

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591821

研究課題名(和文) ナノキャリア「ラクトソーム」を利用した放射性分子イメージングプローブの開発

研究課題名(英文) Development of nuclear medicinal molecular imaging probe using nanocarrier "Lactosome"

研究代表者

山本 文彦 (YAMAMOTO, FUMIHIKO)

東北薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40253471

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)：数十～200nmの粒子径を持つ血中のナノキャリアはEPR効果によって腫瘍集積性を示すことから、シグナル剤で標識したナノキャリアは、腫瘍を標的とした分子イメージングプローブの基材として期待される。我々はこれまでに新規ナノキャリア「ラクトソーム」の<sup>18</sup>F標識体などを開発し小動物PETによる腫瘍イメージングにも成功したが、一方でクリアランスが遅い、ABC現象を発現するなどの問題点も明らかにした。本研究では、SPECTイメージング剤としての開発も視野に入れ、様々なラクトソームの放射性ヨウ素標識体の開発の検討、ならびに問題点解決や有用性を探る目的でラクトソームのさらなる特性の探索を検討したので報告する。

研究成果の概要(英文)：Nanoparticles in the blood stream with diameters from a few tens of nm to 200 nm are expected to accumulate in solid tumors due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect. We focus on and have developed micelles composed of amphiphilic polymer "Lactosome" for cancer imaging probes, as a novel nanocarrier which possesses a tumor accumulation property due to the EPR effect. We reported previously radiosynthesis and a successful in vivo imaging of mouse tumor of <sup>18</sup>F-labeled Lactosome as the preliminary study with using small animal PET. In this study, in order to elucidation further characteristics of Lactosomes with aim of developing radiotracers for in vivo solid tumor imaging by SPECT, some kind of radioiodine-labeled Lactosomes were synthesized and evaluated in tumor or inflammation model mice.

研究分野：放射性薬品化学、分子イメージング薬学

キーワード：分子イメージング 腫瘍 PET SPECT 放射性標識

### 1. 研究開始当初の背景

ナノキャリアをドラッグデリバリーシステムの基材として用いることは、内包薬剤を酵素分解などから保護し、尿排泄を回避し、標的部位に効率よく送達する利点が期待できる。血中に投与した粒径 20~100nm のナノキャリアは増殖の速い腫瘍組織において、透過性が亢進した毛細血管系より漏出しさらにリンパ管排出系が未発達でもあるため、間質腔に蓄積する EPR(Enhanced Permeation Retention)効果を示すことが知られる(図1)。蛍光剤や放射性同位元素などのシグナル剤でナノキャリアを標識すれば、分子イメージングプローブとしても有用性が期待できる。複数の薬剤や標識剤やリガンドを同時に送達することも可能であり、腫瘍の診断・治療精度の向上に寄与できると考えられる。しかしながら、現在までに分子イメージングのプラットフォームとして具体的に確立されているナノキャリアはない。

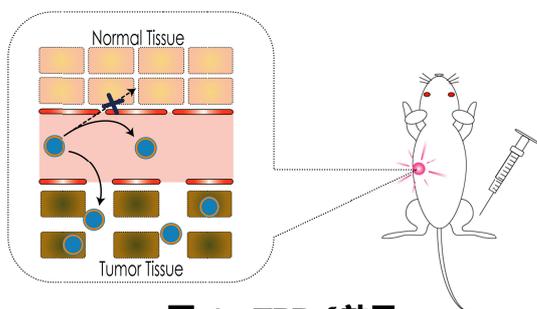


図1 EPR (効果)

我々が開発した新規ナノキャリア(ラクトソーム)は、疎水性部位にはポリL-乳酸、親水性部位にはポリサルコシンから構成されている両親媒性ポリデブシペプチドの自己組織化により形成されるミセルである。その疎水部及び親水部の鎖長を変化させることにより形状及び粒径を制御できる(図2)。これまでの先行研究において、我々は EPR 効果による腫瘍組織認識能やすぐれた血中代謝安定性を有するラクトソームの性質に着目し、<sup>18</sup>F および <sup>123</sup>I 標識体の合成、予備検討として小動物 PET および SPECT を用いたマウス実験腫瘍のイメージングにも成功した。

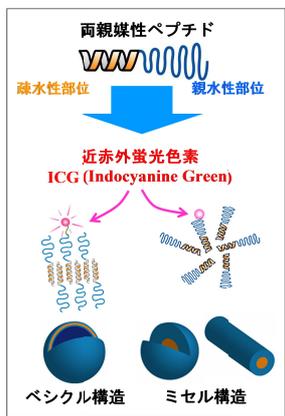


図2 両親媒性ポリデブシペプチドの自己組織化により形成される粒子

ラクトソームの腫瘍集積は、腫瘍組織に特徴的な血管透過性と排出機能の未熟性を利用してはいるため病態が異なる炎症病変には集積しないか集積したとしても集積パターンが大きく異なると予想され、困難だった腫瘍描画や炎症部位との識別が可能ではないかと考えられる。

### 2. 研究の目的

極めて特異的腫瘍認識性の高い分子イメージングプローブの創薬と腫瘍画像診断の精度向上を目指し、分子イメージングに大きく貢献すると期待されるナノキャリア(ラクトソーム)の効率的放射性標識合成法を確立するとともに、将来の単光子放出断層撮像装置(SPECT)ならびに陽電子放出断層撮像装置(PET)の臨床適用を指向した腫瘍イメージングプローブ開発を遂行する。

特に既存の腫瘍診断プローブに対する本材料の優位性を明らかにするため、分子イメージングによる腫瘍と炎症病変の識別の可能性を探る。

### 3. 研究の方法

放射性核種で標識したポリ乳酸を内包物質に設定した内包型ラクトソームやラクトソーム構成分子を直接標識する本体標識型ラクトソーム、さらにはABC現象の軽減を目的に構造改良を行ったA<sub>3</sub>B型ラクトソームの放射性標識体について、それらの効率的合成法を<sup>125</sup>Iを用いて確立する(図3)。単光子放出核種(<sup>123</sup>I)標識体を用いる小動物用SPECT、またポジトロン放出核種(<sup>124</sup>I)標識体を用いる小動物用PETによる炎症病変および腫瘍組織のイメージング適用を前提としているため、高比放射能かつ短時間で達成可能な標識手法を検討する。得られた<sup>125</sup>I標識ラクトソームについては、インビボ動物実験によって生体内分布や腫瘍選択性を評価する。

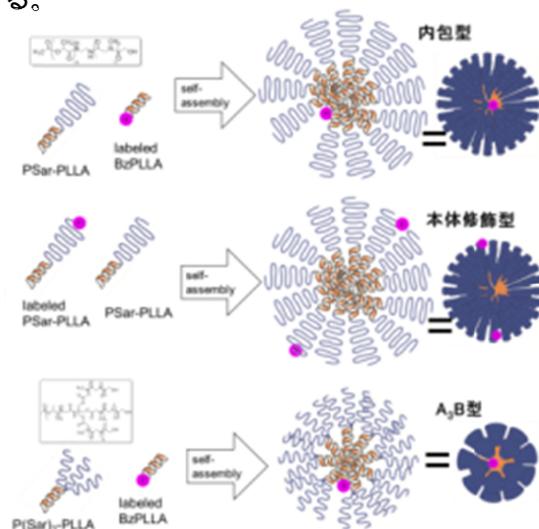


図3 標識ラクトソームの模式図

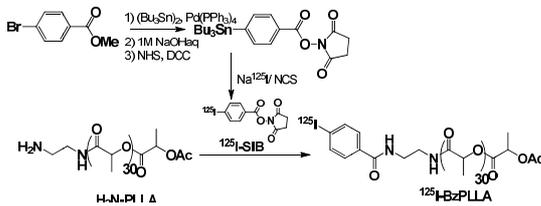
### (1) 内包型 <sup>125</sup>I 標識ラクトソームの合成

内包型標識ラクトソームである <sup>125</sup>I 標識ラクトソームの効率的標識法確立を計画した。内包するヨウ素の標識法については、すでに確立している <sup>18</sup>F 標識ラクトソームの合成法に準じ検討を行った。<sup>18</sup>F は半減期が 110 分の短寿命核種でありまたハロゲンであるため、短寿命の放射性ヨウ素においても応用可能であると考えられた。

#### <sup>125</sup>I 標識内包物の効率的合成

p-プロモ安息香酸メチルから 2 ステップで誘導したトリブチルスズ安息香酸を N-ヒドロスクシミドを縮合させて活性エステル体を得た。これを前駆体として、Na<sup>125</sup>I と酢酸酸性条件下で酸化剤 N-chlorosuccinimide と室温にて 30 分間反応させ、スズ-ヨウ素交換反応により <sup>125</sup>I-SIB を合成した (放射化学収率 69%)。

次に、末端にアミノ基を有するポリ-L-乳酸 (重合度 30) と用事合成した <sup>125</sup>I 標識試薬 <sup>125</sup>I-SIB とを 100 で 30 分間反応させ、ラクトソームの内包物となる <sup>125</sup>I-BzPLLA (放射化学収率 48%) を得た (Scheme 1)。



Scheme 1 <sup>125</sup>I-BzPLLA の標識合成

で得た <sup>125</sup>I-BzPLLA のラクトソームへの組み込みは、フィルム法により行った。即ち、両親媒性ポリデプシペプチドポリマー PSar<sub>75</sub>-PLLA<sub>30</sub> を試験管内壁にフィルム状に施し、<sup>125</sup>I-BzPLLA と親和させた後に、水または生理食塩水を入れ、50 にて 42kHz の超音波を混合溶液に 15 分間照射し自己集合化を行った (図 4)。



図 4 フィルム法による自己集合化の手順

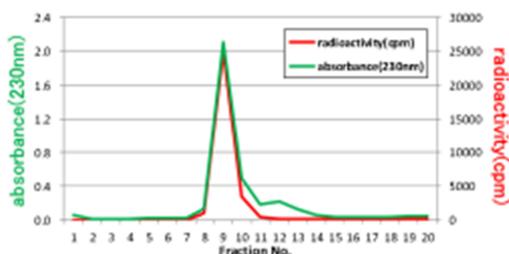


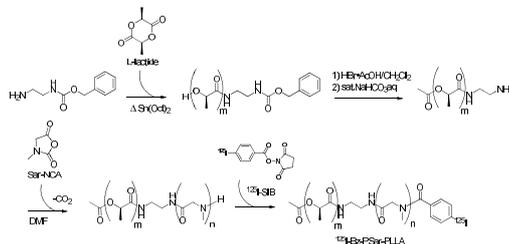
図 5 内包型 <sup>125</sup>I 標識ラクトソームのサイズ排除カラムクロマトグラム

ゲルろ過カラム Sephacryl S-100HR を用いた分析の結果、<sup>125</sup>I-BzPLLA 放射能の 97%以上がラクトソームに組み込まれていることがわかった (図 5)。

以上の結果、内包型 <sup>125</sup>I 標識ラクトソームを効率よく得る方法を確立した。全合成時間は 2~2.5 時間程度であり、本手法は短半減期の SPECT 核種 <sup>123</sup>I や PET 核種 <sup>124</sup>I を用いる標識合成にも適用が可能であると考えられる。

### (2) 本体修飾型 <sup>125</sup>I 標識ラクトソームの合成

先行研究では内包型標識ラクトソームは、ステルス特性や高い血中滞留性があることが明らかとなっているが、生体内における化学形については明らかではない。このため、放射能の生体内挙動がラクトソームの挙動片影していない可能性も懸念される。事実、本研究においては放射能の甲状腺の高い放射能集積など <sup>125</sup>I 標識ラクトソームは <sup>18</sup>F 標識ラクトソームと異なる分布を示すデータも得られている。このため、ラクトソームを構成する両親媒性ポリマーに直接 <sup>125</sup>I 標識を行って粒子化する本体修飾型 <sup>125</sup>I 標識ラクトソームの合成を検討した (Scheme 2)。



Scheme 2 <sup>125</sup>I-iodobenzoyl-PSar-PLLA の標識合成

### Sar 末端にアミノ基を有する両親媒性ポリマーの合成

両親媒性ポリデプシペプチドへの放射性ヨウ素標識を計画する場合、1) 疎水性コアを形成するポリ-L-乳酸部、2) 疎水部と親水部をつなぐリンカー部、3) ポリサルコシン部、のいずれかが可能性として考えられ得る。このうち 2) への放射性ヨウ素導入は合成化学的に容易ではなく将来の短寿命核種使用を想定すれば効率が悪いと予想される。1) と 3) を考えた場合、ラクトソームの両親媒性ポリマーを合成する途上でサルコシン末端に NH 基を有する中間体を得ることが可能で、<sup>125</sup>I-SIB を使う標識が理論上可能である 3) が比較的容易に標識体を得られると考えられた。Sar 末端に NH 基を有する両親媒性ポリマーの合成は、市販の N-carbobenzoxy-1,2-diaminoethane を出発原料として L-lactide の重合に引きつづき、合成した Sar-NCA の重合により行った (収率 5.7%)。

### 非放射性 SIB を用いた両親媒性ポリマー Sar 末端へのヨウ素導入反応条件の検討

合成した両親媒性ポリマーの Sar 末端にヨウ素標識化剤 SIB を導入し、iodobenzoyl-PSar-PLLA を得る反応を、DMF 存在下非放射性化合物を用いて検討した。反応液を留去後、水を加えて粒子化を行った後に透析し、NMR にて構造解析した結果、両親媒性ポリマーのサルコシン末端 2 級アミノ基へのヨードベンゾイル基の導入を確認した（収率 4 %）。

### $^{125}\text{I}$ -SIB を用いた両親媒性ポリマー Sar 末端へのヨウ素導入反応条件の検討

2 - 2 ) で得られる知見を参考に、もっともよい条件を放射性ヨウ素標識に適用することを検討した。アセトニトリルを反応溶媒として両親媒性ポリマーと  $^{125}\text{I}$ -SIB を室温で 30 分攪拌し、HPLC にて反応を追跡した。その結果、目的物の生成を確認した。反応には溶媒効果が大きく影響することが明らかとなったため、より収量をあげるためには、温度や反応時間などの詳細な検討が必要である。本研究期間内では達成できなかったが、十分な収量の目的物が得られれば、粒子化の後、インビボ評価を今後行って行く予定である。

### (3) $\text{A}_3\text{B}$ 型 $^{125}\text{I}$ 標識ラクトソームの合成

ラクトソームは単回投与の場合には、ステルス性と高い血流滞留性のため優れた腫瘍認識能を示すが、複数回投与すると、血中から速やかに肝臓に移行し腫瘍集積しなくなる accelerated blood clearance(ABC)現象が生じることが明らかとなった。ABC 現象軽減のための新たなドラッグデザインとして、粒子径がより小さい  $\text{A}_3\text{B}$  型ラクトソームが開発されつつあり期待されている。その  $^{125}\text{I}$  標識体の合成を行った。

ラクトソームの標識方法は、フィルム化した  $\text{A}_3\text{B}$  型両親媒性ポリマーと  $^{125}\text{I}$ -SIB を水溶液中で超音波照射することにより自己集合させた。 $^{125}\text{I}$ -BzPLLA 放射能の 85%以上がラクトソームに組み込まれ、 $\text{A}_3\text{B}$  型  $^{125}\text{I}$  標識ラクトソームを効率よく得る方法を確立した。全合成時間は 2 ~ 2.5 時間程度であり、本手法は短半減期の SPECT 核種  $^{123}\text{I}$  や PET 核種  $^{124}\text{I}$  を用いる標識合成にも適用が可能であると考えられる。

### (4) $^{125}\text{I}$ 標識ラクトソームの動物生体内分布評価

内包型  $^{125}\text{I}$  標識ラクトソームと (3) の  $\text{A}_3\text{B}$  型  $^{125}\text{I}$  標識ラクトソームについて、Colon26 腫瘍移植マウス、テレピン油誘発性炎症モデルマウス、の各病態モデル動物における放射能生体内分布を評価した。

### (5) $^{125}\text{I}$ 標識ラクトソームを用いたマイクロオトラジオグラフィーの試み

1) の内包型  $^{125}\text{I}$  標識ラクトソームと 3) の  $\text{A}_3\text{B}$  型  $^{125}\text{I}$  標識ラクトソームについて、放

射能分布を組織学的に調べるため、オートラジオオフィの予備検討を行った。腫瘍モデルマウスにおける  $^{125}\text{I}$  標識ラクトソーム投与後 2 時間後の肝臓、脾臓、について凍結組織包埋剤中で凍結させ  $10\mu\text{m}$  の切片を作成した。切片は 1 週間イメージングプレートに露光させ BAS-5000 にて解析した。その後切片は H E 染色を行った。

## 4. 研究成果

### (1) $^{125}\text{I}$ 標識ラクトソームの動物生体内分布評価

#### 内包型 $^{125}\text{I}$ 標識ラクトソームの動物生体内分布

腫瘍モデルマウスにおいては、2 ~ 48 時間にかけて、血液において最も高い放射能分布を示しクリアランスは遅かった（血中半減期 16.5 時間）。肝臓や脾臓への集積は血流由来のものであることは、環流脱血モデルの放射能分布との比較により確認された。したがってステルス性は保持されていることが示された。また腫瘍への集積は徐々に増加したことから、EPR 効果による腫瘍集積が示された。脱ヨウ素代謝の指標となる甲状腺への集積は投与後 0.47 ~ 0.82%dose であったことから、生体内では比較的安定であることが示唆された。 $^{18}\text{F}$  標識ラクトソームと同様、SPECT および PET イメージング剤としての可能性を有することが期待される（図 6）。

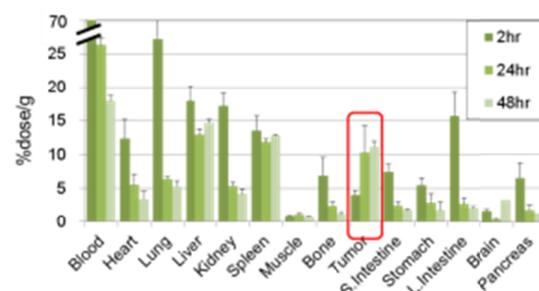
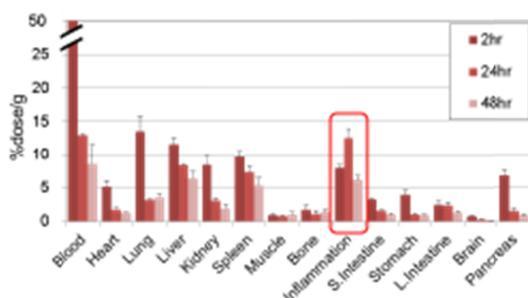


図 6 Colon 26 腫瘍移植マウスにおける内包型  $^{125}\text{I}$  標識ラクトソームの生体内分布 (n=3-5)

炎症病変モデルマウスにおいては、同様に 2 ~ 48 時間にかけて、血液において最も高い放射能分布を示した。炎症病変部位においては 24 時間で最大 13%dose/g 程度の集積を示し、2 時間における集積は腫瘍よりも大きかった。このことからラクトソームは炎症病変のイメージング剤としても可能性があることが期待された。炎症部位への集積機序については不明であるが、48 時間後では減少していることから、炎症組織での血流の増加や、毛細血管の透過性亢進によるラクトソームの運搬、白血球への取り込み、細菌への取り込み、組織間質への結合などいくつかの機序

が考えられ得る。特筆すべき点として甲状腺への集積が1.1~2.4%doseと高かった。ブロック実験によって甲状腺への放射能は遊離したヨウ素であることを確認しており、炎症病変モデルにおいては腫瘍モデルや正常マウスに比べると脱ヨウ素代謝が著しいことが示唆された。病変モデルの違いによる脱ヨウ素代謝の変化についてはメカニズム解明を含めて今後詳細に調べていく必要があるが、ステルス性を示すはずのラクトソームの内包物が外部に漏出している可能性もあり、内包型標識ラクトソームがラクトソームとしての体内挙動を正確に示していないとの懸念も残る。この事実から、本研究期間では成しえなかった本体修飾型ラクトソームの放射化学を早期に完成させ、同様の評価を行う必要がある(図7)。

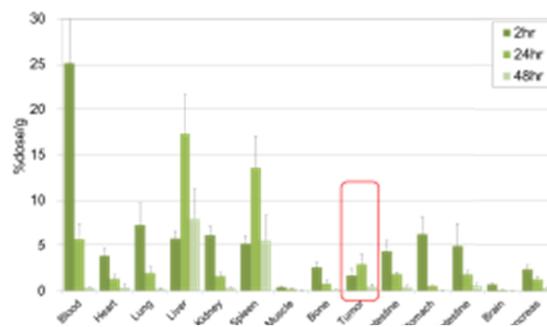


**図7** テレピン油誘発性炎症病変モデルマウスにおける内包型<sup>125</sup>I標識ラクトソームの生体内分布 (n=3-5)

#### A<sub>3</sub>B型<sup>125</sup>I標識ラクトソームの動物生体内分布

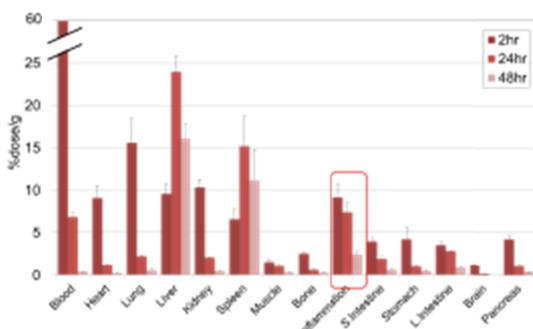
腫瘍モデルマウスにおいては、2時間で血中において最も高い放射能を示したが、クリアランスは早かった(血中半減期4.3時間)。肝臓や脾臓への集積は、投与後2時間では血液より低くステルス性を示していると考えられるが、24時間後には血液は急激に減少しているのに対し肝臓や脾臓には多く集積しており、代謝排泄が起こっていると考えられる。また腫瘍への集積は、24時間までは増加しているが48時間では速やかに減少している。A<sub>3</sub>B型ラクトソームは、粒子径を小さくすることによりラクトソームABC現象を軽減し複数回投与における腫瘍イメージングが可能となることを期待してデザインされたものであり、定性的評価として蛍光イメージングである程度ABC現象が軽減されて腫瘍イメージングに成功したことが明らかになっている。本研究ではABC現象の変化は検討していないが、本研究においてA<sub>3</sub>Bラクトソームの初回投与について初めて定量的に分布を解析した。その結果、腫瘍集積性は従来型のラクトソームよりも低かったことが明らかとなった。したがって、ABC現象を軽減するデザインが、腫瘍集積性を犠牲にしていることが明らかとなった。複数回投与の核医学イメージングや、将来DDS基材とし

てA<sub>3</sub>B型ラクトソームを開発していく場合には、さらなる腫瘍集積性の向上も検討する必要がある(図8)。



**図8** Colon 26腫瘍移植マウスにおけるA<sub>3</sub>B型<sup>125</sup>I標識ラクトソームの生体内分布 (n=6-7)

炎症病変モデルマウスにおいては、同様に2において血液において最も高い放射能分布を示した。炎症病変部位においては2時間で最大9%dose/g程度の集積を示し、集積は腫瘍よりも大きかった。このことから従来型ラクトソームと銅由鬼炎症病変のイメージング剤としても可能性があることが期待された(図9)。



**図9** テレピン油誘発性炎症病変モデルマウスにおけるA<sub>3</sub>B型<sup>125</sup>I標識ラクトソームの生体内分布 (n=4-5)

#### 画像診断薬<sup>67</sup>Ga-クエン酸ガリウムとの比較

腫瘍および炎症病変位の画像診断や治療効果判定などに臨床利用されているガリウムシンチグラフィとの生体内分布比較を炎症病変モデルと用いて行った。クエン酸ガリウム放射能は、投与後腎臓や骨に集積することが知られている。本モデルにおいても特に腎臓においては炎症病変部位と同レベルの取り込みを認めた。また24時間~48時間で取り込み放射能はあまり変わらなかった。ラクトソームは、投与後血中放射能レベルは高いが、腎臓や骨への集積は低い。このことから、臨床応用されているクエン酸ガリウムは腎臓や骨などの近辺組織においては苦手としている炎症病変を、ラクトソームは描画できる可能性が示唆された。

### (5) <sup>125</sup>I 標識ラクトソームを用いたマイクロオートラジオグラフィーの試み

オートラジオグラムを得る条件を確立した。得られた画像は、肝臓(図10) 脾臓、腫瘍の各組織において、血管とそれ以外の分布は明確に判別できた。また脾臓においては白脾臓と赤脾臓の分布の違いが確認できた。放射能分布は赤脾臓の方が多いことが確認された。ABC 現象を起こした場合には集積が異なり、白脾臓に集積する可能性がある。本研究期間では行わなかったが、今後 ABC 現象における各組織の分布を組織学的に観察する予定である。

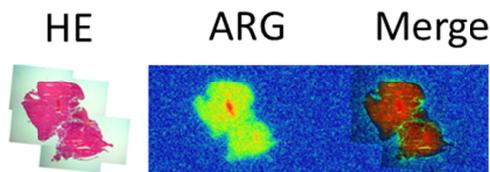


図 10 マウス投与後 2 時間の組織染色とオートラジオグラム(肝臓)

### 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 7 件)

1. E.Hara, A.Makino, K.Kurihara, M.Ueda, I.Hara, T.Kawabe, F.Yamamoto, E.Ozeki, K.Togashi, S.Kimura, Radionuclide Therapy Using Nanoparticle of <sup>131</sup>I- Lactosome in Combination with Percutaneous Ethanol Injection Therapy, J Nanopart Res, 15(12), 2131 (2013), 査読有, DOI 10.1007/s11051-013-2131-2

2. F.Yamamoto, R.Yamahara, A.Makino, K.Kurihara, H.Tsukada, E. Hara, I.Hara, S.Kizaka-Kondoh, Y.Ohkubo, E.Ozeki, S.Kimura, Radiosynthesis and initial evaluation of <sup>18</sup>F labeled nanocarrier composed of poly(L-lactic acid)-block-poly(sarcosine) amphiphilic poly-depsipeptide., Nucl. Med. Biol., 40(3), 387-394 (2013), 査読有, DOI 10.1016/j.nucmedbio.2012.12.008

[学会発表](計 26 件)

1. Kensuke Kurihara, Motoki Ueda, Isao Hara, Eri Hara, Kohei Sano, Akira Makino, Eiichi Ozeki, Fumihiko Yamamoto, Hideo Saji, Kaori Togashi and Shunsaku Kimura, Chemotherapy and Radionuclide Therapy Using <sup>90</sup>Y-DOTA-Lactosome after Percutaneous Ethanol Injection Therapy Compared with Using Doxorubicin and Pegylated liposomal doxorubicin, 27th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine EANM ' 14

(Gothenburg, Sweden, 2014.10. 18-22)

2. Fumihiko Yamamoto, Mitsuharu Kimura, Akira Makino, Yumi Yamamoto, Yohei Saito, Eiichi Ozeki, Shunsaku Kimura, Yasuhito Ohkubo, Synthesis and initial evaluation of radioiodine labeled A<sub>3</sub>B-type Lactosome as an imaging probe of tumor and/or inflammation, The Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 61th Annual Meeting, (St.Louis, USA, 2014.06.08)

3. 木村光晴、山本文彦、牧野顕、原功、小関英一、木村俊作、山本由美、齋藤陽平、大久保恭仁、ヨウ素 <sup>125</sup>I 標識ラクトソーム放射能の生体内分布における血流の影響、第 14 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、2014 年 9 月 13 日、京都勧業館みやこめっせ(京都府・京都市)

4. 木村光晴、山本文彦、大西いぶき、牧野顕、山本由美、齋藤陽平、小関英一、木村俊作、大久保恭仁、<sup>125</sup>I 標識 A<sub>3</sub>B 型ラクトソームの病態モデル動物を用いた基礎評価、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(福岡県・福岡市)

[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 なし

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 文彦(YAMAMOTO, FUMIHIKO)  
東北薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 40253471

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

木村 俊作(KIMURA, SHUNSAKU)  
京都大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 80150324

栗原 研輔(KURIHARA, KENSUKE)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 90531997

船木 善仁(FUNAKI, YOSHIHITO)  
東北大学・サイクロトロン・アイソトープ  
センター・助教  
研究者番号: 50261491