

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03976

研究課題名(和文) 微弱電流によるナノ粒子の腫瘍内浸透・細胞取込み亢進による革新的がん治療技術の確立

研究課題名(英文) Development of innovative cancer treatment technology by enhancing intratumoral penetration and cellular uptake of nanoparticles by weak electric current

研究代表者

小暮 健太郎 (KOGURE, Kentaro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：70262540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イオントフォレシス(IP)によるナノ粒子のEPR効果亢進と細胞内取込誘導による効率的ながん治療法の確立を目的とした。担癌マウスに静脈投与したナノ粒子の腫瘍蓄積量を、IPにより約2倍増加させることに成功した。またFITC標識デキストランの発育鶏卵血管漏出が、IPにより約2倍増大することを見出した。また、腫瘍組織IPによるコネクシンCx43の発現量減少とリン酸化の亢進、Hsp90タンパク質活性化を介したGTPase活性化、ユニークなエンドサイトーシス誘起を見出した。また、IPと抗がんナノ粒子を組み合わせた場合、ナノ粒子投与単独よりも腫瘍成長が抑制される傾向を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微弱電流を用いる薬物送達技術イオントフォレシスによって、腫瘍組織の生理機能を変化させることで、ナノ粒子等の薬物送達効率を向上させることに成功したことは、世界で初めての成果であり、がん治療薬物領域の発展に大きく貢献するものである。また、近年ヒトのがんでは、EPR効果が見られないとも言われているが、イオントフォレシスを組み合わせることでEPR効果を誘起することが可能になり、がん治療効果の増強に繋がることから、国民の健康福祉に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish an efficient cancer treatment method by enhancing the EPR effect and inducing intracellular uptake of nanoparticles by iontophoresis (IP). We succeeded in increasing the tumor accumulation of nanoparticles administered intravenously to tumor-bearing mice by about 2 times by IP. We also found that IP increased FITC-labeled dextran leakage in embryonic chicken eggs by about 2-fold. We also found that tumor tissue IP reduced the expression level of connexin Cx43 and promoted phosphorylation, activated GTPase through Hsp90 protein activation, and induced unique endocytosis. In addition, the combination of IP and anti-cancer nanoparticles tended to suppress tumor growth more than administration of nanoparticles alone.

研究分野：薬物送達

キーワード：ドラッグデリバリー 微弱電流 ナノ粒子 がん治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子は、がん治療のための有効なツールとして近年注目され、多くの研究者が開発に取り組んでいる。なぜなら、腫瘍組織は血管透過性と滞留性が亢進しているため、高分子やナノ粒子が蓄積しやすい特性 (EPR 効果) を有しており、この EPR 効果が世界標準のがん治療 DDS 戦略となっているためである。血液中に投与したナノ粒子は、EPR 効果によって腫瘍に蓄積する。抗がん剤を封入したナノ粒子であれば、腫瘍組織近傍まで到達すれば、抗がん剤が粒子から放出されることで抗腫瘍効果が発揮される。しかし、低分子抗がん剤は副作用が懸念されるため、特異性の高い治療薬が望まれている。近年、siRNA や shRNA 発現プラスミド DNA などの核酸医薬品が、特異性の高いがん治療ツールとして注目されている。それら核酸医薬の腫瘍送達キャリアーとして、様々なナノ粒子の開発・改良が進められている。しかし、腫瘍組織では、ナノ粒子は容易に内部に浸透できない。最近の報告では、30nm のナノ粒子は浸透できるが、70nm のナノ粒子は浸透し難いことが見出されている。この場合のナノ粒子は抗がん剤を封入したものであるが、もし siRNA 等の場合には、30nm のサイズに収めることは、困難である。そのため、核酸医薬等の次世代抗がん剤を封入したナノ粒子は、低分子抗がん剤封入ナノ粒子に比べて、腫瘍内への浸透が困難である点が問題であった。

2. 研究の目的

研究代表者は「従来は、キャリアーの改良のみに焦点が当てられてきたが、標的となる腫瘍の状態をナノ粒子が浸透できるように変化させればよいのではないかと考えた。これまでに研究代表者は、微弱電流 (0.3 ~ 0.5 mA/cm²) による経皮送達技術であるイオントフォレシス (IP) に着目し、ナノ粒子や核酸医薬などの皮内送達技術を確立した。さらにメカニズム解析の結果から、in vivo での微弱電流処理によって皮膚細胞のシグナル伝達が活性化され、組織間隙が開裂すること、細胞外物質の細胞内取り込みがエンドサイトーシスによること、分子量 10,000 以上の物質が取り込み直後に細胞質まで到達すること、などを発見した。さらに、微弱電流処理時の細胞質送達量は、汎用トランスフェクション試薬による細胞質送達量の約 3 倍であることを見出し、微弱電流処理が細胞質送達を増大させることを明らかにしていた。この現象は、皮膚以外の組織の細胞でも誘起される可能性を見出していた。すなわち、研究代表者は、微弱電流処理が組織と細胞の生理を変化させる革新的な薬物送達技術であると考えている。これらのことから、前述の問題点であるナノ粒子の腫瘍内浸透と細胞内取り込みが微弱電流処理によって大きく改善することが期待された。さらには、微弱電流処理によって腫瘍血管の細胞間隙も開裂することが予想され、それによって EPR 効果が亢進することで飛躍的にナノ粒子の腫瘍蓄積量が増大することも期待された。これまでの実績に基づき、本研究では、腫瘍組織の微弱電流処理により、ナノ粒子の腫瘍内浸透を亢進するとともに、がん細胞内への取り込みを増進させることで従来のナノ粒子 DDS における問題点を解決し、革新的ながん治療技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子の腫瘍内浸透の検証と条件の最適化: マウス黒色腫瘍メラノーマ B16-F1 細胞を培養し、 1×10^6 cells/ml の濃度でマウス背部皮膚下に注射することで、担癌マウスを作成した。担がんマウスの腫瘍径が 1000 mm³ 程度になった後、蛍光標識化したナノ粒子 (ポリエチレングリコール修飾リポソーム) 懸濁液を担癌マウス尾静脈から投与し、腫瘍部位表面の皮膚に電極 (Ag/AgCl: ヒト心電図検査用電極シート) を貼り付け、イオントフォレシス (IP) (0.34mA/cm²) を 1 時間実施した。IP 処理後、腫瘍を採取し、凍結切片について共焦点レーザー顕微鏡により腫瘍内におけるナノ粒子の動態を評価した。評価結果に基づき、ナノ粒子投与と IP の実施タイミング等について検討することで、最適条件を見出した。

(2) IP による腫瘍組織間隙開裂の評価: 担癌マウスに IP 処理を行った後、腫瘍組織を採取し、組織切片を作成した。1 次抗体として抗コネキシンタンパク質 CX43 抗体、抗リン酸化 CX43 抗体を、2 次抗体として蛍光標識化抗体を用いて腫瘍組織切片を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡観察により腫瘍組織間隙開裂評価した。

(3) 血管透過性増大の検証: 当初、担癌マウスの腫瘍を用いて血管透過性増大を検討する計画であったが、困難であったため、血管の観察が容易である発育鶏卵を用いた。発育鶏卵の卵殻にグラインダーを用いて窓を作り、血管が見れるようにした後、FITC 標識デキストラン (分子量 10,000) 等を静脈内注射によって血管内に投与した。その後、Ag/AgCl 電極 2 枚を用いて発育鶏卵に微弱電流処理 (0.34mA/cm², 1 時間) を行った。一定時間後に漿尿液を回収し、蛍光強度を測定することで、FITC 標識デキストランの血管からの漏出を評価した。また、血管を回収し、凍結切片とした後に、共焦点レーザー顕微鏡観察を行うことで、血管壁内への FITC 標識デキストランの浸透を検証した。

(4) 抗がんナノ粒子送達による腫瘍成長抑制効果の検証: 担癌マウスに、抗がん効果のあるトコフェロールコハク酸を含有したナノ粒子を静脈内投与した後、IP 処理を行った。一定期間、腫瘍径と体重変化を経的に追跡測定した。また、蛍光標識化した抗がんナノ粒子を担癌マウスに静脈内投与した後、IP 処理を行い、回収した腫瘍組織の凍結切片について共焦点レーザー顕微鏡観察を行うことで、抗がんナノ粒子の腫瘍内送達を検証した。

4. 研究成果

(1) ナノ粒子の腫瘍内浸透の検証と条件の最適化：イオントフォレシス (IP) によるナノ粒子の腫瘍内奥への効率よい浸透達成のため、蛍光標識化ナノ粒子を担癌マウスの尾静脈から投与し、IP 処理後に回収した腫瘍組織の凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、腫瘍内にナノ粒子が送達されていることを確認した。IP とナノ粒子投与のタイミングの最適化を経て、IP による腫瘍内へのナノ粒子の浸透性の定量的評価を画像解析ソフト ImageJ を用いて行った結果、通常の EPR 効果による腫瘍内へのナノ粒子蓄積量と比較して、IP 処理によって腫瘍組織間隙を開裂した場合には、約 2 倍量のナノ粒子が腫瘍内に送達されることを明らかにした (論文投稿準備中)。

(2) IP による腫瘍組織間隙開裂の評価：腫瘍組織の IP によって、細胞間隙構成タンパク質である Gap Junction 構成タンパク質コネキシン Cx43 の発現量減少とリン酸化の亢進を確認することに成功した (論文投稿準備中)。さらに、微弱電流処理が細胞レベルで Hsp90 タンパク質活性化を介して GTPase を活性化すること (Sci. Rep. 2019)、また微弱電流によってチューブ状のユニークなエンドサイトーシスが誘起されること (Int. J. Pharm. 2020) を見出した。

(3) 血管透過性増大の検証：血管透過性増大の評価に関して、発育鶏卵を用いた微弱電流処理による血管透過性亢進の定量的評価系を構築した。発育鶏卵静脈内に投与した蛍光標識化高分子物質が、微弱電流処理によって血管外へ漏出することを世界で初めて見出した。定量的評価によって、微弱電流処理により分子量 10,000 の FITC 標識デキストランの血管漏出が約 2 倍増大することが明らかとなった。また、微弱電流処理後の血管壁中に FITC 標識デキストランが浸透している様子が観察されたことから、微弱電流処理によって高分子が血管細胞層に浸透することで血管外に漏出したことが示唆された (論文投稿中)。

(4) 抗がんナノ粒子送達による腫瘍成長抑制効果の検証：抗がんナノ粒子を用いたがん治療効果検討のため、抗がん作用を有するトコフェロールコハク酸を含有させたナノ粒子を用い、腫瘍成長抑制効果を検討した結果、実験動物の個体差が大きかったため有意な差を観察するには至らなかったが、IP と抗がんナノ粒子を組合わせた場合には、抗がんナノ粒子投与単独の場合よりも腫瘍成長が抑制されている傾向が認められた (論文投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Hasan M, Hama S, Kogure K. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Low Electric Treatment activates Rho GTPase via Heat Shock Protein 90 and Protein Kinase C for Intracellular Delivery of siRNA. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40904-z | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Torao T, Mimura M, Oshima Y, Fujikawa K, Hasan M, Shimokawa T, Yamazaki N, Ando H, Ishida T, Fukuta T, Tanaka T, Kogure K | 4. 巻 576 |
| 2. 論文標題 Characteristics of unique endocytosis induced by weak current for cytoplasmic drug delivery | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Int J Pharm | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2019.119010 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中谷奈津, 福田達也, 小暮健太郎 |
| 2. 発表標題 発育鶏卵を用いた微弱電流処理による血管透過性亢進の検討 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第140年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mimura M, Khatun A, Natatani N, Fukuta T, Kogure K. |
| 2. 発表標題 Acceleration of the enhanced permeability and retention effect for delivery of nanoparticles by treatment with weak current. |
| 3. 学会等名 Liposome Research Days 2019（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小暮健太郎 |
| 2. 発表標題 微弱電流を用いた核酸医薬送達 |
| 3. 学会等名 日本核酸医薬学会DDS部会主催合同サテライトシンポジウム2019 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kogure K |
| 2. 発表標題 Weak Current-mediated delivery of liposomes |
| 3. 学会等名 Liposome Research Days 2019 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 福田達也, 虎尾 祐, 三村美夕紀, 大島康史, 中谷奈津, 田中 保, 小暮健太郎 |
| 2. 発表標題 微弱電流による特殊なエンドサイトーシスを利用した高分子送達の機構解析 |
| 3. 学会等名 第18回遺伝子・デリバリー研究会第18回夏期セミナー |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hasan M, Hama S, Kogure K |
| 2. 発表標題 Mechanistic study of faint electric treatment mediated cytoplasmic delivery of siRNA |
| 3. 学会等名 第40回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小暮健太郎、藤川昂樹、Mahadi Hasan、濱 進、田中 保、田良島典子、南川典昭 |
| 2. 発表標題 微弱電流による新規核酸 iRed の細胞内送達と遺伝子発現制御 |
| 3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第 17 回シンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 小暮健太郎 |
| 2. 発表標題 微弱電流によるナノ粒子の皮内デリバリー |
| 3. 学会等名 第 35 回物性物理化学研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kogure K, Tarashima N, Fujikawa K, Oshima Y, Torao T, Mimura M, Hasan M, Hama S, Tanaka T, Saito H, Minakawa N |
| 2. 発表標題 Effective cellular delivery of intelligent shRNA expression device by faint electricity |
| 3. 学会等名 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kogure K, Kigasawa K, Hama S, Kajimoto K |
| 2. 発表標題 Transdermal delivery of liposomes encapsulating functional proteins by iontophoresis |
| 3. 学会等名 ILS/LRD Liposome Advances Combined Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小暮健太郎、賀川真夕子、大島康史、虎尾 祐、三村美夕紀、福田達也、Hasan Mahadi、濱 進、田中 保 |
| 2. 発表標題 微弱電流による核酸医薬の細胞内送達 |
| 3. 学会等名 第26回DDSカンファランス |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小暮健太郎、大島康史、虎尾 祐、三村美夕紀、藤川昂樹、Mahadi Hasan、濱 進、福田達也、田良島典子、田中 保、南川典昭 |
| 2. 発表標題 微弱電流処理による高分子医薬の細胞質送達と機能発現 |
| 3. 学会等名 第39回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大島康史、Mahadi Hasan、田良島典子、濱 進、福田達也、田中 保、南川典昭、小暮健太郎 |
| 2. 発表標題 微弱電流処理を利用した機能性核酸の細胞内取り込みの検討 |
| 3. 学会等名 日本薬学会138年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|---|--|----|
| 研究 分担者 | 南川 典昭 (MINAKAWA Noriaki) (40209820) | 徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授 (16101) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究 分 担 者 | 田中 保 (TANAKA Tamotsu) (90258301) | 徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学 域）・教授 (16101) | |