

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670550

研究課題名(和文) 薬剤溶出性高分子ポリマー磁性体粒子を用いた新しい温熱療法

研究課題名(英文) Thermosensitive particles which release anticancer agent by applying magnetic field

研究代表者

齊藤 元 (Saito, Hajime)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20323149

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)：我々は温熱で収縮し内部に封入された薬剤を放出する温度感受性高分子ポリマーを用い、かつ従来から継続研究している<sup>43</sup> で発熱が自動停止する感温性磁性体を組み合わせた機能性磁性体による温熱療法の開発を目的とし、当該研究期間で以下の成果を得た。

昇温により高分子ポリマーは有意に収縮し、MTX含有薬剤放出性高分子ポリマーでは加温により有意なMTXの放出を確認した。さらに培養細胞実験において、感温性磁性体による自動定温温熱療法と高分子ポリマー放出MTX同等量との併用でも同様の温熱感受性と抗腫瘍効果が確認できた。今後、機能性微粒子を用いた癌治療可能性の追求には、動物実験を含めさらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method of magnetically induced hyperthermia using thermosensitive ferromagnetic particles (FMPs) with low Curie temperature ( $T_c$ ) enough to mediate automatic temperature control. In this work, we evaluated the effect of our original hyperthermia system combined with the delivery of anticancer drug from nanogel particles in vitro. A nanogel based on polymerised N-isopropylacrylamide (NIPAM) was synthesized, characterized and loaded with methotrexate (MTX). The result was that diameter of thermosensitive particles reduced dependent on increasing temperature, and MTX was released significantly. The proliferation of cultured cancer cells was inhibited by MTX combined with our original hyperthermia system.

Further investigation, including in vivo experiment, was needed to making them ideal candidates for cancer thermo-chemotherapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 外科学一般

キーワード：磁性体 がん 温熱療法

### 1. 研究開始当初の背景

切除不能進行癌では対症療法しか残されておらず、QOLを考慮した低侵襲治療が望まれる。また近年切除困難な悪性腫瘍に対しラジオ波焼灼治療が行われるが、外科切除に比し低侵襲ながらも熱傷関連合併症の危険を有し、また治療毎に穿刺を毎回必要とする事も患者にとって苦痛となるため、今後さらに低侵襲治療の進歩が望まれる。一方、癌細胞は43℃近傍でアポトーシスが誘導され、この性質を応用したのが温熱療法であり低侵襲治療の一つであるが、癌細胞は43℃の厳密な温度管理をしないと熱耐性が生じる事も知られており、腫瘍内部の厳密な温度管理が必須である。そこで我々は一定温度(キュリー温度:  $T_c$ )に達すると磁性が失われ発熱が停止する感温性磁性体(開発済み)を注入し、体外から磁場を印可し温度測定することなく自動温度制御可能な誘導加熱方法を考案し、その臨床応用を目的とし研究継続している。また温熱療法は温熱増感作用を持つ薬剤との併用で治療成績は向上する事が知られているが、治療毎の薬剤穿刺注入は患者にとって負担である。一方で、テクノロジーの進歩とともに、様々な機能性微粒子が開発されており、それらの臨床応用を目的として研究も盛んにおこなわれている。

### 2. 研究の目的

本研究は、43℃で収縮し温熱増感作用を有する薬剤を封入した温度感受性高分子ポリマーと感温性磁性体を併用した機能性微粒子を用い、磁場誘導温熱治療の毎に薬剤を放出する本システムのがん治療応用への可能性を追求することを目的とした。本法が臨床応用となれば、初回穿刺のみでその後は何回でも体外より磁場をあてるだけで薬剤併用温熱治療を継続でき、かつ薬剤完全放出後は磁場誘導温熱療法に継続移行できる利点をもつ。

### 3. 研究の方法

(1) 温度感受性高分子ポリマーの抗がん剤吸着・放出能解析:

外側に親水性モノマー(N-isopropylacrylamide: NIPAM)と内側に疎水性モノマー(Glycidyl methacrylate: GMA)を構造とする高分子ポリマーの仕込み組成を変化させ、ソープフリー乳化共重合法により、温度感受性を有する粒子(NG粒子)を作成した。NG粒子のGMAのエポキシ基を利用して、3-mercapto-1-propane sulfonic acid sodium salt(MPSA)のチオール基の求核反応によりNG粒子にスルホン基を導入し、MPSA粒子を作成した。そして温度変化に伴う抗がん剤のMPSA粒子への吸着を検討した。抗がん剤としてメトトレキサート(methotrexate: MTX)を用いた。

(2) 温度感受性高分子ポリマーと感温性磁性体を併用した発熱特性の評価:

温度感受性高分子ポリマーと感温性磁性体(粒子径150 $\mu$ m, 500mg,  $T_c$ :43℃)を1% agar 50ml tubeの中心部に注入、臨床応用を想定した直径10cmループ状コイルと誘導加熱電源(Hot Shot 5, Ameritherm Inc)500A, 189kHzの条件のもとに誘導加熱を行い、セラミック温度センサーで中心および周辺部の加温分布を計測した。

(3) 培養細胞を用いた抗腫瘍効果の検討:

マウスメラノーマ細胞(B16)を6穴wellに培養、confluentとなった時点で、それぞれMTX含有高分子ポリマー放出量として期待されるMTX(0.5 $\mu$ M, 1.0 $\mu$ M, 2.0 $\mu$ M)をdose dependentに、またはvehicleを加え、温熱群(43℃)および非温熱群(37℃)で30分インキュベートとした。そして37℃, 24時間のrecovery timeの後、dishを洗浄、トリプシンにて細胞を剥がし、viable cellをカウントし、MTXによる抗腫瘍効果および温熱増感作用を比較評価した。

### 4. 研究成果

(1) 温度感受性高分子ポリマーの薬剤吸着・放出能の評価:

各温度変化に伴う温度感受性高分子ポリマーの粒子径を動的光散乱法により測定した。温度感受性高分子ポリマーは温度上昇に伴いその粒子計は縮小していることが確認された(図1)。これは温度感受性高分子ポリマーが昇温に伴い収縮し、内部の物質を外部へ放出できる特性を示す。

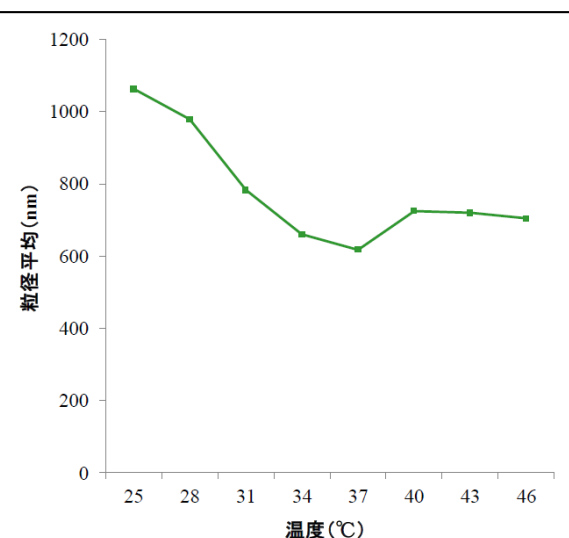
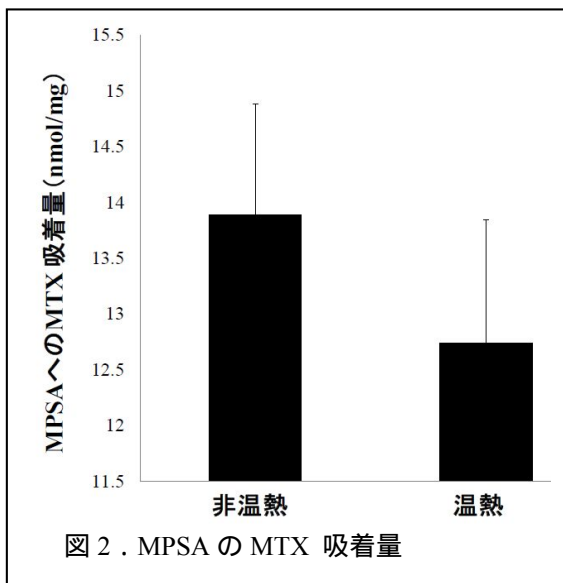


図1. 温度変化に伴う温度感受性高分子ポリマー粒子径

また、MPSA粒子への抗がん剤吸着としてMTXのほかに、メルファラン(melphalan: L-PAM)、ドキソルビシン(Doxorubisin: DXR)を試みたが、温度による吸着量に有意差は認めなかった。この理由として、含有できる物

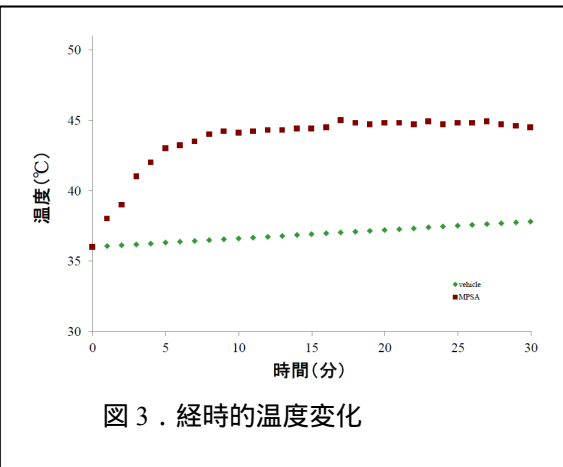
質の性質はカチオン性とアニオン性を分子内に有する化合物であると考えられるため、これらの抗がん剤は吸着できなかったものと思われる。なお MTX は MPSA 粒子に吸着できた。

図 2 に MTX の温度変化に伴う MPSA 粒子への吸着量を示す。温度上昇に伴い MPSA 粒子内での吸着量が低下し、MPSA 粒子から消音に伴い MTX が外部へ放出されたことが確認された。

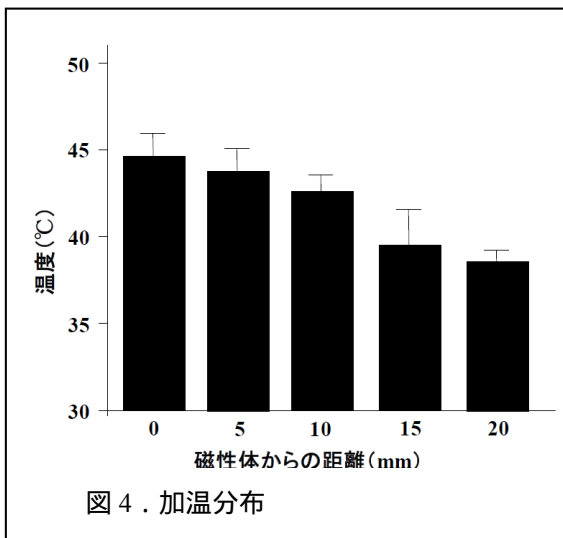


(2) 温度感受性高分子ポリマーと感温性磁性体を併用した発熱特性の評価：  
温度感受性高分子ポリマーと感温性磁性体に誘導加熱電源 (Hot Shot 5, Ameritherm Inc) 500A, 189kHz の条件のもとに誘導加熱を行い、昇温および加温分布を計測した。

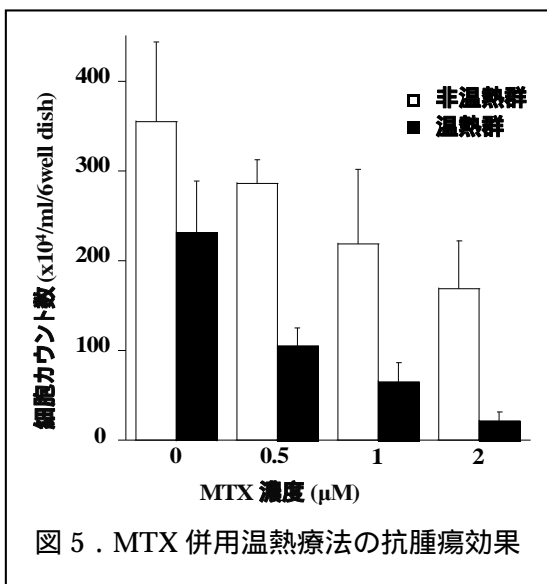
その結果、誘導加熱後約 5 分で Tc43 付近に達し、以後昇温はプラトーとなり Tc を保った (図 3)。なお、vehicle でもわずかな昇温が時間の経過とともに観察されるが、これは磁場における NaCl の影響と考えられる。一方で人体では透磁率が異なることより、将来的に人体応用となっても有害となる程度の昇温は発生しないものと予測している。



また昇温効果(43 以上)は磁性体半径 10mm までの範囲であった (図 4)。腫瘍中心に磁性体および温度感受性高分子ポリマーを注入できれば最大径 20mm までの腫瘍が本法の適応となりうるが、今後さらに効率的な発熱効果の改善が望まれる。



(3) 培養細胞を用いた抗腫瘍効果の検討：  
マウスメラノーマ細胞 (B16) を用いて MTX および温熱併用の抗腫瘍効果を評価した。その結果、vehicle に比較して MTX ではメラノーマ細胞において dose dependent に有意な抗腫瘍効果を認めた。また温熱群では MTX の有意な温熱増感作用も認めた (図 5)。



以上より、今回の研究では温度感受性 MPSA から薬剤放出を可能とする加温能として我々の保有する感温性磁性体の発熱効率は許容範囲であることがわかり、またその抗腫瘍効果を in vitro で確認できた。さらにマウスメラノーマ細胞においては MTX が dose dependent に抗腫瘍効果を示すこと、また温熱増感作用を有することも明らかとなった。MPSA は温度変化に伴う薬剤放出機能を有する温度感受性高分子ポリマーとしてドラッ

グデリバリーシステムの観点から新たな抗がん剤治療への応用が期待される。今後は感温性磁性体と温度感受性高分子ポリマーの合体の創薬，そして薬剤封入効率の向上，さらに他がん種にも対応できるように，薬物性質として封入可能性のあるプラチナ製剤も対象として，研究を継続したいと考えている。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

齊藤 元 (Saito Hajime)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：20323149

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：