

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09511

研究課題名(和文) ナノ粒子を用いた血管炎症病変の非侵襲的診断および治療法の探求

研究課題名(英文) Noninvasive imaging and therapy of vascular inflammation with gold nanoparticles

研究代表者

小菅 寿徳 (Kosuge, Hisanori)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：00376774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、金ナノ粒子を用いて血管炎症疾患である動脈硬化や腹部大動脈瘤の非侵襲的な診断および治療の可能性について検討した。金ナノ粒子投与後に頸動脈結紮および腹部大動脈瘤モデルマウスをCT撮影することにより、血管炎症部位に金ナノ粒子が集積することを確認した。また、金ナノ粒子を取り込んだ細胞に近赤外線レーザー光を照射することにより細胞死の誘導が確認された。これらの結果から金ナノ粒子を用いた血管炎症疾患の特異的CT診断や近赤外線レーザー光照射による非侵襲的治療の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、金ナノ粒子を用いて血管炎症部位(動脈硬化や腹部大動脈瘤)をCT撮影により非侵襲的に検出することが可能であった。また、金ナノ粒子を取り込んだ細胞に対して近赤外線レーザー光を照射することにより、細胞死が誘導されることが示され、近赤外線レーザー光照射による非侵襲的な治療の可能性が示唆された。金ナノ粒子は診断および治療の双方に有用であり、血管炎症性病変の早期発見に加え、早期治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We evaluated gold nanoparticles for noninvasive imaging and therapy of vascular inflammation. Computed tomography (CT) imaging demonstrated gold nanoparticles accumulated in the lesion of vascular inflammation in mouse models after injection of gold nanoparticles. Laser light exposure induced death of cells with gold nanoparticles. Based on these experiments, gold nanoparticles have the potential for CT imaging and laser ablation of vascular inflammation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：血管炎症 ナノ粒子

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

1. 研究開始当初の背景

心血管病は欧米諸国を中心に依然死亡率が高い疾患である。マクロファージは、動脈硬化進展・プラーク破綻や動脈瘤の拡張・破裂に重要な役割を担っている。マクロファージを含む血管壁内の細胞生物学的な変化は、不安定プラーク進展、動脈瘤の拡張やそれに伴う臨床イベントの予測に重要な因子と考えられる。しかし、現行の画像診断から血管壁の細胞生物学的変化の情報を十分に得ることは難しい。一方、ナノ粒子は血管炎症細胞を特異的に標的できるため、細胞生物学的変化を捉えることができ、病変の早期発見や不安定化の検出を可能とする。申請者らは血管炎症の動物モデル(動脈硬化や動脈瘤)を用いて、蛍光イメージングや *in vivo* MRI によりカーボンナノ粒子が動脈硬化部位へ集積することを確認した。また、カーボンナノ粒子を取り込んだマクロファージ細胞に対して近赤外線レーザー光を照射することにより、細胞のアポトーシスを誘導することを確認し、診断に加え治療への応用の可能性を見出した。ナノ粒子は血管炎症病変の非侵襲的診断や治療への有用性が期待されるが、カーボンナノ粒子は現行の画像診断装置(CT、MRI など)では利用し難いなど臨床への応用、特に治療への応用は進んでいないのが実情である。

金ナノ粒子は CT 造影剤としての利用が報告され、さらにレーザーを用いた photothermal therapy の適用の可能性がある。金ナノ粒子は *in vivo* では不安定なため、ポリエチレングリコールでコーティングされるが、ヨード造影剤と同様に大半が急速に体外へ排泄される。そのため、細胞生物学的変化を調べるには十分とはいえない。しかし、金ナノ粒子をより大きな粒子中に集積・内包させることで、半減期が短い金ナノ粒子単体に比べマクロファージへの取り込み効率が格段に改善し、診断・治療効果の向上が期待できる。近年、我々は、DNA やマグネタイトナノ粒子を内包したリン酸カルシウムナノ粒子を、界面活性剤を用いずに簡便に合成する技術を開発した。合成されたリン酸カルシウムナノ粒子は、マクロファージなどの細胞内に高効率に取り込まれる。リン酸カルシウムは細胞内で溶解し、血清中にもともと含まれる無機イオンとなるため、生体に対する安全性は高い。

2. 研究の目的

本研究は、金ナノ粒子を用いて血管炎症疾患である動脈硬化や大動脈瘤の進展に重要な役割を担っているマクロファージを標的とした非侵襲的な診断および治療の可能性を追求するものである。金ナノ粒子を内包したリン酸カルシウムマトリックスからなる複合ナノ粒子を合成し、マイクロ CT 装置を用いて金ナノ粒子や複合ナノ粒子のマクロファージへの取り込みを検証する。また、金ナノ粒子を取り込んだマクロファージに近赤外線レーザー光を照射し、細胞死を誘導するレーザー設定について検討する。さらに、金ナノ粒子や核酸を内包した複合ナノ粒子を合成し、複合ナノ粒子投与による動脈瘤進展の抑制について検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* における CT 装置を用いた金ナノ粒子のマクロファージへの取り込みの検証

金ナノ粒子(GNPs)を内包したリン酸カルシウムマトリックスからなる複合ナノ粒子を合成する。マウスマクロファージ細胞(RAW264.7)と GNPs の共培養を行う。培養 24 時間後、細胞を回収しマイクロ CT 装置により、CT 値を測定する。また、細胞毒性を MTT assay により評価する。

(2) *in vivo* における CT 装置を用いた金ナノ粒子のマクロファージへの取り込みの検証

8 週齢の雄 FVB マウスに高脂肪食を 1 ヶ月与え、streptozotocin(40mg/kg)を 5 日間腹腔内投与する。Streptozotocin 投与 2 週間後に左総頸動脈を結紮する。術後 2 週間でマクロファージに富んだ内膜肥厚が形成されるため、頸動脈結紮術の 2 週間後にマイクロ CT にてマウスの撮影を行う。撮影後 GNPs を尾静脈から静注し、24、48 時間後に CT 撮影を行い、経時的に頸動脈への集積を観察する。

20 週齢の雄 ApoE ノックアウトマウスに浸透圧ポンプを皮下に植込み、アンジオテンシン II を持続的に (1 µg/kg/min) 14 日間注入する。腹部エコーにより経時的に大動脈径を測定する。アンジオテンシン II 注入開始 2 週間後にマイクロ CT にて大動脈の撮影を行う。撮影後 GNPs を尾静脈から静注し、24、48 時間後に CT 撮影を行い経時的に大動脈への集積を観察する。*In vivo* 撮影後大動脈を摘出し、摘出血管をマイクロ CT にて撮影する。

In vivo CT 撮影終了後に頸動脈・大動脈を摘出し、細胞内へのナノ粒子の取り込みを電子顕微鏡を用いて評価する。

(3) 金ナノ粒子を取り込んだ細胞にレーザー光を照射し、細胞死を誘導するレーザー設定の検討

RAW264.7 と GNPs を 24 時間共培養する。その後細胞を回収し、近赤外線レーザー光照射(830nm)を行う。設定は 29.4mW-400mW、200 femtosecond、10-30 分とする。照射後、細胞活性を MTT assay により評価する。

頸動脈結紮モデル、腹部大動脈瘤モデルに対して GNPs を尾静脈から静注し、病変血管と正常血管を摘出する(*ex vivo*)。摘出血管に対して、近赤外線レーザー光照射を行い、照射後細胞死(アポトーシス)を TUNEL 染色法にて評価する。

頸動脈結紮モデル、大動脈瘤モデルに対して GNPs を尾静脈から静注し、麻酔後、対象血管を露

出し、露出病変血管に近赤外線レーザー光を照射する (in vivo)。照射後、血管を摘出し細胞死 (アポトーシス) を TUNEL 染色法にて評価する。Ex vivo および in vivo のレーザー設定は、細胞実験の結果に基づく。

(4) 金ナノ粒子や核酸を内包した複合ナノ粒子の投与による動脈瘤の進展抑制に関する検証
マイクロ RNA の炎症抑制効果を検証するため、LPS 刺激下の細胞にマイクロ RNA を導入し、TNF- の発現抑制について ELISA にて評価する。また、金ナノ粒子やマイクロ RNA を共内包した複合粒子の合成を行う。腹部大動脈瘤モデルに対して、複合ナノ粒子を尾静脈より静注し、14 日目にマイクロ CT 撮影を行い、ナノ粒子の動脈瘤への集積を(2) の結果と比較検討する。撮影後大動脈を摘出し、病変部へ浸潤しているマクロファージを免疫染色により評価する。

4. 研究成果

(1) in vitro における CT 装置を用いた金ナノ粒子のマクロファージへの取り込みの検証
リン酸カルシウム過飽和溶液と GNPs (粒子径 5 nm、ポリエチレングリコール修飾) の混合液から、複合ナノ粒子を得るための設計指針を検討した。得られた知見に基づき、リン酸カルシウムと GNPs からなる複合ナノ粒子の合成に成功した。in vitro, in vivo での検討に向けた大量合成が今後の課題である。

また、GNPs 単体 (粒子径 15 nm、表面修飾基は不明) の細胞への取り込みを検証した結果、GNPs 単体と共培養した細胞は、共培養していない細胞と比較し、有意に CT 値の上昇を認めた。細胞毒性は認められなかったことから、以降の実験は GNPs 単体で施行した。

(2) in vivo における CT 装置を用いた金ナノ粒子のマクロファージへの取り込みの検証

頸動脈結紮モデルマウスに、10mgAu, 20mgAu の GNPs を静注した。48 時間後、10 mg Au 投与群と 20 mg Au 投与群共に、左頸動脈 (結紮側) は右頸動脈 (非結紮側) に比べ高い CT 値を示した。また、20mgAu 投与群は 10 mg Au 投与群に比し、左頸動脈 (結紮側) の CT 値が高値であった。

腹部大動脈モデルマウスに、10mgAu, 20mgAu の GNPs を静注した。両群ともに無投与群と比較し、動脈瘤血管外膜側に有意な CT 値上昇を認めた。24 時間後は大動脈内腔の CT 値も高かったが、48 時間後には低下し、より特異的な GNPs の集積が血管外膜側に認められた。また、摘出血管においても、GNPs 投与群において血管外膜側に高 CT 値を認めた。

走査電子顕微鏡で血管壁の観察は可能であったが、エネルギー分散型 X 線分析による組成分析では白金と金のピークの分離が困難であった。試料作成の段階で白金パラジウムコーティングを行ったことが原因と考えられ、カーボンコーティングによる作成が必要であると考えられた。

(3) 金ナノ粒子を取り込んだ細胞にレーザー光を照射し、細胞死を誘導するレーザー設定の検討

RAW264.7 と GNPs を 24 時間共培養し、共培養した細胞と共培養していない細胞 (コントロール) にそれぞれ近赤外線レーザー光を照射した。GNPs (100 μ gAu/ml) と共培養した細胞に対して、29.4mW, 53mW, 75mW, 97mW, 155mW, 200mW の強度で 5 分照射を行ったが、いずれの強度でも細胞死誘導は見られなかった。GNPs (200 μ gAu/ml) と共培養した細胞に対して、437mW \cdot 10 分の照射を行うと、コントロール細胞に比し有意に細胞活性の低下が見られたが、196mW \cdot 10 分の照射では細胞死は誘導されなかった。また GNPs (100 μ gAu/ml) と共培養した細胞に対して、437mW \cdot 30 分、400mW \cdot 20 分の照射によりコントロール細胞と比べ有意に細胞活性低下を認めた。一方、400mW \cdot 10 分、178mW \cdot 20 分の照射では細胞死誘導は見られなかった。細胞死誘導を認めたレーザー強度は強く in vivo での利用は困難であると想定されるため、レーザー設定について細胞を用いてさらに検討する必要があると考えられた。そのため、ex vivo や in vivo に対しての検討には至らなかった。

(4) 金ナノ粒子や核酸を内包した複合ナノ粒子の投与による動脈瘤の進展抑制に関する検証
LPS 刺激の濃度や刺激時間を変えて TNF- の発現について検証したが、マイクロ RNA 導入による TNF- 発現抑制について有意な結果を得るには至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Nakamura M, Oyane A, Kuroiwa K, Shimizu Y, Alexander P, Misawa M, Numano T, Kosuge H. Facile one-pot fabrication of calcium phosphate-based composite nanoparticles as delivery and MRI contrast agents for macrophages. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2018;162:135-145. 査読有
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.11.034

[学会発表] (計 10 件)

Hisanori Kosuge, Maki Nakamura, Ayako Oyane, Kazuko Tajiri, Nobuyuki Murakoshi, Satoshi Sakai, Akira Sato, Masaki Ieda, Kazutaka Aonuma. Noninvasive imaging of experimental

aortic aneurysms using gold nanoparticles. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019 年

Hisanori Kosuge, Maki Nakamura, Ayako Oyane, Kazuko Tajiri, Nobuyuki Murakoshi, Satoshi Sakai, Akira Sato, Kazutaka Aonuma. Gold Nanoparticles Allow CT Imaging of Experimental Atherosclerosis. Vascular Discovery: From Genes to Medicine Scientific Sessions 2018 2018 年

Hisanori Kosuge, Maki Nakamura, Ayako Oyane, Kazuko Tajiri, Nobuyuki Murakoshi, Satoshi Sakai, Akira Sato, Masaki Ieda, Kazutaka Aonuma. Gold Nanoparticles for Detection of Vascular Inflammation in Experimental Carotid Atherosclerosis and Aortic Aneurysms. American Heart Association Scientific Sessions 2018 2018 年

中村真紀、黒岩輝代子、大矢根綾子、小菅寿徳. Interaction of calcium phosphate with gold nanocrystals coated with polyethylene glycol. Bioceramics 30 2018 2018 年

Hisanori Kosuge, Maki Nakamura, Ayako Oyane, Kazuko Tajiri, Nobuyuki Murakoshi, Satoshi Sakai, Akira Sato, Kazutaka Aonuma. Gold nanoparticles for imaging vascular inflammation. 第 82 回日本循環器学会学術集会 2018 年

中村 真紀, 黒岩 輝代子, 大矢根 綾子, 小菅 寿徳. ポリエチレングリコールで被覆された金ナノ粒子を担持したリン酸カルシウム系ナノ粒子の作製. 公益社団法人日本セラミックス協会 2018 年年会 2018 年

中村 真紀, 大矢根 綾子, 黒岩 輝代子, 清水禎樹, 三澤 雅樹, 沼野 智一, 小菅 寿徳. マクロファージイメージングのためのリン酸カルシウム複合ナノ粒子の one-pot 合成. つくば医工連携フォーラム 2018 2018 年

Maki Nakamura, Ayako Oyane, Kiyoko Kuroiwa, Masaki Misawa, Tomokazu Numano, Hisanori Kosuge. FACILE ONE-POT FABRICATION OF MAGNETIC IRON OXIDE-CALCIUM PHOSPHATE COMPOSITE NANOPARTICLES AS DELIVERY AND IMAGING AGENTS FOR MACROPHAGES. 17th Asian BioCeramics Symposium 2017 2017 年

中村 真紀、大矢根 綾子、黒岩 輝代子、三澤 雅樹、沼野 智一、小菅 寿徳. マクロファージ検出のための磁性酸化鉄ナノ粒子含有リン酸カルシウム系粒子の作製. 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 2017 年

中村 真紀, 黒岩 輝代子, 大矢根 綾子, 三澤 雅樹, 沼野 智一, 小菅 寿徳. 医療用注射液を用いた磁性酸化鉄含有リン酸カルシウムナノ粒子の作製. 公益社団法人日本セラミックス協会 2017 年年会 2017 年

〔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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中村 真紀

ローマ字氏名：Nakamura Maki

研究協力者氏名：大矢根 綾子

ローマ字氏名：Oyane Ayako

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。