

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760551

研究課題名(和文) 癌の画像診断・温熱治療への応用を目的とした磁性ナノ粒子の創製

研究課題名(英文) Synthesis of magnetic nanoparticles for MRI and magnetic hyperthermia treatment of tumor

研究代表者

林 幸彦朗 (Hayashi, Koichiro)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80580886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、磁気共鳴画像法(MRI)と磁気温熱療法(磁気ハイパーサーミア)を一体化する「セラノスティクス」の実現を可能にするような磁性ナノ粒子の開発に取り組んだ。葉酸とポリエチレングリコールを修飾した超常磁性マグネタイトナノ粒子クラスター(FA-PEG-SPION NCs)を担癌マウスに静脈内投与することで、MRIで腫瘍を造影することに成功した。さらに、このNCsを静脈内投与したマウスに人体に無害な交流磁場を印加すると、腫瘍のみが加熱され、腫瘍の温度は周囲の正常組織の温度よりも約6℃高くなった。この結果、腫瘍細胞の増殖を抑制でき、生存率を大幅に改善することができた。

研究成果の概要(英文)：We synthesized folic acid (FA)- and polyethylene glycol (PEG)-modified superparamagnetic nanoparticle clusters (FA-PEG-SPION NCs) for theranostics combining magnetic resonance imaging (MRI) and magnetic hyperthermia treatment (MHT). SPION clustering and modification were achieved simultaneously via the thiol-ene click reaction. Twenty-four hours after intravenous injection of FA-PEG-SPION NCs, the NCs accumulated locally in the tumor and enhanced the MRI contrast. Furthermore, 24 h after intravenous injection of the NCs, the mice were placed in an alternating current magnetic field (ACMF) for 20 min. The tumors of the mice underwent local heating by application of an ACMF. The temperature of the tumor was higher than the surrounding tissues by 6°C at 20 min after treatment. Thirty-five days after treatment, the tumor volume of treated mice was one-tenth that of the control mice. Furthermore, the treated mice were alive after 12 weeks; control mice died up to 8 weeks after treatment.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学 無機材料・物性

キーワード：磁気ハイパーサーミア MRI ナノ医療 セラノスティクス ナノ粒子 超常磁性 マグネタイト 酸化鉄

1. 研究開始当初の背景

日本において、ここ 30 年間、がんによる死亡者数は年間 30 万人を超え、死亡原因の第 1 位を占めている。しかし、がんは早期発見・治療により大幅に生存率を改善することができ、がんの種類によっては、直径 1cm 未満のがんであれば、5 年生存率が 90%以上である。このため、がん診断の精度を高め、早期に適切に治療することが、生存率向上において、非常に重要である。

がん検診では、触診・視診・血液検査・細胞診に加えて、PET・CT・MRI 等の画像診断が行われる。この画像診断の精度を向上させることが、がんの早期発見に非常に有効である。画像診断の精度を高めるためには、がんを特異的に造影する造影剤(プローブ)の開発が必要不可欠である。

がんの治療においては、現在、外科手術・化学療法・放射線療法が一般的である。しかし、これらの治療法には、侵襲性・副作用・被曝等の問題があり、低侵襲で副作用の少ない治療法の開発が求められている。

がんを早期に発見し、低侵襲かつ副作用の少ない治療を行うことで、患者の身体的・精神的・経済的負担を軽減することを目的とした、診断と治療を一体化する「セラノスティクス」と呼ばれる次世代医療技術が注目されている。例えば、高空間分解能な画像診断法である MRI と、低侵襲で副作用が少ないがん治療法として期待されている磁気温熱療法(磁気ハイパーサーミア)は、共に磁場を用いた医療技術であるため、これらを統合することで、セラノスティクスを実現することができうる。しかし、このためには、MRI 造影剤及び磁気ハイパーサーミア用発熱体として働く材料の開発が必要不可欠である。

超常磁性酸化鉄ナノ粒子(SPIONs)は現在臨床で MRI 造影剤として用いられており、さらに、交流磁場中で発熱するという特性も有するため磁気ハイパーサーミア用発熱体としての応用も期待できる。しかしながら、現在用いられている SPIONs ベースの MRI 造影剤はがん特異性がないため、肝臓のクッパー細胞をターゲットとした肝臓がんの造影に使用は限られる。このため、がんに特異的に集積する SPIONs の開発が求められる。さらに、がんの高感度検出を可能にするためには、SPIONs の T_2 緩和能(造影能)も必要である。

また、SPIONs は交流磁場中での発熱量が十分ではないため、SPIONs を磁気ハイパーサーミア用発熱体として用いた場合は、腫瘍全体を加熱し、治療効果を得るために大量に投与する必要がある。発熱量は材料を変えることで向上させることができるが、毒性を考慮すると、選択肢はほとんどなく、SPIONs が最も適した材料となる。このため、SPIONs を用いて発熱量を高める工夫が求められる。

2. 研究の目的

MRI と磁気ハイパーサーミアを統合したセ

ラノスティクスを実現することを目的とし、腫瘍に集積し、さらに、 T_2 緩和能及び発熱量が大きい SPIONs ベースの材料を開発する。このような材料を開発するために、具体的には、以下のことに取り組む。

(1) T_2 緩和能及び発熱量が大きい SPIONs ベースの材料を開発するために、SPIONs をクラスター化する。

(2) 腎臓からの排出を抑制するためにも、SPIONs をクラスター化する。

(3) Enhanced permeability and retention (EPR) 効果を利用した受動的ターゲティングにより腫瘍集積量を高めるために、クラスターのサイズを 50~100 nm に制御する。

(4) EPR 効果を促進するために、血中滞留時間を延長する効果を持つポリエチレングリコール(PEG)をクラスターに修飾する。

(5) PEG に加えて、がん細胞と特異的に結合する分子である葉酸(FA)もクラスターに修飾することで腫瘍集積量を高める。

(6) 腫瘍移植マウスを用いた動物実験により、開発した材料の MRI 造影剤及び磁気ハイパーサーミア用発熱体としての有用性を評価することにも取り組む。

3. 研究の方法

(1) SPIONs の合成

Iron (III) 3-allylacetylacetonate (IAA) をエタノールに溶解し、ヒドラジン-水和物と蒸留水を加え、80°C で 24 時間加熱することにより、アリル基が結合した超常磁性酸化鉄ナノ粒子(Allyl-SPIONs)を one-pot で合成した。Allyl-SPIONs は遠心分離で回収し、水で 3 回洗浄した。

(2) SPIONs のクラスター化及び表面修飾

Allyl-SPIONs のアリル基を利用して、チオール-エンクリック(TEC)反応により表面修飾を行った。チオールが結合した PEG (SH-PEG) を用いることで PEG のみを修飾し、チオールと FA が結合した PEG (SH-PEG-FA) を用いることで FA と PEG を修飾した。TEC 反応は、Allyl-SPION, SH-PEG または SH-PEG-FA、2,2'-azobis[2-(2-imidazolyl)propane]dihydrochloride を水に溶解し、60°C で 3 時間加熱することで生じた。また、TEC 反応過程で PEG が SPIONs を包み込んでいくためクラスター化も同時に達成された。PEG が結合した SPION クラスター(PEG-SPION NCs) と FA と PEG が結合した SPION クラスター(FA-PEG-SPION NCs) は遠心分離で回収することができ、水で 3 回洗浄した。

(3) 構造解析及び磁気特性評価

構造解析は X 線回折(XRD)、フーリエ変換赤外分光法(FTIR)、透過型電子顕微鏡(TEM)、動的分散(DLS)、示差熱-熱重量同時測定(DTA-TG)により行った。磁気特性は試料振動型磁力計(VSM)により評価した。

(4) 腫瘍移植マウスの作製

4 週齢雌 SCID マウス(CB17/ICr-Prkdc^{scid})に抗アシアロ GM1 (ウサギ)を腹腔内投与した。1

日後、ヒト多発性骨髄腫細胞株RPMI8226をマウスの背中に皮下投与した。

(5)MRI

①ファントムを用いた実験

PEG-SPION NCsまたはFA-PEG-SPION NCsをファントムに均一に分散させ、小動物用7T MRIを用いて T_2 撮像を行った。

②マウスの腫瘍造影

PEG-SPION NCsまたはFA-PEG-SPION NCs (48 $\mu\text{mol Fe/kg}$)を腫瘍移植マウスに静脈内投与し、24時間後、 T_2 撮像を行った。

(6)磁気ハイパーサーミア

①発熱量評価

Allyl-SPIONsまたはFA-PEG-SPION NCsを水に分散し(2.2 $\text{mg}_{\text{SPION}}/\text{mL}$)、交流磁場(100 Oe, 230 kHz)を印加した。温度はサーモグラフィで測定した。発熱量は以下の式から求めた。発熱量(SAR) = $(C_w/m)(dT/dt)$ ここで C_w は水の比熱、 m はSPIONsの濃度、 dT/dt は交流磁場を印加してから1分間の時間-温度曲線の傾きである。

②治療効果評価

FA-PEG-SPION NCs (48 $\mu\text{mol Fe/kg}$)を腫瘍移植マウスに静脈内投与し、24時間後、交流磁場を20分間印加した群(磁気ハイパーサーミアを行った群)と、対照群(無処置、FA-PEG-SPION NCs投与のみ、交流磁場印加のみ)を作製した($n=5$)。治療後の腫瘍体積及び生存率から、治療効果を評価した。

(7)毒性試験(生化学検査)

リン酸緩衝生理活性食塩水(PBS)またはFA-PEG-SPION NCs (48 $\mu\text{mol Fe/kg}$)をマウスに静脈内投与し($n=5$)、1カ月後血清を採取した。血清中の尿素窒素(BUN)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)の値から毒性を評価した。

4. 研究成果

(1)構造解析及び磁気特性

Allyl-SPION NCsのXRDパターンから、SPIONsはマグネタイト単相であることが分かった。また、シェラー式から求めた結晶子サイズは9.3 nmであった。

IAA, Allyl-SPIONs, SH-PEG, PEG-SPION NCs, SH-PEG-FA, FA-PEG-SPION NCsのFTIR測定により表面修飾の確認を行った。TEC反応により、アリル基とチオールに起因する吸収が消滅し、PEG及び葉酸由来の吸収が現れた。この結果から、Allyl-SPIONsとSH-PEGまたはSH-PEG-FAとの間でTEC反応が生じ、SPIONsのFA及びPEG修飾が達成できたと判断した。

FA-PEG-SPION NCsのTEM像から、粒径7~9 nmのSPIONsから成るクラスターが形成されており、このクラスターのサイズは60~100 nmであることが分かった。また、クラスターはPEGとFAからなる有機層で被覆されており、この層の厚さは4~7 nmであった。PEG-SPION NCsも同様であることがTEM像から分かった。以上の結果から、TEC反応によって、クラスター化

と表面修飾が共に達成されていることが分かる。また、クラスターのサイズはEPR効果が利用可能なサイズに制御されていることも明らかになった。

DLSで測定から、Allyl-SPIONs、PEG-SPION NCs、FA-PEG-SPION NCsのPBS中での平均粒径はそれぞれ8.9 nm、84.4 nm、98.9 nmであった。この結果は、TEM像から得られた結果と一致しており、溶液中のほぼ全ての粒子がクラスター化及び表面修飾されていることを示している。また、PBS中においても、クラスターのサイズがEPR効果が利用可能なサイズに制御されていることが明らかになった。

Allyl-SPIONs、SH-PEG、PEG-SPION NCs、SH-PEG-FA、FA-PEG-SPION NCsのPBS中でのゼータ電位はそれぞれ-4.2 mV、-25.9 mV、-15.7 mV、7.0 mV、-0.2 mVであった。表面修飾する分子の影響を受けてゼータ電位が変化していることから、表面修飾が達成されていることが分かった。

TG曲線から、Allyl-SPIONs、PEG-SPION NCs、FA-PEG-SPION NCsの有機相はそれぞれ4.0%、26.1%、29.3%であった。この結果から、PEG-SPION NCs中のPEGは22.1%、FA-PEG-SPION NCs中のFA-PEGは25.3%であることが分かった。

PEG-SPION NCs及びFA-PEG-SPION NCsの磁化曲線を測定した。比較のために、現在臨床で酸化鉄系MRI造影剤として使用されているResovistの磁化曲線も測定した。PEG-SPION NCs、FA-PEG-SPION NCs、Resovistは全て保磁力及び残留磁化がゼロであり、超常磁性であることが分かった。また、PEG-SPION NCs、FA-PEG-SPION NCs、Resovistの飽和磁化はそれぞれ48.6 emu/g、44.4 emu/g、2.4 emu/gであり、PEG-SPION NCs及びFA-PEG-SPION NCsはResovistより約20倍も大きい飽和磁化を有することが明らかになった。以上の結果は、SPIONsのクラスター化が飽和磁化を上昇させることを示している。

(2)MRI

PEG-SPION NCs、FA-PEG-SPION NCs、の緩和能を評価した。比較としてResovistの緩和能も評価した。PEG-SPION NCs、FA-PEG-SPION NCs、Resovistが均一に分散したファントムの T_2 MRIから、PEG-SPION NCs及びFA-PEG-SPION NCsはResovistに比べて、より暗くコントラストを増強することが分かった。また、鉄濃度と緩和能($r_2=1/T_2$)を見てみると、PEG-SPION NCs及びFA-PEG-SPION NCsはResovistの1/10の濃度でResovistと同等の緩和能を示すことが分かった。これは、SPIONsのクラスター化により、飽和磁化が上昇したことと、サイズが増大したことによりmotional average regimeからstatic dephasing regimeに変化したことが理由として挙げられる。

次に、PEG-SPION NCsまたはFA-PEG-SPION NCsを腫瘍移植マウスに静脈内投与し、MRIで腫瘍を造影できるか確かめた(図1A)。PEG-SPION NCsを投与した場合は、腫瘍内のごく一部が若干造影する程度であるが、

FA-PEG-SPION NCsを投与した場合は、腫瘍内を広く渡って強く造影できた。また、これらのNCsを投与する前後の腫瘍と腫瘍周囲の筋肉の T_2 を見ると、筋肉の T_2 は変化していないが、腫瘍の T_2 は短縮されていた(図1B)。さらに、FA-PEG-SPION NCsの方がPEG-SPION NCsよりも腫瘍の T_2 を短縮していた。以上の結果から、FA修飾により能動的ターゲティングが働き、SPIONsの腫瘍集積量が高まること明らかになった。

FA-PEG-SPION NCsの腫瘍内分布を組織解析により評価した。FA-PEG-SPION NCsは壊死した腫瘍組織ではなく、生存している腫瘍組織に集積していた。この結果は、MRIで造影された部分は、壊死した腫瘍組織ではなく、生存腫瘍組織であるということを示している。また、FA-PEG-SPION NCsの腫瘍集積にEPR効果が寄与していることを示唆している。

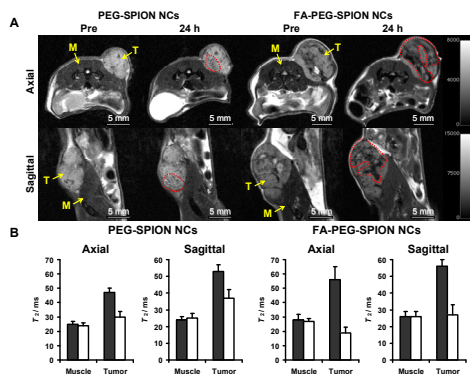


図1. (A) PEG-SPION NCsまたはFA-PEG-SPION NCsを静脈内投与腫瘍移植マウスのMRI、(B) 投与前後の筋肉と腫瘍の T_2

(3) 磁気ハイパーサーミア

Allyl-SPIONs、FA-PEG-SPION NCs の SAR を評価した。それぞれが分散した懸濁液に交流磁場を印加すると、交流磁場印加直後に懸濁液の温度が急激に上昇した。交流磁場を 10 分間印加すると、Allyl-SPIONs は約 18°C、FA-PEG-SPION NCs は約 20°C、懸濁液の温度を上昇させた。Allyl-SPIONs、FA-PEG-SPION NCs の SAR を見積もると、156 W/g_{Fe}、248 W/g_{Fe}であった。Allyl-SPIONs より FA-PEG-SPION NCs の方が約 1.6 倍も SAR が大きいのは、SPIONs をクラスター化することにより、飽和磁化が上昇したためであると思われる。以上の結果から、SPIONs をクラスター化することで緩和能だけでなく発熱量も増強することができることが明らかになった。

次に、FA-PEG-SPION NCs を用いた磁気ハイパーサーミアの治療効果を評価した。20 分間交流磁場を印加すると、腫瘍だけが局所的に加熱され、腫瘍の温度は周囲の正常組織の温度よりも約 6°C 高くなった(図 2A)。治療後の腫瘍体積を対照群と比較すると、磁気ハイパーサーミアにより顕著に腫瘍細胞の増殖が抑制された(図 2B)。これは 35 日後の写真からも明らかである(図 2D)。さらに、生存率も大幅に改善され、対照群は 8 週以内に全滅す

るが、磁気ハイパーサーミアを行った群は 12 週以上も生存した(図 2C)。

(4) 毒性

FA-PEG-SPION NCs を投与したマウスの血清中の BUN、ALT、ALP、AST の値を PBS を投与したマウスの値と比較したところ、大きな違いはなく、FA-PEG-SPION NC に重大な毒性がないことが明らかになった。

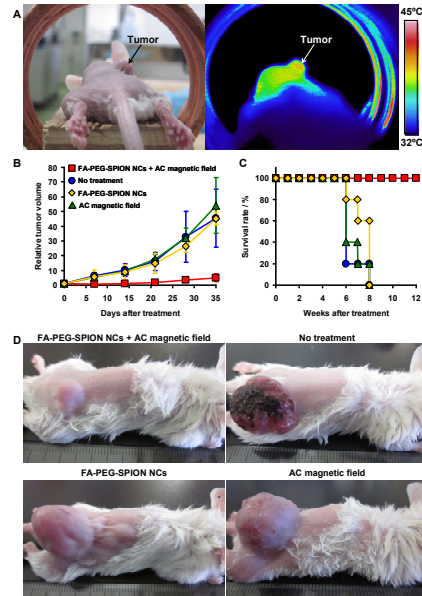


図 2. (A) 磁気ハイパーサーミアを行っている時の写真とサーモグラフィ画像、治療後の (B) 腫瘍体積と (C) 生存率、(D) 治療後 35 日の写真

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① K. Hayashi, M. Nakamura, H. Miki, S. Ozaki, M. Abe, T. Matsumoto, K. Ishimura, Photostable Iodinated Silica/Prophyrin Hybrid Nanoparticles with Heavy-Atom Effect for Wide-Field Photodynamic/Photothermal Therapy Using Single Light Source, *Adv. Funct. Mater.*, **24**, 503–513 (2014). 査読有
- ② K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, One-Pot Synthesis of Magnetic Nanoparticles Assembled on Polysiloxane Rod and Their Response to Magnetic Field, *Colloid Polym. Sci.*, **291**, 2837–2842 (2013). 査読有
- ③ K. Hayashi, M. Nakamura, W. Sakamoto, T. Yogo, H. Miki, S. Ozaki, M. Abe, T. Matsumoto, K. Ishimura, Superparamagnetic Nanoparticle Clusters for Cancer Theranostics Combining Magnetic Resonance Imaging and Hyperthermia Treatment, *Theranostics*, **3**, 366–376 (2013). 査読有
- ④ K. Hayashi, M. Nakamura, H. Miki, S.

- Ozaki, M. Abe, T. Matsumoto, K. Ishimura, Gold Nanoparticle Cluster/Plasmon-Enhanced Fluorescent Silica Core-Shell Nanoparticles for X-Ray Computed Tomography/Fluorescence Dual-Mode Imaging of Tumors, *Chem. Commun.*, **49**, 5334–5336 (2013). 査読有
- ⑤ K. Hayashi, M. Nakamura, K. Ishimura, Near-Infrared Fluorescent Silica-Coated Gold Nanoparticle Clusters for X-Ray Computed Tomography/Optical Dual Modal Imaging of the Lymphatic System, *Adv. Healthc. Mater.*, **2**, 756–763 (2013). 査読有
- ⑥ K. Hayashi, M. Nakamura, H. Miki, S. Ozaki, M. Abe, T. Matsumoto, K. Ishimura, Near-Infrared Fluorescent Silica/Porphyrin Hybrid Nanorings for In Vivo Cancer Imaging, *Adv. Funct. Mater.*, **22**, 3539–3546 (2012). 査読有
- ⑦ K. Hayashi, M. Nakamura, K. Ishimura, Silica-Porphyrin Hybrid Nanotubes for In Vivo Cell Tracking by Near-Infrared Fluorescence Imaging, *Chem. Commun.*, **48**, 3830–3832 (2012). 査読有
- ⑧ K. Hayashi, K. Maeda, M. Moriya, W. Sakamoto, T. Yogo, In Situ Synthesis of Cobalt Ferrite Nanoparticle/Polymer Hybrid from a Mixed Fe-Co Methacrylate for Magnetic Hyperthermia, *J. Magn. Magn. Mater.*, **324**, 3158–3164 (2012). 査読有
- ⑨ K. Hayashi, M. Nakamura, W. Sakamoto, T. Yogo, K. Ishimura, Synthesis and 3D Hierarchical Organization of 2D Structured Iron Oxide Based on Enzymatic Structure, Activity and Thermostability, *Mater. Res. Bull.*, **47**, 3959–3964 (2012). 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 林 幸壺朗, 中村 教泰, 石村 和敬 : ヨウ素含有シリカ/ポルフィリンハイブリッドナノ粒子の合成と重原子効果を利用した癌のフォトサーマル/光線力学併用療法, 日本セラミックス協会第26回秋季シンポジウム, 2013年9月4日~6日, 信州大学(長野県).
- ② 林 幸壺朗: 超常磁性酸化鉄ナノ粒子クラスターを用いた磁気ハイパーサーミアによる腫瘍成長抑制, 第48回ナノバイオ磁気工学専門研究会, 2013年8月29日, 中央大学駿河台記念館(東京都).
- ③ 林 幸壺朗, 中村 教泰, 石村 和敬 : 超常磁性ナノ粒子クラスターを用いたMRI及びハイパーサーミア, 第29回日本DDS学会学術集会, 2013年7月4日~5日, 京都テルサ(京都府).
- ④ 林 幸壺朗, 中村 教泰, 石村 和敬 : 超常磁性ナノ粒子クラスターの合成とMRI/ハイパーサーミアセラノスティクスへの応用, ナノ学会第11回大会, 2013年6月6日~8日, 東京工業大学(東京都).
- ⑤ 林 幸壺朗, 中村 教泰, 石村 和敬 : 超常磁性ナノ粒子クラスターの合成とMRIとハイパーサーミアを統合したセラノスティクスへの応用, 日本セラミックス協会2013年年会, 2013年3月17日~19日, 東京工業大学(東京都).
- ⑥ 林 幸壺朗 : 生体内イメージングおよび癌治療への応用を目的とした機能性ナノ粒子の開発, 第19回ヤングセラミストミーティング in 中四国, 2012年11月17日, 徳島大学(徳島県).
- ⑦ 林 幸壺朗, 中村 教泰, 石村 和敬 : CT/蛍光デュアルモードリンパ系イメージングのための金ナノ粒子クラスターコア/蛍光シリカシェルナノ粒子の創製, 日本セラミックス協会第25回秋季シンポジウム, 2012年9月19日~21日, 名古屋大学(愛知県).
- ⑧ 林 幸壺朗, 前田 一樹, 守谷 誠, 坂本 渉, 余語 利信 : 鉄-コバルト錯体を用いたコバルトフェライト/高分子ハイブリッドナノ粒子のin situ合成と磁気ハイパーサーミアへの応用, 日本セラミックス協会第25回秋季シンポジウム, 2012年9月19日~21日, 名古屋大学(愛知県).
- ⑨ 林 幸壺朗, 中村 教泰, 石村 和敬 : 金ナノ粒子クラスターコア/蛍光シリカシェルナノ粒子の創製とリンパ節およびリンパ管のCT/蛍光デュアルモードイメージング, 第7回日本分子イメージング学会学術集会, 2012年5月24日~25日, アクトシティ浜松(静岡県).

[その他]

- ① 2013年11月, 徳島大学若手研究者学長賞(徳島大学)
- ② 2013年6月, Young best presentation award(ナノ学会)
- ③ 2013年3月, 岡奨学賞(徳島大学)
- ④ 2012年9月, 優秀ポスター発表賞(日本セラミックス協会)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 幸壺朗 (HAYASHI, Koichiro)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 80580886

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし