

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 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390389

研究課題名（和文）ソノポレーション法による特異的分子標的治療法に適したナノバブルと新規抗癌剤の開発

研究課題名（英文）Development of new anticancer drugs and nanobubbles suitable for specific molecular target therapy using sonoporation

研究代表者

福田 仁一（FUKUDA JINICHI）

九州歯科大学・歯学部・その他

研究者番号：00106270

研究成果の概要（和文）：これまで、口腔扁平上皮癌の治療のために、マイクロバブルとソノポレーション法を用いた遺伝子・薬剤導入法を検討し、一定の抗癌効果があることを確認したが、新たな遺伝子・薬剤キャリアーとして超音波造影ガスを封入した新規バブルリポソームに着目した。九州工業大学と共同研究中の新規抗癌剤 Ky-2（HDACi）を同バブルを用いて Ca9-22 細胞に導入したところ、コントロール群に比較して、著明な抗腫瘍効果を認めた。次にドキソルビシン内包リポソーム製剤であるドキシルに超音波造影ガスを封入し、新規ナノバブルリポソームの作製に成功した。Ca9-22 細胞においてドキソルビシン封入バブルリポソームと超音波の併用による致死活性効果について評価したところ、同バブルと超音波を併用した群で導入効率および死活性効果の増強が認められた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects on cytotoxicity by combination of a novel HDAC inhibitor, Ky-2, and bubble liposomes on oral squamous carcinoma cells *in vitro*. Cell viability was significantly reduced by treatment with Ky-2 at 25 nM and bubble liposomes and ultrasound, while it also led to augmentation of the proportion of cells in the sub-G1 phase and DNA fragmentation. In addition, immunoblot analysis revealed that Ky-2 enhanced the expression of apoptosis-related proteins. We made new bubble liposomes from Doxil® and investigated the effects on cytotoxicity by combination of this new Doxil® bubble liposome (encapsulated doxorubicin bubble liposomes, EDBL) and ultrasound in human gingival squamous cell carcinoma Ca9-22 cells. Results showed that the effect on cytotoxicity was enhanced by a combination of EDBL and ultrasound.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
23 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
24 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ソノポレーション，ナノバブル，癌

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療における遺伝子・薬剤の有効性を高める方法として、ナノスケールの運

搬体を利用してがん組織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。

これまで、口腔扁平上皮癌の治療のために、マイクロバブルとソノポレーション法を用いた遺伝子・薬剤導入法を検討し、一定の抗癌効果があることを確認したが、新たな遺伝子・薬剤キャリアーとして超音波造影ガスを封入した新規バブルリポソームに着目した。

また、新規抗癌剤であるヒストンアセチル化酵素阻害剤 HDACi の開発を九州工業大学と共同研究しており、ソノポレーション法との併用を検討する。

2. 研究の目的

本申請で、正常組織への為害性が少なく局所に遺伝子や薬剤を効率的に導入できるソノポレーション法を用いて口腔扁平上皮癌に対する特異的標的治療法を開発する。また、同法に適した新規抗癌剤の開発を行う。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌の治療のために、超音波発振装置とナノバブルリポソームを用いたソノポレーション法を検討した。ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株 Ca9-22 細胞にバブルリポソームと超音波発振装置を用いて新規 HDACi である Ky-2 を導入し、抗腫瘍効果について評価した。また、ドキシルビシン内包 PEG リポソーム製剤であるドキシルに超音波造影ガスを封入し、新規ナノバブルリポソームの作製を試みた。Ca9-22 細胞においてドキシルビシン封入バブルリポソームと超音波の併用による致死活性効果について調べた。

4. 研究成果

新規 HDAC 阻害剤である Ky-2 とソノポレーションの併用によって、Ca9-22 細胞において有意な細胞致死活性を示した。さらにその濃度は 25 nM であり、他の HDAC 阻害剤である SAHA が 1.25 μM であるのと比較してかなり低濃度であった。細胞周期については 24 時間で sub-G1 期の割合が著しく上昇した。さらに Annexin V/PI assay を行ったところ、Ky-2 作用後 24 時間で細胞膜の外部に露出したフォスファチジルセリンが検出され、また Hoechst 染色では核の断片化を示す細胞が観察された。これらの結果より、Ky-2 を Ca9-22 cells に作用させると apoptosis が誘導されていることが明らかとなった。さらに apoptosis 関連タンパク発現を確認したところ、Ky-2 作用後 18 時間より Caspase-9, -3, -6, -7 の cleaved form の発現を認め、lamin A/C および PARP の変性が見られたことから、Caspase の段階的活性発現が生じていることが明らかとなった。

ドキシルビシン内包 PEG リポソーム製剤であるドキシルに超音波造影ガスを封入し、新規ナノバブルリポソーム(EDBL)を作製した。ヒト歯肉扁平上皮癌細胞 Ca9-22 細胞においてドキシルビシン封入バブルリポソームと超音波の併用に

よる致死活性効果について調べたところ、超音波照射 96 時間後では、コントロール:100% に対し、ドキシルのみ:89.6%, EDBL のみ:42.8%, 超音波のみ:96.1%, ドキシルと超音波併用:84.2% と細胞数の減少を認めた。EDBL と超音波を併用群では 3.7% と有意な細胞数の減少を認めた。超音波照射 48 時間後では、コントロールと比較し、EDBL と超音波を照射した群のみ細胞質が膨張し、形態的变化を認めた。また、subG1 の著明な増加を認めた。さらに、EDBL と超音波を照射した群で細胞核の断片化を認め、またアネキシン陽性細胞と、アネキシン陽性かつ PI 陽性細胞の増加が認められた。細胞死がアポトーシスによるものと考えられた。

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 4 件)

- ① Mori K, Sato S, Kodama M, Habu M, Takahashi O, Nishihara T, Tominaga K, Takenaka S. Oral cancer diagnosis via a ferrocenylnaphthalene diimide-based electrochemical telomerase assay. *Chin Chem*. 59. 289-295. 2013.
- ② Fujii, S., Okinaga, T., Ariyoshi, W., Takahashi, O., Iwanaga, K., Nishino, N., Tominaga, K., Nishihara, T. : Mechanisms of G1 cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells induced by hybrid-compound histone deacetylase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 434(3) 413-20 2013
- ③ Takahashi, O., Okinaga, T., Iwanaga, K., Habu, M., Ariyoshi, W., Tominaga, K., Nishino, N and Nishihara, T.: Novel histone deacetylase inhibitor exhibits antitumor activity via apoptosis induction in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Biophysical Chemistry* Vol.2, No.3, :215-221, 2011.
- ④ Sakedai, M., Ariyoshi, W., Okinaga, T, K. Iwanaga, M. Habu, I. Yoshioka, K. Tominaga, T. Nishihara. 2011. Inhibition of adjuvant arthritis in rats by electroporation with interleukin-1 receptor antagonist. *J. Interferon and Cytokine Res*. 2011 Nov;31(11):839-46

[学会発表] (計 4 件)

- ① 岩永賢二郎, 沖永敏則, 山本雅史, 西原達次, 冨永和宏. ナノ・マイクロバブルと超音波を利用したドラッグデリバリーシステムの確立. 第 73 回九州歯科学会総会. 2013 年 5 月 19 日. 北九州
- ② 岩永賢二郎. ナノバブルを利用した超音

波遺伝子・ドラッグデリバリーシステムの確立. 第72回九州歯科学会総会. 2012年5月18日. 北九州

- ③ 藤井誠子, 高橋理, 岩永賢二郎, 土生学, 福田仁一, 富永和宏. ミエローマ細胞における新規ヒストン脱アセチル化阻害剤の効果. 第57回日本口腔外科学会総会. 2012年10月19日. 横浜
- ④ 藤井誠子, 高橋理, 岩永賢二郎, 土生学, 福田仁一, 富永和宏. マウスミエローマ細胞株における新規ヒストン脱アセチル化阻害剤に対する感受性の違い. 第66回日本口腔科学会総会. 2012年5月18日. 広島

[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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 仁一 (FUKUDA JINICHI)
九州歯科大学・歯学部・その他
研究者番号: 00106270

(2) 研究分担者

岩永 賢二郎 (IWANAGA KENJIRO)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 20448484

富永 和宏 (TOMINAGA KAZUHIRO)
九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 40188793

西原 達次 (NISHIHARA TATSUJI)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 80192251

土生 学 (HABU MANABU)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 00360058

兒玉 正明 (KODAMA MASAOKI)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 40423975

(3) 連携研究者

西野 憲和 (NISHINO NORIKAZU)
九州工業大学・生命体工学研究科・教授
研究者番号: 40145165