

令和元年9月10日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03194

研究課題名(和文)放射線刺激と無機ナノ粒子の併用による放射線増感治療システムの提案

研究課題名(英文) Investigation of titanium peroxide nanoparticles for cancer therapy application

研究代表者

荻野 千秋 (Ogino, Chiaki)

神戸大学・工学研究科・教授

研究者番号：00313693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、PAATiOxの粒径は100 nmよりも20 nmの方が肝臓にトラップされにくく、腫瘍への集積率も高いことが示唆された。また、PAAよりもPEG修飾の方が肝臓へのトラップがされにくいことも示された。そこで今後は、PEG修飾PAATiOxに抗体を提示した粒子を作製し、血中滞留性や体内動態、標的腫瘍への集積率を評価していく必要がある。また、X線との複数回併用治療によって、優位な放射線増感効果が確認されたため、既存の治療法よりも効果的な治療プロトコルを検討することで、臨床への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の推進により、無機ナノ粒子と放射線治療を併用した新しいがん治療方法の構築が期待できる。これまでに、過酸化チタンナノ粒子による効果を確実にし、その分子レベルでの機序について解明を行ってきており、ほぼその機構を明らかにすることが出来た。更には、今年度、繰り返し照射を行う事で、根治的ながん治療効果が見出せたことで、より臨床サイドでの応用の可能性が高くなった。今後は、この成果をもとに、臨床応用に向けた展開を行っていく計画である。

研究成果の概要(英文)： In present study, the size of PAATiOx nanoparticle is effective for accumulation in tissue, and 20nm nanoparticle could not be trapped by the liver than at 100 nm, and its accumulation effect to the tumor is also high. It was also shown that PEG modification is less likely to be trapped in the liver than that by PAA modification. Therefore, in the future, it is necessary to antibody modified PEG-modified PAATiOx, and to evaluate retention effect in blood, pharmacokinetics, and accumulation rate into a target tumor. Moreover, since the dominant radiosensitization effect was confirmed by multiple combination treatment with X-rays irradiations, this clinical application can be expected by examining a treatment protocol with more effective than existing X-ray therapy strategy.

研究分野：人間医工学

キーワード：過酸化チタン 放射線照射 過酸化水素 活性酸素種 ナノ粒子 低侵襲治療システム ナノテクノロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

すい臓がんは、初期(ステージ0)で発見されることはほとんど無く、約8割はステージIVの最も進んだ状態で見ついている(日本膵臓学会膵がん登録20年総括)。通常、がん治療には外科的切除の後に化学治療や放射線治療が行われるが、すい臓がんと診断された7~8割は、発見時に既に切除手術の対象とならないほど進行している。その場合は根治を断念し、症状改善のみを目指した姑息的な処置として、抗がん剤による化学治療や放射線治療、またはその両者が行われる事が多い。しかし、すい臓がんは放射線に対する感受性が低く、効果が低いことが知られている。

近年では、放射線の代替療法として重粒子線や赤外線といった異なる物理エネルギー照射が盛んに研究されているが、放射線の長年蓄積された臨床的知見と比べると、それらが世間に広く浸透するにはまだ多くの問題が存在する。しかし、本研究で提案する「既存の放射線治療」と、「放射線の治療効果を増強する物質・薬剤」を組み合わせる“放射線増感治療”は、コスト面と安全面の両方の問題を比較的容易にクリアできると考えられる。

本研究で使用するナノ粒子「過酸化チタンナノ粒子」は、放射線照射によりラジカルを生成することを見出しており、すでに特許も成立している(国内:P2012-500638, 国際:US8580312 B2, CN102781472 B)。また、この過酸化チタンナノ粒子(PAATiOx)の局所投与とX線照射を併用した治療によって、マウスに移植したヒトすい臓がんに対して抗腫瘍効果を示すことにも成功している(図1)。課題としては、このナノ粒子を静脈投与によって腫瘍に集積させることが挙げられる。

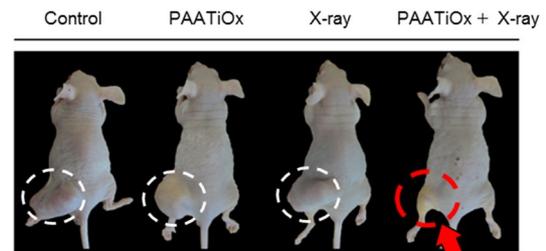


図1. 過酸化チタンナノ粒子(PAATiOx)の局所投与とX線の抗腫瘍効果

2. 研究の目的

本研究の目的は、「既存の放射線治療」・放射線増感作用のある「ナノ粒子」・「ドラッグデリバリーシステム」を融合させることで、すい臓がんなどの放射線低感受性組織を標的とした革新的な治療技術を開発することにある。近い将来に本手法を臨床試験へ展開するためには、まず、このナノ粒子自体が腫瘍へ効果的に集積しなければならない。そのために、粒径によるEPR(enhanced permeability and retention)効果の影響を検討し、腫瘍への集積率が高い最適なサイズの粒子を生成する。また、局所注射の場合には腫瘍からの拡散を抑え、静脈注射の場合には標的のがん細胞に特異的に結合することが望まれる。それを可能にするために、標的のがん細胞への結合能力を有する細胞標的低分子抗体を表面修飾した無機/有機ハイブリッドナノ粒子を開発する。

3. 研究の方法

1. 粒子の投与量による体内分布及び放射線併用治療の評価

これまでの研究で、マウスの尾静脈から投与したPAATiOxがEPR効果によって腫瘍に集積することを確認している(data not shown)。しかしながらその集積率は低く、数%程度であった。そのため、腫瘍への集積率を向上させることで効果的な治療を目指す必要がある。まず、粒子の投与量を増加させることで、腫瘍への集積量も向上するかを確認した。

2. 粒径による体内分布への影響

次に、PAATiOx粒子の大きさによる体内分布への影響を評価した。EPR効果は腫瘍の新生血管にみられる細孔から粒子が浸透していく受動的な取り込み機構であるため、粒径が小さい方が有利であると考えた。そこで、100nmの粒径をもつ従来のPAATiOx(STS01)と20nmのPAATiOx(STS01)粒子の体内分布を比較した。

3. 抗体修飾粒子の体内分布への影響

より効果的な治療方法とするためには、腫瘍へ到達した粒子をがん細胞に結合させ、その場に留まらせることが必要である。がん細胞と空間的に近接することでX線増感治療の効果が向上し、長く留まることで効果の持続や治療回数の削減が期待できる。そこで、PAATiOxにがん細胞への結合能力を付与するため低分子抗体を表面修飾した。用いた低分子抗体はすい臓がんをはじめとする多くのがん細胞の表面に発現している上皮増殖因子受容体(EGFR)を認識するラクダ抗体由来のanti-EGFR VHHである。このanti-EGFR/PAATiOx粒子が標的の腫瘍において長く滞留するかどうかを体内分布の経時変化で評価した。

4. 血中滞留性の向上を目的とした粒子の体内分布

これまでTiOxを水分散させるためにポリアクリル酸(PAA)を表面修飾していたが、肝臓への取り込みが多いため、他のナノ粒子で血中滞留性の向上が報告されているポリエチレングリコール(PEG)による表面修飾粒子を試みた。PEG2000を表面修飾したPEG-TiOx(粒径約100nm)を作製し、同程度の粒径を持つPAATiOx(STS01)(粒径約100nm)と体内分布を比較した。

5. 複数回照射の検討

体内分布の検討によって尾静脈投与後 1 時間で腫瘍への集積率が最大になることが示唆された。そこで、このタイミングで X 線照射を行って抗腫瘍効果を評価した。また、実際の治療を視野に入れて、1 週間後に同様に粒子の投与と X 線照射を行う複数回照射実験も行った。さらに、粒子による治療の効果を評価するため、抗がん剤ゲムシタピン (GEM) との効果と比較した。

4. 研究成果

1. 粒子の投与量による体内分布及び放射線併用治療の評価

図 2A に示すように、これまで検討してきた 10 mg/mL より多い 25 mg/mL や 40 mg/mL では腫瘍への集積量が多くなることが示された。また、粒子を尾静脈投与して 1 時間後に 5 Gy の X 線を照射し、腫瘍体積の変化を測定した結果 (図 2B) 25 mg/mL や 40 mg/mL 投与した場合に 10 mg/mL より優れた抗腫瘍効果が見られた。しかしながら、投与量に応じて肝臓への集積量増加も確認された (data not shown)。この結果、投与量を増加させることで腫瘍への集積量と抗腫瘍効果の向上も期待できるが、肝臓への負担が大きいため、投与量を変えずに腫瘍への集積率を向上させる手法が必要である。

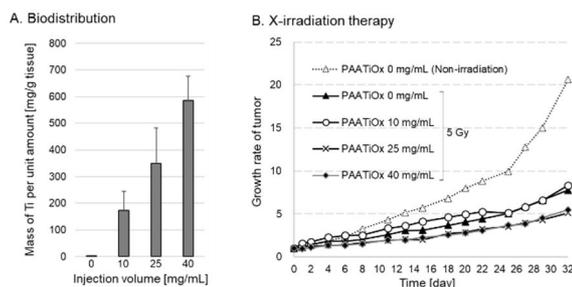


図 2. 粒子の投与量による影響 (A) 腫瘍への集積量 (B) X 線併用治療による抗腫瘍効果

2. 粒子径による体内分布への影響

1 時間後において 20 nm の粒子の腫瘍への集積率が高くなったが、優位な差は認められなかった (図 3)。また、肝臓への集積に関して大きな差は見られなかった。そこで、最も集積率が高い 1 時間後辺りでの経時変化を細かく調べると同時に、マウスに担癌する細胞腫の違いによる影響も評価した (図 4)。その結果、BxPC3 細胞株で作製した担癌にはどちらの粒子もほとんど集積しなかった。一方、これまでの上記の実験でも使用していた MIA PaCa2 細胞株の方では、20 nm の粒子を尾静脈投与した 1 時間後に腫瘍に最も集積していることが確認された。また、この 20 nm の粒子は 30 分後に肝臓に集積している割合が低いことから、血中滞留性が高いことが示唆された。これにより、肝臓にトラップされずに腫瘍へ到達する割合が増えたことが考えられる。

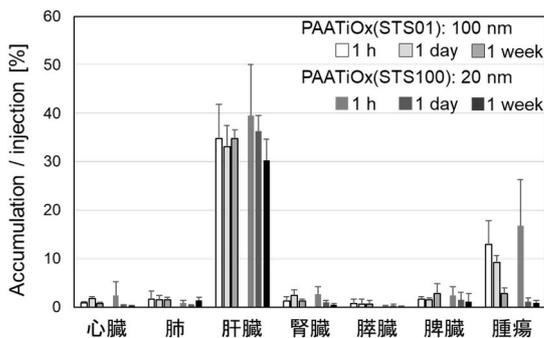


図 3. 粒子径による体内分布への影響

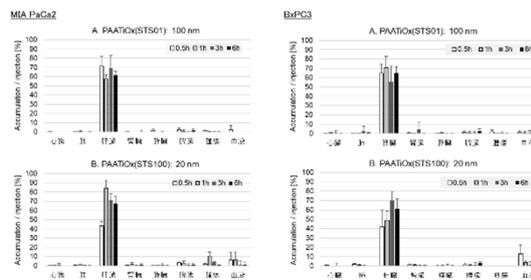


図 4. 細胞株 (MIA PaCa2、BxPC3) または粒子径による体内分布への影響

3. 抗体修飾粒子の体内分布への影響

肝臓へのトラップは抑制されたものの、腫瘍での滞留性の向上は見られなかった。その理由として、担癌に用いた細胞株 MIA PaCa2 の EGFR 発現量が比較的少なかったことが考えられる。そのため、本実験は EGFR 高発現の細胞株による再評価が必要である (図 5)。

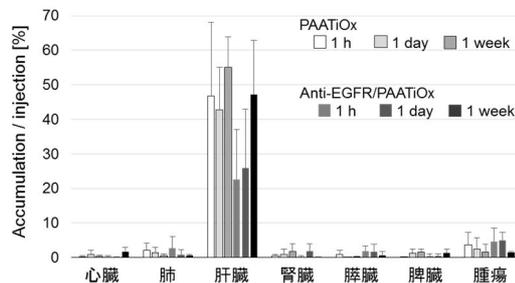


図 5. Anti-EGFR 標識粒子における体内分布

4. 血中滞留性の向上を目的とした粒子の体内分布

PEG2000 を表面修飾した PEG-TiOx (粒径約 100 nm) を作製し、同程度の粒径を持つ PAATiOx(STS01) (粒径約 100 nm) と体内分布を比較した結果、肝臓への取り込みが約半分ほどに減少した (図 6)。しかしながら、腫瘍への集積量はほとんど変化がなかった (data not shown)。粒径は同程度であり、肝臓へのトラップが少ないため、血中滞留性が向上していることは考えら

れるが、腫瘍への集積量に影響がない理由は不明である。現在、他の臓器への集積量を測定し、粒子の体内動態を評価中である。

5. 複数回照射の検討

1回目の投与から3週間後(22日目)の結果を図7に示す。1回投与してX線未照射の群では、コントロールのリン酸緩衝液(PBS)と比較して、PAATiOxもGEMの投与も変化がなかった。1回投与してX線を照射した群では、PBSと比較してどちらの群も腫瘍の増殖が抑えられている様子が観察された。さらに、1週間後に2回目の投与とX線照射を行った群では、PAATiOxとGEMの投与においてほとんど腫瘍が見えなかった。つまり、X線を2回照射するだけでは治療できなかった腫瘍がPAATiOxを併用することで治療可能なことが示唆された。また、その効果は抗がん剤と同程度以上であったことから、安全性や副作用を評価していくことで今後の応用が期待できる。

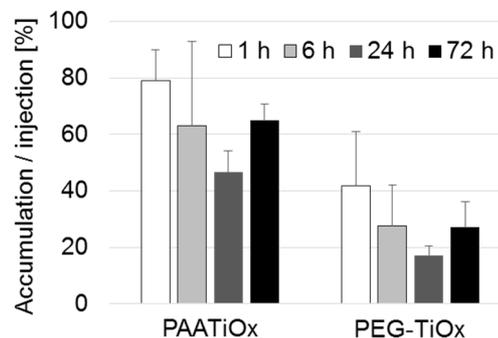


図6. PEG修飾粒子における肝臓への集積量

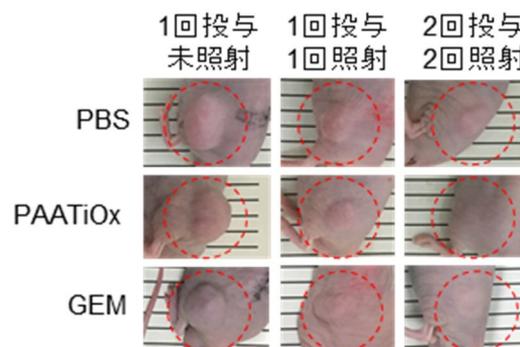


図7. 単回照射治療と複数回照射治療による抗腫瘍効果への影響(線間隔5mm)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Morita K, Suzuki T, Nishimura Y, Matsumoto K, Numako C, Sato K, Nakayama M, Sasaki R, Ogino C, Kondo A. In vivo tissue distribution and safety of polyacrylic acid-modified titanium peroxide nanoparticles as novel radiosensitizers. J Biosci Bioeng. 126(1) 119-125. (2018)

[図書](計1件)

Morita, K., Nishimura, Y., Suzuki, T., Ogino, C., Kondo, A. A cancer treatment strategy that combines the use of inorganic/biocomplex nanoparticles with conventional radiation therapy, Nanoparticle Technology Handbook, Category A - Medical, Cosmetic, Biological, 439-443 (2018)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 佐々木 良平

ローマ字氏名: SASAKI, Ryouhei

所属研究機関名: 神戸大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 教授

研究者番号(8桁): 30346267

研究分担者氏名: 中山 雅央

ローマ字氏名: NAKAYAM, Masao

所属研究機関名: 神戸大学

部局名: 医学研究科

職名: 医学研究員

研究者番号(8桁): 60582004

研究分担者氏名：沼子 千弥
ローマ字氏名：NUMAKO, Chiya
所属研究機関名：千葉大学
部局名：大学院理学研究院
職名：准教授
研究者番号(8桁): 80284280

研究分担者氏名：西村 勇哉
ローマ字氏名：NISHIMURA, Yuya
所属研究機関名：神戸大学
部局名：科学技術イノベーション研究科
職名：部局研究員
研究者番号(8桁): 40728218

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。