

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870390

研究課題名(和文)胃癌に対するHER2標的抗体医薬を搭載した金ナノ粒子製剤の開発と治療効果の検討

研究課題名(英文) Novel HER2-targeted gold nanoparticles for gastric cancer

研究代表者

黒田 新士 (Kuroda, Shinji)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60633758

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)：トラスツズマブ(Tmab)結合金ナノ粒子(Tmab-AuNP)は、Tmab抵抗性を有するHER2陽性胃癌細胞株に対しても有意な細胞障害活性を示した。HER2陰性胃癌細胞株に対してはHER2細胞外ドメインを強制発現させることで同様に有意な細胞障害活性を示すようになった。Tmab-AuNP特有の細胞障害メカニズムとしては、Tmab-AuNPの細胞内への取り込みによる酸化ストレスやオートファジーの増強が一因と考えられた。以上より、Tmab-AuNPはTmab抵抗性癌腫に対する有効な新規治療薬となり得る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Trastuzumab (Tmab)-conjugated gold nanoparticles (Tmab-AuNP) showed strong cytotoxic effect on a Tmab-resistant HER2-positive gastric cancer cell line while Tmab did not. On a HER2-negative gastric cancer cell line, Tmab-AuNP showed strong cytotoxic effect after HER2 extra-cellular domain was over-expressed on the cell surface. These specific cytotoxic activity of Tmab-AuNP was produced through increase of oxidative stress and autophagy induced after intracellular uptake of Tmab-AuNP. These findings demonstrated that Tmab-AuNP could be a novel intriguing therapeutic agent for Tmab-resistant cancers.

研究分野：消化器外科

キーワード：金ナノ粒子 トラスツズマブ HER2 胃癌 トラスツズマブ抵抗性

1. 研究開始当初の背景

(1) ナノテクノロジー (金ナノ粒子)

近年医学の分野においてナノテクノロジーへの注目度が高く、ドラッグデリバリーへの観点から数十～数百 nm の大きさのキャリアが理想的であることが分かっている。それは Enhanced Permeation and Retention (EPR) 効果によるもので、このサイズのナノ粒子は血管透過性の亢進した腫瘍組織に選択的に集積しやすい利点がある。ドラッグデリバリーに利用されるナノデバイスの種類は多岐にわたるが、欧米で最も注目を浴びているものの一つに金ナノ粒子がある。金ナノ粒子は生体内での安定性に加え、抗体・ペプチドなどによる表面修飾が容易であるという特徴を有しているため、分子標的薬や遺伝子治療のキャリアーとして用いられるようになった。さらに、癌組織に分布した金ナノ粒子は放射線の治療効果を増強したり、光線力学療法として近赤外線照射により熱を発生させる事で癌を治療することも可能であり、癌の集学的治療において様々な併用効果が期待できる薬剤となり得る。

(2) トラスツズマブ (ハーセプチン)

トラスツズマブは細胞増殖に關与する表面抗原である HER2 蛋白質に対するヒトモノクローナル抗体であり、細胞増殖シグナルの抑制や免疫作用を介して抗腫瘍効果を發揮する。これまで HER2 陽性の乳癌にしか適応がなかったが、近年日本において HER2 陽性の切除不能・再発胃癌に対しても適応が認められ、臨床の現場で胃癌症例に使用されるようになった。HER2 陽性症例は胃癌全体の約 20% であるが、これらの症例には 16 ヶ月ほどの生存期間が期待できるようになった。しかし、約 80% の HER2 陰性症例はトラスツズマブが使用できないこと、また他の消化管腫瘍である大腸癌では集学的治療により 2 年以上の生存期間が期待できることを踏まえると、さらなる新規治療薬の開発が待たれるところである。

2. 研究の目的

申請者は、これまで細胞増殖に關与する表面抗原である EGFR (HER1) に対するモノクローナル抗体 (セツキシマブ) を結合させた金ナノ粒子を用いた肺癌の治療研究に携わってきた。また、消化器腫瘍専門の臨床医として実際に臨床の現場で HER2 陽性胃癌患者に対してトラスツズマブを使用し、その有効性を経験するとともに治療抵抗性の獲得に対する更なる改善の必要性を実感した。そこで、トラスツズマブを結合した金ナノ粒子製剤が HER2 陽性胃癌に対する治療効果の改善に貢献できるのではないかとという着想に至った。

3. 研究の方法

(1) トラスツズマブ結合金ナノ粒子

(Tmab-AuNP) の作成と質的評価

先行論文のプロトコル (Kumar S, et al. Nat Protoc. 2008) に従い Tmab-AuNP を作成し、分光光度計にてナノ粒子の安定性と表面修飾の適正を評価し、陽性コントロールとなる HER2 陽性胃癌細胞株への Tmab-AuNP の取り込みと実際の治療効果を踏まえて評価を行う。

(2) HER2 陽性胃癌細胞株に対する治療効果
HER2 陽性胃癌細胞株 (NCI-N87, MKN7) に対する Tmab-AuNP の細胞障害活性を、XTT アッセイにてコントロール群と比較検討する。

(3) HER2 陰性胃癌細胞株に対する
HER2-ECD 強制発現系を併用した治療効果
HER2 陰性胃癌細胞株 (MKN74) に HER2 extracellular domain (HER2-ECD) を強制発現させることにより Tmab-AuNP の治療効果がどの程度増強するかを検討する。

(4) Tmab-AuNP の治療メカニズムの解析
蛍光標識した Tmab および Tmab-AuNP を用いて、HER2 陽性・陰性胃癌細胞株へのこれらの取り込みを Time-lapse イメージングにて経時的に観察する。また、Tmab 抵抗性 HER2 陽性胃癌細胞株 (MKN7) を用いて、Tmab-AuNP の細胞障害メカニズムを Tmab との比較により解明する。

(5) マウス皮下腫瘍モデルにおける治療効果
ヌードマウスに HER2 陽性胃癌細胞株を用いて背部皮下腫瘍モデルを作成し、Tmab-AuNP の腫瘍内投与を行いその治療効果をコントロール群と比較する。

4. 研究成果 (番号は 3. 研究の方法と対応)

(1) 金ナノ粒子 (AuNP)、トラスツズマブ (Tmab) 他、必要な試薬を購入し、先行論文 (Kumar S, et al. Nat Protoc. 2008) を参考に、トラスツズマブ結合金ナノ粒子 (Tmab-AuNP) を製作した。分光光度計にて数ナノメートルのピーク波長のシフトを認め、金ナノ粒子表面に Tmab が結合していることを確認した。また、HER2 陽性胃癌細胞株 (NCI-N87) における暗視野顕微鏡を用いた観察において、Tmab-AuNP は AuNP と比較し有意に多数の取り込みが確認された。

(2) HER2 陽性胃癌細胞株 (NCI-N87, MKN7) に対する Tmab-AuNP の細胞障害活性を XTT アッセイにて検討したところ、コントロール群である Tmab、AuNP および Tmab と AuNP の混合 (Tmab+AuNP) と比較し、有意に強い細胞障害活性を認めた。また、NCI-N87 における IC50 を比較したところ、Tmab-AuNP は Tmab よりも約 6.5 倍強力な細胞障害活性を有することが示された。

(3) 一方で、HER2 陰性胃癌細胞株 (MKN74) に対する細胞障害活性を XTT アッセイにて検討したところ、Tmab-AuNP は他のコントロール群と比較して、有意な細胞障害活性を示さなかったが、HER2-ECD を発現させるアデノウイルスベクターを用いて MKN74 に HER2-ECD を強制発現させると、Tmab-AuNP はコントロール群と比較して有意な細胞障害活性を示すようになった。

(4) 蛍光標識した Tmab および Tmab-AuNP を用いて、Tmab 抵抗性胃癌細胞株である MKN74 における取り込みを Time-lapse イメージングにて経時的に観察したところ、Tmab は細胞表面にわずかに結合するのみであったが、Tmab-AuNP は細胞表面に結合した後に細胞内に取り込まれていくことが確認された。また、Tmab 感受性胃癌細胞株である NCI-N87 を用いた同様の実験では、Tmab も細胞内に取り込まれるもののライソゾームと共に局在しており、一方で Tmab-AuNP は単独で細胞内に存在しているものも確認された。また、Tmab-AuNP は Tmab と比較し、有意に酸化ストレスを誘導し、またオートファジーを増強することも確認されており、これらのことから Tmab-AuNP 特有の細胞障害メカニズムとして、細胞内に取り込まれた Tmab-AuNP による酸化ストレスやオートファジーの増強が一因として考えられた。

(5) ノードマウスにおける NCI-N87 の背部皮下腫瘍モデルを作成し、Tmab-AuNP の腫瘍内投与による治療効果を確認したところ、Tmab、AuNP および Tmab+AuNP などのコントロール群と比較し、Tmab-AuNP は有意に強力な抗腫瘍効果を示した。

Tmab 抵抗性癌 (胃癌、乳癌など) に対する治療法の開発は、現在日本のみならず世界各国で注目の領域であり、その中で本研究結果は Tmab-AuNP が Tmab 抵抗性癌腫に対する有効な治療戦略となり得る可能性を示したこととなる。さらに詳細な治療メカニズムの解明や全身投与可能な薬剤の開発など、まだ克服すべき点はあるものの、金ナノ粒子を用いた新規抗体療法の開発は、今後有効な治療戦略として注目を集める可能性がある。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

久保田 哲史、黒田 新土、藤原 俊義 (他 3 名、2 番目)、金ナノ粒子を用いた HER2 標的抗体療法、第 37 回癌免疫外科研究会、2016 年 5 月 12 日 ~ 2016 年 5 月 13 日、川越プリン

スホテル (埼玉)

Tetsushi Kubota, Shinji Kuroda, Toshiyoshi Fujiwara, (他 3 名、2 番目)、Novel HER2-targeted gold nanoparticles; integration of antibody and nanotechnology、American Association for Cancer Research (AACR)、2016 年 4 月 16 日 ~ 2016 年 4 月 20 日、New Orleans (USA)

Shinji Kuroda, Tetsushi Kubota, Toshiyoshi Fujiwara, (他 5 名、1 番目)、Trastuzumab-conjugated gold nanoparticles as a novel HER2-targeted therapy、Federation of Asian Clinical Oncology (FACO)、2015 年 10 月 29 日 ~ 2015 年 10 月 31 日、Kyoto (Japan)

久保田 哲史、黒田 新土、藤原 俊義 (他 4 名、2 番目)、金ナノ粒子を用いた新規 HER2 標的抗体療法、第 74 回日本癌学会学術集会、2015 年 10 月 8 日 ~ 2015 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場 (名古屋)

久保田 哲史、黒田 新土、藤原 俊義 (他 3 名、2 番目)、金ナノ粒子を用いた HER2 標的抗体療法、第 31 回日本 DDS 学会学術集会、2015 年 7 月 2 日 ~ 2015 年 7 月 3 日、京王プラザホテル (東京)

Tetsushi Kubota, Shinji Kuroda, Toshiyoshi Fujiwara, (他 3 名、2 番目)、HER2-targeted gold nanoparticles produce potent antitumor effects on human gastric cancer cells、American Association for Cancer Research (AACR)、2015 年 4 月 18 日 ~ 2015 年 4 月 22 日、Philadelphia (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科消化器

外科学ホームページ

<http://www.ges-okayama-u.com/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 新士 (KURODA, Shinji)

岡山大学医学部・客員研究員

研究者番号：60633758

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

久保田 哲司 (KUBOTA, Tetsushi)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器

外科学・大学院生