

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820356

研究課題名(和文) 三次元培養系を用いたナノ粒子の固形がん浸透性評価と粒子構造の最適化

研究課題名(英文) Evaluation of tumor penetration ability of nanoparticles using 3D cell culture system toward particle design optimization

研究代表者

太田 誠一(Ohta, Seiichi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40723284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト胃がん細胞株MKN74を用い、モデル腫瘍としてがん細胞の3次元培養組織(スフェロイド)を作製した。抗がん剤シスプラチンを担持したヒアルロン酸のナノゲルをモデルナノ粒子として使用し、作製したスフェロイド中での浸透挙動を可視化することに成功した。ナノゲル化したヒアルロン酸は直鎖のものよりも著しく浸透性が高いことが分かり、薬物キャリアの形状制御の重要性が示唆された。さらに、反応拡散方程式を用いた粒子浸透の数値モデルを構築し、これが実験結果と概ね一致することを示した。

研究成果の概要(英文)：Multicellular 3D cancer spheroid was fabricated as a tumor model using MKN74 human gastric cancer cells. Penetration behavior of model nanoparticles, hyaluronan nanogels incorporating anti-cancer drug cisplatin, into tumor spheroid was successfully visualized. It was found that the penetration ability of hyaluronan nanogels was significantly higher than that of their linear analog, suggesting the importance of the shape of drug nanocarriers. Furthermore, a mathematical model based on reaction-diffusion equation was proposed to describe the penetration behavior of nanoparticles. The model calculation fitted the experimental results well.

研究分野：医用化学工学

キーワード：ナノ粒子 腫瘍浸透性 スフェロイド ヒアルロン酸 ナノゲル ドラッグデリバリー

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ粒子を用いた疾患の診断・治療が盛んに検討されている。中でもがんを標的としたものは一定の成果を挙げており、腫瘍組織内の血管透過性の亢進を利用した方法 (EPR 効果) や、抗体などのがん特異的リガンドを用いる方法など、ナノ粒子を腫瘍組織に選択的に集積させる技術が提案されてきた。これらの多くは血管を介して粒子を腫瘍まで送達するが、組織内部の血管の間隔は少なくとも 100  $\mu\text{m}$  以上あり、血管を出た後の粒子がこの距離を浸透することができず、粒子が到達できない領域が出来てしまうことが少なくない。しかし、固形がん内部への浸透性を向上させるための粒子設計の指針は確立されておらず、粒子の浸透機構自体についても、細胞外マトリックス (ECM) 中の粒子拡散と、細胞による能動的輸送のどちらが支配的かなど、見解が統一されていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん細胞の 3 次元培養組織 (スフェロイド) をモデル腫瘍として用い、ナノ粒子の腫瘍組織浸透の評価系を構築する。さらに、実験結果に基づいてナノ粒子の浸透挙動を数理モデル化し、粒子浸透機構の定式的理解を試みる。以上の検討により、固形がん浸透性を向上させるためのナノ粒子の材料設計指針を獲得することを目指す。

### 3. 研究の方法

ヒト胃がん細胞株 MKN74 を用い、共同研究者である東京大学 酒井康行教授の開発した PDMS 酸素透過性プレート (M. Shinohara et al: *Biotechnol. Prog.* 30 (2014) 178) を使用してスフェロイドを培養した。モデルナノ粒子として、蛍光分子が修飾され、抗がん剤であるシスプラチン (CDDP) が担持されたヒアルロン酸 (HA) の微粒子 (HA ナノゲル) を作製した。この HA ナノゲルの胃がんスフェロイド中での浸透挙動を、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

### 4. 研究成果

(1) がん細胞スフェロイドを用いたモデル腫瘍組織の構築

実験的検討の開始に先立ち、現在までに論文発表された医用ナノ粒子の腫瘍送達効率を、公開されている薬物動態データを元に網羅的に解析し、その年次変化や材料種の依存性などを調査した。結果を Fig. 1 に示す。ナノ粒子の腫瘍送達効率は、平均して投与量の 0.7% 程度でしかなく、その値は 2005 年から 10 年間でほぼ変化していないことが明らかとなった。またナノ粒子の材料や腫瘍への標的方法を変えても、送達効率は平均としてはほぼ同じであることも分かった【発表論文 1】。これらの結果から、ナノ粒子の腫瘍への送達技術はまだ改善の余地があり、材料設計

の更なる最適化が必要であることが示唆され、本研究の意義が明確となった。

続いて、MKN74 を用いて、がん細胞スフェロイドの作製を行った。結果を Fig. 2a に示す。直径 100  $\mu\text{m}$  程度のがん細胞スフェロイドが形成されていることが確認された。実際の腫瘍組織では、がん細胞に加え繊維芽細胞を始めとする間質系の細胞が存在し、これらが分泌する ECM が腫瘍微小環境の主要な因子の一つとなる。この環境をより忠実に再現するために、続けてマウス繊維芽細胞株 NIH/3T3 との共培養によるスフェロイドの作製を検討した。その結果、Fig. 2b に示すように、様々な共培養比でモデル腫瘍スフェロイドを作製することに成功した。

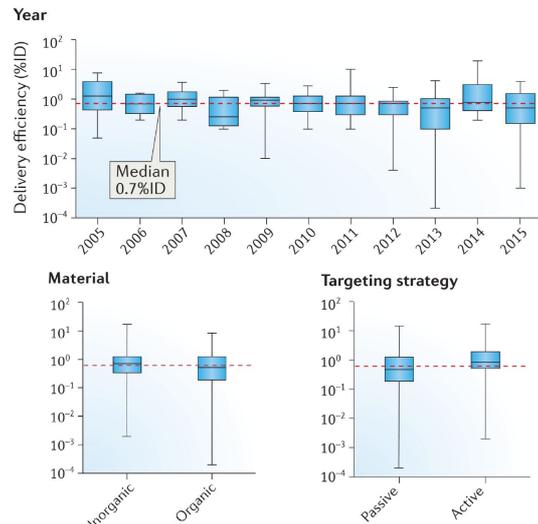


Fig. 1 薬物動態データから算出した、既報の医用ナノ粒子の腫瘍送達効率の年次推移および材料、標的方法による違い

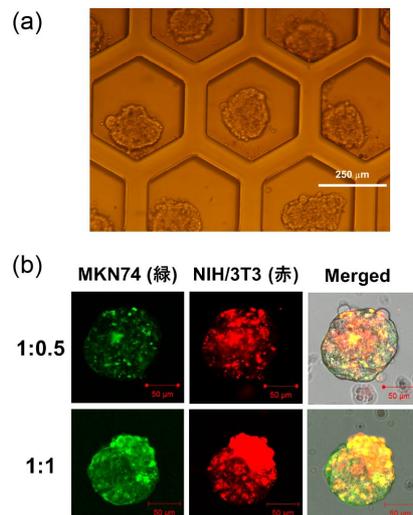


Fig. 2 (a) PDMS マイクロウェル上で培養された MKN74 スフェロイドの光学顕微鏡像。(b) 異なる共培養比で培養された MKN74 と NIH/3T3 の共培養スフェロイドの共焦点顕微鏡像。

## (2) HA ナノゲルの固形がん浸透性評価

以上で構築したモデル腫瘍組織を使用し、我々が開発を進めている CDDP 担持 HA ナノゲルの浸透性評価を行った。HA ナノゲルは、HA にキレート配位子を修飾し、これと白金系抗がん剤である CDDP が結合することにより、HA が分子内/間で架橋することで作製されたナノ粒子である。HA は多くのがん細胞に過剰発現している CD44 と特異的に結合する性質を持つため、がんを標的とした薬物キャリアとして期待される。HA ナノゲルと、同じ分子量を持つ直鎖の HA との間でスフェロイド中の浸透挙動を比較したところ、直鎖の HA ポリマーは十分に中まで浸透することが出来ず辺縁部に分布していたのに対し、HA ナノゲルはスフェロイドの中心部まで浸透していることが明らかとなった (Fig. 3) 【発表論文 2】。これは、直鎖の HA が架橋されてナノゲル化することで流体力学的半径が小さくなり、細胞間の ECM 中を拡散しやすくなったからだと考えられる。この結果は、同じ分子量の高分子キャリアを使用した場合でも、そのコンフォメーションによって腫瘍中への浸透性が大きく変わる可能性を示唆しており、粒子形状の制御の重要性を示すものと言える。

同様の浸透性の違いは、マウス腹膜播種モデルを用いた *in vivo* での実験でも確認されており、今回構築した評価系の有用性を裏付けている。

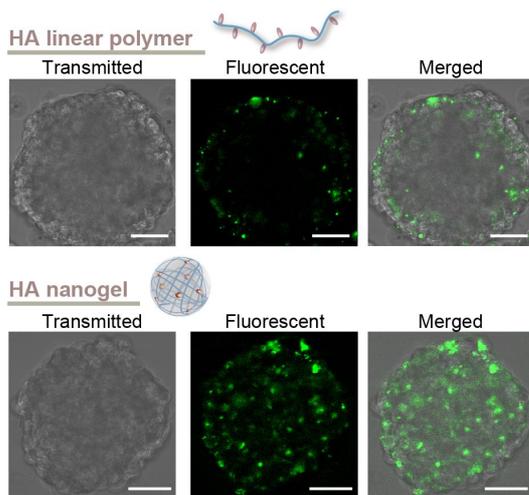


Fig. 3 直鎖の HA と HA ナノゲルの、MKN74 スフェロイド中での浸透性の比較。それぞれの材料をスフェロイドとインキュベートし、共焦点顕微鏡で観察を行った。スケールバー：50  $\mu\text{m}$ 。

## (3) ナノ粒子浸透挙動の数値モデル化

腫瘍組織中において、ナノ粒子はフィックの法則に従い、拡散によって ECM を浸透していくと考えられる。またその過程で、粒子ががん細胞表面の受容体と結合すると、エンドサイトーシスによって取り込まれ、そのうち

一部はエキソサイトーシスされて再び細胞外へと輸送される。これらの過程は、反応拡散方程式によって以下のように表すことが出来る。

$$\frac{dC}{dt} = \frac{1}{r^2} D \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{dC}{dr} \right) - \gamma(c) \quad (1)$$

ここで、 $C$  は腫瘍中のナノ粒子濃度である。また、 $\gamma(c)$  は細胞による取り込み項であり、我々はこれが表面受容体との一次反応の形で表現されることを以前に報告している (S. Ohta et al: *Biomaterials* 33 (2012) 4639)。この数値モデルを、実験で得られたナノ粒子のスフェロイド中での濃度分布の時間変化と比較した結果を Fig. 4 に示す。ナノ粒子の浸透深さが時間の経過と共に深くなっていく過程が示されており、計算結果と実験結果が概ね一致していることが確認された。今後、様々な物性のナノ粒子に今回構築した実験系と数値モデルを適用することで、粒子浸透においてどの過程が律速で、どこを改善すれば浸透性が向上するか、などの指針を得ることができると期待される。

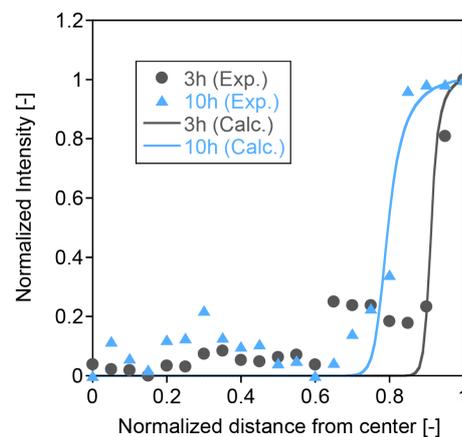


Fig. 4 粒子暴露 3 時間及び 5 時間後の、ナノ粒子のスフェロイド中での濃度分布。プロットと実線は、実験結果と数値モデルによる計算結果をそれぞれ表す。

## 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 2 件)

(1) S. Wilhelm, A. J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H. F. Dvorak, and W. C. W. Chan

"Analysis of nanoparticle delivery to tumours"

*Nature Reviews Materials* 1 (2016) 16014.

(2) S. Ohta, S. Hiramoto, Y. Amano, M. Sato, Y. Suzuki, M. Shinohara, S. Emoto, H. Yamaguchi, H. Ishigami, Y. Sakai, J.

Kitayama, and T. Ito  
"Production of Cisplatin-Incorporating  
Hyaluronan Nanogels via Chelating  
Ligand-Metal Coordination"  
*Bioconjug. Chem.* 27 (2016) 504-508.

〔学会発表〕(計 2件)

- (1) 天野由貴・太田誠一・篠原満利恵・酒井康  
行・伊藤大知

"スフェロイドモデルを用いたヒアルロン  
酸ナノゲルのがん組織浸透挙動の検討"  
第 37 回日本バイオマテリアル学会大会  
京都テルサ 2015 年 11 月 9-10 日

- (2) 天野由貴・太田誠一・篠原満利恵・酒井康  
行・伊藤大知

"シスプラチン内包ヒアルロン酸ナノゲル  
の抗腫瘍効果における細胞外マトリクス  
の影響"  
化学工学会第 81 年会 関西大学 千里山

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者

太田 誠一 (Ohta Seiichi)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40723284