

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12783

研究課題名（和文）膵臓癌患者の生命予後・QOL向上を目指すセラノスティックス粒子の開発

研究課題名（英文）Development of theranostic nanoparticle for pancreatic cancer

研究代表者

西尾 忠（Nishio, Tadashi）

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：80401892

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）：本研究では、癌の診断治療に対して、腫瘍細胞への効率的輸送能、イメージング能（蛍光発光）、治療用薬剤（抗癌剤）を搭載したナノ粒子を設計・作製し、新規な医療ツール開発に関する基礎検討を行った。有機シリカ及びポリマーをベースに表面修飾して作製したナノ粒子は膵臓癌をはじめとする各種腫瘍細胞に効率良く取り込まれたほか、これらの増殖能や浸潤能を有意に低下させることが可能であった。さらに動物実験において臓器特異的な集積が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では特に多臓器転移や術後再発率の高い膵臓癌をはじめとする各種癌の診断と治療を一体化可能とするナノ粒子を作製し、医療ツールの開発を目指した。作製したナノ粒子はその表面修飾物質の構造の違いにより腫瘍細胞に対する取り込み効率が大きく変化した。また、ナノ粒子に抗癌剤を担持させることで、腫瘍細胞の増殖能や移動能が低下することを確認した。癌は我が国の死因第一位であり、早期診断及び早期介入が患者の生命予後とQOLに大きく影響する。今回得られた結果は癌治療に貢献する一助になることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We performed the basic research in developing of organo-silica and polymer nanoparticle for diagnostic and therapeutic implications for cancer. The nanoparticle has several functions including active targeting moiety, fluorescent imaging moiety, and therapeutic reagent (anticancer drug). The developed nanoparticles inhibited the cell proliferation, migration, and invasion against the tumor cells. In addition, nanoparticles showed organ-specific accumulation in animal experiments.

研究分野：生体医工学

キーワード：がん ナノ粒子

### 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国では国民の2人に1人が癌に罹患し、3人に1人がこれにより死亡している。中でも進行の早い膵臓癌は発見時に患者の約40%において既に多臓器への転移が見られ、術後の再発率も高い難治性癌である。このため本疾患の早期診断・治療介入は患者の生命予後を大きく左右する。通常、本疾患や他の難治性癌の診断及び治療は診療ガイドラインに基づき行われるが、初期症状に乏しい場合や腫瘍マーカーが特異性に欠ける場合がある。また、CTやMRIを用いる画像診断においても初期の微小癌の検出は困難な場合が多く、炎症等による偽陽性もしばしば認められる。これを補完するためバイオプシーや細胞診等を組み合わせる診断が行われるが、検査項目が増加することで合併症リスクが高まるほか、確定診断に至るまで長時間を有する。このため、早期治療の時期を逸する場合や、既に病期が進行し手術適用のない患者への侵襲的検査により患者に身体的・精神的負担を大きくするという問題がある。

このような背景から、本研究では、癌に対する検査の早期段階から、信頼性の高い確定診断・治療補助ツールの開発を目指して、診断・治療一体型(セラノスティックス)ナノ粒子の開発を目指した。現在、国内外でミセルやリポソーム等のナノ粒子を用いたセラノスティックス研究が行われており、アメリカでは既にナノ粒子を用いた皮膚癌に対する治験が実施され、その有効性が確認されている。本研究では有機シリカナノ粒子及びポリスチレンナノ粒子を基盤としてこれら粒子表面の効率的な多機能化と腫瘍に対するセラノスティックスの開発を行うことで、創薬分野やドラッグデリバリーシステム領域へ貢献しようと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では有機シリカナノ粒子及びポリスチレンナノ粒子に複数の機能を付加することで腫瘍特異的なセラノスティックス粒子を創製し、癌の早期発見、術前治療を可能とし、癌治療に貢献する医療ツールの開発を目的とする。

#### (1) ナノ粒子の作製と粒子表面の多機能化

表面上に反応性官能基を有する有機シリカナノ粒子及びポリスチレン製ポリマーナノ粒子を独自に作製又は購入し、イメージング分子(標的とする腫瘍が微小であっても検出可能な蛍光分子)、ターゲティング分子(腫瘍細胞に多くに発現する輸送担体に対するリガンド分子)、治療用分子(現在用いられている抗癌剤)をそれぞれ導入する(図1)。また、腫瘍細胞に過剰発現している輸送担体 L-type amino acid transporter-1 (LAT-1) に対する親和性リガンド分子の探索研究も並行して行う。

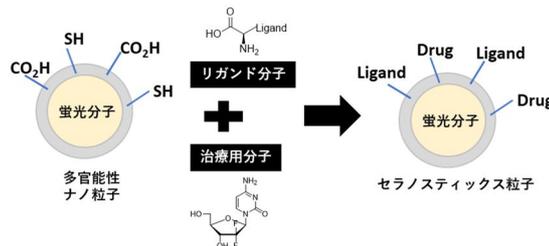


図1. セラノスティックス粒子の作製イメージ

#### (2) 培養細胞及び実験動物を用いた機能性評価

作製したナノ粒子を膵臓癌を含む複数種類の腫瘍細胞株へ添加し、細胞内への取り込み速度や蛍光強度(粒子数に該当)を蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーで解析し有用なナノ粒子を選定する。また、細胞増殖阻害実験や細胞浸潤能を評価し、*in vitro*におけるナノ粒子の抗腫瘍効果を精査する。さらに健常マウス及び腫瘍移植マウスにナノ粒子を投与し、腫瘍部位特異的な粒子の集積の有無や腫瘍縮小効果を判定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 有機シリカナノ粒子を用いた研究

##### 粒子作製と表面修飾

まず、(3-mercaptopropyl)-trimethoxy silane と fluoresceinisothiocyanate をアンモニア水中で一昼夜加熱し、表面上に反応性チオール基を有する蛍光性ナノ粒子を合成した。次に、*N*-(2-aminoethyl)maleimide を反応させて側鎖を伸長させると同時にアミノ基を付与した。さらに塩基性触媒下、4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium (DMT-MM) を触媒として20種類以上のアミノ酸及びその類縁体を縮合させ、表面がアミノ酸修飾された蛍光性ナノ粒子を作製した(図2)。

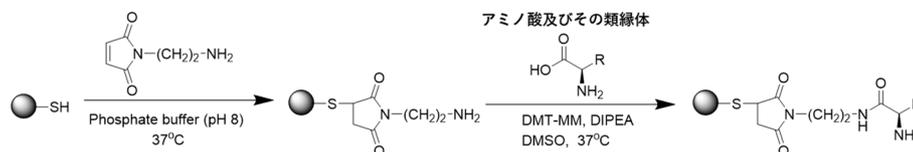


図2. アミノ酸修飾ナノ粒子の合成

これら粒子は、電子顕微鏡による粒径の測定や動的光散乱計による表面電位の測定等により物性評価を行った。

##### 培養細胞及び実験動物を用いた機能性評価

上記のアミノ酸修飾ナノ粒子の細胞適合性を確認するため、膵臓癌を含む各種腫瘍細胞(肝細胞

胞癌,乳癌,子宮頸癌,骨肉腫)を用いて細胞取り込み能を蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーにより定量的に解析し,有用なリガンド分子候補を選定した.次にナノ粒子を取り込ませた腫瘍細胞を懸濁液としてマウスへ静脈内投与し,24時間後及び1週間後に臓器(脳,心臓,肺,肝臓,脾臓及び腎臓)を摘出して蛍光顕微鏡によりその分布を観察した.さらに,4T1腫瘍細胞(乳癌)移植マウスを用いて,ナノ粒子投与後の腫瘍集積性を評価した.

#### (2)ポリマー粒子を用いた研究

##### ポリマー粒子の表面修飾

市販の蛍光性ポリスチレンナノ粒子を用い,粒子表面上のカルボキシ基を反応活性基として20種類のL-アミノ酸,リン脂質及びステロイド類を(1)の方法を用いて結合させた.次いでナノ粒子上の残存官能基に4種類抗癌剤(gemcitabine,irinotecan,doxorubicin,paclitaxel)をそれぞれ結合させた.薬剤の粒子表面における修飾量は高速液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)により定量した.

##### 培養細胞を用いた機能性評価

まず,(2)で作製した抗癌剤修飾前の各種ポリマー粒子を腫瘍細胞(膵臓癌,肝細胞癌,乳癌,骨肉腫,神経芽腫)へ投与し,蛍光顕微鏡による粒子取り込み効率の定量や共焦点レーザー顕微鏡による細胞局在の評価を行った.次に抗癌剤を同時修飾したナノ粒子の腫瘍細胞の増殖阻害作用をMTTアッセイにより評価した.さらに,蛍光標識したゲラチン上に腫瘍細胞を播種させた後,抗癌剤担持ナノ粒子を添加し,腫瘍細胞の浸潤突起の形成能やゲラチン破壊量を計測することで,ナノ粒子投与前後における浸潤・転移阻害能の評価を行った.

### 4.研究成果

#### (1)有機シリカナノ粒子を用いた研究

作製したアミノ酸修飾ナノ粒子はいずれも粒子径が約100nmで均質であった.正確なアミノ酸修飾率は算出できなかったが,粒子の表面電位の数値がアミノ酸の種類により大きく変化していることから表面修飾反応が進行したと考えた.粒子の細胞取り込み実験では,アミノ酸の側鎖構造

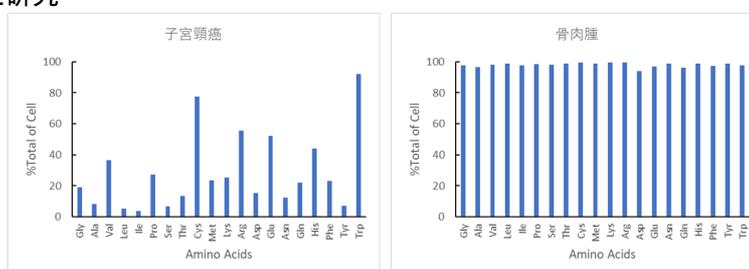


図3. アミノ酸修飾ナノ粒子の各種腫瘍細胞への取り込み率の変動(抜粋)

及び腫瘍細胞の種類に依存して取り込み率が大きく変動した(図3).アミノ酸のうち,L-tryptophanを修飾したナノ粒子では,いずれの細胞を用いた場合でも70%~90%以上の取り込みが見られた.また,1細胞当たりの蛍光量も他のアミノ酸を用いた場合と比較して高値を示した.さらに,共焦点レーザー顕微鏡を用いた3D観察によりナノ粒子が細胞内部に存在していることが立体的に確認できた.一方,D-tryptophanや3-indolepropionic acidを粒子表面に修飾させた場合の取り込み率は低値であった.過去の報告でLAT-1を介することで,L-tryptophanが単独で効率良く腫瘍細胞に取り込まれる報告がある.今回の結果を併せて考えると,リガンドの立体構造の違いにより特異的な取り込みを制御することが可能であることを示唆するものであった.しかし,骨肉腫細胞株では表面修飾したアミノ酸の種類に依存せず90%以上の細胞取り込みが見られたが,この理由は不明であった.さらに,L-tryptophan修飾ナノ粒子を腫瘍細胞に取り込ませた標識細胞をマウスに投与した所,肺,肝臓及び脾臓において集積性が高いことを確認した.また,このナノ粒子を4T1腫瘍細胞移植マウスに静脈内投与して腫瘍及び臓器蓄積性を評価したが,粒子由来の蛍光は検出できず,投与量や投与経路等の検討がさらに必要であることが考えられた.

#### (2)ポリマー粒子を用いた研究

使用した市販の蛍光性ポリマーナノ粒子は粒径が100~200nmであり,(1)の結果から推測して表面修飾後も大幅な粒径の変化は無いと考えられた.アミノ酸等の修飾効率も算出できなかったが,修飾分子の違いにより細胞実験において,粒子取り込み率が大きく変動した.有機シリカナノ粒子と異なりアミノ酸修飾ポリマー粒子の取り込み率は低値であり,最も結果の良かったL-tryptophanでも30%以下に留まった.原因としてナノ粒子の構成材料の違いが影響していることが示唆された.これに対し,リン脂質やステロイドを修飾した場合には取り込み率は改善され,中でもリン脂質の一種である1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-

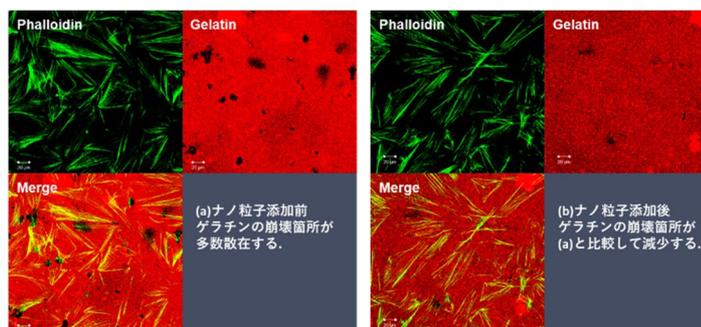


図4. 薬剤担持ナノ粒子添加前後の腫瘍細胞の浸潤能の変化

phosphoethanolamine(DOPE)が66%

と最も高値を示した.なお,3D顕微鏡観察により本粒子が細胞内部に完全に取り込まれていることを確認している.次に修飾する抗癌剤の選定をLC-MSにより行ったが,薬剤担持後のナノ粒子

上の irinotecan 及び paclitaxel は殆ど検出されなかったことから粒子に結合不能と判断し, LC-MS で検出可能でかつ細胞増殖阻害活性がほぼ同等であった gemcitabine 又は doxorubicin を修飾したナノ粒子を用いて研究を進めた. 蛍光標識ゲラチンを用いて, 腫瘍細胞の浸潤転移能を評価した所, ナノ粒子を添加することで添加前と比較して有意に浸潤突起の形成が抑制されることを確認した(図 4).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tadashi Nishio, Yoko Toukairin, Tomoaki Hoshi, Tomomi Arai, Makoto Nogami	4. 巻 47
2. 論文標題 Determination of 3-chloro-L-tyrosine as a novel indicator of chlorine poisoning utilizing gas chromatography-mass spectrometric analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 101782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2020.101782	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 Makoto Nogami, Tomoaki Hoshi, Yoko Toukairin, Tomomi Arai, Tadashi Nishio	4. 巻 13
2. 論文標題 Immunohistochemistry of advanced glycation end product N <sup>ε</sup> -(carboxymethyl)lysine in coronary arteries in relation to cardiac fibrosis and serum N-terminal-pro basic natriuretic peptide in forensic autopsy cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Res Notes	6. 最初と最後の頁 239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-020-05082-6.	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 Tomohiro Doura, Tadashi Nishio, Fuyuhiko Tamanoi, Michihiro Nakamura	4. 巻 34
2. 論文標題 Relationship between the glutathione-responsive degradability of thiol-organosilica nanoparticles and the chemical structures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Materials Research	6. 最初と最後の頁 1266-1278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1557/jmr.2018.501	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 Tadashi Nishio, Yoko Toukairin, Tomoaki Hoshi, Tomomi Arai, Makoto Nogami	4. 巻 53
2. 論文標題 Development of an LC-MS/MS method for quantification of 3-chloro-L-tyrosine as a candidate marker of chlorine poisoning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 101939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2021.101939.	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 Tadashi Nishio, Yoko Toukairin, Tomoaki Hoshi, Tomomi Arai, Makoto Nogami	4. 巻 207
2. 論文標題 Quantification of 2-aminothiazoline-4-carboxylic acid as a reliable marker of cyanide exposure using chemical derivatization followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 114429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2021.114429. Epub 2021 Oct 16.	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	中村 教泰 (Nakamura Michihiro)  (10314858)	山口大学・大学院医学系研究科・教授  (15501)	削除:2019年9月30日

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
---------	---------