

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20310067

研究課題名(和文) 一分子 DDS イメージングによる腫瘍滞留性ナノ粒子の新規開発

研究課題名(英文) Development of nano-particles with tumor retention by single molecular DDS imaging

研究代表者

大内 憲明(OHUCHI NORIAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90203710

研究成果の概要(和文)：

抗癌剤の開発において癌の転移メカニズム並びにドラッグデリバリーシステムを理解することは非常に重要である。我々は非常に精度の高い分解能を持った生体内イメージングシステムを開発し、転移中のがん細胞における膜タンパク PAR1 を追跡することに成功した。更に、薬剤の大きさと動態の関連の検討のため蛍光ナノ粒子を担癌マウスに注入し生体内イメージングを施行した。更に、抗がん剤内包高分子ミセルの構造的安定並びに抗腫瘍効果を評価する新たな方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：

To develop an effective anticancer drug, the understanding of cancer mechanisms and drug delivery system (DDS) is very important. Here, we have developed a method for *in vivo* imaging with very high spatial accuracy and succeeded in tracking the membrane protein PAR1 during metastasis in living mice. To investigate drug movement in association to its size in tumor, fluorescent nano-particles were injected into the tumor-bearing mice and visualized by *in vivo* imaging. Additionally, we developed a novel method to evaluate the structural stability and anti-cancer effect of drug-incorporating polymeric micelles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：生体内イメージング、転移、ナノ粒子、腫瘍滞留性ナノ粒子、高分子ミセル、ドラッグデリバリーシステム

## 1. 研究開始当初の背景

わが国においてがんは 1981 年以来死亡原因の第 1 位であり、さらに 2005 年には 129,338 人ががんにより死亡している。これを受け、第 3 次対がん総合戦略においてがん罹患率と死亡率の減少が疾病対策上の最重要課題となっており、新しい画期的な治療方法の開発が急務であった。がんの薬物治療の研究は多数行われ、延命効果の得られる治療法が出現している一方で、死亡率は年々増加している。この原因として、従来の薬物療法は生体に対する副作用が少なからずあり、これが薬物療法のコンプライアンスの大きな低下、すなわち、薬剤作用低下、治療効果の減少の原因となっていることが考えられる。それゆえ、正常組織に対する作用 (=副作用) を減らし、がん組織に対する作用 (=効果) を増大させ、コンプライアンスの増加を実現する新規薬剤の研究開発が重要である。また、がんの種類によって、薬剤の分布、浸透度が異なり、薬物に対する応答性が異なることが知られており、がんの個性に応じた治療戦略が必要となる。

## 2. 研究の目的

「がん組織の個性に応じた薬物治療」の実現には、腫瘍組織のがん細胞動態を把握するとともに、腫瘍組織に生じる新生血管の特徴を利用した薬剤開発が重要である。これまでに我々は、抗腫瘍抗体 Trastuzumab に蛍光ナノ粒子を結合し、マウスのがん組織における薬剤動態を生体ナノイメージング法で可視化することに成功してきた。(Cancer Res. 2007)。本研究では、このイメージング技術を発展させ、(1)腫瘍組織におけるがん細胞動態の解明、(2) Drug Delivery System (DDS) における粒子のサイズ効果の解析、(3) ナノキャリア基盤薬剤の開発、を行う。すなわち、がん細胞動態と薬剤動態の物理的解析を行い、これをナノキャリア基盤薬剤創薬へ反映させることにより、「がん組織の個性に応じた薬物治療」法の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の生体ナノイメージング装置を新たに開発し、(1)腫瘍組織におけるがん細胞動態の解明、(2) DDS における粒子のサイズ効果の解析、(3) ナノキャリア基盤薬剤の開発、の各研究テーマに応用した。各テーマにおける方法の詳細については、4. 研究成果の項目で併せて述べる。

生体ナノイメージング装置開発: イメージング装置開発では、高感度なシグナル検出に加え、生体由来の振動(呼吸、拍動)の軽減が大きな壁となる。高感度検出については、高速観察可能なニポウ板(Nipkow disk)タイプの共焦点顕微鏡に多色イメージング可能な 2

光路分離ユニットを取り付け、冷却しながら電子増幅する Electron-Multiplier CCD (EM-CCD) カメラを採用した。この光学系において、レーザー光を試料面に効率よく集光させながら照射することで、ガラス板上では数ミリ秒の露光時間で量子ドット(蛍光性ナノ粒子)1 粒子の検出が可能となっている。また生体振動をできるだけ排除するためには、マウスの背中側皮下に埋め込んだ腫瘍を露出させた後、1cm×1cm の小窓付のチャンバーをはめ込み、外科用の強力接着剤でチャンバーと皮膚を接着させた。その後チャンバー付きマウスを独自低振動性ステージにボルトで強固に固定した。解析法として、分子モーターの蛍光ナノ計測法を応用し、量子ドットの蛍光強度分布をガウス関数で近似計算することで、蛍光の重心位置を高精度で算出した。以上の光学的工夫により、XY 平面において 9nm の空間位置精度で生体ナノイメージングに成功している(図 1)。

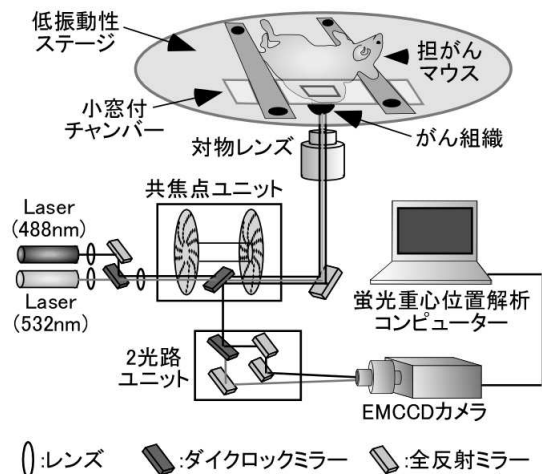


図 1 生体ナノイメージング装置の概要

## 4. 研究成果

### (1) 腫瘍組織におけるがん細胞動態の解明:

がん転移には、細胞膜蛋白質の拡散性増加や細胞膜形態変化などの膜ダイナミクスが重要である。我々はがん転移を可視化するために、細胞膜蛋白質の 1 つであるがん転移活性化因子 PAR1 (Protease-activated Receptor 1) に注目して研究を行っている。PAR1 の N 末細胞外領域に特異的に反応する単クローン抗体を調製し PAR1 抗体と量子ドットが結合したトレーサーを作製した。担がんマウスの尾静脈から PAR1 抗体-QD を注入することで、マウスのがん細胞の PAR1 を蛍光標識した。その後生体ナノイメージング装置で量子ドットの蛍光重心位置を解析し PAR1 の動きの変化を調べた。その結果、血管遠方のがん細胞では、PAR1 は非常に遅い拡散係数(拡散性運動の大きさを表す指標)を示したが、血管内浸潤に向かって拡散係数は増加し、

血流中のがん細胞では血管遠方の細胞に比べ拡散係数が約 1000 倍以上に増加していた。このように膜蛋白質の拡散運動が増加することによって、転移が活性化されと考えられた。血流中のがん細胞は、その後血管壁に接着し、拡散係数が血流中に比べ約 1/20 にまで減少した。血管近傍細胞や血管壁接着細胞では、細胞運動の進行方向へ向かって特異的に仮足を形成している様子が観察された。以上の結果から、がん細胞は組織内の場所に応じて巧みに膜蛋白質の拡散運動を促進することで、受容体の反応速度を増大させ、がん転移を効果的に引き起こしていると考えられた。

### (2) DDS における粒子のサイズ効果の解析：

通常がんの増殖は血管新生を伴うが、新生血管は構築が脆弱であり、血管内皮の間隙が正常血管より広いことが電顕による観察等で明らかになっている。従って薬剤に適切な粒径を与えることで正常血管を透過せず、腫瘍血管のみ透過し、腫瘍間質に選択的に取り込ませ、腫瘍特異的 DDS を実現することが可能である。この現象は enhanced permeability and retention (EPR) と呼ばれ、DDS 研究者が大いに注目している。

DDS における粒子のサイズ効果を検討するために、担がんマウスに 20, 40, 100, 200nm の異なる粒径 (図 2) をもった蛍光ナノ粒子を静脈注射し、生体ナノイメージング装置で各粒子の挙動を追跡した (図 3)。

その結果、粒径 200nm の粒子は血管外に漏出せず、20, 40, 100nm の粒子が腫瘍間質に漏出することが明らかになった。粒径 20, 40, 100nm の粒子について、間質内の粒子動態から得られた結果を用いて数値計算することで最高腫瘍内薬剤濃度の到達時間をシミュレーションした。その結果、血管外から漏出した薬剤の 2.25 % (平均速度 + 2 x 拡散の標準偏差) が到達する時間は 20 nm, 40 nm, 100 nm それぞれ 140.0, 196.9, 358.4 分であった。16 % (平均速度 + 1 x 拡散の標準偏差) が到達する時間は それぞれ 148.7, 207.4, 372.0 分であった。50 % (平均速度 + 1 x 拡散の標準偏差) が到達する時間は それぞれ 158.0, 218.5, 389.4 分であった。97.75% (平均速度 - 1 x 拡散の標準偏差) が到達する時間は それぞれ 178.5, 242.6, 423.1 分であった。薬剤注入から血管外漏出までの時間は数時間と比較的短いものであることが分かった。以上の結果は、薬剤の分子設計を行う際、レファレンスとして、非常に有用な情報であると考えられる。

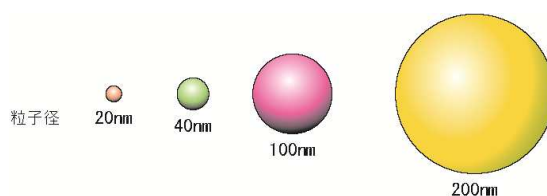


図 2 サイズの異なる蛍光ナノ粒子

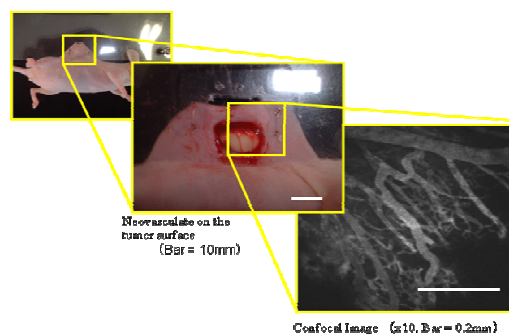


図 3 生体ナノイメージングによる腫瘍血管及び腫瘍間質の観察

### (3) ナノキャリア基盤薬剤の開発

カプセルタイプのナノキャリアを媒介とする薬物は、新たながん治療製剤として期待されている。ナノキャリアの 1 つである高分子ミセルは、親水性-疎水性などの不均質な構造を持つブロック共重合体が、水中で自発的に会合したナノキャリアであり、内核と外殻の明確な二層構造を持つ。外殻により生体との相互作用を通して体内動態・分布を決定し、内核には薬物を物理的あるいは化学的に封入することができる。封入薬物として、抗がん剤パクリタキセル (微小管障害剤) が代表的であり、近年はパクリタキセル内包高分子ミセルの 1 つである NK105 の臨床試験が進行している。

一方、パクリタキセル内包高分子ミセルの構造安定性や抗がん剤効果の評価は、多粒子系による細胞増殖効果の検討が主であり、粒子レベル・分子レベルでの理解は不十分であった。本研究では、蛍光ナノイメージング法で高分子ミセル製剤の機能性を検討するために、新たなブロック共重合体を合成し、この共重合体の親水部を近赤外波長を持つ蛍光色素で標識することにより、パクリタキセル内包蛍光高分子ミセルの合成を行った。この蛍光ミセルの構造安定性を 1 粒子レベルで評価した結果、ミセルは生理的環境下において、数日以上、構造的安定性を保つことが示された。さらに、パクリタキセル内包蛍光高分子ミセルが微小管に及ぼす影響をヒト乳がん培養細胞にて、分子レベルで検討した結果、同濃度のパクリタキセルに比べ、高分

子ミセル製剤の方が微小管機能阻害効果がゆっくりとした反応であることが示された。以上の成果は、高分子ミセル製剤の薬効性を考える上で重要な情報であり、今後高分子ミセル製剤の分子設計を行う上で、本実験系が有用な評価系に成り得ることを示している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Kobayashi Y, Inose H, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Control of shell thickness in silica-coating of Au nanoparticles and their X-ray imaging properties. J Colloid Interface Sci, 査読有, 358, 2011, 329-333
2. Imamura J, Suzuki Y, Gonda K, Nath Roy C, Gatanaga H, Ohuchi N, Higuchi H. Single-particle tracking confirms that multivalent Tat-protein transduction domain induced Heparan-sulfate Proteoglycan (HSPG) cross-linkage activates Rac1 for internalization. J Biol Chem, 査読有, 286, 2011, 10581-10592
3. 権田幸祐、渡邊朋信、大内憲明、樋口秀男. がん転移の生体ナノイメージング、生物物理、査読無、51、2011、82-83
4. Park YS, Dmytruk A, Dmitruk I, Kasuya A, Takeda M, Ohuchi N, Okamoto Y, Kaji N, Tokeshi M, Baba Y. Size-selective growth and stabilization of small CdSe nanoparticles in aqueous solution. ACS Nano, 査読有, 26, 2010, 121-128
5. Gonda K, Watanabe TM, Ohuchi N, Higuchi H. In vivo nano-imaging of membrane dynamics in metastatic tumor cells using quantum dots. J Biol Chem, 査読有, 285, 2010, 2750-2757
6. Hikage M, Gonda K, Takeda M, Kamei T, Kobayashi M, Kumasaka M, Watanabe M, Satomi S, Ohuchi N. Nano-imaging of the lymph network structure with quantum dots. Nanotechnology, 査読有, 21, 2010, 185103
7. Kobayashi Y, Nozawa T, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N. Direct coating of quantum dots with silica shell. J Sol-Gel Sci Techn, 査読有, 55, 2010, 79-85

8. Kobayashi Y, Minato M, Ihara K, Sato M, Suzuki N, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Synthesis of silica-coated AgI nanoparticles and immobilization of proteins on them. J Nanosci Nanotechnol, 査読有, 10, 2010, 7758-7761
9. Cong L, Takeda M, Hamanaka Y, Gonda K, Watanabe M, Kumasaka M, Kobayashi Y, Kobayashi M, Ohuchi N. Uniform silica coated fluorescent nanoparticles: synthetic method, improved light stability and application to visualize lymph network tracer. PLoS One, 査読有, 18, 2010, e13167
10. Kawai M, Higuchi H, Takeda M, Kobayashi Y, Ohuchi N. Dynamics of different sized solid state nanocrystals as tracers for a drug delivery system in the interstitium of a human tumor xenograft. Breast Cancer Research, 査読有, 11, 2009, R43
11. Takeda M, Tada H, Higuchi H, Kobayashi Y, Kobayashi M, Sakurai Y, Ishida T, Ohuchi N. In vivo single molecular imaging and sentinel node navigation by nano-technology for molecular targeting drug delivery system and tailor made medicine. Breast Cancer, 査読有, 15, 2008, 145-152
12. Kobayashi Y, Shimizu N, Misawa K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M. Preparation of amine free silica coated AgI nanoparticles with modified Stöber method. Surfaces Engineering, 査読有, 24, 2008, 248-252

[学会発表] (計 19 件)

1. 大内憲明. 高精度蛍光ナノ計測による新世代がん診断法の開発. 第7回ナノバイオ国際シンポジウム、基調講演、2011/02/16、東京
2. Hamanaka Y, Gonda K, Takeda M, Shiraiishi K, Yokoyama M, Ohuchi N. In vivo real-time tracking of polymeric micelles for DDS visualization. 4th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, 2010/12/15-16, Singapore, Singapore
3. Ohuchi N, Gonda K, Takeda M. Research for Cancer Cell Imaging and Therapy based on Nano-biotechnology. Tohoku GCOE - MIT SMART Program Workshop, 2010/10/11-2010/10/12, Singapore

4. Takeda M, Hikage M, Gonda K, Ohuchi N. Precise sentinel node imaging by fluorescent nanoparticles in laparoscopic surgery. 6th World Congress of Biomechanics and 14th International Conference on Biomedical Engineering, 2010/08/03-04, Singapore, Singapore
  5. 大内憲明、権田幸祐、河合賢朗、多田寛、武田元博. in vivo ナノイメージングによる乳癌研究：1 分子可視化で判ってきたこと. 第 18 回日本乳癌学会学術総会、2010/6/24-25、札幌
  6. 権田幸祐、渡邊朋信、武田元博、大内憲明、樋口秀男. 転移性がん細胞の膜ダイナミックスの in vivo ナノイメージング. ナノ学会第 8 回大会、2010/5/13-15、岡崎
  7. 大内憲明. ナノ・バイオテクノロジーによる乳がんの 1 分子イメージング・DDS と大規模臨床試験. 第 4 回低侵襲医療機器実現化フォーラム、主催：(財)医療機器センター研究開発部、2009/11/24、東京慈恵医大、東京
  8. 武田元博、権田幸祐、樋口秀男、大内憲明. 乳がんのナノ標的イメージングと薬物動態・腫瘍機能解析. 第 31 回日本バイオマテリアル学会シンポジウム 6「生体イメージングとターゲティング」、2009/11/17、京都府民総合交流プラザ、京都
  9. Gonda K, Takeda M, Higuchi H, Ohuchi N. In vivo imaging of membrane dynamics in metastatic tumor cells using quantum dots. The 68th annual meeting of Japan Cancer Society, 2009/10/03, Pacifico Yokohama
  10. Takeda M, Kohno M, Amari M, Nakajima M, Ishida T, Ohuchi N. Diagnosis of cancer by detecting the chemiluminescence of hematoporphyrins in peripheral blood lymphocytes. The 68th annual meeting of Japan Cancer Society, 2009/10/02, Pacifico Yokohama
  11. 権田幸祐、渡邊朋信、河合賢朗、武田元博、樋口秀男、大内憲明. 分子イメージング In vivo ナノイメージングで解き明かすがん転移と DDS の仕組み. 第 25 回日本 DDS 学会学術集会、ワークショップ「分子イメージング」、2009/07/03-2009/07/04、東京ドームホテル
  12. 大内憲明. がん治療に向けたナノバイオ
- 研究最前線. 第 8 回国際バイオ EXPO、特別講演、2009/07/01-2009/07/03、東京ビッグサイト、東京
  13. 権田幸祐、渡邊朋信、武田元博、樋口秀男、大内憲明. 生体ナノ計測で解き明かすがん転移メカニズム. ナノ学会第 7 回大会、2009/05/10、東京大学 本郷キャンパス (浅野地区) 武田ホール
  14. 武田元博、権田幸祐、樋口秀男、大内憲明. 蛍光 1 分子計測による薬物動態イメージング. 第 48 回日本生体医工学学会オーガナイズドセッション「ナノキャリアーと物理エネルギーを融合したハイブリッド標的化・診断」、2009/04/23-2009/04/25、タワーホール船堀、東京
  15. Gonda K, Watanabe TM, Takeda M, Higuchi H, Ohuchi N. In vivo imaging of membrane dynamics in metastatic tumor cells. The 2nd International Symposium on Nanomedicine, Asian Core Symposium-Nano and Biomedical Molecular Science-, 2009/02/04, Okazaki, Japan
  16. Takeda M, Gonda K, Kawai M, Sakurai Y, Cong L, Higuchi H, Ohuchi N. Bioimaging and dynamics of functional nano-particles. The 2nd International Symposium on Nanomedicine, Asian Core Symposium-Nano and Biomedical Molecular Science-, 2009/02/04, Okazaki, Japan
  17. Kawai M, Takeda M, Ohuchi N. The feature of the interstitial nano drug delivery system with fluorescent nanocrystals of different sizes in the human tumor xenograft in mice. The 13<sup>th</sup> International Conference on Biomedical Engineering, 2008/12/04, National University of Singapore, Singapore
  18. Ohuchi N. Plenary lecture: Drug resistance as a target for cancer chemotherapy. The 26th Congress of the International Association for Breast Cancer Research, 2008/09/24, 岡山県倉敷市
  19. 河合賢朗、武田元博、石田孝宣、大内憲明. 蛍光ナノ粒子を用いた担がんマウスにおける腫瘍間質ナノドラッグデリバリーシステムの解析. ナノ学会第 6 回大会、2008/05/07、福岡
- [図書] (計 1 件)
1. 武田元博、権田幸祐、大内憲明. 金原出

版、乳癌 テーラーメイド治療の理論と実践「ナノDDSと乳癌標的治療」、2009、83-90

[産業財産権]

○出願状況 (計7件)

1. 名称：免疫組織染色法、およびこれを用いた抗体医薬の有効性を判定する方法  
発明者：岡田尚大、中野寧、権田幸祐、武田元博、大内憲明  
権利者：コニカミノルタエムジー(株)、東北大学  
種類：特願  
番号：2011-067448  
出願年月日：2011年3月25日  
国内外の別：国内
2. 名称：組織の自家蛍光と蛍光物質内包ナノ粒子の蛍光を利用した免疫組織化学法  
発明者：岡田尚大、郷田秀樹、中野寧、権田幸祐、武田元博、大内憲明  
権利者：コニカミノルタエムジー(株)、東北大学  
種類：特願  
番号：2011-059172  
出願年月日：2011年3月17日  
国内外の別：国内
3. 名称：免疫組織化学染色方法及び反応試薬  
発明者：高野敬三、星野秀樹、岡田尚大、中野寧、権田幸祐、武田元博、大内憲明  
権利者：コニカミノルタエムジー(株)、東北大学  
種類：特願  
番号：2011-057345  
出願年月日：2011年3月16日  
国内外の別：国内
4. 名称：半導体ナノ粒子集積体及び半導体ナノ粒子集積体の製造方法  
発明者：星野秀樹、高橋優、権田幸祐、武田元博、大内憲明  
権利者：コニカミノルタエムジー(株)、東北大学  
種類：PCT  
番号：JP2011/056000  
出願年月日：2011年3月15日  
国内外の別：国外
5. 名称：組織染色方法、組織評価方法および生体物質検出方法  
発明者：相宮拓司、郷田秀樹、岡田尚大、中野寧、権田幸祐、武田元博、大内憲明  
権利者：コニカミノルタエムジー(株)、東北大学  
種類：PCT

番号：JP2011/055991  
出願年月日：2011年3月15日  
国内外の別：国外

6. 名称：がん発症又はがん発症リスクの判定方法  
発明者：権田幸祐、宮下穰、武田元博、大内憲明  
権利者：東北大学  
種類：特願  
番号：2010-196442  
出願年月日：2010年9月2日  
国内外の別：国内
7. 名称：がん細胞運動およびがん細胞浸潤抑制剤  
発明者：権田幸祐、樋口秀男、大内憲明、武田元博  
権利者：同上  
種類：PCT  
番号：JP2009/055479 (JST 支援海外出願)  
出願年月日：2009年3月19日  
国内外の別：国外

○取得状況 (計0件)

[その他]  
なし

6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
大内 憲明 (OHUCHI NORIAKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90203710
- (2) 研究分担者  
粕谷 厚生 (KASUYA ATSUYO)  
東北大学・国際高等研究教育機構・客員教授  
研究者番号：10005986  
  
武田 元博 (TAKEDA MOTOHIRO)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：10333808  
  
甘利 正和 (AMARI MASAKAZU)  
東北大学・病院・講師  
研究者番号：50400312  
  
河合 賢朗 (KAWAI MASAOKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・客員准教授  
研究者番号：80513530
- (3) 連携研究者  
なし