

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390294

研究課題名(和文) マルチモダリティ分子イメージングを目的とする自己組織化ナノデバイスの開発

研究課題名(英文) Development of self-assembling nanodevices for multimodal molecular imaging

研究代表者

向 高弘 (MUKAI, Takahiro)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30284706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：PAMAM G4-dendrimerに多数のDTPAを結合させた高分子をコアとし、カチオン性高分子PEI、さらにアニオン性高分子 PGAと順次、混合することによりIn-111および蛍光標識自己組織化ナノ粒子を作製した。このPGA被覆自己組織化ナノ粒子は、細胞障害性や血液毒性を示すことなく高い細胞内への取り込みを示した。また、リンパ節へも高い集積を示し、センチネルリンパ節イメージング用の放射性プローブ、蛍光プローブとしての有用性が示された。さらにアニオン性高分子 PGAの代わりにHAを利用することで、CD44陽性がん細胞の核医学および蛍光イメージングプローブとしての可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We established a ternary anionic complex constructed with PAMAM G4-dendrimer modified with DTPA, polyethyleneimine (PEI), and γ -polyglutamic acid (PGA) for molecular imaging. We prepared In-111- or fluorescent-labeled PGA/PEI/G4-DTPA, and evaluated the effectiveness as a nuclear or optical imaging probe for sentinel lymph node (LN). These complexes had little agglutination activity with erythrocytes and no cytotoxicity. Upon administration into rat or mouse footpads intradermally, high uptake was observed in the first draining popliteal LN. Moreover, these complexes clearly visualized the popliteal LN with SPECT and in vivo fluorescent imager.

In-111- and Cy5 dye-labeled ternary complex hyaluronic acid (HA)/PEI/G4-Cy5-DTPA-111In was synthesized by electrostatic interaction. The HA complex demonstrated specific accumulation in CD44 positive tumor cells.

These results suggested that G4-DTPA/PEI/anionic polymer complexes would be useful as nanoprobe for multimodal imaging.

研究分野：放射線科学

キーワード：薬学 放射線 ナノバイオ イメージング

1. 研究開始当初の背景

生体分子イメージングは、我が国の科学政策の重要な項目の一つとして取り上げられるように、生物個体内で働く生体分子の機能および動態を、生きている状態でイメージングにより解析できる、特徴ある手法であり、医学・薬学を含むライフサイエンス分野を中心に、その将来が大きく期待されている。現在、イメージング技術として、主に PET や SPECT を利用する核医学診断法、MRI および光イメージング法を基盤とした研究が推進されている。各イメージングモダリティには一長一短があるため、生体分子イメージングにはそれぞれのケースに対応した分子イメージング技術の選択や相互補助が重要であり、PET/CT や SPECT/CT、最近では PET/MRI などの複合イメージング装置が臨床使用されるに至っている。一方、複数のモダリティに対応できるプローブ(マルチモダリティ分子イメージングプローブ)は、生命現象の解明、病態機能診断において、新たなツールとなることが期待され、その開発研究が進められている。しかし、合成および精製の煩雑性、生体内安定性、毒性面に問題を抱えており、臨床適用に至ったプローブは存在しない。

リポソームやミセル、デンドリマーなどのナノ粒子は、高い生体適合性を示すだけでなく、粒子を抗がん剤や分子イメージングプローブのキャリアとして利用することで悪性腫瘍の治療や診断を達成するなど、バイオメディカル分野の領域において広く研究が推進されている。近年、DNA、ポリエチレンジアミン(PEI)、ポリグルタミン酸(PGA)より構成される自己組織化ナノ粒子が遺伝子ベクターとして開発され、高い細胞内移行性と、低い生体毒性を両立しうることが報告された。

2. 研究の目的

本研究では、この自己組織化ナノ粒子の分子設計を生体安全性の高い分子イメージングプローブのナノキャリアとして展開することとし、以下のプローブ設計を行った。すなわち、核医学イメージング、磁気共鳴画像(MRI)、光イメージングに対応可能なシグナル分子を容易に導入できるポリアミドアミンデンドリマー(PAMAM dendrimer, generation 4th; G4)をコアとして選択し、そこにシグナル放出金属を導入するためのキレート剤(DTPA)を導入後、PEI、PGAと自己組織化させることで分子イメージング用ナノ粒子である PGA/PEI/G4-DTPAを開発することを計画した。

本研究の最終的な目的は、RI、MRI、蛍光でのマルチモダリティイメージングが可能な PGA 複合体の開発であるが、まずは SPECT 用核種である ^{111}In を用いて RI 標識 PGA 複合体を作製し、細胞、小動物を用いた基礎的な評価を行うことにより核医学イ

メージング用ナノ粒子としての有用性を検討した。また、数十 nm の粒子径を有する粒子型プローブの利用が適しているセンチネルリンパ節を標的組織とした。次にこれらの結果を基に、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づいた高精度な分子イメージングを目指し蛍光剤・消光剤結合 PGA 複合体の作製を試みた。さらにアニオン性高分子として、PGA の代わりに、ヒアルロン酸(HA)を使用し作製した HA 複合体についても検討した。

3. 研究の方法

(1) PGA/PEI/G4-DTPA- ^{111}In

PAMAM G4-dendrimer (G4) と *p*-SCN benzyl diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA)を反応させることで G4-DTPA を合成した。これを PEI と混合させることで PEI/G4-DTPA とした後、さらに PGA と混合し PGA/PEI/G4-DTPA を作製した。なお、 ^{111}In 標識体は G4-DTPA- ^{111}In を用いて同様の方法で作製した。

得られたナノ粒子について、マウスマクロファージ様細胞である RAW264 を用いて *in vitro* 評価を行った。また、マウス赤血球を用いて各複合体の赤血球凝集能、溶血性を評価した。さらにラットの foot pad から投与し、経時的に各臓器での放射能を測定することによりナノ粒子の生体内分布を評価した。

(2) PGA/PEI-QSY7/G4-TAMRA-DTPA

蛍光剤 TAMRA を G4 と反応させた後 DTPA を反応させ G4-TAMRA-DTPA を得た。また消光剤 QSY7 を PEI と反応させ PEI-QSY7 を得た。そして G4-TAMRA-DTPA を核とし PEI-QSY7、PGA を自己組織化させることにより、PGA/PEI-QSY7/G4-TAMRA-DTPA を得た。

得られたナノ粒子について、RAW264 を用いて *in vitro* 評価を行った。また、ヌードマウスの foot pad から投与し、膝窩リンパ節への集積性を評価した。

(3) HA/PEI/G4-Cy5-DTPA- ^{111}In

蛍光剤 Cy5 を G4 と反応させた後 DTPA を反応させ G4-Cy5-DTPA を得た。そしてこれを核とし PEI、HA と順次自己組織化させることにより、HA/PEI/G4-Cy5-DTPA を得た。 ^{111}In 標識体は G4-Cy5-DTPA- ^{111}In を用いて同様に作製した。

得られたナノ粒子について、がん細胞を用いて *in vitro* 評価を行った。

4. 研究成果

(1) PGA/PEI/G4-DTPA- ^{111}In

G4-DTPA、PEI、PGA と順次、混合することにより作製した PGA/PEI/G4-DTPA の粒子径とゼータ電位を測定した。その結果、粒子径 24.8 ± 3.7 nm、膜電位 -48.9 ± 1.6 mV のナノ粒子の生成を確認した。

作製したナノ粒子の細胞集積性を RAW264 を用いて評価した結果、PGA/PEI/G4-DTPA-¹¹¹In は PEI/G4-DTPA-¹¹¹In と同等の細胞集積性を示した。また、この集積性は低温条件下で有意に抑制されることから、集積機構の温度依存性が示唆された。また、phagocytosis 阻害薬である cytochalasin D 共存下において取り込みが有意に抑制されたことから取り込み機構の一部に phagocytosis が関与していることが示唆された。一方、PGA 共存下での PGA/PEI/G4-DTPA-¹¹¹In の細胞集積性は、PGA の添加量に依存して抑制されたことから、この集積性には PGA に特異的な輸送経路が関与している可能性が示された。

また RAW264 を用いて細胞障害性を評価した結果、PEI/G4-DTPA では非常に強い細胞障害性を示したが、PGA/PEI/G4-DTPA では細胞障害性が認められなかった。さらに、マウス赤血球を用いて各複合体の赤血球凝集能、溶血性を評価した結果、PEI/G4-DTPA では赤血球の著しい凝集とわずかな溶血が確認されたが、PGA/PEI/G4-DTPA では赤血球の凝集、溶血は認められなかった。

PGA/PEI/G4-DTPA-¹¹¹In をラットの foot pad から投与し、経時的に各臓器での放射能を測定することにより各粒子の生体内分布を評価した。その結果、投与 24 時間後において膝窩リンパ節への高い放射能の集積を認めた。また、膝窩リンパ節、投与部位以外の臓器への取り込みは非常に低い値を示し、リンパ管から血管への漏出は起こりにくいことが示された。また、SPECT/CT 撮像においても、膝窩リンパ節の明瞭なイメージングに成功した (図 1)。

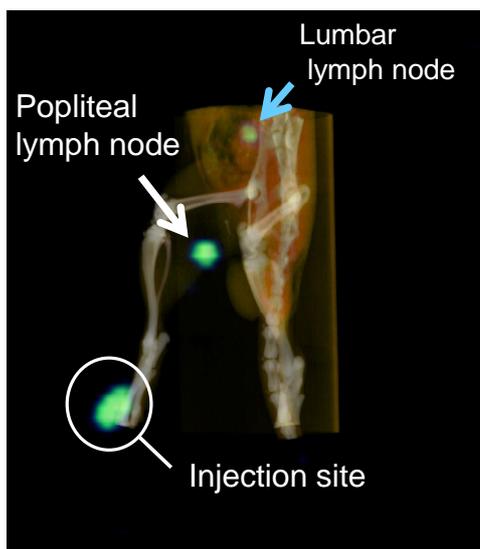


図 1 PGA/PEI/G4-DTPA-¹¹¹In 投与 24 時間後の SPECT/CT 像

(2) PGA/PEI-QSY7/G4-TAMRA-DTPA
G4-TAMRA-DTPA、PEI-QSY7、PGA と順次、混合することにより作製した PGA/

PEI-QSY7/G4-TAMRA-DTPA の粒子径とゼータ電位を測定した。その結果、粒子径 41.2 ± 5.0 nm、膜電位 -48.8 ± 3.0 mV のナノ粒子の生成を確認した。

得られた複合体の蛍光強度は消光剤のない複合体と比べ低い値であり FRET による消光効果と考えた。そこで細胞集積性を RAW264 を用いて評価したところ、細胞に添加後数時間で蛍光シグナルが認められ、その強度は経時的に増加した (図 2)。また、この蛍光シグナルの分布はリソソームマーカー LysoTracker の分布と一致したことから、本複合体は細胞に取り込まれた後、リソソームに移行し、そこで複合体が解離することにより、蛍光強度が増強したと考えられる。さらにヌードマウスを用いた蛍光イメージングの結果から、PGA/PEI-QSY7/G4-TAMRA-DTPA によるリンパ節の検出可能であることが明らかになった (図 3)。

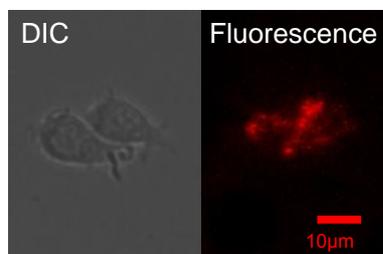


図 2 PGA/PEI-QSY7/G4-TAMRA-DTPA を RAW264 へ添加 24 時間後の顕微鏡像

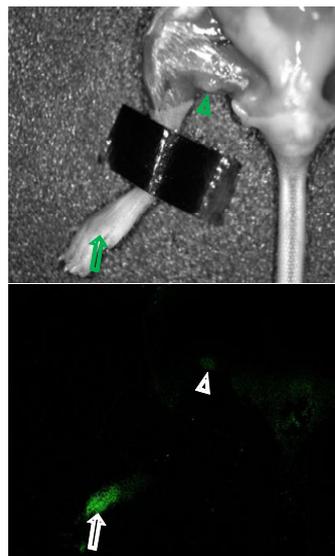


図 3 PGA/PEI-QSY7/G4-TAMRA-DTPA 投与 6 時間後の画像 (右: 蛍光、矢印: 投与部位、矢頭: リンパ節)

(3) HA/PEI/G4-Cy5-DTPA-¹¹¹In

G4-Cy5-DTPA、PEI、HA と順次、混合することにより作製した HA/PEI/G4-Cy5-DTPA の粒子径とゼータ電位を測定した。その結果、粒子径 37.2 ± 2.2 nm、膜電位 -32.4 ± 0.6 mV のナノ粒子の生成を確認した。

HA は生体適合性のよい負電荷を持つ高分子であり、がん幹細胞で高発現した HA レセプター (CD44) に結合することがわかっている。そこでまず数種のがん細胞 (T24: ヒト膀胱癌由来細胞、PANC1: ヒト膵臓癌由来細胞、MCF7: ヒト乳癌由来細胞) について、CD44 の発現量をウェスタンブロットにより検討した。その結果、CD44 発現量は T24 > PANC1 > MCF7 の順となった。そこで、これらのがん細胞への HA/PEI/G4-Cy5-DTPA-¹¹¹In の集積性を検討した。その結果、¹¹¹In 標識複合体はいずれのがん細胞へも経時的に集積した。またその集積量は T24 > PANC1 > MCF7 の順となり、CD44 の発現量と相関した。また、これらの細胞を蛍光顕微鏡にて観察したところ、複合体の集積量に依存した蛍光シグナルが認められた (図 4)。

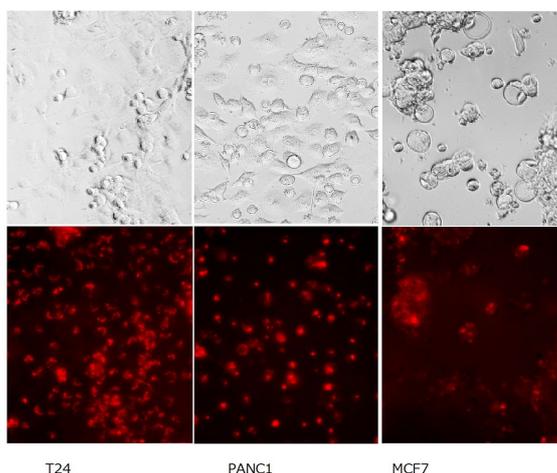


図 4 HA/PEI/G4-Cy5-DTPA-¹¹¹In をがん細胞へ添加 24 時間後の顕微鏡像

(4) まとめ

本研究では、PAMAM G4-dendrimer に多数の DTPA を結合させた高分子をコアとし、カチオン性高分子 PEI、さらにアニオン性高分子 PGA と順次、混合することにより ¹¹¹In および蛍光標識自己組織化ナノ粒子の作製に成功した。この PGA 被覆自己組織化ナノ粒子は、細胞障害性や血液毒性を示すことなく高い細胞内への取り込みを示した。また、リンパ節へも高い集積を示し、センチネルリンパ節イメージング用の放射性プローブ、蛍光プローブとしての有用性が示された。さらにアニオン性高分子 PGA の代わりに HA を利用することで、CD44 陽性がん細胞の核医学および蛍光イメージングプローブとしての可能性を示すことができた。これらの結果は、マルチモダリティ分子イメージングプローブの開発に有用な知見を与えるものと考えられる。

<引用文献>

Tomoaki Kurosaki, Takashi Kitahara, Shintaro Fumoto, Koyo Nishida, Junzo

Nakamura, Takuro Niidome, Yukinobu Kodama, Hiroo Nakagawa, Hideto To, Hitoshi Sasaki: Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and -polyglutamic acid for gene delivery systems, 30 巻, 2009, 2846-2853

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 1 件)

Kohei Sano, Yuriko Iwamiya, Tomoaki Kurosaki, Mikako Ogawa, Yasuhiro Magata, Hitoshi Sasaki, Takashi Ohshima, Minoru Maeda, Takahiro Mukai: Radiolabeled -polyglutamic acid complex as a nano-platform for sentinel lymph node imaging, Journal of Controlled Release, 査読有, 194 巻, 2014, 310-315
DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.08.025

[学会発表](計 8 件)

長谷川真理子, 田中将史, 向高弘: アポ E 由来ペプチドを基盤とする脂質ナノディスクの腫瘍細胞への集積性評価, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 神戸サンポーホール (神戸)

神寶圭介, 萩森政頼, 向高弘: 腎障害の軽減を目的としたリポソーム化ヨード造影剤の開発, 第 64 回日本薬学会近畿支部大会, 2014 年 10 月 11 日, 京都薬科大学 (京都)

辻野奈緒美, 田中将史, 向高弘: 腫瘍イメージングを目指した葉酸修飾脂質ナノディスクの細胞集積性の評価, 第 64 回日本薬学会近畿支部大会, 2014 年 10 月 11 日, 京都薬科大学 (京都)

Masayori Hagimori, Eri Hatabe, Kohei Sano, Hitoshi Sasaki, Hideo Saji, Takahiro Mukai: Development of fluorescent -polyglutamic acid complex for sentinel lymph node imaging, 2014 World Molecular Imaging Congress, 2014 年 9 月 17 日~20 日, Seoul (Korea)

千石梓, 畑辺恵里, 萩森政頼, 佐野紘平, 佐々木均, 佐治英郎, 向高弘: センチネルリンパ節の蛍光イメージングを目指した -ポリグルタミン酸被覆ナノ粒子の作製, 第 14 回放射性医薬品・画像診断薬研究会, 2014 年 9 月 13 日, 京都勧業館 (京都)

萩森政頼, 畑辺恵里, 佐野紘平, 佐々

木均, 佐治英郎, 向高弘: センチネルリンパ節イメージングを目指した蛍光標識 -ポリグルタミン酸複合体の開発, 第9回日本分子イメージング学会学術集会, 2014年5月22日~23日, 千里ライフサイエンスセンター(豊中)

畑辺恵里, 萩森政頼, 佐野紘平, 佐々木均, 向高弘: 生体イメージングを目指した -ポリグルタミン酸被覆蛍光ナノ粒子の作製, 第63回日本薬学会近畿支部大会, 2013年10月12日, 同志社女子大学(京田辺)

Kohei Sano, Yuriko Iwamiya, Tomoaki Kurosaki, Mikako Ogawa, Yasuhiro Magata, Hitoshi Sasaki, Takashi Ohshima, Minoru Maeda, Takahiro Mukai: Sentinel lymph node imaging with a novel radiolabeled -polyglutamic acid complex, The Society of Nuclear Medicine, 59th Annual Meeting, 2012年6月9日~13日, Miami Beach (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向 高弘 (MUKAI, Takahiro)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 30284706

(2) 研究分担者

佐々木 均 (SASAKI, Hitoshi)
長崎大学・大学病院・教授
研究者番号: 00170689

(3) 連携研究者

田中 将史 (TANAKA, Masafumi)
神戸薬科大学・薬学部・講師
研究者番号: 40411904