

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550165

研究課題名（和文） 急性心筋梗塞の非侵襲的な早期診断に適した磁性ナノ粒子の開発

研究課題名（英文） Development of magnetic nanoparticles for non-invasive early diagnosis of acute myocardial infarction

研究代表者

堤内 要 (TSUTSUMIUCHI KANAME)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：50329851

研究成果の概要（和文）： 高温熱分解法を用いて4-メチルカテコール(4-MC)や *N*-ビニル-2-ピロリドン/メタクリル酸メチル/メタクリル酸三元共重合体[P(VP-MMA-MA)]で被覆されたマグネタイトナノ粒子 (MNPs) を調製した。マクロファージに高い特異性がある標的分子を結合させた磁性ナノ粒子の調製法を開発し、磁性粒子が核磁気共鳴画像法 (MRI) の強力な造影効果を示すことを利用して、急性心筋梗塞の原因となる不安定プラークを非侵襲的に早期診断できる材料の開発を行った。

研究成果の概要（英文）： Ligands-bound magnetite nanoparticles (MNPs) have been expected as enhancing agents for magnetic resonance imaging (MRI). To develop MNPs for non-invasive early diagnosis of acute myocardial infarction, we prepared MNPs coated with 4-methylcatechol (4-MC) and *N*-vinyl-2-pyrrolidone/methyl methacrylate/methacryl acid terpolymer [P(VP-MMA-MA)] by thermal decomposition of iron pentacarbonyl, and conjugated MNPs with ligand molecules to target macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ナノ材料・磁性・マグネタイト・マクロファージ・標的指向性・

核磁気共鳴画像法 (MRI) ・造影剤・がん

1. 研究開始当初の背景

研究分担者の小林は、直径 10 nm のマグネタイト微粒子をリポソームで包み、がん細胞を特異的に認識する抗体タンパク質を化学的に結合させた発熱素材 (AML) を調製し、交番磁界を照射する形式のがん温熱療法を 10 年以上研究してきた。中部大学に設置したクリーン度が高い調製室で患者用にこの

素材を調製し、信州大学医学部で平成 19 年 10 月に初めて臨床応用された。研究分担者の小林はもっと多くのがん治療の臨床応用を主として研究する事としていた。しかし、同じ学科に勤務する研究代表者で、比較的近い研究分野である堤内がこの研究の発展形を考えた。発熱素材の AML の平均粒子径は 120nm であるが、毛細血管を通過して悪性

腫瘍部位に集積することから、がん治療には利用できる。マグネタイトは強力な MRI 造影剤として利用できることを研究分担者は 12 年前に報告している。マグネタイト微粒子を特定の細胞に集積できれば、特定の細胞が MRI で容易に診断できるであろう。しかし、粒子径が 120nm の素材はがん以外の病気の診断や治療には利用できない。本研究では、20 ~ 30 nm 程度の小さな素材を新たに調製し、特定の細胞にのみ集積できるようにデザインして、MRI による早期診断が可能であることを実証することとした。

2. 研究の目的

本研究で開発目標とする診断対象は、死亡順位が 2 番目の心疾患で、なかでも最も重要な急性心筋梗塞の早期診断である。そして、特定の細胞としてはマクロファージと考えている。動脈硬化は、虚血性心疾患や諸々の血管障害の原因となる病変である。動脈硬化症では、正常な血管(右図上)の内膜の中で脂質が徐々に蓄積し、右図中に示したように不安定なプラークが形成される。プラークの形成には、酸化 LDL(Oxidized Low Density Lipoprotein)とマクロファージ細胞が大きく関係している。血中 LDL が多くなると血管壁内で酸化された LDL も多くなり、マクロファージが不安定プラークの中に入り込み、マクロファージ細胞表面のレセプターから酸化 LDL を取り込んで、最終的に右図中に示したように泡沫化細胞となる。最近の心臓内科学

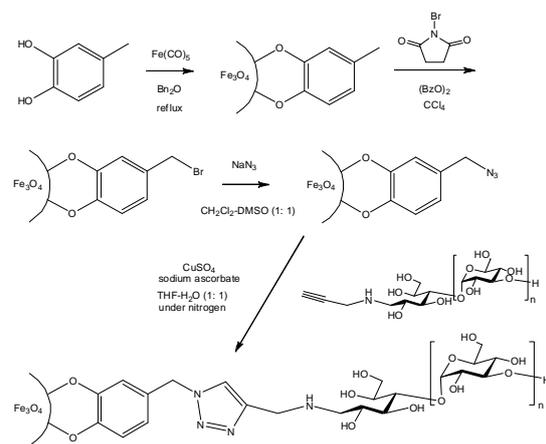


では、このプラークが何かの衝撃などで右図下に示したように破綻してしまい、高粘性液体が血管中に放出され、血栓ができる、とされている。この血栓が心臓の毛細血管で詰まって血流を遮断すれば急性心筋梗塞であり、脳の毛細血管で詰まって血流を遮断すれば脳梗塞となる。この原因となる不安定プラークを早期に診断する非侵襲的な手段は今のところなく、一刻も早い開発が望まれている。毛細血管は一層の内皮細胞からなる最も細い血管です。内皮細胞の壁には、多くの 10nm 程度の小孔と比較的少ない 60nm 程度の大きな孔が存在すると云われています。悪性腫瘍組織では増殖のために多くの酸素が要求され

ます。そのため、新しい血管が構築されます。しかし、新生血管では構築中のために血管内皮細胞がまだきちんと構築されていない。120 nm の AML が血管から悪性腫瘍部位に集積することを研究分担者は 10 年前に実証した(腎細胞がんの動物モデルを作成し、このがんに対するモノクローナル抗体を結合させた AML を使用してマグネタイト微粒子の腎細胞がんへの DDS (Drug Delivery System)を示した)。もっと小さな粒子径の素材を開発できれば、生体中の特定細胞に磁性微粒子を DDS できるはずである。不安定プラークにはマクロファージを中心とする炎症性細胞が侵入する。これらの細胞の直径は 20 μ m もあるが、マクロファージは形を変えて不安定プラークの壁にある大きな孔(60 nm 程度)を通過するといわれている。当然、20 ~ 30 nm のナノ粒子は不安定プラーク壁を通過し、粒子表面の標的分子の働きによってマクロファージへ特異的に磁性微粒子が DDS されるであろう。そうすれば、MRI で不安定プラークの存在位置の診断が非侵襲的に可能となり、急性心筋梗塞の治療も早期に可能になると期待される。

3. 研究の方法

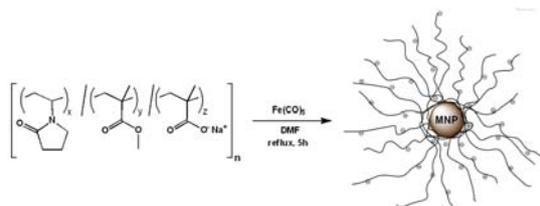
標的指向性マグネタイトナノ粒子の調製は以下の 2 つの方法で行った。①4-メチルカテコール(4-MC)存在下、鉄アセチルアセトンを高温熱分解し、生成したマグネタイトナノ粒子[(4-MC)_n-MNPs]表面の 4-MC 分子を用いて抗体やリガンド分子を置換する方法(図式 1)、②N⁺ピ



図式 1

ニル-2-ピロリドン/メタクリル酸メチル/メタクリル酸三元共重合体[P(VP-MMA-MA)]存在下、鉄ペンタカルボニルを高温熱分解し、そのカルボキシル基を用いて抗体やリガンド分子を置換する方法(図式 2)である。これら 2 つの方法を用いてマクロファージや泡沫化細胞への指向性を有する磁性ナノ粒子

の調製とその評価を行った。一方、マクロフ



図式 2

ァージを指向するためのリガンド分子としては、マクロファージ上のデクチン-1 というレセプターに認識される(1→3)-β-D グルカンと、心筋症発症の予測マーカーとして期待されているタンパク質 pentraxin 3 (PTX3) に対する抗体 (抗 PTX3 抗体) を検討した。ただし、抗 PTX3 抗体は極めて高価であるため、反応条件を検討する目的で、一部の乳がんや胃がんの細胞に発現する HER-2 タンパク質のモノクローナル抗体であるハーセプチンを用いて実験を行った。

4. 研究成果

まず①の方法について報告する。図式 1 に従い 4-MC 被覆 MNP の調製し、次いで四塩化炭素中、*N,N*-ジメチルホルムアミドおよび過酸化ベンゾイルを 6 時間還流させて臭素化を行った。さらに、ジクロロメタン-DMSO 混合液 (1:1) 中、アジ化ナトリウムを室温で 48 時間反応させ、表面にアジド基を導入した MNP を調製した。一方、末端アルキンを有する(1→3)-β-D-グルコピラノースの調製は、まず、トリイソブチルアルミニウム-水-アセチルアセトン (1 : 0.4 : 0.8) 触媒を用いた 1,3-アンヒドロ-2,4,6-トリ-O-ベンジル-β-D-グルコピラノースの開環重合と、液体アンモニア中、リチウムを用いた脱ベンジル化により(1→3)-β-D-グルコピラノースを合成した。さらに 2-プロピニルアミンと水素化シアノホウ素ナトリウムで還元アミノ化することにより末端アルキンを有する(1→3)-β-D-グルコピラノースを調製した。その後、THF 中アスコルビン酸ナトリウムと硫酸銅存在下、30°C で 2 日間、クリック反応を行い、透析(分画分子量 1000kDa)で精製を行った。結果として(1→3)-β-D-グルコピラノース被覆 MNPs が 65% の収率で得られた。図 1 の透過型電子

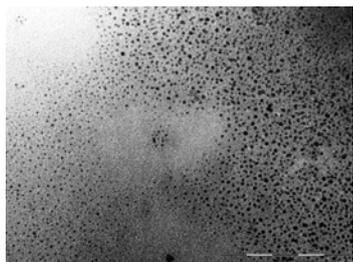


図 1. (1→3)-β-D-グルコピラノースを有する MNPs の TEM 画像。

顕微鏡 (TEM) 観察における画像からマグネタイトコアの個数平均粒子径は 3.2 nm と算出された。

また、対照としてマルトヘプタオースを有する磁性ナノ粒子も同様に合成し RAW 細胞 (マウス白血球細胞) への取込挙動を調べたところ、有意な差を認めることができた。また、(1→3)-β-D グルカン置換磁性ナノ粒子を用いて RAW 細胞と 3T3 細胞 (マウス線維芽細胞) への取込挙動でも有意な差を認めることができた (図 2)。

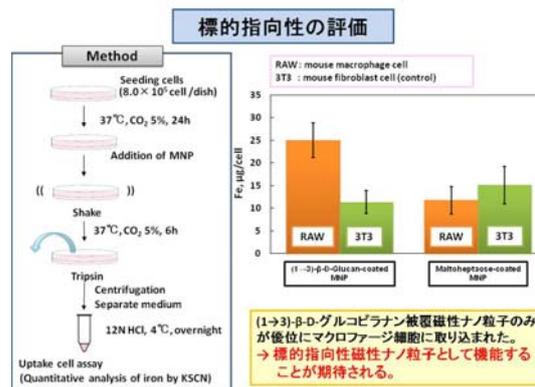


図 2. (1→3)-β-D-グルコピラノースを有する MNPs の標的指向性評価。

次に②の方法について報告する。マグネタイトナノ粒子の調製は P(VP-MMA-MA) の存在下、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 中で鉄ペンタカルボニルを 3 時間還流させて行った (図式 2)。反応液を冷却後、DMF に対し 4 倍量のアセトンを加えて遠心分離した。茶褐色の上清を回収し透析膜 (cut off 100,000) を用いて低分子量成分を除去して P(VP-MMA-MA) 被覆 MNPs [P(VP-MMA-MA)-MNPs] の水溶液を得た。これらの個数平均粒子径は透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により 8-20 nm と見積もった。

不安定プラークに集積することが期待される抗 PTX3 抗体は極めて高価であるため、本研究では初めに一部の乳がんや胃がんの細胞を指向しうるハーセプチンを用いて実験を行った。ハーセプチンとの反応は、pH 6.5 のリン酸ナトリウム緩衝液中 *N*-シクロヘキシル-*N'*-(2-モルフォリノエチル)カルボジイミド (CMCD) を用いて 4°C で 20 時間行い、透析膜 (cut off 300,000) を用いて遊離の抗体を取り除いてハーセプチンを有する P(VP-MMA-MA)-MNPs を得た。この標的指向性の確認は、HER-2 発現しているヒトがん細胞 (GLM) と HER-2 発現のないマウス線維芽細胞 (3T3) を用いて行った。さらに、ハーセプチンによる特異的な取り込みであることを確認するため、対照として HER-2 に結合しない抗体であるリツキサンでも同様の実験を

行った。なお、抗体の結合量は試料溶液 100 μL に 6.0 mol/L の塩酸を 200 μL 加えて 120°C で 24 時間分解させた後、過剰の水酸化ナトリウムを加えて鉄成分を沈殿として除去し、抗体に由来するアミノ酸を *o*-フタルアルデヒド(OPA)で蛍光標識して 355nm の励起波長による 460nm の蛍光強度から算出した。その結果、抗体結合量は粒子あたり 0.11 分子以下と導入反応にまだ課題が残ることが判明した。しかしながら、粒子あたり 0.08 分子しか抗体が結合していない試料でも、細胞取り込み試験において、HER-2 発現のあるがん細胞では HER-2 発現のない 3T3 細胞と比較して細胞取り込み量に優位な差が見られた。また、ハーセプチンとリツキサンを有するナノ粒子 7 の細胞取り込み量を比較しても、細胞取り込み量に優位な差が見られた(図 3)。

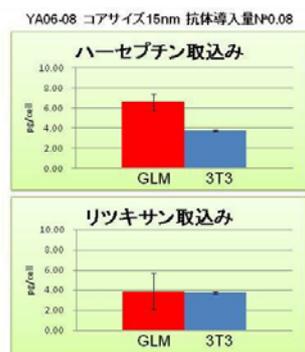


図 3. 抗体を有する P(VP-MMA-MA)-MNPs の細胞取込試験。

最後に、現時点での最適条件を用いて P(VP-MMA-MA)-MNPs に抗 PTX3 抗体を結合し、泡沫化細胞への指向性を有することが期待される磁性ナノ粒子を調製した。抗 PTX3 抗体に蛍光標識をして P(VP-MMA-MA)-MNPs に導入し、佐賀大学医学部の協力を得てマウスを用いた標的指向性の評価を行ってもらった。その結果、蛍光では標的部位への集積が認められたものの、MRI ではまだ十分な造影効果が認められなかった。従って、今後も抗体の導入反応の条件を詳細に検討する必要があると明らかになった。

以上のように、本研究では(1 \rightarrow 3)- β -D グルカン有する(4-MC)_n-MNPs を調製し、マクロファージに高い特異性があることを明らかにすることができた。また、P(VP-MMA-MA)-MNPs への抗体導入反応にはまだ改善の必要性が多々認められるものの、抗 PTX3 抗体を導入することにより、急性心筋梗塞の原因となる不安定プラークに集積する可能性が示唆される磁性ナノ粒子を調製することができた。これらの材料についてさらに研究を進めることで急性心筋梗塞を非侵襲的に早期診断できる材料が開発できると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 山城 舞, 杉村俊英, 小林 猛, 堤内 要, *N*-ビニル-2-ピロリドン/メタクリル酸メチル/メタクリル酸三元共重合体被覆マグネタイトナノ粒子の調製と特性解析, *高分子論文集*, 査読有, 2012, 印刷中.
- ② Takeshi Kobayashi, Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles, *Biotechnology Journal*, 査読有, Vol.6, No.11, 2011, pp.1342-1347. DOI:10.1002/biot.201100045
- ③ Toyone Kikumori, Takeshi Kobayashi, Masataka Sawaki, Tsuneo Imai, Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes, *Breast Cancer Research and Treatment*, 査読有, Vol.113, No.3, 2009, pp.435-441. DOI: 10.1007/s10549-008-9948-x

[学会発表] (計 14 件)

- ① 堤内 要ほか 3 名, ポリ(ビニルピロリドン-co-メタクリル酸)被覆マグネタイトナノ粒子に結合したハーセプチンの定量分析, 第 61 回高分子学会年次大会, 2012 年 5 月 29 日, パシフィコ横浜.
- ② 堤内 要ほか 3 名, 4-メチルカテコール被覆マグネタイトナノ粒子と(1 \rightarrow 3)- β -D-グルコピラナンの複合化, 第 61 回高分子学会年次大会, 2012 年 5 月 29 日, パシフィコ横浜.
- ③ 與語勇輝, 堤内 要ほか 4 名, がん温熱療法用 Fe₃O₄ ナノ粒子の最適合成条件の検討と物性評価 (II), 第 59 回応用物理学関係連合講演会, 2012 年 3 月 16 日, 早稲田大学早稲田キャンパス.
- ④ 堤内 要ほか 2 名, 抗体を有するポリ(ビニルピロリドン-co-メタクリル酸)被覆マグネタイトナノ粒子の特性解析, 第 16 回高分子分析討論会, 2011 年 10 月 26 日, 工学院大学新宿校舎.
- ⑤ 堤内 要, 小林 猛ほか 3 名, HER2 高発現胃癌細胞を指向するポリ(ビニルピロリドン-co-メタクリル酸)被覆マグネタイトナノ粒子の調製と機能, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 29 日, 岡山大学津島キャンパス.
- ⑥ 與語勇輝, 堤内 要ほか 2 名, がん温熱療法用 Fe₃O₄ ナノ粒子の合成と物性評価, 第 72 回応用物理学学会学術講演会, 2011 年 8 月 30 日, 山形大学小白川キャンパス.
- ⑦ 堤内 要, 小林 猛ほか 3 名, ハーセプ

チンを有するポリ(ビニルピロリドン-co-メタクリル酸)被覆マグネタイトナノ粒子のHER-2 高発現胃癌細胞への取込, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011年5月25日, 大阪国際会議場.

- ⑧ Kaname Tsutsumiuchi, Takeshi Kobayashi et al. (4), Analysis of 4-Methylcatechol-coated Magnetite Nanoparticles by Reactive Pyrolysis-Gas Chromatography, International Conference on Polymer Analysis and Characterization & 15th Symposium on Polymer Analysis in Japan' (ICPAC), 2010.12.10, Nagoya Congress Center.
- ⑨ 堤内 要, 小林 猛ほか 3 名, ハーセブチンを有するポリ(ビニルピロリドン-co-メタクリル酸)被覆マグネタイトナノ粒子の合成と機能, 第 59 回高分子討論会, 2010年9月16日, 北海道大学.
- ⑩ Kaname Tsutsumiuchi, Takeshi Kobayashi et al. (3), Synthesis of Carbohydrates-Coated Magnetite Nanoparticles Using Click Chemistry, 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), 2010.8.5, Makuhari Messe International Conference Hall.
- ⑪ 堤内 要, 小林 猛ほか 4 名, ポリ(ビニルピロリドン-co-メタクリル酸)誘導体を用いたマグネタイトナノ粒子の調製, 第 59 回高分子学会年次大会, 2010年5月27日, パシフィコ横浜.
- ⑫ 堤内 要, 小林 猛ほか 4 名, 磁性ナノ粒子の調製と抗体結合, 第 61 回日本生物工学会大会, 2009年9月24日, 名古屋大学.
- ⑬ 堤内 要, 小林 猛ほか 5 名, 高温熱分解法などを利用した温熱治療のための磁性ナノ粒子の調製, 日本ハイパーサーミア学会第 26 回大会, 2009年9月12日, 千葉大学.
- ⑭ 小林 猛, 磁性微粒子を利用した癌の温熱免疫療法の開発ー進行期メラノーマに対する温熱免疫療法, 日本ハイパーサーミア学会第 26 回大会, 2009年7月19日, 神戸大学.

[その他]

ホームページ等

http://stu.isc.chubu.ac.jp/bio/public/Bio_Chem/labo/tsutsumiuchi_lab/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤内 要 (TSUTSUMIUCHI KANAME)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号: 50329851

(2) 研究分担者

小林 猛 (KOBAYASHI TAKESHI)

中部大学・生物機能開発研究所・客員教授

研究者番号: 10043324