

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659671

研究課題名(和文) 温感性複合体(不活化センダイウイルス粒子、抗癌剤、磁性体粒子)による癌治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel formulation to make possible to multidisciplinary cancer-therapy with anti-cancer drugs, thermic, and immune treatment.

研究代表者

李 千萬 (LEE, CHUNMAN)

大阪大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：10432543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：抗腫瘍作用と免疫賦活作用を有するヒトセンダイウイルス含有免疫複合体を作製し、さらに抗癌剤、磁性体粒子を含んだナノファイバーを開発した。このファイバーは交流磁場印加のON-OFFにより自己発熱と抗癌剤の放出を同時に実現でき、抗癌剤放出の制御を交流磁場印加によりコントロールできた。ヒト胸膜中皮腫細胞、悪性黒色腫細胞、肺癌細胞に対する高い細胞増殖抑制効果を示し、ヒト肺癌皮下腫瘍モデルマウスに対し、交流磁場印加により、無治療群や抗癌剤非含有群に比し皮下腫瘍の抑制効果を認めた。交流磁場印加による抗癌剤の制御が可能となり、さらに抗腫瘍免疫の賦活化により質の高い抗腫瘍療法が可能となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We developed the novel formulation of Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ-E) and Glycol Chitosan. This formulation will activate the anti-tumor immunity, and it is easy to add this formulation to the following fiber mesh sheet. Then, we developed the novel nano-fiber sheet including PNIPAAm derivatives, anti-cancer drug, and magnetic substance. We can do the thermal therapy in the cancer treatment by adding the alternating magnetic field. Additionally, we control the drug release from this fiber by turning ON the switch of alternating magnetic field. In the cytotoxicity assay, this fiber with magnetic field revealed high cytotoxic activity against human mesothelioma, melanoma, and lung cancer cells. In vivo experiments, this fiber with magnetic field made tumor-bearing mice high body temperature (42-43 degree), and this fiber revealed anti-tumor effect. We expected to achieve the multimodal therapy for the intractable cancer by novel fiber and the alternating magnetic field.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・呼吸器外科

キーワード：呼吸器外科 温熱治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌が腹腔や胸腔に散らばった「播種性腫瘍病変」に対しては、可能であれば、可及的に癌を切除する volume reduction surgery を行った後に、抗癌剤治療、放射線治療、温熱療法や免疫療法を行うことが試みられている。また、近年新規製剤の開発により、生体への侵襲の強い外科的治療を行わずに、第一選択として抗癌剤治療、選択的放射線治療、免疫療法が試みられている。しかしながら、根治性に関しては未だ十分な結果は得られていないのが現状である。

(2) 温熱治療は以前から抗癌剤治療と組み合わせた温熱化学療法として行われており、近年免疫の賦活などの有効な報告が多くなされているが、標的の温度維持などの問題点がある。また、温熱療法の適応となる疾患は、「播種性腫瘍病変」が多く、病変が広範囲に及ぶため、腫瘍選択性を有し、抗腫瘍効果の向上した治療法が開発が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 我々は、これまでに比べ容易な方法で集学的癌治療を行うことが可能となる温度応答体、抗癌剤、免疫賦活剤などを組み合わせた新規温度応答性複合体を開発することを目的とした。

(2) 腫瘍選択性が高く、免疫賦活作用のある複合体を開発し、温熱療法の抗腫瘍効果向上を目指す。

(3) 抗癌剤の局所濃度を交流磁場の印加によりコントロールできる、抗癌剤含有新規温度応答性複合体を開発する。

3. 研究の方法

(1) 温度応答体(磁性粒子、マグネタイト粒子)、不活化センダイウイルス粒子 Hemagglutinating Virus of Japan Envelope (HVJ-E)、ヒアルロン酸 Hyaluronic acid (HA) を含有した安定した温感複合体を開発するための条件検討を行い、抗腫瘍効果を検討した。

(2) 温度応答性ポリ N-イソ・プロピル・アクリル・アミド (PNIPAAm)、マグネタイト粒子、抗癌剤を含有したナノファイバー不織布を作製し、その温熱効果ならびに抗腫瘍効果を検討した。

4. 研究成果

(1) HVJ-E を基盤として、マグネタイト粒子と CD44 のリガンドである HA とを含有した新規温度応答性複合体を作製した。

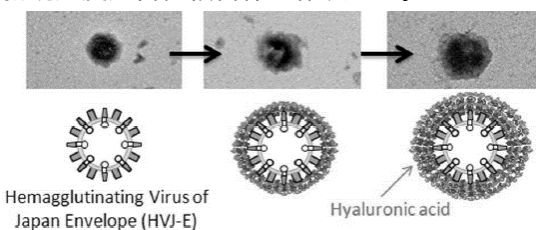


図1 HVJ-Eの積層法による新規粒子の作製

基盤にカチオン性ポリマー溶液とアニオン性ポリマー溶液を相互に浸けることで基盤上にイオン複合体のナノ薄膜を積層させる相互積層法 (layer-by-layer) により、グルコール・キトサン (GC) を用いた複合体を作製した。動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering) による積層膜の積層状態の評価では、HVJ-E に GC と HA を交互に積層する度に粒子径が増大することが確認された (図2 左)。また、光散乱電気泳動法 (Electrophoretic Light Scattering) による粒子の電荷測定では、GC と HA を交互に積層する度に電荷が交互に変動することが確認された (図2 右)。

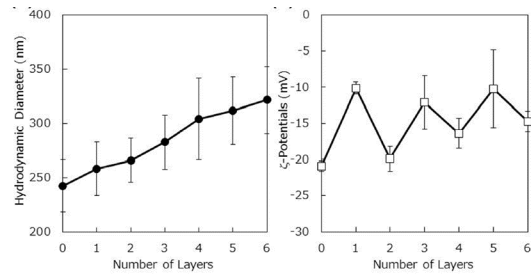


図2 新規粒子の粒子径と電荷

新規粒子の形状について、pH が酸性に傾くと凝集が生じるが、積層化が行われた場合には、図3の如く、pH6 から pH7.4 において凝集は起こらず、HVJ-E に HA を安定的に積層化できたことが確認された。

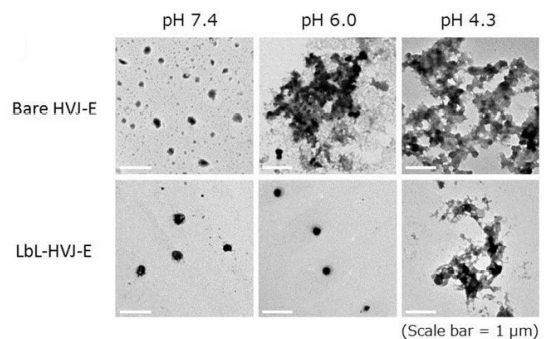


図3 HA積層化HVJ-Eの形状

(2) 誘導加熱電源 HOTSHOT を用いて単相交流電力を発生させ、マグネタイト粒子 (MP) を含有した新規粒子の加熱効果を確認した。MP を 0.0025%以上の濃度にするると、400 A, 281 kHz の条件下で交流磁場を印加すると、一定の時間までは印加時間と MP 粒子の濃度依存的に 35 から 45 の加熱を認めた (図4)。

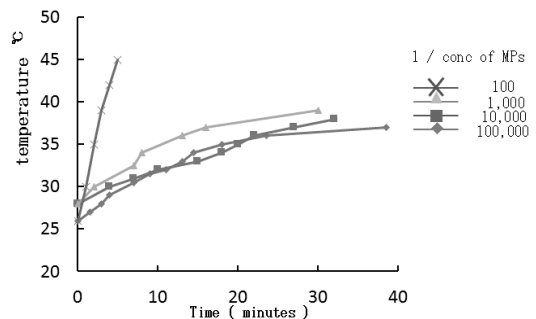


図4 交流磁場印加による粒子加熱

新規粒子を用いた温熱療法による細胞増殖抑制試験において、マグネタイト粒子の濃度依存的にヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 MSTO-H211 の細胞増殖抑制効果を認めた(図5)。

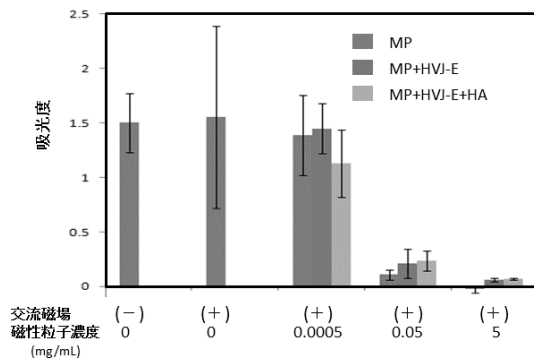


図5 交流磁場印加による細胞増殖抑制効果

MP, MP+HVJ-E 粒子, MP+HVJ-E+HA 粒子は洗浄することなく、腫瘍細胞と共培養したままで加熱したために、各粒子間で抗腫瘍効果に差を認めなかった。

(3) MP+HVJ-E+HA 粒子の腫瘍特異性を確認するために HVJ-E に PKH26 を標識した粒子を用いて、2 時間 MSTO-H211 と共培養後に洗浄し観察すると、HA を相互積層法で修飾した HA(+)-PKH26 標識 HVJ-E は HA を修飾しない HA(-)-PKH26 標識 HVJ-E や PKH26 標識 HVJ-E に比し、MSTO-H211 細胞に多く結合していることが確認された(図6)。MSTO-H211 は、HA の受容体である CD44 をその細胞表面上に豊富に発現していることが確認されており、相互積層法で修飾された HA により、腫瘍細胞を標的とすることが可能であることが確認された。

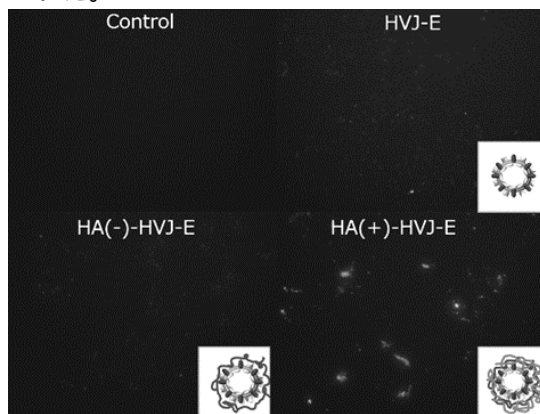


図6 各 HVJ-E 粒子の腫瘍細胞への結合性

(4) 温度応答性ポリマーであるポリ N-イソ・プロピル・アクリル・アミド (PNIPAAm) を用い、マグネタイト粒子 (MP) と抗癌剤を含有したナノファイバーを作製し、HOTSHOT を用いた交流磁場印加による加熱効果を検討すると、MP 30 wt%、抗癌剤 3 wt% のナノファイバー 40 mg で、45 周辺の温度を維持することが可能であった。

このナノファイバーを用いて、*in vivo* での加熱効果を検討した。ナノファイバーを背

側に埋め込んだマウスに全身麻酔を行い、HOTSHOT で交流磁場を印加し、その表面温度を赤外線サーモグラフィー FLIR i5 で測定した。480 A, 166 kHz, 362 W で印加することで、マウス背側に埋め込んだナノファイバー部分に一致し、赤外線サーモグラフィーで徐々に温度の上昇を認め、45 前後までの加熱効果を認め、また、局所温度は、交流磁場の印加時間を調整することで、10 分から最長 30 分まで維持することが可能であった(図7)。また、適切な cooling により、マウスは全身麻酔から覚醒後には患部を含め明らかな熱傷などの傷害を認めなかった。

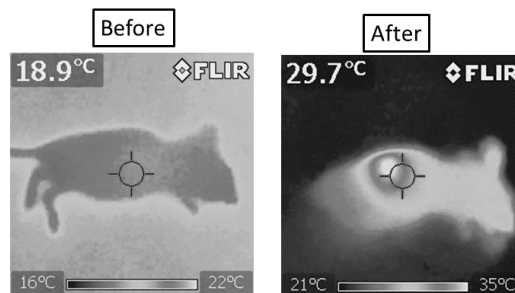


図7 ナノファイバーの加熱効果 (in vivo)

ナノファイバーには抗癌剤が含有されており、交流磁場の印加 Alternating Magnetic Field (AMF) "ON" による加熱により抗癌剤 (DOX) の放出とマグネタイト粒子 (MNP) の温熱効果による抗腫瘍効果が悪性胸膜中皮腫細胞、ヒト肺癌細胞などに対して認められた(図8)。

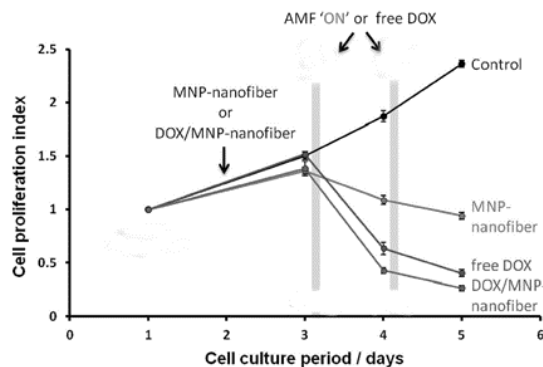


図8 温熱、抗癌剤による抗腫瘍効果

(5) ヒト肺癌皮下腫瘍モデルの作製と温熱効果の検討。ヒト肺癌細胞株 NCI-H23 ならびに NCI-H522 を用いて、CB-17/SCID マウスの背側に細胞を接種し、10 mm 程度の皮下腫瘍が形成されることを確認した(図9)。

上記担癌マウスモデルにおいて、細胞を接種し皮下腫瘍を作製後 33 日目にヒト腫瘍担癌マウスモデルの腫瘍と皮膚との間に抗癌剤、マグネタイト粒子、含有ナノファイバーを埋め込み、その7日後より計3回の温熱治療(43、20分間、1回/週を3週)を行い、その7日目に腫瘍のサイズを測定し、抗腫瘍効果を検討した。皮下腫瘍のサイズは、

Control に比し、抗癌剤+マグネタイト粒子含有ナノファイバー+交流磁場、抗癌剤含有ナノファイバー、マグネタイト粒子含有ナノファイバー+交流磁場、ナノファイバーの順に、高い抗腫瘍効果を認めた。



図9 マウス皮下腫瘍

上記担癌マウスモデルにおいて、細胞を接種し皮下腫瘍を作製後 33 日目にヒト腫瘍担癌マウスモデルの腫瘍と皮膚との間に抗癌剤、マグネタイト粒子、含有ナノファイバーを埋め込み、その7日後より計3回の温熱治療(43、20分間、1回/週を3週)を行い、その7日目に腫瘍のサイズを測定し、抗腫瘍効果を検討した。皮下腫瘍のサイズは、Control に比し、抗癌剤+マグネタイト粒子含有ナノファイバー+交流磁場、抗癌剤含有ナノファイバー、マグネタイト粒子含有ナノファイバー+交流磁場、ナノファイバーの順に、高い抗腫瘍効果を認めた。

(6)「播種性腫瘍病変」は、外科切除などの根治が不可能な疾患であり、たとえ切除ができたとしても、細胞レベルで取りきれない疾患である。これまでに、このような腫瘍病変に対して、抗癌剤の全身投与や局所散布、放射線療法などが試みられているが、根治できるまでには到っていない。近年、悪性黒色腫、膵癌などの難治癌といわれる腫瘍性病変に対し、腫瘍免疫を賦活化させる免疫療法が試みられている。

我々は、これまでに悪性黒色腫や前立腺癌に対して、臨床試験が行われている不活化センダイウイルス粒子 Hemagglutinating Virus of Japan Envelope (HVJ-E) を用いた製剤の研究を行っており、本研究においても、HVJ-E をマグネタイト粒子と組み合わせた新規粒子を作製し、温熱療法と免疫療法を組み合わせた治療法を開発することを目的とし、また腫瘍細胞表面に多く発現する CD44 を標的とした標的治療を念頭に置き、CD44 のリガンドであるヒアルロン酸 (HA) を HVJ-E と結合させた粒子を開発した。

積層法により HVJ-E を核として、その表面に HA とキトサンを交互に積層させた粒子を作製し、その安定性を粒子径、表面電荷、pH 安定性で検討し、交流磁場の印加による加熱効果を確認した。また、HA 修飾によるヒト悪性胸膜中皮腫への親和性が高いことを確認

し、この粒子が今後 CD44 を標的とした分子標的治療において有用な免疫温熱治療製剤となる可能性が示唆された。

(7) 含有抗癌剤の徐放性を加熱により調整できる抗癌剤含有新規温度応答性複合体(ナノファイバー)をエレクトロスピニング法で作製した。温度応答性ポリマーの PNIPAAm) を用いたが、PNIPAAm は下限臨界溶液温度を生体温付近に有するため、生体システムに応用し易く、しかも可逆的にその性質を ON-Off で変化させることが可能である。

このファイバーは温度に応答した可逆的な膨潤・収縮変化を示し、それに伴う薬物の放出も制御することが確認できた。そこで、抗癌剤ならびにマグネタイト粒子を含有させることで、ファイバー自体の発熱を確認した。この発熱挙動は、内包する磁性粒子の量や交流磁場の強度によっても調節可能であった。

また、自己発熱で生じた熱に応答して、温度応答性高分子が脱水和するため、内部の水とともに内部の抗癌剤を外部に放出させることを確認した。すなわち印加する交流磁場の ON-OFF によって自己発熱と抗癌剤の放出を同時に実現することができ、温熱効果単独や抗癌剤単独に比し、ヒト悪性黒色腫に対する抗腫瘍効果が高いことを確認した。

(8) *in vivo* での温熱効果の確認。マウスの背部に作製した新規温度応答性ナノファイバーを埋め込み、交流磁場を印加することで、その表面温度を測定すると、含有するマグネタイト粒子の用量ならびに一定時間までは時間依存的に表面温度の上昇を認めた。また、その実験条件から至適なマグネタイト粒子含有量を決定した。細胞を接種し皮下腫瘍モデルを作製後、ナノファイバーを埋め込み、治療実験を行うと、抗癌剤+マグネタイト粒子含有ナノファイバーに交流磁場を印加した群で高い抗腫瘍効果を認めた。

(9) 本研究において、腫瘍に対する標的治療、温熱治療、免疫治療を併用した集学的治療に用いる新規粒子の作製を行い、その可能性が示唆された。標的治療でのマグネタイト粒子、HVJ-E の腫瘍細胞への結合量などの問題を解決することで、抗癌剤を含有した集学的治療への応用が可能であると考えられた。

「播種性腫瘍病変」や腫瘍切離断端からの再発予防を念頭に置いたナノファイバー製剤を開発したが、抗癌剤、マグネタイト粒子を含有し、交流磁場の ON-Off により発熱し、それにより自在に抗癌剤の徐放を制御することができることを確認した。また、担癌マウスにおける交流磁場の印加により、このファイバーシートを用いた治療で高い抗腫瘍効果を確認した。ナノファイバーの用途は腫瘍切離断端だけでなく、管腔臓器腫瘍に対する低侵襲治療への応用が可能であると考えられた。また、上記2つの製剤を融合するこ

とで、集学的治療の効果を高めることが期待でき、難治性腫瘍に対する新規治療法と成り得ると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

M. Ozasa, C.M. Lee, Y. Sawa, S. Murakami, Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells. Inflammation and regeneration, 査読有、2014、109-11、<http://www.jsir.gr.jp/journal/Vol134No2/pdf/0109-0116.pdf>

T. Okada, K. Uto, C.M. Lee, M. Ebara, Takao Aoyagi, Nano-decoration of the Hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) using a layer-by-layer assembly technique. Langmuir, 査読有、29(24)、2013、7384-7392、DOI: 10.1021/la304572s

Y.J. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi, A smart hyperthermia nanofiber with switchable drug release for inducing cancer apoptosis. Adv. Funct. Mater. 査読有、23(46)、2013、5753-5761、DOI: 10.1002/adfm.201300746

E. Umemoto, A. Takeda, C.M. Lee, M. Miyasaka, Dynamic changes in endothelial cell adhesion molecule Nepmucin/CD300LG expression under physiological and pathological conditions. Plos One, 査読有、2013、DOI: 10.1371/journal.pone0083681

Y.J. Kim, M. Ebara, T. Aoyagi, A smart nanofiber web that captures and release cells. Angew. Chem. -Int. Edit. 査読有、51、2012、10537-10541、DOI: 10.1002/anie.201204139

〔学会発表〕(計15件)

E. Ebara, Y.J. Kim, K. Uto, C.M. Lee, T. Aoyagi, Smart anticancer nanofibers that allows the simultaneous use of chemo- and radiotherapy. International Symposium on Smart Biomaterials, 2014, March

T. Okada, K. Uto, C.M. Lee, E. Ebara, T. Aoyagi, Hyaluronic acid-functionalized HVJ-Envelope as tumor targeting nanocarriers. NanoBio Seattle 2012 July

T. Okada, K. Uto, C.M. Lee, E. Ebara, T. Aoyagi, Design of hyaluronic acid functionalized HVJ-Envelope for tumor-targeting using layer-by-layer assembly technique. The 9<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, 2012 June

岡田孝春、李千蕙、荻原充宏 他、新規癌治療法開発に向けた HVJ-E の機能化、

つくば医工連携フォーラム 2012 2012年1月18日

岡田孝春、李千蕙、荻原充宏 他、CD44 ターゲティングを目指した LBL 法による HVJ-E ベクター表面へのヒアルロン酸のコーティング、第 60 回高分子討論会 2011年9月28日

〔図書〕(計5件)

荻原充宏、ガンを熱して退治する不織布を開発!、子供の科学 9月号、第929号、6(2013)。など

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称: 被覆 HVJ-E 及び被覆 HVJ-E の製造方法  
発明者: 荻原充宏、宇都甲一郎、青柳隆夫、李千蕙

権利者: 独立行政法人物質・材料研究機構  
種類: 特許

番号: 特開 2013 - 039098 号

取得年月日: 2013年2月28日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

李千蕙 (Lee, Chunman)

大阪大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号: 10432543

(2) 研究分担者

荻原充宏 (Ebara, Mitsuhiro)

独立法人 物質・材料研究機構・生体材料センター・研究員

研究者番号: 10452393

(3) 連携研究者

金田安史 (Kaneda, Yasufumi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10177537