

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430154

研究課題名(和文) 網内系に捕捉されることなくがん組織に集積するステルス性酸化鉄ナノ粒子の開発

研究課題名(英文) Development of magnetite nanoparticle with stealth and active targeting function

研究代表者

石井 恵子 (Ishii, Keiko)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00291253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、深部がんや難治がんへの応用を目指して、画像診断や温熱療法に有用と考えられる酸化鉄ナノ粒子の開発を行った。静脈内に投与したナノ粒子は肝臓や脾臓などの細網内皮系に捕捉され、目的とするがん組織に到達しにくいという問題があったが、我々は麹菌アスペルギルス・オリゼーが産生する両親媒性タンパク質RolAで酸化鉄ナノ粒子を被覆することによりステルス化させることに成功した。さらに、アクティブターゲティングにより粒子のがん組織への集積性を高めるため、ヒト乳がん細胞に多く発現するHER2を抗原とする抗体ペルツマブの1本鎖可変領域(scFv)を作製した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop magnetic iron-oxide nanoparticles with novel properties for the imaging and thermal therapies of cancer in deep tissues and intractable cancer. It has been a problem that intravenously injected nanoparticles are mostly trapped by the reticuloendothelial system in liver and spleen before they reach target cancer cells. We approached this issue by coating the iron-oxide particles with RolA, a surface hydrophobin of *Aspergillus oryzae*. RolA-coated iron-oxide nanoparticles were less recognized by macrophages, suggesting they are endowed with stealth property. We further aimed to add an active targeting property to the iron-oxide nanoparticles and produced a single-chain fragment variable (scFv) containing variable regions of anti-HER2 antibody pertuzumab.

研究分野：感染免疫学

キーワード：ステルス化 酸化鉄ナノ粒子 MRIによる診断 温熱療法 ガン組織指向性 scFv

1. 研究開始当初の背景

悪性新生物(がん)はわが国の死亡原因の第1位を占め、国民の健康にとって重大な脅威である。近年の診断技術の進歩による早期発見やがん細胞特異的な分子標的治療薬の開発などは治療成績の向上に寄与しつつあるが、薬剤への不応性に起因する再発がんの増加は依然として問題であり、新たな治療法の開発が強く望まれる。

近年、各種素材からなるナノ粒子の技術開発が進んでおり、これらのがんの診断や治療に応用するための基礎研究が進められている。しかしながら、静脈内に投与されたナノ粒子が肝臓や脾臓などの細網内皮系(網内系)に捕捉され、がん組織に十分に送達されない(*Pharmaceutical* 2013;5:542-569)ことが進展を妨げている。この問題を解決する目的で、ポリエチレングリコールなどを用いたナノ粒子のステルス化が試みられているが、頻回投与によるステルス効果の減弱(*J Control Release* 2013;172:38-47)が新たな問題となっている。

磁性体である酸化鉄ナノ粒子はすでに核磁気共鳴画像(MRI)の造影剤として用いられているが、がん組織に集積させると、がんの位置を示すマーカーとなりうる。一方、磁場を与えて粒子を発熱させると、熱に弱いがん細胞を選択的に死滅させることが可能であり、温熱療法への利用が期待されている(*Nanomedicine* 8:1689-1707, 2013)。研究分担者の高見は独自の方法で、表面修飾やサイズコントロールが可能で、水分散性の高い酸化鉄ナノ粒子の合成に成功している(*Dalton Trans.* 40:1073-1078, 2011)。この酸化鉄ナノ粒子はマウスの肝臓や脾臓の細網内皮系に捕捉されるため、ステルス化が必要と考えた。一方で、真菌のアスペルギルス・フミガーツスの分生子表面を覆うタンパク RodA が樹状細胞や T 細胞などの免疫細胞による認識を回避すると報告されている(*Nature* 27:1117-21, 2009)。そこで、研究分担者の阿部が単離することに成功していた近縁のアスペルギルス・オリゼーの類似タンパク RoIA (*Molecular Microbiology* 57:1780-1796, 2005)をステルス化に利用することにした。

2. 研究の目的

診断や治療が難しい深部がんや難治がんに対する新規の診断・治療ツールとして、静脈内に投与後、網内系に捕捉されず、がん組織に選択的に侵入し、がん組織に留まる独自の酸化鉄ナノ粒子を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス、細胞: マウスは C57BL/6 及び BALBc を用いた。マウス骨髄由来樹状細胞(BM-DC)は C57BL/6 マウスの骨髄細胞を GM-CSF 存在下で 8 日間培養して得た。株化細

胞 RAW264.7 をマウスマクロファージとして用いた。担がんマウスを作製する目的でマウス大腸がん細胞 Colon-26 を用いた。多くのヒト乳がん細胞表面に発現する HER2 の発現細胞として KPL-4 を、その対照として HER2 陰性の MDA-MB-231 を用いた。

(2) 酸化鉄ナノ粒子の RoIA 被覆: 酸化鉄ナノ粒子及び RoIA は不要な炎症を誘導する LPS を除去後使用した。酸化鉄ナノ粒子に RoIA を添加し、30 で 10 min 反応して結合させた。減圧乾燥後、被覆量を測定した。

(3) 樹状細胞活性化: LPS やその他の炎症誘導物質の混入を調べるため、RoIA、RoIA 被覆粒子、あるいは非被覆粒子存在下で BM-DC を 37、24 時間培養し、培養上清中の炎症性サイトカイン IL-12p40 及び TNF- を ELISA 法で測定した。

(4) マクロファージによる貪食: RAW264.7 細胞に RoIA 被覆粒子あるいは非被覆粒子を添加し、37、4 時間培養した。培養後の細胞を洗浄後、大気圧電子顕微鏡により貪食粒子の有無を観察した。また、37%塩酸で細胞を溶解し、原子吸光法により貪食された鉄量を定量した。

(5) 腹腔内炎症: C57BL/6 マウス腹腔に RoIA 被覆粒子あるいは非被覆粒子を投与し、48 時間後に白血球を Diff-Quick で染色し、各白血球の数を計測した。

(6) 腹腔内マクロファージによるナノ粒子の貪食: 上記と同様に粒子を投与したマウスの腹腔内マクロファージを鉄染色キット(武藤科学)で染色した。

(7) MRI による組織分布解析: C57BL/6 マウス静脈より RoIA 被覆粒子あるいは非被覆粒子を投与し、2 時間後に小動物用 MRI 装置(Bruker, AV400WB)を用いて、腹腔臓器の T2 強調画像を取得した。4%アガロースゲルを明度の指標として、粒子集積率を算定した。

(8) 担がんマウスの作製: BALB/c マウスの皮下に 5×10^5 の Colon-26 を移植し、腫瘍径が 5 mm 以上で粒子投与実験に用いた。

(9) リコンビナント pertuzumab-scFv の作製: pertuzumab の H (heavy)鎖と L (light)鎖の可変領域のアミノ酸配列を基に single-chain fragment variable (scFv、PerscFv)をデザインし、ベクター pET20b を用いてプラスミド pPerscFv を作製した。PerscFv は大腸菌 BL21(DE3)内で発現させ、His-tag を利用して精製した。

(10) PerscFv の HER2 への結合: KPL-4 に PerscFv を 4 で 30 分間反応させ、蛍光標識

抗 His-tag 抗体を反応後、フローサイトメータ (BD FACSCanto II) で結合を解析した。

4. 研究成果

(1) 酸化鉄ナノ粒子の RoIA 被覆：酸化鉄ナノ粒子の被覆率は 120% 以上であり、完全被覆ナノ粒子が得られた。

(2) RoIA あるいは酸化鉄ナノ粒子自体の免疫誘導能：RoIA、非被覆粒子、あるいは RoIA 被覆粒子を加えて培養した BM-DC は炎症性サイトカインである TNF- α 及び IL-12p40 をほとんど産生しなかったことから、LPS その他の炎症誘導物質の混入があったとしても研究に支障を与えない程度である。

(3) RoIA 被覆によるステルス化

マクロファージによる貪食の回避：非被覆粒子はマクロファージに貪食されたが、RoIA で被覆することにより、貪食されにくいことが、大気圧電子顕微鏡像 (図 1) 及び鉄量の測定により明らかになった (図 2)。

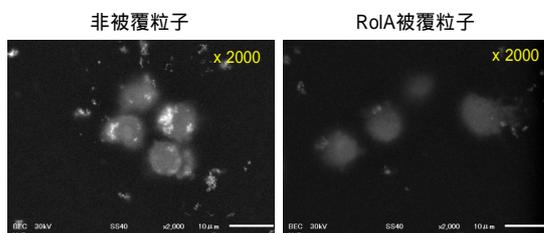


図 1. RoIA 被覆または非被覆酸化鉄ナノ粒子を加えて培養した RAW264.7 の大気圧電子顕微鏡像

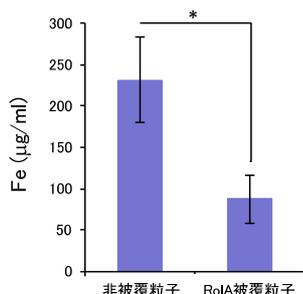


図 2. RoIA 被覆または非被覆酸化鉄ナノ粒子を加えて培養した RAW264.7 の塩酸溶解液中の鉄量

炎症の抑制：非被覆粒子をマウス腹腔に投与したところ、マクロファージ、好中球、リンパ球が顕著に増加し、粒子により腹腔内炎症が起こることが示された。RoIA 被覆粒子の投与では、いずれの白血球の増加も認められなかった (図 3) ことから、RoIA 被覆によるステルス効果が明らかになった。この所見に一致して、RoIA 被覆粒子は非被覆粒子に比べ、マクロファージに貪食されにくいことが、腹腔白血球の鉄染色により示された (図 4)。

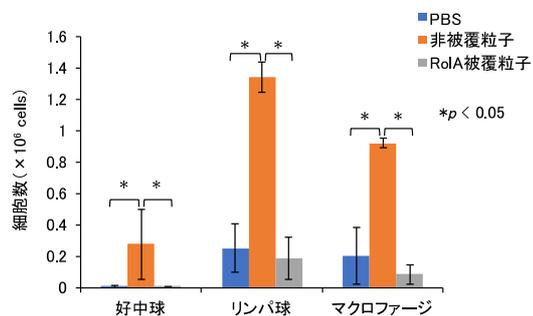


図 3. RoIA 被覆または非被覆酸化鉄ナノ粒子を腹腔に投与したマウスの腹腔内白血球数

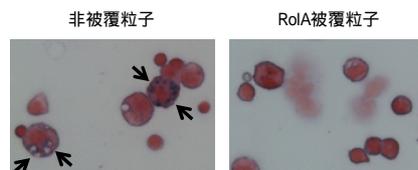


図 4. RoIA 被覆または非被覆酸化鉄ナノ粒子を腹腔に投与したマウスの腹腔マクロファージの鉄染色 矢印はベルリンブルーによる染色箇所を示す。

網内系による粒子捕捉の回避：非被覆粒子をマウス静脈に投与すると、肝臓及び脾臓が MRI の T2 強調画像で黒く写り、粒子が網内系に捕捉されることが示された。RoIA 被覆粒子投与マウスでは、肝・脾への集積が少ない (図 5、6) ことから、静脈投与において RoIA 被覆によるステルス化が有用であることが示された。

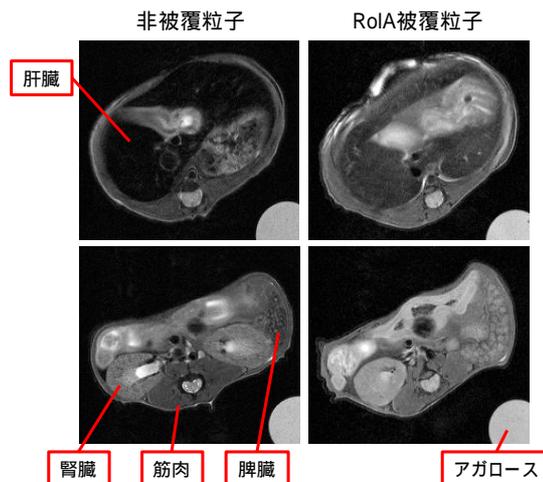


図 5. 非被覆または RoIA 被覆酸化鉄ナノ粒子を静脈投与したマウスの MRI T2 強調画像

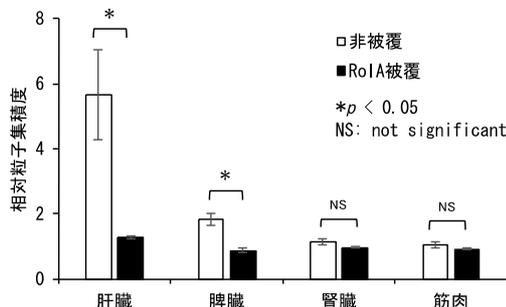


図 6. 各臓器における粒子集積度

(4) 担がんマウスにおける粒子の腫瘍への集積: RoIA 被覆粒子を担がんマウスの静脈より投与し、粒子の動向を MRI で調べたところ、肝臓や脾臓に比較し、腫瘍にはわずかの量しか集積しなかった(図7)。腫瘍組織へ選択的に侵入させるため、粒径の異なる粒子(20, 40, 200 nm)について検討したが、いずれも腫瘍に十分に集積しなかった。

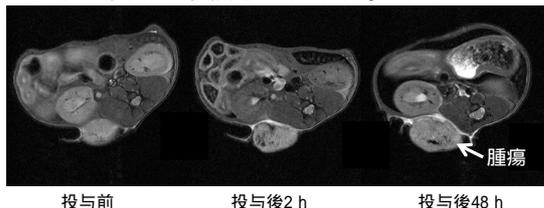


図7. RoIA 被覆粒子の腫瘍への集積

(5) がん指向性 scFv 作成: ナノ粒子が腫瘍組織に侵入したとしても滞留できないのではないかと考え、ナノ粒子のアクティブターゲティングを目指した。目的のためにがん細胞表面のがん特異的タンパク質に結合する抗体を利用し、さらに小型化するために抗原結合部位のみを持つ scFv を作製した。この scFv のデザインに際しては、乳がん細胞の多くに発現する HER2 に結合し、乳がんの増殖を抑え、治療薬としても用いられる pertuzumab の抗原結合部位のアミノ酸配列を持つようにした(PerscFv)。PerscFv は不溶性となる割合が高く、精製は困難を伴ったが、現時点で少量の可溶性タンパクを得ている。

(6) PerscFv の HER2 への結合: PerscFv を HER2 陽性 KPL-4 あるいは HER2 陰性 MDA-MB-231 に反応させ、フローサイトメトリーで解析したところ、PerscFv が MDA-MB-231 には結合せず、KPL-4 に結合することが示された(図8)。

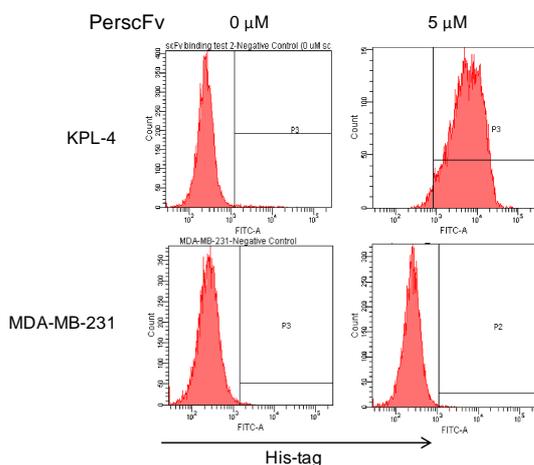


図8. PerscFv の HER2 陽性乳がん細胞への結合

以上本研究では、酸化鉄ナノ粒子を RoIA で被覆することによりステルス化し、粒子の網内系への捕捉を低下させることに成功した。しかしながら、ナノ粒子を腫瘍組織に集

積させることが難しいことが明らかになったので、ナノ粒子にアクティブターゲティング能を与えることを試みた。乳がんの治療用として用いられる抗体 pertuzumab の scFv をデザインし、その作製に成功した。タンパク質を酸化鉄ナノ粒子に結合させることにはすでに成功しているので、scFv 結合ナノ粒子のがん組織指向性を検討し、担がんマウスの温熱治療を目指す。

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 10 件)

Terauchi Y, Kim YK, Tanaka T, Nanatani K, Takahashi T, Abe K. Asp30 of *Aspergillus oryzae* cutinase CutL1 is involved in the ionic interaction with fungal hydrophobin RoIA. *Biosci Biotechnol Biochem*. May 5:1-6, 2017. doi: 10.1080/09168451. (査読有り)

Akahori Y, Miyasaka T, Toyama M, Matsumoto I, Miyahara A, Zong T, Ishii K, Kinjo Y, Miyazaki Y, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: Dectin-2-dependent host defense in mice infected with serotype 3 *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Immunol* 17:1, 2016. doi: 10.1186/s12865-015-0139-3. (査読有り)

Miyasaka T, Watanabe Y, Akahori Y, Miyamura N, Ishii K, Kinjo Y, Miyazaki Y, Liu T, Uemura Y, Kawakami K: Human CD4⁺CD8⁻ invariant natural killer T cells promote IgG secretion from B cells stimulated by cross-linking of their antigen receptors. *World J. Vaccines* 6, 34-41, 2016. (査読有り)

Mor V, Singh A, Farnoud AM, Rella A, Tanno H, Ishii K, Kawakami K, Sato T, Del Poeta M: Glucosylceramide administration as a vaccination strategy in mouse models of cryptococcosis. *PLoS One* 11: e0153853, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0153853. (査読有り)

Nakayama M, Sasaki R, Ogino C, Tanaka T, Morita K, Umetsu M, Ohara S, Tan Z, Nishimura Y, Akasaka H, Sato K, Numako C, Takami S, Kondo A. Titanium peroxide nanoparticles enhanced cytotoxic effects of X-ray irradiation against pancreatic cancer model through reactive oxygen species generation in vitro and in vivo. *Radiat Oncol* 2016 Jul 7;11(1):91. doi: 10.1186/s13014-016-0666-y. (査読有り)

Nakamura Y, Sato K, Yamamoto H, Matsumura K, Matsumoto I, Nomura T, Miyasaka T, Ishii K, Kanno E, Tachi M,

Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: Dectin-2 deficiency promotes Th2 response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 83: 671-681, 2015. doi: 10.1128/IAI.02835-14. (査読有り)

Sato K, Yamamoto H, Nomura T, Matsumoto I, Miyasaka T, Zong T, Kanno E, Uno K, Ishii K, Kawakami K: *Cryptococcus neoformans* infection in mice lacking type I interferon signaling leads to increased fungal clearance and IL-4-dependent mucin production in the lungs. *PLoS One* 10:e0138291, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0138291. (査読有り)

Takahashi T, Tanaka T, Tsushima Y, Muragaki K, Uehara K, Takeuchi S, Maeda H, Yamagata Y, Nakayama M, Yoshimi A, Abe K. Ionic interaction of positive amino acid residues of fungal hydrophobin RoIA with acidic amino acid residues of cutinase CutL1. *Mol Microbiol* 96:14-27, 2015. doi: 10.1111/mmi.12915. (査読有り)

Zhu Y, Takami S, Seong G, Dejhosseini M, Hossain MZ, Noguchi T, Hojo D, Aoki N, Aida T, Adschiri T. Green solvent for green materials: a supercritical hydrothermal method and shape-controlled synthesis of Cr-doped CeO₂ nanoparticles. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 373:2057, 2015. doi: 10.1098/rsta.2015.0012. (査読有り)

Kikuta S, Nakamura Y, Yamamura Y, Tamura A, Homma N, Yanagawa Y, Tamura H, Kasahara J, Osanai M. Quantitative activation-induced manganese-enhanced MRI reveals severity of Parkinson's disease in mice. *Sci Rep* 5:12800, 2015. doi: 10.1038/srep12800. (査読有り)

[学会発表](計 2 件)

景澤貴史、石井恵子、渡邊祐里絵、松村香菜、笛末崎、小山内実、高橋徹、村垣公英、佐藤大貴、阿部敬悦、高見誠一、阿尻雅、冨樫貴成、川上和義: *Aspergillus oryzae* 由来 RoIA による免疫回避とステルスナノ粒子開発への応用 日本生体防御学会 2015年7月10~12日 東京(台東区生涯学習センター ミレニアムホール)

石井恵子、渡邊祐里絵、松村香菜、笛末崎、小山内実、高橋徹、村垣公英、佐藤大貴、阿部敬悦、高見誠一、阿尻雅、冨樫貴成、川上和義: *Aspergillus oryzae* 由来 RoIA による免疫回避とステルスナノ粒子開発への応用 日本生体防御学会 2014年7月9~11日 仙台(東北大学 片平さくら

ホール)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 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 0 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

<http://www.infect-immun.med.tohoku.ac.jp/?FrontPage>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 恵子 (ISHII Keiko)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00291253

(2) 研究分担者

阿部 敬悦 (ABE Keietsu)

東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 50312624

(3) 研究分担者

高見 誠一 (TAKAMI Seiichi)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授
研究者番号: 40311550

(4) 連携研究者

川上 和義 (KAWAKAMI Kazuyoshi)

東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10253973

(5) 連携研究者

小山内 実 (OSANAI Makoto)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90286419