

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461833

研究課題名(和文)MRI分子画像を用いたナノDDSによる体内動態の解明から治療効果早期診断への応用

研究課題名(英文)Pharmacokinetics and pharmacodynamics evaluation of micellar nanoparticles incorporating SN-38 using molecular imaging

研究代表者

西尾福 英之(NISHIOFUKU, HIDEYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80458041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミセル化ナノ粒子であるNK012の動注薬剤としての有用性について肝腫瘍動物モデルを用いて評価し、さらに生体内での代謝経路についてその動態について評価した。動注群と静注群の2群を作成し、18匹の肝腫瘍モデルを用いてNK012とfree SN-38の末梢血中濃度と腫瘍内濃度を測定した。末梢血中濃度は24時間におけるAUCを測定したが両群で有意差を認めなかったが、腫瘍内は、投与3分後、2時間後、24時間において動注群で有意に高い濃度を認めた。動態評価を行うために、NK012を蛍光標識し組織内、腫瘍内での可視化を行い、投与後経時的に腫瘍内から肝実質内のクッパー細胞に取り込まれていくことが示された。

研究成果の概要(英文)：Purpose: To evaluate the pharmacokinetics of intraarterial (IA) administration of micellar nanoparticles incorporating SN-38 (NK012) injection compared with intravenous (IV) administration in a rabbit liver tumor model. Methods: 18 rabbits with VX2 liver tumors were divided into two groups. NK012 and free SN-38 in the plasma, liver parenchyma, and tumors were measured within 24 hours. Results: There were no significant differences in the serum area under the concentration-time curve for free SN-38, at 1,500 and 1,310 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ in the IA and IV groups, respectively. The IA group showed significantly higher free SN-38 concentrations in tumor tissues at all time points compared with the IV group. Histologic findings showed that significantly higher tumor necrosis ratios were observed in the IA group compared with the IV group at 24 hours. Conclusions: Micellar nanoparticles could be a promising IA drug delivery system to achieve high tumor tissue concentrations of SN-38.

研究分野：ナノDDS

キーワード：ナノDDS

1. 研究開始当初の背景

イメージングは、生命現象を可視化する技術であるが、その目的は形態学的現象から機能的・生物学・生理学的現象の解明へと変化し、超早期診断や個別化治療への実現化が期待されている。一方、ナノテクノロジーを使った高分子ミセル化製剤(ナノ DDS; ドラッグデリバリーシステム)は、既存の抗がん剤を DDS 化することで腫瘍への特異性・選択性が増し、抗がん剤の効果の増強、副作用の低減、さらには医療費のコスト削減に寄与すると考えられている。我々は、これまで局所麻酔下でのカテーテルを用いた非侵襲的血管内治療を消化器癌に対して実施しており、特に肝腫瘍に対しては超選択的抗がん剤動注療法の開発を行ってきた。がん診療において我々がすでに培ってきた血管内治療技術と新規抗がん剤であるナノ DDS とを融合させることにより可能となる超選択的腫瘍内動注療法は、より特異的で効果が高く、毒性の低い新たな治療法となることが期待される。

2. 研究の目的

ナノ DDS は、既存の抗がん剤を DDS 化し、腫瘍を標的とした超選択的な治療を実施でき、従来の抗がん剤の効果を高め、副作用を低減することが可能となる。しかし、ナノ DDS 製剤の体内動態は明確になっておらず、その高分子製剤であるナノ DDS を用いた治療の効果判定法には、機能的・生物学・生理学的なバイオ情報を得ることができる分子イメージングとしての MRI が期待されている。本研究は、臨床用高磁場 MRI を用い、これまで我々が構築してきた高分子情報を可視化するイメージング技術により、がん診療におけるナノ DDS の体内動態を基礎レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ラット肝腫瘍モデル作成とナノ DDS の体内動態の画像化：ラットの肝腫瘍モデルに血管内治療技術を用いて肝臓に直接ナノ DDS を投与し、その肝実質・類洞・腫瘍内での動態を血管造影・造影超音波を用いて観察する。病理標本との対比を行い、分子イメージング技術の一つである ECR1 を用いて画像化する。

基礎研究：

実験動物モデル作成とナノ DDS 製剤の体内動態の評価

F344 ラットに同系の大腸癌 RCN-9 株細胞を培養し細胞浮遊液を調整する。ラットを全身麻酔下で開腹後、30G 針を用いて門脈内に直接癌細胞を注入し肝転移モデルを作製する。肝転移モデルが安定して作製できる日数やその管理について確立する。

ラットの左頸動脈を露出させ、20G サーフロー針を穿刺する。血管造影下で 1.9Fr マイクロカテーテルを挿入して、腹腔動脈・肝

動脈を造影する。肝動脈から直接腫瘍の濃染を確認した後、ナノ DDS の超選択的動脈内投与を行う。

ナノ DDS 粒子の動態を血管造影と超音波で確認する。さらに、摘出した肝臓の病理標本を確認し、画像との相関関係を評価する。

新規治療法の開発：

ナノ DDS と血管内治療とを融合させた新規治療法の開発と分子イメージングによる画像化

10~12 週数令の F344 ラットを用いて、平成 26 年度に実施した手法でラット肝腫瘍モデルを作成する。腫瘍作成を開腹下で確認後、経皮的に肝動脈内への抗がん剤の超選択的腫瘍内動注療法を実施する。

コントロール群(n=5)、動注群(n=18)、静注群(n=18)の 3 群を作成し、抗がん剤投与量としては、30mg/kg と設定する。各群において、5 分・30 分・3 時間・6 時間・24 時間・72 時間後の腫瘍内、肝実質内、血液中内の NK012・非結合型 NK012 の測定を行う。

経過中の腫瘍の状態を確認するために、ECR1 を撮像する。治療後から上記タイミングでと殺し、肝臓・腫瘍の摘出を行い、ナノ DDS の肝実質内・腫瘍内での動態を病理学的に確認し、ECR1 と比較検討する。

4. 研究成果

ナノテクノロジーを使った高分子ミセル化製剤ナノドラッグデリバリーシステム(ナノ DDS)は、既存の抗がん剤を DDS 化することで腫瘍への特異性・選択性が増し、抗がん剤の効果の増強、副作用の低減、さらには医療費のコスト削減に寄与すると考えられている。我々は、ナノ DDS の有効性とその生体内での動態を解明することを目的に研究を実施している。

第一段階として、ミセル化ナノ粒子である NK012 の動注薬剤としての有用性について家兔肝腫瘍 VX2 モデルを用いて検討し、さらに生体内での代謝経路についてその動態について評価した。VX2 肝腫瘍モデルを用いて、動注群と静注群の 2 群を作成し、18 匹の日本白色兔を用いて NK012 とその代謝産物(活性体)である SN-38 の末梢血中濃度、腫瘍内、肝実質濃度を測定した。病理組織学的評価として、Hematoxylin and eosin(H&E)染色と TUNEL 染色を施行し、腫瘍のアポトーシスと壊死について評価した。末梢血中濃度は、投与後から 24 時間における AUC を測定したが両群で有意差を認めなかった。また、肝実質内濃度においても、両群において有意な差を認めなかった。一方、腫瘍内濃度は、投与 3 分後、2 時間後、24 時間のいずれにおいても動注群で有意に高い濃度を認めた。NK012 だけではなく、その代謝産物である SN-38 においても有意に高い濃度を示し、経時的に維持されていた。動態評価を行うために、NK012

を蛍光標識し組織内、腫瘍内での可視化を行い、投与後、経時的に腫瘍内から肝実質内のクッパー細胞に取り込まれていくことが示された。

組織学的評価としては、H&E 染色で腫瘍の壊死率を評価したところ、24 時間後において、静注群と比較して動注群で有意に高い壊死率を示した。また、壊死に先行して発生するとされるアポトーシスについては、投与後 2 時間後において、静注群では出現していなかったが、動注群においてはすでにアポトーシスを起こした細胞を確認することができた。この研究から、ナノ DDS は理論通りに腫瘍に選択的に流入し、正常組織においては、蓄積することなく代謝されることが判明した。さらにその代謝経路の一つとして、肝などのクッパー細胞経由での代謝が示された。腫瘍への選択性としての原理としては、以前から報告されている EPR 効果と呼ばれる現象が考えられる。EPR 効果とは、腫瘍の微小環境において、腫瘍の栄養血管内皮の未成熟性とリンパ系ドレナージ効果の欠損しており、この環境においてナノ粒子が選択的に蓄積するというものである。その未成熟血管の壁を通過することが、ナノ粒子では可能であり、さらに一旦腫瘍内に流入したナノ粒子は、リンパ系ドレナージ効果が欠損していることから腫瘍内に長時間留まることが可能となる。この効果を今回の研究で証明することができたと考えている。

第二段階として、大腸がんラット肝転移モデルにおけるナノ DDS 製剤の効果を検証している。NK012 の代謝産物は SN-38 であり、この薬剤は大腸がんを中心として、様々な消化器癌に有効であり、臨床の現場で使用されている。そのため、本研究では、臨床と同様に大腸がん細胞株を用いて、肝転移モデルを作成して、ナノ DDS の有効性について評価することを目的とした。

まずは、臨床で用いられている既存の抗がん剤（イリノテカン；SN-38 の前駆物質）とナノ DDS である NK012 の比較を行った。本研究で用いる大腸がん株である RCN-9 と両抗がん剤の感受性について評価した。両者ともに RCN-9 との感受性を示したが、新規抗がん剤においてその有用性が示唆された。次に F344 ラットの肝転移モデルを作成し、ナノ DDS である NK012 の動注群・静注群、イリノテカン動注群、コントロール群の 4 群を設定し、各群における腫瘍内、肝実質、末梢血の薬剤濃度を直後から 7 日目まで経時的に評価した。NK012 において、動注群では静注群に対して、経時的に全ての測定ポイントで腫瘍内濃度の高値を示した。一方、肝実質においては、両群において有意な差は認めなかった。転移性肝腫瘍においても、ナノ DDS は、腫瘍に選択的に流入し、その DDS の特殊性から腫瘍内に長時間停滞し、さらに正常肝細胞には停滞せず、代謝されることが示された。また、本薬剤の画像による可視化を試みるために、

NK012 の蛍光染色により、経時的なイメージングに成功し、その組織内量や組織内濃度が実測値と相関するイメージングが獲得できた。腫瘍壊死効果、新生血管の評価については、現在検証中である。腫瘍内濃度においては、前述したように、本研究において、NK012 において動注群で高い腫瘍内濃度を確認でき、経時的に維持していることを確認したが、投与後 3 時間の時点において両群の濃度差が最も近接することが確認された。これについては、EPR 効果とナノ DDS との関連性について追試を実施し、さらなる薬剤動態の解明に向けた取り組みを開始している。

最後に、MRI による分子イメージングであるが、これに関しては、MRI の適切なシーケンスの決定に難渋し、現時点ではまだ確立できていないため、予定の分子イメージングの確立には至っていないが、その代替法として、造影超音波を用いた分子イメージングに取り組んだ。現在、臨床で使用しているマイクロ粒子を用いた定量評価を実施することで、投与後早期のナノ DDS の動態の評価とクッパー相における定量的・定性的評価を実施することで、分子イメージング法の確立に着手している。

今後、これらの技術を引き続き継承・進歩させ、より臨床に近い条件でのナノ DDS の有効性評価とそのイメージング化に取り組み、臨床現場へ応用していく計画である。

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 2 件)

1. Nishiofuku H, et al. Intraarterial therapy using micellar nanoparticles incorporating SN-38 in a rabbit liver tumor model. J Vasc Interv Radiol. 2017 Mar;28(3):457-464.
2. Matsushima S, Nishiofuku H, et al. Equivalent cross-relaxation rate imaging and diffusion weighted imaging for early prediction of response to bevacizumab-containing treatment in colorectal liver metastases- preliminary study. Clin Imaging. 2017 ;41:1-6.

[学会発表](計 7 件)

1. Nishiofuku H, et al. Targeted intraarterial therapy using micellar nanoparticle incorporating SN-38 in a rabbit liver tumor model. JSIR & ISIR 2015 The Japanese Society of Interventional Radiology & International Japanese Society of Interventional Radiology
2. Nishiofuku H, et al. Novel intraarterial therapy using micellar

nanoparticle incorporating SN-38. SIR
2015 Society of Interventional Radiology

3. Nishiofuku H, et al. Technical
recommendations for intra-arterial
therapy in rat liver tumor model. RSNA 2014
Radiological Society of North America

〔図書〕(計1件)

1. 【IVR 医が知っておきたい動物実験の知識】IVR 医のためのラットを用いた動物実験の
基本. 西尾福英之, 以下3名省略。IVR:
Interventional Radiology 31 巻 1 号
Page13-17,2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 転移性肝癌治療薬及び転移性肝癌の治
療方法

発明者: 西尾福英之

権利者: 公立大学法人奈良県立医科大学、日
本化薬株式会社

種類: 公開特許公報(A)

番号: 特許、特願 2014-266233

出願年月日: 2014年12月26日

国内外の別: 国内

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.nara-radiology.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西尾福英之 (NISHIOFUKU, Hideyuki)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80458041

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

松島 秀 (MATSUSHIMA, Shgeru)

愛知県がんセンター・遺伝子医療研究部・

研究員

研究者番号: 70444297

(4)研究協力者

なし