

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05175

研究課題名(和文)ハイブリッドナノ粒子を用いたがん幹細胞を標的とする抑制効果とがん治療への応用

研究課題名(英文) Inhibitory Effects of Hybrid Nanoparticles Targeting Cancer Stem Cells and Their Application to Cancer Therapy

研究代表者

古水 雄志 (Komizu, Yuji)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：80735829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ハイブリッドナノ粒子(HL)を用いた肝がん細胞におけるがん幹細胞(CSC)に対する増殖抑制効果を検討した。HLは、正常な肝細胞に影響を与えることなく、肝がん細胞の増殖を選択的に抑制した。特に、HLで処理した肝臓がん細胞のCD133+ /EpCAM+ CSCサブ集団の減少が観察された。さらに、HLはコロニー形成細胞数を著しく減少させた。最後に、HLのCSCの細胞膜への融合・蓄積を確認した。これらの結果は、HLが肝癌治療におけるCSCを標的とした新しいナノ医療治療薬となる可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

厚生労働省の人口動態統計によると、がんは1981年以降ずっと日本人の死因第1位で、全体の3割を占める。近年、抗がん剤が効かない原因としてCSCの存在に注目が集まっており、CSCを標的とするがん治療は、がんの根本治療を目指すための最重要課題となっており、本研究課題の研究意義は極めて大きなものである。本研究成果は新規ナノ粒子であるHLのCSCに対する選択的な細胞増殖抑制効果について細胞レベルでの成果を報告したものであり、今後の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the inhibitory effects of HL on the growth of CSC subpopulations in liver cancer cells (HepG2) in vitro. HL selectively inhibited liver cancer cell growth without affecting normal hepatocytes. Notably, reduction in the CD133+ /EpCAM+ CSC sub-population of liver cancer cells treated with HL was observed by flow cytometric analysis. Furthermore, HL markedly decreased the number of colony-forming cells in the soft agar colony formation assay. Finally, we confirmed the fusion and accumulation of HL into the cell membranes of CSCs, using a fluorescently labeled lipid (NBDPC), by flow cytometry. Significant accumulation of HL/NBDPC into the CSCs (especially EpCAM+ cells) occurred in a dose-dependent manner. These results suggest that HL could be novel nanomedical therapeutic agents for targeting CSCs in liver cancer therapy.

研究分野：医用生体工学

キーワード：がん幹細胞 薬剤耐性 ハイブリッドナノ粒子 肝臓がん 増殖抑制効果 コロニー形成試験 アポトーシス 薬

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、がん組織中のがん幹細胞(CSC)の存在が注目され、抗がん剤による治療後もがん組織中に幹細胞の性質(A:薬剤耐性能、B:自己複製能・多分化能)を持つCSCが優位に生き残るため、がんの治療抵抗性や再発を引き起こすと考えられる(図1)。そこで、がん細胞のみならず、CSCを標的とする治療薬の開発が強く望まれている。

一方、ベシクル分子とミセル分子から成るハイブリッドナノ粒子(ハイブリッドリポソーム:HL)(JACS, 1985)は、HL自身が種々のがん細胞に対して、アポトーシス誘導型の細胞死を示すことが発見された(Matsumoto, *Int. J. Cancer*, 115, 377 (2005))。さらに、動物実験レベルでは顕著な延命効果を報告し、臨床応用ではリンパ腫瘍の患者への高い安全性、延命効果及び腫瘍縮小効果を得ており、すでに国内で十数例の臨床試験が実施されている(Ueoka et al., *Curr. Pharm. Des.*, 17, 1709 (2011))。

このような研究背景のもと、2007年より申請者らが、HLの制がん機構に関する研究を進めており、HL自身の膜流動性(揺らぎ)やがん細胞膜の流動性が制がん効果と相関することを明らかにした(Komizu et al., *BMCL*, 16, 6131 (2006); Komizu et al., *ACS Med. Chem. Lett.*, 2, 275(2011); Komizu et al., *BMCL*, 21,3962 (2011))。

特に重要な発見として、正常な細胞とがん細胞では、がん細胞の方が膜流動性がより大きく、HLがこの膜流動性の違いを認識して、がん細胞膜へ選択的に融合・蓄積することでアポトーシスを誘導することを明らかにした(Komizu et al., *BBRC*, 418, 81(2012), *生物物理*, 54, 5 (2014))。

2. 研究の目的

現在、世界では様々ながんでCSCを標的とした治療薬の開発が急速に進んでおり、CSCを標的とする治療は、がんの根本治癒を目指すための最重要課題となっている。そこで、本研究課題では、ハイブリッドナノ粒子(HL)を用いたCSCの増殖抑制効果と抑制メカニズムを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HLの調製

HL(DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$)は、リン脂質として、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)及びミセル分子として、ポリオキシエチレンアルキルエーテル($C_{12}(EO)_{23}$)を秤量し、5%グルコース溶液中で超音波照射を行い、孔径0.22 μ mフィルターで濾過滅菌したものをを用いた。

(2) HLによる肝臓がんCSCに対する増殖抑制効果と機構の解明

細胞は、肝がん(HepG2)細胞と、正常細胞として、正常ヒト胎児肝細胞(Hc細胞)を使用した。対象実験として、一般的な抗がん剤であるドキソルビシン(DOX)を用いた。CSCの同定と割合の測定のために、肝がんのCSCマーカーとして、CD133とEpCAMに対する蛍光標識抗体を反応させ、フローサイトメトリー(FCM)解析を行った。HL処理後の細胞を回収し、生存細胞数の計数とFCM解析を行った。さらに、HLのCSCへの蓄積について、蛍光脂質(NBDPC)で標識したHLを用い、CSCへの蓄積量(FCM解析)について測定した。軟寒天コロニー形成試験によりCSCの腫瘍形成能力を測定した。

4. 研究成果

DOXは、HepG2およびHc細胞の増殖を用量依存的に阻害した。一方、HLで処理すると、50-200

μM の濃度範囲で HepG2 細胞の増殖が用量依存的に阻害された。しかし、HL は同じ濃度範囲では Hc 細胞の増殖を抑制しなかった。これらの結果は、HL は 50-200 μM の濃度範囲において、HepG2 細胞の増殖を選択的に阻害し、正常肝細胞には影響を与えないことを示している。

細胞内のカスパーゼ-3 の高い活性は、時間および用量依存的に観察され、HL がカスパーゼ-3 を活性化することによって HepG2 細胞のアポトーシスを誘導したことを示している。したがって、HL はカスパーゼ-3 の活性化を介してアポトーシスを誘導することにより、HepG2 細胞の増殖を著しく抑制できることが示唆された。

そこで、肝がん細胞の CD133(+)/EpCAM(+) 集団には、癌幹細胞/前駆細胞が高度に濃縮されていることがよく知られている。そこで、肝がん細胞の CD133(+)/EpCAM(+) CSC 集団に対する HL の効果を検討した。DOX は HepG2 細胞の CD133(+)/EpCAM(+) 集団を用量依存的に増加させ、これらの細胞が化学療法に耐性を示していることが分かった。特に、HL で処理した肝臓がん細胞では、CD133(+)/EpCAM(+) CSC 亜集団の減少が用量依存的に観察された (図 1)。これらの結果は、HL が HepG2 細胞の CD133(+)/EpCAM(+) 集団を選択的に阻害することを示す。

DOX 前処理細胞は、非処理細胞 (コントロール) に比べ、より大きく、より多くの腫瘍コロニーの形成を誘導した。また、DOX は 0.001~0.05 μM の濃度範囲でコロニー形成細胞数を増加させる傾向を示した。この結果は、DOX 処理により HepG2 細胞

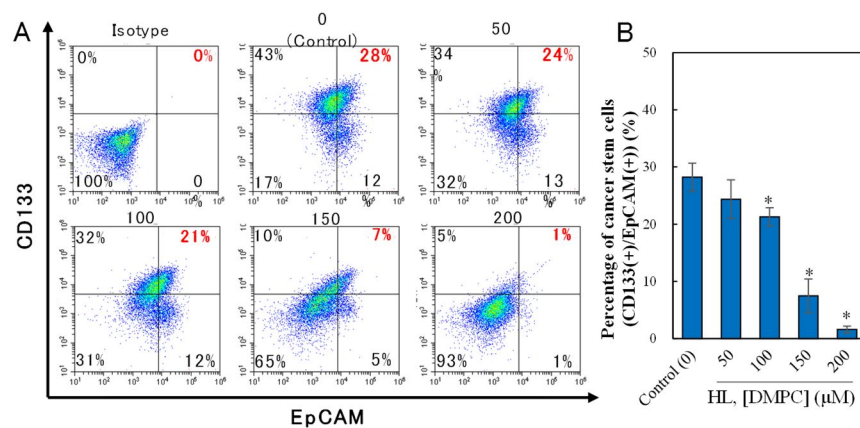


図 1 HL 処理した HepG2 細胞の CSC マーカー (CD133/EpCAM) のフローサイトメトリー解析

のうち CSC が濃縮されたことを示唆している。一方、HL で前処理した細胞は、用量依存的に非処理細胞 (コントロール) よりも低い数の腫瘍コロニーを誘導した。HL は、用量依存的にコロニー形成細胞数を有意に減少させた (図 2)。これらの結果から、HL は肝臓がん細胞のコロニー形成能を抑制することが明らかになった。

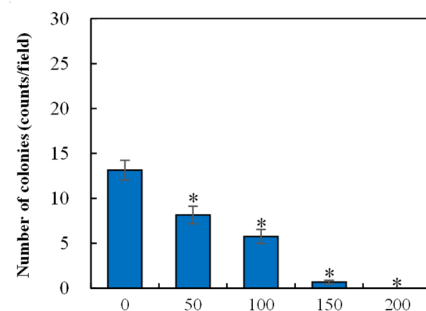


図 2 HL 処理した HepG2 細胞のコロニー形成試験

各細胞集団を 200 μM HL/NBDPC で処理した後、NBDPC (+)細胞を CD133(+)/EpCAM(-)、CD133(+)/EpCAM(+), CD133(-)/EpCAM(+), および CD133(-)/EpCAM(-) 細胞についてゲートした。その結果、HL/NBDPC が CD133(+)/EpCAM(+), CD133(-)/EpCAM(-) 細胞よりも CD133(+)/EpCAM(+), CD133(-)/EpCAM(-) 細胞に蓄積していることが分かった。さらに、CD133(+)/EpCAM(+), CD133(-)/EpCAM(-) 細胞 (特に EpCAM(+), CD133(-)) における HL/NBDPC の他の集団と比較した有意な蓄積は、用量依存的に生じた。これらの結果は、HL が HepG2 細胞の CD133(+)/EpCAM(+), CD133(-)/EpCAM(-) 集団に選択的に集積することを示唆している。

これらの結果は、HL が肝臓がん治療における CSC を標的とした新規ナノ医療治療薬となる可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 R. Jinno, Y. Komizu, Y. Kado, H. Ichihara, Y. Matsumoto, S. Ishida, T. Matsushita	4. 巻 26
2. 論文標題 Evaluation for inhibitory effects of hybrid liposomes on the growth of breast cancer stem cells using soft agar colony formation assay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Alternatives to Animal Testing and Experimentation	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11232/aatex.26.1	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 K. Inamura, R. Jinno, Y. Komizu, Y. Matsumoto, T. Matsushita	4. 巻 132
2. 論文標題 Selective elimination of tumorigenic hepatic stem cells using hybrid liposomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 206-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.04.001	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 K. Inamura, A. Shiraki, K. Inoue, R. Jinno, Y. Komizu, T. Takeda, S. Ishida, T. Matsushita	4. 巻 25
2. 論文標題 Development of a new culture vessel using hydrogen-rich gelatin for evaluation of hydrogen gas effect on cellular toxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Alternatives to Animal Testing and Experimentation	6. 最初と最後の頁 41-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11232/aatex.25.41	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 K. Inamura, Y. Komizu, M. Yamakuchi, S. Ishida, Y. Matsumoto, T. Matsushita	4. 巻 509
2. 論文標題 Inhibitory effect of hybrid liposomes on the growth of liver cancer stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 268-274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.12.118	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 -

〔学会発表〕 計28件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 親富祖 亮太、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、小島 理恵、川部 雅章、松下 琢、石田 誠一
2. 発表標題 胆汁排泄機能を備えた肝細胞の三次元培養系を用いた薬物動態に関する基礎研究
3. 学会等名 第28回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千歳 盛一郎、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、小島 理恵、川部 雅章、松下 琢、石田 誠一
2. 発表標題 がん細胞の三次元培養を用いた薬剤耐性克服薬スクリーニング系の開発に関する研究
3. 学会等名 第28回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳野 莉子、古水 雄志、松本 陽子、松下 琢、石田 誠一
2. 発表標題 新規メカニズムのナノ粒子を用いた造腫瘍性細胞の排除機構に関する研究
3. 学会等名 第28回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳野 莉子、古水 雄志、松本 陽子、松下 琢、石田 誠一
2. 発表標題 新規ナノ粒子を用いた造腫瘍性細胞の排除機構に関する研究
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Riko Jinno, Yuji Komizu, Yoko Matsumoto, Taku Matsushita, Seiichi Ishida
2. 発表標題 Quality control of hepatic stem cells derived from human fetal hepatocytes using novel nanoparticles
3. 学会等名 The 11th edition of the World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳野 莉子、古水 雄志、市原 英明、松本 陽子、石田 誠一、松下 琢
2. 発表標題 乳がん幹細胞の増殖に対するハイブリッドリボソームの阻害効果に関する研究
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 古水 雄志、松本 陽子、石田誠一、松下 琢
2. 発表標題 ハイブリッドリボソームの肝がん幹細胞への特異的蓄積と増殖抑制効果
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 北島 真優子、日吉 浩平、千歳 盛一郎、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、小島 理恵、川部 雅章、松下 琢、石田 誠一
2. 発表標題 肝がん細胞の三次元培養による薬剤耐性現象の再現と薬剤耐性克服薬スクリーニングへの応用
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 萌、陳野 莉子、古水 雄志、松本 陽子、松下 琢、石田 誠一
2. 発表標題 造腫瘍性細胞に対する新規ナノ粒子の選択的作用に関する研究
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日吉 浩平、北島 真優子、千歳 盛一朗、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、小島 理恵、川部 雅章、松下 琢、石田 誠一
2. 発表標題 三次元培養担体Cellbedを用いた膵臓がん細胞の薬剤耐性現象の再現に関する研究
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳野莉子、稲村恒亮、古水雄志、松本陽子、松下琢
2. 発表標題 新規ナノ粒子を用いた腫瘍原性細胞の排除機構に関する研究
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千歳盛一朗、坂田望、古水雄志、岩佐卓哉、佐々木皓平、小島理恵、川部雅章、松下琢
2. 発表標題 シリカファイバー三次元培養担体を用いた薬剤耐性現象の再現と薬剤耐性克服薬スクリーニングへの応用
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古水雄志、佐々木皓平、石田誠一、松下琢
2. 発表標題 シリカ繊維からなる三次元培養足場を用いた薬剤耐性克服現象の in vitro 評価
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 親富祖亮太、坂田望、古水雄志、岩佐卓哉、佐々木皓平、小島理恵、川部雅章、石田誠一、松下琢
2. 発表標題 三次元培養担体 Cellbed における肝細胞を用いた胆汁排泄機能の再構築に関する研究
3. 学会等名 第33回日本動物実験代替法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千歳盛一朗、坂田望、古水雄志、岩佐卓哉、佐々木皓平、小島理恵、川部雅章、石田誠一、松下琢
2. 発表標題 三次元培養担体 Cellbed を用いた薬剤耐性克服現象の再現と薬剤耐性克服薬スクリーニングへの応用
3. 学会等名 第33回日本動物実験代替法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 陳野莉子、古水雄志、松本陽子、松下琢、石田誠一
2. 発表標題 新規ナノ粒子を用いた腫瘍原性肝幹細胞の排除機構に関する研究
3. 学会等名 第33回日本動物実験代替法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 親富祖亮太、坂田望、古水雄志、岩佐卓哉、佐々木皓平、小島理恵、川部雅章、石田誠一、松下琢
2. 発表標題 三次元培養担体を用いた毛細胆管の再構築による胆汁排泄機能を備えた肝毒性評価法
3. 学会等名 シンポジウム【細胞アッセイ技術の現状と将来】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角祐里奈、陳野莉子、古水雄志、松本陽子、松下琢、石田誠一
2. 発表標題 ハイブリッドリポソームの乳がん幹細胞に対する増殖抑制効果
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 親富祖亮太、坂田望、古水雄志、岩佐卓哉、佐々木皓平、小島理恵、川部雅章、石田誠一、松下琢
2. 発表標題 3次元培養担体Cellbedを用いた肝細胞の胆汁排泄機能の再構築に関する研究
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳野 莉子、稲村 恒亮、古水 雄志、松本 陽子、松下 琢
2. 発表標題 再生医療における新規ナノ粒子を用いた腫瘍原性幹細胞の選択的排除に関する研究
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田 望、稲村 恒亮、水民 敬浩、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、小島 理恵、川部 雅章、石田 誠一、松下 琢
2. 発表標題 三次元培養担Cell bed™ を用いたHepG2 細胞の薬剤耐性克服薬スクリーニングへの応用と胆汁排泄機能の再現
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 我那覇 一冨、稲村 恒亮、古水 雄志、金 秀良、石田 誠一、松下 琢
2. 発表標題 胎児肝細胞及び成人肝細胞における化学物質毒性発現の比較解析
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古水 雄志
2. 発表標題 シリカファイバー三次元培養担体を用いたヒト肝臓細胞の機能発現に関する研究
3. 学会等名 2019年 日化協LRI 研究報告会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古水 雄志、坂田 望、千歳 盛 一郎、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、小島 理恵、川部 雅章、石田 誠一、松下 琢
2. 発表標題 シリカファイバー三次元培養担体を用いた抗がん剤スクリーニングへの応用
3. 学会等名 第3回がん三次元培養研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陳野 莉子、井野川 人姿、古水 雄志、友重 竜一、松下 琢
2. 発表標題 骨芽細胞のハイドロキシアパタイト培養担体を用いた分化誘導に関する研究
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第32回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田 望、水民 敬浩、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、小島 理恵、川部 雅章、石田 誠一、松下 琢
2. 発表標題 三次元培養担体Cellbedを用いた肝細胞の胆汁排泄機能の再現
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第32回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Komizu, N. Sakata, S. Chitose, T. Iwasa, K. Sasaki, R. Kojima, M. Kawabe, T. Matsushita
2. 発表標題 Application Of Anticancer Drug Screening System Using Silica Fiber-based Three-dimensional Culture Scaffold
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology(ASCB)/EMBO 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田 望、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、小島 理恵、川部 雅章、石田 誠一、松下 琢
2. 発表標題 三次元培養担体を用いた胆汁排泄機構を備えた肝毒性評価法
3. 学会等名 シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と未来」
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究業績データベース
<http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp?kyoinId=yndbyyosgys>

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	松下 琢 (Matsushita Taku) (10209538)	崇城大学・生物生命学部・教授 (37401)	

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
---------	---------