

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10102

研究課題名(和文) ナノ粒子を用いた分化誘導療法による新たな神経芽腫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment for neuroblastoma by differentiation induction therapy using nanoparticles

研究代表者

鈴木 孝二 (Suzuki, Koji)

福井大学・学術研究院医学系部門・講師

研究者番号：10397268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：高リスク神経芽腫に対し、イソトレチノイン酸を内包しMIBGを結合させたナノ粒子による治療方法開発を計画した。研究初年度にレチノイン酸内包したナノ粒子を作成することができた。次に、マウス神経芽腫細胞株を用いて実験を行った。レチノイン酸内包したナノ粒子と共培養することで、NB2aの分化が促進され形態変化を確認した。MIBGをナノ粒子に結合させることが困難であり、レチノイン酸包埋ナノ粒子の生体内での役割を検討した。マウスに接種したNB2a 皮下腫瘍の成長および病理組織学的な分化について検討したが実験系を確立することができなかった。今回の検討をもとに、他の神経芽腫細胞株で再度検討を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫に対する分化誘導療法は全身的な合併症が少なく、濃厚な治療歴のある患者にも実施可能な治療である。今回、ナノ粒子を用いた治療を検討することで、より効率的に腫瘍へ集積させることで、通常のATRAの投与と比較して、効果的に治療効果を上げることは可能となる。本研究期間では、生体内における、ナノ粒子の治療効果を見出すことはできなかったが、今後、研究を継続することで、生体内におけるより効率的なドラッグデリバリーシステムを開発し、副作用の少ない新たな治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：For high-risk neuroblastoma, we planned to develop a treatment method using nanoparticles containing isotretinoic acid and bound with MIBG. In the first year of the study, we were able to create nanoparticles encapsulating retinoic acid. Next, an experiment was performed using a mouse neuroblastoma cell line. By co-culturing with nanoparticles encapsulating retinoic acid, NB2a differentiation was promoted and morphological changes were confirmed. Since it is difficult to bind MIBG to nanoparticles, we investigated the role of retinoic acid-embedded nanoparticles in vivo. We examined the growth and histopathological differentiation of NB2a subcutaneous tumors inoculated into mice, but could not establish an experimental system. Based on this study, we plan to carry out the study again with other neuroblastoma cell lines.

研究分野：小児癌

キーワード：神経芽腫 分化誘導療法 ナノ粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児固形腫瘍では、脳腫瘍に次いで頻度の高い疾患である。高リスク群では 30-40%程度と治療成績は十分ではなく、新規の治療方法開発が必要である(Cohn SL, et al. J Clin Oncol. 27: 289-297,2009)。高リスク神経芽腫に対してはイソトレチノイン(13-cis-retinoic acid 以下 13-cis-RA)による分化誘導療法の効果が報告され、寛解導入療法、自家造血幹細胞移植併用大量化学療法、外科切除、放射線照射などによる集学的治療を終えた高リスク神経芽腫症例に対する維持療法としての有効性が報告されている。一方、がん治療における効果を左右する要因の一つとして、抗がん剤がターゲットとなる腫瘍局所へ十分に到達していることがあげられる。すなわちドラッグデリバリーシステム(以下 DDS)を改良することはがん治療を成功させる上で重要な鍵となる。近年、ナノ粒子と呼ばれる直径約 50-100 ナノメートルの微小粒子が注目されている。ナノ粒子は親水性ポリマーとポリアミノ酸誘導体などの疎水性ポリマーを水中で自己組織化させたもので、球表面に親水性ポリマーが、内側に疎水性ポリマーが位置する二層構造をもつ粒子であり、合成方法は確立されさまざまな研究分野で活用されている。増大する腫瘍においては血管新生が盛んに行われるが、これらの新生血管においては血管透過性が亢進する。ここをナノ粒子が通過し腫瘍局所に取り込まれると考えられている。ナノ粒子内に抗がん剤を包埋することで、効率的に抗がん剤が腫瘍内に取り込まれることも報告される。さらに、ナノ粒子の表面に腫瘍特異的な抗原を認識する抗体を結合させることで、能動的にナノ粒子を腫瘍細胞へホーミングさせることも研究が進んでいる。今回の研究では我々がすでに先行研究において報告している自家造血幹細胞移植モデルを用いることとしている。RA は神経芽腫細胞の分化誘導に有効であるが濃度依存的であるとされる。また、がん微小環境における MDSCs を減少させ、がん免疫療法の有効性を高めるとも報告される(Adrienne H.L. Cancer Immunol Res 2016)。

2. 研究の目的

13-cis-RA を内包し表面に MIBG を結合させたナノ粒子を作成し、これを自家造血幹細胞移植モデルマウスに投与することで、腫瘍への DDS を改善し、かつ、効率的にがん微小環境における、抗腫瘍免疫を発揮させ同時に神経芽腫細胞自体の分化を誘導させることで抗腫瘍効果が得られるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 13-cis-RA を内包し表面に MIBG を結合させたナノ粒子(以下 RA-MIBG-np とする)を作成する。

・ナノ粒子の作成については福井大学高エネルギー研究センター 清野教授、牧野准教授らの協力を得て作成する。

・ヒトへの使用が認可されている poly(lactide-co-glycolide)(PLGA)に polyvinyl alcohol を安定剤として用い double emulsion 法で作成したものを利用する。

(2) 作成したナノ粒子(RA-MIBG-np)の機能解析を行い、投与量についても検討を行う。

・作成したナノ粒子に含有される 13-cis-RA 量を測定し、その後の実験では、13-cis-RA 量に基づいて投与量設計を行う。

・マウス由来神経芽腫細胞腫細胞株 Neuro-2a(以下 NB2a)を同系マウス(A/J マウス)の腹壁皮下へ接種し腫瘍を作成する。

・腫瘍接種後、腫瘍径が 1cm 大となった時点で、尾静脈より RA-MIBG-np を投与する。

13-cis-RA として 35mg/kg を基準量(実際の臨床での投与量相当)として、1/100 量、1/10 量、基準量、10 倍量、100 倍量の RA-GD2-np を担がんマウスに投与し、投与後の腫瘍サイズの変化、および、病理組織学的解析、神経芽腫細胞の分化傾向の有無について評価を行う。また、単

回投与、複数回投与それぞれにおける差異についても検討する。

・副作用評価としては、マウスの活動性、体重減少の有無などにより評価を行う。

腫瘍内に RA-MIBG-np が実際に集積しているかどうかについては、腫瘍内イソトレチノイン酸濃度を測定する必要があるが、直接測定することができないため、イソトレチノイン酸投与により転写亢進が報告されている (G Ital Dermatol Venereol. 145(5):559-71. 2010) FOXO1 を PCR 法により確認することも検討する。

(3) 自家造血幹細胞移植モデル神経芽腫担がんマウスに対する、RA-GD2-np による抗腫瘍効果を検討する。

・レシピエントマウスに対して放射線全身照射(6 Gy)による前処置を行ったのち、ドナーマウス由来の骨髄細胞を尾静脈より輸注する。同日 NB2a を 2×10^6 cells 腹壁皮下に接種する。

移植後 10 日目からレシピエントマウスに対して RA-MIBG-np の投与を開始する。投与方法については、前年度に検討した結果を踏まえて設定する。

・ナノ粒子投与後、腫瘍サイズの測定を行い、非移植群、移植のみの群、移植+ナノ粒子治療群における、腫瘍量の変化について比較検討を行う。

・ナノ粒子投与後 7 日、14 日、21 日、28 日の時点で、レシピエントマウスを安楽死させて、脾臓、腫瘍を摘出、血液採取を行い、治療による変化について免疫学的項目を含めて検討する。

(具体的な免疫学的検討項目)

免疫寛容を形成する抑制性免疫細胞の動態を脾細胞および腫瘍内において解析する

MDSCs は CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞として、制御性 T 細胞は CD4 陽性 CD25 陽性 FoxP3 陽性細胞として、フローサイトメトリーを用いて測定する。

誘導された免疫系細胞の機能解析を in vitro で行う

脾細胞の ELISPOT アッセイにより、腫瘍特異的 IFN- γ 産生エフェクター T 細胞数を測定する。

細胞障害性活性は、 ^{51}Cr 標識 Nb2a と脾細胞の共培養による ^{51}Cr 放出量で測定する。

腫瘍内の各種免疫担当細胞の局在性の継時的変化の解析

腫瘍内における MDSCs、制御性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞の局在を腫瘍組織切片の免疫染色により評価する。

腫瘍内微小環境形成に関わるサイトカイン、ケモカインの測定

制御性 T 細胞、MDSCs の抑制機能や腫瘍内への集積に関与する TGF- β 、IL-10、CCL2、CXCL12 等のサイトカイン、ケモカインを ELISA 法により測定する。タンパクとして測定困難な場合には、mRNA 発現量を RT-PCR 法によって評価する。

4 . 研究成果

初年度に ATRA 抱合ナノ粒子の作成を行うことができた。

【ATRA による神経芽腫がん細胞の分化】

in vitro において、ATRA および ATRA 抱合ナノ粒子を含んだ培養液内でヒト神経芽腫細胞 (SK-N-SH 細胞) を培養すると、神経突起伸長(細胞形態における分化)が観察された。また、神経細胞へ分化したことを示す neurofilament-M 蛋白の発現が増えていることを Western blotting 法で確認した。

【in vitro における SK-N-SH の増殖抑制効果】

ATRA 群、ATRA 抱合ナノ粒子群、ATRA 非抱合ナノ粒子群、無治療群 (培養液 : MEM α) の 4 群を設定した。共同研究者により作成された ATRA 抱合ナノ粒子は粒子 1 つに平均 10 個の ATRA が抱合されている。そこで、10 μM 、1 μM 、0.1 μM 、0.01 μM の濃度に調整した ATRA 入

り培養液、 $1\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0.01\mu\text{M}$ 、 $0.001\mu\text{M}$ の濃度に調整した ATRA 抱合ナノ粒子入り培養液および ATRA 非抱合ナノ粒子入り培養液、試薬なしの培養液（無治療群）で SK-N-SH 細胞を培養し、がん細胞の増殖抑制効果を評価した。各培養液は 48 時間毎に交換し 14 日後に自動セルカウンター（Countess®）を用いて細胞数を測定した（図 1）。

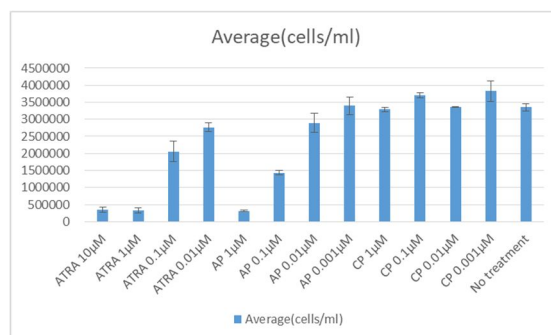


図 1. 細胞増殖抑制効果

ATRA 非抱合ナノ粒子（CP）入りの培養液で細胞を培養すると、細胞数は濃度に依存することなく無治療群（No treatment）と同等であった。一方、ATRA と ATRA 抱合ナノ粒子（AP）は濃度により SK-N-SH 細胞の増殖抑制効果を示した（同様の実験を 3 回行い、いずれも増殖抑制効果が確認された）。また、水溶性テトラゾリウム塩を発色試薬として用いた生細胞数測定キット（Cell Counting Kit-8、DOJINDO）においても ATRA と ATRA 抱合ナノ粒子はがん細胞の増殖抑制効果を示した。以上より ATRA 抱合ナノ粒子における腫瘍増殖抑制効果はナノ粒子による細胞障害ではなく、ATRA による腫瘍増殖抑制効果であることが確認された。

【in vivo における腫瘍増殖抑制効果】

ATRA 群、ATRA 抱合ナノ粒子群、ATRA 非抱合ナノ粒子群、無治療群の 4 群間で、SK-N-SH 細胞担がんマウスの腫瘍増殖抑制効果を比較検討する方針とした。SK-N-SH 細胞がヒト由来細胞であることから免疫不全マウスを用いて担がんマウスを作成することにした。過去の報告では 5×10^6 細胞を皮下接種することで担がんマウスを作成していたため、マトリゲルを用いて 5×10^6 細胞、 1×10^7 細胞を接種し腫瘍の発育過程を観察した。しかし、腫瘍の発育までに 1 か月以上かかることや、発育した腫瘍径にばらつきがあることから安定した担がんマウスを作成することは困難だった。

【マウス由来細胞を用いた研究への変更】

マウス由来の神経芽腫がん細胞株である NB2a 細胞は、A/J マウスに接種することで 1~2 週間のうちに腫瘍が発育する。この NB2a 細胞により腫瘍差育成を行ったが、皮下腫瘍の大小不同が目立ち再現性が得られにくく、Neuro2a 細胞株へ変更のうえ in vivo の研究を開始したが、本研究期間内に成果を得ることでできず、今後も研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	大嶋 勇成 (Oshima Yusei) (40303391)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	