

令和元年6月4日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01428

研究課題名(和文)超音波感受性物質内封ナノリポソームを用いた非侵襲的がん超音波力学療法の実用化研究

研究課題名(英文) Study on practical application of non-invasive sonodynamic cancer therapy using ultrasound sensitive substance-loaded nanoliposome

研究代表者

芝口 浩智 (Shibaguchi, Hirotomo)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：60295061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：非侵襲的ながん治療を考えた時、低出力の超音波と超音波感受性物質、超音波増感剤を組み合わせた組合せ超音波力学療法(combination sonodynamic therapy: cSDT)は非常に有望である。今回作製した約90 nmの直径を持つナノ粒子は肝臓への集積なしに腫瘍組織に集積させることに成功した。一方で、増感剤については相変化ナノ液滴等ナノサイズの気泡を作製することができず、これまでと同様にマイクロバブルを使用した。担癌動物を用いたcSDTとしての効果は限定的だった。この結果は、cSDTのためには腫瘍組織の微小環境において超音波感受性剤と増感剤の両者が必要不可欠なことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの超音波力学療法(SDT)の効果を増強するための組合せSDT(cSDT)において、薬剤のナノ粒子への封入を試みてきた。粒子径100-200 nmでは腫瘍組織と肝臓に集積したが、粒子径約90 nmの超音波感受性物質内封ナノ粒子では、腫瘍組織に特異的に集積させることに成功した。これらの結果は、薬剤の静脈内投与によるcSDTを考える上で期待した通りの結果である。一方、超音波増感剤では、ナノサイズのものを作製できず、従来同様にマイクロバブルを用いたが、その効果は限定的であった。したがって、cSDTではナノサイズにした超音波感受性物質、増感剤の両者を腫瘍組織に集積させる必要がある。

研究成果の概要(英文)：When considering non-invasive cancer treatment, combination sonodynamic therapy: cSDT, which combines low-intensity ultrasound and ultrasound-sensitive substances and ultrasound sensitizers, is very promising. The nanoparticles with a diameter of about 90 nm created this time were successfully accumulated in tumor tissue without accumulation in the liver. On the other hand, phase-change nanodroplets and other nanosized bubbles can not be produced as ultrasound sensitizers, and microbubbles have been used as before, but their effects as cSDT using mouse xenograft model are limited. The results suggest that cSDT requires both an ultrasound-sensitive agent and an ultrasound sensitizer with a high concentration in the tumor tissue microenvironment to enhance the anti-cancer effect.

研究分野：分子生物学

キーワード：超音波力学療法 ドラッグデリバリーシステム ナノメディシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの治療は、外科療法や放射線療法、化学療法を中心に単独、あるいはこれらを併用することで行われているが、いずれも人体に対して侵襲的であり、特に化学療法と放射線療法の併用では、強い副作用のため治療が中断されることもしばしばである。非侵襲的ながん治療方法を考えるとき、低出力の超音波と超音波感受性物質を用いる超音波力学療法(SDT)は、超音波が光に比べ体の深部にまで到達できることや装置の簡便さ、特定部位にのみ照射できることなどを考慮すると非常に有望といえる。ポルフィリン誘導体の一つ DEG を用いた SDT が担癌マウスモデルにおいて、有意な腫瘍増殖抑制作用を示したが、DEG の特徴の一つに他のポルフィリン誘導体と異なり光線によって励起しないことがある。これは、SDT / 光線力学療法の代表的な副作用である光過敏症を回避するという点から超音波感受性物質として有利であり、実際に光線照射によって他のポルフィリン誘導体が皮膚過敏症を引き起こす条件下で DEG ではそのような傷害は認められなかった。一方、従来の SDT に対して超音波増感剤を組合せた組合せ SDT (cSDT) が強力な抗腫瘍効果を示すことを明らかにしてきたが、このときの薬剤は腫瘍内投与であり実際に臨床応用を考えると静脈内投与できる剤型が望ましい。これまでに超音波感受性物質のナノリポソームへの封入によりナノ粒子化を試み、その生体内での分布や動態を検討してきたが、作製したナノ粒子は Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR 効果) によって腫瘍組織に集積したが、同時に肝臓へも集積した。したがって、ナノ粒子の改良により腫瘍組織に特異的に集積する製剤を作製する必要があった。

2. 研究の目的

本研究計画では、cSDT の実用化に向けた基礎データとして静脈内投与により循環系を通して腫瘍に選択的、且つ高濃度に薬剤が集積するような超音波感受性物質の修飾・改良を目的とする。これまで、DEG の薬物送達(DDS)として PEG ナノリポソームを作製し、担癌マウスモデルで生体内分布を検討してきたが、腫瘍組織への集積が認められる一方で、肝臓へも滞留した。SDT/cSDT の利点の一つは、たとえ超音波照射をする領域以外に薬剤が存在しても超音波を照射しない限り活性化することがないため問題にならないことであるが、超音波の入射角の自由度を担保できる点などを考慮すると腫瘍組織以外には滞留しないことが求められる。また、実際の cSDT の効果についても今回作製する DEG 内封ナノリポソームを用いて検討し、これら基礎データをもとに cSDT の実用化に向けた課題解決を目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画では、cSDT の効果増強のために超音波感受性物質を内封した肝臓に集積しないナノリポソーム製剤を作製するが、ナノ粒子製剤作製に先立って超音波感受性物質として DEG を改めて作製し、その性状解析を行った。

- (1) DEG の性状解析：今回新たに合成した DEG は、(a) 薄層クロマトグラフィーと (b) 液体クロマトグラフィー、(c) TOF-MS にてそれぞれ確認を行った。次に、
- (2) DEG のナノ粒子化とその性状解析：DEG 溶解リン酸緩衝液と脂質よりナノ粒子化を試みた。粒子径は、動的光散乱法によって測定した。
- (3) ナノ粒子の生体内分布：作製したナノ粒子の担癌マウスモデルでの動態は、DEG と Alexa Fluor 750 を共封入し蛍光を In vivo imaging system (IVIS) を用いて経時的に三日間隔にわたって測定した。
- (4) cSDT の抗腫瘍作用：cSDT の効果は、ヒト胃癌細胞株 MKN-74 細胞を播種した SHO マウスモデルで、マイクロサイズではあるが、ソナゾイドを超音波増感剤として用いて、cSDT 後、経時的に腫瘍サイズを測定することでその効果を検討した。

4. 研究成果

本研究計画で用いた DEG は、他の報告で多く見られる超音波と光線の両方に感受性を持つ化合物と違い、超音波だけにしか反応せず光線には反応しない特徴を持つ。また、励起状態から

定常状態に戻る時に蛍光を発しないなど、超音波感受性物質としてはやや特異な化合物である。

(1) DEG の性状解析：今回新たに合成した DEG は、(a) 薄層クロマトグラフィーと (b) 液体クロマトグラフィー、(c) TOF-MS にてそれぞれ確認を行った。

(a) 薄層クロマトグラフィーは、シリカゲルに対して $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}=6:4:1$, $7:3:0.5$ 及び $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=1:1$ でそれぞれ新規合成産物、標品、2 点打ちでスポットの Rf 値を比較し、同一化合物であることを確認した。

(b) 液体クロマトグラフィーでは、ODS-300-5 カラムにて流速 1.0mL/min で (A) アセトニトリルと (B) 0.1%ギ酸水溶液を A:B = 20:80~A:B = 80:20 まで移動相の組成比を 15 分かけて直線的に変更しサンプルの保持時間を測定、標品と新規合成産物が同じ保持時間で溶出されることを確認した。このとき、LC 純度は 92.8%だった。

(c) TOF-MS による測定では、標品、新規化合物ともに MW827 の目的分子量に相当する分子イオンピークが認められ、DEG であることが確認された。

以上 (a) - (c) から、今回目的とする DEG が作製できたことを確認した。

(2) DEG 内封ナノ粒子の性状解析：DEG 内封ナノリポソームを作製 (a)、その性状解析 (b) を行った。

(a) 今回新たに合成した DEG (500 μM) および Alexa Fluor 750 (114 μM) の PBS 溶液よりナノリポソームを作製した。このとき、総脂質濃度は 27.7 mg/mL だった。

(b) 作製した DEG 内封ナノリポソームの平均粒子径を動的光散乱法で測定した結果、 $86 \pm 0.14 \text{ nm}$ だった。

(3) ヒト胃癌細胞株 MKN-74 を播種した SHO マウスに上記 (2) で作製した DEG 内封ナノリポソームを静脈内投与し、その動態を IVIS にて経時的に観察した結果、DEG 内封ナノ粒子は肝臓に集積することなく腫瘍組織にのみ特異的に集積した。以前作製したナノ粒子は肝臓にも集積したが、サイズ以外で何がその違いを決める因子なのかについては十分な検討を行っておらず、今後さらに詳細な解析が必要である。サイズ以外にも動態に決定的な影響を及ぼす因子が同定できれば、今後のナノ粒子作製時に有用な情報となりうることが期待できる。

(4) 当初の目的通り、肝臓に集積することなく腫瘍組織にのみ集積する DEG 内封ナノ粒子を作製できたことから、ソナゾイドを超音波増感剤として用いた cSDT を行ったところ、ナノ粒子化していない DEG を静脈内投与した場合に比べて有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。その一方で、腫瘍内投与時に見られたような劇的な腫瘍退縮効果は見られなかった。このことから、気泡についても十分量が腫瘍組織の微小環境に存在することが cSDT の強力な効果に必要なことが示唆された。今後は、ナノサイズで DEG 内封ナノ粒子と同時に腫瘍組織に集積させることのできるナノ気泡製剤を開発し cSDT での効果確認が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Shibaguchi H, Luo NX, Shirasu N, Kuroki M, Kuroki M. Enhancement of antitumor activity by using a fully human gene encoding a single-chain fragmented antibody specific for carcinoembryonic antigen. *OncoTargets Ther*, 10: 3879-3990, 2017.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Shibaguchi H, Shirasu N, Kuroki M, Kuroki M, Yasunaga S. Mechanism of anticancer effect on sonodynamic therapy in combination with DEG and microbubbles. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016.10.06. 横浜

2. Shibaguchi H, Shirasu N, Yasunaga S. Effect of the elastic modulus and the cell adhesion molecules in the *in-vitro* model of cancer metastasis. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017.09.30. 横浜
3. Shibaguchi H, Shirasu N, Yasunaga S. Effect of the interaction between cell adhesion molecules and extracellular matrix and the elastic modulus in cancer metastasis. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.12.07. 神戸
4. Shibaguchi H, Shirasu N, Yasunaga S. Accumulation of sonosensitizer-loaded nanoparticle in cancer tissue in sonodynamic therapy. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2018.09.29. 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計 2 件)

名称：Tumor proliferation inhibitor containing ultrasound-sensitive substance and method for inhibiting tumor proliferation by using tumor proliferation inhibitor and low-intensity pulsed ultrasound waves.

発明者：Hirofumi Shibaguchi, Hirofumi Tsuru

権利者：Fukuoka University

種類：特許

番号：US patent No. 14/186859

取得年：2017.09.19.

国内外の別： 国外

名称：超音波感受性物質を含む腫瘍増殖抑制剤および腫瘍増殖抑制剤と低出力超音波を用いた腫瘍増殖抑制方法

発明者：芝口 浩智, 水流 弘文

権利者：芝口 浩智

種類：特許

番号：第 5908839 号

取得年：2016.04.01.

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：安永 晋一郎

ローマ字氏名：Yasunaga Shin'ichiro

所属研究機関名：福岡大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 50336111

研究分担者氏名 : 白須 直人

ローマ字氏名 : Shirasu Naoto

所属研究機関名 : 福岡大学

部局名 : 医学部

職名 : 講師

研究者番号 (8 桁): 70551422

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。