

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16093

研究課題名(和文) 膵がんに対するセラノスティクスを可能とするCO₂産生ナノ粒子の開発研究課題名(英文) Development of CO₂ generating nanoparticles for pancreatic cancer theranostics

研究代表者

濱野 展人 (Hamano, Nobuhito)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80708397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リポソームの構成脂質を、リン脂質であるDPPC、MSPC、PEG脂質を21.6：2.6：1 (mol比)とし、薄膜法を用いてリポソームを作製した。pH勾配を利用しドキシソルビシンを封入すると同時に炭酸水素アンモニウム(ABC, 300 mM)もリポソーム内部に封入した。結果、約80%のドキシソルビシン封入率を有するリポソームを得ることができた。本リポソームを42℃に加熱したところドキシソルビシンの放出が確認され、加熱によってCO₂の産生が示唆された。更に加熱条件における本リポソームの殺細胞効果について検討したところ、ABCを含まないリポソームと比較して高い殺細胞効果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドキシソルビシンとABCを共に封入できる脂質ナノ粒子の作製に成功し、加熱に伴ってCO₂の産生及びCO₂産生によりドキシソルビシンの放出が促され、ABCを含まないリポソームと比較して高い殺細胞効果を得ることができた。以上、温度にตอบสนองすることでCO₂を産生することから、外部エネルギーを利用したがんの診断・治療システムを可能とし得る新たなナノ粒子として、医療に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：CO₂ generating-lipid nanoparticles (CO₂-L) which were composed of phospholipid (DPPC and MSPC), and PEG-lipid were prepared by thin film method. To encapsulate doxorubicin as a anti-tumor agent, pH gradient remote loading procedure was used. In addition, to generate carbon dioxide (CO₂), ammonium bicarbonate (ABC) was used. The encapsulation efficiency of dox is about 80%. The CO₂-L showed the drug release triggered via mild hyperthermia (42℃). Moreover, the cytotoxicity of combination of CO₂-L and mild hyperthermia is higher than that of combination of control liposomes and mild hyperthermia. Therefore, CO₂-L might be a useful tools for cancer theranostics using ultrasound.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：CO₂産生ナノ粒子 がん治療

1. 研究開始当初の背景

がん医療が飛躍的に進歩した現在においても、膵がんのような難治性がんの治療成績の向上が喫緊の課題として挙げられている。厚生労働省が推進している「がん研究 10 年戦略」中間報告にて、膵がんは早期発見が困難であり、早期診断方法の確立や有用な治療法の開発を早急に推進すべきとの報告があった(厚生労働省、2019年)。膵がんの早期発見が難しい理由として、膵がん組織内部は間質が豊富に存在することに加えて間質液圧が高いため、超音波や MRI などの診断造影剤や抗がん剤などが、がん細胞に到達しにくいことが原因とされている。近年、この間質を突破するには 30-50 nm 程のサイズを有するナノ粒子が有用との報告がある一方、未だ膵がんなどに対して有用な診断法や治療法は見つかっていない。これまでに申請者は、臨床で用いられている診断技術の 1 つである超音波と、超音波に応答するナノ粒子を用いて、がん組織の描出及びがん治療に成功してきた。しかしながら、これまでの超音波応答性ナノ粒子は 500 nm 程度とサイズが大きく、間質を突破しがん深部組織への到達は困難である。また超音波診断は、膵がん検出のスクリーニングには優先して用いられているものの(日本膵臓学会において定められている膵がん診療ガイドラインにおいて「行なうよう勧められている」診断法(グレード B))、精度の高いがんの診断は難しいものとなっている。精度の高い診断が困難なことから、他のがん(前立腺がんや肝がん)では適応されている強力集束超音波: HIFU による治療への応用も困難な状況となっている。

このような背景から申請者は、造影剤となり得るナノ粒子が膵臓がんの深部組織に集積すれば、超音波を利用した診断システムの構築のみならず、治療にも応用可能であると考えた。

2. 研究の目的

本申請研究では、がんの深部まで到達可能であり、かつ加温により CO₂ を産生するナノ粒子を作製し、体外からの超音波照射により投与したナノ粒子の形態・応答変化を利用することで、安全かつ効率的ながん診断・治療を可能とするシステムを構築することを目的とする。本研究の遂行により、これまで診断と治療が困難であった膵臓がんに対する次世代型セラノスティクスシステムの研究基盤を構築することを目指す。

3. 研究の方法

マイクロ流体技術を用いた CO₂ 産生ナノ粒子の作製

ナノ粒子の調製には、マイクロ流体技術を用いた装置である NanoAssemblr™ (Precision Nanosystems International Inc.) を使用した。無水エタノールに目的の脂質組成になるよう種々の脂質を溶解して脂質溶液(脂質濃度: 15 mg/ml)とした。脂質として、ホスファチジルコリン(PC: PMPC、HSPC、DPPC など)、コレステロール、PEG 脂質を用いた。バッファーとして炭酸水素アンモニウム (Ammonium hydrogen carbonate: ABC) 溶液を用い、脂質溶解液と共にそれぞれ常温もしくは加温し、シリンジに充填した。そのシリンジを NanoAssemblr™ に設置し、任意の Flow rate 及び Flow ratio の条件でリポソームを調製した。その後、透析処理によりリポソーム溶液中の有機溶媒及び過剰な ABC を除去した。ゼータサイザーにて、調製直後の粒子径と PDI を測定し、リポソームの物性を評価した。

ABC を基盤としたアンモニウム勾配を利用し、ドキシソルピシンの封入を試みた¹。過剰な ABC を除去したリポソームにドキシソルピシン溶液(DOX)をリポソーム(脂質): ドキシソルピシン = 10 : 1 (wt/wt) となるよう混合し、任意の温度(60°C、37°C、室温)で 10 分もしくは 24 時間インキュベートした。得られたリポソームはカラムを用い、封入されていない DOX を除去し精製した。脂質の濃度はリン脂質テストワコー(WAKO)で測定し、内封されたドキシソルピシンの濃度は Triton X-100 を加えた溶液(終濃度 1%)の 480 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定し、検量線にて算出した。また、ドキシソルピシンの内封率は以下の式より算出した。精製した DOX 封入リポソームの封入率は以下の式より算出した。

DOX 封入率 (%) = [(D/L)after] / [(D/L)before] × 100

(D/L)after は、インキュベート後の脂質とドキシソルピシンの割合、(D/L)before はインキュベート前の脂質とドキシソルピシンの割合を表す。

薄膜法を用いた CO₂ 産生ナノ粒子の作製

ナノ粒子の構成脂質を DOPC : コレステロール : PEG 脂質 = 60 : 40 : 5 (mol ratio) もしくは DPPC : MSPC : PEG 脂質 = 21.6 : 2.6 : 1 (mol ratio) とし、これらをエタノールに溶解し、薄膜法にてリポソームを作製した。300 mM pH 4 クエン酸バッファーで水和後、100 nm のフィルターを Mini Extruder (Avanti Polar Lipids) を用いて 100 nm のフィルターに 20 回通すことで粒子径を約 100 nm に調製した。PD-10 カラムを用い、リポソームの外相を pH7.5 PBS に交換した後に、DOX 及び ABC の封入を試みた。過剰な DOX 及び ABC は PD-10 カラムで取り除き、DOX 封入 CO₂ 産生ナノ粒子とした。リポソーム(脂質): ドキシソルピシン = 10 : 1 (wt/wt) = 1:10 (wt/wt)、25°C 2 時間インキュベートし DOX を封入した。DOX 封入率は の項と同様の方法で算出した。

加温によるドキシソルピシンの放出率の測定

で作製した CO₂ 産生ナノ粒子を 37-50°C で加温し、DOX の放出から CO₂ 産生能を評価した。37-50°C で加温したヒートブロック上で CO₂ 産生ナノ粒子をインキュベートした。インキュベート後にナノ粒子を PD-10 カラムに通すことで、放出された DOX を除去した。DOX を取り除いた後に、脂質の濃度をリン脂質テストワコーで、内封された DOX の濃度を Triton X-100 を 1% 加えた溶液 (終濃度 1%) の 480 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定し、検量線にて算出した。また、DOX の放出率は以下の式より算出した。

$$\text{DOX 放出率 (\%)} = 100 - [(D/L)\text{sample}] / [(D/L)\text{initial}] \times 100$$

(D/L)initial は処理前の脂質とドキシソルピシンの割合を表す。

DOX 封入 CO₂ 産生ナノ粒子のヒト膀胱がん細胞に対する殺細胞効果

ヒト膀胱がん細胞である BxPC3 の細胞懸濁液 (1×10⁴ cells/well) を 96 ウェルプレートに播種し 24 時間後、DOX 封入 CO₂ 産生ナノ粒子 (Dox; 5-20 μg/ml) を加え、37°C、2 時間インキュベートした。2 時間後、42°C で 5 分加温し、培地交換し 24 時間後、Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) を使用し、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm における吸光度を測定し、殺細胞効果を評価した。

4. 研究成果

これまでの検討 (研究活動スタート支援: 19K21232) において、PMPC : コレステロール : PEG 脂質 = 70 : 30 : 3-4 (mol ratio)、脂質溶液 : ABC 溶液 (126.5 mM) の混合比 1 : 6 において、60-80 nm 程度の均一なリポソームを得ることができている。そこで、薬物放出を指標として CO₂ ガスの産生について検討した。モデル薬物として、ドキシソルピシン (DOX) をリポソーム内に封入後、封入率及び DOX の放出率から CO₂ 産生ナノ粒子の有用性を評価した。既報¹ から、ABC のアンモニウム勾配を用い DOX の封入を試みた。ABC 300 mM pH 5.5 もしくは pH 未調整 (pH = 7.8)、DOX : 脂質 = 1:10 (wt:wt)、37°C 24 時間インキュベート条件で DOX を封入した結果、pH5.5 ABC を用いることで 90% の DOX 封入ナノ粒子を得ることができた。このナノ粒子を 55°C で加温し、DOX 放出について評価した。結果、60 分間加温しても DOX の放出は確認できなかった。この原因が pH 及び ABC 濃度に起因すると考え、2.7 M もしくは過飽和 ABC を用いて検討を進めた。加えて、脂質組成及び構成脂質にも着目し、PMPC の他、PMPC の相転移温度 (28°C) よりも高い DPPC、DSPC に置き換えて検討を行なった。DSPC : コレステロール : PEG 脂質 = 54 : 44 : 3 (mol ratio)、脂質溶液 : ABC 溶液 (過飽和) の混合比 1 : 5、DOX : 脂質 = 1:10 (wt:wt)、37°C 24 時間インキュベート条件で作製した結果、およそ 150 nm PDI 0.2、DOX 内封率が約 50% の DOX 封入ナノ粒子を得ることができた。しかしながら既報^{1, 2} と比較し、内封率が不十分であること、DOX 封入後の粒子径が想定よりも大きいことから、マイクロ流体技術を用いての CO₂ 産生ナノ粒子を作製することは困難と考え、既報^{1, 2} でも用いられている薄膜法での作製を試みることにした。

薄膜法を用いた CO₂ 産生ナノ粒子の作製では、まず DOX 封入の最適条件を検討する為、水和時における ABC 濃度を 150、200、253、1000 mM とふって検討した。結果、150 mM で 99%、200 mM で 80%、253 mM で 70%、1000 mM ではわずか 8% の DOX 封入率を示した。この結果から、ABC 200 mM 条件で封入した DOX 封入リポソームの加温による DOX 放出を試みた。しかし、50°C 加温条件でも DOX の放出は観察されなかった。DOX の放出を速やかにすべく、構成脂質を DPPC : MSPC : PEG 脂質 = 21.6 : 2.6 : 1 (mol ratio) とし、同様の条件で検討を進めた。結果、300 mM ABC 以下の条件で DOX 内封率 80% 以上のナノ粒子を得ることができた。更に本ナノ粒子を 42°C で加温すると、DOX の放出が観察された。また ABC 濃度が高いほど DOX 放出率は高く、CO₂ 産生効率が良いことが示唆された。この結果を踏まえ、本リポソームによる膀胱がん細胞への殺細胞効果について検証した。ABC を含まない、硫酸アンモニウムを用いて DOX を封入したリポソームを、コントロールリポソームとして用いた。結果、DOX 封入 CO₂ 産生ナノ粒子を処理した群において、DOX 単独と比較し、十分な殺細胞効果を得ることはできなかった。一方で、CO₂ 産生ナノ粒子は添加量依存的な殺細胞効果を示したことから、コントロールリポソームと比較した場合に有意な殺細胞効果が示された。この結果より、加温によって CO₂ 産生が促され DOX の放出が起こった結果、コントロールリポソームよりも殺細胞効果が向上したことが示唆された。

本研究当初の想定と異なり、マイクロ流体技術を用いての DOX 封入 CO₂ 産生ナノ粒子を作製することは困難であった。ABC は加温すると CO₂ を産生することから、ナノ粒子を作製する際に加温することができない。しかしながらマイクロ流体技術を用いることで、DSPC のような相転移温度が高い脂質を用いても加温することなく、小さい粒径を得ることができる。しかしながら、今回のように過飽和 ABC 溶液を用いる場合、調製時に有機溶媒と ABC が混合する際に ABC の結晶が形成される可能性があり、そのため粒子が不安定化する可能性が示唆された。加えて、過剰な ABC を含むためアンモニア濃度が上昇し、その結果リポソームへの DOX 封入が阻害されている可能性が示唆される³。これは薄膜法で ABC 濃度条件について検討

した結果でも、ABC濃度上昇に伴いDOX封入率は減少したことから、本可能性は高いと考えられる。最終的に脂質組成 DPPC : MSPC : PEG 脂質 = 21.6 : 2.6 : 1 (mol ratio) で作製した DOX 封入 CO₂ 産生ナノ粒子を用いることで、がん治療における温熱療法 (ハイパーサーミア) で用いられる 42°C という温度で ABC 濃度依存的に DOX の放出が確認できたことから、加温による CO₂ の産生が示唆され、まだ課題は残るものの、加温による殺細胞効果の増強が示された。より効果を高めるためには CO₂ 産生量の向上が課題となる。今回の検討から、過剰な ABC を用いると DOX 封入率に課題が生じるため、CO₂ 産生量と DOX 封入率のバランスを考慮した最適化が必要であると考えられる。以上、超音波による CO₂ ガスの検出など検討する余地はあるものの、本申請研究によって、超音波を利用したがんに対する診断・治療システムの基盤となる CO₂ 産生ナノ粒子の開発に成功した。今後更なる改善を図ることで、CO₂ ガスによる超音波造影や in vivo での抗腫瘍効果の検討を進めていきたい。

(引用文献)

1. Chen KJ, Liang HF, Chen HL, Wang Y, Cheng PY, Liu HL, Xia Y, Sung HW. A thermoresponsive bubble-generating liposomal system for triggering localized extracellular drug delivery. *ACS Nano*. 2013, 7(1):438-46. doi: 10.1021/nn304474j. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23240550.
2. Han HD, Jeon YW, Kwon HJ, Jeon HN, Byeon Y, Lee CO, Cho SH, Shin BC. Therapeutic efficacy of doxorubicin delivery by a CO₂ generating liposomal platform in breast carcinoma. *Acta Biomater*. 2015, 24:279-285. doi: 10.1016/j.actbio.2015.06.019. Epub 2015 Jun 20. PMID: 26102337.
3. Yamamoto E, Hyodo K, Suzuki T, Ishihara H, Kikuchi H, Kato M. Simulation of Stimuli-Responsive and Stoichiometrically Controlled Release Rate of Doxorubicin from Liposomes in Tumor Interstitial Fluid. *Pharm Res*. 2018, 35(5):103. doi: 10.1007/s11095-018-2380-y. PMID: 29557075.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱野展人、庄子雅人、根岸洋一
2. 発表標題 がんセラノスティクスを目的としたCO2産生リポソームに関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱野展人、庄子雅人、根岸洋一
2. 発表標題 がんの診断・治療への応用を目指したCO2産生リポソームの開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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