

平成 22年 5月 19日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700391

研究課題名 (和文) 腫瘍選択的高分子ミセル MRI 造影剤

研究課題名 (英文) Polymeric micelle MRI contrast agent for tumor imaging

研究代表者

白石 貢一 (SHIRAIISHI KOUICHI)

財団法人神奈川科学技術アカデミー・重点研究室光触媒グループ・研究員

研究者番号：40426284

研究成果の概要 (和文)：

本研究の目的は、MRI 造影剤を疎水・親水の 2 層構造を有する「高分子ミセル」の内殻に内包し、画像強調能力を固形がんにおいて発揮させ、微小ながん組織を選択的に強調できる新規 MRI 造影剤を開発することである。*In vitro* において、目的とする MRI 造影剤の作製を達成し、MRI 造影効果の制御が可能であることを示した。また、*in vivo* においては固形がんへのターゲティングを達成し、MRI によって画像強度の増加が認められ、本 MRI 造影剤が固形がんのイメージングに応用できることが示唆された。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学/生体材料学

キーワード：MRI 造影剤、高分子ミセル、DDS、固形がんのイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

がん (悪性新生物) は日本人の死亡原因の 3 割を占める大きな疾患であり、がん治療には早期発見が最重要であることは言うまでもない。がん診断におけるモダリティの一つに MRI (Magnetic Resonance Imaging、磁気共鳴画像)がある。放射線被曝がないという大きな特徴をもつとともに、病変部位の形態情報を得るには有効な手法とされている。2003 年にアメリカがん治療学会(ASCO)において、乳がんに対して最適な検診は MRI であることを報告している。これは、MRI の拡散強調画像法によって検出される手法である。

一方で、MRI を用いた診断方法で発見できる固形がんのサイズは 1cm 程度が限界であ

り、早期発見のための十分な技術が確立されていないのが現状である。この現状を打破するために、診断薬である MRI 造影剤を用いて固形がんの選択的な画像化が達成されると、これまで診断できなかったような小さな固形がんまで画像化でき、すなわち早期診断につながる技術となる。

MRI 造影剤は投与直後に、その場で速やかに拡散し、拡散された造影剤が血管内の画像を強調できる診断薬として MRAngiography のために用いられてきた。近年、脂溶性部位が造影剤に導入され、正常肝臓細胞に取り込まれることで、取りこまれないことを利用してがん組織を識別する EOB プリモビストが認可され、市販されている。この EOB プリ

モビストは正常細胞に造影剤を貪食させて、貪食されない（機能が働かない）がん細胞との相違を確認する方法である。しかしながら、MRI 造影剤は重金属イオンであることを考慮すると、より安全に固形がんを認識、画像化するためにはがん細胞内を利用するよりも、がん組織を利用して画像化することに利点があると考えられる。

固形がん選択的に認識できる MRI 造影剤の問題点は以下のように考えられる。

- ① がん組織や病変部を特異的に強調させる造影剤がない
- ② 血中半減期が短く、腫瘍へ集積する前に排出されてしまう

”Molecular Imaging”のストラテジーには Amplification Strategy (造影効果の増幅)が必要であるとハーバード大学 R.Weissleder 教授らは考えており、すでにいくつかの研究例が報告されている。現状では、この増幅効果を有する MRI 造影剤の研究例は上記に記したグループやモデル研究を含めて欧米に数グループしかない。

その背景の中で、本研究の特徴は以下のように挙げられる。

- ① 臨床開発中の抗がん剤キャリアーである高分子ミセルを用いてデリバリーを行えること
- ② 高分子ミセル(会合体)の会合-解離を利用する

上記に挙げた2つの点から空間的・時間的な制御によってその造影効果（緩和能）を変化させることができる。

MRI 造影剤中の磁性イオンであるガドリニウムイオンが周囲の水分子との相互作用によってスピン-格子緩和時間 ( $T_1$ ) を短くすることに着目し、親水・疎水の明確な2層構造を持つ高分子ミセルの内殻に MRI 造影剤を内包することで造影効果を制御できる（低下させる）ことを提案した。

つまり、MRI 造影剤を固形がんターゲットにするまでの間は造影効果を最小限に抑えることで血管のバックグラウンドを低くし、高分子ミセルが固形がん組織に集積後に解離し始めることで造影効果が発揮され画像化できる新しい MRI 造影剤である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ブロックコポリマーが形成するナノレベルの集合体であり、疎水性内殻、親水性外殻の明確な2層構造を有する「高分子ミセル」に着目し、MRI 造影剤を高分子ミセルの内殻に一時的に内包し、画像強調能力を抑えることによって、がん組織で高分子ミセルが解離した際に画像強調能力が現れ、固形がんを強調できる新しい MRI 造影剤を開発し、2-3mm の微小ながん組織を選択的に強調し発見することを目的とする。

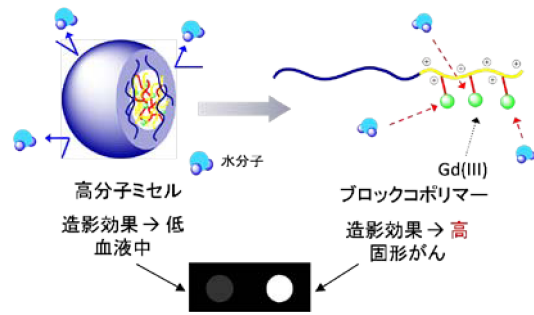
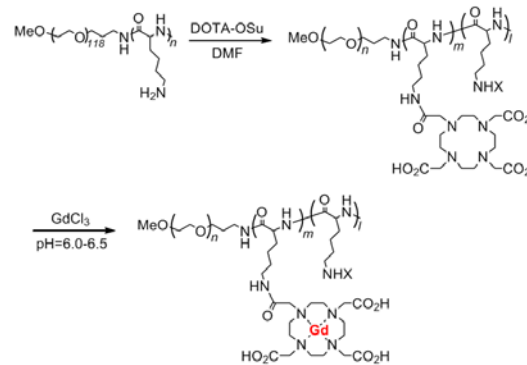


図1 固形がん選択的高分子ミセル MRI 造影剤の概念図

## 3. 研究の方法

### 3. 1. 高分子の合成

既知の分子量をもつ PEG-NH<sub>2</sub> をアニオン重合開始剤として異なるリシン(Lys)鎖長を有するブロックコポリマー (PEG-P(Lys(Z))) を合成を行い、脱保護をした後に PEG-*b*-P(Lys)を得た。側鎖のリシン残基のアミノ基に対して、種々の導入率で DOTA 誘導体を導入した。得られたブロックコポリマーに対して塩化ガドリニウム(GdCl<sub>3</sub>)を反応させ、ガドリニウムイオンを配位したブロックコポリマーを得た(スキーム 1)。



スキーム 1

### 3. 2. ブロックコポリマーの緩和能 ( $r_1$ )

合成したブロックコポリマーの縦緩和時間( $T_1$ )を磁場強度 9.4T(400MHz)のもと、反転回復法を用いて測定し、緩和能( $r_1$ )を求めた

### 3. 3. 高分子ミセル形成と緩和能

PEG-P(Lys-DOTA-Gd)は DOTA 基の導入量により、その性質が二分される。スキーム 2 の X=H の正電荷を有するブロックコポリマーを用いてポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルを形成させた。

#### 3. 3. 1. ポリメタクリル酸との PIC ミセルの形成挙動と緩和能

ポリメタクリル酸をポリアニオンをとして用いて PIC ミセルを作製し、その緩和能を PIC ミセルの形成前後と比較した。作製される PIC ミセルの粒子径及び緩和能の関係をアニオン/カチオン比の関係から検討した。

### 3. 3. 2. ポリアリルアミンとの PIC ミセルの形成挙動と緩和能

ポリアリルアミンをポリカチオンをとして用い、PIC ミセルを作製した。その緩和能を PIC ミセルの形成前後と比較した。

### 3. 3. 3. 疎水性の置換基の効果による緩和能の変化

正荷電を有する PEG-P(Lys-DOTA-Gd)に対して PEG-ポリアスパラギン酸 (PEG-P(Asp)) をカウンターアニオンとし、アスパラギン酸鎖に疎水性基であるベンジル基を種々の割合で導入した PEG-ポリアスパラギン酸ベンジルを用いて疎水性の効果と緩和能の関係を検討した。

### 3. 4. PIC ミセルの *in vivo* 評価

正電荷を有するブロックコポリマーに対して生体親和性のあるデキストラン硫酸 (分子量=8,000 を Dex8k、分子量=500,000 を Dex500k とそれぞれ略記) を用いて PIC ミセル形成をさせ、0.05 mmol Gd/kg の投与量でマウス尾静脈より投与した際の血中動態を評価した。同様にがんマウス(Colon26)を作製し、高分子ミセル MRI 造影剤の体内分布、腫瘍集積性の評価を行った。

## 4. 研究成果

### 4. 1. 高分子の合成とその緩和能

PEG 鎖の分子量 5000 に対して、PLys 鎖長と DOTA 基の導入率の変化は緩和能にほとんど影響を与えなかった。ただし、低分子 MRI 造影剤である Gd-DTPA と比較して、この磁場において 2 倍ほど高い緩和能を与えた。これは、高分子の緩和能は周囲の水分子の環境とともに、高分子の運動性に強く依存する高分子水和効果のためである。高分子近傍の水分子が高分子へ結合水の形をとり、その運動性が低分子 Gd-DTPA と比較して制限される高分子水和効果によって、予想通り緩和能の向上が認められた。(表 1)

表 1 ブロックコポリマーの緩和能 (9.4T)

	PEG /( $\times 10^3$ )	Lys /個	DOTA /個	Gd /個	$r_1$ / $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
1	5	23	7	7	5.6
2	5	23	23	7	6.2
3	5	65	10	9	6.1
4	12	19	10	8	7.1
5	GdDTPA				3.7

PEG 鎖の影響は緩和能に顕著に現れた。PEG 鎖の分子量 12000 と長くなることで、PEG 鎖の分子量 5000 を用いた場合よりも水への溶解性 (親和性) がよくなることによって、緩和時間が短縮されたと考えられる。

### 4. 2. ポリオンコンプレックス(PIC)ミセルの形成とその緩和能

#### 4. 2. 1. ポリメタクリル酸との PIC ミセルの形成挙動と緩和能

ポリメタクリル酸との PIC ミセルの形成挙動と緩和能を図 2 に示す。アニオン/カチオン比が 1/1 の際に、PIC ミセルの粒子径は最小値を与えるが、逆にその緩和能はアニオン/カチオン比が 1 よりもそれ以上でより低くなった。

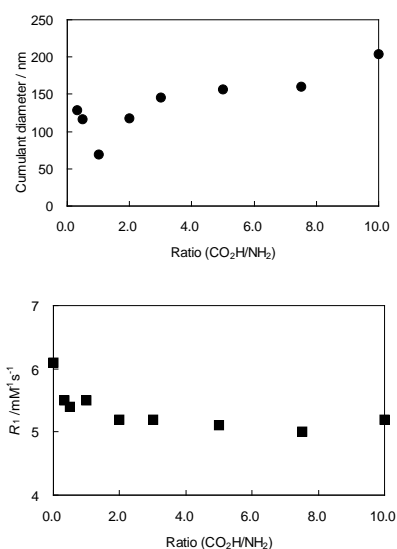


図 2 アニオン/カチオン比の変化による粒子径の変化 (A) と緩和能の変化 (B)

この粒子径の変化は過剰な荷電を保持することで凝集を引き起こすことを示している。緩和能についてはそれほど大きな変化ではないが、過剰な荷電によって緩和能が減少する傾向が得られた。多点のイオンコンプレックスを形成させ高分子ミセルを作製する本方法では、過剰な荷電を有する PIC ミセルが反対の荷電を有するポリマーによってさらなる凝集が形成されることは容易に考えられる。それに対応して、緩和能も大きな凝集構造のほうがより疎水性が高い、つまり水との相互作用が起こりにくいことが原因と考えられる。

次に、この PIC ミセル形成の緩和能変化を MRI によって画像化した。その結果を図 3 に示す。同じ濃度の Gd 水溶液 (0.25mM) の Gd-DTPA、ブロックコポリマー、デキストラン硫酸との PIC ミセル (CO<sub>2</sub>H/NH<sub>2</sub>=2/1)、ポリメタクリル酸との PIC ミセル (CO<sub>2</sub>H/NH<sub>2</sub>=2/1)

の9.4Tの磁場におけるT1強調画像を以下に示した。比較として、低分子のGd-DTPAを測定した。予想通り、ブロックコポリマーのMRIから得られる。

画像はGd-DTPAの画像と比較して画像強度が高くなっているが、PICミセル形成後は、

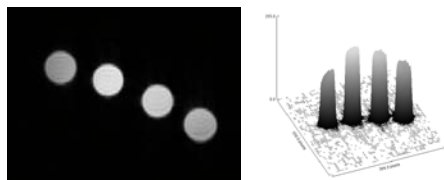


図3(a) *in vitro*におけるMRIのT1強調画像(左)Axial画像(右)シグナル強度のグラフ(左から右)Gd-DTPA, カチオン性ブロックコポリマー、デキストラン硫酸とのPICミセル、ポリメタクリル酸とのPICミセル Gd(III)=0.25mM、9.4T

この測定法においてそれらの画像強度が落ちていることが分かった。この差が図2で示したポリメタクリル酸とのPICミセル形成による緩和能の減少をMRIでも示したことになる。さらに、表1のブロックコポリマー2は、アニオン性を有しており、対ポリカチオンオンとしてポリアリルアミンの添加によってPICミセルを形成した。このときのMRI(9.4T)におけるT1強調画像を図3(b)に示した。

その結果、PICミセル形成によって緩和能は $6.2\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ から $3.8\text{s}^{-1}$ まで下がった。この減少率はおおよそもとの40%程度まで下がったことになる。カチオン性ブロックコポリマーの減少率が~20%程度までに留まったのに対して、このPICミセル形成はさらに緩和能の減少が認められた。それにより、MRIから得られたT1強調画像についてもGd-DTPAとほぼ同様の画像強度まで低下した。*in vitro*の系において、高分子ミセルMRI造影剤の概念である、高分子ミセル形成前後にMRIの画像強度の差を表すことに成功した。

#### 4. 2. 2. 疎水性の置換基の効果による緩和能の変化

正荷電を有するPEG-P(Lys-DOTA-Gd)に対してPEG-ポリアスパラギン酸(PEG-P(Asp))をカウンターアニオンとし、かつアスパラギン酸鎖に疎水性基であるベンジル基を種々の割合で導入し、疎水性の効果と緩和能の関係を検討した。その結果を図4に示す。

PEG-P(Asp)鎖のアスパラギン酸鎖の長さをユニット数22と44の2種類を用いて検討した結果、興味深い結果を示した。9.4Tにおいて、予想通りベンジル修飾化率が高く疎水性効果で緩和能が下がるとともに、疎水性基を低い割合で導入したPICミセルの緩和能も同時に下がった(図4)。

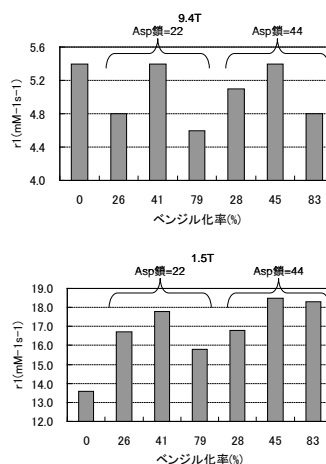


図4 正荷電を有するPEG-P(Lys-DOTA-Gd)と異なるベンジル置換率を有するPEG-P(Asp-Bzl)からのPICミセルMRI造影剤の(左)9.4Tと(右)1.5Tのr1変化(pH=7.1-7.4)

ポリアスパラギン酸鎖へ高い疎水性基の導入により疎水性相互作用によって高分子ミセルが形成され、緩和能が減少した(Asp=22のベンジル化率79%、Asp=44のベンジル化率83%)、一方でポリアスパラギン酸鎖へ低い疎水性基の導入はポリイオンコンプレックス(PIC)により高分子ミセルが形成される。この効果によっても緩和能が減少した。(Asp=22のベンジル化率26%、Asp=44のベンジル化率28%)。

1.5Tの磁場のもとでは、疎水性の効果よりも分子の大きさによる効果が顕著に現れたといえる。つまり、高分子ミセル形成によってもとのポリマーよりも緩和能はより大きくなった(図4(下))。

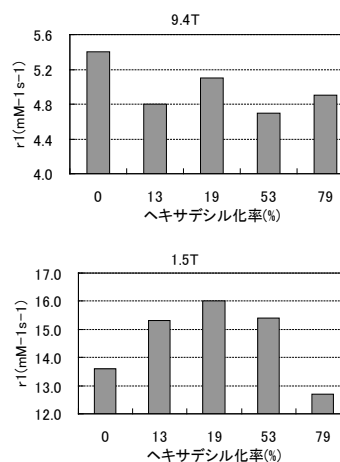


図5 正荷電を有するPEG-P(Lys-DOTA-Gd)と異なるヘキサデシル置換率を有するPEG-P(Asp-hexadecyl)からのPICミセルMRI造影剤の(左)9.4Tと(右)1.5Tのr1変化(pH=7.1-7.4)



この条件の下で、ポリアスパラギン酸鎖が短く(Asp=22)、かつ疎水性置換基を低く導入すること(Bzl 基=26%)によって緩和能が 9.4T 及び 1.5T において低くなったことから、より高い疎水性基を低導入率で導入し、PIC ミセルの形成を行った。

高分子ミセルの形成と低い導入率で高い疎水性を示すと考えられる長鎖アルキル基であるヘキサデシル基(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)をベンジル基の代わりに導入し、同様の実験を行った(図 5)。ベンジル化した際と同様に低導入率のときと高導入率のときに緩和能が下がる傾向が得られたが、期待されたほどの減少は見られず、上述したベンジル基を導入した PEG-P(Asp)と同程度の緩和能を与えた。

#### 4. 3. PIC ミセルの *in vivo* 評価

正電荷を有するブロックコポリマーに対してデキストラン硫酸(Dex8k, Dex500k)を用いて PIC ミセル形成をさせ、0.05 mmol Gd/kg の投与量でマウス尾静脈より投与した際の血中動態の結果を図 6 に示す。

同様に坦がんマウス(Colon26)を作製し、高分子ミセル MRI 造影剤の体内分布、腫瘍集積性の評価を行った。

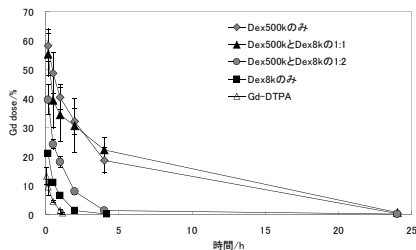


図 6 正電荷を有する PEG-P(Lys-DOTA-Gd) と異なる分子量のデキストラン硫酸からなる PIC ミセル MRI 造影剤の血中濃度評価 Dex500kのみ(◆)、Dex500k と Dex8k の 1:1(▲)、Dex500k と Dex8k の 1:2(●)、と Gd-DTPA(△) の血中濃度変化 投与量は PIC ミセル 0.05mmolGd/kg または Gd-DTPA 0.10 mmol Gd/kg (n=3. Mean±SD).

Gd-DTPA と比較して顕著な血中循環の延長が確認された(図 6)。正電荷を有する高分子の場合には投与後に顕著な急性毒性を示すことが知られているが、PIC ミセルの形成によって急性毒性が軽減された。また、分子量の異なるデキストラン硫酸の混合比によって体内分布、腫瘍集積性にも影響を与えた。Dex500k と Dex8k の混合比が 1(Dex500k/Dex8k=1)のときに腫瘍集積性が高く、かつ腎臓からの排出性、肝臓への低い蓄積性が観測された。Dex500k と Dex8k の混合比が 1 以下であると、腎臓から排出し易いが

血中滞留性が落ち腫瘍への集積性が低く、また Dex500k と Dex8k との混合比が 1 以上であると腎臓から排出しにくく肝臓・脾臓への蓄積が顕著に高かった(図 7)。

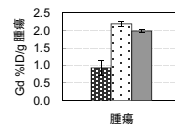
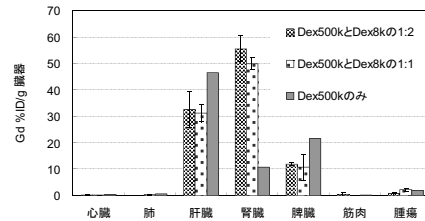


図 7 正電荷を有する PEG-P(Lys-DOTA-Gd) と異なる分子量のデキストラン硫酸からなる PIC ミセル MRI 造影剤の体内分布評価 腫瘍集積量の拡大図(左)

投与量は PIC ミセル 0.05mmolGd/kg, n=3. Mean±STD.

血中動態及び体内分布(腫瘍集積性)が最もよかった Dex8k/Dex500k=1/1 の比から形成される PIC ミセル MRI 造影剤の腫瘍画像を図 8 に示す。MRI は 9.4T 小動物用 MRI を用いて行い、造影剤投与前を Pre とし、造影剤投与後に画像を取得し、比較した。

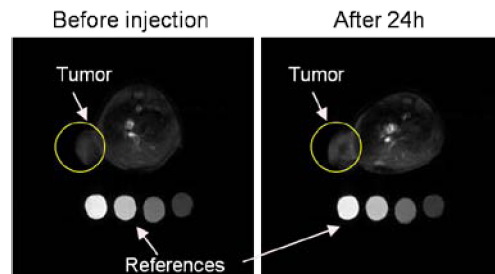


図 8 PEG-P(Lys-DOTA-Gd) とデキストラン硫酸からなる PIC ミセル MRI 造影剤の腫瘍集積性の MRI 評価 投与量は PIC ミセル 0.05mmolGd/kg CDF<sub>1</sub>(female) (colon26, Volume = ~100mm<sup>3</sup>), Parameters: Gradient echo TR/TE=8.0/4.5, matrix=192x192, FOV=4.5x4.5 cm.

腫瘍における画像強度は PIC ミセル MRI 造影剤の集積によって投与後 24 時間において、画像強度の増加が認められた。しかしながら、劇的な画像変化は得られなかった。このことは、以下の理由に起因する。

- ① PIC ミセルは解離することで造影能を発揮するため、固形がんへ集積した PIC ミセル MRI 造影剤が解離しているかどうかの検討が今後必要になる。
- ② 造影剤の固形がんへのターゲティングが

現段階では十分高いとは言えず、さらにターゲティング効率を上げることでより高い造影効果を期待できる。

ことが理由としてあげられる。

これまで MRI 造影剤を含む診断薬の固形がんへのターゲティングにおいて、定量的に十分高く成功した例は非常に少ない。これは、高分子などを用いたナノ粒子の作製は構造、長さ、性質を制御することによって初めて達成されるためである。本研究はその達成に向けて固形がんへのターゲティングの成功と MRI による画像化に成功した。しかしながら、本研究のコンセプトである固形がんのみで画像化できるに対しては、*in vitro* において確認することができたが、*in vivo* においては今後のさらなる検討が必要である。特に *in vitro* におけるより詳細な検討、安定性の制御などを確認し、*in vivo* 実験につなげ、*in vivo* においてどのように高分子ミセルが解離していくかを検討することができれば、非常に高いインパクトを与えることが予想できると考えられる。

#### 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. K. Shiraishi, K. Kawano, T. Minowa, Y. Maitani, M. Yokoyama, Preparation and *in vivo* imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents, J. Controlled Release, 査読有、136 巻、2009、14-20.
2. H. Ma, K. Shiraishi, K. Kawano, Y. Maitani, and M. Yokoyama, Accelerated Blood Clearance Was Not Induced for a Gadolinium-Containing PEG-poly(L-lysine)-Based Polymeric Micelle in Mice. Pharmaceutical Research, 査読有、27 巻、2010、296-302.

[学会発表] (計 4 件)

1. 白石貢一ほか、腫瘍イメージングを目指した高分子ミセル型MRI造影剤の開発、第3回日本分子イメージング学会、埼玉県大宮、2008年5月
2. 白石貢一ほか、*In vivo* tumor targeting and imaging of PEG-based polymeric micelle MRI contrast agent, World Molecular Imaging Congress、2008年9月、Nice(France)
3. 白石貢一ほか、腫瘍血流遮断薬による変性領域形成と高分子ミセル集積挙動のMRIによる観察、第26回日本DDS学会、2009年6月、東京
4. 白石貢一ほか、ポリエチレングリコール

ーポリリシンからなる高分子ミセルのMRI 造影剤への展開、第58回高分子討論会、2009年9月、熊本

[図書] (計 3 件)

1. 白石貢一ほか、医学館、DrugDeliverySystem、2008年、33-39
2. 白石貢一ほか、CMC出版、次世代医療のための高分子材料工学、2008年、
3. 白石貢一、医学館、DrugDeliverySystem、2009年、74-75

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

白石 貢一 (SHIRAISHI KOUICHI)  
財団法人神奈川科学技術アカデミー・常勤  
研究員  
研究者番号：40426284