

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430160

研究課題名(和文)体性幹細胞を用いたバイオドラッグデリバリーシステムによる新規癌治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a new anti-cancer therapy by bio-drug delivery system with somatic stem cells

研究代表者

伊井 正明 (II, MASA AKI)

大阪医科大学・実験動物部門・講師

研究者番号：10442922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤(Pirarubicin)を生体吸収性ポリマー-PLGAナノ粒子に封入した粒子を作製した。次に、ヒト脂肪由来幹細胞にこのナノ粒子を取り込ませた細胞複合体を合成した。ヒト膵癌細胞株(KP1N)とこの抗がん剤ナノ粒子抱合脂肪幹細胞との共培養実験では、抗がん剤ナノ粒子を多く抱合した脂肪幹細胞で膵癌細胞の遊走能や増殖能が抑制され、また、アポトーシスも誘導されるという実験結果を得た。今後は、免疫不全マウスの背部にヒト膵癌細胞を移植した担癌マウスに抗がん剤ナノ粒子抱合脂肪幹細胞を静脈内投与し、抗がん剤ナノ粒子単独投与群や脂肪幹細胞単独投与群と比較しながら腫瘍の発育の程度を経時的に観察する予定である。

研究成果の概要(英文)：We made a biodegradable anti-cancer drug (Pirarubicin: Pir) conjugated PLGA nanoparticle, and loaded them into human adipose-derived mesenchymal stem cells generating a cell-complex (PirNP-hAdSC). The in vitro experiment in which human pancreatic cancer cells (KP1N) and PirNP-hAdSCs were co-cultured exhibited significant inhibition of proliferation and migration and promotion of apoptosis in KP1N cells. We will evaluate tumor growth in KP1N bearing immunodeficient mice after intravenous administration of 1) PBS, 2) PirNP alone, 3) hAdSCs alone, and 4) PirNP-hAdSCs upto 4 weeks after KP1N transplantation with one week interval.

研究分野：再生医療・幹細胞生物額・循環器学

キーワード：がん治療 脂肪幹細胞 DDS 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

わが国における死因第一位の疾患である癌に罹患する患者は増加の一途をたどっており、新規治療法の開発が期待されている。一般的に用いられる全身化学療法は、重篤な全身性副作用により患者は多大なる苦痛を伴うだけでなく治療継続困難になることもあり問題を抱えている。したがって、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が重要である。

間葉系幹細胞は骨髄・皮膚・胎盤などの胎生組織のみではなく脂肪組織にも多数存在することが知られており、脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: AdSC) は多分化能を有することから再生医療のツールとして注目されているが、それだけでなく癌組織への集積性や癌細胞増殖抑制効果についての報告もあることから、抗がん剤と AdSC を併用することによって新たな癌治療法開発の可能性が示唆される。

2. 研究の目的

AdSC は容易かつ多量に分離でき、癌細胞の増殖抑制・アポトーシス誘導効果及び腫瘍への集積性を有する。本研究では、このような AdSC の性質を活用し、抗癌剤の徐放させることのできるナノ粒子を AdSC に包含させて腫瘍に移植することにより、AdSC の抗腫瘍効果に加えて抗癌剤の選択的デリバリーとの相乗効果による効率のよい腫瘍縮小効果について検討した。

3. 研究の方法

AdSC に生分解性ポリマー (乳酸・グリコール酸共重合体: PLGA) に抗癌剤を封入した薬剤徐放化ナノ粒子を包含させ、細胞機能及び薬剤徐放パターンの観点から最適な包含条件を検討した。

次に、ヒト膵臓癌細胞株による担癌マウス (皮下移植モデル) を用いて、抗癌剤徐放化 PLGA ナノ粒子包含 AdSC 移植による抗腫瘍効果を検討した。

4. 研究成果

まず、2種類の PLGA に抗癌剤 (ピラルピシン: Pir) を封入した薬剤徐放化ナノ粒子 (Pir-PLGA) を作製し、薬剤封入率を測定した。(図1)次に、最適な封入率となったナノ粒子を実験に用いて AdSC に包含させ (AdSC $1.0 \times 10^5$  コに対して Pir-PLGA $10, 25, 50 \mu\text{g}$ ) (図2) 増殖能 (図3) アポトーシスの有無 (図4) 遊走能の評価を行った。血清存在下では、Pir-PLGA を多く包含した AdSC ほど増殖能の低下を認め、培養開始 24 時間後にはアポトーシスを起こしていることが示唆された。無血清下では、早期では有意差を認めないが培養開始 24 時間以降では Pir-PLGA を多く包含した AdSC ほど viability の低下を認めた。遊走能について

は、粒子を包含しても低下を認めなかった。(図5)次に、Pir 徐放化ナノ粒子を包含させた AdSC とヒト膵臓癌細胞株 (KP-1N) との共培養を行い 48 時間後に KP-1N の増殖能を評価したところ、Pir-PLGA を多く包含した AdSC が最も増殖抑制するという結果が得られた。(図6)

具体的な実験結果を以下に示す。

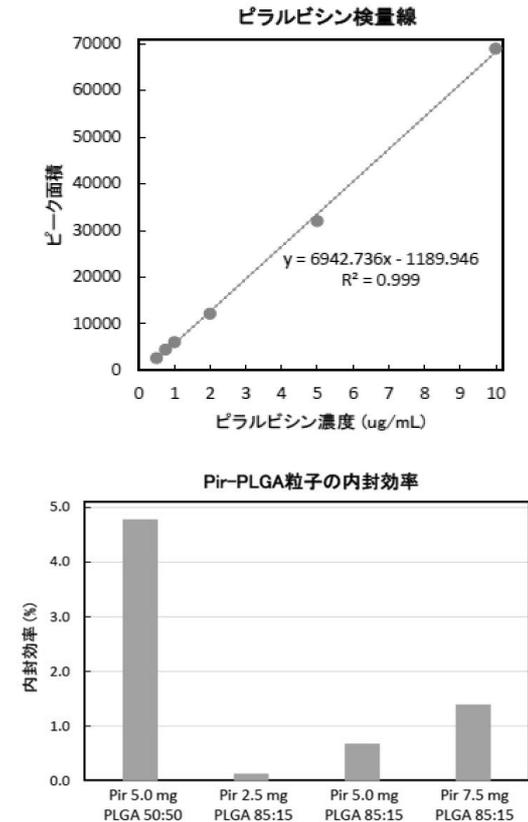
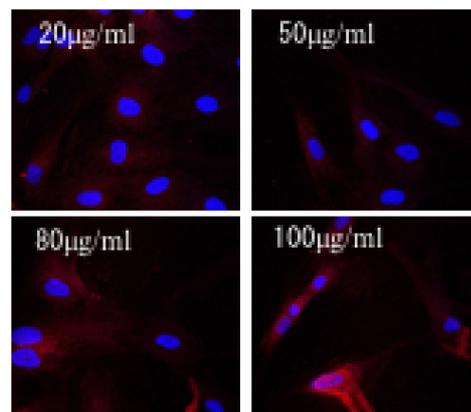


図1 ピラルピシンの HPLC 法による濃度測定のための検量線 (上図) 及び、PLGA (50:50 と 85:15 2 種類) に対するピラルピシンの混合率を変化させてナノ粒子を作製した場合の薬剤封入率の違い



hAdSC (5x10<sup>4</sup>) に PLGA ナノ粒子 (20-100 $\mu\text{g}$ ) 添加 30min 後

図2 ローダミン (赤色蛍光色素) のついた PLGA ナノ粒子が濃度依存性に AdSC に取り込

まれた画像

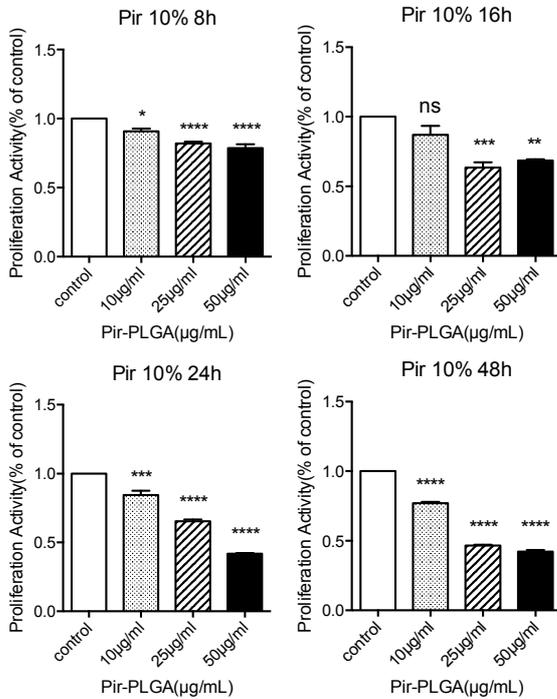
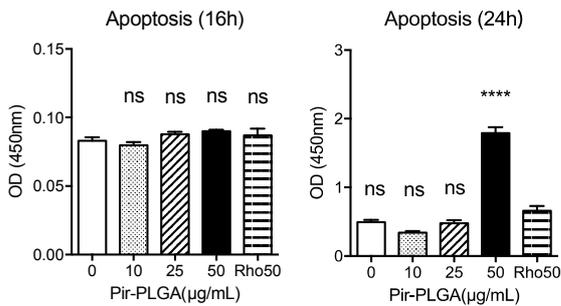


図3 PLGA ナノ粒子が AdSC に抱合された状態で細胞増殖能に与える影響 (上段2つ: ローダミン蛍光色素封入 PLGA ナノ粒子、下段2つ: ピラルピシン Pir 封入 PLGA ナノ粒子)



DAPI染色 TUNEL染色 (共培養24h後)

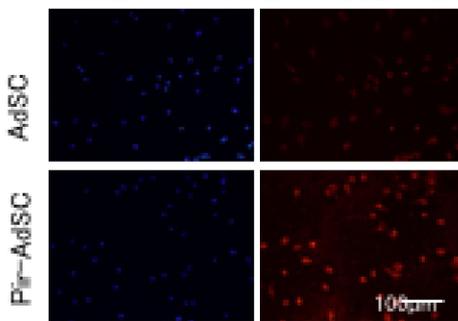


図4 Pir-PLGA ナノ粒子が AdSC に抱合された状態で細胞アポトーシスに与える影響 (上図左: Pir-PLGA ナノ粒子抱合後 16h、上図右: Pir-PLGA ナノ粒子抱合後 24h) 下図: 赤色蛍光陽性細胞 = TUNEL に染まるアポトーシスに陥った AdSC

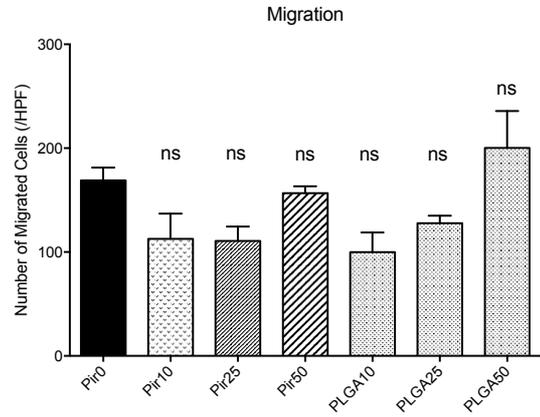


図5 Pir-PLGA ナノ粒子が AdSC に抱合された状態で細胞遊走能に与える影響 (Pir: ピラルピシン封入 PLGA ナノ粒子抱合、PLGA: 薬剤非封入 PLGA ナノ粒子抱合)

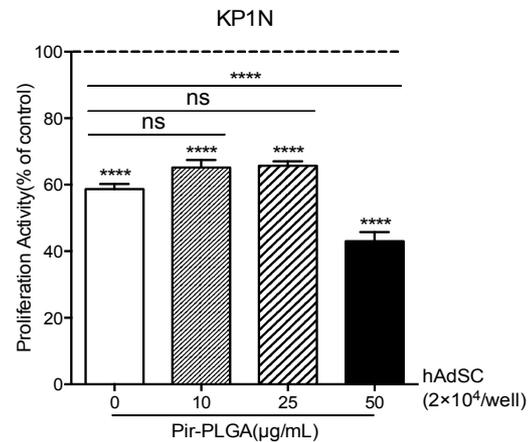
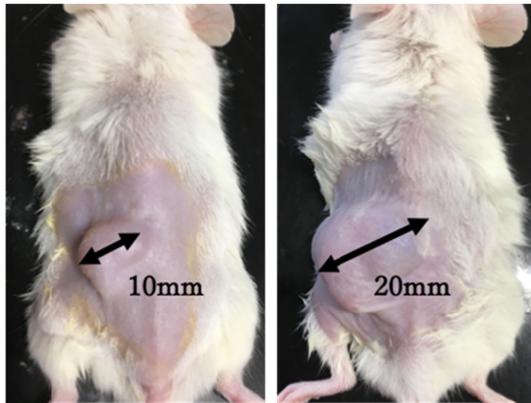


図6 Pir-PLGA ナノ粒子抱合 AdSC とヒト膵臓癌細胞株 (KP1N) との共培養実験結果 (48 時間後に比色法にて評価)

考察・今後の方針

Pir は細胞分裂時に作用するため、血清存在下では早期から AdSC の viability に影響を及ぼす反面、Pir-PLGA ナノ粒子を多量に抱合した AdSC は癌細胞の増殖を強く抑制した。一方、Pir-PLGA ナノ粒子は AdSC に抱合後 16 時間以内では遊走能に影響を与えなかったため、in vivo におけるバイオ DDS として AdSC を利用できることが示唆された。今後は Pir 徐放化 PLGA ナノ粒子抱合 AdSC 移植による抗腫瘍効果について、ヒト膵臓癌細胞株 (KP1N 等) 皮下移植担癌マウスモデル (下図参照) を用いて検討する。また、PLGA の乳酸とグリコール酸の配合比率を変えることで、封入した薬剤の徐放期間が変化するため、今回 in vitro で用いた粒子以外に薬剤徐放期間のさらに長い粒子を作製して実験に用いる予定である。



移植後21日

移植後42日

## 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 2 件)

細胞内封入性向上を目的とした抗がん薬の細胞内移行・排出特性の解析

久米麻世、竹林裕美子、宮崎誠、伊井正明、永井純也

日本薬剤学会第 32 回年会(さいたま市) 2017/5/11-13.

Development of a Novel Hybrid Treatment for Pancreatic Cancer with Pirarubicin-conjugated Biodegradable Nanoparticle and Adipose-derived Stem Cells.

Masahiko Aoki, Masaaki Ii, Masahiro Goto, Kazuhide Higuchi

Digestive Disease Week (Chicago, USA) 2017/5/6-9.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 該当無し

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊井正明(II MASA AKI)

大阪医科大学・実験動物部門・講師

研究者番号：10442922

(2)研究分担者  
該当無し

(3)連携研究者

田畑泰彦(TABATA YASUHIKO)

京都大学・再生組織構築研究部門 生体材

科学分野・教授

研究者番号：50211371

(4)研究協力者

青木雅彦(AOKI MASAHIKO)