

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713040

研究課題名(和文)核医学診断および治療を目的とするナノ粒子キャリアの生体内制御技術の創成

研究課題名(英文) Approaches to control in vivo dynamics of nanoparticle carriers for diagnosis and therapy in nuclear medicinal fields

研究代表者

牧野 顕 (MAKINO, Akira)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授

研究者番号：00566226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ粒子をキャリアとしたImage-based Therapyを実現するためには、診断ではプローブを投与してから撮像までの待ち時間の短縮、内照射治療では粒子が血中に滞留している間の非特異的な被ばくの低減が重要な課題である。そこで本研究では、血液に滞留したナノ粒子を強制的に血液外に排除する手法を検討し、抗ナノ粒子抗体を用いて血液由来のバックグラウンドシグナルの大幅低減させることに成功した。また、飛程が短く非特異的な被ばくを抑制することが可能であると期待されるオージェ電子放出核種を用いたナノ粒子型内照射治療用薬剤を開発した。

研究成果の概要(英文)：For the development of the image-based therapy using nanoparticle carriers, shortening the waiting time from the probe dosage to the imaging, and reduction of non-specific radiation exposures caused by RI labeled nanoparticle circulating blood is important issues. In this study, we investigated a method to forcibly remove nanoparticles circulating in blood. Using anti-nanoparticle antibody, we succeeded in greatly reducing the nanoparticle in blood, which causes for the undesired background signal on imaging. Additionally, we also developed nanoparticle type drug for internal radiation therapy using Auger electron emission nuclide with short radiation range, which is expected to be able to suppress nonspecific exposure.

研究分野：分子イメージング

キーワード：ナノ粒子 核医学イメージング 内照射治療

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子をキャリアとしたドラッグデリバリーシステム (DDS) の特徴は、内包した任意の薬剤を粒子の体内動態依存的に標的分子まで送達できる点にある。この DDS を核医学分野に応用することができれば、Imaging-based Therapy を構造の全く同じキャリアでシームレスに実行可能であり、効率の良い治療が可能となる。さらに、内用放射線治療薬剤を内包させれば、全く新しいタイプの内用放射線治療を開発可能であり、核医学分野へのナノ粒子キャリアの導入は非常に魅力的である。

しかしナノ粒子は元来、治療薬を徐放することにより、薬剤の血中濃度を維持するためのキャリアとして利用することを前提に開発が進められてきたことから、DDS に使用されるナノ粒子は肝臓等の生体の異物排除システムに認識されにくく、高い血中滞留性を有するようにデザインされている。この性質は内包した治療用薬剤の副作用を抑えながら、薬剤の効果を持続させるためには極めて有効であるが、イメージングでは、バックグラウンドシグナル増大に繋がり、プローブ投与早期での高コントラストなイメージ取得の妨げとなることからナノ粒子の核医学イメージングへの適用に対する障害となっている。特に短半減期核種を用いる PET イメージングの場合は、薬剤の投与からイメージングまでの待機時間を長く取れないことから、その欠点が顕著に表れる。また、内用放射線治療への応用では、粒子が血液に滞留している間の内照射用薬剤から放出される線による非標的細胞への傷害が無視できないという問題が予想される。

2. 研究の目的

ナノ粒子をキャリアとした Imaging-based Therapy の実現には、特に診断において、ナノ粒子プローブ投与後早期にイメージングをするために十分な標的部位となるがん部位とバックグラウンドのシグナル比を得ることが重要である。このためには、1) 標的部位へのプローブの集積性を高めること、2) 血中に循環しているプローブ由来のバックグラウンドシグナルを低減させることの2つの手法が考えられ、従来の研究では、1) のプローブの集積性を高めることで、プローブ投与後早期でのコントラスト比の改善が試みられてきた。具体的には、粒子表面を標的部位に発現している受容体と特異的に結合する抗体やペプチド鎖などにより修飾することが検討されているが、その結果は十分なものとは言えない。

そこで本研究では、血中に滞留しているナノ粒子の動態制御を目的とし、例えば強制的に血液外に排除することによって、プローブ

投与早期での標的部位とバックグラウンドシグナルのコントラストを改善することを目的として、研究を実施した。

また内照射治療用については、内照射治療用の核種を高分子ミセルに内包した新規ナノ粒子型薬剤の合成を行い、その細胞障害性について検討を行った。

3. 研究の方法

ナノ粒子には、疎水性部位がポリ乳酸又はポリペプチド鎖、親水性部位がポリサルコシンからなる両親媒性ポリ(デブシ)ペプチドを用いた。これらの粒子は疎水部位と親水性部位の鎖長バランスを制御することにより、ナノ粒子の粒子径を制御することが可能であることから、がんへの受動的なナノ粒子の集積メカニズムである EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果が期待される粒子径が 30~50 nm のミセルをキャリアとして選択した。

(1) 血中に滞留しているナノ粒子の動態制御によるバックグラウンドシグナルの低減に基づいた高コントラストイメージングの実現

放射性ナノ粒子プローブを静注するとナノ粒子は血中に滞留しながら、EPR 効果によりがんが集積する。そこでがんに一定量のナノ粒子が集積した時点で、再度、静脈からナノ粒子のクリアランス薬を投与することにより、ナノ粒子を血液中から強制的に排除し、バックグラウンドシグナルを低減させることを計画した。

追投与するナノ粒子のクリアランス薬については、1) ナノ粒子を特異的に認識する抗ナノ粒子抗体、2) ナノ粒子を構成する両親媒性高分子鎖と相互作用することにより、ナノ粒子の形態変化を引き起こすことができる分子の開発を進めた。

例えば、ddY マウスに疎水部位がポリ乳酸、親水性部位がポリサルコシンからなる両親媒性ポリデブシペプチドから調製した高分子ミセル(ナノ粒子)を 5 mg/kg にて投与し、そのナノ粒子に対応する抗体(免疫グロブリン M, IgM) を産生させた。放射性ナノ粒子プローブを投与した別の ddY マウスにこの抗体を含む血清を追投与し、マウス体内の放射能分布の変化を臓器摘出法にて調べた (Figure 1)。

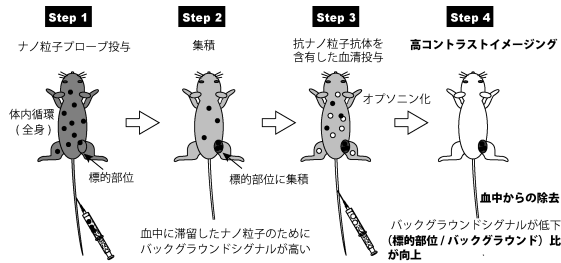


Figure 1. 抗ナノ粒子抗体を含有する血清の追投与によるバックグラウンドシグナル低減の概念図

(2) ナノ粒子の特性を活かした内照射用プローブの検討

内照射治療では一般に線放出核種が治療用核種として使用される。しかしながら、

線の飛程は数 mm 程度と比較的長いために、血液中に比較的長く滞留するナノ粒子をキャリアとした内照射治療では、全身の非特異的な被ばくが大きくなる傾向がある。そこで本研究では、飛程が短かつ線エネルギー付与が大きなオージェ電子放出核種を用いたナノ粒子型内照射治療薬剤の開発を進めた。

オージェ電子放出核種には半減期が ^{77}Br を選択し、 ^{77}Br を内包したナノ粒子の創製ならびにインビトロでの治療効果評価実験を進めた。

4. 研究成果

(1) 血中に滞留しているナノ粒子の動態制御によるバックグラウンドシグナルの低減に基づいた高コントラストイメージングの実現

ナノ粒子を構成する両親媒性高分子鎖と相互作用する分子の設計については、多くの化合物の合成と評価を行ったが、両親媒性高分子鎖の自己組織化により調製されるミセルは、熱力学的に極めて安定であり、ナノ粒子の形態変化を引き起こすことはできなかった。

抗ナノ粒子抗体を用いた、粒子の動態制御については、放射性プローブ投与の一時間後に抗体を含む血清を追投与したところ、投与量依存的に血液に含まれる放射能が低減した。また、肺や心臓など血液が多く含まれる臓器に含まれる放射能も血清投与量依存的に減少していることが確認された (Figure 2)。一方で肝臓への集積量増加が確認され、追投与した抗体によって、血中に滞留しているナノ粒子がオプソニン化され、細網内皮系細胞を介して血中から強制的に排除されたものと考えられる。

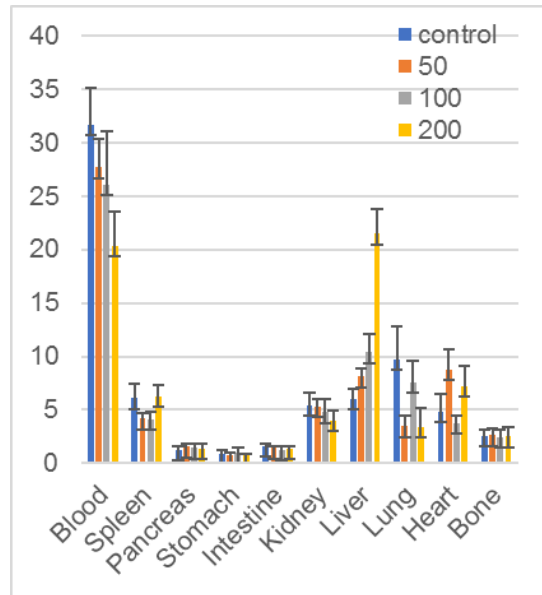


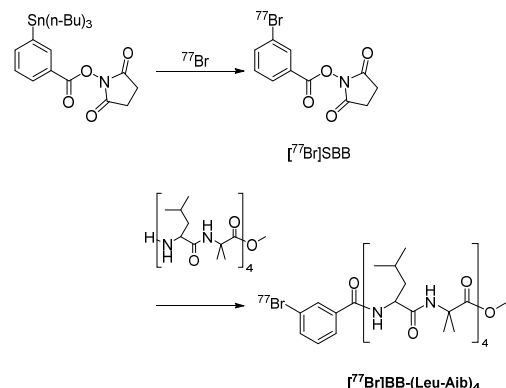
Figure 2. 抗体含有血清の追投与後の放射性ナノ粒子の体内分布

現時点では、血中に滞留しているナノ粒子の 30~40% を血液外に排出させることに成功している。血清に含まれている抗体濃度を上げることで、更なる血液由来のバックグラウンドシグナル低減を検討しており、これによりこれまで不可能であった高コントラストなイメージングが実現されるものと期待される。

(2) ナノ粒子の特性を活かした内照射用プローブの検討

オージェ電子放出核種である ^{77}Br をミセルに内包する方法について検討を行った。

サイクロトロンにて製造した ^{77}Br から Succinimidyl-4- ^{77}Br bromobenzoic acid (^{77}Br -SBB) を合成し、これを疎水性ペプチドである (Leu-Aib) の交互配列 4 量体の N 末端に修飾した (^{77}Br]BB-(Leu-Aib)₄) (Scheme 1)。 ^{77}Br]BB-(Leu-Aib)₄ をミセルを構成する両親媒性ポリデブシペプチドに混ぜることで、 ^{77}Br を内包したナノ粒子の調製を試みた。



Scheme 1

粒子化における ^{77}Br の内包効率は 90%以上と高効率であり、得られたミセルの粒子径は 35 nm 程度であった。そこでこの ^{77}Br を内包したミセルをプレート上で培養した細胞に振りかけ、その細胞障害性を調べたところ、オージェ電子の効果によってがん細胞の増殖が抑制されることが示した。

オージェ電子を用いた治療では、オージェ電子放出核種を核近傍までデリバリーすることが細胞に障害を与えるための必要条件であると考えられている。より少ない線量にて高い治療効果を得るためには、EPR 効果によってがん細胞周辺に集積したナノ粒子キャリアを細胞に内在化させ、それを核近傍に移行させる必要があると考えられ、今後、キャリアである粒子の表面修飾を行い、細胞への内在化効率を上げることを検討する計画である。

本研究ではこのほかにも、既に単剤でその細胞障害性が確認されている 5-[^{77}Br]bromo-4'-thio-2'-deoxyuridine ([^{77}Br]BTdu) の構造類自体をリポソームに内包させ、がん部位へ選択的に薬剤送達させる手法について検討を行った。

オージェ電子放出核種を用いた内照射治療において、ナノ粒子をキャリアとして薬剤をがんへのデリバリーすることが有効であると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kensuke Kurihara, Motoki Ueda, Isao Hara, Eri Hara, Kohei Sano, Akira Makino, Eiichi Ozeki, Fumihiko Yamamoto, Hideo Saji, Kaori Togashi, Shunsaku Kimura “Inflammation-induced synergetic enhancement of nanoparticle treatments with DOXIL and ^{90}Y -Lactosome for orthotopic mammary tumor” *Journal of Nanoparticle Research* 2016, 18, 137 査読有
DOI: 10.1007/s11051-016-3448-4

Akira Makino, Shunsaku Kimura “Solid Tumor-Targeting Theranostic Polymer nanoparticle in Nuclear Medicinal Fields” *The Scientific World Journal* 2014, ArticleID 424513 査読有

Akira Makino “Morphology control of molecular assemblies prepared from bio-based amphiphilic polymers with a helical hydrophobic unit and application as nanocarriers for contrast agents and/or drug delivery” *Polymer Journal* 2014, 46, 783-791 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

牧野 顕、岡沢秀彦、清野 泰 「ナノ粒子をキャリアとしたイメージングプローブによる高コントラストイメージングのための基礎検討」第 12 回日本分子イメージング学会学術集会 2017 年 5 月 26 日 大さん橋ホール (神奈川県横浜市)

牧野 顕、岡沢秀彦、清野 泰 「高分子ミセルプローブによる高コントラストイメージング法の開発」日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月 24 日 仙台国際センター (宮城県仙台市)

Akira Makino, Ayaka Tomoike, Masahiro Ono, Yasushi Kiyono, Hidehiko Okazawa, Hideo Saji “Evaluation of in vivo dynamics of the polymeric micelle by using two different radioisotope modification approaches” Ninth Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry 2015 年 11 月 9 日 放射線医科学研究所 (千葉県千葉市)

牧野 顕、鹿沼俊樹、坂下広幸、浅井竜哉、岡沢秀彦、清野 泰 「オージェ電子を用いたナノ粒子型内照射治療薬剤に関する基礎検討」第 54 回日本核医学会学術総会 2014 年 11 月 6 日 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

牧野 顕、清野 泰、岡沢秀彦 「ナノ粒子の特性を活かした分子プローブの創製」第 3 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会 2014 年 10 月 14 日 港のホテル (福井県坂井市)

牧野 顕 「ポジトロン断層撮影法 (PET) のための ^{18}F 標識分子プローブの開発について」平成 26 年度有機合成化学北陸セミナー 2014 年 10 月 4 日 福井大学 (福井県福井市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.u-fukui.ac.jp/birc/index02.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 顕 (MAKINO, Akira)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授

研究者番号: 00566226

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし