

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18850

研究課題名(和文)がん標的型高性能細胞製剤の開発および難治性がん治療への応用

研究課題名(英文)Development of tumor-targeting cell therapeutics for cancer therapy.

## 研究代表者

草森 浩輔(Kusamori, Kosuke)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90707407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難治性がんを標的可能な高性能細胞製剤の開発を目的として、腫瘍集積性を有する間葉系幹細胞を用いて抗腫瘍型間葉系幹細胞の開発を行った。まず、アビジン-ビオチン複合体法を応用することによりマウス間葉系幹細胞株C3H10T1/2細胞の表面に対して抗がん剤であるドキソルビシンを封入したリポソームを修飾することに成功した。また、遺伝子導入法を用いることによりinterferon gamma放出C3H10T1/2細胞の樹立に成功した。これらの抗腫瘍型C3H10T1/2細胞は高い抗腫瘍効果を示したことから、本法を応用することで間葉系幹細胞を用いたがん標的治療法の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we tried to develop tumor-targeting cell therapeutics for cancer therapy using mesenchymal stem cells (MSCs), which have a tumor-homing ability. We selected an avidin-biotin complex (ABC) method and a gene transfection method to functionalize mouse mesenchymal stem cell line C3H10T1/2 cells. We revealed the ABC method could modify C3H10T1/2 cells with Nanoluc luciferase, a reporter protein, for at least 14 days without significant changes in the characteristics of C3H10T1/2 cells. The ABC method was also used to develop doxorubicin-containing liposome-modified C3H10T1/2 cells. Moreover, interferon gamma-releasing C3H10T1/2 cells were established by the gene transfection method. These cells showed an excellent anti-tumor effects. These functionalized MSCs will be useful for cell-based cancer therapy.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：細胞移植治療 間葉系幹細胞 細胞機能化 がん治療

## 1. 研究開始当初の背景

医療分野において、がんの克服を目的とした研究は目覚ましい進歩を遂げ、がんの種類に対する個別の治療薬、または、がん患者に対する個別の治療法が開発された。しかしながら、これらの治療法が適用されたがん患者においても、がんの根本的治療法の確立は未だ達成されていないのが現状であり、5年生存率が50%に満たない胆道がんや膵臓がんは、難治性がんとして極めて重要性の高い疾患と位置付けられている。

間葉系幹細胞は、脂肪組織および骨髄などから容易に単離可能な分化多能性幹細胞であり、間葉系に属する幅広い細胞への分化能ならびに損傷組織における修復作用などを有することが知られている。さらに、間葉系幹細胞は腫瘍組織から放出されるケモカイン等を感じて積極的に腫瘍内に集積する性質を有することから、間葉系幹細胞を用いたがん標的治療法に対して注目が集まっている。しかしながら、間葉系幹細胞のがん細胞増殖抑制効果は弱く、生体移植後の細胞生存率も低いことが報告されていることから、間葉系幹細胞を移植するだけではがんを効果的に治療することは困難である。

これまでに申請者は、薬物送達に関する知識を細胞に応用し、細胞移植後の体内動態解析または生存期間の延長に成功してきた。これらの成果の中で、動物に移植した細胞は、移植初期に大半が死滅することを明らかにし、細胞を疾患治療に応用するには、細胞の生存期間を延長することが重要であることを示した。すなわち、がんに対する間葉系幹細胞の効果が低い原因は、間葉系幹細胞自身の抗腫瘍活性が低いたくなく生体内に投与した間葉系幹細胞の生存期間が極めて短いためにがん部位へと十分に集積していないことが推察される。そこで、優れたがん集積性と強力ながん抑制機能を間葉系幹細胞に付与することができれば、間葉系幹細胞を利用した有効性の高いがん標的治療法が開発できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、間葉系幹細胞のがん集積性を最大限に活用した有効性の高い難治性がん治療法を提唱することを目的に、遺伝子導入法と化学修飾法を駆使することによる、優れたがん抑制機能を有したがん標的型高性能間葉系幹細胞を開発する。具体的には、細胞の生存またはがん抑制機能の向上を目的とした遺伝子の種類や発現期間を最適化した遺伝子導入法を確立するとともに、同様な機能の向上を目的とした機能性分子の化学修飾法の開発および最適化を行う。これらの方法を用いて優れたがん抑制機能と高い生存能を有する高性能間葉系幹細胞を確立し、高い腫瘍集積性を有する間葉系幹細胞の開発を試みる。最終的には、開発した高性能間葉系幹細胞を用いてがんの増殖抑制効果につ

いて検討し、間葉系幹細胞によるがん治療法の有効性を実証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株

マウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞は、15% FBS、0.6% 抗生物質 抗真菌剤混合溶液を添加した DMEM 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。ホタルルシフェラーゼ遺伝子安定発現マウス大腸癌細胞株 colon26/luc 細胞は、10% FBS、0.6% 抗生物質 抗真菌剤混合溶液を添加した DMEM 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。

### (2) レポータータンパク質のビオチン化

NanoLuc luciferase (Nluc) および enhanced green fluorescent protein (GFP) は、6 mM sulpho-NHS-LC-biotin (NHS-biotin) と室温で 30 分間反応させることによりビオチン化した。それぞれのビオチン化タンパク質は、vivaspin 20 遠心式濃縮ユニットを用いて 4,000 g で 5 分間遠心することにより精製した。

### (3) アビジン-ビオチン複合体(ABC)法を用いた C3H10T1/2 細胞に対する Nluc 修飾

C3H10T1/2 細胞 ( $2 \times 10^5$  細胞) を 6 ウェル培養プレートに播種して 37°C で一晚培養した。翌日、C3H10T1/2 細胞に対して各濃度の NHS-biotin を添加し、室温で 10 分間培養することで C3H10T1/2 細胞をビオチン化した。ビオチン化 C3H10T1/2 細胞は PBS で 2 回洗浄後、100 µg/mL のアビジンを添加して室温で 5 分間培養することによりアビジン化した。アビジン化 C3H10T1/2 細胞は PBS で 2 回洗浄後、100 µM ビオチン化 Nluc を添加して 5 分間培養することで Nluc 修飾 C3H10T1/2 細胞を調製した。C3H10T1/2 細胞に修飾された Nluc 量は、Nano-Glo Luciferase Assay Reagent を用いて発光量を指標に測定した。

### (4) 共焦点レーザー顕微鏡による GFP 修飾 C3H10T1/2 細胞の観察

ABC 法を用いて調製した GFP 修飾 C3H10T1/2 細胞を Lab-Tek II チャンバースライドに播種し、37°C で 3 時間培養した。その後、チャンバースライド上の GFP 修飾 C3H10T1/2 細胞に対して 2% グルタルアルデヒド溶液を添加して 4°C で 2 時間固定処理を行った。固定した GFP 修飾 C3H10T1/2 細胞は Fluoro-KEEPER Antifade Reagent を用いて封入後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP 修飾 C3H10T1/2 細胞における GFP 由来の蛍光を観察した。

### (5) Nluc 修飾 C3H10T1/2 細胞の増殖性および接着性、遊走能の評価

ABC 法を用いて調製した Nluc 修飾 C3H10T1/2 細胞の増殖性を評価するために、6 ウェル培養プレートに  $2 \times 10^5$  細胞の Nluc 修

飾 C3H10T1/2 細胞を播種し、一晚培養した。翌日、培養プレートに接着した NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞をセルスクレーパーを用いて剥離し、トリパンブルー色素排除法を用いて細胞数を計測した。計測に使用しなかった細胞は培養プレートに再度播種した。この操作を毎日繰り返し、経日的に細胞数を計測した。次に、NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞の培養プレートに対する接着性を評価するために、96 ウェル培養プレートに  $2 \times 10^5$  細胞の NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞を播種して 10、30、90 分後に PBS で細胞を洗浄した。その後、培養プレートに残存した細胞をセルスクレーパーを用いて剥離し、回収した細胞数をトリパンブルー色素排除法を用いて計測した。また、NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞の遊走能を評価するために、24 ウェルトランズウェルのインサート側に  $4 \times 10^4$  細胞の NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞を播種した。底面のウェルには無血清培地および colon26/luc 細胞を 48 時間培養した条件培地を添加した。24 時間培養後、細胞を 2.5% グルタルアルデヒド溶液で 2 時間固定し、インサート上部の細胞を脱脂綿で除去した。その後、インサート下部に遊走した細胞をクリスタルバイオレットを用いて染色し、染色された細胞を顕微鏡で観察し、その細胞数を計測した。

#### (6)細胞の分化

NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞の脂肪細胞への分化を評価するために、 $5 \times 10^3$  細胞の NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞を 96 ウェル培養プレートへ播種して 48 時間培養した。その後、サブコンフルエントになった細胞の培地を mesenchymal stem cell adipogenic differentiation medium に交換し、3 日ごとに培地を変えながら 14 日間培養した。脂肪細胞への分化はオイルレッド染色法を用いて評価した。同様に、NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞への分化を評価するために、 $5 \times 10^3$  細胞の NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞を 96 ウェル培養プレートへ播種して 72 時間培養した。コンフルエントになった細胞の培地を mesenchymal stem cell osteogenic differentiation medium に交換し、3 日ごとに培地を変えながら 21 日間培養した。骨芽細胞への分化はアリザリンレッド S 染色法を用いて評価した。染色した細胞はいずれも顕微鏡で観察した。

#### (7)ABC 法を用いた C3H10T1/2 細胞に対する GFP の修飾効率

これまでと同様に、ABC 法を用いて GFP 修飾 C3H10T1/2 細胞を調製した。また、リポフェクション法を用いて pCAG-GFP プラスミドを C3H10T1/2 細胞に遺伝子導入して 48 時間培養した GFP 遺伝子導入 C3H10T1/2 細胞を調製した。これらの細胞を 2.5% グルタルアルデヒド溶液で 2 時間固定した。固定したそれぞれの細胞は、BD LSRFortessa flow

cytometer を用いて解析した。

#### (8)マウスに移植した NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞のイメージング解析

NIuc 修飾 C3H10T1/2 細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞/100  $\mu\text{L}$ ) または NIuc 溶液 (0.3 ng/100  $\mu\text{L}$ ) をヌードマウス (BALB/c Slc-nu/nu) の腹腔内に投与した。その後、経日的にマウスの腹腔内に Nano-Glo Luciferase Assay Reagent を投与して、NIuc 由来の発光を IVIS イメージングシステムを用いてイメージングし、マウスにおける NIuc の残存期間を評価した。

#### (9)ドキソルピシン封入ビオチン化リポソームの調製

ビオチン化リポソームを調製するために、1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DSPC)、cholesterol、polyethylene glycol-NH<sub>2</sub> (DSPE-NH<sub>2</sub>) を 59.5、7.5、33 の比率で調製した混合物をクロロホルムに溶解した。エバポレーターを用いて溶媒を蒸発した後、乾燥した脂質膜を 250 mM 硫酸アンモニウム溶液 (pH 4.5) に溶解し、エクストルダーターを用いて、リポソームを整粒した。得られたリポソームは、PD-10 カラムを用いて HBSS に溶媒を置換し、1 mg/mL ドキソルピシン溶液を混合して 37 °C で 60 分間培養することでリポソームにドキソルピシンを封入した。リポソームに封入されなかったドキソルピシンは超遠心によって除いた。その後、ドキソルピシン封入リポソームに対して 0.55 mg/mL NHS-biotin を添加することによりドキソルピシン封入ビオチン化リポソームを調製した。調製したリポソームの粒子径およびゼータ電位はゼータサイザーを用いて測定した。また、リポソームに封入したドキソルピシン量を測定するために、リポソームに 0.5% Triton-X 溶液を添加して、凍結融解を 3 回繰り返した後、上清におけるドキソルピシン量を測定した。

#### (10) C3H10T1/2 細胞に対するドキソルピシン封入リポソーム修飾

NHS-biotin を用いてビオチン化した C3H10T1/2 細胞に、アビジン溶液を添加することでアビジン化 C3H10T1/2 細胞を得た。アビジン化 C3H10T1/2 細胞に対して、100  $\mu\text{g/mL}$  ドキソルピシン封入ビオチン化リポソームを添加して 10 分培養し、3,000 rpm で 3 分間遠心することにより、ドキソルピシン封入リポソーム修飾 C3H10T1/2 細胞を調製した。ドキソルピシン封入リポソーム修飾 C3H10T1/2 細胞は、Lab-Tek II チャンバースライドに播種して 2.5 時間培養後、4% パラホルムアルデヒド溶液で 1 時間固定し、固定したドキソルピシン封入リポソーム修飾 C3H10T1/2 細胞におけるドキソルピシン由来の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

#### (11)ドキソルピシン封入リポソーム修飾

#### C3H10T1/2 細胞による抗腫瘍効果

Colon26/luc 細胞( $1 \times 10^5$  細胞)を 100 mm 培養ディッシュに播種し、一晚培養した。翌日、colon26/luc 細胞を播種した 100 mm 培養ディッシュに対してドキシソルピシン封入リポソーム修飾 C3H10T1/2 細胞を  $1 \times 10^6$  細胞で播種し、48 時間培養した。その後、回収したすべての細胞を lysis 溶液を用いて溶解し、上清中に含まれるルシフェラーゼの発光量を指標に colon26/luc 細胞の増殖抑制効果を評価した。

#### (12) Interferon gamma 放出 C3H10T1/2 細胞の樹立と抗腫瘍効果

Colon26/luc 細胞( $1 \times 10^5$  細胞)をトランスウェルの底面ウェルに播種し、一晚培養した。翌日、リポフェクション法を用いて interferon gamma 放出プラスミドを遺伝子導入した C3H10T1/2 細胞をトランスウェルのインサート側に播種し 48 時間培養した。その後、底面ウェルに残存する colon26/luc 細胞を lysis 溶液を用いて溶解した後、上清中に含まれるルシフェラーゼの発光量を指標に colon26/luc 細胞の増殖抑制効果を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ABC 法を用いた C3H10T1/2 細胞表面への GFP 修飾

ABC 法を用いてビオチン化 GFP を修飾した C3H10T1/2 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、C3H10T1/2 細胞の表面にのみ GFP の蛍光が認められた。一方、未処置の C3H10T1/2 細胞では蛍光は検出されなかった。以上のことから、ABC 法は細胞の表面に化合物を修飾可能であることが示された。

##### (2) C3H10T1/2 細胞に対するビオチン化の最適化と NLuc の修飾期間

ABC 法による化合物の表面修飾法を最適化するために、ビオチン化における C3H10T1/2 細胞の生存率と NLuc の修飾量を評価したところ、C3H10T1/2 細胞に修飾した NLuc 量は NHS-biotin の濃度依存的に増大した。一方、ビオチン化 C3H10T1/2 細胞の生存率は、 $5,000 \mu\text{M}$  以上の NHS-biotin を用いたときに有意に減少した。これらの結果から、C3H10T1/2 細胞の生存率に影響を与えず、最大の NLuc を修飾可能な NHS-biotin の濃度は  $1,000 \mu\text{M}$  とし、以降の実験では  $1000 \mu\text{M}$  NHS-biotin を用いた。さらに、ABC 法による C3H10T1/2 細胞に対する NLuc の修飾持続期間について評価したところ、C3H10T1/2 細胞における NLuc の修飾は少なくとも 14 日間以上持続し、5 日目までは 80% 以上の修飾を持続することが明らかになった。一方、ビオチン化 NLuc を未処置の C3H10T1/2 細胞に添加した群では、細胞に NLuc 活性はほとんど検出されなかった。

##### (3) ABC 法による NLuc 修飾が C3H10T1/2 細胞

##### に与える影響

ABC 法を用いて NLuc を修飾した C3H10T1/2 細胞の増殖性について評価したところ、NLuc 修飾 C3H10T1/2 細胞と未処置の C3H10T1/2 細胞の population doubling time (PDT) はそれぞれ 19.6 時間および 18.9 時間であり、ABC 法による NLuc 修飾は C3H10T1/2 細胞の増殖性に影響しないことが示された。次に、NLuc 修飾 C3H10T1/2 細胞と未処置の C3H10T1/2 細胞の培養プレートに対する接着性は、それぞれ播種して 10 分後に 48% および 43%、30 分後に 67% および 69%、90 分後に 101% および 113% であり、ABC 法による NLuc 修飾は C3H10T1/2 細胞の培養プレートに対する接着性にも影響しないことが示された。さらに、NLuc 修飾 C3H10T1/2 細胞と未処置の C3H10T1/2 細胞の無血清培地への遊走がそれぞれ 2.1% および 2.8% であったのに対し、colon26/luc 細胞の条件培地への遊走能は、それぞれ 31.4% および 34.0% であったことから、ABC 法による NLuc 修飾は C3H10T1/2 細胞の培養プレートに対する遊走能にもほとんど影響を与えないことが示された。最後に、NLuc 修飾 C3H10T1/2 細胞と未処置の C3H10T1/2 細胞はそれぞれ分化培地において骨芽細胞または脂肪細胞に分化し、通常培地ではこれら細胞への分化は認められなかったことから、ABC 法による NLuc 修飾は C3H10T1/2 細胞の分化能にも影響を与えないことが示された。これらの結果から、ABC 法による C3H10T1/2 細胞への NLuc 修飾は、C3H10T1/2 細胞の特性に影響を与えないことが明らかになった。

##### (4) ABC 法による C3H10T1/2 細胞に対する GFP の修飾効率

ABC 法を用いて調製した GFP 修飾 C3H10T1/2 細胞と pCAG-GFP プラスミドを遺伝子導入して調製した GFP 導入 C3H10T1/2 細胞における GFP 陽性細胞の数を flow cytometer を用いて評価したところ、GFP 修飾 C3H10T1/2 細胞における GFP 陽性細胞の数は全体の約 95% であったのに対し、GFP 遺伝子導入 C3H10T1/2 細胞における GFP 陽性細胞の数は、約 7% であった。以上のことから、ABC 法を用いた化合物修飾は極めて高い修飾効率であることが示された。

##### (5) マウスに移植した NLuc 修飾 C3H10T1/2 細胞の NLuc 修飾期間

ABC 法を用いて NLuc を修飾した C3H10T1/2 細胞をヌードマウスの腹腔内に投与後、経日的に基質を投与し、その発光を IVIS イメージングシステムを用いて検出した。その結果、NLuc 修飾 C3H10T1/2 細胞を移植したマウスにおいては 7 日目まで NLuc 由来の発光が観察された一方、NLuc 溶液を腹腔内に投与したマウスにおいては NLuc 由来の発光は 3 日後には検出されなかった。以上のことから、ABC 法を用いて C3H10T1/2 細胞に修飾した NLuc

はマウスに投与後も維持されており、少なくとも7日間は維持されることが明らかになった。

#### (6)ドキシソルピシン封入りポソームの特性および殺細胞効果

薄膜法およびリモートローディング法を用いて調製したドキシソルピシン封入りポソームのサイズおよびゼータ電位はそれぞれ約150 nmおよび5 mVであり、ビオチン化したドキシソルピシン封入りポソームにおいては、それぞれ約156 nmおよび-0.3 mVであった。また、いずれのドキシソルピシン封入りポソームにおいてもドキシソルピシンの封入量はほぼ100%であった。

#### (7)C3H10T1/2細胞に対するドキシソルピシン封入りポソーム修飾

ABC法を用いてドキシソルピシン封入りポソームをC3H10T1/2細胞に修飾し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、細胞の表面にのみドキシソルピシン由来の蛍光が観察された。また、C3H10T1/2細胞に修飾されたドキシソルピシン量は、 $1 \times 10^5$ 細胞あたり約1  $\mu$ gであった。

#### (8)ドキシソルピシン封入りポソーム修飾C3H10T1/2細胞の抗腫瘍効果

Colon26/luc細胞に対してドキシソルピシン封入りポソーム修飾C3H10T1/2細胞を播種し、48時間培養したところ、colon26/luc細胞由来の発光量は著しく減少したことから、ドキシソルピシン封入りポソーム修飾C3H10T1/2細胞は抗腫瘍効果を有することが示された。

#### (9) Interferon gamma 放出 C3H10T1/2 細胞の抗腫瘍効果

トランスウェルの底面ウェルに対して colon26/luc 細胞を、インサートには interferon gamma 放出 C3H10T1/2 細胞を播種して48時間共培養したところ、colon26/luc細胞由来の発光量は未処置のC3H10T1/2細胞と共培養した場合と比較して著しく減少したことから、interferon gamma 放出C3H10T1/2細胞は抗腫瘍効果を有することが示された。

### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計8件)

草森浩輔、高山幸也、勝見英正、坂根稔康、山本昌。アビジン-ビオチン法を用いた間葉系幹細胞への長期的な化合物修飾とがん治療への応用。第16回日本再生医療学会総会、2017年3月7日~9日、仙台国際センター(仙台)。

辻村真里、草森浩輔、西川元也、勝見英正、坂根稔康、山本昌。細胞自殺を応用した生体内における移植細胞の増殖制御。第16回日本再生医療学会総会、2017年3月

7日~9日、仙台国際センター(仙台)。

高山幸也、草森浩輔、田辺典子、勝見英正、坂根稔康、山本昌。アビジン-ビオチン法を用いた腫瘍集積性を有する間葉系幹細胞の機能化に関する検討。日本薬剤学会第31年会、2016年5月19日~21日長良川国際会議場・岐阜都ホテル(岐阜)。

高山幸也、草森浩輔、月森千尋、田辺典子、勝見英正、坂根稔康、山本昌。アビジン-ビオチン法を用いた間葉系幹細胞に対する薬物封入担体の修飾。第32回日本DDS学会学術集会、2016年6月30日~7月1日、グランシップ(静岡)。

高山幸也、草森浩輔、林実茄、勝見英正、坂根稔康、山本昌。間葉系幹細胞への長期的な薬物修飾を目的としたアビジン-ビオチン法の応用。第66回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016年10月15日、大阪薬科大学(大阪)。

草森浩輔、辻村真里、織田千尋、西川元也、勝見英正、坂根稔康、山本昌。自殺遺伝子を利用したインスリン放出性細胞株の細胞増殖制御。日本薬学会第136年会、2016年3月26日~29日、パシフィコ横浜(横浜)。

辻村真里、草森浩輔、西川元也、勝見英正、坂根稔康、山本昌。ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼを利用した生体内におけるインスリン放出性細胞株の細胞増殖制御法の確立。第65回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015年10月17日、大阪大谷大学(大阪)。

辻村真里、草森浩輔、西川元也、勝見英正、坂根稔康、山本昌。ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼを利用したインスリン放出性細胞株の細胞増殖制御法の確立。第31回日本DDS学会学術集会、2015年7月2日~3日、京王プラザホテル(東京)。

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

草森浩輔(KUSAMORI, Kosuke)  
京都薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 90707407