

2008/2024A

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20年度 総括研究年度終了報告書

研究代表者 石坂 幸人

平成21（2009）年3月

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20年度 総括研究年度終了報告書

研究代表者 石坂 幸人

平成21（2009）年3月

目次

I. 総括研究報告書	
「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 石坂幸人	----- 1
II. 分担研究報告書	
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 石坂幸人	----- 7
2. 「磁性体ナノ粒子の開発」に関する研究 長谷川正勝	----- 12
3. 「感温性高分子を用いたインテリジェント型リボソームの構築」 に関する研究 河野健司	----- 15
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 青木伊知男	----- 18
5. 「膵臓癌に対する高性能標的化抗体の作製の基盤研究」に関する研究 濱田洋文	----- 21
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 中釜 斉	----- 24
7. 「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 山下克美	----- 26
8. 「膵管がんモデル動物による早期診断法の開発」 津田洋幸	----- 29
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 33

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総括研究報告書

「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

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立することを目標としている。平成 20 年度は単クローン結合型磁性体ナノ粒子からなる MRI プローブの改良と抗体結合様式の最適化を行った。また、ラット膵臓癌に反応性を示す単クローン抗体が新たに得られるとともに、温度応答性リボソームに MRI 造影剤であるガドリニウムを付与することにも成功した。次年度ではこれらを基盤として、オールインワンナノデバイスを作成するとともに、ラット膵臓癌の de novo 検出を行う。

研究組織

研究代表者 石坂幸人（国立国際医センター、
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、准教授）
津田洋幸（名古屋市立大学、教授）

A. 研究目的

本課題では、膵臓癌等の予後不良な難治性腫瘍に対して診断と治療を同時行う事が可能なナノデバイス、以下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稼働
2. 感温性リボソームによる局所 DDS を可能にするシステムを立ち上げ、最終的に MRI プローブとしての機能と同時に外部からの加温誘導によって DDS を行う事が可能なプローブを創成する。

これを達成するためには、以下に示す要件が必要であり、この研究班はそれぞれの分野を専門領域とする研究者から構成されている

- a. 磁性体ナノ粒子と単クローン抗体を用いた MRI 画像化（長谷川、石坂、濱田、

山下）

- b. 温度に反応して融解する温度応答性リボソーム（河野、青木）
- c. 標的化可能な優れた単クローン抗体（濱田）
- d. ヒト膵臓癌に類似した動物モデル（津田、中釜）

である。平成 20 年度の研究成果として、ラット膵臓癌を検出することを可能にするシステムが準備できた。

長谷川と研究代表者はこれまでに、優れた MRI 用造影剤として carboxy-methyl dextran magnetite (以下 CMDM) を創製した（出願特許番号 特 2006-048576）。本プロジェクトでは、この CMDM と 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。また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確立したシステムを用いて作成した抗体で、抗原に対する結合性が究めて優れており、良質な in vivo イメージングを可能にする。

また分担研究者である河野は、42 度の加温誘導によって速やかに包埋した内容物を放出できる温度応答性リボソームを開発してきた。そこで、同リボ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、リボソーム内に MRI 造影剤と抗癌剤を搭載させ、その表面に単クローン抗体を付与する。今年度、リボソームの構成成分である脂質にガドリニウム (Gd) を付与することで新たな MRI プローブとしての可

能性が広がった。

B. 研究方法

a. 磁性体ナノ粒子への抗体結合方法の改良

磁性体ナノ粒子は酸化鉄がデキストランでコーティングされている。平成19年度の研究終了時点で抗体結合型磁性体ナノ粒子の安定性が極めて脆弱であることが判明した。そこで、分担研究者である名糖産業株式会社名古屋研究所と研究代表者は、デキストランの長さを調製することで、抗体結合型磁性体ナノ粒子の安定性の改善を行った。

b. 新たな単クローン抗体を用いた *in vivo* イメージング

これまで、ヒト膵臓癌に反応性を示す抗体として6回膜貫通型蛋白質 PAP2a (phosphatidic acid phosphatase type2a) に対する抗体、 α PAP2a を使用してきた。しかし、平成19年度の解析で、この抗体がモデル動物で作成された膵臓癌に対して反応性を示さない事が明らかとなった。そこで、分担研究者である濱田は、今年度新たにスクリーニングを行い、同じく分担研究者である津田が作製したラット膵臓癌由来細胞株を用いて反応性に関する解析を行った。ヒト腺癌（膵臓癌・前立腺癌等）の標的化抗体のスクリーニング法として従来の蛍光抗体法(FACS)や ELISA 法よりも高感度かつ高性能抗体を選別しやすい手法を用いている。即ち、アデノウイルスベクターのファイバー部に IgG の Fc 結合 Z33 モチーフ (FNMQQRRFYALHDPNLNNEEQRNAKIK SIRDD)を含むファイバー変異型アデノウイルス Adv-FZ33 を作製した。このファイバー-Z33 変異型アデノウイルスは細胞表面抗原に対する抗体依存的に細胞内に感染することが可能で、従来の蛍光抗体法や ELISA 法よりも抗体の性能の差異を明確にすることができる。そこで、がん細胞表面抗原と結合する標的化抗体依存的に癌細胞に遺伝子導入効率を高めることができる抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリー（免疫細胞としてヒト膵癌細胞株 PK-1, AsPC1, KCI-MOH1 を使用した。）をスクリーニングした。Adv-FZ33 で陽性ウェルをスクリーニング後、限界希釈法によりモノクローナル抗体を数種類樹立した FACS 解析により2つのクロー

ーンが陽性を示した。これらクローンについて、無血清清馴化を行い、精製抗体を調製した。得られた抗体に Cy5.5 標識を施し、ラット膵臓癌細胞株を移植した担癌マウスを用いて *in vivo* イメージングを行った。

c. 新たな温度応答性リポソームの作成

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 (EYPC)、パルミトイルオレイルホスファチジルコリン (POPC)、水素化大豆ホスファチジルコリン (HSPC) 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ドキシソルピシン (DOX) 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。

AIO を投与した後 MRI プローブが目的組織に集積した事を検出する為のツールとして、感温性リポソーム自体に MRI 造影剤が付与されていることが望まれる。平成19年度の研究成果として、リポソーム投与後、外部からの加温誘導に反応してリポソーム内に包埋したマンガンイオンが腫瘍組織内で放出される様子を MRI で観察することが可能になった。この際、リポソームにロダミンを標識し、蛍光イメージングで腫瘍に集積する様子を観察した。しかし膵臓組織は深部臓器であるため、蛍光イメージングを使用することは難くリポソーム自身に MRI 造影剤を付与されていることが必要である。前年度使用したマンガンイオンは T1 強調画像によって検出されることから、リポソームに T1 強調画像で検出される MRI 造影剤を標識できれば、リポソームの集積とリポソームからの放出を連続的に行うことが可能となる。そこで河野は今年度、1分子中にガドリニウムキレートと8個担持した dendron 脂質を合成し、この分子を

含有した感温性リボソームを作製した。さらにこのリボソームを担癌マウスに投与し、各正常組織中のシグナルと腫瘍特異的なシグナルの強度の時間変化を観察した。

(倫理面への配慮)

本プロジェクトはマウス及びラットを使用し、各研究施設内の動物実験指針を遵守しながら行った。

C. 研究結果

a. 磁性体ナノ粒子への抗体結合方法の改良

磁性体ナノ粒子のデキストラン長を長くすることで、抗体付き磁性体ナノ粒子の安定性が改善され、4度保存で数週間に亘って安定性を保ち得るプローブの作成に成功した。

また、抗体の磁性体ナノ粒子への結合様式の改良として、これまで使用してきたアミノ結合から、カルボキシル基を介した結合様式への変換を図った。その結果、磁性体ナノ粒子付加型抗体の抗原に対する結合性が著しく改善された。

b. 新たな単クローン抗体を用いた in vivo イメージング

ヌードマウスの皮下に膵臓癌細胞株とコントロール腫瘍細胞である乳癌細胞を移植することで作製した担癌マウスに対する蛍光イメージングを行った。その結果、投与後 2 時間で陽性腫瘍特異的に抗体の集積傾向を認め、24 時間後にシグナル強度の左右差が認められた。特に、膵臓癌細胞株の腫瘍塊はコントロール腫瘍と比較してサイズが小さい傾向を示すにもかかわらず、強い蛍光シグナルが得られた。一方、コントロール IgG 投与群では、コントロールと陽性腫瘍群間にシグナルの差は認めなかった。

c. 新たな温度応答性リボソームの作成

ガドリニウム脂質を 10% 含有した感温性リボソームを作製し、担癌マウスに投与し、その体内動態について検討した。その結果、リボソームの投与後、腫瘍における MR シグナルが強くなり、リボソームが集積していることが示唆された。腫瘍部位における MR 強度の経時変化をモニタリングすることで、リボソームの腫瘍への集積過程を追跡した。そしてリボソーム投与後 2 時間までは、時

間とともに、リボソーム集積量が増大するが、その後一定となることがわかった。一方、肝臓や腎臓におけるリボソームの分布もモニタリングし、投与 3 時間後に集積量が最大となるが、その後は集積量が低下し、これらの臓器から除去されることがわかった。これらの結果から、このリボソームを用いることで、適切なタイミングや標的部位を検知することが可能となり、理想的ながん化学療法につながるものと期待される。

D. 考察

a. AIO ナノデバイスの作成に向けた諸要素の整備

本年度の研究成果により、本プロジェクトの目標である動物モデル膵臓癌に対する MRI 検出と局所 DDS の可能性が大きく広がった。即ち、ガドリニウム付加型温度応答性リボソームの作成、ラット膵臓癌に反応性を示す新たな単クローン抗体の作成及び、ナノ粒子に対する単クローン抗体の最適な結合様式の確立が研究成果として上げられる。

これらの要素を統合しながら、次年度では以下の段階をクリアしながら、目標を達成する。即ち、

- i) 蛍光標識した単クローンを用いたラット膵臓癌の de novo 検出
- ii) ガドリニウム付加型温度応答性リボソームを用いた膵臓癌の MRI 検出
- iii) 外部から加温誘導によるマンガンイオンの膵臓癌組織内での放出

である。一般に膵臓癌組織は抗癌剤や抗体が集積しにくい臓器として知られている。近年、TGF- β 遮断剤である LY364947 の投与により、抗癌剤の抗腫瘍効果が増強できることが担癌マウスを用いて明かにされた (PNAS USA 104, 3460, 2007)。抗体を用いた in vivo イメージングの場合でも、同様の化合物を投与することで、より鮮明なイメージングが可能になるものと期待される。

b. 抗体結合型磁性体ナノ粒子による MRI 検出の感度を如何にあげるか?

一般に MRI は感度が低く、蛍光イメージングの 100 分の 1 程度の感度とされている。蛍光イメージングで得られるのと同様の差を検出できる検出システムの確立が望まれる。

考えられる改良法としては、検出システムの改変が挙げられる。本プロジェクトで使用するシステムは、基本的には抗原・抗体反応の結果に依存するものであり、コントロール腫瘍に集積する MRI プローブを完全にゼロに押さえ込む事は出来ないことが予測される。そこで、対照組織中のシグナルをベースとした場合に、陽性腫瘍に残存するシグナルを評価することで、システムの有効性が検証できるものと期待される。

E. 結論

本研究の結果から、膀胱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、これらを基盤に、最終年度としての目標を達成する。

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. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Kono, "The correlation between fusion capability and transfection activity in hybrid complexes of lipoplexes and pH-sensitive liposomes", *Biomaterials*, **29**, 4029-4036 (2008).
2. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, N. Emi, K. Kono, "Effect of transferrin as a ligand of pH-sensitive fusogenic liposome-lipoplex hybrid complexes", *Bioconjugate Chemistry*, **19**, 1588-1595 (2008).
3. 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*, **19**, 1040-1048 (2008).
4. 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).

5. 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).
6. Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto KI, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I. Nitroxyl Radicals for Labeling of Conventional Therapeutics and Noninvasive Magnetic Resonance Imaging of Their Permeability for Blood-Brain Barrier: Relationship between Structure, Blood Clearance, and MRI Signal Dynamic in the Brain. *Mol Pharm*. In press.
7. Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto K, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I. Nitroxyl radicals as low toxic spin-labels for non-invasive magnetic resonance imaging of blood-brain barrier permeability for conventional therapeutics. *Chem Commun* 7;(1):53-5, 2009.
8. Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I, Masamoto K, Mileva M, Obata T, Higuchi M, Gadjeva V, Kanno I. Multimodal silica-shelled quantum dots: direct intracellular delivery, photosensitization, toxic, and microcirculation effects. *Bioconjug Chem*, **19**(6):1135-42, 2008.
9. Winn Aung, Sumitaka Hasegawa, Michiko Koshikawa, Takayuki Obata, Hiroo Ikehira, Takako Furukawa, Ichio Aoki, Tsuneo Saga. Visualization of in vivo electroporation-mediated transgene expression in experimental tumors by optical and magnetic resonance imaging. *Gene Therapy*, in press.
10. 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.*, **10**(6):597-609. 2008.
11. Matsuura, K., Wakasugi, M., Yamashita, K., and, Matsunaga, T.: Cleavage-mediated activation of CHK1 during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **283**, 25485-25491, 2008.
12. Isoda, M., Kanemori, Y., Nakajo, N., Uchida, S., Yamashita, K., Ueno, H., and

Sagata, N.: The ERK-MAPK Pathway Phosphorylates and Targets Cdc25A for SCF^{TrCP}-Dependent Degradation for Cell-Cycle Arrest. *Mol. Biol. Cell*, in press.

2. 学会発表

1. Aoki I, Yoneyama M, Hirose J, Minemoto Y, Koyama T, Aoshima S, Kershaw J, Kono K, Ishizaka Y, Kanno I. Thermosensitive Polymer-Modified Liposome as a Multimodal and Multifunctional Carrier for MRI and Optical Imaging: Tumor Detection, Visualization of Triggered Drug Release, and Chemotherapy. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Scientific Meeting and Exhibition, 2008; 16: 796.

2. Ichio Aoki, Misao Yoneyama, Jun Hirose, Yuzuru Minemoto, Takayoshi Koyama, Sadahito Aoshima, Jeff Kershaw, Kenji Kono, Yukihito Ishizaka, Iwao Kanno. Development of Multimodal Thermosensitive Polymer-Modified Liposome (MTPL) as a Carrier for MRI and Optical Imaging. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1569, Nice, France, 10 - 13 September 2008.

3. Winn Aung, Sumitaka Hasegawa, Michiko Koshikawa, Takayuki Obata, Hiroo Ikehira, Takako Furukawa, Ichio Aoki, Tsuneo Saga. In Vivo Optical and Magnetic Resonance Imaging of Electroporation-Mediated Transgene Expression in Experimental Tumors. 2008 World Molecular Imaging Congress, 698, Nice, France, 10 - 13 September 2008

4. Kenichi Odaka, Ichio Aoki, Junji Moriya, Kaoru Tateno, Hiroyuki Tadokoro, Tohru Minamino, Toshiaki Irie, Issei Komuro, Kanno Iwao. In-Vivo Application of Manganese-Labeled Immunocytes. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1034, Nice, France, 10 - 13 September 2008

5. Michiko Koshikawa, Sumitaka Hasegawa, Isao Takahashi, Misao Hachiya, Takako Furukawa, Makoto Akashi, Satoshi Yoshida, Ichio Aoki, Tsuneo Saga. Exploring Molecular Targets for Mesothelioma Imaging. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1141, Nice, France, 10 - 13 September 2008

6. Joonas A. Autio, Jeff Kershaw, Takayuki Obata, Sayaka Shibata, Daigo Kuroiwa, Iwao Kanno, Ichio Aoki. Compartmentalized

Diffusion-Weighted Fmri Signal in Alpha-Chloralose Anesthetized Rat Somatosensory Cortex at 7 T. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1918, Nice, France, 10 - 13 September 2008

7. Zhivko Zhelev, Bakalova Rumiana, Aoki Ichio, Gadjeva Veselina, Kanno Iwao. Quantum Dots in Multimodal Imaging: Probe Design, Spectral Characteristics, and Application, 2008 World Molecular Imaging Congress, 1595, Nice, France, 10 - 13 September 2008

8. SCF^{beta-TrCP}によるCdc25Bの制御: 内田早苗、善岡克次、工藤保誠、渡辺信元、松永司、山下克美; 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会; 神戸・2008年12月

9. CDK活性化フォスファターゼCdc25の機能制御機構: 山下克美、内田早苗、松永司、中釜斉; 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会; 神戸・2008年12月

10. JNK-and SCF^{b-TrCP}-mediated destruction of Cdc25B controls cell cycle arrest by non-genotoxic stress: K. Yamashita, S. Uchida, and H. Nakagama; 8th International Conference on Protein Phosphatase, Maebashi, 2008, 11.

11. Cdc25BのJNKおよびSCF^{b-TrCP}依存的分解: 内田早苗、工藤保誠、善岡克次、松永司、山下克美; 第67回日本癌学会学術総会・名古屋・2008年10月

12. Degradation of Cdc25B by JNK-initiated and SCF^{b-TrCP}-mediated Ubiquitination; S. Uchida, Y. Kudo, K. Yoshioka, T. Matsunaga, K. Yamashita; 第60回日本細胞生物学会大会・横浜・2008年6月

H. 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. 特願 2008-120480

発明人; 河野健司 (大阪府立大学工学部)、青島真人 (大阪大学工学部)、磯崎正史 (テルモ株式会社)、野沢滋典 (テルモ株式会社)、石坂幸人 (国立国際医療センター)

発明の名称; 「温度感受性リポソーム」
出願人; 公立大学法人大阪府立大学、

国立大学法人大阪大学、国立国際医療
センター総長、テルモ株式会社
出願日；2008/5/2 平成 20 年

2. 特願 2009-090184

発明の名称：ACE2 活性誘導剤

弊所管理番号：PJ09005HS-TH

発明人：石坂幸人（国立国際医セ）、芳
賀しおり（国立国際医セ）、足立恭子、
志津里芳一、広瀬美奈

出願人：ヒューマンサイエンス振興財団

「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立することを目標としている。ヒト腺癌に反応性を示す単クローン抗体を結合させた磁性体ナノ粒子を用いて、担癌モデルマウスに対するMRI撮像を可能にする諸条件を設定した。また、研究班で新たに作成された単クローン抗体がラット膵臓癌にも反応性を示す事、蛍光標識した抗体が選択的に抗原陽性腫瘍に集積することを明らかにした。

A. 研究目的

膵臓癌の予後は以前悪く、画期的な診断法と加療法の開発が望まれている。一方近年の抗体医療の成果は、膵臓癌の標的化を可能にする抗体の作成が可能であることを示唆する。本研究班ではこの難治性腫瘍の診断と治療を可能にするシステムの開発を行うとともに、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研究
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。

本年度は昨年度に引き続き、特に項目-1の基盤技術の開発を担当した。

本プロジェクトは、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画像を得るとともに、1.5テスラーMRI臨床機による撮像を並行して行い、臨床への出口に向けた研究の進展を図る。また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を使用し、ネイティブな抗原に対する結合性を示すとともに、生体内での標的化能が極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. 研究方法

a. 磁性体ナノ粒子の改良

磁性体ナノ粒子は酸化鉄がデキストランでコーティングされている。平成19年度の研究終了時点で抗体結合型磁性体ナノ粒子の安定性が極めて脆弱であることが判明した。そこで、分担研究者である名糖産業株式会社名古屋研究所と共同で、安定性を改善を行った。まず、磁性体ナノ粒子は一度、Miltenyi社製磁気カラム用磁石で回収し、これに抗体を付加した後、再度磁石で精製

することで、非結合型の抗体を除去した。精製後、4度で数日間保管した後、再度磁石を用いて回収し、結合している抗体の量を SDS-PAGE で解析した。磁性体ナノ粒子の改良点として、酸化鉄を包み込むデキストランの長さを変化させることによる安定化を行った。

b. 単クローン抗体と高磁場 MRI を用いた高分解能 MRI 画像化

安定化させた抗体付加型磁性体ナノ粒子に Cy5.5 を標識し、浜松フォトニクス社製 CCD カメラを用いて蛍光イメージングを行った。シグナルの変化をモニターし、陽性腫瘍に集積するシグナルがもっとも強く得られる時間帯を把握した後、MRI 解析を行った。検出は、分担研究者である青木（放医研）が高磁場 MRI を用いた撮像のための最適な条件で行った。放医研に設置された MRI は、国内有数の水平型 7 テスラ実験用 MRI 装置で、100 μm 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と高感度マルチチャンネル・フェイズドアレイ・コイルを用いた。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した。

c. 新たな単クローン抗体を用いた in vivo イメージング

分担研究者が作成に成功した 2 種類の単クローン抗体産生ハイブリドーマを無血清培地に馴化させた後、大量培養し、精製抗体を調製した。ラット膵臓癌細胞株及びコントロール腫瘍として乳癌細胞株を用いて

抗体の反応性を FACS にて検証した。また、それぞれの細胞株をヌードマウスの皮下に移植し、作製した担癌マウスに Cy5.5 蛍光標識抗体を投与し、in vivo イメージングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は主にマウスを用いて行う。国立国際医療センター動物施設の動物管理委員会の規約を遵守し、動物に対して最小限の負担で行い得る実験計画のもとに進める。

C. 研究結果

a. 磁性体ナノ粒子の改良

磁性体ナノ粒子のデキストランの長さを変化させることで、抗体付き磁性体ナノ粒子の安定性が増強した。平成 20 年度当初では、抗体付加型磁性体ナノ粒子を調製後、翌日でほとんどの抗体が磁性体ナノ粒子から遊離していた。しかし、改良の結果 3 週間の保存でも 90% 以上の抗体付き磁性体ナノ粒子が回収できるようになった。

b. 単クローン抗体と高磁場 MRI を用いた高分解能 MRI 画像化

結合性が安定した抗体付き磁性体ナノ粒子にさらに Cy5.5 を標識し、in vivo イメージングの最適条件を設定した。その結果、投与後 24 時間で、陽性腫瘍への集積が認められた。そこで、MRI による撮像を行った。初日にプレスキャンを行い、プローブ投与翌日に再度 MRI による撮像を行った。その結果、MRI 上、左右差が検出される場合も多かったが、常に陽性所見が得られるという安定した投与条件を設定することはできなかった。

次に抗体結合様式の改良を行った。これ

まで抗と磁性体ナノ粒子との結合はアミノ基を介して行ってきた。その結果、磁性体ナノ粒子に結合させた抗体の抗原に対する反応性が有意に減弱し、その改善が必要であった。そこで、磁性体ナノ粒子に対する結合をカルボキシル基を介した結合様式へ変換することを試みた。その結果、従来法よりも抗原に対する結合性が改良され、かつ磁性体ナノ粒子1個に対して抗体が1-2分子結合したプローブが作成可能になった。抗体のS-S結合を乖離させ、磁性体ナノ粒子とS-C(炭素)結合させることも試みたが、上手く稼働させることは出来なかった。

結合性を改良した抗体付き磁性体ナノ粒子を担癌マウスに投与し、1.5 テスラーMRI臨床機での撮像を行った。その結果、420 ug鉄相当のプローブを投与したマウスで陽性腫瘍にT2強調画像上、シグナルが得られた。

c. 新たな単クローン抗体を用いた *in vivo* イメージング

これまで使用してきた6回膜貫通型蛋白質 PAP2a (phosphatidic acid phosphatase type 2a) に対する単クローン抗体は、膵臓癌症例の内80%以上で反応性を示すが、ラット膵臓癌には反応性を示さないことが昨年の解析で明らかになった。そこで分担研究者である濱田は再度ハイブリドーマをスクリーニングし、今年度2つの新クローンを獲得した。

これらの精製抗体について、ラット膵臓癌細胞株に対する反応性を検定したところ、いずれも反応することが分かった。そこで、ヌードマウスの皮下に膵臓癌細胞株とコントロール腫瘍細胞である乳癌細胞を移植することで作製した担癌マウスに対する蛍光イメージングを行った。その結果、投与後

2時間で陽性腫瘍特異的に抗体の集積傾向を認め、24時間後にシグナル強度の左右差が認められた。特に、膵臓癌細胞株の腫瘍塊はコントロール腫瘍と比較してサイズが小さい傾向を示すにもかかわらず、強い蛍光シグナルが得られた。一方、コントロール IgG 投与群では、コントロールと陽性腫瘍群間にシグナルの差は認めなかった。

これまで使用してきた PP2a とその抗体である T13 で得られるシグナルは、蛍光標識した抗体を投与することにより、抗原を発現する腫瘍選択的なシグナルが検出されたが、今回新たに調製できた抗体の場合には、陽性シグナルが得られるまでに長い時間を要した。

D. 考察

1. 抗体結合型磁性体ナノ粒子による MRI 検出の感度を如何にあげるか?

本年度、抗体付き磁性体ナノ粒子の改良が進み、磁性体ナノ粒子1個に対して1-2個の抗体が結合できるようになった。またカルボキシル基を介した結合様式により、抗原に対する結合性も確保された。このようにして作成された MRI 用プローブを Cy5.5 標識して、蛍光イメージングによって *in vivo* でのイメージングを行うと、抗体単独の場合と同様、陽性腫瘍に選択性を示しながら集積する傾向も認められる。しかしながら、MRI による解析では蛍光イメージングで得られる顕著な差が得られない。これは光イメージングと MRI 感度の差の為と思われる。一般に MRI は感度が低く、蛍光イメージングの100分の1程度の感度とされている。投与量を上昇させればコントロール腫瘍に集積する非特異的シグナルも増強し、特異性が減弱する。

考えられる改良法としては、MRI プローブの強度の増強や検出システムの改変が挙げられる。臨床機 MRI を用いた撮像において、後者に関する改良法の可能性が示唆された。即ち、対照検体のシグナルを基準として、陽性腫瘍中のシグナル強度を評価することができれば、抗体の特性性をデータとして得る事が可能になる。本プロジェクトで使用するシステムは、基本的には抗原・抗体反応であり、コントロール腫瘍に集積する MRI プローブを完全にゼロに押さえ込む事は出来ない。そこで、対照組織中のシグナルをベースとした場合に、陽性腫瘍に残存するシグナルを評価することで、システムの有効性が検証できる。次年度では、陽性腫瘍中で認められる MRI シグナルを最も顕著に検出するための解析法の確立に向け、解析システムの改良を行う。即ち、組織中に集積する磁性体ナノ粒子に由来する鉄濃度を評価し、この濃度付近で変化する鉄濃度を最も鋭敏に検出するための解析法を設定する。このシステム開発は、本プロジェクトに研究協力者として参加している徳島大学菅田栄一教授及び国立国際医療センターの志村まり室長とともに行う。

2. 新規単クローン抗体を用いたラット膵臓癌検出の可能性

本年度、ラット膵臓癌にも反応性を示す単クローン抗体が得られた。この抗体を使用することにより、ラット膵臓癌を開腹する事無しに検出する事が可能になるものと期待される。一般に膵臓癌組織は抗癌剤や抗体が集積しにくい臓器として知られている。近年、TGF- β 遮断剤である LY364947 の投与により、抗癌剤の抗腫瘍効果が増強できることが担癌マウスを用いて明かにされ

た(PNAS USA 104, 3460, 2007)。抗体を用いた *in vivo* イメージングの場合でも、同様の化合物を投与することで、より鮮明なイメージングが可能になるものと期待される。

3. 単クローン抗体による標的イメージング

今年度は α PAP2a 及び新たに獲得した腺癌反応性抗体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見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。 α 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 *in vivo* 標的に適した抗体スクリーニングシステムの成果であると言える。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 造影剤として機能することが期待される。次年度では、ラット膵臓癌の *in vivo* イメージングを達成する。

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. Haga S., Yamamoto N., Nakai-Murakami C., Osawa Y., Tokunaga K., Tetsutaro Sata T., Yamamoto N., Sasazuki T. and Ishizaka Y. Modulation of TNF- α -converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and angiotensin-converting enzyme 2 induces TNF- α production and facilitates viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 7809-7814, 2008.
2. 小山貴芳、石坂幸人. 蛋白質導入 7、58-61, 2008.
3. Nakai-Murakami, C., Yuzuru Minemoto, Yukihiro Ishizaka. Vpr-induced DNA double-strand breaks: Molecular mechanism and biological relevance. *Current HIV Research*, 7 (2), 109-113, 2009.

2. 学会発表

1. Aoki I, Yoneyama M, Hirose J, Minemoto Y, Koyama T, Aoshima S, Kershaw J, Kono K, Ishizaka Y, Kanno I. Thermosensitive Polymer-Modified Liposome as a Multimodal and Multifunctional Carrier for MRI and Optical Imaging: Tumor Detection, Visualization of Triggered Drug Release, and Chemotherapy. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Scientific Meeting and Exhibition, 2008; 16: 796.
2. Ichio Aoki, Misao Yoneyama, Jun Hirose, Yuzuru Minemoto, Takayoshi Koyama, Sadahito Aoshima, Jeff Kershaw, Kenji Kono, Yukihiro Ishizaka, Iwao Kanno. Development of Multimodal Thermosensitive Polymer-Modified Liposome (MTPL) as a Carrier for MRI and Optical Imaging. 2008 World Molecular Imaging Congress, 1569, Nice, France, 10 - 13 September 2008

H. 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. 出願

1. 特願 2008-120480

発明人；河野健司（大阪府立大学工学部）、青島貞人（大阪大学工学部）、磯崎正史（テルモ株式会社）、野沢滋典（テルモ株式会社）、石坂幸人（国立国際医療センター）

発明の名称；「温度感受性リポソーム」

出願人；公立大学法人大阪府立大学、国立大学法人大阪大学、国立国際医療センター総長、テルモ株式会社

出願日；2008/5/2 平成 20 年

2. 特願 2009-090184

発明の名称；ACE 2 活性誘導剤

弊所管理番号；PJ09005HS-TH

発明人；石坂幸人（国立国際医セ）、

芳賀しおり（同）、足立恭子、

志津里芳一、広瀬美奈

出願人；ヒューマンサイエンス振興財団

磁性体ナノ粒子の開発

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 による優れた検出能を持ち、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」の合成法を改良した。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で再現性よく特異的に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、本複合体は癌種特異的 MRI 造影剤などとして実用化の期待できる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、特異的か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 α PAP2a を結合した「 α PAP2a-磁性ナノ粒子複合体」について、磁性ナノ粒子の粒子径、磁性、および粒子表面物性、並びに抗体の導入方法を最適化することで、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 19 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 α PAP2a との結合方法として直接

結合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 検出を行った。平行して、CMDM の物性改善についても予備的に検討し、その方向付けを行った。

2 年目の今年度には、CMDM の磁性の向上や表面物性の最適化、抗体導入方法の改良（直接結合からスペーサー経由結合法へ）、および精製法の改善（限外ろ過から磁気分離法へ）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。

3 年目の 21 年度には、これら成果を臨床試験に移行する準備として、主に 3 項目の検討を進める。第 1 項目は、薬剤合成の効率化及びスケールアップの検討である。特に、効率的な抗体導入に必須である磁気分離工程について、分離条件の最適化、次いでスケールアップを検討する。第 2 項目としては、対象とする生物検体について、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。第 3 項目としては、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 (カルボキシメチル テ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) ¹
R1	20~50 (mM・s) ¹

(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

本研究の当該年度には、 α P_{AP2a}-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、スパーサーを經由してアミド結合により抗体を導入する方法が導入効率や特異性発現の点で好ましいことが分かった。

磁性ナノ粒子本体については、原料である CMD 分子量の検討など、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。

また、抗体導入における精製では、限外ろ過法に比較して磁気分離法が大変良好な分離効率を与える点で優れている事も分かった。

このようにして改良を進めた「 α P_{AP2a}-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、蛍光および MRI にて腫瘍特異的に集積する様子を再現性よく観

察することができた。

D. 考察

当該年度の研究の結果、 α P_{AP2a}-磁性ナノ粒子複合体を生物体内の目的部位へ再現性よく集積させ、MRI 画像化を達成できたので、臨床応用を念頭に次年度の課題として次の3点を実施する時期と考える。

①合成法の最適化とスケールアップ：抗体導入の効率化、特異性の向上、および安定性の向上などの観点から更に合成・精製条件を最適化し、スケールアップを検討する。

②有効性検証の拡大：対象とする生物検体について、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安全性の検証：本目的に最適な磁性ナノ粒子、及びその抗体複合体について動物による初歩的な安全性試験を行う。

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。本研究の成果を臨床試験に移行する準備を開始する時期と判断される。

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

感温性高分子を用いたインテリジェント型リポソームの構築

分担研究者：河野健司 大阪府立大学工学部

研究要旨：オールワンナノデバイスのコアとなる要素である、温度応答性リポソームの開発研究を推進した。特に今年度は、血中における安定性と鋭敏な温度応答性を有する感温性リポソームの開発を進めるとともに、ガドリニウムを付加したリポソームの作成を行い、担癌マウスを用いて投与後の全身分布及び腫瘍組織での集積について、経時的变化を追跡した。これまでに包埋したマンガンイオンを MRI 検出することで、腫瘍組織内で包埋物が放出される様子が MRI によりリアルタイムで検出できるようになっている。今年度開発した新たな要素を既存のリポソームに加えることにより、リポソームの腫瘍への集積と腫瘍組織内での内包物の放出観察を同時に行う事が可能なツールを開発できるものと期待される。

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。本研究では、血中における安定性と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温度応答性リポソームの組成の検討、②MRI で検出可能な感温性リポソームの作製について検討を行った。

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 (EYPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、水素化大豆ホスファチジルコリン (HSPC) 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ドキシソルピシン (DOX) 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。温度応答性デンドリ

マーは、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. 温度応答性リポソームの組成の検討

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。すでに、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示されている。そこで、リポソームの温度応答性に及ぼす脂質組成の効果について検討した(図 1)。ここでは、比較的流動性の高い膜を形成する POPC と固いゲル状の膜を形成する HSPC の混合脂質を用いた。また、いずれのリポソームもコレステロールを 30% 含有する。いずれのリポソームも 40℃以上で DOX の放出が促進されることが分かる。HSPC の含有率が増加すると DOX 放出若干抑制される傾向を示したが、その程度はわずかであった。また、リポソームの DOX 放出挙動に及ぼすコレステロール含率の影響を調べ、その結果を図 2 に示した。コレステロール含率が 30% ~45% でほぼ同様な温度応答性を示すことがわかった。

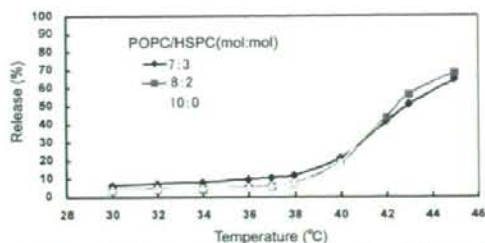


図 1. リポソームからのドキソルビシンの放出の温度依存性。

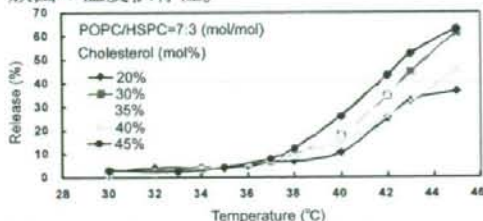


図 2. リポソームからのドキソルビシンの放出に及ぼすコレステロールの影響。

体内におけるリポソームの挙動について調べた。図 3 は種々の組成のリポソームをマウスの尾静脈から投与した時の血中残存量を示す。脂質組成や感温性ポリマーの有無によらずほぼ同様の血中滞留性を示した。一方、DOX の血中濃度を調べ、その時のリポソーム脂質濃度との比率から、リポソーム内に残存している DOX 量を推定した(図 4)。HSPC を含有するリポソームおよび PEG 鎖を末端にもつ感温性高分子 (PEG-EO131) で修飾したリポソームが比較的高い血中安定性を示した。これらのリポソームでは、投与 12 時間後に 50% 以上の DOX 保持率を示した。

C-2. MRI で検出可能な感温性リポソーム

感温性リポソームを体内に投与したのち、標的部位への集積過程を追跡することができれば、最適のタイミングで、標的部位を加温することができる。したがって、このようなリポソームを用いることで、高精度な癌化学療法が可能になる。そこで、1 分子中にガドリニウムキレートをもつ 8 個担持した dendron 脂質を合成し、この分子を含有した感温性リポソームを作製した (図 5)。

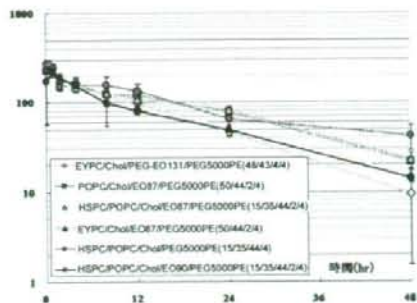


図 3. マウスにおけるリポソームの血中滞留性。血液中における脂質濃度の経時変化を示す。投与量は $10 \mu\text{mol lipid}/5\text{ml}/\text{kg}$ 。

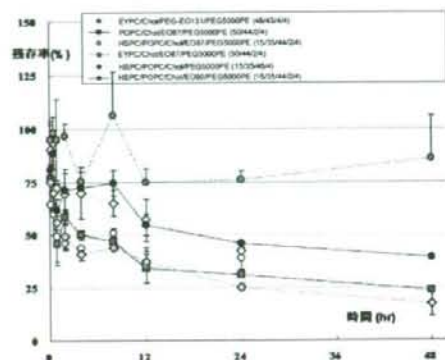


図 4. マウスにおけるリポソームの血中安定性。リポソーム中の DOX 残存率の経時変化を示す。投与量は $10 \mu\text{mol lipid}/5\text{ml}/\text{kg}$ 。



図 5. ガドリニウムキレートを担持した dendron 脂質の合成。

このガドリニウム脂質を 10% 含有した感温性リポソームを作製し、担癌マウスに投与し、その体内動態について検討した。図 6 に示されるように、リポソームの投与後、腫瘍における MR シグナルが強くなり、リポソームが集積していることが分かる。腫瘍部位における MR 強度の経時変化をモニタリングすることで、リポソームの腫瘍への集積過程を追跡した。そして、リポソーム投与後 2 時間までは、時間とともに、リポソーム集積量が増大するが、その後一定となることがわかった。一方、肝臓や腎臓

におけるリポソームの分布もモニタリングし、投与3時間後に集積量が最大となるが、その後は集積量が低下し、これらの臓器から除去されることがわかった。これらの結果から、このリポソームを用いることで、適切なタイミングや標的部位を検知することが可能となり、理想的ながん化学療法につながるものと期待される。

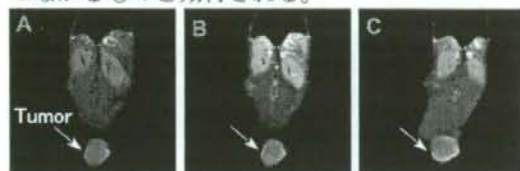


図 6. MRI によるガドリニウム脂質含有感温性リポソームの腫瘍への集積過程のモニタリング。(A) 投与前、(B) 投与1時間後、(C) 投与8時間後。

D. 結論

本研究において、温度に対して高感度を示し、しかも体内において安定な温度応答性リポソームを開発することに成功した。また、このリポソームにガドリニウム担持デンドロン脂質を含有させることで、マウス体内の腫瘍部位への集積過程を追跡できる可視化機能の付与に成功した。本研究で開発された可視化機能と温度応答機能を併せ持ったインテリジェントリポソームは、最適のタイミングで、癌病巣だけを攻撃することが可能なことから、副作用を低減し最大限の治療効果を得る、理想的ながん化学療法につながるものと期待される。

E. 研究発表

1. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Kono, "The correlation between fusion capability and transfection activity in hybrid complexes of lipoplexes and pH-sensitive liposomes", **Biomaterials**, **29**, 4029-4036 (2008).
2. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, N. Emi, K. Kono, "Effect of transferrin as a ligand of pH-sensitive fusogenic liposome-lipoplex hybrid complexes", **Bioconjugate Chemistry**, **19**, 1588-1595 (2008).
3. 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**, **19**, 1040-1048 (2008).

4. 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).

5. 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).