

Nanocapsule を用いた初期転移巣のイメージングと治療

原田 聡、江原 茂、石井慶造、世良耕一郎、斉藤義弘⁴

¹岩手医科大学医学部放射線医学講座
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

²東北大学工学部量子工学専攻
980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6

³岩手医科大学サイクロترونセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

⁴ (公社) 日本アイソトープ協会仁科記念サイクロترونセンター (NMCC)
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1 はじめに

現在まで我々は、放射線照射により抗癌剤を放出するカプセルを開発し、放射線照射による抗癌剤標的療法を開発してきた¹⁻⁶⁾。すなわち 1) マイクロカプセルを治療標的臓器に集中させ、2) マイクロカプセルに放射線を照射、3) マイクロカプセルから抗癌剤を放出させ、4) 放出された抗癌剤と放射線との相乗効果により抗癌作用を増強する、さらに 5) マイクロカプセルの抗癌剤限局化で副作用軽減させる、の 5 段階からなる標的療法である^{4,5)}。

今回、我々は、従来のマイクロカプセルに、CT による体内動態可視化と、抗原抗体反応を用いた初期転移巣へのカプセル集積能を加える。それにより、初期転移送へのカプセル集積と CT による初期転移巣検出を検討し、集積したマイクロカプセルに放射線を照射することで、上記 2)~5) に記した薬剤標的療法を研究する。

現在、初期転移巣の血管内皮には、 $\alpha v \beta 3$ 抗原が発現していることが知られている^{7,8)}。今回我々は、直径をナノオーダーまで微細化したカプセルを $\alpha v \beta 3$ 抗体で標識、CT 用造影剤と抗癌剤を封入する。本ナノカプセルを、肺転移を高頻度におこす担癌マウスに尾静脈より体内に注入し、集積を PIXE 法と CT による検出後、肺に照射を加え、カプセルから抗癌剤を放出させる。放出された抗癌剤と放射線との相乗効果により初期転移巣の治療効果増強と、カプセルによる抗癌剤限局化作用による、抗癌剤の副作用軽減を研究する。

2 材料と方法

2.1 マイクロカプセル作成

ヒアルロン酸 0.1 g、アルギン酸 0.1 g、カルボプラチン 5 mg、抗 $\alpha v \beta 3$ 抗体 (E[c(RGDfK)]₂) 1 μ g を蒸留水 10 cc に溶解し、カプセル液を作成する。本カプセル溶液を、超音波振 (1.5 MHz, 200watt) を加えた Ca と Fe の 0.3 mmol/l 溶液に噴霧し、アルギン酸を Ca, Fe 重合することで、カプセルを作成した。

2.2 動物モデル作成

人乳癌由来、高転移性実験腫瘍 MM48 をマウス左下腿 (C3He/N、6 週齢♂) に移植し、腫瘍径が 8mm 大となった時点で実験に使用した。

2.3 処置と測定

2.3.1 CT によるナノカプセル動態の検討

上記 2.1 で作成したナノカプセルを、尾静脈より静脈注射し、1、3、6、9、12、24 時間後に CT を撮像後、肺と腫瘍を採取した。カプセル動態は、CT 値の変動から、PIXE では肺、あるいは腫瘍中の Pt 含有量から算出した。

この手技により、カプセル集積が最大となった時間を割り出した。

2.3.2 ナノカプセルと放射線照射による初期転移巣治療の検討

肺の初期転移巣へのナノカプセル集積が最大となった時点で、Softex MV 100 を使用し、400 KeV X 線を、2、5、または 10Gy 照射した。ナノカプセルからのカルボプラチン放出は、PIXE 法により測定し、転移巣の治療効果は、照射 14 日後の肺結節の数を肉眼的、および CT 画像により検討した。

3 結果

3.1 生成されたナノカプセル

生成されたマイクロカプセルを図 1 に示す。カプセル径は 763 ± 0.65 nm であった。

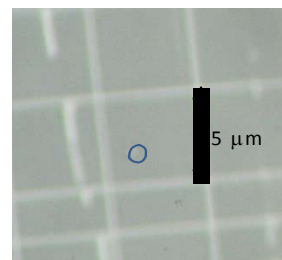


図 1 生成されたナノカプセル

3.2 ナノカプセル静注後の正常肺組織と肺転移巣への集積

ナノカプセル静注前と静注後の胸部 CT 画像を、それぞれ、図 2-A と図 2-B に、転移性腫瘍と正常肺組織の CT 値の経時的変動を図 3 に、転移組織と正常肺組織の Pt 変動量を図 4 に示した。

3.2.1 ナノカプセル静脈注射による CT 画像の変化

CT により描出された転移巣 (図 2-A、 \square 内)は、ナノカプセル静脈注射により、X 線吸収が増加し、全体として白く描出され、辺縁が明瞭化した(図 2-B、 \square 内)。さらに、ナノカプセル静脈注射前には観察されなかった転移結節が観察可能となった (図 2-B、 \rightarrow)。

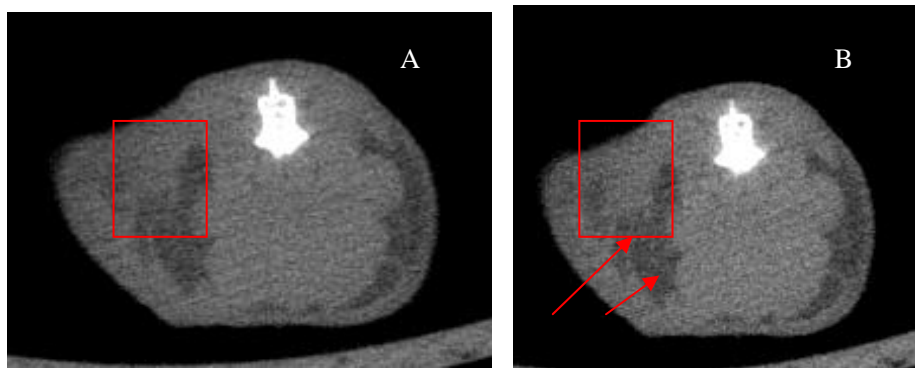


図 2 A:ナノカプセル静注前の胸部 CT B:静脈注射後の胸部 CT
ナノカプセル静注により、腫瘍輪郭が明瞭化 (\square)。新たな転移結節が検出される (\rightarrow)。

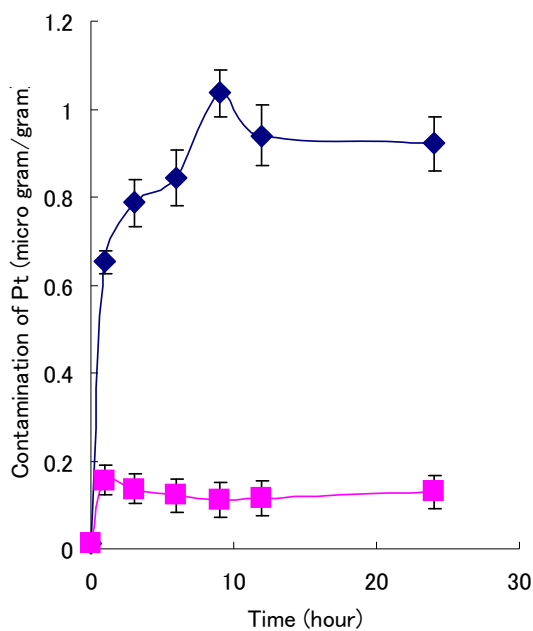


図 3 ナノカプセル静注後の肺組織と肺転移巣の経時的変動
(◆) 肺転移巣。(■) 肺正常組織。

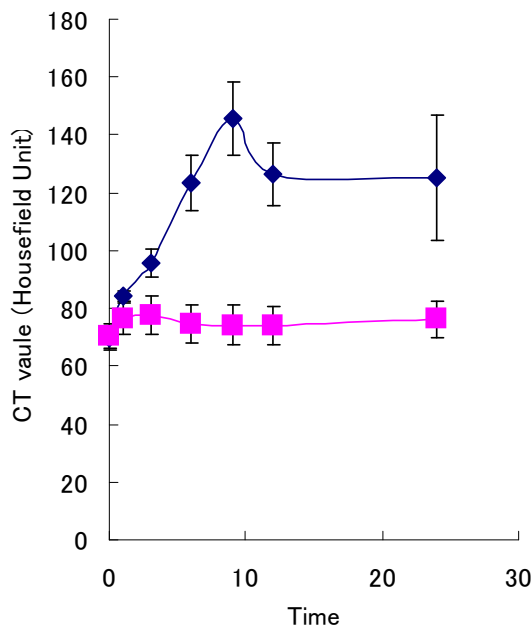


図 4 ナノカプセル静注後の CT 値の経時的変動
(◆) 肺転移巣。(■) 肺正常組織。

3.2.2 ナノカプセル静注後の CT 値の経時的変化 (図 3、4)

肺転移巣へは肺正常組織よりも各経時的観察点で高濃度の Pt が定量され (図 3)、ナノカプセルが正常肺組織よりも肺転移巣により多く集積していることが認められた。そのピークは静脈注後 9 時間後に観察され、それ以降は穏やかな減少傾向が認められた (図 3)。CT 値の経時的変化は PIXE による Pt 経時的変化と同じ変動を示した。すなわち、静脈注後 9 時間後にピークを持つ一過性の上昇と、それ以降の穏やかな減少傾向である。このことから、CT 値変動によるナノカプセル動態の非観血的観察が可能と考えられた。

3.2.3 ナノカプセル集積時における放射線照射とカプセルからの抗癌剤放出

ナノカプセル静脈注射後の集積のピークが、静脈注射 9 時間後に認められたため、この時点で肺に放射線を照射した。その後、カプセル数の変動を示す CT 値の経時的変化と転移巣への抗癌剤沈着としての Pt 含有量の経時的変化を、それぞれ、図 5 と図 6 に示した。マイクロカプセル数を反映する CT 値は 10Gy (図 5-▲) と 5Gy 照射後 (図 5-■) とともに、照射しなかった群 (図 5-×) と比べ、有意に低下を示した。低下の程度は放射線照射線量が大きいほど著明で、照射 22 時間後の時点で、照射 10Gy で 70.5 ± 5.2 Hu (図 5-▲), 5Gy で 74.1 ± 5.6 Hu (図 5-■) であった。これより、放射線照射による、カプセルの破裂が考えられた。カルボプラチン量を反映する、転移巣内 Pt 含有量は、照射 10Gy 後では、照射 3 時間後 (カプセル静脈注射 12 時間後)、わずかに増加後 (図 6-▲)、その後穏やかな減少を示したが、非照射群 (図 6-×) と比較すると、その値は $0.96 \sim 0.99$ $\mu\text{g/g}$ と有意に高い値を維持した。照射 5 Gy 後では照射 3 時間後 (カプセル静脈注射 12 時間後)、一過性の低下を呈したが (図 6-■)、その後、明らかな変化は見られず、照射後の各時点で、有意差はないものの、照射しなかった転移巣よりもわずかに高い値 ($0.94 \sim 0.96$ $\mu\text{g/g}$) を呈した (図 6-■)。これらより、放射線照射に伴うナノカプセル破裂による、転移巣へのカルボプラチン沈着と、カプセル殻からのカルボプラチンの徐放が考えられた。

放射線照射後 2Gy に関しては、CT 値と Pt 含有量ともに、放射線を照射しなかった群と、明らかな差は認められなかった (図 5、6-◆)。

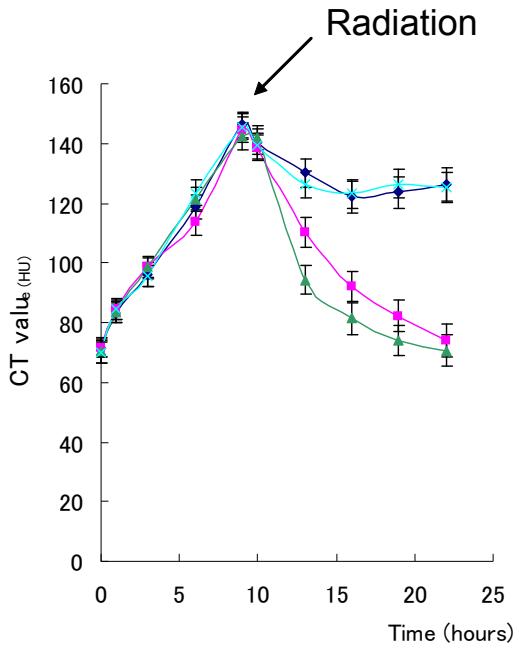


図5 放射線照射に伴うCT値の変動
2Gy (◆)、5Gy (■)、10Gy (▲)
非照射群(×)

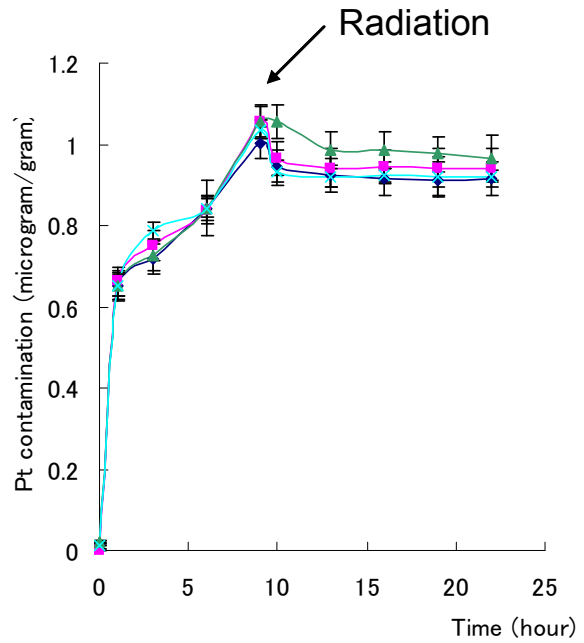


図6 放射線照射に伴うPt含有量の変動
2Gy (◆)、5Gy (■)、10Gy (▲)
非照射群(×)

3.3.1 ナノカプセルと放射線照射による転移巣の治療効果

放射線照射単独 (■)と放射線とナノカプセル併用時 (■) の転移巣の治療効果を、転移巣の数の減少を以て図7に示す。

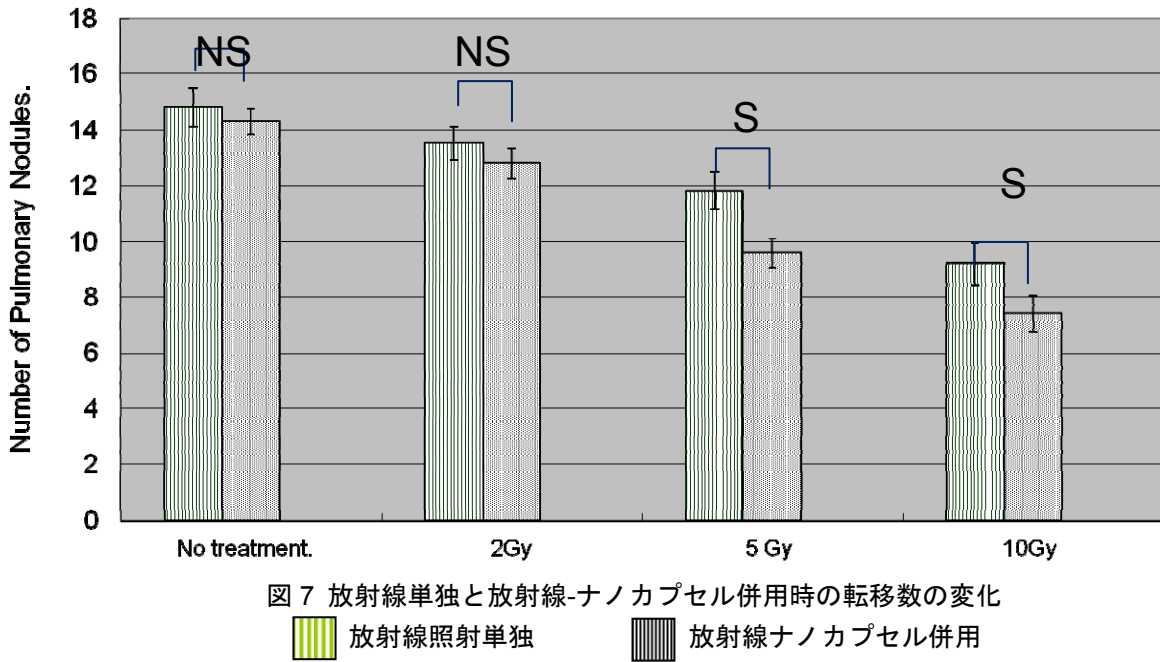


図7 放射線単独と放射線-ナノカプセル併用時の転移数の変化
■ 放射線照射単独 ■ 放射線ナノカプセル併用

ナノカプセル単独では有意な転移巣の減少は見られず、2 Gy 照射時ではナノカプセル併用による有意な転移巣減少は見られなかったが、5 Gy、および 10 Gy 照射時では、ナノカプセル併用による有意な転移巣の減少が認められた。これは、2 Gy ではナノカプセル単独では、放射線照射によるカプセル破裂や薬剤放出が不十分であったのに対し、5 Gy および 10 Gy 照射下では、放射線によるカプセルの破裂と薬剤放出が起きたためと考えられた。

4 考察

癌転移は癌患者生存率を左右する要因の一つである⁹⁾。したがって、癌治療における生存率向上のためには、転移巣の早期発見と早期治療が重要な課題となる⁹⁾。現在まで、転移巣の早期発見（初期転移巣発見）には、主に造影剤を用いた CT が使用されてきたが、初期転移巣の描出が不明瞭な場合や、発見されても、それが転移巣と断定できない場合が多々存在する¹⁰⁾。もし、CT 画像で、初期転移巣周囲に集積し、それを明瞭に描出する物質が存在すれば、初期転移巣を早期に、しかも正確に発見することが可能になる。さらに、その物質が初期転移巣を治療する能力を持てば、転移巣の早期治療にも役立つと考えられる。

初期転移巣の血管内皮には、 $\alpha v \beta 3$ 抗原が発現していることが知られている^{7,8)}。今回、我々は、放射線で抗癌剤カルボプラチンを放出するナノカプセル表面を $\alpha v \beta 3$ 抗体で標識し、抗原抗体反応で初期転移巣周囲に集積させ、CT で初期転移巣を検出、その後、放射線を照射し、ナノカプセルから放出された抗癌剤と放射線の相乗効果で初期転移巣を治療することを考えた。

$\alpha v \beta 3$ 抗体で標識したナノカプセルは転移巣に集積した。この集積は CT で検出可能で、初期転移巣を明瞭に描出するとともに、CT 値を観察することにより、カプセル集積度を計測するのが可能であった。放射線照射後では、照射 5 Gy と 10 Gy 後にカプセル数の減少が認められ、カルボプラチン濃度は 5 Gy でわずかに増加、10 Gy では有意に増加した。これは、カプセルから放出されたカルボプラチンが、初期転移巣に対し、放射線と共に相乗的に作用し、転移巣を減少させたと考えられ、本ナノカプセルによる初期転移巣の治療効果増強が可能なことが示唆された。

参考文献

- 1) Harada, Satoshi ; Ehara, Shigeru ; Ishii, Keizoh ; Yamazaki, Hiromichi ; Matsuyama, Shigeo ; Sakai, Takuro ; Obara, Yoshihiro ; Sato, Takahiro ; Oikawa, Masakazu ; Sera, Koichiro. The target-chemotherapy directed by the radiation. International Journal of PIXE Vol 15 No 3&4, (2005) 221-224
- 2) S. Harada, S. Ehara, K. Ishii, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Komori, T. Kamiya, T. Arakawa, M. Saitoh, M. Oikawa, and K. sera. Optimizing the radiosensitive liquid core microcapsules for the targeting of chemotherapeutic agents. Nucl. Inst. And Meth. Phys. Res. B260 (1), (2007) 164-168.
- 3) S. Harada, S. Ehara, K. Ishii, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Komori, T. Kamiya, T. Arakawa, M. Saitoh, M. Oikawa, and K. Sera. Improvement of radiosensitive Liquid-core microcapsules by Yttrium polymerization Int. J. PIXE (2007) 17: 33-40
- 4) S. Harada, S. Ehara, K. Ishii, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Komori, T. Kamiya, T. Arakawa, M. Saitoh, M. Oikawa, and K. sera. Targeted Delivery of Chemotherapeutic Agents by using Improved Radiosensitive Liquid-Core Microcapsules and Assessment of Their Antitumor Effect. Int. J. Radiation Oncology, Biol. Phys. 175 (2009) P 455-462.
- 5) S. Harada, S. Ehara, K. Ishii, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Komori, T. Kamiya, T. Arakawa, M. Saitoh, M. Oikawa, and K. sera. Improved radiosensitive microcapsules using H_2O_2 Int. J. PIXE (2010) 20: 30-36.

- 6) S. Harada, S. Ehara, K. Ishii, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, T. Kamiya, T. Sakai, K. Arakawa, M. Saitoh, S. Oikawa and K. Sera. Increasing antitumor effects of chemoradiotherapy by drug efflux inhibition with encapsulated RLIP-76. *Int. J. PIXE* (2011) 21: 30-36
- 7) G. E. Morozevich, N. E. Kozlova, A. E. Berman. A Role for Integrin $\alpha\beta3$ in Invasion Activity of Highly Metastatic Syrian Hamster Fibroblasts. *EXCLI Journal* (2004) 3:105-114.
- 8) Newton V. Verbisck,¹ E'rico T. Costa,¹ Fabri'cio F. Costa, *et. al.* ADAM23 Negatively Modulates $\alpha\beta3$ Integrin Activation during Metastasis. *Cancer Res* (2009) 69: 5546-5552.
- 9) Rebecca Siegel, MPH; Elizabeth Ward, PhD, Otis Brawley, MD, Ahmedin Jemal, DVM, PhD. Cancer Statistics, 2011. *The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities on Premature Cancer Deaths*. *CA Cancer J Clin* (2011) 61: 212-236.
- 10) Daniel M. Libby, MD, FCCP; James P. Smith, MD, FCCP, Nasser K. Altorki, MD, FCCP; Mark W. Pasmantier, MD, David Yankelevitz, MD; and Claudia I. Henschke, PhD, MD. Managing the Small Pulmonary Nodule Discovered by CT. *Chest* (2004) 125:1522-1529.

Imaging of incipient metastases and their treatment, using radiosensitive liquid-core nanocapsules

S. Harada, S. Ehara, K. Ishii, K. sera and Y. Saitoh⁴

¹Iwate Medical University, School of Medicine, Department of Radiology
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan.

²Department of Quantum Science and Energy Engineering, Tohoku University
6-6 Aza-Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8579 Japan.

³Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

⁴Takizawa Institute, Japan Radioisotope Association
348-1 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

The imaging of incipient metastases and their treatment, using radiosensitive liquid-core nanocapsules, *IN VIVO* in C3He/N mice.

Nanocapsules were prepared by spraying a mixture of 4.0% alginate, 3.0% hyaluronic acid, and 1 μ g E[c(RGDfK)]₂ (α v β 3 antibody) into 0.5 mmol FeCl₂ and CaCl₂ supplemented with 5mg of Carboplatin (Pt-containing anticancer drugs). Cells of MM48 (α v β 3+), a highly metastatic tumor were inoculated in the left hind legs of C3He/N mice. The nanocapsules were intravenously injected, and their kinetics and accumulation to incipient metastatic foci were observed using CT. and PIXE. At the time of maximum accumulation of nanocapsules, the radiation was given.

The accumulated nanocapsules released Carboplatin, which decreased the number of incipient metastases synergistically with radiation.