

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 15 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461928

研究課題名(和文)金ナノ粒子増感効果による超適応治療に向けての基礎研究

研究課題名(英文)Fundamental research using gold nanoparticles as a radiosensitizer for super adaptive radiotherapy

研究代表者

小松 哲也 (KOMATSU, Tetsuya)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：50334769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、金ナノ粒子のさまざまな投与方法について評価検討した。悪性黒色腫細胞をマウスの大腿部に移植し、以下の8群に分け効果を評価した。対照群 ペグ化金ナノ粒子を経静脈的に投与 ペグ化金ナノ粒子を、腫瘍を直接穿刺して投与 放射線照射のみ に対し放射線照射 に対し放射線照射 非ペグ化金ナノ粒子を経静脈投与し放射線照射 非ペグ化金ナノ粒子を直接穿刺投与し放射線照射。放射線量は10Gyを大腿部に照射。腫瘍サイズの推移と生存期間を評価した。金ナノ粒子は、有意な程度までの放射線増感作用、生存期間の改善を示さなかった。ペグ化GNP単独投与で、投与初期に軽度の腫瘍抑制効果が見られた。

研究成果の概要(英文)：We assessed various methods of administering gold nanoparticles (GNPs). Cells from the B16F10 mouse melanoma cell line were implanted in the femoral area of mice and the mice were assigned to the eight following groups : (1) control, (2) intravenous (IV) injection of polyethylene glycol (PEG)-binding GNPs (Peg-GNPs) alone, (3) direct intratumoral (IT) injection of Peg-GNPs alone, (4) radiotherapy (RT)-alone, (5) Peg-GNP IV + RT, (6) Peg-GNP IT + RT, (7) naked GNP (N-GNPs) IV + RT and (8) N-GNP IT + RT. The femoral area was irradiated with a single dose of 10 Gy. To evaluate the effects of GNPs, we measured the changes in the tumor volume ratio to the initial tumor volume over time and observed survival.

The administration of GNPs with RT did not improve either the suppression of tumor growth or survival to a statistically significant extent. The administration of Peg-GNPs alone showed a slight tumor suppressing effect at the early stage..

研究分野：放射線治療学

キーワード：金ナノ粒子 放射線増感剤 マウス 悪性黒色腫

## 1. 研究開始当初の背景

金ナノ粒子 (gold nanoparticles: GNP) は 2004 年に Hainfeld らにより *in vivo* の実験において放射線増感剤としての有効性が初めて報告された [1]。その作用機序としてはオージェ電子の関与や腫瘍血管の障害など様々なものが考えられているが、未だ十分に解明されていない。投与経路としては、これまで経静脈投与 (Intravenous injection: IV) と、腫瘍を直接穿刺して投与する方法 (Intratumoral injection: IT) が行われてきたが、この二つの投与経路についての比較検討は行われていない。GNP を IV 投与した場合、適切な GNP 粒子径の選択により Enhanced permeability and retention (EPR) 効果によって腫瘍に集積する [2]。しかし、その大部分は他臓器に取り込まれてしまい、腫瘍へ到達するのはごくわずかである [1]。IT 投与した場合、腫瘍内の GNP の密度が高まるため、より高い治療効果が得られる可能性がある。一方その場合、分布が不均一になるというデメリットがある [3]。

また、近年は薬剤の Polyethylene glycol (PEG) 化による良好な治療効果が報告されている [4]。GNP は体内に投与すると異物として速やかに網内系に取り込まれ消失してしまうが、PEG 化することによりこの反応は抑制され、より持続的な治療効果が得られると考えられる。

## 2. 研究の目的

今回の研究の目標は、この GNP の生物学的作用に関して投与経路の違いと Peg 化の効果について *in vivo* での評価をおこなうこと、更に可能であれば GNP の集積を当院の所有する実験動物用 Computed Tomography (CT) を使用して画像化し、物理学的な解析を行い生物学的な結果と対比させることにある。

## 3. 研究の方法

### (1) 担癌マウスの作成と薬剤注入

マウスは日本クレアより週齢 6 週のヌードマ

ウス BALB/C-nu/nu (メス) を購入した。移植細胞はマウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 を使用し、1 マウスあたり細胞数  $2 \times 10^4$  を大腿部皮下に注入し、担癌マウスを作成した (Figure 1)。

GNP は Peg 化 GNP (Peg-GNP) と通常の GNP: Naked GNP (N-GNP) の 2 種類を使用した。Peg-GNP は 15 nm Methyl terminated 5000 PEG coated GNP 2.8 mg/ml (Sigma-aldrich, MO, USA), N-GNP は 15 nm GNP 濃度 200 mg Au/cc (Nanoprobes, NY, USA) を使用した。治療群として、control, Peg-GNP IV alone, Peg-GNP IT alone, Radiotherapy (RT) alone, Peg-GNP IV + RT, Peg-GNP IT + RT, N-GNP IV + RT, N-GNP IT + RT の 8 群を設定した。移植後 12~19 日の間に腫瘍径が約 1 cm となった時点で治療を開始した。GNP 注入は、それぞれの薬剤を 27 G ニードル付き 1 mL シリンジを使用して、尾静脈から、あるいは腫瘍を直接穿刺して薬剤を注入した。注入量は 1 マウスあたり Peg-GNP は 0.3 ml、N-GNP は 0.2 ml を IV、IT と同量使用した。

### (2) CT 撮像

マウスの CT 撮像に先行して、Peg-GNP 自体の濃度を人体用の CT (HiSpeed GE WI) を使用して、1 mm スライス厚、FOV 25 cm, 512×512 pixel, 120 kV, 70 mA の条件にて撮像した。Peg-GNP は平均 CT 値 107 HU の高吸収値で明瞭に描出された (Figure 2)。マウスの CT 撮像は麻酔 BOX 使用を使用し 3.0% イソフルラン流量 2.0 L/min にて導入麻酔行い、2.5% イソフルラン 0.4 L/min air の維持麻酔下にておこなった (Figure 3)。CT 撮像装置は実験動物用 CT 装置 (LCT200 Hitachi Aloka medical Ltd, Tokyo) を使用し、pixel size 24  $\mu$ m, スライス厚 24  $\mu$ m, スライス間隔 24  $\mu$ m, 80 kv 0.2 mA, 加算回数 2 回の条件にて撮像した。撮像時期としては、Peg-GNP 注入マウス

(IV 及び IT)は GNP 注入直後と 24 時間後に、N-GNP 注入マウス (IV 及び IT)は注入直後に撮像をおこなった。



Figure 1



Figure 2

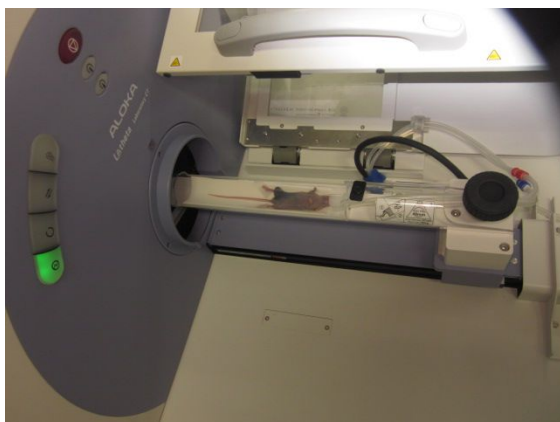


Figure 3

### (3) X線照射

治療としての X 線照射は MBR-1520R-3 (Hitachi Medical Corporation, Tokyo) を使用し、照射条件 150 kv , 20 mA で filter ( 0.5 mm 厚 Aluminium + 0.1 mm 厚 Copper ) を使用し、線源皮膚間距離を 55 cm としておこなった。マウスの患側大腿部以外の部分は 2 cm 厚の低融点鉛合金 (cerrobend block) で作成したブロックにて保護した。X 線照射時は麻酔を使用せず、50 ml のコニカルチュ

ーブを加工したものを作成使用し、補綴下にておこなった。線量は 1 回線量 10 Gy の照射をおこなった。

### (4) 評価方法

治療後は経時的に腫瘍の長径と短径を測定し、腫瘍体積を腫瘍体積 = { ( 長径 × 短径<sup>2</sup> ) / 2 } mm<sup>3</sup> の近似式を用いて算出した。腫瘍径は 1 日おきに週に 3 回計測し、治療開始時の腫瘍体積に対する各測定時点における腫瘍体積比を tumor volume ratio (TVR) = (測定時の腫瘍体積) / (治療直前の腫瘍体積) として算出し、腫瘍増大速度の指標とした。腫瘍体積比の時間経過を評価し、各群間で比較をおこなった。平均値の比較には T 検定を使用し、有意水準を 5% ( 両側 ) に設定した。また Kaplan-Meier 法にて生存解析をおこない、log-rank 検定にて生存率についての比較をおこなった。最終的には移植された腫瘍の増殖能を均一にして比較するため、上記期間、つまり細胞移植後 12 ~ 19 日の期間において腫瘍体積が 200 mm<sup>3</sup> 以下あるいは 1300 mm<sup>3</sup> 以上だった個体は解析から除外した。

## 4. 研究成果

### (1) CT 画像

Figure 4 に Peg-GNP を IT 注入した後の CT 画像を示す。CT を撮像した 6 匹のマウスいずれにおいても GNP の集積は描出できなかった。



Figure 4

### (2) 腫瘍縮小効果

Figure 5 はそれぞれの群の TVR の平均値を経時的に示したグラフである。control 群の腫

瘍増大速度が最も速く、その次が照射せず薬物のみ投与した群であった。照射と薬物を併用した群では照射単独群とほぼ同様な腫瘍増大速度を示した。

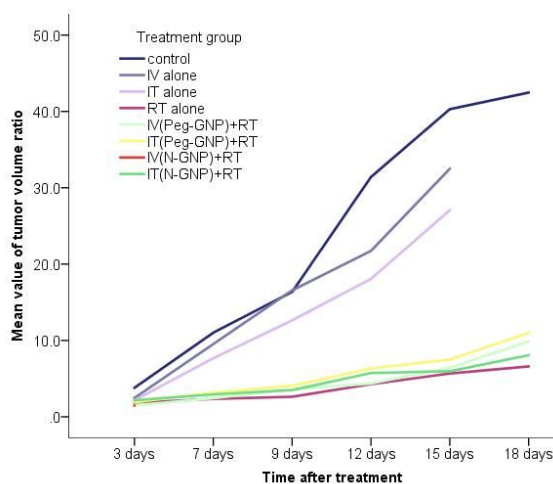


Figure 5

Figure 6 は治療開始から 3 日後の、それぞれの治療法における TVR の比較を明確に示したものである。control 群に対しいずれの治療法も腫瘍増大抑制効果が認められた。また平均値でみた場合、RT alone に対し GNP IV 併用群はやや低値を示し、Peg-GNP、N-GNP とともに若干の放射線増感作用の存在を疑わせた。

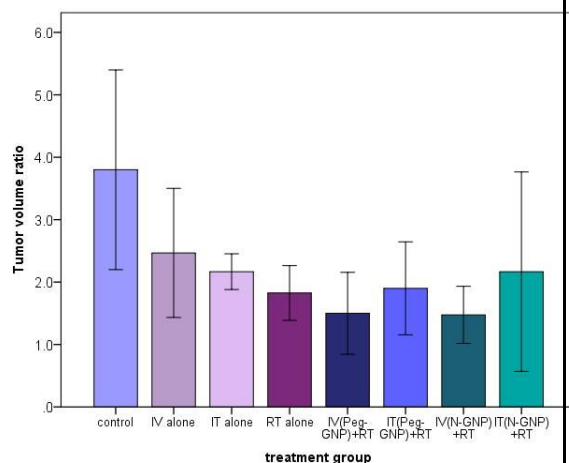


Figure 6

Table 1 は 3 日後及び 15 日における TVR について、治療方法間での有意差検定をおこなったものである。N-GNP IV + RT は 4 匹の内、治

療 5 日後に 3 匹が、治療 6 日後に 1 匹が死亡したため 7 日後以降は評価対象には入らなかった

b)と c)は薬剤単独の抗腫瘍効果を評価したものである。3 日後には IT 群で有意差をもって腫瘍抑制効果を認め、IV 群でも有意傾向を示した。しかし、15 日後には有意差はなくなっていた。

d) ~ g)はそれぞれの薬物 及び投与方法について、放射線増感作用を評価したものである。3 日後は d) Peg-GNP IV 群及び f) N-GNP IV 群において、照射単独群に比較し腫瘍体積比の平均値が減少していたが(それぞれ 1.8 vs. 1.5, 1.8 vs. 1.4)、統計学的には有意差はなかった。その後は d) Peg-GNP IV 群の増大速度は速くなり、15 日後においてはその値は逆転していた。

### (3) 生存期間

Figure 7 は Peg-GNP を使用した群の、Figure 8 は N-GNP を使用した群のそれぞれの生存期間を示したものである。GNP 併用による生存期間の延長は認められなかった。

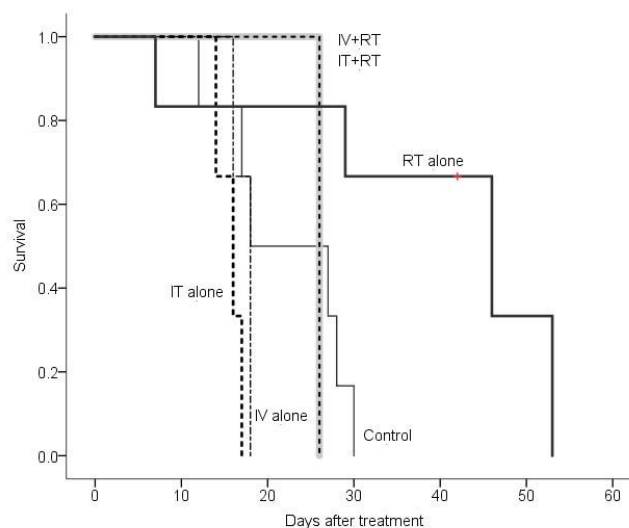


Figure 7 Survival after Peg-GNP injection

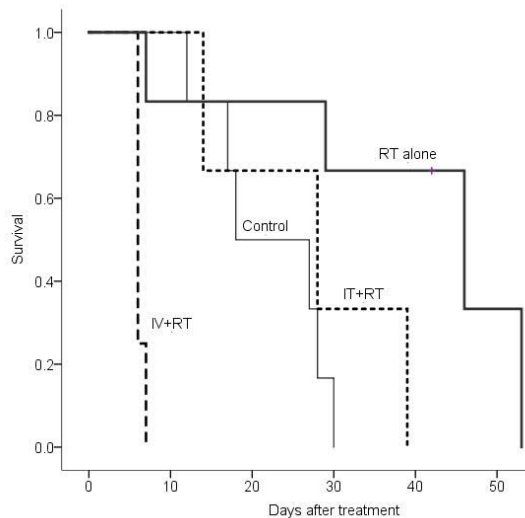


Figure 8 Survival after N-GNP injection

その他、各群間でログランク検定をおこなった結果は以下の通りであった。

Control 群と RT alone 群の間に有意差を認め、RT alone 群が良好であった。

薬物(GNP)単独群に比較し GNP 併用放射線治療は有意差をもって良好であった。(Peg-GNP IT alone vs Peg-GNP IT + RT:  $P = 0.025$ , Peg-GNP IV alone vs Peg-GNP IV + RT:  $P = 0.030$ )

RT alone 群と GNP 併用照射群では、GNP 併用照射群の有意な生存期間の改善はなかった。(RT alone vs. Peg-GNP IV + RT :  $P=0.070$ , RT alone vs. Peg-GNP IT + RT :  $P = 0.070$ , RT alone vs. N-GNP IT + RT :  $P = 0.094$ ). N-GNP IV+RT 群ではむしろ有意差をもって生存期間が不良であった。(RT alone vs. N-GNP IV + RT :  $P = 0.004$ )

#### (4) 結果の解釈

2008年に Changらは B16 melanoma cell lines を移植したマウスに対し、電子線を用いて GNP の放射線増感作用を報告した [5]。彼らは電子線 1 回 25 Gy という大線量を用いて、細胞移植後 7 日目に治療開始した。この時の腫瘍体積は 50-90 mm<sup>3</sup> と我々の実験開始時の腫瘍体積よりかなり小さかった。その後 2013

年に Mousavie Anijdan らはほぼ似たような条件で実験をおこなったところ放射線増感作用は部分的にしか確認できなかった [6]。彼らの実験では、最初の 1 ヶ月は GNP の放射線増感作用を示唆する所見を認めたが、最終的には有意差には至らず、考察で腫瘍体積が放射線増感作用に非常に影響するのではないかと述べている。今回の我々の実験結果もこれに類似している。今後腫瘍の大きさと放射線増感作用の関係について検討を行う必要があると考えられる。

また GNP 単独の効果に関して、PEG-GNP の投与初期に GNP 単独の抗腫瘍効果が認められ、細胞障害的性質を反映したものと考えられる。

これまでの放射線増感剤としての金ナノ粒子の研究においては、治療開始時の腫瘍体積の影響や金ナノ粒子そのものの毒性についてはあまり問題にされてこなかった。金ナノ粒子の放射線増感作用は複雑な生物学的要素が関係しており、単に物理的な計算のみでの効果予測は困難と考えられた。

#### < 引用文献 >

- 1: Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol.* 2004;49:309-15.
- 2: Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annu Rev Med.* 2012;63:185-98.
- 3: Herold DM, Das IJ, Stobbe CC, Iyer RV, Chapman JD. Gold microspheres: a selective technique for producing biologically effective dose enhancement. *Int J Radiat Biol.* 2000;76:1357-64.
- 4: Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res.* 2010;62:90-9.

5: Chang MY, Shiau AL, Chen YH, Chang CJ, Chen HH, Wu CL. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci.* 2008;99:1479-84.

6: Mousavie Anijdan SH, Mahdavi SR, Shirazi A, Zarrinfard MA, Hajati J. Megavoltage X-ray Dose Enhancement with Gold Nanoparticles in Tumor Bearing Mice. *Int J Mol Cell Med.* 2013;2:118-23.

Table 1

Comparison	Group	3 days after		15 days after	
		Mean value	P value	Mean value	P value
a) Control vs. RT alone	Control RT alone	3.8 1.8	0.024	40.3 5.6	0.014
b) Control vs. Peg-GNP IV alone	Control Peg-GNP IV alone	3.8 2.4	0.091	40.3 32.5	0.605
c) Control vs. Peg-GNP IT alone	Control Peg-GNP IT alone	3.8 2.1	0.047	40.3 27.0	0.392
d) RT alone vs. Peg-GNP IV + RT	RT alone Peg-GNP IV + RT	1.8 1.5	0.177	5.6 6.4	0.680
e) RT alone vs. Peg-GNP IT + RT	RT alone Peg-GNP IT + RT	1.8 1.9	0.745	5.6 7.5	0.424
f) RT alone vs. N-GNP IV + RT	RT alone N-GNP IV + RT	1.8 1.4	0.129		
g) RT alone vs. N-GNP IT + RT	RT alone N-GNP IT + RT	1.8 2.1	0.375	5.6 5.9	0.859
h) Peg-GNP IV alone vs. Peg-GNP IT alone	Peg-GNP IV alone Peg-GNP IT alone	2.4 2.1	0.295	32.5 27.0	0.568
i) Peg-GNP IV + RT vs. Peg-GNP IT + RT	Peg-GNP IV + RT Peg-GNP IT + RT	1.5 1.9	0.158	6.4 7.5	0.659
j) N-GNP IV + RT vs. N-GNP IT + RT	N-GNP IV + RT N-GNP IT + RT	1.4 2.1	0.108		
k) Peg-GNP IV + RT vs. N-GNP IV + RT	Peg-GNP IV + RT N-GNP IV + RT	1.5 1.4	0.911		
l) Peg-GNP IT + RT vs. N-GNP IT + RT	Peg-GNP IT + RT N-GNP IT + RT	1.9 2.1	0.551	7.5 5.9	0.497

5. 主な発表論文等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小松 哲也 (KOMATSU, Tetsuya)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：50334769

(2)研究分担者

株木 重人 (KABUKI, Shigeto)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00402777

国枝 悦夫 (KUNIEDA, Etsuo)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70170008