

令和元年9月9日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05395

研究課題名(和文) がんのラジオセラノスティックスを達成するための自己組織化ナノデバイスの開発

研究課題名(英文) Development of self-assembled nanodevices for cancer-targeted radiotheranostics

研究代表者

向 高弘 (Mukai, Takahiro)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30284706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体適合性が高くかつ細胞移行性に優れた自己組織化ナノ粒子製剤の分子設計を応用し、がんの分子イメージングと同時に治療を可能とするセラノスティックナノデバイスを開発した。すなわち、がんの診断薬あるいは治療薬のキャリアとなるコア(デンドリマー、リポソーム、金ナノロッド)に、静電的相互作用を介して、がんへの標的指向性を有するアニオン性ポリマーを被覆した自己組織化ナノ粒子を合成し、それが標的となるがん細胞・組織へ高く集積し、また、がん治療の可能性を示したことから、セラノスティクスプローブとしての有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己組織化ナノ粒子は、診断薬や治療薬のキャリアとなるコア成分および被膜を構成するアニオン性高分子の種類を変えることで、多岐に渡るプローブ設計が可能となる。本研究にて得られた成果は、生体分子イメージング領域のみならず、生命現象の解明や病態機能診断分野、がん治療分野に新たなブレークスルーをもたらすものと考えられる。また、高い診断精度に基づく治療の最適化、患者負担の軽減、医療経済効果に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：On the basis of our drug design of self-assembled nanoparticle probes which show high biocompatibility and high cellular uptake, we developed new theranostic nanoprobe useful for cancer-targeted molecular imaging and therapy. We synthesized self-assembled nanoparticles by coating core component (dendrimer, liposome, and gold nanorod) with various anionic polymers targeting cancers. Since these probes highly accumulated in the target cancer cells/tissues, and had a potential for cancer therapy, we demonstrated the effectiveness of these probes as cancer-targeted theranostics probes.

研究分野：放射線科学、物理系薬学

キーワード：薬学 放射線 癌 ナノ材料

## 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤治療 (Therapeutics) と診断 (Diagnostics) を合わせたセラノスティックス (Theranostics: 治療的診断法) は、これからのがん療法において新たな概念として期待されている。しかし抗がん剤の問題点の一つは、薬物を細胞膜を通過させ個々のがん細胞内の標的部位へ到達させるという厳密な薬物送達が必要なことである。一方、放射性医薬品を用いる内用放射線治療では、放射線が強い細胞殺傷作用をもち、かつ、その効果のある一定の範囲まで (飛程: 数 mm 以下) 及ぼすことができるため、放射性化合物を標的細胞周辺に集積させることにより、その放射線の飛程内のすべての標的細胞を一挙に死滅させることが期待される (crossfire effect)。したがって、標的へのデリバリーの面では、通常の抗がん剤と比較して、内用放射線治療薬剤の方が克服すべき障壁が少ないと考えられる。このような内用放射線治療薬剤を用いる治療法は、i) 放射性化合物が存在している間は連続的に細胞へ放射線を照射することになるため、効果が大きく、一回の投与で長期間の治療効果が期待できること、ii) 依存性や耐性などがおこらないこと、iii) 外来での治療が可能であることから、より効果的な治療と共に、患者の在宅診療に対する願望を満たし、QOL の向上に繋がることが期待される。

我々はこれまでに、生体適合性が高く、大量生産や保存が可能な分子イメージング用ナノ粒子の開発を目的に、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) をはじめとするアニオン性高分子の性質に着目して研究を行ってきた。その中で、ポリアミドアミンデンドリマー (G4) をコアとし、そこにキレート試薬である DTPA を導入後、 $^{111}\text{In}$  標識し、ポリエチレンイミン (PEI)、 $\gamma$ -PGA と自己組織化させることにより、 $^{111}\text{In}$  標識  $\gamma$ -PGA 被覆ナノ粒子 ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/PEI/ $\gamma$ -PGA) を再現性良く作製することに成功した (抗原または薬物送達複合体, WO2011/105520)。このナノ粒子製剤は、アニオン性を示し、細胞と静電的に反発するため細胞毒性が低いにもかかわらず、細胞への高い集積性を示した。また、ラット foot pad に投与したところ、膝窩リンパ節へ高く集積し、その SPECT イメージングに成功してきた。

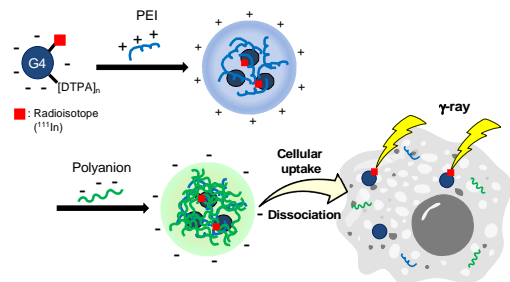
## 2. 研究の目的

以上の背景より、研究代表者は、本ナノ粒子製剤における特徴、即ち、生体適合性および細胞移行性が高いこと、混和するのみで種々の分子を自己組織化できること、に着目し、本製剤設計をがんの分子イメージングと同時に内用放射線治療を可能とする新規概念、ラジオセラノスティックス (Radiotheranostics) へと展開することを計画した。

## 3. 研究の方法

### 3-1. デンドリマーをコアとする自己組織化ナノ粒子の開発

本研究では、がん診断を目的としたプローブを開発するにあたり、メラノーマ細胞への取込みが報告されている  $\gamma$ -PGA、 $\gamma$ -PGA と同様にメラノーマ細胞へ取込まれ、抗炎症作用および抗がん作用を持つと報告されている Chondroitin Sulfate A (CS)、がん幹細胞マーカーである CD44 に結合性を示すヒアルロン酸 (HA)、炎症組織の血管内皮細胞に高発現する P-セレクチンへの結合性を示すフコイダン (FD) に注目した。いずれもアニオン性ポリマーであり、がん組織への標的指向性が期待される。そこで本研究では、イメージングシグナル放出素子である放射性同位元素を導入可能な G4 に着目し、その誘導体をコアとする、PEI およびアニオン性ポリマー ( $\gamma$ -PGA、CS、HA、FD) からなる放射性標識自己組織化ナノ粒子作製し、がんの核医学イメージングプローブとしての有用性を評価した (右図)。



#### 3-1-(1) DTPA-G4/PEI/ポリアニオン複合体および $^{111}\text{In}$ 標識ポリアニオン複合体の作製

5% グルコース溶液中にて DTPA-G4 と PEI (分子量: 25 kDa) を混合し、15 分間室温でインキュベートすることで DTPA-G4/PEI 複合体 (PEI 複合体) を作製した。また、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4 を用いて同様に作製することで  $^{111}\text{In}$  標識 PEI 複合体を得た。さらに、PEI 複合体をアニオン性ポリマーと混合し、15 分間室温でインキュベートすることで、ポリアニオン複合体、 $^{111}\text{In}$  標識ポリアニオン複合体をそれぞれ作製した。得られた複合体の粒子径とゼータ電位は、Zetasizer Nano ZS (Malvern 社) で測定した。

#### 3-1-(2) 細胞取込み能評価および細胞傷害性評価

得られた  $^{111}\text{In}$  標識 CS 複合体を B16-F10 細胞に添加し、37 度でインキュベートした後、細胞内に取込まれた放射能を測定し、単位タンパク質量あたりの取込み割合 (%dose/mg protein) として算出した。また、細胞取込み機構を評価するため、 $^{111}\text{In}$  標識複合体とともに各種エンドサイトーシス阻害剤あるいは CS を同時添加し、取込み量を評価した。細胞障害性については、マウスマクロファージ RAW264 細胞に各複合体を添加後、WST-8 試験液を用いて評価した。

### 3-1-(3) 生体内放射能分布評価

マウス (ddY 系、雄性、5 週齢) に  $^{111}\text{In}$  標識 CS 複合体 (1  $\mu\text{g}$  DTPA-G4/0.5  $\mu\text{Ci}$ ) を尾静脈より投与し、10、30 分、1、3、6、24 時間後の各時点で、イソフルラン麻酔下、心臓より血液を採取することにより安楽死させた。脾臓、膵臓、胃、小腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉、骨を摘出し、それぞれの湿重量測定、 $\gamma$ カウンタによる放射能測定を行った。放射能集積は、組織 1 g 当たりの投与量に対する割合 %ID/g (% injected dose/g) と、組織当たりの投与量に対する割合 %ID/organ (% injected dose/organ) として算出した。

また、B16F10 細胞を用いて、メラノーマの肺転移モデルマウスを作製し、 $^{111}\text{In}$  標識  $\gamma$ PGA 複合体を投与した。生体内放射能分布を上記の方法に従って評価した。

## 3 - 2 . リポソームをコアとする自己組織化ナノ粒子の開発

自己組織化ナノ粒子において、がん病変部位に抗がん剤を効率良く送達するためには、粒子コアに抗がん剤を効率良く封入できるキャリアを選択する必要がある。本研究では、リポソームの利用を考え、カチオン性リポソームの表面にがん指向性を有するアニオン性ポリマー (CS、ヒアルロン酸 (HA)) を静電的相互作用により結合させる新たな設計概念の基、新規放射性標識プローブの開発を実施した。

### 3-2-(1) 放射性標識カチオン性リポソームをコアとするアニオン性自己組織化ナノ粒子の合成

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)、1,2-stearoyl-3-trimethylammonium-propane (DSTAP)、cholesterol を用いて逆相蒸発法によりカチオン性リポソームを作製した。粒子径やゼータ電位などの物理化学的性質を基に最適な脂質組成を決定した。続いて、トランスキレーション法を用いて、別途調製した  $^{111}\text{In}$ -oxine と反応させることにより、 $^{111}\text{In}$  標識カチオン性リポソームを合成した。放射化学的純度は、サイズ排除カラムを用いて分析した。続いて、 $^{111}\text{In}$  標識カチオン性リポソームと CS あるいは HA を種々の割合で混合して、自己組織化ナノ粒子を合成した。

### 3-2-(2) CS、HA 被覆放射性標識カチオン性リポソームの細胞取込み評価

3-1-(2)と同様の方法で評価した。なお、HA 被覆自己組織化ナノ粒子については、CD44 陽性 T24 細胞および CD44 陰性 MCF-7 を用いて検討した。

### 3-2-(3) CS 被覆放射性標識カチオン性リポソームの体内分布評価

3-1-(3)と同様の方法で評価した。

### 3-2-(4) $^{111}\text{In}$ 標識ナノディスクの合成および体内分布評価

リポソームを利用した場合、粒子サイズが大きく、体内において細網内皮系による取込みが増大する可能性が考えられたため、HDL を模倣した細網内皮系回避型脂質ナノディスクの  $^{111}\text{In}$  標識体を新たに合成し、3-1-(3)の方法に従い、健常マウスにおける体内放射能分布を評価した。

## 3 - 3 . 金ナノロッド (GNR) をコアとする自己組織化ナノ粒子の開発

GNR は、棒状の構造を有し、光超音波イメージングプローブとしての有用性が近年示されている。また、近赤外光の照射により発熱する性質を持つことから、光熱療法への応用が期待されている。本研究では、カチオン性 GNR に、アニオン性ポリマーである CS を静電的相互作用により被膜させた自己組織化ナノ粒子を新たに設計・合成し、がんの光熱療法用薬剤としての有用性を評価した。

### 3-3-(1) CS 被覆 GNR の合成

粒子表面に TMU 基を有する GNR と CSA を電荷比 1 : 2.5 で反応させることにより、粒子 (GNR-CS) を形成させた。粒子サイズおよびゼータ電位を測定した。

### 3-3-(2) GNR-CS の細胞取り込み評価

3-1-(2)と同様の方法で、GNR-CS を B16-F10 細胞に添加し、1、3、6 時間インキュベートした。細胞内に取り込まれた GNR は、細胞溶解液の吸光度を測定することにより算出し、%dose/mg protein として結果を算出した。

### 3-3-(3) 細胞障害性評価

B16-F10 細胞に GNR-CS を取り込ませた後、細胞をチューブに回収し、近赤外レーザー光 (808 nm、2 W/cm<sup>2</sup>) を 5 分間照射した。照射後の細胞の温度変化をサーモグラフィにより観察した。また、培養プレート上で GNR-CS を取り込ませた B16-F10 に近赤外光 (4 W/cm<sup>2</sup>) を 10 分間照射し、その 1.5 時間後に Live/Dead Cell Staining Kit を用いて細胞の静止判定を行った。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. デンドリマーをコアとする自己組織化ナノ粒子の開発

###### 4-1-(1) ポリアニオン複合体の作製

粒子径、ゼータ電位の測定結果に基づき、DTPA-G4/PEI/ポリアニオンの電荷比が 1:8:8~32 となるよう反応させることにより、安定したポリアニオン複合体が作製できた。同じポリアニオン量で  $^{111}\text{In}$  標識ポリアニオン複合体を作製したところ、いずれの粒子もサイズは約 30~50 nm、ゼータ電位は約 -50 mV となり、セルロースアセテート膜電気泳動でも表面電荷が負電荷の単一の粒子であることを確認した。また、放射化学的純度は 90% 以上であった。

###### 4-1-(2) $^{111}\text{In}$ 標識複合体のがん細胞取込み評価および細胞傷害性評価

B16-F10 における各  $^{111}\text{In}$  標識複合体の取り込み実験を行い、細胞内の放射能を経時的に測定した。 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4 は細胞内へほとんど取り込まれないが、これを PEI で被覆することにより、細胞内への取り込みは有意に増加した。また、CS 複合体もアニオン性被膜による取り込みの低下は見られず、PEI 複合体と同等以上に高く取り込まれた。

$^{111}\text{In}$  標識 CS 複合体は分子サイズが大きいため、エンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれている可能性が高いと考えた。そこで、各種エンドサイトーシス阻害剤を用いて、これらの阻害剤の共存下での取り込み量の変化を評価した。いずれの阻害剤においても control 群と有意な差が見られなかったことから、CS 複合体の B16-F10 に対する別の取り込み経路の関与が示唆された。一方、CS 共存下で  $^{111}\text{In}$  標識 CS 複合体を細胞へ添加し、細胞内取込み量を測定した。CS 濃度が 100  $\mu\text{M}$  のときに CS 複合体の細胞内への取り込みが有意に減少した。また、CS 濃度依存的に抑制された。以上より、CS 複合体の B16-F10 への取り込みにおいて、CS 特異的な輸送経路の関与が示唆された。

続いて、細胞傷害性評価のために、RAW264 に各複合体を添加した結果、PEI 複合体は濃度依存的に高い細胞傷害性を示したが、CS 複合体は G4-DTPA の濃度が高くなっても 50% 程度の傷害性しか示さなかった。したがって、アニオン性高分子である CS を用いて複合体の表面をアニオン性にすることで、細胞膜との相互作用を弱めることができ、細胞毒性を低減することができたと推察された。

###### 4-1-(3) 生体内放射能分布評価

CS 複合体の健常マウス静脈内投与時における放射能の体内分布評価を行った。血中濃度は時間とともに低下しており、3 時間後にはほぼ消失していた。また、脾臓・肝臓・肺といったマクロファージが豊富に存在している組織への集積が高かった。よってこれらの組織への取り込みはマクロファージが関与している可能性が考えられた。しかし、肺において複合体投与直後は高い集積が見られたが、時間とともに減少していることから、脾臓や肝臓と異なり、一度集積してもほかの臓器へ複合体が流れ出ている可能性が考えられた。仮に、肺にがんが転移したとすれば、がん組織は血管透過性が亢進していることと、リンパ系が未発達であることより、正常肺より肺がんが高く集積し、高い放射能を維持し続けるのではないかと考えた。したがって、核医学イメージングを想定した際に、肺転移がんをコントラスト良く観察できることが期待された。そこで、 $^{111}\text{In}$  標識  $\gamma$ PGA 複合体のメラノーマ肺転移モデルマウスにおけるがん集積性を評価した結果、正常肺に比べて、がん組織への高い集積性を示した。

##### 4-2. リポソームをコアとする自己組織化ナノ粒子の開発

###### 4-2-(1) 放射性標識カチオン性リポソームをコアとするアニオン性自己組織化ナノ粒子の作製

カチオン性リポソームの脂質組成をモル比 DSPC:DSTAP:Cholesterol = 8:2:5 としたとき、粒子径約 50~60 nm、ゼータ電位約 +30~50 mV の安定した粒子を作製できた。 $^{111}\text{In}$  標識においては、放射化学的純度が 90% 以上であった。また CS および HA と混合した際に、粒子径約 60~90 nm、ゼータ電位約 -30~50 mV となったことから、アニオン性ポリマーにより被覆できていると考えられた。

###### 4-2-(2) CS、HA 被覆放射性標識カチオン性リポソームの細胞取込み評価

B16-F10 における  $^{111}\text{In}$  標識カチオン性リポソームおよび CS 被覆粒子の取り込み実験を行い、細胞内の放射能を経時的に測定した。CSA 被覆粒子は表面電荷が負であるにもかかわらず、カチオン性リポソームと同等以上に細胞に取込まれた。また HA 被覆粒子は、CD44 陰性細胞 MCF7 よりも CD44 陽性細胞 T24 に高く取り込まれた。

###### 4-2-(3) CS 被覆放射性標識カチオン性リポソームの体内分布評価

CS 被覆放射性標識カチオン性リポソームのマウス静脈内投与時における放射能の体内分布評価を行った。投与 1 時間後で血中からほぼ消失しており、脾臓・肝臓への集積が高かった。また、 $^{111}\text{In}$  標識カチオン性リポソームと比較して CS 被覆放射性標識カチオン性リポソームの

集積はほとんどの組織において低かったが、脾臓でのみ高かった。

#### 4-2-(4) <sup>111</sup>In 標識ナノディスクの合成および体内分布評価

1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine とスチレンマレイン酸共重合体 (SMA) から構成される粒子径約 8~10 nm の SMA ナノディスクを作製し、<sup>111</sup>In 標識を行った。<sup>111</sup>In 標識 SMA ナノディスクは、POPC リポソームと比較して血中滞留性が向上し、脾臓への集積が低下した。以上より、SMA ナノディスクはリポソームで問題となっていた細網内皮系への集積を低減できると考えられ、新たなコア粒子としての応用が期待された。

### 4 - 3 . 金ナノロッド (GNR) をコアとする自己組織化ナノ粒子の開発

#### 4-3-(1) GNR-CS の合成

GNR と CS の電荷比が 1 : 2.5 となるように反応させた結果、粒子サイズ約 35 nm、ゼータ電位 - 25 mV のアニオン性粒子の合成に成功した。また、得られた GNR-CS 溶液に近赤外レーザー光を照射した結果、GNR 濃度に依存した発熱を認めた。

#### 4-3-(2) GNR-CS の細胞取り込み評価

GNR-CS の B16-F10 細胞に対する取り込みを評価した結果、経時的に高く取り込まれ、アニオン性の GNR と比較して約 50 倍高い取り込みを認めた。負に帯電する細胞膜との相互作用により細胞に高く取込まれたカチオン性 GNR と比較しても、GNR-CS は B16-F10 細胞へ高く取込まれた。

#### 4-3-(2) GNR-CS の細胞障害性評価

GNR-CS 添加群 (近赤外光照射なし)、近赤外光照射群 (GNR-CS 添加なし) では、メラノーマ細胞にほとんど傷害を与えなかったのに対し、GNR-CS 添加と近赤外光照射を組合せた群において生存率が有意に低下することが明らかとなったことより、がんの光熱治療の可能性を示した。

以上、本研究では、 dendrimer、リポソーム、GNR をコアとし、静電的相互作用を介してアニオン性自己組織化ナノ粒子を開発した。これらの粒子を構成する成分は概ね生体適合性が高く、計画どおり水溶液中で混和するのみで自己組織化した。また、粒子は負に帯電しているにもかかわらず、細胞へ高く取込まれた。特に、 dendrimer あるいはリポソームをコアとした場合、<sup>111</sup>In による標識が可能であり、今後 <sup>90</sup>Y 標識体を用いた検討を進めることで治療効果の評価を行う予定である。また、GNR をコアとした場合、近赤外光の照射に伴って生じる熱を利用することで、がん細胞に傷害を与えることに成功した。このことから、本製剤設計が、がんのセラノスティクス薬剤の開発に有効である可能性を示したと考える。

### 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)

J Label Compd Radiopharm. 61, 87-863 (2018)

Masafumi Tanaka, Akira Hosotani, Takahiro Mukai

Indium-111 labeling of high-density lipoprotein-mimicking phospholipid-styrene maleic acid copolymer complexes and its biodistribution in mice.

Biol Pharm Bull. 40(3), 297-302 (2017)

Masayori Hagimori, Eri Hatabe, Kohei Sano, Hiroataka Miyazaki, Hitoshi Sasaki, Hideo Saji, Takahiro Mukai

An activatable fluorescent  $\gamma$ -polyglutamic acid complex for sentinel lymph node imaging.

[学会発表] (計 10 件)

第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会

(2018 年、10 月、姫路)

三木麻友美、佐野紘平、田中寿枝、宗兼将之、山崎俊栄、向 高弘

がんの光熱治療を目的としたコンドロイチン硫酸被覆金ナノロッドの開発

World Molecular Imaging Congress 2018

(2018 年、9 月、Seattle)

Kohei Sano, Mayu Kinugasa, Toshie Tanaka, Hiroataka Miyazaki, Takahiro Mukai

Radiolabeled chondroitin sulfate A complex as a tumor-targeted nanoparticle probe for nuclear imaging

第 16 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2018)  
(2018 年、9 月、三浦)  
田中寿枝、佐野紘平、宗兼将之、山崎俊栄、向高弘  
<sup>111</sup>In 標識  $\gamma$ -ポリグルタミン酸被覆ナノ粒子の肺転移メラノーマ核医学診断用プローブとしての有効性  
評価

第 28 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2018)  
(2018 年、6 月、仙台)  
Masayuki Munekane, Kohei Sano, Toshihide Yamasaki, Takahiro Mukai  
Preparation and characterization of chondroitin sulfate-coated liposome for cancer theranostics

第 67 回 薬学会近畿支部総会・大会  
(2017 年、10 月、神戸)  
衣笠真由、佐野紘平、向高弘  
がんの核医学診断を目的としたコンドロイチン硫酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発

第 27 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2017)  
(2017 年、6 月、東京)  
Toshie Tanaka, Kohei Sano, Mayu Kinugasa, Mayumi Miki, Hiroataka Miyazaki, Hitoshi Sasaki,  
Takahiro Mukai  
Development of <sup>111</sup>In-labeled self-organized nanoparticle probe for diagnosis of lung-metastatic cancer

第 55 回日本薬学会中国四国支部学術大会  
(2016 年、11 月、岡山)  
香本祥汰、萩森政頼、向高弘、上田真史  
核磁気共鳴画像法による卵巣癌診断能の向上を目的とした自己組織化ナノ粒子プローブの開発

第 16 回放射性医薬品・画像診断薬研究会  
(2016 年、10 月、京都)  
香本祥汰、萩森政頼、向高弘、上田真史  
葉酸受容体を標的とした自己組織化ナノ粒子 MRI プローブの合成と基礎評価

第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会  
(2016 年、10 月、高槻)  
樋口真理子、萩森政頼、向高弘  
フコイダン被覆自己組織化ナノ粒子によるがん細胞の傷害性の検討

第 11 回日本分子イメージング学会  
(2016 年、5 月、神戸)  
森山理央、萩森政頼、千石梓、向高弘  
がんの核医学及び蛍光イメージングを目指したヒアルロン酸被覆ナノプローブの開発とがん細胞への集積性の検討

〔産業財産権〕  
該当なし

〔その他〕  
ホームページ  
<https://www.kobepharma-u.ac.jp/biophys/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：田中 将史  
ローマ字氏名：Masafumi Tanaka

研究協力者氏名：萩森 政頼  
ローマ字氏名：Masayori Hagimori