

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461813

研究課題名(和文)4種類の酸化鉄ナノ粒子を用いた抗癌剤の結合と腫瘍への集積の検討

研究課題名(英文) Consideration as a Drug delivery system of newly developed superparamagnetic iron oxide.

研究代表者

渡邊 尚武 (Watanabe, Shobu)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：60570364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新しく開発した表面電荷を全体にマイナスチャージした酸化鉄ナノ粒子をシスプラチンと結合させ、その条件(酸化鉄ナノ粒子の径；30nm、50nmと反応時間；1時間、24時間)による抗腫瘍効果を検討した。新たな酸化鉄ナノ粒子は従来型のSPI0と比較してプラチナと結合しやすく、また粒子の小さい方が細網内皮系に捕捉されずに腫瘍内に滞留する事がわかった。腫瘍内のプラチナの集積は不十分であったが結合方法や使用薬剤によっては新たなドラッグデリバリーシステムの構築に有効であると示唆される。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the anti-tumor effect using the newly developed negatively charged superparamagnetic iron-oxide (SPI0) nanoparticles created by changing the reaction time with cisplatin and the diameter of the particles.

In this study, negatively charged SPI0 nanoparticle was combined with cisplatin well than conventional SPI0. Although the Iron concentration in the tumor tissue was higher in a small size of SPI0, Platinum concentration was lower in the tumor tissue. The reaction time did not have a clear influence on the antitumor effect. Further studies are necessary, such as conditions of the release of the drug, negatively charged SPI0 nanoparticle can be expected to become an effective contrast agent also as drug delivery system.

研究分野：医師薬学

キーワード：酸化鉄ナノ粒子 ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

Superparamagnetic iron-oxide(SPIO)は肝臓癌の診断に Ultra-small superparamagnetic iron-oxide(USPIO)はリンパ節転移の診断に臨床で使用されている(本邦未承認)。現在、本邦で肝臓の MR 用造影剤として使用されている SPIO の作用機序は、約 55nm の SPIO を静脈注射し 10-20 分後に MR 撮影すると肝臓の Kupffer 細胞がこの粒子を貪食するため肝臓の磁場の不均一が生じ、元来 Kupffer 細胞の存在しない腫瘍部を認識できるようになる。この粒子は鉄のコアの周囲にデキストランで被包することにより作成されている。デキストラン被包の大きな目的は粒子同士の凝集を防ぐためである。我々は従来型の SPIO と USPIO の生体内外での性質や動態を研究してきた。

我々は従来型の SPIO と USPIO をベースとして粒子径、表面電荷を換えることにより Kupffer 細胞が認識しにくい粒子の開発を行った。この粒子の開発目的は MR 用の優れたコントラストを持つ血管内 pooling 画像を得るためのものであった。我々の開発した酸化鉄ナノ粒子は従来型の SPIO や USPIO に比べてラットマクロファージの培養で貪食能の低下を示しマウスに投与した際、高い血中濃度を 5 時間以上持続することを証明した。またウサギに投与して 5 時間以上、MR で良好な血管像を得ることができることを証明した。酸化鉄ナノ粒子の表面電荷を調整することにより細網内皮系で補足され難い酸化鉄ナノ粒子を作成できることが証明できた。

過去の研究で従来型の SPIO がプラチナ製剤と結合し腫瘍内局所注入による抗腫瘍効果と電磁波を使った温熱療法の有効性が確認された。しかし血管内投与は従来型の SPIO では細網内皮系に捕捉されるため腫瘍へ粒子を導入することが困難であったため局所注入が選択されている。そのため従来型 SPIO を、より細網内皮系に捕捉されにくい酸化鉄ナノ粒子に置き換えることにより腫瘍内に選択的に抗癌剤を集積できる可能性がある。

2. 研究の目的

新しく開発した酸化鉄ナノ粒子の細網内皮系に捕捉されず長時間血中に存在する性質を利用して、この粒子を MRI 用造影剤として使用するだけでなく薬剤のキャリアーとして利用しドラッグデリバリーシステムとして利用しドラッグデリバリーシステムの構築を検討する。腫瘍への粒子の集積については腫瘍組織では正常組織に比べ血管透過性が著しく亢進しているため高分子や微粒子は血管より流出しやすいとされている。またリンパ系が発達していないため、腫瘍組織に到達した物質は蓄積する。このような特性を Enhanced permeation and retention effect(EPR 効果)を用いた腫瘍に対する受動的ターゲティングを行う。今回、従来柄の SPIO と USPIO と異なる酸化鉄ナノ粒子と抗癌

剤(プラチナ製剤)の 4 種類の結合体を作成し抗癌剤との結合能と腫瘍への集積を検討する

3. 研究の方法

従来型の SPIO と USPIO のサイズで、約 55nm と 30nm の粒子の表面電荷を全体にマイナスチャージした粒子を作成、全ての酸化鉄ナノ粒子濃度は約 55mg/ml に調整する。

(1)4 種類の酸化鉄ナノ粒子へのプラチナ製剤結合量の検討

プラチナ製剤であるシスプラチン 2mg を酸化鉄ナノ粒子(55nm、30nm)2ml と 1 時間および 24 時間反応させて限外濾過を利用してシスプラチン-酸化鉄ナノ粒子結合体を抽出。抽出した 4 種類の結合体のプラチナ濃度を ICP-MS により測定する。

(2)4 種類の酸化鉄ナノ粒子の抗腫瘍効果と腫瘍細胞への集積の検討

細胞毒性試験：

VX2 細胞を使用。96 ウェルプレートに 5×10^3 細胞/ウェル播種の割合で培地を加え、それぞれに上記薬剤(1000 $\mu\text{g/ml}$)を 10 μl (0.1, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$)を加え 48 時間後、生細胞数を MTT assay を用いて測定し抗腫瘍効果の検討を行う。

ウサギ VX2 モデルを用いた腫瘍への酸化鉄ナノ粒子集積と抗腫瘍効果の検討：

肝臓に VX2 腫瘍細胞を移植した生後 15 週の日本白色ウサギ(体重 2.5-3kg)を 12 羽使用。各酸化鉄ナノ粒子 4 種類(A:30nm の酸化鉄ナノ粒子にシスプラチンを 1 時間反応させたもの、B:30nm の酸化鉄ナノ粒子にシスプラチンを 24 時間反応させたもの、C:55nm の酸化鉄ナノ粒子にシスプラチンを 1 時間反応させたもの、D:30nm の酸化鉄ナノ粒子にシスプラチンを 24 時間反応させたもの)を投与するために無作為に 3 羽ずつ 4 群に分類した。ウサギは MRI の撮影前にケタミン(25mg/kg)、塩酸メドミジン(0.1mg/kg)を筋注にて麻酔した後、A-D の 4 種類の酸化鉄ナノ粒子を 0.8mmol/kg ずつ静脈注射を行った。MRI による撮像は静注前および静注後 1 日後、7 日後に行い腫瘍体積の増減を算出。また 7 日の撮像後に犠牲死させた後、肝組織を摘出し腫瘍および周囲正常内に含まれるプラチナおよび鉄の濃度を測定した。

また摘出した腫瘍組織内の鉄の分布を病的に評価する為に摘出標本の鉄染色(ベルリンブルー染色)を施行し無作為に選んだ 3 視野(200 倍率)における鉄陽性面積を計測し平均を算出し各投与群間での鉄陽性面積の比較を行った。

4. 研究成果

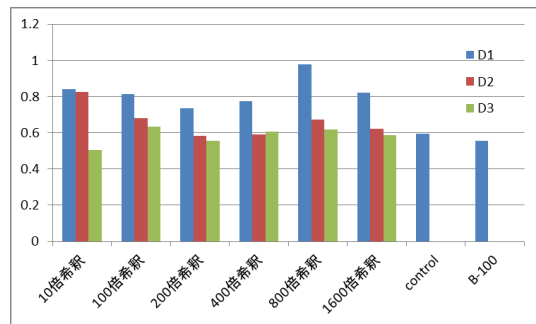
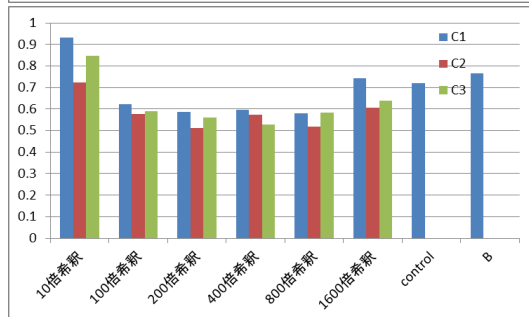
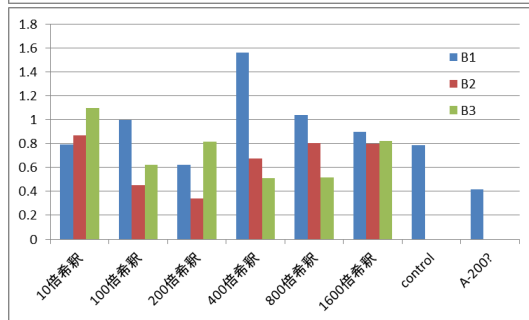
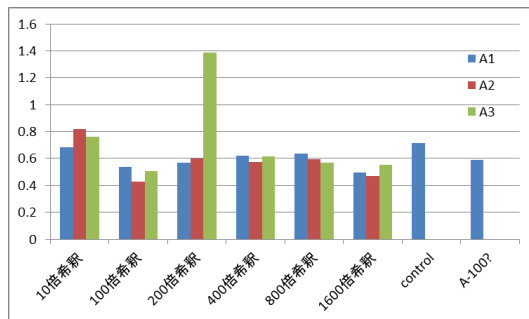
(1)4 種類の酸化鉄ナノ粒子へのプラチナ製剤結合量の検討

各酸化鉄ナノ粒子と結合したプラチナ濃度は 55nm の酸化鉄ナノ粒子を 1 時間反応させたものは平均 163.5 $\mu\text{g/ml}$ 、24 時間反応させ

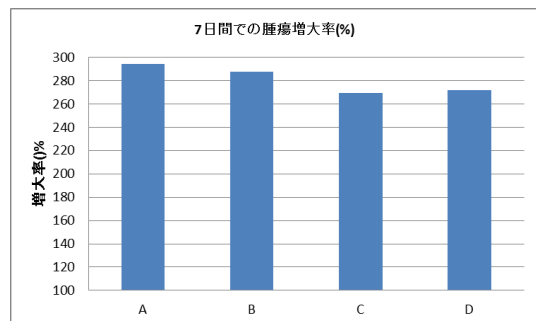
たものは 186 $\mu\text{g/ml}$ となった。30nm の酸化鉄ナノ粒子を 1 時間反応させたものは平均 172.2 $\mu\text{g/ml}$ 、24 時間では 165.7 $\mu\text{g/ml}$ であった。過去に行った従来型の SPI0 と USPI0 を用いた研究では平均で 105.6 $\mu\text{g/ml}$ のプラチナと結合するという結果が出ていることから、今回使用した表面電荷をマイナスチャージさせた酸化鉄ナノ粒子は従来型と比較して多くのプラチナと結合することが示された。また粒子径による結合量の差は 1 時間反応させたもの同士には有意な差は認められなかったが 24 時間反応させたもの同士では 55nm 酸化鉄ナノ粒子の方がプラチナと結合する傾向が認められた。

(2)4 種類の酸化鉄ナノ粒子の抗腫瘍効果と腫瘍細胞への集積の検討

いずれのサイズの酸化鉄ナノ粒子も反応時間による毒性の差は認められなかったが、サイズによる粒子間の比較では小さい 30nm の粒子の方が強い毒性を示した。培養細胞内には同重量の酸化鉄ナノ粒子が加えられることから径が小さい方がより多くの粒子が投与される事となりそれにより多くのプラチナ製剤が培養細胞内に取り込まれたことが原因と考えられる。

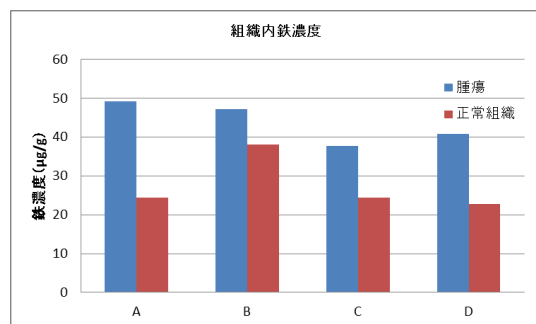


投与前と 1 日後の間には A-D 投与群のいずれにも肝腫瘍の増大率に明らかな差は認められなかった。7 日後との比較での腫瘍増大率は A 投与群が 294.4%、B 投与群が 288.1%、C 投与群が 269.5%、D 投与群が 271.9% であり各投与群間の腫瘍増大率には明らかな有意差は認められなかった。このことから投与後 1 週間の期間内では粒子径や反応時間による抗腫瘍効果の差は無いと考えられた。



各粒子間の鉄陽性面積には明らかな有意差は認められず ($p=0.98$)、また鉄成分の分布も腫瘍辺縁に多く見られ中心部は壊死や変性が強くほとんど認められなかった。これらの腫瘍壊死、変性は各腫瘍による個体差が非常に大きく鉄陽性面積での正確な比較検討は困難であると考えられた。

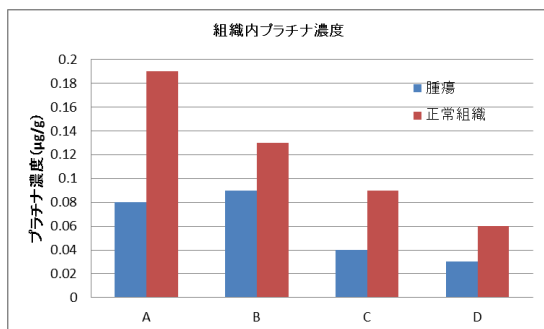
組織内の鉄濃度は、腫瘍組織内が A 投与群；49.3 $\mu\text{g/g}$ 、B 投与群；47.3 $\mu\text{g/g}$ 、C 投与群；37.8 $\mu\text{g/g}$ 、D 投与群；40.8 $\mu\text{g/g}$ 、正常肝組織内の鉄濃度は A 投与群；24.4 $\mu\text{g/g}$ 、B 投与群；38.1 $\mu\text{g/g}$ 、C 投与群；24.4 $\mu\text{g/g}$ 、D 投与群；22.8 $\mu\text{g/g}$ となった。



いずれの投与群でも腫瘍組織内の鉄濃度は正常組織よりも有意に高い値を示しており、このことから酸化鉄ナノ粒子は粒子径の小さい粒子の方が細網内皮系に捕捉されにくく

く腫瘍内に集積することが示唆された。また粒子のサイズ間での比較では粒子径の小さい A、B 投与群の方が C、D 投与群より腫瘍内の鉄濃度が高い傾向が認められることから粒子径が小さい酸化鉄ナノ粒子の方が、細網内皮系に捕捉されにくく、腫瘍内に多く集積されると考えられる。

また、組織内のプラチナ濃度は腫瘍組織内が A 投与群；0.08 µg/g、B 投与群；0.09 µg/g、C 投与群；0.04 µg/g、D 投与群；0.03 µg/g、正常肝組織内の鉄濃度は A 投与群；0.19 µg/g、B 投与群；0.13 µg/g、C 投与群；0.09 µg/g、D 投与群；0.06 µg/g となった。



粒子径同士での比較では鉄濃度同様に粒子径が小さい方が各組織内に集積する結果を示したことから、酸化鉄ナノ粒子と結合したシスプラチンのプラチナ成分は鉄と同様、粒子径が小さい方が細網内皮系に捕捉されることなく腫瘍内に集積したと考えられるが、腫瘍組織よりも正常組織内に多く集積が認められた点が鉄と異なる結果となった。これは鉄が主に肝臓内の網内皮系である Kupffer 細胞に捕捉され貪食されるのに対して、プラチナは腎から尿となって排泄されるという代謝経路の違いが影響するものと考えられた。

(3) 今回の実験結果から、新たに開発された酸化鉄ナノ粒子は従来の SPI0 よりもシスプラチンに代表されるプラチナと結合しやすく、また粒子径の小さなものの方が細網内皮系に捕捉されることなく腫瘍内に集積されることがわかった。細胞毒性に関しても粒子径の小さな酸化鉄ナノ粒子の方が強い抗腫瘍効果を示すことが示唆された。しかし MRI での腫瘍増大率には明らかな有意差は指摘できず、組織内のプラチナ濃度は鉄と異なり腫瘍内に優れた集積を認めなかったことから体内に摂取されたのちに結合したプラチナ成分が酸化鉄ナノ粒子より離脱し腎を介して体外へと排泄された可能性が考えられる。

本研究の limitation としては固体による腫瘍の増大速度に差があることや腫瘍内部の性状の差があげられる。そのため、腫瘍内部の鉄やプラチナ濃度の値にばらつきが生じた可能性がある。また抗腫瘍効果に明らかな差は認められなかった点に関しては薬剤注入後の経過観察期間が 1 週間と短く結果に反

映されにくくなった可能性が考えられる。ウサギは体格が小さく処置による影響により長期的な生存が困難であることが原因であるが、移植する腫瘍細胞の個数を減らすことや、より肝機能に影響が少ないであろう左葉の外側区の辺縁に移植するなど改善できると考える。

細網内皮系に捕捉されにくい物質の同定は、薬剤の効果を標的部で高めるためには欠くことの出来ない作業である。我々の開発した酸化鉄ナノ粒子は、まさにこの物質にふさわしいと考えられる。今回使用したシスプラチンに関しては生体内に注入後の結合に改善の余地が認められるが酸化鉄ナノ粒子自体は腫瘍内に優先的に分布されており、今後の研究によって特異的に癌細胞をターゲティングできる Drug delivery system を構築できる可能性がある。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 尚武 (WATANABE, Shobu)
滋賀医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：60570364

(2) 研究分担者

新田 哲久 (NITTA, Norihisa)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 40324587

(3)連携研究者
()

研究者番号：