

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590670

研究課題名(和文) 活性酸素消去能に優れた白金ナノ粒子のDDS開発と転移性肝癌治療への応用

研究課題名(英文) Development of platinum nanoparticles as reactive oxygen species scavengers for the treatment of hepatic metastasis

研究代表者

勝見 英正 (Katsumi, Hidemasa)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30434666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転移性肝癌の進展及び病態に活性酸素種が深く関与している点に着目し、触媒反応を利用して様々な種類の活性酸素種を持続的に消去可能な白金ナノ粒子を用いることで転移性肝癌が効率よく抑制可能であることを示した。すなわち、活性酸素消去能に優れた白金ナノ粒子を開発することに成功し、マウスにおけるその肝臓選択的な体内動態、肝転移抑制効果ならびに安全性を明らかにした。また、白金ナノ粒子による肝転移抑制効果には活性酸素消去による接着因子の抑制が一部関与している可能性が示された。以上のように転移性肝癌治療における白金ナノ粒子の有用性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) are involved in the hepatic metastasis. To prevent hepatic metastasis, we prepared citric acid-protected platinum nanoparticles (Pt-NPs), which exhibited ROS-scavenging activities and selective delivery to a specific type of liver cell. Pt-NPs reduced the superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical levels in solution. Pt-NPs predominantly accumulated in hepatic nonparenchymal cells after intravenous injections in mice. In a mouse model of hepatic metastasis, the number of tumor cells in the liver was effectively reduced by a bolus intravenous injection of Pt-NPs. These results indicate that Pt-NPs are promising compounds for preventing hepatic metastasis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：薬学 薬剤学 薬物送達システム ナノ粒子 白金 活性酸素 肝転移 肝疾患

### 1. 研究開始当初の背景

遠隔臓器への癌転移の抑制は極めて困難でありその抑制方法の開発が望まれている。肝臓は肺・骨に匹敵する癌転移好発臓器であり、特に、大腸癌をはじめとする消化器癌などは肝臓に高頻度に転移する。大腸癌を例にとると、初回診断時の肝転移の有病率は10%、治癒切除後の再発の40%が肝再発とされ、大腸癌死亡例での剖検で70%に肝転移を認めたと報告もある。また、その治療成績は悪く、5年生存率は極めて低いことから、医学が進歩した今日においても治療が極めて困難な疾患の一つとされている。転移性肝臓癌の治療法は抗癌剤を利用した化学療法が中心であるが、現在までのところ、顕著な治療効果は得られておらず、骨髄抑制、脱毛、悪心、食欲低下などの全身性の副作用も問題となっていることから、有効かつ安全な治療法の実現が切望されている。

転移性肝臓癌などの癌転移の進行には、活性酸素が大きく寄与していることが報告されている。活性酸素には、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなど様々な種類があり、これら活性酸素が癌転移を促進する接着分子やタンパク分解酵素などの多くのメディエーターの発現を亢進することにより癌細胞の浸潤・転移能を増強することが明らかとされつつある。したがって、こうした活性酸素を消去可能な抗酸化剤を医薬品として体外から投与し、複合的にメディエーターを阻害することによる転移性肝臓癌治療が期待される。これまでも、低分子の抗酸化剤や活性酸素消去酵素などを肝動脈あるいは静脈内投与することによる治療効果が報告されているが、これらの既存の抗酸化剤は特定の活性酸素種のみを消去するものが多く、その効果も一過性である。また、投与後の抗酸化剤の血中からの消失は比較的速く、治療に十分量の抗酸化剤を標的臓器である肝臓に送達させるのが困難である。

一方、溶液中に白金を安定に分散させた白金ナノ粒子は、1) 触媒反応を利用して様々な種類の活性酸素種を持続的に消去可能であること、2) ナノ粒子のサイズや表面電荷などの物性を調整することによる体内動態制御については標的臓器である肝臓への高い送達が可能とされることなどから、白金ナノ粒子を利用した効率的な転移性肝臓癌治療が実現できるものと考えられる。白金ナノ粒子は電気工学領域における新たなナノ材料として電気工学的な研究を中心とした検討が既に行われているが、その優れた抗酸化効果に着目し、疾患治療の予防や治療に応用した報告例はほとんど見当たらない。そこで本研究では、活性酸素消去と肝臓ターゲティング能に優れた白金ナノ粒子を創製し、有効性と安全性に優れた転移性肝臓癌治療システムの開発を目指す。

### 2. 研究の目的

転移性肝臓癌は、消化器癌など多くの腫瘍で認められ、既存の抗癌剤による治療成績及び予後が極めて悪いことから、その抑制法の実現が切望される。本研究は、転移性肝臓癌の進展及び病態に活性酸素種が深く関与している点に着目し、触媒反応を利用して様々な種類の活性酸素種を持続的に消去可能な白金ナノ粒子を用いることによる転移性肝臓癌の新規治療法の構築を目的とするものである。活性酸素消去と肝臓ターゲティング能に優れた白金ナノ粒子を創製し、転移性肝臓癌治療における有効性及び安全性を検証する(図1)。

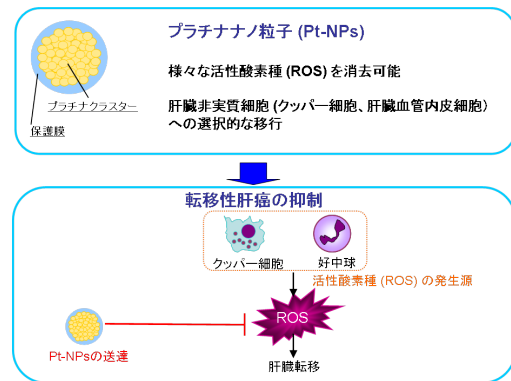


図1 白金ナノ粒子による肝転移抑制の概念  
Pt-NPs; 白金ナノ粒子, ROS; Reactive oxygen species

### 3. 研究の方法

#### (1) 白金ナノ粒子の作製

塩化白金イオンに対してクエン酸及びアスコルビン酸を水中で反応させることにより作製した。

#### (2) 白金ナノ粒子の活性酸素消去能の評価

スーパーオキシドアニオン消去能：スーパーオキシドアニオンに対する消去効率を化学発光法を用いて評価した。すなわち、キサンチン及びキサンチンオキシダーゼの混合溶液に白金ナノ粒子を添加し、溶液中のスーパーオキシドアニオンの減少量を指標にスーパーオキシドアニオンに対する消去能を評価した。

過酸化水素消去能：過酸化水素に対する消去効率を過酸化水素特異的検出プローブである BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた蛍光プローブ法により評価した。すなわち、過酸化水素溶液に白金ナノ粒子を添加し、溶液中の過酸化水素の減少量を指標に過酸化水素に対する消去能を評価した。

ヒドロキシラジカル消去能：ヒドロキシラジカルに対する消去効率をヒドロキシラジカル特異的検出プローブ HPF を用いた蛍光プローブ法により評価した。すなわち、紫外線照射下、過酸化水素溶液に白金ナノ粒子を添加し、溶液中のヒドロキシラジカルの減少量を指標にヒドロキシラジカルに対する消去能を評価した。

### (3) 体内動態特性の評価

マウスに白金ナノ粒子を静脈内投与した後、経時的に血漿ならびに各主要臓器を回収し、サンプル中白金量を誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いて測定した。また、コラゲナーゼ灌流法により肝臓実質細胞及び非実質細胞を分取し、それぞれに含まれる白金量をICP-MSで測定することで白金ナノ粒子の肝臓内分布を評価した。

### (4) 転移性肝臓に対する治療効果

肝臓転移抑制効果は遺伝子導入で細胞標識した癌細胞を用いて *in vivo* imaging により評価した。

転移性肝臓モデルは、深麻酔下、colon26/Luc を Balb/c マウスに門脈内投与することにより作製した。投与3週間後にホルタル・ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを腹腔内投与し、発光した癌細胞を *in vivo* 微弱光イメージングシステムを用いて検出した。

白金ナノ粒子による肝臓転移抑制効果は、colon26/Luc を門脈内に投与した後、白金ナノ粒子を静脈内投与し、*in vivo* 微弱光イメージングシステムで癌細胞の増殖を観察することで評価した。

マウス大動脈血管内皮細胞を用いて、過酸化水素添加時の各種癌転移関連因子の発現に対する白金ナノ粒子の影響をリアルタイム PCR を用いて測定することにより転移抑制機構について解析した。

### (5) 白金ナノ粒子の安全性評価

一般に白金製剤は腎臓障害を惹起しやすいことから、マウス腹腔投与後の腎臓における安全性を評価した。腎臓における安全性は、摘出した腎臓の組織切片を作製した後、HE染色を施し顕微鏡で観察することにより評価した。

白金ナノ粒子腹腔内投与後の体重変化を測定し全身毒性を評価した。

## 4. 研究成果

活性酸素消去能に優れた白金ナノ粒子を作製し、そのマウスにおける体内動態特性、肝臓転移抑制効果及び安全性を評価した。すなわち、白金ナノ粒子は塩化白金イオンをアスコルビン酸及びクエン酸と反応させることにより作製した。作製した白金ナノ粒子は活性酸素種である過酸化水素、スーパーオキシドアニオン及びヒドロキシラジカルに対し、顕著な消去効果を示すことが明らかとなった。

マウス静脈内投与後の白金ナノ粒子の体内動態をICP-MSを用いて評価したところ、白金ナノ粒子は急速に血中から消失し肝臓中に移行することが明らかとなった(図2)<sup>1)</sup>。白金ナノ粒子静脈内投与後の肝臓を摘出し、肝臓内分布を詳細に評価したところ、白金ナノ粒子はクッパー細胞や血管内皮細胞など

の肝臓非実質細胞に主に分布していることが示された。肝臓転移の病態の進展にはクッパー細胞等からの活性酸素種の産生が寄与していることから、白金ナノ粒子は肝臓転移治療に有利な体内動態特性を示すことが明らかとなった。

そこで次に、活性酸素消去能に優れた白金ナノ粒子の肝臓選択的な体内動態特性を活かして肝臓転移モデルマウスに対する治療効果について検討した。Colon26/Luc細胞を接種した当日及び3日目において白金ナノ粒子を静脈内投与しその後の癌増殖を *in vivo* イメージングを用いて評価したところ、肝臓における癌増殖は白金ナノ粒子の静脈内投与により顕著に抑制されることが示された(図3)。

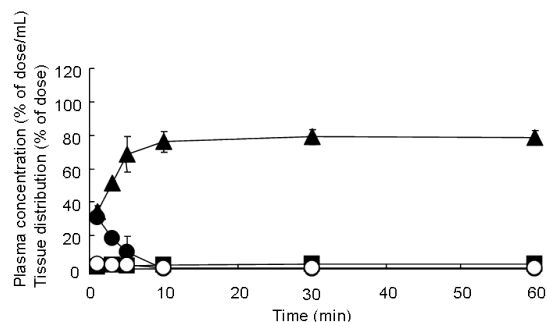


図2 白金ナノ粒子のマウス静脈内投与後の体内動態

○, 血漿; ▲, 肝臓; ●, 腎臓; △, 脾臓。

マウスに白金ナノ粒子を50 µg of platinum/kgで静脈内投与した後、経時的に血漿ならびに各主要臓器を回収し、サンプル中白金量を誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いて測定した。

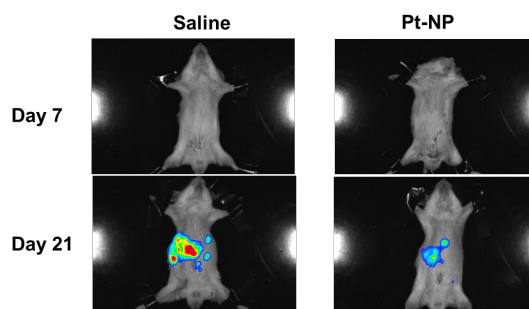


図3 白金ナノ粒子投与後の肝臓における癌増殖

Colon26/Lucを門脈内に投与した後、白金ナノ粒子を静脈内投与し、*in vivo*微弱光イメージングシステムにより癌細胞の増殖を観察した。Saline; 生理食塩水、Pt-NP; 白金ナノ粒子

さらに、マウス大動脈血管内皮細胞を用いた検討において、過酸化水素により誘導される接着分子(ICAM、VCAM)の発現が白金ナノ粒子の添加により抑制されたことから、白金ナノ粒子による肝臓転移抑制機構には活性酸素

種消去を介した接着分子の抑制が寄与している可能性が示された。

一般にシスプラチンなどの白金製剤は腎臓障害を惹起しやすいことが報告されている。そこで次に白金ナノ粒子の腎臓における安全性を腎臓の組織切片を観察することで評価した。白金製剤であるシスプラチンを対照として投与した群では、腎臓において炎症性細胞の浸潤が認められ、腎臓障害が惹起されていることが確認された。一方、白金ナノ粒子投与群では、ほぼ正常な腎細胞が観察された。さらに、白金ナノ粒子投与時の全身毒性を評価する目的で、経日的に体重を測定したところ、シスプラチン投与群では体重減少が確認された。一方、白金ナノ粒子投与群では、体重増加が認められ、シスプラチン投与時のような食欲不振・悪心・嘔吐等の胃腸障害による全身毒性を惹起しにくいことが示された。以上より白金ナノ粒子はシスプラチンと比較して安全性の高い製剤であると考えられた。臨床応用に向けてはさらなる検討が必要であるが、以上の検討から、肝転移治療における白金ナノ粒子の有用性が示された。

#### <引用文献>

Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto 他 Pharmacokinetics and preventive effects of platinum nanoparticles as reactive oxygen species scavengers on hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Metallomics* 6、2014、1050-1056 DOI: 10.1039/c4mt00018h

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 2 件)

Hidemasa Katsumi, Kosuke Kusamori, Akira Yamamoto 他 Pharmacokinetics and preventive effects of platinum nanoparticles as reactive oxygen species scavengers on hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Metallomics* 査読有 6、2014、1050-1056 DOI: 10.1039/c4mt00018h

勝見英正、山本 昌 メラニン産生抑制を目的とした抗酸化剤の経皮デリバリーに関する最新研究 *Fragrance Journal* 査読無 11、2012、22-25

##### [学会発表](計 9 件)

堺 香輔、勝見英正、草森浩輔、山本 昌 他 活性酸素消去能に優れたプラチナナノ粒子による転移性肝癌の抑制 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 26 日 神戸サンボーホール(神戸)

堺 香輔、草森浩輔、勝見英正、山本 昌 他 白金ナノ粒子による癌転移抑制メカニズムの解明 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2014 年 10 月 11 日 京

都薬科大学(京都)

勝見英正、山本 昌 優れた活性酸素種消去能を有するプラチナナノ粒子を用いた酸化ストレス疾患治療戦略. 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 30 日 熊本大学(熊本)

勝見英正、山本 昌 他 Development of platinum nanoparticles, liver-targeting reactive oxygen species scavenger, for prevention of hepatic ischemia/reperfusion injury 5th Asian Arden Conference 2013 年 8 月 5 日 愛知学院大学(愛知)

勝見英正、山本 昌 他 Development of platinum nanoparticles, liver-targeting reactive oxygen species scavenger, for prevention of hepatic ischemia/reperfusion injury 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society 2013 年 07 月 23 日 Hawaii (USA)

勝見英正、山本 昌 他 プラチナナノ粒子の肝臓ターゲティングによる肝転移抑制 第 29 回日本 DDS 学会学術集会 2013 年 7 月 4 日 京都テルサ(京都)

勝見英正、山本 昌 他 活性酸素消去能に優れたプラチナナノ粒子の創製とその肝虚血・再灌流障害抑制効果 第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会 2013 年 6 月 14 日 ウィンクあいち(愛知)

勝見英正、山本 昌 他 腹膜播種治療を目的としたプラチナナノ粒子の創製 第 12 回日本 NO 学会学術集会 2012 年 6 月 29 日 神戸国際会議場(神戸)

本波香織、勝見英正、山本 昌 他 優れた抗酸化効果を有するプラチナナノ粒子の経皮吸収性及び機能性評価 日本薬剤学会第 27 年会 2012 年 5 月 26 日 神戸国際会議場(神戸)

##### [図書](計 1 件)

勝見英正、山本 昌 情報機構 敗血症の診断/治療の実状と戦略 病態・メカニズムをふまえた開発戦略、製剤学的アプローチによる敗血症治療の研究開発～抗酸化剤の DDS 開発と敗血症治療への応用～、2013、101-104.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

勝見 英正 (KATSUMI, Hidemasa)  
京都薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 30434666

##### (2)研究分担者

山本 昌 (YAMAMOTO, Akira)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00166779

##### (3)研究協力者

草森浩輔 (KUSAMORI, Kosuke)  
堺 香輔 (SAKAI, Kosuke)