

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463096

研究課題名(和文) ナノバブルと超音波を用いた癌の特異的分子標的治療法の確立と臨床への応用

研究課題名(英文) Application to oral cancer treatment of nanobubbles and sonication

研究代表者

岩永 賢二郎 (iwanaga, kenjiro)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20448484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、医療用に用いられる程度の出力の超音波と造影剤であるナノ・マイクロバブルを併用することにより、様々な細胞や臓器へ薬剤や遺伝子を導入する技術を開発してきた。抗Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 抗体を付着させたEGFR-MBを用い、EGFR高発現ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株における抗癌剤の効果増強を検討した。Bleomycine (BLM) とEGFR-MBを用いたソノポレーション法では、より低濃度のBLMで著明な癌細胞増殖抑制効果が得られた。本手法は新たな癌特異的抗癌治療となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ultrasound creates transient permeability of cell membranes in the presence of nanobubbles or microbubbles, and foreign molecules can easily enter cells, which is known as 'sonoporation'. We developed anti-Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) antibody conjugated MBs (EGFR-MB). We examined the effect of EGFR-MB on oral squamous cell carcinoma. MBs were conjugated with an anti-EGFR antibody, and were entrapped ultrasound contrast gas. Ca9-22, a human gingival carcinoma cell line, were exposed to ultrasound with EGFR-MB and anti-cancer drug bleomycin (BLM). Sonoporation and EGFR-MB had a strong cytotoxic effect on Ca9-22 cells at the low dose of BLM. In addition, sonoporation and EGFR-MB remarkably increased the population of apoptotic cells even at a low dose BLM. Treatment with EGFR-MB and ultrasound make it possible to administer drugs into the cells more efficiently and specifically, suggesting a novel application for chemotherapy treatment for oral squamous cell carcinoma.

研究分野：口腔外科

キーワード：ソノポレーション ナノバブル マイクロバブル ドラッグデリバリー 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療における薬剤、遺伝子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および遺伝子を送達することを目的とするターゲティング型 DDS(Drug delivery system)の研究が注目されている。申請者らは、これまで、医療用に用いられる程度の出力の超音波と造影剤であるナノ・マイクロバブルを併用することにより、様々な細胞や臓器へ薬剤や遺伝子を導入するソノポレーション法を開発してきた。リポソームに超音波造影ガスを封入した1µm以下のナノバブルリポソームは、その内部に抗癌剤や遺伝子などを封入することができ、バブル表面のPEGに標的指向性を付与することができる。

2. 研究の目的

本申請では、同法を用いた遺伝子および抗癌剤の局所治療法を改良し、臨床応用を目指した。ナノバブル・マイクロバブルによるソノポレーション法の導入効率の向上、癌細胞に特異的なリガンド(EGFR)を標的とした癌細胞特異的導入法の確立を目的とした。

また、臨床応用を目指し、従来の口腔癌化学療法に対して超音波導入法を併用し、その有効性を評価した。

また、アムホテリシンB含有バブルリポソームを作製し、超音波併用によるカンジダ発育阻止効果についても検討した。アムホテリシンBは殺菌作用を示す抗真菌薬だが副作用も問題とされている。近年、リン脂質二重膜構造のリポソーム内に超音波造影ガスを封入した微小気泡(バブルリポソーム)への超音波照射により、内包薬剤導入効率の向上が報告されている。アムホテリシンBのバブルリポソーム製剤と超音波を併用し、低濃度で効果的なドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発を試みた。

3. 研究の方法

実験にはヒト歯肉扁平上皮癌細胞株Ca9-22細胞を用いた。抗EGFR抗体は、B細胞ハイブリドーマである528細胞の培養上清より精製を行い回収した。Polyethylene glycol(PEG)で修飾したリポソームに、抗EGFR抗体を結合させ、それに超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンガスを内封することで、抗体修飾マイクロバブルを作製した。これをCa9-22細胞懸濁液、pVIVO1-GFP/LacZ混合液もしくはBleomycin(BLM)の混合液に添加し、超音波を照射した。その後、pVIVO1-GFP/LacZの導入効率、細胞の増殖抑制および細胞死の種類についてそれぞれ評価を行った。

舌癌(T1,2)に対して術前化学療法後に切除を予定している患者に同意を得た。入院当

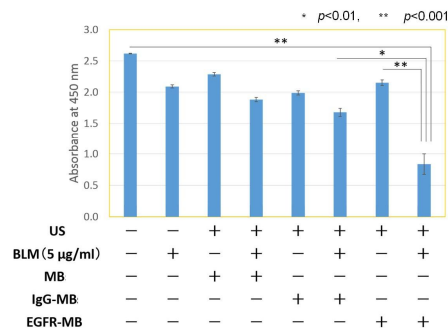
日(手術6日前)から手術前日までペブレオマイシン5mgを持続皮下注下に1日1回超音波導入を行う。超音波造影剤としてソナゾイドを用いた。舌癌切除後、切除物の病理標本の超音波照射部位と非照射部位の抗腫瘍効果を比較した。

真菌株として *Candida albicans* ATCC18804を用いた。抗真菌薬として、アムホテリシンBをリン脂質二重膜内に封入したリポソーム製剤のアムビゾームを使用した。アムビゾームに超音波造影ガスを封入し、バブルアムビゾームを作製した。増殖能の評価として吸光度、CFUの計測を行い。発育阻止効果の評価としてYM寒天培地におけるコロニーの直径を計測した。

4. 研究成果

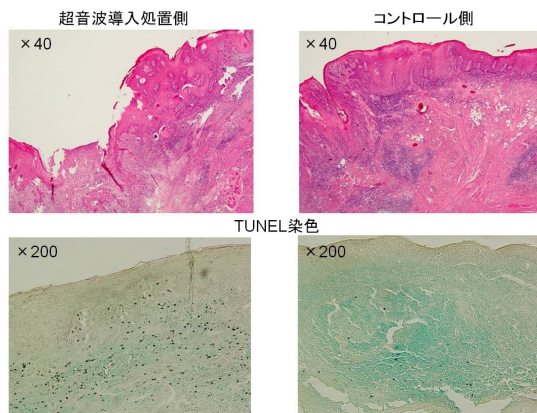
抗体修飾マイクロバブルと超音波の併用でCa9-22へのpVIVO1-GFP/LacZ導入効率が上昇した。また、低濃度のBLMでも抗体修飾マイクロバブル併用下の超音波照射群では著明な癌細胞増殖抑制効果が認められた。さらに、薬剤導入後の細胞にはアポトーシスが起きていることが確認できた。

抗体修飾マイクロバブルとソノポレーションの効果

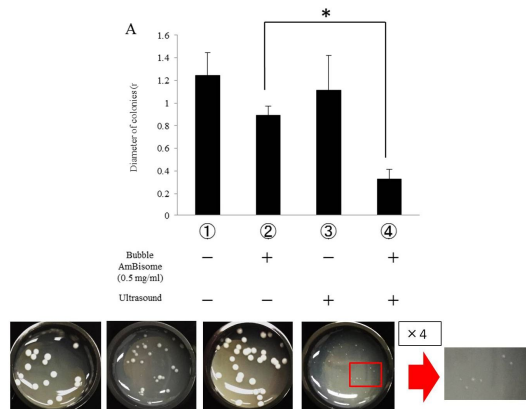


舌癌切除物の病理組織標本(HE, TUNEL染色)で評価した。術前化学療法の影響もあり、超音波非照射群でもTUNEL陽性細胞が認められたが、超音波照射群のほうがよりTUNEL陽性細胞を多く認める傾向にあった。

病理組織像



各実験とも、対照群に比してバブルアムピゾーム超音波併用群において著明な発育阻止効果が確認された。*In vitro*において、今回作成したバブルアムピゾームと超音波を併用することにより、真菌に対する効率的なDDSを構築できる可能性が示唆された。



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2件)

1. Tominaga, K., Habu, M., Iwanaga, K., Kodama, M., Tsurusima, H., Kokuryo, S., Miyamoto, I., Fukudome, Y., Yoshioka, I. : Maxillary single-jaw surgery combining Le Fort 1 and modified horseshoe osteotomies for the correction of maxillary excess. *Int J Oral Maxillofac Surg* 45(2) 194-199 2016 doi: 10.1016/j.ijom.2015.10.020.

2. Kokuryo, S., Habu, M., Miyamoto, I., Uehara, M., Kodama, M., Iwanaga, K., Yoshioka, I., Tominaga, K. : Predictability and accuracy of maxillary repositioning during bimaxillary surgery using a three-dimensional positioning technique. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 118(2) 187-93 2014 doi: 10.1016/j.oooo.2014.03.024.

[学会発表](計11件)

1. 山本雅史 岩永賢二郎 超音波併用アムホテリシン B 含有ナノバブル製剤によるカンジダ発育阻止効果について 第 14 回日本超音波治療研究会 高知 11月28日 2015

2. 岩永賢二郎 平林文香 高橋理 土生学 上原雅隆 笹栗正明 富永和宏: 口腔癌細胞株における抗癌剤内包ナノバブルと超音波の併用による致死活性効果の検討. 第 60 回日本口腔外科学会総会 10月16日~18日 名古屋 2015

3. 平林文香 岩永賢二郎 沖永敏則 有吉涉 西原達次: 抗体修飾バブルリポソームを活用した抗癌活性の作用機序の解明. 第 57

回歯科基礎医学会学術大会 新潟 9月11日~13日 2015

4. 山本雅史 沖永敏則 岩永賢二郎 有吉涉 西原達次: Sonoporation 法併用による Liposomal Amphotericin B バブル化製剤における真菌発育阻止の評価. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 新潟 9月11日~13日 2015

5. 山本雅史 沖永敏則 岩永賢二郎 高橋理 有吉涉 富永和宏 西原達次: C.albicans株におけるアムホテリシンB含有ナノバブルとソノポレーション法併用による発育阻止効果について. 第 75 回九州歯科学会総会 5月23日 北九州 2015

6. 山本雅史 岩永賢二郎 高橋理 土生学 上原雅隆 笹栗正明 富永和宏: C.albicans株におけるアムホテリシン B 含有バブルリポソームと超音波の併用による発育阻止効果について. 第 69 回日本口腔科学会総会 5月14日 大阪 2015.

7. 岩永賢二郎 高橋理 山本雅史 平林文香 上原雅隆 笹栗正明 宮本郁也 吉岡泉 富永和宏: 扁平上皮癌細胞株における超音波造影ガス封入ドキシルと超音波の併用による致死活性効果. 第 68 回日本口腔科学会総会 東京 5月8日 2014.

8. 高橋理 岩永賢二郎 土生学 上原雅隆 笹栗正明 富永和宏: ナノバブルと新規 HDAC 阻害剤を使用した新たな口腔癌治療法の検討. 第 32 回日本口腔腫瘍学会 1月札幌 2014.

9. Iwanaga, K., Nishihara, T. and Tominaga, K.: Local delivery system of cytotoxic agents to tumors by focused sonoporation. 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM). KItakyusyu, November 7 2013.

10. Nagao, F., Tsuzisawa, K., Iwanaga, K., Yoshioka, I., Nishihara, T. and Tominaga, K.: Anti-inflammatory effect of IL-1 receptor antagonist gene transfection into synovial cells using sonoporation. 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM). KItakyusyu, November 8 2013.

11. 岩永賢二郎 高橋理 山本雅史 富永和宏: 扁平上皮癌細胞株における抗癌剤封入ナノバブルと超音波の併用による致死活性効果. 第 58 回日本口腔外科学会総会 10月12日 福岡 2013.

[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0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

岩永賢二郎 (iwanaga kenjiro)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20448484

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()