

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670601

研究課題名(和文) スーパーアパタイト超微細粒子を用いたICGによる固形腫瘍のイメージング診断の開発

研究課題名(英文) Development of imaging for solid tumors using indocyanine green incorporated into nanoparticles.

研究代表者

大橋 朋史 (Ohashi, Tomohumi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20723620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：炭酸アパタイト粒子内にインドシアニングリーン(ICG)を直接内包させることに成功した。In vitro実験では ICG単独投与と比較してICG内包炭酸アパタイト粒子投与1, 3, 6時間で1.5-2倍程度のICGの取り込み上昇がみられた。動物実験では、2時間-6時間でICG内包炭酸アパタイト粒子の方が腫瘍内へのICGの取り込みが1.5-2倍程度増強していることが分かった。静脈内投与した炭酸アパタイト粒子は、腹腔内投与した腫瘍集積を増強させたが、そのメカニズムとして細胞接着因子であるインテグリン $\alpha 1$ の発現低下による腫瘍間質液圧の減少によるEPR効果の増強が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We successfully formed up ICG-incorporated nanoparticles of carbonate apatite (ICG-CA) with the size of 20nm in diameter. ICG-CA gave 1.5-2 folds higher uptake of ICG in colon cancer cells in vitro as compared to ICG alone. In vivo imaging study also revealed that intra-venous administration of ICG-CA particles enhanced uptake of ICG fluorescence for the subcutaneous tumors in nude mice, when compared to systemic injection of ICG alone. CA particles also enhanced ICG uptake into xenograft tumors when ICG alone was injected into intra-abdominal space and CA was injected via tail vein almost at the same time. We found that CA reduced integrin $\alpha 1$ expression and it lowered tumor interstitial fluid pressure, which may in part explain the underlying mechanism.

研究分野：消化器外科

キーワード：ナノ粒子 固形腫瘍 インドシアニンググリーン (ICG) イメージング

1. 研究開始当初の背景

インドシアニングリーン (ICG) は肝切除やセンチネルリンパ節のイメージングに使用される極めて安全な薬剤である。一方で、腫瘍集積性の低さから、ICG を用いた腫瘍イメージングは困難とされてきた。しかし、近年の科学技術の進歩とともに、ICG の腫瘍への集積を可能とするような様々な drug delivery system (DDS) が開発されるようになった。リポソームやミセルがその代表的なものであり、ICG を長く腫瘍に留めておくことが可能となってきている。一方で、正常臓器への蓄積の問題や製造工程の複雑化、コストがかかることも懸念される。

我々は、30nm の微細なナノキャリアである炭酸アパタイト粒子の in vivo 全身投与法の開発に成功した。炭酸アパタイト粒子は腫瘍周囲の透過性の亢進した血管から流出・集積する EPR (enhanced permeability and retention) 効果を増強させる働きにより、静脈注射後、内包した薬剤を短時間で腫瘍に送達させることができ、過去に炭酸アパタイト粒子に Doxorubicine を内包させることで良好な抗腫瘍効果が得られることを報告した (Hossain, Yamamoto ら. PLoS One 2013)。また、マウス皮下腫瘍モデルに対する炭酸アパタイト粒子は核酸の DDS としても良好なマウス皮下腫瘍に対する治療成績が得られたことを報告した (Hiraki ら. Mol Ther Nucleic Acids. 2015)。特に、核酸においては炭酸アパタイト粒子はリポソームやアテロコラーゲンといった既存の DDS よりはるかに良好な腫瘍集積と抗腫瘍効果を確認している。

sCA に ICG を内包させマウス皮下腫瘍へ経静脈的に集積させることができれば、新しいイメージング方法となる。一方で、正常臓器に蓄積する ICG は、短時間で消退し、副作用も少ないと考えられる。近年、イメージングのための様々なナノキャリアの研究・開発が進む中、炭酸アパタイト粒子を用いた本方法は複雑なナノキャリアの設計を必要としない、安価なイメージング法となる可能性がある。また、炭酸アパタイト粒子が血中の小分子化合物を腫瘍に集積させる作用は、ICG を使用したイメージングに留まらず、様々な薬剤に対する腫瘍到達性の改善に寄与する可能性を秘めている。

2. 研究の目的

(1)炭酸アパタイト粒子に ICG を内包させることが可能かを検討し、可能な場合 ICG 単独使用と比べて、マウス皮下腫瘍のイメージング効果の向上がみられるかどうかについて検討する。

(2) ICG を腹腔内に投与し、炭酸アパタイト粒子を EPR 増強剤として静脈内投与する事で、皮下腫瘍のイメージング性能が向上するかどうかについて検討する。またそのメカニ

ズムについて検討する。

以上により、炭酸アパタイト粒子を用いた ICG イメージングの可能性と有用性について明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 炭酸アパタイト粒子を用いた腫瘍イメージング法の最適化の検討： ICG を内包した炭酸アパタイト粒子 (以後 ICG in sCA と記述)によるイメージングについて評価する。初めに、ICG in sCA を作成し、その粒子の形状を透過型電子顕微鏡によって評価する。次いで、物質の性質として、吸光度や蛍光強度測定を行い、ICG 単独使用の場合と比較する。細胞実験では、ICG in sCA の毒性の有無を確認するため、大腸癌細胞株を用いて ICG 濃度として 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 μ g/ml で細胞培養液に添加し、暴露後 24 時間と 48 時間の細胞生存率を測定する。ICG の細胞内への取り込みについては、投与 1, 3, 6 時間後に蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーを用いて評価する。動物実験では、皮下腫瘍マウスモデル (HT29)の尾静脈へ ICG in sCA を投与し、腫瘍と正常臓器への ICG の集積を静脈注射後 2,4,6,24 時間後に in vivo imaging system (IVIS) にて測定する。

(2) 腫瘍の間質液圧は他の正常組織より高い炭酸アパタイト粒子を EPR 増強剤として静脈内投与する事で、腫瘍イメージングが向上するかを、正常臓器の ICG 取り込みと比較しつつ評価する。

Caが腫瘍細胞膜上のインテグリン beta1 と細胞外マトリックスであるコラーゲンとの接着を破綻させ、組織間質液圧を低下させうるという既報に基づいて、炭酸アパタイト粒子のカルシウムが EPR 効果の増強メカニズムとして腫瘍部の間質液圧低下させる可能性を考えた。マウス皮下腫瘍モデル (HT29)を用いて、炭酸アパタイト粒子投与後の腫瘍間質液圧を経時的に直接圧センサーで測定する。また、皮下腫瘍モデルにおける細胞接着因子 integrin β 1 の発現評価を行う。

4. 研究成果

(1) 炭酸アパタイト粒子を用いた ICG 腫瘍イメージングの最適化の探索の中で、炭酸アパタイト粒子に ICG を内包せしめることに成功した (ICG in sCA)。

ICG in sCA の知見は以下の通りである。平均 20 nm 程度の球形の粒子であった。これは炭酸アパタイト粒子単体と同等のサイズであった。極大吸収波長は ICG 単独と同じ 780 nm であり、吸光度は ICG の 0.8 倍、蛍光強度は 1.2 倍程度であることが分かった。図 3 マウス皮下腫瘍への ICG 取り込み

アルブミン添加により吸収極大波長は ICG

と同様に 25nm red shift が確認される一方で、吸光度は ICG の 1.5 倍程度となったが、蛍光強度は 1.2 倍のままであった。大腸癌細胞株 (HCT116) に対する細胞毒性の検討を行ったところ、ICG 濃度 2.5 μ g/ml ~ 60 μ g/ml では、24 時間、48 時間の ICG in sCA 暴露によっても細胞障害性は確認されなかった (全ての濃度、時間において ICG 単独暴露で 80%前後、ICG in sCA 暴露で 80%強の細胞生存率であった)。大腸癌細胞株 (HCT116、HT29) に対する ICG の取り込みをフローサイトメトリーで評価したところ、ICG 単独投与と比較して ICG in sCA 投与 1 時間後、3 時間後、6 時間で 1.5~2 倍程度の ICG 取り込み上昇が見られた。蛍光顕微鏡における観察においても、ICG in sCA は 1 時間から 3 時間で細胞質に充満するように ICG が取り込まれていることが分かった。マウス固形腫瘍モデル (HT29) において、ICG の取り込みを IVIS にて評価したところ、投与 2 時間 ~ 6 時間では ICG 投与に比し、ICG in sCA 投与群で腫瘍内への ICG の取り込みが 1.5~2 倍程度増強していることが分かったが、24 時間後にはほぼ同等の ICG 集積となった (図 1)。ICG 投与と ICG in sCA 投与したマウスの腫瘍を蛍光顕微鏡で観察したところ、ICG 投与では腫瘍辺縁に ICG の集積を認めるのみであったが、ICG in sCA を投与したマウスの腫瘍では腫瘍中心部まで ICG が広範に集積していることが確認された。

正常臓器への ICG の集積としては、肺、腎臓、脾臓は 6 時間後までは ICG in sCA 投与群で ICG 投与群と比較して約 1.5 倍 ~ 2 倍弱の ICG の集積を認めたが、24 時間後にはほぼ同等の集積となった。肝臓への ICG 集積は ICG in sCA 投与群が常に ICG 投与群の 2.5 倍程度であった。

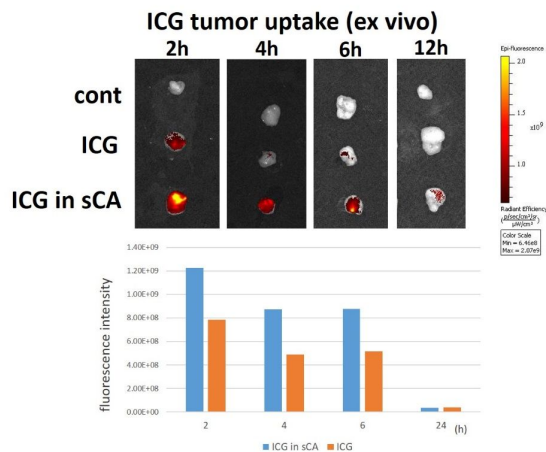


図 1. マウス皮下腫瘍モデルにおける腫瘍イメージングの輝度

(2) マウス皮下腫瘍 (HT29) の間質液圧を測定したところ、炭酸アパタイト粒子の静脈投与前と比べて、静脈後 2~4 時間後における間質液圧の有意な減少を認めた。10 時間後にはもとの間質液圧まで上昇することが分かった (図 2)。

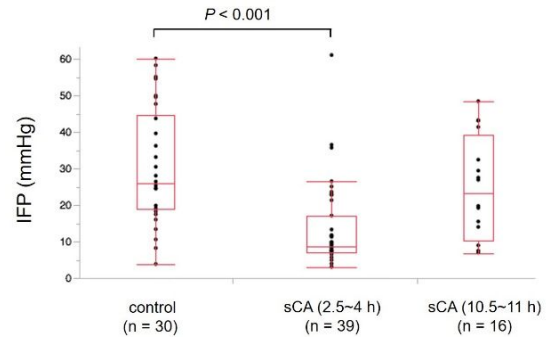


図 2. 炭酸アパタイト粒子投与後の組織間質液圧

また、炭酸アパタイト粒子の静脈後 4 時間で蛍光免疫染色にてマウス皮下腫瘍において integrin β 1 の発現低下がみられた。(図 3)

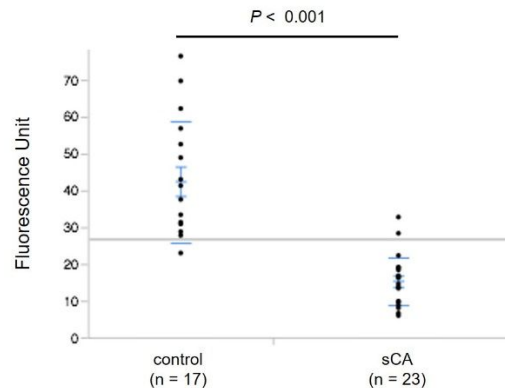


図 3. sCA 投与 4 時間後 integrin β 1 蛍光強度

(考察)

ICG を炭酸アパタイト粒子に内包させマウス皮下腫瘍のイメージングが可能であり、ICG 単独よりも 2 h、4 h、6 h で蛍光強度が高かった。しかし、正常組織、特に肝臓で ICG in sCA 投与群の蛍光強度が高かった。ことから皮下や体表の腫瘍のイメージングは効果的に行えるが、体内深部での腫瘍イメージングには更なる工夫が必要と考えられた。

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 1 件)

Wu X, Yamamoto H, Nakanishi H, et al.
Innovate delivery of siRNA to solid tumors
by super carbonate apatite. PL
oS One. 2015 Mar 4; 10 (3)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 73 回日本癌学会学術総会 (2014.9.25 ~
2014.9.25)

Carbonate apatite nanoparticle system
enhances solid tumor imaging by reducing
tumor interstitial fluid pressure

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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〕

特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 朋史 (OHASHI, Tomohumi)

大阪大学医学部附属病院・医員

研究者番号：2 0 7 2 3 6 2 0

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：