

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08118

研究課題名（和文）IVRとナノメディシンの併用によるがんターゲティングおよび微小環境の制御

研究課題名（英文）Cancer Targeting and Microenvironment Control by Combination of IVR and Nanomedicine

研究代表者

香田 渉（KODA, Wataru）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30401920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：IVRとナノ粒子を組み合わせることにより、副作用を軽減しながら相乗的に抗癌作用を増幅させる治療の開発するための基礎的実験を行った。IVR手技を用いてナノ粒子を直接的に効率よく目的組織に送達するための担体としてフィブリン糊が使用できることを確認した。また、フィブリン糊を冷却してゲル化の速度をコントロールすることにより、臨床使用に適した反応遅延効果を得られることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノメディシンとIVRを組み合わせ治療の基礎実験を進めることにより、副作用を軽減しながら相乗的に抗癌作用を増幅させる新たな低侵襲がん局所治療法の開発に繋がることが期待される。また、臨床使用に適したフィブリン糊の作成方法を確立することで、担体としての利用以外にも様々な応用が可能になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We performed basic experiments to develop a treatment combining IVR and nanoparticles to synergistically amplify anticancer activity while reducing side effects and showed that fibrin glue could be used as a carrier to directly and efficiently deliver nanoparticles to target tissues using IVR techniques. We also showed that cooling the fibrin glue controlled the rate of gelation and provided a delayed reaction effect suitable for clinical use.

研究分野：放射線医学

キーワード：IVR ナノ粒子 担体 フィブリン糊

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーと医学の融合により新たな高度医療が実現されつつある。なかでも体内の薬物分布を量的・空間的・時間的に制御し、病巣に選択的に送達するナノ粒子の開発とがん治療への応用が注目されている。しかし、現状ではナノ粒子の組織送達率は10%以下に過ぎない。組織送達率を上げることが治療効果の増強につながる一つの鍵であるが、従来の方法ではここに限界があった。一方、近年、画像診断装置の進歩に伴いラジオ波焼灼療法や凍結療法などのアブレーション治療、動脈塞栓療法、動注化学療法など様々な画像誘導下低侵襲治療 (interventional radiology ; IVR) が普及し、がん局所治療の選択肢として重要な役割を担うようになってきている。我々はナノメディシンと IVR を組み合わせることにより、副作用を軽減しながら相乗的に抗癌作用を増幅させる新たな低侵襲がん局所治療法の開発が可能ではないかと考えた。IVR では薬剤の標的臓器への高濃度注入が可能であるが、これにより局所の環境を制御することで治療効果を高めることも期待される。例えば血管作動性物質を用いて腫瘍の微小環境を修飾し、EPR 効果の増強を図ることなども想定されるが、こうした補助的な治療により十分な治療効果の増強を得られたということはほとんど報告されていない。

これまでに我々のグループでは、in vivo で血管作動性物質によって血管透過性が亢進することを血管造影や組織標本などで示してきた。また、超音響イメージングはその変化をいち早く捉えることが可能であり、治療効果を評価するモダリティとして有用であることも報告してきた。そこで、当初はこれらの技術を用いてナノ粒子の組織送達率の変化および抗腫瘍効果を評価することにより、ナノメディシンと IVR を組み合わせた低侵襲がん局所治療法の開発につながることを目指した。まず、家兎 VX2 肝腫瘍に対する肝動脈血管造影やラット肝腫瘍に対する超音響イメージングを用いて、薬剤の EPR 効果と治療効果を評価することを試みた。しかし、家兎での肝動脈注入は、血管攣縮により血行動態のバラツキが大きかった。その対策として様々な細径マイクロシステムや血管拡張薬を使用した動注方法も試みたが、フリーフローでの確実な注入が実現できず、信頼性のある実験データを得ることが困難であると判断し、断念した。また、ラットでの超音響イメージングを用いた評価においては、EPR 効果の代表的な薬剤であるニトログリセリンの動注や血管透過性亢進が報告されている凍結療法による血管透過性の変化を ICG を用いて評価したが、明らかな効果は示すことができず、超音響イメージングを使用した実験系も断念した。

そして、現段階で血管透過性亢進を利用したナノ粒子の送達率向上を実験的に証明することは困難と判断し、まず IVR で直接的にナノ粒子を効率よく目的組織に送達することを目指すことにした。薬剤混合したフィブリン糊は既製のフィブリン糊製剤で容易に作成でき、これまで様々な薬剤や細胞医薬品の担体となることが多く報告されている。フィブリン糊は IVR においても血管内注入の実績があり、ナノ粒子の担体としても有望であると考えられることから、まずこれをナノ粒子の担体として使用することとした。しかし、IVR において使用されるフィブリン糊はトロンビン液を希釈して作成・注入されるが、ゲル化時間が安定せず、十分な量が注入できなくなるなど注入が不確実となることが問題であった。そのため、ナノ粒子の担体として利用するには、組織内に安定した再現性の高い注入が可能なフィブリン糊の作成が必要であり、我々はその方法として冷却が有効ではないかと考えた。また、こうして作成したフィブリン糊は様々な応用が可能になることも予想される。

2. 研究の目的

IVR 手技を用いてナノ粒子を直接的に効率よく目的組織に送達することを目指し、ナノ粒子の担体としてフィブリン糊を使用する。本研究では、IVR 手技でナノ粒子の担体としてフィブリン糊を使用するための基礎として、①ナノ鉄粒子や抗がん剤を混合したフィブリン糊を作成してフィブリン糊が様々な薬剤の担体になることを確認する、②フィブリン糊のゲル化をコントロールする手法として「冷却」がゲル化速度とゲルの安定性へ及ぼす影響を調べ、その性能を検証する、③フィブリン糊の新たな応用の一つとして断熱効果について検証する。

3. 研究の方法

フィブリン糊はベリプラスト® (CSL ベーリング、東京) を使用した。

(1) フィブリン糊作成実験

(1-1) IVR での使用が期待される抗がん剤 (シスプラチン)、ナノ鉄粒子 (Rezovist, Fujifilm RI pharma, Tokyo)、ICG、X線造影剤 (Iopamiron, Bayer) を混合してフィブリン糊を作成することが可能か評価した。

(1-2) 臨床の IVR で用いられているトロンビン 5 単位/ml のフィブリン糊と、トロンビン 5 単位/ml の 5℃冷却フィブリン糊・シスプラチン含有フィブリン糊、トロンビン 1 単位/ml のフィブリン糊の反応を吸光マイクロプレートリーダー (MULTISCKAN SkyHigh, thermoscientific) でカイネティクス測定 (波長 405nm) を行い、反応速度を評価した。フィ

ブリン糊は 96 ウェルマイクロプレート内のウェル内でフィブリノーゲン液 A 液 $50\mu\text{l}$ と トロンビン液 $50\mu\text{l}$ をそれぞれマイクロピペットで注入し、マイクロプレートシェーカーを用いて 10 秒間混合後、速やかに測定を開始した。

(1-3) トロンビン 5 単位/ml 室温フィブリン糊と 10°C 冷却フィブリン糊、1 単位/ml 室温フィブリン糊の粘度変化を、 $0.3\sim 10,000\text{mPa}\cdot\text{s}$ と低粘度から高粘度まで連続的に測定可能な音叉振動式粘度計 SV-10 (A & D) を用いて測定した。フィブリン糊はフィブリノーゲン液 5ml と トロンビン液 5ml を注射器で混合後、10ml サンプル容器に速やかに注入し測定を行った。

(2) 冷却フィブリン糊の有用性評価

(2-1) 門脈枝での塞栓効果をコントロール (生食注入)、トロンビン 1 単位/ml フィブリン糊、トロンビン 5 単位/ml 冷却フィブリン糊で比較した。当初ラットを用いた塞栓を試みたが、予備実験に供した個体の約半数に上腸間膜静脈 (SMV) 末梢へ 4F シースを挿入する際の血管の破綻や塞栓後数日での死亡を認めたため、ハイフローマイクロバルーンでの塞栓は困難と判断し、家兎を用いることとした。全身麻酔下に開腹し、下腸間膜静脈 (IMV) に 4Fr シースを留置。ハイフローマイクロバルーンカテーテル (Pinnacle Blue® 27, Tokai Medical Products) でバルーン閉塞下に門脈枝にフィブリン糊もしくは生食 (コントロール) を注入。10 分間バルーン閉塞後に門脈造影を施行。2 週間後と 4 週間後に経動脈的門脈造影で再開通を評価し、4 週間後の非塞栓葉重量/全肝重量 (%) を測定した。

(2-2) 反応速度を遅延させたフィブリン糊は空気を混合して泡沫状にしたフィブリン糊が作成することが可能である。冷却したフィブリン糊製剤に空気を混合してフィブリン糊 foam を作成し、その断熱効果をファントム (ゼラチン) を用いて臨床のアブレーション治療で使用される生理食塩水と比較した。ファントムの中心に凍結針を 10mm 刺入し、中心から 3mm の位置に、1mm 厚 \times 26mm \times 10mm のフィブリン糊 foam (75% 空気) と生理食塩水を断熱材として配置。熱電対で中心から 10mm、深さ 5mm の温度推移をファントム側、生理食塩水側、コントロール側 (ファントムのみ) の 3 点で計測した。

4. 研究成果

(1) フィブリン糊作成実験

(1-1) シスプラチン、ナノ鉄粒子、ICG を混合し、通常フィブリン糊と同様に作成できることを確認した。鉄粒子を用いた温熱療法などへの応用も期待される。

(1-2) 反応速度に関しては、フィブリン糊はトロンビン濃度に応じて吸光度・粘度ともに変化が急速となった。吸光度カイネティクスでは 5 単位/ml フィブリン糊は室温で作成したものが 10 分でプラトーとなったのに対し、 5°C で作成したものは、15 分ほどで変化が緩やかになり、反応が遅延した。またシスプラチンの追加でプラトーに達する時間がやや早まり、X 線造影剤では吸光度はほとんど変化しなかった (図 1)。

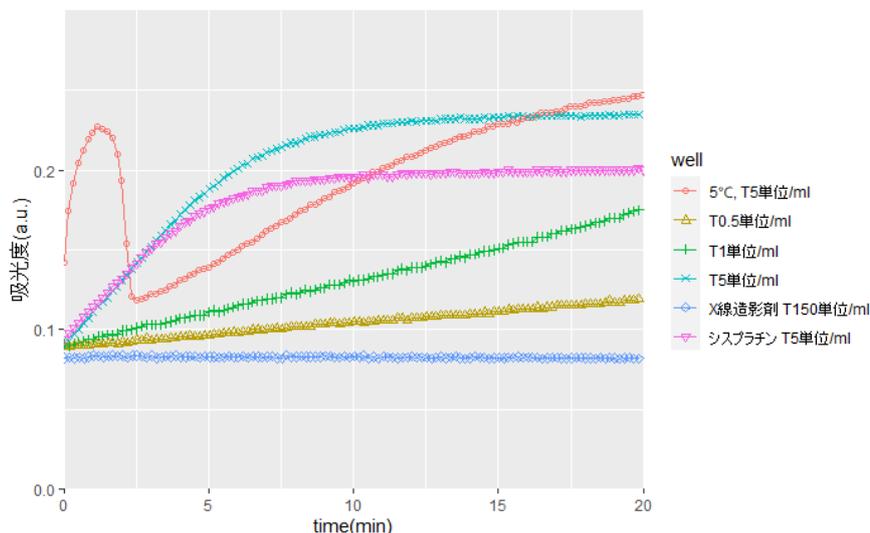


図 1 吸光度カイネティクス

5°C フィブリン糊は当初はプレート面への結露によるアーチファクトがある。

(1-3) 粘度では室温で作成したトロンビン濃度 5 単位/ml のフィブリン糊に比べトロンビン濃度 1 単位/ml のフィブリン糊は反応が大きく遅れたうえ、粘度が $11,000\text{mPa}\cdot\text{s}$ 弱でプラトーに達した。一方、冷却フィブリン糊は $10,000\text{mPa}\cdot\text{s}$ に達するまでに室温に比べ約 4 分遅れ、粘度は室温と同様に短時間で測定範囲外となった (図 2)。以上の *in vitro* 実験から、冷却フィブリン糊はトロンビン濃度を低下させて作ったものよりも、臨床使用に適した反応遅延効果を示し、安定した塞栓物質もしくは担体になる可能性があると考えられた。

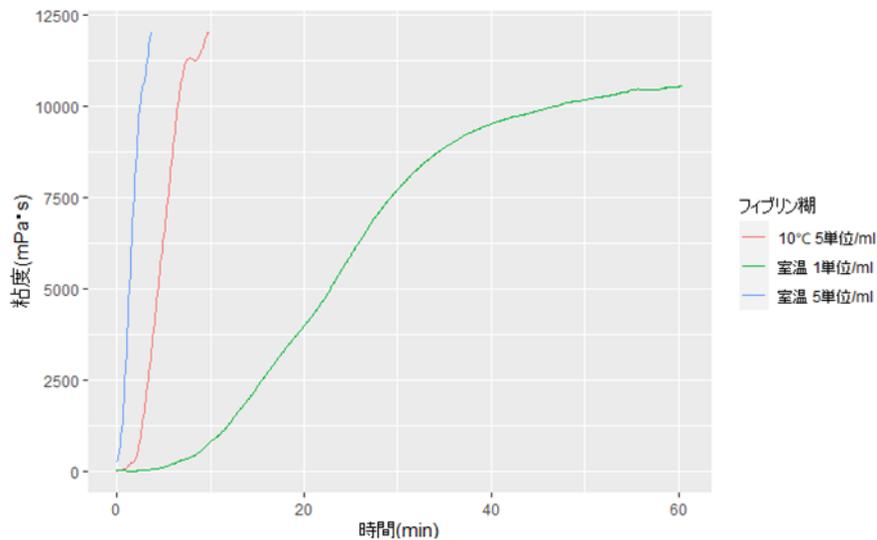


図2 粘度計カイネティクス

(2) 冷却フィブリン糊の有用性評価

(2-1) 7羽の家兔 (New Zealand White、オス、3.30-4.00kg) を3群に分けて実験を行った。すべての群でIMVに4Fシースを挿入したが、バルーン挿入の際にIMVからSMVに合流する箇所ではバルーン挿入の際に血管損傷が生じ、1羽を術中に安楽死としたため、コントロール群3羽、トロンビン1単位/mlフィブリン糊群1羽、トロンビン5単位/ml冷却フィブリン糊群2羽の計6羽となった。コントロール群はすべて直後から4週間後まで門脈枝は開存しており、門脈瘤の形成も認めなかった。トロンビン1単位/ml群1羽では、バルーン解除後に多くが門脈内からフィブリン糊が流出し、直後の造影でも2割ほどが閉塞するのみで多くが開存していたが、4週間後の造影でも2割ほどの閉塞は持続していた。トロンビン5単位/ml冷却フィブリン糊群は血管内にフィブリン糊を緩徐に注入することが可能であったが1羽は準備したフィブリン糊が不足して十分量注入できなかった。直後に2羽ともに完全閉塞していたが2週間後にフィブリン糊が不足した1羽で3割ほどの部分再開通を認め、4週間後も同様であった。残り1羽は完全閉塞が持続していた。4週間後の非塞栓葉重量/全肝重量(%)はコントロール群では既報と同様に約20%であった。4週間後まで塞栓が持続した冷却5単位/mlフィブリン糊の1羽は全肝の61%と約3倍となっており、良好な肝肥大効果を認めた(表1)。以上のin vivo実験から、フィブリン糊の冷却作成は安定した注入が可能でかつ良好な塞栓効果・担体の安定性を保っている可能性が示唆された。



図3 家兔の門脈枝塞栓術
尾状葉を残して約80%に当たる左葉～右葉を塞栓した

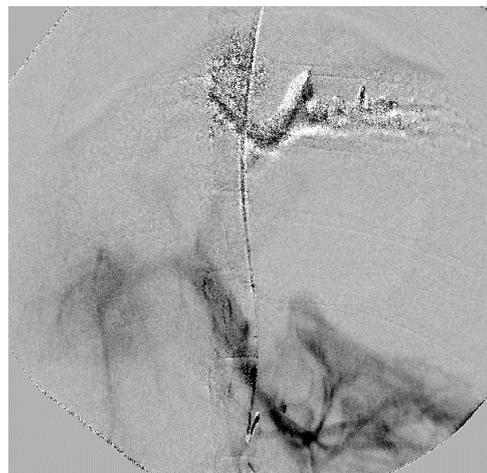


図4 塞栓後4週間後の経動脈的門脈造影
門脈血流は尾状葉に流入している

表1 4週間後の非塞栓葉重量/全肝重量(%)

	コントロール群	1単位/ml フィブリン糊群	5単位/ml冷却 フィブリン糊
非塞栓葉重量(%)	21.6(17.3-24.2)	35.4	49.9(38.7-61.0)

(2-2) フィブリン糊 foam の断熱効果に関して、中心から10mm地点で生理食塩水の温度低下は

当初フィブリン糊 foam より緩やかであったが、凍結後は温度低下が早まり、最終的なアイスボールのサイズはコントロール側が 11.0mm、生理食塩水側が 10.6mm、フィブリン糊 foam 側 9.8mm とフィブリン糊 foam が最も優れた断熱効果を示した (図 5)。フィブリン糊 foam の断熱効果は液体状態の生理食塩水より劣っていたが、凍結状態の生理食塩水よりは優れていた。臨床の RFA や凍結療法で断熱材として使用される生理食塩水は、体内で灌流状態を作ることや目的の位置に留めておくことがしばしば難しく、フィブリン糊 foam は断熱材として生理食塩水の代替として有用である可能性がある。また空気の割合をさらに増やすことで断熱効果が上がることや、フィブリン糊は組織接着作用があり、術後の出血予防効果も期待されるが、さらなる検討が必要である。

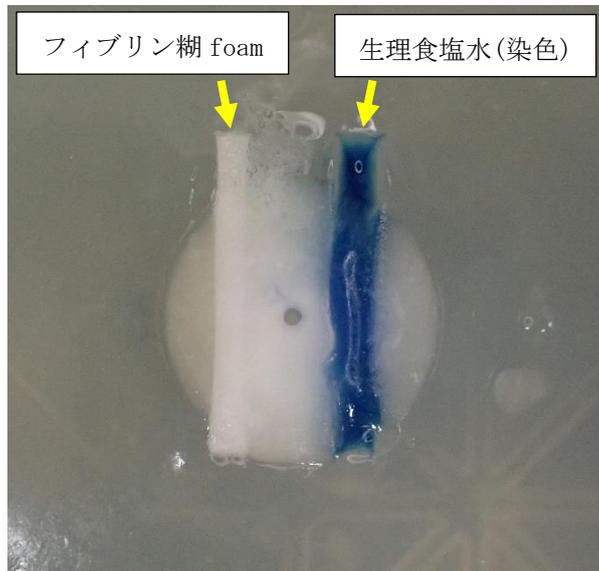


図 5 10 分凍結後のアイスボール
フィブリン糊 foam 側のアイスボールが
生理食塩水側よりも小さくなっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	小林 聡 (KOBAYASHI Satoshi) (30313638)	金沢大学・保健学系・教授 (13301)	

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