

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861034

研究課題名（和文）固形がんの内用療法を可能とする新規放射性核種封入リポソームの開発

研究課題名（英文）Development of Novel Radiolabeled Liposomes for Therapy of Solid Tumor

研究代表者

濱道 修生 (Hamamichi, Shusei)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：60721686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：リポソームは網内系組織（肝臓・脾臓）に非特異的に集積するため、リポソームの内部に封入される放射性核種（RI）-リガンド錯体の性質に着目し、正常組織への非特異的集積の低減を可能にする新規リガンドの作製を試みた。複数のRI封入リポソームを腫瘍皮下移植マウスに投与した結果、網内系クリアランスには、リポソームの分解が重要因子であり、これをもとに診断・治療に必要なRI集積の増減目標の設定を進めている。また新規リガンドを作製し、上記確立した動物モデル、解析方法を用いて有用性を検討している。さらに、RI封入リポソームはリポソーム化抗がん剤の薬効予測のバイオマーカーとして応用できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Since liposome is well-known to accumulate in the reticuloendothelial system (RES), we focused on characteristics of radioisotope (RI)-ligand complex inside the liposome, and designed new ligands that would reduce accumulation of RI in the non-target organs. Through evaluating multiple RI-encapsulated liposomes by using tumor xenografted mice, we demonstrated that, to achieve clearance of RI from the RES, liposomes needed to be properly degraded in the RES. Based on these results, we proceeded to determine necessary settings for diagnosis and therapy. We synthesized novel ligands and tested their capacities toward minimizing RES accumulation of RI by using aforementioned animal models and methods. In addition, we assessed the application of RI-encapsulated liposome as a biomarker of liposomal anti-cancer agent, and determined that there was a clear correlation between tumor accumulation of RI-encapsulated liposome and pharmacological effectiveness of the liposomal anti-cancer agent.

研究分野：核医学

キーワード：放射性核種封入リポソーム 放射性核種 リポソーム 固形がん 内用療法

1. 研究開始当初の背景

ラジオアイソトープ(RI)内用療法は放射線治療のひとつであり、その治療効果はターゲット部位への RI の集積量と正常組織への非特異的被曝線量の低減により決定される。従来、細胞殺傷性の強い高エネルギー放射線を放出する RI 固有の性質に着目し、それを利用したがん治療の開発が進められてきた。しかし、これらの体内動態は RI 自体の性質によるため、内用療法への利用には限界があった。そこで、標的指向性を持つペプチドやタンパク質などに RI を結合させることで、RI をターゲット部位に、より効率よく集める方法が開発された。

その著例のひとつが B 細胞非ホジキンリンパ腫に対して有用性を示すイブリツモマブチウキセタン(ゼヴァリン®)である。さらにこの手法は、診断用 RI と治療用 RI を各々結合させることができるため、集積を画像として把握しつつ、治療を進めるといった診断治療一体型(theranostics)医療としても注目を集めている。ただし、ゼヴァリン®対象となるリンパ腫は放射線感受性が高いが、固形がんは一般的にリンパ腫より低感受性であり、固形がんに対する内用療法を成功させるためには、腫瘍により多くの放射性核種を集積させ、正常組織への非特異的集積を低減させることが極めて重要と考えられる。

2. 研究の目的

我々は、薬物送達システムのひとつであるリポソームとリポソームの内部に封入される RI-リガンド錯体の性質を巧みに利用し、有効な治療効果に乏しい固形がんに対する RI 内用療法の開発を目指している。リポソームは、enhanced permeability and retention (EPR)効果により、腫瘍への高い集積性を持つことが知られている。我々は、リポソームに診断用 RI を高率に封入する技術を既に開発しており、これを治療用 RI に応用することで、RI の高い腫瘍集積を図る。

一方、リポソームを用いた際、ナノキャリアの特性として網内系組織(肝臓・脾臓)への非特異的集積も観察される。本研究では、正常組織への非特異的集積の低減を目指し、リポソームの性質を制御するのではなく、リポソームに封入された RI-リガンド錯体の性質に着目し、リポソームが正常細胞に取り込まれ、リポソームが分解されても RI-リガンド錯体は蓄積することなく、細胞外、並びに体外へと排出される新規リガンドの作製を試みた。

3. 研究の方法

まず、新規リガンドの一部となる In-111 1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)と In-111 diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)、並びに網内系クリアランスが確認されている In-111 ethylenedicysteine (EC)の各封入リポソーム

の体内分布と RI-リガンド錯体の排出を複数の腫瘍皮下移植マウスで検討した。腫瘍内、並びに肝臓内の RI 封入リポソームの状態は HPLC で解析した。さらに、*in vivo* SPECT/CT イメージングにより RI 封入リポソームの集積を解析し、より実際の体内分布、特に腫瘍と網内系組織の集積を視覚化し、診断・治療に必要な集積の増減目標を設定した。

次に DOTA、並びに DTPA を基本骨格とし、EC と同等の網内系組織への低い集積性を持つ新規リガンドの作製を目標とし、EC の網内系クリアランスに関与が示唆されるトランスポートの基質に注目してプライオリティー・リストを作成した。最初の基質候補としてグルタチオンに着目し、グルタチオンと maleimido-mono-amide-DOTA、または maleimido-mono-amide-DTPA を用いて、グルタチオン-DOTA、並びにグルタチオン-DTPA を作製した。各種分析手段により、複合体の形成、In-111 との錯体形成などを確認した後、上記確立した動物モデル、及び解析方法を用いて新規リガンドの体内動態を検討した。

4. 研究成果

従来、リポソームの表面修飾によるより高い腫瘍集積を試みた研究が多数報告されてきたが、これだけでは RI の非特異的集積の改善には繋がらない。我々は、細胞内に取り込まれたリポソームが分解され、リポソーム内に封入されていた RI-リガンド錯体が速やかに細胞外、並びに体外へと放出されることに注目し、リガンドの性質が重要な役割を果たすと考えた。

そこで本研究では In-111 DOTA と In-111 DTPA、並びに In-111 EC の各封入リポソームを複数のマウス腫瘍皮下移植モデルに投与し、体内分布を解析した。S180 皮下移植 ddY マウスでは、In-111 EC による網内系クリアランスが見られたが、EMT6 皮下移植 BALB/c マウス、並びに CT26 皮下移植 BALB/c マウスでは、全てのリガンドが迅速に排出されなかった。ddY マウスの肝臓ではリポソームの分解が確認された一方、BALB/c マウスの肝臓では大部分がリポソームとして存在していた。したがって、網内系クリアランスの達成には、網内系組織におけるリポソームの処理能力が重要な因子であることが明らかとなった。

次に、治療実験前の基礎検討として、BALB/c-nu/nu マウスを用いた動物実験を実施した。In-111 EC 封入リポソームの投与量を減少することにより、ヌードマウスにおいても網内系クリアランスは確認された。また、*in vivo* SPECT/CT 装置を用いて、In-111 EC 封入リポソーム、及び In-111 EC 封入 polyethylene glycol (PEG) 修飾リポソームの腫瘍への集積と網内系組織からの排出を可視化した。これらの結果をもとに、RI 封入リポソームによる診断・治療に必要な RI 集積の

増減目標の設定を今後進めていく。

In-111 EC の網内系クリアランスに關与すると示唆されるトランスポーターの基質に注目し、プライオリティー・リストを作成した。In-111 グルタチオン-DOTA 封入リポソーム、並びに In-111 グルタチオン-DTPA 封入リポソームを作製し、S180 皮下移植 ddY マウスを用いて、新規リガンドによる網内系クリアランスを評価した。その結果、網内系クリアランスは確認されなかったため、上記プライオリティー・リストを参考に、新規リガンドの作製、及び有用性の検討を進めている。

これまでの知見から、RI 封入リポソームを用いて、リポソーム化抗がん剤の薬効を予測できる可能性が示唆されたため、その応用を本研究ではコントロールとして用いた In-111 DTPA 封入 PEG 修飾リポソームを使って検討した。まず、リポソームの腫瘍集積と腫瘍の組織学的解析を比較し、リポソームによる腫瘍集積と EPR 効果と關連する要因との關係を明らかにした。さらに薬効予測を検討するため、まず In-111 DTPA 封入 PEG 修飾リポソームを投与し、*in vivo* SPECT/CT 装置により腫瘍集積を撮像した。その後、リポソーム化抗がん剤(ドキシル[®])を投与し、ドキシル[®]による抗がん作用を解析した。その結果、RI 封入リポソームの腫瘍集積とドキシル[®]の薬効に高い相関が確認され、RI 封入リポソームはリポソーム化抗がん剤の薬効予測を可能とするバイオマーカーとして期待できる。

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)

Ito K*, Hamamichi S*, Asano M, Hori Y, Matsui J, Iwata M, Funahashi Y, Umeda IO, Fujii H. Radiolabeled Liposome Imaging Determines an Indication for Liposomal Anti-cancer Agent in Ovarian Cancer Mouse Xenograft Models. **Cancer Sci.** 2016 Jan;107(1):60-67. DOI: 10.1111/cas.12841. Peer-reviewed. *: **Equal contribution.**

[学会発表](計5件)

Hamamichi S, Matsuura Y, Ohnuki K, Umeda IO, Fujii H. Tumor Accumulation and Rapid Clearance from the Reticuloendothelial System by ¹¹¹In-ethylenedicysteine PEGylated Liposome in a Human Head and Neck Cancer Xenograft Model. **The 11th Annual Meeting of the Japanese Society for Molecular Imaging**, May 28-29 2016, Kobe International Conference Center (Kobe).

Hamamichi S, Matsuura Y, Ohnuki K, Umeda IO, Fujii H. Clearance of radiolabeled liposome from RES in human cancer mouse

model. **The 55th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society for Nuclear Medicine**, Nov. 5-7 2015, Hyatt Regency Tokyo (Tokyo).

Hamamichi S, Matsuura Y, Ohnuki K, Umeda IO, Fujii H. ¹¹¹In-ethylenedicysteine liposomes with high tumor accumulation and rapid background clearance in a human cancer xenograft model. **The 10th Annual Meeting of the Japanese Society for Molecular Imaging**, May 20-21 2015, Tower Hall Funabori (Tokyo).

Hamamichi S, Matsuura Y, Ohnuki K, Umeda IO, Fujii H. Biodistribution patterns of radionuclides through altering chelating ligands in radiolabeled liposomes. **The 54th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society for Nuclear Medicine**, Nov. 6-8 2014, Osaka International Convention Center (Osaka).

Hamamichi S, Umeda IO, Fujii H. Development of radiolabeled liposomes for theranostic application toward cancer diagnosis and treatment. **The 9th Annual Meeting of the Japanese Society for Molecular Imaging**, May 22-23 2014, Senri Life Science Center Building (Osaka).

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
国立がん研究センター・先端医療開発センター・機能診断開発分野
<http://epoc.ncc.go.jp/division/functional-imagi>

ng/

日経産業新聞
2016年3月30日付

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱道 修生 (HAMAMICHI, Shusei)
国立がん研究センター・先端医療開発セン
ター・機能診断開発分野・研究員
研究者番号：60721686

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：