

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300362

研究課題名(和文) 磁性ナノ粒子+腫瘍浸透ペプチドによる難治固形癌の電磁誘導焼灼治療

研究課題名(英文) Realizing the induction heating cancer therapy by developing new iron nano particle and combination of tumor penetrating peptide (iRGD).

研究代表者

小田 竜也(Oda, Tatsuya)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20282353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,000,000円

研究成果の概要(和文)：磁性ナノ粒子を腫瘍に集積させ、外部から照射する交流磁場による誘導加熱で癌を焼灼する新規治療の実現を目的にした。コバルトなどの生体に有害な金属を添加せずに高効率に発熱する、棒状の磁性ナノ粒子(DINP)の開発に成功し、国際特許出願した。血管内投与する磁性ナノ粒子のステルス化、iRGDペプチドの同時投与による腫瘍集積増強は十分な効果を得られなかった。DINPを腫瘍に直接注入し、交流磁場照射により腫瘍を完全に焼灼する事には成功し、新たな電磁誘導癌焼灼治療性の可能性を示せた。

研究成果の概要(英文)：The present research aimed to realize the induction heating cancer therapy, that involve delivers magnetic nano-particles to cancer nodules and eradicate cancer by heat using irradiation of alternating current magnetic field. For this purpose, iron nano particle with high heat productive power more than 500 W/g was indispensable, which was not available at the project start time, and we originally developed surface-modified iron nanoparticle (DINP). The successful production of this new iron nanoparticle were subjected to application of international patent. The surface modification of DINP by block-polymer PEG did not confer sufficient stealth effect which aimed to escape from capture by macrophage and Kupffer cells. The enhanced delivery of DINP by co-administration of tumor specific penetrating peptide (iRGD) were also unsuccessful. Instead, we directly injected DINP into mouse xenograft and obtained complete eradication by induction heating.

研究分野：消化器外科学

キーワード：電磁誘導加熱 癌焼灼治療 磁性ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肝癌を初めとする固形癌の治療成績が依然として不十分な理由として i) 治療担体 1 つ 1 つの殺細胞効果が不十分である事 ii) 治療担体の S/N 比( S=Signal: 腫瘍への集積、 N=Noise: 非腫瘍部への非特異的な分布 ) が低い事の 2 つが挙げられる。現在精力的に開発されている新規抗がん剤である分子標的薬、抗体薬は癌細胞の増殖シグナルを抑制する消極的な“ cytostatic (静細胞的)”効果に留まり、積極的に細胞を殺す“ cytocydal (殺細胞的)”な力は充分でない。
- (2) 我々が本治療の開発に参入した 5 年前、電磁誘導がん焼灼治療の実現に必要な **各種技術の到達目標値が明確にされていなかった**。肝臓中の腫瘍を治療対象とした場合、周囲を取り巻く正常肝組織への熱拡散により腫瘍(特に辺縁部)はなかなか温まらないことをシュミレーションした。この研究の結論として **腫瘍焼灼には直径 10mm の腫瘍に 1.7 W / g<sub>腫瘍</sub> の熱量を加える事が必要で、それは 1000W / g<sub>鉄粒子</sub> 以上の発熱特性を持つ鉄粒子を 1~2mg<sub>鉄粒子</sub> / g<sub>腫瘍</sub> の濃度で腫瘍に集積させる事により達成出来る**事を明らかにした (Yamada, Oda 筑波大、2010 Intnat J. Hyperthermia )
- (3) 磁性ナノ粒子の **電磁誘導発熱機構は主に 2 つ**、 i) 磁性体の保磁力に規定される磁気特性カーブの面積に比例する **ヒステリシス損**、 ii) 粒子が交流磁場の反転に伴い激しく回転する事による **摩擦熱**、である。既存の磁性ナノ粒子の多くはヒステリシス実際、既存の超常磁性ナノ粒子(レゾピスト)は交流磁場(15mT(rms), 120KHz)のもとで 32W / g<sub>鉄粒子</sub> の発熱量しか無かった。筑波大学磁気機能工学喜多研究室と **ヒステリシス発**

**熱を最大限に利用する球状強磁性ナノ粒子を共同開発し**、更に、磁場発生装置の強度を 3 倍の 45mT(rms), 120KHz に改良し、 **現在は 480 W / g<sub>鉄粒子</sub> の発熱特性を達成している**。さらに、摩擦熱の発生を高める為に粒子の形状を棒状にしたり、表面に 2-10nm の孔を付加して表面修飾性を高めた粒子の開発に着手している。

- (4) ある範囲の大きさのナノ粒子(20nm~200nm)は EPR(enhanced permeability and retention)効果により、血管構造が不完全で透過性が高まっている腫瘍に受動的に集積しやすいという利点がある。磁性ナノ粒子を治療担体とする電磁誘導焼灼治療は腫瘍集積の S/N 比をあげる上でも有利な戦略だといえる。一方、こういった **ナノ粒子を生体内に投与した場合、肝臓や脾臓のマクロファージ(M )を代表とする細網内皮系(RES)に捕捉**され、血液滞留時間が短くなり腫瘍に有効に分布しにくい問題がある。ここで、さらに、筑波大学数理工学研究所長崎研究室との共同研究で、特殊な多点アンカリング機能を有するポリエチレングリコール(PEG)誘導体で磁性ナノ粒子表面を覆った。 **この粒子は M による貪食を回避するステルス作用が非常に高く**、結果として腫瘍に高率(0.58mg<sub>鉄粒子</sub> / g<sub>腫瘍</sub>)に集積した。
- (5) 血管内に投与された治療薬が腫瘍でまず接触するのは血管内皮であり、腫瘍血管内皮を能動的にターゲティングする事は治療担体の腫瘍特異的集積を増強する上で有効な戦略である。2010-4 月に米国カリフォルニア大学から発表された internalizing RGD (**iRGD**) は、腫瘍血管内皮に特異的に発現する

インテグリン  $\alpha 3 / \beta 5$  を標的とし、**低分子抗癌剤からナノ粒子製剤までの腫瘍集積性を劇的に促進する**注目度が高い物質である。血管内皮に結合するとあたかもそれまで閉じていたゲートが開くように、治療担体を腫瘍内へ浸透させる効果を有し、この iRGD を抗ガン剤に先行投与しておけば抗ガン剤の腫瘍集積効果を数十倍に高められる事が示されている。競争の激しいこの分野で**申請者は iRGD の開発者である Ruoslahti 氏の研究室で 2010-6 月に直接交渉し、共同研究をいち早く取り付け、2010-9 月から iRGD ペプチドの供与を受けた。**

## 2. 研究の目的

本研究は、**電磁誘導がん焼灼治療は“熱”という最も強力で確実な殺細胞効果に着目した治療法で 30 年以上の開発の歴史があるが、発熱量が不十分な鉄磁性粒子を使ったり、粒子の腫瘍への送達量が少ない事により実用化出来ていなかった。**十分に高発熱の磁性ナノ粒子を、必要十分量腫瘍に集積させる複数の技術開発を行い、それらを包括的に統合し、多発肝転移の電磁焼灼治療の実現を目的とする。多点アンカリング PEG 修飾が完成している球状粒子の動物皮下腫瘍、動物肝転移モデルにおける体内動態を確認、さらに、腫瘍浸透ペプチド iRGD を同時投与する事により、鉄粒子を  $1 \sim 2 \text{mg}_{\text{鉄粒子}} / \text{g}_{\text{腫瘍}}$  の密度で腫瘍に送達させる技術を確立する。平行して  $1000 \text{ W} / \text{g}_{\text{鉄粒子}}$  の高発熱棒状ディンプル磁性ナノ粒子をリン酸-PEG 修飾し生体投与を可能にする事も目標にした。

## 3. 研究の方法

(1)[課題 A] ナノ粒子の表面修飾による腫瘍集積増大: PEG コーティング粒子(FeNP-IS) 単独投与での生体内分布、腫瘍集積

ナノ粒子が肝臓や脾臓のマクロファージ(M $\phi$ ) を代表とする細網内皮系(RES)に捕捉されてしまう問題を解決する事が電磁誘導焼灼がん治療の実現には不可欠である。我々が筑波大学数理物質研究科長崎研究室との共同研究で作成している、リン酸による多点アンカリング機能を有する PEG 誘導体は非常に優れた粒子安定性と、ステルス効果を持つ。既に開発が出来ているこのステルス磁性ナノ粒子(FeNP-IS)の動物腫瘍モデルにおける体内動態を把握する。

(2)[課題 B] 腫瘍血管透過性亢進ペプチド(iRGD) によるナノ粒子の腫瘍集積増強

internalizing RGD (**iRGD**) は米国カリフォルニア大学(UCSB)で開発され、低分子薬剤、抗体薬、ナノ粒子といった抗がん治療担体のサイズに関係なく腫瘍集積性を 5 倍～数十倍に高める事ができる注目度の高い物質である (Sugahara, Ruoslahti, Cancer Cell 2009)。我々の磁性ナノ粒子の腫瘍集積量を高める上で、開発元の UCSB の技術アドバイスは大きな研究推進力になる。マウス由来のがん細胞株、ヒト膵臓癌の細胞株、ヒト膵臓癌患者の手術摘出検体移植モデルにおいて、iRGD ペプチド先行投与後 FeNP-IS を投与。3 時間、8 時間後の腫瘍、肝臓、脾臓、肺、心臓、皮膚、筋肉の組織を採取。ICP-MS により鉄粒子の集積量を定量化すると共に鉄染色で組織学的に鉄粒子の集積を確認。目標値である  $1 \sim 2 \text{mg}_{\text{鉄粒子}} / \text{g}_{\text{腫瘍}}$  の腫瘍集積を達成する。

(3)[課題 C] 磁性ナノ粒子の高発熱化 棒状ディンプル磁性ナノ粒子の作成

現在、ヒステリシス熱を有効に使う球状磁性ナノ粒子を開発し  $480 \text{ W} / \text{g}_{\text{鉄粒子}}$  の発熱特性を達成しているが、数値目標としての  $1000 \text{ W} / \text{g}_{\text{鉄粒子}}$  には及ばず、さらなる開発が必要である。その為に、ヒステリシス熱に加えて回転摩擦熱を高めた棒状の磁性ナノ粒子を開発する。これはいわば、ナノ

サイズの棒磁石であり、交流磁場の照射で激しく回転する為、球状の粒子に比べ、周囲組織との摩擦が大きく高い発熱が期待出来る。こういった、強磁性ナノ粒子が今まではあまり利用されなかった理由は、粒子の凝集を防ぐ分散安定性が保ちにくかった事による。我々は、この棒状の磁性ナノ粒子の表面修飾を促進するために、粒子表面に孔や凹凸を有する、表面積の大きな棒状ディンプル強磁性ナノ粒子を開発する。

(4) 高発熱磁性ナノ粒子の PEG 修飾+iRGD 並行投与による動物腫瘍の電磁誘導加熱

本研究で開発を進めている高発熱強磁性ナノ粒子(課題 A)を生体内に投与する為には、粒子間の磁氣的相互作用や血漿タンパクの吸着により凝集体(数  $\mu\text{m}$ )を作りやすいという問題を解決することが不可避である。棒状ディンプル強磁性ナノ粒子の表面には多くの水酸基(-OH)露出しており、これを官能基として、課題 B で開発する表面修飾剤 PEG-b-PVBP のリン酸基と反応させステルス化を行う。このステルス機能を十分に持った高発熱磁性ナノ粒子を動物腫瘍モデルに投与し、すでに開発、改良が済んでいる交流磁場照射装置で誘導加熱焼灼治療を行う。腫瘍へのナノ粒子集積は 48 h、96 時間後でも維持されるのに対し、肝臓からは比較的速やかに排泄されるので、48 時間以降に電磁誘導治療を施行する事でより効率的な腫瘍焼灼が期待できる。

#### 4. 研究成果

(1) (DINP) を表面修飾する [課題 A] 粒子の腫瘍への集積は 0.58mg 鉄粒子 / g 腫瘍まで達成したが、結果が安定しなかった。また、[課題 B] として、腫瘍血管からナノ粒子が間質組織をすり抜け腫瘍へ到達する事を促進する為腫瘍血管特異的透過性亢進ペプチド(iRGD)を同時投与する事により能動的集積効果の上乗せを狙った。しかし、iRGD

の効果も当初期待した 5-7 倍には及ばず、1.2-1.5 倍程度に留まった。

(2) H26 は本研究で開発した磁性ナノ粒子 (DINP) が JST の支援制度に採択され、国際特許申請を果たした。癌焼灼治療用の磁性ナノ粒子は研究開始当初 32W / g 鉄粒子のリゾビストがベンチマークであり、発熱特性を上げる為に、材料工学的には鉄にコバルト、プラチナなどの希土類を混ぜる事が一般的であった。DINP は人体への臨床応用を視野に入れ、生体に有害な物質を一切添加せずに鉄粒子の形状を整える事(多孔性の棒)によってのみ発熱量を 600W / g 鉄粒子にまで上昇する事に成功した。DINP は、生体への投与経路として a)血液内 b)腹腔、胸腔内 c)腫瘍内への穿刺注入のいずれにおいても有毒金属を含まない磁性ナノ粒子として、幅広い応用の可能性がある。DINP はその製造過程で凝集・沈殿してしまうが、[課題 A] の為導入した筑波大独自の PEG ブロックポリマー (PEG-b-PVBP) で修飾する事により磁性流体として成立する事が出来た。H25 年度からは、DINP を腫瘍に直接注入し、外部からの交流磁場照射で腫瘍を焼灼する方法を平行して行なった。ヒト膀胱癌細胞株、大腸癌細胞株、マウスメラノーマ細胞株をそれぞれマウスの皮下に移植し腫瘍体積が 100-200  $\text{mm}^2$  になったタイミングで磁性ナノ粒子を直接注入。外部から 114KHz、640Oe の交流磁場を 5 分間照射した。結果として、腫瘍はほぼ完全に焼灼され、再発は見られない。現在論文投稿準備中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Kurokawa T, Hashimoto S, et

al. Anticancer effects of gemcitabine are enhanced by co-administered iRGD peptide in murine pancreatic cancer models that overexpressed neuropilin-1. *Br J Cancer*. 査読有 110(6):1481-7. 2014 PubMed PMID: 24556620. Pubmed Central PMCID: PMC3960621. Epub 2014/02/22. eng.

Oda T, Hashimoto S, Miyamoto R, Shimomura O, Fukunaga K, Kohno K, et al. The Tight Adaptation at Pancreatic Anastomosis without Parenchymal Laceration: An Institutional Experience in Introducing and Modifying the New Procedure. *World J Surg*. 査読有 2015 Apr 18. PubMed PMID: 25894407. Epub 2015/04/22. Eng.

Kishimoto M, Miyamoto R, Oda T, Ohara Y, Yanagihara H, Ohkohchi N, Kita E. Measurement of intravenously administered  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particle amount in mice tissues using vibrating sample magnetometer. *IEEE Trans Nanobioscience*. 査読有 13(4):425-30. 2014

Hawa Latiff, Kishimoto M, Horiuchi A, Seki A, Miyamoto R, Yanagihara H, Oda T, Ohkohchi N, Kita E. Characterization of Spinel-Structured Iron Oxide Nanoparticles Synthesized by Heating of  $\alpha$ -FeOOH Platelets in Tetra-Ethylene Glycol. *MATERIALS TRANSACTIONS*. 査読有 55(5):813-817.2014;

Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Hashimoto S, Enomoto T, et al. Histological advantages of the tumor graft: a murine model involving transplantation of human pancreatic

cancer tissue fragments. *Pancreas*. 査読有 42(8):1275-82. 2013 PubMed PMID: 24152953. eng.

小田 竜也, 橋本真治, 宮本良一 他 . 磁性ナノ粒子を用いた新規抗癌治療の開発. 膵・胆道癌 FRONTIER. 査読無 3(1) 38-42.2013

Ohara Y, Oda T, Yamada K, Hashimoto S, Akashi Y, Miyamoto R, et al. Effective delivery of chemotherapeutic nanoparticles by depleting host Kupffer cells. *Int J Cancer*. 査読有 2012;131(10):2402-10. PubMed PMID: 22362271. Eng.

Kishimoto M, Minagawa M, Yanagihara H, Oda T, Ohkohchi N, Kita E. Synthesis and magnetic properties of platelet  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles for medical applications using hysteresis-loss heating. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 査読有 2012 4//; 324(7):1285-9.

Ujiiie K, Kanayama N, Asai K, Kishimoto M, Ohara Y, Akashi Y, et al. Preparation of highly dispersible and tumor-accumulative, iron oxide nanoparticles Multi-point anchoring of PEG-b-poly(4-vinylbenzylphosphonate) improves performance significantly. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 査読有 88(2):771-8. 2011 PubMed PMID: 21890332. eng

[学会発表](計3件)

Miyamoto R, Oda T, Hashimoto S, Yamada K, et al. Electromagnetic thermoablation for refractory solid cancer using new magnetic nanoparticles. Tsukuba International Conference on Materials Science.2013年8月

28日-9月6日・つくば国際会議場(つくば市)

Miyamoto R, Oda T, Hashimoto S, Yamada K, et al. Electromagnetic thermoablation for refractory solid cancer using newly developed magnetic nanoparticles. つくば医工連携フォーラム 2014.2014年1月28日つくば国際会議場(つくば市)

宮本良一、小田竜也、橋本真治、大原佑介、明石義正、福永 潔、村田聡一郎、大河内信弘. 新規薬剤をターゲットとした膵癌に対する新規温熱化学療法.

第72回日本癌学会学術総会.2013年10月3日-5日・パシフィコ横浜(横浜市)  
〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計5件)

名称: 癌焼灼治療用強磁性酸化鉄粒子  
発明者: 柳原英人, 喜多英治, 小田竜也 他  
権利者: 筑波大学  
種類: 特許  
番号: 特開 2012-235034  
出願年月日: 2011年5月9日  
国内外の別: 国内

名称: 癌焼灼治療用強磁性酸化鉄粒子の製造方法  
発明者: 柳原英人, 喜多英治, 小田竜也 他  
権利者: 筑波大学  
種類: 特許  
番号: 特開 2012-236778  
出願年月日: 2011年5月10日  
国内外の別: 国内

名称: 新規な癌焼灼治療用強磁性酸化鉄粒子  
発明者: 柳原英人, 喜多英治, 小田竜也 他

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特開 2013-34655

出願年月日: 2011年8月8日

国内外の別: 国内

名称: 強磁性酸化鉄粒子の製造方法  
発明者: 喜多英治, 長崎幸夫, 小田竜也 他  
権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特開 2014-94838

出願年月日: 2012年11月7日

国内外の別: 国内

名称: 癌焼灼治療用表面修飾酸化鉄粒子  
発明者: 小田竜也, 長崎幸夫, 浅井佳, 喜多英治, 柳原英人, 大河内信弘, 岸本幹雄  
権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-200836

出願年月日: 2012年9月12日

国際特許出願番号: PCT/JP2013/074350

国際特許出願年月日: 2013年9月10日

国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田竜也 (ODA Tatsuya)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 20282353

(2) 研究分担者

柳原英人 (YANAGIHARA Hideto)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号: 50302386