

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11698

研究課題名(和文) 新たなDrug Delivery Systemを活用した特異的分子標的癌治療法

研究課題名(英文) Development of specific molecular target therapy for oral cancer using new drug delivery system

研究代表者

岩永 賢二郎 (IWANAGA, KENJIRO)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20448484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：扁平上皮癌の表面に過剰発現している上皮成長因子受容体(EGFR)に対する抗体(抗EGFR抗体)を新規マイクロバブル(帝京大学薬学部生物薬剤教室より供与)に結合させ、抗EGFR抗体修飾マイクロバブル(直径1.5 μ m)を開発した。同バブルを用い、*in vitro*、*in vivo*の実験系で口腔扁平上皮癌細胞(Ca9-22)に低濃度のbleomycinを導入したところ、癌細胞への導入効果の増強を認めた。新規抗癌剤として、金属ナノ粒子材料であるPtナノコンポジットビーズ(新日鉄住金化学から供与)を*in vitro*、*in vivo*の実験系で癌細胞に導入したところ、導入群で著明な抗腫瘍効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

舌癌などは、表層から超音波を当てることができ、ソノポレーション法を用いる部位として適している。抗EGFR抗体修飾マイクロバブルは表面が水溶性ポリエチレングリコールで修飾されているため、肝臓などを中心とする細網内皮系組織の貪食細胞に処理されず、血中に長時間循環滞留することができる。バブルに抗EGFR抗体を結合させることにより、より選択的に癌局所へ抗癌物質を集積することができる。これらのバブルを用いれば、ターゲットとなる癌組織にバブルを集積させ、体外からの超音波診断とともに、治療用超音波エネルギーで、非侵襲的に抗癌剤を導入できる。口腔癌の治療を始め、様々な難治性疾患の治療に応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Sonoporation is a drug and gene delivery system using ultrasonication that allows the intracellular delivery of foreign molecules that cannot enter cells under normal conditions. In this study, we developed anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody-conjugated Microbubbles (EGFR-MBs) and evaluated their capacity to enhance anti-cancer drug toxicity *in vitro* and *in vivo*. Bleomycin delivery using sonoporation with EGFR-MBs was significantly more toxic to the cells compared with the other groups. We next examined the effect of EGFR-MBs in a murine squamous cell carcinoma model. Bleomycin delivery by sonoporation with EGFR-MBs exhibited remarkable antitumor activity.

We focused novel platinum nanoparticles-conjugated latex beads, platinum nanocomposite (PtNCP) beads, and investigated the possibility to incorporate novel anti-cancer effect of these combined nanoparticles. PtNCP beads treatment suppressed tumor growth and identified increasing pathological necrotic areas, *in vivo*.

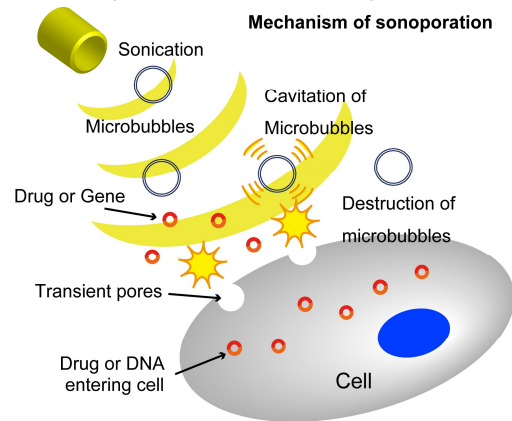
研究分野：口腔外科

キーワード：癌 ソノポレーション マイクロバブル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来の口腔癌治療では、基本的に外科的治療が選択され、必要に応じて放射線療法、化学療法が術前もしくは術後療法として選択されている。しかし、化学療法や放射線療法は、腫瘍だけでなく隣接した正常組織へ影響を及ぼし、様々な副作用が生じ、結果として患者のQOLの低下を引き起こす。そのため、癌のみを標的とする治療として分子標的薬などの治療法が行われているが、まだ補足的な利用の段階であり、現在でもさらなる癌細胞特異的な新規癌治療法の開発について様々な研究が進められている。近年、癌治療における薬剤、遺伝子の有効性を高める方法として、ナノ・マイクロスケールの運搬体を利用して病巣に選択的に薬剤、遺伝子を送達することを目的とするターゲティング型DDSが注目を集めている。代表者は、これまで、医療用に用いられる程度の出力の超音波と造影剤であるナノ・マイクロバブルを併用することにより、様々な細胞や臓器へ薬剤や遺伝子を導入する技術(ソノポレーション法)を開発してきた。リポソームに超音波造影ガスを封入した新規マイクロバブルは、従来のナノバブルに比べ、安定性があり、その内部に抗癌剤などを封入することができる。さらに、新規キャリアーとしてPtナノコンポジットビーズに着目した。Ptナノ粒子は、抗菌作用、抗がん作用、抗酸化作用を持つことが報告されている。新日鉄住金化学により新規開発されたPtナノコンポジットビーズは、表面に抗体などのがん指向性を付与できる。これらの新たなナノ粒子を用いた遺伝子および抗癌剤の特異的分子標的療法を開発する。



2. 研究の目的

(1)抗 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 抗体を結合させたマイクロバブルを開発する。ソノポレーション法と同マイクロバブルを用いた抗癌剤の Drug Delivery system を改良し、導入効率の向上、抗癌剤の効果増強を in vitro と in vivo の実験で検討した。

(2) 新規開発された Pt ナノコンポジットビーズを用い、癌治療への可能性を検証すべく、口腔扁平上皮癌細胞に対する影響を検討した。

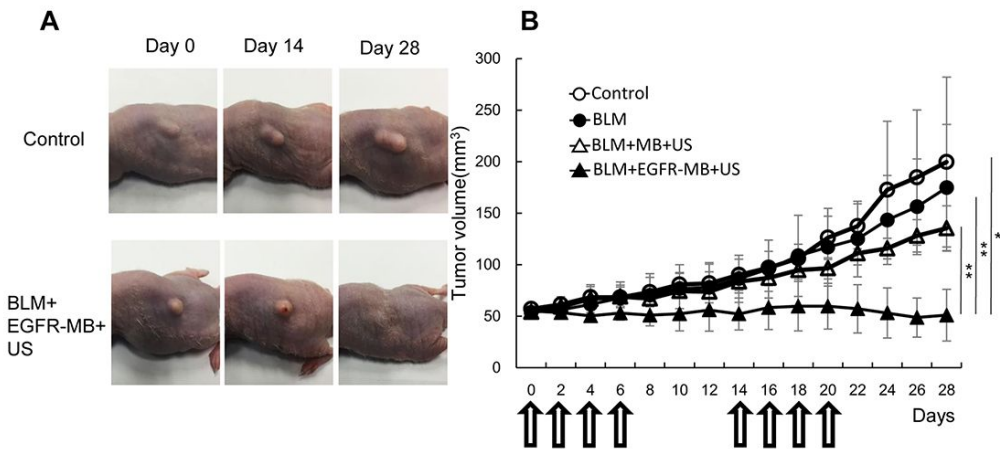
3. 研究の方法

(1)抗 EGFR 抗体は 528 細胞の培養上清より精製を行い回収した。Polyethyleneglycol(PEG)で修飾したリポソーム(帝京大学薬学部生物薬剤学教室より供与)に、抗 EGFR 抗体を結合させ、パーフルオロプロパンガスを内封することで、抗 EGFR 抗体修飾マイクロバブルを作製した。ヒト歯肉扁平上皮癌細胞 Ca9-22 に対して同バブルを用いたソノポレーション法による抗癌剤 bleomycin(BLM)の効果増強について検討した。また Ca9-22 cell を接種したヌードマウスの担癌モデルを作製し、同バブルを用いたソノポレーション法の腫瘍に対する治療効果を評価した。コントロールとして抗体を付着していないマイクロバブル、IgG 抗体結合マイクロバブルを使用した。

(2)ヒト口腔扁平上皮癌細胞である HSC-3-M3 細胞を実験に用いた。Pt(プラチナ)ナノコンポジットビーズは新日鉄住金株式会社新材料開発センターより提供をうけた。HSC-3-M3 細胞に対して Pt ナノコンポジットビーズを作用させ、WST-8 assay kit を使用して細胞増殖試験を行った。また、Pt ナノコンポジットビーズで処理された HSC 細胞を走査型電子顕微鏡で観察した。HSC-3-M3 細胞を接種したヌードマウスの担癌モデルを作製し、Pt ナノコンポジットビーズを局所注入し腫瘍体積変化の評価や、病理学的分析を行った。

4. 研究成果

(1)抗 EGFR 抗体結合マイクロバブルを用いたソノポレーション法では、より低濃度の BLM でも著明な癌細胞増殖抑制効果が認められ、癌細胞にアポトーシスが誘導されていることが確認できた。また、低濃度の BLM と抗 EGFR 抗体結合マイクロバブル、ソノポレーション法を併用した担癌マウスでは、処置後 28 日において腫瘍の増殖抑制を認めた。ソノポレーション法に抗 EGFR 抗体結合マイクロバブルを併用することにより、効率よく抗癌剤を導入することが可能であった。本手法は口腔癌に対する新たな特異的治療ツールとなり得る可能性が示唆された。



(2)Pt ナノコンポジットビーズを腫瘍内に局所注入した腫瘍の体積は対象群の腫瘍体積と比較して腫瘍増殖スピードの遅延を示す傾向にあった。病理組織学的標本観察では、コントロール群、ラテックスビーズ群と比較して、Pt ナノコンポジットビーズ群では腫瘍組織内に壊死層が多く観察された。腫瘍増殖の遅延がPt ナノコンポジットビーズによって腫瘍細胞の細胞死が引き起こされている可能性が示唆された為、in vitroでPt ナノコンポジットビーズの腫瘍細胞への影響を検討した。WST-8 assayの結果からPt ナノ粒子に比べてPt ナノコンポジットビーズでより低濃度で癌細胞の増殖を抑えた。Pt ナノコンポジットビーズで処理された細胞のSEM像では、細胞骨格は不明瞭化し、細胞の大きさが膨化していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

1. Tanaka, M., Okinaga, T., Iwanaga, K., Matsuo, K., Toyono, T., Sasaguri, M., Ariyoshi, W., Tominaga, K., Enomoto, Y., Matsumura, Y., Nishihara, T. : Anticancer effect of novel platinum nanocomposite beads on oral squamous cell carcinoma cells. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2019 Jan 28. 9999B 1-7 Doi 10.1002/jbm.b.34320 (査読有)
2. Hirabayashi, F., Iwanaga, K., Okinaga, T., Takahashi, O., Ariyoshi, W., Suzuki, R., Sugii, M., Maruyama, K., Tominaga, K., Nishihara, T.: Epidermal growth factor receptor-targeted sonoporation with microbubbles enhances therapeutic efficacy in a squamous cell carcinoma model. PLOS One. 12(9) 2017 Sep 22. e0185293 (査読有)
3. Ono, S., Iwanaga, K., Hirabayashi, F., Tominaga, K. : Effect of ultrasound and encapsulated doxorubicin bubble liposomes on cytotoxicity in human gingival squamous cell carcinoma Ca9-22 cells. J Kyushu Dent Soc 71(1) 1-9 2017 (査読有)
4. Yamamoto, M., Iwanaga, K., Okinaga, T., Ariyoshi, W., Tominaga, K., Nishihara, T. : Application of combination bubble liposomal amphotericin B and sonication has the dramatic effect on oral candidiasis. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 29(3) 193-197 2017 (査読有)

〔学会発表〕(計 5件)

1. Kenjiro Iwanaga, Fumika Hirabayashi, Toru Tamahara, Mina Dodo, Wakana Iijima, Kazuhiro Tominaga, Izumi Yoshioka, Tatsuji Nishihara, Takeyoshi Koseki : Targeted drug delivery system using ultrasound and antibody-conjugated microbubbles enhances therapeutic efficacy in a squamous cell carcinoma model. International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison 2018. Sendai, January 13-14, 2018



P-25

2. Fumika Hirabayashi, Kenjiro Iwanaga, Toshinori Okinaga, Wataru Ariyoshi, Kazuhiro Tominaga, Izumi Yoshioka, Tatsuji Nishihara. Synergistic effects of antibody-conjugated microbubble and ultrasound on cytotoxicity of oral cell carcinoma cells. The Tenth Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology(10th JKBT). Kitakyushu, 19-21 November, 2017.

3. 平林文香 岩永賢二郎 沖永敏則 有吉渉 西原達次：口腔癌細胞増殖抑制における抗体付着マイクロバブルと超音波との相乗作用．第 58 回歯科基礎医学会学術大会．札幌市 2016 年 8 月 24-26 日

4. 平林文香 岩永賢二郎 沖永敏則 有吉渉 西原達次：Tumor-specific drug delivery system using receptor-targeted microbubbles and ultrasound. Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2016. 北九州市 2016 年 5 月 28-29 日

5. 平林文香 岩永賢二郎 高橋理 富永和宏：口腔癌細胞株に対する抗体修飾マイクロバブルとソノポレーションを用いた drug delivery system の開発．第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会総会 福岡市 2016 年 4 月 16～17 日

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西原 達次

ローマ字氏名：(NISHIHARA, tatsuji)

所属研究機関名：九州歯科大学

部局名：九州歯科大学歯学研究科

職名：特任教授

研究者番号(8桁)：80192251

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。