

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：82606  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22791237  
 研究課題名（和文） 膵臓がんの超早期診断を目的にした MRI 用分子プローブの開発  
 研究課題名（英文） Development of MRI probe for early diagnosis of pancreatic cancer  
 研究代表者  
 吉本 光喜（YOSHIMOTO MITSUYOSHI）  
 独立行政法人 国立がん研究センター・研究所・主任研究員  
 研究者番号：00345638

研究成果の概要（和文）：ヒト膵臓がんが発現している  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンを標的にした RGD 修飾リポソームを作成した。得られたリポソームに鉄-デフェロキサミン錯体を封入することにより、MRI 造影剤として用いた。Panc-1 皮下移植マウスを用いて MR 撮像を行った結果、視覚的に顕著な造影効果は認められなかったが、投与前に比べて腫瘍筋肉信号強度比の増加が認められ、MR 用膵臓がんイメージング剤としての可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer expresses  $\alpha_v\beta_3$  integrin. In this study, we synthesized RGD targeting liposomes which loaded Fe-deferoxamine for magnetic resonance imaging (MRI). In MR imaging study using Panc-1 bearing mice, the significant contrast enhancement was not obtained in the visual evaluation. However, RGD targeting liposome increased tumor to muscle signal ratio on T1 weighted images.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：膵臓がん、RGD ペプチド、MRI、分子イメージング、早期診断

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は最も予後不良な癌種の一つであり、腫瘍径 2cm 未満の腫瘍に限っても 5 年生存率は 57% である。また、早期の段階から転移が見られ、外科的治療が困難な症例が多いことから、転移前の超早期診断が予後の改善において非常に重要である。申請者のこれまでの検討から、 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンは発癌早期から発現しており、早期発見の標的分子になり得ることが分かった。我々は、SPECT 用  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンイメージング剤により、

発がんモデルにおいて膵臓がんの検出にも成功した。この研究により、RGD ペプチドが優れたイメージング剤として様々なモデルに応用可能であることが示された。

2. 研究の目的

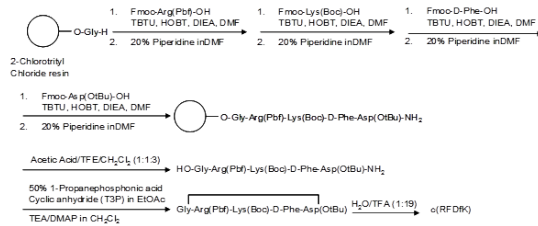
SPECT による膵臓がん検出に成功したが、より微小な病変の検出を目的として、MR 用分子プローブの開発を計画した。 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンに対し親和性を有する RGD ペプチドをドラッグデリバリーに用いられるリポソーム

表面に修飾した RGD 修飾リポソームを作成し、さらに造影効果を有する鉄-デフェロキサミン錯体を封入することにより、MR 造影剤としての有用性について評価した。

### 3. 研究の方法

#### ① RGD ペプチドの合成

cyclic (Arg-Gly-Asp-D-phe-Lys) (c(RGDfK)) の合成は一般的なペプチド合成法である Fmoc 固相合成法により行う。H-Gly-2-ClTrt resin を出発原料とし、下記のスキームに従って合成を行った。



得られた RGD ペプチドと SATA を反応させ SATA-RGD を得た。次いで、0.5M ヒドロキシルアミン、0.5M 水酸化ナトリウムと反応させることにより、アセチル基の脱保護を行い、RGD-SH を得た。精製は HPLC により行った。

#### ② Fe 内包 RGD 修飾リポソームの作成

##### (ア) Fe 内包リポソームの作成

DSPC, cholesterol, mPEG-DSPE, および maleimide-mPEG-DSPE からなるリポソームを thin film hydration 法により作成した。脂質フィルムの水和時に Fe-デフェロキサミン錯体を加えることによりリポソーム内に封入した。作成したリポソームのリン脂質濃度は、リン脂質 C-テストキットを使用し、コリンオキシダーゼ。DAOS 法にて測定した。

##### (イ) リポソーム表面への RGD 修飾

リポソームへの RGD ペプチドの修飾は、SH 基と選択的に反応するマレイミド基を有する maleimide-mPEG-DSPE との架橋により行った。リポソーム溶液に RGD-SH を加え、0.5M ホウ酸バッファー中で反応させることにより Fe 封入 RGD 修飾リポソームを作成した。

##### (ウ) 粒度分布測定

作成したリポソームの粒度分布は、測定試料を生理食塩水に懸濁し、動的光散乱法にて測定した。

#### ③ $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する親和性評価

ヒト膀胱がん細胞 (Panc-1) と  $\alpha_v\beta_3$  インテグリン特異的阻害剤である <sup>125</sup>I-エ

キスタチンとの競合阻害実験を行い、RGD 修飾リポソームの <sup>125</sup>I-エキスタチンに対する 50% 結合阻害濃度を算出することにより、結合親和性の評価を行った。

#### ④ Fe 封入 RGD 修飾リポソームの縦緩和時間測定

T1 緩和時間の測定は高速スピネコー法 (TR: 200, 400, 800, 1500, 3000, 5500 ms; TE: 10, 30, 50, 70, 90 ms; FA: 90 degree; In-plane resolution: 0.156\*0.156 mm; Slice thickness: 1 mm; NEX: 1) を用いて行った。Fe-デフェロキサミン溶液及び Fe 内包リポソーム溶液のファントムを作成し緩和時間を測定した。横軸にファントム中の溶液濃度、縦軸に緩和時間の逆数をプロットすることにより、造影効果の指標となる緩和能 (R 値) を算出した。

#### ⑤ Panc-1 皮下移植マウスにおける MR イメージング

Panc-1 皮下移植マウスの尾静脈より Fe 封入 RGD 修飾リポソームをを投与し、投与 4、24 時間後に MRI 撮像を行った。撮像には 9.4 テスラ小動物用 MRI 装置を使用し、リニア型コイルを用いて RF パルスを送信し、8 チャンネルマウスボディコイルを用いて信号受信した。撮像方法は、脂肪抑制高速スピネコー法を用いて、T1 強調画像を撮影した。

造影効果の評価は、視覚的評価及び腫瘍-筋肉信号強度比により行った。腫瘍-筋肉信号強度比の算出は ImageJ を用いて行い、画像中の腫瘍部位とその近傍の脊柱筋に関心領域を設定し、画素値を測定することにより行った。

### 4. 研究成果

#### ① RGD ペプチドの合成

RGD ペプチドは一般的な Fmoc 固相合成法により合成することができた。また、SATA-RGD 及び RGD-SH を比較的高収率で得ることができた。最終目的物である RGD-SH は HPLC により確認した。

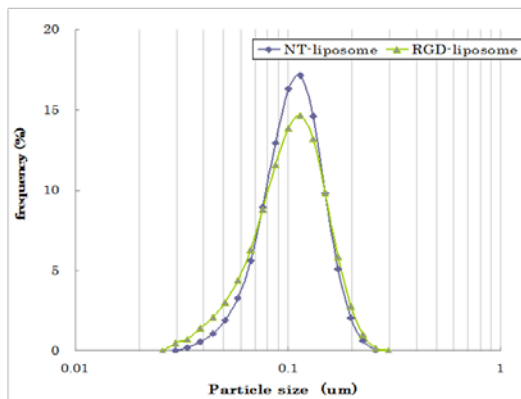
#### ② Fe 内包 RGD 修飾リポソームの作成

RGD-SH に対して大過剰量のリポソームを反応させ反応上清中の RGD-SH の有無を HPLC で確認した結果、RGD-SH が消失し、カップリング反応が進行していることが確認できた。また、RGD-SH の量をリポソーム中の maleimide の量に対して段階的に変化させて反応させた結果、RGD-SH/maleimide=30:1 で修飾反応が飽和に達した。

リポソーム水和時に用いる Fe-デフェ

ロキサミン濃度を 0.75mM~100mM まで変化させて、封入率を比較した結果、濃度依存的に封入量が増加することが確認できた。このことから、デフェロキサミンの溶解限度 (20%) に近い 100mM Fe-デフェロキサミン溶液を水和時に用いることにした。

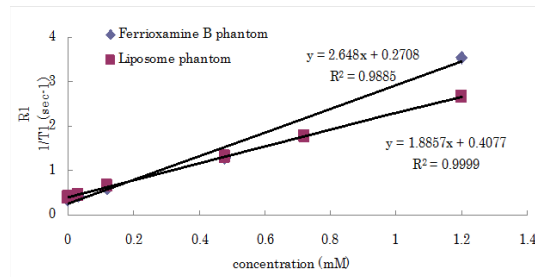
動的光散乱法にてリポソームの粒度分布を測定した結果を以下に示す。RGD 修飾リポソーム及び未修飾リポソームの平均粒子径はいずれも約 100nm であり、RGD 修飾による粒子径の変化は認められなかった。また、ロット間による差も認められなかった。



- ③  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンに対する親和性評価  
Panc-1 を用いて RGD 修飾リポソームによる  $^{125}\text{I}$ -エキスタチンの競合阻害実験を行った。50%結合阻害濃度は  $20\ \mu\text{M}$  (リン脂質濃度換算) であったことから、 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンに対し高い親和性で結合することが示された。

- ④ Fe 封入 RGD 修飾リポソームの縦緩和時間測定

Fe-デフェロキサミン溶液及びFe内包リポソーム懸濁液の緩和時間を測定し、緩和能 ( $R_1$  値) を求めた結果を以下に示す。



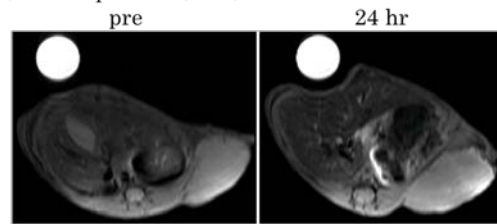
Fe-デフェロキサミン溶液の  $T_1$  緩和能 ( $R_1$  値) は  $2.6\text{mM}^{-1}\text{sec}^{-1}$  であった。一方、Fe内包リポソームの  $R_1$  値はFe-デフェロキサミン溶液の約 30%減弱することが明らかになった。高濃度の Fe-デフェロキサミンを封入することにより強い  $T_1$

緩和時間短縮効果を期待したが、リポソーム内に封入することにより Fe と水分子のプロトンとの相互作用が制限されることにより  $R_1$  値が減弱すると考えられた。

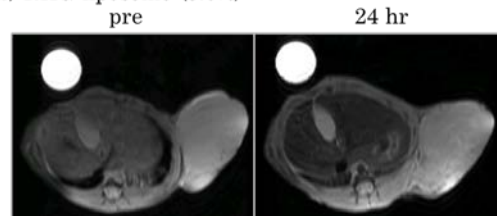
- ⑤ Panc-1 皮下移植マウスにおける MR イメージング

Panc-1 皮下移植マウスに Fe 内包 RGD 修飾リポソームを投与し MRI 撮像を行った結果を下に示す。比較として、 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンに親和性を有さない Fe 内包 RKG リポソームも投与した。

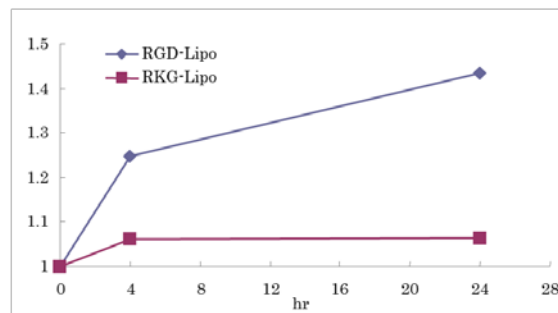
- (a) RGD-liposome (5.0%)



- (b) RKG-liposome (5.0%)



視覚的な評価では Fe 内包リポソーム投与による顕著な造影効果を確認することはできなかった。しかしながら、高速スピネコー法  $T_1$  強調画像中の腫瘍-筋肉信号強度比を算出した結果、Fe 内包 RGD 修飾リポソーム投与により投与 24 時間後で約 40%の信号強度の増加を確認することができた (下図)。一方、RKG 修飾リポソームによる腫瘍-筋肉信号強度比の増加は約 5%であることから、RGD 修飾リポソームが  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンを介して腫瘍組織に集積していることが示された。



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)

研究所・主任研究員  
研究者番号：00345638

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Yoshimoto M, Hayakawa T, Mutoh M, Imai T, Tsuda K, Kimura S, Umeda IO, Fujii H, Wakabayashi K. In vivo SPECT imaging using  $^{111}\text{In}$ -DOTA-c(RGDfK) to detect early pancreatic cancer in a hamster pancreatic carcinogenesis model. J. Nucl. Med., 査読有, 53(5):765-71, 2012.  
DOI: 10.2967/jnumed.111.099630

〔学会発表〕(計6件)

- ① 早川卓也, 吉本光喜, 梅田泉, 武藤倫弘, 谷中昭典, 中釜斉, 藤井博史. MRIによる微小膵癌検出を目指したRGD修飾リポソームの開発. 日本薬学会第132年回. 2012年3月30日, 札幌.
- ② 吉本光喜, 早川卓也, 津田啓介, 梅田泉, 藤井博史, 谷中昭典, 若林敬二. 化学発がんモデルを用いた $^{111}\text{In}$ -DOTA-c(RGDfK)による膵がんイメージング. 第11回放射線医薬品・画像診断薬研究会. 2011年12月3日, 京都.
- ③ 吉本光喜, 津田啓介, 梅田泉, 藤井博史. ハムスター化学発癌モデルにおける $^{111}\text{In}$ -DOTA-c(RGDfK)の早期膵がんイメージング. 第51回日本核医学会総会. 2011年10月28日, 筑波.
- ④ 早川拓也, 吉本光喜, 武藤倫弘, 梅田泉, 藤井博史, 谷中昭典, 若林敬二, 中釜斉. ハムスター化学発がんモデルにおける $^{111}\text{In}$ -DOTA-c(RGDfK)を用いた早期膵がんイメージング. 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月3日, 名古屋.
- ⑤ 早川拓也, 吉本光喜, 武藤倫弘, 梅田泉, 藤井博史, 谷中昭典, 若林敬二, 中釜斉.  $^{111}\text{In}$ -DOTA-c(RGDfK)による早期膵がんイメージング～ハムスター化学発がんモデルを用いた検討～. 第6回日本分子イメージング学会. 2011年5月26日, 神戸.
- ⑥ 早川拓也, 吉本光喜, 武藤倫弘, 梅田泉, 藤井博史, 谷中昭典, 若林敬二, 中釜斉.  $^{111}\text{In}$ -DOTA-c(RGDfK)を用いたハムスター発がんモデルにおける早期膵がんイメージング. 第131年会日本薬学会. 2011年3月30日, 静岡.

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉本 光喜 (YOSHIMOTO MITSUYOSHI)

独立行政法人 国立がん研究センター・研