

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591912

研究課題名(和文) ミセルナノ粒子を使用したトリプルネガティブ乳癌治療に関する研究

研究課題名(英文) Novel treatment for triple negative breast cancer using Poloxamer

研究代表者

岩熊 伸高 (IWAKUMA, Nobutaka)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30309801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミセルナノ粒子Poloxamerが乳癌細胞MDA-MB-231に対する細胞毒性を有し、その細胞毒性はヒト乳腺上皮(非乳癌)細胞MCF12Aに比べて有意に強いものであった。Poloxamerは、MCF12Aに比べてMDA-MB-231において強い乳癌細胞膜変性を来していたが、両細胞の細胞増殖能には影響を与えていなかった。Propidium iodide染色では、MCF12Aに比べてMDA-MB-231においてより多くの細胞膜傷害が認められた。トリプルネガティブ乳癌担癌マウスモデルへのPoloxamer投与では、経静脈投与により腫瘍増殖が抑制されたが、経口投与では抑制されなかった。

研究成果の概要(英文)：Poloxamer was toxic to triple negative human breast cancer cells MDA-MB-231 in culture as evidenced by propidium iodide assays compared with human mammary epithelial (non-cancer) cells MCF12A. Poloxamer had significant cytotoxicity against MDA-MB-231 than MCF12A by the LDH assay. Poloxamer was not associated with cell proliferation in both MDA-MB-231 and MCF12A. Poloxamer inhibited the growth of breast cancer tumors in intravenous administration. However, Poloxamer did not inhibit the growth of breast cancer tumors in the oral administration.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：癌ナノテクノロジー トリプルネガティブ乳癌 ミセルナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

我が国において、現在も増え続ける女性の乳癌による罹患率と死亡率は社会問題である。世界長寿国である日本は、女性の平均寿命も世界一位であり、食生活や生活環境の欧米化に伴い、更なる高齢者の乳癌罹患数の増大が予想される。

また最近の乳癌に対する遺伝子学的研究で、乳癌のサブタイプ分類が証明され、乳癌治療におけるテーラーメイド化が進んでいる。その乳癌サブタイプの中で、ホルモンレセプター (ER, PgR) 陰性、Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) 陰性のトリプルネガティブ乳癌が問題視されている。現在の乳癌薬物療法は、抗がん剤による化学療法を中心に、内分泌療法と分子標的治療をそのサブタイプ別に使い分けることが推奨されており、乳癌治療効果に大きく貢献している。そういった中でトリプルネガティブ乳癌は、内分泌療法および分子標的治療が適応外のため、薬物治療の選択が抗がん剤による化学療法のみであり、さらに生物学的特徴として一般に予後不良であり、実臨床に於いても悩まされる場面が多く、新たな治療の開発が急務である。

そのような乳癌に対する新しい診断と治療として癌ナノテクノロジーが注目されている。癌ナノテクノロジーとは、大きさ 1-200nm (10⁻⁹m) の人工ナノ粒子を取扱い癌の診断と治療にかんする技術・研究であり、今後の研究の進展と臨床応用が期待される。我々のこれまでの癌ナノテクノロジーに関する研究では、100nm 以下のナノ粒子が乳癌細胞内に取り込まれる事を報告しており、それをイメージ化することにも成功した。更には乳癌腫瘍内に取り込まれたゴールドシリカナノ粒子にレーザーを照射することで、腫瘍焼灼療法が可能であった。

そこで今回我々は、100nm 以下のナノ粒子をトリプルネガティブ乳癌に取り込ませる

ことで、治療に応用させるという発想からミセルナノ粒子 Poloxamer に着目した。

2. 研究の目的

我々は、界面活性剤であるミセルナノ粒子に着目し、そのミセルナノ粒子による乳癌に対する治療効果と関連有害事象を *in vitro* 実験および *in vivo* 実験を通して研究・検証し、トリプルネガティブ乳癌に対する新しい治療法を開発し、臨床応用することである。

3. 研究の方法

(1) トリプルネガティブ乳癌細胞培養実験 (*in vitro*)

ミセルナノ粒子 Poloxamer をヒト乳癌トリプルネガティブ細胞株 MDA-MB-231 と 24 時間培養し、培養後の細胞を MTT cell proliferation assay にて解析し、Poloxamer が癌細胞増殖能に及ぼす影響を検証する。対照実験としてヒト乳腺上皮 (非乳癌) 細胞株 MCF12A およびヒト乳癌ホルモンレセプター陽性細胞株 MCF7 に対しても 24 時間培養後に同様の解析を行い比較検討する。

ミセルナノ粒子 Poloxamer をヒト乳癌トリプルネガティブ細胞株 MDA-MB-231 と 24 時間培養し、培養後の細胞溶液を LDH cytotoxicity assay にて解析し、癌細胞に対する Poloxamer の細胞毒性を *in vitro* で検証する。対照実験としてヒト乳腺上皮 (非乳癌) 細胞株 MCF12A およびヒト乳癌ホルモンレセプター陽性細胞株 MCF7 に対しても 24 時間培養後に同様の解析を行い比較検討する。

ミセルナノ粒子 Poloxamer をヒト乳癌トリプルネガティブ細胞株 MDA-MB-231 と 24 時間培養し、培養後の細胞を Annexin assay にて解析し、Poloxamer 培養後の乳癌細胞膜変成を検証する。対照実験としてヒト乳腺上皮 (非乳癌) 細胞株 MCF12A に対しても 24 時間培養後に同様の解析を行い比較検討する。

ミセルナノ粒子 Poloxamer をヒト乳癌トリプルネガティブ細胞株 MDA-MB-231 と 24 時間培養し、培養後の細胞を Propidium iodide にて染色後、蛍光顕微鏡で観察し、Poloxamer による細胞膜傷害を証明する。

(2) トリプルネガティブ乳癌担癌マウスにおけるミセルナノ粒子治療実験 (*in vivo*)

生後 4 週の *nu/nu* ノードマウスに培養したヒト乳癌トリプルネガティブ細胞 MDA-MB-231 を皮下移植後約 2 週間飼育し、腫瘍径約 1cm のトリプルネガティブ乳癌担癌マウスを作製する。

In vitro 実験にて証明、選択されたより強い癌細胞傷害能を持つ Poloxamer を、作製したトリプルネガティブ乳癌担癌マウスモデルに 4 週間連続経口投与し、腫瘍径を 1 週間毎 (Day7, 14, 21) に計測し、腫瘍増殖に対する効果を検証する。

In vitro 実験にて証明、選択されたより強い癌細胞傷害能を持つ Poloxamer を、作製したトリプルネガティブ乳癌担癌マウスモデルに経静脈投与 (Day1) し、腫瘍径を 1 週間毎 (Day7, 14, 21) に計測し、腫瘍増殖に対する効果を検証する。

4. 研究成果

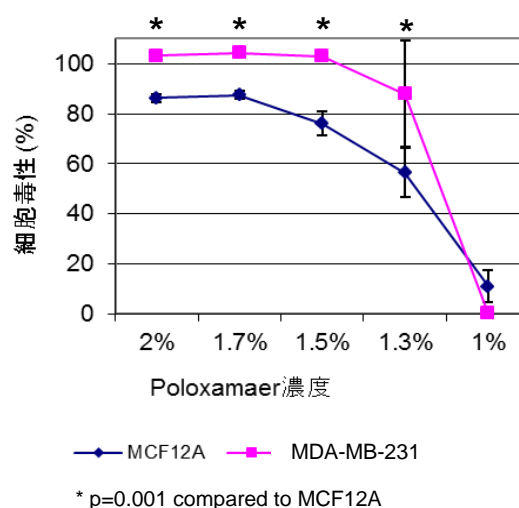
(1) トリプルネガティブ乳癌細胞培養実験 (*in vitro*)

ミセルナノ粒子 Poloxamer とヒト乳癌トリプルネガティブ細胞株 MDA-MB-231 との 24 時間培養後の MTT cell proliferation assay での解析では、Poloxamer が細胞増殖能に影響を与えないことが検証された。対照実験では、ヒト乳腺上皮 (非乳癌) 細胞株 MCF12A およびヒト乳癌ホルモンレセプター陽性細胞株 MCF7 に対しても Poloxamer が細胞増殖能に影響を与えないことが検証された。

ミセルナノ粒子 Poloxamer とヒト乳癌トリプルネガティブ細胞株 MDA-MB-231 との

24 時間培養後の LDH cytotoxicity assay では、Poloxamer が癌細胞に対する細胞毒性を有することが検証された。その細胞毒性は、ヒト乳腺上皮 (非乳癌) 細胞株 MCF12A に比べて有意に強いものであった。

ミセルナノ粒子 Poloxamer の細胞毒性



また同様にヒト乳癌ホルモンレセプター陽性細胞株 MCF7 に対しても Poloxamer が細胞毒性を有することが検証された。

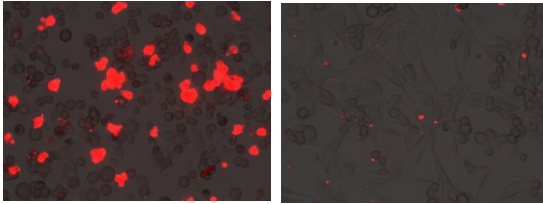
ミセルナノ粒子 Poloxamer とヒト乳癌トリプルネガティブ細胞株 MDA-MB-231 との 24 時間培養後の Annexin assay での解析では、ヒト乳腺上皮 (非乳癌) 細胞株 MCF12A に比べてヒト乳癌トリプルネガティブ細胞株 MDA-MB-231 において、強い乳癌細胞膜変成を来していた (詳細は論文に掲載予定)。

ミセルナノ粒子 Poloxamer とヒト乳癌トリプルネガティブ細胞株 MDA-MB-231 との 24 時間培養後に Propidium iodide 染色を行い、蛍光顕微鏡で観察したところ、ヒト乳腺上皮 (非乳癌) 細胞株 MCF12A に比べてヒト乳癌トリプルネガティブ細胞株 MDA-MB-231 において、より多くの Poloxamer による細胞膜傷害が認められた。

**蛍光顕微鏡による観察
(Propidium iodide 染色)**

MDA-MB-231

MCF12A



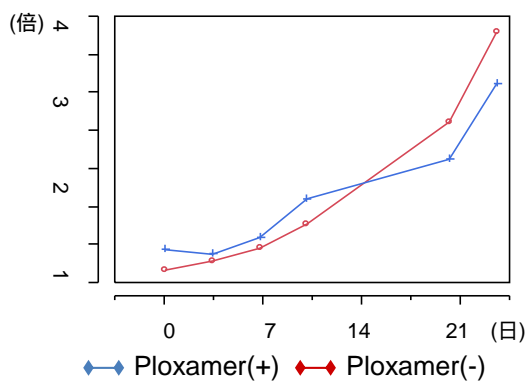
Ploxamer による細胞障害を受けた細胞は、細胞膜が障害され細胞内が Propidium iodide 染色で赤く染まっている。MCF12A に比べて MDA-MB-231 において、より多くの細胞が障害を受けている。

(2) トリプルネガティブ乳癌担癌マウスにおけるミセルナノ粒子治療実験 (*in vivo*)

生後 4 週の *nu/nu* ノードマウスに培養したヒト乳癌トリプルネガティブ細胞 MDA-MB-231 を皮下移植後約 2 週間飼育し、腫瘍経約 1cm のトリプルネガティブ乳癌担癌マウスの作成に成功した。

1.3% Poloxamer を作製したトリプルネガティブ乳癌担癌マウスモデルに 4 週間連続経口投与し、腫瘍経を 1 週間毎 (Day7, 14, 21) に計測した。Poloxamer 投与による明らかな腫瘍増殖抑制は認められなかった。

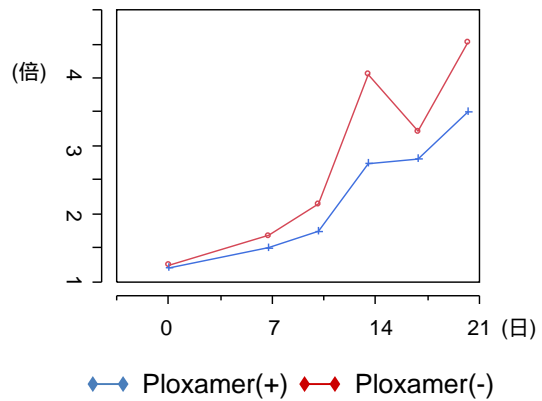
腫瘍増殖の比較



1.3% Poloxamer を作製したトリプルネガティブ乳癌担癌マウスモデルに経静脈投与 (Day1) し、腫瘍経を 1 週間毎 (Day7, 14, 21)

に計測した。Poloxamer 投与により腫瘍増殖が抑制された。

腫瘍増殖の比較



< 引用文献 >

がんの統計編集委員会、財団法人がん研究振興財団 2003.

人間開発報告書 2007/2008、国連開発計画 (UNDP).

平山雄、予防ガン学への道-乳ガンの激増と高危険群、中外医薬、38、1985、693-699.

Grobmyer SR, Iwakuma N. Cancer Nanotechnology. Encyclopedia of Cancer -2nd edition, ed. M. Schwab. Springer, New York, 2009.

Iwakuma N, Sharma P, Delano M, Moldawer L, Moudgil BM, Grobmyer SR. Differential Uptake of PEG-FITC Silica Nanoparticles by Human Breast Cancer Cells and Normal Human Breast Epithelial Cells. NSTI Proceedings, 2, 2007, 348-351.

Zhang Q, Iwakuma N, Wu C, McNeil J, Sharma P, Moudgil BM, Jiang H, Grobmyer SR, Gold Nanoparticles as a Contrast Agent for In Vivo Tumor Imaging with Photoacoustic Tomography. Nanotechnology, 20; 39, 2009.

Sharma P, Brown SC, Singh A, Iwakuma I, Pyrgiotakis G, Krishna V, Knapik JA, Barr K, Moudgil BM, Grobmyer SR, Near-infrared absorbing and luminescent gold speckled silica nanoparticles for photothermal therapy. *J. Mater. Chem.*, 20, 2010, 5182-5185.

Bartrakova EV, Kabanov AV, Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release*, 10; 130(2), 2008, 98-106.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

岩熊伸高, 唐宇飛, 高良慶子, 三島麻衣, 竹中美貴, 高橋龍司, 白水雄, Grobmyer SR: 臨床指針 乳がん診療へのがんナノテクノロジー研究の応用, 査読無, 臨牀と研究, 90(4): 81-85, 2013

Sharma P, Bengtsson NE, Walter GA, Sohn HB, Zhou G, Iwakuma N, Zeng H, Grobmyer SR, Scott EW, Moudgil BM: Gadolinium-Doped Silica Nanoparticles Encapsulating Indocyanine Green for Near Infrared and Magnetic Resonance Imaging. *Small*, 査読有, 8(18): 2856-68, 2012. doi: 10.1002/sml.201200258.

Grobmyer SR, Zhou G, Gutwein LG, Iwakuma N, Sharma P, Hochwald SN: Nanoparticle delivery for metastatic breast cancer. *Nanomedicine*, 査読有, 8(1): S21-30, 2012. doi: 10.1016/j.nano.2012.05.011.

〔学会発表〕(計 5 件)

岩熊伸高, 唐宇飛, Grobmyer Stephen, 三島麻衣, 竹中美貴, 古川実奈, 岩本周

子, 藤井輝彦, 赤木由人, 白水雄, 淡河恵津世. ナノ粒子を用いた乳がん腫瘍組織へのドラッグデリバリー量的解析 第 22 回日本乳癌学会学術集会 2014 年 7 月 10-12 日 大阪国際会議場(大阪)

岩熊伸高, 唐宇飛, Grobmyer R Stephen, Krishna Vijay, 三島麻衣, 竹中美貴, 高橋龍司, 高良慶子, 藤井輝彦, 白水雄, ポリヒドロキシフラーレンを用いた非侵襲的イメージングと新しい乳癌局所治療に関する研究, 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014 年 4 月 3-5 日, 国立京都国際会館(京都)

Iwakuma N, Toh U, Grobmyer SR, Koura K, Takenaka M, Otsuka H, Takahashi R, Shirouzu K. Active targeting nanoparticle for breast cancer diagnosis and treatment. *Breast Cancer Symposium, ASCO 2012*. 2012 年 9 月 13-15 日 サンフランシスコ (アメリカ)

Iwakuma N, Toh U, Grobmyer SR, Koura K, Takenaka M, Otsuka H, Takahashi R, Shirouzu K. The potential of targeting nanoparticle for breast cancer diagnosis. *The 8th European Breast Cancer Conference 2012* 年 3 月 21-24 日 ウィーン(オーストリア)

Iwakuma N, Toh U, Otsuka H, Nakagawa S, Takahashi R, Koura K, Shirouzu K. The potential of cancer nanotechnology for diagnosis and therapy of breast cancer. *Global Breast Cancer Conference 2011*. 2011 年 10 月 6-8 日 ソウル(韓国)

〔図書〕(計 1 件)

岩熊伸高, 唐宇飛, 高良慶子, 白水雄, Grobmyer SR: 特集 乳がんにおける多

様性と個別化 機能的イメージングを応用した治療の個別化 ナノテクノロジーによる乳がんの診断と治療 腫瘍内科, 10(2): 131-135, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentana/molecular/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩熊 伸高 (IWAKUMA, Nobutaka)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30309801