

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790770

研究課題名（和文）非小細胞肺癌における EGFR を標的としたナノ粒子によるオートファジー誘導療法

研究課題名（英文）Anti-EGFR antibody conjugated gold liposome for molecular imaging and therapy on NSCLC cells

研究代表者：

横山 智央（TOMOHISA YOKOYAMA）

東京医科大学 医学部・講師

研究者番号：40408240

研究成果の概要（和文）：本研究では、EGFR の発現強度の異なる NSCLC 細胞を用いて、anti-EGFR antibody (ab) で修飾した gold ナノ粒子 (EGFR-gold nanoparticles) の治療・診断効果について検討を行い、EGFR-gold nanoparticles はリアルタイムに治療効果を判定でき、非小細胞肺癌に対する診断・治療に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated *in vitro* effect of these liposomes on EGFR-expressing/-null NSCLC cells. Our findings demonstrated that EGFR-targeted liposome is a promising agent for therapy and molecular imaging of NSCLC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,024,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非小細胞肺癌、ナノ粒子、DDS (drug delivery system)、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

肺癌は最も死亡者数の多いがん種であり、新たな治療法の開発が望まれている。近年、様々な分子を標的にしたがん治療薬が開発されてきているが、肺癌に対する分子標的薬（抗体医薬）による有効性については明らかになっていない。このため、現在の課題は肺癌に対する分子標的薬の開発、その低感受性/耐性のメカニズム解明およびそれを克服することである。非小細胞肺癌や大腸癌においては、EGFR (epidermal growth factor receptor) や KRAS の mutation 有無によって、gefitinib・cetuximab に対する感受性に違いが起こる事がわかってきており、その臨床背

景（腺癌・非喫煙者/過去軽度喫煙者・アジア人・女性）が注目されているが、現実はこのような臨床背景の集団においても感受性に違いがあるのが報告されている。この為、これらの治療予測因子および感受性の違いを引き起こすメカニズムについて解明することが必要である。

近年、ナノ粒子は、がん細胞における薬剤の体内循環および治療効果をモニタリングするために開発され様々な癌に対して研究されているが、肺癌の抗体を標的にしたナノ粒子については未だ十分に検討されていない。さらには、ナノ粒子によって引き起こされる細胞死の機序を解明する。

そこで、これまでの知見を踏まえ*、gold ナノ粒子を抗 EGFR 抗体で修飾する事によって非小細胞肺癌におけるオートファジー様細胞死のメカニズム・生物学的意義の解明、さらにはそのシグナル伝達因子を解明し、分子標的薬を開発、およびその低感受性/耐性のメカニズムを解明する予定である。また、本研究で用いられる gold ナノ粒子は治療目的のみならず、MRI (magnetic resonance imaging) を用いたがん診断として、更には暗視野顕微鏡を用いることによって gold ナノ粒子の腫瘍細胞への取り込みを検出可能とし、リアルタイムに DDS (drug delivery system) の評価をできる可能性があり、肺癌の診断・治療を目的としたバイオマーカーの開発につながると思われる。

*Yokoyama T, Tam J, Kuroda S, Scott AW, Aaron J, Larson T, Shanker M, Correa AM, Kondo S, Roth JA, Sokolov K, Ramesh R. EGFR-targeted hybrid plasmonic magnetic nanoparticles synergistically induce autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. PLoS One. 2011;6 :e25507.

2. 研究の目的

(1) EGFR の発現強度の異なる非小細胞肺癌の分子を標的とした日本製のナノ粒子 (gold, Platinum, Palladium、または Cy3) を作成し、その治療効果 (細胞増殖抑制効果) およびナノ粒子の細胞内への取り込みを検出する事によってリアルタイムな DDS の評価を行う。

(2) 本研究で作成されたナノ粒子による細胞増殖抑制効果が、どのような細胞死によって引き起こされるかを検討するために、オートファジー様細胞死/アポトーシス誘導効果を観察し定量化する。また、オートファジー様細胞死のメカニズム、シグナル伝達因子、および、その生物学的意義の解明、更には細胞内へ取り込まれるレセプター介在性エンドサイトーシスとオートファジーの相互作用の解明を行う。

(3) オートファジーを誘導する薬剤または同一のシグナル伝達因子を標的とした薬剤併用による細胞増殖抑制効果およびその機序を解明し、ナノ粒子との併用による薬剤相加・相乗効果について検討を行う。

(4) *In vivo* における、抗 EGFR 抗体で修飾された gold ナノ粒子および同一のシグナル伝達因子を標的にしたオートファジー誘導薬剤との併用による治療効果、またその効

果を optical image を用いて検討。

以上、非小細胞肺癌の低感受性/耐性のメカニズムを解明し、より効率のよい治療法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、EGFR の発現強度の異なる NSCLC 細胞 (強発現:HCC827&H1299) および EGFR 非発現の NSCLC 細胞 (非発現:H520) を用いて行った。

(2) Liposome 内部に gold, platinum, palladium または Cy3 を封入し、その周りを anti-EGFR ab で修飾した数種のナノ粒子 (120nm: 片山化学工業株式会社: 大阪) を作成して検討を行った。細胞増殖抑制効果については WST-1 assay (Roche Applied Science) を用いて行った。オートファジー/アポトーシス誘導効果 (PARP、Caspase-3、LC3-II) およびシグナル伝達因子 (PI3K-AKT-mTOR、MAPK など) は immunoblotting 法にて検討した。

(3) ナノ粒子の細胞内への取り込みは暗視野コンデンサーを用いた反射偏光顕微鏡 (NIKON: gold ナノ粒子の検出) または蛍光顕微鏡 (Cy3 ナノ粒子の検出) を用いて観察を行った。

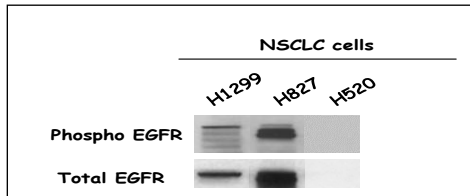
(4) 細胞増殖抑制の相加・相乗効果の評価は CalcuSyn software (Biosoft) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) Gold, platinum, palladium または Cy3 を内包した様々なサイズのナノ粒子を作成し (ワインレッドケミカルおよび片山化学)、細胞増殖抑制効果および細胞内への取り込みについて検討を行った。製造段階でのコンタミ、製造後のナノ粒子の安定性を検討した結果、gold ナノ粒子が最も安定していた為、以後の研究に用いた (120nm: 片山化学工業株式会社: 大阪)。

(2) 3 種類の EGFR 強発現/非発現 NSCLC 細胞 【H1299 (EGFR mutation なし)・H827 (EGFR mutation あり)・H520 (EGFR 発現なし)】 における、phospho/total EGFR の発現強度について immunoblotting 法を用いて検討を行った。

H1299 細胞は mild、H827 細胞は strong な phospho/total EGFR な発現を認めたが、H520 細胞は phospho/total EGFR の発現を認めなかった。

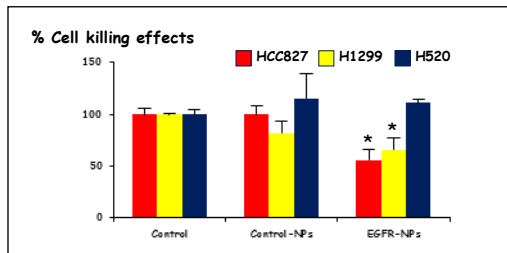


(3) EGFR 強発現/非発現 NSCLC 細胞 (H1299/H827/H520) における、EGFR-gold nanoparticles 細胞増殖抑制効果 (anti-EGFR ab 2ng/ml 72 時間治療) について WST-1 を用いて検討を行った。

EGFR-NPs: 抗 EGFR 抗体にて修飾された gold nanoparticles, Control-NPs: Gold nanoparticles のみ (未修飾)

* <0.05 vs control, control-NPs

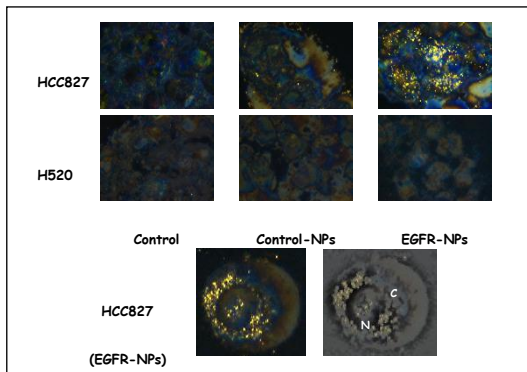
EGFR の発現した細胞 (H1299, H827) では、EGFR-NPs による細胞増殖抑制効果を認めたが、EGFR 非発現細胞 (H520) では細胞増殖抑制効果を認めなかった。また、control-NPs では EGFR 非発現/発現細胞にて細胞増殖抑制効果を認めなかった。



(4) EGFR 強発現/非発現 NSCLC 細胞 (H827/H520) における、ナノ粒子の細胞内への取り込みについて反射偏光顕微鏡を用いて観察。NSCLC 細胞は、anti-EGFR ab 2ng/ml 濃度のナノ粒子を添加後 48 時間に観察した。

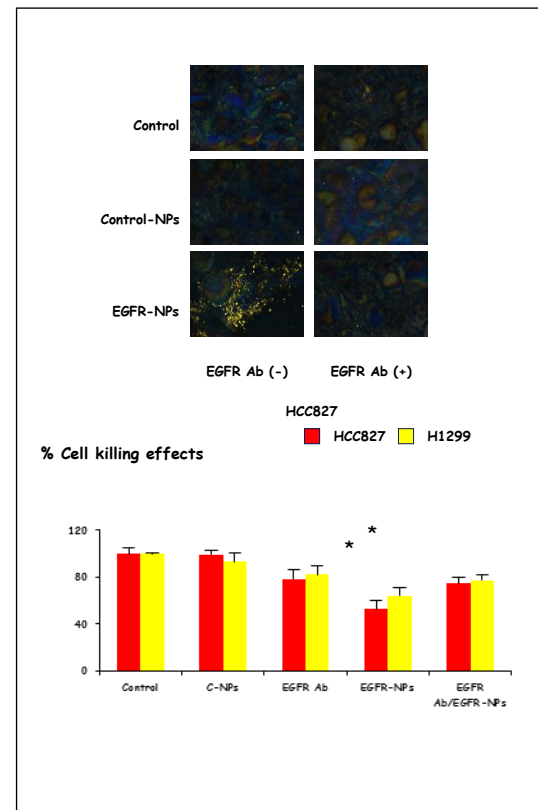
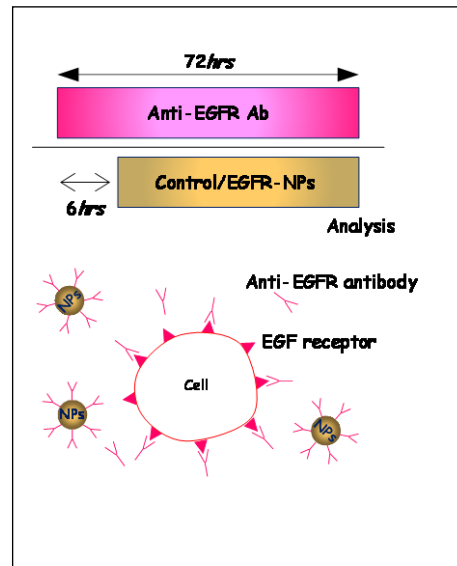
(N) Nuclear, (C) Cytoplasm (x 1,000)
EGFR-NPs: 抗 EGFR 抗体にて修飾された gold nanoparticles, Control-NPs: Gold nanoparticles のみ (未修飾)

EGFR の発現した細胞 (H827) では、EGFR-NPs の細胞内への取り込みを認めたが、EGFR 非発現細胞 (H520) では認めなかった。また、ナノ粒子は細胞質のみならず、核内への取り込みも認められた。



ノ粒子の細胞内へ取り込み阻害効果について (Blocking study) 偏光顕微鏡を用いて観察。

NSCLC 細胞 (H827&H1299) は anti-EGFR antibody (2 ng/ml) 添加の有無にて 6 時間の前治療を行い, その後 control/EGFR-targeted nanoparticles を添加し, さらに 66 時間 (Total 72 時間) 培養した。 (* <0.05 v.s. anti-EGFR antibody)



Anti-EGFR antibody にて前治療を行うこと
によって、EGFR-NPs の細胞内への取り込みは
認められなかった。また、EGFR-NPs は同濃度
の Anti-EGFR antibody のみと比べ、強い細胞
増殖抑制効果を EGFR の発現した細胞 (H827、
H1299) にて認めた。

(6) ナノ粒子による細胞死のメカニズム・
シグナル伝達因子、他の薬剤による相加・相
乗効果、in vivo 研究については現在も進行
中であり、その再現性等について確認をして
いる。

これまでの研究成果のまとめ

● anti-EGFR ab で修飾されたナノ粒子は
EGFR の発現した NSCLC 細胞において強い細胞
増殖抑制効果を認めたが、非発現の NSCLC 細
胞では細胞増殖抑制効果を認めなかった。

● 偏光顕微鏡を用いた検討では、
anti-EGFRab で修飾されたナノ粒子は EGFR の
発現した NSCLC 細胞において細胞内に取り込
まれていることが確認されたが、EGFR の非発
現細胞では細胞内取り込みを認めなかった。

● anti-EGFR ab で修飾されたナノ粒子は同濃
度の anti-EGFR ab と比べ強い細胞増殖抑制
効果を認めた。

● anti-EGFR ab で修飾されたナノ粒子は
NSCLC 患者への治療応用が可能と思われ、リ
アルタイムな治療効果の判定が可能と思わ
れる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yokoyama T, Osato Y, Miyazawa K, Hayabe
H, Miyasato A, Nomura M, Gotoh N, Itoi
T, Tauchi T, Ikeda N, Ohyashiki K.
EGFR-targeted gold liposome for
molecular imaging and therapy on NSCLC
cells. AACR 103th Annual meeting 2012,
March 31-April 4, Chicago USA.
- ② Yokoyama T, Miyazawa K, Nomura M, Gotoh
N, Ohyashiki K. Anti-EGFR antibody
conjugated gold liposome for molecular
imaging and therapy on NSCLC cells. 第
49回日本癌学会学術集会. 名古屋 2011
年 10 月 3-5 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 智央 (YOKOYAMA TOMOHISA)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：40408240