

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08094

研究課題名(和文) 小線源療法と局所の化学療法との併用を可能にする生分解性温度応答性ミセル製剤の開発

研究課題名(英文) Development of thermo-responsive micelle for combined region-specific chemo- and brachytherapies

研究代表者

牧野 顕 (Makino, Akira)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授

研究者番号：00566226

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)：がんへの局所投与に用いる温度応答性の治療用ナノ粒子キャリアを新たに設計、合成した。これに治療用の放射性同位元素であるCu-64と抗がん剤の一種であるDocetaxelを標識または内包することで、小線源治療と化学療法との併用療法が可能な新たな高分子ミセル製剤の開発を進めた。開発したミセル製剤は体温に反応して凝集することで、注入部位に高い滞留性を示した。また、標識したCu-64を安定に凝集体内部に留める一方、Docetaxelを効率よく放出した。その結果、Cu-64から出る線とDocetaxelとの併用療法によって、単剤よりも高い治療奏功性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺がんの小線源治療では、治療に用いた金属製シード線源を生体内に残置する必要がある。本研究では、金属製線源に代わり、生分解性の温度応答性高分子ミセルをキャリアとして用いた放射線源を開発すること、組織内照射と局所での化学療法との併用療法実現による治療奏功性を向上させることを目的に研究を行った。これらの成果は、がんの新しい治療法や健康長寿社会の形成に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Thermo-sensitive polymer micelle was newly designed and synthesized as carriers for local administration to tumor. By labeling with Cu-64, which is a therapeutic radioisotope, and/or encapsulating Docetaxel, which is a type of anticancer drug, a new biodegradable therapeutic agent was developed that can be used for combination treatments of brachytherapy and chemotherapy. The newly developed micelle showed high retention behavior at the injection site by body-temperature responded aggregation formation. Importantly, the labeled Cu-64 was stably retained inside the aggregate, but Docetaxel was efficiently released. As the result, the combination therapy with -rays emitted from Cu-64 and Docetaxel showed higher therapeutic response than the single agent.

研究分野：放射性医薬品化学

キーワード：小線源治療 高分子ミセル 体温応答性 抗がん剤 併用療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小線源治療(組織内照射)は、低侵襲で機能や組織を温存した治療が可能であり、放射線外部照射やホルモン療法との併用によって、悪性度が高いがんに対しても有効である。組織内照射では、管、針、ワイヤー状の容器に治療用放射性核種を封入した器具(放射線源)を治療部位に直接挿入する。治療が終了すると放射線源は抜去するが、例えば抜去が容易ではない前立腺がん治療では、チタン製の線源を永久挿入する必要がある。この点が適応範囲の限定要因となっているため、治療終了後に挿入したままにしても体内で分解する性質を有した生分解性放射線源の研究が進められている。しかしながら、生分解性線源を使用するメリットが限られており、金属製線源との置換を目指す動きはまだ鈍い。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに設計した生分解性両親媒性高分子から粒子径 35 ~ 50 nm の温度応答性高分子ミセルを調製することに成功し、特許を申請している(特願 2018-119349)。この温度応答性高分子ミセルには次に示す特徴があり、組織内照射と局所の化学療法との併用を可能とする小線源療法用の生分解性放射線源として、基礎的な性質を兼ね備えていることが期待されている。

- 代表的な生分解性高分子であるポリ乳酸とポリペプチド誘導体を構成素子としており、治療用放射性核種が十分に減衰した後に体内で分解され、排泄される
- ミセル溶液は体温に反応して、速やかにサブミクロメートルサイズの多孔質凝集体を形成する
- 組織内照射に用いる放射性同位元素と任意の化学療法用薬剤とを内包することが可能であり、それらの内包量を簡単に制御できる
- ミセルから放射性同位元素は放出せず、化学療法用薬剤のみを徐放できる

本研究では生分解性の放射線源として温度応答性高分子ミセルを用いることで、組織内照射と局所の化学療法との併用療法実現による治療奏功性の向上できるかについて検討することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 治療用の温度応答性ナノ粒子の調製

上記した生分解性両親媒性高分子の疎水性ユニットからなる疎水性高分子鎖の末端にエチレングリコール鎖を介して 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid を導入した。これに放射性の Cu-64 を錯化した上で、温度応答性高分子ミセルに導入することで治療用放射性同位元素である Cu-64 温度応答性高分子ミセルを調製した。また、粒子化の際に抗がん剤の一種である Docetaxel を粒子のコア部分に封入した。

(2) 温度応答性ナノ粒子の物性評価

調製したナノ粒子に放射性同位元素が安定に封入されているか、Docetaxel がどの程度の速さで放出されるかなどについて、ナノ粒子を透析膜内に封入した上で、透析膜外液に放出される放射能と Docetaxel 濃度から求めた。また、ミセルに対して封入可能な Docetaxel の物質量などについて評価した。

(3) ナノ粒子の体内動態評価について

ヒト前立腺がん由来細胞である PC3 を皮下移植したモデルマウスを作製した。このマウスのがん塊部位に対して、Cu-64 で標識した温度応答性ミセル、温度非応答性ミセル、Cu-64 塩化銅水溶液をそれぞれ局所投与し、その後の経時的な体内分布を小動物 PET 装置によって得た画像から評価した。

(4) 治療効果評価実験

PC3 を皮下移植したモデルマウスのがん塊部位に対して、未治療コントロールとして PBS、治療群として、Cu-64 塩化銅水溶液、Cu-64 で標識した温度応答性ミセル、Cu-64 標識 DOX 内包温度応答性ミセルなどを局所投与した。その後経日的ながん塊のサイズ変化を計測することで、治療効果について評価した。

4. 研究成果

(1) 治療用ナノ粒子の調製

疎水性部位がポリ乳酸、温度応答ユニットがポリ *N*-*n*-propylglycine から構成されたジブロックポリマーを化学合成した。得られたポリマーの鎖長は、¹H NMR 測定により決定した。氷冷した水系溶媒中で合成したポリマーを自己集合化させたところ、粒子径が 50 nm 程度の高分子ミセルが形成した。またミセル溶液の温度を徐々に上げていくと、20-25 °C 付近でミセルが会合し、凝集体を形成した。透過型電子顕微鏡で、凝集前後の観察を行ったところ、高分子ミセル同士が会合・凝集することにより、多孔質凝集体を形成している様子が観察された。

ナノ粒子の放射性同位元素標識のために、ポリ乳酸の末端にエチレングリコール鎖を介して 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) を導入したポリマー (DOTA-PLLA) を合成した。医療用小型サイクロトロンにて ⁶⁴Ni (p,n) ⁶⁴Cu 反応で製造した Cu-64 を酢酸緩衝溶液中で DOTA-PLLA の DOTA 部位に錯化させた後、基材となるポリマーと混合し粒子化を行うことで、治療用放射性同位元素である Cu-64 温度応答性高分子ミセルを調製した。また同様に、抗がん剤の一種である Docetaxel と基材ポリマーとを混合した上で粒子化を行うことで、Docetaxel を内包した高分子ミセルを調製することに成功した。

(2) 温度応答性ナノ粒子の物性評価

PBS 中における、温度応答性ミセルに標識した Cu-64 の安定性と、内包した Docetaxel の放出速度を調べた。Cu-64 は極めて安定にミセルに標識されており、96 時間でミセルから漏出した放射能は全体の 5% 以下であった。これに対して、Docetaxel は 6 時間後で 50% 近くがミセルから放出された。また放出速度は凝集体形成前後で大きな差異はなかったことから、多孔質凝集体の形成により、Docetaxel 放出のための十分な表面積が確保されていることが、速やかな薬剤放出に繋がっていると推察された。ミセル内部に封入した抗がん剤の放出速度については、治療法などを考慮しながら最適化する必要があると考えられ、Doxetaxel 以外の薬剤ではどのような放出挙動をとるのか、同じ薬剤の放出速度をどのように制御するかなどについては今後の課題であると考えている。

(3) ナノ粒子の体内動態評価について

Cu-64 で標識した温度応答性ミセル、温度非応答性ミセル、Cu-64 塩化銅水溶液をそれぞれ、ヒト前立腺由来細胞である PC を皮下移植したモデルマウスのがん塊部位に局所投与し、経時的な体内動態を小動物 PET 装置で観察した (Figure 1)。

Cu-64 で標識した温度応答性ミセルはがん塊部位に極めて良好な滞留性を示し、投与 72 時間後に投与した放射能の約 90% が、局所投与部位に残存していることが確認された。一方で、Cu-64 で標識した温度非応答性ミセルを投与した群では、投与した薬剤の一部が体全体に拡散され、72 時間後の残存量は 50% 程度であった。Cu-64 塩化銅水溶液を投与した群においては、投与 12 時間後には 80% 近くの放射能ががん塊から流出し、肝臓などの代謝系臓器に集積している様子が確認された。

温度非応答性ミセルの粒子径は 50 nm 程度であることから、Cu-64 塩化銅水溶液と比べると拡散によるがん塊からの放射能流出速度が遅かったと考えられるが、体温に応答したミセルの凝集プロセスが、がん部位に薬剤を滞留させる上で極めて重要な役割を果たしていることが示された。

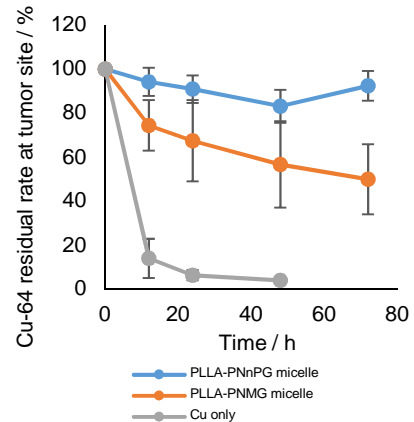


Figure 1. がんに残存した放射能の経時変化

(4) 治療効果評価実験

PBS 投与群を基準 (Control) として治療効果評価を進めた。Cu-64 を標識していない空の温度応答性ミセルを投与した群では PBS 投与群と比べて、がんの増悪抑制が確認されなかった。マウスの体重変化についても、Control との有義な差は認められなかったことから、温度応答性ミセル自体に毒性はないことが確認された。

Cu-64 塩化銅水溶液投与群では、有意な治療効果は認められなかった。Cu-64 が注入部位に滞留せず、がん細胞に対して十分な線量が照射されなかったためであると考えられる。一方、Cu-64 で標識した温度応答性ミセルを投与した群では、個体差が大きく、統計学的な有意差 ($p < 0.05$) は確認することができなかったが、がんの増悪抑制傾向を確認することができた。更に Cu-64 標識 DOX 内包温度応答性ミセルなどを局所投与した群では、より強いがんの増悪抑制効果が観察された。すなわち、高分子ミセルを小線源治療のキャリアとして用いた小線源治療が有効であること、従来の金属性線源とは異なり抗がん剤との併用療法が可能となること、放射線と抗がん剤との併用によって治療効果を増幅できること、といった本研究のコンセプトを実証することに成功した。

ヨウ素-125 を封入した金属製シード線源を用いる前立腺がん治療では、がんの大きさに応じて、がん全体に放射線が照射されるように数百本程度のシード線源を挿入する。それに比べて本検討では、皮下移植されたがんの中心付近に対して治療用ミセル溶液の注入を行った。線の組織内飛程は数 mm 程度であることから、がんの辺縁部分に対して十分な放射線が照射されていない可能性がある。今後、局所投与方法の最適化を進めることで、治療効果を向上させることが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 牧野 顕、森 哲也、岡沢秀彦、清野 泰
2. 発表標題 小線源療法のためのキャリアとしての生分解性温度応答性ミセルの評価
3. 学会等名 第60回 日本核医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牧野 顕、森 哲也、岡沢秀彦、清野 泰
2. 発表標題 組織内照射と局所での化学療法とお併用を可能にするミセル製剤の開発
3. 学会等名 日本分子イメージング学会第14回総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野 顕、森 哲也、岡沢秀彦、清野 泰
2. 発表標題 放射線内照射治療への応用を目指した温度応答性高分子ミセルの設計と合成
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Makino, Tetsuya Mori, Hidehiko Okazawa, Yasushi Kiyono
2. 発表標題 Preparation and evaluation of biodegradable polymer micelle for brachytherapy
3. 学会等名 European Association of Nuclear Medicine 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野 颯、森 哲也、岡沢秀彦、清野 泰
2. 発表標題 組織内照射治療への応用が可能な温度応答性高分子ミセルの合成
3. 学会等名 第3回日本核医学会分科会 放射性薬品科学研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------