

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 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592206

研究課題名（和文）

ナノサイズパーティクルを用いた口腔癌のレセプターターゲティング DDS の開発

研究課題名（英文）

Development of receptor targeting DDS of oral cancer using the nanosize particle

研究代表者

中島 雄介 (NAKAJIMA YUSUKE)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：90431957

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ナノサイズパーティクル(Minicell) と EGF レセプターを同時に認識する bispecific antibody を製作した。この抗体を用いて、培養口腔癌細胞における Minicell の発現量を計測した結果、EGF レセプターの発現量に比例して Minicell の発現が確認された。次にヌードマウスの移植腫瘍における抗腫瘍効果を計測した。抗癌剤をパッケージした Minicell を EGF レセプター低発現腫瘍と高発現腫瘍へ局所投与したところ、高発現群の腫瘍でより高い抗腫瘍効果が認められた。しかし2群間で統計学的有意差を認めるまでには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

In present study, we developed the bispecific antibody that can recognize both nanosize particle (Minicell) and EGF receptor (EGFR). At first, expression level of Minicell on the cultured oral cancer cell line was examined by using this antibody and we confirmed that its expression was increased in proportion to that of EGFR. Next, we measured the antitumor efficacy by direct injection of anticancer drug packaged Minicell into tumour xenografts of nude mice. As a result, high EGFR expression tumor group showed more effective antitumor efficacy than low EGFR expression group. But unfortunately, the result didn't reveal the statistical significance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

癌治療におけるドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System ; DDS) の目的

は、抗癌剤を化学修飾したりキャリアに封入したりすることで、より多くの抗癌剤を選択的に局所の癌組織に到達させることによ

て治療効果を高めることにある。また同時に周囲の正常組織や増殖が盛んな骨髄組織への集積を可能な限り抑えることで、副作用を軽減することにある。

口腔癌などの固形腫瘍に対する DDS にはアクティブ・ターゲティング（能動的標的指向）とパッシブ・ターゲティング（受動的標的指向）という二つの概念が存在する。アクティブ・ターゲティングには、分子間の特異的結合能を利用して標的を囚ろうとするもので、モノクローナル抗体や各種レセプターに対するリガンドを利用した方法がある。一方パッシブ・ターゲティングは、腫瘍の脈管系の特性を生かして抗癌剤の腫瘍選択的集積を達成しようとするものである。一般的に固形腫瘍では腫瘍新生血管の増生、それに見合うリンパ系回収機能の増生がないこと、また腫瘍局所では著しい血管透過性の亢進が起きていることが見出されており、これらにより正常血管では血管外へ漏出しにくい高分子物質も、腫瘍血管からは漏出しやすく、いったん癌局所で漏出した物質はその場に長く停滞しやすい傾向にある。結果として血中安定性に富む高分子抗癌剤は、パッシブ・ターゲティングが可能となることが予想され、このアイディアは EPR 効果 (enhanced permeability and retention effect) と称され、現在世界的に受け入れられている。

近年急速に開発が進むナノメディシン (nano-medicine) の技術を活用し、抗癌剤を化学修復あるいはキャリアに封入することが可能になってきた。そこで、今回われわれが注目したのは、バクテリア由来のナノサイズパーティクルを用いた、口腔癌組織特異的な DDS の開発である。

2. 研究の目的

上述した様に、ナノメディシン (nano-medicine) の技術開発が、急速に進んでおり、いろいろな抗癌剤を化学修復しキャリアに封入することが可能になってきた。そこで本研究では、バクテリア由来のナノサイズパーティクル (Minicell) をキャリアとしたレセプター・ターゲティングの概念を用い、口腔癌における腫瘍選択的なドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System : DDS) の開発を目的とする。

3. 研究の方法

研究全体像

バクテリア由来 Minicell の精製純度の向上

- ・濃度勾配遠心法
- ・Filtration、FACS 解析



Minicell 内への抗癌剤パッケージング方法の確立

- ・HPLC
- ・免疫蛍光染色法 (immunofluorescence)



Bispecific Antibody の製作
発現レベルのチェック

- ・免疫蛍光染色法 (immunofluorescence)



in vitro における Minicell の腫瘍
選択的発現のチェック

- ・培養口腔癌細胞における発現解析



in vivo における Minicell の抗腫瘍
効果の測定

- ・マウス移植腫瘍の volume 測定



in vivo における Minicell 全身投与後
の腫瘍特異的発現の確認

- ・マウス移植腫瘍と腫瘍臓器における ^{125}I の取り込み測定

4. 研究成果

(1) 抗癌剤をパッケージするための vehicle として、バクテリア由来のパーティクル Minicell の抽出、精製を行った。具体的には S. Typhimurium bacterial strain を用いて、濃度勾配超遠心法により Minicell 成分を精製抽出し、純度を高めるための Filtration を繰り返し、アガロースプレート培地にて colony の形成や微生物のコンタミネーションがないことを確認した。

(2) 精製された Minicell 内への効率のいい再現性を持った抗癌剤のパッケージング方法を検討した。混合する抗癌剤は、口腔癌に対して適用が認められているシスプラチン、カルボプラチン、ドセテキセルの 3 薬剤を用意した。

(3) Minicell 表面の特異抗体 (O-antigen) と標的口腔癌細胞表面に高発現している EGF レセプターの両方を認識できる bispecific antibody を製作した。

(4) *in vitro* で Minicell の腫瘍細胞選択的発現メカニズムを解析した。EGF レセプターを発現している口腔癌細胞表面にリポフェクチン法を用いて Minicell を発現させ、免疫蛍光染色法にて解析したところ、EGF レセプターの発現量に比例して、Minicell の発現が計測された。

(5) *in vivo* で抗癌剤をパッケージした Minicell の抗腫瘍効果を計測した。具体的には、ヌードマウスに腫瘍形成し、Minicell を腫瘍内に局所投与、移植腫瘍の大きさを計測し抗腫瘍効果を判定した。コントロール群に EGF レセプター低発現の腫瘍、実験群に EGF レセプター高発現の腫瘍を設定し、腫瘍径を測定したところ、実験群で抗腫瘍効果が強く認められたが、2 群間に統計学的有意差を認めるまでに至らなかった。

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 3 件)

- ① Hanabata Y, Nakajima Y, Morita KI, Kayamori K, Omura K.
Coexpression of SGLT1 and EGFR is associated with tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma.
Odontology, 査読有, 100(2)巻, 2012, 156-163.
DOI: 10.1007/s10266-011-0033-2.
- ② Uekusa M, Omura K, Nakajima Y, Hasegawa S, Harada H, Morita KI, Tsuda H.
Uptake and kinetics of 5-aminolevulinic acid in oral squamous cell carcinoma.
Int J Oral Maxillofac Surg, 査読有, 39(8)巻, 2010, 802-805.
DOI: 10.1016/j.ijom.2009.11.024.
- ③ Prapinjumrune C, Morita KI, Kuribayashi Y, Hanabata Y, Shi Q, Nakajima Y, Inazawa J, Omura K.
DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma.
J Oral Pathol Med, 査読有, 39(7)巻, 2010, 525-532
DOI: 10.1111/j.1600-0714.2009.00847.x.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 田口貴英、中島雄介、小村健、口腔癌の細胞核内における EGFR の発現解析、第 31 回日本口腔腫瘍学会総会、2013 年 1 月 24-25 日、東京
- ② 中島雄介、原田浩之、島本裕彰、富岡寛文、田中香衣、平井秀明、釘本琢磨、大迫利光、田口貴英、小村健、舌扁平上皮癌の生検方法による治療成績の検討、第 57 回日本口腔外科学会総会、2012 年 10 月 19-21 日、横浜
- ③ 富岡寛文、小村健、田口貴英、釘本琢磨、平井秀明、望月裕美、田中香衣、島本裕彰、中島雄介、原田浩之、下顎歯肉扁平上皮癌 114 例の顎骨浸潤に関する検討、第 57 回日本口腔外科学会総会、2012 年 10 月 19-21 日、横浜
- ④ 原田浩之、小村健、中島雄介、島本裕彰、富岡寛文、田中香衣、釘本琢磨、大迫利光、口腔扁平上皮癌における原発巣再発の臨床的検討。一手術群と放射線治療群との比較一、第 36 回日本頭頸部癌学会、2012 年 6 月 7-8 日、松江
- ⑤ 島本裕彰、小村健、原田浩之、中島雄介、富岡寛文、田中香衣、金親あや乃、平井秀明、口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移高度進展例の検討、第 36 回日本頭頸部癌学会、2012 年 6 月 7-8 日、松江
- ⑥ 上林功樹、藤巻拓郎、島田泰如、中島雄介、根岸貴志、市田祐之、玉城宏一、横山利幸、小村健、眼瞼基底細胞癌を発症した Gorlin 症候群の 1 例、第 116 回日本眼科学会総会、2012 年 4 月 5-8 日、東京
- ⑦ 中島雄介、花畑泰子、森田圭一、柏森高、小村健、口腔扁平上皮癌における EGFR および SGLT1 の発現解析、第 35 回日本頭頸部癌学会、2011 年 6 月 9-10 日、名古屋
- ⑧ 原田浩之、小村健、中島雄介、生田稔、島本裕彰、富岡寛文、田中香衣、金親あや乃、釘本琢磨、大迫利光、口底扁平上皮癌の臨床病理学的検討、第 35 回日本頭頸部癌学会、2011 年 6 月 9-10 日、名古屋
- ⑨ 富岡寛文、望月裕美、金親あや乃、田中香衣、島本裕彰、生田稔、中島雄介、原田浩之、小村健、口腔扁平上皮癌における対側頸部リンパ節転移症例の検討、第 35 回日本頭頸部癌学会、2011 年 6 月 9-10 日、名古屋
- ⑩ 島本裕彰、小村健、原田浩之、中島雄介、生田稔、富岡寛文、田中香衣、金親あや乃、平井秀明、釘本琢磨、大迫利光、ラッシュヤタームカヤナン プラディット、当科における口腔多発癌症例の検討、第 29 回日本口腔腫瘍学会総会、2011 年 1 月 27-28 日、

熊本

- ⑪原田浩之、釘本琢磨、金親あや乃、田中香衣、富岡寛文、島本裕彰、生田稔、中島雄介、小村健、口腔扁平上皮癌のpN別治療成績、第48回癌治療学会学術集会、2010年10月29-30日、京都
- ⑫田中香衣、金親あや乃、富岡寛文、島本裕彰、生田稔、中島雄介、原田浩之、小村健 T1、T2 舌癌手術症例の検討、第34回日本頭頸部癌学会総会、2010年6月10-11日、東京
- ⑬中島雄介、小村健 当科におけるビスフォスフォネート系薬剤関連顎骨壊死患者の治療概要、第55回日本口腔外科学会総会、2010年10月16-18日、千葉幕張

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 雄介 (NAKAJIMA YUSUKE)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：90431957