

令和元年9月9日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06256

研究課題名（和文）熱による放射性薬剤の送達制御に基づく腫瘍特異的小線源療法および内用療法の開発

研究課題名（英文）Development of tumor-specific brachytherapy and internal radiotherapy by controlling delivery of radiopharmaceuticals into tumor tissues with heat

研究代表者

佐野 紘平（Sano, Kohei）

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00546476

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、治療用¹²⁵I-線放出核種の高い腫瘍集積性と正常組織における不必要な被曝の低減を同時に達成しうる新たな小線源療法及び内用療法を確立することを目的として、熱をトリガーとして凝集するポリマー（ポリオキサゾリン；POZ）の化合物群を合成し、その放射標識体について、インビボにおける腫瘍選択的な熱制御により、腫瘍特異的な集積性および腫瘍縮小効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射性標識熱応答凝集性ポリマーの投与と腫瘍部位の加温を組み合わせることにより、腫瘍部位選択的な高い治療効果を達成できたことより、熱応答凝集性ポリマーを基盤とする新たな小線源療法および内用療法の構築に成功したものとする。これにより、がん治療法の選択肢が増え、効果的かつ安全性の高い治療実施推進により、治療効果の向上のみならず、医療経済効果への寄与が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to establish brachytherapy and internal radiotherapy where high tumor uptake of ¹²⁵I-ray-emitting radionuclide and low radiation to normal tissues can be simultaneously achieved. We synthesized radiolabeled polyoxazolines (POZ) which can thermoresponsively self-aggregate above their lower critical solution temperature (LCST). These probes were highly accumulated in the tumor and showed marked anti-tumor effect in vivo by combination with tumor-selective heating.

研究分野：放射線科学

キーワード：核医学 放射性医薬品 がん治療

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。病巣への選択的なプローブ送達認められた場合、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。

プローブを用いる放射線治療法は、密封小線源を用いる密封小線源療法と非密封 RI を用いる内用療法に大別される。密封小線源療法は治療用線源が内包されたチタン製カプセルを腫瘍組織およびその近傍に留置することで、特に前立腺がんに対して、高い抗腫瘍効果が期待できる。しかし、密封小線源のサイズが小さいため、留置操作が煩雑であり、また、治療後に線源を除去するケースがある等の問題を抱えている。一方、内用療法としては、 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、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) をがんに送達させる例が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により、血液毒性などの重篤な副作用も数多く報告されている。放射線治療用薬剤には、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。

上記の背景の下、申請者はこれまでに、体内から比較的速やかにクリアランスされ、かつ、熱に応答して凝集する特長を有する水溶性ポリマー(ポリオキサゾリン:POZ)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・滞留させる手法を考え、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てきた。オキサゾリン誘導体の構造ごとに凝集温度(下限臨界溶液温度)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という知見をもとに、申請者は、種々の凝集温度を示す POZ 誘導体の合成法を構築し、それらの放射性標識体 (^{111}In 、 ^{90}Y) の合成に成功してきた。また、正常マウスにおける生体内分布を評価し、熱に応答した挙動(体温より凝集温度の低い POZ 誘導体は、高分子化合物の集積しやすい肝臓や脾臓に高い集積を認めた)を示すことを確認した。そこで本研究課題では、 ^{90}Y 標識 POZ 誘導体について、熱による送達制御に基づく小線源療法用薬剤および内用療法用薬剤としての有用性を証明すべく、以下に示す 3 つの治療戦略による評価を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、治療用 β -線放出核種の高い腫瘍集積性と正常組織における不必要な被曝の低減を同時に達成しうる新たな小線源療法および内用療法を確立することにある。つまり、熱をトリガーとして凝集する化合物群を構築し、その放射性標識体について、インビボにおける腫瘍選択的な熱制御により、高い腫瘍集積性及び腫瘍縮小効果の達成を目指す。凝集前の化合物群は比較的速やかな生体クリアランスを示すように設計することにより、副作用の軽減につながることから、上記に示す目的を達成できるものと考えられる。

熱に応答して凝集する特性を持つ ^{90}Y 標識 POZ 誘導体について、腫瘍特異的な内用療法用薬剤としての有効性を、以下の 3 つのがん治療ストラテジにより評価した。

(1) 小線源療法への適用:

従来の密封小線源療法は、線源となるチタン製カプセルのサイズが非常に小さいため留置操作が煩雑であり、また、治療後に線源を除去するケースがあるなどの問題を抱えている。本研究では、体温条件下で凝集する POZ 誘導体を利用し、その ^{90}Y 標識体についてインジェクタブル小線源療法用薬剤としての有用性を評価した。POZ 誘導体は生体適合性が高く、投与処置が簡易であり、腫瘍内での凝集を介して長期に亘る治療効果が期待された。

(2) 温熱療法との併用療法(若手研究(B)の継続研究)

温熱療法が適用される約 42~43°C で凝集する POZ 誘導体を利用した。体温では凝集せず、尿中に速やかにクリアランスされるため、不必要な被曝の低減を達成する一方、温熱療法を利用して腫瘍への特異的な集積性の向上を目指した。温熱療法と内用療法の相乗治療効果が期待できた。

(3) 近赤外光照射による局所発熱を利用した腫瘍特異的治療法

(1) (2) では、腫瘍の存在部位が明らかで、かつ、腫瘍を選択的に加温できる場合においてのみ利用可能である。存在部位の不明ながんを対象とした治療法を確立するために、まず(a) 金属粒子(金ナノロッド; GNR)を投与し、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果に

より腫瘍へ集積させる。(b) 光超音波イメージング等の方法により、腫瘍の存在部位が明らかになるため、がんの摘出手術が可能となるのみならず、(c) 残存腫瘍部位においても、GNR が近赤外光照射後の無輻射過程により生じる熱を利用して、(d) 二次投与された⁹⁰Y 標識 POZ 誘導体の積極的な集積を達成し、がんの根治を目指した、診断から治療への新たなワークフローを構築できる可能性があると考えた。サイズが小さく、存在部位の不明な腫瘍に対し、効果を発揮することが期待された。

3. 研究の方法

A. インジェクタブル小線源療法用薬剤としての有効性評価

A-1. 腫瘍内滞留性評価

これまでに、側鎖にイソプロピル基とプロピル基が2:3の割合で導入されたPOZ誘導体が、25°Cで凝集することを確認してきた。また、キレート剤であるDOTAを介して¹¹¹Inおよび⁹⁰Yにて標識したプローブの合成を完了してきた。本研究では、小線源療法の代表適用疾患である前立腺がんを移植したマウスを作製し、腫瘍内に投与されたプローブがどの程度の期間、組織内に保持されるかを評価し、投与するプローブの分子量や濃度について最適な条件を探った。また、腫瘍組織内の放射能局在についてオートラジオグラフィ法により調べた。

A-2. 治療実験

A-1の結果に基づき設定した条件にて治療実験(腫瘍サイズ測定、生存率の算出)を進めた。非標識ポリマー投与群等との比較により、インジェクタブル小線源療法用薬剤としての有効性を示した。放射エネルギーに応じた治療効果について評価した。副作用評価として体重測定及び組織切片の病理学的評価を実施した。

B. 温熱療法との併用療法

B-1. 温熱療法との併用によるPOZの腫瘍集積性評価

これまでに、側鎖にエチル基とイソプロピル基が約1:5の割合で導入されたPOZ誘導体(凝集温度:約38°C)について、¹¹¹In標識体の合成に成功してきた。担がんマウスにプローブを静脈内投与し、温熱療法併用下での腫瘍集積性について評価した。温熱療法の手技としては、皮下移植腫瘍を恒温槽にて温める方法を選択した。加温処置停止後のプローブの腫瘍内滞留性についても、時間依存性を調査した。

さらに、別途蛍光(FITC)標識POZ誘導体を合成し、POZ誘導体のがん組織内分布についてプローブ型インピボ共焦点顕微鏡を用いて評価した。

B-2. 温熱療法との併用による⁹⁰Y標識POZの抗腫瘍効果および副作用の評価

B-1における体内動態評価の結果に基づき、適切な投与放射エネルギーを設定した。腫瘍移植マウスを用いて、温熱療法との組み合わせによる治療実験を行い、温熱療法単独あるいは⁹⁰Y標識POZ単独投与群等との比較により、本法の腫瘍特異的内用療法としての有効性を評価した。加えて、体重および血球数測定により副作用評価を実施した。

C. 近赤外光照射による局所発熱を利用したプローブの腫瘍特異的集積および治療効果

C-1. 蛍光色素標識POZ誘導体の設計、合成および物性評価

Bと同様に約38°Cで凝集するPOZ誘導体を利用した。まず、光吸収体として金属粒子(GNR)を選択し、その水溶液に近赤外レーザー光(波長:808nm)を用いて光照射することにより、溶液の温度上昇を評価し、凝集温度以上で凝集が起こるかどうかを評価した。GNR濃度、照射強度、凝集までに要する時間についても併せて評価した。

C-2. ¹¹¹In標識POZ誘導体を用いる、近赤外光照射併用下での腫瘍集積性評価

C-1におけるインピトロ評価の結果に基づき、マウスへのGNRの投与量を決定した。続いて、マウスへの近赤外光照射の実施下において、¹¹¹In標識POZの腫瘍および周辺の正常組織への集積性について評価した。光照射の間、腫瘍組織の温度変化をサーモグラフィにより評価した。なお、対照群として、非処置群、近赤外光照射群(GNR投与なし)およびGNR投与群(近赤外光照射なし)を設定した。

4. 研究成果

A. インジェクタブル小線源療法用薬剤としての有効性評価

側鎖にエチル基、イソプロピル基、イソプロピル-プロピル基、プロピル基を持ち、分子量が約20 kDaのEtPOZ、IspPOZ、Ipr-PrPOZ、PrPOZをそれぞれ合成し、続いてそれらの凝集温度を測定した結果、それぞれ70以上、34、25、19であった。Ipr-PrPOZおよびPrPOZは体温に近い温度(36-37)で加温すると1秒以内に凝集することを確認した。次に、¹¹¹In標識POZ誘導体を99%以上の高い放射化学的純度で得た後、それらをPC-3腫瘍組織内へ投与し、1日後の放射能滞留性を評価した結果、体温(麻酔下で約33-34)よりも低い凝集温度を持つIpr-PrPOZ(74%)およびPrPOZ(74%)は、EtPOZ(5.6%)およびIprPOZ(16%)と比較し

て有意に高く放射能が保持された。また、Ipr-PrPOZ の腫瘍内滞留性は分子量の増加に伴って増加し、20 kDa の化合物は、投与 7 日後においても腫瘍組織内に高く滞留すること (70%)、その腫瘍滞留性は投与濃度 (0.1 - 2.0 mM) には依存しないことを認めた。また、ex vivo オートラジオグラフィにより腫瘍内の放射能分布を調べた結果、¹¹¹In 標識 Ipr-PrPOZ の腫瘍内における局在化を認めた。そこで、⁹⁰Y 標識 Ipr-PrPOZ を合成し、それをを用いた治療実験を実施した結果、⁹⁰Y 標識 Ipr-PrPOZ は投与放射能依存的な腫瘍増殖抑制効果を示し、特に 3.7 MBq 投与群については治療開始 90 日後においても 50% 以上のマウスが生存した (非処置群および非放射性 POZ 投与群では 50 日以内にすべてのマウスが死亡した)。一方、体重の減少は認められず、また、正常組織 (肝臓、腎臓、脾臓) に対する傷害性について病理学的手法により評価したが、顕著なダメージは観察されなかった。

以上の結果を纏め、Journal of Nuclear Medicine 誌に論文報告した。

B. 温熱療法との併用療法

側鎖に Et 基および Ipr 基を持つオキサゾリンを用いて、分子量約 10、20、30 kDa の Et-IspPOZ を合成した。凝集温度を測定したところ、いずれも約 37 - 38 °C であった。次に、これらの ¹¹¹In 標識体を合成し、腫瘍組織内温度を約 40 - 41 °C に加温した際の腫瘍集積性について評価した。非加温時と比較して加温時の腫瘍集積性は、分子量が 20、30 kDa の場合に有意に増加した。一方、その腫瘍集積性は投与量 (4 - 40 nmol) には依存しなかった。加温時間については、30 分以上であれば加温による有意な腫瘍集積性の向上を認めたが、60 分間の加温によりさらに高い腫瘍集積性を達成した。

また、¹¹¹In 標識 Et-IprPOZ は、加温解除 3 時間後においても腫瘍に滞留していた。さらに、凝集温度が 51 °C になるように合成した Et-IprPOZ 誘導体と比較して有意に高く腫瘍へ集積したことから、POZ 誘導体の凝集作用を介して腫瘍へ高く集積することが示唆された。さらに、蛍光標識した Et-IprPOZ 誘導体は、加温時に腫瘍血管近傍に凝集体として存在していることが明らかとなった。これらの結果を纏めて、Molecular Pharmaceutics 誌に論文報告した。

さらに、⁹⁰Y 標識 Et-IprPOZ 誘導体を合成し、分子量が 20 kDa、投与量が 4 nmol、加温時間 60 分の条件で治療実験を実施した。その結果、非処置群、加温群、⁹⁰Y 標識 Et-IprPOZ 誘導体投与群と比較して、加温と ⁹⁰Y 標識 Et-IprPOZ 誘導体の投与を組み合わせた群で高い治療効果が示された。

C. 近赤外光照射による局所発熱を利用したプローブの腫瘍特異的集積および治療効果

GNR 水溶液を調製し、808 nm のレーザー光を照射した結果、GNR 濃度および照射光の強度に依存して GNR 溶液の温度上昇を認め、それに伴う POZ の凝集を確認した。マウスのがん組織に投与した GNR が 1 nM、照射光強度が 0.6 W/cm² の条件で、がん組織内温度は約 43 °C に上昇した。この条件で静脈内から投与された ¹¹¹In 標識 Et-IprPOZ (凝集温度 38 °C) は、非処置群、近赤外光照射群 (GNR 投与なし)、GNR 投与群 (近赤外光照射なし) と比較して有意に高い腫瘍集積性を示した。これらの結果より、GNR に対する光照射により生じる熱を利用して、POZ をがん組織へ効率良く送達できることを明らかとした。

以上、本研究では、熱に応答して凝集する特性を持つ (下限臨界溶液温度を有する) POZ を薬剤の母体として選択し、その放射性標識体について、(A) 小線源療法用薬剤および (B、C) 内用療法用薬剤としての有用性を評価した。(A) では、凝集温度を体温以下に設定した POZ 誘導体を利用し、その放射性標識体を腫瘍組織内に投与することで、高い放射能滞留性と治療効果を得ることに成功した。従来の小線源療法で利用されるカプセル型薬剤に替わる、利便性の高い薬剤として期待できる。(B、C) では、凝集温度を体温以上かつ温熱療法の適用温度 (42-43 °C) 以下に設定した POZ 誘導体を利用した。(B) では、実験的に温水で加温した腫瘍に、POZ が凝集作用を介して高く集積することを明らかにするとともに、高い治療効果が得られた。(C) では、近赤外光の照射に伴って GNR が生じる熱を利用することで、POZ を腫瘍部位に高く集積させることに成功した。近年、GNR を母体とするがんのセラノスティクス薬剤の開発が精力的に進められており、これと POZ を組み合わせる治療法を新たに提唱できたものと考えている。

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 4 件)

ACS Appl. Polym. Mater. 1, 953-958 (2019)

Kohei Sano, Ling Bao, Natsuka Suzuno, Kento Kannaka, Toshihide Yamasaki, Masayuki Munekane, Takahiro Mukai

Development of cancer-targeted single photon emission computed tomography/fluorescence dual

imaging probe based on polyoxazoline.

JSMI Report 11, 9-14 (2018)

佐野紘平

水溶性ポリマーを基盤とするがんのセラノスティックス薬剤開発

Mol. Pharm. 15, 3997-4003 (2018)

Kohei Sano, Yuko Kanada, Katsushi Takahashi, Ning Ding, Kengo Kanazaki, Takahiro Mukai, Masahiro Ono, Hideo Saji

Enhanced delivery of radiolabeled polyoxazoline into tumors via self-aggregation under hyperthermic conditions.

J. Nucl. Med. 58, 1380-1385 (2017)

Kohei Sano, Yuko Kanada, Kengo Kanazaki, Masahiro Ono, Hideo Saji

Brachytherapy with intratumoral injections of radiometal-labeled polymers that thermoresponsively self-aggregate in tumor tissues.

[学会発表](計 15 件)(国際学会 4 件、国内学会 11 件)

日本薬学会第 139 年会

(2019 年、3 月、千葉)

佐野紘平

水溶性高分子の物理化学的特性に基づくがんのセラノスティックス薬剤の創製

日本薬学会第 139 年会

(2019 年、3 月、千葉)

佐野紘平、石田有美、高橋勝史、水上達也、宗兼将之、山崎俊栄、向高弘

光反応性金ナノロッドと熱応答凝集性ポリマーを組み合わせた新規がん治療法の開発

The 10th China-Japan-Korea Symposium on Radiopharmaceutical Sciences

(2018 年、11 月、Xiamen)

Ling Bao, Kohei Sano, Natsuka Suzuno, Toshihide Yamasaki, Masayuki Munekane, Takahiro Mukai

Development of SPECT/Fluorescence dual imaging probe based on polyoxazoline derivative for detection of tumors.

The 10th China-Japan-Korea Symposium on Radiopharmaceutical Sciences

(2018 年、11 月、Xiamen)

Kohei Sano, Yuko Kanada, Katsushi Takahashi, Ning Ding, Toshihide Yamasaki, Masayuki Munekane, Masahiro Ono, Hideo Saji, Takahiro Mukai

Enhanced delivery of radiolabeled thermoresponsive polymers into tumors under hyperthermic conditions for internal radiotherapy.

第 58 回日本核医学会学術集会

(2018、11 月、沖縄)

佐野紘平、金田侑子、金崎健吾、丁寧、小野正博、佐治英郎

Brachytherapy with Intratumoral Injections of Radiometal-labeled Polymers that Thermo-responsively Self-aggregate in Tumor Tissues.

第 2 回日本核医学会分科会放射薬品科学研究会 / 第 18 回放射性医薬品・画像診断薬研究会

(2018、9 月、東京)

包玲、佐野紘平、鈴野菜都佳、山崎俊栄、宗兼将之、向高弘

ポリオキサゾリンを母体構造とするがんの核医学・蛍光デュアルイメージングプローブの開発

World Molecular Imaging Congress 2018

(2018 年、9 月、Seattle)

Kohei Sano, Yuko Kanada, Katsushi Takahashi, Ning Ding, Masahiro Ono, Hideo Saji, Takahiro Mukai

Cancer-targeted internal radiotherapy using radiolabeled polyoxazoline that self-aggregate under hyperthermic conditions.

医療薬学フォーラム 2018 / 第 26 回クリニカルファーマシーシンポジウム (2018、6 月、東京)

佐野紘平

熱応答凝集性ポリマーを基盤とした小線源療法用薬剤の開発

第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム

(2017 年、10 月、京都)

熱応答凝集性ポリマーを基盤とした小線源療法用薬剤の開発

佐野紘平、金田侑子、山田真智子、小野正博、佐治英郎、向高弘

第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会

(2017 年、10 月、神戸)

高橋勝史、佐野紘平、金田侑子、小野正博、佐治英郎、向高弘

熱応答凝集性ポリマーを母体とする新規内用放射線治療薬剤の腫瘍集積性評価

第 1 回日本核医学会分科会放射薬品科学研究会 / 第 17 回放射性医薬品・画像診断研究会

(2017 年、9 月、京都)

佐野紘平、金田侑子、高橋勝史、小野正博、向高弘、佐治英郎

ポリオキサゾリンを基盤とする内用放射線療法用薬剤の開発

日本薬学会第 137 年会

(2017 年、3 月、仙台)

金田侑子、佐野紘平、丁寧、小野正博、佐治英郎

放射標識熱応答凝集性ポリマーを用いる新規内用療法の開発

日本薬学会第 137 年会

(2017 年、3 月、仙台)

佐野紘平

水溶性ポリマーを母体とするがんの診断・治療用プローブの開発

第 32 回 日本 DDS 学会学術集会

(2016 年、7 月、静岡)

佐野紘平、金田侑子、金崎健吾、小野正博、佐治英郎

熱応答凝集性ポリオキサゾリンを基盤とする新規小線源療法用薬剤の開発

63rd the Society of Nuclear Medicine

(2016 年、6 月、San Diego)

Kohei Sano, Yuko Kanada, Kengo Kanazaki, Ning Ding, Masahiro Ono, Hideo Saji.

Brachytherapy using ⁹⁰Y-labeled thermoresponsive polymers that self-aggregated in tumor tissues.

〔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 なし