

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：	34401
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21659193
研究課題名（和文）	血管内皮前駆細胞と抗癌剤を用いた新しいハイブリッド癌治療法の開発
研究課題名（英文）	Development of a novel hybrid cancer therapy using endothelial progenitor cells and anticancer drug
研究代表者	
	伊井 正明 (II MASAOKI)
	大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：	10442922

研究成果の概要（和文）： PLGA を基質としたピラルビシンを抱合するナノ粒子（封入率 2.17 μ g/mg・平均粒子径 890nm）を作製した。ピラルビシン抱合（PrbPLGA 群）あるいは薬剤非抱合ナノ粒子（PLGA 群）を培養血管内皮前駆細胞（EPC）に取り込ませた後、細胞遊走能と増殖能を評価したが有意な差はそれぞれの機能で認めなかった。そして、これらナノ粒子抱合 EPC を担癌マウス（骨肉腫細胞 MG83 による皮下腫瘍モデル）に対して移植実験を行ったところ、対照群（生理食塩水投与群）に比べ、PLGA 群 > prPLGA 群の順で有意な腫瘍縮小効果が得られた。

研究成果の概要（英文）： We made pirarubicin-conjugated PLGA-based nanoparticles (incorporation rate: 2.17 μ g/mg, average particle diameter: 890nm), and then the pirarubicin-conjugated PLGA (PrbPLGA group) or PLGA alone (PLGA group) was uptaken in cultured endothelial progenitor cells (EPCs). There were no significant differences of migration activity and proliferation activity between PrbPLGA group and PLGA group. When these nanoparticle-uptake EPCs were transplanted in tumor-bearing mice, the size of tumors were significantly reduced in PrbPLGA group than that in PLGA group compared with saline injected (control) group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	0	900,000
2010 年度	800,000	0	800,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	210,000	2,610,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胆道学、膵臓学

1. 研究開始当初の背景

我が国死因第一位である癌の治療における重要な因子として、血管新生が挙げられ重要な標的となる。成体における血管新生は既存

の成熟血管内皮細胞の増殖や遊走のみならず、骨髄に由来する血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) の動員を伴った血管形成も重要な再生過程である

ことが明らかにされた (Asahara et al. Science, 1997) が、この現象は癌組織における腫瘍血管新生においても同様であることがその後の研究により確認され Hilbe et al. J Clin Pathol, 2006)、癌組織の発育を促進させるとの報告もある。(Oh, et al. Cancer Res) これらの知見から、EPCは「癌組織に集積する性質を持つ」ということが逆に言えるため、既存の一般的な癌治療法である抗癌剤投与による全身化学療法とのコンビネーションによる新たな治療法となる可能性が示唆される。つまり、全身化学療法では重篤な全身性副作用により多くの患者は多大なる苦痛を伴うだけでなく、治療継続が困難になり大きな問題となる。重要な点は、正常組織にも同等にダメージを与える抗癌剤をいかに効率よく癌組織に集積・作用させ、正常組織への影響を最小限にとどめるかということである。そこで申請者は、EPCを抗癌剤の担体として癌組織に集積させようという着想に至った。

2. 研究の目的

抗癌剤と血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた新しいハイブリッド癌治療法の開発を本研究の最終目的とする。最終目的達成のためにはさらに以下のような個々の目的を設定し、順を追って実験する必要がある。

(1) 加水分解性ナノパーティクルを用いた抗癌剤の徐放化

(2) 徐放抗癌剤の EPC への包含

(3) 抗癌剤包含 EPC の *in vivo* における腫瘍集積性の確認及び選択性効率の上昇

(4) 抗癌剤包含 EPC の抗腫瘍効果の確認及び腫瘍縮小効率の上昇

これらの研究目的は動物実験を用いた前臨床研究として行う。

3. 研究の方法

(1) 抗癌剤の選択

膀胱癌細胞株 KP-1N に対して細胞増殖抑制効果を示す可能性のある薬剤を 4 種類 (Pacritaxel・Pirarubicin・Gemcitabine・Cisplatin) 用いて細胞増殖・アポトーシスを評価する実験を行い、最適な薬剤を選択した。

(2) 癌細胞増殖能評価

癌細胞を 1×10^4 /穴の密度で gelatin コートした 96 穴細胞培養プレートに撒き、 $1\%O_2$,

$10\%FBS/DMEM$ 培養液中に $1-25 \text{ nM}$ 濃度の抗癌剤存在下で 48 時間細胞培養した後に比色法にて細胞増殖を定量可能な MTS 試薬を用いる。各群はそれぞれ 3 穴の吸光度平均値で比較する。

(3) 癌細胞アポトーシス誘導能評価

Gelatin コートした 3.5 cm 培養皿に細胞を撒き、 $5\%FBS/DMEM$ で培養する。 $1-25 \text{ ng/ml}$ 濃度の抗癌剤存在下で 24 時間培養し、細胞を回収する。7-AAD 試薬による染色後に FACS 解析にて 7-AAD 陽性細胞 (=DNA 傷害) を死細胞としてその割合を定量する。

(4) EPC 培養

マウスより骨髓細胞液を採取し、比重遠心法にて単核球分画を単離する。ラット由来ビトロネクチンでコートした培養皿に単核球細胞を $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ の密度で撒く。細胞は $10\%FBS/DMEM\text{-low glucose}$ 培養液にて 24h 間培養の後、浮遊細胞のみを回収し $10\%FBS$, VEGF, IGF-1, EGF, bFGF, インスリンを添加因子とした EPC 分化培養液 (EGM-2 Bullet KitTM)にてさらに 5 日間培養する。培養 7 日目に接着細胞をアセチル化低比重リポ蛋白: acLDL の取り込み及びレクチン結合蛋白発現の内皮細胞性質をともに有する EPC を多く含む細胞 (95%以上) を実験に用いる。(Ii, M, Method Mol Biol, 2010.)

(5) 薬剤徐放化ナノ粒子包含 EPC 作製

加水分解性ナノ粒子と抗癌剤を一定の比率で混合し、封入体を合成する。このナノ粒子薬剤封入体は内皮細胞や平滑筋細胞のファゴサイトーシス現象により細胞質内に取り込まれることが確認されているため、一定量のナノ粒子抗癌剤封入体を $DMEM$ 培養液中で EPC と CO_2 インキュベータ中で 3 時間反応させ、EPC 抗癌剤包含体を作製する。

(6) ノードマウス皮下移植モデル

KP-1N 細胞 (1×10^6) と $100 \mu\text{l}$ の MatrigelTM (BD Bioscience)を混合した細胞溶液をノードマウスの背側皮下に局所注射により移植する。移植 2 週間後、マウスの背部に形成された腫瘍病変を固形癌のモデルとして実験に使用する。(Mizukami et al. Nat Med, 2005.)

(7) in vivo における EPC 集積確認

移植する EPC に DiI (赤色蛍光色素) でラベルした PLGA を取り込ませた後、細胞 (5×10^5 /マウス) を尾静脈から全身、あるいは腫瘍周辺に局所投与する。細胞移植の7日後に腫瘍組織・肺・肝・脾を採取し、病理組織標本を作製し、蛍光顕微鏡下にて DiI 陽性細胞数を各組織標本上で観察する。

(8) 担癌マウスに対するハイブリッド治療治療群として、1. PBS 投与、2. PLGA 抱合 EPC 移植、3. 抗癌剤 PLGA 抱合 EPC 移植、の3群を設定し、腫瘍縮小効果を比較する。腫瘍サイズの定量は超音波画像診断装置により移植治療後経時的(1,2,3,4週目)に行う。

4. 研究成果

(1) 各種抗癌剤による細胞増殖抑制効果 Paclitaxel 及び Pirarubicin が 1nM 以上の濃度で効果を示した。(図1)

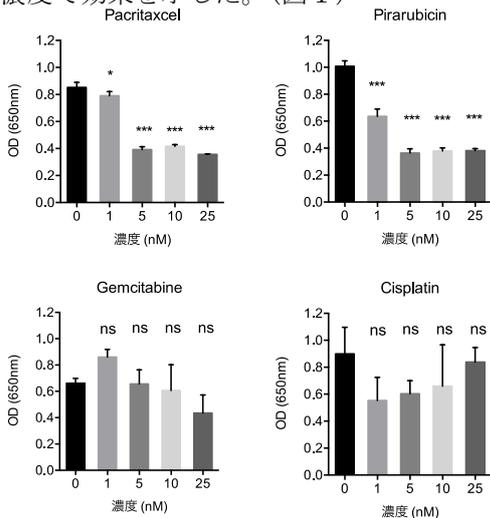


図1: 吸光度測定法による細胞増殖能評価 (*, P<0.05, ***, P<0.0001)

(2) 各種抗癌剤による細胞死誘導効果 Pirarubicin と Cisplatin が 1nM 以上の濃度で、Paclitaxel は 10nM 以上の濃度、Gemcitabine は 5nM 以上の濃度で効果を示した。(図2)

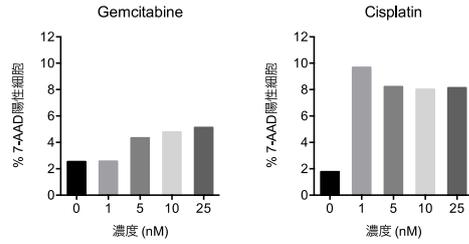
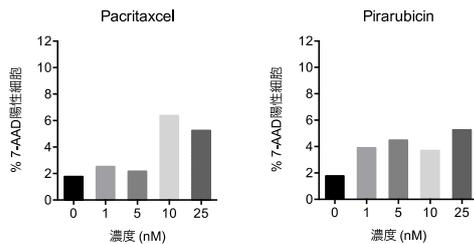


図2: 7-AAD 陽性死細胞含有率

(3) 抗癌剤包合ナノ粒子作製及び EPC への取込確認

(1)(2)の結果より、Pirarubicin を用いて以下の実験を行った。抗癌剤を徐放させるために、PLGA を基質とした薬剤包合ナノ粒子の作製を試みた。諸条件を検討し試作を繰り返した結果、封入率 2.17µg/mg・平均粒子径 890nm の Pirarubicin を抱合するナノ粒子作製に成功した。また、粒子を赤色蛍光色素 (DiI) でラベルし、培養 EPC に取り込ませることが可能であった。(図3)

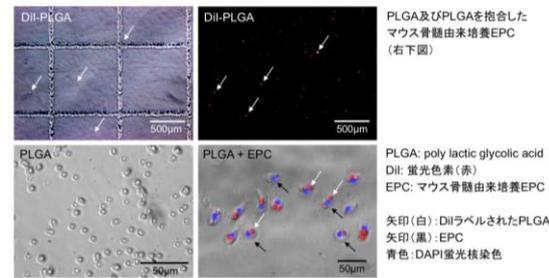


図3: 薬剤包合 PLGA ナノ粒子を取り込んだ培養 EPC

(4) PLGA ナノ粒子包合 EPC の腫瘍組織への集積確認

PLGA 抱合 EPC 移植後の腫瘍集積性の検討を①経静脈的全身投与(尾静脈経由)、②経静脈的全身投与(右心室経由)、③経動脈的全身投与(左心室経由)、④腫瘍周囲皮下注入投与で行った。

腫瘍内に集積した DiI-PLGA-EPC を細胞移植7日後に組織学的に解析したところ、腫瘍への集積率順は③>①=②>④であったが、他臓器(肝臓・脾臓)への集積率順も同じく、③>①=②>④であった。①の経路により DiI-PLGA-EPC をマウスに投与した場合の腫瘍内集積像を図4に示す。移植細胞数↓ (10^4 , 10^5 , 5×10^5)

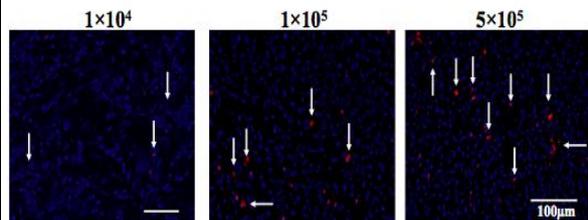
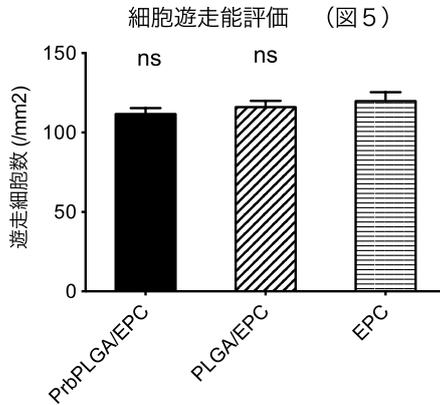


図4: 腫瘍組織に集積したPLGA-EPC (Blue:DAPI Red :DiI-PLGA-EPCs)

(5) Pirarubicin-PLGA 包含 EPC (PrbPLGA/EPC) の細胞遊走能と癌細胞増殖抑制効果
 抗癌剤/PLGA ナノ粒子抱合後の EPC 遊走能を走化因子である SDF-1(100 μ g/mL)を用いて解析したところ、EPC 単独と比べても有意な差は認めなかった。(図5)



また、細胞増殖能についても同様に各群有意な差は認めなかった。(図6)

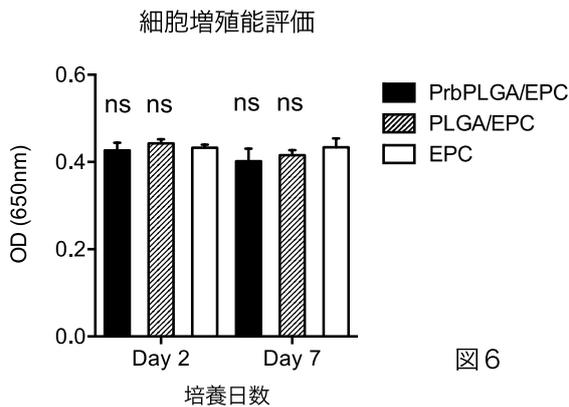
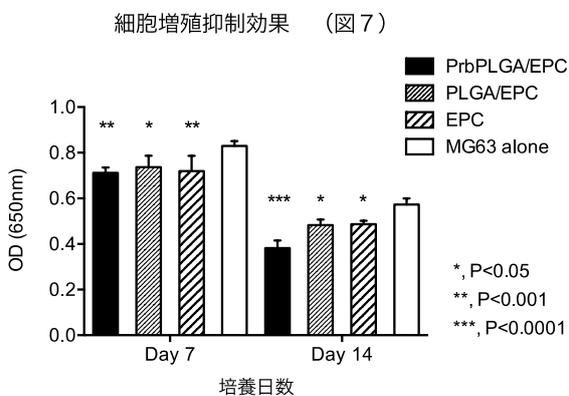


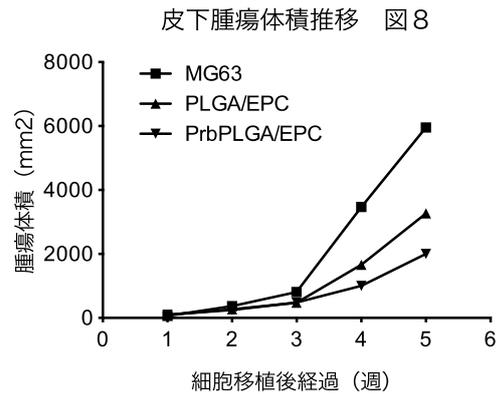
図6

次に、癌細胞 KP-1N と Pirarubicin-PLGA 包含 EPC に対してトランスウェルを用いた分離共培養した場合の癌細胞増殖能を MTS 試薬により評価したところ、培養2日目では差が無かったものの、7日及び14日目には有意な増殖抑制効果を示した。(図7)



(6) Pirarubicin(Prb)PLGA 包含 EPC 移植による腫瘍縮小効果

①EPC 単独、②EPC+PLGA、③EPC+PrbPLGA、④コントロール (PBS 投与群) のように移植群を4つに分けて経時的に皮下腫瘍のサイズを超音波画像診断装置によって評価した。EPC 単独移植群においても腫瘍縮小効果は認められたが、PrbPLGA 包含 EPC 移植群ではさらに大きな腫瘍抑制効果を認めた。(図8)ただし、本実験結果は成果報告の時間的制約のため n=1 のデータであり、今後有意な差のあるものかどうかは例数を増やして再検討する必要がある。



(7) 総括

Pirarubicin 徐放化ナノ粒子包含 EPC を作製・移植することにより、腫瘍に対する縮小効果を検討した。EPC 単独移植群 (PLGA/EPC) に比べて抗癌剤包含 EPC 移植治療群 (PrbPLGA/EPC) において高い腫瘍縮小効果が得られる傾向が認められ、有効な新しい癌治療法になる可能性が示唆された。

PrbPLGA/EPC 移植により得られた高い腫瘍縮小効果については、今後も実験例数を増やして信頼性のある結果にしていくと共に、そのメカニズムについても組織学的・分子生物学的にさらに検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊井正明 (II MASAOKI)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：10442922