

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月25日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04911

研究課題名(和文)放射性核種体内動態の革新的制御機構による難治癌に対する選択的内用療法の開発

研究課題名(英文) Radionuclide-carrying liposomes with both high tumor accumulation and rapid background clearance

研究代表者

梅田 泉 (Umeda, Izumi, O.)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：40160791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：核医学にDDSキャリアであるリポソームと錯体化学を取込み、放射性核種の体内動態を巧みに制御することによって、放射性核種を腫瘍に大量に集積させ、かつ正常組織からは速やかにクリアランスさせる独自システムの開発を進めた。診断用核種、治療用核種の両方を効率よくリポソームに封入する手法を確立し、radiotheranosticsのプラットフォームとしての可能性を示した。また、様々な腫瘍モデルにおいて、高い腫瘍集積性と正常組織からの迅速なクリアランスを両立させるための必要条件も明らかにした。リポソームの腫瘍集積と治療効果に高い相関のあることも見いだした。臨床応用に向けて大きく前進したと考える。

研究成果の概要(英文)：We devised a new strategy that attain high tumor accumulation, as well as rapid background clearance, especially from the liver, by combination of liposomes and coordination chemistry in nuclear medicine field. Both diagnostic and therapeutic radionuclides were encapsulated in liposomes with high efficiency, showing the possibility as the platform of radio-theranostics. In addition, in various tumor models, the requirement to balance the quick clearance from the normal tissues with high tumor accumulation was clarified. We also found that that liposomal tumor accumulation and curative effect had high correlation. It would be greatly advanced for clinical application.

研究分野：分子イメージング、放射性医薬品化学、腫瘍核医学

キーワード：核医学 内用療法 radiotheranostics イメージング がん リポソーム DDS 錯体化学

## 1 研究開始当初の背景

本研究の最終目的は浸潤・遠隔転移を来した難治癌・進行癌をも治癒に導きうる革新的放射線内用療法の開発である。進行がんは根治的手術が困難で、現状では化学療法の適応となる。化学療法は近年分子標的薬の出現などで長足の進歩を遂げているものの、多くの固形癌では十分な有効性は発揮できておらず、がんの根治には至らない。一方、細胞殺傷性の強い高エネルギー $\beta$ 線を放出する放射性核種を結合した化合物を体内に投与してがん細胞周辺に送達・集積させることによりがん細胞を直接死亡させる核医学治療(内用放射線療法)は、近年非ホジキンリンパ腫等の治療において大きな成功を収め、注目を集めている。核医学治療はいわば全身性の放射線治療であり、原理的には上述のような進行固形がんにも有効なはずである。しかし、実際には固形癌に対してはその効果は限定的である。固形がんは一般にリンパ腫に比べて放射線感受性が低いことが大きな原因と考えられる。これを克服するためには、第一に腫瘍に大量の放射性核種を集積させることが必要である。と同時に、投与する放射エネルギーが増大することから、正常組織の被曝をいかに抑えるかがもう一つの重要な課題となる。しかしながら、一般には腫瘍集積を増大させるためには、血中滞留量を増加させるため、正常組織集積量も増大する。従って、上述の二点を同時に満たすことは極めて難しく、臨床応用まで至った例はほとんどない。

## 2 研究の目的

我々は上述の二点の課題を両立させるため、核医学領域に薬物送達システム(DDS)を導入し、さらに用いる放射性核種が金属イオンであることを利用して、錯体化学を駆使して、放射性核種の体内動態を巧みに制御することを試みてきた。これまでSarcoma180担がんマウスをモデルとして検討を進め、放射性核種は主に $^{111}\text{In}$ を用いてきた。本研究では、これまでの検討を治療用放射性核種に拡張、かつ種々のヒトがんモデルでの検討を行い、我々のコンセプトを臨床応用に進めるための諸検討を行うことを目的とした。

## 3 研究の方法

(1) 用いた試薬など  
配位子分子として、nitrilotriacetic acid (NTA、和光純薬)、diethylenetriamine- $\text{N,N,N',N'',N'''}\text{-pentaacetic acid}$  (DTPA、和光

純薬)、1,4,7,10-tetraazacyclododecane- $\text{N,N',N'',N'''}\text{-tetraacetic acid}$  (DOTA、東京化成)、ethylenedicysteine (EC、ABX社)を用いた。リポソーム調製のリン脂質は日本油脂より購入した。放射性核種として塩化インジウム $^{111}\text{InCl}_3$ (日本メジフィジックス)および塩化イットリウム $^{88}\text{YCl}_3$ (理研)を用いた。

### (2) リポソームの調製と放射性核種の封入

Distearoylphosphatidylcholine (DSPC) とコレステロール(CH)(モル比2:1)あるいはDSPC/CH/DSPE-PEG2000(2:1:0.2)を用いて、薄膜法でリポソームを調製し、孔径 $0.1\ \mu\text{m}$ のヌクレオポアメンブラン2枚を装着したエクストリュージダを用いて、粒子径を平均 $120\ \text{nm}$ とした。Active loading法を用いて放射性核種を封入する場合には、リポソーム調製時に配位子溶液を加え、予め配位子をリポソームに封入した。

### (3) 担がん動物を用いた体内動態の検討

腫瘍モデルとして、マウス肉腫細胞Sarcoma180、ヒト頭頸部癌細胞FaDu、ヒト卵巣癌細胞Caov3、SK-OV-3、KURAMOCHI、TOV-112Dなどを用いた。Sarcoma180はddYマウスに、またヒト癌細胞はBalb/c nu/nuマウスのそれぞれ下肢皮下に移植した。放射性核種封入リポソームを尾静脈投与し、一定時間後に動物を屠殺して、臓器を摘出した。摘出臓器の重量と放射活性を測定し、組織分布を評価した。

## 4 研究成果

核医学で用いる核種には画像診断用( $^{111}\text{In}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ など)と治療用( $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{64/67}\text{Cu}$ など)がある。 $^{111}\text{In}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ と $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ は化学的性質が類似している。核医学領域においては $^{90}\text{Y}$ などの動態を $^{111}\text{In}$ の動態で類推するのは一般的な手法である。治療用核種は製造が限定されており、日本国内ではほとんど流通しておらず、入手が難しい。そこで本研究では、治療用核種検討にあたり、まず $^{111}\text{In}$ および $^{88}\text{Y}$ を代替核種として検討を行った。

### (1) リポソーム内への治療用核種の高濃度封入法

リポソーム内に水溶性配位子を予め封入し、一方で放射性核種を脂溶性配位子で錯体形成させ、錯体交換反応によってリポソーム内に核種を高濃度に封入する手法を検討した。 $^{111}\text{In}$ の場合は、脂溶性配位子8-hydroxyquinoline(8HQ)を用い、水溶性配

位子としてDOTA、DTPA、EDTA、EC等を用いる事でいずれも高濃度封入が可能であった。HPLC分析の結果、リポソーム内でそれら水溶性配位子と $^{111}\text{In}$ が錯体を形成していることが確かめられた。一方、 $^{88}\text{Y}$ の場合は、8HQとの脂溶性錯体の形成が悪く、toropoloneの方が高成績だった。水溶性錯体としてDOTAを用いた場合、 $^{111}\text{In}$ と比べて加熱と長い反応時間が必要だった。条件を選ぶことで $^{88}\text{Y}$ -DOTA封入リポソームを得ることが出来た。

(2)Sarcoma180担がんddYマウスを用いての投与後の腫瘍集積と正常組織からのクリアランスに関する検討

DSPC / CHから調製したリポソームに $^{111}\text{In}$ -ECを封入して投与した場合、同じリポソームに $^{111}\text{In}$ -DOTAなどを封入した場合と比べて、腫瘍への集積は有意な差はなかったが、肝臓からのクリアランスは有意に早くなることが認められた。Yの動態をInの動態で類推する常法に従って、次に $^{88}\text{Y}$ -EC封入リポソームの調製を試みた。しかしながら、期待した結果を得ることはできず、 $^{88}\text{Y}$ とECとの錯体形成が不安定と推測された。そこで、Yに対して $^{111}\text{In}$ -ECと類似した挙動を持たせるための配位子を検討した。YはInと比べ原子半径が大きいので、ECにメチレン基をひとつ追加したPCを合成してin vivoでの検討を行ったが、錯体の安定性に問題があった。そこで、Yと安定な錯体を形成するDOTAやDTPAを骨格として、これに修飾基を導入することを試みている。DTPAにエトキシベンジル基を導入したEOBを用いた場合、リポソームへの $^{88}\text{Y}$ 封入は可能であり、投与した場合、排泄を加速させる傾向が認められた。現時点では、まだ十分なクリアランスとは言えないが、他の候補化合物も含め、さらに検討を重ねる予定である。

(3)ヒトがん担がんマウスでの検討 / マウス系統の違いによる肝臓でのリポソーム分解の違い

上述のように、Sarcoma180担がんddYマウスの系では、いったん肝臓に集積した放射性核種を迅速に体外に排泄するシステムを構築し、ほぼ腫瘍のみへの放射性核種集積に成功した。腫瘍と肝臓との間に差が生じる原因を検討した結果、腫瘍と肝臓でリポソーム分解速度が異なるためであり、肝臓ではリポ

ソームが速やかに壊されることを見いだした。

我々のコンセプトを広く一般的なものに拡げるため、次に広く他がん種モデルへの適用を試みた。その結果、上述の肝臓からの迅速な排泄はマウス種によって大きく結果が異なることが明らかとなった。BALB/c マウスおよび BALB/c - nu/nu マウスでは、これまでと同量のリポソーム投与量 (リン脂質として  $100\mu\text{mole/kg}$ ) では肝臓からの放射性核種の迅速なクリアランスは認められなかった。これはマウス系によって、肝臓から放射性核種-配位子錯体を排出するシステムが異なるか、あるいは、リポソームを壊す能力が異なるかのいずれかと考えられた。そこで、BALB/c nu/nu マウスに、リン脂質量  $5\text{-}100\mu\text{mole/kg}$  の  $^{111}\text{In}$ -EC 封入リポソームを投与し、腫瘍および肝臓への  $^{111}\text{In}$  集積量を評価した。その結果、投与量の低下に依存して肝臓からの  $^{111}\text{In}$  消失が観察された。従ってマウス系によってリポソームを壊す能力が異なると考えられた。十分な消失には投与量を  $10\mu\text{mole/kg}$  以下にする必要があった。しかし一方で、投与量の低下は腫瘍集積量の低下を引き起こした。そこで、リポソームのポリエチレングリコール (PEG) 修飾を検討した。PEG 添加はリポソームの血中滞留時間を延長し、腫瘍集積性を向上させた。6%PEG 添加  $^{111}\text{In}$ -EC 封入リポソームを、ヒト頭頸部癌細胞 FaDu 皮下移植 BALB/c - nu/nu マウスに投与した結果、迅速な肝臓クリアランスと良好な腫瘍集積が共に観察され、腫瘍選択的な集積が可能となった。in vivo SPECT/CT 撮像でもこれを裏付けるイメージを得ることができた。

(4)リポソームの腫瘍への集積と治療効果の相関について

上でも述べたように、核医学で用いる核種には画像診断用 ( $^{111}\text{In}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ など) と治療用 ( $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{64/67}\text{Cu}$ など) がある。リポソームはどのような核種も原理的には封入可能であり、同じリポソームを用いて核種を換えるだけで画像診断と核医学治療の両方を可能にする。それによって、薬剤の分布を可視化でき、治療効果の予測や評価が可能となる (

radiothenostics)。治療用核種の供給が予定より遅れたため、まず、治療用核種の代わりに抗がん剤ドキソルビシンをリポソームに

封入し (D-lip)、画像診断や放射活性測定による薬剤の腫瘍集積評価と、薬剤の治療効果との相関について検討を行った。ヒト卵巣癌皮下移植モデル4種類を用いてD-lipの薬効を検討した結果、癌腫によって薬効には差があり、さらに、薬効と<sup>111</sup>Inリポソームの腫瘍集積量 (AUC) には相関が認められた。次に治療効果の個体差が大きかったSK-OV-3担がんマウスに<sup>111</sup>In-リポソームを投与して各々の腫瘍集積量をSPECT/CTで評価した後に、D-lipを投与し、25日間腫瘍径等を観察した。その結果、治療前の<sup>111</sup>In-リポソーム腫瘍集積量とD-lipの治療効果は優れた相関を示した ( $R^2=0.73$ )。すなわち、D-lipの薬効はリポソームの腫瘍集積量に依存しており、<sup>111</sup>In-リポソームを用いたイメージングによって薬効を予測できた。D-lipの代わりに治療十分量の治療用核種を腫瘍に送達できれば、同様に治療効果が期待でき、その送達量を予め評価できるのがこの系の優れた点と考える。年度内に治療用核種として<sup>64</sup>Cuの供給を受けることができ、リポソームへの封入と担がん動物への投与等を実施した。リポソームへの封入は良好であり、担がん動物での体内動態は<sup>111</sup>In-リポソームとほぼ同等であった。D-lipで観察された、腫瘍への集積と治療効果の良好な相関から、治療用核種封入リポソームでの治療効果も十分に期待出来ると考えられる。

#### (5)まとめと今後の展望

本研究では、難治癌・進行癌をも治療できる新しい放射線内用療法 (核医学治療法) の開発を目指し、投与した放射性核種の体内動態を巧みに制御する独創的なシステムの開発を進めた。放射性核種を腫瘍に集積させ、正常組織である肝臓からは迅速にクリアランスさせるという我々のコンセプトは、投与量などの最適化によって、ヒト癌マウスモデルでも機能するようになり、臨床応用に向けて一歩前進したと考えている。また、治療用核種である<sup>90</sup>/<sup>88</sup>Yや<sup>64</sup>/<sup>67</sup>Cuをリポソーム内に封入し、腫瘍へ集積させることも可能になった。今後、治療用核種の十分な供給を確保して、さらに臨床導出に向けての検討を進めたい。

## 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4件)

Ito K, Hamamichi S, Abe T, Akagi T, Shirota H, Kawano S, Asano M, Asano O, Yokoi A, Matsui J, Umeda IO, Fujii H, Antitumor effects of eribulin depend on modulation of the tumor microenvironment by vascular remodeling in mouse models, *Cancer Science*, 2017, 108(11): 2273-2280. DOI: 10.1111/cas.12841

Hori Y, Ito K, Hamamichi S, Matsui J, Umeda IO and Fujii H, Functional characterization of VEGF- and FGF-induced tumor blood vessel models in human cancer xenografts, *Anticancer Res*, vol.37 no.12, 2017, 6629-6638. DOI: 10.1111/cas.12841

Kimura S, Kakishima Y, Kushimaru T, Kondoh S, Yoshimoto M, Fujii H and Umeda IO. Application of HaloTag® technology to in vivo molecular imaging using protein probes labeled by metallic radionuclides. *Radioisotopes*, 2016, 65, 247-255. DOI: 10.3769 /radioisotopes. 65.247

Kamimura M, Saito R, Hyodo H, Tsuji K, Umeda IO, Fujii H and Soga K. Over-1000 nm near-infrared fluorescence and SPECT/CT dual-modal in vivo imaging based on rare-earth doped ceramic nanophosphors. *Journal of Photopolymer Science and Technology*. 2016, 29(4):525-532.

〔学会発表〕(計21件)

I. O. Umeda, S. Hamamichi, H. Fujii, Preferential Tumor Accumulation in Mice bearing Human Head and Neck Cancer using Radionuclide-carrying Liposomes aiming for Radiotheranostics, European Association of Nuclear Medicine 2017 (EANM2017), poster, 2017/10/21, Austria Center Vienna (Vienna, Austria)

Izumi O. Umeda, <sup>111</sup>In-EC-PEGylated liposomes enable both high tumor

accumulation and rapid background clearance, The 12th Asia Oseania Congress of Nuclear Medicine and Biology(AOCNMB2017), poster, 2017/10/5, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

梅田 泉、濱道修生、藤井博史、がん選択的集積を可能にする放射性核種錯体封入リポソーム - ヒト腫瘍皮下移植モデルでの検討 -、第 33 回日本 DDS 学会 学術集会、2017/7/7、口頭、京都市勧業館「みやこめっせ」(京都府京都市)

Izumi Ogihara Umeda, Shusei Hamamichi, Hirofumi Fujii, High tumor accumulation and rapid background clearance by using radionuclide-carrying liposomes for targeted radionuclide therapy and theranostics, Society of nuclear medicine and molecular imaging 2017, 口頭、2017/6/13, Colorado Convention Center(Denver, America)

Ken Ito, Shusei Hamamichi, Takanori Abe, Hiroshi Shiota, Satoshi Kawano, Makoto Asano, Osamu Asano, Akira Yokoi, Junji Matsui, Izumi O.Umeda, Hirofumi Fujii, Eribulin modulates tumor microenvironment through vascular remodeling for antitumor effect in multiple mouse xenograft models, American Association for Cancer Research 2017, poster, 2017/4/2, Walter E. Washington Convention Center (Washington,D.C.(USA))

梅田 泉、伊藤 憲、濱道修生、浅野 誠、岩田正夫、堀 優作、松井順二、船橋泰博、藤井博史、分子イメージング手法によるリポソーム化抗がん剤の薬効予測、日本薬学会第 137 年会、口頭発表、2017/3/27、東北大学川内キャンパス 仙台国際センター(宮城県仙台市)

濱道修生、梅田 泉、藤井博史、伊藤 憲、浅野 誠、堀 優作、岩田正夫、松井順二、船橋泰博、放射性核種封入リポソームを用いたリポソーム化抗がん剤の薬効予測技術の開発、第 86 回日本核医学会 関東甲信越地方会、口頭発表、2017/1/28、富士フィルム西麻布本社講堂(東京都港区)

Shusei Hamamichi, Yuki matsuura, Kazunobu Ohonuki, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, SPECT/CT Imaging of <sup>111</sup>In-ethylenedicysteine Liposome

Demonstrates High Tumor Accumulation and Rapid Background Clearance in a Human, World Molecular Imaging Congress 2016, poster, 2016/9/9, New York, USA

梅田 泉、藤井 博史、迅速な網内系クリアランスを可能にした放射性核種封入リポソームによるがんのイメージングとセラノスティックス、第 32 回日本 DDS 学会学術集会、シンポジスト、2016/7/1、グランシップ(静岡県静岡市)

Shusei Hamamichi, Yuki Matsuura, Kazunobu Ohnuki, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, Thmor Accumulation and Rapid Clearance from the Reticuloendothelial System by <sup>111</sup>In-eyhylenedicysteine PEGylated Liposome in a Human Head and Neck Cancer Xenograft Model, 第 9 回日本分子イメージング学会・学術集会、シンポジスト、2016/5/29、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

梅田 泉、木村禎亮、藤井 史、ニトロイミダゾール類とは異なる集積機序を持つ <sup>99m</sup>Tc 標識低酸素イメージングプローブの開発、第 9 回日本分子イメージング学会・学術集会、シンポジスト、2016/5/29、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

梅田 泉、放射性核種封入リポソームを用いたがん選択的画像診断およびセラノスティックス、第 55 回日本生体医工学会、シンポジスト、2016/4/27、富山国際会議場(富山県富山市)

松浦祐樹、濱道修生、大貫和信、梅田 泉、藤井博史、難治癌内用療法を目指したヒトがんモデルにおける放射性核種封入リポソームを用いた放射性核種の迅速な正常組織クリアランスによる腫瘍選択的滞停の実現、日本薬学会第 136 年会、ポスター、2016/3/28、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

濱道修生、松浦祐樹、大貫和信、梅田 泉、藤井博史、網内系クリアランスが速い放射性核種封入リポソームを用いた診断治療一体化技術のヒト腫瘍モデルでの検討、第 55 回日本核医学会学術総会、ポスター、2015/11/6、ハイアットリージェンシー東京(東京都新宿区)

Izumi O. Umeda, Ken Ito, Shusei Hamamichi, Makoto Asano, Masao Iwata, Junji Matsui, Yusaku Hori, Yasuhiro Funahashi, Hirofumi Fujii,

SPECT/CT Imaging of Radionuclide-carrying Liposomes Predict Therapeutic Effects of Liposomal Anti-cancer Agents in Mouse Xenograft Models, EANM'15 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, poster, 2015/10/11, Congress Center Hamburg(Hamburg(Germany))

伊藤憲、濱道修生、浅野 誠、堀 優作、松井順二、岩田正夫、船橋泰博、梅田 泉、藤井博史、放射性核種内包リポソームを用いた分子イメージング手法によるリポソーム化抗がん剤の薬効予測法の開発、第 74 回日本癌学会学術総会、口演、2015/10/8、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

濱道修生、松浦祐樹、大貫和信、梅田 泉、藤井博史、網内系クリアランスが迅速である放射性核種封入リポソームを用いた診断治療一体化技術の検討、第 15 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、口演、2015/9/12、京都勧業館「みやこめっせ」（京都府京都市）

Izumi O. Umeda, Ken Ito, Shusei Hamamichi, Makoto Asano, Masao Iwata, Junji Matsui, Yusaku Hori, Yasuhiro Funahashi, Hirofumi Fujii, Predictive Estimation of Therapeutic Effects of Liposomal Anti-cancer Agents by SPECT/CT Imaging of Radiolabeled Liposomes in Mouse Xenograft Models, World Molecular Imaging Congress 2015, poster, 2015/9/3, Hawaii Convention Center (Honolulu (USA))

伊藤 憲、濱道修生、浅野 誠、堀 優作、岩田正夫、松井順二、船橋泰博、梅田 泉、藤井博史、放射性核種内包リポソームを用いた分子イメージング手法によるリポソーム化抗がん剤の薬効予測法の開発、第 10 回日本分子イメージング学会・学術集会、口演・ポスター、2015/5/21、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

Shusei Hamamichi, Yuki Matsuura, Kazunobu Ohnuki, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, <sup>111</sup>In-ethylenedicycysteine Liposomes with High Tumor Accumulation and Rapid Background Clearance in a Human Cancer Xenograft Model, 第 10 回日本分子イメージング学会・学術集会、ポスター、2015/5/21、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

21 藤井博史、梅田 泉、濱道修生、放射性核種を利用した診断治療一体化がん診療、第 10 回日本分子イメージング学会・学術集会、シンポジスト、2015/5/21、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ncc.go.jp/jp/epoc/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅田 泉 (UMEDA, Izumi O.)  
国立がん研究センター・先端医療開発センター・機能診断開発分野・ユニット長  
研究者番号：40160791

### (2) 研究分担者

藤井 博史 (FUJII, Hirofumi)  
国立がん研究センター・先端医療開発センター・機能診断開発分野・分野長  
研究者番号：80218982

秋元 哲夫 (AKIMOTO, Tetsuo)  
国立がん研究センター・東病院・副院長、放射線治療科長  
研究者番号：10261851

高橋 秀依 (TAKAHASHI, Hideyo)  
帝京大学・薬学部・教授  
研究者番号：10266348  
(平成 28 年度より連携研究者)

### (3) 連携研究者

吉野 孝之 (YOSHINO, Takayuki)  
国立がん研究センター・東病院・外来、病棟医長  
研究者番号：20469969

栗原 宏明 (KURIHARA, Hiroaki)  
国立がん研究センター・中央病院・放射線診断科・医長  
研究者番号：20264674

濱道 修生 (HAMAMICHI, Shusei)  
国立がん研究センター・先端医療開発センター・機能診断開発分野・特任研究員  
研究者番号：60721686