

「膵臓がんの核医学診断・治療を志向した SMA ナノディスクの開発」  
 神戸薬科大学 宗兼 将之

1 研究の背景と目的

近年、薬物送達技術としてリポソーム等の輸送担体に薬物を封入し、がん等の病態特異的に薬物を送達する技術が活発に開発されている。リン脂質とアポリポタンパク質から構成される粒子径約 10 nm の HDL 模倣粒子もその 1 つであるが、所属研究室では、アポリポタンパク質を生体適合性の高い合成ポリマーのスチレンマレイン酸共重合体 (SMA) に変更した SMA ナノディスクの開発を行っている (*J. Labelled Comp. Radiopharm.*, 2018, 61, 857)。本研究では、血管透過性が乏しい膵臓がん等の難治性がんに対して、粒子径約 100 nm の既存のナノ粒子製剤は組織内に充分移行せず、粒子径約 30 nm の小さなナノ粒子は組織内へ移行するとの報告 (*Nat. Nanotechnol.*, 2011, 6, 815) に着目し、粒子径の小さな SMA ナノディスクを膵臓がんの診断・治療に応用することを着想した。核医学診断技術は、生体内に投与した放射性医薬品から放出される放射線を生体外から検出することで、がん等の病態部位へ集積した放射性医薬品を描出することができる技術で、がんの診断や治療効果判定等に用いられている。診断用の放射性核種は生体透過性の高い放射線を放出するため、膵臓がん等の深部のがんに対しても有効である。また、利用する放射性核種を、細胞傷害性を有する治療用放射性核種に変更することで、診断と治療を同時に行うことができる。そこで本研究では、膵臓がんの核医学診断・治療を志向した SMA ナノディスクの開発を目的とした。

2 研究方法・研究内容

膵臓がんを標的とした SMA ナノディスクの核医学診断・治療薬としての有用性を評価するため、本研究では以下の項目に関して評価を行った。

- A. 種々の組成の SMA ナノディスクの作製と物理化学的評価
- B. SMA ナノディスクの In-111 標識、血清中安定性評価
- C. 健常マウスにおける体内分布評価
- D. 担がんマウスを用いた体内分布、がん組織内分布の評価

A. 種々の組成の SMA ナノディスクの作製と物理化学的評価

SMA ナノディスクはリン脂質と SMA から構成されており、リン脂質には脂肪酸鎖の長さや不飽和度の異なる様々な種類が存在する (図 1)。リン脂質の脂肪酸鎖の長さや不飽和度の違いが SMA ナノディスクに及ぼす影響を評価するため、1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)、1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phospho -choline (POPC) の 3 つのリン脂質を用いて SMA ナノディスクを作製した。また、リン脂質と SMA の組成比の影響を評価するため、種々の組成比のものを作製した。作製した SMA ナノディスクは、ゼータサイザーを用いて粒子径とゼータ電位を評価した。

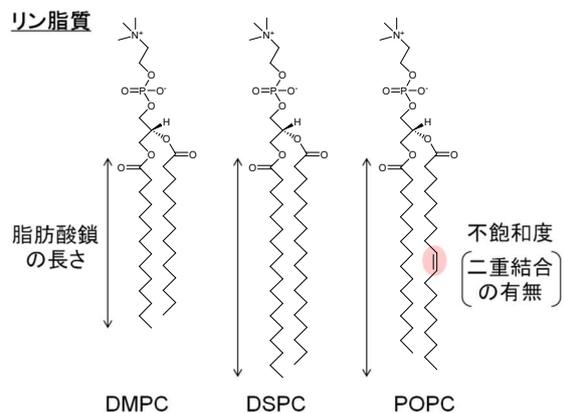


図 1. リン脂質の構造

## B. SMA ナノディスクの In-111 標識、血清中安定性評価

ナノディスクを作製する際に、リン脂質の1%の放射性標識用脂質 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-diethylenetriaminepentaacetic acid (PE-DTPA) を混合した。PE-DTPA が診断用放射性核種の In-111 ( $^{111}\text{In}$ ) と安定な錯体を形成することを利用し、PE-DTPA 含有 SMA ナノディスクと  $^{111}\text{InCl}_3$  を混合攪拌することで、放射性標識を行った。

標識した SMA ナノディスクを血清中でインキュベートし、インキュベート後にゲルろ過カラムで分離分析することで、SMA ナノディスクの安定性を評価した。インキュベート前後の溶出プロファイルの評価することで、血清中で安定に存在する SMA ナノディスクのリン脂質の種類やリン脂質と SMA の混合比を評価した。

なお、本研究における放射性同位元素の取扱いに関しては、「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」など関連法規を遵守し、使用施設の予防規程に従い実施した。

## C. 健常マウスにおける体内分布評価

健常マウスの静脈内に  $^{111}\text{In}$  標識 SMA ナノディスクを投与し、投与 1、6、24 時間後に解剖を行い、血液及び各組織の重量と放射能を測定した。血中濃度推移を解析することで、SMA ナノディスクの血中滞留性を評価した。正常組織への集積は、核医学診断において診断能の低下を引き起こし、核医学治療において副作用の発現に繋がるため、各正常組織への移行性を確認した。糞尿に関する測定を行い、排泄経路や排泄量を確認した。放射能はガンマカウンタを用いて測定し、投与量に対する集積量 (%dose) 及び単位重量当たりの集積量 (%dose/g) を算出した。

なお、動物実験の実施に関しては、実験計画を神戸薬科大学動物実験委員会により承認を受けた後に行い、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」など関連法規を遵守した。

## D. 担がんマウスを用いた体内分布、がん組織内分布の評価

担がんマウスは、難治性モデルのヒト膵臓がん細胞 BxPC-3 と比較対象のマウス大腸がん細胞 colon26 を皮下移植することで作製した。作製した担がんマウスの静脈内に  $^{111}\text{In}$  標識 SMA ナノディスクを投与し、投与 24 時間後に解剖を行い、がん組織 (BxPC-3 及び colon26) の重量と放射能を測定した。比較対象 (コントロール) として粒子径約 70 nm の  $^{111}\text{In}$  標識リポソームを用いることで、ナノディスクの有用性を評価した。

## 3 研究成果

### A. 種々の組成の SMA ナノディスクの作製と物理化学的評価

リン脂質と SMA の混合割合を変化させると粒子径が変化し、リン脂質の割合が高いほど粒子径が大きくなった。しかし、リン脂質の割合が高い場合は、ゲルろ過クロマトグラフィーで分解してしまい、安定な SMA ナノディスクを回収することができなかった。そこで、安定な SMA ナノディスクを回収できた混合割合 (リン脂質と SMA の重量比が 1:2) に固定してリン脂質の種類を変化させた。

粒子径は、リン脂質の炭化水素鎖の長さに応じて大きくなった (DMPC、POPC 及び DSPC-SMA ナノディスクで、それぞれ  $6.9 \pm 0.3$ 、 $9.8 \pm 0.3$ 、 $25.0 \pm 0.3$  nm であった)。また粒子の分散性は、POPC-SMA ナノディスクと比較して DMPC 及び DSPC-SMA ナノディスクで低かった。ゼータ電位はいずれも約  $-15$  mV で、リン脂質の種類による違いは観察されなかった。

## B. SMA ナノディスクの $^{111}\text{In}$ 標識、血清中安定性評価

いずれの SMA ナノディスクも 85%以上の標識率で  $^{111}\text{In}$  標識が可能であった。また、いずれも 95%以上の高い純度を示したことから、本標識体を用いて下記の評価を行った。

まず、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、標識した SMA ナノディスクの血清中安定性を評価した。図 2 は各 SMA ナノディスクのクロマトグラムを示しており、縦軸が放射能 (%) で、横軸が画分を示している。いずれの SMA ナノディスクにおいても血清添加前後でクロマトグラムに変化があった。DMPC 及び POPC-SMA ナノディスクでは、血清添加後の溶出プロファイルにおいて 3 つのピークが観察された。これらのピークは、リポタンパク質等の血清成分が溶出すると考えられる画分に観察されたことから、SMA ナノディスク中の標識脂質が血清成分に移行した可能性が考えられた。一方で DSPC-SMA ナノディスクは、インキュベート前よりわずかに早い溶出時間に 1 つのピークが観察された。血清成分との相互作用により粒子径の増大が観察された可能性が考えられた。いずれも血清添加前後でクロマトグラムに変化があったことから、SMA ナノディスクの一部は、血清中で安定ではない可能性が考えられた。血清添加前のピークと添加後に新しくできたと考えられるピークは、それぞれを分離することが困難で定量的な評価までは行うことができなかった。

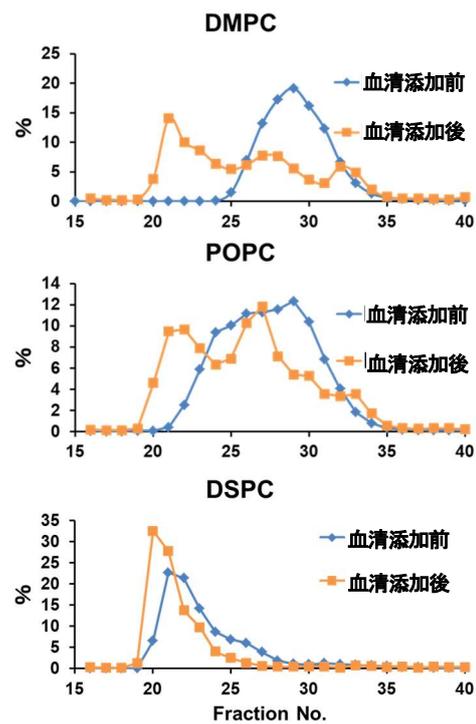


図 2.  $^{111}\text{In}$  標識 DMPC-, POPC-, DSPC-SMA ナノディスクの血清中安定性評価

## C. 健常マウスにおける体内分布評価

健常マウスにおける  $^{111}\text{In}$  標識 DMPC-, POPC-, DSPC-SMA ナノディスクの静脈内投与後の体内放射能分布の結果は図 3 の通りであり、いずれの SMA ナノディスクも他の組織と比較して肝臓、脾臓への集積が高かった。DSPC-SMA ナノディスクの肝臓、脾臓への集積は、他と比較して特に高かった。一方で、血液中の放射能は、DMPC 及び POPC-SMA ナノディスクで高く、Enhanced Permeability and Retention 効果によるがんへの高い集積が期待された。

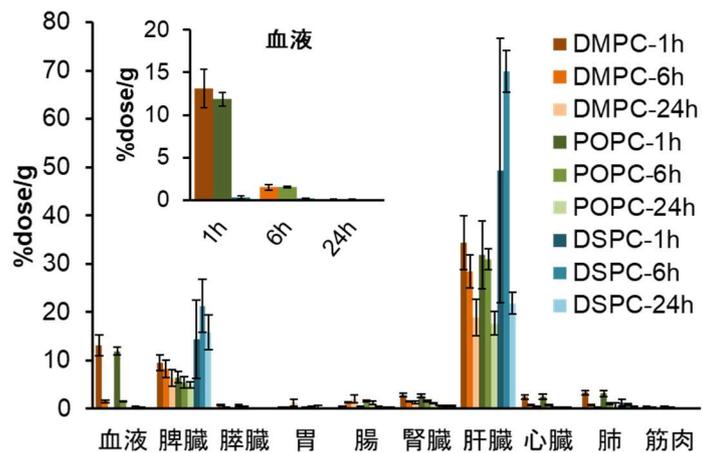


図 3. 健常マウスにおける  $^{111}\text{In}$  標識 DMPC-, POPC-, DSPC-SMA ナノディスクの生体内放射能分布

D. 担がんマウスを用いた体内分布、がん組織内分布の評価

粒子の分散性が比較的 low、健康マウスを用いた評価で良好な体内分布を示した DMPC-SMA ナノディスクを用いて、がん集積性を評価した。また、比較対照として DMPC リポソームを用いた。

24 時間後の体内分布は図 4 の通りであり、DMPC-SMA ナノディスクは、DMPC リポソームと同様の組織移行性を示したが、脾臓や肝臓等の正常組織への集積は比較的 low かった。

がんへの集積性は、リポソームとナノディスクで異なり、標的の膵臓がん細胞である BxPC-3 だけでなく Colon-26 においてもリポソームと比較して高いナノディスクの集積が観察された。しかしながら、絶対的な集積量は、1.0%前後と low かった。核医学診断では、得られた画像の濃淡を指標に診断を行うため、がん等の標的組織と正常組織とのコントラストが重要である。そのため、がん組織への高い集積のみならず、正常組織への低集積が求められる。血液は全身を循環していることから、がん/血液比は診断能の指標として用いられる。がん/血液比はいずれも高値を示しており、Colon-26 における血液比は、リポソームで  $8.1 \pm 2.8$ 、ナノディスクで  $8.3 \pm 4.2$  であり、BxPC-3 における血液比は、リポソームで  $3.1 \pm 1.5$ 、ナノディスクで  $4.2 \pm 2.1$  であった。また、ナノ粒子の膵臓がんへの集積は他種のがんよりも低いことが知られているが、DMPC-SMA ナノディスクを用いることにより膵臓がんへの集積性が改善されたかを評価するため、難治性がんモデルの BxPC-3 と比較対照の Colon-26 との集積比を算出した。BxPC-3/Colon-26 比は、DMPC リポソームで  $0.41 \pm 0.20$ 、DMPC-SMA ナノディスクで  $0.55 \pm 0.22$  であり、DMPC-SMA ナノディスクの方が高い値を示す傾向が観察され、DMPC-SMA ナノディスクの膵臓がんへの移行性の改善が示唆された。以上のことから、<sup>111</sup>In 標識 DMPC-SMA ナノディスクは、難治性の膵臓がんを標的とした核医学診断に有効である可能性が示された。

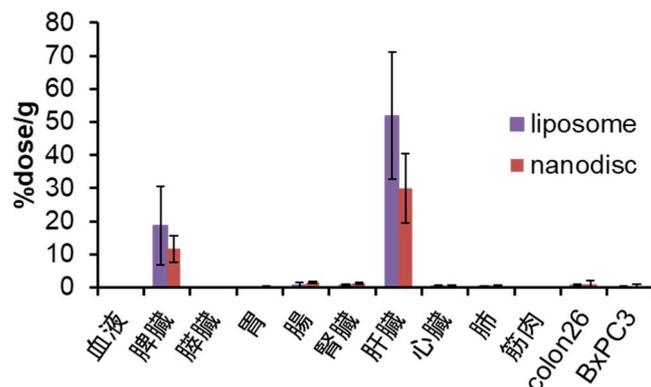


図 4. 担がんマウスにおける <sup>111</sup>In 標識 DMPC リポソーム及びナノディスクの生体内放射能分布

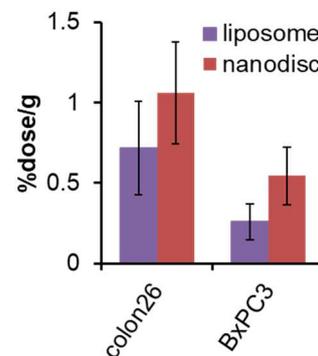


図 5. <sup>111</sup>In 標識 DMPC リポソーム及びナノディスクのがん集積

4 生活や産業への貢献および波及効果

膵臓がんは、早期発見が困難であり、5 年生存率が約 10%と低い難治性がんである。本研究では、生体深部でも診断が可能である核医学診断薬として、膵臓がんへの集積性を示す In-111 標識 SMA ナノディスクを開発した。今後、膵臓がんにとくに発現している分子に対する標的化等を行い、がん集積性をさらに改善することにより、膵臓がんの精度の高い早期診断に貢献できると期待できる。また、放射性核種を診断用から治療用へと変更することで、核医学診断のみならず、核医学治療を行うことが可能であるため、高い治療効果を示す新規治療法の開発への貢献が期待される。