

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17176

研究課題名(和文) 上皮成長因子受容体を標的としたターゲティング型薬剤導入法の確立

研究課題名(英文) Establishment of drug delivery targeting epidermal growth factor receptor.

研究代表者

平林 文香(Hirabayashi, Fumika)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20808406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、ソノポレーション法とEGFR、抗EGFR抗体の抗原抗体反応を併用することで、扁平上皮癌細胞に対して特異的に薬剤を導入する方法の開発を試みた。平成30年度は、使用する細胞の検討を行った。

平成31年度、令和1年度は、ドラッグデリバリーシステムに使用する抗癌剤の選択を行った。in vivoでは、手技の確立と、それを用いた担癌マウスに対しての抗腫瘍効果における実験を行った。また、人への応用実験へ向けて、実験の準備を進めている。患者や症例の選択、超音波の条件設定等のため時間がかかっているが、今後ヒトの口腔癌への応用を検討している段階である。他大学とも連携を取りながら、研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ソノポレーション法は、超音波を用いることで細胞為害性が少なく、部位特異的かつ簡便に高い導入効率を得られる方法であるが、口腔領域の悪性腫瘍に対して行っている施設は少ない。舌癌や口底部癌等、口腔領域の悪性腫瘍は、表層から超音波を当てることができ、このソノポレーション法を用いる部位としては適したターゲットと考える。近年、抗EGFR抗体は分子標的薬として化学療法に使用されているが、さらにこの効果を効率的に癌細胞へ導入する方法を開発することができれば、化学療法をより効率的に行えるようになると思われる。現在、in vitro、in vivoでその方法を検討している段階である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the establishment of the method to specifically introduce a drug into squamous cell carcinoma cells by using the sonoporation and the anti-EGFR antibodies. In 2018, we considered the cells to be used in the examination.

In 2019, we selected the anticancer drug to be used in the drug delivery system. In vivo, we established the procedure and conducted an experiment on its antitumor effect on tumor-bearing mice. We are also preparing for the experiment for human application. Although it takes time to select patients and cases and to set ultrasonic conditions, it is still under consideration for application to human oral cancer.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 化学療法 超音波 ソノポレーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の治療は、主に外科的切除、化学療法、放射線療法の3つに分けられるが、根本治療は外科的切除のみであり、化学療法、放射線療法はあくまで補助療法として用いられている。しかし、口腔癌における外科的切除は、審美的、機能的障害が大きく、患者の術後のQOLの低下は避けられない。本申請では、特異性が高い抗癌剤治療とともに、患者に対する負荷や副作用が少ない治療法の開発を目的とした。

これまでの研究で、超音波を用いたソノポレーション法を用いた新たなドラッグデリバリー法について開発を進めてきた。この方法は、生体に対する安全性が高く、簡便に行うことができ、照射部位を限定することで局所的な導入が可能であるため、その効果が期待されている。

これまで当施設では、超音波発振装置とマイクロバブルを用いて、*in vitro*、*in vivo*での遺伝子・薬剤導入を行いその効果が増強されることを見出した(Cancer Gene Therapy, 2007, Iwanaga)さらに、扁平上皮癌細胞の表面に過剰発現している上皮成長因子受容体(EGFR)と抗EGFR抗体の反応を介した導入法の開発を試みた。マイクロバブルと抗EGFR抗体混合液を作製し、*in vitro*の実験系でEGFR保有ヒト癌細胞並びに、EGFR非保有細胞への超音波を用いた遺伝子導入を行ったところ、EGFRが高発現しているヒト扁平上皮癌細胞で明らかな導入効果の増強を認めた。また、抗体溶液を加えることによって低濃度のプレオマイシン(BLM)でも癌細胞の増殖を著明に抑制した。(J Oral Pathol med, 2009, Maeda)しかし、この実験では抗EGFR抗体がマイクロバブルに特異的に結合しているわけではない。

そこで、新規マイクロバブルとして、リポソーム表面をポリエチレングリコール(PEG)で修飾し、そのPEGに抗EGFR抗体を修飾したマイクロバブルの開発を帝京大学と共同して行った。この抗EGFR抗体修飾マイクロバブルを用い、*in vitro*、*in vivo*の実験系でソノポレーション法を行ったところ、癌細胞への導入効果の増強を認め、新たな抗癌治療のmethodとして有用であることが示唆された。(PLOS ONE, 2017, Hirabayashi)

本実験では、さらにこの抗体修飾マイクロバブルの化学療法における有用性を検討し、副作用の少ないターゲティング型薬剤導入法の確立を目指す。同時に、抗EGFR抗体そのものの抗腫瘍効果を検証し、新規抗癌剤の開発に努める。

2. 研究の目的

本研究は口腔癌の外科手術に代わる新たな化学療法を確立することを目的とする。ソノポレーション法は、超音波を用いることで細胞為害性が少なく、部位特異的かつ簡便に高い導入効率を得られる方法であるが、口腔領域の悪性腫瘍に対して行っている施設は少ない。舌癌や口底部癌等、口腔領域の悪性腫瘍は、表層から超音波を当てることができ、このソノポレーション法を用いる部位としては適したターゲットと考える。また、既存のマイクロバブルはもともと血管造影剤として使用されているが、本申請ではこのマイクロバブルを応用して、抗EGFR抗体修飾マイクロバブルの開発を行った。この抗EGFR抗体修飾マイクロバブルは、口腔癌だけでなく多くの悪性腫瘍で高発現していると言われているEGFRに特異的な薬剤導入の確立を可能にする。また近年、抗EGFR抗体は分子標的薬として化学療法に使用されているため、臨床応用も視野において研究を行った。

3. 研究の方法

(1)癌細胞の維持

本実験には、以前より当科の研究で用いてきたEGFR高発現であるヒト扁平上皮癌細胞株であるCa9-22細胞に加え、舌癌細胞株HSC-3、HSC-4、SAS細胞を継代培養して使用した。

(2)抗体修飾マイクロバブルと超音波の併用による抗癌剤導入法の有効性の解析

抗体修飾マイクロバブルの作製は、帝京大学薬学部と共同で行い、既にプロトコル化されている。今回その抗体修飾マイクロバブルを用いて、EGFR保有細胞とEGFR非保有細胞に対する抗癌剤の導入効果を、WST-8、ヘキスト染色、フローサイトメトリーにより、比較検討した。

(3)新規マイクロバブルの開発

抗EGFR抗体修飾マイクロバブルの作製においては、さらに効率的な薬剤導入を目指して、修飾する抗EGFR抗体の量を調製し、新たなマイクロバブルの作製を試みた。さらにはマイクロバブル内に抗癌剤を封入し、その周囲に抗EGFRを修飾し新たな抗EGFR修飾抗癌剤封入マイクロバブルの作製を行った。

(4)EGFRの上皮新生における役割の解明

細胞レベルで抗EGFR抗体を直接作用させ、その細胞増殖への影響を、タンパク・遺伝子レベルで解明する。PCR、WS-blotを用いて行った。

(5)抗体を用いた新たな抗癌剤の開発

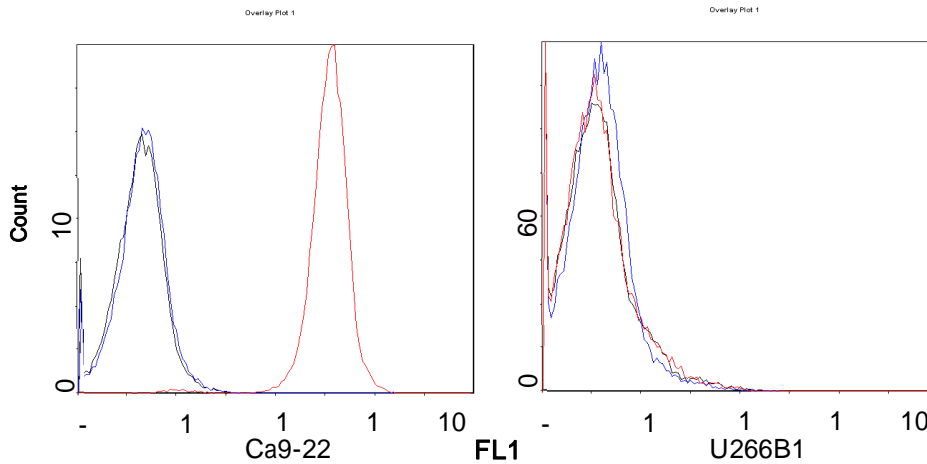
抗EGFR抗体そのものも現在分子標的薬として化学療法に用いられている。その実際に用いられているプロトコルの抗EGFR抗体の量と今回作成した新たな抗体修飾マイクロバブルに付着させている抗EGFR抗体の量を比較検討し、抗EGFR抗体の抗腫瘍効果と併用する抗癌剤の相乗効果について検証した。

(6)非臨床動物実験モデルの確立・治験の応用

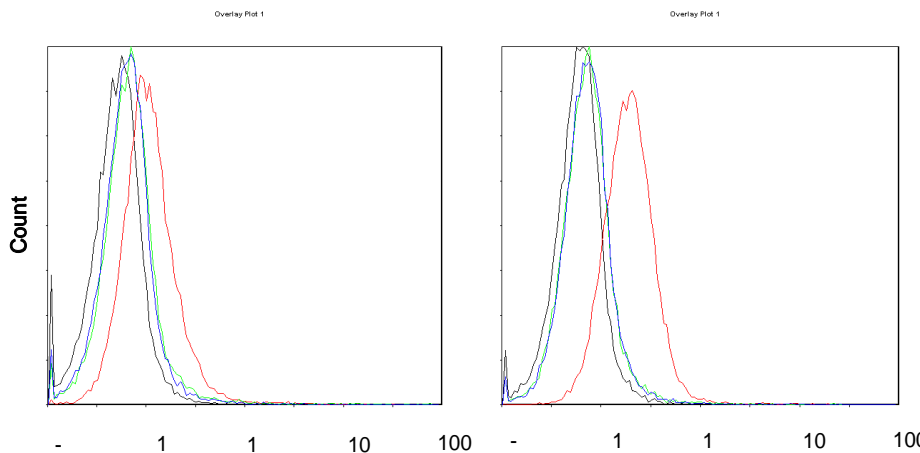
これまで *in vitro* の実験系で確立してきた新たな癌治療の効果を、動物実験モデルにおいて検討した。より臨床応用に近づけるために、抗体付着抗癌剤内封マイクロバブルは尾静脈からの静注を行い、腫瘍への効果を検討する予定であった。

4. 研究成果

平成 30 年度は、まず実験を開始するにあたり必要な道具、資料の収集、そしてプロトコルの作成を行った。細胞は以前より使用しているヒト扁平上皮癌細胞株である Ca9-22 細胞に加え、舌癌細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS 細胞、ヒトリンパ球由来細胞である U266B1 細胞を継代培養を行い、それぞれの細胞の EGFR の発現度を確認し、どの細胞が実験に適しているか検討を行った。また抗体修飾マイクロバブルとそれぞれの細胞を作用させ、どれくらいの時間作用させると結合するかどうかについての検討を行った。



(図 1) リンパ球系細胞 U266B1 細胞と比較し Ca9-22 は顕著に EGFR が発現していることを確認した。



(図 2) Ca9-22 と抗体修飾マイクロバブルを 1 分作用させた時と比較し、30 分作用させた時には約 3.5 倍の結合率を認めた。

平成 31 年度、令和 1 年度は、ドラッグデリバリーシステムに使用する抗癌剤の選択を行った。もともとバブルに内包されている抗癌剤ドキシルに加え、既存の抗癌剤をバブルに封入もしくは修飾することができないか検討を行った。*in vivo* では、マウスの尾静脈への静注の手技の確立と、それをういた担癌マウスに対しての抗腫瘍効果における実験を行っている。また、人への応用実験へ向けて、倫理委員会で承認されているプロトコルに基づき、実験の準備を進めている。患者や症例の選択、超音波の条件設定等のため時間がかかっているが、今後ヒトの口腔癌への応用を検討している段階である。他大学とも連携を取りながら、研究を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	岩永 賢二郎 (Iwanaga Kenjiro)	東北大学・予防歯科学分野・助教	