

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

「高磁場MRIとオールインワンナノデバイスによる癌微小  
病変の非侵襲的診断・治療システムの開発」

に関する研究

平成19年度 総括研究年度終了報告書

主任研究者 石坂幸人

平成20（2008）年3月

## 目次

I. 総括研究年度終了報告		
「高磁場MRIとオールインワンナノデバイスによる癌微小病変の 非侵襲的診断・治療システムの開発」に関する研究	-----	1
石坂幸人		
II. 分担研究年度終了報告		
1. 「高磁場MRIとオールインワンナノデバイスによる癌微小病変の 非侵襲的診断・治療システムの開発」に関する研究	-----	8
石坂幸人		
2. 「磁性ナノ粒子の開発」に関する研究	-----	13
長谷川正勝		
3. 「感温性リポソームの構築」に関する研究	-----	16
河野健司		
4. 「高磁場MRIを用いた癌微小病変高感度検出システムの開発」 に関する研究	-----	21
青木伊知男		
5. 「膵臓癌に対する高性能標的化抗体の作成の基盤研究」に関する研究	-----	23
濱田洋文		
6. 「膵臓癌発がんモデルの作成とMRI画像診断」に関する研究	-----	28
中釜 斉		
7. 「ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による局所DDSの開発」 に関する研究	-----	31
山下克美		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	36

「高磁場MRIとオールインワンナノデバイスによる癌微小病変の  
非侵襲的診断・治療システムの開発」に関する研究

研究要旨：本プロジェクトでは MRI 造影剤・抗癌剤・単クローン抗体を搭載したナノプローブとして、診断・治療を同時に行う事が可能なオールインワンナノデバイス（AIO）を作成する。平成19年度、単クローン抗体による in vivo イメージング、マンガンイオン包埋型リポソームによる MRI 画像化、温度に反応して融解する感温性リポソームの改良、このリポソームと抗癌剤を組み合わせたピンポイント DDS が可能になった。また新たに膵臓癌、前立腺癌に反応性を示す単クローン抗体が得られた。今年度明確になった問題を解決し、次年度では AIO の創成を行う。

A. 研究組織

研究代表者 石坂幸人（国立国際医セ、  
難治性疾患研究部長）

分担研究者

長谷川正勝（名糖産業株式会社参与）

河野健司（大阪府立大学工学部 教授）

青木伊知男（放射線医学総合研究所・分子  
イメージング研究センター・先端生体計測研  
究グループ・計測システム開発チーム・チー  
ムリーダー主任）

濱田洋文（札幌医科大学 教授）

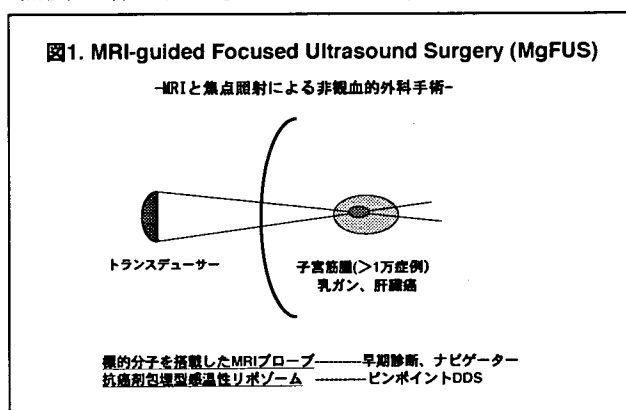
中釜 斉（国立がんセンター研究所 副所長）

山下克美（金沢大学薬学部 准教）

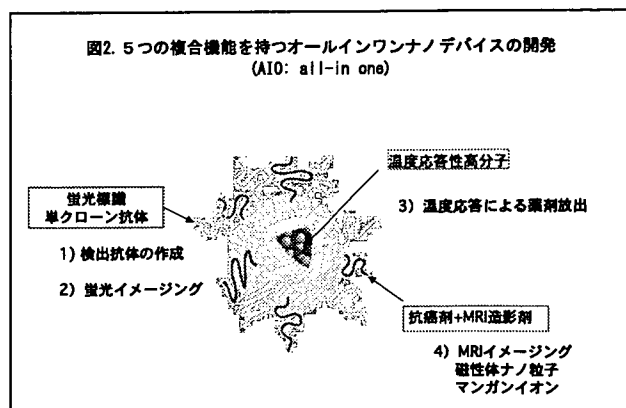
B. 研究目的

近年、MRI による病変の検出を行いながら同部位に外部から超音波焦点照射し、局所温度を 80 度程度にまで上昇させることで、腫瘍病変の切除を可能にする機器が使用可能になった（図 1）。これは MRI-guided ultrasound surgery と呼ばれ、子宮筋腫症例について既に 1 万例以上の症例に施行されている。患者の負担が軽減されるとともに、治療成績も良好であることから、今後さらに臨床における

需要が増加するものと思われる。



本研究課題では、このような新しい機器の性能を最大限引き出すことを目的として、診断と治療が同一のナノ粒子で達成可能なオールインワンナノデバイス（AIO）の創成を目指している。AIO に搭載する機能を図 2 に

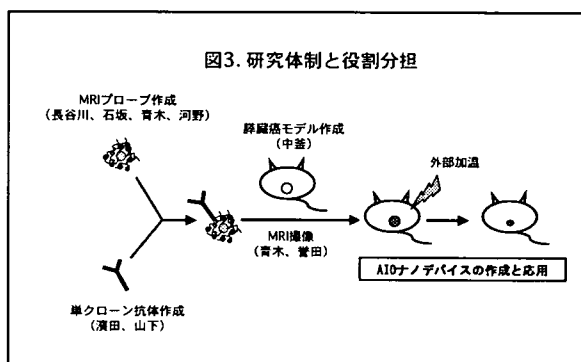


示す。即ち、

1. 腫瘍を標的化可能な単クローン抗体や標的ペプチド
  2. 磁性体ナノ粒子やマンガンイオン等の MRI 造影剤の搭載
  3. 抗癌剤を搭載したリポソーム
- そして、
4. 抗癌剤を自在に放出するための特性である。

本プロジェクトでは、これらの要件を達成することが可能な分担研究者から構成され、A10 の有効性は動物モデルを用いて検証する事までを網羅している。

図 3 に分担研究者と分担研究内容を示す。



### I. MRI プローブの調整と選択

a. 磁性体ナノ粒子 (CMDM) : 研究代表者である石坂と長谷川 (名糖産業株式会社) らはこれまでに、MRI 用造影剤として carboxy-methyl dextrans magnetite (以下 CMDM) を創成した (出願特許番号 特 2006-048576)。CMDM は、ナノ粒子の表面がマイナスに荷電しているため、非特異的な細胞への取り込みが究めて少ない。そのため、CMDM を担癌マウスに投与すると、腫瘍組織中に集積した後、消退する傾向を示す。一方、市販されている他社の磁性体ナノ粒子はそれ自身の性質として、腫瘍組織に取り込まれてしまうことが明らかとなった。本プロジェクトの要件である MRI による標的化を達成するための MRI プローブとしては、CMDM が最も適しているということが出来る。

b. マンガンイオンと感温性リポソームの融合 : 近年、新しい MRI 用プローブとしてマンガンイオンが使用されるようになり、分担研究者である青木はこれまでマンガンイオンを中枢神経系の MRI 解析に使用して来た。一方、河野は温度に反応して融解するリポソームの開発を長年手がけ、世界で最も厳格にかつ急峻に温度に反応して融解するリポソームの開発に成功している。そこで、本課題では、この2つ要素を融合させ、感温性リポソームの中にマンガンイオンを包埋した MRI プローブの作成を行う。

II. in vivo 標的に適した標的分子の作成 : in vivo イメージングを行うための最も重要な要件として、特異性の高い抗体分子や標的ペプチドの調整が挙げられる。これまで多くの研究者により MRI プローブと単クローン抗体を組み合わせた active targeting が試みられて来た。しかし、必ずしも良い結果が得られていない。この際使用する単クローン抗体には、その抗原に対する特異性もさることながら、生体内でネイティブな形で発現する抗原に最適な条件で結合することが求められる。本課題に参画する濱田は、独自のユニークなスクリーニングシステムを立ちあげ、単クローン抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングに、得られる抗体の機能も評価できるシステムを用いて良好なクローンを得ることに成功している。このような抗体と上記 MRI プローブを組み合わせることで、これまでなし得なかった標的 MRI プローブの創成が可能になると期待される。

### III. モデル動物を用いた高磁場 MRI 解析

本課題では、現在臨床的に最も予後悪い膵臓癌を標的として研究を進める。膵臓癌のモデル動物としてはハムスターに *N*-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) を投与して誘発される

膵臓癌が最も良く解析されている。そこで、BOP 誘発モデル動物の調整と得られた膵臓癌における遺伝子発現解析を行う（中釜博士）。これらの技術を統合しながら、我が国最大磁場強度を誇る放射線医学総合研究所の7テスラMRIを用いてMRIによる画像化を行う。一方、臨床で使用されている1.5テスラMRIによる解析も並行して行い、研究協力者としての参加する菅田博士（徳島大学歯学部教授）に解析を依頼する。

#### IV. 自在に放出可能な感温性リポソームの応用

AIO ナノデバイスの中で最も重要な機能は、外部から物理的刺激によって、抗癌剤を必要な時期に必要な組織にリリースすることが可能なシステムである。マンガンイオンの局所放出を稼働させ、その発展型として抗癌剤のDDSを行う。

以上の分担研究内容を上手く統合することで、AIOの創成を行う。

#### C. 研究方法

##### I-a. 磁性体ナノ粒子の改良（長谷川、石坂）

MRIプローブ用磁性体ナノ粒子の開発すべき特徴として、

1. 長い血液半減期を示す特性
2. 肝臓への非特異的集積の少ない特性
3. 結合させた標的分子の機能が十分に発揮できる特性

が挙げられる。そこで、磁性体ナノ粒子の粒径を変化させ、磁性強度と血中滞留時間を測定することで、ナノ粒子の最適化を図る。

##### I-b. マンガンイオン包埋型感温性リポソームの作成（青木、河野）

温度により疎水性に変化するポリマーを含んだリポソーム（以下、感温性リポソーム）を作成し、抗癌剤アドリアマイシン（以下ADR）、MRI造影剤であるマンガン、および蛍

光色素ローダミンを内包し、PEGにより血中滞留性を延長させた新規造影剤を開発する。光イメージングにて、腫瘍組織に集積したMRIプローブを検出し、外部からの加温誘導でリリースされたマンガンイオンをMRI検出する。

II. *in vivo* 標的に適した標的分子の作成（濱田、山下）高性能標的化抗体（STAAB: Super-targeting antibody）の作製を新規に開発したスクリーニング方法を用いて行う。具体的にはアデノウイルスのリガンドであるファイバ一部分にZ33というペプチドを発現させた改変型アデノウイルスを用いてスクリーニング法を行う。抗原としては、ヒト膵臓癌細胞（PK-1, AsPC1）等を使用する。

また、膵臓β-細胞に発現するGLP-1（glucagons like peptide-1）受容体に結合する分子による膵臓組織の画像化に向け、GLP-1受容体発現細胞株の樹立を行い、MRI解析に供する。新たな標的抗体として、GLP-1受容体に対する単クローン抗体作成を試みる。

#### III. モデル動物を用いた高磁場MRI解析（中釜）

a. 膵臓癌モデル動物の作成：BOP単独投与での膵臓発がん実験を行う。一方、名古屋市立大学・津田洋幸らが樹立したCre/lox制御型ヒト変異Ha-ras<sup>G12V</sup>を導入したTgラットを用いたモデル膵臓癌の作成も行う。即ち、Creを発現するアデノウイルスを膵管に注入し、膵臓の誘発を図る。

b. 免疫組織染色による抗PAP2a抗体及び抗epiregulin抗体のハムスター膵臓腫瘍での反応性の検討：膵臓癌2例の凍結切片及び3例のホルマリン固定標本切片（ホルマリン標本2例は奈良医科大学・堤雅弘先生より供与）を用いて、2種の抗PAP2a抗体（T13, S11）及び2種の抗epiregulin（6E2, 9E5）抗体の免

疫組織染色を行った。

IV. 自在に放出可能な感温性リポソームの応用：脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子である 2 エトキシエトキシエチルビニルエーテル (EOEOVE)-オクタデシルビニルエーテル (ODVE) ブロック共重合体、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質と卵黄ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよびコレステロールに pH5 に調製した緩衝液を加え、エクストルーダー（孔径 100nm）を用いてリポソームを作製した。温度応答性 dendrimer は、種々の世代数のポリアミドアミンにアルキルアミド基を導入することによって調製した。

（倫理面への配慮）

ヒト手術材料を用いる臨床研究に関しては札幌医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会にて許可を受けている（許可番号第 217-3 号、平成 18 年 2 月 10 日付け承認）。また動物実験に関しては、それぞれの分担研究者が所属する研究機関が定める動物実験委員会に実験計画書を提出し、3R (Reduction, Refinement, Replacement) の原則に基づいて内容が吟味され、かつ委員会で承認された上で実験を行った。特に実験に用いる動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いることとし、動物の苦痛に対しても十分な配慮を払う。

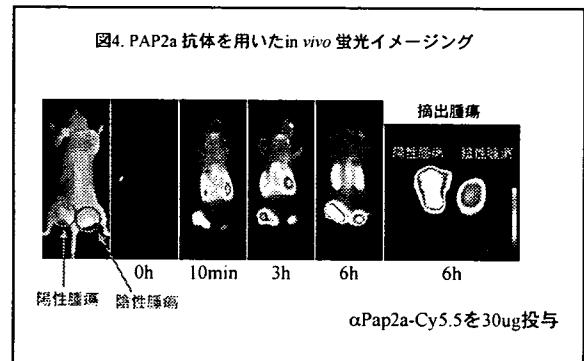
#### D. 研究結果

##### 1-a. MRI 用プローブの最適化と抗体を用いた in vivo イメージング

解析用 CMDM の最適化を図った。解析の結果、抗体結合型 CMDM と非結合型 CMDM を分離することが必要であることが考えられた。

一方、濱田が開発した膵臓癌標的抗体、

抗 PAP2a 抗体により再現良く in vivo イメージングが可能になった (図 4)。



##### I-b. マンガンイオン包埋型感温性リポソームの作成

マンガンを含む感温性リポソームを作成し、in vivo での有用性を検討した。その結果、Bulb/c nude 担癌マウスにおいて、造影剤の投与後直後から蛍光イメージにおいて高い信号が観察され、8時間後までに徐々にその特異性が上昇した。また、投与8時間後に撮像された MRI では、42°C加温の前後で、MRI の信号が上昇し、薬剤の放出が示唆された。

##### II. in vivo 標的に適した標的分子の作成

ヒト膵がん細胞に対する遺伝子導入効率を高める抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリーをスクリーニングした。その結果、昨年度に引き続き今年度も膵がん細胞を始めとして多くの固形がん細胞を標的化できるモノクローナル抗体の樹立に成功した。今年度作成し得た抗体の標的臓器は、膵臓癌・肺癌・前立腺癌である。

##### III. モデル動物を用いた高磁場 MRI 解析

ハムスター膵臓腫瘍の凍結切片を用いた 2 種の抗 PAP2a 抗体 (T13, S11) 及び 2 種の抗 epiregulin (6E2, 9E5) 抗体の検討では、陰性コントロールであるマウス血清を 1 次抗体として用いた場合でも、間質における非特異的染色が認められた。ホルマリン固定標本に関

しては、奈良医科大学・堤雅弘先生より供与された 2 例及び本研究の BOP 単独投与の膵臓発がん実験で得られた 1 例を用いて検討したが、陽性所見は得られなかった。

#### IV. 自在に放出可能な感温性リポソームの応用

感温性を有する共重合体を ADR 包埋リポソームに複合化し、しかも、脂質組成を最適化することで高感度を示す温度応答性リポソームを開発することに成功した。また、生体適合性と温度応答性を併せ持つリポソームとして、ポリエチレングリコール (PEG) と感温性ブロックを含む新規ブロック共重合体で修飾したリポソームを作成した。ADR 含有リポソームを微静脈投与し、42°C で局所加温することで、顕著な腫瘍成長抑制効果が観察された。標的抗体と組み合わせる事でピンポイント DDS による副作用の少ない癌治療の可能性が示唆された。

#### E. 考察

今年度の研究成果をまとめると以下のようなになる。即ち、

- i) 抗体による in vivo イメージングが可能になった。
- ii) マンガンイオン包埋型感温性リポソームを投与後、加温誘導によりリアルタイムでの MRI シグナルの検出が可能になった。
- iii) 抗癌剤包埋型感温性リポソームと加温誘導により、選択的な DDS による抗腫瘍効果が誘導された。また、
- iv) 標的抗体が新たに作成できた。

以上の成果は、次年度で予定している AIO 作成の実現性を強く支持するものである。

一方、次年度解決すべき問題点も明確になっている。即ち、

- i) 抗体結合型磁性体ナノ粒子と非結合型ナノ粒子の分離法の確立 (詳細は、分担研究報

告書石坂分、D-1 参照): 抗体単独での in vivo イメージングは可能になっているが、MRI による検出はまだ確実にできる状況にはない。最大の原因として、抗体付き CMDM の純度が低い点にあると考えている。即ち、現在使用している MRI プロブは未精製であり、抗体非結合型磁性体ナノ粒子の占める割合が高い (全体の 70-80%)。そのため有効に機能する抗体結合型磁性体ナノ粒子の純化を行うことで、特異的シグナルが得られるものと考えられる。

- ii) 動物モデル腫瘍検出抗体の調整: BOP 誘発ハムスター膵臓癌での PAP2a 発現が認められていない。同腫瘍組織を検出することが可能な抗体の調整が必須要件となる。解決方法としては、3 つ選択肢が挙げられる。

- a. 今年度新たに濱田分担研究者が作成した抗体の中から、同腫瘍を検出することが可能な抗体を選別する。
- b. ハムスターに加えてラットで作成した膵臓癌に対する PAP2a 抗体の反応性を検証する。
- c. ラットまたはハムスターで作成した膵臓癌を免疫原として使用し、新たな単クローン抗体を作成する。

- iii) 抗体結合型感温性リポソームの作成: 磁性体ナノ粒子から感温性リポソームを用いた標的 MRI プロブの作成を行う。その際、磁性体ナノ粒子を用いた実験系で経験したように抗体結合型リポソームと非結合型リポソームを分離することが必須要件になるものと考えられる。磁性体ナノ粒子を用いて得られる基盤技術情報をもとに、分離精製することを試みる。

以上の問題点を解決し、次年度ではモデル動物中の膵臓癌検出系を具体化することを目標とする。

また、磁性体ナノ粒子の臨床を念頭において

- iv) 抗体医薬との融合との融合を図る。抗体

結合型磁性体ナノ粒子による MRI 画像化を稼働させるとともに安全性試験を行い、抗体医薬として臨床応用されている抗体を用いた MRI 画像化システムの開発を推進する。

#### F. 結論

AIO ナノデバイス創成に向けた基盤技術の準備が進んでいる。次年度、AIO のプロトタイプ の作成を目指す。

#### G. 健康危険情報

特記すべき事無し。

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kitayama H., Miura Y., Ando Y., Hoshino S., Ishizaka Y., and Koyanagi Y. Human Immunodeficiency Virus Type-1 Vpr Inhibits Axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J. Virol.* In press.
2. Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y., Kojima A, Kurata T, Sata T, Tokunaga K All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* **35** 2955-2964, 2007.
3. Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S. and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **23**, 391-397, 2007.
4. Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, K., Takizawa, Y., Tokunaga, K., Taguchi, T., Hoshino, S., Miyagawa, K., Sata, T., Kurumizaka, H., Yuo, A. and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* **26**, 477-486, 2007.
5. Suzuki K, Nakamura K, Kato K, Hamada H and Tsukamoto T. Exploration of target molecules for prostate cancer gene therapy. *Prostate* **67**, 1163-1173, 2007.
6. Tomihara K, Kato K, Masuta Y, Nakamura K, Uchida H, Sasaki K, Tanaka T, Huang J, Hiratsuka H and Hamada H. Gene transfer of CD40-ligand to dendritic cells stimulates interferon-gamma production to induce growth arrest and apoptosis of tumor cells. *Gene Therapy* **15**, 203-213, 2007.
7. Ishii, K., Nakamura, K., Kawaguchi, S., Li, R.,

Hirai, S., Sakuragi, N., Wada, T., Kato, K., Yamashita T. and Hamada, H. Selective gene transfer into neurons via Na, K-ATPase beta 1 targeting gene transfer with monoclonal antibody and adovirus. *J. Gene Med.*, in press 2008.

8. K. Kono, C. Kojima, N. Hayashi, E. Nishisaka, K. Kiura, S. Watarai, A. Harada, "Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin.", *Biomaterials*, **29**, 1664-1675 (2008).
  9. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Shimizu, N. Emi, K. Kono, "Generation of highly potent nonviral gene vectors by complexation of lipoplexes and transferrin-bearing fusogenic polymer-modified liposomes in aqueous glucose solution.", *Biomaterials*, **29**, 1262-1272 (2008).
  10. Y. Yuba, C. Kojima, N. Sakaguchi, A. Harada, K. Koiwai, K. Kono, "Gene delivery to dendritic cells mediated by complexes of lipoplexes and pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes", *J. Controlled Release*, submitted.
  11. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, "Preparation of pH-sensitive poly(glycidol) derivatives with varying hydrophobicities: their ability to sensitize stable liposomes to pH", *Bioconjugate Chemistry*, submitted.
  12. Tsuchiya N, Ochiai M, Nakashima K, Ubagai T, Sugimura T, Nakagama H. SND1, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **67**, 9568-9576, 2007.
- ##### 2. 学会発表
1. Nakagama H., Ochiai M, Sugimura T, Nakashima K, Tsuchiya N. A component of RNA-induced silencing complex, SND1, is up-regulated in human colon cancers and implicated in colon carcinogenesis at early stages. 7th Joint Conference of the AACR and the JCA, Hawaii, USA, January, 2007.
  2. Izumiya M, Ochiai M, Sugimura T, Nakagama H. Genome-wide array revealed possible microdeletions in inflammation-associated colon tumors in mice. 98th Annual Meeting of the AACR, Los Angeles, USA, April, 2007.
  3. Fukuda H, Seki C, Takamura T, Nakagama H. Translesion DNA synthesis at PHP-



- adducted dG. 第 66 回日本癌学会総会, 横浜, October, 2007.
4. Tsuchiya N, Sugimura T, Nakagama H. Biological role of SND1/Tudor-SN in early stage of colon carcinogenesis. 第 66 回日本癌学会総会, 横浜, October, 2007.
  5. Kondo Y, Ochiai M, Sugimura T, Nakagama H. Comprehensive approach to the identification of the genetic sensceptibility to PhIP-induced colon carcinogenesis in rats. 第 66 回日本癌学会総会, 横浜, October, 2007.
  6. Uchida, S., Yoshioka, K., Matsunaga, T., Yamashita, K. Degradation of Cdc25A and Cdc25B by non-genotoxic stress. Joint Meeting of the Japanese Society of Developmental Biology & the Japan Society for Cell Biology. Fukuoka, Japan. May, 2007.
  7. Yamashita, K., Yoshioka, K., Matsunaga T., Nakagama, H., Ishizaka, Y. JNK targets Cdc25B for Degradation. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, Japan. October, 2007.
  8. 内田早苗、善岡克次、松永司、山下克美. JNK phosphorylates Cdc25B and indices its degradation. 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会、合同大会、横浜、2007 年 12 月.
  9. Bakalova R, Masamoto K, Zhelev Z, Aoki I, Obata T, Kanno I. Polymer coating of quantum dots is crucial for their in vivo optical imaging application. Joint Molecular Imaging Conference, Providence, 0366, 2007; Sep 8-11.
  10. Y. Kawai, I. Aoki, N. Matsumoto, M. Umeda, T. Higuchi, J. Kershaw, A. C. Silva, and C. Tanaka. Detection of Reactive Gliosis using Manganese- enhanced MRI (MEMRI). Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Scientific Meeting, 2007; 15: 1215.

1. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 特許出願

1. 公開番号：WO2006/123829

国際出願番号：PCT/JP2006/310406

発明の名称：PAP2a に対する抗体ならびにその診断的および治療的応用

発明者：濱田洋文、加藤和則、中村公則

出願日：2006. 5. 17

2. 出願番号：特願2007-147478  
 発明の名称：IL-13Ra2 に対する抗体およびこれを含む診断・治療薬  
 発明者：濱田洋文、加藤和則、中村公則  
 出願日：2007. 6. 1

3. 出願番号：PCT 出願(PCT/JP2008/054563)

発明の名称：新規核内移行ペプチド

発明者：石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡

出願日：2008 3 7

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

「高磁場MRIとオールインワンナノデバイスによる癌微小病変の  
非侵襲的診断・治療システムの開発」に関する研究

分担研究者 国立国際医療センター 石坂幸人

研究要旨：本プロジェクトでは、MRI 造影剤・抗癌剤・単クローン抗体を搭載した MRI 用ナノプローブの作成技術を確認することを目標としている。平成19年度は、単クローン抗体と磁性体ナノ粒子の結合の最適化を行った。まず、磁性体ナノ粒子に単クローン抗体を結合させ、結合様式の最適化を図るとともに試験管内実験及び担癌モデルマウス実験にて機能評価を行った。次年度では、抗体結合型磁性体ナノ粒子の精製法を確認し、抗癌剤の局所 DDS を可能にするオールインワンナノデバイスの開発を行う。

A. 研究目的

微小腫瘍病変の検出と局所 DDS によるピンポイント抗癌剤治療法開発を考える上で、近年有用な機器が臨床に導入された。この機器は MRI による病変の診断を行いながら同部位に外部から超音波焦点照射し、局所温度を 80 度程度にまで上昇させることで、腫瘍病変の切除を可能にする。このような外科手術は、子宮筋腫症例について既に 1 万例以上症例に施行され、良好な成績が得られている。しかし、病変の検出サイズが cm オーダーであることに加えて、病変部位の治療は加温誘導にのみ依存していることから、どのような癌に対しても対応可能な非侵襲的治療システムを完成するためには、今後様々な改良を加えることが必要である。本プロジェクトではこのような高度な医療技術を念頭におきながら、以下に示す 3 項目を網羅したオールインワンナノデバイス（AIO）の創成を目的としている。即ち、

1. 高磁場 MRI と単クローン抗体・磁性体ナ

ノ粒子を用いた癌微小病変の高解像度画像システムの開発

2. 感温性リポソームによる局所 DDS の臨床応用に向けた改良と安全性の検定、さらに
3. 非侵襲的診断・治療の実現に必要な全ての因子を搭載した AIO ナノ粒子の作成と有用性の検討 である。

本年度は、特に項目-1 の基盤技術の開発を担当した。

A. 優れた磁性体ナノ粒子と単クローン抗体を用いた MRI 画像化

申請者らはこれまでに、MRI 用造影剤として有用なナノ粒子として carboxy-methyl dextran magnetite (以下 CMDM) を創成した (出願特許番号 特 2006-048576)。CMDM と市販されているポリエチレングリコール (図中 PEG-NH<sub>2</sub>) やデキストランコート (図中 Dextran-NH<sub>2</sub>) された磁性体ナノ粒子をマウスに投与すると、CMDM が最も長い時間血管内に滞留する

傾向を示した。また、各磁性体ナノ粒子を担癌マウスへ投与した後、腫瘍組織への集積・消退の経時的变化を MRI で解析したところ、CMDM は一旦集積した後、時間経過とともに減少する傾向を示すのに対して、他の磁性体ナノ粒子はそれ自身の性質として、腫瘍組織に取り込まれてしまうことが明らかとなった。一方、標的ペプチドを用いた予備実験により、ペプチド付加型 CMDM を用いることでも腫瘍組織の MRI 画像化が得られる可能性が示唆された。

本プロジェクトは、これまでに得られた基礎情報と技術をもとに、7 テスラー高磁場 MRI と単クローン抗体を用いて、特異性及び解像度の優れた MRI 画像を得ることを第一の目標としている。特に、本研究で使用する抗体は、分担研究者である濱田らが独自に開発したシステムにより得られた抗体で、抗原に対する結合性が究めて優れていることから、良質な画像の取得が期待される。

## B. オールインワンナノデバイスの創製と有用性の証明

リポソームの表面にマレイミド基を付与することで、様々なペプチドを同ナノ粒子に結合させることが可能となっている。また例えば、リポソーム内に抗癌剤ばかりでなく、DNA や蛋白質を包埋することも可能になっており、診断と局所 DDS の可能性が期待できる。そこで、同リポソーム機能をシステム構築の中心に据えることにより AIO ナノ粒子を作成し、その有用性を証明することを本プロジェクトの最終目標とする。具体的には、リポソーム内に MRI 造影剤と抗癌剤を投入し、その表面に単クローン抗体を付与するための技術を確立する。即ち、抗体またはリポソーム中にガドリニウム(Gd)を付与または包埋する。また、Gd を用いて MRI シグナルを得ることで、AIO の検出を行い、そこに焦点照射を行う事によ

り感温性リポソームから DDS を行う。本システムを完成させるため、抗体結合型磁性体ナノ粒子を用いた基盤技術を確立する。

## B. 研究方法

### A. 磁性体ナノ粒子の改良

現在使用している磁性体粒子は MRI 解析に適してはいるが、依然肝臓へ非特異的な集積性が認められる。そのため、血液中の半減期が短いに加えて、深部臓器の腫瘍病変解析には不利となる。そこで肝臓への集積を減少させるための試みとして、磁性体粒子の粒径を変化させ、血中滞留時間の長い化合物の選択することを試みた。様々な粒径の磁性体粒子をマウスに投与し、経時的に血液中の鉄量を NMRT2 緩和時間を測定し、半減期を算出した。磁性体ナノ粒子の粒径の減少に伴い磁性強度が減弱する可能性があることから、血中滞留時間を勘案しながら、MRI プローブとして耐え得るナノ粒子による検出により低濃度・低バックグラウンドでの高解像度検出システムを青木と共同して構築する。

### A. 単クローン抗体と高磁場 MRI を用いた高分解能 MRI 画像化

分担研究者である青木（放医研）が高磁場 MRI を用いた画像解析のための諸条件を設定する。撮像は、国内有数の水平型 7 テスラ実験用 MRI 装置に、100  $\mu\text{m}$  以下の空間分解能を達成することが可能な傾斜磁場装置、および高感度マルチチャンネル・フェイズドアレイ・コイルを用いる。パルスシーケンスとコイル形状の最適化、および対象動物の生理的管理を行った後、臨床で用いられる  $T_1$ 、 $T_2$ 、 $T_2^*$  強調画像に加えて、定量的データを取得可能な  $T_1$ 、 $T_2$  計算画像、および水の分子拡散を検出する。そして、腫瘍と正常組織との間で異なる細胞密度を検出することが可能な拡散強調画像および定量的拡散計算画像を取得する。

以上のような試みを通して、最も効率よく標的腫瘍組織を検出する諸条件を決定する。さらに腫瘍の経時的な変化および DDS による治療効果を定量的・非侵襲的かつ経時的に観察する。加えて、磁性体粒子の MRI 検出上問題点となる「不均一な背景信号によるバックグラウンドの排除」に関しては、他の造影剤との併用や画像解析による「正の信号」への変換、コントラストを最大化する撮像法の開発などを試みる。これらの情報を臨床で使用している低磁場 MRI での解析条件に反映させる。また将来の MRI 新機種創成に生かす。

### C. PAP2a 抗体を用いた *in vivo* イメージング

上記目的に対して本研究では、特に早期診断が難しいとされる膵臓癌を第一候補に研究を進める。具体的には、分担研究者らが開発した磁性ナノ粒子表面に、膵臓癌抗体  $\alpha$  PAP2a を結合した「 $\alpha$  PAP2a-磁性ナノ粒子複合体」の各種物性（結合方法、粒子径、磁性、および粒子表面物性等）を適切に調整することで、優れた腫瘍標的能力を有する MRI 造影剤を開発する。

初年度である当該年度では表 1 に示す物性を有する数種類の CMDM に  $\alpha$  PAP2a を結合させる。平行して、磁性ナノ粒子の物性改善についても予備的に検討し、その方向付けを行う。

表 1. CMDM

粒子径	30~60 nm
磁化率	0.025~0.040 cgs
R2	100~350 (mM · s) <sup>-1</sup>
R1	20~50 (mM · s) <sup>-1</sup>

(倫理面への配慮)

本研究は主にマウスを用いて行う。所属施設の動物管理委員会の規約を遵守し、動物に

過剰な負担をかけないような実験デザインにて研究を進める。

### C. 研究結果

#### 1. MRI 用プローブの最適化

種々の粒子径を有する CMDM を作成し、T2 緩和能力及び血中半減期を測定した。粒径と磁性強度は比例する傾向が認められる一方、血中半減時間は反比例する傾向が認められた。これらの中で、CMDM-055 (粒径約 55 nm、磁性強度  $R2=301$  (mM · s)<sup>-1</sup>) は、腫瘍への非特異的な取り込みも少ないことが明らかとなり、以降の単クローン抗体結合の第一選択とすることとした。

#### 2. PAP2a 蛋白質を標的分子とした *in vivo* イメージング

6 回膜貫通型蛋白質 PAP2a (phosphatidic acid phosphatase type2a) は、膵臓癌症例の内 80%以上で陽性である。分担研究者(濱田)から供与された抗 PAP2a 抗体を近赤外蛍光色素である Cy5.5 を標識し、蛍光イメージングによる腫瘍検出を行った。

ヌードマウスの皮下に PAP2a 陽性腫瘍とコントロール腫瘍を移植し、蛍光標識抗体を尾静脈から投与し、蛍光イメージング検出機(浜松フォトニクス社)にて検出した。投与後 10 分で陽性腫瘍特異的に抗体の集積が認められ、その集積性は時間経過に伴って上昇した。さらに腫瘍を摘出し蛍光観察した結果、陽性腫瘍では内側からも強いシグナルが認められ、抗体集積の特異性が確認できた。

#### 3. 抗体結合型磁性体ナノ粒子による MRI 検出

次に上述した CMDM-055 へ抗体を結合させ MRI を用いた解析へ移行した。蛍光イメージングと同様に腫瘍を皮下移植したヌードマウスに抗体結合型磁性体を投与、磁性体の腫瘍への集積を 1.5 テスラ MRI 臨床機を用いて検

出を試みた。T1 強調画像 (TR/TE; 546.0/12.0) 及び T2 強調画像 (TR/TE; 2702.2/96.0) 似よる解析を行った結果、特異的なシグナルは検出されなかった。その最大の原因は抗体と磁性体が有効に結合している頻度が極めて低いことが考えられた。即ち、一定量の鉄量に相当する検体を既知量の抗体とともに SDS-PAGE 電気泳動法にて解析し、ナノ粒子一個当たり結合している抗体モル比を換算したところ、解析に使用した検体中に含まれる抗体結合型磁性体は全体の約 10% であることが明らかとなった。

抗体結合条件を改良し、有効結合率の高い抗体結合型磁性体ナノ粒子を用いて、撮像を再度試みた。その結果、鉄換算量として 240  $\mu\text{g}$  分の抗体付き磁性体ナノ粒子を投与した群で、特異的な集積を検出することが可能となった。この検体中の有効抗体結合型磁性体ナノ粒子量は、20% 程度であった。

## D. 考察

### 1. 抗体結合型磁性体ナノ粒子の精製

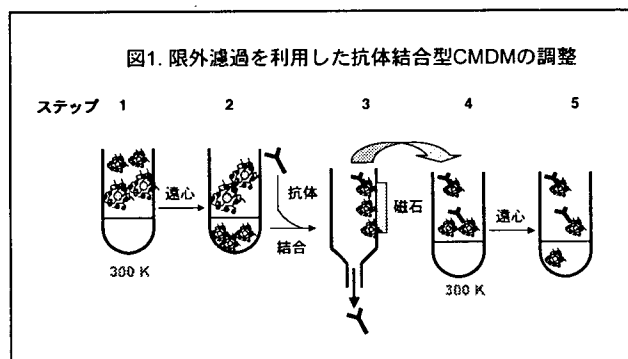
抗体を結合させた磁性体ナノ粒子を用いた MRI 画像化のための重要課題として、抗体結合型磁性体ナノ粒子と非結合型磁性体ナノ粒子を分離するための技術確立が挙げられる。即ち、現状では抗体結合型磁性体ナノ粒子の全体に示す割合は、高々 20-30% であり、MRI プローブとして有効に機能する抗体分子を有効に作用させることが出来ない。一方、抗体が結合していない CMDM を単独で投与すると、その量によっては、腫瘍組織に集積した後、局所に停留してしまう可能性も考えられる。

即ち、抗体が付与された磁性体ナノ粒子を純化するための精製方法が肝要となる。その戦略としては磁性体が有する 2 つの物性を利用した方法が考え、試行する予定である。

1. 磁石を用いた非結合型抗体の除去：磁性体ナノ粒子は磁石に対して結合性を示す。そ

こで、抗体を作用させた後の磁性体ナノ粒子を磁力下に置き、磁石で保持することで、フリーの抗体を除去することが可能になる。

2. 限外濾過を用いた抗体非結合型磁性体ナノ粒子の除去：各種粒径の磁性体ナノ粒子性質は、異なるポアサイズの限外濾過膜により精製可能である。そのポアサイズは分子量約 300 kDa から 1000 kDa である。一方、結合させる抗体は分子量が約 150 kDa であり、抗体結合型 CMDM と非結合型 CMDM を限外濾過を用いて分離することが可能となる。
3. 以上の要件を背景に、以下に示す方法により抗体付き磁性体ナノ粒子を精製純化することが可能になるものと期待される。



即ちまず、

1. 一定の大きさのポアサイズを有する限外濾過カラムを用いて磁性体ナノ粒子を分子ふるい分けし、所定のポアサイズ以下のサイズからなる磁性体ナノ粒子を準備する。
2. カラムを素通りした磁性体ナノ粒子に抗体を付与する。
3. 抗体結合反応を行った後の検体を磁石で吸着し、フリーの抗体を排除する。
4. ステップ-1 で使用した限外濾過カラムを用いて、再度検体を遠心する。
5. メンブレンにトラップされる抗体結合型 CMDM を回収する。

現在、この方法により精製した MRI プローブを用いて、画像化を試みている。一方、前述した CMDM-055 は粒径が大きく、ポアサイズ 300K の限外濾過カラムではトラップされ

る（保持部に停留する）ことから、1000K カラムを用いて、同様の操作を行うことを計画している。また 500K のポアサイズのフィルターも使用することが可能であり、純度の高い抗体結合型 CDM の調整を再現良く行う事が可能になるものと思われる。これらのプローブを用いて特異性の高いイメージングを次年度得ることを目標とする。

## 2. 抗体による Targeting イメージング

今年度は  $\alpha$  PAP2a を用いて基礎実験を行った。蛍光標識した同抗体を担癌マウスに投与すると標的分子を発現する腫瘍部位に再現性良く特異的な集積を示すことが明らかとなった。 $\alpha$  PAP2a 抗体は、分担研究者として本プロジェクトに参加している濱田らが開発した単クローン抗体で、ネイティブな抗原への結合を指標としてスクリーニングした結果得られたクローンである。一般的に生体内で厳格に特異性を示す抗体の作成は難しく、本プロジェクトで良好な結果が得られた最大の要因は優れた  $\alpha$  PAP2a の性能によるところが大きい。一方、本プロジェクトで展開される基盤技術を一般化することは究めて重要であり、今後、様々な単クローン抗体を用いた試みを行うことが肝要と思われる。また現在、抗体医薬が加速度的に進展しており、臨床で使用されている抗体と組み合わせた MRI 画像化の試みも重要である。次年度以降、抗体医薬との癒合を図る。

## E. 結論

本研究の結果から、膵臓癌標的抗体を導入した磁性ナノ粒子複合体は、癌種特異的 MRI 造影剤として実用化が期待できることが示された。また、确实且つ効率的に癌部位を診断できる MRI 造影剤を開発するためのいくつかの知見が得られ、これらを参考に来年度の研究方針を策定する。

F. 健康危険情報 特記すべき事無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kitayama H., Miura Y., Ando Y., Hoshino S., Ishizaka Y., and Koyanagi Y. Human Immunodeficiency Virus Type-1 Vpr Inhibits Axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J. Virol.* In press.
2. Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, Sata T, Tokunaga K All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* **35** 2955-2964, 2007.
3. Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S. and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **23**, 391-397, 2007.
4. Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, K., Takizawa, Y., Tokunaga, K., Taguchi, T., Hoshino, S., Miyagawa, K., Sata, T., Kurumizaka, H., Yuo, A. and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* **26**, 477-486, 2007.

### 2. 学会発表 なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

【特許番号】 PCT/JP2008/054563

【発明人】 石坂幸人（国立国際医療センター）

長谷川正勝（名糖産業株式会社）

野原 聡（名糖産業株式会社）

【特許出願人】 国立国際医療センター総長  
名糖産業株式会社

【発明者の名称】 「新規核内移行ペプチド」

【出願日】 平成 20 年 3 月 7 日

### 2. 実用新案登録 無し

### 3. その他 特記すべき事無し。

## 厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

### 分担研究報告書

#### 「磁性体ナノ粒子の開発」に関する研究

分担研究者 長谷川正勝 名糖産業株式会社 名古屋研究所参与

研究要旨：MRI による検出や高周波により発熱する性質を持ち、且つ生体安全性の高い磁性ナノ粒子に、膵臓癌特異的認識機能を有する抗体を導入した「抗体-磁性ナノ粒子複合体」を作成した。これら複合体の *in vivo* 生物試験の結果、目的とする膵臓癌モデル細胞に特異的集積する様子を蛍光ならびに MRI で画像化することができた。これにより、本複合体が癌種特異的 MRI 造影剤などとして実用化できる可能性を持った化合物であることが示された。

#### A. 研究目的

本研究は、微小癌に対する MRI 診断と非侵襲的な局所 DDS の構築を目指すものである。癌に特異的な標的機能を有する抗体と、MRI による検出が可能な磁性ナノ粒子との複合体を生体内に投与し、MRI により、特異的且つ早期に癌部位を検出できるシステムの開発を目的とする。

#### B. 研究方法

上記目的に対して、本研究では、特に早期診断が難しいとされる膵臓癌を第一候補に研究を進める。具体的には、分担研究者らが開発した磁性ナノ粒子表面に、膵臓癌抗体  $\alpha$ PAP2a を結合した「 $\alpha$ PAP2a-磁性ナノ粒子複合体」の各種物性（結合方法、粒子径、磁性、および粒子表面物性等）を適切に調整することで、優れた腫瘍標的能力を有する MRI 造影剤を開発する。

初年度である当該年度では、組合せる磁性ナノ粒子として研究実績のある CMDM（表 1 に主な物性を示す）を用い、導入する抗体である  $\alpha$ PAP2a との結合方法の最適

化を主に行い、膵臓癌を移植したモデル動物にて腫瘍特異的 MRI 検出を行う。平行して、磁性ナノ粒子の物性改善についても予備的に検討し、その方向付けを行う。

2 年目には、磁性ナノ粒子の磁性の向上や表面物性の最適化を図る事で、腫瘍特異的な検出画像の再現性、画像解像度の向上、および検出感度の向上（投与量の低減）に繋げる。また、対象とする生物検体については、腫瘍移植マウスから腫瘍発現マウスへ、またラットなどへ大型化するなど、より臨床に近い検体へとステップアップする。

3 年目には、これら成果を臨床試験に移行する準備として、複合体および本目的に最適な磁性ナノ粒子について、動物による安全性試験を行う。なお、本システムが確立できれば、同様の方法にて、ターゲットとする腫瘍に合わせた特異的抗体を選択する事で、他の癌種にも幅広く応用展開することが可能となる。

表 1. CMDM (カルボキシル デキストランマグネイト)

粒子径	30~60 nm
磁化率	0.025~0.040 cgs

R2	100~350 (mM・s) <sup>-1</sup>
R1	20~50 (mM・s) <sup>-1</sup>

(倫理面への配慮)

大型動物にステップアップする際、サルを使用しないこととする。その他については、特に考慮すべき事項なし。

### C. 研究結果

本研究の当該年度の結果、 $\alpha$  P<sub>AP2a</sub>-磁性ナノ粒子複合体について、多くの化学・生物データを蓄積することができた。まず、結合方法については、直接的なアミド結合に始まり、抗体を還元型とした後に、連結部分としてスペーサーを用いた特徴的な形態を有した方法、また、スペーサー長についても評価することができた。

磁性ナノ粒子本体については、予備的な検討ではあるが、磁性（検出感度）の大幅な向上を行う目処が立ちつつあり、表面性質の改変に関しても種々の知見を獲得することができたことから、次年度に反映させたい。

このようにして改良を進めた「 $\alpha$  P<sub>AP2a</sub>-磁性ナノ粒子」複合体は、膵臓癌移植マウスに投与した結果、腫瘍特異的に集積する様子が蛍光および MRI にて観察することができ、研究計画のうちの、当該年度予定分をクリアした。

### D. 考察

当該年度の研究の結果、 $\alpha$  P<sub>AP2a</sub>-磁性ナノ粒子複合体を生物体内の目的部位へ集積させ、MRI 画像化を達成できたが、次の2点について改善する必要がある、次年度の課題と考える。

①目的腫瘍（膵臓癌）の画像が確実に得られる、即ち再現性を確保させること。

②画像鮮明度を向上させるため、投与し

た複合体の腫瘍部位への集積率を向上させること。これは、投与量を低減させることにも繋がる。

これらを解決するには、 $\alpha$  P<sub>AP2a</sub> の磁性ナノ粒子への固定化率の向上や、磁性ナノ粒子本体の磁性向上を優先的に取り組むことが最重要である。更に、肝臓など目的以外の臓器への取り込みを減らすことも目的腫瘍部位への集積率を上げることに繋がるが、これについては、磁性ナノ粒子の表面物性の最適化などが重要な因子と考える。

### E. 結論

本研究の結果から、膵臓癌標的抗体を導入した磁性ナノ粒子複合体は、癌種特異的 MRI 造影剤として実用化が期待できることが示された。また、確実且つ効率的に癌部位を診断できる MRI 造影剤を開発するためのいくつかの知見が得られ、これらを参考に来年度の研究方針を策定する。

### F. 健康危険情報

分担研究者らが開発した磁性ナノ粒子は、その類似品が既に MRI 造影剤として製品化され、高い生体安全性が示されている。従って、本研究で開発される抗体-磁性ナノ粒子複合体は、原則安全性が高いと考えられる。しかし、新しい医薬品ではあるので、臨床応用に際しては GMP および GCP に則した対応が必要であることは言うまでもない。

### G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし



H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

以上

「感温性リポソームの構築」に関する研究

分担研究者 河野健司  
大阪府立大学

研究要旨：感温性を有する共重合体を ADR 包埋リポソームに複合化し、しかも、脂質組成を最適化することで高感度を示す温度応答性リポソームを開発することに成功した。また、生体適合性と温度応答性を併せ持つリポソームとして、PEG と感温性ブロックを含む新規ブロック共重合体で修飾したリポソームを作成した。ADR 含有リポソームを微静脈投与し、42℃で局所加温することで、顕著な腫瘍成長抑制効果が観察された。標的抗体と組み合わせる事でピンポイント DDS による副作用の少ない癌治療の可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究では、体外からのマイルドな加温によって、標的部位において選択的に薬物送達する超高感度温度応答性リポソームの開発を試みる。我々は温度応答性高分子をリポソームに複合化することによって温度応答性リポソームの作製について検討をしてきた。これまでに我々が開発した温度応答性リポソームは、45℃において内包した薬物の劇的な放出を引き起こした。しかし、臨床応用を考えると、リポソームの応答温度領域を 40℃付近にまで低下させることが望まれる。また、同時に血中における安定性も要求される。そこで本研究では、血中における安定性と 40℃付近における鋭敏な温度応答性を有する感温性リポソームの開発を目指して、①体温付近で疎水性化する感温性ポリマーの複合化による温度応答性リポソーム、②生体適合性と温度応答性を併せ持つ新規ブロック共重合体を複合化したリポソーム、③新規生体適合性感温性ポリマーの作製、についても検討を行った。

B. 研究方法

脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子である 2 エトキシエトキシエチルビニルエーテル (EOEOVE)-オクタデシルビニルエーテル (ODVE) ブロック共重合体、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質と卵黄ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよびコレステロールに pH5 に調製した緩衝液を加え、エクストルーダー（孔径 100nm）を用いてリポソームを作製した。このリポソーム分散液に

アドリアマイシン (ADR) を加え、インキュベートすることで ADR 内封共重合体修飾リポソームを調製した。下肢に Colon26 の腫瘍をもつマウスに ADR 内封リポソームを尾静脈投与し、その後の腫瘍径の変化を測定することで、リポソームの抗腫瘍効果を評価した。温度応答性 dendrimer は、種々の世代数のポリアミドアミンにアルキルアミド基を導入することによって調製した。

C. 研究成果及び考察

C-1. 体温付近で疎水性化する感温性ポリマーの複合化による温度応答性リポソーム

以前に研究では 40℃付近で親水性から疎水性に変化する EOEOVE-ODVE ブロック共重合体を複合化したリポソームの薬物放出挙動について検討した。その結果、このリポソームは共重合体の転移温度以下においては安定に薬物を保持するが、転移温度以上において内包物質を放出することがわかった。しかし、著しい ADR の放出が起こる温度は 45℃以上であった。

EOEOVE-ODVE ブロック共重合体の転移温度は、重合開始剤の疎水性度に影響される。以前の共重合体はメトキシエトキシ基を有する開始剤を用いて共重合体を合成したが、ここではより疎水性の高いイソブトキシ基を有する開始剤を用いて共重合体を合成した。得られた EOEOVE-ODVE ブロック共重合体は一方、37℃において疎水性化する EOEOVE-ODVE ブロック共重合体は 37℃で親水性から疎水性に転移した。

この共重合体を複合化したリポソームの ADR

放出挙動を調べ、39°C以上において ADR を放出した。また、リポソーム脂質として、卵黄ホスファチジルコリン、コレステロールに加えてジオレオイルホスファチジルエタノールアミンを用いることで、その温度応答挙動を格段に改善することができた (図 1)。

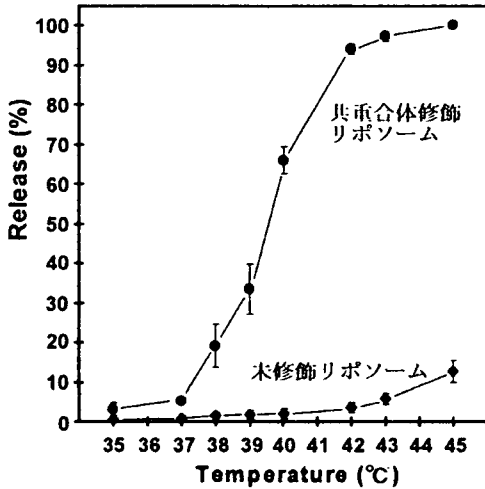


図 1. 脂質組成を最適化した共重合体修飾リポソームの ADR 放出挙動。

さらに、このリポソームの抗腫瘍効果について検討した。マウス大腸がん由来 Colon26 担癌マウス (Balb/C) に、ADR 含有リポソームを微静脈投与し、24 時間後に 10 分間、42°C で局所加温したところ、顕著な腫瘍成長抑制効果が観察された (図 2)。同様にリポソームを投与して加温処理を施さなかった場合、腫瘍成長抑制は弱かったこと、また、リポソーム投与をしないで同様の加温処理をした場合は、ほとんど腫瘍成長に影響を及ぼさなかったことから、局所加温によって腫瘍部位に集積したリポソームから ADR が放出され、腫瘍の成長を抑制したものと考えられる。

図 3 (右図). ADR を内包した共重合体修飾および未修飾 PEG-リポソームおよびフリー ADR の血中滞留性. 血中の ADR 濃度の経時変化を示す。

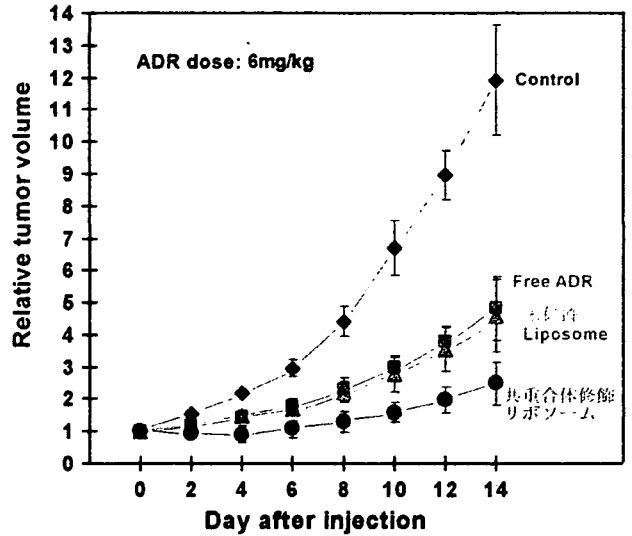
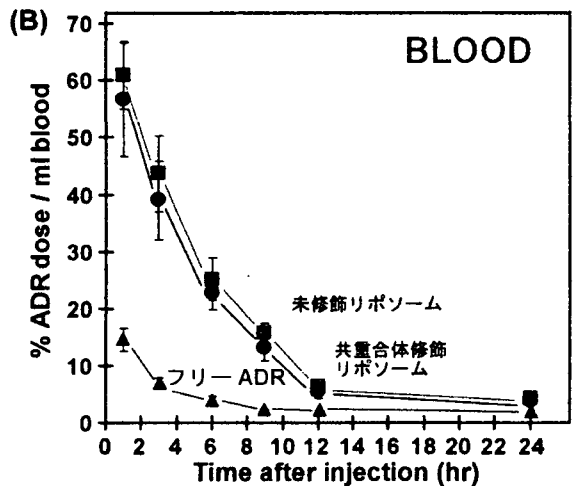


図 2. ADR 含有温度応答性共重合体修飾リポソームによるマウス腫瘍成長の抑制効果。

また、ADR 内包温度応答性リポソームの抗腫瘍効果を、フリーの ADR を投与した場合と比較した場合、リポソームのほうがより強い腫瘍成長抑制を示した。この結果は、リポソームを用いると血中を循環しながら腫瘍に集積することによって効率よく ADR を腫瘍に送達していることを示唆している。そこで、腫瘍における ADR 集積量を検討した (図 3, 4)。しかし、以前の温度応答性リポソームに比べて抗腫瘍効果は若干低かった。このリポソームは DOPE を含有するため、血中での安定性が劣ることが原因と思われる。

今後、血中での安定性と温度応答性を両立することが必要である。



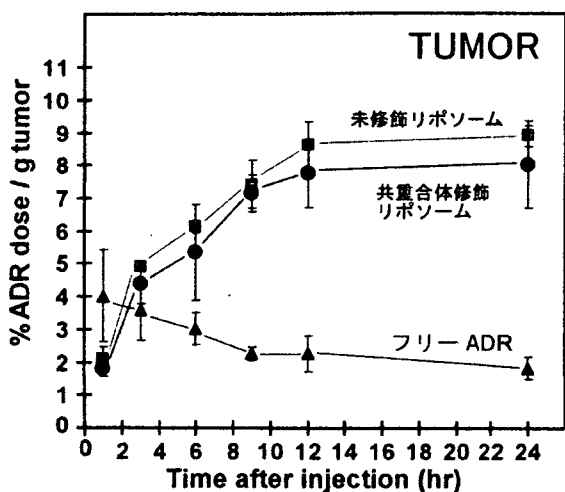


図4. ADR を内包した共重合体修飾および未修飾 PEG-リポソームおよびフリー ADR の腫瘍集積量の経時変化。

### C-2. 生体適合性と温度応答性を併せ持つ新規ブロック共重合体を複合化したリポソーム

生体適合性と温度応答性を両立させるための新規高分子として、ポリエチレングリコールと EOEOVE-ODVE からなる 3 種類の鎖長の異なるトリブロック共重合体を複合化したリポソームを作製した。これらのトリブロック共重合体は、オキシエチレンユニットが 17、EOEOVE ユニットが 87、131、あるいは 174、また ODVE ユニットが約 4 からなる。いずれの共重合体も 40°C で親水性から疎水性に転移した。末端の PEG ブロックが親水性のため、ポリ EOEOVE ブロックの転移温度が若干高温側にシフトしたものと考えられる。

これらの PEG-EOEOVE-ODVE 共重合体を複合化したリポソームからの ADR 放出挙動を調べた。いずれの共重合体で修飾したリポソームも 37~40°C において ADR の放出が急激に促進された。このことは、共重合体における温度感受性ブロックであるポリ EOEOVE ブロックが疎水性化することによってリポソーム膜の不安定化が誘起されることを示している。

さらに、これらの共重合体修飾リポソームの温度感受性に及ぼすポリ EOEOVE ブロックの鎖長の影響について検討した。EOEOVE ユニットが 87、131、あるいは 174 の共重合体で修飾したリポソームの ADR 放出について検討したところ、重合度 87 の EOEOVE ブロックをもつ共重合体で修飾したリポソームが最も高い温度感受性を示した。

しかし、この共重合体修飾リポソームは 37°C においても放出が促進された。一方、より長いポリ EOEOVE ブロックを有する 2 つの共重合体で修飾したリポソームは、40°C における ADR 放出促進は若干劣るが、37°C において、ADR を全く放出しなかった。これらの結果は、PEG-EOEOVE-ODVE 共重合体は、リポソームに体温付近以上で ADR を放出する機能を与えること、また、良好な ADR 放出制御を得るためには、十分な鎖長のポリ EOEOVE ブロックが必要であることを示している。

これらの共重合体で修飾したリポソームの ADR 放出挙動に及ぼす血清タンパク質の影響についても検討した。血清タンパク存在下では、共重合体修飾リポソームからの ADR 放出は 37°C において若干抑制され、40°C 以上では、促進される傾向を示し、血清存在下においても、良好な温度応答性を示すことがわかった。

PEG ブロックを含む共重合体修飾リポソームは、共重合体末端の PEG ブロックのために血中においても良好な安定性と血中滞留性を示すことが期待される。今後、生体内におけるリポソームの挙動とその ADR デリバリーによる抗癌活性について検討する予定である。

### C-3. 新規生体適合性感温性ポリマーの作製

これまでにポリグリシドール骨格を有する高分子が脂質膜と強く相互作用してリポソーム膜を不安定化し、内包物質の放出を誘起することを明らかにしてきた。しかもポリグリシドールはグリセリンが縮合した骨格を有するため、生体適合性に優れていると考えられる。そこで、このポリグリシドールを分子骨格とする新規な温度応答性高分子の作製を行った (図5)。

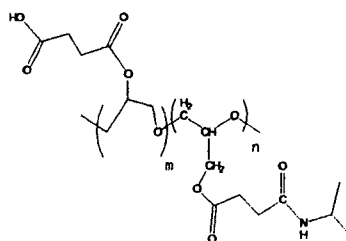


図5. NIPAM 基を有する分岐型ポリグリシドール誘導体の構造。

重合度が 10、20、および 40 の分岐型ポリグリシドールを無水コハク酸と反応させることによって、サクシニル化ポリグリシドールを得た。