

令和元年5月27日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10169

研究課題名(和文)腫瘍特異的リンパ球をドラッグキャリアに用いた皮膚悪性腫瘍に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of new therapy for skin cancer with drug carried tumor specific lymphocytes

研究代表者

浅井 純 (Asai, Jun)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50438222

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)：まず、抗がん剤含有ナノ粒子を作成した。抗がん剤にはドセタキセル、ナノ粒子にはPLGAを選択した。ドセタキセルとPLGAを有機溶媒に融解させ、界面活性剤水溶液中でエマルジョン化した。リンパ球へのナノ粒子取り込みをクマリン含有ナノ粒子で代用し、共焦点レーザー顕微鏡にて検討したところ、リンパ球内にクマリンの取り込みが確認できた。しかしドセタキセルPLGAナノ粒子含有リンパ球を作成し、血管肉腫細胞と共培養して抗腫瘍効果を検討したところ、細胞増殖試験、フローサイトメトリーにて有意な細胞増殖抑制効果は得られず、リンパ球への薬剤の取り込み効率をさらに上げる必要があると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までにリンパ球をドラッグデリバリーシステムに応用するという試みはされておらず、本研究は、リンパ球をドラッグキャリアとして利用する初の試みであり、有意な抗腫瘍効果は認められなかったものの、リンパ球への薬剤取り込みが確認出来たことより、今後の新たなリンパ球を用いたドラッグデリバリーシステムの可能性を見出した研究であるといえる。

研究成果の概要(英文)：First, we prepared docetaxel or coumarin-loaded PLGA nanoparticles(DOC-NP, FL-NP). nanoparticles were prepared by an emulsion solvent evaporation method. In vitro cellular uptake of FL-NP by lymphocytes was confirmed with confocal laser microscope. The anti-tumor effects of DOC-NP on angiosarcoma cells were evaluated by proliferation assay and FACS analysis, however, DOC-NP did not show significant anti-tumor effects. It would be because low uptake of docetaxel into lymphocytes. Further device would be necessary to improve drug uptake to lymphocytes.

研究分野：皮膚科

キーワード：ナノ粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞が虚血部位や炎症部位、さらには悪性腫瘍周囲に集積する性質を有することが明らかになり、幹細胞を抗癌剤や抗腫瘍サイトカインの運び手として用いた新しいDDSが注目を集めている。中でも脂肪由来幹細胞 (adipose derived stem cell: AdSC) は、脂肪組織の中に含まれる間葉系幹細胞であり、AdSCがいくつかの悪性腫瘍において他の幹細胞と比較して腫瘍周囲により集積しやすい性質や腫瘍抑制効果があることが報告されるようになり、新たな悪性腫瘍の治療法の一つとして研究、開発が進んでいる。(Takahara K, et al, *Biochem Biophys Res Commun*.2014 18;446(4):1102-7)

本研究者は、AdSCの抗腫瘍効果や腫瘍に集積する性質を利用し、抗癌剤含有PLGAナノ粒子をAdSCに取り込ませて腫瘍部位に局所的に作用させることを目的に、新たなcell-mediate drug delivery system (CmDDS)を用いた皮膚悪性黒色腫に対する新規治療法の開発を行ったが、AdSCが腫瘍周囲以外に肺組織へも浸潤し、期待通りの抗腫瘍効果を得ることが出来なかった。そこで本研究では、AdSCよりも腫瘍特異的に集積することが考えられる腫瘍特異的リンパ球に着目し、腫瘍特異的リンパ球を新しいドラッグキャリアとして利用した新たな治療法の開発を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍に対する免疫応答で活性化したリンパ球が腫瘍特異的に浸潤することを利用して、腫瘍特異的リンパ球をドラッグキャリアとする新しい cell-mediate drug delivery system による皮膚悪性腫瘍治療の開発を行うことが目的である。具体的には 抗がん剤含有 PLGA ナノ粒子の作成、作成した抗がん剤含有ナノ粒子の腫瘍特異的リンパ球への取り込み、in vitroにおける抗がん剤含有PLGAナノ粒子取り込み腫瘍特異的リンパ球の抗腫瘍効果の検討、といった課題に関する検討を行うことによって上記を達成することを目指している。

3. 研究の方法

1. リンパ球に取り込まれやすい抗がん剤含有 PLGA ナノ粒子の調整:抗がん剤含有 PLGA ナノ粒子は薬剤および PLGA を有機溶媒に溶解させ、界面活性剤水輸液中でエマルジョンにすることによって作成した。粒子中の薬剤含有量は高速液体クロマトグラフィを用いて測定した。リンパ球への取り込みについては、抗がん剤と同様の化学特性をもつ蛍光物質を含有するナノ粒子を代替として用い、PLGA ナノ粒子とリンパ球との共培養後、視覚化して評価した。評価には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

2. PLGA ナノ粒子取り込みリンパ球による抗腫瘍効果の検討:リンパ球からの徐放について、まず抗がん剤含有 PLGA ナノ粒子を取り込ませたあと、経時的に培養上清を採取して HPLC にて薬剤量の測定を行った。また培養上清、もしくは抗がん剤含有ナノ粒子取り込みリンパ球と腫瘍細胞とを共培養し、細胞増殖試験やフローサイトメトリーにて抗腫瘍効果を検討した。

4. 研究成果

本研究は、腫瘍に対する免疫応答で活性化したリンパ球が腫瘍特異的に腫瘍部位に浸潤することを利用して、腫瘍特異的リンパ球をドラッグキャリアとする新しい cell-mediated drug delivery system による皮膚悪性腫瘍治療の開発を行うことを目的として実験を行った。

まず、リンパ球に取り込ません抗がん剤含有ナノ粒子を作成した。抗がん剤にはドセタキセルを、ナノ粒子にはPLGAを選択した。薬剤およびPLGAを有機溶媒に誘拐させ、界面活性剤水溶液中でエマルジョン化した。続いて、抗がん剤と同様の化学的特性をもつ蛍光物質(クマリン)を含有したナノ粒子を代替とし、PLGAナノ粒子とリンパ球との共培養によりその取り込みを蛍光顕微鏡ならびに共焦点レーザー顕微鏡にて検討したところ、リンパ球内にクマリンの取り込みが確認できた。

次に、ドセタキセル含有PLGA粒子をリンパ球と共培養させ、ドセタキセルのリンパ球への取り込みを検討したところ、ナノ粒子の取り込み量が少なく、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による定量評価は困難であった。現状ではHPLCより高感度な薬剤検出方法がなくリンパ球に取

り込まれたドセタキセル含有量の評価は今後の課題である。

上記で作成したドセタキセル含有リンパ球を用いて血管肉腫に対する治療効果を検討するために、ドセタキセル含有リンパ球と血管肉腫細胞株との共培養を行い、細胞増殖試験、フローサイトメトリーを行ったが、優位な細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果は認められなかった。この結果はリンパ球に取り込まれたドセタキセルの量が少なかったためかリンパ球からの放出が出来なかったためであると考えられた。

結論として、リンパ球をドラッグキャリアとする drug delivery system を確立するためにはリンパ球への薬剤の取り込み効率をさらに上げていく必要があると考えた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)(すべて査読有り)

1. Kanemaru M, Asai J, Jo JI, Arita T, Kawai Onishi M, Tsutsumi M, Wada M, Tabata Y, Katoh N. Nanoparticle-mediated local delivery of pioglitazone attenuates bleomycin-induced skin fibrosis. *J Dermatol Sci*. 2019 Jan;93(1):41-49. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.11.012.
2. Fujisawa Y, Funakoshi T, Nakamura Y, Ishii M, Asai J, Shimauchi S, Fujii K, Fujimoto M, Katoh N, Ihn H. Nation-wide survey of advanced non-melanoma skin cancers treated at dermatology department in Japan. *J Dermatol Sci*. 2018 Dec; 92(3): 230-236. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.10.004.
3. Kataoka Y, Wada M, Bito M, Asai J, Katoh N. Subcutaneous nodules at progesterone injection sites after fertility treatment. *Australas J Dermatol*. 2018 Sep 23. doi: 10.1111/ajd.12929.
4. Hioki M, Ohshita A, Yoshida S, Kanehisa F, Katoh N, Asai J. Pelvic lymph node metastasis in extramammary Paget disease of the scrotum without inguinal lymph node metastasis. *Australas J Dermatol*. 2018 Nov 18. doi: 10.1111/ajd.12959.
5. Krishnan H, Rayes J, Miyashita T, Ishii G, Retzbach EP, Sheehan SA, Takemoto A, Chang YW, Yoneda K, Asai J, Jensen L, Chalise L, Natsume A, Goldberg GS. Podoplanin - an emerging cancer biomarker and therapeutic target. *Cancer Sci*. 2018 Mar 25. doi: 10.1111/cas.13580.
6. Arita T, Nomiyama T, Asai J, Katoh N. Successful treatment of refractory alopecia universalis by persuading a patient not to sleep with her dog. *Allergol Int*. 2018 Jan;67(1):156-157. doi: 10.1016/j.alit.2017.06.011.
7. Suzuki G, Yamazaki H, Aibe N, Masui K, Sasaki N, Shimizu D, Kimoto T, Asai J, Wada M, Komori S, Katoh N, Yamada K. Clinical Usefulness of the Platelet-to Lymphocyte Ratio in Patients with Angiosarcoma of the Face and Scalp. *Int J Mol Sci* 2017 18(11):2402. doi: 10.3390/ijms18112402.
8. Arita T, Asai J, Taura M, Wada M, Takenaka H, Miyashita A, Katoh N. Squamous cell carcinoma of neck metastasized to the lung and cervical lymph nodes, successfully treated with systemic docetaxel and local radiation therapy to the neck in a renal transplant patient. *J Dermatol*. 2017 Dec;44(12):e346-e347. doi: 10.1111/1346-8138.14018.
9. Minamiyama R, Asai J, Kaneko Y, Kanehisa F, Cho Z, Takenaka H, Katoh N . Necrotizing Sweet syndrome in a patient with myelodysplastic syndrome. *Clin Exp Dermatol*. 2017 Apr 19 (e-pub). doi: 10.1111/ced.13088.
10. Cho Z, Konishi E, Kanemaru M, Isohisa T, Arita T, Kawai M, Tsutsumi M, Mizutani H, Takenaka H, Ozawa T, Tsuruta D, Katoh N, Asai J. Podoplanin expression in peritumoral keratinocytes

predicts aggressive behavior in extramammary Paget's disease. *J Dermatol Sci*. 2017 Jul;87(1):29-35. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.03.012.

11. Kataoka Y, Konishi E, Nishimoto H, Ogari K, Kanehisa F, Komori S, Takenaka H, Katoh N, Asai J. Lipidized and aneurysmal fibrous histiocytoma with epithelial cysts on the left calf. *J Dermatol*. 2018 Feb;45(2):232-233. doi: 10.1111/1346-8138.13788.
12. Taura M, Asai J, Wakabayashi Y, Masuda K, Katoh N. Drug eruption caused by esomeprazole: A case report and mini-review. *Allergol Int*. 2017 Jan 13 (e-pub). doi: 10.1016/j.alit.2016.12.009.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Asai J, Cho Z, Kanemaru M, Isohisa T, Arita T, Onishi M, Tsutsumi M, Ozawa T, Tsuruta D, Katoh N. Podoplanin in peritumoral keratinocytes mediates dermal invasion of extramammary Paget's disease. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2017 Dec 15-17; Kochi, Japan.
2. Isohisa T, Asai J, Arakawa Y, Kanemaru M, Arita T, Yamada Y, Onishi M, Konishi E, Katoh N. Immunohistochemical analysis of macrophage polarization in sarcoidosis with cutaneous lesions. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2017 Dec 15-17; Kochi, Japan.
3. Kanemaru M, Wada M, Arita T, Yamada Y, Asai J, Katoh N. Histone deacetylase inhibitors suppress the growth of angiosarcoma cells. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2017 Dec 15-17; Kochi, Japan.
4. Arita T, Kishida T, Katoh N, Matsuda O, Asai J. IL-12-expressing adipose-derived mesenchymal stem cells for treatment of melanoma. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2017 Dec 15-17; Kochi, Japan.
5. Fukushima S, Inoue H, Park J, Kiyotani K, Kiniwa Y, Fujisawa Y, Kato H, Asai J, Yokota K, Ihn H, Nakamura Y. Immune biomarkers to predict response of nivolumab, intratumoral gene expression and T cell receptor repertoire analysis. *Journal of Investigative Dermatology* 137(10): S286 · October 2017
6. Kanemaru M, Asai J, Jo J, Tabata Y, Katoh N. Poly(lactic- co -glycolic acid) (PLGA) nanoparticles containing pioglitazone attenuate bleomycin-induced skin fibrosis. *Journal of Investigative Dermatology* 137(10): S258 · October 2017 (European Society for Dermatological Research 2017 Annual Meeting. 2017 Sep 27-30; Salzburg, Austria.)
7. Fujisawa Y, Yoshikawa S, Minakawa A, Takenouchi T, Yokota K, Uchi H, Kamo R, Nakamura Y, Kato J, Asai J. Epidemiology of malignant melanoma in Japan: Analysis of 4239 patient data. *Journal of Investigative Dermatology* 137(10): S288 · October 2017
8. Asai J, Cho Z, Konishi E, Kanemaru M, Isohisa T, Arita T, Onishi M, Takenaka H, Ozawa T, Tsuruta D, Katoh N. Podoplanin in peritumoral keratinocytes mediates dermal invasion in extramammary Paget's disease. 76th SID annual meeting. 2017 Apr 26-29; Portland, OR.
9. Isohisa T, Asai J, Arakawa Y, Konishi E, Katoh N. Immunohistochemical analysis of macrophage polarization in sarcoidosis. 76th SID annual meeting. 2017 Apr 26-29; Portland, OR.
10. Arita T, Kishida T, Katoh N, Mazda O, Asai J. Novel therapeutic approach using cell-mediated IL-12 gene transfer with adipose-derived mesenchymal stem cells for melanoma treatment. 76th SID annual meeting. 2017 Apr 26-29; Portland, OR.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：皮膚創傷用組成物

発明者：高木智久、浅井純、岡山哲也、三浦かつら、坂上茂樹

権利者：住友精化株式会社、京都府公立大学法人

種類：皮膚創傷予防及び/又は治療組成物

番号：PCT/JP2019/19579

出願年：2018

国内外の別： 国内、国外

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田畑 泰彦

ローマ字氏名：Tabata Yasuhiko

所属研究機関名：京都大学

部局名：ウィルス・再生医科学研究所

職名：教授

研究者番号（8桁）：50211371

(2)研究協力者

研究協力者氏名：金丸 麻衣

ローマ字氏名：Kanemaru Mai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。