

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591828

研究課題名(和文) インテグリン指向性リポソームによる膵がんの早期診断及び内照射治療法の開発

研究課題名(英文) Development of integrin targeting liposome for imaging and radionuclide therapy 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・その他部局等・主任研究員

研究者番号：00345638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵癌の早期診断に加え、内照射治療を目的としたリポソーム製剤の開発を試みた。膵癌に高発現している α_3 インテグリンに着目し、RGD修飾リポソームの開発を計画した。我々は、粒子径が約100nmのRGD修飾リポソームの作成に成功した。また、RGD修飾リポソームは α_3 インテグリンに対する高い結合親和性を有していることを確認した。しかし、体内分布の結果から、肝臓や脾臓への顕著な集積が認められ、また、腫瘍への集積も低かった。本研究では、リポソームへのRGD修飾はPEGの機能を損なう可能性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)： α_3 integrin is overexpressed in endothelial cells and various tumor cells including pancreatic cancer. In this study, we developed RGD-modified liposomes for imaging and internal radionuclide therapy of pancreatic cancer. We successfully synthesized the RGD-modified liposomes with about 100 nm of particle size. The RGD-modified liposomes dose-dependently inhibited the binding of ^{125}I -echistatin to PANC-1. The IC50 values were 5-67 μM as phospholipids. In contrast, RGD-modified liposome and unmodified liposome did not inhibit the binding. Biodistribution studies using the liposomes loaded with ^{111}In indicated rapid clearance of the RGD-modified liposome from blood. Significant accumulation of radioactivity in spleen was found with increase in the amount of RGD modification (170.4-403.9% ID/g at 24 h). Unmodified liposome showed the highest tumor uptake (2.80% ID/g) at 24 h, whereas the RGD-modified liposomes showed the lower tumor uptake (1.47-2.25% ID/g).

研究分野：分子イメージング

キーワード：膵がん リポソーム RGD インテグリン

1. 研究開始当初の背景

膵がんは年々増加傾向にあり、本邦の癌による死因の 6.8% を占め、肺癌、胃癌、大腸癌、肝癌に次いで第 5 位である。膵がんには特異的な初発症状(自覚症状)がなく、膵がんと診断された時には大半が高度に進行している。また、既に癌が膵臓の周囲の重要臓器に拡がっていたり、肝臓などの他臓器に転移していることが多いため、多くの症例が外科手術の適応にならない。例え切除可能であっても早期に再発を生じることが多く、Stage I の症例に限っても 5 年生存率は 57% しかない(日本膵臓学会膵癌登録 20 年間の総括)。また、膵がんは血流に乏しく、十分な量の抗がん剤が到達しないため、治療効果を得られないことが考えられる。従って、膵がんを克服するためには早期発見に加え、より効果的な治療方法の開発が必要である。

細胞接着因子の一つである $\alpha_v\beta_3$ インテグリンは、膵がんで高発現することが報告されている。これまでの申請者の検討から、ハムスターを用いた N-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 誘発膵がんモデルにおいて前癌病変(過形成や異型過形成)の段階から、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの高発現が明らかとなり、膵がんの早期診断や治療において有望な標的分子であることを示した。

2. 研究の目的

本研究では膵がんの早期診断に加え、内照射治療を目的とし $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを標的にした RGD 修飾リポソームの開発を計画した。リポソームは効率的に内包物を腫瘍組織へ運搬できるため、 $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ -DOTA-c(RGDfK) 単独に比べ優れた画像コントラストや治療効果が期待できる。申請者はこれまで、MRI 用分子プローブの開発を目的として、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに親和性を有する RGD 修飾リポソームの作成に成功している。これらの知見を基に、種々の RGD 修飾リポソームを作成する。皮下腫瘍移植モデルに加え、ヒト膵がんの発癌過程に酷似している BOP 誘発ハムスター膵がんモデルを用いて放射性核種内包 RGD 修飾リポソームの膵がんイメージング剤及び内照射治療薬剤としての評価を行う。

3. 研究の方法

(1) RGD 修飾リポソームの作成

Distearoylphosphatidylcholine (DSPC)、コレステロール、N-carbamoyl-methoxypolyethylene glycol (2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (mPEG-DSPE) からなるリポソームをエクストリューダーを用いて作成した。また、mPEG-DSPE に対して maleimide-mPEG-DSPE の比率を 50、5.0、2.5、1.0mol% と変化させることにより、RGD 修飾量の調整を行った。RGD をリポソーム表面に修飾するために、c(RGDfK) をチオール化し SH 基

を導入し、maleimide と反応させることにより RGD を修飾した。 ^{111}In 標識するためのキレート剤としてデフェロキサミンを封入した。作成したリポソームは動的散乱法により粒子径を測定した。

(2) リポソームの ^{111}In 標識

リポソームへの ^{111}In 標識は、錯体交換反応により行った。0.5M 酢酸バッファー(pH 6.0)に 0.5mM オキシニ-エタノール溶液、 $^{111}\text{InCl}_3$ 溶液を加えて、37 °C で 30 分間インキュベートし、 ^{111}In -オキシニ錯体を形成させた。その後、超遠心分離(1,000,000 rpm, 20 °C, 20 min)を行い、リポソーム沈殿と上清に分離することにより未反応の ^{111}In -オキシニ錯体を除去した。

(3) $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する結合親和性の評価

RGD 修飾リポソームによる ^{125}I -エキスタチン ($\alpha_v\beta_3$ インテグリン阻害剤) の PANC-1 (ヒト膵癌細胞) に対する 50% 結合阻害濃度 (IC_{50}) を調べることで、結合親和性を評価した。 ^{125}I -エキスタチンとリポソーム、PANC-1 (2×10^5 cells) を反応溶液に加えて室温で 2 時間インキュベートした後、セルハ-ベスタを用いて細胞をガラスフィルターにトラップした。フィルターを洗浄後、フィルターの放射能を測定した。

(4) 体内動態に関する検討

^{111}In 内包 RGD 修飾リポソーム及び ^{111}In 内包 RGD 未修飾リポソームをそれぞれ 74 kBq/ μmol lipid/100 μl となるように調整し、PANC-1 皮下移植マウスに尾静脈より投与した。投与して一定時間後に血液や各組織を取り出し、重量及び放射能を測定し、組織重量集積率(%ID/g)を算出した。

4. 研究成果

作成したリポソームの粒子径は約 100nm であった。また、RGD の有無による粒子径の差は認められなかった(図 1)。

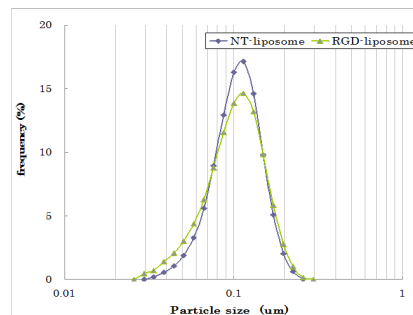


図 1. RGD 修飾リポソーム及び RGD 未修飾リポソームの粒径分布

^{125}I -エキスタチンと $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを発現している PANC-1 細胞を用いて、結合親和性の評価を行った。RGD 修飾リポソームは ^{125}I -エキスタチンの PANC-1 への結合を濃度

依存的に阻害した。また、それぞれの IC50 は RGD 修飾量依存的に低下し、5-67 μM (リン脂質換算)であった。一方、RGD 非修飾リポソームでは阻害効果は認められず、RGD を修飾することにより、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンへの結合能を与えることができた。

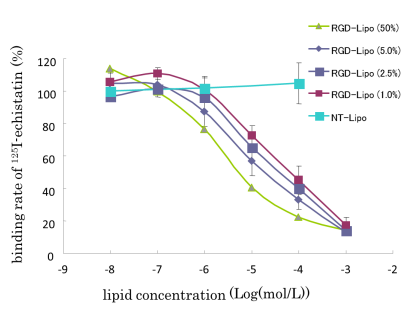


図 2. RGD 修飾リポソームによる ^{125}I -エキスタチンの結合阻害

PANC-1 担癌マウスを用いて、 ^{111}In 内包 RGD 修飾リポソームの体内動態に関する検討を行った。その結果、RGD 未修飾リポソームに比べ、RGD 修飾リポソームは脾臓への集積が顕著に増加した。また、RGD 修飾リポソームは血中クリアランスが早く、RGD 修飾により PEG の効果が消失していることを確認した。一方、腫瘍への集積は低く、投与 24 時間後において 1.47~2.21 %ID/g であった。RGD 未修飾リポソームの腫瘍集積は 2.8 %ID/g と最も高い集積率を示したが、高い血液滞留性が大きく影響しているものと考えられた。

以上の結果より、RGD 修飾はリポソームに $\alpha_v\beta_3$ インテグリン結合親和性を与えることができたが、未修飾リポソームに比べて体内動態に著しく影響を与えることが分かった。

< 引用文献 >

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 9 件)

Tani H, Kurihara H, Hiroi K, Honda N, Yoshimoto M, Kono Y, Murakami R, Kumita S, Arai Y, Itami J. Correlation of ^{18}F -BPA and ^{18}F -FDG uptake in head and neck cancers. *Radiother. Oncol.*, 113(2):193-7, 2014. 査読有. DOI: 10.1016/j.radonc.2014.11.001.
Yoshimoto M, Hirata M, Kanai Y, Naka S, Nishii R, Kagawa S, Kawai K, Ohmomo Y. Monitoring of gefitinib sensitivity with radioiodinated PHY based on EGFR expression. *Biol. Pharm. Bull.*, 37(3):355-60, 2014. 査読有. <http://doi.org/10.1248/bpb.b13-00559>

Yoshii Y, Matsumoto H, Yoshimoto M, Furukawa T, Morokoshi Y, Sogawa C, Zhang MR, Wakizaka H, Yoshii H, Fujibayashi Y, Saga T. Controlled Administration of Penicillamine Reduces Radiation Exposure in Critical Organs during ^{64}Cu -ATSM Internal Radiotherapy: A Novel Strategy for Liver Protection. *PLoS One*, 9(1): e86996, 2014. 査読有. DOI: 10.1371/journal.pone.0086996. eCollection 2014.

Hayakawa T, Mutoh M, Imai T, Tsuta K, Yanaka A, Fujii H, Yoshimoto M. SPECT/CT of lung nodules using ^{111}In -DOTA-c(RGDfK) in a mouse lung carcinogenesis model. *Ann. Nucl. Med.*, 27(7):640-7, 2013. 査読有. DOI: 10.1007/s12149-013-0729-1.

Hirata M, Kanai Y, Naka S, Yoshimoto M, Kagawa S, Matsumuro K, Katsuma H, Yamaguchi H, Magata Y, Ohmomo Y. A useful EGFR-TK ligand for tumor diagnosis with SPECT: development of radioiodinated 6-(3-morpholinopropoxy)-7-ethoxy-4-(3'-iodophenoxy)quinazoline. *Ann. Nucl. Med.*, 27(5):431-43, 2013. 査読有. DOI: 10.1007/s12149-013-0703-y.

Yoshimoto M, Kurihara H, Honda N, Kawai K, Ohe K, Fujii H, Itami J, Arai Y. Predominant contribution of L-type amino acid transporter to 4-borono-2- ^{18}F -fluoro-phenylalanine uptake in human glioblastoma cells. *Nucl. Med. Biol.*, 40(5):625-9, 2013. 査読有. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2013.02.010.

Ueno T, Imaida K, Yoshimoto M, Hayakawa T, Takahashi M, Imai T, Yanaka A, Tsuta K, Komiya M, Wakabayashi K, Mutoh M. Non-invasive X-ray Micro-computed Tomographic Evaluation of Indomethacin on Urethane-induced Lung Carcinogenesis in Mice. *Anticancer Res.*, 32(11):4773-80, 2012. 査読有. <http://ar.iiarjournals.org/content/32/11/4773.long>.

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

Hirata M, Kanai Y, Naka S, Matsumuro K, Kagawa S, Yoshimoto

M, Ohmomo Y. Synthesis and evaluation of radioiodinated phenoxyquinazoline and benzylaminoquinazoline derivatives as new EGF receptor tyrosine kinase imaging ligands for tumor diagnosis using SPECT. Ann. Nucl. Med., 26(5):381-9, 2012. 査読有. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12149-012-0583-6>.

〔学会発表〕(計 2 件)

Yoshimoto M, Hayakawa T, Kimura S, Umeda IO, Fujii H. Synthesis and characterization of RGD-modified liposomes for targeting $\alpha\beta 3$ integrin. 11th World Federation of Nuclear Medicine and Biology. 2014/8/27-31, Cancun (Mexico).

Yoshimoto M, Hayakawa T, Yamaguchi M, Kimura S, Umeda IO, Fujii H. Development of RGD-liposomes for MR imaging of pancreatic tumor. 2012 World Molecular Imaging Congress. 2012/9/5-8, Dublin (Ireland).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 光喜 (YOSHIMOTO, Mitsuyoshi)

国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：00345638