

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15316

研究課題名(和文) 光音響法に基づくがんのセラノスティックスに資する薬剤開発と革新的DDSへの展開

研究課題名(英文) Development of probes for cancer theranostics based on photoacoustic effect and application for innovative DDS

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：光音響法に基づく、がんの高感度光音響イメージングおよびがん治療を達成しうる分子プローブの創製を目的として、HER2に対するモノクローナル抗体であるトラスツズマブを結合させた、酸化鉄ナノ粒子内包リポソームを新たに合成し、評価を行った。電子顕微鏡での観察により酸化鉄ナノ粒子はリポソーム内に数多く封入されており、高感度な光音響シグナルを示すことを明らかとした。また、HER2陽性がん細胞に対してHER2特異的な結合性を示した。また、近赤外レーザー光照射に伴い、IONPの発熱効果も確認できたことから、がん治療用薬剤としての可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：In order to develop molecular probes enabling cancer-targeted photoacoustic imaging and cancer therapy, we newly synthesized trastuzumab (anti-HER2 monoclonal antibody)-conjugated liposome containing iron oxide nanoparticles (IONP) (Tra-IONP-liposome). The observation using transmission electron microscopy revealed many IONPs were encapsulated in the aqueous phase of liposomes. The Tra-IONP-liposome exhibited the intense photoacoustic signals, and could bind HER2-positive cancer cells HER2-specifically. Furthermore, this probe produced heat enough for cytotoxicity effect by irradiation of near-infrared light.

研究分野：分子イメージング、放射線科学

キーワード：ドラッグデリバリー 光音響 セラノスティックス

1. 研究開始当初の背景

蛍光プローブを用いる蛍光イメージング法は、光の低い生体透過性ゆえに、体表面およびその近傍しかイメージングできず、ヒトを対象とする臨床領域へ展開するためには、体深部まで検出可能な方法の開発が課題である。本研究では、光よりも生体組織透過性が高らかに高い近赤外レーザー光と超音波イメージング法を組み合わせた光音響イメージング法(図1)が有効であると考え、新規光音響分子プローブの創製を計画した。

代表者はこれまでに、酸化鉄ナノ粒子 (Iron oxide nanoparticles; IONP) を光音響シグナルユニットとして用いて、がんの悪性度にかかわる Epidermal Growth Factor Receptor 2 (EGFR2; HER2) を標的とした光音響プローブを開発し、その有用性を報告してきた (*Nanomedicine, NBM*, 11:2051-2060 (2016))。しかし、プローブの感度が比較的低く、十分な光音響シグナルを得るためにはプローブ量を増やして投与する必要があり、より高感度な光音響分子イメージングプローブの開発を計画した。

また、臨床において、診断と治療を別々ではなく、同時に行うことが出来れば効率的だと考えられ、またそれは個別化医療を可能とすることから、同一の化合物を用いて診断と治療を融合して行うセラノスティックス (Therapeutic + Diagnostic) 法の構築が希求されている。光音響プローブが音響シグナルを示す過程で生じる熱を利用すれば、その熱によるがん細胞の死滅を達成できるのではないかと考えた。(図1)

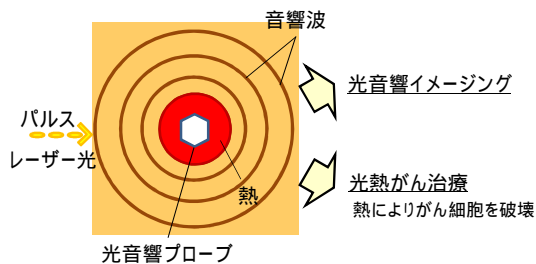


図1: 光音響システムの概要および診断・治療への展開

2. 研究の目的

光音響シグナルの高感度化を達成するために、代表者は光音響シグナルユニットの存在密度に着目した。近赤外光を吸収し、比較的強い光音響シグナルを示す金属ナノ粒子 (金ナノロッドおよび IONP (IONP については磁気共鳴画像への適用も可能)) を、リポソーム内水相に数多く (20 以上) 内包し、局所の金属ナノ粒子濃度を上昇させることで光音響シグナルの改善を狙った。また、リポソーム表面にがん標的抗体を付加した光音

響分子プローブを創製し、他に類を見ない、高感度な光音響分子イメージングを目指した (図2)。さらに、プローブが音響シグナルを示す過程で生じる熱を利用

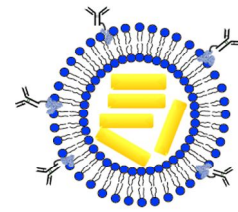


図2. 金属ナノ粒子内包リポソームの構造

すれば、がん細胞の死滅が期待できることから、本研究では、光音響法を治療へ展開すべく、生体に安全な近赤外光を利用して、光音響法に基づくがんの診断と治療を同時に達成可能な新たなセラノスティックス法の構築を目指した。

上記の目的を達成するために、本研究では、がんを標的とする光音響分子イメージングプローブおよび治療用薬剤の開発を以下のように達成する。医薬品化学・光量子学・薬物動態学的な観点から、モル吸光係数が高く、強い光音響シグナルを示し、かつがん組織集積性の高いがん分子イメージングに有効な光音響分子プローブを創製する。得られたプローブについて、がんのインビボ光音響イメージングの可能性を評価する。

において高いがん組織集積性および正常組織とのコントラストを示したプローブに関して、光照射により生じる熱を利用したがん治療の有効性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 金属ナノ粒子内包リポソームの合成および物理化学的特性評価

IONP 内包リポソームは以下の組成 [1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) 28.6 mol%、Cholesterol 32.6 mol%、Ganglioside GM3 30.5 mol%、Dicetyl phosphate (DCP) 4.1 mol%、1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine (DPPE) 4.2 mol%、Rhodamine-PE 0.1 mol%] で合成した。ミセル溶液に IONP 溶液を Fe 量として 350mg 添加した。

金ナノロッド内包リポソームについても、DPPC、Cholesterol、Ganglioside、DCP、EPPE からなるリポソームを合成した。

(2) 金属ナノ粒子内包リポソームの物理化学的特性評価

脂質定量は、0.125% SDS 存在下でコレステロール E-テストワコーを使用してコレステロールを定量し、コレステロールのモル数から総脂質モル数を算出して総脂質濃度として換算した。

鉄定量は、標準物質として、鉄粒子 (Fe 5mg/mL) を用いた。HEPES 緩衝液で段階希釈してスタンダードを作成した。リポソームも HEPES 緩衝液で希釈し、サンプル及びスタンダードをメタノール: クロロホルム=1:1 溶液で 10 倍希釈してリポソームを破壊後、

376nmの吸光度を測定した。

金ナノロッドの定量は、サンプルを精製水で希釈し、波長 790 nm の吸光度を測定することで行った。

抗体濃度は、簡易 ELISA (直接固相化) によって測定した。トラスツズマブ 5 mg/mL を PBS(-) で段階希釈し、スタンダードを作成し、固相化した (500 ng/mL の等倍希釈をした。下限は 7.81 ng/mL とした。) リポソームサンプルは、PBS(-) で 200 ~ 4000 倍希釈して固相化した。その後室温で 1 時間静置し、洗浄した後、ブロッキングを行った。Anti-human IgG (Fc specific)-Peroxidase を 40000 倍希釈して使用した。洗浄後、1 Step™ Ultra TMB-ELISA によって発色し、2 M 塩酸で反応を止めた後、450 nm の吸光度を測定した。

粒子径およびゼータ電位は Zetasizer Nano-ZSP にて測定した。

さらに、金属ナノ粒子がリポソームに内包されているかを評価するため、エタノールと Epon812 の混合液により包埋し、透過型電子顕微鏡 (日立 H7100) を用いて観察を行った。

(3) 金属ナノ粒子内包リポソームの光音響シグナル測定

(1) で得られた IONP 内包リポソームおよび比較対照として同濃度の IONP の光音響シグナルについて、797 nm のパルスレーザー光を用いて測定した。1 mm セル厚のポリスチレン製キュベットに被測定溶液を封入し、水を満たした水槽にキュベットおよび超音波探触子を水没させ、水槽外よりレーザーを照射し PA 信号を検出した。得られた PA 信号は、測定サンプルの濃度と照射レーザーの強度で規格化した。

(4) 金属ナノ粒子内包リポソームの放射性標識体の合成

本プロブの細胞あるいは動物を用いた検討を実施するにあたり、がん細胞/がん組織への取込み量を定量的に評価するために、(1) で得られた化合物の放射性標識体を合成した。リポソーム表面にはアルブミンおよび抗体 (ハーセプチン) が導入されていることから、これらのタンパク質のアミノ基を N-succinimidyl [¹²⁵I]iodobenzoate (¹²⁵I-SIB) にて標識した。¹²⁵I-SIB は既報に従って合成し、リン酸緩衝液中 (pH 9) IONP 内包リポソームと混和し、室温で 30 分間インキュベートした。限外濾過フィルター (Molecular weight cut-off: 3 kDa) を用いて未反応の ¹²⁵I-SIB を除去し、得られた ¹²⁵I 標識 IONP 内包リポソームの放射化学的純度はゲルろ過クロマトグラフィ法により評価した。

(5) 細胞取込み実験

HER2 高発現細胞 (N87: ヒト胃がん細胞) および HER2 低発現細胞 (SUIT2: ヒト膵がん細胞) は、DMEM 培地中で 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養することにより実験に使用し

た。各細胞に IONP 内包リポソームを添加し、一定時間後に PBS にて洗浄した後、蛍光顕微鏡 (FSX100, Olympus) を用いて細胞内における脂質の局在を評価した。また、5% フェロシアン化カリウムと 2% 塩酸、細胞内の IONP の局在を調べた。また、HER2 への特異的結合性を評価するために、IONP 内包リポソームを細胞に添加する際に、過剰量のトラスツズマブを添加する群を設けた。

(6) IONP の発熱評価

IONP に近赤外レーザー光を照射した際の発熱について評価するため、IONP の PBS 溶液 (200 μg/mL) に 808 nm のレーザー光を照射し (1.2 W/cm²) 温度変化についてサーモグラフィにより評価した。

4. 研究成果

(1, 2, 3) 金属ナノ粒子内包リポソームの合成、物理化学的特性評価、光音響シグナル評価

IONP 内包リポソームについて、初期の抗体濃度を 0、50、100、300 μg/mL として合成を行ったところ、内包された鉄濃度はそれぞれ 34、36、52、49 mg/mL であり、内包効率は 30 ~ 47% であった。また、回収できた脂質量は 49、55、69、68 mg/mL であった。抗体濃度はそれぞれ、0、60、79、293 μg/mL であり、脂質 1 mg あたりの抗体濃度として、0、1.1、1.2、4.3 μg/mg の最終製剤を得た。いずれの粒子も、平均粒子径およびゼータ電位は、それぞれ約 80 nm 程度、-80 mV 程度であった。

IONP 内包リポソーム (抗体修飾前) を透過型電子顕微鏡を用いて観察した結果、約 80 nm 程度のリポソーム内部に IONP が高密度に充填されている様子が観察でき、目的通りの化合物を合成することに成功した。ま

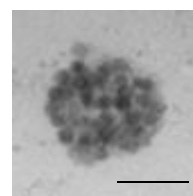


図3 酸化鉄ナノ粒子内包リポソームの透過型電子顕微鏡観察 (Bar = 50 nm)

た、IONP 内包リポソーム溶液 (抗体修飾前) に関して、光音響シグナルを測定した。その結果、IONP 内包リポソームの光音響シグナルは、IONP 単独と比較して約 2 - 3 倍向上することが明らかとなり、光音響シグナルの高感度化の可能性が示された。

一方で、金ナノロッド内包リポソームについては、平均粒子径約 70 nm、ゼータ電位約 -70 mV の粒子を得た。しかしながら、透過型電子顕微鏡による観察で、金ナノロッドはリポソームの表面に接着している様子が観察され、想定とは異なり、粒子内に内包されていないことが分かった。それゆえ、金ナノロッド内包リポソームの合成・評価について

はここで断念した。

(4) 金属ナノ粒子内包リポソームの放射性標識体の合成

¹²⁵I-SIB は既報に従って、放射化学的収率約 50 - 60% で合成した。放射化学的純度は 99% 以上であった。得られた ¹²⁵I-SIB を IONP 内包リポソームと反応した結果、放射化学的純度 95% 以上で最終製剤を得た。

(5) 細胞取込み実験

トラスツズマブ結合 IONP 内包リポソームおよび IONP 内包リポソームを HER2 高発現細胞 (N87) および低発現細胞 (SUIT2) に添加し、その取込みを蛍光脂質の検出および鉄染色により評価した結果、IONP 内包リポソームでは、N87 および SUIT2 細胞への取込みはわずかであった一方で、トラスツズマブ結合 IONP 内包リポソームでは、SUIT2 細胞と比較して N87 細胞に高く取込まれていた (図 4)。また、この取込み (蛍光シグナルおよび鉄染色陽性部位) は、過剰量のトラスツズマブの同時添加により抑制されたことから、トラスツズマブ結合 IONP 内包リポソームは HER2 特異的にがん細胞に結合することが示された。

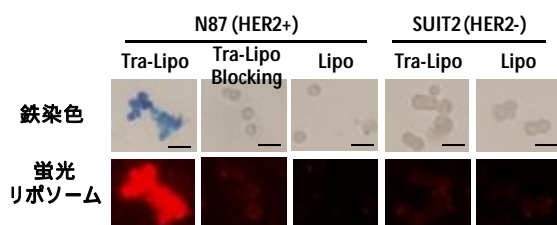


図4 酸化鉄ナノ粒子内包リポソームの細胞内取込み評価。Tra-Lipo: トラスツズマブ結合IONP内包リポソーム、Lipo: IONP内包リポソーム
Bar: 25 μ m

(6) IONP の発熱評価

IONP の PBS 溶液に 808 nm のレーザー光を照射した結果、IONP を含まない PBS と比較して有意に高い温度上昇 (約 10) を認め、これは細胞に傷害を与えるに十分な変化であったことから、がん治療への可能性を示した。

以上、本研究では、がんの高感度光音響イメージングおよびがん治療を達成しうる分子プローブの創製を目的として、トラスツズマブ結合 IONP 内包リポソームを新たに合成し、評価を行った。本プローブは高感度の光音響シグナルを示し、がん細胞に対して HER2 特異的な結合性を示した。また、レーザー光照射に伴い、IONP の発熱効果も確認できたことから、がん治療用薬剤としての可能性も示された。今後、放射性標識体を用いて生体内分布を定量的に評価するとともに、最適な条件にて光音響イメージング実験およびがんの治療実験を進めていく予定である。

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)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~biophys/>

6. 研究組織

(1) 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