

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 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基礎研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591528

研究課題名（和文） 胆膵癌に対するアミノ酸抱合ナノ粒子の増殖抑制効果に関する検討

研究課題名（英文） Anti-cancer effects and mechanism induced by nanoperticles loaded amino acid for biliary and pancreatic cancer cells

研究代表者

松山 隆生 (MATSUYAMA RYUSEI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30464548

研究成果の概要（和文）：アミノ酸抱合ナノ粒子のうち抗腫瘍活性が高いと報告されている Gly (Shirotake et al. Chem. Perm. Bull. 56(1):137-138, 2008) を用いた結果、膵癌細胞株 MIA-Paca2 に対する増殖抑制効果が高い可能性が示唆された。今後その作用機序のメカニズムの詳細な解明により、将来的に胆膵癌に対する抗癌剤治療に代替する有効な治療法への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In our study, results using Gly (Shirotake et al. Chem. Perm. Bull. 56(1):137-138, 2008) has been reported anti-tumor activity is high among the nanoperticles loaded amino acid likely higher growth inhibitory effect on pancreatic cancer cell line MIA-Paca2 was suggested. The detailed elucidation of the mechanism of the action mechanism will consider a subject from now on. The possibility as an effective cure for which the anticancer drug treatment to bile duct and pancreatic cancer will be substituted in the future is expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード：ナノ粒子・膵癌細胞・増殖抑制効果

1. 研究開始当初の背景

膵胆道癌は、その解剖学的な位置関係から容易にリンパ節転移や神経浸潤を伴い、今尚極めて予後不良の疾患である。さらに多くの症例が stage IVa 以上、すなわち切除困難あるいは不能例として発見される。根治不能であるばかりか生存期間も中央値 3～5 か月以下で 1 年生存率 10% 以下、5 年生存率 0.4～3%

と極めて短く、さらに黄疸や疼痛などを伴って、患者の QOL を著しく悪化させる。近年、Gemcitabine をはじめとする新規抗癌剤、新たなレジメンの登場により集学的治療による有効例も報告されつつある。しかしながら Gemcitabine の奏功率は 30% 程度であり多くの患者は効果もなく副作用のみに苦しめられているのが現状である。

現在これらの化学療法剤治療に変わる代替治療法として免疫細胞療法や様々な食品、蛋白質、アミノ酸などが研究されておりそれぞれ抗癌作用が報告されている。食品としてはこれまでに大豆から精製されるイソフラボンの抗癌作用が報告されており、現在米国立がん研究所(NCI)が290万ドルの予算を計上して抗癌効果の研究に乗り出している。これらの代替治療の特徴は宿主の免疫機能を落とすことなく治療が可能なことであり、化学療法治療に行き詰まりが見えている現在において注目されている分野である。

さらには近年においてはナノ粒子テクノロジーの進歩によって高純度、球状、均一粒径のナノ粒子(粒径が1~100ナノメートル)の作成が可能となり、薬剤を腫瘍まで搬送する輸送手段としてのドラッグデリバリーシステムの作成や、遺伝子治療のための遺伝子導入の開発などが進められておりナノ粒子を癌に対する代替治療に応用することが検討されている。分担研究者らはこれまでに外科領域において、創傷縫合に用いられているN-ブチル-1-2-シアノアクリレート(n-BCA)を、糖類や界面活性剤を重合反応の安定化剤として用い、酸性条件下で重合反応を進めて物理化学特性の異なるナノ粒子を作成に成功し報告、特許の取得を行ってきた(Chem. Pharm. Bull. 56:137-138, 2008, 特願2006-317336)。

さらに研究分担者らはこれまでに病原細菌との親和性を有し、特異的な接合によって増殖抑制作用を示す高分子名の重合体の作成に成功し(特願2007-101610)、これらを用いてメチシリン、バンコマイシン耐性グラム陽性球菌の増殖抑制効果について報告してきた(日本薬学会 第129年会 2009年3月)。癌細胞は細胞生物学から観ると病原細菌などの単細胞生物と同じように自己増殖の繰り返しが問題であり病原細菌で得られた結果から、これら高分子名の重合体と癌細胞の接合により病原細菌と同様に自己増殖の抑制が可能であると想定し本研究を想定した。

2. 研究の目的

我々が開発した高分子名の重合体を用いて膵胆道癌細胞の増殖抑制効果とそのメカニズムを解明し、胆膵臓癌に対する新たな代替治療法の開発を行う。

ナノ粒子をもちいた癌を対象とした研究にはナノ粒子を抗癌剤の輸送物質とする研究や遺伝子治療における導入手段などが行われている。本研究はナノ粒子を用いた研究ではあるが、これまで行われてきたいかなる研究とも異なり、化学療法剤にはとらわれず、我々が独自に開発した高分子ナノ重合体(特願2006-317336)を用いて、高分子ナノ重合体そのものの癌細胞増殖抑制効果を研究するものであり非常に独創的であり、これまでの研

究施設でも行われていない新規性の非常に高い研究である。癌細胞に対する増殖抑制効果が証明、実証されれば化学療法剤にかわる代替治療法としてこの分野の研究はさらに進むことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞増殖抑制効果の観察、ナノ粒子の濃度等の至適化、抑制効果を持つ粒子特性の選別を行った。異なる種類の胆道癌、膵癌細胞株(AsPC-1, BxPC-3, NOZ, OZ, PNC-1, MIA-Paca2)を、物理化学特性の異なるナノ粒子(D70, Asp, Arg, Gly)(Shirotake et al. Chem. Pharm. Bull. 56(1):137-138, 2008)とともに培養を行い、培養48時間後、⑦2時間後に癌細胞のミトコンドリア代謝活性をホルマザンの吸光度定量により測定し増殖抑制を観察した。本実験により抑制効果のあるナノ粒子を選別し、その至適濃度と培養時間を検討した。

(2) (1)の結果をもとに膵癌細胞株 MIA-Paca2 と Gly 抱合ナノ粒子の培養を行い、培養12時間後、24時間後、48時間後、60時間後、72時間後に癌細胞のミトコンドリア代謝活性をホルマザン吸光度定量により測定しより詳細な増殖抑制を観察した。本実験により膵癌細胞株 MIA-Paca2 に対する Gly 抱合ナノ粒子の抑制効果のある至適濃度・培養時間を検討した。

(3) (2)の結果をもとに、膵癌細胞株 MIA-Paca2 への増殖抑制効果を発揮すると想定される Gly 抱合ナノ粒子添加時の、透過型顕微鏡を用いた癌細胞の形態学的観察を行った。

4. 研究成果

平成22年度の成果として、異なる種類の胆道癌、膵癌細胞株(AsPC-1, BxPC-3, NOZ, OZ, PNC-1, MIA-Paca2)を、物理化学特性の異なるナノ粒子(D70, Asp, Arg, Gly)とともに培養を行い、増殖抑制を観察した結果、ヒト膵癌細胞株 Panc1 と MIA-Paca2 でいずれのアミノ酸抱合ナノ粒子添加で72時間後に最大の増殖抑制効果が得られることが明らかになった。一方、その他の胆膵癌細胞株ではいずれのナノ粒子においても増殖抑制効果が得られなかった。

さらに、MIA-Paca2 においてアミノ酸配合粒子のうち Gly で特に増殖抑制効果が強いことが示唆された。

以上の知見は、Gly 抱合粒子が膵癌の治療に有効な抗腫瘍効果を発揮する可能性を持つことが示唆された。

平成23年度は Gly 抱合ナノ粒子の MIA-Paca2 に対する増殖抑制効果が得られる至適濃度とその培養時間を検討した。

その結果Gly 抱合ナノ粒子添加72時間後にMIA-Paca2 の最大増殖抑制効果が得られた。さらに、MIA-Paca2 のミトコンドリア代謝活性をホルマザン吸光度定量(MTT assay)により測定した結果、Gly の至適濃度は75 μ l/ml と推定された。

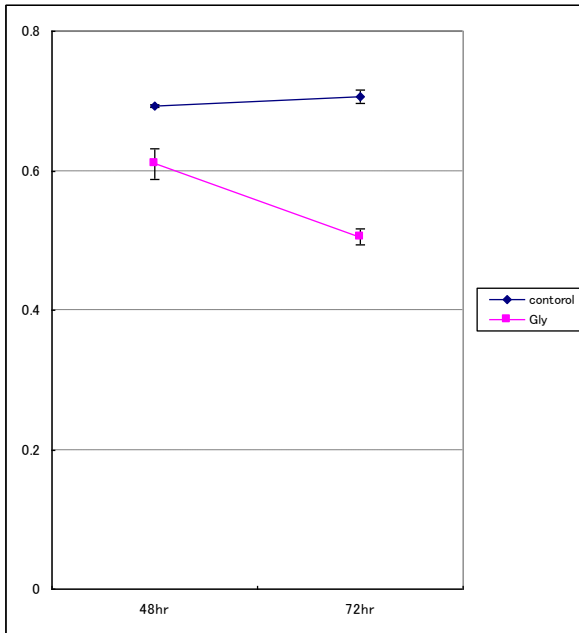
Gly 50 μ l/ml
浸潤指数 : 1.64

Gly 75 μ l/ml
浸潤指数 : 0.64

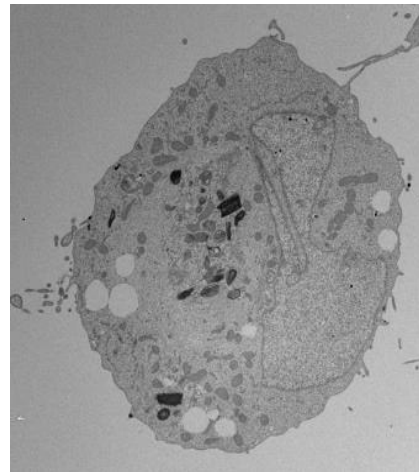
MTT assay の結果を踏まえ、MIA-Paca2 と Gly の Invasion assay を行った結果、Gly 濃度 75 μ l/ml で浸潤指数 0.64 が得られ、50 μ l/ml 時の浸潤指数 1.64 と比較して明らかな浸潤抑制効果が得られた。

平成 24 年度は前年度の実験より得られた結果を踏まえて、MIA-Paca2 へ至適濃度の Gly 抱合ナノ粒子を添加した際、透過型電子顕微鏡を用いて癌細胞の形態学的変化の観察を行った。

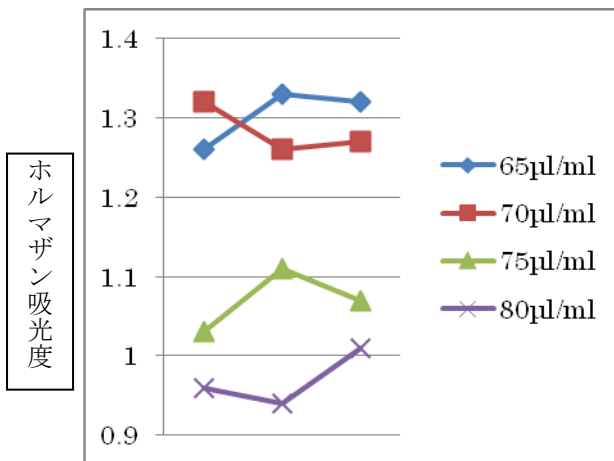
①Gly による MIA-Paca2 増殖抑制実験結果



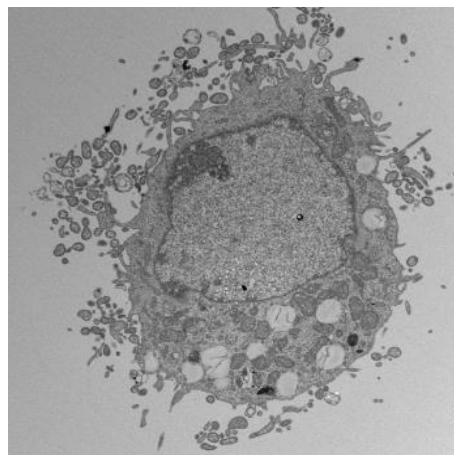
④Gly(-)MIA-Paca2 透過型電子顕微鏡写真



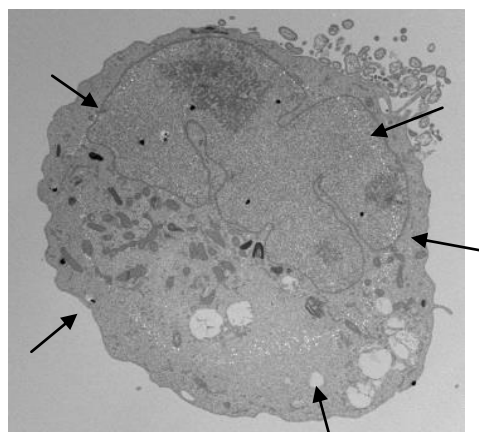
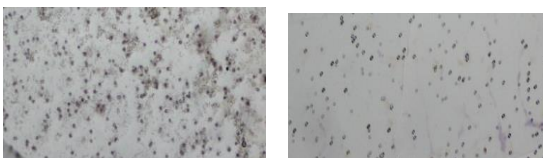
②MTT assay による Gly の MIA-Paca2 増殖抑制至適濃度



⑤Gly(+)MIA-Paca2 透過型電子顕微鏡写真



③Invasion assay



Gly 抱合ナノ粒子添加なしのコントロール MIA-Paca2 と比較して、添加ありの MIA-Paca2 では細胞自体、及び細胞表面の突起の変形が観察された。さらに Gly 抱合ナノ粒子添加時では MIA-Paca2 細胞内に白色の空泡が細胞内を取り巻くように出現(→)するのが観察された。

抗癌剤アクチノマイシン D を癌細胞に添加すると細胞の空洞化や細胞膜の破壊、さらには細胞間の突起の退化による細胞傷害性が観察されたとの報告がある。さらに、研究分担者らは Gly 抱合ナノ粒子が大腸癌細胞株、肝臓癌細胞株、ヒト T 細胞リンパ腫細胞株に対して強い抗腫瘍効果を示したと報告している。今回我々が Gly 酸抱合ナノ粒子を MIA-Paca2 へ添加して観察された、①細胞自体の変形②細胞表面の突起の変形③細胞内をとりまく白色空泡の出現は、同様の細胞傷害の形態学的変化が観察された可能性が高いと考えられる。

以上の結果より、Gly 抱合ナノ粒子の膵癌細胞株 MIA-Paca2 に対する増殖抑制効果が期待でき、さらにその作用機序のメカニズムの解明により、将来的に胆膵癌に対する抗癌剤治療に代替する有効な治療法としての可能性が期待される。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 隆生 (MATSUYAMA RYUSEI)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：30464548

(2) 研究分担者

城武 昇一 (SHIROTAKE SHOICHI)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号：20143274

遠藤 格 (ENDO ITARU)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：60211091