

2009/2014B

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19～21年度 総合研究報告書

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 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	-----	11
2. 「磁性ナノ粒子の開発」に関する研究		
村瀬勝俊	-----	16
3. 「感温性リポゾームの開発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	-----	18
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	-----	23
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	-----	29
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	-----	35
7. 「癌化初期細胞のイメージングに向けた基盤研究」に関する研究		
山下克美	-----	40
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	-----	45
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	52

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
総合研究報告書

「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開始した。これを実現するため、磁性体ナノ粒子の改良、ナノ粒子への単クローン結合法の確立、温度応答性リポソームの開発、MRI 造影剤付加型温度応答性リポソームの創成及び優れた標的能力を持つ単クローン抗体の作成を進めた。また、膵臓がん動物モデルの開発と応用を並行して行い、難治性腫瘍である膵臓がんに対する新規治療法開発の基盤を整備した。3 年間の研究成果として、抗体結合型磁性体ナノ粒子を用いて標的腫瘍の MRI 検出が可能になるとともに、ガドリニウム標識型温度応答性リポソームを創成した。このリポソームを用いて、抗癌剤の局所投与による抗腫瘍効果の誘導や、局所での薬剤放出のリアルタイムモニタリングが可能になった。現在、MRI 診断下に高周波焦点照射による非観血的外科手術が可能になっている。本課題で開発された技術をこのようなシステムと組み合わせる事によって、新しい治療法開発の可能性が広がる。

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）

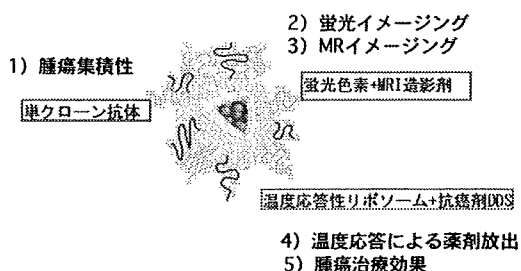
山下克美（金沢大学薬学部、准教授）

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に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。

図1. AIOナノ粒子に必要な5つの機能



即ち、図1に示す様な「腫瘍集積性・MRI感受性・蛍光特性・抗腫瘍性・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た。これを達成するための具体的な研究内容として、

- a. 磁性体ナノ粒子と単クローン抗体を用いたMRI画像化（村瀬、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。

村瀬と研究代表者は、優れたMRI用造影剤として carboxy-methyl dextran magnetite (以下CMDM) を創成した（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画像を得ることを第一の目標とした。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。

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の開発を目的とした。そして、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を行っ

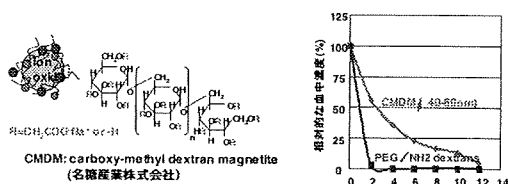
た。

## B. 研究方法

### a. 抗体結合型 CMDM 作成方法の確立

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。同様の磁性体ナノ粒子が多種作成されているが、CMDM はナノ粒子の表面がマイナスに荷電しているため、細胞への非特異的取り込みが少なく、生体内での半減期も長い点が優れている (図 2)。

図2. 臓器への非特異的取り込みの少ない磁性体ナノ粒子



まず第一の目標として、この CMDM に抗体を効率良く架橋する技術を開発した。しかし、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究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。また、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定するため、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 種類を試み、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、最適な結合方法を確定した。

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) 法で得たクローンを用いた。特に本研究課題で使用した抗体は膵臓癌症例の内 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。

投与後数時間から 24 時間で、抗体が陽性腫瘍により多く集積することが分かった。そこで投与後 24 時間後の腫瘍組織を MRI 解析に供すると共に、同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 スードマウスに 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を収集した。

#### 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精力的に行った。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あり、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-MOHI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)

マウス及びラットを用いる実験では、各研究施設内の動物実験指針を遵守した。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・説明同意書を作成し、札幌医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会で許可を受けた。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日付けで承認を受けた。

#### C. 研究結果

##### a. 磁性体ナノ粒子への抗体結合方法の改良

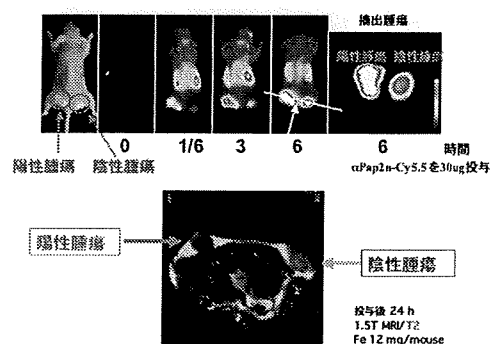
CMDMをコーティングするデキストランの高分子化及び、架橋処理により3次元化させることで、物理的強度を向上することが出来た。この結果、結合させた抗体が簡単に脱離することがなく、未結合抗体除去後の回収率も究めて良好となった。

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(図3)。

図3. 抗体による光イメージングと磁性体ナノ粒子によるMRI検出

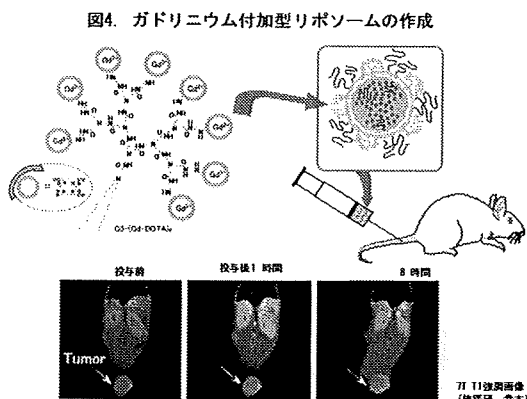


その結果、投与後 10 分で陽性腫瘍特異的に抗体の集積傾向を認め、3 及び 6 時間後には明瞭なシグナル強度の差が認められた（前頁図 3）。特に、膵臓癌細胞株の腫瘍塊はコントロール腫瘍と比較してサイズが小さかったが、強い蛍光シグナルが得られた。一方、コントロール IgG 投与群では、コントロールと陽性腫瘍群間にシグナルの差は認めなかった。また腫瘍塊を取り出し、周囲の結合組織を除去した後に、蛍光イメージング解析を行ったところ、より明瞭な左右差が検出された（図 3、右上）。

次に 1.2 mg 鉄相当の抗体付き CMDM を投与後、図 3(上図 6 時間目の図)に示す様な方向から MRI 解析を行った。その結果、陽性腫瘍に T2 強調画像で鉄が集積している様子が検出され（図 3 左下図）た。さらに 7T-MRI による解析を精力的に進め、独立した 10 個体の担癌マウスを用いた撮像解析を行ったところ、危険率  $P < 0.05$  で有意に陽性腫瘍に多くの鉄が集積する事が分かった。さらに ICP-MS 解析を行い、陽性腫瘍組織中の鉄含有量が対照検体と比較して、約 1.5 倍の鉄を含むことも明らかにできた。以上の結果から、確かに抗体付き CMDM が標的腫瘍中に集積していることが明らかになった。

### c. 新たな温度応答性リポソームの作成

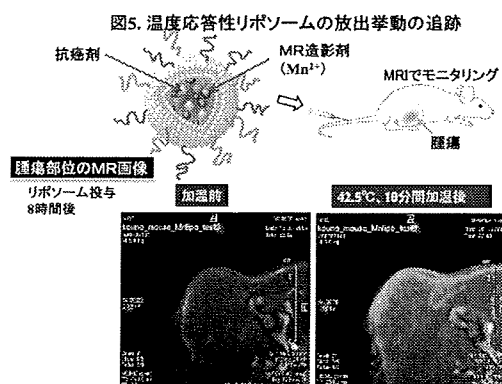
ガドリニウム脂質を 10% 含有した感温性リポソームを作製し、担癌マウスに投与し、その体内動態をモニターすることが可能になった。即ち、リポソームの投与後腫瘍における MR シグナルが強くなり、リポソームが集積していることが示唆された（図 4）。



また、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、リポソームの腫瘍

への集積過程を追跡した。その結果、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の集積量が増大するが、その後一定となり、投与後 8 時間でも明瞭なシグナルが残存することが分かった。一方、肝臓や腎臓では投与 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明らかになった。

さらに、腫瘍に温度応答性リポソームを腫瘍組織に集積させた後、外部から加温誘導することでリポソームが融解し、内部に包埋された MRI 造影剤であるマンガンが組織中に放出される様子をリアルタイムで MRI でモニターすることに成功した（図 5、右下図、シグナル）。



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. A10 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。

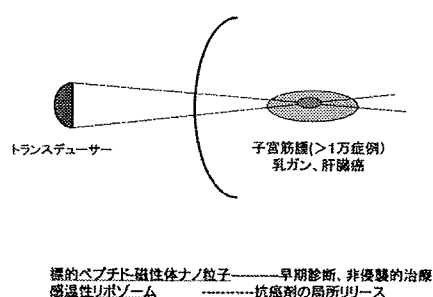
一方、温度反応性リポソームに MRI プローブとしての Gd-DOTA を付与した新たなナノデバ

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思われる。

近年、MRIにより病変を検出しながら、高周波照射を用いて患部温度を上昇させることで、温熱加療を可能にする医療機器(MRg-FUS: MR guided focused ultrasound surgery)が開発された(図6)。

図6. MRI-guided Focused Ultrasound Surgery  
—MRIと焦点照射による非観血的外科手術—



そして、この医療機器の有効性が立証されたことから米国 FDA により臨床での使用が認可された。本機器が一般化することで、今後患者 QOL の大幅な改善が期待される。しかし、このシステムは MRI の単純画像に依存して病変部位を診断していることや子宮筋腫等の比較的大きな病変を対象にしてきたために照射野が広い事、また加療システムが温熱にのみ依存していることなど、繊細でかつ多角的な治療法を行うためには、今後いくつかの点を改善することが必要である。本研究課題では、抗体を結合させた磁性体ナノ粒子等を用いて、特異的な画像を取得する一方、温度で融解するリポソームと抗癌剤を使用することで、加温誘導による局所 DDS を可能にするためのシステム開発が可能になった。このシステムと MRg-FUS を融合させることで、患者の負担がより軽減された新たな癌治療法の可能性が広がるものと期待される。また、抗体付き磁性体には MRg-FUS のナビゲーターとしての機能も期待できる。

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及び認識抗原が多く同定できた。この3年間で樹立した抗 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、代表的な膵臓がん細胞株 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できる。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。

膵臓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を開始した。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。これに対して本課題を通して開発された抗体は優れた標的性を有していることから、様々な分野への応用性が期待される。

## 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に向けた諸条件が整備された。

## F. 健康危険情報

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た。

## 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-guanyl 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 wntless 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.
  25. 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.
  26. Kawai Y, Aoki I, Umeda M, Higuchi T, Kershaw J, Higuchi M, Silva AC, Tanaka C. In vivo visualization of reactive gliosis using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* 2010 Feb 15;49(4):3122-31.
  27. Inoue Y, Aoki I, Mori Y, Kawai Y, Ebisu T, Osaka Y, Houry T, Mineura K, Higuchi T, Tanaka C. Detection of necrotic neural response in super-acute cerebral ischemia using activity-induced manganese-enhanced (AIM) MRI, NMR in Biomedicine. 2010 Apr;23(3):304-12.
  28. Aung W, Hasegawa S, Koshikawa M, Obata T, Ikehira, Furukawa T, Aoki I, Saga T. Visualization of in vivo electroporation-mediated transgene expression in experimental tumors by optical and magnetic resonance imaging. *Gene Therapy* 2009 Jul;16(7):830-9. Epub 2009 May 21.
  29. Matsumoto K, Nagata K, Yamamoto H, Anzai K, Aoki I. Visualization of Free Radical Reactions in a Aqueous Sample Irradiated by 290 MeV Carbon Beam. *Magnetic Resonance in Medicine.* 2009 May;61(5):1033-9.
  30. Sawada K, Sun XZ, Fukunishi K, Kashima M, Sakata-Haga H, Tokado H, Aoki I, Fukui Y. Developments of sulcal pattern and subcortical structures of the forebrain in cynomolgus monkey fetuses: 7-tesla magnetic resonance imaging provides high reproducibility of gross structural changes. *Brain Struct Funct.* 2009 Feb 12.
  31. Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto K, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I. Nitroxyl Radicals for Labeling of Conventional Therapeutics and Non-Invasive Magnetic Resonance Imaging of Their Permeability for Blood-Brain Barrier: Relationship between Structure, Blood Clearance, and MRI Signal Dynamic in the Brain. *Molecular Pharmaceutics.* 2009 Mar-Apr;6(2):504-12.
  32. 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 (Camb).* 2009 Jan 7;(1):53-5. Epub 2008 Nov 13.
  33. 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.* 2008 Jun;19(6):1135-42. Epub 2008 May 22.
34. Bakalova, R., Zhelev, Z., Aoki, I., Kanno, I. Multimodal and biocompatible quantum dots - strategy of design. *Nature Photonics*, 2007, 1(9): 487-489
35. Silva AC, Lee JH, Wu CW, Tucciarone J, Pelled G, Aoki I, Koretsky PA. Detection of cortical laminar architecture using manganese-enhanced MRI. *J Neurosci Methods.* 2007 Jan 30;167(2):246-57. Epub 2007 Sep 2.
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、中釜斉：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、中釜斉：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、中釜斉：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、中釜斉、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、中釜斉：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、中釜斉、山下克美：JNK誘発性SCF<sup>btCP</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、中釜斉、山下克美：Sequence requirement for degradation of Cdc25B by SCF<sup>btCP</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
15. 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.*
16. 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.*
17. 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.
18. 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
  19. 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
  20. 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
  21. 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
  22. 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
  23. 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
  24. Multimodal Thermo-Sensitive Polymer-Modified Liposome for Visualization and Treatment of Disseminated Cancer. Daisuke Kokuryo, Hiroyuki Yoshida, Kenji Kono, Iwao Kanno, Ichio Aoki. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2009*; 17: 894.
  25. Quantitative Assessment of Prenatal X-Ray Exposure Using Longitudinal Gadolinium-, Manganese-Enhanced and Perfusion MRI in Neonatal Rats. Shigeyoshi Saito, Kazuhiko Sawada, Xue-Zhi Sun, Tetsuya Suhara, Iwao Kanno, Ichio Aoki. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2009*; 17: 1261.
  26. Evaluation of Hippocampal Degeneration After Prenatal Radiation Exposure Using Manganese-Enhanced MRI (MEMRI). Shigeyoshi Saito, Xue-Zhi Sun, Kazuhiko Sawada, Tetsuya Suhara, Iwao Kanno, Ichio Aoki. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2009*; 17: 1292.
  27. Signal Source in Heavily Diffusion-Weighted Functional MRI. Daigo Kuroiwa, Hiroshi Kawaguchi, Jeff Kershaw, Atsumichi Tachibana, Joonas Autio, Masaya Hirano, Ichio Aoki, Iwao Kanno, Takayuki Obata. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2009*; 17: 1571.
  28. Diffusion-Weighted TE-Dependent FMRI Signal in Rat Somatosensory Cortex at 7 T. Joonas Arttu Autio, Jeff Kershaw, Takayuki Obata, Sayaka Shibata, Daigo Kuroiwa, Iwao Kanno, Ichio Aoki. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2009*; 17: 1572.
  29. Daisuke Kokuryo, Seiji Nakashima, Kenji Kono, Iwao Kanno, Ichio Aoki. Visualization of Drug Accumulation and Release in a Disseminated Mouse Tumor Model using Multimodal Thermo-sensitive Polymer-modified Liposome. 2009 World Molecular Imaging Congress, 697, Montreal, Canada, 23-26 September 2009
  30. Daisuke Kokuryo, Yuichi Kimura, Takayuki Obata, Taiga Yamaya, Hiroo Ikehira, Ichio Aoki, Iwao Kanno. Bridge Capsule: Holding Fixture to Improve Reproducibility and

Registration During Longitudinal Multimodal Imaging. 2009 World Molecular Imaging Congress, 697, Montreal, Canada, 23-26 September 2009

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

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開始した。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い、平成 20 年度では抗体結合型 MRI プローブの安定化を試みた。そして平成 21 年度では、このプローブを用いて 7 テスラ高磁場 MRI で標的腫瘍の MRI 解析に成功した。本研究成果は単クローン抗体を用いた active targeting の基盤技術となるもので、同研究班分担研究者が推進する温度応答性リポソームとの癒合に依る新たな医療技術の開発に資するものである。

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 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 ナノデバイスの作成と有用性の検討 である。

当該分担研究課題として、上記項目 1 を行い、項目 2 と融合させる事で、最終的に AIO ナノデバイスの作成を試みる。

B. 研究方法

a. 磁性体ナノ粒子の改良 (平成 19 年度)

それまで使用されてきた磁性体粒子は MRI 解析に適してはいるが、血液中の半減期が短いという難点が認められた。そこで肝臓などへの非特異的な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。まず、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径を設定した。

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 (平成 19 年度)

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した。撮像は、国内有数の水平型 7 テスラ (T) 実験用 MRI 装置に、100  $\mu$ 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した。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 (平成 19-21 年度)

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、磁性ナノ粒子表面に分担研究者である濱田らが開発した膵臓癌抗体  $\alpha$  PAP2a を結合させた。「 $\alpha$  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)を適切化し、腫瘍標的能力に優れた MRI 造影剤を開発する。初年度である当該年度では種々の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、その方向付けを行った。

一方、標的腫瘍は活性型 H-ras 遺伝子でトランスフォームさせた NIH3T3 細胞(a1-1)に PAP2a cDNA 発現ベクターを導入し、外来遺伝子を発現するクローンを樹立した。対照腫瘍細胞は a1-1 にコントロールベクターを導入して得た細胞株を使用した。これらをヌードマウスの背部にそれぞれ  $5 \times 10^5$ - $10^6$  個移植した。左背部には標的腫瘍細胞、右背部にはコントロール腫瘍細胞を移植した。10 日から 2 週間後に形成される皮下腫瘍の大きさを観察し、左右差が少ない個体を選別して、撮像実験に供した。

蛍光標識した抗体によるイメージングは、浜松フォトニクス社製 CCD カメラを使用して行った。C5.5 で標識した抗体または CMDM を担癌マウスに投与後、経時的に蛍光シグナル強度をモニターした。

d. 磁性体ナノ粒子の改良 (平成 20 年度)

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究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の長さを変化させることにより、安定化を行った。

e. 単クローン抗体と高磁場 MRI を用いた高分解能 MRI 画像化(平成 21 年度)

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、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、陽性腫瘍に有意なシグナルが得られる時間帯を把握し、その時間帯を狙って MRI 解析を行った。検出は、分担研究者である青木(放医研)が 7T-高磁場 MRI を用いて行った。腫瘍中の組織の MRI に与える影響を最小限にするため、腫瘍径の大きさを 5 mm 前後とし、抗体プローブを投与する前に、ガドリニウム(Gd)投与後の T1 強調画像で、対照腫瘍と標的腫瘍論文化に必要なデータとして、10 検体以上のデータを集中的に収集し、得られたデータを統計解析した。

1. 5T-臨床機を用いた解析は、徳島大学歯学部教授菅田栄一博士の研究協力の元に行った。

また、国立国際医療センター志村まり室長及び東レリサーチセンター無機分析化学研究部室長 飯田豊氏の協力により、腫瘍中に集積した鉄含有量を Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS 解析)で定量した。

(倫理面への配慮)

本研究に関連する遺伝子組み換え実験及び動物実験は、それぞれ所内のバイオセーフティー委員会及び動物実験管理委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

a. MRI 用プローブの改良と最適化 (平成 19-20 年度)

平成 19 年度当初、抗体付加型磁性体ナノ粒子は究めて不安定で、調製後翌日にはほとんどの抗体が磁性体ナノ粒子から遊離していた。そこで、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の増強を試みた。その結果、4 度-三週間の保存でも 90%以上の抗体が磁性体ナノ粒子に結合性を示すプローブの作成に成功した。

b. PAP2a 蛋白質を標的分子とした *in vivo* イメージング (平成 20-21 年度)

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。

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。

第一の改善点として、CMDM の磁性強度の増強の必要性が考えられた。CMDM の改良を分担研究課題とする名糖産業は CMDM の合成条件を改良し、従来の磁性ナノ粒子に比べ、約 2 倍の緩和能力 (R2) を有する CMDM を作成することに成功した。(表 1)。

表 1. 改良 CMDM

	従来	改良後
粒子径	50-60 nm	
R2	70-100	150-200
R1	15-20	30-40

この CMDM に抗体を架橋した MRI プローブを用いて集中的に MRI 撮像実験を行った。900  $\mu$ g Fe/20g BW 相当量の抗体プローブを尾静脈から投与し、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。

さらに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 1.5 倍高いことが明らかとなった。

#### 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平成 20 年度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、平成 21 年度に 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。

#### D. 考察

##### a. 抗体結合型磁性体ナノ粒子の機能性の証明 単クローン抗体による標的イメージング

本分担研究の研究成果として、抗体付き磁性体ナノ粒子を用いた in vivo イメージングが可能になった。 $\alpha$ 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あり、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。また、磁性体ナノ粒子の特性及び磁性強度の改善も成功の原因として挙げる事ができる。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る。実際、 $\alpha$ PAP2a 以外の抗体について蛍光標識イメージングが可能になったことから、本技術は様々な単クローン抗体に応用可能であることが期待される。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。

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、20-30%であり、MRIプローブとして特異性を向上させるためには、フリーの抗体を除去する必要性が考えられる。一方、抗体が結合していないCMDMを単独で投与すると、腫瘍組織に認められるEPR効果によって腫瘍組織に集積するため抗体で得られるシグナル強度が減弱する可能性も危惧される。

## 2. 本研究成果のプロジェクト全体における位置づけ

難治性腫瘍である膵臓がんに対して新規診断法や治療法を開発することを目標に本プロジェクトでは、抗体とナノ粒子を融合させた新たなシステムの開発を目指してきた。特に、空間分解能に優れたMRIによる腫瘍同定が可能で、かつ外部からの物理的な腫瘍に対して active targeting を行いながら薬剤を放出可能なオールインワンデバイスの作成に向けた試みである。

本分担研究課題の成果として抗体付きナノ粒子の機能性を生体内で証明できた事は、様々な応用が可能になることを強く示唆する。また、今年度河野らとともに新しい温度応答性リポソームの創成も可能になり、抗体との融合による新たな機能性の広がりが期待される。

## 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を得た。

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分かった。

## 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

1. 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. 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]
3. 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.
4. 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.
5. 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.

### 2. 学会発表 なし

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、2009年7月、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、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、2009年11月、  
京都。

5. 峯本譲、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

【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」

【出願番号】2008 3 7 PCT 出願済み

##### 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）  
総合研究報告書

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による検出可能な性質を有し、且つ生体安全性の高い磁性ナノ粒子に、膵臓癌特異的抗体を結合した「抗体-磁性ナノ粒子複合体」を作成した。この複合体を、膵臓癌モデル細胞を移植したマウスに投与した結果（in vivo）、目的の膵臓癌に特異的集積する様子を蛍光および鉄染色、さらにはMRIで確認することができた。これにより、本複合体が癌腫特異的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、従来、効果的な診断方法のない微小癌に対して、安全なMRIによる診断システムを作成することを目的とする。即ち、癌に特異的な結合能を有する抗体と、MRIによる検出が可能な磁性ナノ粒子とを組み合わせることにより、標的癌を特異的に検出することができ、早期に癌部位を検出できるシステムの開発を目指すものである。

B. 研究方法

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。

$\alpha$ PAP2aの結合量としては、CMDM1粒子に対して1分子を均一に結合することを目標に設定した。

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こととした。さらに有効性が確認できれば、膵臓癌

移植ラットにステップアップしていくこととした。

（倫理面への配慮）

特に考慮すべき事項なし。

C. 研究結果

初年度（H19）は、主に $\alpha$ PAP2aとCMDMの結合方法について検討した。その結果、CMDM表面のカルボキシル基にジアミノヘキサンを結合することにより、スペーサー且つアミノ基導入の両方を可能とする様式を開発した。これにより、 $\alpha$ PAP2aのカルボキシル基と選択的にアミド結合することにより、活性部位が損なわれない結合方法が可能となった。

H20年度は、CMDM本体の改良を行った。即ち、MRI検出能を高上させる為に、磁性を高上させる検討を行った。CMDMの合成条件を改良した結果、従来の磁性ナノ粒子に比べ、約2倍の緩和能力（R2）を有するCMDMを作成することが出来た。（表1に改良CMDMの主な物性を示す）。

表1. 改良CMDM

	従来	改良後
粒子径	50-60 nm	
R2	70-100	150-200
R1	15-20	30-40

このように合成した「 $\alpha$ PAP2a-CMDM 複合体」だが、安定性が悪いことが判明した。この原因を検討した結果、150 kDa の大分子量を有する抗体は、CMDM と結合した後、その表面をコーティングするデキストランの不安定性に起因して脱離されることが判明した。

そこで、H20-21 年度では、デキストランのコーティング強度を向上させるべく、高分子デキストランに変更し、さらにそれを架橋処理して3次元化させた。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磁気精製工程も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集積が確認できた。さらに目標とする MRI においては、MRI 自体感度が低いという欠点がある中、H21 年度の MRI 試験では、6 回実施中、4 回の特異的集積が確認できた。

#### D. 考察

本研究により開発された「 $\alpha$ PAP2a-CMDM 複合体」にて、MRI 画像化を達成できたが、さらなる改良として、次の2点が考えられる。

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られる。

#### 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の可能性があることが示された。また、このようなシステムによる新しいタイプの特異的 MRI 造影剤を開発することに有用な多くの知見が得られた。

#### 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、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 $\square$ 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

「感温性高分子を用いたインテリジェント型リポソームの構築」に関する研究  
分担研究者 河野健司 大阪府立大学 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、ドキシソルビンを含むリポソームを担癌マウスに投与し、腫瘍集積後に局所加温することで、内包物が腫瘍組織に放出される様子をMRI直視下に観察することができた。また、抗がん剤を同様の方法で局所投与することで、腫瘍の増殖を強く抑制することが可能になった。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が可能となり、精度の高い癌化学治療の実現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。本研究では可視化機能と温度応答機能を有するリポソームを構築し、その抗癌剤送達システムとしての有用性を明らかにすることを目指した。ここでは、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の構築、②MRIによる検出が可能なりポソームの構築③これらのリポソームによる抗癌剤デリバリーによる抗腫瘍効果、について検討した。図1に本研究によるリポソーム構築の概念図を示した（ここでは、温度応答性ポリマーとして2エトキシエトキシエチルビニルエーテル(EOEOVE)ポリマーおよびMRI造影素子としてGdデンドロン脂質を用いている）。

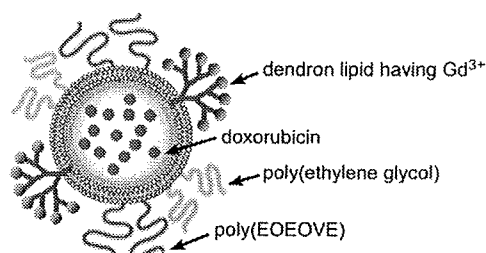


Figure 1. Design of multifunctional liposome for anticancer drug delivery.

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。ポリアミドアミン(PAMAM)-G3デンドロン脂質[2]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(図2)。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。

C. 研究成果と考察