

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17197

研究課題名(和文)マクロファージを対象とした新規薬剤輸送システムの確立と新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Establishment of new drug delivery system and development of new treatment strategy by macrophages

研究代表者

妹尾 悟史 (SENO, SATOSHI)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40801105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目標はマクロファージという免疫を担当する細胞を標的とした新たな薬物運搬の技術を開発することである。今回はまず初めにマクロファージの同定に適した染色方法を確認すべく、マウスに埋め込んだ物質(=スパーサー：放射線治療の際に腫瘍と周囲組織を離すために用いる物質)に集まったマクロファージとそのサブタイプであるType1・type2マクロファージの染色による同定を行った。HE染色という一般的な染色後、免疫染色という特殊な染色を色々行ったが、最終的には染色でのマクロファージの同定は困難であった。また線維染色も行い、マクロファージの浸潤と線維形成の関連も調べ、両者に関連があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先述したように本研究の最終目標はマクロファージという免疫を担当する細胞を標的とした新たな薬物運搬の技術を開発することであるが、この研究期間ではそこに到達するのは難しいと考え、薬物輸送の標的であるマクロファージの同定並びに薬物運搬を担うナノ粒子の取り込みの観察を行うこととした。だが、今回の期間ではマクロファージの同定するに有用な染色方法を決定するに至らなかった。今後は染色の方法を変え、またマクロファージが密にならないような検体に変えるなどし、マクロファージを同定する方法を見つける予定である。その点では、次回につながる結果であったとしては、今回の結果は学術的意義があったと考える。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this study is to develop new drug delivery system targeting macrophages responsible for immune system. This time, we first embedded the substance (= spacer: substance used to release tumor and surrounding tissue during radiation treatment) in mouse for weeks and we used its submitted substances to confirm the dyeing method suitable for macrophages and identify by staining of Type1 and Type2 macrophage, which is a subtype of macrophage. After HE staining which is a general method of staining, several kinds of immunohistochemical staining was performed, but finally the identification of macrophages in staining was very difficult. In addition, fiber staining was also performed to investigate the relationship between infiltration and fiber formation of macrophages and found that both are related to both.

研究分野：放射線治療

キーワード：マクロファージ 薬物輸送システム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線治療は根治照射や緩和照射など全て含めると、ほぼ全ての腫瘍に対し放射線治療が適応となるが、放射線に対する感受性は個々の腫瘍により異なる。放射線感受性の低い腫瘍の代表例として膠芽腫が挙げられ、若くして早期に再発する症例を経験することは稀ではなく、放射線治療の分野では解決すべき課題の一つである。膠芽腫の予後は非常に悪く、現在でも生存期間中央値は約1-2年で、5年生存率は10%も満たない。しかも半数以上が1年以内に再発し、再発すると予後は生存期間中央値で1年もない。治療法の一つに放射線治療があるが感受性は低く、根治を得られる症例は極めて少ない。粒子線治療やホウ素中性子捕捉療法の治療も開発されてきたが、まだ臨床試験の段階であり、膠芽腫は現在においても難治性の腫瘍である。

我々の教室では、放射線防護目的に使用するスぺーサーの研究を長年行っており、現在は抗癌剤併用に伴うスぺーサーへの影響と周囲組織の癒着の関係を調べる基礎研究を行っている。癒着にはマクロファージが関連していると言われており、その関係でマクロファージに関する文献の検索を行ってきたが、神経膠腫も含めた放射線治療抵抗性とマクロファージの関係を記載した論文をいくつか見つけ、この治療抵抗性に関係するマクロファージをターゲットとした治療が実現できれば、膠芽腫のみならず多くの腫瘍の局所制御率や生存率の向上が図れるのではないかと考えた。

また、我々の教室で長年行ってきた20nm~100nmのナノ粒子は、基本的な投与経路である静脈内投与を行うと、補体経路を活性化する粒子が表面に吸着し、肝臓や脾臓、骨髄などのマクロファージに貪食されやすい性質を持つ。また、金ナノ粒子などでは表面に物質を修飾することも可能で、ナノ粒子が新たなドラッグナノキャリアとして注目されている。例えば、循環器の分野では、動脈硬化に対しシリカナノ粒子を金で被覆した一連のコアシェルナノ粒子の開発・臨床試験が行われており、その粒子を動脈硬化部位のプラークに存在するマクロファージに粒子を取り込ませ、近赤外線レーザーをコアシェルナノ粒子に照射し、動脈硬化部位を加熱・治療する方法が行われている。もともとナノ粒子はマクロファージに取り込まれやすい性質を持ち、この特徴に注目し新たな運搬手段として利用可能であり、表面修飾が可能なナノ粒子を用いればTAMに効率良く捕食される運搬物質を開発することは十分に可能であると考えた。以上が本研究を始めようと思った背景である。

### 2. 研究の目的

最終的な目標はナノ粒子を新規薬物輸送システム(Drug Delivery System:DDS)とし、癌治療抵抗性の原因となっている腫瘍関連マクロファージ(Tumor Associated Macrophage:TAM)をターゲットとした新規治療戦略とすることにあるか、2年間での実現は困難と考える。そこで、今回の期間ではナノ粒子を用いたTAMに対するDDS開発を主目的とし、ナノ粒子の取り込みに伴うTAMへの影響を調査することを目標とする。具体的には以下の4点で、1. DDSに適したナノ粒子の検討、2. TAMへ効率良く運搬されるためのナノ粒子表面への修飾物質の開発、3. TAMによる運搬体の捕食の確認、4. 捕食に伴うTAMの変化を調べる。

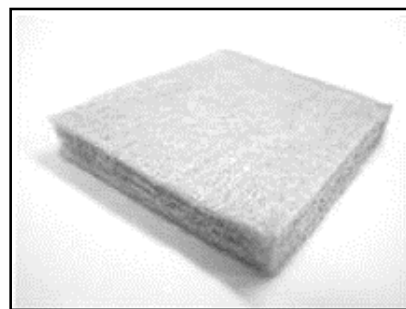
### 3. 研究の方法

本研究ではTAMに効率良く捕食されるナノ粒子の開発を目標とし、捕食後のナノ粒子の挙動やTAMの変化を以下の4つに分けて調査・研究する。

1. DDSに適したナノ粒子の検討
2. TAMへ効率良く運搬されるためのナノ粒子表面への修飾物質の開発
3. TAMによる運搬体の捕食の確認
4. 捕食に伴うTAMの変化

その調査に先立ち、まずはナノ粒子に取り込まれたマクロファージを同定するために、マクロファージ並びにマクロファージのサブタイプであるTypw1とType2のHE染色と免疫染色を行った。免疫染色にはマクロファージはIba1、Type1はCD86、Type2はCD206を用いた。さらに蛍光染色用にType1に対する抗体であるCD11cも使用した。いずれの抗体も我々の教室で用いているのが初めてであり、予備実験も含め染色を行った。

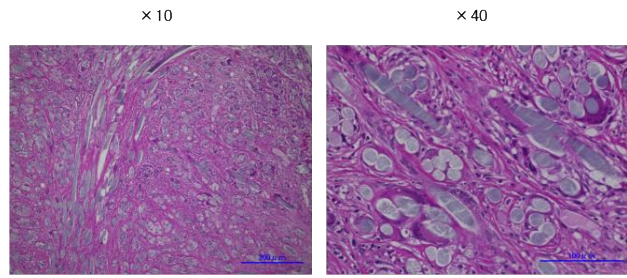
マクロファージの染色に用いるスぺーサーは、放射線治療で用いるPGAスぺーサー(右図、可溶性の縫合糸を網目状に縫い合わせた板状のスぺーサー、密度:  $0.2\text{g}/\text{cm}^3$ ・サイズ:  $20\times 20\times 4\text{mm}$ )をマウスに挿入し、1ヶ月後に取り出したものを用いた。スぺーサーの研究も我々の教室では長年行っており、スぺーサーへの延焼細胞浸潤が密であることを確認しており、今回の染色に用いるのに適していると判断した。



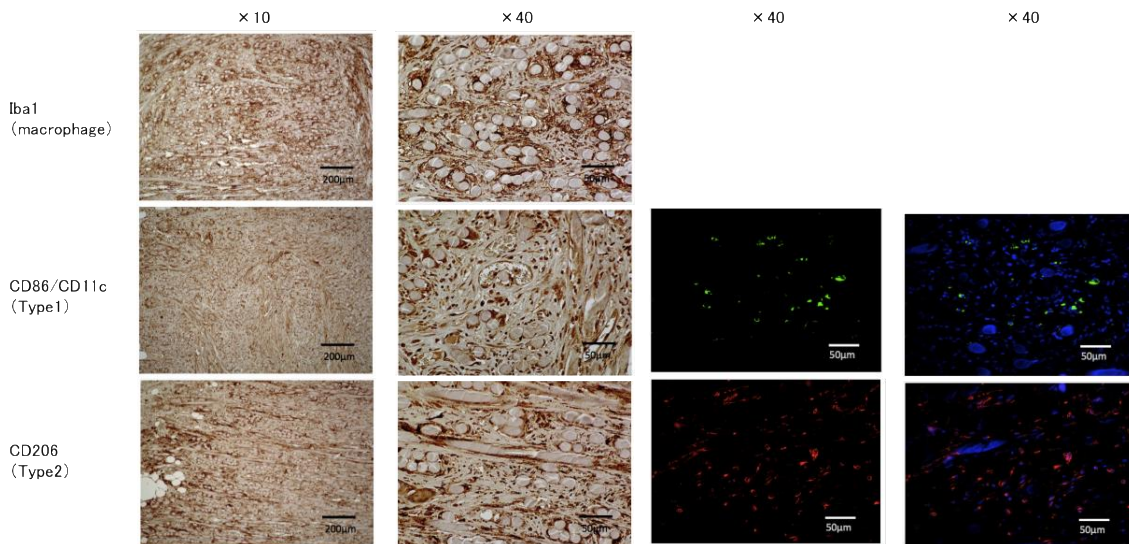
#### 4. 研究成果

##### ①マクロファージの同定

マクロファージの HE 染色を行い、形態学的にマクロファージの存在確認を行った。右に結果を示すが、用いたスパーサーの繊維に絡みつくように多角巨細胞が確認でき、マクロファージの同定は難しいが、マクロファージが癒合してできる多角巨細胞の存在はマクロファージの存在を裏付ける根拠となったため、次の免疫染色に移行した。



まずは Iba1 で全体の染色を行ったが、マクロファージの集簇が予想以上に密であり、サブタイプの染色での同定は困難であろうと予想された。そこで、スパーサーの挿入前に炎症細胞浸潤を減少させる目的で抗がん剤をして同様の染色実験を行ったが、確かに炎症細胞浸潤は確かに減るものの、マクロファージ集簇は密であり、下に示すように染色でのサブタイプの同定は困難であった。予備実験を含め、条件を変更して染色を繰り返したが、本研究期間中にマクロファージの同定に適した染色の種類、染色方法を決定するに至らなかった。



前述のようにマクロファージの浸潤自体が密であり、算出しやすい箇所を選択してはいるが、蛍光染色を行った検体で Type1 と Type2 の比の計算を 1 検体あたり 20 箇所で行った。抗がん剤を投与せず炎症細胞浸潤が密な組織と、抗がん剤を投与し炎症細胞浸潤が緩やかな組織では、それぞれ Type1/typ2 の比が平均して 0.65 と 0.95 という結果であった。いずれの群でも Type2 の割合が大きい結果となったが、抗がん剤を投与しなかった群では、抗がん剤投与群と比較し、炎症細胞浸潤が早く生じるため、炎症の治癒段階に移行する Type2 への分化がより早く生じているものと推測される。

今回は抗がん剤投与のあり・なしでの比較であり、本研究とは直接関係ないため Type1/Type2 の経時的な変化は評価していない。ただ異物に対するマクロファージの反応、特に Type1 と Type2 の役割に関しては不明なことが多く、経時的な Type1/Type2 の変化を評価することは非常に意義であると考えられる。

##### ②マクロファージの浸潤と線維化

先述のように炎症細胞浸潤を減少させる目的で、抗がん剤を投与したマウスを用いて実験を行った。本研究とは直接は関係ないが、抗がん剤投与群では炎症細胞浸潤の浸潤が減少し、かつスパーサー内に広がる線維化も減っているように見えた。そこで Picrosirius red 染色を用いて線維化の評価を行った。

結果としては抗がん剤投与群では線維化が少ない傾向であり、これは前述のように抗がん剤投与群では炎症細胞浸潤が遅れるため、炎症の治癒段階に移行し、線維化を誘導する Type2 への分化が遅れるためではないかと考える。こちらも同様に経時的な評価は必要であり、異物への反応を評価するのに有意義であると考えられる。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------