

## 平成 21 年度 がん特定領域研究 若手共同研究報告書

研究課題名：

難治性がん転移巣診断に向けたマンノース修飾ナノ粒子 MRI 造影剤の開発

若手研究代表者（申請者）：白石 貢一  
所属研究機関（申請時）：財団法人神奈川科学技術アカデミー  
所属研究機関（現在）：東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター  
共同研究者：川上茂  
所属研究機関：京都大学大学院薬学研究科

研究成果概要

### 本研究の目的

本研究の目的は、腹腔内に進展するがん転移巣への新たなターゲティング手法を確立し、早期診断及び治療を目指すことである。腹腔内から全身循環血へと速やかに吸収される低分子薬剤は腹腔内において薬効が発揮されにくいものに対して、本研究は①高分子ミセルという分子量 1~2 万の合成高分子が自己集合した 10-200nm のナノ粒子を用いた MRI 造影剤と②マンノース修飾によるマクロファージや樹状細胞のような抗原提示細胞系に選択的に認識させるという特徴を有する。これら 2 つの要素技術からなり、ナノ粒子を取り込んだマクロファージが腹腔内がん転移巣へ集積する性質を利用し、難治性の腹腔内がん転移巣の高感度な MRI 診断を行うことが特色・独創的な点である。

本研究は新たながん転移巣診断用 MRI 造影剤の開発技術となることが期待されるとともに、高分子ミセルへの薬物封入によって診断薬から治療薬に移行することも可能であり、これまで達成し得なかった治療薬の効率的なターゲティングに発展することが期待される。

### 研究成果

#### ① マンノース化蛍光-MRI 標識高分子ミセルの作製

Polyethylene-*b*-poly(L-lysine)に対して、蛍光標識化合物である AlexaFluor488(インビトロジェン)を結合し、その後 MRI 造影剤である Gd-DOTA を導入し、ブロックコポリマー(1)を得た。この(1)とマンノースが結合された PEG-DSPE(Man-PEG-DSPE)を有機溶媒中で混合し、水へ透析置換することでマンノース修飾された粒子径 65nm の高分子ミセル(A)

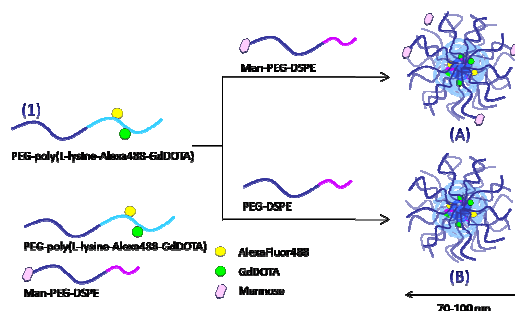


図 1 マンノース化蛍光-MRI 標識高分子ミセル

を作製した (図 1)。一方で、(1)とマンノース修飾されていない PEG-DSPE から粒子径 97nm の高分子ミセル (B)を作製した。低分子 Gd-DTPA の MRI 造影効果が、 $r_1=3.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (1.5T) であったのに対し、作製した(A)及び(B)のどちらも  $r_1=17.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (1.5T)とおよそ 6 倍に向上した。

## ② マンノース化蛍光-MRI 標識高分子ミセルの腹腔マクロファージ系細胞への取り込み検討

作製したマンノース化高分子ミセルのマンノース受容体を介したマウス腹腔マクロファージ初代培養細胞への取り込みを高分子ミセル濃度  $500\mu\text{g}/\text{well}$  において検討した (図 2)。マンノース受容体の阻害剤として Mannan( $1.0\text{mg}/\text{mL}$ )を添加し、比較検討した。その結果、図 2 に示すようにマンノース修飾した高分子ミセルのみマクロファージ細胞への取り込みが促進されていることが分かった。一方で、Mannan を添加することにより、その取り込みが阻害されていることからマンノース受容体を介しての取り込みの可能性が高いことが示唆された。

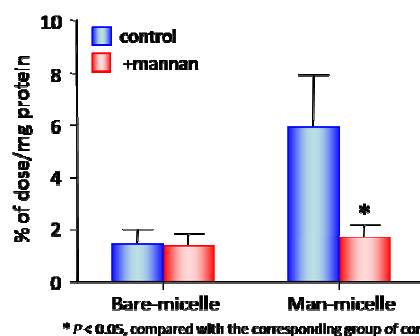


図 2 マクロファージを介した細胞への取り込み

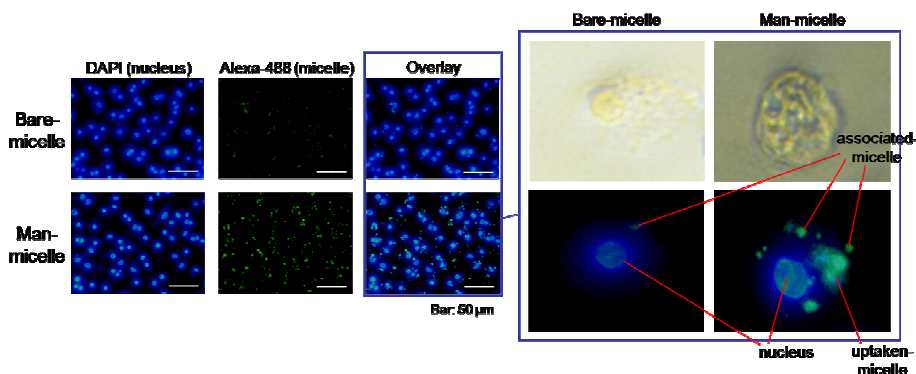


図 3 マクロファージを介した細胞への取り込みの様子

マクロファージ細胞への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察したところ、マンノース修飾高分子ミセルを用いた場合に、細胞内で高い AlexaFluor488 由来の蛍光が観察されていることから、マンノース受容体を介して取り込まれている可能性が図 3 から示唆された。

## ③ マンノース化蛍光-MRI 標識高分子ミセルの腹腔マクロファージ系細胞への取り込み検討

次に、この高分子ミセルのマクロファージ細胞に種々のエンドサイトーシス阻害剤を添加し、細胞への取り込み過程を検討した(図 4)。その細胞への取り込みの様子は非選択的な

阻害剤であるコルチニン、及びクラスリン介在性のエンドサイトーシス阻害剤であるクロルプロマジンによってその取り込みが阻害されたことから、クラスリン介在性のエンドサイトーシスに参与している可能性が示唆された。

### 総括及び今後の展望

本研究において作製したマンノース修飾高分子ミセルは低分子薬剤では発揮できない効果をナノサイズの粒子である高分子ミセルを用いることで克服できることを期待し、初代培養腹腔マクロファージへマンノースレセプター介在性エンドサイトーシスにより取り込まれる可能性を示した。今後はマクロファージへの取り込みをより詳細

に検討し、機構や特性を明らかにすることが必要であると考えられる。また、取り込まれた細胞の MRI による画像化を行い、投与濃度と MRI による検出感度の関係を検討し、動物モデルを用いた MRI による評価を行っていきたいと考えている。本研究で作製したマンノース修飾高分子ミセル MRI 造影剤を難治性の腹腔内がん転移巣を検出するための造影剤として用いて、今後、さらなる研究の展開を行いたいと考えている。

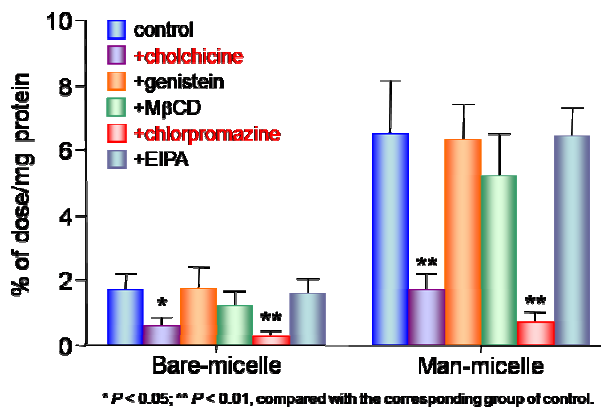


図4 マクロファージを介した細胞への取り込み