

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07641

研究課題名(和文) 分子イメージングと内用放射線治療を目指す腫瘍指向性ナノ粒子キャリア創薬研究

研究課題名(英文) Development of tumor-directed nanoparticle carrier drug for molecular imaging and radionuclide therapy

研究代表者

山本 文彦 (Yamamoto, Fumihiko)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40253471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍画像診断の精度向上や画像診断と放射線治療を同じ基材で行うラジオセラノスティクスの創製を目指し、核医学画像診断薬としての可能性を持ち、腫瘍認識性や特異的集積性の高いナノ粒子キャリア「ラクトソーム」の開発および改良を行なった。生体内安定性を保持したまま腫瘍認識特性が改善されることを期待してラクトソームに腫瘍認識能を有する葉酸基を導入し生体内分布や腫瘍認識特性を検討して、機能性官能基を粒子表面に導入するドラッグデザイン戦略の妥当性を評価した。転移脳腫瘍へのラクトソーム集積メカニズムに関する新たな知見を得るとともに、核医学治療薬として開発する場合に留意すべき新たな知見も得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行は、ラクトソームへの機能性官能基の付加によってより効率的な腫瘍認識を目指すものであり、臨床では困難だった箇所(脳)の腫瘍組織の描画を実現するとともに、ラクトソームだけでなくナノキャリアの核医学診断プローブとしての臨床応用に道を拓くものである。また、核医学画像診断だけでなく核医学治療も可能で、安全で精度の高い個別医療技術として期待されているラジオセラノスティクスの創製の一助として貢献する成果であり学術的意義や社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to improve the accuracy of tumor imaging diagnosis and to create novel radio-theranostics that can perform both imaging diagnosis and radiotherapy using the same material, I attempted to develop and improve nanoparticle carrier "lactosome" that has potential as a nuclear medicine imaging agent and has high tumor recognition and specific accumulation properties. Folate group was introduced with tumor recognition ability on the lactosome, and examined its biodistribution and tumor recognition properties while maintaining biodistribution and in vivo stability, and evaluated the validity of the drug design strategy of introducing any other functional groups on the particle surface. New insights were also obtained into the mechanism of lactosome accumulation in brain tumors, as well as new insights that should be taken into account in the development of nuclear medicine therapeutics.

研究分野：放射薬学、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 セラノスティクス 腫瘍 放射性標識 SPECT 創薬 ナノ粒子

### 1. 研究開始当初の背景

がんの診療においては、早期の段階で腫瘍を発見し悪性度や進行度の診断と治療を適切に行うことが重要で、特に分子イメージング技術はがんの早期診断・治療につながる有効な手段として注目される。血中に投与した粒径数十~200nmのナノキャリアは増殖の速い腫瘍組織の間質腔に、透過性が異常亢進した毛細血管系より漏出し、リンパ管が未発達なことも手伝って蓄積することが知られる (EPR 効果: 図 1)。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たり標的部位に効率よく送達したりという利点がある。

研究代表者らが開発中の新規ナノキャリア「ラクトソーム」は、疎水性部位としてポリ L- 乳酸 (PLLA)、親水性部位としてポリサルコシン (PSar) から構成される両親媒性ポリデンプペプチドが自己組織化により形成されたミセル粒子である。ポリマー鎖長を変化させれば粒径を制御でき、また生体内代謝機構により分解・代謝し毒性が低いと考えられる。研究代表者らはこれまでに、ラクトソームは血中滞留性を有することを明らかにし (血中半減期 10~20 時間) 近赤外蛍光剤や短半減期核種  $^{18}\text{F}$  や  $^{123}\text{I}$  等で標識した粒径約 20~30nm のナノ粒子の効率的合成法を確立した。またすぐれたステルス特性を利用して肝臓同所移植がんの近赤外蛍光イメージングに世界で初めて成功したほか、脳腫瘍に特集的集積性が高いことを見出した。さらに小動物 PET や SPECT を用いたマウス移植実験腫瘍のイメージングにも成功した他 (図 2) 経皮的エタノール注入療法との併用が腫瘍治療効果を増大させることを明らかにした。最近、 $^{111}\text{In}$  標識や  $^{90}\text{Y}$  標識にも成功、同じナノ粒子で診断だけでなく治療も行える「ラジオセラノスティクス」としての可能性を有することを明らかにした (図 3)。

### 2. 研究の目的

研究代表者らの今までの先行研究の結果、 $^{125}\text{I}$  標識ラクトソームと  $^{18}\text{F}$  標識ラクトソームとは腫瘍以外の組織で放射能分布が異なることがあり、内包型標識ラクトソームの放射能分布がラクトソーム動態を正確に反映していないとの懸念が生じた。またラクトソームの小動物腫瘍イメージングは可能だったものの集積速度は遅く時間がかかることもわかった。これらのことから、標識位置の異なるラクトソームの動態を確認したり、短時間イメージングのために腫瘍認識能を向上させるなど、ドラッグデザインに改善の余地があると考え、ラクトソーム本体を構成する両親媒性ポリマーに放射性標識子を導入したり腫瘍認識能を有する官能基を導入する表面修飾型ラクトソームの新たなドラッグデザインが必要との着想に至った。しかしながらラクトソームのステルス性はポリサルコシン密度に左右されるため、表面に機能性官能基を有しながらまたは標識子をもちながら、なおかつステルス性を維持するために最適な導入割合も検討する必要があると考えた。

そこで本研究の目的として、EPR 効果による腫瘍集積性を持つナノ粒子ラクトソームをリード化合物として、イメージング時間短縮や腫瘍認識特性を改良するために、合成化学的に機能性官能基を付加させ、分子イメージングプローブとしてのドラッグデザインの妥当性や有用性、ステルス性の保持に最適な導入割合を評価することを設定した。前述のように、放射性標識ラクトソームが肝臓や脳など描画が困難な代謝亢進組織や排出系器官においても腫瘍を容易に描画できる可能性を見出していることもあり、本研究により正確なラクトソームの生体内挙動を示すとともに、機能性官能基の付加によってより効率的な腫瘍認識が可能となり、臨床では困難だった箇所の腫瘍組織の描画を実現するとともに、ナノキャリアの核医学診断プローブやセラノスティクスとしての臨床応用の可能性を明らかにすることにした。

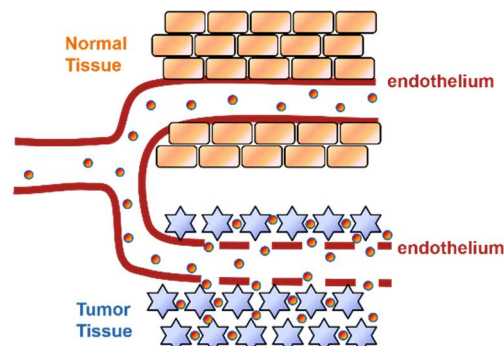


図 1 EPR(Enhanced Permeation Retention)効果  
ナノキャリアは増殖の速い腫瘍組織の間質腔に透過性が異常亢進した毛細血管系より漏出し、リンパ管排出系が未発達なために蓄積する。(Cancer Res.,46,5387,1986)

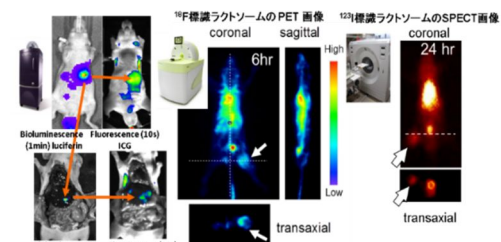


図 2 マウス肝臓に移植された肝臓がん (HepG2) の ICG 標識ラクトソーム近赤外イメージング (木村ら Biomaterials, 30, 5156, 2009) と短寿命核種標識ラクトソーム腫瘍の PET, SPECT 描画 (山本ら Mol. Imaging Biol., 12 (Suppl.2), S948, 2010, Nucl. Med. Biol., 40, 387, 2013)

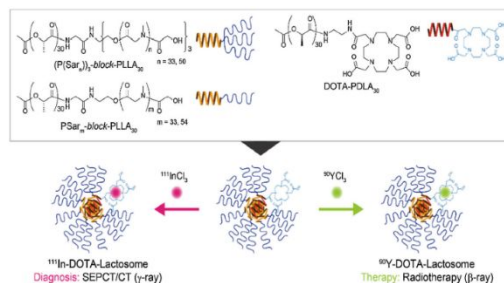


図 3  $^{111}\text{In}$  標識ラクトソームと  $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソーム (栗原, 山本ら J. NanopartRes., 18, 137, 2016)

### 3. 研究の方法

生体内安定性と腫瘍認識能の向上を期待して、ラクトソームの表面への機能性官能基付加ドラッグデザイン戦略の妥当性の評価を行うとともに、ラジオセラノスティクスとしての臨床適用を目指した基礎検討を行った。

#### (1) 機能性ラクトソームの創製と放射性イメージングプローブとしての基礎評価

機能性ラクトソーム創製のうち、いくつか可能性があるデザインから葉酸修飾体を先行して評価を行うことにした。ラクトソームの表面に機能性分子を導入する戦略の妥当性が明らかになれば、他の機能性分子導入にも応用できる。また安定性評価の基礎データは本体標識型ヨウ素ラクトソーム評価とも情報共有できると考えている。

多くの腫瘍細胞には葉酸受容体が過剰発現しているため、葉酸で表面修飾したナノ粒子製剤が腫瘍標的リガンドとして期待されている。葉酸基をラクトソーム表面に付加すれば、腫瘍表面に積極的に結合しイメージングの時間短縮につながると期待される。すでに両親媒性ポリマーの PSar 末端 NH 基に葉酸基を効率的に導入する条件を見出ししていたので、まず葉酸修飾ラクトソームの放射性ヨウ素体の効率的調製法と精製法を検討した。

内包型  $^{125}\text{I}$  標識ラクトソームとして、既に合成法を確立している  $^{125}\text{I}$  標識 PLLA と葉酸修飾両親媒性ポリマーを自己集合させ粒子化を行い、 $^{125}\text{I}$  標識 100%葉酸修飾ラクトソーム (100%FA-LS) を作製した。また葉酸を持たない両親媒性ポリマーと葉酸修飾両親媒性ポリマーをモル比 9:1 で混合してフィルム化を行ったものに  $^{125}\text{I}$  標識 PLLA を加えて粒子化し、葉酸修飾率を変えた  $^{125}\text{I}$  標識 10%葉酸修飾ラクトソーム (10%FA-LS) を作製した。それぞれについて腫瘍認識能とインビボにおけるステルス特性保持を評価した。インビトロ評価として、葉酸受容体過剰発現細胞である KB 細胞及び葉酸受容体低発現細胞である colon26 細胞を用いて、それぞれの標識体の添加 2 時間後の結合親和性評価・細胞株取り込み評価を行った。またインビボ評価として、KB 細胞及び colon26 細胞をそれぞれヌードマウスの右大腿部に移植し、移植 11-14 日後にそれぞれの標識体を尾静脈投与して、投与 0.5-24 時間後に各臓器を取り出し、湿重量と放射能を測定した。

#### (2) $^{111}\text{In}$ 標識ラクトソームの脳腫瘍イメージングの可能性評価

マウス実験腫瘍 (皮下) の小動物 SPECT イメージングに成功している  $^{111}\text{In}$  標識ラクトソームについて、脳腫瘍イメージングへの適用可能性と集積機序の評価を行った。すでに開発している  $^{111}\text{In}$  標識ラクトソームを用いて、脳腫瘍転移モデルマウスの生体内放射能動態を剖検法によって調べた。脳腫瘍転移モデルにはメラノーマ細胞心室内投与による髄膜播種モデル作成を検討し、生体内分布を調べ脳腫瘍への集積へのリンパ管を通じた髄膜液の寄与について解析した。さらに、画像診断だけでなく治療応用を目指したラジオセラノスティクスとしての開発の基礎検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 機能性ラクトソームの創製と放射性イメージングプローブとしての基礎評価

両親媒性ポリマーの PSar 末端に葉酸基を有するラクトソームについて、その放射性ヨウ素体の効率的調製法を確立した。スズ前駆体から得た放射性 SIB を、ポリ乳酸と反応させさらにフィルム法により葉酸修飾両親媒性ポリマーとともに粒子化を行うことで、放射化学的収率 57-60% で  $^{125}\text{I}$  標識葉酸修飾ラクトソームを合成できた。

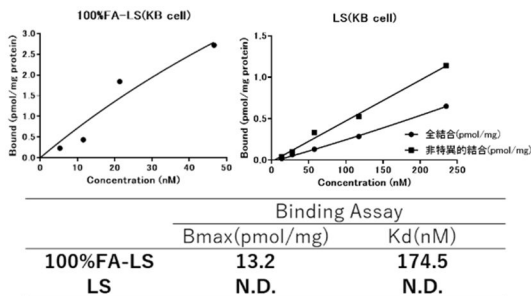


図 4 100%葉酸修飾ラクトソームの細胞親和性

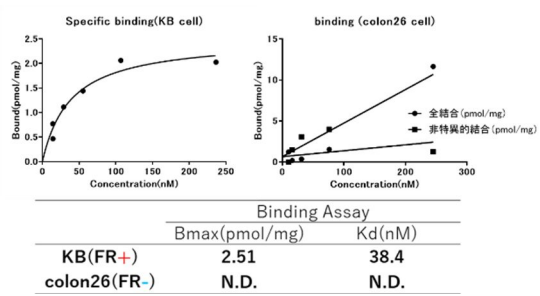


図 5 10%葉酸修飾ラクトソームの細胞親和性

インビトロ評価では、100%FA-LS は KB 細胞と colon26 細胞への取り込み量に有意な差はなかったが、取込 2 時間後における KB 細胞に対する Kd 値が 175nM と比較的高い親和性を示し飽和性のある結合が観察された。また細胞への取り込みは 11%/mg を示した。葉酸を持たないラクトソーム (LS) では、Kd 値は得られず細胞取り込みもほとんど観察されなかったことから、葉酸受容体を介した取込みが示唆された (図 4)。10%FA-LS は KB 細胞に対して取込 2 時間後における Kd 値が 38.4nm と高い値を示し、colon26 細胞に対しては Kd 値は得られなかった。100%FA-LS より 10%FA-LS の方が低濃度でも高い親和性で飽和性のある結合をすることが明らかとなっ

た(図5)。また細胞への取り込みはKB細胞に対して1.2%/mgでありcolon26細胞に対して7.6倍高く100%FA-LSと同様、葉酸受容体を介して特異的に細胞内に取り込まれたことが示唆された。

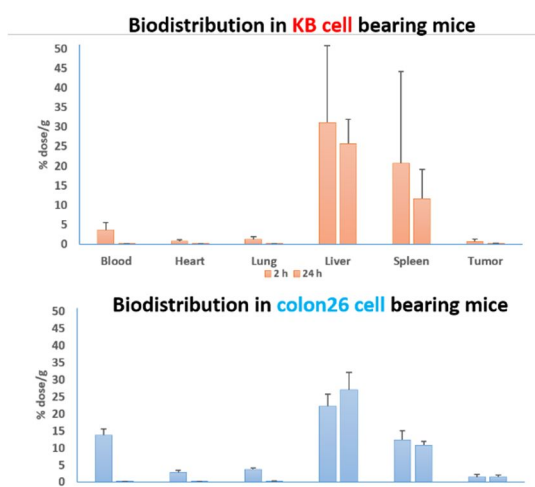


図6 腫瘍マウスにおける100%葉酸修飾ラクトソームの生体内分布

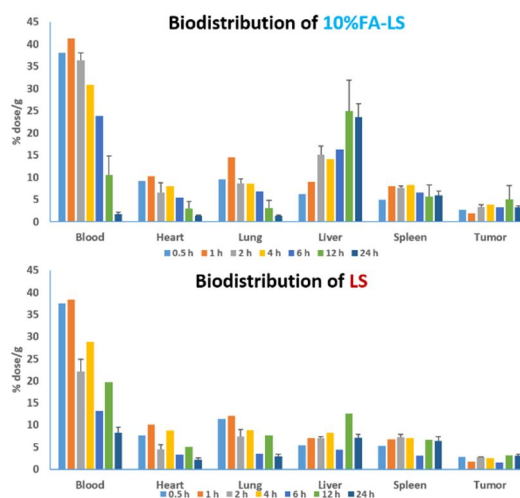


図7 KB腫瘍マウスにおける10%葉酸修飾ラクトソームの生体内分布

インビボ評価では、腫瘍移植マウスにおける100%FA-LS投与放射能は、血中クリアランスが早く速やかに細網内皮系に移行した。このことからラクトソーム表面すべてに葉酸基を付加させると生体内で異物として認識されステルス性を失うことが明らかとなった。腫瘍への放射能集積はわずかであった(図6)。10%FA-LS投与放射能は、投与後1時間で血中放射能が41%dose/gと最大を示しその後徐々に減じて24時間後には1.8%dose/gとなった。細網内皮系である肝臓および脾臓へは投与後30分でそれぞれ6.2%dose/gおよび5.0%dose/gで経時的に増大した(図7)。このことからラクトソームのステルス性をある程度保持していることが知らされた。KB腫瘍への集積は経時的に徐々に増加しラクトソームより高い値を示したほか、腫瘍/血液比は投与12時間後以降はラクトソームより有意に高かった。このことはEPR効果に加え葉酸受容体を介した腫瘍の集積を示唆しているものと考えられる。

以上のことから、このドラッグデザイン戦略は妥当でありステルス性をある程度保持したまま葉酸受容体を介した腫瘍認識能を向上させることが可能であると考えられた。葉酸基をもちいたラクトソーム表面修飾が10%ならばステルス性保持が可能であったことは、他の機能性官能基(RGDペプチド、膜透過性ペプチド)または標識子などをラクトソーム表面に導入する場合の基礎的な知見ともなりうる。

## (2) 放射性標識ラクトソームの脳腫瘍イメージングの可能性評価

評価に使う病態モデル動物として、メラノーマ細胞心室内投与による脳腫瘍転移マウスの作成は6割程度の成功率で作成する条件を確立した(図8)。また、このモデル動物はまた血液脳関門(BBB)が破綻しているモデルであることも明らかにした。このモデル動物における<sup>111</sup>In標識A<sub>3</sub>B型ラクトソーム投与後の生体内分布を検討した結果、脳腫瘍の他、腋下リンパ節と骨髄に比較的高い放射能分布がみられることを明らかにした(図9,10)。ラクトソームの脳腫瘍への分布メカニズムとして脳腫瘍への分布は破綻したBBB通過とリンパ系を介した分布の2通りの可能性が示唆された。さらに投与放射能が赤血球を主とする血球成分にも高い割合で分布するなど新たな知見を得た。

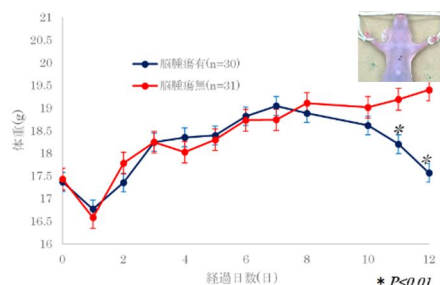


図8 腫瘍脳転移モデルの作成

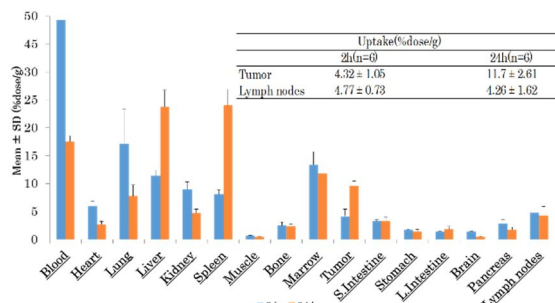


図9 腫瘍マウスにおける<sup>111</sup>In標識A<sub>3</sub>B型ラクトソームの生体内分布

ラジオセラノスティクスへの展開を見据え、これまでの A<sub>3</sub>B 型よりも腫瘍集積性のほうが高いと予想される <sup>111</sup>In 標識 AB 型ラクトソームの新規開発を開始した(図 11)。AB 型両親媒性ポリマーと DOTA-ポリ D 乳酸からフィルム法で調製した LS 粒子に、<sup>111</sup>In-塩化インジウム液を加え約 50 で加温した。サイズ排除カラム分析により目的物が得られていることを確認し放射化学的収率は約 4%であった。正常マウスを用いた試行的な初期評価では、ある程度ステルス性を保持し脳へは移行しないなどラクトソームとしての基礎的性質は保持していた。今後は効率的合成法の確立、腫瘍集積性の評価をしていきたい。

以上のことから将来の内用療法実用化やラジオセラノスティクス開発に向けた重要な情報が得られたと考えている。A<sub>3</sub>B 型の脳腫瘍集積評価については一定の結論を得たが、ラクトソームの知見として新たな知見も得られたのでさらに治療基材としての検討を今後行っていく必要がある。

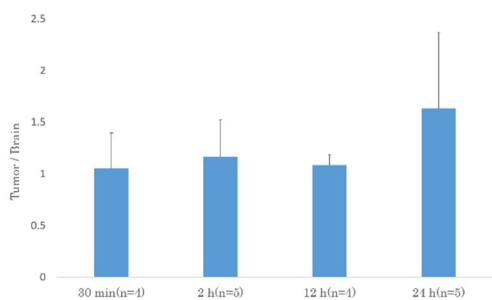


図 10 <sup>111</sup>In 標識 A<sub>3</sub>B 型ラクトソームの脳腫瘍への集積

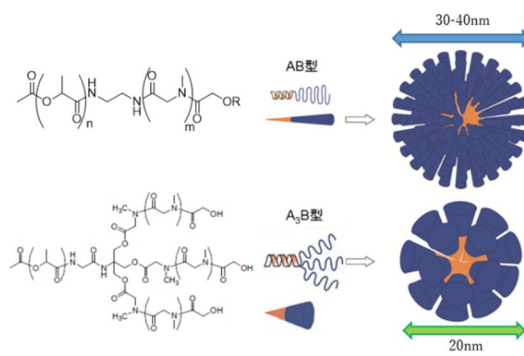


図 11 AB 型ラクトソームと A<sub>3</sub>B 型ラクトソーム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeshi Fuchigami, Noriko Fujimoto, Terushi Haradahira, Yumiko Nojiri, Takashi Okauchi, Jun Maeda, Tetsuya Suhara, Fumihiko Yamamoto, Morio Nakayama, Minoru Maeda, Takahiro Mukai	4. 巻 61
2. 論文標題 Synthesis and characterization of <sup>11</sup> C-labeled benzyl amidine derivatives as PET radioligands for GluN2B subunit of the NMDA receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Labelled Compd. Radiopharm	6. 最初と最後の頁 1095-1105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Yohei, Kuwahara Yoshikazu, Yamamoto Yumi, Suzuki Masatoshi, Fukumoto Manabu, and Yamamoto Fumihiko	4. 巻 16
2. 論文標題 ddY Mice Fed 10% Fat Diet Exhibit High p27KIP Expression and Delayed Hepatocyte DNA Synthesis During Liver Regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metab. Syndr. Relat. Disord.	6. 最初と最後の頁 305-313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 針生 怜、岡田美桜、佐々木遼、牧野顕、山本由美、齋藤陽平、山本文彦
2. 発表標題 葉酸修飾ラクトソームの細胞取り込みと生体内分布評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 針生怜、鳥井唯花、菊地綾乃、牧野顕、山本由美、齋藤陽平、山本文彦
2. 発表標題 ラクトソームの葉酸修飾率最適化の検討
3. 学会等名 第3回放射性薬品科学研究会 / 第19回放射性医薬品・画像診断薬研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綾部 祐希、佐々木 遼、山本 由美、齋藤 陽平、小関 英一、木村 俊作、山本 文彦
2. 発表標題 In-111標識A3B型ラクトソームの血液中における放射能分布
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿嶋美杜、針生 怜、綾部祐希、佐々木遼、山本由美、齋藤陽平、山本文彦
2. 発表標題 放射性ラクトソーム安定性評価のための125I-PLLAの生体内分布の検討
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 遼、高橋 静由、綾部 祐希、山本 由美、齋藤 陽平、小関 英一、木村 俊作、山本 文彦
2. 発表標題 In-111標識ラクトソームの脳腫瘍への集積機序の検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 針生 怜、鳥井 唯花、伊澤 悠香、菊地 綾乃、佐々木 遼、高橋 静由、牧野 顕、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 葉酸修飾ラクトソームの開発及び腫瘍認識能の初期評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 麗歌, 山本 由美, 虻川 郁, 小林 茉優子, 齋藤 陽平, 山本 文彦
2. 発表標題 COX-2イメージングを目的としたニメスリドヨウ素誘導体の炎症モデルにおける in vivo評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 茉優子, 山本 由美, 石田 麗歌, 虻川 郁, 齋藤 陽平, 山本 文彦
2. 発表標題 COX-2イメージングを目的とした炎症モデルマウスにおけるニメスリドp -ヨウ素誘導体の in vivo 阻害評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 陽子, 山本 由美, 齋藤 陽平, 山本 文彦
2. 発表標題 OX-2イメージングを目的とした新規ニメスリドp -置換誘導体の合成及び評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本由美、多胡哲郎、豊原潤、齋藤陽平、山本文彦
2. 発表標題 ニメスリド[11C]メトキシ誘導体の標識合成および評価
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 山本由美、緑山莉枝、齋藤陽平、山本文彦
2. 発表標題 COX-2イメージングを目的としたm-/p-125Iニメスリド誘導体の生体内分布評価
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木遼、山本由美、齋藤陽平、原功、小関英一、木村俊作、山本文彦
2. 発表標題 腫瘍モデルマウスにおけるIn-111標識ラクトソームの生体内分布
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 陽平, 山本 由美, 山本 文彦
2. 発表標題 放射線照射による突然変異パターンに対するAPOBEC3Bの影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本文彦編著 / 齋藤陽平, 山本由美著	4. 発行年 2019年
2. 出版社 京都廣川書店	5. 総ページ数 308
3. 書名 基礎放射薬学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小関 英一  (Ozeki Ei-ichi)		
研究協力者	原 功  (Hara Isao)		
研究協力者	針生 怜  (Hariu Satoshi)		
研究協力者	佐々木 遼  (Sasaki Ryo)		
研究協力者	高橋 静由  (Takahashi Shizuki)		
研究協力者	柴田 達郎  (Shibata Tatsuro)		
研究協力者	齋藤 陽平  (Saito Yohei)		
研究協力者	山本 由美  (Yamamoto Yumi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	木村 俊作  (Kimura Shunsaku)  (80150324)	京都大学・工学(系)研究科・教授    (14301)	
連携研究者	牧野 顕  (Makino Akira)  (00566226)	福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授    (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関