

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06489

研究課題名（和文）胸部悪性疾患に対する腫瘍特異的細径ナノ粒子を用いた光線力学的治療法の確立

研究課題名（英文）Development of photodynamic therapy using tumor-specific small-sized nanoparticle for thoracic malignancy

研究代表者

加藤 達哉（Kato, Tatsuya）

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：20624232

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：光線力学的療法（PDT）は癌細胞に集積する光感受性物質にレーザー照射し、活性酸素の酸化作用により腫瘍を変性壊死させる。本研究は光感受性物質タラポルフィン（以下NPe6）をナノ粒子へ含有し、腫瘍の深部へ高濃度でNPe6を到達させることをその目的とした。完成したナノ粒子を電子顕微鏡にて観察、粒子径を確認した。細胞株を用いたFlow cytometryと蛍光顕微鏡を用いた解析で、ナノ粒子封入NPe6はがん細胞内への取り込みが優位に亢進していることが示され、さらにナノ粒子にがん細胞特異的な葉酸リガンドを付加することでさらなる取り込み増強が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでのPDT治療の問題点であった光感受性物質の腫瘍深部への輸送および周囲の正常組織へのダメージといった問題点を克服できる可能性がある。すなわち、光感受性物質を腫瘍特異的なナノ粒子へ封入し、腫瘍深部へ高濃度かつ均等に光感受性物質を到達させることでレーザー治療効果の増強し、かつナノ粒子の腫瘍に対する選択性をあげることで周囲の正常組織へのダメージを減らせることができると期待される。

研究成果の概要（英文）：Photodynamic therapy (PDT) irradiates a photosensitizer that accumulates in cancer cells with laser light and causes degenerative necrosis of the tumor by the oxidative action of reactive oxygen species. The purpose of this study was to encapsulate the photosensitizer talaporfin (NPe6) in nanoparticles and to reach the deep part of the tumor with high concentration of NPe6. This novel nanoparticle was observed with an electron microscope to observe the structure of the nanoparticle and to confirm the particle size. Flow cytometry and fluorescence microscopic analyses using lung cancer and mesothelioma cell lines showed that nanoparticle with encapsulated NPe6 enhanced the uptake into cancer cells significantly. It was also confirmed that the uptake was enhanced by adding folic acid as a ligand.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：光線力学的療法 ナノ粒子 肺癌 悪性胸膜中皮腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

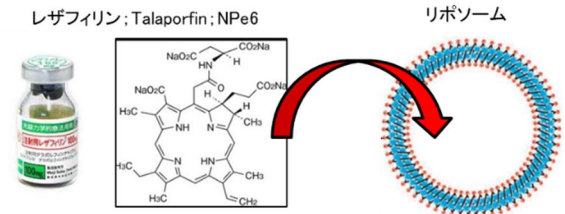
1. 研究開始当初の背景

これまで光線力学的治療法 (photodynamic therapy (以下 PDT)) は、光感受性物質の腫瘍深部への輸送、励起光の深部への到達といった観点から、腫瘍組織が外部ないし管腔に露出した 1cm 以下の病変においてのみ行われてきた。Drug Delivery System が注目される中で、ナノ粒子を用いた腫瘍選択的な薬剤の送達を目指した DDS は薬剤の有効性と安全性を高めるために有用である。光感受性物質を高濃度で封入し、腫瘍選択性のあるリガンドを付けることで腫瘍特異性と有効性を増すことができる新規細径ナノ粒子の開発は、従来の PDT の欠点を補う上で重要であると考えた。本研究は PDT 治療を目的とした腫瘍特異的に集積する小径ナノ粒子を開発し、低侵襲治療を目指し内視鏡を用いた胸部悪性疾患に対する PDT 治療適応拡大を試みるものであり、有用な治療選択肢の一つとなり得るものと期待された。

2. 研究の目的

(1) 腫瘍特異性のある新規小径ナノ粒子の開発

第 2 世代光感受性物質であるタラポルフィン [mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6)、商品名レザフィリン] は、第 1 世代ポルフィリンより治療として用いる波長が高いため、より深部まで治療できることが期待されたが、腫瘍深部へのデリバリーの限界値、腫瘍選択性の問題は未解決のままであり、周囲組織に付随的損傷が起こる可能性がある。我々はこのタラポルフィンをナノ粒子に packing し、腫瘍特異性を上げるためリガンドを結合させ、PDT 治療を目的とした癌特異的な新規小径ナノ粒子開発を目指した。



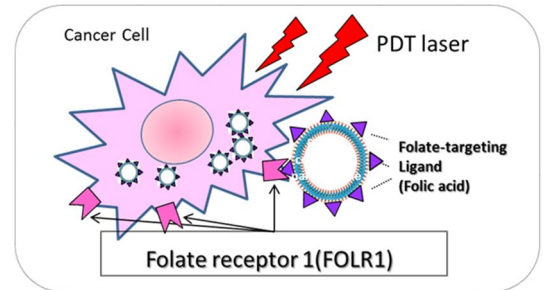
(2) 内視鏡を用いた胸部悪性疾患に対する PDT 治療の臨床応用拡大

これまで超音波内視鏡は転移リンパ節、末梢肺癌の「診断法」として使用されてきたが、我々は内視鏡下にレーザー治療を行うことで「治療法」として応用することを目指し、レーザーの開発を同時に推進した。

3. 研究の方法

(1) 胸部悪性腫瘍に対する PDT 治療のための新規小径ナノ粒子の開発

共同研究先である北海道大学薬学研究院薬剤分子設計学教室の協力によりタラポルフィンを封入した腫瘍特異的な細径ナノ粒子の開発を目指した。タラポルフィンは励起効率が高く、正常組織から早く排泄される特性をもち、また光線過敏症等の副作用も少ない。光感受性物質の吸収効率として最も生体由来組織の影響が少ない励起波長は 650 ~ 700nm 近辺が理想とされるが、タラポルフィンは長波長領域での吸収帯 (波長: 664 nm) を有する。まず水溶性であるタラポルフィンをリポソームの内水相に封入した小径ナノ粒子を開発し、完成した新規ナノ粒子を電子顕微鏡にて観察した。続いて腫瘍特異性を高めるため葉酸を付加した新規ナノ粒子の開発を行った。レーザー装置はタラポルフィンの至適励起波長 664 nm を出力できる装置の開発を行う予定とした。



(2) リガンド付加新規ナノ粒子の腫瘍細胞特異的な集積の確認

これまでの我々の検討で、ヒト肺癌細胞株 H460、H520、ヒト MPM 細胞株 H28、H2052 は葉酸受容体 FOLR1 を高発現していることが分かっている。これらの細胞株を用いてフローサイトメトリー、共焦点顕微鏡により新規ナノ粒子の細胞内への取り込みを確認した。

(3) ヒト肺癌、悪性胸膜中皮腫細胞株を用いた PDT レーザー治療効果の確認

同様の細胞株を用いて PDT レーザーを照射し (total dose は 5-10 J cm⁻² 程度) 24 時間後に殺細胞効果を Cell viability assay (MTT assay) を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) タラポルフィン封入新規ナノ粒子の開発

本研究の核となるタラポルフィン (NPe6) を含有した新規ナノ粒子の開発を行った。完成した新規ナノ粒子を電子顕微鏡にて微細構造を観察し、粒子径分布解析を行い、径が約 60-100nm 程度であることを確認した (図 1)。

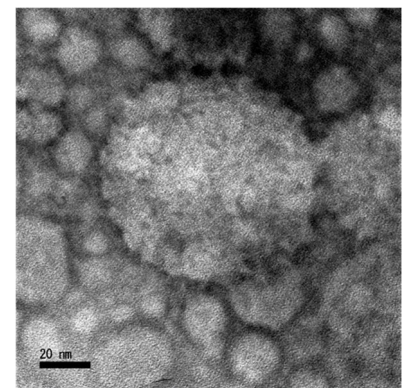


図 1 タラポルフィン (NPe6) 封入ナノ粒子の電子顕微鏡写真

(2) 新規ナノ粒子の腫瘍細胞への集積の確認

次に、肺癌細胞株 (A549)、悪性胸膜中皮腫細胞株 (H2052、H2452、H28、H226、211H) を用いて新規ナノ粒子のがん細胞への集積の検討を行った。フローサイトメトリーを用いた解析では、各細胞株に NPe6 単独群とナノパーティクル封入 NPe6 群 (以後 Nano-NPe6 群) を 0、3、1、0 μg/ml の濃度で導入し、それぞれの細胞への集積を検討した。いずれの細胞においても NPe6 単独群では非投与群と比較してほとんど波形に変化を認めなかったが、Nano-NPe6 群では著明な右方移動を示し、NPe6 をナノ粒子へ封入したことにより、がん細胞内への取り込みが優位に亢進していることが示された (図 2)。

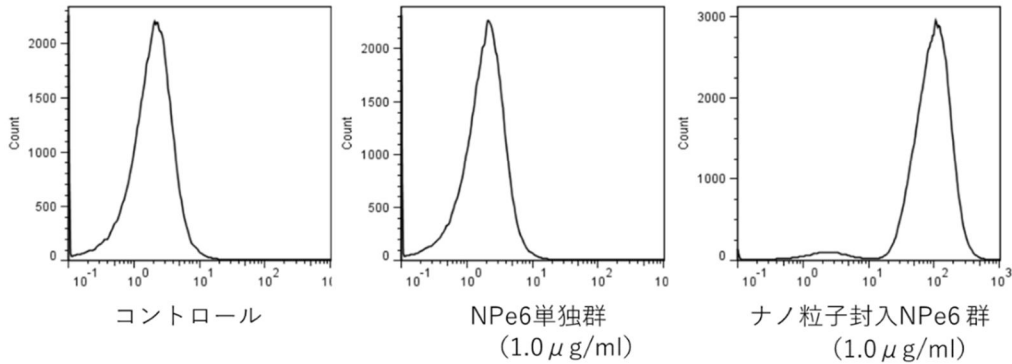


図2 Flow cytometryによるタラポルフィン (NPe6) 封入ナノ粒子のがん細胞内への取り込みの確認

さらに蛍光顕微鏡を用いて細胞内への集積性の確認を行った。いずれの細胞株においても NPe6 単独群では細胞質内にはほとんど蛍光を観察できなかったが、Nano-NPe6 群では細胞質への著明な蛍光の取り込みを確認することができた (図3)。以上より、NPe6 をナノ粒子へ封入することによって当初の予想通り細胞内への uptake が亢進し、治療効果の増強が期待される結果となった。

H226細胞

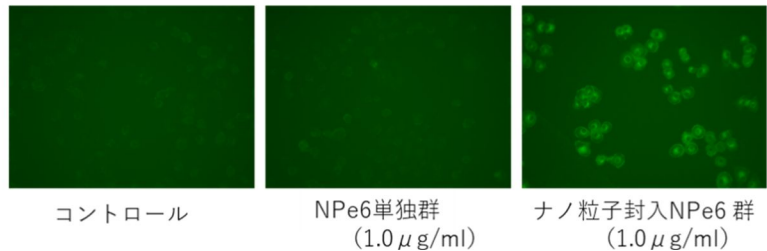


図3 蛍光顕微鏡によるタラポルフィン (NPe6) 封入ナノ粒子のがん細胞内への取り込みの確認

(3) リガンド付加ナノ粒子の腫瘍特異性の確認

タラポルフィン (NPe6) 含有ナノ粒子をさらに細胞内への取り込み率をあげる試みとして、葉酸をリガンドとしてナノ粒子に加えたりガンド修飾 NPe6 ナノ粒子の作製を行った。前述の細胞株は、以前の検討で葉酸受容体である FOLR1 が発現亢進していることは既に実証済である。これらの細胞株に NPe6 単独群 コントロールリポソーム リガンド無しナノ粒子封入 NPe6 群 リガンド有りナノ粒子封入 NPe6 群を導入し、Flow cytometry を用いて導入効率を検討した。いずれの細胞においても NPe6 単独群では非投与群と比較してほとんど波形に変化を認めなかったが、リガンド無しナノ粒子封入 NPe6 群で右方移動を示し、リガンドありナノ粒子封入 NPe6 群群では同様にそれ以上の右方移動を示した。以上より、NPe6 をナノ粒子へ封入したことにより、がん細胞内への取り込みが優位に亢進していることが示され、この効果はナノ粒子にリガンドを付加することでさらに増強することが確認できた。さらに蛍光顕微鏡を用いて細胞内への集積の確認を行い、リガンド有りナノ粒子封入 NPe6 群で細胞質への蛍光の取り込みを確認した。

(4) PDT レーザー治療効果の確認

同細胞株に同様のナノ粒子を導入し、その後 664nm のレーザー照射を施行し、MTS assay を用いてがん細胞に対する殺細胞効果を検討した。一部の細胞にある程度の効果を認めたが、レーザー装置の故障、修理、代替の器機を手配するのに時間を要した。今後の展望として同細胞株に Nano-NPe6 群と NPe6 単独群を導入し、その後レーザー照射を施行し、MTS assay を用いてがん細胞に対する殺細胞効果を検討する。その後にもマウスを用いた肺癌、悪性胸膜中皮腫の皮下腫瘍モデルを用いて尾静脈より経静脈的に NPe6 単独と Nano-NPe6 を全身投与し、Nano-NPe6 群の優位性を示す仮説の元、腫瘍病変を in vivo 蛍光システムを用いてその診断能を評価する。さらに最終目標としてマウス皮下腫瘍に Nano-NPe6 を投与後、レーザー照射を行い、抗腫瘍効果を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----