

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461924

研究課題名(和文) Nanocapsuleを用いた、癌転移巣検出と放射線-抗癌剤標的療法の開発

研究課題名(英文) Targeted delivery of anti-cancer-drug using nanocapsules, directed by radiotherapy.

研究代表者

原田 聡 (Harada, Satoshi)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：20244931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：放射線により内容を放出する、2種類のマイクロカプセルを用いて、悪性腫瘍検出と治療を検討した。

悪性腫瘍転移巣検出型マイクロカプセルは、表面を  $\alpha$ 3とVEGFR-1抗体で標識、内容をP-selectin抗原とした。転移巣治療型カプセルは表面をP-selectin抗体で標識し、内容をカルボプラチンとした。静脈注射により、腫瘍検出型マイクロカプセルは転移巣をCTで描出させ、1回目の放射線照射で、P-selectin抗原を腫瘍血管に放出した。次に治療型マイクロカプセルを静脈し、転移巣に集積させ2回目の放射線を施行し、カルボプラチンを放出させ、抗腫瘍効果増強と、抗癌剤副作用軽減を行った。

研究成果の概要(英文)：We aimed to image malignant tumors by 2 radiotherapy sessions. In the first session, we injected CT-detectable microcapsules with P-selectin to observe malignant tumors by VEGFR-1/2 and  $\alpha$ 3 antibody-antigen complex accumulation. In the second session, we performed chemo-radiotherapy using microcapsules which have a high affinity for P-selectin and PSGL-1. In the first session, anti-VEGFR-1/2 and anti- $\alpha$ 3 microcapsules accumulated in the malignant tumor, which could be detected by CT. These microcapsules released P-selectin and PSGL-1 in response to the first irradiation. Subsequently, microcapsules for tumor treatment were injected. Those microcapsules accumulated around the tumor through P-selectin-antigen-antibody reaction. In the second session, microcapsules released carboplatin. The released carboplatin attacked synergistically with radiation, which resulted in increased antitumor effect. And localization of carboplatin by capsules reduced adverse effect.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：ドラッグデリバリー 放射線治療 癌化学療法 PIXE micro PIXE camera

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、放射線照射により抗がん剤を放出するマイクロカプセルを作成し、腫瘍に誘導後、放射線照射を施行しマイクロカプセルより抗がん剤を放出させ、放出された抗がん剤と放射線との相乗効果により、抗がん作用の増強および、マイクロカプセルによる抗がん剤の副作用軽減を研究してきた。

すなわち、1) ヒアルロン酸が放射線によりアセチルグルコサミンに分解する事、2) アルギン酸を  $Fe^{2+}$  で重合させた化合物に放射線を照射すると、 $Fe^{2+}$  が放射線照射による Fenton 反応で  $Fe^{2+}$  から  $Fe^{3+}$  に変化し、 $Fe^{2+}$  による重合が崩壊する事、の 2 点を利用し、ヒアルロン酸をアルギン酸を  $Ca^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  で重合させマイクロカプセルを作成すると、放射線照射に反応して、内容を放出するマイクロカプセルができることが判明した。

### 2. 研究の目的

放射線に反応して抗がん剤を放出するマイクロカプセルを改良して、(i) マイクロカプセルを用いた転移巣の Computed Tomography (CT) による描出、(ii) CT により描出された腫瘍へのマイクロカプセルへの誘導と、放射線による抗がん剤の放出、および放出された抗がん剤-放射線相乗効果と、マイクロカプセルによる薬剤限局化作用による抗がん剤副作用軽減、以上の 2 点を研究も目的とする。

### 3. 研究の方法

**Nanocapsule 作成:** 転移を検出する転移型と、抗がん剤を放出する転移巣治療型を作成した。

**転移巣検出型 Nanocapsule:**

アルギン酸 0.1%、-ヒアルロン酸 0.05% の 10 ml 溶液に、CT 造影剤 1 cc, ascorbic acid 1g を加えたものをカプセル溶液とした。これに、 $5\mu\text{g}$  selectin 抗体と  $5\mu\text{g}$  PSGL-1、インジウム  $500\mu\text{g}$  を添加後、超音波破碎で重合液中に噴霧した。重合液は、 $v_3$  抗体、VEGFR-1 抗体  $5\mu\text{g}$  を含むオリーブ油を重層した  $0.3\text{ mMol } Ca^{2+}$  と  $0.3\text{ mMol } Fe^{2+}$  溶液とする。噴霧中は、重合液に、超音波振動を加え、さらに微細化を施行した。重合液中の Nanocapsule は径 800 nm のフィルターでろ過し、精製した。

**転移巣治療型 Nanocapsule:** カプセル溶液に 5 mg カルボプラチンを添加し、オリーブ油に P-selectin 抗原  $5\mu\text{g}$  を含む重合液中に噴霧して、転移検出型と同じ過程を経て、カプセルを作成した。

**動物モデル作成:** C3HE/J マウスに人乳がん由来の MM46 (低転移性) または MM48 (高転移性) を左大腿皮内に移植して、担癌マウスを作成する。2 週間後に実験に使用した。

**転移検出型 Nanocapsule による、転移検出:**

上記担癌マウスに尾静脈より 10 億個の Nanocapsule を静脈注射し、1~12 時間、1 時間おきに、実験動物用 CT により、全身の断層画像を、3 mm 間隔、1 mm 厚で撮像する。転移が見られた臓器に関して、転移巣におけるカプセル投与前、および投与後の、検出

された転移巣の数の変動から研究した。

**第 1 回目の放射線照射と転移治療型**

**Nanocapsule の誘導:** 転移が検出された臓器に、400 KeV 軟線 X 線、2, 5, 10, 20, 30 Gy の第 1 回目の照射を施行し、Nanocapsule から P-selectin 抗原を放出させると同時に、放射線により、転移巣血管内皮に P-selectin 抗原を誘導した。2 時間後、抗がん剤 Carboplatin を内包する転移巣治療型 Nanocapsule を静注し、P-selectin と PSGL-1 の抗原抗体反応により転移巣に同 Nanocapsule を集積させ。静注後の Nanocapsule 動態を CT で観察し、転移巣への集積が高となった時点で、転移臓器を剖出した。剖出臓器に関し、免疫染色と Western blotting による、P-selectin の放射線による誘導と、Nanocapsule からの放出を観察した。腫瘍組織中の Nanocapsule と capsule 内容の状態は、micro PIXE camera と定量的 PIXE を用い、転移巣検出型 Nanocapsule では、同カプセルに添加した In (インジウム) を、転移巣治療型 Nanocapsule に関しては、カルボプラチンの Pt を画像化、および定量化して研究した。**Nanocapsule による転移巣検出と抗がん剤治療型 Nanocapsule 誘導の適化;** 上記実験データに関して、以下の事を検討した。

**転移検出型 Nanocapsule** に関して静注するカプセル数、インテグリン  $v_3$  抗体と VEGFR-1 抗体の標識量と反応時間、混入する CT 造影剤の量、内包する P-selectin 抗原の量。

**転移治療型 Nanocapsule** に関して: 第 1 回目の照射線量、Nanocapsule の投与量、P-selectin 抗原、PSGL-1 の標識量と反応時間 上記を検討し、効率的な Nanocapsule による転移巣検出を研究した。:

**第 2 回目の放射線照射による転移巣治療型からの抗がん剤放出、放出された抗がん剤と放射線との相乗作用による抗腫瘍効果増強、抗がん剤滅却化作用による抗がん剤副作用軽減の研究:**

P-selectin, PSGL の抗原抗体反応により集積した、転移巣治療型まいくるかぶせるに対して、第 2 回目の放射線を加え、転移巣治療型 Nanocapsule から抗がん剤を放出させた。放射線は、400KeV 軟線 X-線 2, 5, 10, 20, あるいは 30 Gy の 1 回照射を施行した。治療効果評価は、CT 画像により、転移巣の数、サイズを 1 ヶ月計測し、治療効果を評価した。副作用は、マウスの死亡、体重減少、毛羽立ちにより評価した。他、第 2 回目の照射による抗がん剤放出を計測するため、照射直後に転移巣を剖出し、Micro PIXE camera の Pt の分布画像から、カプセル内容放出を画像化し、定量的 PIXE から、転移巣内カルボプラチン濃度を算出した。

### 4. 研究成果

**Nanocapsule 作成**

アルギン酸-ヒアルロン酸を、 $Ca^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  で重合

させ、Nanocapsule を作成する事に成功した。破裂率はアスコルビン酸を加えることにより増加し、その破裂率は  $70.2 \pm 7.2\%$ であった。本カプセル内容を P-selectin 抗原と CT 造影剤とし、カプセル表面を、VEGFR1/2 抗体、 $\alpha$ 3 抗体で標識したものを転移巣検出型、内容を抗癌剤カルボプラチンとし、カプセル表面を P-selectin 抗体、PSGL-1 で標識したものを、転移巣治療型マイクロカプセルとした。

#### 転移巣検出型マイクロカプセルによる転移巣イメージング。

転移巣検出型マイクロカプセルをマウス尾静脈より静脈注射して、CT による転移巣イメージングを行った。転移巣は注入マイクロカプセル 10 億個で経時的に徐々に明瞭化し、マイクロカプセル注射 9 時間後に最大に明瞭化した。観察された転移巣の個数はマイクロカプセル注入前と比較すると有意に増加し、転移巣検出に対する有用性が確認された。

また、組織切片での観察から、マイクロカプセルの集積が最大となったのは、尾静脈から注入後 9 時間であり、CT での転移巣が最大に明瞭化した時点と一致していた。これにより、マイクロカプセルの転移巣に対する集積度が、CT でも検出可能であることが確認された。

#### 1 回目の放射線照射と転移巣検出型マイクロカプセルからの P-selectin 抗原放出。

転移巣検出型マイクロカプセルの集積が最大となった、静注 9 時間後に、転移臓器 (本実験では肺) 第 1 回目の放射線を照射した。照射により、転移巣検出型マイクロカプセルから、P-selectin 抗原が放出されるのを、micro PIXE camera で観察、約 70% のカプセルが P-selectin 抗原を放出していることが判明した。同腫瘍に対する、P-selectin 抗原の免疫染色、Western blotting による P-selectin 抗原を経時的に観察したところ、転移巣検出型マイクロカプセルから放出された P-selectin 抗原の他、放射線照射照射によっても腫瘍血管内皮に誘導される P-selectin 抗原が確認され、照射後 12 時間後に P-selectin の発言が最大となることが判明した。

#### 転移巣治療型マイクロカプセル静脈注射と、

その集積： 血管内皮における P-selectin 抗原の発言が最大となった、照射 12 時間後に、P-selectin 抗体と PSGL-1 で標識してあった転移巣治療型マイクロカプセル 10 億個を尾静脈より静脈注射した。マイクロカプセルは P-selectin、PSGL-1 の抗原抗体反応により転移巣に徐々に集積し、注射 6 時間後にその集積度が最大となることが、micro PIXE camera、定量的 PIXE により明らかとなった。また、これら転移巣治療型マイクロカプセル動態は、カプセル殻中の Fe による放射線吸収により、CT でも観察可能であることが判明した。

#### 第 2 回目の放射線照射と転移巣治療型マイクロカプセルからの抗癌剤 (カルボプラチン)

#### 放出

転移巣治療型マイクロカプセルの集積が、転移するに最大に集積した、転移巣治療型マイクロカプセル静脈注射 6 時間後に、放射線照射を施行した。放射線照射により、約 70% のマイクロカプセルがカルボプラチンを放出する事を、micro PIXE camera で確認した。さらに、定量的 PIXE により、放出された Pt 量が、 $3.23 \pm 2.4 \mu\text{g/g}$  であり、転移巣治療に必要なカルボプラチン濃度を満たしていることが判明した。

#### 抗腫瘍効果と副作用軽減作用

抗腫瘍効果を Growth delay 法で計測したところ、EF 1.7 の増感作用を示し、マイクロカプセルから放出されたカルボプラチンと放射線の間の相乗効果によって、抗腫瘍効果が増強する事が明らかとなった。副作用に関しては、マイクロカプセルの抗癌剤限局化作用により、マウスの毛羽立ち、体重減少を呈したマウス数が有意に低下し、特に、死亡したマウスの数は 0 であった。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- 1 S. Harada, S. Ehara. K. Ishii , T. Sato, T. Kamiya , K. Sera. S. Goto Innovation of hyaluronic acid-protamine microparticles and their kinetics in vivo. Int J. PIXE, 査読あり 26;) 2016;45-51.
- 2 Satoshi Harada, Shigeru Ehara. Keizo Ishii, Takahiro Sato, Masashi Koka, Tomihiro Kamiya, Koichiro Sera. Shyoko Goto. Targeted concurrent chemoradiotherapy, by using improved microcapsules that release carboplatin in response to radiation, improves detectability by computed tomography as well as antitumor activity while reducing adverse effect in vivo. Biomed. & Pharmacother. 査読あり 70: 2015;196-205
- 3 Satoshi Harada, Shigeru Ehara a, Keizo Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka , Tomihiro Kamiya, Koichiro Sera, Shyoko Goto. Imaging and treatment of malignant metastatic tumors by using radiation-sensitive, immunolabeled liquid-core microcapsules. Nucl. Inst. and Meth. Phys. Res. B 査読あり 318 : 2014;173-177
- 4 S. Harada, S. Ehara , K. Ishii , T. Sato , M. Koka , T. Kamiya, K. Sera, S. Goto An Enhanced Radiation Effect On Tumor Growth Using Oxygen-Rich

Microcapsules. Int. J PIXE 査読あり;,  
23, 2013; 39-45.

〔学会発表〕(計 12 件)

- 1 Satoshi Harada, Shigeru Ehara a, Keizo Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka , Tomihiro Kamiya, Koichiro Sera, Shyoko Goto. Nanoparticle imaging and treatment of primary and metastasized tumor through immunogenic cell death and abscopal effect, respectively, by targeted dendritic-cell-mediated T-cell priming and immune checkpoint blockade via radiotherapy. 102 th Annual Meeting of Radiological Society of North America.; 2016/12/2 ; Chicago, IL USA.
- 2 Satoshi Harada , Shigeru Ehara a, Keizo Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka , Tomihiro Kamiya, Koichiro Sera, Shyoko Goto. Imaging of primary tumor and metastases and their treatment through targeted dendritic cell mediated T-cell priming and immune checkpoint blockade, using encapsulated nanoparticles directed by radiotherapy. 58th Annual meeting of American Society of Therapeutic Radiation Oncology, ; 2016/9/27; Boston MA, USA.
- 3 Satoshi Harada , Shigeru Ehara a, Keizo Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka , Tomihiro Kamiya, Koichiro Sera, Shyoko Goto Imaging, and treatment of primary-tumor through immunogenic cell death (ICD), and metastasis through abscopal effect, using targeted nanoparticles via radiotherapy. 75th Annual Meeting of Japan Radiological Association; 2016/4/16; Yokohama Japan.
- 4 Satoshi Harada, Shigeru Ehara a, Keizo Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka , Tomihiro Kamiya, Koichiro Sera, Shyoko Goto. Nanoparticle imaging, and treatment of micrometastasis, using targeted anti-CD47 siRNA nanoparticle, via radiotherapy. 101th Annual Meeting of Radiological Society of North America; 2015/12/3; Chicago; USA.
- 5 Satoshi Harada , Shigeru Ehara a, Keizo Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka , Tomihiro Kamiya, Koichiro Sera, Shyoko Goto Imaging and treatment of tumors using targeted B6H12 nanoparticles via radiotherapy in vivo. 74th Annual Meeting of Japan Radiological Association; 2015/4/18; Yokohama Japan.
- 6 Satoshi Harada, Shigeru Ehara a, Keizo Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka , Tomihiro Kamy, Koichiro Sera, Shyoko Goto. Nanoparticle imaging and treatment of micrometastasis, using targeted anti-CD47 siRNA nanoparticle, via radiotherapy. 100th Annual Meeting of Radiological Society of North America.; 2014/12/1; Chicago, IL USA.
- 7 Satoshi Harada, Shigeru Ehara a, Keizo Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka , Tomihiro Kamy, Koichiro Sera, Shyoko Goto. Tumor Imaging, Antitumor Action, and Inhibition of Metastasis Using Targeted Anti-CD47 siRna Nanoparticles and Radiotherapy. 56th Annual meeting of American Society of Therapeutic Radiation Oncology; 2014/9/16; San Francisco CA, USA
- 8 原田聡、江原茂、世良耕一郎、石井慶造、福田光宏、山崎浩道、佐藤隆博、神谷 富裕 . カプセル化 DSB 修復阻害剤 nanoparticle (AZT-2281)を用いた標的放射線増刊療法. ; 第73 回本医学放射線学会学術集会; 2014/4/11 ; 横浜.
- 9 Satoshi Harada, Shigeru Ehara a, Keizo Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka , Tomihiro Kamiya, Koichiro Sera, Shyoko Goto. Imaging and oxygen radiation sensitization using nanoparticles targeted by folate receptor-mediated endocytosis via radiotherapy will enable better diagnosis and treatment of micrometastasis. 99th Annual Meeting of Radiological Society of North America.; 2013/12/5; Chicago, USA.
- 10 Satoshi Harada, Shigeru Ehara a, Keizo Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka , Tomihiro Kamiya, Koichiro Sera, Shyoko Goto. Nanoparticle Imaging and Treatment for Micrometastasis Using Targeted folate Receptor-Mediated Endocytosis via Radiotherapy. 55th Annual meeting of American Society of Therapeutic

Radiation Oncology; 2013/9/23;  
Atlanta USA.

(3)連携研究者  
無し( )

- 11 原田聡、江原茂、世良耕一郎、石井慶造、  
福田光宏、山崎浩道、佐藤隆博、神谷  
富裕。放射線可溶性マイクロカプセル  
とCTを用いた悪性腫瘍検出と、放射線-  
標的薬剤標的療法。第72回本医学放  
射線学会学術集会; 2013/4/13; 横浜。

研究者番号:

(4)研究協力者  
無し

- 12 Satoshi Harada, Shigeru Ehara a, Keizo  
Ishii , Takahiro Sato , Masashi Koka ,  
Tomihiko Kamiya, Koichiro Sera,  
Shyoko Goto. Micro capsular maging  
of malignant tumors and  
radiation-induced release of  
liquid-core microcapsules for their  
treatment. 13th International  
Conference on Particle Induced X-ray  
Emission; 2013/3/5; Gramado Brazil.

〔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

原田 聡 (HARADA, Satoshi)  
岩手医科大学・医学部・放射線医学講座・  
講師  
研究者番号: 20244931

### (2)研究分担者

無し  
研究者番号: