

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08041

研究課題名(和文) 金ナノ粒子による局所温熱効果を利用した末梢動脈疾患治療の効果検証

研究課題名(英文) Local hyperthermia treatment for peripheral arterial disease by using gold nano-rods

研究代表者

得能 智武 (TOKUNOU, Tomotake)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50567378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：金ナノ粒子(金ナノロッド)は、光エネルギーを熱に変換するフォトサーマル効果を示すことが知られている。静注した金ナノ粒子は、肝臓や脾臓など網内系に多く集積されることが分かったが、コントロールと比べ、心不全モデルでは心臓の炎症部位に金ナノ粒子が、有意に集積することが分かった。片側の大腿動脈を結紮切除した下肢虚血モデルでは、術後の患側に金ナノ粒子を注入し、近赤外線レーザーを照射し患部の温熱療法を行った。金ナノ粒子の温熱効果を利用し、42度に設定するように調整した。術後1週間までの検討では、患部の血流はコントロール群に比べ、金ナノ粒子群では早期の改善傾向が見られたが、今後条件を最適化する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金ナノ粒子のフォトサーマル効果を利用して研究をおこなった。静注した金ナノ粒子は炎症部位に集積することが分かったが、下肢虚血モデルのように血流が少ない疾患では金ナノ粒子の注入方法を考える必要があった。また今回使用した棒状の金ナノ粒子(金ナノロッド)は、組織透過性の高い近赤外線領域に強い吸収域をもち、光エネルギーを熱に変換するフォトサーマル効果を利用することができた。心不全や下肢虚血には温熱療法の効果も示唆されているが、今回のように局所で温熱療法を行う手段としては選択肢の一つになりうると考える。

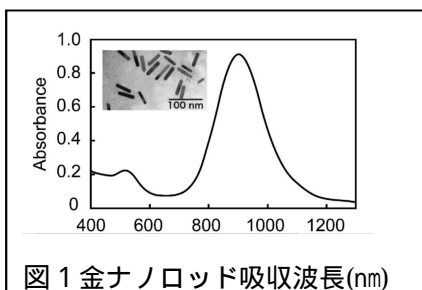
研究成果の概要(英文)：Gold nano-rods, rod-shaped gold nanoparticles, act as thermal converters for photothermal therapy. Intravenous gold nano-rods were accumulated in the reticuloendothelial system, such as liver and spleen. And the nano-rods were accumulated in the inflammatory site of heart failure model mice. In the lower limb ischemia model, unilateral femoral artery was ligated and resected, gold nano-rods were injected into the ischemic area. Local hyperthermia treatment (42 degree) was performed by using gold nano-rods and near-infrared laser. After 1 week therapy with this condition, gold nano-rods showed early improvement of ischemia, but further investigation is needed.

研究分野：循環器内科学

キーワード：低酸素 血管新生 金ナノロッド

1. 研究開始当初の背景

球状の金ナノ粒子は可視光域(500nm 付近)に吸収域を持つが、可視光は生体組織への透過性が低く、応用範囲が制限される。一方、金ナノロッドは棒状の金ナノ粒子であり、球状の金ナノ粒子と違い組織透過性の高い近赤外線領域(800-900nm)に強い吸収域を持つ(図1)。



ルギーを熱に変換するフォトサーマル効果を示す他、粒子表面の様々な化学修飾が行えるため発光によるバイオイメージングや薬物のデリバリーシステムにも応用可能な新しい診断・治療(theranostics: 診断と治療を同時に行える新しい治療技術)を実現する機能性ナノ材料として期待されている(Niidome *Yakugaku Zasshi*. 2013)。

心臓虚血再灌流障害、心筋梗塞、などの障害部位のイメージングや薬剤のデリバリーシステムに応用されている(Matoba et al. *Int Heart J*. 2014)。しかし末梢血管疾患の温熱治療にはまだ応用されていない。臨床では、心不全や下肢虚血に対する全身温熱療法(和温療法)が検討されている(Miyata et al. *Circ J*. 2010)が、専用の全身温熱装置(遠赤外線均等乾式サウナ)が必要なことや全身温熱に耐えられない人もいることなどから、我々は局所温熱の可能性を研究してきた。今回、この研究において金ナノロッドを局所温熱療法に応用出来るかを検討したい。

関節リウマチモデルマウスの関節炎症部位に静脈内注射した金ナノロッドが取り込まれることが報告されている(Shao et al. *ACS Nano*. 2011)。特に抗 intracellular adhesion molecule(ICAM)-1 抗体を結合した金ナノ粒子を関節リウマチモデルマウスに静脈投与したところ、抗体なしと比較し患部に約2倍の金ナノ粒子の取り込み増加が認められている。さらに別の報告では、siRNA(siCCR2:chemokine C-C motif receptor 2)を結合したLipidナノ粒子を静脈内投与することによる自己免疫性心筋炎モデルマウスの心筋炎と予後の改善効果が報告されている(Leuschner et al. *Eur Heart J* 2014)。金ナノロッドによる温熱療法と抗体を利用したデリバリーを組み合わせる相乗効果としては、以下のような臓器特異的治療の可能性が示唆されている。癌治療においては¹³¹I 標識抗体の効果が全身温熱治療で増強することが動物実験で報告されている(Saga et al. *Eur J Cancer*. 2001)。ポリエチレングリコール(PEG)修飾金ナノロッドを担癌マウスに静脈内注射し光照射により局所温熱することでシスプラチンの抗がん効果(アポトーシス)が増強した(Mehtala et al. *Nanomedicine* 2014)。心不全や下肢虚血に対する全身温熱(和温療法)による血流改善の機序は、温熱によるHSPの発現に伴う抗酸化作用や内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の増加によるNOを介した血管内皮機能改善などが示唆されている(Fujita et al. *Circ J* 2010, Miyauchi et al. *Circ J* 2012)。

我々は、炎症が起こっている部位には金ナノロッド取り込みが亢進すると予想しているが、実験に使用する金ナノロッドはPEG修飾しているため血管内投与しても毒性の問題はほぼないと考えられる。静注した場合も金ナノロッドは24時間後に肝臓、脾臓などの網内系に残存しているがマウスへの影響は認められないことがわかっている。我々はこの特殊な金ナノロッドを利用して局所の温熱療法を行うことで、局所において血管新生を促し、虚血性の血管疾患治療につなげることを考えている。

2. 研究の目的

炎症疾患において金ナノロッドが炎症部位に集積するかどうかをみる。

下肢虚血モデルにおいて、金ナノロッドと近赤外線による温熱効果で、下肢に限局した温熱を発生させることによる局所温熱の血管新生効果を明らかにする。

3. 研究の方法

金ナノロッド投与後の体内分布

炎症モデルマウス（心不全マウス）を使用して金ナノ粒子静注後の分布を調べる研究

金ナノロッド（1.66mM）を尾静脈注射（10 μ L/g）し24時間後に心臓やその他の臓器に取り込まれた金重量を測定。コントロールマウスと心不全マウス（TNF トランスジェニックマウス）を比較。

金ナノロッドと温熱療法による血管新生促進作用効果検証

下肢虚血モデルマウスにおいて金ナノロッドと近赤外線照射による血管新生改善効果をみる研究

下肢虚血作成（マウス大腿動脈の結紮、除去）後に、金ナノロッドをそれぞれのマウスの患側へ投与（120ng/ μ l（金重量）を1~3 μ l/g体重）。下肢の疾患部に近赤外線レーザー光（波長915nm, ビーム径5mm）を3-4cmの位置から照射する。照射パワーを100mWから400mWまで変化させ、体表面温度が42 程度(mild hyperthermia)になる条件を設定する。体温を常時モニター（高感度サーモグラフィ）しながら20分間照射を続ける。Day0, Day1, Day3, Day7にレーザー Doppler（JMSレーザー血流計）を使用して患側と健側下肢の血流を測定する。

4. 研究成果

金ナノロッド投与後の体内分布

金ナノロッド（1.66mM）を尾静脈注射（10 μ L/g）し24時間後に心臓に取り込まれた金重量を比較したところ、正常マウス（WT）と比較し約3.2倍の金ナノロッドが心不全マウス（TG）の心臓に取り込まれていることが明らかになった（Higuchi et al. *Heart Vessels*. 2019）（図2左）。金ナノロッドが心臓に取り込まれる（図2右：電子顕微鏡写真）機序としては炎症心筋内の血管透過性の亢進や、心筋内浸潤細胞のマクロファージによる取り込み機序などが考えられた。

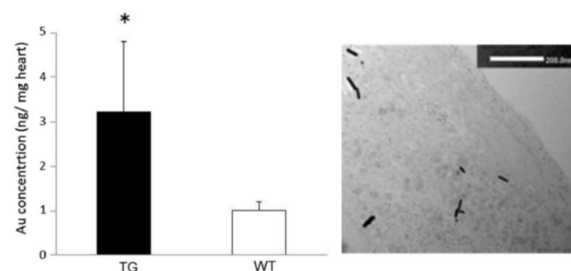


図2 金ナノロッド 心臓への取り込み

金ナノロッドと温熱療法による血管新生促進作用効果検証

片側下肢の大腿動脈結紮除去後、レーザー Doppler（図3左 JMS レーザー血流計で測定）での血流測定および、サーモグラフィ（図3中央と右）での表面温度測定を行った。患肢に注入した金ナノ粒子を含有する部位に近赤外線を当て、42度に保つ温熱療法を行った。

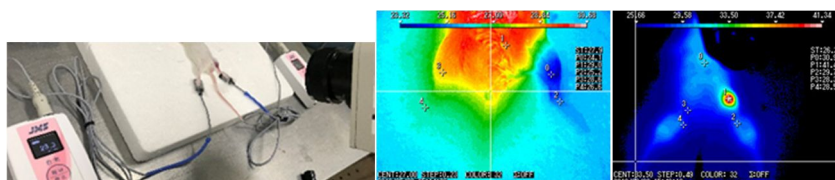


図3

下肢虚血作成後にレーザー Doppler で血流を計測（Day0, Day1, Day3, Day7）した（虚血前の血

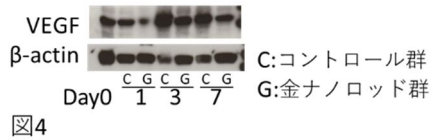


図4

流平均値を1)、コントロール群の平均値(0.80 \pm 0.08、0.58 \pm 0.19、0.75 \pm 0.24、1.18 \pm 0.29)と金ナノロッド群の平均値(0.47 \pm 0.15、1.19 \pm 0.33、1.05 \pm 0.30、0.99 \pm 0.26)を比べると、金ナノロッド群が早期に回復している傾向はみられた。

下肢の組織から回収した蛋白で行ったウエスタンブロットの結果から、VEGFの結果を示す(図4)。Day3からVEGF発現増加を認めるものの、コントロール群と金ナノロッド群で有意差はなかった。これまで足浴による温熱療法は血管内皮機能の改善をもたらすことが知られている。また我々も、長期的、習慣的な温熱療法が血圧を安定化させている可能性を示した(Yamasaki et al. *Sci Rep.*2022)が、これも温熱療法による血管機能改善効果が一因にあると考えている。今回の研究では、局所の温熱治療による血管新生効果、血流改善効果は限定的であったが、条件設定によっては有用な治療法の1つになり得ると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tokunou Tomotake, Ando Shin-ichi	4. 巻 43
2. 論文標題 Recent advances in the management of secondary hypertension-obstructive sleep apnea	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 1338 ~ 1343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-020-0494-1	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 -
1. 著者名 Hiroyuki Sawatari, Akiko Chishaki, Mari Nishizaka, Mami Miyazono, Tomotake Tokunou, Chie Magota, Umpei Yamamoto, Sakiko Shimizu Handa, Shin-ichi Ando	4. 巻 35
2. 論文標題 Accumulated nocturnal hypoxemia predict arterial endothelial function in patients with sleep-disordered breathing with or without chronic heart failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 800 ~ 807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-020-01557-5	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 -
1. 著者名 得能智武、安藤真一	4. 巻 28
2. 論文標題 組織低酸素がもたらす全身性の病態変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 THE LUNG perspectives	6. 最初と最後の頁 27-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Yoshihiro Higuchi, Takuro Niidome, Yuji Miyamoto, Yoshihiro Komohara, Tomotake Tokunou, Toru Kubota, Takahiko Horiuchi	4. 巻 34
2. 論文標題 Accumulation of gold nano-rods in the failing heart of transgenic mice with the cardiac-specific expression of TNF-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 538-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-018-1241-2.	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 Hiroshi Kojima, Tomotake Tokunou, Yusuke Takahara, Kenji Sunagawa, Yoshitaka Hirooka, Toshihiro Ichiki, Hiroyuki Tsutsui	4. 巻 7
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor-1 deletion in myeloid lineage attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14025.	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 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tomotake Tokunou, Toyoki Maeda, Takahiko Horiuchi, Naoki Makino
2. 発表標題 Telomere shortening is accelerated in a gender-differential manner in patients with insomnia receiving sleep medication.
3. 学会等名 5th Asean Sleep Federation Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋口義洋、得能智武、久保田徹、堀内孝彦
2. 発表標題 Accumulation of Gold Nano-rods in the Failing Heart of Transgenic Mice with the Cardiac-specific Expression of TNF-
3. 学会等名 第83回日本循環器学会
4. 発表年 2019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	樋口 義洋 (Higuchi Yoshihiro) (40404032)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	堀内 孝彦 (Horiuchi Takahiko) (90219212)	九州大学・大学病院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関