

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10131

研究課題名(和文) 標的指向性マイクロバブルと金属ナノ粒子及び低出力超音波を用いた口腔癌治療法の確立

研究課題名(英文) Development of specific molecular target therapy for oral cancer using microbubble and platinum nanocomposite beads and ultrasound.

研究代表者

岩永 賢二郎 (Iwanaga, Kenjiro)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20448484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗EGFR抗体修飾マイクロバブルを用いたソノポレーション法による口腔癌細胞へのBLMの導入後、培養48時間後にWST-8による生細胞数の評価を行ったところ、BLM単独群やマイクロバブルを使用したBLM導入群、またIgG修飾マイクロバブルを使用したBLM導入群では、そこまで細胞数の減少は認められなかったが、抗EGFR抗体修飾マイクロバブルを併用したBLM導入群では有意に生細胞数が減少した。一方、Ptナノコンポジットビーズに、強い抗腫瘍効果があることを見出した。また新規デバイスを用いて口腔癌細胞の環境を模倣した3次元培養を行ったところ、生態環境に近い口腔癌スフェロイドを大量かつ均一に作製できた。

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低出力の超音波を用いているため、細胞障害性が低く、毒性や免疫反応がない。顎顔面口腔領域には多くの脈管神経が存在し、また口腔内は湿潤下であるため、エレクトロポレーション法等は非現実的である。また、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、同法に適したターゲットである。また、一般的な2次元培養下の細胞は組織環境が生体と大きく乖離している。今回、新たなデバイスを用いて口腔癌細胞の環境を模倣した3次元培養を行い口腔扁平上皮癌細胞のスフェロイドを確立した。開発したデバイスは生態環境に近い口腔癌スフェロイドを大量かつ均一に作製可能であることが示唆された。

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. BLM delivery using sonoporation with EGFR-MBs was significantly more toxic to the cells compared with the other groups. Platinum nanocomposite beads treatment suppressed tumor growth and identified increasing pathological necrotic areas, in vivo. Human tongue squamous cell carcinoma cell line (HSC-3) and human gingival squamous cell carcinoma cell line (Ca9-22) were cultured and seeded onto polyethylene glycol (PEG)-coated microwell chips, respectively. The cells cultured in our microwell chips gradually aggregated and formed smooth-edged spheroids by day 5 of culture. LIVE/DEAD staining showed that the formed spheroids was composed mainly of viable cells even at day 5 of culture. The WST-8 assay suggested increased anticancer drug resistance in the spheroid group compared to the 2D culture group.

研究分野：口腔外科

キーワード：マイクロバブル ソノポレーション 口腔癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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。近年、癌治療における薬剤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、抗癌剤、抗酸化作用を持つことが報告されている。Pt ナノコンポジットビーズは、表面に抗体などの癌指向性を付与できる。これらの新たなナノ粒子を用いた抗癌剤の特異的分子標的療法を開発する。

また、これまで行われてきた 2 次元培養下での研究は *in vivo* 環境から乖離しているが、3 次元培養では *in vivo* 環境をより正確に模倣する。3 次元培養法の中でもスフェロイドは、生理学的応答、遺伝子パターンなど生態内の腫瘍の特徴を正確に模倣することができる。さらに、癌関連死の 90% 以上は腫瘍ではなく転移性疾患によって引き起こされることに加え、癌幹細胞が腫瘍の進行に寄与する可能性が示されるという報告もある。癌幹細胞性をはじめとした生態内腫瘍の特性をより正確に模倣した癌細胞スフェロイドを大量に作製することが重要であるといえる。スフェロイドは大量で均一に製作することが難しいという課題があるが、スフェロイドを大量に作製することができるデバイスを用い、スフェロイドを作製し、より口腔癌組織を模倣した 3 次元培養を行い、その特性について検証した。

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の作製プロトコールは既にある。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* 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) 細胞同士が凝集した球状の集合体(スフェロイド)を大量に製作可能なデバイスを用いて口腔癌組織の環境を模倣した 3 次元培養を行い、その特性について 2 次元培養と比較検証した。

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。PEG で修飾したリポソームに、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。

(2) ヒト舌扁平上皮癌細胞である HSC-3M3 細胞を実験に用いた。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の評価や、病理学的分析を行った。

(3) HSC-3 と Ca9-22 をそれぞれ培養し、非接着処理を施したマイクロウェルチップ上に播種した。形成されたスフェロイドの形態観察と直径の計測および real-time RT-qPCR 法による遺伝子発現の解析を行った。また LIVE/DEAD 染色を行い、スフェロイド構成細胞の生死判定を行った。さらに、回収したスフェロイドを outgrowth させた 2 次元培養を行い、定着・細胞増殖について観察するとともに、遺伝子発現を確認した。2 次元培養細胞とスフェロイドのシスプラチンに対する抵抗性を WST-8 assay を用いて比較した。

4. 研究成果

(1) 抗 EGFR 抗体修飾マイクロバブルとソノポレーション法の併用による BLM の導入後、培養 48 時間後に WST-8 による生細胞数の評価を行ったところ、BLM 単独群やマイクロバブルを使用した BLM 導入群、また IgG 修飾マイクロバブルを使用した BLM 導入群では、そこまで細胞数の減少は認められなかったが、抗 EGFR 抗体修飾マイクロバブルを併用した BLM 導入群では有意に生細胞数が減少した。

(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。

(3) デバイス上の HSC-3 と Ca9-22 は、培養 5 日目にかけて徐々に凝集し、辺縁平滑なスフェロイドを形成した。スフェロイド構成細胞の生死判定のため行った LIVE/DEAD 染色では、培養 5 日目においてもスフェロイド内部は生細胞を主体に構成されていることが示された。また、遺伝子プロファイルの解析結果では、培養 3 日目のスフェロイド群では幹細胞マーカーと低酸素性マーカーの遺伝子発現量は 2 次元培養群と比較して亢進していることが確認された。さらに、スフェロイドを接着性プレートに再播種し、2 次元条件下で outgrowth させた癌細胞も 2 次元培養群と比較して幹細胞マーカー発現の亢進が維持されていた。WST-8 assay より、2 次元培養群に対してスフェロイド群で増加しており、シスプラチンに対する抵抗性の亢進が示唆された。

開発したデバイスは生態環境に近い口腔癌スフェロイドを大量かつ均一に作製可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田礼子、西牟田文香、岩永賢二郎、吉賀大午、吉岡泉 |
| 2. 発表標題 専用デバイスによる口腔扁平上皮癌3次元培養の確立と評価 |
| 3. 学会等名 第55回NPO法人日本口腔科学会九州地方会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田礼子、岩永賢二郎、山崎亮太、吉岡香絵、有吉渉 |
| 2. 発表標題 Establishment and evaluation of spheroid for oral squamous cell carcinoma cells |
| 3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 池田礼子、岩永賢二郎、山崎亮太、吉岡香絵、有吉渉 |
| 2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞の3次元培養法の確立と評価 |
| 3. 学会等名 第64回日本歯科基礎医学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田 礼子、西牟田 文香、阿比留 衣祝、山崎 亮太、岩永 賢 二郎、吉賀 大午、吉岡 泉、有吉 渉 |
| 2. 発表標題 口腔扁平上皮がん細胞による2次元培養法と3次元培養法の比較 |
| 3. 学会等名 第81回九州歯 科学会総会・学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔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 分担者 | 丹田 奈緒子 (tanda naoko) (00422121) | 東北大学・大学病院・助教 (11301) | |
| 研究 分担者 | 小関 健由 (koseki takeyoshi) (80291128) | 東北大学・歯学研究科・教授 (11301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|