

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18058

研究課題名(和文) 骨肉腫を標的としたエクソソーム様細胞外小胞化ナノマテリアルを応用したDDS開発

研究課題名(英文) DDS development based on exosome-like extracellular vesiculated nanomaterials targeting osteosarcoma

研究代表者

傍島 淳(Sobajima, Atsushi)

信州大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00770760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：主目的であったナノマテリアルのエクソソーム様細胞外小胞(ELECV)化は可能である事が明確に示された。しかし、薬剤を担持させた状態でのELECV化は非常に限定的条件下でなければならない事が明らかとなった。この条件を満たす薬剤と細胞の組み合わせを今後、検討していきたい。また、ナノサイズのフェライトでELECV化できる事が確認できたことから、新たながんの治療法を開発できる可能性を示す事が出来た。今後、ELECV化させた小胞の組織特異性を明らかにして、ターゲットがん細胞だけを治療できる技術の開発を進めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発において、ターゲット組織や細胞にのみ、その薬剤を配送する技術開発こそが最も遅れているところである。エクソソームは離れた細胞同士の新たな情報伝達システムとして注目されており、その特異性に注目が集まっている。この研究で一部のナノマテリアルが細胞内に取り込まれた後、エクソソーム内に取り込まれた状態での放出が確認されたことは薬剤のキャリアーとしてのナノマテリアルをターゲット細胞に特異的に配送できる可能性を示しており、DDSのブレイクスルーになり得ると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in our first main objective, the conversion of nanomaterials into exosome-like extracellular vesicles (ELECVs). However, it has become evident that ELECVs with drug-loaded nanomaterials can only be produced under very limited conditions. Our next aim is to study the combinations of drugs and cells that satisfy these conditions. The fact that we could confirm the possibility of ELECVs with nano-sized ferrites demonstrated the potential of developing new cancer treatment methods. Future studies will clarify the tissue specificity of ELECV-enhanced vesicles towards the specific targeting of cancer cells.

研究分野：整形外科学

キーワード：エクソソーム カーボンナノマテリアル ドラッグデリバリーシステム 骨芽細胞 ナノフェライト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ドラッグデリバリーシステム (DDS) の現状

抗癌剤のみならず、投薬治療の理想は患部でのみ有効性濃度が持続され、他の正常組織に副作用を及ぼさない事である。そのための方法として期待されている技術が DDS である。ターゲット細胞だけに薬効発現量となるよう薬物を集積させるアイデアであるが、DDS の中で最も解決できていない技術がターゲティングであり、この部分をブレイクスルーするアイデアが求められている。そのアイデアの一つとして組織特異性が高いエクソソームを用いたターゲティングが検討されているが、適当な薬物保持技術が求められている。

(2) カーボンナノマテリアル (CNM) の骨親和性

我々のグループはカーボンナノチューブ (CNT) の骨親和性が高い事を 2008 年に発表し、私はその医療応用を目指した CNT 複合ポリエチレンソケットの開発で CNT の体内動態と発癌性評価を行って、今年、発表した。この CNT の他に若手研究 (B) (17K16687) として CNM の一つである膨張黒鉛の足場材としての評価を行っている。さらに、我々は別の CNM であるカーボンナノホーン (CNH) も骨親和性が高い事を明らかにし、今年度の日本整形外科基礎学術集会で発表済みである (上田ら)。そして、この研究に既に我々が CNT で報告していた CNT のエクソソーム様細胞外小胞 (ELECTV) 化現象が CNH では明らかに細胞内でエクソソーム化レベルのサイズである事を発見し (未発表)、エクソソームと共に放出される事も確認済みである。これは申請時、大阪大で観察された生きたままの骨芽細胞の基質小胞に非常に似た形態をしており、我々が報告した CNT の骨形成能促進効果の一つの理由かもしれない。これらの結果は CNM がヒトの骨組織に非常に親和性があり、骨組織用の DDS キャリアーに向いている事を示している。

(3) CNM の薬物担持能力

本申請で DDS キャリアーとして検討する CNM は CNH である。CNH はすでに前グループ研究員であった安嶋らが DDS キャリアーとしての可能性を報告している。

2. 研究の目的

図 1 に示した人工材料である CNH と生命現象であるエクソソームのエクソサイトーシスを組み合わせた新しいピンポイントデリバリーシステム (PPDS) を開発するための 3 項目を研究目的としている。

CNH がエクソソーム化される細胞条件

主要な腫瘍原発薬となる肺や乳腺などの細胞から分泌されるエクソソームの骨組織の特異性
CNH の細胞内、及びエクソソーム内での薬物の保持力と有効性評価

3. 研究の方法

(1) MC3T3 - E1 マウス前骨芽細胞の培養条件

MC3T3 - E1 マウス前骨芽細胞 (MC) は骨研究で最もよく用いられるセルラインであるが、再現性に問題があると言われているため、我々はその特性を培地条件を変えて検討した。具体的には MC を MEM 培地と DMEM 培地で培養するだけでなく、MEM はアスコルビン酸 (AA) 添加済タイプと無添加タイプを購入した上で、無添加タイプには使用直前に AA 添加を行う群も用意した。さらに DMEM も使用直前添加群も用意し、それぞれの培地条件での MC の増殖性を比較した。

(2) CNM の細胞毒性

MC3T3 - E1 マウス前骨芽細胞 (MC) を培養プレートに 24 時間接着後、CNM である酸化 CNH (ox-CNH) 及び CB を 5, 20, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 24・48 時間、暴露した。その後、アラマブルー試薬を加えて 60 分後、蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定した。未暴露 MC の蛍光強度を 100% として細胞毒性を評価した。

(3) CNM 暴露 MC の透過型電子顕微鏡観察

MC をカバーガラス上で 24 時間培養し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の ox-CNH、CB を 24 時間、暴露した。MC は PB でウォッシュ後、2.5% グルタルアルデヒドで固定した。1% 四酸化オスミウム液で後固定し、脱水後、エポキシ樹脂包埋した。超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

(4) 薬物担持ナノマテリアルの細胞毒性

ELECTV 化させる CNH に担持させる薬物が ELECTV 化細胞に影響を与えないかを明らかにするために、まず、シスプラチン (CDDP) を Walker256 乳癌細胞 (Walker) に 4 日間、暴露実験を行った。その結果から、抗がん剤以外の薬剤とその薬剤が影響を受けないと考えられる細胞との組み合わせで薬剤担持ナノマテリアルによる細胞毒性の有無を検討した。組み合わせとして、骨粗鬆症薬であるイバンドロネート (商品名ボンビバ : BV) を担持させたナノサイズハイドロキシアパ

タイト (nano-HAp) を MC に暴露した時の細胞毒性をアラマブルー法で評価した。

(5) ナノフェライトの細胞毒性

ナノフェライトは一般的な化学合成法で自作し、その作製方法は FeCl_3 と FeCl_2 を HCl に溶かし、その後 NaOH で pH 調整しフェライト粒子を析出した。この場合、析出したフェライト粒子中に粒径サイズの大きい硬磁性フェライト粒子も含まれているため、多段階沈澱法を用いてナノフェライト粒子を分離し抽出した。ナノフェライト粒子分離後に Milli-Q で数回洗浄し、粒径サイズをナノサイザーで確認した。

MC と Walker を培養プレートに 24 時間接着後、ナノフェライトを 1~2 日、暴露した。その後、アラマブルー試薬を加えて 45 分後、蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定した。未暴露 MC の蛍光強度を 100% として細胞毒性を評価した。

(6) ナノフェライトの細胞内取り込み

MC と Walker を培養プレートに 24 時間接着後、ナノフェライトを暴露し、その取り込み量の変化を 1 週間、フローサイトメーターで測定した。取り込み量は未暴露 MC の側方散乱光 (SSC) 値を 1 とした相対比で評価した。

(7) ナノフェライト暴露 MC の TEM 観察

CNM 暴露 MC と同様の方法でナノフェライトを 3 日暴露した MC の超薄切片を作製し、TEM で観察した。

4. 研究成果

(1) MC の培養条件

MC の細胞増殖性はベース培地である MEM 培地と DMEM 培地で全く異なった。MEM 培地では AA の添加の有無、およびスタート時の細胞濃度にかかわらず MC の増殖に問題はなかったが、DMEM 培地では AA が添加されていない場合、細胞は増殖しなかった。AA を添加した場合でも細胞濃度が低い場合は細胞増殖が抑制された。MEM 培地では新鮮 AA を加えた MC で最も増殖が高かったが、他の研究と比較しやすくするため、購入可能な AA 添加済の MEM 培地で以降の骨芽系細胞実験を行った。

(2) CNM の細胞毒性

MC に対する ox-CNH と CB の細胞毒性結果を図 1 に示した。ox-CNH の比較対象として用いた CB と今回の最高濃度 (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で暴露してもほとんど細胞毒性を示さなかった。この結果は ox-CNH 自体は MC に対して DDS のキャリアーとして利用する場合、安全性に問題がない事を示している。

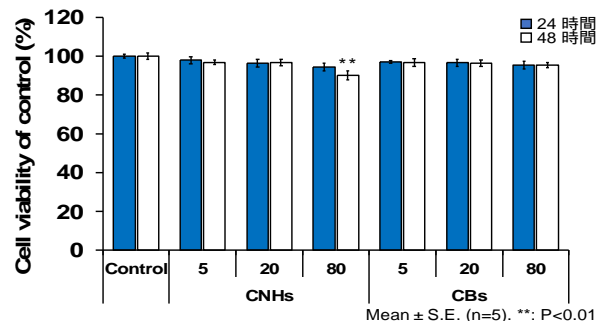


図 1 各 CNM に対する MC の細胞毒性

(3) CNM 暴露 MC の TEM 観察

ox-CNH と CB を暴露した MC はどれも細胞内にそれぞれのナノ粒子をライソソームに蓄積しており、一部、細胞質基質にも確認できた。CB はそれほど多くの蓄積は見られなかった。そして、ox-CNH 暴露 MC では図 2 に示すように一部、細胞外に ELECVC 化したと思われる ox-CNH が観察された。

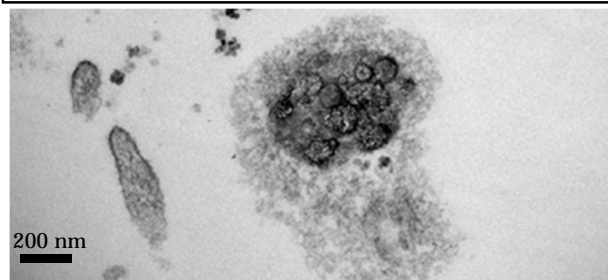


図 2 細胞外 ELECVC 化 ox-CNH

(4) 薬物担持ナノ材料の細胞毒性

CDDP を 4 日間暴露した Walker はコントロールと比較し、生存率が 10% くらいとなった。骨肉腫をターゲットにした ELECVC 細胞候補として好発骨転移部位として乳癌細胞での検討を試みたが、CDDP との組み合わせで ELECVC を検討する事は困難であると判断し、より単純な組み合わせでの検討を行うために、薬剤がターゲット細胞でない組み合わせでナノ材料担持薬剤の細胞毒性を検討する事とした。その組み合わせとして、本来のターゲットが破骨細胞である BV とその薬剤が特異的に結合する nano-HAp との組み合わせで MC における毒性評価を行った。高濃度の BV ではやはりそれ自体に MC に対して細胞毒性がある事が確認されたため、細胞毒性の出ない濃度を検討した上で、nano-HAp に担持させて MC に暴露させたところ、BV 単独では細胞毒性を示さなかった濃度でさえも、nano-HAp に担持されることによって細胞毒性を示す事が

明らかとなった。この結果は ELECVC による DDS の開発の大きな課題を示している。特異的細胞への薬剤投与を目的とした DDS 開発において ELECVC 化は非常に重要な行程であるが、この過程で多くの低分子薬物はその細胞内で溶出し、ELECVC 化のための細胞に細胞毒性が出てきてしまう。我々の目的に合った抗がん剤はそれ自体では細胞膜を通過せず、がん細胞内に取り込まれた時のみ作用する分子標的薬的抗がん剤という事になる。このような ELECVC 化に適した抗がん剤で今後、検討する必要がある。

(5) ナノフェライトの細胞毒性

ELECVC 化現象は DDS 以外のがん治療の方法にも使えるのではないかと考え、それに適したナノマテリアルを検討した。そして、がんの温熱療法に応用できるナノマテリアルとしてナノフェライトがある事を知り、このナノマテリアルの ELECVC 化が可能かどうかを検討する事にした。

そこでまずナノフェライトの MC に対する細胞毒性を調べたところほとんどなかった(図3)。骨転移しやすい Walker でも細胞毒性を調べたがこちらも同様に細胞毒性はほとんどなかった。

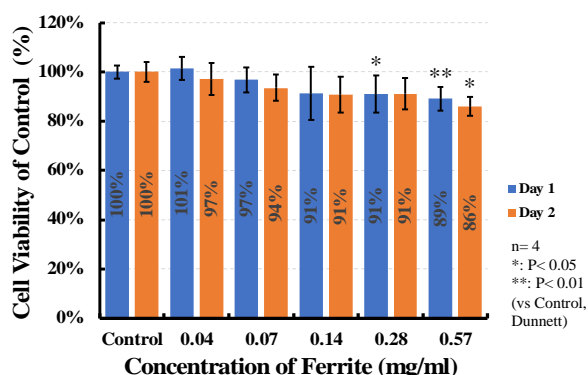


図3 ナノフェライトに対するMCの細胞毒性

(6) ナノフェライトの細胞内取り込み

MC と Walker でナノフェライトの取り込み結果は異なった。MC では図4のように、SSCの増加が4日目まで観察され、その後、低下していった。この低下がナノフェライトの ELECVC 化によるものかは現在、検証中である。一方、Walker ではほとんど変化が見られなかった。

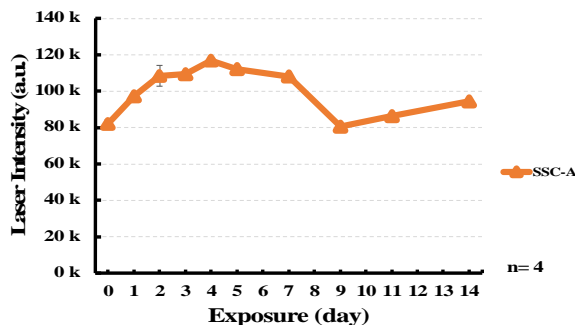


図4 MCにおけるナノフェライトの取り込み

(7) ナノフェライト暴露MCのTEM観察

ナノフェライト暴露MCをTEMで観察したところ、ナノフェライトが ELECVC 化したと思われるTEM像が得られた(図5)。この ELECVC と思われる小胞は直径が100nmより少し大きいくらいであるが、その他にも数百nmサイズの細胞外小胞にもナノフェライトが取り込まれている像も確認できている。

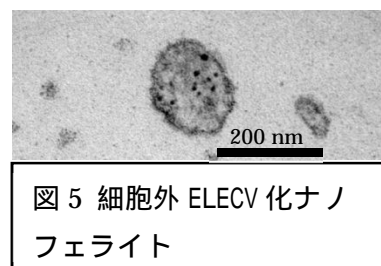


図5 細胞外 ELECVC 化ナノフェライト

(8) 総括

研究スタート時に目的にしていたナノマテリアルの ELECVC 化は可能である事が明確になった。一方でナノマテリアルに抗がん剤などの薬剤を担持した状態で培養細胞に ELECVC 化させる事は非常に限定的条件下でなければならない事が明らかとなった。この条件を満たす薬剤と細胞の組み合わせを今後、検討していきたい。

また、ナノマテリアルの ELECVC 化技術を用いた薬剤を用いない新たながんの治療法の可能性をナノフェライトを用いて示す事が出来た。今後、ELECVC 化させた小胞の組織特異性を明らかにして、ターゲットがん細胞だけを治療できる技術の開発を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Izumiya Makoto, Haniu Miyu, Ueda Katsuya, Ishida Haruka, Ma Chuang, Ideta Hirokazu, Sobajima Atsushi, Ueshiba Koki, Uemura Takeshi, Saito Naoto, Haniu Hisao	4. 巻 22
2. 論文標題 Evaluation of MC3T3-E1 Cell Osteogenesis in Different Cell Culture Media	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7752 ~ 7752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22147752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Manabu, Izumiya Makoto, Haniu Hisao, Ueda Katsuya, Ma Chuang, Ueshiba Koki, Ideta Hirokazu, Sobajima Atsushi, Uchiyama Shigeharu, Takahashi Jun, Saito Naoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Current Methods in the Study of Nanomaterials for Bone Regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1195 ~ 1195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano12071195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------