

平成21年 4月 8日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592334  
 研究課題名（和文） 口腔癌のための新しい細胞阻害剤と薬剤デリバリーシステムを用いた治療法の開発  
 研究課題名（英文） A feasibility study for the treatment of oral cancer using a new drug delivery system and cell inhibitor  
 研究代表者  
 森川 秀広（MORIKAWA HIDEHIRO）  
 東北大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号：60302155

研究成果の概要：本研究では、超音波照射によるナノバブルの破壊に伴う標的腫瘍の細胞膜の浸透圧変化により抗腫瘍効果が期待できる細胞阻害剤をスクリーニングし、口腔癌の治療に有効な新しいドラッグデリバリー剤の開発を行うことを目的とする。これまで我々は、様々な阻害剤の中からこれまでの文献等を参考にして、合計約 200 種類の阻害剤を選定し、これを 98 プレートに分与して、阻害剤プレートを作成した。さらに、腫瘍細胞を培養したプレート内で様々な条件下で超音波照射を行い、超音波照射した細胞を阻害剤プレートに播種し、細胞毒性を MTT アッセイで評価し、ナノバブルと超音波を用いたドラッグデリバリーシステムに応用可能と思われる阻害剤を選択した。その結果、このデリバリーシステムに有用と思われる細胞阻害剤として、3 種類の阻害剤（特許申請準備中）を選択することができた。しかし、これらの細胞阻害剤を臨床応用するまでには、膨大な前臨床実験が必要である。そこで、本研究においては、ナノバブルと超音波を用いた分子導入法を用いた場合のこれらの細胞阻害と従来の抗腫瘍剤の抗腫瘍効果や腫瘍標的性を効率的かつ精確に比較検討できる検証システムの開発を試みた。我々は、検証システムとして、ルシフェラーゼ発現腫瘍を用いて *in vivo* 発光イメージングシステムを用いる検証システムとナノバブルを超音波造影剤として用いた高周波超音波三次元イメージングシステムを用いた検証システムの有効性を検討した。その結果、これらの検証システムを用いることにより、生体内での光学顕微鏡レベルの腫瘍微小血管構築画像をリアルタイムで構築することが可能となり、従来の抗腫瘍剤と上記細胞阻害剤との抗腫瘍効果や腫瘍標的性の比較検討が容易にかつ精確にできるようになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：(1) 口腔癌 (2) ナノバブル (3) 超音波 (4) 細胞阻害剤 (5) 分子導入  
 (6) デリバリーシステム (7) 癌治療 (8) ナノメディシン

## 1. 研究開始当初の背景

ナノバブルと超音波を利用した分子導入法の問題点は分子導入効率の低さにあると言える。導入効率を高めるためには、ナノバブルの膜に組織標的性の機能を持たせること、およびキャビテーション気泡からの衝撃波の作用で変形し一過性の透過性を示す細胞膜を容易に拡散し得る外来分子構造の設計が重要と考えられる。

これまで、東北大学大学院医工学研究科治療医工学講座分子デリバリーシステム研究分野との共同研究の結果、口腔癌の治療に応用可能な以下の重要な成果を得ることができた。

- (1) 内部にガスと液体を含むリポゾームの作成技術を樹立した。このことにより、超音波造影性を有するドラッグデリバリー型ナノバブルの作製が可能になった。
- (2) ミセル型バブル、二重膜構造のリポソーム型バブル、市販のアルブミンマイクロバブルを使い遺伝子発現活性を調べた場合、リポゾームは3者のなかで導入効率が一番高く、これはバブル原液に含まれるバブルの数、すわちキャビテーション核の数に依存すること、また、膜のゼータ電位、粒度分布には依存しないことが明らかになった。
- (3) 超音波イメージング装置（最高周波数80MHz）を用いることにより、血管内を流れる直径400nmの一個一個のナノバブルの動きが可視化されることを見出した。これは波長の4乗に逆比例するというレイリーの散乱理論がナノレベルで顕著に現れた現象であり、診断用超音波装置（周波数3.5MHz）ではこれまで報告されていない新しい極微の現象である。光学顕微鏡の空間分解能では200nm以下の物体を認識することは不可能であるが、超音波散乱を利用することで200nm以下のガス気泡の挙動が捉えられることを意味している。
- (4) 腫瘍血管の血管透過性は、通常の血管よりも高く、直径200nm以下の高分子が血管から漏出し血管周囲に滞在する、いわゆるEPR効果（Enhanced Permeability and Retention Effect）が認められ、バブル漏出・滞留を基本とした新生血管を対象とする分子導入法が確立できるものと

判断できた。

## 2. 研究の目的

急速に進行する高齢者社会において、様々な基礎疾患を有する高齢者の口腔癌患者が急増している。

しかしながら、現在、口腔癌患者に用いられている抗癌剤は、腎、肝、骨髄機能などへの副作用が大きく、基礎疾患を有する高齢者への使用は著しく制限されている。

一方、現時点では抗腫瘍剤としては用いられていない様々な細胞阻害剤が知られており、これらの細胞阻害剤を癌治療に応用しようとする試みが為されている。これらの細胞阻害剤を抗腫瘍剤として用いるための要件としては、標的となる腫瘍細胞に選択的に薬剤が取り込まれる必要があり、標的腫瘍細胞に選択的に薬剤を取り込ませるデリバリーシステムがあれば、細胞毒性が少ない細胞阻害剤でも低容量で有効な、副作用が少ない、従来の抗腫瘍剤に耐性型の腫瘍細胞にも有効な新しい癌化学療法システムを開発できるかと思う。

研究代表者は、これまで口腔外科専門医として口腔癌患者の診療に携わる一方で、ナノバブルと超音波の癌治療への応用を研究テーマにしている東北大学大学院医工学研究科との共同研究を行ってきた。超音波とナノバブルを使った分子導入法では、気泡が超音波照射により破壊される時に生じる衝撃波や液体ジェットなどの衝撃圧を利用して、細胞膜に一過性の浸透圧変化を誘起し、エンドサイトーシスを介さずに、外因性分子を細胞質に直接導入することを基本原理としている。したがって、分子導入効率の改善では、浸透圧変化した細胞膜を容易に通過し得る外来分子の設計が有用になる。

本研究では、超音波照射によるナノバブルの破壊に伴う標的腫瘍の細胞膜の浸透圧変化により膜透過性が増大する細胞阻害剤をスクリーニングし、薬剤の治療効果の検証を行うとともに、この検証結果から、超音波とナノバブルを用いた分子導入に適した分子構造を検討し、癌治療に有効な新しいドラッグデリバリー剤の開発を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞阻害剤のスクリーニング

細胞阻害剤のスクリーニングを目指し、以下2つに大別される阻害剤の各項目からそれぞれ過去の文献等を参考に合計200選定し、これを96プレートに分与して、阻害

剤プレートを作成した。

①キナーゼ、フォスファターゼ阻害剤（プロテインキナーゼ、カルモジュリンキナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ[MAPキナーゼ]、チロシンキナーゼ、Akt[PKB]、ファスファチジルイノシトール3キナーゼ、プロテインフォスファターゼ）

②プロテアーゼ阻害剤（カスパーゼ、細胞外マトリックスメタロプロテアーゼ、プロテアソーム、プロテアーゼ、シクロオキシゲナーゼ、アポトーシス、血管新生、成長因子[サイトカイン、免疫調整、ホルモン関連]、細胞分裂[細胞骨格]、細胞接着、細胞周期、ポリメラーゼ、DNA[RNA]、Gたんぱく質関連、タンパク質修飾、核輸送、カルシウムシグナル関連、神経性関連、イオノフォア[イオンチャンネル、調製剤]、脂肪[脂肪酸、リン脂質関連]、ホスホジエステラーゼ、酸化ストレス、NO[NOS一酸化窒素関連]、セカンドメッセンジャー関連、糖プロセッシング関連）

#### (2) 細胞株

波形特性に対する細胞株の感受性の違いを比較するために、付着細胞に、Colon26マウス結腸がん細胞、EMT6マウス乳がん細胞、浮遊細胞にC1498マウス白血病細胞、両特性をもつものに3LLマウス・ルイス肺がん細胞を使用した。

#### (3) 超音波造影性リポゾーム

各組成と平均直径は  
Distearoyl-Phosphocholine (DPPC)+  
6%Distearoyl Phosphoethanolamine  
(DSPE)-PEG-OMe (平均直径 170nm) および  
DSPC + 6 mol% DSPE-PEG2K-OMe  
(平均直径 120nm) である。ナノバブルはロータリーエバポレーターで作成し、バブルの粒度分布は粒度分布測定装置で測定した。

#### (4) 超音波照射と阻害剤暴露

超音波は平面超音波で周波数は1MHzとした。細胞カルチャープレート内でウェル底部から超音波を入射させ、これと培養液の自由界面で反射する反射波とを組合わせて重畳超音波を作成した。Duty比、音圧強さ、培養液の体積を変えることで、重畳超音波の特性を変えることができた。細胞は重畳超音波の腹と節の位置に配置し、超音波照射後の細胞をトリプシン処理して、前述の阻害剤プレートに細胞を播種した。

#### (5) 細胞毒性の評価

24時間後、細胞毒性をMTTアッセイで

評価し、もっと細胞生存率が低い阻害剤を選定した。

(6) 抗腫瘍効果の検証システムの開発  
細胞阻害剤を臨床応用するまでには、膨大な前臨床実験が必要である。そこで、本研究においては、ナノバブルと超音波を用いた分子導入法を用いた場合のこれらの細胞阻害と従来の抗腫瘍剤の抗腫瘍効果や腫瘍標的性を効率的かつ精確に比較検討できる検証システムの開発を試みた。我々は、検証システムとして、ルシフェラーゼ発現腫瘍を用いて *in vivo* 発光イメージングシステムを用いる検証システムとナノバブルを超音波造影剤として用いた高周波超音波三次元イメージングシステムを用いた検証システムの有効性を検討した。

#### 4. 研究成果

本研究では、超音波照射によるナノバブルの破壊に伴う標的腫瘍の細胞膜の浸透圧変化により膜透過性が増大する細胞阻害剤をスクリーニングし、超音波とナノバブルを用いた分子導入に適した口腔癌の治療に有効な新しいドラッグデリバリー剤の開発を行うことを目的とする。これまで我々は、様々な阻害剤の中からこれまでの文献等を参考にして、合計約 200 種類の阻害剤を選定し、これを 98 プレートに分与して、阻害剤プレートを作成した。さらに、腫瘍細胞を培養したプレート内で様々な条件下で超音波照射を行い、超音波照射した細胞を阻害剤プレートに播種し、細胞毒性を MTT アッセイで評価し、ナノバブルと超音波を用いたドラッグデリバリーシステムに応用可能と思われる阻害剤を選択した。その結果、このデリバリーシステムに有用と思われる細胞阻害剤として、3 種類の阻害剤（特許申請準備中）を選択することができた。しかし、これらの細胞阻害剤を臨床応用するまでには、膨大な前臨床実験が必要である。そこで、本研究においては、ナノバブルと超音波を用いた分子導入法を用いた場合のこれらの細胞阻害と従来の抗腫瘍剤の抗腫瘍効果や腫瘍標的性を効率的かつ精確に比較検討できる検証システムの開発を試みた。我々は、検証システムとして、ルシフェラーゼ発現腫瘍を用いて *in vivo* 発光イメージングシステムを用いる検証システムとナノバブルを超音波造影剤として用いた高周波超音波三次元イメージングシステムを用いた検証システムの有効性を検討した。その結果、これらの検証システムを用いることにより、生体内での光学顕微鏡レベルの腫瘍微小血管構築画像をリアルタイムで構築することが可能となり、従来の抗腫瘍剤と上記細胞阻害剤との

抗腫瘍効果や腫瘍標的性の比較検討が容易にかつ精確にできるようになった。

#### 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 2 件)

- ① Yukiko Watanabe, Atsuko Aoi, Sachiko Horie, Noriko Tomita, Shiro Mori, Hidehiro Morikawa, Yasuhiro Matsumura, Georges Vassaux, Tetsuya Kodama: Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. Cancer Science 99(12): 2525-2531, 2008. 査読あり
- ② 小玉哲也, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 佐久間基成, 陳鋭, 大木宏介, 森川秀広, 森土朗, 小野栄夫: 高周波超音波イメージングシステムによるシスプラチン抗腫瘍効果の定量化 第 46 回日本生体医工学会大会プログラム・抄録集 277-277, 2008. 査読なし

[学会発表] (計 15 件)

- ① Tomita N, Horie S, Oosawa F, Rui C, Watanabe Y, Morikawa H, Ohki K, Fukumoto M, Mori S, Kodama T. Development of diagnostic imaging system for regional lymph node micrometastasis with high-frequency ultrasound. 2008 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS). Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China, November 2-5, 2008.
- ② 富田典子, 堀江佐知子, 大澤ふき, 陳鋭, 渡邊夕紀子, 森川秀広, 大木宏介, 森土朗, 小玉哲也: 高周波超音波イメージングシステムを用いた所属リンパ節転移画像診断システムの開発 (優 S03-02-4) (優 PS03-21-1). 第 46 回日本癌治療学会総会. 2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日 (名古屋国際会議場).
- ③ 富田典子, 堀江佐知子, 大澤ふき, 陳鋭, 渡邊夕紀子, 森川秀広, 大木宏介, 福本学, 森土朗, 小玉哲也: 高周波超音波を利用した新しいリンパ節内微小転移診断システムの開発(EW11-3). 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008 年 10 月 28 日-30 日 (名古屋国際会議場).
- ④ 大木宏介, 森土朗, 宮下 仁, 川村 仁, 森川秀広: ナノバブルと超音波を用いた腫瘍血管造影法による口腔癌診断システムモ

デルの開発(1-P-012). 第 53 回(社)日本口腔外科学総会. 2008 年 10 月 20-21 日 徳島

- ⑤ 宮下 仁, 森土朗, 大木宏介, 川村 仁, 森川秀広: ナノバブル超音波を用いた抗腫瘍剤および抗腫瘍分子の導入による新たな癌治療法の開発(1-P-013). 第 53 回(社)日本口腔外科学総会. 2008 年 10 月 20-21 日 徳島
- ⑥ 森土朗, 大木宏介, 宮下 仁, 川村 仁, 森川秀広: ナノバブルと超音波を用いた口腔癌の治療のための新しい画像診断・分子導入システム(2-B-1-4). 第 53 回(社)日本口腔外科学総会. 2008 年 10 月 20-21 日 徳島
- ⑦ 森土朗, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 陳鋭, 大澤ふき, 佐久間基成, 大木宏介, 宮下 仁, 川村 仁, 森川秀広, 小玉哲也: 口腔癌の診断・治療のためのナノバブルと超音波を用いた画像診断・分子導入システムの開発(081). 第 32 回日本頭頸部癌学会. 2008 年 6 月 12-13 日 東京
- ⑧ 大木宏介, 森土朗, 堀江佐知子, 富田典子, 渡邊夕紀子, 陳鋭, 大澤ふき, 佐久間基成, 宮下 仁, 川村 仁, 森川秀広, 小玉哲也: ナノバブルを用いた腫瘍血管造影法による口腔癌早期診断システムモデルの開発(083). 第 32 回日本頭頸部癌学会. 2008 年 6 月 12-13 日 東京
- ⑨ 宮下 仁, 森土朗, 富田典子, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 陳鋭, 大澤ふき, 佐久間基成, 大木宏介, 川村 仁, 森川秀広, 小玉哲也: ナノバブル超音波システムを用いた抗腫瘍剤および抗腫瘍分子の導入による新たな癌治療法の開発(016). 第 32 回日本頭頸部癌学会. 2008 年 6 月 12-13 日 東京
- ⑩ 小玉哲也, 渡邊夕紀子, 堀江佐知子, 富田典子, 大澤ふき, 佐久間基成, 陳鋭, 大木宏介, 森川秀広, 森土朗, 小野栄夫: 高周波超音波イメージングシステムによるシスプラチン抗腫瘍効果の定量化 第 46 回日本生体医工学会大会プログラム・抄録集 277 頁. 2008 年 05 月 08 日-10 日 (神戸国際会議場).
- ⑪ 富田典子, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 大澤ふき, 佐久間基成, 大木宏介, 森川秀広, 森土朗, 小野栄夫, 小玉哲也: 高解像度超音波イメージングシステムを用いたシスプラチンによる抗腫瘍効果の定量化(35-24). 日本超音波医学会 東北地方会第 35 回学術集会. 2008 年 03 月 23 日 (仙台市情報・産業プラザ アエル 5 階).
- ⑫ Noriko Tomita, S Horie, Y Watanabe, F

Ooswa, M Sakuma, R Chen, K Ohki, H Morikawa, S Mori, M Ono, T Kodama: Evaluation of cisplatin-induced antitumor effect with contrast-enhanced high-frequency ultrasound. 11th International Symposium on Advanced Biomedical Ultrasound. March 7, 2008. Sendai, Japan

- ⑬ Tomita N, Horie S, Watanabe Y, Funamoto K, Hayase T, Oki K, Morikawa H, Ono M, Mori S, Kodama T. Three-dimensional image of intratumoral neovascular constructed with high-frequency contrast-enhanced micro-ultrasound. SMIT 2007, Sendai, 20-22 November, 2007.
- ⑭ 堀江佐知子, 富田典子, 渡邊夕紀子, 大木宏介, 森川秀広, 森 士朗, 小野栄夫, 小玉哲也: 高周波超音波画像診断による抗腫瘍効果の評価(P-805) 第 66 回 日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3, 4, 5 日 横浜
- ⑮ 富田典子, 堀江佐知子, 渡邊夕紀子, 船本健一, 早瀬敏幸, 大木宏介, 森川秀広, 小野栄夫, 森 士朗, 小玉哲也: ナノバブルと高周波超音波による腫瘍内血管の三次元画像の構築(P-808) 第 66 回 日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3, 4, 5 日 横浜

[その他: 受賞] (計 2 件)

- ① ゴールドリボン賞受賞  
大木宏介, 森士朗, 宮下仁, 川村仁, 森川秀広. ナノバブルと超音波を用いた腫瘍血管造影法による口腔癌診断システムモデルの開発. 第 53 回日本口腔外科学会総会. 日本口腔外科学会雑誌 54 号 139 頁. 2008 年 10 月 20 日-21 日(アスティとくしま).
- ② 宮下仁, 森士朗, 大木宏介, 森川秀広. ナノバブルと超音波を用いた抗癌剤および抗腫瘍分子導入による新たな癌治療法の開発. 第 53 回日本口腔外科学会総会. 日本口腔外科学会雑誌 54 号 140 頁. 2008 年 10 月 20 日-21 日(アスティとくしま).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森川 秀広 (MORIKAWA HIDEHIRO)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 60302155

### (2) 連携研究者

森 士朗 (MORI SHIRO)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号: 80230069

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号: 40271986