

微小腫瘍検出のための高緩和能を有する新規造影剤 SPIO-Cy5-PICsome の開発 [国際飛躍賞記録]

國領大介¹, 安楽泰孝², 岸村顕広^{2,5}, 田中さやか^{3,6},
狩野光伸⁴, 西山伸宏^{3,7}, 佐賀恒夫¹, 青木伊知男¹,
片岡一則^{2,3}

¹放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター ²東京大学大学院工学系研究科

³同医学系研究科 ⁴岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

⁵現 九州大学大学院工学研究院 ⁶現 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

⁷現 東京工業大学資源化学研究所

背景・目的

腫瘍の早期診断は、治療効果の向上や生命予後の点で重要である。我々は、近年発展のめざましい自己組織化ナノ粒子技術、および病巣への標的化技術の発展を利用し、これまでに非常に長い血中半減期を有するポリイオンコンプレックス型中空ナノ粒子 PICsome を応用し、蛍光イメージングによって、腫瘍への高い集積性を確認し報告した^{1,2}。本研究では、MRI を用いた微小腫瘍の検出を目指し、高い MR 造影能を有する超常磁性酸化鉄微粒子 (Super-Paramagnetic Iron Oxide, SPIO)³ を、蛍光色素 (Cy5) で標識した PICsome に内包した新規造影剤 SPIO-Cy5-PICsome を開発し、その造影能、腫瘍への集積性の評価、ならびに微小腫瘍検出の可能性を検討した。

方 法

作製した中空ナノ粒子 SPIO-Cy5-PICsome は電荷の異なる 2 種類の高分子 (fluorescence (Cy5)-labeled PEG-*b*-poly(α,β -aspartic acid)

(Cy5-PEG-PAsp), poly([5-aminopentyl]- α,β -aspartamide) (Homo-P(Asp-AP))) を混和することにより形成された Cy5-PICsome の中空部分に、Ferucarbotran (リゾピスト[®], 富士フィルム RI ファーマ, 東京) を封入した (Fig. 1)。粒子サイズは、EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果⁴によるナノ粒子の腫瘍集積性が期待できる 100 nm 程度になるよう調整した。

実験に使用した MRI およびコイルは、造影能の評価ならびに皮下腫瘍への腫瘍集積性の評価には、前臨床用 40 cm ボア・7.0 テスラ MR 装置 (Magnet: Kobelco, Jastec, 神戸, Console: Bruker-Biospin, Ettlingen, Germany) および 35 mm ポリュームコイル (Rapid Biomedical, Lympar, Germany) を、微小腫瘍の検出には、前臨床用 20 cm ボア・7.0 テスラ MR 装置 (Bruker-Biospin) および冷却コイル (CryoProbe[™], Bruker-Biospin) を使用した。

造影能の評価には、CPMG 法を用いて取得した T₂ 値より計算した r₂ 値を用いた。腫瘍集積性は、BALB/c スードマウス (日本 SLC, 静岡) の臀部にマウス由来大腸癌細胞 Colon26

キーワード high-field magnetic resonance imaging (MRI), superparamagnetic iron oxide (SPIO), drug delivery system (DDS), tumor detection

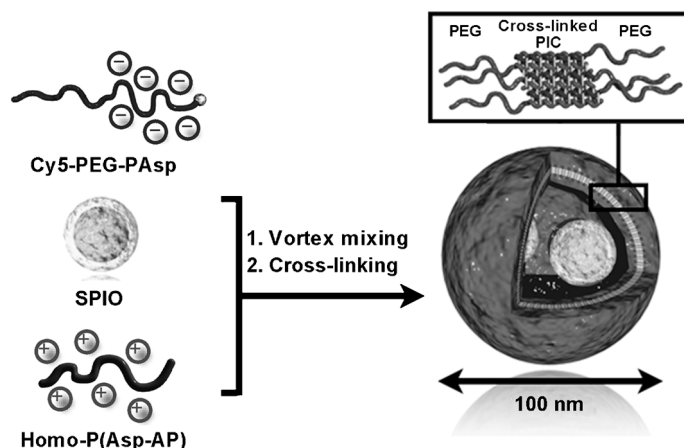


Fig. 1. Schematic representation of SPIO-Cy5-PICsome preparation¹⁰⁾.

(1.0×10^6 cells/ $50 \mu\text{l}$) を移植した担がんモデルマウスを用い、その尾静脈から SPIO-Cy5-PICsome (Fe 濃度: 0.45 mg/kg) を投与し、投与前、および投与 1, 3, 6, および 24 時間後の T_2 強調画像および T_2 値を比較した。対照群として、同濃度の Ferucarbotran 単独投与を行った。MR 撮像はスピンエコー法を用いて行い、使用したパラメータは、以下のとおりである: TR = $3,000 \text{ ms}$; TE = $10\text{--}100 \text{ ms}$ (マルチエコー); FOV = $38.4 \times 19.2 \text{ mm}^2$; スライス厚 = 1.0 mm ; Matrix = 256×128 ; 加算回数 = 1; 撮像時間 = 6 分 24 秒。微小腫瘍検出は、腫瘍移植後 3 日 (サイズ約 4 mm^3) の担がんマウスを使用し、投与前および投与 24 時間後の T_2 強調画像において検討した。

結果・考察

SPIO-Cy5-PICsome の横緩和能 r_2 は $663 \pm 28 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、Ferucarbotran 単体の 2.54 倍という高い緩和能を示した。これは、同一 PICsome 内に複数の SPIO が封入されたこと^{5)~7)}、および PICsome の膜により水分子

拡散が制限され、Ferucarbotran との接触が増加した可能性^{8),9)}が考えられた。

腫瘍集積性に関しては、SPIO-Cy5-PICsome 投与後の T_2 値は、3 時間後から腫瘍内での顕著な短縮を認め、6, 24 時間後には信号低下の範囲が拡大した (Fig. 2)。一方、Ferucarbotran の単独投与では顕著な信号変化は認められなかった。このことから、SPIO-Cy5-PICsome は長時間血中内を循環することで、EPR 効果により受動的に腫瘍に高集積したと考えられた。微小腫瘍の検出に関しては、SPIO-Cy5-PICsome 投与 24 時間後の微小腫瘍内の MR 信号が明瞭に低下し、さらに蛍光イメージングにおいても、腫瘍付近の信号強度が上昇していたことから、微小腫瘍への集積が確認できた (Fig. 3)。このことから、開発した SPIO-Cy5-PICsome は高い緩和能を有し、微小腫瘍の検出に有用であることが示された。今後、抗がん剤などを搭載することにより、造影剤ならびに治療薬を併せもつ Theranostics プロブに展開できると期待される。

なお、本研究の成果は、Journal of Controlled Release, 169 (3) : 220-7; 2013 において

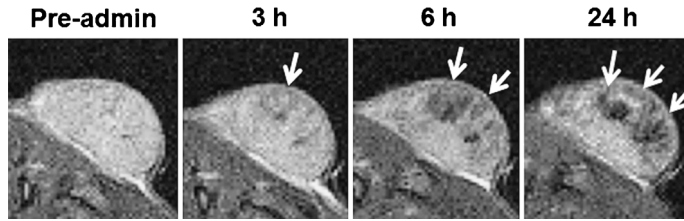


Fig. 2. Typical T₂-weighted MR images for an *in vivo* tumor model. The MR signal in the tumor was changed at 3 hours after SPIO-Cy5-PICsome administration, and the area over which the MR signal changed was extended at 6 and 24 hours after administration (white arrows)¹⁰.

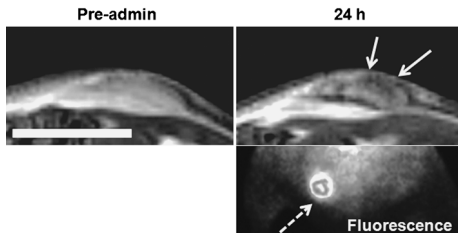


Fig. 3. Application for small tumor detection using SPIO-Cy5-PICsomes (upper). Scale bar : 3 mm. The T₂-weighted MR signal at 24 hours after SPIO-Cy5-PICsome administration was changed from the signal before the administration (white arrows). The fluorescent signal from the tumor region was also higher than the signal from other regions (bottom, white dash arrow)¹⁰.

公表した¹⁰).

謝 辞

本研究の実施に関して、柴田さやか氏、関田愛子氏、城潤一郎博士、Jeff Kershaw 博士のご協力をいただきました。この場を借りて感謝いたします。本研究は、最先端研究開発支援プログラム (内閣府) による助成を受けて実施いたしました。

文 献

- 1) Anraku Y, Kishimura A, Oba M, Yamasaki Y, Kataoka K : Spontaneous formation of nanosized unilamellar polyion complex vesicles with tunable size and properties. *J Am Chem Soc* 2010 ; 132 : 1631-1636
- 2) Anraku Y, Kishimura A, Kobayashi A, Oba M, Kataoka K : Size-controlled long-circulating PICsome as a ruler to measure critical cut-off disposition size into normal and tumor tissues. *Chem Commun (Camb)* 2011 ; 47 : 6054-6056
- 3) Bulte JW, Kraitchman DL : Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed* 2004 ; 17 : 484-499
- 4) Matsumura Y, Maeda H : A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy : mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986 ; 46 : 6387-6392
- 5) Berret JF, Yokota K, Morvan M, Schweins R : Polymer-nanoparticle complexes : from dilute solution to solid state. *J Phys Chem B* 2006 ; 110 : 19140-19146
- 6) Yang J, Lee CH, Ko HJ, Suh JS, Yoon HG, Lee K, Huh YM, Haam S : Multifunctional magnetopolymeric nanohybrids for targeted detection and synergistic therapeutic effects on breast cancer. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007 ; 46 : 8836-8839
- 7) Lai SM, Hsiao JK, Yu HP, Lu CW, Huang CC, Shieh MJ, Lai PS : Polyethylene glycol-based biocompatible and highly stable superparamag-

- netic iron oxide nanoclusters for magnetic resonance imaging. *J Mater Chem* 2012 ; 22 : 15160–15167
- 8) Vuong QL, Gillis P, Gossuin Y : Monte Carlo simulation and theory of proton NMR transverse relaxation induced by aggregation of magnetic particles used as MRI contrast agents. *J Magn Reson* 2011 ; 212 : 139–148
- 9) Poselt E, Kloust H, Tromsdorf U, Janschel M, Hahn C, Masslo C, Weller H : Relaxivity optimization of a PEGylated iron-oxide-based negative magnetic resonance contrast agent for T(2)-weighted spin-echo imaging. *ACS Nano* 2012 ; 6 : 1619–1624
- 10) Kokuryo D, Anraku Y, Kishimura A, et al. : SPIO-PICsome: development of a highly sensitive and stealth-capable MRI nano-agent for tumor detection using SPIO-loaded unilamellar polyion complex vesicles (PICsomes). *J Control Release* 2013 ; 169 : 220–227

Development of SPIO-loaded Unilamellar Polyion Complex Vesicles (SPIO-Cy5-PICsomes) as a High Relaxivity Contrast Agent for Early-stage Tumor Detection [Proceedings of the 2013 Young Investigator Award]

Daisuke KOKURYO¹, Yasutaka ANRAKU², Akihiro KISHIMURA^{2,5},
Sayaka TANAKA^{3,6}, Mitsunobu R KANO⁴, Nobuhiro NISHIYAMA^{3,7},
Tsuneo SAGA¹, Ichio AOKI¹, Kazunori KATAOKA^{2,3}

¹*Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences
4-9-1 Anagawa, Inage, Chiba 263-8555*

²*Graduate School of Engineering, The University of Tokyo*

³*Graduate School of Medicine, The University of Tokyo*

⁴*Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University*

⁵*Current : Graduate School of Engineering, Kyushu University*

⁶*Current : Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University*

⁷*Current : Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology*

The detection of early-stage tumors is important for improving treatment efficacy and prolonging patient survival. One promising strategy for detecting small tumors is to utilize nano-carriers that have a long blood half-life and accumulate in tumor (due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect) as a contrast agent. In this report, a novel SPIO (superparamagnetic iron oxide)-loaded and fluorescence dye (Cy5)-labeled unilamellar polyion complex vesicle (named “SPIO-Cy5-PICsome”), composed of two biocompatible oppositely charged block copolymers and FDA-approved SPIO nanoparticles, was developed and evaluated *in vitro* and *in vivo* for its ability to detect small tumors with preclinical high-field MRI. *In vitro* relaxivity (r_2) of the SPIO-Cy5-PICsomes was 2.54 times higher than that of free ferucarbotran. The MR signal from colon-26 subcutaneous tumor regions began to change at 3 hours after SPIO-Cy5-PICsome administration, and the area of signal alteration was expanded at 6 and 24 hours after the administration. A small tumor (4 mm³) could be detected at 24 hours after the administration. Therefore, SPIO-Cy5-PICsomes are a powerful nano-carrier with the potential to detect small and early-stage tumor for early cancer detection.