

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21914

研究課題名（和文）転移性骨腫瘍治療を指向した機能性ナノカーボン粒子の創製

研究課題名（英文）Development of functional nanocarbon particles for the treatment of bone metastasis

研究代表者

中村 真紀（Nakamura, Maki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・研究グループ長

研究者番号：00568925

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：転移性骨腫瘍では、破骨細胞の活性化により骨の吸収が過剰に進行する。本研究では、新たな転移性骨腫瘍治療システムの創製に向けて、薬剤キャリアとして有望なナノカーボンに治療薬（骨吸収抑制剤）を搭載した複合ナノ粒子を作製した。その際、骨の主要無機成分であるリン酸カルシウムを仲介させることにより、ナノカーボンと骨吸収抑制剤の複合化に成功した。また、細胞実験により、作製した複合ナノ粒子が強力な破骨細胞抑制効果を示すことを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性骨腫瘍では、骨に到達したがん細胞が破骨細胞を活性化することで骨の吸収や損傷が進み、患者の生活の質（QOL）を著しく低下させる。本研究では、患部において破骨細胞の活性を低下させ、骨の再生を促進することのできる転移性骨腫瘍治療システムの創製に向けて、ナノカーボンに骨吸収抑制剤を搭載した複合ナノ粒子の作製法を確立した。本複合ナノ粒子は、骨吸収抑制剤の単独使用に比べて、少量の薬剤の使用で破骨細胞抑制効果を発揮したことから、副作用の少ない新たな治療法への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In bone metastasis, the activation of osteoclasts leads to excessive bone resorption. In this study, we fabricated composite nanoparticles by loading therapeutic agents (bone resorption inhibitors) onto nanocarbons, promising drug carriers, for the development of a novel treatment system for bone metastasis. In this process, calcium phosphate, the main inorganic component of bone, mediated the loading of bone resorption inhibitors on nanocarbons. The resulting composite nanoparticles exhibited strong anti-osteoclast effects as revealed by cell experiments.

研究分野：ナノ材料化学、生体材料学

キーワード：転移性骨腫瘍 ナノカーボン ビスホスホネート リン酸カルシウム 破骨細胞 複合ナノ粒子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

通常、骨では、骨形成に寄与する骨芽細胞と、骨吸収に寄与する破骨細胞がバランス良く働いている。しかし、がんが骨に転移すると、破骨細胞の活性化により骨吸収が促進され、骨がもろくなる。そのため、骨折や強い痛みを生じるなど患者の生活の質 (QOL) が著しく低下する。薬物療法の1つとして、ビスホスホネートなどの骨吸収抑制剤による治療が行われているが、全身循環による重篤な副作用例も報告されており、少量の薬剤で効果を発揮する治療法の開発が望まれている。

研究代表者らは、ナノカーボン材料の一種であるカーボンナノホーン (CNH) の薬剤キャリアとしての有用性に着目してきた[1, 2]。CNHは、直径 100 nm 程度の球状構造を有し、特に疎水性物質の吸着能力に優れる。また、細胞実験や動物実験から、比較的低毒性であること、免疫細胞の一種であるマクロファージに取り込まれやすいことなどが報告されている。さらには、骨形成促進効果を有することも報告され[3]、骨周辺環境での応用が期待されている。

このように CNH は薬剤キャリアとして多く研究されており、破骨細胞に対しても有用な薬剤キャリアとなり得ると考えられた。そこで研究代表者らは、CNH にビスホスホネートを搭載 (担持) した複合ナノ粒子が、少量の薬剤の担持でも破骨細胞抑制効果を発揮できると考え、研究に着手することとなった。

2. 研究の目的

本研究では、患部において破骨細胞の活性を低下させ、骨の再生を促進することのできる転移性骨腫瘍治療システムの創製に向けて、CNH にビスホスホネートを担持した複合ナノ粒子を作製し、その破骨細胞抑制効果などを細胞実験により実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 複合ナノ粒子の作製

CNH に酸化処理を施し、水への分散が可能な酸化 CNH (OxCNH) とした[4]。ビスホスホネートとして、イバンドロン酸 (IBN)、ゾレドロン酸 (ZOL)、パミドロン酸 (PAM) を検討した (図 1)。OxCNH ならびにビスホスホネートを、CaP 過飽和溶液 (カルシウムイオンやリン酸イオンなどにより構成) と混合し、反応液とした (Ca: 3.7-6.6 mM, P: 1.8-3.3 mM, OxCNH: 50 µg/mL, IBN/ZOL/PAM: 0.074 mM)。この反応液を 25°C で 30 分静置し、生成物を遠心操作で洗浄・回収して試料を得た。なお、反応液の調製の際には、薬事承認を受けている医療用注射液のみを原料とした。

(2) 試料の構造・組成評価

(1) で得られた試料の構造・組成を、走査電子顕微鏡 (SEM) 観察、透過電子顕微鏡 (TEM) 観察、エネルギー分散型 X 線分光法、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法、高速液体クロマトグラフ法などにより調べた。

(3) マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7 細胞) に対する複合ナノ粒子の評価

破骨細胞の前駆細胞である RAW264.7 細胞に複合ナノ粒子を添加し、24 時間後に細胞生存率評価 (cell counting kit-8 を使用)、細胞取込量測定 (細胞内に取り込まれた OxCNH を紫外可視分光法により定量) を行った。また、細胞内のリソソームを染色 (LysoTracker を使用) した上で、顕微鏡観察を行った。なお、比較のため、OxCNH 単体ならびにビスホスホネート単体 (IBN、ZOL、PAM) の評価も行った。

(4) 破骨細胞に対する複合ナノ粒子の評価

破骨細胞への分化を誘導するタンパク質である receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) を加えた培地中で RAW264.7 細胞を培養し、4 日後に破骨細胞を得た。この破骨細胞に複合ナノ粒子を添加し、24、48 時間後に細胞生存率評価 (alamarBlue を使用) を行った。

また、複合ナノ粒子を RAW264.7 細胞と共存させた状態で、RANKL により破骨細胞への分化を誘導した。培養 4 日後に破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼで染色し、1 ウェル内の破骨細胞数をカウントすることで分化状態の評価を行った。

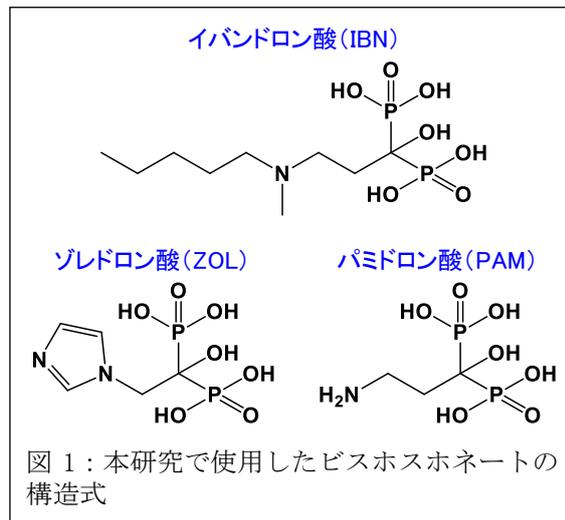


図 1: 本研究で使用したビスホスホネートの構造式

4. 研究成果

(1) CNH にビスホスホネートを担持した複合ナノ粒子の作製[5, 6]

まず、OxCNH と IBN を水中で混合したが、強力な疎水基を持たない IBN は、疎水性の高い OxCNH にはほとんど吸着せず、直接複合化することはできなかつた。そこで、IBN と親和性の高いリン酸カルシウム (CaP) に着目し、CaP を仲介して IBN を OxCNH と複合させることを考えた。

CaP 過飽和溶液と OxCNH、IBN を混合し、反応液とした。この反応液から得られた試料の構造・組成解析により、OxCNH、IBN、CaP の 3 成分から成る複合ナノ粒子 (OxCNH-IBN-CaP) が得られたことが分かった。得られた複合体は、OxCNH の表面に、IBN を含む CaP のナノ粒子が多数付着した構造をとっていた (図 2)。OxCNH の表面にはカルボキシル基などの含酸素官能基が導入されており[4]、それを起点として IBN を含む CaP が成長し、複合ナノ粒子を形成したと考えられる。

また、IBN の代わりに ZOL や PAM を用いた場合でも、同様に 3 成分から成る複合ナノ粒子 (OxCNH-ZOL-CaP、OxCNH-PAM-CaP) が得られた。

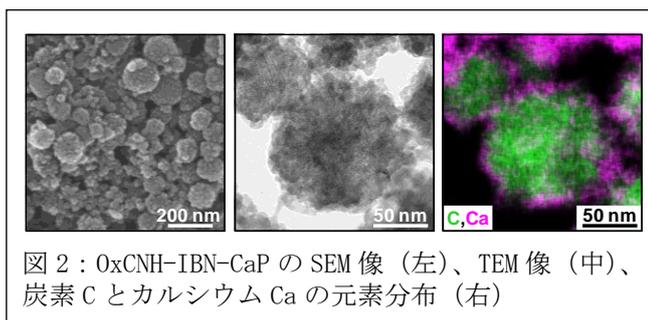


図 2 : OxCNH-IBN-CaP の SEM 像 (左)、TEM 像 (中)、炭素 C とカルシウム Ca の元素分布 (右)

(2) RAW264.7 細胞に対する複合ナノ粒子の評価[5, 6]

3 種類の複合ナノ粒子 (OxCNH-IBN-CaP、OxCNH-ZOL-CaP、OxCNH-PAM-CaP) を RAW264.7 細胞に添加し、細胞応答を評価した。その結果、複合ナノ粒子の濃度依存的に細胞生存率が減少し、その効果は OxCNH やビスホスホネートを単体で添加した場合と比べて強くなった。顕微鏡観察の結果、細胞内に取り込まれた複合ナノ粒子はリソソーム内に集積していた。細胞内消化を担うリソソーム内部は弱酸性に保たれており、そこでリン酸カルシウムが徐々に溶解し、ビスホスホネートを放出、細胞死を引き起こしたと考えられた。

高粒子濃度条件での細胞生存率抑制効果は、OxCNH-PAM-CaP \approx OxCNH-ZOL-CaP > OxCNH-IBN-CaP の順であった。ビスホスホネート単体の細胞生存率抑制効果が、PAM \approx ZOL > IBN の順であったことから、細胞内に放出されたビスホスホネートが細胞生存率の抑制に寄与したと考えられた。また、細胞への取込量は、OxCNH-PAM-CaP > OxCNH-ZOL-CaP > OxCNH-IBN-CaP の順であり、細胞生存率抑制効果と相関していた。複合ナノ粒子が多く細胞内に取り込まれることで、細胞内に放出されるビスホスホネート量が多くなったと考えられた。以上より、複合ナノ粒子に担持されるビスホスホネートの種類の違いが、複合ナノ粒子の細胞取込量に影響を与え、さらには、細胞生存率抑制効果にも影響を与えることが示唆された。

(3) 破骨細胞に対する複合ナノ粒子の評価[5, 6]

RAW264.7 細胞を分化させて得た破骨細胞に、3 種類の複合ナノ粒子を添加し、細胞応答を評価した。その結果、複合ナノ粒子の濃度依存的に細胞生存率が減少し、その効果は OxCNH やビスホスホネートを単体で添加した場合と比べて強くなった (図 3)。以上より、複合ナノ粒子では、少量のビスホスホネートでも破骨細胞抑制効果を発揮できることが明らかとなった。

また、3 種類の複合ナノ粒子の中では、OxCNH-ZOL-CaP \approx OxCNH-IBN-CaP > OxCNH-PAM-CaP の順であった。なお、3 種の複合ナノ粒子の細胞生存率の濃度依存性は、それぞれのビスホスホネートを単体で添加した場合と類似していた。すなわち、複合ナノ粒子の細胞生存率抑制効果は、ビスホスホネートそれ自体の細胞生存率抑制効果の影響を強く受けることが示唆された。

また、RAW264.7 細胞を破骨細胞に分化させる際に複合ナノ粒子 (OxCNH-ZOL-CaP) を共存させ、破骨細胞への分化に複合ナノ粒子が与える影響についても検討した。その結果、複合ナノ粒子の濃度依存的に RAW264.7 細胞から分化する破骨細胞の数が減少し、特に高濃度条件で添加した場合には、細胞がほとんど観察されなかつた。(2)での検討により、同濃度条件での RAW264.7 細胞に対する細胞生存率抑制効果が強力であったことから、分化をする前に RAW264.7 細胞が大幅に減少したと考えられた。また、OxCNH 自身が破骨細胞への分化を抑制する可能性を示唆する結果も得られた。

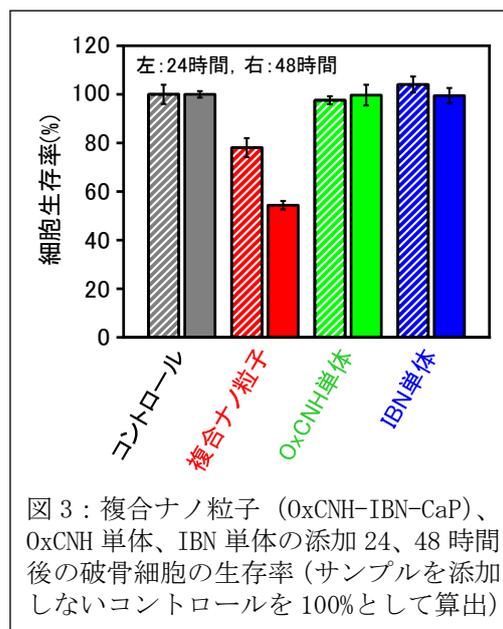


図 3 : 複合ナノ粒子 (OxCNH-IBN-CaP)、OxCNH 単体、IBN 単体の添加 24、48 時間後の破骨細胞の生存率 (サンプルを添加しないコントロールを 100%として算出)

<引用文献>

- [1] M. Zhang, M. Yudasaka, “Carbon nanohorns and their high potential in biological applications”, *Carbon Nanoparticles and Nanostructures*, eds. N. Yang, X. Jiang, D.W. Pang, Springer, Cham, 2016, p77-107.
- [2] 中村 真紀, 湯田坂 雅子, 「炎症性疾患の治療を指向したカーボンナノホーン薬剤キャリアの開発」, *生物工学*, 2017, **95**, 715-718.
- [3] 平田恵理, 「ナノカーボンと骨再生」, *生物工学*, 2017, **95**, 712-714.
- [4] M. Zhang, M. Yudasaka, K. Ajima, J. Miyawaki, S. Iijima, “Light-assisted oxidation of single-wall carbon nanohorns for abundant creation of oxygenated groups that enable chemical modifications with proteins to enhance biocompatibility”, *ACS Nano*, 2007, **1**, 265-272.
- [5] M. Nakamura, K. Ueda, Y. Yamamoto, K. Aoki, M. Zhang, N. Saito, M. Yudasaka, “Ibandronate-loaded carbon nanohorns fabricated using calcium phosphates as mediators and their effects on macrophages and osteoclasts”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, **13**, 3701-3712.
- [6] M. Nakamura, K. Ueda, Y. Yamamoto, K. Aoki, M. Zhang, N. Saito, M. Yudasaka, “Bisphosphonate type-dependent cell viability suppressive effects of carbon nanohorn-calcium phosphate-bisphosphonate nanocomposites”, *Biomater. Sci.*, 2022, **10**, 6037-6048.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Maki Nakamura, Katsuya Ueda, Yumiko Yamamoto, Kaoru Aoki, Minfang Zhang, Naoto Saito, Masako Yudasaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Bisphosphonate type-dependent cell viability suppressive effects of carbon nanohorn-calcium phosphate-bisphosphonate nanocomposites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 6037 ~ 6048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2bm00822j	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 中村 真紀, 湯田坂 雅子, 上田 勝也, 青木 薫, 齋藤 直人	4. 巻 39
2. 論文標題 転移性骨腫瘍治療に向けたビスホスホネート内包ナノ複合体の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオマテリアル	6. 最初と最後の頁 268-269
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 -

1. 著者名 Maki Nakamura, Katsuya Ueda, Yumiko Yamamoto, Kaoru Aoki, Minfang Zhang, Naoto Saito, Masako Yudasaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Ibandronate-Loaded Carbon Nanohorns Fabricated Using Calcium Phosphates as Mediators and Their Effects on Macrophages and Osteoclasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 3701 ~ 3712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsaami.0c20923	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村 真紀, 山本 由美子, 張 民芳, 上田 勝也, 青木 薫, 齋藤 直人, 湯田坂 雅子
2. 発表標題 転移性骨腫瘍の治療を目指した骨吸収抑制剤担持ナノカーボン複合体
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 真紀, 山本 由美子, 張 民芳, 上田 勝也, 青木 薫, 齋藤 直人, 湯田坂 雅子
2. 発表標題 ビスホスホネートを担持したリン酸カルシウム・ナノカーボン複合体 - 破骨細胞への分化に与える影響 -
3. 学会等名 日本セラミックス協会 第36回秋季シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 真紀, 山本 由美子, 張 民芳, 上田 勝也, 青木 薫, 齋藤 直人, 湯田坂 雅子
2. 発表標題 ビスホスホネートを担持したリン酸カルシウム・ナノカーボン複合体 - ビスホスホネートの種類に依存した細胞応答性の検証 -
3. 学会等名 日本セラミックス協会 第35回秋季シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 真紀, 山本 由美子, 張 民芳, 上田 勝也, 青木 薫, 齋藤 直人, 湯田坂 雅子
2. 発表標題 ビスホスホネートを担持したリン酸カルシウム・ナノカーボン複合体 - ビスホスホネートの種類に依存した影響 -
3. 学会等名 日本セラミックス協会 2022年年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 真紀, 上田 勝也, 山本 由美子, 青木 薫, 張 民芳, 齋藤 直人, 湯田坂 雅子
2. 発表標題 Fabrication of bisphosphonate-loaded carbon nanohorns and their in vitro evaluation
3. 学会等名 第62回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 真紀, 上田 勝也, 山本 由美子, 青木 薫, 張 民芳, 齋藤 直人, 湯田坂 雅子
2. 発表標題 転移性骨腫瘍の治療を目指したビスホスホネート担持ナノカーボン複合体の開発
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 真紀, 上田 勝也, 山本 由美子, 青木 薫, 張 民芳, 齋藤 直人, 湯田坂 雅子
2. 発表標題 Fabrication of Nanocomposites Containing Bisphosphonates and Their Effects on Macrophages and Osteoclasts
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials and the 8th Asian Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田 勝也, 鎌仲 貴之, 出田 宏和, 三村 哲彦, 岡本 正則, 青木 薫, 中村 真紀, 湯田坂 雅子, 羽二生 久夫, 齋藤 直人
2. 発表標題 Carbon nanohorn-Bisphosphonate複合体の材料学的評価および細胞応答性評価
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 真紀, 上田 勝也, 山本 由美子, 青木 薫, 張 民芳, 齋藤 直人, 湯田坂 雅子
2. 発表標題 ビスホスホネートを担持したリン酸カルシウム - ナノカーボン複合体の作製と細胞応答性評価
3. 学会等名 日本セラミックス協会 第34回秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ビスホスホネート含有カーボン粒子複合体及びその製造方法	発明者 湯田坂 雅子、中村 真紀、齋藤 直人、青 木 薫、上田 勝也	権利者 産業技術総合研 究所、信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-500417	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

転移性骨腫瘍を治療するための薬剤を内包したナノ複合体を開発 https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2021/pr20210107/pr20210107.html
--

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
研究協力者	湯田坂 雅子 (Yudasaka Masako)		
研究協力者	齋藤 直人 (Saito Naoto)		

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