

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650621

研究課題名（和文） 多光子励起顕微鏡による DDS 製剤体内動態の新規評価法の開発

研究課題名（英文） Development of an innovative method for evaluating DDS formulation pharmacokinetics by using multi-photon excitation microscopy

研究代表者

大内 憲明 (OHUCHI NORIAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90203710

研究成果の概要（和文）：GFP 融合 EB1 発現ヒト乳癌細胞を作製し，細胞内における GFP 融合 EB1 集積部の移動速度を微小管伸長速度として測定し得た．抗癌剤投与によってその速度変化を捉えることができ，抗腫瘍効果を反映していることが示唆された．また，マウス固定装置を独自に作製し，担癌マウスの生体内においても微小管伸長速度を測定し得た．抗癌剤静脈投与後の経時の変化を測定することにより，抗癌剤の抗腫瘍効果をリアルタイムに評価できると考えられた．

研究成果の概要（英文）：We prepared GFP-fused EB1-expressing human breast cancer cells. The growth rate of the microtubule plus-end was measured using the positions of EB1 assembly over time. Analysis of the dynamics of the EB1-GFP comet showed that the microtubule growth rates decreased when the cells were treated with anticancer drugs. We also measured the microtubule growth rates in tumor-bearing mice by using an original stereotaxic instrument. Thus, alteration in EB1-GFP dynamics is an effective indicator for the effects of anticancer drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤の多くは，分子量が数百程度の低分子からなり，その特有の分子構造が細胞分裂の停止を引き起こし，細胞死へと導く能力を有している．生体内における抗がん剤の動態は受動的で，抗がん剤の種類と標的とする癌腫によってその動態は特徴付けられるため，ある抗がん剤について人為的に操作できるパラメータは限られている．

一方，近年研究開発が目まぐるしい DDS 製剤においては，既存の抗癌剤と比して，コントロールすべきパラメータが非常に多い．ドラッグキャリアを構成する材料は多様で，そ

れにより粒径も大きく異なる．また粒子の表面電荷や表面官能基，内包する抗がん剤の種類や量などによって，DDS 製剤のバリエーションは無数とも言える．

動物実験における抗がん剤の薬物効果の評価は，担がん動物の腫瘍縮小効果と薬物の血漿中や臓器，腫瘍組織中の経時的濃度変化の 2 つの大きな柱によって支えられている．前者は抗腫瘍効果を測るための簡便で直接的な指標で，後者は薬物の吸収，分布，代謝，排泄を評価するために必要不可欠で重要な指標である．しかし，DDS 製剤の体内動態を精密に制御するには，製剤の分子特性と生体

内動態の相関性を詳細に解析しながら分子レベルで製剤を改変する必要がある。そのためには生体内の薬物動態を細胞レベルで解析する手法が必要である。しかし、それを達成するためには、実験動物を用いた手技が容易でなく、また抗腫瘍効果を細胞レベルで評価することの困難さから、有用な方法論は確立されていない。これらの障壁を解決することができれば、今までは不可能であった DDS 製剤の詳細な動態解析を可能にすることができる。

2. 研究の目的

- (1) 細胞内の微小管伸長動態を腫瘍細胞活性の指標として評価する方法を確立する。
- (2) この評価系を用いて癌腫に対する抗癌剤の効果を組織内で経時的に解析する。
- (3) 本手法の妥当性を検証するとともに、新規抗癌剤の研究開発への応用を促進する。

3. 研究の方法

- (1) GFP を融合した微小管伸長端結合蛋白質 EB1 を恒常的に発現する癌細胞株を作製する。
- (2) GFP 融合 EB1 発現癌細胞株における EB1-GFP 集積部の軌跡より微小管伸長速度を測定する方法を確立する。
- (3) 作製した癌細胞株に各種抗癌剤を各濃度で投与した際の微小管伸長速度の変化を測定する。
- (4) 担癌マウスの腫瘍細胞内における微小管伸長速度を測定するための観察条件を整え、抗腫瘍効果の評価法としての妥当性を検討する。

4. 研究成果

腫瘍細胞に対する抗癌剤の抗腫瘍効果をリアルタイムで高精度評価可能な実験系を確立するため、GFP を融合した微小管伸長端結合蛋白質 EB1 を恒常的に発現するヒト乳癌細胞を作製した (図 1)。

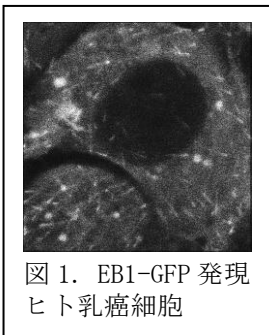


図 1. EB1-GFP 発現ヒト乳癌細胞

EB1 は微小管伸長端に数十分子がコメット状に集積する性質を持つため、EB1 集積部の GFP の蛍光重心位置を微小管伸長端とすることで (図 2)、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、その移動速度より微小管伸長速度を

測定することができた (図 3)。

微小管伸長活性は細胞の生理活性には極めて重要なことから、EB1 の蛍光移動を観察できる細胞を生細胞、EB1 の蛍光移動を観察

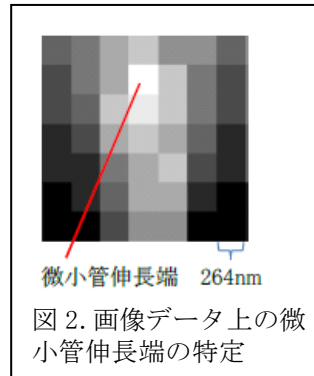


図 2. 画像データ上の微小管伸長端の特定

できない細胞を死細胞と評価した。コントロール実験として行った薬剤非投与下の条件では、微小管伸長速度は 330nm/s と計測された (図 4)。微小管脱重合阻害剤であるパクリタキセルを細

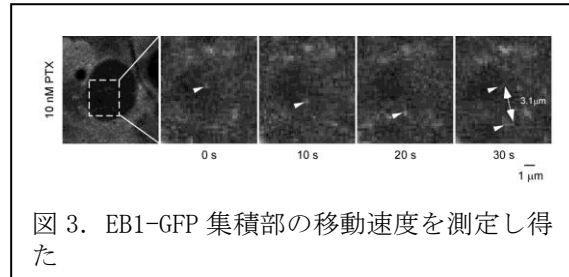


図 3. EB1-GFP 集積部の移動速度を測定し得た

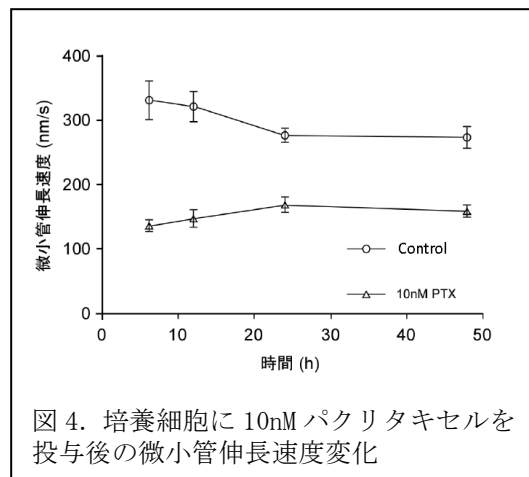


図 4. 培養細胞に 10nM パクリタキセルを投与後の微小管伸長速度変化

胞に投与すると、その投与濃度によって細胞に多様な変化が観察された。パクリタキセル 10nM 条件下では、微小管伸長速度は 150nm/s まで低下した。死細胞数はパクリタキセル濃度依存的に多くなったが、20nM の高濃度条件で生細胞がほぼ全滅状態の中においても GFP 融合 EB1 の集積部が細胞質内で移動する細胞もわずかながら観られた。以上の結果から、パクリタキセルの微小管脱重合阻害活性の波及効果として微小管伸長活性が阻害されること、また EB1 の動態解析はパクリタキセルの阻害効果を細胞個々のレベルでリアルタイム評価するのに適した方法であることが示唆された。

本法を様々な作用機序の抗癌剤に応用するために、微小管標的薬のパクリタキセル、ドセタキセル、ビノレルビン、エリブリンのほか、種々の作用機序で抗腫瘍効果を発揮するシクロホスファミド、エピルビシン、ドキソルビシン、シスプラチン、イリノテカン、フルオロウラシルについて、複数の阻害濃度

における微小管伸長速度を測定し、そのデータを収集した。抗癌剤の濃度が高くなるにつれて、細胞内の GFP 融合 EB1 の集積部の数が減少するとともに蛍光が弱わり、またその移動速度も低下する傾向がみられた。

また、EB1 による評価系を *in vivo* に応用するために、GFP 融合 EB1 発現ヒト乳癌細胞で担癌マウスを作製し、EB1 集積部の蛍光移動を評価する実験系の開発を行った。*In vivo* で1つの癌細胞内の EB1 の蛍光を追跡するためには、担癌マウスの心肺運動によるブレを極限まで抑えこむ必要がある。そのため、独自に作製したマウス固定装置を用いて(図5)、



図5. 独自に作製した装置に固定したヌードマウス

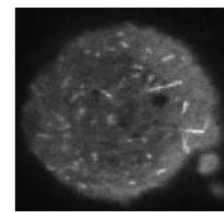


図6. 担癌マウスの癌細胞内の GFP 融合 EB1 集積部

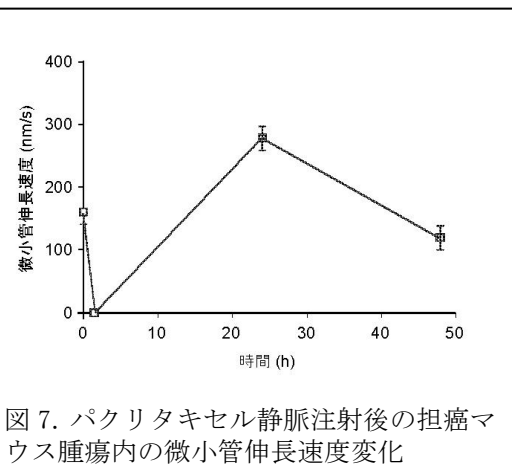


図7. パクリタキセル静脈注射後の担癌マウス腫瘍内の微小管伸長速度変化

生体内の腫瘍細胞における GFP 融合 EB1 は、僅かな環境変化や抗癌剤の組織内濃度変化などによって、計測されるその動態は大きく変化を来すものと考えられ、これらの条件を

厳密に管理することで、生体内でリアルタイムに高精度な抗腫瘍効果の測定が可能と考えられた。

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 11 件)

(1) Ma Q, Nakane Y, Mori Y, Hasegawa M, Yoshioka Y, Watanabe TM, Gonda K, Ohuchi N, Jin T. Multilayered, core/shell nanoparticles based on magnetic ferric oxide particles and quantum dots for multimodality imaging of breast cancer tumors. *Biomaterials*. 査読有. 2012;33(33):8486-8494. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.051.

(2) Gonda K, Miyashita M, Watanabe M, Takahashi Y, Goda H, Okada H, Nakano Y, Tada H, Amari M, Ohuchi N. Development of a quantitative diagnostic method of estrogen receptor expression levels by immunohistochemistry using organic fluorescent material-assembled nanoparticles. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有. 2012;426(3):409-414. doi:10.1016/j.bbrc.2012.08.105.

(3) Kobayashi Y, Minato M, Ihara K, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Synthesis of high concentration colloid solution of silica-coated AgI nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 査読有. 2012;12(8):6741-6745. doi:10.1166/jnn.2012.4531

(4) Sakurai Y, Tada H, Gonda K, Takeda M, Cong L, Amari M, Kobayashi Y, Watanabe M, Ishida T, Ohuchi N. Development of silica-coated silver iodide nanoparticles and their biodistribution. *Tohoku J Exp Med*. 査読有. 2012;228(4):317-323. doi:10.1620/tjem.228.317

(5) Kobayashi Y, I nose H, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Synthesis of Au-silica core-shell particles by sol-gel process. *Surface Engineering* 査読有. 2012;28(2):129-133. doi:10.1179/1743294411Y.0000000069

(6) Kobayashi Y, Nozawa T, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N. Fabrication and fluorescence properties of

multilayered core-shell particles composed of quantum dot, gadolinium compound, and silica. J. Mater. Sci. 査読有. 2012;47(4):1852-1859. doi:10.1007/s10853-011-5972-z

(7) Hamada Y, Gonda K, Takeda M, Sato A, Watanabe M, Yambe T, Satomi S, Ohuchi N. In vivo imaging of the molecular distribution of the VEGF receptor during angiogenesis in a mouse model of ischemia. Blood 査読有. 2011;118(13):e93-100. doi:10.1182/blood-2010-12-322842.

(8) Morimoto H, Minato M, Nakagawa T, Sato M, Kobayashi Y, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Suzuki N. X-ray imaging of newly-developed Gadolinium Compound/Silica core-shell particles. Journal of Sol-Gel Science and Technology. 査読有. 2011;59:650-657. doi:10.1007/s10971-011-2540-6

(9) Ayame T, Kobayashi Y, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N. Preparation of silica-coated AgI nanoparticles by an amine-free process and their X-ray imaging properties. J. Ceram. Soc. Jpn. 査読有. 2011;119:397-401. doi:10.2109/jcersj2.119.397

(10) Kobayashi Y, Inose H, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Control of shell thickness in silica-coating of Au nanoparticles and their X-ray imaging properties. J. Colloid Interface Sci. 査読有. 2011;358(2):329-333. doi:10.1016/j.jcis.2011.01.058.

(11) Imamura J, Suzuki Y, Gonda K, Roy CN, Gatabnaga H, Ohuchi N, Higuchi H. Single-particle tracking confirms that multivalent Tat-protein transduction domain induced Heparan-sulfate Proteoglycan (HSPG) cross-linkage activates Rac1 for internalization. J. Biol. Chem. 査読有. 2011;286(12):10581-10592. doi:10.1074/jbc.M110.187450

[学会発表] (計 27 件)

(1) N. S. Venkataraman, 根城均, 水関博志, 川添良幸, 権田幸祐, 多田寛, 大内憲明. 抗がん剤の効果的ドラッグデリバリーへ向けた第一原理計算. ナノ学会第 10 回大会. 2012 年 6 月 14-16 日. 大阪

(2) 濱中洋平, 権田幸祐, 武田元博, 白石貢一, 横山昌幸, 大内憲明. パクリタキセル内包高分子ミセルの新たな抗腫瘍効果評価法. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011 年 10 月 3-5 日. 名古屋

(3) 濱中洋平, 権田幸祐, 武田元博, 白石貢一, 横山昌幸, 大内憲明. DDS 製剤の抗腫瘍効果イメージング. 第 19 回日本乳癌学会学術総会. 2011 年 9 月 2-4 日. 仙台

[図書] (計 2 件)

(1) 権田幸祐, 渡邊朋信, 大内憲明, 樋口秀男. がん転移の生体ナノイメージング. 生物物理 “日本生物物理学会” 京都, 2011, 51:82-83

(2) 権田幸祐, 樋口秀男, 渡邊朋信, 武田元博, 大内憲明. ナノイメージングで探るがん転移の仕組み. SURGERY FRONTIER “メディカルレビュー社” 東京, 2011, 18:50-57

[産業財産権]

○出願状況 (計 11 件)

(1)
名称: 生体物質検出方法
発明者: 高梨健作, 岡田尚大, 中野寧, 権田幸祐, 大内憲明, 渡邊 みか
権利者: コニカミノルタエムジー株式会社, 国立大学法人東北大学
種類: 特許

番号: PCT/JP2012/072496
出願年月日: 平成 24 年 9 月 4 日
国内外の別: 国外

(2)
名称: 蛍光物質内包ナノ粒子およびこれを用いた生体物質の検出方法
発明者: 権田幸祐, 大内憲明, 渡邊みか, 古澤直子, 相宮拓司, 中野寧
権利者: コニカミノルタエムジー株式会社, 国立大学法人東北大学
種類: 特許

番号: 特願 2011-197340
出願年月日: 平成 23 年 9 月 9 日
国内外の別: 国内

(3)
名称: 生体物質発現レベル評価システム
発明者: 権田幸祐, 大内憲明, 渡邊みか, 相宮拓司, 角森昭教, 郷田秀樹, 中野寧
権利者: コニカミノルタエムジー株式会社, 国立大学法人東北大学
種類: 特許

番号: 特願 2011-197341
出願年月日: 平成 23 年 9 月 9 日
国内外の別: 国内

(4)
名称: 生体物質検出方法

発明者：権田幸祐，大内憲明，渡邊みか，高梨健作，岡田尚大，中野寧
権利者：コニカミノルタエムジー株式会社，
国立大学法人東北大学
種類：特許
番号：特願 2011-197339
出願年月日：平成 23 年 9 月 9 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大内 憲明 (OUCHI NORIAKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90203710

(2) 研究分担者

権田 幸祐 (GONDA KOSUKE)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80375435

甘利 正和 (AMARI MASAKAZU)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：50400312

多田 寛 (TADA HIROSHI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50436127