

「自己組織化ナノ粒子を基盤とする放射線・蛍光デュアルイメージング法の確立」

神戸薬科大学 薬品物理化学研究室 向 高弘

1 研究の背景と目的

生体分子イメージングは、科学政策の重要な項目の一つとして、生体内で働く分子の機能および動態を生きている状態でイメージングにより解析できる手法であり、ライフサイエンス分野を中心に、その将来が大きく期待されている。現在、イメージング技術として、様々なモダリティ（検査装置）を対象とした研究が推進されているが、各モダリティには一長一短があるため、それぞれのケースに対応した分子イメージング法の選択や相互補助が重要である。例えば、がんの診断において、検出感度が高い（空間分解能の低い）核医学診断法により全身のがんの局在を術前にスクリーニングした後、空間分解能および検出感度が高い（生体透過性の低い）蛍光イメージング法による術中診断を実施すれば、高精度のがん治療を達成できると考えられる。このような複数のモダリティに対応できる分子プローブは、病態機能診断において、新たなツールとなることが期待され、その開発研究が進められているが、合成の煩雑性や毒性面に問題を抱えており、臨床適用には至っていない。研究代表者はこれまでに、アニオン性高分子（ γ -ポリグルタミン酸： γ -PGA 等）を被膜にもつ自己組織化ナノ粒子を開発し、合成の簡便性と高い生体適合性を示してきた。また、細胞膜と静電的に反発するにも関わらず、細胞内移行性が高いという他に例のない特徴を持つことから、本研究ではアニオン性自己組織化ナノ粒子を、がんの術前・術中診断に適用可能な放射線・蛍光デュアルモダリティ分子プローブへ展開し、それをを用いるがん特異的分子イメージング法の構築を計画した。

2 研究方法・研究内容

本研究では、 γ -PGA に代わるアニオン性高分子として、抗炎症作用および抗がん作用を持つと報告されている Chondroitin Sulfate A (CS) に注目した。CS とは、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-ガラクトサミンの 2 糖が反復する糖鎖に硫酸が結合した構造を持つアニオン性の生体高分子である。プラスミド DNA をコアとして、ポリエチレンイミン (PEI) と CS を順次反応させて合成した研究では、遺伝子ベクターとして有用であり、マウス悪性黒色腫細胞 B16-F10 において複合体が取り込まれるという報告がなされている。そこで本研究では、pDNA の代わりに、イメージングシグナル放出素子である放射性同位元素および蛍光色素を導入可能な人工合成高分子であるポリアミドアミンデンドリマー（第 4 世代：G4）に着目し、その誘導体をコアとする、PEI および CS からなる放射線／蛍光標識自己組織化 CS 複合体作製し、がんの核医学・蛍光デュアルイメージングプローブとしての有用性を評価した（図 1）。

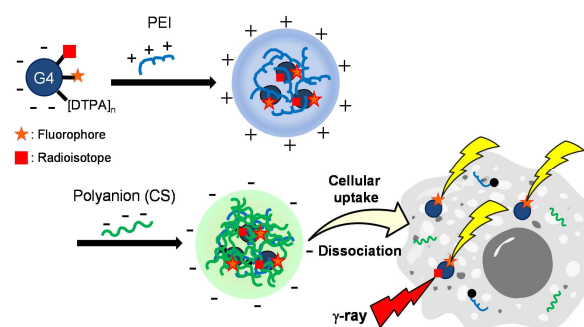


図 1 薬剤設計概念図

キレート剤 (DTPA) 修飾デンドリマー (DTPA-G4) および ^{111}In -DTPA-G4 の合成

G4 と p-SCN-benzyl diethylenetriamine pentaacetic acid (p-SCN-Bn-DTPA) を、リン酸緩衝液 (pH9.0) 中、室温で 24 時間攪拌した。本操作を再度繰り返した後、限外濾過膜 (3.5 kDa) により DTPA-G4 を精製し、凍結乾燥した。続いて、酢酸緩衝液 (pH6.0) に DTPA-G4 を溶解させたところに、 $^{111}\text{InCl}_3$ を混合し、60°C で 1 時間インキュベートした。Amicon-Ultra 4 を用いて精製し、セルロースアセテート膜電気泳動にて反応の進行を評価した。

DTPA-G4/PEI/CS 複合体 (CS 複合体)、¹¹¹In 標識 CS 複合体の作製

DTPA-G4 を 5% グルコース溶液中にて PEI (分子量: 25 kDa) を混合し、15 分間室温でインキュベートすることで DTPA-G4/PEI 複合体 (PEI 複合体) を作製した。また、¹¹¹In-DTPA-G4 を用いて同様に作製することで ¹¹¹In 標識 PEI 複合体を得た。PEI 複合体と CS と混合し、15 分間室温でインキュベートすることで、DTPA-G4/PEI/CS (CS 複合体)、¹¹¹In 標識 CS 複合体をそれぞれ作製した。また、得られた複合体の粒子径と表面電荷は、Zetasizer Nano ZS (Malvern 社) で測定した。

蛍光標識 CS 複合体の合成

G4 をリン酸緩衝液中 Sulfo-Cy5-NHS ester と混合し、遮光下室温で 24 時間反応させた。透析による精製後、p-SCN-Bn-DTPA を上記と同様の方法で反応させ、DTPA-G4-Cy5 (蛍光標識 DTPA-G4) を得た。PEI、CS と順次反応させ、蛍光標識 CS 複合体を得た。

細胞取込み能評価および細胞傷害性評価

RAW264 (マウスマクロファージ) 細胞株およびマウス悪性黒色腫細胞である B16-F10 細胞株は、DMEM 中にて、37 °C、5 %CO₂ 環境下で培養を行った。RAW264 細胞に得られた ¹¹¹In 標識複合体を添加し、37 度でインキュベート後、細胞内に取込まれた放射能を測定し、単位タンパク質量あたりの取込み割合 (%dose/mg protein) として算出した。また、蛍光標識 CS 複合体を細胞に添加し、蛍光顕微鏡で観察した。さらに、細胞取込み機構を評価するため、¹¹¹In 標識複合体とともに各種エンドサイトーシス阻害剤あるいは CS を同時添加し、取込み量を評価した。細胞障害性については、WST-8 試験液を用いて評価した。

生体内分布実験

マウス (ddY 系、雄性、5 週齢) に ¹¹¹In 標識 CS 複合体 (1 μg DTPA-G4/0.5 μCi) を尾静脈より投与し、10、30 分、1、3、6、24 時間後の各時点で、イソフルラン麻酔下、心臓より血液を採取することにより安楽死させた。脾臓、膵臓、胃、小腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉、骨を摘出し、それぞれの湿重量測定、γ カウンタによる放射能測定を行った。放射能集積は、組織 1 g 当たりの投与量に対する割合 %ID/g (%injected dose/g) と、組織当たりの投与量に対する割合 %ID/organ (%injected dose/organ) として算出した。

3 研究成果

CS 複合体の作製

DTPA-G4 の COOH 基由来のマイナス電荷と PEI の NH₂ 基由来のプラス電荷の比が 1 : 8 となるように反応させて合成した DTPA-G4/PEI に種々の量の CS を添加し、粒子径、ゼータ電位を測定したところ (表 1)、DTPA-G4/PEI/CS の電荷比が 1:8:8 となる CS 量を加えることにより、安定したアニオン性ナノ粒子を作製できることが明らかとなった。同じ CS 量で ¹¹¹In 標識 CS 複合体を作製したところ、粒子径は約 45 nm、ゼータ電位は約 -31 mV となり、セルロースアセテート膜電気泳動でも表面電荷が負電荷の単一の粒子であることを確認した。また、放射化学的純度は 93% であった。

表 1 CS 複合体の粒子サイズおよびゼータ電位

ナノ粒子	粒子径 (d. nm)	ゼータ電位 (mV)
DTPA-G4/PEI/CS 1:8:4	65.4 ± 14.6	19.4 ± 0.7
DTPA-G4/PEI/CS 1:8:8	38.4 ± 6.2	-48.8 ± 2.1
DTPA-G4/PEI/CS 1:8:12	34.3 ± 7.2	-48.8 ± 1.0
DTPA-G4/PEI/CS 1:8:16	36.4 ± 13.8	-45.6 ± 1.3

細胞傷害性の評価

カチオン性である PEI 複合体は高い細胞傷害性を示すことが知られている。そこで、マウスマクロファージ様細胞 RAW264 に G4-DTPA、PEI 複合体、CS 複合体のそれぞれを G4-DTPA の量を変化させて添加した。すると PEI 複合体は濃度依存的に高い細胞傷害性を示したが、CS 複合体は G4-DTPA の濃度が高くなっても 50 %程度の傷害性しか示さなかった (図 2)。したがって、アニオン性高分子である CS を用いて複合体の表面をアニオン性にすることで、細胞膜との相互作用を弱めることができ、細胞毒性を低減することができたと推察される。

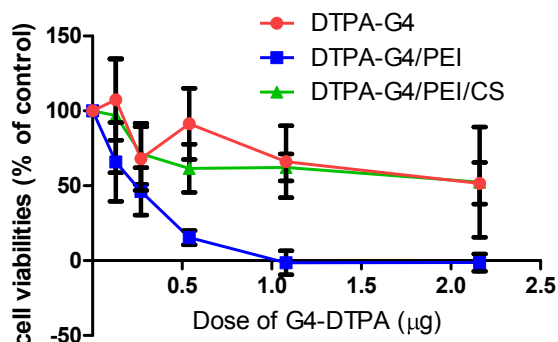


図 2 各複合体の細胞障害性評価

¹¹¹In 標識複合体のがん細胞取込み評価

マウス悪性黒色腫細胞 B16-F10 における ¹¹¹In-DTPA-G4、¹¹¹In 標識 PEI 複合体、¹¹¹In 標識 CS 複合体の取込み実験を行い、細胞内の放射能を経時的に測定した (図 3)。

¹¹¹In-DTPA-G4 は細胞内へほとんど取り込まれないが、これを PEI で被覆することにより、細胞内への取り込みは有意に増加した。また、CS 複合体もアニオン性被膜による取り込みの低下は見られず、PEI 複合体と同等以上に高く取り込まれた。

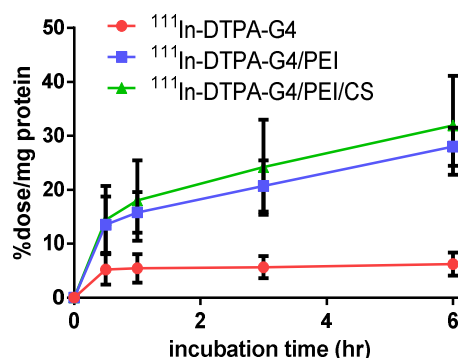


図 3 がん細胞への取込み評価

細胞取込み機構の評価

¹¹¹In 標識 CS 複合体は分子サイズが大きいいため、エンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれている可能性が高いと考えた。そこで、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤である Chlorpromazine、マクロピノサイトーシス阻害剤である Amiloride、カベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤である Genistein、ファゴサイトーシス阻害剤である Cytochalasin D を用いて、これらの阻害剤の共存下での取り込み量の変化を評価した。いずれの阻害剤においても control 群と有意な差が見られなかった。エンドサイトーシス機構で取り込まれている可能性も考えられるが、CS 複合体の B16-F10 に対する別の取り込み経路が関与している可能性が考えられた。

一方、CS (20 μM、100 μM) 共存下で ¹¹¹In 標識 CS 複合体を細胞へ添加し、細胞内取込み量を測定した (図 4)。CS 濃度が 100 μM のときに CS 複合体の細胞内への取り込みが有意に減少した。また、CS が高濃度であるほど取り込みが抑制されていることから、CS 濃度依存的に抑制されていること分かる。以上より、CS 複合体の B16-F10 への取り込みには、CS に特異的な輸送経路が関与している可能性が示された。

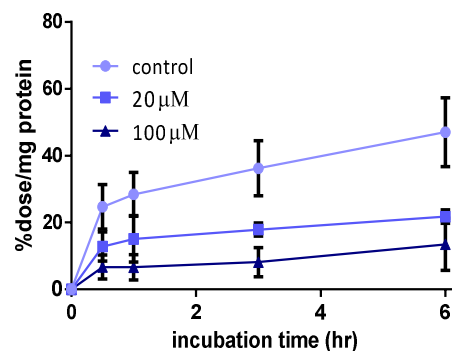


図 4 CS を用いた細胞取込み阻害実験

蛍光標識 CS 複合体の細胞内取込み評価 (蛍光顕微鏡観察)

¹¹¹In 標識 CS 複合体と同様に、Cy5 標識 CS 複合体を B16-F10 細胞に添加し、1、3、6 時間後に蛍光顕微鏡を用いて粒子の局在を観察した (図 5)。その結果、細胞内に多数の蛍光スポットが観察され、粒子の内在化が示唆された。また、¹¹¹In 標識 CS 複合体と同様に、過剰量の CS の同時添加により、細胞内蛍光シグナルが減弱したことから、CS 特異的な輸送経路の関与が示唆された。

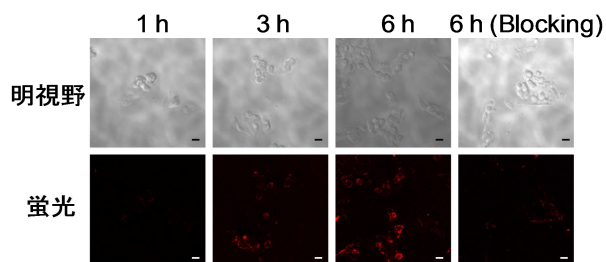


図 5 蛍光顕微鏡観察によるがん細胞取込み評価
Scale bar = 20 μm

健常マウスにおける生体内放射能分布評価

CS 複合体の健常マウス静脈内投与時における放射能の体内分布評価を行った (図 6)。血中濃度は時間とともに低下しており、3 時間後にはほぼ消失していた。また、脾臓・肝臓・肺といったマクロファージが豊富に存在している組織への集積が高かった。よってこれらの組織への取り込みはマクロファージが関与している可能性が考えられた。しかし、肺において複合体投与直後は高い集積が見られたが、時間とともに減少していることから、脾臓や肝臓と異なり、一度集積してもほかの臓器へ複合体が流れ出ている可能性が考えられた。仮に、肺にがんが転移したとすれば、がん組織は血管透過性が亢進していることと、リンパ系が未発達であることより、正常肺より肺がんによく集積し、高い放射能を維持し続けるのではないかと考えた。したがって、核医学イメージングを想定した際に、肺転移がんをコントラスト良く観察できることが期待された。

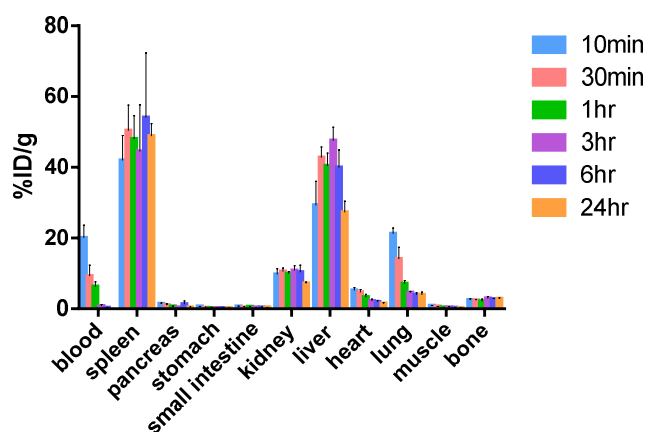


図 6 健常マウスにおける ¹¹¹In 標識 CS 複合体の生体内放射能分布

以上の結果より、本研究で新たに開発した放射線・蛍光デュアルイメージングプローブはがん細胞への高い取込みを示したことから、がん診断用プローブとしての基礎的な性質を有していることを明らかとした。

4 生活や産業への貢献および波及効果

自己組織化された放射性標識ナノ粒子が、センチネルリンパ節検出用放射性プローブとして有用であることを示し、独自の技術として 2011 年に特許出願を済ませている。本研究ではポリアニオンの一例として CS を用いた検討を行ったが、今後、インビボにおいてより詳細な検討を進めるとともに、種々のポリアニオンを被膜として使用することで、自己組織化ナノ粒子を応用性の高い、放射線・蛍光デュアルモダリティ分子イメージングプローブとして展開する予定である。これらの成果は、高い診断精度に基づく治療効果の最適化、患者負担の軽減、医療経済効果に貢献すると期待される。