動態が異なった。すなわち、アミノ末端 dendrimer の大部分は投与部位に残存し、アセチル末端は血液に移行し、カルボキシ末端はセンチネルリンパ節に集積することがわか

った(図1)。以上より、皮内投与では、粒径が6nm以上(G4以上)のカルボキシ末端デンドリマーがセンチネルリンパ節に集積しやすいことがわかった。

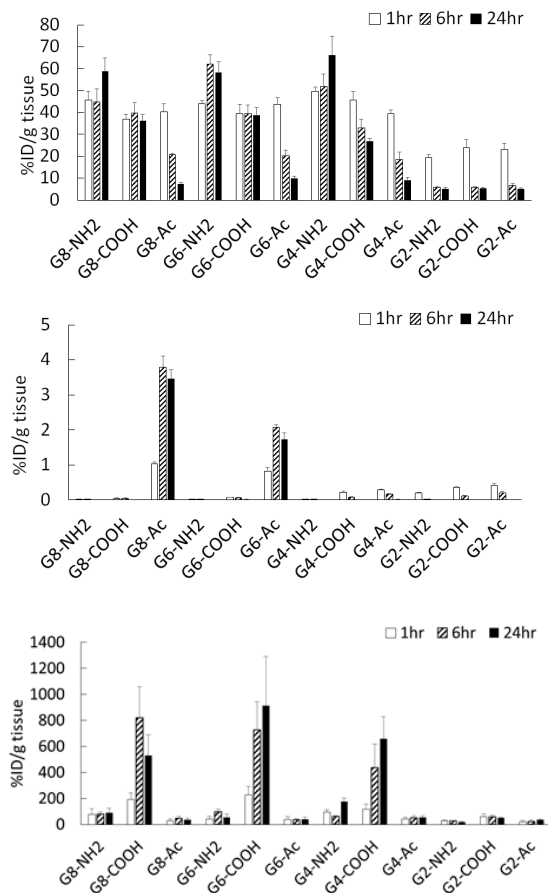


図1、種々のデンドリマーの投与部位(上)血液(中)、リンパ節(下)における集積性

### 核医学イメージングおよび蛍光イメージングによるセンチネルリンパ節の検出

上記の体内動態を検討した放射性標識したデンドリマー(G4-COOH、G6-COOH、G8-COOH)を用いて、センチネルリンパ節のSPECTイメージングを行った。これらのデンドリマーでは、1時間後においてもセンチネルリンパ節を検出できることがわかった。放射性標識に代えて近赤外の蛍光色素HiLyte Fluor680を結合させたデンドリマーを用いることでリンパ節の蛍光イメージングを行った。G4以上のカルボキシ末端のデンドリマーは、マクロファージおよびT細胞とは、ほとんど共局在しないことがわかった。以上より、核医学イメージングおよび蛍光イメージングにより、センチネルリンパ節の検出に成功した。

### 蛍光色素、抗腫瘍ペプチドおよび癌標的ペプチドを結合させたオールイン型デンドリマーの作製

デンドリマーのみでは細胞への取り込みはみられなかったが、並列型、直列型でペプチドを結合させたデンドリマーでは、モデル

癌細胞への選択的かつ効果的な取り込みが見られ、ペプチド単独よりも高い抗癌活性を示した。また、興味深いことに、並列型のデンドリマーは、直列型のデンドリマーよりも細胞への取り込みが少ないにも関わらず、抗癌活性が高いことがわかった。これは、抗ガン活性は細胞への取り込みだけでなく、抗ガン活性をもつp16<sup>INK4a</sup>ペプチドの放出挙動も関与していることが考えられる。したがって、機能的なデンドリマーを作製するには、デンドリマーへの結合戦略も重要であることがわかった。

以上より、核医学イメージングおよび蛍光イメージングにより、センチネルリンパ節の検出に成功した。また、イメージング能、抗癌活性および癌標的能をもつオールイン型デンドリマーの作製にも成功した。

### 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12件)

C. Kojima, K. Saito, E. Kondo, "Design of peptide-dendrimer conjugates with tumor homing and antitumor effects", Res. Chem. Intermediates, 印刷中(2017), 査読有  
K. Saito, H. Iioka, C. Kojima, M. Ogawa, E. Kondo, "Peptide-based tumor inhibitor encoding mitochondrial p14<sup>ARF</sup> is highly efficacious to diverse tumors", Cancer Sci., 107, 1290-1301 (2016), 査読有  
DOI: 10.1111/Cas.12991

児島千恵, 「デンドリマーの機能化とナノメディシンへの応用」, 化学工業, Vol. 67, pp.250-254 (2016), 査読無  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/4002078212>  
4

児島千恵, 「樹状高分子によるがんの『見張り』リンパ節のイメージング」, 化学工業, Vol. 66, pp.855-860 (2015), 査読無  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/4002063165>  
2

C. Kojima, "Preclinical studies of dendrimer prodrugs", Expert Opin. Drug Metab. Toxicol., 11, 1303-1315 (2015), 査読有  
DOI: 10.1517/17425255.2015.1052404.

U. H. Sk, C. Kojima, "Dendrimers for drug delivery of anticancer drugs", Frontiers in clinical drug research-anti-cancer agents, 2, 3-25 (2015), 査読有  
DOI: 10.2174/9781681080727115020003

U. H. Sk, C. Kojima, "Dendrimers for theranostic applications", Biomolecular Concepts, 6, 205-217

(2015), 査読有

DOI: 10.1515/bmc-2015-0012.

Y. Niki, M. Ogawa, R. Makiura, Y. Magata, C. Kojima, "Optimization of dendrimer structure for sentinel lymph node imaging: Effects of generation and terminal group", *Nanomedicine*, 11, 2119-2127 (2015), 査読有

DOI: 10.1016/j.nano.2015.08.002.

C. Kojima, R. Kameyama, M. Yamada, M. Ichikawa, T. Waku, A. Handa, N. Tanaka, "Ovalbumin delivery by guanidine-terminated dendrimers bearing an amyloid-promoting peptide via nanoparticle formulation", *Bioconjugate Chem.*, 1804-1810 (2015), 査読有

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00325

C. Kojima, Y. Niki, M. Ogawa, Y. Magata, "Prolonged local retention of subcutaneously injected polymers monitored by noninvasive SPECT imaging", *Int. J. Pharm.*, 476, 164-168 (2014), 査読有

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.053

C. Kojima, N. Oeda, S. Ito, H. Miyasaka, T. Iida, "Photo-thermogenic properties of different sized gold nanoparticles for application in photo-thermal therapy", *Chem. Lett.*, 43, 975-976 (2014), 査読有

DOI: 10.1246/cl.140124

C. Kojima, K. Irie, T. Tada, T. Tanaka, "Temperature-sensitive elastin-mimetic dendrimers: effect of peptide length and dendrimer generation to temperature sensitivity", *Biopolymers*, 101, 603-612 (2014), 査読有

DOI: 10.1002/bip.22425

[学会発表](計18件)

児島千恵, 「ガンの『見張り』リンパ節のイメージング試薬」, 大阪府立大学・大阪市立大学ニューテクノフェア 2016、2016/12/6、大阪産業創造館、大阪府大阪市。

児島千恵, 西岡恵理、今井俊夫、中平敦、小野寺宏, 「樹脂状ポリリシンをコートした神経細胞足場ファイバー」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、2016/11/21-22、福岡国際会議場、福岡県福岡市。

C. Kojima, Ugir Hossain Sk, D. Fukushima, N. Akazawa, T. Niidome, "Thermosensitivity in elastin-like peptide-grafted polylysine", 第53回ペプチド討論会, 2016/10/26-28, 京都テルサ, 京都府京都市。

C. Kojima, "Fate of Various Dendrimers with Different Sizes and Surfaces after

Subcutaneous and Intradermal Administration", The International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology (ICONAN2016), 2016/9/28-30, パリ第6大学 (UPMC), パリ, フランス。

C. Kojima, "Applications of Dendrimers for Bioimaging", The 5th KIST-OPU-ECUST-TKU Joint Symposium on Advanced Materials and Application, 2016/9/25-27, 韓国科学技術研究所 (KIST), ソウル, 韓国。

小川美香子, 「マルチモーダル生体イメージング法の開発」, 日本分析化学会第65年会, 2016/9/15、北海道大学、北海道札幌市。【招待講演】

児島千恵, 亀山里奈、山田愛実、市川将弘、和久友則、田中直毅, 「アミノ酸ペプチドを結合したグアニジン末端デンドリマーによる蛋白質デリバリー」, 第32回日本DSS学会学術集会, 2016/6/30-7/1、静岡グランシップ、静岡県静岡市。

C. Kojima, D. Fukushima, "Preparation of Photo- and Temperature-Responsive Dendrimers and Their Application to Photo-thermal Therapy", The 33th International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST-33), 2016/6/22-24, 千葉幕張メッセ, 千葉県千葉市。【招待講演】

児島千恵, 福嶋大地, SK Hossain Ugir, 赤澤尚俊, 新留琢郎, 「エラスチン様ペプチドグラフトポリリシンの高次構造と温度応答性の相関」, 第65回高分子学会年次大会, 2016/5/25-27, 神戸国際会議場、兵庫県神戸市。

C. Kojima, Y. Niki, M. Ogawa, Y. Magata, "Dendrimer-Based Sentinel Lymph Node Imaging", The 10th World Biomaterials Congress (WBC 2016), 2016/5/17-22, モントリオールコンベンションセンター、モントリオール、カナダ。

児島千恵, 仁木悠一郎, 小川美香子, 間賀田泰寛, 「癌の見張りリンパ節へ標的化するためのデンドリマーの構造最適化」, 第44回医用高分子シンポジウム, 2015/7/27-28, 産業技術総合研究所 臨海副都心センター、東京都江東区。

児島千恵, 仁木悠一郎, 小川美香子, 間賀田泰寛, 「カルボキシ末端デンドリマーによるセンチネルリンパ節イメージング」, 第10回日本分子イメージング学会学術大会, 2015/5/20-21, タワーホール船堀, 東京都江戸川区。

児島千恵, 「樹状高分子によるガンの『見張り』リンパ節のイメージング」, 分野別「ライフイノベーション」新技術説明会, 2015/1/20, JST 東京本部別館、東京都千

代田区 .

仁木悠一郎、小川美香子、間賀田泰寛、児島千恵、「種々のデンドリマーを用いたセンチネルリンパ節の SPECT・蛍光イメージング」、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会、2014/11/17-18、タワーホール船堀、東京都江戸川区 .

児島千恵、仁木悠一郎、小川美香子、間賀田泰寛、「SPECT による皮下投下したポリマーの体内動態のモニタリング」、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会、2014/11/17-18、タワーホール船堀、東京都江戸川区 .

C. Kojima, Y. Niki, M. Ogawa, Y. Magata, "Dendrimeric Agent for Sentinel Lymph Node Imaging: Optimization of the Size and the Surface Charge", IUMRS-ICA2014, 2014/8/14-20, 福岡大学、福岡県福岡市 .

仁木悠一郎、小川美香子、間賀田泰寛、児島千恵、「世代数・表面電荷の異なるデンドリマーによるセンチネルリンパ節の SPECT イメージング」、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014/7/30-31、慶応義塾大学、東京都港区 .

仁木悠一郎、小川美香子、牧浦理恵、間賀田泰寛、児島千恵、「センチネルリンパ節イメージングのためのポリアミドアミンデンドリマーの構造最適化」、第 63 回高分子学会年次大会、2014/5/28-30、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市 .

〔図書〕(計 1 件)

児島千恵、エヌ・ティー・エス、マイクロ/ナノカプセルの調製、徐放性制御と応用事例「第 3 章第 11 節デンドリマーによってナノカプセル化された金ナノ粒子による X 線 CT イメージング」、2014, 272-246 .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：リンパ節イメージング剤

発明者：児島千恵、仁木悠一郎、小川美香子、間賀田泰寛

権利者：大阪府立大学、浜松医科大学

種類：特許

番号：特願 2014-096756 号

出願年月日：2014 年 5 月 28 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

大阪府立大学工学研究科 児島研究室

URL: <http://www2.chem.osakafu-u.ac.jp/>

JST 新学術説明会の発表資料

URL:<http://shingi.jst.go.jp/abst/p/14/1468/life04.pdf>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

児島 千恵 (KOJIMA, Chie)

大阪府立大学・工学研究科・准教授  
研究者番号：50405346

(2) 研究分担者

小川 美香子 (OGAWA, Mikako)

北海道大学・薬学研究院・教授  
研究者番号：20344351

(3) 連携研究者

近藤 英作 (KONDO, Eisaku)

新潟大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：30252951