

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) 医療分野研究成果展開事業 産学共創基礎基盤研究プログラム
(英語) Medical Research and Developmental Programs Focused on Technology Transfer : Collaborative Research Based on Industrial Demand
- 研究開発課題名 : (日本語) 蛍光トモグラフィイメージングへの利用を目的とした、機能性ナノ粒子を用いた新規近赤外蛍光分子イメージングプローブの創製
(英語) Development of near-infrared fluorescent probe for vulnerable plaque detection
- 研究開発担当者 (日本語) 北海道大学大学院薬学研究院 教授 小川美香子
所属 役職 氏名 : (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Professor, Mikako Ogawa
- 実施期間 : 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 標的化リポソームの作成とその最適化
開発課題名 : (英語) Development of macrophage-targeted liposome encapsulating activatable fluorescence probe for diagnosis of arteriosclerosis
- 研究開発分担者 (日本語) 静岡県公立大学法人静岡県立大学薬学部医薬生命化学分野 教授 奥直人
所属 役職 氏名 : (英語) School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Professor, Naoto Oku
- 分担研究 (日本語) アクチベータブル近赤外蛍光分子イメージングプローブのサルおよびヒト標本での評価
開発課題名 : (英語) Evaluation of NIR-imaging probes in monkeys and human tissue.
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人浜松医科大学光先端医学教育研究センター 教授 間賀田泰寛
所属 役職 氏名 : (英語) Preeminent Medical Photonics Education & Research Center (pMPERC), Hamamatsu University School of Medicine, Professor, Yasuhiro Magata

II. 成果の概要（総括研究報告）

（日本語）

本研究では、脈硬化不安定プラークの簡便なスクリーニングを目指し、蛍光トモグラフィイメージングへの利用が可能な機能性ナノ粒子を用いた新規近赤外蛍光分子イメージングプローブを創製した。この際、細胞標的性と酵素反応特異性を兼ね備えることで、特異性の向上を図った。

動脈硬化病変に生じる不安定プラークは、破綻し脳梗塞・心筋梗塞などを引き起こす。したがって、不安定プラークを早期に検出し適切な治療を行うことが重要である。これまでに、超音波、CT, MRI などによる形態学的検出が試みられているが、プラークの破綻には、形態的には検出されない分子レベルでの変化が直接的な原因となると報告されている。そこで、新規蛍光分子イメージングプローブとして、マクロファージに特異的に取り込まれ、さらにマクロファージ内の酵素により切断されるペプチドを内包した、近赤外蛍光標識リポソームを開発した。蛍光イメージングは、簡便で低侵襲であるため、リスク患者のスクリーニングに有用であると考えた。

マクロファージは、細胞表面のホスファチジルセリン（PS）を認識し、この細胞貪食する性質がある。そこで、動脈硬化不安定プラークに多く浸潤し、プラークの破綻に直接的な影響を及ぼしているマクロファージを標的化したリポソームとして PS 修飾リポソームを作製した。まず、PS リポソームを ^{111}In で放射性標識し、動脈硬化不安定プラークイメージング剤のプラットフォームとなりうるか定量評価を行った。この結果、PS によるマクロファージへの標的化がインビトロ・インビボともに確認された。次に、リポソームへ封入するための近赤外蛍光標識ペプチドを作製した。ペプチドの両端に近赤外蛍光物質 ICG を結合したところ、ペプチドの切断とともに経時的に蛍光強度が増加し、アクチベータブル近赤外蛍光 ICG 標識ペプチドの合成が達成された。そこで、アクチベータブル蛍光標識ペプチドの効率的内包法の確立を目指した。この結果、リポソーム内水相と外水相の pH 勾配を利用したリモートローディング法を用いることにより、血清存在下でも自己消光状態を保持し続けており、蛍光スイッチ機能を安定に保持する近赤外蛍光プローブの開発に成功した。

作製したリポソームを用いてインビボでの検討を動脈硬化モデルマウス、ウサギにて行い、有効性を確認した後、動脈硬化モデルサルを用いた検討を行った。この結果、開発した ICG 標識標的化リポソームを用いてサルの頸動脈病変を描出することに成功した。

（英語）

Molecular imaging enables non-invasive in vivo detection of vulnerable plaques. Macrophage infiltration is characteristics for atherosclerotic vulnerable plaques, and many apoptotic cells are seen in this region. Also, it is known that macrophages recognize phosphatidylserine (PS) that is exposed on the cell surface during apoptosis to phagocytize these cells. Therefore, we prepared phosphatidylserine liposomes for detection of vulnerable plaques.

One of the great feature of optical imaging is that we can control the fluorescent signal in vivo by using the activatable probes. That is, the fluorescence signal can be switched on after the imaging probe is accumulated in the target tissue. In this study, we developed an activatable near-infrared fluorescence labelled liposome for easy-to-use and more specific imaging of atherosclerotic plaques.

PS liposomes were prepared by lipid film hydration, and the liposomes were radiolabeled by ^{111}In to investigate

the targeting ability for macrophages quantitatively. By in vitro uptake study, it is revealed that macrophage targeting was accomplished by PS. Also, atherosclerotic region was successfully detected by ¹¹¹In-PS liposome in apoE^{-/-} mice and WHHL rabbits in vivo. Then, enzyme cleavable peptide was prepared and the peptide was labelled with ICG on lysine residues (peptide-ICG2). Peptide-ICG2 was encapsulated in PS liposome to achieve the delivery to the macrophages. The fluorescence of the ICG labelled peptide was activated by enzyme cleavage, and the target specificity was increased by applying the peptide. In in vivo studies, we could detect the atherosclerotic plaques in apoE^{-/-} mice and WHHL rabbits, the fluorescence images were well matched with Oil-Red O staining. Also, real-time noninvasive imaging was successful in monkeys.

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 1 件、国際誌 0 件)

1. 小川美香子, 生体蛍光イメージングの基礎と activatable probe 総論、臨床画像、32(2), 233-237, 2016.
2. 清水広介, リポソーム DDS の魅力、疾患診断、治療へのチャレンジ、Drug Delivery System, 31, 4, 352-360 (2016)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(シンポジウム)

1. Mikako Ogawa, SRM2016, Atherosclerosis imaging with ¹¹¹In-labelled liposome and its application for multimodal imaging, 2016/6/17、札幌、国内
2. 小川美香子、清水広介、成田雄大、Marten Maess、梅田泉、奥直人、間賀田泰寛、動脈硬化のマルチモダル生体イメージングを目指した DDS 製剤の開発、第 32 回日本 DDS 学会学術集会、2016/7/1、静岡、国内
3. 小川美香子、光を用いた動脈硬化イメージングの可能性、インビボイメージングフォーラム 2016、2016/11/11、東京、国内
4. Naoto Oku, Yudai Narita, Kosuke Shimizu, Mikako Ogawa, and Yasuhiro Magata, Development of activatable fluorescence probe and an appropriate drug delivery system useful for diagnostic imaging of atherosclerosis, the 12th China-Japan Symposium on Health Sciences, 2017/2/10, 中国杭州、国外
5. 清水広介、リポソーム DDS の疾患診断・治療への応用、InnoPack Japan 2017、2017/4/20、東京、国内
6. 成田雄大、清水広介、間賀田泰寛、小川美香子、奥直人、光スイッチプローブ DDS を応用した新規動脈硬化診断法の開発、日本薬剤学会第 32 年会、SNPEE 2017、2017/5/13、大宮、国内

(口頭発表)

1. Marten Maess, Kosuke Shimizu, Yudai Narita, Naoto Oku, Yasuhiro Magata, Mikako Ogawa: Development of near-infrared fluorescent probe for targeted uptake by atherosclerotic plaque macrophages., 第 11 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、神戸、2016 年 5 月 28 日、国内
2. Mikako Ogawa, Marten Maess, Kosuke Shimizu, Yudai Narita, Kazuya Hokamura, Takahiro Natsume,

- Naoto Oku, Yasuhiro Magata. Activatable optical imaging probe for vulnerable plaque imaging, Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2016 Annual Meeting, 2016/06/15, San Diego, USA、国外
3. 小川美香子、清水広介、成田雄大、Marten Maess、奥直人、間賀田泰寛、第48回日本動脈硬化学会総会・学術集会、動脈硬化不安定プラークイメージングのためのアクチベータブル近赤外蛍光イメージング剤の開発 ～サルを用いた検討～、2016/7/15、東京、国内
 4. Mikako Ogawa, Marten Maeß, Kosuke Shimizu, Yudai Narita, Kazuya Hokamura, Takahiro Natsume, Naoto Oku, Yasuhiro Magata., Development of near-infrared fluorescent probe for vulnerable plaque detection, World Molecular Imaging Conference 2016, Sep. 7-10, 2016, New York, USA. 、国外

(ポスター発表)

1. Marten Maess, Kosuke Shimizu, Yudai Narita, Naoto Oku, Yasuhiro Magata, Mikako Ogawa: Development of near-infrared fluorescent probe for targeted uptake by atherosclerotic plaque macrophages., Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology (ATVB) Conference, Nashville, USA, 2016年5月7日、国外
2. 成田雄大、清水広介、小川美香子、Marten Maess、間賀田泰寛、奥直人: 動脈硬化不安定プラーク近赤外蛍光イメージングを指向したマクロファージ標的化 DDS 製剤の開発、第11回日本分子イメージング学会総会・学術集会、神戸、2016年5月29日、国内
3. Marten Maess, Kosuke Shimizu, Yudai Narita, Naoto Oku, Yasuhiro Magata, Mikako Ogawa: Development of near-infrared fluorescent probe for targeted uptake by atherosclerotic plaque macrophages., 第11回日本分子イメージング学会総会・学術集会、神戸、2016年5月29日、国内
4. Marten Maess, Kosuke Shimizu, Yudai Narita, Naoto Oku, Yasuhiro Magata, Mikako Ogawa: Development of near-infrared fluorescent probe for targeted uptake by atherosclerotic plaque macrophages., 第48回日本動脈硬化学会総会・学術集会、東京、2016年7月14日、国内
5. 成田雄大、清水広介、小川美香子、Marten Maess、間賀田泰寛、奥直人: 近赤外蛍光スイッチプローブによる動脈硬化不安定プラークイメージング、in vivo イメージングフォーラム 2016、品川、2016年11月11日、国内
6. Yudai Narita, Kosuke Shimizu, Mikako Ogawa, Yasuhiro Magata, Naoto Oku: Development of near-infrared fluorescent switch-on probes for easy diagnosis of atherosclerosis., The 21st Shizuoka Forum on Health and Longevity, Shizuoka, Japan, 2016年11月25日、国内
7. 清水広介、成田雄大、Marten Maess、外村和也、間賀田泰寛、奥直人、小川美香子、マクロファージ標的化蛍光プローブによる動脈硬化不安定プラークの検出、日本薬剤学会第32年会、大宮、2017年5月13日、国内

(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
特願 2014-024424 号