

## 総 説

### — 腫瘍指向性ポリマーナノ粒子ラクトソーム — 核医学分子イメージングプローブとしての開発と展望

山本 文彦

#### Development and Prospects of Tumor Directional Polymer Particles as Molecular Imaging Probe for Nuclear Medicine

Fumihiko YAMAMOTO

(Received November 20, 2016)

#### 1. はじめに

悪性腫瘍（がん）は1980年代以降，我が国における死亡原因の第1位であり，現在では全体の約30%を占めている．PET 健診などに代表されるがん検診が行われているにもかかわらず，依然としてがんによる死亡者数は多く，年間30万人以上ががんによって死亡しているのが現状である．<sup>1)</sup> また，生涯でがんにかかる確率は約50%ともいわれており，今や日本人の2人に1人が経験する国民病である．そのため，がん患者の生存率やQuality of Lifeの向上と診断・治療に係る医療費を抑制するための早急な対策が必要となっている．がんの早期診断技術の開発，低侵襲治療や標的治療等の研究は，総合科学技術会議における政策提言においても，がん対策等に資する先進医療機器・技術開発の推進に取り組むことが提示されている．

がんの診療においては，できるだけ早期の段階で腫瘍を発見し，悪性度や進行度の診断を的確に行い治療を行うことが重要である．しかしながら，形態学的な診断はある程度の大きさに成長した腫瘍でなければ発見が困難であり，発見が遅れれば転移していたり切除手術が不可能なほど進行していたりするため，治療効率や治療後の患者の生存率向上へは技術的な限界がある．このような状況を打破するためには，がんを初期の微小病変の段階で的確に発見し，そして治療につなげていく技術の開発が必要である．

「分子イメージング」とは，生体内で起こっている生理的または病的な生命現象を体外から細胞レベルまたは分子レベルで捉えて画像化する技術，あるいは生化学・生物学・臨床診断もしくは治療

に適用するために，分子や細胞のプロセスの空間的・時間的分布を直接的あるいは間接的にモニタし記録する技術のことであり，病気の早期診断や治療，創薬に役立てるための新しい方法論として期待されている．特に我が国においては，分子イメージング技術はがんの早期診断・治療に有効な手段として注目されており，放射線や核磁気共鳴など様々なモダリティを利用したがん標的分子イメージング技法の開発研究や臨床適用が行われている．

筆者は前職の京都大学において，新しいポリマーナノ粒子をがん標的の核医学分子イメージングプローブとして開発する研究に携わってきた．本総説では，筆者が現在も継続して展開する腫瘍指向性ナノポリマー「ラクトソーム」の開発研究について，これまでの経緯や概要そして将来展望について解説する．

#### 2. FDG-PET

陽電子放射断層撮影法（Positron Emission Tomography, PET）は，正常組織や病変部位の生体現象を描画する代表的な分子イメージング技法であり，がんの診断や治療効果判定，治療予後を評価するツールとして臨床利用されている．特に2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucose (FDG) は，生体にとってエネルギー源であるグルコースの糖代謝を指標とした描画が可能な放射性PET薬剤であり，解糖系が特異的に亢進しているがん組織を感度良く検出できる．がん組織は細胞分裂が盛んであり，一般に正常組織よりも多くのエネルギーを必要としている．がん組織はグルコースの要求量が正常

組織に比べると数倍高くなることが多く、生体内でグルコースと似た分布をする FDG の集積も高いので、小さながんも定量性高く描画できる。このため、FDG-PET は各種がんに対して保険適応となっており、有用な画像診断技法として臨床現場で利用されている。

しかしながら、心筋や脳など正常であってもエネルギー代謝の盛んな組織もある。そのため FDG-PET でもすべての悪性腫瘍を検出できるわけではなく、脳腫瘍や肝がん、消化器系がん、腎臓がんなど描画を苦手としている腫瘍がある。この問題を解決するために、糖代謝以外の指標を利用してがんを検出する「ポスト FDG」と称される新しい放射性分子プローブの開発研究も盛んである。核酸代謝やアミノ酸代謝、膜脂質代謝など糖代謝以外の指標を利用したり、がん細胞膜に特異的に発現する受容体やタンパク質などを標的としたりするなど数多く試みられているが、その1つとして、初期腫瘍における不完全な新生血管の特徴的な構造を利用して集積するナノ粒子を分子プローブとして利用する可能性も期待されている。

### 3. EPR 効果とステルス特性

粒子径が数十～200 ナノメートル程度のナノ粒子を血中に投じれば、初期の固形腫瘍に集積することが知られている。これは Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果と呼ばれる。腫瘍が増

殖すると腫瘍組織に酸素やエネルギーを供給するために増殖に伴って新生血管が発達していくが、初期の腫瘍においては増殖速度が速いため血管新生が追いつかず、血管上皮が未完成のまま伸長する。そのため、血管上皮細胞に生じているわずかな隙間からある程度の大きさの粒子が漏出する。これに加えてリンパ排出系も未完成であるため、漏出した粒子は排出されずにそのまま組織に集積すると考えられている。つまり、血中に投じたナノ粒子はこの EPR 効果によって腫瘍特異的に集積するのである。<sup>2-8)</sup> (Figure 1)

リポソームは生体細胞膜の構成要素であるリン脂質から作られたナノ粒子で生体適合性が高い DDS 基材として知られるが、リポソームであっても体内に投与すれば生体は異物と認識して急速に細網内皮系組織 (RES) に捕捉され、やがて排出されてしまう。目的の組織に到達させるために、貪食細胞に認識されにくいステルス特性をもたせた機能性リポソームも開発されており、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) で表面修飾したリポソームは、ドキソルビシンを封入した Doxil、としてカポジ肉腫や卵巣がんの治療に臨床利用されているものである。

### 4. ペプトソームとラクトソームの開発

PEG は非イオン性水溶性の合成高分子であるが、生体親和性が高いことから薬剤や医療材料におい

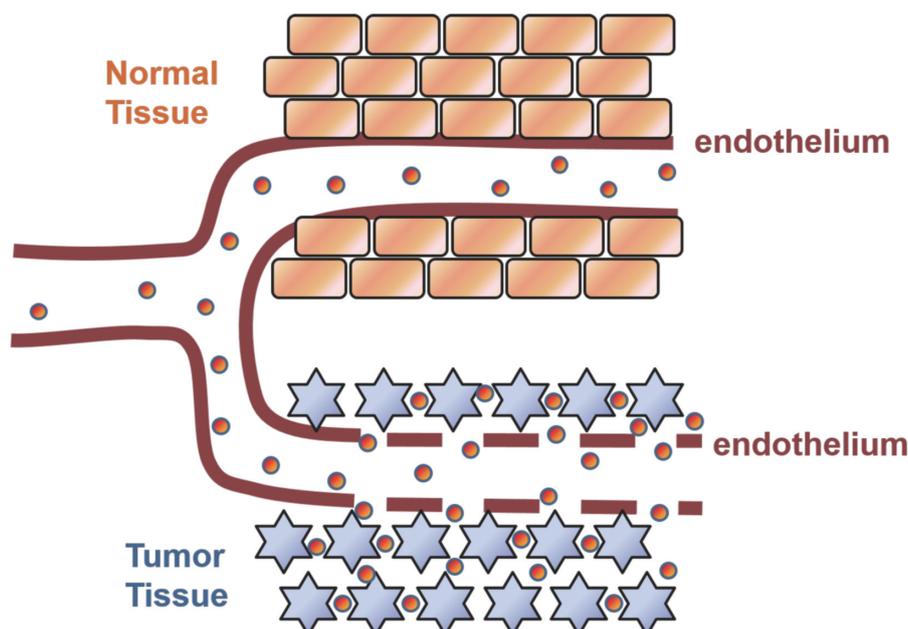


Figure 1. Schematic illustration of the EPR effect.

て利用されている。その一方で、PEG 鎖は生分解性が乏しいと考えられ、なおかつ生体防御システムを活性化するため、疑似アレルギー症状などの急性副作用を高い頻度で引き起こすことが指摘されている。<sup>9,10)</sup>

京都大学大学院工学研究科の木村俊作教授らのグループは、新規ナノ粒子を開発にあたり、天然由来の高分子で非イオン性水溶性高分子を用いることで毒性を軽減することを期待して、リポソームの PEG に代わりポリサルコシンを選んだ。サルコシンは天然に見いだされるアミノ酸であり、生体系ではクレアチンを構成して筋肉中に存在し、リン酸化されてホスホクレアチンとしてエネルギー貯蔵に寄与することが知られている。また、内因性のサルコシンデヒドロゲナーゼにより分解され、サルコシン自身には毒性がない。サルコシンとパーム油からなる界面活性剤は、化粧品や歯磨き粉などに利用され、サルコシンを含む化合物には生体適合性があると考えられている。そこで分子集合体の物理的安定性を増すため、脂質ではなく疎水性ポリペプチドを用いた新しいステルス性ナノ粒子「ペプトソーム (Peptosome)」と「ラクトソーム (Lactosome)」を開発した。

ペプトソームを構成する両親媒性ポリマーは、親水性ポリサルコシンとらせん構造を形成する疎水性ポリペプチドから成り立っており、重合度を

変えて親水性と疎水性とのバランスを選ぶことで、水中においてこのポリペプチドによるベシクル構造の分子集合体を形成することができた。具体的には疎水性ブロックを平均重合度 18、親水性部の長さが数平均重合度 43 および 65 の 2 種類を混合することで、動的光散乱 (DLS) 測定にて流体力学的直径が 100 nm の安定なベシクルを作ることができた。<sup>11-15)</sup>

一方、両親媒性ポリマーの疎水性部位を、らせん構造を形成するポリ-L-乳酸に変えたものでも粒子を作成することが可能であった。ポリ乳酸は 3 残基で 1 周する  $3_{10}$  ヘリックス構造を形成し、25 量体のポリ乳酸の 150 量体のポリサルコシンからなる両親媒性ポリマーは、水中で粒径 100 nm から 200 nm のベシクルを形成することを明らかにした。また、ポリ乳酸を 30 量体にしたものは、粒径 30 nm のミセル粒子を形成することもわかった。これをラクトソームと名付けた。<sup>16)</sup> (Figure 2)

粒径約 100 nm のペプトソームを用いたラットの血中滞留性の評価を調べた結果、Doxil と同様に半減期が 22 時間 (Doxil は 26 時間) と長いことが示され、一方で粒径約 30 nm のラクトソームを用いた血中滞留性は 10~20 時間であり、比較的高い血中滞留性を示した。これらのことは、ペプトソームやラクトソームが生体内において安定でかつステルス特性を有していることを示していた。

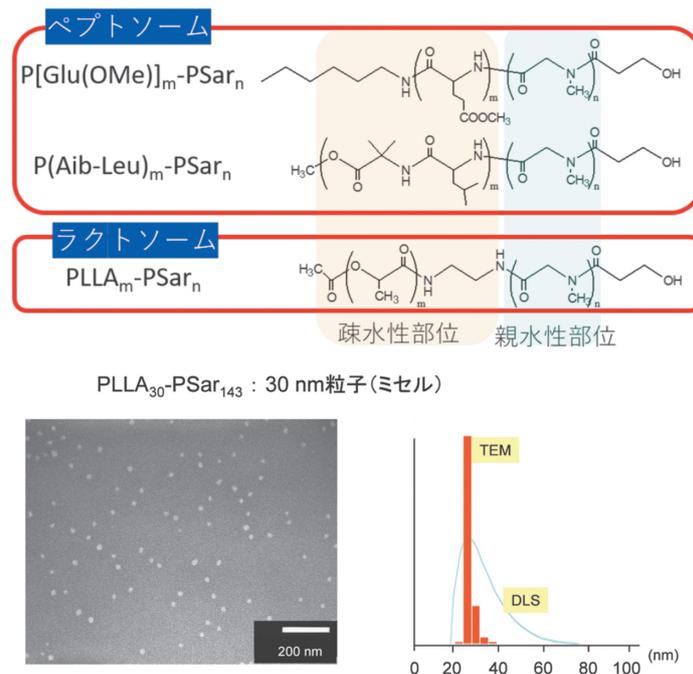


Figure 2. Molecular structures of the amphiphilic block polymers, and size distributions determined of Lactosome by TEM image and DLS measurement.

また、近赤外蛍光色素インドシアニングリーン (ICG) で標識したペプトソームを担癌マウスに投与して近赤外蛍光イメージングによる生体内分布を調べたところ、ペプトソーム接種2日後に、がん組織への集積が明確に示された。このがん組織は形態学的には検知することが困難であった初期のものであったことから、この結果はペプトソームのEPR効果による分子イメージングの有用性を期待させるものであった。しかしながら、ペプトソームは細網内皮系への取り込み、すなわち肝臓への集積も認められた。一方でラクトソームは体内動態がペプトソームと異なる結果を得た。ICG標識ラクトソームの担癌マウスにおける生体内分布を同様に近赤外蛍光イメージングで調べたところ、ペプトソーム同様のがん組織集積を認めた一方で、肝臓など細網内皮系への集積がペプトソームよりも低いことが示された。注目すべきことに、肝臓にHepG2の同所移植を施した担癌マウスにおいて近赤外蛍光イメージングを行ったところ、肝臓がんを描画することに成功した。肝臓同所移植モデルにおいて肝臓を光らせることなく肝臓がんだけを描画できたのは、これが世界で初めての例であった。<sup>17)</sup> (Figure 3)

これらのナノ粒子は、腫瘍を標的とした薬物送達システムとして、次のようないくつかの優位性を持つことが考えられた。

(1) 生体適合性が考えられる化合物を利用して、投与において免疫系に不活性でアレルギー反応が起こりにくいと期待される。

(2) ナノキャリアが分子集合体であり個々の分子として生分解性を有しアミノ酸や乳酸はすでに代謝経路があることから、長期毒性が懸念されるような体内残留性がないと考えられる。

(3) 分子長（重合度）を変えることで任意のサイズや様々なモルフォロジーを有する分子集合体形成を制御でき、要求に応じた性能を引き出す分子集合体の創成が可能である。

(4) ナノキャリアにイメージングプローブや標的指向化合物等を合成化学的に容易に導入できるとともに様々な薬剤を担持できる。

これらの優位性は、これまで生体への投与が困難であった標識子や薬剤を投与可能にすると考えられ、汎用性の高い薬物送達システムとしての可能性を示すものである。とりわけ、ラクトソームに関しては細網内皮系に対するステルス特性が高く、がん組織に特異的に送達してがん組織の早期発見や治療に期待できると考えられた。

#### 4. <sup>18</sup>F 標識ラクトソームの開発<sup>18)</sup>

2008年8月に京都大学医学部附属病院探索医療センターにおいて、流動プロジェクト「新規ポリ乳酸系両親媒性ポリデプシペプチドを用いた分子

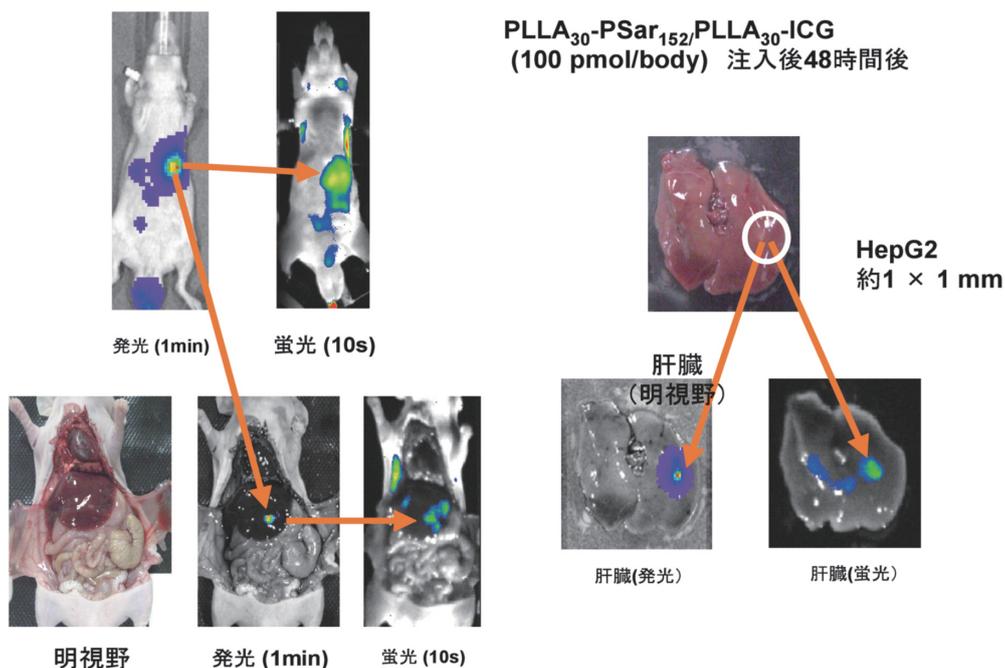


Figure 3. Bright field, luciferin bioluminescence, and ICG fluorescence images of HepG2 hepatocellular carcinoma cell bearing mouse at liver, and its isolated liver.

イメージングシステムおよび薬剤送達システム (DDS) の臨床応用に関する探索的研究」が開始された。このプロジェクトの目的は、固形がんの早期発見を可能にする分子イメージングの手法を進展させ、DDSにも展開可能な新しいイメージングプローブ・ナノキャリアシステムを確立することであった。臨床利用されているFDG-PETのように、新素材ラクトソームによるがん組織を見つけるための核医学診断プローブの可能性を明らかにし、最終的には医師主導型治験を開始することを目標とした。このために新しく研究室が立ち上がり、筆者は専任の准教授として任用され、エフォート100%ですべての業務時間をプロジェクト推進に費やすことが義務付けられた。

核医学診断であればPETか汎用性の高い単一光子放射断層撮像法 (Single Photon Emission Computed Tomography: SPECT) かにこだわる必要はなかったが、ポストFDGを目指した新しいがん診断薬を意識し、まずは京大病院からの供給が可能であったPET用核種 $^{18}\text{F}$ を標識子とした標識ラクトソームを開発することにした。ラクトソームを放射性核種のような標識子で標識するには、ミセル粒子を構成する両親媒性ブロックポリマー (PSar<sub>75</sub>-block-PLLA<sub>30</sub>) に導入するか、ミセルの疎水性核へ標識子をもつ疎水性化合物を担持させる方法が理論的には考えられた。導入する $^{18}\text{F}$ は物理

的半減期が110分と短時間であるため効率的な標識を考えた場合、ラクトソーム調製のできるだけ最終段階に標識するのがよいと考えられた。ラクトソームのステルス特性の保持を考えた場合、ミセルの表面側にあたるPSar<sub>75</sub>-block-PLLA<sub>30</sub>親水性部分のポリサルコシン側への導入は避ける必要がある。しかしながら疎水性核側にあたるポリ乳酸部分への $^{18}\text{F}$ の直接導入は合成化学的に困難であることが予想された。一方で、ICG標識ラクトソームの報告により、ラクトソームは疎水性核に重合度30程度のポリ-L-乳酸 (PLLA<sub>30</sub>) を安定して担持することが明らかにされていた。<sup>17)</sup>したがって、PLLA<sub>30</sub>に $^{18}\text{F}$ を導入して得た標識化合物を、PSar<sub>75</sub>-block-PLLA<sub>30</sub>とともに自己集合させて $^{18}\text{F}$ 標識ラクトソームとすることにした。(Figure 4)

サイクロトロンからの $^{18}\text{F}$ はH $^{18}\text{F}$ 水溶液として供給される。一般に、アニオンとして供給される $^{18}\text{F}$ を有機化合物に導入する場合、OH基を硫酸脱離基で保護した前駆体によりSN2反応を利用して導入することが効率的である。ラクトソームに担持させるPLLA<sub>30</sub>は、末端にOH基を有させることができるため、これをトリフルオロメタンスルホン基またはトシル基を導入して、塩基性条件下で求核置換反応によって $^{18}\text{F}$ を導入することを試みた。ラクトソームに担持させるポリ乳酸の量は、自己集合化後のミセル粒子の粒径に大きく影響する。ICG

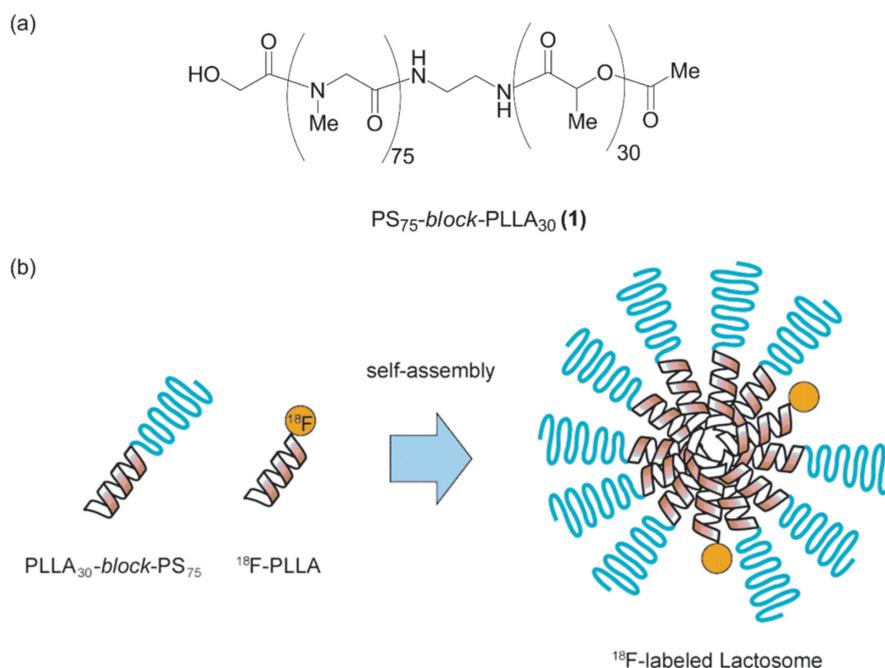
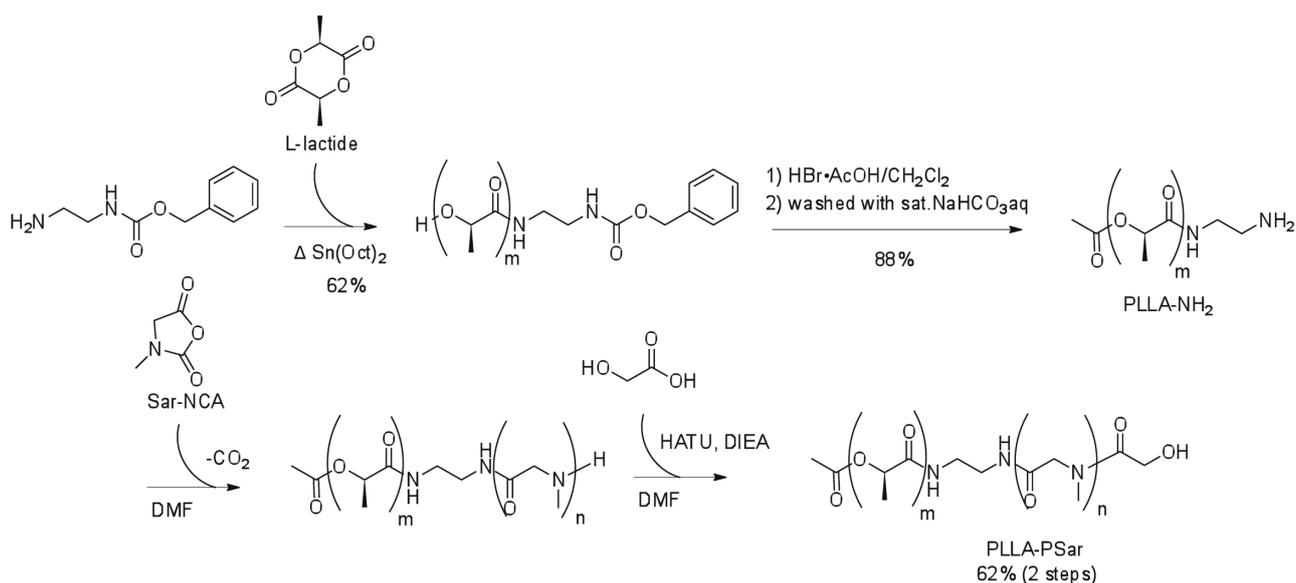


Figure 4. Molecular structure of the amphiphilic block polymer (a). Schematic representation of preparation of the  $^{18}\text{F}$ -labeled Lactosome (b). (Reprinted from ref. 18, Fig. 1 with permission of Elsevier.)

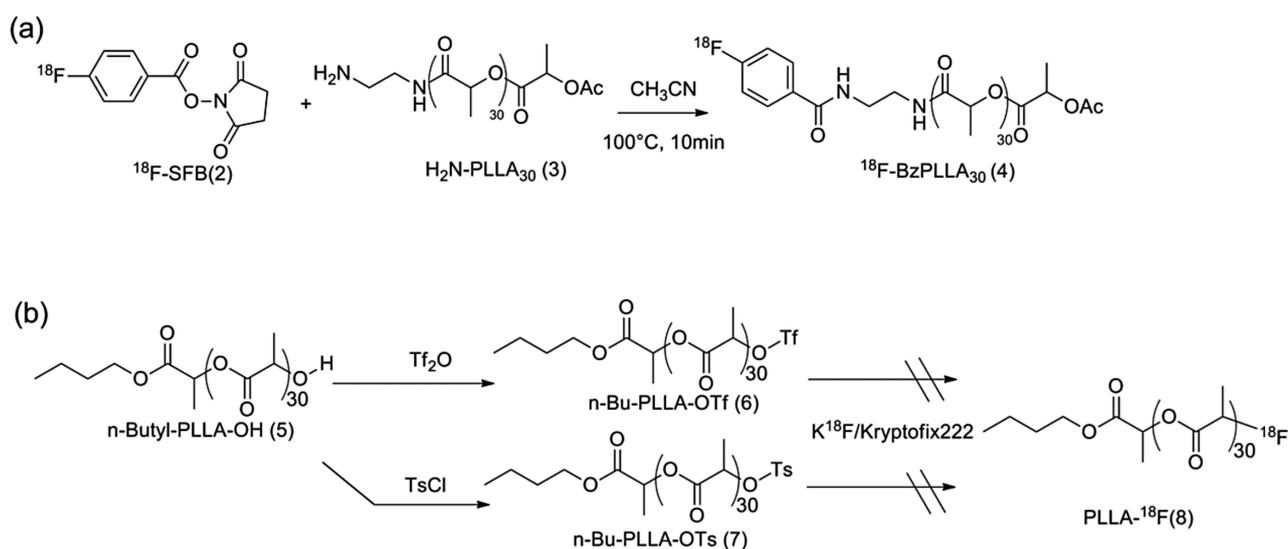
標識ラクトソームを使った近赤外蛍光イメージングの予備的検討において、粒子径は大きくなればステルス特性は弱くなり、肝臓などの細網内皮系にも集積することをこれまでに明らかにしており、50 nm 以下、理想的には 30 nm 程度に抑える必要があった。そのためには担持させる PLLA<sub>30</sub> の量は、PSar<sub>75</sub>-*block*-PLLA<sub>30</sub> 9 mg に対して 1.5~2 mg 以下である必要があった。しかしながらこの反応系では、目的の <sup>18</sup>F 標識ポリ-L-乳酸 (PLLA-<sup>18</sup>F) はほとんど得られず、PLLA-<sup>18</sup>F よりも分子量の小さい分解物が得られるのみであった。この理由として、強塩基性条件下での <sup>18</sup>F 標識反応であるた

め、無水条件で行ってはいけるもののスケールの小さな反応条件で行うことから、空気中のわずかな水分の混入であっても反応系に大きく影響し、<sup>18</sup>F 置換反応よりも PLLA の加水分解が優位に起こったためであることが予想された。このことは、比較的多量の PLLA 前駆体を基質に用いた反応では目的の PLLA-<sup>18</sup>F が少量は得られたことから、そのように考察することが妥当であった。

したがって、次に塩基性条件を用いずに <sup>18</sup>F を PLLA に導入する合成戦略を考えた。タンパク質やペプチドまたは抗体などを間接的に <sup>18</sup>F 標識する試薬として、N-succinimidyl 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzoate



Scheme 1. Synthesis of amphiphilic block polymer PSar<sub>75</sub>-*block*-PLLA<sub>30</sub>



Scheme 2. Synthesis of <sup>18</sup>F-BzPLLA<sub>30</sub> (a). Attempted synthesis of PLLA-<sup>18</sup>F (b). (Reprinted from ref. 18, Scheme 1 with permission of Elsevier.)

( $^{18}\text{F}$ -SFB)が開発されている。 $^{18}\text{F}$ -SFBはethyl-(4-trimethyl-ammonium)benzoate trifluoromethane-sulfonate または t-butyl-(4-trimethyl-ammonium)benzoate trifluoromethane-sulfonate から one-pot で合成が可能である。また、 $\text{NH}_2$  基への 4- $^{18}\text{F}$  fluorobenzoate の導入は中性条件下で短時間に行えることから、PLLA への  $^{18}\text{F}$  への標識に有用であると考えた。そこで、PSar<sub>75</sub>-block-PLLA<sub>30</sub> を合成する過程 (Scheme 1) で得られる 1 級アミノ基を末端に有するポリ-L-乳酸 (PLLA-NH<sub>2</sub>) を用いて、要時調製した  $^{18}\text{F}$ -SFB と加熱下で反応させ、ラクトソームに担持させる標識子として  $^{18}\text{F}$  標識ベンゾイルポリ-L-乳酸 ( $^{18}\text{F}$ -BzPLLA) を合成することにした。種々条件を検討した結果、効率的に  $^{18}\text{F}$ -BzPLLA を得ることが可能となった。この反応は、PLLA-NH<sub>2</sub> が 1.5 mg であっても効率的に進行し、用いた反応基質をすべてラクトソームに担持させたとしても約 30~40 nm 程度の粒径を保持することが可能であった。(Scheme 2)

標識子のラクトソームへの担持は、ICG 標識ラクトソームの方法に準じフィルム法によって行うことにした。すなわちラクトソームへの  $^{18}\text{F}$ -BzPLLA の担持は、フィルム化した両親媒性ブロックポリマー PSar<sub>75</sub>-block-PLLA<sub>30</sub> と  $^{18}\text{F}$ -BzPLLA に、水を加えて約 50°C にて 42 kHz の超

音波を 15 分間照射して粒子化することで可能であった。粒子化に用いた  $^{18}\text{F}$  放射能の 99% 以上がラクトソームに担持することを確認し、 $^{18}\text{F}$  標識ラクトソームの調製を達成した。全合成時間は 200~220 分であり、得られた  $^{18}\text{F}$  標識ラクトソームは小動物 PET 評価実験に用いるのに十分な量の放射能を有していた。

得られた  $^{18}\text{F}$  標識ラクトソームを、担癌マウスに投与し小動物用 PET で評価したところ、腫瘍の描画が可能であった。血中滞留性のため体幹部の放射能は高いレベルで推移したものの、肝臓など細網内皮系の特定の臓器に特異的に放射能が集積することは認めなかった。このことから  $^{18}\text{F}$ -BzPLLA を担持させても、ラクトソームとして性質には大きな影響を与えず、EPR 効果とステルス特性は保持されていることが示された。(Figure 5)

$^{18}\text{F}$  標識ラクトソームの調製法は、放射性ヨウ素標識ラクトソームの調製にも容易に転用が可能であった。 $^{18}\text{F}$ -SFB の合成と同様に、 $^{131}\text{I}$  や  $^{123}\text{I}$  などで標識した N-succinimidyl 4-iodobenzoate を用いれば、放射性 iodoBzPLLA を効率よく得ることができ、またラクトソームへの担持も同様にフィルム法により可能であった。 $^{123}\text{I}$  標識ラクトソームを用いた担癌マウスを用いて SPECT の腫瘍イメージングも可能であった。<sup>19)</sup>

以上のことから、新素材ラクトソームは放射性標識が可能であり、腫瘍を標的とした核医学診断用分子イメージングプローブとして高いポテンシャルを有していることが示された。

## 5. ラクトソームの血液クリアランス改善の試み<sup>20)</sup>

腫瘍を標的とする核医学診断分子イメージングプローブとして高いポテンシャルを持つラクトソームであるが、改善すべき欠点があることもわかった。その 1 つが、投与後の腫瘍描画にある程度の時間を必要とすることであった。例えば、前述の ICG 標識ラクトソームの近赤外蛍光イメージング画像は投与後 2 日後の画像であり、また、 $^{18}\text{F}$  標識ラクトソームの PET 画像も投与後 6 時間を要したものである。核医学診断に用いる放射性核種は寿命が短いものが多く、また、画像診断薬としての将来の実用化を考えた場合、投与してから画像が得られるまでの時間は短いほうがよい。 $^{18}\text{F}$  標識ラクトソームの剖検により放射能分布のプロファイルを観察したところ、腫瘍への集積

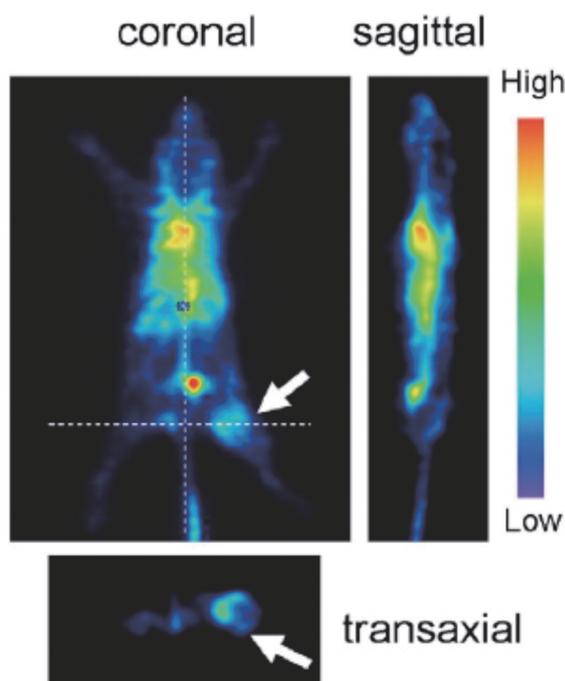


Figure 5. Typical PET images of the tumor bearing mice after injection of  $^{18}\text{F}$ -labeled Lactosome. (Reprinted from ref. 18, Fig. 4 with permission of Elsevier.)

は徐々に増加しているものの投与後比較的早い時間ですでにある程度集積していることが認められた。しかしながら、ラクトソームのステルス特性による高い血中滞留性がクリアランスを遅くしているために、結果的に腫瘍/血液比の高いコントラストが得られるまでに時間がかかってしまっていた。この改善には、ラクトソームが腫瘍にある程度集積した後に、速やかに血液から放射能がクリアランスされることが最も理想的であると考えられた。そこで、血中クリアランスがより速くなるような工夫を検討することにした。

これまで述べてきたように ICG 標識ラクトソームや各放射性標識ラクトソームは、ラクトソームを構成する主成分たる両親媒性ブロックポリマーに標識子を結合させたポリ乳酸を担持させたものであり、疎水性であるポリ乳酸はラクトソームの疎水核に保持されている。EPR 効果により腫瘍に

集積し、かつステルス特性を示して血中滞留性が高いことから、物理的には生体内においても安定な標識ラクトソームを形成していると予想される。両親媒性ポリマーの疎水性部分を構成するポリ乳酸は $3_{10}$ ヘリックス構造を有しているがL体であるため、ステレオコンプレックスを形成するD体のポリ乳酸をさらに強力に担持すると考えられる。一方で、疎水核に担持させようとするポリ乳酸がヘリックス構造を形成しないDL体であれば、物理的な安定性は低下することが予想される。標識子を結合したポリ-DL乳酸をラクトソームに組み込めば、PLLAに比べると血中においてラクトソームから早く標識子が脱離し代謝排泄される。一方で、EPR効果によって腫瘍組織に集積した標識ラクトソームの標識子はラクトソームから脱離したとしてもその場に留まってくれば、結果として投与後の腫瘍描画時間の短縮につながると考

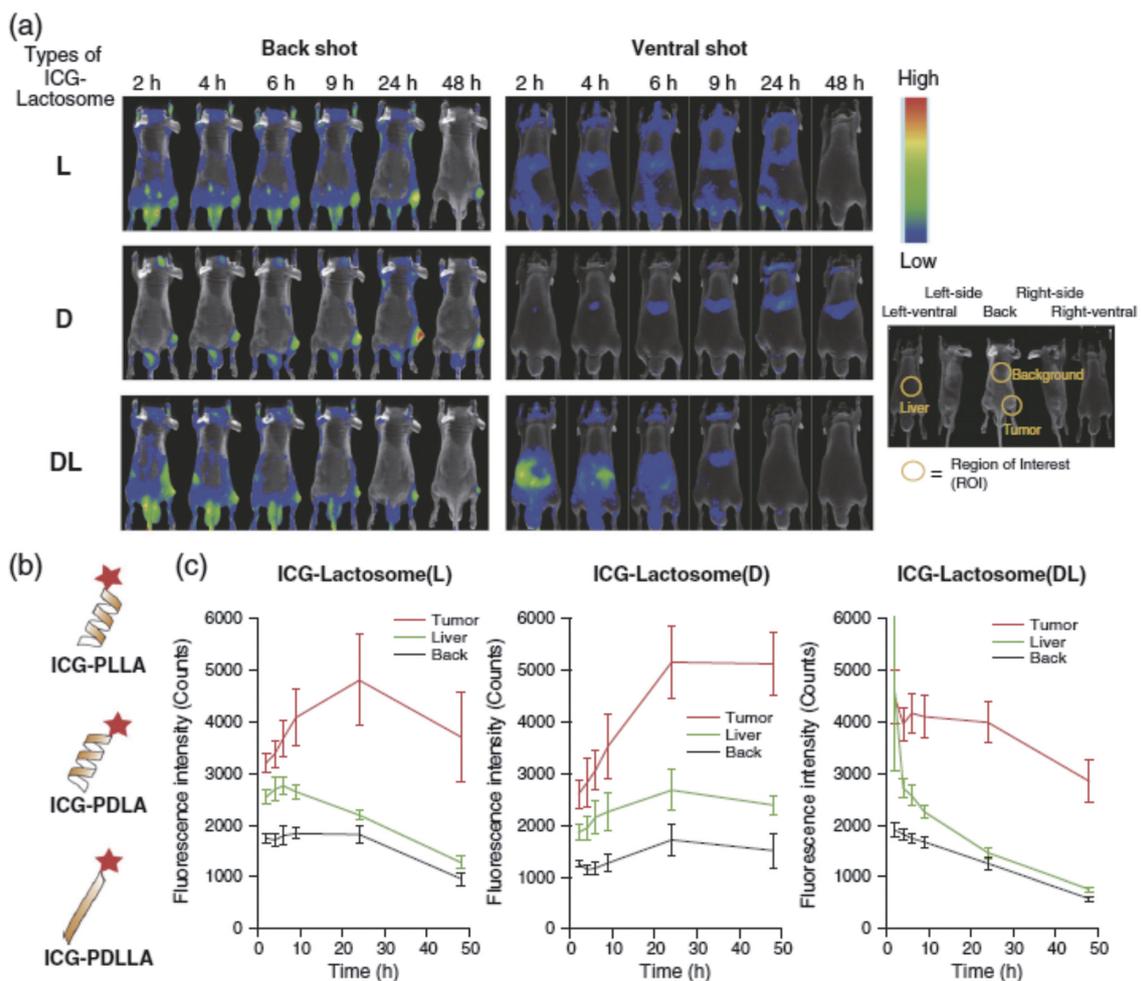


Figure 6. *In vivo* imaging of subcutaneous pancreatic cancer-bearing mouse using three types of ICG-Lactosomes (a). Graphical image of three of ICG-poly(lactic acid)s used for Lactosome labeling (b). Time-courses of near infrared fluorescence signal intensities detected at three ROIs as illustrated in Figure 6a (c). (Reprinted from ref. 20, Fig. 2 with permission of Elsevier.)

えられた。

そこで、ラクトソームに担持させる標識ポリ乳酸を、立体配置が異なるD体 (PDLA), L体 (PLLA), DL体 (PDLLA) とで変え、血中安定性や腫瘍イメージングの違いを調べた。評価はICG標識体を用いた近赤外蛍光イメージングにて行った。3種類の標識ポリ乳酸は、それぞれL-ラクチド、D-ラクチド、DL-ラクチドを出発原料として重合度30のポリ乳酸を合成し、それぞれ活性エステル体であるICG-OSuと反応させてICG-ポリ乳酸を合成した。ICG-ポリ乳酸は、水中において両親媒性ブロックポリマーとともに自己集合させることで、それぞれICG標識ラクトソーム (ICG-Lactosome (L), ICG-Lactosome (D), ICG-Lactosome (DL)) を得た。それぞれのラクトソームを担癌マウスに尾静脈投与し近赤外蛍光イメージングを行ったところ、異なるタイムコースが得られる結果となった。(Figure 6)

ICG-Lactosome (L) は、投与後すぐに全身に蛍光シグナルが広がり、徐々に腫瘍組織に集積することをすでに報告している。腫瘍組織の蛍光シグナルは投与後24時間で最大を示した。ICG-Lactosome (D) はICG-Lactosome (L) と同様に投与後24時間で腫瘍組織への最大集積を示したが、ICG-Lactosome (L) が徐々に腫瘍組織からの蛍光強度が減弱しているのに対しICG-Lactosome (D) はさらに24時間後までの腫瘍組織の蛍光強度が保持された。一方で、ICG-Lactosome (DL) はすぐに全身に蛍光シグナルが分布しバックグランドは急速に減じていった。ICG-Lactosome (DL)

投与群の腫瘍部位の蛍光強度は4~24時間にかけてほぼ同じレベルのままであり、EPR効果が低いのではないかと考察した。これらのことから、ラクトソームのミセル疎水核に保持する標識子の立体化学が、血中の標識ラクトソーム安定性をコントロールしていることが示唆された。

それぞれのICG標識ラクトソームについて血中半減期を評価したところ、ICG-Lactosome (L) は24時間、ICG-Lactosome (D) は54時間、ICG-Lactosome (DL) は14時間と計算され、血中における安定性がICG-Lactosome (D) > ICG-Lactosome (L) > ICG-Lactosome (DL) であると示唆された。ICG-Lactosome (DL) に注目すれば、投与後24~48時間にかけては、他のラクトソームに比べて腫瘍/バックグランド比が高く推移し、腫瘍イメージのコントラストは良好であることが予想された。しかしながら投与直後の腫瘍集積量そのものは他よりも低かった。その理由についてはさらに詳細に検討する必要があるが、EPR効果による腫瘍集積は血中滞留性に大きく依存していること、腫瘍集積後の標識子の漏出があることなどの可能性が考えられる。いずれにせよ投与後初期の腫瘍/バックグランド比の違いはほとんど認められなかったため、標識ラクトソームの血液クリアランスを改善する本戦略は、優れた腫瘍イメージを得るための時間短縮の大きな改善につながらないと考えている。(Figure 7)

臨床で用いられるPET核種は物理的半減期の短いものが多く、FDG-PETなど汎用的に用いられる<sup>18</sup>Fは約110分である。時間がかかっても<sup>18</sup>F標識

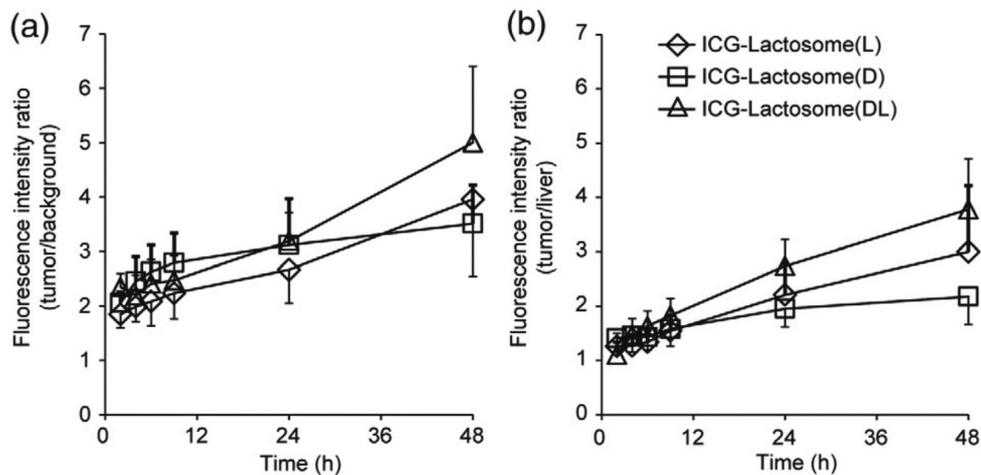


Figure 7. Time-courses of fluorescence intensity ratio at tumor against background (a) and liver (b). (Reprinted from ref. 20, Fig. 4 with permission of Elsevier.)

ラクトソームを用いて十分な腫瘍イメージを得ようとすれば放射能投与を多くする必要があるが、臨床応用を考えると放射能使用には制限があり現実的ではない。現状のラクトソームの性質では $^{18}\text{F}$ 標識ラクトソームを使った臨床応用の実現は厳しいといえる。最近、 $^{76}\text{Br}$ （半減期 16.2 時間）や $^{64}\text{Cu}$ （半減期 12.7 時間）など寿命の長い PET 核種の臨床利用について検討もされ始めているが、日本での実用化はまだ時間がかかりそうである。核医学診断技術としては、PET と比較すると解像度や定量性の面では劣っているものの汎用性の高い SPECT がある。SPECT への応用を考えた場合、数時間から数日の半減期核種も汎用されているため、多少の時間がかかっても腫瘍画像化は期待できるかもしれない。

## 6. ラクトソームの ABC 現象とその解決の試み

ラクトソームを腫瘍標的イメージングプローブとして臨床応用するためには、もう 1 つ改善すべき欠点があった。それは、単回投与においては前述のように、小動物 PET によって腫瘍組織を PET イメージングできたり、肝臓に移植した肝臓がんのみを近赤外蛍光イメージング化したりと、ステルス性によって細網内皮系への集積をせずに腫瘍描画が可能であるが、同じ個体に 2 回以上投与すると 2 回目以降はステルス性を全く失いラクトソームは血中から速やかに肝臓に移行することであった。この accelerated blood clearance (ABC) 現象と呼ばれ

る薬物動態の変化により、複数回投与において標識ラクトソームは腫瘍をイメージできないことが判明した。<sup>21)</sup> ABC 現象の発現は、Doxil など臨床的に利用されている PEG 化リポソームにおいても起こることが知られており、初回投与ではステルス性を示しているものの脾臓が主要な働きを示す免疫システムに認識されて抗-PEG IgM が産生することが明らかとなっている。<sup>22-24)</sup>

担癌マウスにラクトソームを投与して 7 日後に、再び ICG 標識ラクトソームを投与し近赤外蛍光イメージングを行った結果、7 日前にラクトソームを投与しなかった単回投与群では投与後すぐに全身に分布し、24 時間後には腫瘍組織が鮮明にイメージングしたのに対し、複数回投与群で投与後すぐに肝臓へ集積し、その後 24 時間まで肝臓への集積が継続したが腫瘍組織が描画することはできなかった。(Figure 8)

さらに、ラクトソームの初回投与後の血漿中における抗ラクトソーム IgM 量の変化について ELISA 法を用いて評価したところ、投与 1 週間で顕著に増大した。このことは、ラクトソームは PEG 化リポソーム同様に、IgM 抗体が複数回投与における体内動態の変化をもたらしている原因であることを示した。(Figure 9)

IgM のほか IgG<sub>3</sub> の生成量についても調べたところ、IgM はラクトソームの初回投与 3 日目から始まり 4 日目でプラトーに達した。一方の IgG<sub>3</sub> 生成は IgM よりも遅れて 5 日目に優位な増加がみられ

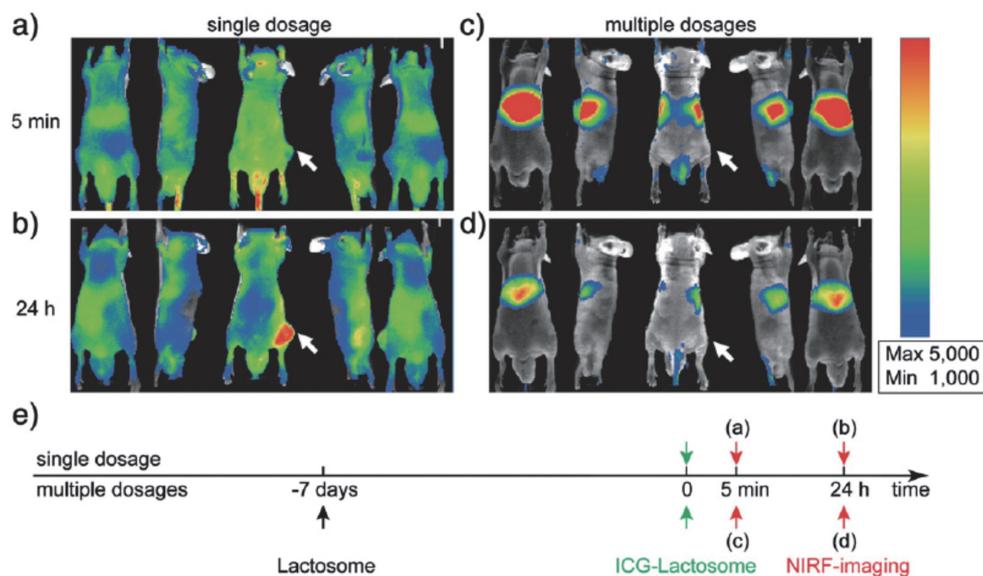


Figure 8. Pharmacokinetic change of Lactosome on the multiple administrations. (Reprinted from ref. 21, Fig. 1 with permission of Elsevier.)

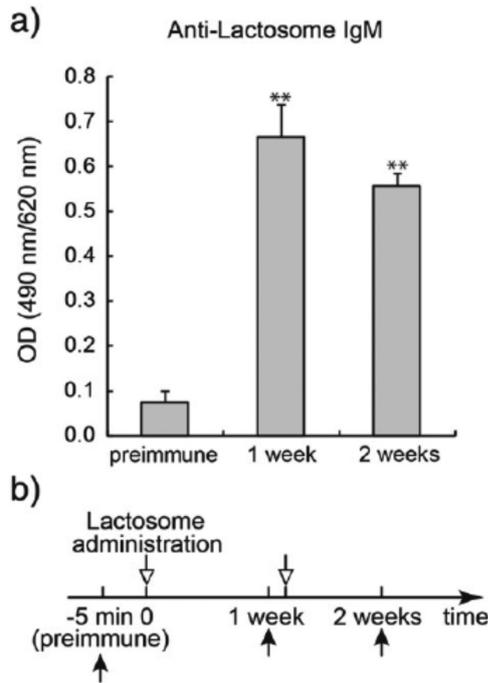


Figure 9. Produced amount of anti-Lactosome IgM determined by ELISA (a) and time schedule for the experiment (b). (Reprinted from ref. 21, Fig. 2 with permission of Elsevier.)

た。これらの結果は、近赤外蛍光イメージングによる ABC 現象の画像解析の評価とも一致するものであった。また、初回投与3カ月経過後であっても ABC 現象が起こることが確認された。(Figure 10) さらに、マウスの種を変えてラクトソームの ABC 現象を確認したところ、多くのマウスで生じることが確認されたが、B-リンパ球をノックアウトしたマウスについては生じなかった。

ABC 現象がヒトで起きるかどうかは不明であるが、臨床応用を考えた場合、画像診断は複数回の検査が想定されるため ABC 現象を回避するラクトソームである必要がある。ラクトソームの分子構造の変換など合成化学的に回避できないかを検討するために、ラクトソームの構成ポリマーのどの官能基や構造がエピトープとなっているのか調べた。サルコシンモノマーやダイマー、サルコシンとポリ乳酸とリンカーや、乳酸ポリマー、ダイマー、ポリサルコシンなどでそれぞれ抗ラクトソーム IgM の発現を調べた結果、粒子であるラクトソーム以外では少量で抗体生成が認められず、結局ラクトソームを構成する両親媒性ポリマーの

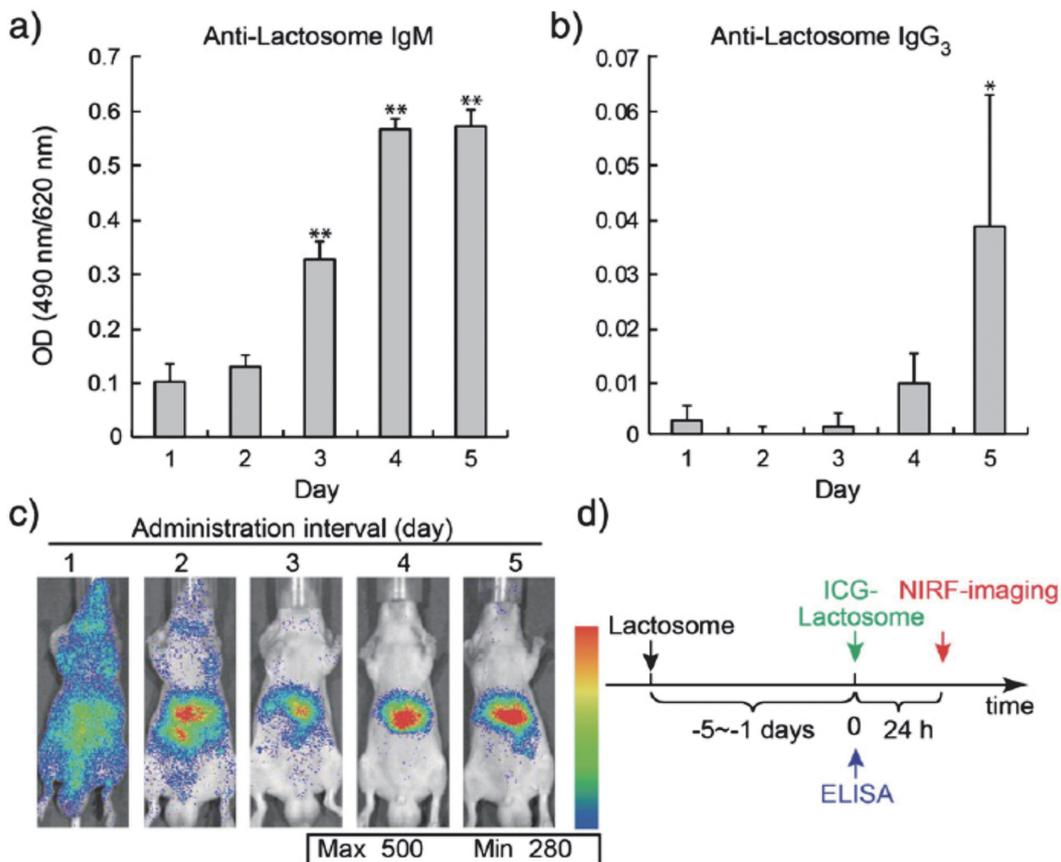


Figure 10. Time course analyses of productions of anti-Lactosome antibodies after Lactosome administration. (Reprinted from ref. 21, Fig. 3 with permission of Elsevier.)

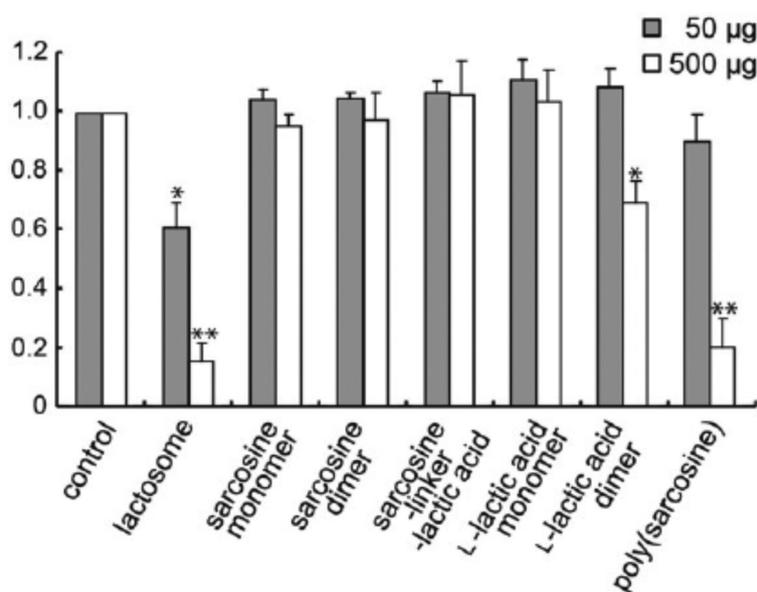


Figure 11. Competitive inhibition assay of various compounds by ELISA with using blood serum containing anti-Lactosome antibodies. (Reprinted from ref. 21, Fig. 5 with permission of Elsevier.)

中でエピトープとなる部分はわからないままであった。(Figure 11) すなわち両親媒性ブロックポリマーは、ナノ粒子になって初めて免疫システムに認識されていることが示唆された。

ところで、PEG 化リポソームにおいては、大量の PEG 化リポソーム投与を行えば IgM の産生に主要な役割を果たしている B 細胞の活性を欠乏させる免疫寛容を起こすことが報告されている。IgM 産生は ABC 現象と深く関わっていることが示唆されるため、リポソームと同様にラクトソームも免疫寛容を利用することで ABC 現象を回避できる可能性がある。そこで、ラクトソームについても投与量をコントロールして免疫寛容による ABC 現象の変化を調べた。<sup>25)</sup> 初回のラクトソーム投与量を変え 7 日後の 2 回目の ICG 標識ラクトソームの投与を一定にした検討を行った。1 回目の投与量が 50 mg/kg までは強い ABC 現象が観察されマウスの腫瘍組織への描画はできなかったが、投与量が 150 mg/kg を超えると肝臓への集積はあるものの、ABC 現象は幾分軽減され腫瘍組織の描画が可能であった。特に 350 mg/kg 投与においては腫瘍への集積は顕著であった。初回投与 7 日後の血漿中の抗ラクトソーム抗体の量は、初回投与量依存的に減少しており特に投与量 100 mg/kg 以上で優位に減少しており、免疫寛容が生じていることが示唆された。ラクトソームに毒性がないことが前提とはなるが、ABC 現象を軽減する 1 つの可能性

として、大量投与をあらかじめ行う投与条件によって免疫寛容を生じさせ、腫瘍画像を得る方法が考えられるかもしれない。

Oku らは、約 10~30 nm の粒径のナノ粒子は ABC 現象が観察されなかったと報告している。<sup>26,27)</sup> これまで我々が研究を推進してきたラクトソームは、そのポリマー編成が PLLA<sub>30</sub>-block-PSar<sub>70</sub> の直鎖構造（以下 AB 型と称し AB 型ポリマーからなるラクトソームを AB ラクトソームと称する）であり、ミセルの粒径は 30 nm 程度である。ラクトソームのステルス性は、高分子ミセル表面に存在する稠密なポリサルコシンのブラシ構造が重要であるため、<sup>28,29)</sup> ポリサルコシンの表面密度を保持したままラクトソーム粒子を小型化することができれば、ABC 現象発現を軽減できる可能性が期待できると考えた。リン脂質の自己組織化では、構成分子の分子構造と自己組織化体の形状との相関関係を、臨界充填パラメーターによって説明することができるので、これに従って集合体の形状を考えた場合、疎水基が同一の化合物からより小さな粒径のミセルを調製するには親水性部位の分子断面積を大きくすることが適切である。そこで、新しいラクトソームとして、PLLA の 30 量体に対していくつか分岐したポリサルコシン鎖が結合した両親媒性ポリマーを設計したところ、ポリサルコシン鎖が 3 つに分岐した A<sub>3</sub>B 型両親媒性高分子が粒径 20 nm 程度の小さなミセルを形成すること

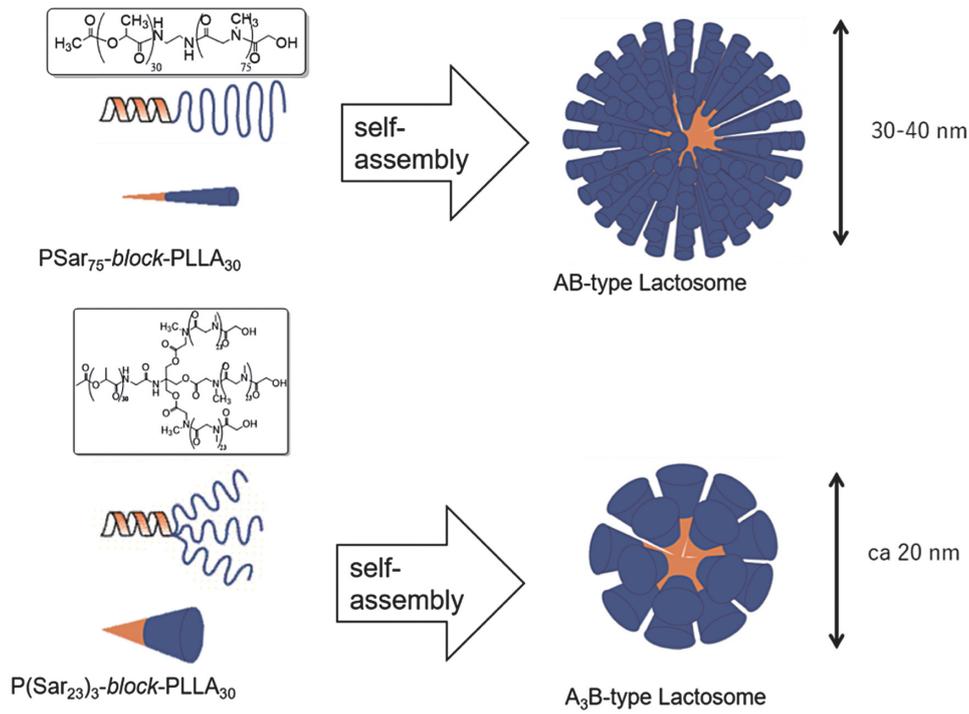
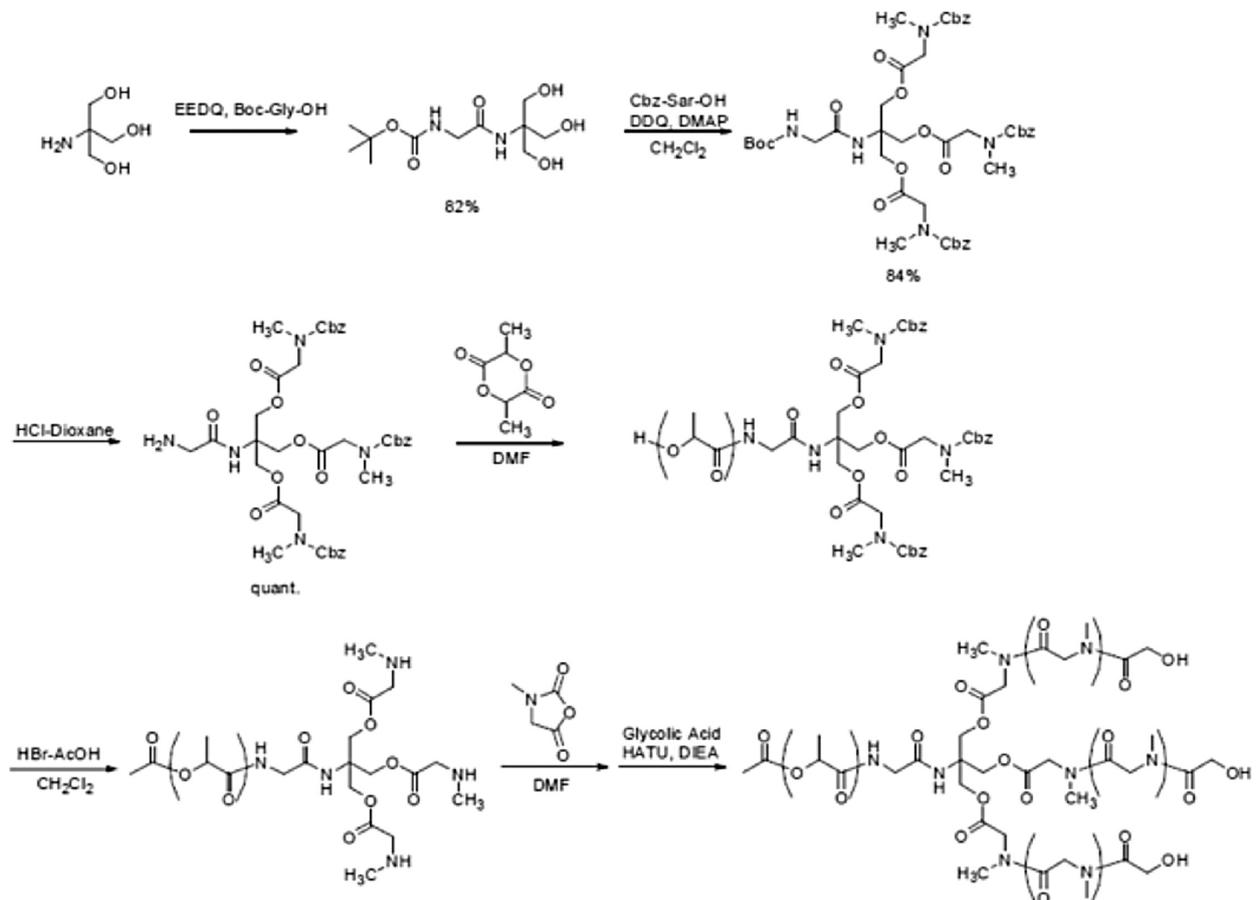


Figure 12. Schematic illustration of the AB-type Lactosome and A<sub>3</sub>B-type Lactosome.



Scheme 3. Synthesis of A<sub>3</sub>B-type amphiphilic block polymer P(Sar<sub>23</sub>)<sub>3</sub>-block-PLLA<sub>30</sub>

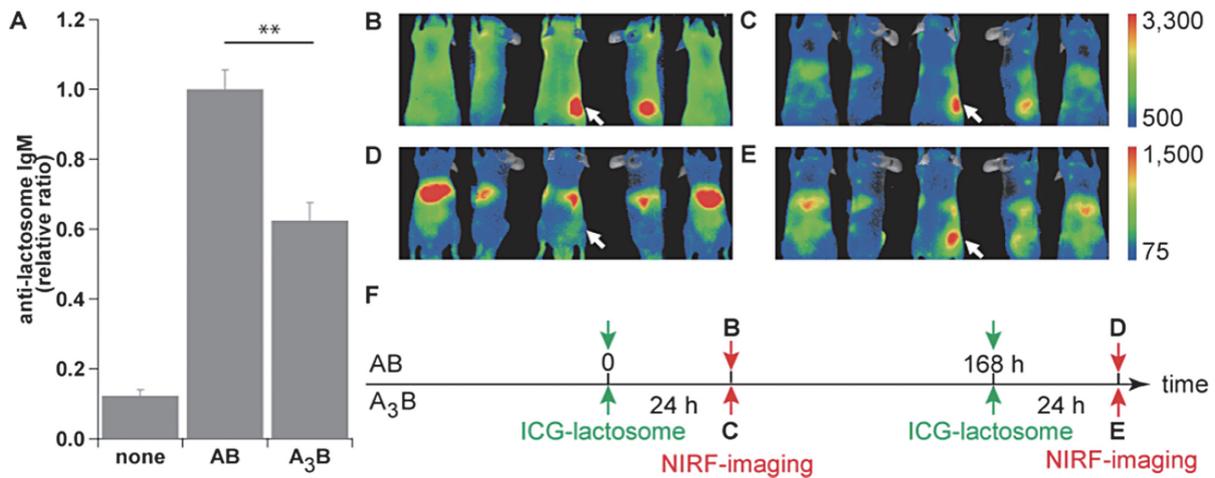


Figure 13. IgM productions upon the administrations of the AB-type and the A<sub>3</sub>B-type Lactosomes (A). Pharmacokinetic change (near infrared fluorescence images) upon multiple doses of AB-type (B, D) and the A<sub>3</sub>B-type Lactosomes (C, E). The images (D, E) were taken at 7 days after the first administration of the AB-type and A<sub>3</sub>B-type Lactosome. (Reprinted from ref. 31, Fig. 2 with permission of publisher.)

が分かった。A<sub>3</sub>B型両親媒性ブロックポリマーは、疎水性部位と親水性部位のリンカーとなる構造部位を開始剤としてポリ乳酸部位、ポリサルコシン部位を重合反応により合成することで達成した。<sup>30)</sup> (Figure 12, Scheme 3)

ICG標識ポリ-L-乳酸 (ICG-PLLA) を担持させることで標識したICG標識A<sub>3</sub>Bラクトソームを用いて担癌マウスのin vivo近赤外蛍光イメージングを行った。その結果、A<sub>3</sub>B型ラクトソームも従来のAB型ラクトソームと同様に、腫瘍組織に集積した。A<sub>3</sub>B型ラクトソームは投与後6時間で腫瘍組織への蛍光強度が最大となるなどイメージングにかかる時間も短縮された。また、AB型ラクトソームと同様にステルス特性を保持しており、肝臓への分布が少なかった。一方でA<sub>3</sub>Bラクトソームの初回投与7日後に再度投与した場合において、投与直後に肝臓への集積量の若干増加は認められるものの投与6時間後には腫瘍組織への集積が認められた。すなわち、AB型ラクトソームで見られたABC効果による腫瘍組織への集積阻害を軽減し、A<sub>3</sub>B型ラクトソームでは腫瘍組織の複数回イメージングが可能であった。また、A<sub>3</sub>B型ラクトソームの抗ラクトソームIgMの生成はAB型ラクトソームと比較して少なかった。<sup>31)</sup> (Figure 13)

以上のことから、粒径20 nmのA<sub>3</sub>B型ラクトソームは頻回投与型のナノ粒子として可能性が示され、A<sub>3</sub>B型ラクトソームはABC現象による腫瘍集積阻害をある程度回避させるラクト

ソームとして、分子イメージングプローブの開発が可能であると考えられた。

## 7. 治療薬としてのラクトソーム

ラクトソームは、EPR効果による腫瘍集積性を利用した分子イメージングプローブとして開発することを当面の目標としているが、抗がん治療薬としてすでに上市されているDoxilと同様、特に疎水性の高い薬物を担持できる特性を備えている。このため、分子イメージングプローブとしてだけでなく治療薬としての開発の可能性も考えられる。ラクトソームの疎水性コアに抗がん剤を内包できる可能性があり、将来は検討する余地がある。しかしながら、予備的検討において安定的に担持できるような抗がん剤は見いだしておらず、また、ラクトソームが細胞内に取り込まれ担持した薬物を放出するかどうかについても現時点では不明である。場合によっては、現在のラクトソームに細胞認識や薬物放出などのさらなる機能を付加するなどの大きな構造変化の必要も考えられるため、検討には相当の時間が必要と思われる。

分子イメージングプローブとして、これまでに研究を推進してきたラクトソームの基本構造は変化させずに治療を行う方法として、内用放射線治療を行うDDS基材としての利用が考えられる。ラクトソームは放射線標識が可能であるため、<sup>131</sup>Iや<sup>90</sup>Yなど医療でも用いられ、治療効果がある強いエネルギーのβ線放出核種で標識すれば、集積した腫瘍組織の放射線治療が期待できる。内用放射線

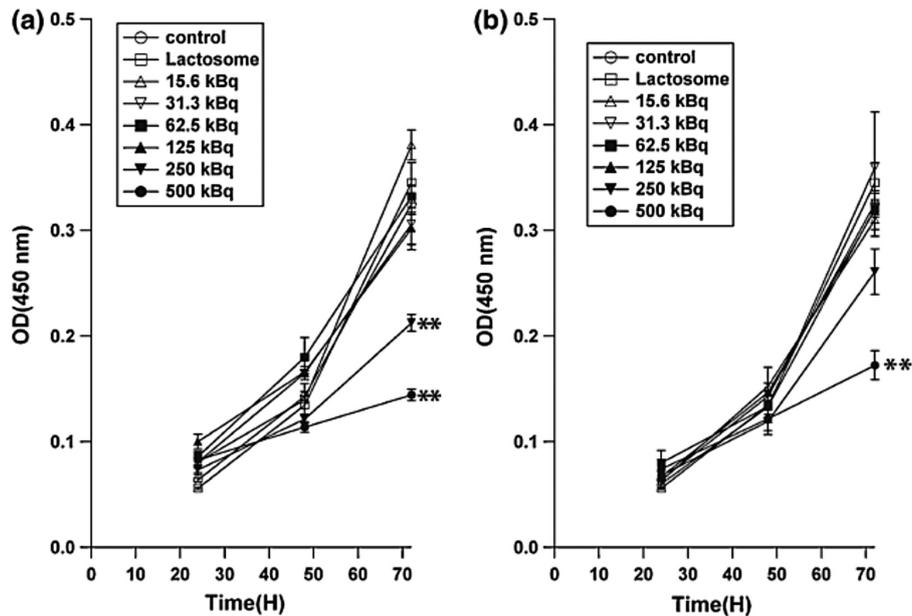


Figure 14. In vitro anti-tumor activity on 4T1 cell at 24, 48, 72 h after addition of  $^{131}\text{I}$ -Lactosome (a) and  $^{131}\text{I}$ NaI (b). \*\* $p < 0.01$  (Reprinted from ref. 32, Fig. 3 with permission of Springer.)

治療であればラクトソームからの放射性核種の遊離は必要ではなく、むしろラクトソームの生体内動態を反映させた DDS 基材として放射性核種は遊離しない方がよい。そこで、 $^{131}\text{I}$  と  $^{90}\text{Y}$  を用いた治療薬としてのラクトソームの検討を紹介する。

#### 7-1. $^{131}\text{I}$ 標識ラクトソームと PEIT 療法への併用の可能性

前述の放射性標識 AB 型ラクトソームのうち、 $^{131}\text{I}$  標識ラクトソームは  $\gamma$  線の他に  $\beta^-$  線を放出する。また、ラクトソームとして腫瘍へ特異的に集積することも確認している。この  $^{131}\text{I}$  標識ラクトソームを用いて腫瘍の内用放射線治療の可能性を検討した。<sup>32)</sup>

In vitro 評価として、4T1 細胞に対する  $^{131}\text{I}$  標識ラクトソームの放射線治療効果を調べた。培養した 4T1 細胞の培地に  $^{131}\text{I}$  標識ラクトソームを加えて、24~72 時間後の細胞数を測定したところ、1 well あたり 250 kBq 以上の  $^{131}\text{I}$  標識ラクトソームを加えた場合には、コントロール（生理食塩水）と比べて細胞数が減少した。特に 72 時間で顕著であった。比較群として  $\text{Na}^{131}\text{I}$  単独を加えた場合も同様に 250 kBq/well 以上で細胞数減少が見られたことから、 $^{131}\text{I}$  からの放射線による細胞毒性であることが示された。(Figure 14)

一方 in vivo 評価として、担癌マウスに  $^{131}\text{I}$  標識ラクトソームを  $2.0 \times 10^2$  MBq/kg 尾静脈投与しそ

の後の腫瘍増殖の抑制を 16 日間にわたって調べたところ、コントロールや非放射性ラクトソーム、NaI 投与群と比べても、腫瘍増殖抑制は認められなかった。この理由としてマウス個体ごとにバラツキが大きいことに加えて、ラクトソームの腫瘍への選択性は高いものの、集積のメカニズムは EPR 効果による能動輸送であるため集積濃度はもともと高くなく、放出放射線が治療効果を十分に示すほどの  $^{131}\text{I}$  が腫瘍組織に集積しないことが考えられた。 $^{131}\text{I}$  標識ラクトソーム単独による内用放射線治療は期待できない結果が示された。

次に、経皮的エタノール注入療法 (percutaneous ethanol injection therapy 以下 PEIT 療法) との併用療法の可能性について検討した。PEIT 療法とは、細胞に対するエタノールの脱水作用とタンパク質変性作用を利用してがん細胞を死滅させる治療法で、がん部位 (腫瘍組織) に直接エタノールを注入して治療する低コストで安全性の高い治療法である。しかしながら、PEIT 療法によって腫瘍組織のすべてのがん細胞を死滅させることは極めて難しいため、生き残った細胞による再発の可能性があるなど予後が悪いことでも知られている。<sup>33-35)</sup> EPR 効果を示す粒径のナノ粒子は腫瘍組織だけでなく血管透過性が高くなった炎症部位にも浸潤することが知られている。<sup>3)</sup> PEIT 療法はしばしば炎症を伴うことが指摘されているため、<sup>36-38)</sup> PEIT

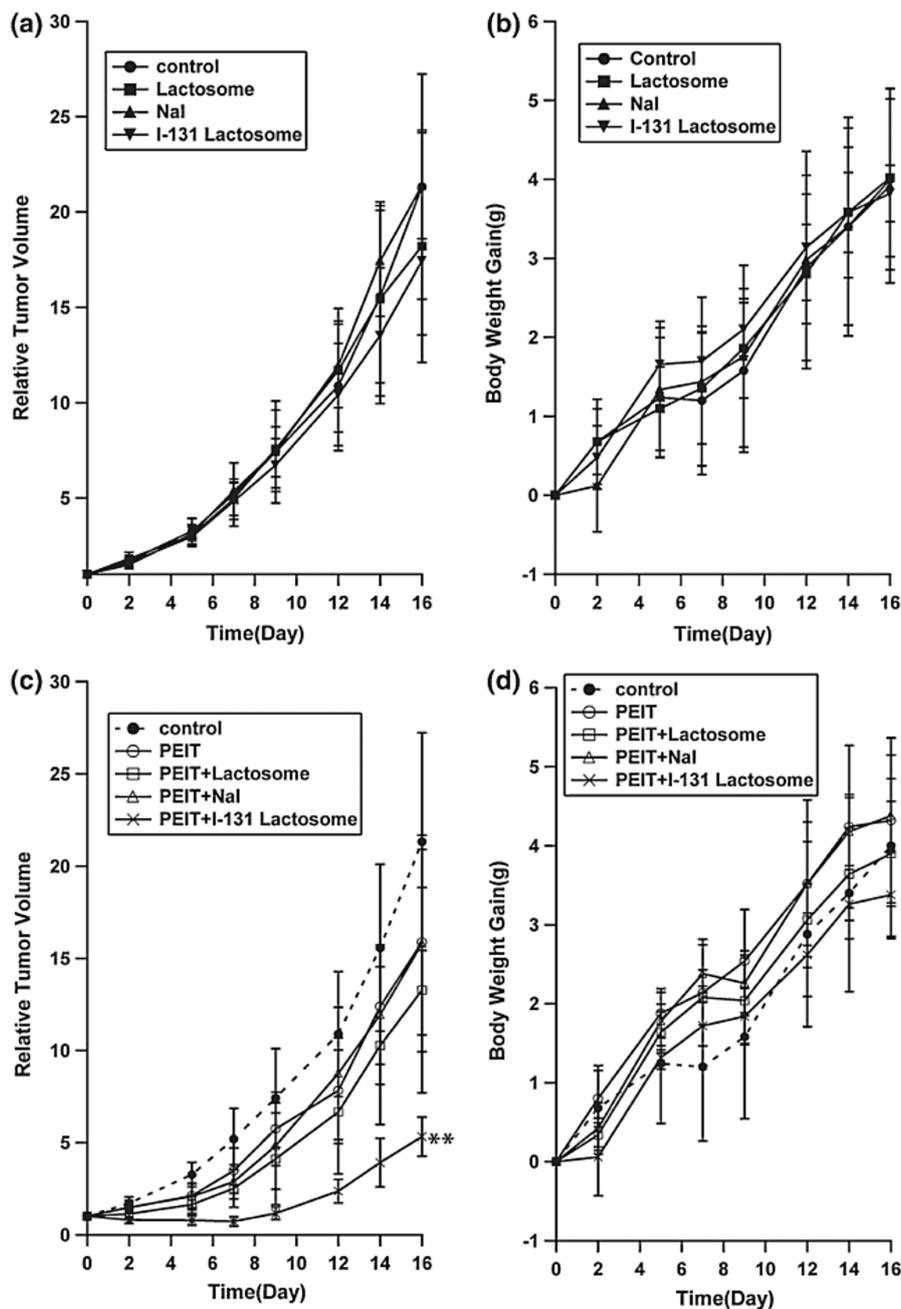


Figure 15. Time courses of a RTV and b body weight gain without PEIT (n=5 per group). Filled circle control (saline), filled square Lactosome, filled triangle  $^{131}\text{I}$ NaI, and inverted triangle  $^{131}\text{I}$ -Lactosome (100  $\mu\text{L}$ ), respectively, intravenously administrated. Time courses of c RTV and d body weight gain with PEIT (n=5 per group). Filled circle control (saline), open circle PEIT only, open square PEIT in combination with Lactosome, open triangle PEIT in combination with  $^{131}\text{I}$ NaI, times PEIT in combination with  $^{131}\text{I}$ -Lactosome. \*\*p<0.01 (Reprinted from ref. 32, Fig. 6 with permission of Springer.)

療法後に生残しているがん細胞を死滅させる増強剤として  $^{131}\text{I}$  標識ラクトソームが利用できるのではないかと考えた。担癌マウスにおいて PEIT 療法と  $^{131}\text{I}$  標識ラクトソーム投与を併用して腫瘍の増殖を観察した結果、PEIT 単独における腫瘍増殖よりもさらに抑制されることがわかった。(Figure 15) 以

上のことから、PEIT との併用療法は放射性標識ラクトソームの治療利用への 1 つの可能性を示した。

## 7-2. $^{90}\text{Y}$ 標識ラクトソーム

$^{90}\text{Y}$  は 2.28 MeV の強い  $\beta$ -線を放出する半減期約 64 時間の治療用放射性核種である。In vivo 治療用放射性医薬品として表面に CD タンパク質を有す

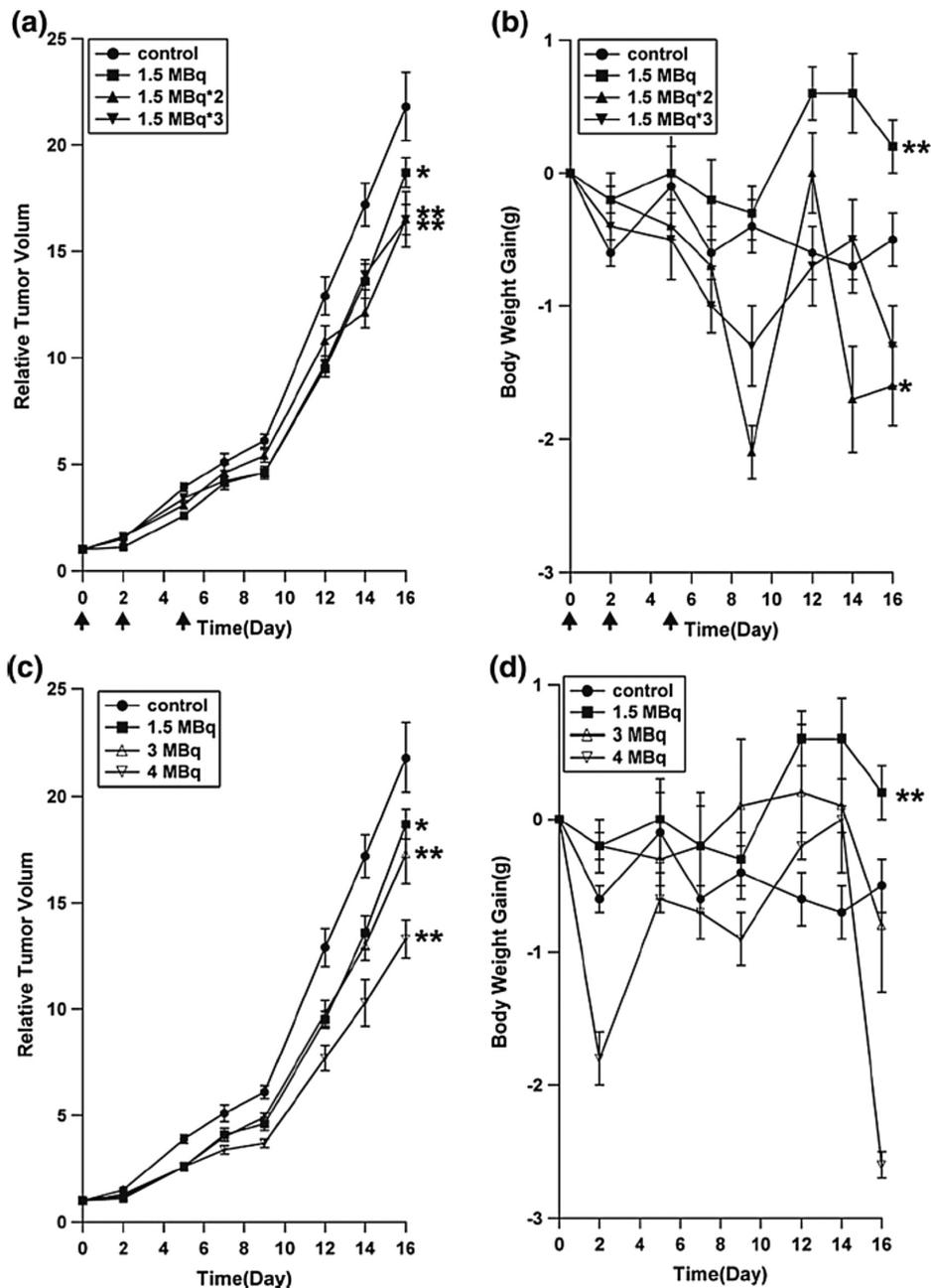


Figure 16. Time courses of a relative tumor volumes and b body weight gain (n=6 per group). Filled circle control (saline), filled square  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Lactosome (1 time), filled triangle  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Lactosome (2 times), and inverted filled triangle  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Lactosome (three times) was respectively intravenously administrated at day 0 (1 time group), day 0, 2 (2 times group), and day 0, 2, 5 (3 times group), respectively. The black arrows show injection days. Time courses of c relative tumor volumes and d body weight gain (n=6 per group). Filled circle control (saline), filled square  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Lactosome (1.5 MBq/mouse), open triangle  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Lactosome (3 MBq/mouse), and inverted open triangle  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Lactosome (4 MBq/mouse). \*p<0.05; \*\*p<0.01 (Reprinted from ref. 39, Fig. 5 with permission of Springer.)

る悪性リンパ腫の内用放射線治療薬としてイブリツモマブチウキセタン（ゼヴァリン）を標識したものが実用化されている。そこで $^{90}\text{Y}$ 標識ラクトソームの合成と腫瘍に対する治療効果について検討した。<sup>39)</sup>ラクトソームの標識方法としては、 $^{18}\text{F}$ や $^{131}\text{I}$ と同様に標識したポリ乳酸を両親媒性ポリ

マーとともに自己集合させ標識ラクトソームとすることにした。イットリウムを安定して導入するために1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)を有するポリ-D-乳酸(DOTA-PDLA<sub>30</sub>)に、 $^{90}\text{Y}$ -塩化イットリウムを加えて $^{90}\text{Y}$ をDOTAとのキレート結合構築による標識

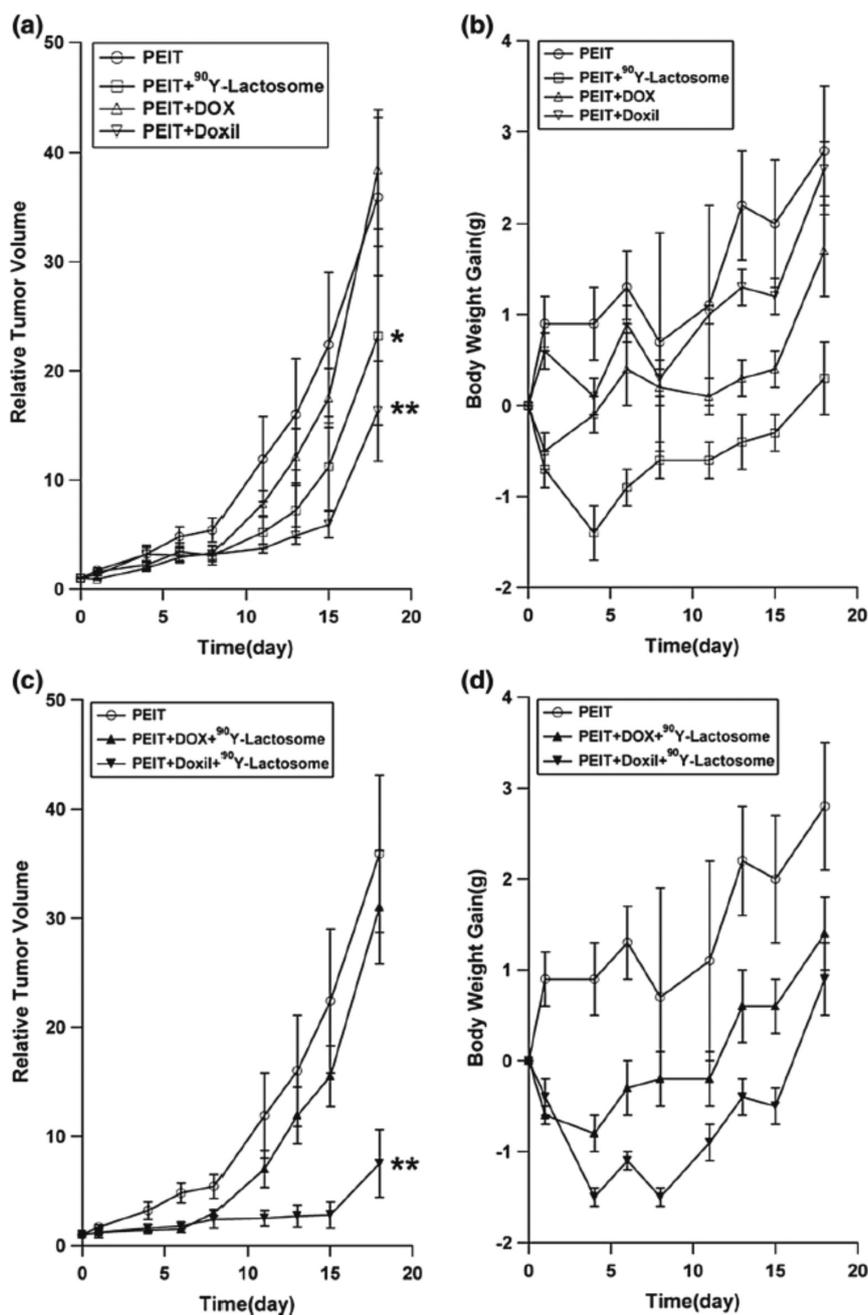


Figure 17. Time courses of a relative tumor volumes and b body weight gain ( $n=5$  per group). Open circle PEIT only, open square PEIT in combination with  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Lactosome ( $^{90}\text{Y}$ -Lactosome), open triangle PEIT in combination with doxorubicin, inverted open triangle PEIT in combination with DOXIL. Time courses of c relative tumor volumes and d body weight gain ( $n=5$  per group). Open circle PEIT only, filled triangle PEIT in combination with doxorubicin and  $^{90}\text{Y}$ -Lactosome, and inverted filled triangle in combination with DOXIL and  $^{90}\text{Y}$ -Lactosome. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  (Reprinted from ref. 39, Fig. 6 with permission of Springer.)

を行った。複数回投与の検討も考慮し ABC 現象の軽減のためにラクトソーム表面のサルコシン密度をある程度高めるために、 $^{90}\text{Y}$ -DOTA-PLLA<sub>30</sub> を担持するためのラクトソームミセルを構成する両親媒性ポリマーは、A<sub>3</sub>B 型と AB 型の混合物とした。(Figure 18) ポリサルコシン表面密度が 0.12 chain/nm<sup>2</sup> の (P(Sar<sub>33</sub>))<sub>3</sub>-block-PLLA<sub>30</sub> は、PSar<sub>33</sub>-

block-PLLA<sub>30</sub> と混合することで 0.22 chain/nm<sup>2</sup> に、また、0.074 chain/nm<sup>2</sup> である (P(Sar<sub>50</sub>))<sub>3</sub>-block-PLLA<sub>30</sub> は、PSar<sub>54</sub>-block-PLLA<sub>30</sub> と混合することで 0.10 chain/nm<sup>2</sup> と密度を上げることができるため、これまでの検討から ABC 現象の原因となる免疫反応を軽減すると考えられた。(P(Sar<sub>33</sub>))<sub>3</sub>-block-PLLA<sub>30</sub>/PSar<sub>33</sub>-block-PLLA<sub>30</sub> を用いたラクトソーム

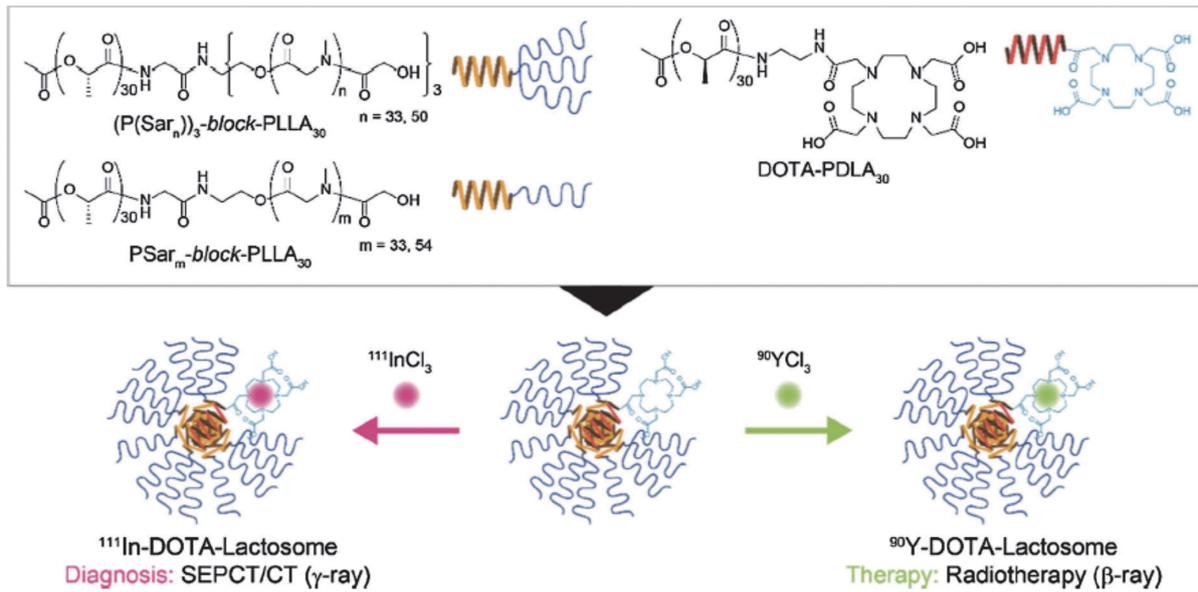


Figure 18. Time courses of a relative tumor volumes and b body weight gain ( $n=5$  per group). Open circle PEIT only, open square PEIT in combination with  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Lactosome ( $^{90}\text{Y}$ -Lactosome), open triangle PEIT in combination with doxorubicin, inverted open triangle PEIT in combination with DOXIL. Time courses of c relative tumor volumes and d body weight gain ( $n=5$  per group). Open circle PEIT only, filled triangle PEIT in combination with doxorubicin and  $^{90}\text{Y}$ -Lactosome, and inverted filled triangle in combination with DOXIL and  $^{90}\text{Y}$ -Lactosome. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  (Reprinted from ref. 39, Fig. 6 with permission of Springer.)

の粒径は 22.9 nm で、 $(\text{P}(\text{Sar}_{50}))_3\text{-block-PLLA}_{30}/\text{PSar}_{54}\text{-block-PLLA}_{30}$  を用いた場合は 25.4 nm であった。

4T1 担癌マウスに  $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソームを投与して、16 日間におけるその治療効果を評価した。マウス 1 匹あたり 1.5 MBq を 1 回投与した群と、初回投与 2 日後に 2 回目の投与を行った群、さらに、5 日目に 3 回目の投与を行った群をそれぞれ検討したところ、16 日後の腫瘍体積は、投与回数が多い方が減少した。また、マウス 1 匹あたりの投与量を 1.5, 3, 4 MBq と変化させた単回投与を検討したところ、16 日後の腫瘍体積は放射能投与量依存的に減少した。(Figure 16)

$^{131}\text{I}$  標識ラクトソームは PEIT 療法との併用により腫瘍増殖抑制を増強したが、 $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソームでも PEIT 療法との併用を検討した。さらに、抗がん剤であるドキソルビシンや Doxil との併用も検討した。PEIT 療法と  $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソームの併用は、PEIT 療法単独に比べて治療 18 日後の腫瘍体積は有意に減少した。また、PEIT 療法と Doxil と  $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソームの三者同時併用は、PEIT +  $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソームや PEIT + Doxil の併用と比べて、さらに顕著な減少を示した。これらのことから、 $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソームは投与量依存的

に腫瘍増殖抑制を示し、単回投与よりも複数回投与がより腫瘍増殖抑制を示した。さらに、PEIT 療法や Doxil との併用が有効であることが示された。(Figure 17)

ところで  $^{90}\text{Y}$ -ゼヴァリンは、表面に CD タンパクを有する悪性リンパ腫だけに適用される内用放射線治療薬であるため、治療に先立ち  $^{90}\text{Y}$  の代わりに画像診断用の核種である  $^{111}\text{In}$  で標識したゼヴァリンを用いて、あらかじめ画像診断によって治療の適切性を確認する必要があることが知られる。つまり、ゼヴァリンという同じ薬物を「診断」と「治療」の療法に用いるセラノスティクス (therapy = 治療と diagnosis = 診断を組み合わせた造語) である。 $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソームも DOTA に  $^{90}\text{Y}$  の代わりに  $^{111}\text{In}$  を組み込むことが可能なため、 $^{111}\text{In}$  標識ラクトソームを調製して、腫瘍組織の画像化を試みた。 $^{111}\text{In}$  標識は  $^{90}\text{Y}$  標識ラクトソームと同様に行い、DOTA を有するポリ-D-乳酸 ( $\text{DOTA-PDLA}_{30}$ ) に、 $^{111}\text{In}$ -塩化インジウムを加えて  $^{111}\text{In}$  を DOTA とのキレート結合によって導入した。 $^{111}\text{In}$ -DOTA-PDLA<sub>30</sub> を担持するミセルを構成する両親媒性ポリマーは A<sub>3</sub>B 型と AB 型の混合物とした。(Figure 18)  $^{111}\text{In}$ -DOTA-ラクトソームを担癌マウスに投与し SPECT/CT を撮像したとこ

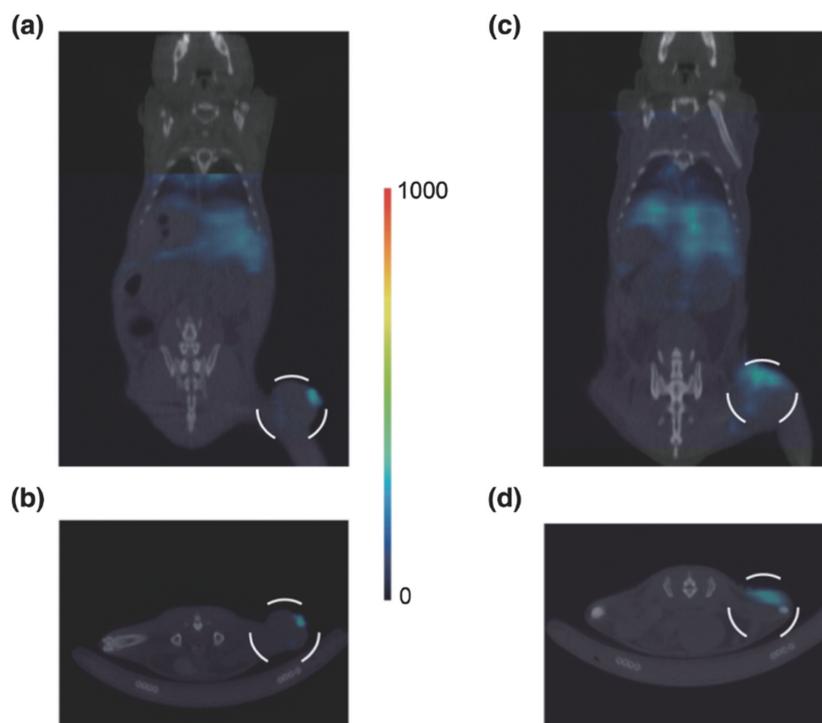


Figure 19. SPECT/CT images of the tumor-bearing mice at 24 h after the injection of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Lactosome. SPECT/CT images of the coronal plane (a, c) and the axial plane (b, d) were obtained with  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Lactosomes composed of  $(\text{P}(\text{Sar}_{33}))_3\text{-block-PLLA}_{30}/\text{PSar}_{33}\text{-block-PLLA}_{30}$  (a, b) and  $(\text{P}(\text{Sar}_{50}))_3\text{-block-PLLA}_{30}/\text{PSar}_{54}\text{-block-PLLA}_{30}$  (c, d). 4T1 tumor cells were transplanted at the femoral right leg indicated by dashed circles. (Reprinted from ref. 39, Fig. 2 with permission of Springer.)

ろ、投与後 24 時間において腫瘍のイメージングが可能であった。(Figure 19) このことから、ゼヴァリンと同様にラクトソームが集積する腫瘍をあらかじめ選定してから内用放射線治療が行うなど、今後ラクトソームをセラノスティクスとして開発展開していく可能性も期待できることが示された。

### 7-3. 光線力学療法の試み

ICG 標識ラクトソームを使った光線力学療法 (PDT) の試みも行われている。Funayama らは、ICG 標識ラクトソームを用いてラット脊髄転移に対する PDT の効果について報告した。<sup>40)</sup> ICG は蛍光色素であるが、光線力学療法を増長する光毒性を有することが知られている。<sup>41-47)</sup> 彼らはこれまでに、ICG の投与と近赤外光の照射が脊髄転移に対して光毒性を示すことや運動性麻痺の進行を遅らせることを報告してきた。ICG を単独で投与しても PDT の効果はあるが、血中タンパク質に結合して速やかに肝臓を経て排出してしまうため、投与してから PDT を行う時間に制限があった。そこで血中滞留性の高い ICG ラクトソームを用いればその時間を遅らせることが可能ではないかと考え、投与後 12 時間後における PDT の効果を検討した。<sup>48)</sup>

ラットにがん細胞を移植して 7 日後に、2 nmol/mg の低濃度 ICG ラクトソームを 5 mg 投与した群と、30.6 nmol/mg の高濃度 ICG 標識ラクトソームを 0.5 mg 投与した群を準備し、コントロール群とともに  $810 \pm 20$  nm の近赤外光を照射した。PDT の治療効果は後脚運動機能を BBB スコアにて数値化することで評価した。コントロールよりも治療効果が現れたが、濃度依存的に高いと予想していたにも関わらず結果は投与濃度の違いによる顕著な違いはなかった。彼らはまた、ICG ラクトソームが脊髄転移の病巣に特異的に集積することを蛍光イメージングで明らかにしている<sup>49)</sup> ことから、ICG ラクトソームを用いた PDT が脊髄転移の局所療法に効果的である可能性が示された。

### 8. おわりに (今後の展望)

本総説は、現在進行中のラクトソーム開発研究のうち、公表論文として公開済みの結果をもとにまとめたものである。これまでの成果として、京都大学工学研究科で開発された新しい DDS および分子プローブ用基材ラクトソームが、マウスがん組織に選択的に集積できることを明らかにし、血

中安定性や分子イメージングを用いた動態観察などによって、がん早期発見のための分子イメージングプローブのプラットフォームとして有用であることを示してきた。その一方で、腫瘍イメージングに時間がかかることや、複数回投与においてはステルス特性を失うことなど、臨床利用において解決すべき欠点もあることが判明した。ラクトソームを構成する両親媒性ブロックポリマーの親水性部位のポリサルコシンを分岐型の A<sub>3</sub>B 型とすることで、ステルス特性を有したままラクトソームの粒径をさらに小さくすることが可能となり、ABC 現象を低減して複数回投与における腫瘍組織のイメージングができた。臨床利用を目指す上で、どんな腫瘍組織を対象にするのが効果的であるか適用腫瘍を検討することも重要である。また、ヒトを対象にする場合はラクトソームの安全性評価についても調べる必要がある。これらのことについてはまだ非公開ではあるが、すでに京都大学グループの主導で検討が進められておりいくつかの適用対象に絞られつつある。また、各種毒性試験についても進行中であるが、現在のところ目立った毒性は認められていない。

最後に、筆者が東北医科薬科大学で進めていきたい基礎研究としてのラクトソーム開発について展望を述べたい。A<sub>3</sub>B 型ラクトソームは腫瘍描画に必要な時間もある程度短縮したが、<sup>18</sup>F など短半減期の PET 用核種が適用できるほどの根本的な改善には至っていないと考えている。また、腫瘍部位への集積量についても AB 型ラクトソームよりも A<sub>3</sub>B 型ラクトソームの方が小さいようである。ラクトソームの腫瘍集積メカニズムである EPR 効果は能動輸送すなわちパッシブターゲティングによるものであるため、腫瘍イメージングにかかる時間短縮や集積量の増大には限界がある。このため、筆者はもっと積極的に腫瘍組織を認識できるような機能をラクトソームに付加することが必要だと考える。ラクトソーム粒子の表面にあたる両親媒性ブロックポリマーのポリサルコシンはステルス特性に重要であるが、この部分に、がん細胞を認識する抗体や、がん細胞に過剰発現する受容体に対するリガンドを付加したり、集積した腫瘍組織の細胞内に透過させるために膜透過性タンパク質を付加したりするなどのデザインが考えられる。このような機能性官能基をラクトソームに付加することでアクティブターゲティングが可能に

なれば、がん組織特異性の向上や投与量の低減による非特異的分布の低下など、短時間での腫瘍イメージングが可能になるかもしれない。ラクトソームの表面に官能基を導入することはステルス特性が消失してしまう可能性もあるが、Shimizu らは、がん細胞膜に発現する membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) を認識するモノクローナル抗体を AB 型ラクトソームの表面に付加しても、細網内皮系にはほとんど集積せずに腫瘍組織を描画できることを近赤外蛍光イメージングで明らかにした。<sup>50)</sup> 機能性官能基の種類や表面の導入密度を検討する必要があるが、ステルス特性を維持することは可能だろうと考えている。

本研究の目的は、ラクトソームを核医学分子イメージングプローブとして開発することであるが、ラクトソームは放射性標識子だけでなく様々な薬物を担持する新しい薬物送達システムとしても期待される。放射性核種を用いたセラノスティクスの可能性について述べたが、放射性標識子と作用の治療薬を同時に担持させることも可能であると考えている。難治がんの領域において画像診断と抗がん剤治療の両面から治療成績を向上させる可能性秘めているので、本学において最適なラクトソームや適用条件を見いだし、臨床試験につなげる基盤研究を進めていきたい。

**謝辞** 本研究は筆者が所属していた京都大学探索医療センター流動プロジェクトとして始められたものであり、多くの方々のご理解とご協力を賜りました。ここにあらためて感謝の意を表します。特に東北医科薬科大学異動後の共同研究を許して下さったプロジェクトリーダーの京都大学大学院工学研究科木村俊作教授、プロジェクトを強力に推進してこられた小関英一株式会社島津製作所新事業開発室シニアマネージャーに衷心より感謝いたします。さらに本誌説執筆のために快くデータ提供いただいた元プロジェクトメンバーの原恵理博士、栗原研輔元助教をはじめ関係諸氏に心から感謝いたします。

また、多くの激励をいただいた恩師の前田稔九州大学名誉教授、佐治英郎京都大学教授、塚田秀夫浜松ホトニクス株式会社中央研究所 PET センター長、近藤科江東京工業大学教授、福田寛東北医科薬科大学教授、大久保恭仁東北薬科大学名誉

教授に感謝いたします。

本研究の一部は、JST 重点地域研究開発推進プログラム（平成 20 年度育成研究）、および JSPS 科研費 JP15K09903, JP24591821, JP22591368 の助成を受けたものです。

## REFERENCES

- 1) The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. *Annual Health, Labour and Welfare Report 2015 No.2 Health and Medical Services*, p.28–105 (2016).
- 2) Bae Y., Nishiyama N., Fukushima S., Koyama H., Yasuhiro M., Kataoka K., *Bioconjug. Chem.*, **16**, 122–130 (2005).
- 3) Fang J., Nakamura H., Maeda H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 136–151 (2011).
- 4) Lammers T., Hennink W. E., Storm G., *Br. J. Cancer*, **99**, 392–397 (2008).
- 5) Lukyanov A. N., Hartner W.C., Torchilin V.P., *J. Control. Release*, **94**, 187–193 (2004).
- 6) Maeda H., *Adv. Enzyme Regul.*, **41**, 189–207 (2001).
- 7) Matsumura Y., Maeda H., *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392 (1986).
- 8) Nishiyama N., Okazaki S., Cabral H., Miyamoto M., Kato Y., Sugiyama Y., *et al.*, *Cancer Res.*, **63**, 8977–8983 (2003).
- 9) Arima Y., *Dissertation for Doctor degree* (2007).
- 10) Moghimi S.M., Szebeni J., *Prog. Lipid Res.*, **42**, 463–478 (2003).
- 11) Fujita K., Kimura S., Imanishi Y., *Langmuir*, **15**, 4377–4379 (1999).
- 12) Kimura S., Kim D. H., Sugiyama J., Imanishi Y., *ibid.*, **15**, 4461–4463 (1999).
- 13) Kimura S., Muraji Y., Sugiyama J., Fujita K., Imanishi Y., *J. Colloid and Interface Sci.*, **222**, 265–267 (2000).
- 14) Nishikawa H., Morita T., Sugiyama J., Kimura S., *ibid.*, **280**, 506–510 (2004).
- 15) Tanisaka H., Kizaka-Kondoh S., Makino A., Tanaka S., Hiraoka M., Kimura S., *Bioconjugate Chem.*, **19**, 109–117 (2008).
- 16) Makino A., Yamahara R., Ozeki E., Kimura S., *Chem. Lett.*, **36**, 1220–1221 (2007).
- 17) Makino A., Kizaka-Kondoh S., Yamahara R., Hara I., Kanzaki T., Ozeki E., Hiraoka M., Kimura S., *Biomaterials*, **30**, 5156–5160 (2009).
- 18) Yamamoto F., Yamahara R., Makino A., Kurihara K., Tsukada H., Hara E., Hara I., Kizaka-Kondoh S., Ohkubo Y., Ozeki E., Kimura S., *Nucl. Med. Biol.*, **40**, 387–394 (2013).
- 19) Yamamoto F., Yamahara R., Kurihara K., Takeuchi E., Hara I., Makino A., Kizaka-Kondoh S., Shimizu A., Ozeki E., Kimura S., *Mol. Imaging Biol.*, **12** (Suppl.2), S948 (2010).
- 20) Makino A., Hara E., Hara I., Yamahara R., Kurihara K., Ozeki E., Yamamoto F., Kimura S., *J. Control. Release*, **161**, 821–825 (2012).
- 21) Hara E., Makino A., Kurihara K., Yamamoto F., Ozeki E., Kimura S., *Int. Immunopharmacol.*, **14**, 261–266 (2012).
- 22) Dams E.T., Laverman P., Oyen W.J., Storm G., Scherphof G.L., Van der Meer J.W., *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 1071–1079 (2000).
- 23) Ishida T., Ichikawa T., Ichihara M., Sadzuka Y., Kiwada H., *J. Control Release*, **95**, 403–412 (2004).
- 24) Koide H., Asai T., Hatanaka K., Akai S., Ishii T., Kenjo E., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **392**, 218–223 (2010).
- 25) Hara E., Makino A., Kurihara K., Sugai M., Shimizu A., Hara I., Ozeki E., Kimura S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 4046–4052 (2013).
- 26) Koide H., Asai T., Hatanaka K., Urakami T., Ishii T., Kenjo E., Nishihara M., Yokoyama M., Ishida T., Kiwada H., Oku N., *Int. J. Pharm.*, **362**, 197–200 (2008).
- 27) Koide H., Asai T., Kato H., Ando H., Shiraishi K., Yokoyama M., Oku N., *Int. J. Pharm.*, **432**, 75–79 (2012).
- 28) Nomura A., Okayasu K., Ohno K., Fukuda T., Tsuji Y., *Macromolecules*, **44**, 5013–5019 (2011).
- 29) Tsuji Y., Ohno K., Yamamoto S., Goto A., Fukuda T., *Adv. Polym. Sci.*, **197**, 1–45 (2006).
- 30) Makino A., Hara E., Hara I., Ozeki E., Kimura S., *Langmuir*, **30**, 669–674 (2014).
- 31) Hara E., Ueda M., Makino A., Hara I., Ozeki E., Kimura S., *ACS. Med. Chem. Lett.*, **5**, 873–877 (2014).
- 32) Hara E., Makino A., Kurihara K., Ueda M., Hara I., Kawabe T., Yamamoto F., Ozeki E., Togashi K., Kimura S., *J. Nanopart. Res.*, **15**, 2131 (2013).
- 33) Ebara M., Okabe S., Kita K., Sugiura N., Fukuda H., Yoshikawa M., Kondo F., Saisho H., *J. Hepatol.*, **43**,

- 458–464 (2005).
- 34) Rempp H., Boss A., Helmberger T., Pereira P., *Abdom. Imaging*, **36**, 635–647 (2011).
- 35) Minami Y., Kitai S., Kudo M., *Eur. J. Radiol.*, **81**, e277–e280 (2012).
- 36) Jansen M.C., van Wanrooy S., van Hillegersberg R., Rijken A.M., van Coevorden E., Prevoo W., van Gulik T.M., *Eur. J. Surg. Oncol.*, **34**, 662–667 (2008).
- 37) Sato S., Mishiro T., Miyake T., Okamoto E., Furuta K., Azumi T., Oshima N., Takahashi Y., Ishihara S., Adachi K., Amano Y., Kinoshita Y., *Hepatol. Res.*, **39**, 40–46 (2009).
- 38) Hernandez-Romero D., Marin F., Roldan V., Penafiel P., Vilchez J.A., Orenes-Pinero E., Giner J.A., Valdes M., Garcia-Alberola A., *Pacing. Clin. Electrophysiol.*, **36**, 31–36 (2013).
- 39) Kurihara K., Ueda M., Hara I., Hara E., Sano K., Makino A., Ozeki E., Yamamoto F., Saji H., Togashi K., Kimura S., *J. Nanopart. Res.*, **18**, 137 (2016).
- 40) Funayama T., Tsukanishi T., Hara I., Ozeki E., Sakane M., *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **10**, 374–378 (2013).
- 41) Bozkulak O., Yamaci R.F., Tabakoglu O., Gulsoy M., *ibid.*, **6**, 117–121 (2009).
- 42) Kim B.J., Lee H.G., Woo S.M., Youn J.I., Suh D.H., *J. Dermatol.*, **36**, 17–21 (2009).
- 43) Noritomi T., Yamashita Y., Kodama T., *et al.*, *Eur. Surg. Res.*, **37**, 153–158 (2005).
- 44) Sato M., Ishihara M., Arai T., *et al.*, *Laser Surg. Med.*, **29**, 282–287 (2001).
- 45) Skrivanova K., Skorpikova J., Svihalek J., Mornstein V., Janisch R., *J. Photochem. Photobiol. B*, **85**, 150–154 (2006).
- 46) Abels C., Fickweiler S., Weiderer P., *et al.*, *Arch. Dermatol. Forsch.*, **292**, 404–411 (2000).
- 47) Baumler W., Abels C., Karrer S., *et al.*, *Brit. J. Cancer*, **80**, 360–363 (1999).
- 48) Funayama T., Sakane M., Abe T., Ochiai N., *Photomed. Laser Surg.*, **30**, 47–53 (2012).
- 49) Funayama T., Sakane M., Abe T., Hara I., Ozeki E., Ochiai N., *Open Biomed. Eng. J.*, **6**, 80–84 (2012).
- 50) Shimizu Y., Temma T., Hara I., Makino A., Kondo N., Ozeki E., Ono M., Saji H., *Cancer Sci.*, **105**, 1056–1062 (2014).