

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 3 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860991

研究課題名(和文)熱応答凝集性ポリマーを基盤とする新規内用放射線治療法の開発

研究課題名(英文)Brachytherapy using radiolabeled thermo-responsive polymers that self-aggregate in tumor tissues

研究代表者

佐野 紘平 (Sano, Kohei)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00546476

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)：本研究は、熱応答凝集性ポリマーを用いる新規内用放射線治療法の開発を目的として、熱により凝集するポリオキサゾリン誘導体およびその放射標識体を合成し、それらの熱応答性を評価するとともに、担がんマウスにおける生体内組織分布評価実験を実施した。その結果、側鎖にエチル基およびイソプロピル基を持つヘテロポリオキサゾリン(約20 kDa)は、凝集温度が39℃であり、瞬時に凝集することを示した。また、Colon26細胞を移植した担がんマウスにおいて、腫瘍へは一定の集積を認めた一方で、正常組織からは速やかにクリアランスされることを示した。今後は加温による腫瘍集積性の変化について詳細に検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish a novel internal radiotherapy using thermo-responsive polymers under mild hyperthermia. We newly designed and synthesized non-radiolabeled and radiolabeled polyoxazoline (POZ) derivatives, and evaluated the physicochemical property and in vivo biodistribution in colon26 tumor-bearing mice. We demonstrated that POZ with ethyl and isopropyl groups in side chains (Et-Isp-POZ) had a transition temperature of 39℃ and showed rapid aggregation. Moreover, In-111-labeled Et-Isp-POZ demonstrated a modest tumor uptake and a rapid clearance from normal tissues in tumor-bearing mice. In the future, we will investigate the tumor uptake of In-111-labeled Et-Isp-POZ under mild hyperthermia.

研究分野：医歯薬学

キーワード：放射性医薬品・造影剤

1. 研究開始当初の背景

腫瘍に細胞殺傷性の強い β 線放出核種やオージェ電子を集めることが出来れば、その放射線が到達する範囲内で、腫瘍細胞を直接死滅させる内用放射線治療が可能となる。内用療法は、病巣への選択的なプローブ送達に認められた場合、単回投与で長期に亘り効果が持続するため、患者のQOLの向上に繋がるがん治療の新たな選択肢となる可能性が期待されている。我が国においても、 Na^{131}I を用いる甲状腺がんの治療や $^{89}\text{SrCl}_2$ による(多発性)骨転移がんの疼痛緩和に関して、治療法としての有用性が認識されている。さらに最近では、ゼヴァリンなどの抗体をプラットフォームとして、ピュア β 線放出核種であるイットリウム-90 (^{90}Y) をがんへ送達させる例が数多く報告されている。この手法はミサイル療法とも呼ばれ、特にリンパ腫などにおける高い抗腫瘍効果が達成されている。しかしながら、一方で、長期間に亘る血中放射能の残存、骨髄への ^{90}Y の被曝、肝臓への抗体の生理的な集積により、血液毒性(白血球や血小板の減少)などの重篤な副作用も数多く報告されている。

内用放射線治療剤には、イメージングを目的とするインビボ放射性薬剤の場合よりも遥かに厳密な生体内動態・分布特異性が求められるがゆえに、容易にはその成果が得られにくく、本分野の創薬研究は世界的にも遅々として進展していない。それだけに、インビボにて選択的に放射能の送達・集積を達成しうる手法が強く求められている。

2. 研究の目的

上記の背景の下、申請者は、比較的速やかに体内よりクリアランスされるプローブを基盤とし、トリガー(熱)を利用して、プローブを腫瘍特異的に凝集、滞留させることにより、高い治療効果と副作用の低減を同時に実現可能な新たな内用療法の確立を目指した。

トリガーとなる加温システムとしては、温熱療法(Hyperthermia)の利用を考えた。温熱療法は、正常組織と比べて、腫瘍細胞の熱に対する脆弱性を利用するものであり、手法は臨床現場においても十分に確立されている。一方、ポリオキサゾリン誘導体が熱処理により凝集する報告がなされた(*Macromol Biosci.* **10**:916-824 (2010))。オキサゾリン誘導体の構造ごとに凝集温度が異なり、種々の構造のオキサゾリン誘導体を組み合わせることで、緻密な温度コントロールのもとで凝集化を引き起こすことが可能である。

そこで本研究課題では、まず、ポリオキサゾリン誘導体の熱応答凝集性に関する調査を行う。温熱療法にて達成しうる温度を考慮に入れて、およそ38~40°Cにて凝集する組成を見出す。次に、プローブの体内動態を把握する目的で、ポリオキサゾリン誘導体の末

端を γ 線放出(金属)核種にて標識したプローブを合成し、定量的な評価を実施する。温熱療法併用下での腫瘍集積性については、厳密な温度依存性を調査するとともに、治療効果の持続性を把握するためにプローブの腫瘍内滞留について時間依存性を評価する。さらに、 ^{90}Y 標識ポリオキサゾリン誘導体を用いる新規内用放射線療法として、がん治療の可能性を追求する。最終的に臨床応用が目標であるが、製剤の製法確立を含む前臨床段階までを本研究範囲内における目標とした。

3. 研究の方法

(1) ポリオキサゾリン誘導体の合成

ポリオキサゾリンは、無水アセトニトリル中にてオキサゾリンモノマーを用いた活性カチオン開環重合を行うことにより合成した。以下に、代表例として、Poly(2-ethyl-2-oxazoline)の合成方法を示した。

p-トルエンスルホン酸メチル(1 eq)を開始剤として、無水アセトニトリル中にて2-Ethyl-2-oxazoline(400 eq)と混和した後、重合反応を実施した。重合反応はマイクロウェーブを用いて140、14分の条件のもと行った。その後、溶媒溜去し、一晚乾燥させた。

なお、側鎖にエチル基、イソプロピル基、プロピル基を有するポリオキサゾリンを合成した。得られたポリマーの分子量はゲル浸透クロマトグラフィー法により測定した。

(2) 凝集温度の測定

ポリオキサゾリンの凝集温度は、サンプルをPBS(-)に溶解させた後、温度変化に伴う分子径の変化をZetasizer Nano-ZS(Malvern)を用いて調べることにより測定した。

(3) 標識前駆体合成および ^{111}In 標識反応

(1)で合成したポリオキサゾリンとエチレンジアミンを混和し、マイクロウェーブを用いて140、7分間加熱した。溶媒溜去し、メタノール透析を行うことで、Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-ethylenediamine

(EtPOZ-EDA)を得た。さらに、メタノール中、キレート剤であるp-SCN-Bn-DOTAと混和し、室温で1.5日反応させた。未反応のDOTAは限外濾過フィルター(Amicon Ultra 4(3 kDa))およびサイズ排除PD-10カラムを用いて精製し、EtPOZ-EDA-DOTAを得た。続いて、この標識前駆体に ^{111}In -acetateを加え、室温で10分間反応した。その後、過剰量のEDTAを加えて限外濾過フィルターあるいはサイズ排除カラムを用いて精製した。放射化学的純度はサイズ排除PD-10カラムを用いて算出した。

(4) 体内分布実験

担がんマウスは Balb/c ノードマウスに Colon26 細胞を移植することにより作製した。正常マウスあるいは移植 7 日後の担がんマウスに (3) で合成した ¹¹¹In 標識体を静脈内より投与し、1、6、24 時間後に麻酔下にて安楽死させた。血液、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、腸、膵臓、脾臓、筋肉、腫瘍を摘出し、それぞれの湿重量測定、γカウンタによる放射能測定を行った。実験期間中、水・餌は自由に与えた。放射能集積は、組織 1g あたりの投与量に対する割合 %ID/g (%injected dose/g) と、組織あたりの投与量に対する割合 %ID/organ として算出した。

4. 研究成果

(1、2、3) ポリオキサゾリン誘導体および ¹¹¹In 標識体の合成およびその特性評価

およそ 20kDa の分子量を持つ POZ を合成した。凝集温度を測定した結果、オキサゾリンの側鎖の組成によって、その温度を調節することができることを示した。Et-POZ が体温以上、Et-Isp-POZ が体温以上かつ温熱療法適用範囲以下、Isp-POZ が体温付近、Pr-POZ が体温以下の凝集温度を持つことを確認した。また、それぞれの ¹¹¹In 標識体について、放射化学的収率 (RCY) は 43-58%、放射化学的純度 (RCP) は 99% 以上であった。

Table 1. 各ポリマーおよび ¹¹¹In 標識体の特性評価

	Et-POZ	Et-Isp-POZ	Isp-POZ	Pr-POZ
Tt ¹	>70°C	39°C	34°C	19°C
RCY ²	52%	43%	58%	50%
RCP ³	>99%	>99%	>99%	>99%

¹Tt: Transient temperature

²RCY: Radiochemical yield

³RCP: Radiochemical purity

(4) 体内分布実験

各標識体を正常マウスの尾静脈より投与し、経時的に各臓器での放射能を測定することにより、各ポリマーの生体内分布を評価した。(Fig. 1~4) (青: 1、赤: 6、緑: 24 時間)

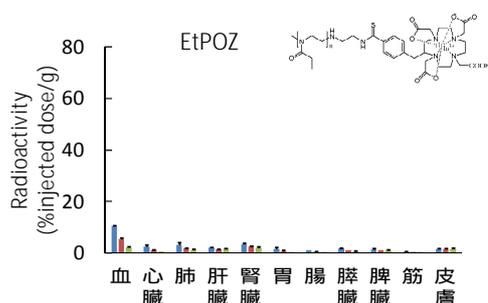


Fig. 1 Et-POZ の体内分布評価

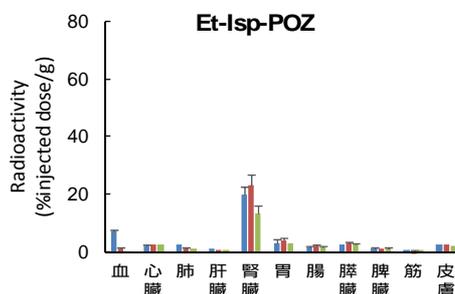


Fig. 2 Et-Isp-POZ の体内分布評価

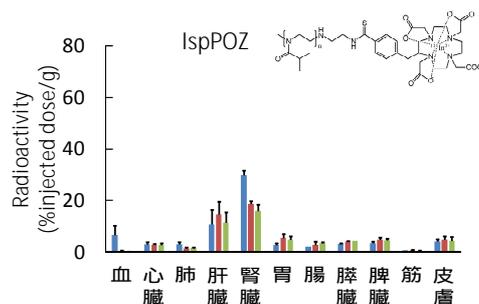


Fig. 3 Isp-POZ の体内分布評価

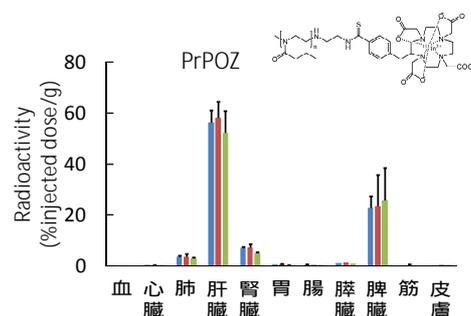


Fig. 4 Pr-POZ の体内分布評価

体温以上の凝集温度を有する Et-POZ (Tt: >70) は、全身から速やかにクリアランスされ、顕著な正常組織への分布を示さなかった。同様に、Et-Isp-POZ (Tt: 39) も全身から速やかに消失したが、腎臓で比較的高い集積を認めた。これは分子構造中にイソプロピル基を有することに起因するものだと示唆された。一方、体温以下の凝集温度を持つ Pr-POZ (Tt: 19) は、高分子薬剤(あるいは凝集した高分子)が集積する傾向の高い肝臓や脾臓に高い集積を認めたことから、生体内での Pr-POZ の凝集が示唆された。体温付近の凝集温度を持つ Isp-POZ (Tt: 34) は、比較的速やかに全身から消失したが、腎臓および肝臓への集積を認めた。

続いて、温熱療法と併用して利用する予定の Et-Isp-POZ に関して、腫瘍組織への集積を評価した結果、投与 1 時間後に 2.6±0.2%ID/g、6 時間後に 3.9±0.7%ID/g、24 時間後に 2.7±1.9%ID/g の集積を認めた。

以上の結果より、Et-Isp-POZ は温熱療法の条件下で速やかに凝集することをインビトロにおいて明らかにした。また、インビボにおいては、正常時には体内から速やかにクリアランスされることを示した。本検討に関しては、分子量が 20kDa 程度のプローブを使用した。今後は他の分子量も含めて検討し、加温による腫瘍集積性の変化について詳細に検討していく予定である。また、既に ^{90}Y 標識体の合成法も確立していることから、高い腫瘍集積性が認められた条件で、治療実験を進めていく予定である。

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)

[学会発表](計3件)

日本薬学会第 136 年会(2016 年 3 月、横浜)
金田 侑子、佐野 紘平、金崎 健吾、丁 寧、大橋 愛美、出口 諄、小野 正博、佐治 英郎
熱応答凝集性ポリマーを基盤とする小線源療法用薬剤の開発

第 55 回日本核医学会(2015 年 11 月、東京)
佐野 紘平、金田 侑子、金崎 健吾、丁 寧、大橋 愛美、出口 諄、小野 正博、佐治 英郎
熱応答凝集性ポリマー型放射性薬剤を用いる小線源療法の開発研究

第 25 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(2015 年 5 月、長崎)
金田 侑子、佐野 紘平、金崎 健吾、丁 寧、大橋 愛美、出口 諄、小野 正博、佐治 英郎
Brachytherapy using injectable and thermo-responsive polymers labeled with radiometal that are self-aggregate in tumor tissues

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/byotai>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 紘平 (SANO, Kohei)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・

助教

研究者番号：00546476