

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01356

研究課題名（和文）シームレスな画像支援を実現するMR・蛍光デュアルイメージング法の開発

研究課題名（英文）MR-fluorescence dual imaging realizes seamless image support for cancer therapy

研究代表者

仲 成幸（Naka, Shigeyuki）

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10359771

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：MR造影剤(Gd)と蛍光色素(fluorescent dye: FD)を内包した高分子ナノミセル(Gd/FDナノミセル)を作製した。このナノミセルを担癌ラットに投与したところ、MRI（磁気共鳴画像）および蛍光画像により、ナノミセルの腫瘍への集積を確認することが出来た。これらの結果により、EPR効果（enhanced permeation and retention effect）によるGd/FDナノミセルを用いた、がん治療におけるMR・蛍光デュアルイメージング法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

がんに対する外科治療では、術前の進展度診断、術中の画像ナビゲーションによる正確な手術、術後の治療効果の評価が重要である。本研究では、新しい高分子ナノミセル（Gd/FDナノミセル）によるDDS（ドラッグデリバリーシステム）を利用して、MR造影剤と蛍光色素をがん病巣に特異的に集積させることにより、MRIによる術前・術後のがん病巣の評価、蛍光画像による術中の画像支援をシームレスに行い、外科治療をより効果的で侵襲の低いものとするを目的とした。

研究成果の概要（英文）：We developed the polymeric nanomicelles (Gd/FD nanomicelle) incorporating a MR contrast media (Gd) and a fluorescent dye (FD). After injecting this nanomicelles into an orthopedic cancer model of rat, we confirmed the accumulation of the nanomicelles to the tumor of the rat by MRI (magnetic resonance imaging) and the fluorescence image. These results suggested the possibility of the MR-fluorescence dual imaging method in the cancer treatment using the Gd/FD nanomicelle by EPR effect (enhanced permeation and retention effect).

研究分野：外科学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム ナノミセル 画像支援 MRI 蛍光観察法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 外科的ながん治療における画像支援は、術前の進展度診断、術中の画像ナビゲーションによる正確な手術、術後の治療効果の評価に必須のものとなっている。この画像支援のために X 線透視、CT、超音波、MRI などが画像モダリティとして用いられている。中でも、MRI は組織の様々な状態を画像化する能力が高く (組織分解能が高く)、さらに肝細胞に特異的に取り込まれる造影剤 (Gd-EOB-DTPA) なども応用され、MR スキャナー自体の機能向上とともに画像診断能力は飛躍的に進歩している。一方、がん病巣に対する高い画像診断能力とはがん病巣の正確な位置の特定に他ならない。そこで、DDS (Drug Delivery System) を利用して MR 造影剤と蛍光色素をがん病巣に特異的に集積させることが出来れば、MRI による術前・術後の評価、蛍光画像による術中の評価をシームレスに行うことが可能になる。

(2) 高分子ナノミセルは血管透過性が亢進した腫瘍組織に特異的に集積・貯留する EPR 効果 (enhanced permeation and retention effect) を有しており、DDS としてがん治療への応用が進められている。滋賀医科大学外科学講座と東京大学工学部片岡-カブラル研究室は、これまでに MR 陽性造影剤である Gd-DTPA (ガドリニウム - ジエチレントリアミン五酢酸) と白金系抗癌剤のオキサリプラチンの誘導体であるダハプラチン (DACHPt) を同時に内包させた高分子ナノミセル (Gd-DTPA/DACHPt ナノミセル) を共同開発し、マウス睪癌 (MiaPaca) モデル、ラット肝癌モデルにおいて MRI により高分子ミセルの腫瘍への集積を画像化し、またその治療効果を示し、Diagnosis (診断) と Therapeutics (治療) を融合した Theranostics として期待されている。

2. 研究の目的

(1) 外科的ながん治療では、術前・術中・術後において的確にがん病巣の進展度を判断することが治療成績の向上および低侵襲治療の成功につながる。このためには、術前・術中・術後において診断と治療のための画像支援が必須となる。この際、画像モダリティの一つとして組織分解能が高く、被爆の心配が無い MRI が有用である。さらに、ナノミセルが腫瘍組織に特異的に集積する EPR 効果に着目し、MR 造影剤 (Gd) と蛍光色素 (fluorescent dye: FD) を内包した高分子ナノミセル (Gd/FD ナノミセル) があれば、MR 画像と蛍光画像により、術前・術中・術後においてがん病巣の状態をよりの確にまたシームレスに診断・評価できると考えた。本研究では、我々が提案する Gd/FD ナノミセルをラット担癌モデルに投与し、MRI および蛍光画像による腫瘍組織の描出能力を評価することにより、最適な Gd/FD ナノミセルの開発、MRI 及び蛍光による観察方法の開発を行う。そして、最終的にはがん治療におけるシームレスな画像支援を実現する MR・蛍光デュアルイメージング法の開発を目的とする。

(2) MR 造影剤と蛍光色素を内包した高分子ナノミセル (Gd/FD ナノミセル) の開発・作製は、これまでの Gd-DTPA/DACHPt ナノミセルの同様の構造に蛍光色素 (IR820、Alexa680 等) を付加したものとなるが、抗がん剤である DACHPt は不要である。しかし、疎水性コア部分の DACHPt を取り除くと安定したミセルを構成することが出来ないため、DACHPt を Retinol (Vitamin A) に置き換え、Gd-DOTA (ガドレル酸メグルミン) と結合させることで安定した高分子ナノミセルを形成させる。上記の新しい Gd/FD ナノミセルについて物性の測定を行ったうえでラット担癌モデルに投与し、磁場強度 3 テスラの臨床用 MRI 装置を用い MR 造影効果と腫瘍への集積効果を評価する。また、蛍光画像観察による評価を行う。これらにより、1. 腫瘍組織描出のために最適な Gd/FD ナノミセルの構造および Gd、蛍光色素の濃度を決定する。2. ラット担癌モデル (肝癌モデル、リンパ節転移モデル、腹膜播種モデル等) において、Gd/FD ナノミセル投与による腫瘍組織の MR 造影効果、蛍光造影効果を評価し、Gd/FD ナノミセルの至適投与量、診断能および術中画像支援の有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 高分子ナノミセル (Gd/FD ナノミセル) の開発・作製

Gd/FD ナノミセルの設計・作製: EPR 効果を有する粒子径のミセルを構成するように、MR 造影効果を示す Gd³⁺錯体とレチノールによる疎水コアを設計する。十分な蛍光強度を有する蛍光色素を選択し、Gd/FD ナノミセルを作製する。Gd/FD ナノミセルの物性評価: 作製した Gd/FD ナノミセルの粒子径、安定性等の物質的特性を評価する。作製された Gd/FD ナノミセルは、以降に述べる動物における安全性評価および MRI および蛍光画像による基礎的評価により、ミセルの構成内容を含む構造を適宜変更し改良する。

(2) Gd/FD ナノミセルの安全性評価

SD mail rat に Gd 濃度として 0.5mmol に調整した Gd/FD ナノミセルを尾静脈より各々、0.5, 1.0, 2.0, 4.0ml/kg 投与し、生死、血液検査 (CBC、肝腎機能) 等にて評価する。

(3) ラット同所性肝癌モデルの作製

同所性肝癌モデル：Wistar-King-Aptekman rat の肝臓にラット肝癌細胞(KDH-8) 0.25ml (5×10^8 個/1ml) を移植する。約9日後に約1cm程度になった肝癌腫瘍をMRIで確認する。

(4) 同所性肝癌モデルにおけるMRIおよび蛍光画像による評価

我々のGd-DTPA/DACHPt ナノミセルの実験結果(Int. J. of Nanomedicine 2015:10 1-11)に従い、先ず同所性肝癌モデルにおいてMRIおよび蛍光画像によるGd/FD ナノミセルの基礎的評価を行う。3テスラMRI装置による画像評価：尾静脈よりGd濃度を0.5mmolに調整したGd/FD ナノミセルを0.2ml/kgより投与し、T1W1における肝腫瘍のsignal intensityを経時的に測定し、Gd/FD ナノミセルの造影効果を評価し、安全域内の至適投与量を決定する。

蛍光画像による評価：MRI撮影評価の後直ちに開腹し、蛍光イメージ装置による肝腫瘍の観察を肝表面より行い、蛍光強度の測定を行う。

肝臓を摘出し組織学的形態評価と画像の対比を行なう。

4. 研究成果

(1) 高分子ナノミセル(Gd/FD ナノミセル)の作製

親水性ポリマーとしてメトキシポリエチレングリコール(MeO-PEG)を用い、疎水性コアとしてのPBLA(ポリ-L-ベンジル-L-アスパルテート)に蛍光色素(IR820)を反応させ、さらにMRI陽性造影剤であるガドレル酸メグルミン(Gd-DOTA)を加え、高分子ポリマーとした。

3種類の高分子ナノミセル MeO-Peg(12K)-PAsp-IR820-DOTA-Gd、MeO-Peg(20K)-PAsp-IR820-DOTA-Gd およびポリエチレングリコールを含まない PAsp-IR820-DOTA-Gd を作製した。それぞれのGd/FD ナノミセルのサイズは20~50nmであった(図1)。

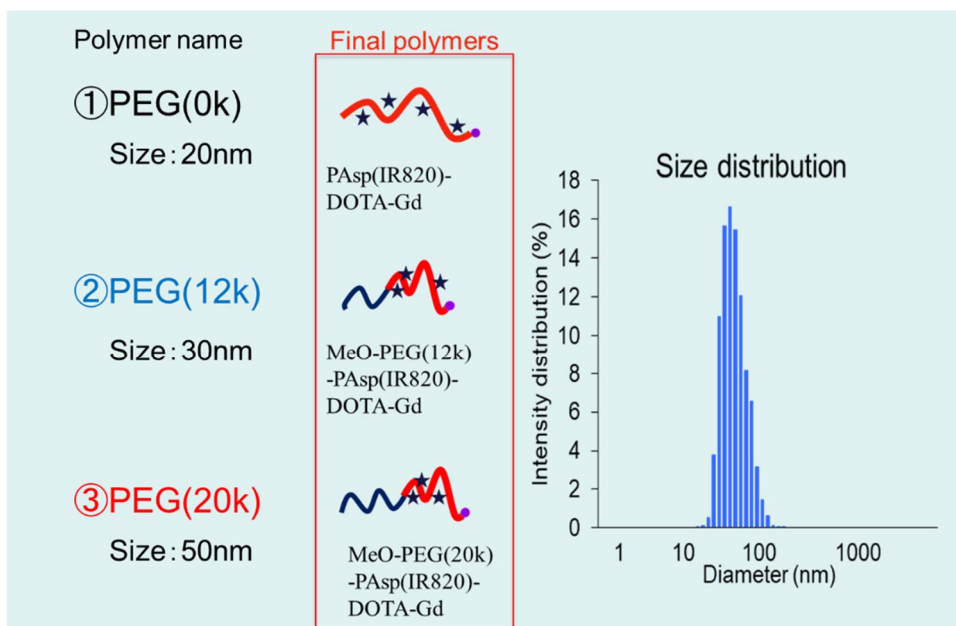


図1. Gd/FDナノミセルの大きさ

(2) 高分子ナノミセル(Gd/FD ナノミセル)のT1緩和能の測定

3T MRIにてT1緩和能の測定をしたところ、PAsp-IR820-DOTA-Gd $5.0\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$ 、MeO-Peg(12K)-PAsp-IR820-DOTA-Gd $17.8\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$ 、MeO-Peg(20K)-PAsp-IR820-DOTA-Gd $44.3\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$ であった。以上より、Gd/FD ナノミセルのT1緩和能はMeO-Peg(20K)-PAsp-IR820-DOTA-Gdが最も高く、Gd造影剤(マグネスコープ)に比べ約8倍であった(図2)。

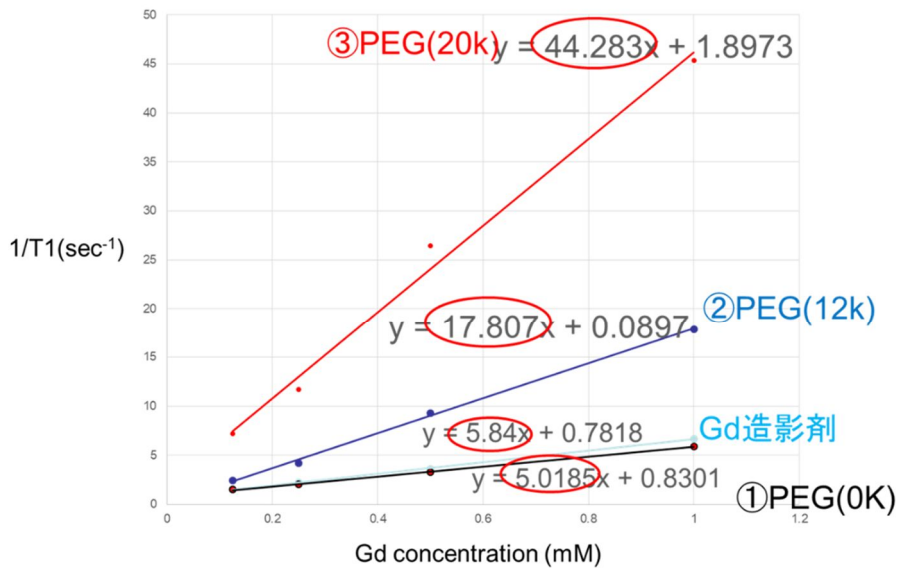


図2. Gd/FDナノミセルのT1緩和能 (TR=2000ms)

(3) 同所性肝癌モデルにおけるMRI画像による評価

Wistar-King-Aptekman rat の肝臓にラット肝癌細胞(KDH-8) 0.25ml(5×10^8 個/1ml)を移植し、同所性肝癌モデルを作成した。移植後7~10日後に肝臓の腫瘍が十分な大きさ(約1cm)になったことをMRI画像により確認し。Gd/FDナノミセルはGd濃度として0.5mmolに調整した。吸入麻酔下のラットに対し、尾静脈よりGd/FDナノミセル0.5, 1.0, 2.0, 4.0ml/kgを注入した。Gd/FDナノミセル0.5, 1.0ml/kgを注入したラットは1日以上生存したが、2.0, 4.0ml/kg注入したラットは死亡した。MRI(シーメンス VERIO 3T)による評価では、Gd造影剤の肝腫瘍への集積を認めた(図3)。

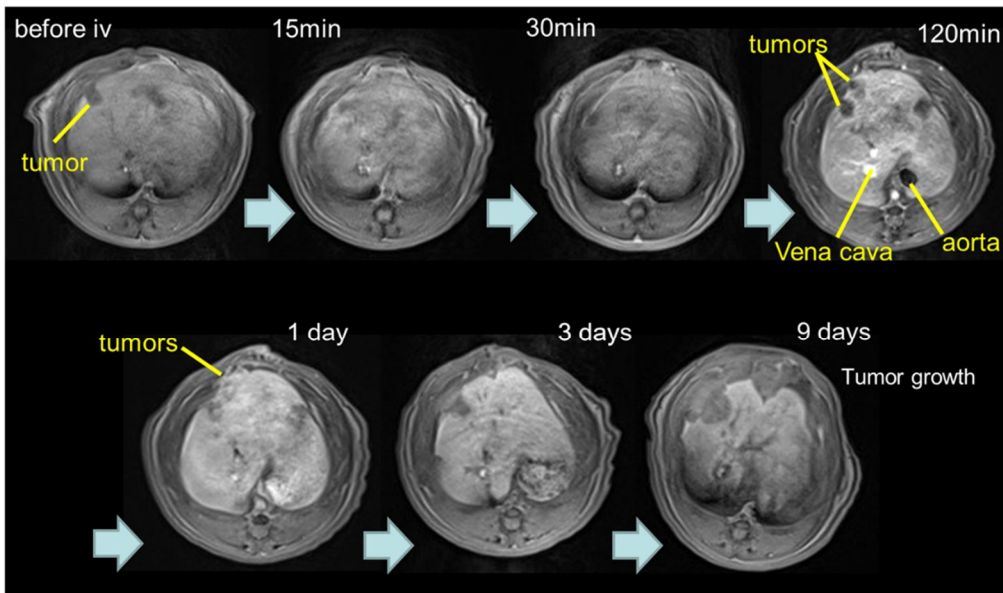


図3. ラット同所性肝癌モデルへのGd/FDナノミセルの集積

(4) 同所性肝癌モデルにおける蛍光画像による評価

吸入麻酔下のラットに対し、尾静脈よりGd/FDナノミセルを注入し、MRIにて肝腫瘍にGd造影剤の集積を確認したのち開腹した。蛍光カメラにて腹腔内を観察した。肝腫瘍に蛍光の発光を認めた(図4)。

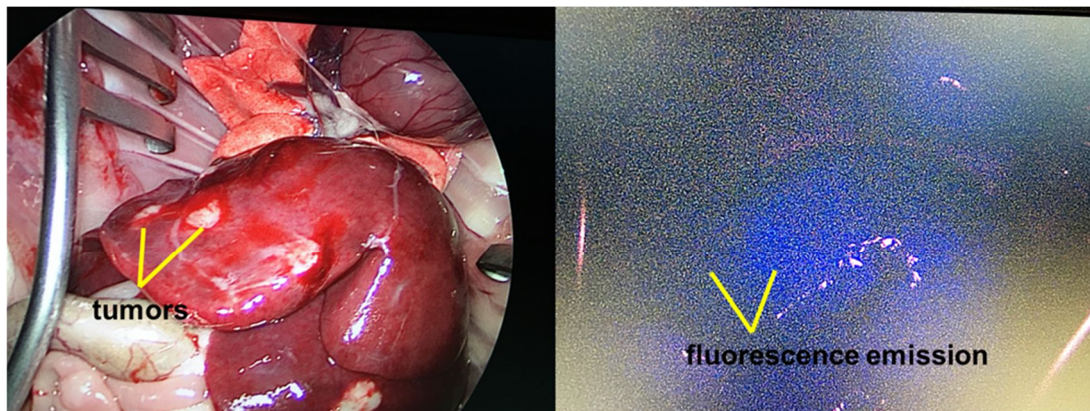


図4. ラット肝腫瘍のGd/FDナノミセルの集積による蛍光発光

<引用文献>

Nguyen Quoc Vinh, S Naka, H Cabral, H Murayama, S Kaida, K Kataoka, S Morikawa and T Tani, MRI-detectable polymeric micelles incorporating platinum anticancer drugs enhance survival in an advanced hepatocellular carcinoma model. International Journal of Nanomedicine 2015;10 1-11

森川茂廣, 仲 成幸, 谷 徹インターベンショナルMRIの現状と展望・腹部領域(肝がん)の現状と展望: インナービジョン 30(9): 40~41・2015

Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, et.al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. Nature Nanotechnology. 2011 Oct 23;6(12):815-23

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Dang Khiem Tran, Naka Shigeyuki, Yamada Atsushi, Tani Tohru	4. 巻 8
2. 論文標題 Feasibility of Microwave-Based Scissors and Tweezers in Partial Hepatectomy: An Initial Assessment on Canine Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fsurg.2021.661064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Atsushi, Tokuda Junichi, Naka Shigeyuki, Murakami Koichiro, Tani Tohru, Morikawa Shigehiro	4. 巻 47
2. 論文標題 Magnetic resonance and ultrasound image guided navigation system using a needle manipulator	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Physics	6. 最初と最後の頁 850 ~ 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mp.13958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Dang Khiem Tran, Naka Shigeyuki, Nguyen Vinh Quoc, Yamada Atsushi, Tani Tohru	4. 巻 34
2. 論文標題 Functional Evaluation of a Novel Microwave Surgical Device in a Canine Splenectomy Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Surgery	6. 最初と最後の頁 164 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08941939.2019.1619884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Dang Khiem Tran, Naka Shigeyuki, Yamada Atsushi, Mukaisho Ken-ichi, Tani Tohru	4. 巻 27
2. 論文標題 Vessel-Sealing Capability of Novel Microwave Sealer: Experimental Study in Animal Models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Innovation	6. 最初と最後の頁 633 ~ 643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1553350620937860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sachiko Kaida, Qin Changyuan, Dang Tran Khiem, Horacio Cabral, Shigeyuki Naka, Tomoharu Shimizu and Masaji Tani
2. 発表標題 Development of visible-DDS using polymer containing MR contrast agent and fluorescent dye
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Japan Society of Clinical Oncology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A. Yamada, S. Naka, J. Tokuda, T. Tani, S. Morikawa
2. 発表標題 An Accuracy Assessment of Hybrid Image Navigation System with MR and Ultrasound to Assist Needle Puncture
3. 学会等名 CARS 2017 Computer Assisted Radiology and Surgery (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷 眞至 (Tani Masaji) (60236677)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	
研究分担者	貝田 佐知子 (Kaida Sachiko) (70710234)	滋賀医科大学・医学部・助教 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------