

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22684

研究課題名（和文）泌尿器腫瘍の診断・治療のための生体膜修飾で拓くナノキャリアのプラットフォーム作製

研究課題名（英文）Establishment of nanocarrier platform by cell membrane modification for diagnosis and treatment of urological cancers

研究代表者

林 昭伸（Hayashi, Akinobu）

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10609043

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ナノマテリアル、特に超常磁性体酸化鉄(SPIO)を利用した治療法の提案を背景に、泌尿器腫瘍（前立腺癌、尿路上皮癌、腎癌）細胞などの生体膜（細胞膜）を利用し、ナノ粒子をコアとした診断・治療用新規ナノキャリアの作製を目指した。（1）破碎した細胞膜の自己集合を利用したナノキャリアの合成、（2）細胞本来が有する生理学的プロセスを利用した方法（ナノ粒子曝露により細胞に取り込まれたナノ粒子がexosomeという形で排出）を試みた。手法が困難であるが、（1）の方法で細胞膜が付着したナノ粒子の作製に成功し、細胞内への取り入れ増大の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ粒子をコアとした診断・治療用新規ナノキャリアが作製できたことは、抗癌剤あるいは温熱療法との併用による治療法への応用に加えて、抗癌剤あるいは核酸医薬品を癌細胞特異的に導入でき、かつ血中滞在期間の延長など特徴を有したナノキャリア作製につながる。これにより、新たながん診断・治療への応用の可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In the background of a proposal for a therapeutic method using nanomaterials, especially superparamagnetic iron oxide (SPIO), we aimed to fabricate novel nanocarriers for diagnosis and treatment with nanoparticles as the core by utilizing biological membranes (cell membranes) of urological tumor cells (prostate cancer, urothelial carcinoma, renal cancer) and other cells. We attempted (1) synthesis of nanocarriers using self-assembly of ruptured cell membranes and (2) method using physiological processes inherent to cells (nanoparticles taken into cells by exposure to nanoparticles are discharged in the form of exosomes). Although the methods being difficult, we succeeded in producing nanoparticles covered by cell membranes and found the possibility of increasing cellular uptake.

研究分野：病理学

キーワード：前立腺癌 ナノ粒子 自己集合

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、ナノマテリアル、特に超常磁性体酸化鉄(SPIO) (Resovist として肝腫瘍の造影剤として利用されている SPIO もある) の細胞への影響や抗癌剤あるいは温熱療法との併用による治療法の提案など行ってきた。最近、赤血球の細胞膜を利用したマイクロ粒子を作製し、マウスの血中での滞在性の向上を示した。癌細胞膜で覆われたナノ粒子が通常のナノ粒子よりも癌特異的取り込みが増加したと報告された [*Theranostics*, 7(10), 2575, 2017]

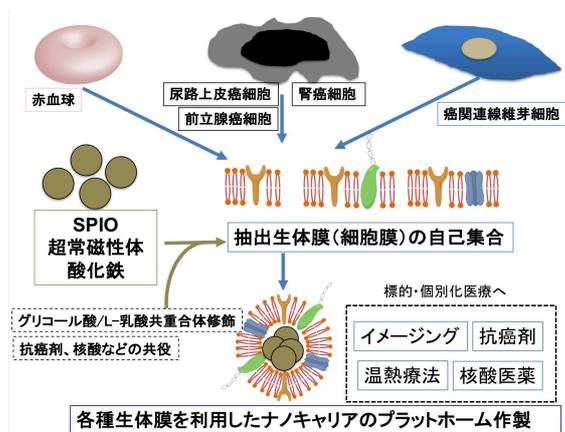


図1 本研究の提案内容

### 2. 研究の目的

本研究では、泌尿器腫瘍(前立腺癌、尿路上皮癌、腎癌)細胞などの生体膜(細胞膜)を利用し、SPIOをコアとした診断・治療用新規ナノキャリアを作製する(図1)。癌細胞や癌関連線維芽細胞、腫瘍血管内皮細胞などの腫瘍微小環境を構成する細胞に対して(標的:腫瘍細胞および腫瘍微小環境)、抗癌剤あるいは核酸医薬品を特異的に導入でき、かつ血中滞在期間の延長など特徴を有したナノキャリア作製およびその作製方法樹立を目指す(図1)。

### 3. 研究の方法

1) Extrusion approach: 各種細胞株からの生体膜(細胞膜)の調整: 尿路上皮癌(T24)に対して、extrusion approach (低浸透圧にて、細胞膜を抽出)を用いて、抽出した細胞膜はself-assembly (自己集合)にて再構築する。ナノキャリアのサイズ、細胞膜の被覆状態、細胞膜の主要な表面タンパク発現の解析より、自己集合の条件を決定する。このナノキャリアを *in vitro/in vitro* 系で、取り込み、細胞応答、細胞内動態を解析する。特に腫瘍ごとの細胞膜の調整、self-assemblyの条件の確定、ナノキャリアのサイズのコントロール、腫瘍特異的な取り込みの確認を電子顕微鏡あるいはフローサイトメーターを利用しながら行う。

2) Exosome approach: T24細胞に80nmの金ナノ粒子を暴露し、培養上清から exosome を回収して、電子顕微鏡にて、細胞内及び exosome 内の金ナノ粒子の確認を行う。

### 4. 研究成果および評価

1) Extrusion approach: 尿路上皮癌(T24)より細胞膜を回収し、細胞膜の回収方法を試行錯誤の結果、凍結法を用いて、細胞膜の破碎、回収を行い、extrusion approachを用いて、尿路上皮癌の細胞膜を被覆した金ナノ粒子を作製する事が出来た。同方法の再確認及び同粒子の尿路上記癌細胞への取り込みを非修飾粒子と比較検討し、有意に取り込みが上昇していることを明らかにした(図2、3)。手順は煩雑であるが、ナノ粒子上に細胞膜が付着し、細胞への取り込みが増加し、新しいナノキャリアの可能性を見出した。

2) Exosome approach: 細胞内の金ナノ粒子が確認された。また、金ナノ粒子の曝露により exosome の放出は高まるも、exosome 内の金ナノ粒子は確認できなかった。生理学的プロセスを利

用する方法は有効でないと判定した。

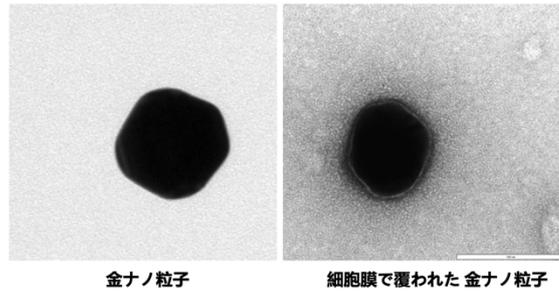


図2 金ナノ粒子と細胞膜で覆われた金ナノ粒子の電子顕微鏡像

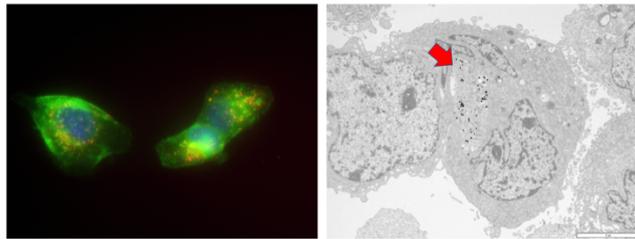


図3と細胞膜で覆われた金ナノ粒子の細胞内局在

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kim Yelee, Park Jun Bum, Fukuda Junji, Watanabe Masatoshi, Chun Yang-Sook	4. 巻 13
2. 論文標題 The Effect of Neddylation Blockade on Slug-Dependent Cancer Cell Migration Is Regulated by p53 Mutation Status	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 531 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13030531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sugioka Kyoko, Hayashi Akinobu, Ichishi Masako, Sugimoto Yasuko, Habe Koji, Yamanaka Keiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Three Cases of Lymphocytic Infiltration of the Eyelid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dermatopathology	6. 最初と最後の頁 124 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/dermatopathology8020018	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 渡邊昌俊	4. 巻 40(3)
2. 論文標題 病理から境界領域へー医工連携への招待ー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 287-292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Koichiro, Shimabukuro Masaya, Kishida Ryo, Tsuchiya Akira, Ishikawa Kunio	4. 巻 2
2. 論文標題 Honeycomb scaffolds capable of achieving barrier membrane-free guided bone regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Advances	6. 最初と最後の頁 7638 ~ 7649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1MA00698C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirokawa Yoshifumi S., Kanayama Kazuki, Kagaya Michiko, Shimojo Naoshi, Uchida Katsunori, Imai Hiroshi, Ishii Kenichiro, Watanabe Masatoshi	4. 巻 117
2. 論文標題 SOX11-induced decrease in vimentin and an increase in prostate cancer cell migration attributed to cofilin activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Molecular Pathology	6. 最初と最後の頁 104542 ~ 104542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexmp.2020.104542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Kenichiro, Nakagawa Yasuhisa, Matsuda Chise, Katoh Daisuke, Ichishi Masako, Shirai Taku, Hirokawa Yoshifumi, Fujiwara Masaya, Sugimura Yoshiki, Watanabe Masatoshi	4. 巻 2021
2. 論文標題 Heterogeneous induction of an invasive phenotype in prostate cancer cells by coculturing with patient derived fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.29893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Al Mahmud Md. Rasel, Ishii Kenichiro, Bernal Lozano Cristina, Delgado Sainz Irene, Toi Masakazu, Akamatsu Shusuke, Fukumoto Manabu, Watanabe Masatoshi, Takeda Shunichi, Cortes Ledesma Felipe, Sasanuma Hiroyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 TDP2 suppresses genomic instability induced by androgens in the epithelial cells of prostate glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 450 ~ 465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim Hyungjin, Roth Daniel, Isoe Yasuhiro, Hayashi Koichiro, Mochizuki Chihiro, Kalkum Markus, Nakamura Michihiro	4. 巻 199
2. 論文標題 Protein corona components of polyethylene glycol-conjugated organosilica nanoparticles modulates macrophage uptake	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 111527 ~ 111527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2020.111527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大塩里紗、中川泰久、渡邊昌俊、飯島一智
2. 発表標題 磁性体酸化鉄ナノ粒子の前立腺癌細胞に対する抗腫瘍メカニズムの解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Watanabe Masatoshi
2. 発表標題 Challenges in the theranostics application of nanoparticles in prostate cancer
3. 学会等名 Science&Technology Today: Flow cytometry an important Tool in Biomedical Sciences, India (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Watanabe Masatoshi
2. 発表標題 The application of nano material in anti-tumor drugs
3. 学会等名 The Third Session of China-ASEAN International Cancer Precision Medicine Conference, China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊昌俊
2. 発表標題 腫瘍に対するバイオミメティックスナノマテリアルのプラットフォーム構築
3. 学会等名 第9回日本泌尿器病理研究会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊昌俊
2. 発表標題 酸化鉄ナノ粒子はドキソルビシンの前立腺癌細胞への細胞毒性に対してパラドキシカルな影響を示す
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塩里沙、中川泰久、渡邊昌俊、飯島一智
2. 発表標題 磁性体ナノ粒子の抗前立腺癌活性におけるmiRNA発現の解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林 幸彦朗 (Hayashi Koichiro)  (80580886)	九州大学・歯学研究院・准教授  (17102)	
研究分担者	渡邊 昌俊 (Watanabe Masatoshi)  (90273383)	三重大学・医学系研究科・教授  (14101)	
研究分担者	石井 健一郎 (Ishii Kenichiro)  (90397513)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト  (14101)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------