

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790143
 研究課題名 (和文) リンパ節を標的とする抗癌剤貯蔵無機ナノ粒子を用いた転移乳癌治療法の開発
 研究課題名 (英文) Development of metastatic breast cancer therapies with anticancer drug-loaded inorganic nanoparticles targeted to lymph nodes
 研究代表者
 村上 達也 (MURAKAMI TATSUYA)
 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点助教
 研究者番号：90410737

研究成果の概要 (和文)：新しい無機ナノ粒子カーボンナノホーン (CNH) をベースとする新しいドラッグキャリアの開発を行った。抗癌剤を CNH に内包させた場合、その抗癌剤はゆっくり放出され、結果として高い抗癌活性が得られた。一方、薬効成分として癌光療法剤を内包させた場合は、レーザー照射部位特異的な抗癌活性が観察された。重要なことに、CNH は乳癌の主要な転移先である腋窩リンパ節に移行することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)： Novel drug-drug carrier complexes with a new type of nanocarbon material, carbon nanohorn (CNH), have been developed. CNH was easily loaded with an anticancer drug, doxorubicin (DXR). The complex slowly released DXR, which would contribute to enhancement of the antitumor activity. When CNH was loaded with a photosensitizer, zinc phthalocyanine (ZnPc), the complex enabled double photodynamic and photothermal cancer therapies. More importantly, CNH administered into tumor-bearing mice was able to accumulate in the adjacent axial lymph nodes, which are well known to be an organ in which breast cancer metastasis often occurs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：医療系薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、ナノ粒子、カーボンナノチューブ、癌化学療法、乳癌、リンパ節転移、腋窩リンパ節、ドラッグキャリア

1. 研究開始当初の背景

乳癌は進行するとリンパ節転移するため、原発巣を切除しても数年後に再発する。炎症性乳癌は特に進行が早い。このような背景か

ら、リンパ節転移巣を標的とした化学療法が求められている。中でも、標的部位に集積し、そこで抗癌剤をゆっくりと放出する、あるいは外部刺激に応じて薬効を発現する薬物輸

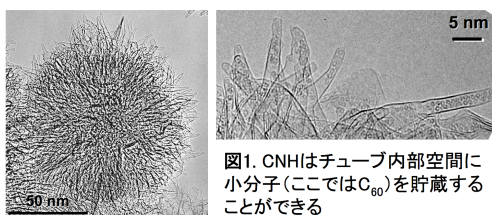
送担体に注目が集まっている。

2. 研究の目的

リンパ節に集積し、抗癌剤をゆっくり放出する、あるいは外部刺激に応じて薬効を発現する薬物輸送担体を作製し、その抗癌活性を評価する。

3. 研究の方法

新しい無機ナノ粒子であるカーボンナノホーン (CNH, 図 1) に、薬物として抗癌剤ドキシソルビシン (DXR)、あるいは光線力学療法剤亜鉛フタロシアニン (ZnPc) を内包させ、薬効を評価する。さらに、カーボンナノホーンを重金属 (Gd_2O_3) でラベルし、体内動態を検討する。



4. 研究成果

CNH は水に分散しないが、研究代表者らは、DXR と水溶性高分子ポリエチレングリコール (PEG) の複合体 PEG-DXR による表面修飾によって、CNH が水分散化することを明らかにしている (図 2)。得られる修飾体 (PEG-DXR-

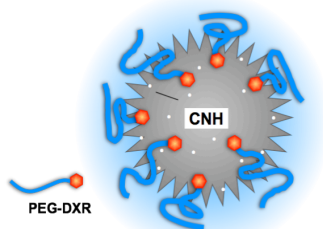


図2. PEG-DXR-CNHの模式図

CNH) を癌モデルマウスの腫瘍内へ投与すると、腫瘍近傍の腋窩リンパ節へ集積することが明らかとなった。図 3 に示すとおり、腋窩リンパ節のみが CNH の黒色に変色していることが分かる。腋窩リンパ節は乳癌の主要な転移先である。組織学的な検討により、腋窩リンパ節に集積した CNH 成分は、腫瘍組織からリンパ管経由で集積したことも明らかとなった。

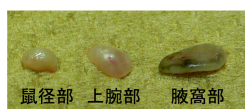


図3. 腫瘍周囲のリンパ節

この癌モデルマウスに対する抗腫瘍効果を検討したところ、PEG-DXR-CNH は等量の PEG-DXR に比べて、高い抗腫瘍効果を示すこ

とが明らかとなった (図 4)。

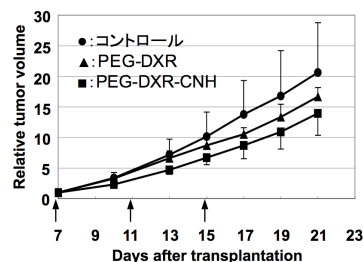


図4. PEG-DXR-CNHの抗腫瘍効果

次に、この PEG-DXR-CNH の高い抗腫瘍効果に関して知見を得るため、PEG-DXR-CNH 投与後の血中 DXR 濃度を定量し、PEG-DXR 投与後と比較した。この結果、投与 0.5 時間後から 3 時間にかけて血中に DXR が検出された (表)。重要なことに、PEG-DXR-CNH 投与後の血中 DXR 濃度は、PEG-DXR 投与後と比べて低かった。このことは、PEG-DXR-CNH に含まれる DXR の腫瘍内滞留性が高いことを示唆している。さらに、実験終了後の腫瘍内残留 DXR を定量したところ、PEG-DXR 投与後ではほとんど検出されなかったのに対し、PEG-DXR-CNH 投与後では、61%もの DXR が残存していた (表)。以上の結果から、PEG-DXR-CNH の高い抗腫瘍効果は、PEG-DXR-CNH の DXR 成分の高い腫瘍内滞留性、すなわち DXR 成分が CNH からゆっくり放出されることに由来することが示唆された。

表 腫瘍内投与後の血中および腫瘍内 DXR 濃度

	PEG-DXR	PEG-DXR-CNH
Residual DXR in tumor tissue on day 21 (%)		
	0.57 *	61 ± 25
Time (hr)	Blood concentration of DXR (ng/ml)	
0.5	33 ± 10	10 ± 5.7
1	24 ± 6.3	8.3 ± 0.96
3	11 ± 4.7	4.2 ± 4.1
24	ND	ND

ND: not detected

*Average of data for two mice in which DXR could be detected

ZnPc 内包 CNH では、PEG の代わりに血清蛋白アルブミン (BSA) が水分散剤として用いられた。得られる複合体 ZnPc@CNH-BSA を癌モデルマウスへ投与し、腫瘍にレーザーを照射したところ、ZnPc@CNH-BSA は、等量の ZnPc に比べて高い抗腫瘍効果を示した (図 5)。また興味深いことに、CNH-BSA も一定の抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

そこで ZnPc@CNH-BSA の高い抗腫瘍効果のメカニズムを検討するため、培養癌細胞を用いてレーザー照射実験を行ったところ、動物実験の結果同様、ZnPc@CNH-BSA が最も高い増殖抑制効果を示した (図 6)。カーボンナノチ

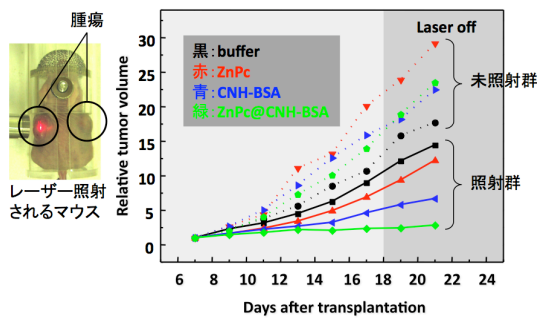


図5. ZnPc@CNHのレーザー照射依存性抗腫瘍効果

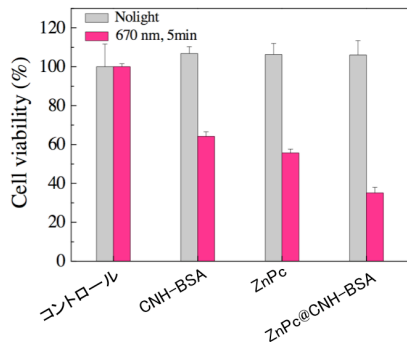


図6. ZnPc@CNH-BSAの培養癌細胞に対する光照射依存性増殖抑制効果

ューブは光線温熱効果を示すことが知られていることから、レーザー照射下、ZnPc@CNH-BSAあるいはCNH-BSAの水分散液の温度を測定した。この結果、いずれの水分散液の温度も照射時間依存的に上昇し、細胞傷害が現れるとされる42℃以上に達した(図7)。

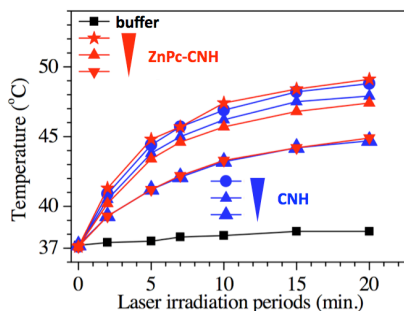


図7. 光照射によるZnPc@CNH-BSA水懸濁液の温度上昇

すなわち、ZnPc@CNH-BSAの高い抗腫瘍効果は、ZnPcによる光線力学効果とCNHによる光線温熱効果の2つの作用によるものであることが示唆された。

CNHの血管内投与後の体内動態を検討するため、高感度検出可能なガドリニウムをCNHに内包することを検討した。方法としては、CNH分散液に酢酸ガドリニウムを添加した後、1200℃で熱処理することによって、CNH内部でガドリニウムを酸化させ、酸化ガドリニウム

ム内包CNH ($Gd_2O_3@CNH$)を得た。

$Gd_2O_3@CNH$ をマウス血管内に投与し、14日後に各種臓器を摘出し、含まれるガドリニウムを定量すると共に、肝臓については組織学的検討も行った。投与したガドリニウムの70-80%は肝臓から検出され、10%程度が脾臓から検出された。肝臓では貪食細胞に取り込まれていることが明らかとなった。これらの結果は、CNHの代謝に関する重要な知見を与えると共に、ガドリニウムがCNHの有用なラベル化試薬として機能することを示唆する。

以上の結果は、カーボンナノホーン(CNH)が、様々な抗癌剤やラベル化試薬を内包でき、薬物によってはゆっくりと放出することから、有望なドラッグキャリアであることを示している。また、CNH自身も光温熱効果による抗癌活性を有し、他に例を見ないドラッグキャリアとなりうる。さらに腫瘍近傍の腋窩リンパ節に集積することから、今後、検出試薬と抗癌剤を同時にCNHに内包させることにより、リンパ節転移性乳癌の診断・治療のための新しいドラッグキャリアを開発できる可能性が明らかとなった。

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10件)

- ① A. S. D. Sandanayaka, O. Ito, M. Zhang, K. Ajima, S. Iijima, M. Yudasaka, T. Murakami, and K. Tsuchida, Photoinduced electron transfer in zinc phthalocyanine loaded on single-walled carbon nanohorns in aqueous solution. *Adv. Mater.* (査読有), **21**, 1-6 (2009)
- ② J. Miyawaki, S. Matsumura, R. Yuge, T. Murakami, S. Sato, A. Tomida, T. Tsuruo, T. Ichihashi, T. Fujinami, H. Irie, K. Tsuchida, S. Iijima, K. Shiba, and M. Yudasaka, Biodistribution and ultrastructural localization of single-walled carbon nanohorns determined in vivo with embedded Gd_2O_3 labels. *ACS Nano* (査読有), **3**, 1399-1406 (2009)
- ③ M. Zhang, T. Murakami, K. Ajima, K. Tsuchida, A. S. Sandanayaka, O. Ito, S. Iijima, and M. Yudasaka, Fabrication of ZnPc/protein nanohorns for double photodynamic and hyperthermic cancer phototherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (査読有), **105**, 14773-14778 (2008)
- ④ K. Ajima, T. Murakami, Y. Mizoguchi, K. Tsuchida, T. Ichihashi, S. Iijima, and M. Yudasaka, Enhancement of in vivo

anticancer effects of cisplatin by incorporation inside single-wall carbon nanohorns. *ACS Nano* (査読有), **2**, 2057-2064 (2008)

- ⑤ T. Murakami, H. Sawada, G. Tamura, M. Yudasaka, S. Iijima, and K. Tsuchida, *Nanomed.* (査読有), **3**, 453-463 (2008)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 村上達也、ナノ粒子の表面修飾による生体適合化とドラッグデリバリーシステムへの応用、日本接着学会東北支部講演会 2009、2009年11月13日、東北大学
- ② 村上達也、抗癌活性を有するナノ粒子カーボンナノホーンの in vitro および in vivo 機能評価、BMB2007、2007年12月14日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ 村上達也、局所投与用ドラッグキャリアとしてのカーボンナノホーン、第29回日本バイオマテリアル学会、2007年11月26日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)
- ④ 村上達也、抗癌剤担持水溶性カーボンナノホーンの薬理評価、第23回日本 DDS 学会、2007年6月14日、熊本日航ホテル (熊本)

[その他]

<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/ppl/grp/murakami.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 達也 (MURAKAMI TATSUYA)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
特定拠点助教
研究者番号：90410737

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：