

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12749

研究課題名(和文) 極小金ナノ粒子を基盤とした微小がんの検出および放射線治療技術の開発研究

研究課題名(英文) Development of early-stage cancer detection method and radiotherapy using ultra-small gold nanoparticles

研究代表者

北村 成史 (Kitamura, Narufumi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50624912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：表面を還元型グルタチオンでコーティングした直径約3ナノメートルの極小金ナノ粒子を作製し、マウスを用いた動物実験で血中半減期1時間以内で尿排泄可能であることを確認した。続いて、当初計画をやや修正し、酸化鉄ナノ粒子ではなくタンパク質を基盤として複数の金ナノ粒子を集積する方法を採用したところ、直径約10~20nmの粒子上に3~4個の金ナノ粒子が結合した生分解性ナノ粒子を作製することに成功した。CTイメージングによる解析の結果、これらのナノ粒子は、足場とするタンパク質のサイズや性質に依存し、それぞれ異なる血中対流時間を示した。この金ナノ粒子を造影剤として利用することで腫瘍中の微小な血管を描出できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の合成した金ナノ粒子は、ナノメートルサイズかつ生分解性の足場を利用することで、これまで抱えていた欠点である「血中対流時間と排泄能の両立が困難」という問題を解決することに成功した。さらに足場となるタンパク質のサイズや物性に依りてその血中対流時間が変わることから、CT造影の観察対象や目的に依りてその血中対流時間を調整可能であることが示された。これにより、マイクロX線CTを用いたin vivoイメージングにおいて微小血管や腫瘍の血管構造の造影、放射線治療への応用が期待できる。また、尿排泄の時間をコントロールすることから、動物実験における経時的な腎機能の評価など基礎研究へも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We prepared ultra-small gold nanoparticles with a diameter of approximately 3 nm by coating with reduced glutathione. In animal experiments using mice, it was confirmed that the nanoparticles could be excreted in urine with a half-life of less than one hour in blood. The initial plan was then slightly modified to integrate multiple gold nanoparticles on a protein basis rather than iron oxide nanoparticles. As a result, biodegradable nanoparticles with 3~4 gold nanoparticles bound on protein particles of about 10~20 nm in diameter were successfully synthesized. The results of CT imaging analysis showed that synthesized nanoparticles had different blood convection times depending on the size and properties of the scaffold protein. The gold nanoparticles can be used as a contrast agent to delineate tiny blood vessels in tumors.

研究分野：ナノ医科学

キーワード：金ナノ粒子 CTイメージング CT造影剤 生分解性ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

微小がんや微小転移がんの早期発見と治療を実現することは、がんの予後の改善において非常に重要な意味を持つ。また、モデル動物を利用した研究においても、生体内で発生した微小がんを検出することで、発生の機序やがんの周辺組織の血管構造の変化などの詳細な情報が得られる意義は大きい。微小がんの検出を目的とした研究は種々行われているが、体内の深い部分での低侵襲で定量的な探索手法としては全身撮像が可能な造影剤 CT^[1]と MRI^[2]が最も有望と考えられる(図1)。CT、MRI共に造影剤を用いることで感度と精度を高めることが可能で、近年では微小がんを特異的に認識する造影剤の開発研究が注目を集めている。CTの造影剤として現状では高原子番号の元素の高い放射線吸収能を利用したヨウ素系造影剤の市販薬のみが臨床応用されている。しかし、このような小分子造影剤は短時間の血管造影に利用できるのみで、微小がんを検出するという用途へは利用できない。そこで、直径10~150 nmのサイズのナノ粒子が腫瘍特異的に集積する現象(EPR効果)を利用したナノ粒子造影剤が注目されている。特に金ナノ粒子造影剤は、ヨウ素系造影剤よりも高いX線吸収係数を持ち、さらに化学的に非常に安定で生体適合性が高いという特徴から、すでに動物実験などの用途での市販薬が開発されて広く研究されている。しかし、金ナノ粒子はその高い安定性のため、生体内での代謝および排泄機構が存在せず、体内に残留して最終的に肝臓や脾臓などの網内系、および皮膚などに沈着してしまうという問題点がある。その一方で、直径が5 nm以下の極小サイズの金ナノ粒子は腎臓のろ過を通過して尿排泄が可能であるが、逆に血中滞留時間が短いために腫瘍への集積が期待できない(図2)。

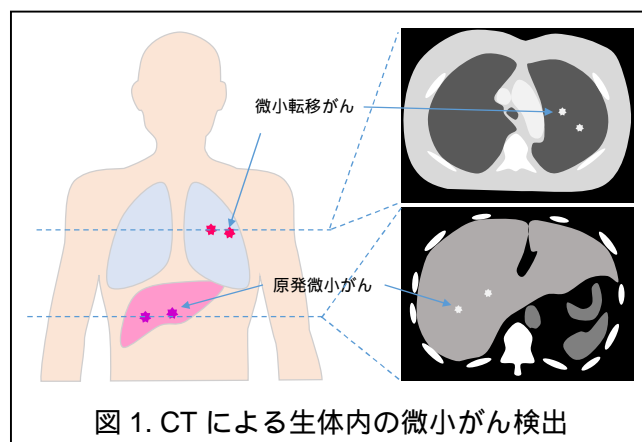


図1. CTによる生体内の微小がん検出

腫瘍への集積を考えた場合、一定期間は排泄されずに血中に留まる必要があり、そのためには腎排泄を犠牲にしなければならないというトレードオフの関係がある。上記のような問題点が金ナノ粒子の臨床応用への障壁となっており、逆にこれをクリアすることは金ナノ粒子造影剤を人の診断・治療に展開するためのブレークスルーとなりうる。その具体的な解決策として、腎排泄されない程度のサイズで腫瘍への蓄積性を持たせ、造影後は極小サイズまで分解する能力を持たせて排泄させるといった方法を採用する。

	金ナノ粒子 10 ~ 150 nm	微小金ナノ粒子 < 5 nm	酸化鉄ナノ粒子 10 ~ 20 nm
特徴	X線吸収・増感	X線吸収・増感	MRI造影
毒性	無	無	無
体外排出	不可	可	分解後に可
腫瘍蓄積	可	不可	可

図2. 金ナノ粒子および酸化鉄ナノ粒子の特徴

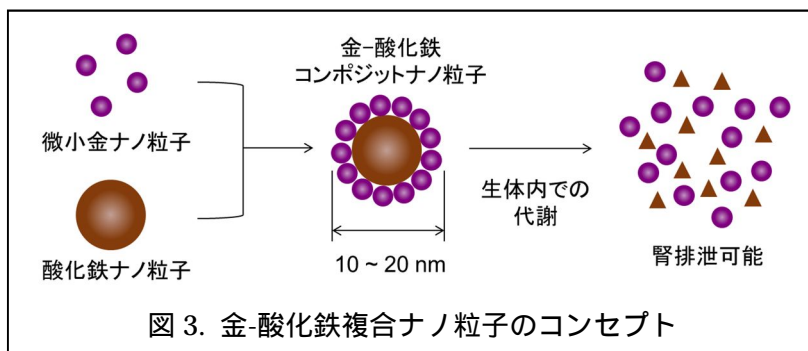
2. 研究の目的

本研究の当初の目的としては、CT造影剤と放射線治療増感剤の2つの機能を持つ金ナノ粒子に体外への排出機能を付与することで臨床応用を可能とすることを目的とした。さらに、MRI造影剤である酸化鉄ナノ粒子と組み合わせることでこれにより、微小がん、微小転移がんの高感度・高精度な検出システムの構築を目指した。この目的のうち、後述の通り、MRI造影剤である酸化鉄ナノ粒子と組み合わせる方針は断念し、まずは金ナノ粒子のCT造影剤としての血中滞留性の改善を第一の目的とした。

3. 研究の方法

生体内で分解可能な粒子を足場材料として、尿排泄可能な極小サイズの金ナノ粒子をアミド結合で担持し、直径約10~20nmのナノ粒子を作製する。微小金ナノ粒子の表面は金表面と特異的に強く結合するチオール基を有する還元型グルタチオンでコーティングし、カルボン酸リッチな表面を持つナノ粒子とする。検討した方法は2通りで、まずは計画書通り、酸化鉄ナノ粒子を足場材料として表面に金ナノ粒子を集積させる方法を検討した(図3)。続いて、タンパク質のアミノ基と、金ナノ粒子表面のカルボキシ基を縮合剤を用いて結合し、タンパク質上に複数の金ナノ粒子を固定する方法について検討を行った。

血中滞留性試験およびCT造影はマウスを用いた動物実験で行った。マイクロX線CTを用い、18 μm ボクセルの解像度で血管造影および心臓・腎臓・膀胱の臓器をイメージングし、そのコントラストの変化から造影能と血中滞留性の評価を行った。生後8週のマウスの腰にがん細胞を担持し、1週間後の腫瘍の新生血管を造影して経時的な観察を行った。



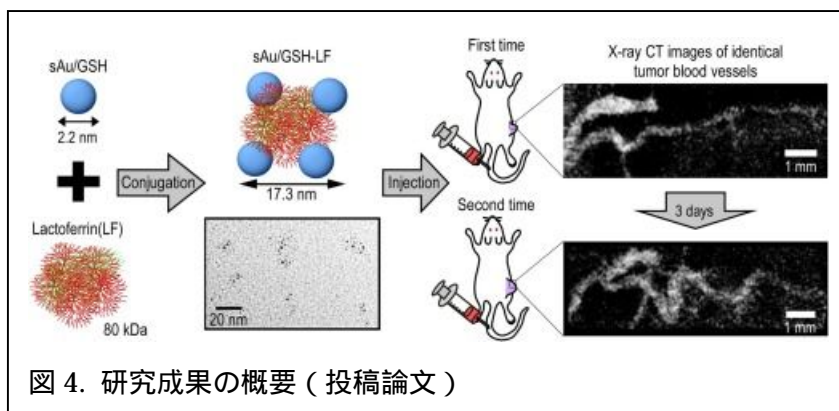
4. 研究成果

我々は、金ナノ粒子を用いた新規造影剤を開発し、X線CTを用いて腫瘍血管の形態変化を経時的に捉えることに成功した(図4)。まず、テトラキス(ヒドロキシメチル)ホスホニウムクロリドを還元剤として、直径2.2nmのグルタチオン担持極小金ナノ粒子(sAu/GSH)を作製した。このsAu/GSH粒子をマウスに静脈注射すると、数分間血管内に留まり、血中半減期は1時間以内であった。さらに観察を続けると、24時間後には市販の造影剤イオパミドールと同様、腎臓から排泄された。

以上の観察結果を元に、次に既報に従って作製した酸化鉄ナノ粒子(15nm)を用い、グルタチオン金ナノ粒子との結合を行った。酸化鉄ナノ粒子の表面はカルボキシ基と強く結合することが知られており、この性質を利用して金ナノ粒子を酸化鉄表面に担持する方法を検討したが、いずれの濃度条件においても粒子同士が大きな凝集塊を作って沈殿してしまい、目的とする大きさの粒子を作製することはできなかった。また、金ナノ粒子表面のグルタチオンコーティングの一部を別の分子で置換し、カルボキシ基の密度を調整する検討も行ったが、研究期間内では状況の改善は見られなかった。

そこで、当初の方針を一部変更し、まずは生分解性のナノ粒子を足場として極小金ナノ粒子を集積し、血中滞留性を改善する方針をとった。足場ナノ粒子の候補として、生理的環境で安定して分散するタンパク質が最適と考えた。sAu/GSH溶液に縮合剤の影響下でラクトフェリンを添加し、Au/GSH・ラクトフェリン複合体(長軸サイズ17.3nm)を作製した。sAu/GSH-LFをマウスに静脈内投与したところ、血中滞留時間は1-3時間であり、iopamidolやsAu/GSHで観察された時間よりかなり長いことが確認された。さらに、図1に示す通り、sAu/GSH-LFを造影剤に用いた担癌マウス腫瘍血管のX線CTイメージングにより、同一の腫瘍血管の形態変化を数日間にわたり撮影することに成功した。通常、血管造影に用いられる15nmサイズの金ナノ粒子では、血中に長時間とどまる性質により、EPR効果(ナノ粒子が腫瘍組織に浸潤して蓄積されていく現象)を発揮し、2回目以降の造影では腫瘍全体のCT値が上昇して血管のコントラストが得られない。また、微小血管のイメージングでは1回の撮像に30分程度の時間を要するため、1時間以内に尿排泄されてしまう極小金ナノ粒子でも造影が困難である。本研究のナノ粒子のように、数時間以内に排泄される性質を付与することで、血管造影を複数回行うことが可能になった。

さらに、同様の手法でアルブミンとの複合体を作製したところ、ラクトフェリンよりも1.5倍ほど血中滞留時間が延長されることが確認できた。これらの結果から、タンパク質のサイズやその生体内での安定性によって血中滞留時間を制御できることが示された。



<引用文献>

- [1] Nakagawa T, Gonda K, Kitamura N, et al. *Sci. Tech. Adv. Mater.*, **2016**, 17(1), 387-397.
- [2] Wolf M J, et al. *Cancer Cell*, **2014**, 26(4), 549-564.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Inose Tomoya, Kitamura Narufumi, Takano-Kasuya Mayumi, Tokunaga Masayuki, Une Norikazu, Kato Chihiro, Tayama Mayu, Kobayashi Yukina, Yamauchi Noriko, Nagao Daisuke, Aimiya Takuji, Furusawa Naoko, Nakano Yasushi, Kobayashi Yoshio, Gonda Kohsuke	4. 巻 203
2. 論文標題 Development of X-ray contrast agents using single nanometer-sized gold nanoparticles and lactoferrin complex and their application in vascular imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 111732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2021.111732	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 北村成史, 多田寛, 高野真由美, 小林芳男, 石田孝宜, 亀井尚, 権田幸祐	4. 巻 72
2. 論文標題 機能性ナノ粒子を用いた生体情報の可視化および病態の定量評価	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 258 ~ 267
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 北村成史, 多田寛, 濱田庸, 宮下穰, 原田成美, 濱中洋平, 坪井洸樹, 大内憲明, 林慎一, 石田孝宜, 権田幸祐
2. 発表標題 核外ER の定量分析に基づく HR+/HER2乳癌の内分泌療法抵抗性の予測
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村成史, 山本大介, 権田幸祐
2. 発表標題 ナノ粒子修飾AFMによる多点結合力の検出を利用した がん細胞微小領域における抗原の密集状態の解析
3. 学会等名 ナノ学会第19回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Narufumi Kitamura, Daisuke Yamamoto, and Kohsuke Gonda
2. 発表標題 Novel Evaluation Method of Protein Micro-regional Density by Using Nanoparticle-modified AFM
3. 学会等名 Japan-China Symposium on Nanomedicine ((国際学会))
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Narufumi Kitamura, Tomoya Inose, and Kohsuke Gonda
2. 発表標題 Size control of gold nanoparticles based on degradable protein scaffold
3. 学会等名 International Symposium on Nanomedicine (国際学会)
4. 発表年 2021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	石田 孝宣 (Ishida Takanori) (00292318)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	多田 寛 (Tada Hiroshi) (50436127)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	高野 真由美 (Takano Mayumi) (60806298)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

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	権田 幸祐 (Gonda Kohsuke) (80375435)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

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