

令和 5 年 4 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02538

研究課題名(和文)オルガネラを標的とするナノヒーターの創製とガン温熱療法の深化

研究課題名(英文)Development of nanoheaters targeting organelles for cancer hyperthermia

研究代表者

井藤 彰 (Ito, Akira)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：60345915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ナノテクノロジーの進歩によって、交流磁場で発熱するナノサイズの磁性粒子(ナノヒーター)が生み出された。我々は工学的な新しいがん治療技術として、生体適合性の高い酸化鉄マグネタイトの磁性ナノ粒子を薬物送達システム(DDS)を駆使して腫瘍へ送達し、体外から交流磁場を照射して磁性ナノ粒子を発熱させるがん温熱療法の開発を行ってきた。本研究ではさらに発展させた細胞内DDSを構築し、ミトコンドリア標的加温を行ったところ、6匹中5匹の腫瘍が完全退縮した。これらの結果から、オルガネラ標的ナノヒーターにより強力ながん温熱療法の開発につながることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

交流磁場で発熱する磁性ナノ粒子を使用するがん温熱療法は、腫瘍局所での加温が可能となるため、患者に対する負荷の低い治療となる可能性がある。本研究では、治療効果を高めるための方策として、がん細胞内でストレスセンサーの役割をもつミトコンドリアを特異的に加温する磁性ナノ粒子を開発することに成功した。ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子によって加温された腫瘍は、6匹中5匹が完治するという強力な治療効果が得られ、ミトコンドリアが温熱療法におけるがん細胞の急所の一つであることが示された。これらの成果は、ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子を用いた温熱療法が、がん治療にとって有用であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Advances in nanotechnology have produced nano-sized magnetic particles (nanoheaters) that generate heat in an alternating magnetic field. As a new engineering-based cancer treatment technology, we delivered magnetic nanoparticles of highly biocompatible iron oxide (magnetite) to tumors using a drug delivery system (DDS), and externally irradiated magnetic nanoparticles with an alternating magnetic field. In this study, we constructed a further developed intracellular DDS and performed mitochondria-targeted heating, which resulted in complete tumor regression in 5 out of 6 mice. These results suggest that organelle-targeted nanoheaters will lead to the development of potent cancer hyperthermia.

研究分野：生体医用工学

キーワード：温熱療法 ドラッグデリバリーシステム 磁性ナノ粒子 ミトコンドリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんによる死亡数と罹患者数は人口の高齢化を主な要因として増加し続けており、より強力な治療法が望まれる。我々は、生体内にて安定で毒性が極めて低いマグネタイト ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) からなる磁性ナノ粒子が交流磁場で発熱する性質を利用して、患者の体外から交番磁場を照射することでがんを加温して殺傷する温熱療法の開発を行ってきた。磁性ナノ粒子を腫瘍に選択的に送達させるために、様々な腫瘍標的型磁性ナノ粒子を開発してきた。

前臨床研究において、動物モデルの腫瘍で高い完全退縮率を達成した。薬剤 (抗がん剤) ではない無機材料である磁性ナノ粒子が交番磁場で発熱する性質を利用して、がんを熱で殺す工学的な新しい治療法を開発した。そして、これらの研究成果を基に、札幌医科大学皮膚科において皮膚癌 (メラノーマ) の臨床研究を開始した。

腫瘍標的型磁性ナノ粒子を用いたがん温熱療法の臨床における治療の有効性も明らかになってきた一方で、技術的なボトルネックはドラッグデリバリーシステム (DDS) にある。Wilhelm らは 2016 年までの十年間で報告された腫瘍標的型ナノ粒子 (磁性ナノ粒子に限らない様々なナノ粒子) の文献調査を行ったところ、平均して血中投与した内のわずか 0.7% しか腫瘍に送達されないことを報告した [*Nat Rev Mater* 1, 16014 (2016)]。我々の動物実験においても、血中投与で磁性ナノ粒子に腫瘍 (全体) を 43 以上に加温させることは難しく、臨床研究においては腫瘍標的型磁性ナノ粒子をメラノーマ腫瘍中に注射することで行われてきた。しかしながら、磁性ナノ粒子を直接注射できる固形腫瘍は臨床では少ないことからブレイクスルーが求められる。送達可能な磁性ナノ粒子の量が少なくても、がん細胞内の「急所」を狙うことで治療効果が格段に高められるのではないかと。その場合、発熱は細胞内微小環境に局在化するため、バルクとしての温度が上がらなくても細胞死を導くことが可能となる新しい原理のがん温熱療法になるのではないかと。といった仮説の下、本研究では従来の腫瘍標的型 DDS に加えてがん細胞内 DDS を開発することでブレイクスルーを達成することとした。これまでの「腫瘍組織全体を 43 以上に加温しようとしていたがん温熱療法」に対して、本研究ではがん細胞は細胞内のどこで温熱を感知して細胞死のシグナルを伝達するのかという学術的「問い」に迫った。ターゲットとして、細胞内のストレスセンサーであるミトコンドリアを選択した。

### 2. 研究の目的

本研究は、オルガネラ標的型磁性ナノ粒子を、がん温熱療法用の新規ナノヒーターとして開発することを目的として、三年間にわたって研究を進めた。磁性ナノ粒子の表面を生体親和性の高いリン脂質極性基を有する MPC (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) ポリマーで被覆して、その表面にミトコンドリア指向性化合物 TPP [Marrache et al. *ACS Nano* 7, 7392 (2013)] を結合することにより、ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子を開発し、がん細胞内へのミトコンドリア集積性と担癌マウスモデルを使用した治療実験で有効性を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子の合成

原子移動ラジカル重合法 (ATRP) により、poly[2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-*co*-2-methacryloyloxyethyl succinate (MES)] (PME73) および poly(MPC-*co*-MES-*co*-4-vinylbenzyl TPP) (PMET73) を合成した。MNPs に PME73 または PMET73 を添加して攪拌することで、ポリマー被覆マグネタイト (MNPs@PME73、MNPs@PMET73) を調製した。

#### (2) 透過型電子顕微鏡によるマグネタイトを取り込んだがん細胞の観察

チャンバースライドにマウス結腸癌 CT26 細胞を播種し、24 時間インキュベートした。磁性ナノ粒子を培地に懸濁させて培地交換し、再び 24 時間インキュベートした。培地を抜き PBS で細胞を 2 度洗い、浮遊細胞とマグネタイトを除去した後、2.5% グルタルアルデヒドと 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) 含む蒸留水で前固定処理を行った。固定された細胞は、様々な割合のエタノールと酸化プロピレンを用いて脱水された。脱水した試料を酸化プロピレン/エポキシ樹脂 (1/1、1/3) 混合液に通してエポキシ樹脂に埋没させ、60 で 72 時間焼成した。超ミクロトームで切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した後、透過型電子顕微鏡で観察した。

#### (3) ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子を用いた温熱治療実験

CT26 皮下腫瘍を形成した担癌マウスモデルに対し、磁性ナノ粒子を投与して外部磁場による温熱療法を行い、治療効果を観察した。腫瘍体積がおよそ  $50 \text{ mm}^3$  となった日を day 0 とし、day 0, 1, 2 に磁性ナノ粒子の投与と磁場照射による温熱治療を行った。治療には周波数 118 kHz、最大 2 kW の交流磁場装置を用いた。マウスの腫瘍部に 40 mg/mL の磁性ナノ粒子を 100  $\mu\text{L}$  注入した後、装置内の水平コイル中央にマウスを置き、交流磁場装置を用いて 30 分間交流磁場を印加することで腫瘍組織を加温した。治療中は光ファイバー温度計を腫瘍表面に固定することで

表面温度をモニターしながら、腫瘍表面が 43 に保たれるように装置の出力を調節した。治療はイソフルラン吸入麻酔薬による麻酔下で行った。治療後、30 日間にわたって腫瘍体積と体重を観察した。動物実験は、名古屋大学大学院工学研究科の動物実験委員会で承認された計画書にしたがって行った (G220016)。

#### 4. 研究成果

##### (1) ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子の合成

ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子 MNPs@PME73 の平均粒子径を動的光散乱で測定したところ、207 nmであった。合成したナノ粒子を細胞に添加して細胞毒性を調べたところ、細胞死につながる毒性は示さなかった。

##### (2) 透過型電子顕微鏡によるマグネタイトを取り込んだがん細胞の観察

MNPs@PME73 とミトコンドリア指向性化合物 TPP を含まない磁性ナノ粒子である MNPs@PME73 を CT26 細胞に添加した後に透過型電子顕微鏡で観察したところ、MNPs@PME73 では MPC の効果で細胞内には取り込まれるもののミトコンドリアでの蓄積はみられなかった一方で、MNPs@PME73T はミトコンドリアに磁性ナノ粒子が蓄積している様子が観察された (図 1)。

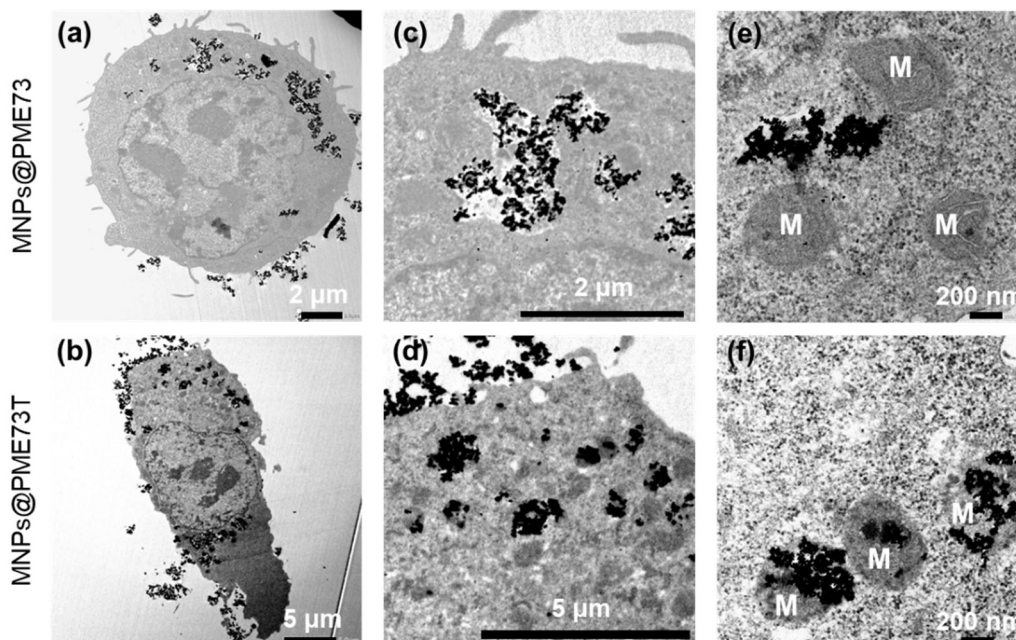


図 1 透過型電子顕微鏡像 (a), (c), (e) MNPs@PME73。 (b), (d), (f) MNPs@PME73T。黒い粒が磁性ナノ粒子。M はミトコンドリア。

##### (3) ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子を用いた温熱治療実験

温熱治療後のマウスの腫瘍体積の推移を図 2 に示す。未治療群は腫瘍サイズがすべてのマウスで増大していったのに対して、温熱治療を行った治療群では腫瘍の成長が抑制される傾向がみられた。また、温熱治療群を比較すると、MNPs@PME73T でより強力に腫瘍成長が抑制されていた。30 日後の治療効果を比較すると、MNPs@PME73 では 6 匹中 2 匹で腫瘍が完全退縮していたのに対し、MNPs@PME73T では 6 匹中 5 匹で腫瘍が完全退縮していた。以上の結果から、ミトコンドリアを標的とした温熱治療が、治療効果の増強に有効であると考えられる。

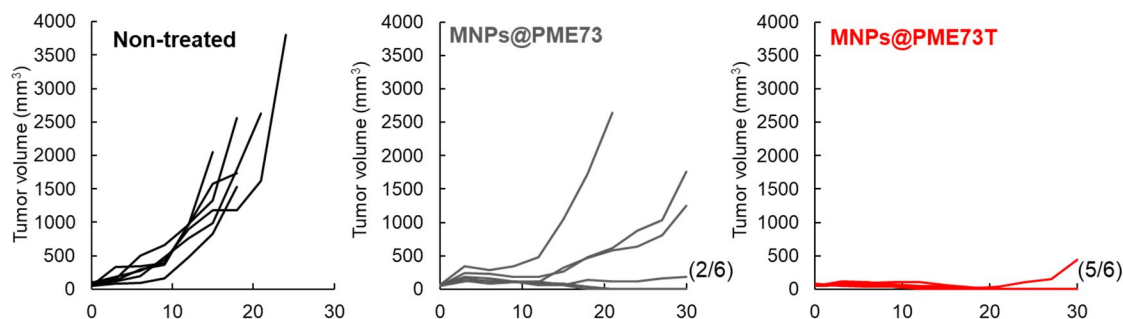


図 2 マウス腫瘍体積の推移 (括弧内の数字は腫瘍が退縮した匹数を示す)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎裕永、金子真大、井藤彰
2. 発表標題 ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子によるがん温熱療法
3. 学会等名 創立100周年記念第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井藤彰
2. 発表標題 機能性磁性ナノ粒子を用いたガン温熱療法の開発
3. 学会等名 31回日本磁気科学会2022 分科会研究会-高分子・材料プロセス分科会-（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井藤彰
2. 発表標題 機能性磁性ナノ粒子を用いた医療技術の開発
3. 学会等名 第35回CES21講演会「医薬分野で活躍する化学工学」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎裕永、金子真大、井藤彰
2. 発表標題 がん温熱療法のためのミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子の開発
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子真大、山崎裕永、井藤彰
2. 発表標題 ハイパーサーミアに向けたミトコンドリア指向性マグネタイトの開発
3. 学会等名 第34回東海ハイパーサーミア研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井藤 彰、金子 真大
2. 発表標題 磁性ナノ粒子を用いたハイパーサーミア - 基礎研究の新展開
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第37回大会
4. 発表年 2020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	岡部 弘基  (Okabe Koki)  (20455398)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教    (12601)	

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