

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2010

課題番号：21591743

研究課題名 (和文) 磁性ナノ粒子の癌細胞特異的相乗的集積法の開発

研究課題名 (英文) Cancer specific delivery of magnetic nanoparticles.

研究代表者

小田 竜也 (ODA TATSUYA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：20282353

研究成果の概要 (和文)：

電磁誘導がん焼灼治療の具現化の為に、抗体結合ナノ粒子で達成されていた $0.2\text{mg}_{\text{鉄粒子}}/\text{g}_{\text{腫瘍}}$ という既存の集積量を上回る粒子送達法の開発を目指した。当初考案したアビジン結合粒子、ビオチン結合粒子を交互に生体に投与するチェーンリポート集積法は生体内では肝臓のKupper細胞に貪食され腫瘍に効率的に送達する事が出来なかった。しかし、特殊なPEGで粒子表面を覆った鉄粒子を作成し、貪食を回避するステルス作用を持たせる事ができ、 $0.58\text{mg}_{\text{鉄粒子}}/\text{g}_{\text{腫瘍}}$ という目標を大幅に上回る集積効果のある鉄粒子を開発できた。

研究成果の概要 (英文)：

For clinical application of induction heating cancer therapy, specific accumulation of magnetic nanoparticles to cancer tissue is a indispensable fundamental technique. Conventional approach, viz. tumor specific antibody conjugate nanoparticle, confer only  $0.2\text{mg/g}$  tumor accumulation. Intending to precipitate more particles to tumor, we have tried to innovate multiple step administration of biotinized and avidinized magnetic nanoparticles alternately. This approach, however, failed to accumulate nanoparticles to tumor, due to non-specific trap by Kupper cells in liver. When we tried alternative approach, i. e. decoration of nanoparticle surface with original unique PEG,  $0.58\text{mg/g}$  tumor accumulation have achieved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

癌細胞を殺傷する効果として“熱”は最も確

実なツールであり、直接病巣に電極を穿刺してラジオ波等の熱で焼灼する治療等が普及している。しかし、高熱域に病巣が入らずに焼け残りが出てしまい治療が不成功に終わることも多い。さらに、既存の治療法が効かない難治、進行癌においては、数十  $\mu\text{m}$  - 数 cm の大小さまざまな癌病巣が無数に存在しており、各々のがん結節に直接穿刺して加温することは出来ない。癌細胞周囲に磁性体を集めた上で体外から電磁波をあて、誘導加熱で癌細胞を殺傷する治療法の概念は 20 年以上も前に提唱されたが、癌細胞特異的に十分量の磁性体を集積する技術が無く、実用化には至っていない。

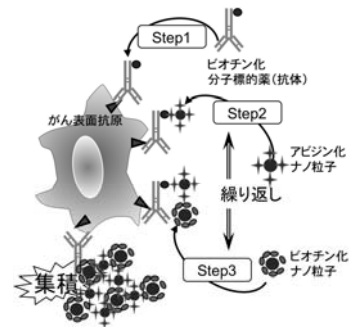
近年、臨床応用が急速に進んでいる分子標的治療薬は、癌細胞を特異的にターゲティングする事は出来るが、癌細胞の増殖シグナルを抑制する消極的な“cytostatic (静細胞的)”効果に留まり、積極的に細胞を殺す“cytotoxic (殺細胞的)”な力は充分でない。殺細胞効果を担う物質を融合した新規治療も試みられているが、癌細胞周囲に集められる担体の量に限界があり、治療効果も充分でなかった。

### 総合的な殺細胞効果

$$= A: 1 \text{ 個の細胞に集積する治療担体数} \\ \times B: \text{治療担体 1 個当たりの殺細胞力}$$

ここで  
 の式で表される A を上げる事、すなわち分子標的抗体などで特異性を高めた治療担体の量を、さらに相乗的に増やす事が技術的に可能になれば、総合的な殺細胞効果を高める事につながる。電磁誘導加熱癌治療の実現化に寄与できるだけでなく、ドラッグデリバリーの新たな汎用技術になる。本研究の目的を達成する為に、私はチェーンリポート集積法を提案した (特許出願 2007-151774)。そのア

イデアは通常の病理診断や研究に使われている免疫染色の基本原則 (解離定数  $K_d=10^{-15}\text{M}$  と蛋白同士の結合としては最も強固なアビジンとビオチンの結合を利用して可視化物質を大量に集積させる汎用技術) を生きた動物の 3 次元的な体内に応用するものである。ビオ



＝図4 チェーンリポート集積法＝

チン化抗体を癌表面の受容体や抗原に特異的に結合させ(図 4-Step1)、アビジン化ナノ粒子を強固に結合させる(Step2)。続いてビオチン化ナノ粒子(Step3)を投与し、Step2、3 を交互に繰り返す事により癌細胞周囲へのナノ粒子の集積量を相乗的に高める。

## 2. 研究の目的

進行・難治癌に対する、画期的な治療法の開発が求められる中、磁性ナノ粒子をがん病巣にのみに集め、体外から交流磁場を印加して加熱、殺傷する電磁誘導加熱癌治療の実現化を最終目標に据えている。それに際する現時点での2つの技術的な制約は、i) 癌細胞に集められる磁性ナノ粒子の総数が少ない、ii) 1個1個の磁性ナノ粒子の発熱量が小さい、である。電磁誘導加熱がん治療が成り立つためには、 $1000\text{W} / \text{g}_{\text{鉄粒子}}$  の高発熱鉄粒子を  $1-2\text{mg}_{\text{鉄粒子}} / \text{g}_{\text{腫瘍}}$  集積させる必要がある。ナノ粒子に腫瘍特異的抗原を認識する抗体を結合させて腫瘍をターゲティングする方法では  $0.2\text{mg}_{\text{鉄粒子}} / \text{g}_{\text{腫瘍}}$  程度の集積量が最高で、我々が目標とする  $1-2\text{mg}$  とは約 10 倍の開きがある。本基盤 C では前者 i) の制約を解決する事を目的に、チェーンリポート集積法とい

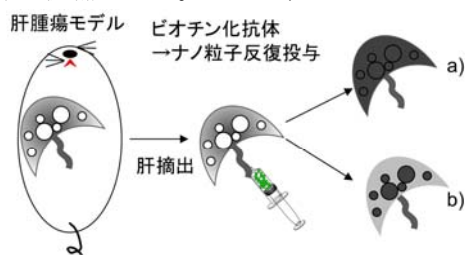
う新規技術の確立を目指した。この方法は、免疫染色の技術を生体内に応用し、磁性ナノ粒子をアビジン修飾した粒子Aとビオチン修飾した粒子Bを交互に生体内に投与して腫瘍への集積を高めようというものであった。

in vitro では複数回投与により細胞表面へのナノ粒子集積量が上がることは確認出来ていたので、チェーンリピート集積法を、マウスを使った in vivo の実験系で再現する事が本研究期間で行うことであった。肝臓に多発性の転移巣をもつ動物モデルを使い、アビジン化治療担体、ビオチン化治療担体を交互に投与して癌病巣への治療担体の集積量を相乗的にあげる新規ドラッグデリバリーのシステムを完成させる事が、研究計画調書に記載した到達目標である。

### 3. 研究の方法

#### 1 : ラット肝腫瘍モデルの摘出肝臓(ex-vivo)におけるチェーンリピート集積法の確立

癌細胞に高発現している非癌細胞では発現が低い膜表面分子 (HER2, EGFR, IGFR, IL-4, c-met 等の受容体や claudin4 等の構造蛋白等) に対する抗体が本研究で使う治療抗体の候補になる。しかし、スライドガラ



=図7 ex vivoでのチェーンリピート集積=

ス切片上で行った免疫組織染色の既存の結果が、血管を通して抗体を注入した3次元構築を保った臓器でも再現されるとは限らない。まず、3次元的な臓器内で癌を特異的にターゲティング出来る抗体を網羅的にスクリーニングする。微小鉄剤 (3-15 $\mu$ m) に代わる可視化できる微小粒子

として、蛍光を発するナノ半導体結晶 (QuantumDot=Qdot) を用いる。肝腫瘍モデルは申請者が独自に開発したマイクロカプセル化癌細胞による高効率肝腫瘍モデルを使い、腫瘍を伴った肝を摘出する。

i)経門脈的あるいは経肝動脈的にビオチン化抗体を注入。ii)PBS 注入による洗浄 iii)アビジン化 Qdot 注入 iv)ビオチン化 Qdot 注入。その後、iii $\leftrightarrow$ iv を繰り返し、Qdot の分布を蛍光顕微鏡で観察する。非癌肝への非特異的な集積 (図 7a) が少ない、(図 7b) の様な S/N 比の高い蛍光を提供する抗体を選定する。

#### 2 : アビジン化、ビオチン化デキストランマグネタイトの作製

ビオチン化及びアビジン化デキストランマグネタイトは、生体内で癌組織周囲に特異的にデキストランマグネタイトを集積させるための根幹となる物質である。予備実験でカルボキシル基に対し縮合反応を利用してビオチンの結合を試みたが、導入効率が極めて低く反応に供与されるカルボキシル基の数が少ないことが原因だと考えられた。産業技術総合研究所との共同研究により、末端カルボキシル基以外の部位 (6 単糖を開環し、水酸基を活性化したもの等) にビオチンを導入する事を試みる。現在の所この物質は報告の無い新規のものであり、開発、作製に時間を要する可能性はある。

#### 4. 研究成果

本研究の目標は抗体結合ナノ粒子で達成されていた0.2mg鉄粒子/g腫瘍という集積量を上回る粒子送達方を開発する事であった。現在、全く別のアプローチで0.58mg鉄粒子/g腫瘍の集積量が達成できたので、今後はこの新しいアプローチを主軸に据えて研究を展開していきたい。

当初考案したアビジン結合粒子、ビオチン結合粒子を交互に生体に投与するチェーンリピート集積法は生体内では肝臓のKupper細胞、脾臓を初めとするマクロファージによる貪食作用を受けやすく、腫瘍に効率的に送達する事がなかなか出来なかった。さらに、ナノ粒子とアビジンの結合は安定して再現させる事が出来ず、粒子の体内動態も単独の粒子とは大きく異なる事から、将来的な薬剤としての認可獲得にも多くの障害があることが認識できた。

肝臓や脾臓のマクロファージ(Mφ)により貪食され、腫瘍に有効に分布しない問題がある。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、粒子表面をPEGで覆うことによりMφによる貪食を回避するステルス作用を持たせる事ができた。粒子のPEG化によるステルス化は比較的一般的な汎用技術だが、粒子への結合のリンカーであるブロックポリマーが偶然にも腫瘍血管への特異結合をもたらしているらしく、摘出臓器における磁性ナノ粒子の分布を鉄染色(プルシアンブルー染色)を行うと、ほぼ、腫瘍血管内皮に特異的に集積していた。当初の目標である  $1\sim 2\text{mg 鉄粒子} / \text{g 腫瘍}$  の集積が現実のものとして捉えられる所にきている。

#### 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5件)

- ① Kita E, Oda T, Kayano T, Sato S, Minagawa M, Yanagihara H, Kishimoto M, Mitsumata C, Hashimoto S, Yamada K, Ohkohchi N. Ferromagnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia and thermoablation therapy. Journal of Physics D. 43. 474011. 2010 査読有
- ② Kita E, Kayano T, Minagawa M, Yanagihara H, Kishimoto M, Hashimoto S, Yamada K, Oda T, Ohkohchi N, Takagi T, Kanamori T, Ikehata Y, Nagano I. Heating characteristics of ferr

romagnetic iron oxide nano-particles for magnetic hyperthermia. Journal of Applied Physics. 107. 09B321. 2010 査読有

- ③ Yamada K, Oda T, Hashimoto S, Enomoto T, Ohkohchi N, Ikeda H, Yanagihara H, Kishimoto M, Kita E, Tasaki A, Satake M, Ikehata Y, Nagae H, Nagano I, Takagi T, Kanamori T. Minimally required heat doses for various tumour sizes in induction heating cancer therapy determined by computer simulation using experimental data. International Journal of Hyperthermia. 26(5)465-474. 2010 査読有
- ④ Hashimoto S, Oda T, Yamada K, Takagi M, Enomoto T, Ohkohchi N, Takagi T, Kanamori T, Ikeda H, Yanagihara H, Kita E, Tasaki A. The measurement of small magnetic signals from magnetic nanoparticles attached to the cell surface and surrounding living cells using a general-purpose SQUID magnetometer. Phys Med Biol. 54: 2571-83. 2009 査読有
- ⑤ Kita E, Yanagihara, H. Hashimoto, S. Yamada, K. Oda T. Kishimoto, M. Tasaki, A. Hysteresis Power-Loss Heating of Ferromagnetic Nanoparticles Designed for Magnetic Thermoablation. Magnetics, IEEE Transactions on, 44(11); 4452-4455. 2009 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① Ohara Y, Oda T, Yamada K, Hashimoto S, Akashi Y, Kobayashi A, Fukunaga K, Sasaki R, Ohkohchi N. Enhanced delivery of chemotherapeutic nanoparticles by depleting host Kupffer cells. Ohara Y, Oda T, Yamada K, Hashimoto S, Akashi Y, Kobayashi A, Fukunaga K, Sasaki R, Ohkohchi N. Enhanced delivery of chemotherapeutic nanoparticles by depleting host Kupffer cells. American Association of Cancer Research special conference "Nano in Cancer" 2011. 1. 12-15 Miami, FL, USA
- ② 大原佑介、小田竜也、山田圭一、橋本真治、明石義正、村田聡一郎、小林昭彦、福永 潔、佐々木亮孝、大河内信弘. マクロファージ除去によりナノ粒子化抗癌剤の腫瘍集積を増大させる. 第69回日本癌学会学術総会. 2010. 9. 22. 大阪
- ③ 山田圭一、小田竜也、大原佑介、橋本真

治、小林昭彦、村田聡一郎、福永 潔、佐々木亮孝、大河内信弘。多発性肝転移を電磁誘導加温にて焼灼する条件とそのための新規磁性粒子の開発。第22回日本肝胆膵外科学会・学術集会。2010.5.26 仙台

- ④ S Hashimoto, T Oda, K Yamada, Y Ohara, N Ohkohchi, H Yanagihara, M Kishimoto, E Kita, T Kanamori, Y Ikehata, H Nagae, I Nagano Development of thermo-ablation cancer therapy using new ferromagnetic nanoparticles and alternative magnetic field device :Superparamagnetic particles versus New ferromagnetic nanoparticles. 第68回日本癌学会総会. 2009.10.1-10.3 横浜
- ⑤ 榎野尊 橋本真治 山田圭一 小田竜也 佐伯大輔 金森敏幸 柳原英人 岸本幹雄 喜多英治 強磁性ナノ粒子流体における溶媒粘性の影響。第33回日本磁気学会学術講演会。2009.9.12-9.15 長崎
- ⑥ 橋本真治、小田竜也、山田圭一、大原佑介、大河内信弘、柳原英人、喜多英治、岸本幹雄、長野勇、池畑芳雄 強磁性体ナノ粒子を用いた新規温熱療法の開発へ向けて。第33回日本磁気学会学術講演会。2009.9.12-9.15 長崎
- ⑦ Yamada K, Oda T, Hashimoto S, Takagi M, Ohkohchi N, Ikeda H, Yanagihara H, Kita E, Tasaki A, Takagi T, Kanamori T. The physical requirement for induction heating cancer therapy using magnetic nanoparticles. 25th Annual Meeting of the EUROPEAN SOCIETY for HYPERTHERMIC ONCOLOGY. 2009. 6.4-6.6 Verona, Italy
- ⑧ 高木美那子, 小田竜也, 山田圭一, 橋本真治, 村田聡一郎, 大河内信弘 リゾピストにおける電磁誘導焼灼治療と免疫反応を組み合わせた多発がん結核治療の試み。第109回日本外科学会定期学術集会 2009.4.2-4.4. 福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 竜也 (ODA TATSUYA)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
研究者番号：20282353

### (2) 研究分担者

村田 聡一郎 (MURATA SOICHIRO)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：40436275

### (3) 連携研究者

喜多 英治 (KITA EIJI)  
筑波大学・大学院数理工学物質科学研究科・教授  
研究者番号：80134203

金森 敏幸 (KANAMORI TOSHIYUKI)  
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ  
ニクス研究センターバイオナノマテリア  
ルチーム・主任研究員  
研究者番号：50356797