

200912014A

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21年度 総括研究報告書

研究代表者 石坂幸人

平成22（2010）年5月

## 目次

|   |       |    |
|---|-------|----|
| I. 総合研究報告   |       |    |
| 「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<br>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. 「オールインワンナノデバイスの設計と機能評価」に関する研究                          |       |    |
| 石坂幸人  | ----- | 8  |
| 2. 「磁性ナノ粒子の開発」に関する研究                                      |       |    |
| 村瀬勝俊  | ----- | 12 |
| 3. 「感温性リポゾームの開発と磁性体ナノ粒子のリポゾームへの包埋」に関する研究                  |       |    |
| 河野健司  | ----- | 14 |
| 4. 「高磁場MRIによる癌病変描出法の開発」に関する研究                             |       |    |
| 青木伊知男   | ----- | 17 |
| 5. 「単クローン抗体の作成とその臨床的有用性の検定」に関する研究                         |       |    |
| 濱田洋文  | ----- | 20 |
| 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  | ----- | 25 |
| 7. 「GLP-1受容体単クローン抗体の作成」に関する研究                             |       |    |
| 山下克美  | ----- | 28 |
| 8. 「膵管がんモデル動物による早期診断法の開発」に関する研究                           |       |    |
| 津田洋幸  | ----- | 30 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                                       | ----- | 33 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷   | ----- | 35 |

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 21 年度は単クローン結合型磁性体ナノ粒子からなる MRI プローブを用いて標的腫瘍の MRI 検出が可能になった。また、温度応答性リポソームにガドリニウムをさらに付与することにより、検出と薬剤放出が共に可能なナノデバイスの開発にも成功するとともに、独自のスクリーニングシステムを用いて標的化可能な単クローン抗体が数多く作成された。本研究課題の成果により、オールインワンナノデバイスの作成を可能にするための技術基盤が整備され、微小癌の MRI 検出と局所 DDS を可能にする新たな診断・治療法の開発が可能になった。

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

村瀬勝俊（名糖産業株式会社）

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. MRI 検出可能な感温性リポソームによる局所 DDS を確立し、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。

即ち、腫瘍集積性・MRI 感受性・蛍光特性・抗腫瘍・温度感受性による薬剤放出という 5 つの機能を併せ持つ新たな MRI プローブの作成を目指している。

これを達成するための具体的な研究として、

- 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. MRI 検出が可能でかつ、温度に反応して融解する温度応答性リポソーム（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）

を各分担研究者が行った。

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 dextrans 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 (T) 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あり、抗原に対する結合性が極めて優れている。平成 21 年度の研究成果として、単クローン抗体付加型磁性体と MRI による腫瘍の画像化に成功した。

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ポソームを開発し特に今年度はリポソームの構成成分である脂質にガドリニウム (Gd) を付与することにより、MRI 検出が可能なナノデバイスの作成に成功した。

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図った。さらに CMDM 表面をコーティングするデキストランの物理的強度を向上させた。さらに、結合条件として、CMDM 一粒子に対して 1-2 分子の抗体を架橋するための条件を確立するため、種々の濃度の抗体を CMDM に架橋させた。また、CMDM に対する抗体の結合方法としてアミノ結合、カルボキシ結合及び S-C (イオウ-炭素) 結合の 3 種類を作成した後、CMDM に架橋された抗体の抗原への反応性を FACS 解析で検証することで、結合方法を確立した。

CMDM への抗体結合の安定性評価は、以下のように行った。即ち、Milteni 社製磁気ビーズ用カラムに抗体付き CMDM をアプライし、一端磁石で捕捉した CMDM 画分を SDS-PAGE にアプライし、泳動された蛋白質を染色することで、IgG の light 鎖と Heavy 鎖を検出した。

使用する抗体は、分担研究者である濱田らが確立した ATAAB (super-targeting antibody) 法で得たクローンであり、これは膵臓癌症例の内 80% 以上で陽性を示す 6 回膜貫通型蛋白質 PAP2a (phosphatidic acid phosphatase type 2a) を認識する。得られた複数のクローンの中で、T13 と命名したクローンを用いて開発研究を行った。

#### b. in vivo イメージング

まず、抗体による in vivo イメージングに向け、T13 を結合させた CMDM にさらに Cy5.5 を用いて蛍光標識プローブを用いた。担癌マウスの尾静脈から one-shot で投与し、経時的に腫瘍への集積性を浜松フォトニクス社製 CCD カメラを用いて解析した。

投与後 24 時間後で、抗体が集積することが分かったため、同時間後の腫瘍組織中の鉄含有量を Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS 解析) で測定した。

#### c. 新たな温度応答性リポソームの作成

ポリアミドアミン(PAMAM)-G3 デンドロン脂質に gadolinium-tetraazacyclododecane tetraacetic acid (Gd-DOTA) を結合することで、G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub> を合成した。また、エトキシエトキシエチルビニルエーテルオクタデシルビニルエーテル (EOEOVE-ODVE) ブロック共重合体、G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub>、卵黄ホスファチジルコリン、コレステロール、PEG(2000)脂質の混

合薄膜を水和させることで多重機能性リポソームを調製した。腫瘍モデルマウスは、BALB/C ノードマウスに Colon26 細胞 (マウス大腸がん由来) を移植、成長させることで作成した。この担癌マウスに G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub> を投与し、腫瘍中に集積する MRI プローブの時間的変化を 7T-MRI で解析した。

#### d. 高磁場 MRI を用いた高分解能 MRI 画像化と加温誘導システムの開発

7T 高磁場 MRI で、in vivo イメージングを行った。撮像は、国内有数の水平型 7T 実験用 MRI 装置に、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、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<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>2</sub>\*強調画像に加えて、定量的データを取得可能な T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub> 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、最も効率よく標識細胞を検出する諸条件を決定した。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した。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、撮像前処理として Gd 投与後の MRI 観察を行い、腫瘍中の壊死巣の有無や対照組織と標的腫瘍間での血液分布等の違いの有無を解析した。5 mm 直径程度の腫瘍組織を用いることで、対照組織と標的腫瘍間で著しい差を認める担癌マウスは解析から除外した。さらに翌日の撮像終了後にも同様の操作を行い、in vivo での撮像条件のバラツキを最小限にする努力を払った。

また、体内深部領域での加温と放出をモニターするために、局所加温を目的とした高周波 RF 表面コイルを作成し、RF パルスの連続照射により加温を行うと同時に、MRI の撮像および温度イメージングの取得を行った

#### e. 新たな単クローン抗体の作成

濱田らは、新たな単クローン抗体の作成を引き続き行った。開発された Adv-FZ33 と膵がん細胞株に対する抗体のライブラリーと組み合わせたスクリーニング法は従来の腫瘍マーカー探索 (マイクロ

アレイ解析、プロテオミクス解析など)と異なり、抗原同定と同時に細胞表面を認識する高性能な抗体を得ることを可能にする。得られる抗体は標的化能に優れているのに加えて、抗原同定から診断などへの応用に迅速に利用できる。また得られた抗体にはラットへの反応性を持つ抗体も含まれており、これらの抗体はラット膵がんモデルを用いて検討することが出来る。

このスクリーニングシステムでは、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 (FNMQQRRFYALHDPNL NEEQRNAKIKSIRDD) が挿入されている。このファイバー変異型アデノウイルス Adv-FZ33 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可能な抗体産生ハイブリドマ・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、単クローン抗体を同定した。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 つのクローンが陽性を示した。これらクローンについて、無血清倍馴化を行い、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 イメージングを行うという一連の作業の流れの中で in vivo イメージングに適した単クローン抗体の作成を行った。

(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

CMDM をコーティングするデキストランの高分子化及び、架橋処理により 3 次元化させることで、物理的強度を向上することが出来た。この結果、結合させた抗体が簡単に脱離することがなく、未結合抗体を除去する精製工程を安定に実施させることができた。

抗体の磁性体ナノ粒子への結合様式としては、アミノ結合による架橋によって再現性良く

抗体が安定的に CMDM に結合性を示すことが明らかとなった。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。

ICP-MS 解析によって標的腫瘍中の鉄含有量が対照腫瘍の約 1.5 倍増加することが分かり、確かに CMDM が標的腫瘍中に集積していることが強く示唆された。

#### c. 新たな温度応答性リポソームの作成

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。その結果、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示唆された。さらに、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增大するが、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。今回使用したリポソームは、これまで分担研究者である河野が開発してきた温度応答性を示す特性を有しており、MRI による観察を行いながら、外部から加温誘導することで、リポソーム内に包埋されたマンガンが組織中に流出する様子

をリアルタイムに検出することもできる。

d. 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・スクリーニング: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。すなわち、ヒト膵がんなどに対し計600種の高効率標的化抗体を樹立し、現在までに約60種の抗原を同定できた。

#### 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オールインワンナノデバイスを作成するための基盤が確立できた。

まず、抗体をナノ粒子に結合させる方法及び、結合させたナノデバイスが標的腫瘍に選択的に集積することがMRI解析によって達成できた。

一方、温度反応性リポソームにMRIプローブとしてのGd-DOTAを付与した新たなナノデバイスの作成にも成功した。

以上の2つの技術基盤を統合することで、当初の目標を達成できるものと期待される。

また、ファイバーZ33型アデノウイルスを用いたスクリーニング系を用いることで、難治性がんである膵臓がん・前立腺がんに対する抗体を数種類樹立し、認識抗原を明らかにできた。今までに樹立した抗CD276抗体(5個)と抗EphA2抗体(5個)は多くの癌で高発現しており、代表的な膵がん細胞株8種においてすべて発現が見られた。また、得られた抗体の中でラットに反応性を示すモノクローナル抗体が含まれていることから、抗体を投与した場合の副作用などの影響や、分子イメージングへの適応を考慮し、担癌ラットモデルでの抗体の集積性や抗腫瘍効果を解析、さらに温感性リポソームへの結合を行い、より特異性・集積性そして診断・治療効果の高いピンポイントDDSの開発を目指すことが可能になるものと期待される。

膵がんを初めとする難治がんに対する効果の高い新たな治療法として、イムノトキシン(iTox)を搭載した単クローン抗体による治療法の樹立を目指して実験が開始された。以前からiToxに関しては国内外で多くの研究が重ねられているが、標的抗原がiToxの標的分子として適しているという直接的な実験証拠から

選ばれた分子ではない。また、多くの抗体はELISAなど、標的化を前提に選別されたクローンではないため、臨床に使える優れたiTox活性の得られるものは稀である。これに対して濱田らが開発したシステムで得られる抗体は標的性を有しており、将来的な標的治療において最適な抗原・抗体をセットとして機能する可能性が期待される。

#### 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、温度応答性リポソームの優れた機能性も証明され、オールインワンナノデバイスの作成が可能に基盤が整備された。

#### F. 健康危険情報

ファイバー改変アデノウイルスベクターを本研究で用いているが、使用・管理とも指定の施設内で行い、汚染・持ち出し等の問題もなく、順調に研究が施行できている。またヒト手術材料を用いる臨床研究に関しては、倫理面に配慮した実施計画書・説明同意書などを作製し、すでに、札幌医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会でも許可を受けている。研究課題「新規標的化抗体による癌の診断・治療法の開発」、許可番号第217-3号、平成18年2月10日付け。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hoshino S, Konishi M, Mori M, Shimura M, Nishitani C, Kuroki Y, Koyanagi Y, Kano S, Itabe H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol.* 2010 Feb 9. [Epub ahead of print]
2. Haga S, Nagata N, Okamura T, Yamamoto N, Sata T, Yamamoto N, Sasazuki T, Ishizaka Y. TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res.* 2010 Mar;85(3):551-5. Epub 2009 Dec 6.
3. Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, Kaneko K, Ishizaka Y, Tanaka Y, Sata T, Tokunaga KHIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to

- lysosomes. *J Biol Chem.* 2009 Dec 11;284(50):35060-72. Epub 2009 Oct 16.
4. Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Poon RY, Yamashita K. Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res.* 2009 Aug 15;69(16):6438-44. Epub 2009 Jul 28.
  5. Nakai-Murakami, C., Yuzuru Minemoto, Yukihito Ishizaka. Vpr-induced DNA double-strand breaks: Molecular mechanism and biological relevance. *Current HIV Research*, 7 (2), 109-113, 2009.
  6. Eiji Yuba, Chie Kojima, Atsushi Harada, Tana, Shinobu Watarai, Kenji Kono, "pH-Sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a carrier of antigenic proteins for activation of cellular immunity", *Biomaterials*, 31, 943-951 (2010).
  7. Chie Kojima, Kouhei Yoshimura, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Kenji Kono, "Synthesis and characterization of hyperbranched poly(glycidol) modified with pH- and temperature-sensitive groups", *Bioconjugate Chem.*, 20, 1054-1057 (2009).
  8. Eiji Yuba, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Kenji Kono, "Carboxylated hyperbranched poly(glycidol)s for preparation of pH-sensitive liposomes", *J. Control. Release*, in press.
  9. Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, Kamiya K, Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F, Nakagama H. Translesional DNA synthesis through a C8-guananyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in vitro: Rev1 inserts dC opposite the lesion and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3' dC terminus. *J Biol Chem*, 284:25585-25592, 2009.
  10. Okamoto K, Taya Y, Nakagama H. Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase. *FEBS Lett*, 583:2710-2714, 2009.
  11. Fukuda K, Abei M, Ugai H, Kawashima R, Seo E, Wakayama M, Murata T, Endo S, Hamada H, Hyodo I, Yokoyama KK. E1A, E1B double-restricted replicative adenovirus at low dose greatly augments tumor-specific suicide gene therapy for gallbladder cancer. *Cancer Gene Ther.*, 16 (2) : 126-136, 2009.
  12. Toyama K, Honmou O, Harada K, Suzuki J, Houkin K, Hamada H, Jeffery D. Kocsis. Therapeutic benefits of angiogenic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp. Neurol.*, 216(1): 47-55, 2009.
  13. Ono I, Akasaka Y, Kamiya T, Sato M, Kobune M, Hamada H, Yamashita T. De novo follicular regeneration of the skin by wingless int 3 and bone morphogenetic protein 2 genes introduced into dermal fibroblasts and fibroblast growth factor-2 protein. *Wound Rep. Reg.*, 17: 436-446, 2009.
  14. Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Hamada H, Azuma H, Ikeda H. Biocompatibility study of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, with human umbilical cord hematopoietic stem/progenitor cells using an in vitro expansion system. *ASAIO J.*, 55(3): 200-205, 2009.
  15. Song CH, Honmou O, Ohsawa N, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. *J Virol.*, 83(11): 5918-5927, 2009.
  16. Huang J, Inoue M, Hasegawa M, Tomihara K, Tanaka T, Chen J, Hamada H. Sendai viral vector mediated angiopoietin-1 gene transfer for experimental ischemic limb disease. *Angiogenesis*, 12 (3):243-249, 2009.
  17. Katsu M, Koyama H, Maekawa H, Kurihara H, Uchida H, Hamada H. Ex vivo gene delivery of ephrin-B2 induces development of functional collateral vessels in a rabbit model of hind limb ischemia. *J. Vasc. Surg.*, 49(1): 192-198, 2009.
  18. Kojima Y, Honda K, Hamada H, Kobayashi N. Oncolytic gene therapy combined with double suicide genes for human bile duct cancer in nude mouse models. *J. Surg. Res.*, 157(1):e63-e70, 2009.
  19. Sasaki K, Kogure K, Chaki S, Nakamura Y, Moriguchi R, Hamada H, Danev R, Nagayama K, Futaki S, Harashima H. An artificial virus-like nano carrier system: enhanced endosomal escape of nanoparticles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives. *Anal Bioanal Chem.*, 391(8): 2717-2727, 2009.
  20. Tanaka, H., Tsuda, H., et al., Mature acinar

- cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. *Cancer Sci.*, 101: 341-346, 2010.
21. Fukamachi, K, Tsuda, H., et al., An animal model of preclinical diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390: 636-641, 2009.
  22. Isoda M, Kanemori Y, Nakajo N, Uchida S, Yamashita K., Ueno H, and Sagata N.: The extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase pathway phosphorylates and targets Cdc25A for SCF<sup>b-TrCP</sup>-dependent degradation for cell cycle arrest. *Mol Biol Cell* 20: 2186-2195, 2009.
  23. Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Poon RYC, and Yamashita K.: Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res* 69: 6438-6444, 2009.
  24. Yamashita Y, Kasugai I, Sato, M Tanuma N, Yamashita K., Nomura M, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T, Katakura R, and Shima H.: CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. *J Neuro-oncol*: in press.
2. 学会発表
1. 中嶋誠司、原田敦史、青島貞人、国領大介、青木伊知男、石坂幸人、河野健司 Gd-DOTA 結合デンドロン脂質の導入によるMR造影機能を付与した温度応答性リポソームの構築、第25回日本DDS学会学術集会、7月3-4日、東京。
  2. 中嶋誠司、国領大介、青木伊知男、青島貞人、石坂幸人、原田敦史、河野健司、ガドリニウムキレートを有するデンドロン脂質の合成とその導入によるMR造影機能を有する温度応答性リポソームの調製、第58回高分子討論会、9月16□18日、熊本。
  3. 河野健司、中嶋誠司、原田敦史、国領大介、青木伊知男、青島貞人、石坂幸人、可視化機能と温度応答機能をもつ多重機能性リポソームの設計、第58回高分子討論会、9月16□18日、熊本。
  4. 中嶋誠司、国領大介、青木伊知男、青島貞人、石坂幸人、原田敦史、河野健司、MRIによるモニター機能を付与したドキシソルピシン内包温度応答性リポソームの機能評価、第31回バイオマテリアル学会、11月17□18日、京都。
  5. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜齊：化学物質で誘発される細胞障害性ストレスによる microRNA の発現プロファイルの変化とその大腸発がんにおける意義、第24回発癌病理研究会 2009. 8. 25-8. 27
  6. Fukuda H, Takamura T, Masuda Y, Kamiyama K, Ochiai M, Nakagama H：発がん物質 PhIP に対する細胞応答及同付加体部位での損傷乗越え DNA 修復の解析 DNA-damage checkpoint response to PhIP-exposure and translesion DNA synthesis at PhIP-dG、第68回日本癌学会学術総会 2009. 10. 1-10. 3
  7. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜齊：Changes of microRNA expression by chemically-induced cellular stress and its significance in colon、第68回日本癌学会学術総会 2009. 10. 1-10. 3
  8. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜齊：化学物質で誘発される細胞障害性ストレスによる microRNA の発現変動とその大腸発がんへの関与 Changes of microRNA expression by chemically-induced cellular stress and their relation to colon carcinogenesis、第38回日本環境変異原学会 2009. 11. 26-11. 27
  9. 田中創始、大嶋浩、深町勝巳、アレキサンダー・デビッド、二口充、城卓志、津田洋幸. Possible identification of cytogenesis of pancreas cancer and lung cancer in the rat. 68回日本癌学会総会 2009年10月。
  9. 内田早苗、渡辺信元、松永司、中釜齊、山下克美：Degradation of Cdc25B induced by cellular stresses. 第82回日本生化学会大会 10.21-24, 2009. 神戸。
  10. 山下克美、内田早苗、松永司、落合雅子、中釜齊：遺伝毒性・非遺伝毒性化学発がん物質のバイオイメージングによる検出。第68回日本癌学会学術総会。10.1-3, 2009. 横浜。
  11. 松永司、山下克美、若杉光生：癌細胞における DNA 損傷/複製ストレス後の Chk1 リン酸化の異常亢進。第68回日本癌学会学術総会 10.1-3, 2009. 横浜
  12. 内田早苗、渡辺信元、工藤保誠、善岡克次、松永司、中釜齊、山下克美：JNK 誘発性 SCF<sup>bTrCP</sup> 依存的 Cdc25B ユビキチン化の分子機構。第68回日本癌学会学術総会 10.1-3, 2009. 横浜。
  13. 内田早苗、渡辺信元、工藤保誠、松永司、中釜齊、山下克美：Sequence requirement for degradation of Cdc25B by SCF<sup>bTrCP</sup> in response to cellular stress. 第32回日本分子生物学会年会 12.9-12, 2009. 横浜。



14. 内田早苗、松永司、渡辺信元、中釜斉、山下克美：Cdc25B の分解制御機構：上流 PEST 配列の寄与. 第 4 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 11.13-14, 2009. 熊本.

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；「温度感受性リボソーム」

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総長、テルモ株式会社

出願日；2008/5/2 平成 20 年

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

「オールインワンナノデバイスの設計と機能評価」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。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 撮像を行い、陽性腫瘍に有意に強い、MRI シグナルを検出した。単クローン抗体を搭載した磁性体プローブの投与後の腫瘍組織に有意に高い濃度の鉄が集積することを誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS)によって証明した。本解析によって、抗体付き磁性体ナノ粒子の MRI プローブとしての有用性が証明された。

A. 研究目的

膵臓癌の予後は依然悪く、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。さらに、MRI の画像下に高周波の焦点照射を行う事で、腫瘍の非観血的な治療技術も開発されている。本研究班ではこのような技術基盤を組み合わせる事で、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稼働
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。

本分担研究では昨年度に引き続き、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(T)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、1.5T-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試みる。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

本研究では、標的分子を認識する抗体として濱田らが作成した単クローン抗体を使用した。これは膵臓癌症例の内80%以上で陽性を示す6回膜貫通型蛋白質PAP2a (phosphatidic acid phosphatase type2a)を認識するIgG型単クローン抗体である。

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、安定性の改善を行った。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を架橋させることによって安定化を行った。

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、浜松フォトンクス社製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 テスラー実験用 MRI 装置で、 $100\ \mu\text{m}$  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。特に本年度は、データの論文化に向け、同様の実験を繰り返し行った後、得られたデータを Sign test で解析し、有為差検定を行った。

(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を架橋させることで、抗体付き磁性体ナノ粒子の安定性が増強した。平成 19 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再現性良く認められた。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。今回まず、ガドリニウムを投与し、陽性腫瘍と陰性腫瘍の陰影に差異がないことを確認した。その後、 $900\ \mu\text{g Fe}/20\text{g BW}$  相当量の抗体プローブを投与し、24 時間後に MRI 画像を得た。

独立して行った撮像実験で得られた 10 検体分のデータを統計処理した結果、 $p=0.02$  で陽性腫瘍により強い MRI シグナルが存在

することが評価された。

### c. 陽性腫瘍中の鉄含有量

担癌マウスに抗体付き磁性体ナノ粒子を投与した後、組織中の鉄量を ICP-MS で測定した。その結果、陽性腫瘍の鉄濃度は陰性腫瘍に比べて約 1.5 倍高いことが明らかとなった。

## D. 考察

### 1. 抗体結合型磁性体ナノ粒子による腫瘍の MRI 検出

今年度は、昨年度までの解析によって解析可能になってきた MRI イメージングを集中的に行った。その結果、統計学的有為差を示すデータとして、陽性腫瘍に強い MRI シグナルを得る事に成功した。また ICP-MS による解析により、確かに陽性腫瘍中に多くの鉄が含有されていることも明らかにした。

近年、蛍光イメージングの著しい進展により、応用性に富んだ解析システムが開発されている。しかし、蛍光イメージングによる深部臓器の解析は不可能であり、さらなる応用性の発展には画期的な技術革新が必須となっている。一方 MRI は、深部臓器の解析が可能であるのに加えて、空間分解能にも優れているため、抗体を組み合わせた active targeting によって腫瘍特異的な検出が可能になれば、臨床的に様々な応用性が期待される。特に近年、抗体医薬が著しい速度で進展しており、抗体による病巣イメージングが可能になれば、抗体医薬の更なる発展も期待できる。しかし、抗体付き磁性体ナノ粒子を用いた MRI 解析に関する報告は必ずしも多くない。その理由の一つに MRI の感度が挙げられる。即ち、MRI の感度は蛍光イメージングの 100 分の 1 程度の感度とされており、究めて高い S/N 比で目的とする組織に抗体が集積することが絶対的な要件となる。

本プロジェクトでは、分担研究者である濱田ら（札幌医科大学）が作成した単クローン抗体を使用している。即ち、彼らはアデノウイルスの膜表面に発現するファイバー蛋白質部分を改変し、抗体 Fc 部位が結合できる Z33 というペプチドを発現させた。さらにアデノウイルス中にリポーター遺伝子を挿入し、このリポーター遺伝子の発現を指標とした抗体スクリーニング法を稼働させた。得

られる抗体は、Native な抗原に対して反応性を示し、かつウイルスが標的細胞に融合することを可能にする。即ち、理想的な標的抗体を選択するための優れたシステムであり、本研究期間中にも多くの有用な抗体が得られている。今回、このシステムで得られた抗体が MRI イメージングを可能にする分子であることが証明されたことから、これまで同方法で得られた抗体が同様の目的に適した抗体であることが期待できる。

## 2. 単クローン抗体による MRI イメージングの改良

本研究では、抗体付き磁性体ナノ粒子の作成に集中してきた。しかし、感度を改善するためにいくつかの改良を行う必要性も考えられる。まず第一に磁性体ナノ粒子への抗体の結合システムが挙げられる。磁性体ナノ粒子一分子に対して、賦与することができる抗体のモル数は 1-2 個である。結合モル数を上昇させる事がより特異性を上昇させるために必要であると思われる。

また、抗体を磁性体ナノ粒子に結合させる際の化学反応によって抗体の抗原に対する結合性が減弱する。

以上の観点から、将来的には蛍光標識プローブと同様に、抗体に MRI プローブを直接賦与するためのプローブの作成が肝要と思われる。

## 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明らかになった。

## 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

- Hoshino S, Konishi M, Mori M, Shimura M, Nishitani C, Kuroki Y, Koyanagi Y, Kano S, Itabe H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol.* 2010 Feb 9. [Epub ahead of print]

- Haga S, Nagata N, Okamura T, Yamamoto N, Sata T, Yamamoto N, Sasazuki T, Ishizaka Y. TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res.* 2010 Mar;85(3):551-5. Epub 2009 Dec 6.
- Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, Kaneko K, Ishizaka Y, Tanaka Y, Sata T, Tokunaga KHIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *J Biol Chem.* 2009 Dec 11;284(50):35060-72. Epub 2009 Oct 16.
- Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Poon RY, Yamashita KStress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res.* 2009 Aug 15;69(16):6438-44. Epub 2009 Jul 28.
- Nakai-Murakami, C., Yuzuru Minemoto, Yukihito Ishizaka. Vpr-induced DNA double-strand breaks: Molecular mechanism and biological relevance. *Current HIV Research*, 7 (2), 109-113, 2009.
- Kenji Kono, Toshiaki Ozawa, Tomohide Yoshida, Fuminori Ozaki, Yukihito Ishizaka, Kazuo Maruyama, Chie Kojima, Atsushi Harada and Sadahito Aoshima. Highly temperature-sensitive liposomes based on a thermosensitive block copolymer for tumor-specific chemotherapy. *Biomaterials*, in press.

## 2. 学会発表

- 中嶋誠司、原田敦史、青島貞人、国領大介、青木伊知男、石坂幸人、河野健司 Gd-DOTA 結合デンドロン脂質の導入による MR 造影機能を付与した温度応答性リポソームの構築、第 25 回日本 DDS 学会学術集会、2009 年 7 月、東京。
- 中嶋誠司、国領大介、青木伊知男、青島貞人、石坂幸人、原田敦史、河野健司、ガドリニウムキレートを有するデンドロン脂質の合成とその導入による MR 造影機能を有する温度応答性リポソームの調製、第 58 回高分子

討論会、2009年9月、熊本.

3. 河野健司、中嶋誠司、原田敦史、国領大介、青木伊知男、青島貞人、石坂幸人、可視化機能と温度応答機能をもつ多重機能性リポソームの設計、第58回高分子討論会、2009年9月、熊本.

4. 中嶋誠司、国領大介、青木伊知男、青島貞人、石坂幸人、原田敦史、河野健司、MRIによるモニター機能を付与したドキシソルビン内包温度応答性リポソームの機能評価、第31回バイオマテリアル学会、2009年11月、京都.

5. 峯本讓、深町勝巳、津田洋幸、濱田洋文、石坂幸人 in vivo イメージングを用いた膵臓がん検出法の開発 第68回日本癌学会学術総会 2009年9月、横浜.

#### 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；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（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

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

分担研究者 村瀬勝俊 名糖産業株式会社 名古屋研究所

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、鉄染色で確認、さらに MRI 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 造影剤として実用化できる可能性が示された。

A. 研究目的

本研究は、微小癌に対する MRI 診断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た。具体的には、分担研究者らが開発した磁性ナノ粒子「CMDM」の表面に、膵臓癌抗体  $\alpha$ PAP2a を結合した「 $\alpha$ PAP2a-CMDM 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。

昨年度までに、CMDM（表 1 に主な物性を示す）と、 $\alpha$ PAP2a 抗体との結合条件を検討したが、15kDa の分子量を有する抗体は CMDM との結合後に容易に脱離しやすいことが判明し、当該年度では、CMDM 表面をコーティングするデキストランの物理的強度を向上させることとした。さらに、結合条件の検討も行い、CMDM 1 粒子に対して 1 分子の  $\alpha$ PAP2a を均一に結合する条件決定を目標とした。

また、対象とする生物検体については、PAP2a 発現腫瘍移植マウスを使用する。

表 1. CMDM（カルボキシメチル デキストランマグネイト）

|     |                               |
|-----|-------------------------------|
| 粒子径 | 40□ 60 nm                     |
| 磁化率 | 0.025□ 0.040 cgs              |
| R2  | 150□ 250 (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、サルの使用は計画しない。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、CMDM をコーティングするデキストランを高分子化すること、及び架橋処理により 3 次元化させることで、物理的強度を向上することが出来た。この結果、結合させた抗体が簡単に脱離することがなく、未結合抗体を除去する精製工程を安定に実施させることができた。

このようにして改良した  $\alpha$ PAP2a□ CMDM 複合体を、膵臓癌移植マウスに投与した結果、陽性腫瘍特異的に集積する様子が蛍光にて再現良く観察することができた。また、鉄染色においても同様の特異的集積が確認できている。目標とする MRI においては、感度が低いという欠点がある中、今年度 6 回実施した内、4 回特異的集積が確認できた。

D. 考察

当該年度の研究の結果、 $\alpha$ PAP2a-CMDM 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、今後の課題と考える。

①目的腫瘍（膵臓癌）の MRI 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、 $\alpha$ PAP2a 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改良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、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た。

#### 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。

#### 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

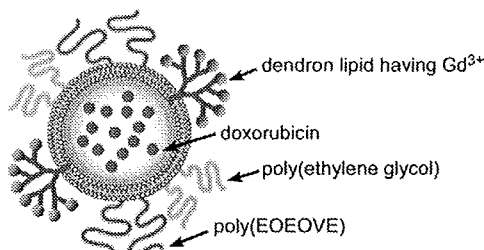
「感温性リポソームの開発と磁性体ナノ粒子のリポソームへの包埋」に関する研究

分担研究者 河野健司 大阪府立大学 工学研究科

**研究要旨** MRIによって体内における分布と腫瘍集積がリアルタイムでモニターでき、しかも温度に高感度に応答して抗癌剤を放出する、可視化温度応答性リポソームの構築を行った。ガドリニウムイオンを多数結合した新規デンドロン脂質を温度応答性高分子修飾リポソームに組み込むと、リポソームの体内挙動を高感度でMRIによって追跡することができた。また、ドキソルビシンを内包させたMRI可視化温度応答性リポソームを、担癌マウス投与し、腫瘍集積後に局所加温することで、腫瘍成長を強く抑制することがわかった。このようなりポソームを用いることで、リポソームの腫瘍集積性の最適化や腫瘍集積量の評価を踏まえて最適化された、精度の高い癌化学治療や患者個人に対応したパーソナル癌化学治療の実現が期待される。

A. 研究目的

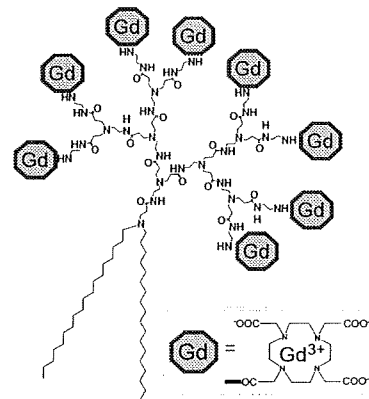
温度応答性リポソームは、体外からの病巣部位の局所加温によって薬物を放出させることができるため、病巣選択的な薬物治療を行うためのDDSとして有用である。また、薬物送達の精度を高めるための新しい機能として可視化機能があげられる。体内におけるDDSの挙動をリアルタイムで追跡することができれば、標的病巣へのキャリアの集積過程や他の臓器、組織へのリポソームの分布状況を把握することで精度の高い薬物治療が期待できる。我々はこれまでに、高い血中滞留性を示すポリエチレングリコール修飾リポソームに温度応答性高分子、ポリ[(2-エトキシ)エトキシエチルビニルエーテル] (EOEOVE) を導入することによって、血中滞留性と温度応答性を併せ持つリポソームを作製し、抗癌剤（ドキソルビシン、DOX）の送達システムとしての機能について研究を進めてきた。本年度は、このリポソームにMRIによる検出が可能なガドリニウムキレートを多数担持したデンドロン脂質を組み込むことで、温度応答機能と可視化機能を併せ持つリポソームの構築について検討した（図1）。



**Figure 1. Design of multifunctional liposome for anticancer drug delivery.**

B. 研究方法

ポリアミドアミン(PAMAM)-G3 デンドロン脂質 [2] に Gd-DOTA を結合することで、G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub>を合成した（図2）。また、エトキシエトキシエチルビニルエーテル $\square$  オクタデシルビニルエーテル (EOEOVE-ODVE) ブロック共重合体、G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub>、卵黄ホスファチジルコリン、コレステロール、PEG(2000)脂質の混合薄膜を水和させることで多重機能性リポソームを調製した。腫瘍モデルマウスは、BALB/Cヌードマウスに Colon26 細胞（マウス大腸がん由来）を移植、成長させることで得た。



**Figure 2. Structure of PAMAM G3 dendron lipid having Gd chelates, G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub>.**

C. 研究成果と考察

Gd-(DOTA)、G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub>、G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub> 含有リポソームの緩和度は、それぞれ 4.6、6.2、5.5 (mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) と求められた。G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub> を含有させることでリポソームに MR 造影能を付与できることが分かる。



PEG 修飾温度応答性リポソームからの DOX 放出挙動に及ぼす G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub> 添加の影響について検討した。PEG 脂質と EOEOVE-ODVE 共重合体で修飾したリポソームはこの高分子の転移温度以上で DOX の放出を促進した。また、このリポソームに G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub> を含有させてもその温度応答挙動にほとんど影響しないことがわかった。

皮下腫瘍を持つマウスにこのリポソームを投与し、MRI を用いてその体内動態を追跡した。腫瘍部位におけるシグナル強度は時間と共に徐々に増大した (図 3)。このことは時間とともにリポソームが腫瘍に集積することを示す。粒径の異なるリポソームを、100 nm および 50 nm のフィルターを用いてエクストルーション法によって作製し、その腫瘍集積性を比較した (図 4)。100 nm のリポソームは、より腫瘍に集積しやすいことが分かる。

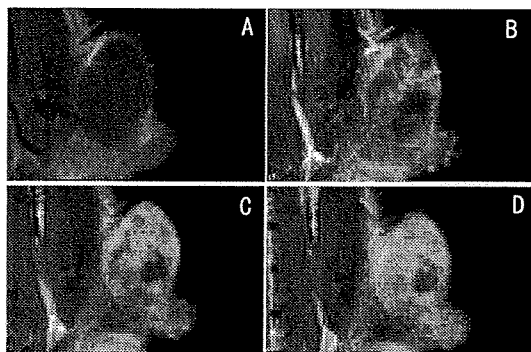


Figure 3. T1-weighted images of tumor of BALB/c nude mouse at different time points before (A) and 1h (B), 5h (C) and 8h (D) after injection of liposome containing 10 mol% G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub>.

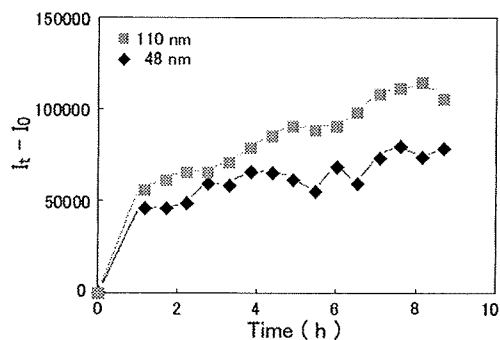


Figure 4. Time-course of MR signal intensity increase in tumor after administration of liposome containing G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub> with diameters of 100 nm (squares) and 50 nm (diamonds).

一方、リポソームの腫瘍集積挙動に及ぼす腫瘍

体積の影響を調べた (図 5)。マウスに大きさの異なる腫瘍を作製し、100nm の粒径のリポソームを投与した。その結果、体積の大きな腫瘍に対して、リポソームはより高い集積性を示した。体積の大きい腫瘍はより多くの毛細血管をもち、リポソームが効率よく集積したものと考えられる。

さらに、このリポソームの腫瘍抑制効果を調べた (図 6)。DOX を内包した温度応答性 MR 可

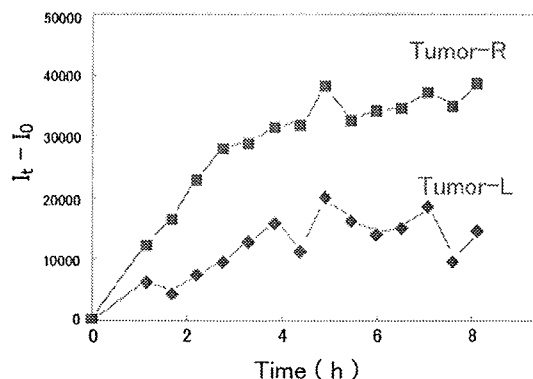


Figure 5. Time-course of MR signal intensity increase in tumors with different sizes after administration of liposome containing G3-(Gd-DOTA)<sub>8</sub> with diameters of 100 nm. Volumes of tumors in left leg and in right leg were 140 and 240 mm<sup>3</sup>, respectively.

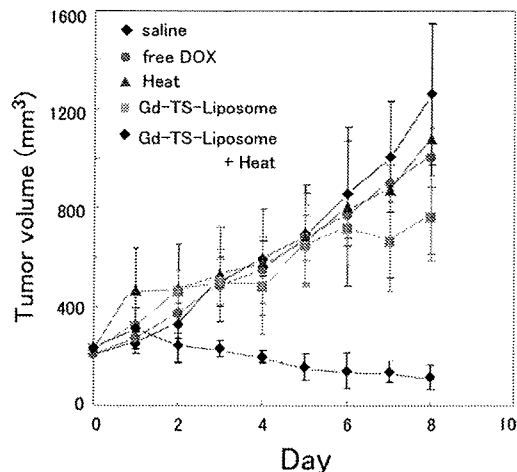


Figure 5. Time-course of tumor growth after injection of saline, free DOX, or DOX-loaded temperature-sensitive liposomes containing Gd-dendron lipid with or without local heating.

視化リポソームを投与し、8時間後に 44℃ で 10 分間、局所加温をした場合、腫瘍成長は強く抑制された。

## E. 結論

本研究で開発した多機能型リポソームは MRI によって、その体内挙動をリアルタイムで追跡し、しかも、局所加温によって腫瘍成長を抑制することができる。このようなリポソームを用いることで、リポソームの腫瘍集積性の最適化や腫瘍集積量の評価を踏まえて最適化された、精度の高い癌化学治療や患者個人に対応したパーソナル癌化学治療の実現につながるものと期待される。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Eiji Yuba, Chie Kojima, Atsushi Harada, Tana, Shinobu Watarai, Kenji Kono, "pH-Sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a carrier of antigenic proteins for activation of cellular immunity", **Biomaterials**, **31**, 943-951 (2010).

Chie Kojima, Kouhei Yoshimura, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Kenji Kono, "Synthesis and characterization of hyperbranched poly(glycidol) modified with pH- and temperature-sensitive groups", **Bioconjugate Chem.**, **20**, 1054-1057 (2009).

Eiji Yuba, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Kenji Kono, "Carboxylated hyperbranched poly(glycidol)s for preparation of pH-sensitive liposomes", **J. Control. Release**, in press.

### 2. 学会発表

中嶋誠司、原田敦史、青島貞人、国領大介、青木伊知男、石坂幸人、河野健司 Gd-DOTA 結合デンドロン脂質の導入による MR 造影機能を付与した温度応答性リポソームの構築、第 25 回日本 DDS 学会学術集会、7 月 3 日 4 日、東京。

中嶋誠司、国領大介、青木伊知男、青島貞人、石坂幸人、原田敦史、河野健司、ガドリニウムキレートを有するデンドロン脂質の合成とその導入による MR 造影機能を有する温度応答性リポソームの調製、第 58 回高分子討論会、9 月 16 日 18 日、熊本。

河野健司、中嶋誠司、原田敦史、国領大介、青木伊知男、青島貞人、石坂幸人、可視化機能と温度応答機能をもつ多重機能性リポソームの設計、第 58 回高分子討論会、9 月 16 日 18 日、熊本。

中嶋誠司、国領大介、青木伊知男、青島貞人、石坂幸人、原田敦史、河野健司、MRI によるモニター機能を付与したドキシソルビシン内包温度応答性リポソームの機能評価、第 31 回バイオマテリアル学会、11 月 17 日 18 日、京都。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「高磁場 MRI による癌病変描出法の開発」に関する研究

分担研究者 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・チームリーダー

**研究要旨** MRI による微小癌診断・治療システムの改善を図るため、優れた磁性体ナノ粒子およびナノキャリアを検討し、7 テスラ高磁場 MRI により画像診断における特異性、解像度及び感度の改善を図る。2009 年度は、深部腫瘍モデルについて、MRI による温度イメージングと高周波 RF パルスによる加温を同時に行うシステムを実現すると共に、各臓器へのリポソームの集積を定量化した。さらに、石坂らが開発した磁性体ナノ粒子による腫瘍への標的化に関しても、横緩和時間を正確に計測する RF コイル開発とパルスシーケンスの最適化を行い、単クローン抗体・磁性体ナノ粒子の各腫瘍への集積を定量的に評価することに成功した。本研究により、感温性リポソームおよび磁性体ナノ粒子の 2 つの異なる担体を用いて、高磁場 MRI によりがん病変を高い空間分解能かつ定量的に計測し、評価するシステムが達成された。

A. 研究目的

本プロジェクトでは将来の先端医療の実現に向け、2 つのシステムを実現する。即ち、「単クローン抗体・磁性体ナノ粒子と高磁場 MRI による微小病変の高解像度画像化」および「感温性リポソームによる局所 DDS の臨床応用に向けた基盤整備」である。本分担では、1) 石坂らが合成した単クローン抗体・磁性体ナノ粒子を高磁場 MRI により、高い空間分解能で、非侵襲的かつ定量的に評価する、2) 河野らと共同で開発した感温性リポソームと用いて、皮下ならびに深部移植腫瘍において、その薬剤動態と薬剤放出を可視化し、温度計測を含む包括的な計測システムを確立することにある。

2009 年度は、深部腫瘍モデルについて、MRI による温度イメージングと高周波 RF パルスによる加温を同時に行うシステムを実現すると共に、各臓器へのリポソームの集積を定量化した。さらに、石坂らが開発した磁性体ナノ粒子による腫瘍への標的化に関しても、横緩和時間 (T2) を正確に計測する RF コイル開発とパルスシーケンスの最適化を行い、単クローン抗体・磁性体ナノ粒子の各腫瘍への集積を定量的に評価した。

B. 研究方法

a. 温度感受性リポソームに関する研究)

体内深部領域での加温と放出をモニターするために、局所加温を目的とした高周波 RF 表面コイルを作成し、RF パルスの連続照射により加温を行うと同時に、MRI の撮像および温度イメージングの取得を行った。7 テスラ (T) 水平型 MRI (JASTEC, Bruker 社製) を用い、マウスの体幹部専用送受信 RF コイルを開発し、マン

ガン造影剤に最適化されたパルスシーケンスを使用した。また、リポソームの脂質膜内に封入された蛍光色素 Rhodamine を追跡するために、蛍光イメージング装置 (IVIS Lumina, ジェノジェン社製) を使用し、各臓器における長期動態を計測した。

背筋移植モデルとして BALB/c nude を開腹し、腹膜に近い位置の背筋内に開腹し、背筋部に colon-26 細胞株  $2.0 \times 10^5 / 10 \mu\text{l} \times 2$  箇所もしくは、背中側から背筋に  $1.0 \times 10^5 / 20 \mu\text{l} \times 2$  箇所投与し、8 日後に MRI 内部で複合造影剤の投与を行った。投与 12 時間後に、光ファイバーによる温度プローブを腫瘍内に留置し、RF 照射による  $42.5^\circ\text{C}$  加温を実施し、連続的に T1 強調画像および gradient echo による温度マップを取得した

b. 磁性体ナノ粒子に関する研究)

動物実験の詳細は、石坂らの報告に譲るが、高磁場 MRI において、in vivo での正確な横緩和時間を計測するために、1) 均一な RF 照射が行われるコイル内の計測領域の特定、2) 体動の抑制のための固定法の改善、3) RF パルスの profile の改善を行った。

動物実験として、BALB/c nude (20g) の左右の上肢に異なった特徴を持つ腫瘍を皮下移植し、in vivo にて微粒子造影剤 (900 ug Fe/mouse) の投与前および投与 24 時間後の解剖学的画像と集積を反映する T2 を定量的に計測し、個体間比較を行った (n = 10)。また、ネクロシスが生じたなど、非特異的な集積を評価する為に、投与前に Gd-DTPA を使用した血管漏出の評価も、全個体に対して行った。

(倫理面への配慮) 全ての実験は、放射線医学総合研究所が定める実験倫理委員会の承認を受け、動物に苦痛が生じないよう麻酔下にて実施した。

### C. 研究成果

a. 温度感受性リポソームに関する研究 BALB/c nude 担癌マウスにおいて、MRI による温度マップを取得しながら、加温を行うシステムが開発された。複合造影剤の投与前と比較し、 $T_1$  強調 MRI の信号強度は、温度マップにより、 $41^{\circ}\text{C}$  以上の上昇が生じた領域において、上昇した。全身状態は大半の実験動物で良好であった。

また、蛍光イメージングにより腫瘍、肝臓、腎臓の各臓器における薬剤集積が評価され、薬剤投与後 12-24 時間が、最も腫瘍での集積が上昇し、肝臓での集積が低下することが観察された。

b. 磁性体ナノ粒子に関する研究

サンプル列を使用して、均一な RF 照射が行われる空間領域を特定し、その範囲内に計測対象動物が入るように、位置固定を行った。また、体幹部専用の固定具を作成し、体動を改善した。さらに、再焦点パルスの周波数とパルス波形を最適化した。その結果、マウスの下肢に移植された皮下腫瘍モデルにおいて、安定した  $T_2$  の計測が可能となった。

動物実験として、左右の上肢に異なった特徴を持つ腫瘍を皮下移植し、*in vivo* にて投与前、投与後、および投与 24 時間後の  $T_2$  を定量的に計測した。抗体に対して特異的に結合すると考えられる腫瘍において、より  $T_2$  の短縮が顕著に観察された。

### D. 考察

温度感受性リポソームを用いた加温をトリガーとした薬剤放出システムを実現するためには、安全かつ低侵襲な加温方法の確立が必要である。また、投与後、どの時点で加温すれば他臓器への副作用が最小となるかを判定する必要がある。本研究により、MRI 内部での加温の実現および断層温度マップの同時計測が実現され、MRI による温度マップを取得しながら、加温を行う安全なシステムが開発されたと言える。また、加温の時期としては、本複合剤においては、12-24 時間が、副作用を最小化すると推定された。ナノ粒子は、粒径や表面修飾など様々な条件によって、腫瘍集積性、肝臓・

腎臓での集積性が変化する。重要な事は、本研究で開発された手法により、今後開発される微粒子を使った DDS において、放出に最適となる時期を特定し、最適化することが可能になったことである。これにより、臨床応用も含めて、最も苦痛が少なくなる薬剤放出タイミングを、明確なデータに基づいて、患者の個々の状態に応じて提示できると考えられる。酸化鉄微粒子を用いた研究では、抗体による動的標的化の可視化に成功した。通常の MRI では、定量的な評価が困難であるため、薬剤を投与して 24 時間後の集積を評価することは困難であった。本研究では、 $T_2$  の時定数により定量マップを作成することで、長時間経過した後や異なる個体間でも薬剤集積の評価が出来ることが示された。さらに、従来ばらつきが大きかった  $T_2$  の計測を安定化させる事に成功した。本研究で開発された手法は、酸化鉄など陰性造影剤を使用した DDS の追跡に対して、薬剤がどの程度集積したかを追跡する定量評価に有用であると考えられた。

### E. 結論

高精度な温度感受性を持つリポソームを使用して、MRI と蛍光の両方のモダリティで使用可能な複合造影剤の作成および動物実験における DDS の可視化に関する有用性が示された。この造影剤は、腫瘍集積性・MRI 感受性・蛍光特性・抗腫瘍・温度感受性による薬剤放出という 5 つの機能を併せ持ち、その過程が全て可視化可能な点に大きな特長を持つ。さらに、本研究により、MRI 内部での加温の実現および断層温度マップの同時計測が実現され、MRI による温度マップを取得しながら、加温を行う安全なシステムが開発された。また、投与後 12-24 時間後に加温することで、腫瘍に対する十分な薬剤効果を保ちつつ、肝臓における薬剤放出を最小化することができる事が示された。また、抗体による酸化鉄微粒子の腫瘍への標的化を実現し、 $T_2$  の定量的マッピングにより、投与後、長期間の後に生じる薬剤集積の定量的比較が可能となった。これらの経過により、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が達成されたと考えられる。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表