

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06114・19K21232

研究課題名(和文)超音波とCO<sub>2</sub>産生ナノ粒子を活用したがんセラノスティクスシステムの構築研究課題名(英文) Development of cancer theranostics system using CO<sub>2</sub> generating nanoparticles and ultrasound

研究代表者

濱野 展人 (Hamano, Nobuhito)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80708397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ流体技術を用いてリン脂質、コレステロール、PEG脂質と炭酸水素アンモニウム(ABC)を用いてナノ粒子を作製したところ、およそ60 nmの均一な球形構造を示すナノ粒子が作製できた。更に本ナノ粒子は65℃に加温したところで、PDIが急激に増加した。この温度に伴うPDIの増加は、温度上昇によってCO<sub>2</sub>が産生され、粒径に変化が生じたためと考えている。本ナノ粒子のがん組織への集積を検討したところ、投与24時間後のがん組織への集積が確認された。以上、ABC含有ナノ粒子はがん組織に移行可能なCO<sub>2</sub>産生ナノ粒子として機能し、がんセラノスティクスシステムの基盤となることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロ流体技術と炭酸水素アンモニウムを用いることでおよそ60 nmの均一なナノ粒子の作製に成功し、温度上昇に伴うCO<sub>2</sub>の産生とがん組織への集積を示唆した。これまでの報告において100 nm以下のCO<sub>2</sub>を産生するナノ粒子は存在しないことから、学術的に意義深いものと考えられる。また温度に応答しCO<sub>2</sub>を産生することから、外部エネルギーを利用したがんの診断・治療システムを可能とするナノ粒子として、がん医療に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：CO<sub>2</sub> generating-Nanoparticles (ABC-NPs) which were composed of phospholipid, cholesterol, and PEG-lipid were prepared by microfluidics techniques using a NanoAssembler. To generate carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), ammonium bicarbonate (ABC) was used as a buffer. The size of ABC-NPs showed about 60 nm, low PDI, and sphere structure. When ABC-NPs were warmed at 65℃, PDI of ABC-NPs was increased. It assumed that generating CO<sub>2</sub> was accompanied by an increase in temperature so that the size of NPs was changed. In addition, ABC-NPs were accumulated in tumor tissue when it was administered to tumor-bearing mice. Therefore, ABC-NPs could work as generating CO<sub>2</sub> at tumor tissue and be expected to be an agent cancer theranostics using ultrasound.

研究分野：がん治療DDS

キーワード：マイクロ流体技術 in vivoイメージング がん治療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超音波は、臨床においてがんの診断 (肝がん等に対する超音波造影法) や治療 (前立腺がんや肝がんに対する高密度焦点式超音波: HIFU の照射) に用いられている。しかしながら、超音波を用いた診断と治療が融合したシステムは未だ確立されていない。また超音波造影や治療において、超音波単独では不十分な点も存在し、超音波造影能の向上及び治療効果・治療時間の改善作用を有する『マイクロバブル』と呼ばれる超音波応答性製剤の開発が求められている。しかしながら『マイクロバブル』ではがんの深部組織まで到達できないなどサイズ面で問題を抱えている。そのような背景から申請者は、超音波を用いた診断と治療を融合したシステム (セラノスティクスシステム) の開発には、新規超音波応答性ナノ粒子が重要な鍵となると考えた。

これまでに申請者は、臨床で用いられている診断技術の1つである超音波と、超音波に反応するナノ粒子を用いて、がん組織の描出及びがん治療に成功してきた。しかしながら、これまでの超音波応答性ナノ粒子は 500 nm 程度とサイズが大きく、がん深部組織への到達は困難である。また超音波診断は、がん検出のスクリーニングには優先して用いられているものの、精度の高いがんの診断は難しいものとなっている。精度の高い診断が困難なことから、他のがん (前立腺がんや肝がん) では適応されている強力集束超音波: HIFU による治療への応用も困難な状況となっている。このような背景から申請者は、超音波に反応し造影剤となり得るナノ粒子が、がんの深部組織に集積すれば、超音波を利用した診断システムの構築のみならず、治療にも応用可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

本申請研究では、がんの深部まで到達可能な粒子径 30-60 nm 程度の CO<sub>2</sub> 産生ナノ粒子を作製し、体外からの外部エネルギーにより投与したナノ粒子の形態・応答変化を利用することで、安全かつ効率的ながん診断・治療を可能とするシステムを構築することを目的とする。本研究の遂行により、臨床応用を見据えた新たな次世代型セラノスティクスシステムの研究基盤を構築できると考え、がん組織に移行し、熱により CO<sub>2</sub> を産生し超音波に対し親和性を有したナノ粒子の作製を目的とし、研究を進めた。

### 3. 研究の方法

#### (1) CO<sub>2</sub> 産生ナノ粒子の作製

CO<sub>2</sub> 産生ナノ粒子は、マイクロ流体技術を利用した装置である NanoAssemblr を用いて作製した。リン脂質、コレステロール、PEG 脂質 (DSPE-PEG2000-OMe) をエタノールに溶解したものと炭酸水素アンモニウム (Ammonium bicarbonate: ABC) を NanoAssemblr にて混合することでナノ粒子を作製した。脂質混合溶液と ABC の比率を変化させることで、粒子径を制御した。また PEG 脂質の含有量が粒子径に及ぼす影響を検討するため、PEG 脂質含有量を変化させてナノ粒子を作製した。

#### (2) 物性評価

(1)の項で作製したナノ粒子の粒子径を Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical) を用いて測定した。また本ナノ粒子の構造を電子顕微鏡にて観察した。有機材料ハイコントラスト電子顕微鏡 (Bio-TEM) JEM-1400 を用い、ナノ粒子 (脂質濃度として 2-3 mg/mL) と酢酸ウラン溶液を混合しネガティブ染色法により、ナノ粒子の形態を観察した。

ナノ粒子の温度に対する応答性を検討するため、Zetasizer Nano ZSP を利用し、測定時の温度を 37°C から 65°C へと変化させることで、温度が及ぼす影響について検討した。温度を変更する際は 120 秒間温度平衡後、粒子径を測定した。

#### (3) がん組織への集積性に関する評価

ヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 ( $5 \times 10^6$  cells/mouse) を Balb/c ノードマウス (6 週齢、雌) に皮下移植した担がんモデルマウス (腫瘍径: 約 100 mm<sup>3</sup>) に、DiR 標識した CO<sub>2</sub> 産生ナノ粒子 (DiR として 100 µg/kg) を尾静脈投与し in vivo イメージングシステム (IVIS) にてがん組織への移行性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) CO<sub>2</sub> 産生ナノ粒子の物性及び温度に対する応答性

CO<sub>2</sub> 産生ナノ粒子はマイクロ流体技術を用いて作製した。リン脂質と ABC の混合比を最適化することで、粒子径  $60.1 \pm 8.5$  nm、PDI  $0.056 \pm 0.02$  と均一なナノ粒子を得ることが出来た (n=3)。また混合時において 60°C 以上で混合すると粒子は µm オーダーとなった。ABC はおよそ 70°C で CO<sub>2</sub> に分解することが知られている。従って、脂質と ABC を混合する際に CO<sub>2</sub> が発生してしまったため、一部大きな粒子ができたと考えられる。この温度による応答性を検討するため、ナノ粒子の作製後、温度を変更しながら粒子径を測定した。結果、65°C で測定した際、粒子径分布の右方向へのシフト及び PDI の上昇が観察された (Fig. 1)。この温度応答性が ABC によるものか否かを検討するため、5% グルコース溶液で作製したナノ粒子では温度による粒子径分布、PDI の変化は観察されなかった。この結果から、粒子径の増大は ABC によるものであり、温度によって CO<sub>2</sub> が産生されたことが示唆された。

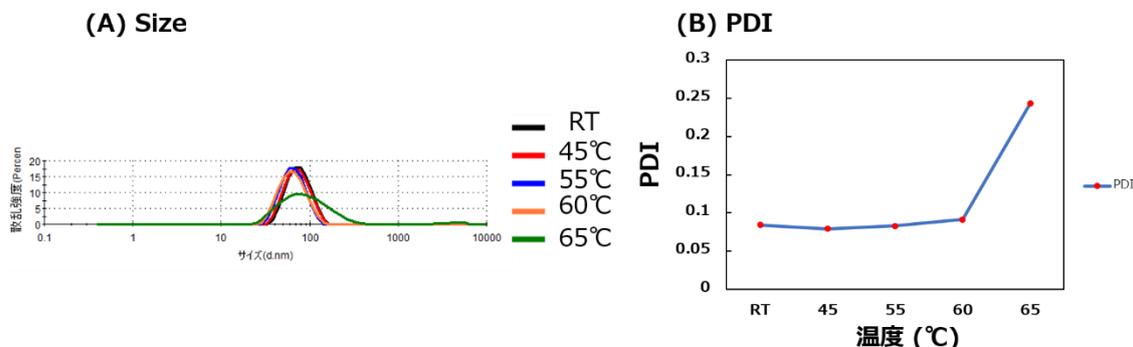


Fig. 1 CO<sub>2</sub>産生ナノ粒子の温度に対する粒子径変化

また本ナノ粒子の形態を観測するため、TEMにて撮影した。撮影したサンプルは、温度応答性を確認したサンプルに加え、PEG脂質の割合を増加させたナノ粒子を数種類作製し、PEG脂質の割合が粒子径に及ぼす影響をTEMにて観察した。TEM画像では、PEG含有率が増加するほど、小さい粒形が多くなる傾向を示した。しかしながら、PEG含有率増加に伴い、その形状は一部凝集体のようなものも観察され、均一な粒子は観察されなかった (Fig. 2)。一方で、PEG含有率が少ないものだと、60-70 nm程度を示し、均一な球形構造が観察された。DLS法にて粒子径を測定した結果と比較し、TEM画像のPEG含有率が増加すると70 nmから30 nmと小さくなる一方、PDIは0.1以下から、0.2を超えるという増加傾向を示し、TEMと同様の結果となった。更にTEMによる画像解析を用いることで、球形構造であることが明らかとなった。本結果から、均一な球形構造のナノ粒子を得るにはPEG含有率が少ない方が良いということが示唆された。本ナノ粒子の更なる構造を観察するため、今後cryo-TEMにて観察することで、より正確な構造解析を行う予定である。

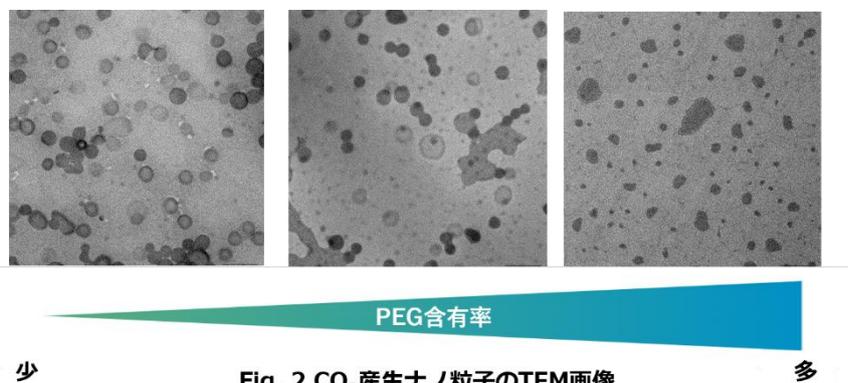


Fig. 2 CO<sub>2</sub>産生ナノ粒子のTEM画像

## (2) がん組織への集積性

(1)の検討から、およそ70 nmの温度応答性を有するナノ粒子が作製できたことから、次に本ナノ粒子のがん組織に対する移行性を検討した。ナノ粒子を投与し、24時間後がん組織及び心臓、肝臓、脾臓、腎臓を回収し、IVISにてDiR由来の蛍光を観測することで、ナノ粒子の移行性を評価した。コントロール(未投与群)と比較し、ナノ粒子投与群において強い蛍光が観測されたことから、本ナノ粒子はがん組織に移行しうるナノ粒子であることが明らかとなった (Fig. 3)。しかしながら他臓器と比較した場合、特に肝臓による捕捉が観察されるのも見受けられた。今後、抗体やペプチド修飾などを施すことで、よりがん組織への標的指向性を高めていく必要があると考えられる。

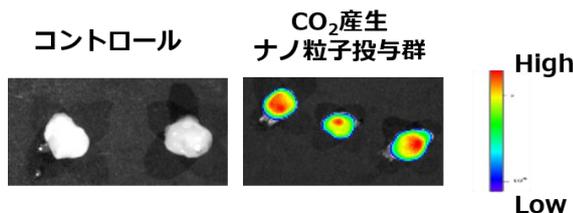


Fig. 3. CO<sub>2</sub>産生ナノ粒子の乳がん組織への集積性 (投与24時間後)

以上、本研究からABCとリン脂質から作製されるナノ粒子は温度応答性を有しCO<sub>2</sub>を産生しうるナノ粒子であり、がん組織に移行可能であることが示唆された。超音波の中でも集束超音波は、その特性から照射部位にのみ超音波を照射可能なこと及び照射部位が高温になることが報告されており、がん治療などに臨床応用されていることが知られている。今後、温度応答性のトリガーとして集束超音波を用いることで、集束超音波に対する応答性を検討しCO<sub>2</sub>産生ナノ粒子と超音波を用いたセラノスティクス構築に向け検討していく予定である。

**【謝辞】**

本研究の一部は、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム（課題番号 JPMXP09A19UT0388）の支援を受けて実施されました。

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〕

ホームページ等

<https://www.ps.toyaku.ac.jp/yakubutsusotatsu/>

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