

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 深部・転移がんへの Radio-induced photodynamic (RIPD) - Theranostics
を実現する ^{89}Zr 標識・抗体担持生分解性キャリアの開発
(英語) Development of ^{89}Zr -labeled, antibody-conjugated, and biodegradable
polymeric micelle-based drug carrier for radio-induced photodynamic
theranostics of deep or metastatic cancer
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 教授 松浦栄次
所属 役職 氏名： (英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and
Pharmaceutical Sciences, Professor, Eiji Matsuura
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) ^{89}Zr 標識・ヒト低分子抗体バリエーション (scFv) 抗体担持 Lactosome による
PET イメージング診断および Cherenkov 光による光応答性治療法の開発
開発課題名： (英語) Development of PET imaging diagnostics using ^{89}Zr -labeled and
scFv-conjugated Lactosome and radio-induced photodynamic therapy
utilizing Cherenkov radiation.
- 研究開発代表者 (日本語) 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 教授 松浦栄次
所属 役職 氏名： (英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and
Pharmaceutical Sciences, Professor, Eiji Matsuura
- 分担研究 (日本語) RNA を細胞内に効率よく運び込むミセル型 DDS キャリアの開発
開発課題名： (英語) Development of a polymeric micelle-based DDS carrier for efficient
RNA delivery
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人岡山大学大学院 自然科学研究科 教授 大槻高史
所属 役職 氏名： (英語) Okayama University Graduate School of Natural Science and Technology,
Professor, Takashi Ohtsuki

分担研究 (日本語) 光線力学療法に応用拡大に向けた核酸薬剤の開発
開発課題名: (英語) Development of the nucleic acid medicine for the expansion of the application of the photodynamic therapy.
研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 講師 小淵浩嗣
所属 役職 氏名: (英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Assistant Professor, Hirotsugu Kobuchi

分担研究 (日本語) Theranostic 医薬品に用いる第3世代ナノキャリアの開発とスーパーEPRによる薬効増強
開発課題名: (英語) 3rd Generation of nanocarrier for theranostics agents augmenting medicinal effects by super EPR effect
研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学大学院 工学研究科 教授 木村俊作
所属 役職 氏名: (英語) Graduate School of Engineering, Kyoto University Professor, Shunsaku Kimura

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

本研究は、深部がんあるいは転移がんに対して診断と治療の両方に有効な DDS キャリアの開発を目指し、大きく 2 つのテーマに分けて研究を推進した。

(1) Lactosome を用いる固形がんの PET イメージング

研究代表者の松浦は、Lactosome に標的指向性を持たせるための、がん分化抗原メソセリン (MSLN) に対するヒト低分子抗体を昨年度までに作成し、今年度はこれをモノクローン化して産生した。この抗 MSLN 低分子抗体を担持させたラクトソームの、抗原 MSLN への濃度依存的な結合や、MSLN 高発現細胞への有意な取り込みを確認した。また、 ^{89}Zr に対するキレーター-DFO を修飾するポリマーの工夫により ^{89}Zr 標識 Lactosome の 50% 血清中での安定性が向上した。さらに抗体担持・ ^{89}Zr 標識 Lactosome を用いて、皮下がんモデルマウスの PET イメージングを行い、腫瘍および各臓器への集積を確認した。

木村俊作教授（京都大学大学院工学研究科）は、新規ナノ粒子製剤 triskelion 型 Lactosome を構成する両親媒性ポリペプチドの合成を行っている。また、Zr イオンの配位子として DFO に代わる新規配位子の合成を開始し、モデル分子系にてこの新規配位子が Zr イオンと安定な錯体を形成することを確認した。

(2) ^{89}Zr 標識 Lactosome によるがんの RNAi 治療法の開発

松浦は、Cherenkov 光による活性酸素種の産生評価と PDT 効果の検証のため、活性酸素種を産生する光増感剤を内包させた Lactosome の作製を行った。また、これらを ^{89}Zr と混合させることで ^{89}Zr から放出される Cherenkov 光による光増感作用の確認も行っている。

大槻高史教授（岡山大学大学院自然科学研究科）は、Lactosome による機能的担持に向けた RNA の疎水的修飾部分の最適化を目的として、siRNA 自体の活性を保ちつつ Lactosome の疎水コアに融合させることを想定して、疎水的化合物の修飾をもつ siRNA を数種類作製した。両親媒性ポリマーを結合した siRNA、および疎水性基に結合した疎水的修飾 siRNA を作製し、これらが、いずれも Lactosome に融合可能であることも分かった。また、Lactosome への細胞膜透過性ペプチド (CPP) の結合方法の最適化を検討中である。

小渕浩嗣講師（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）は、光線力学療法 of 改良を目的とし、がん細胞の PpIX 量の蓄積に関わる分子の解析を行った。培養細胞実験系にて、PpIX の細胞外排出に寄与する ABC transporter とヘム合成系のある種の酵素がアミノレブリン酸誘導によるがん細胞の PpIX 蓄積に有効であることを確認した。そこで、腫瘍移植モデルマウスに、in vivo 用トランスフェクション試薬を用いてがん組織内部に siRNA 複合体を注入し、一定時間後の腫瘍内における標的遺伝子の RNAi 効果を解析した。標的遺伝子に対する siRNA 複合体は、コントロールと比較して mRNA レベルおよびタンパク質発現レベルでそれぞれ約 50% 抑制することが確認できた。なお、動物実験系での RNAi 効果を増強させるため、最適な siRNA 複合体の調製について検討中である。

以上のように、概ねマイルストーンを達成し、経過は順調である。

The aim of this study is to develop a novel DDS effective for both diagnosis and therapy of cancer. The study embarked on two objectives and each of them were performed as described below:

(1) *In vivo* PET imaging of solid tumors using novel Lactosome-based nanocarrier

Matsuura has previously developed a human single chain variable fragment (scFv) against mesothelin (MSLN). In the present year, he has obtained monoclonal scFv that exhibits high affinity to MSLN-expressing cancer cells. Lactosome-polymeric nanocarriers conjugated with the anti-MSLN scFv exhibited dose-dependent binding to MSLN and were significantly internalized by MSLN-expressing cancer cells. In addition, the modified method for conjugating deferoxamine (DFO), improved stability of the ^{89}Zr -labeled polymer. The ^{89}Zr -scFv-conjugated nanocarriers were then used for PET imaging of xenografted mice and their distributions in tumors and organs were determined.

Kimura has engaged in synthesis of a new amphiphilic polymer, namely, 'Triskelion' Lactosomes. He also started to synthesize a highly efficient chelating agent for Zr ion. It was finally confirmed that the new chelating agent can form stable complexes with Zr ion.

(2) Development of RNAi therapy for cancers using ^{89}Zr -labeled Lactosome

Matsuura has prepared photosensitizer-loaded Lactosomes, and investigated the production of reactive oxygen species and photodynamic therapy (PDT) efficacy of ^{89}Zr -originated Cherenkov light.

Ohtsuki is currently optimizing the hydrophobic group attached to RNA for loading its function into the fabricated ^{89}Zr -labeled Lactosome. The modification would be fused to the hydrophobic core of Lactosome while preserving the activity of the siRNA itself. Several types of siRNAs with hydrophobic modifications were prepared and he found that these modifications can fuse the siRNA to Lactosome. Presently, the optimization of the method for binding of cell-penetrating peptide (CPP) to Lactosome is under evaluation.

Kobuchi has screened molecules responsible for the PpIX accumulation in cancer cells to improve efficacy of PDT. In *in vitro* system, it was confirmed that ABCG2 which contributes to efflux of PpIX and certain heme synthetic enzymes were effective for the aminolevulinic acid-derived PpIX accumulation in cancer cells. Then, siRNA complex was injected into tumor-region of xenografted mice and RNAi effect were evaluated. The siRNA complexes were able to suppress both mRNA and protein levels by approximately 50% to the control. Much effective siRNA-complex for *in vivo* is currently arranged.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 高分子ミセル「ラクトソーム」を用いた光照射特異的な RNAi 技術の開発、ポスター、大島 真，赤星彰也，松浦栄次，小関英一，渡邊和則，大槻高史、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、2016/11/21，国内.
2. Matsuura E. Harnessing disease-specific antibody and its variant in “theranostics” of cancer. The Joint Congress of Int Congress on Mechanics in Medicine & Biology and Australian Medtech Conference, Melbourne, Australia, 2017、2017/5/25（招聘講演）国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし