

ナノ粒子を用いた薬物輸送システムの開発； 神経芽腫がん細胞の分化誘導療法

研究代表者： 吉川 利英（医学系部門小児科学・特命助教）
共同研究者： 鈴木 孝二（医学系部門小児科学・助教）
大嶋 勇成（医学系部門小児科学・教授）
牧野 颯（高エネルギー医学研究センター・准教授）
清野 泰（高エネルギー医学研究センター・教授）

概 要	All-trans-retinoic acid (ATRA) は神経芽腫がん細胞を神経細胞へと分化誘導する特性を持つ。本研究は、ATRA を抱合させたナノ粒子をマウスに投与することで腫瘍局所に高濃度の ATRA を輸送する drug delivery system の開発を目指した。神経芽腫がん細胞株はヒト由来の SK-N-SH 細胞を使用し、ATRA による態学的な分化（神経突起伸長）と分子学的な分化（Neurofilament-M 蛋白の発現）の誘導を確認した。in vitro 実験において、ATRA、ATRA 抱合ナノ粒子、ATRA 非抱合ナノ粒子、無治療の 4 群間で SK-N-SH 細胞の増殖抑制効果を比較したところ、ATRA および ATRA 抱合ナノ粒子は類似した増殖抑制効果を示した。in vivo 実験では、免疫不全マウスに SK-N-SH 細胞を接種したが、腫瘍の発育が遅く、発生した腫瘍の大きさにばらつきがあり安定した担がんマウスを作成することは困難だったため神経芽腫がん細胞株をマウス由来の NB2a に変更して現在実験を継続中である。
関連キーワード	神経芽腫、分化誘導療法、ナノ粒子、薬物輸送システム

研究の背景および目的

【目的】

神経芽腫は小児で発症頻度が高い悪性固形腫瘍である。MYCN 遺伝子の高度増幅を伴うような高リスク群では、強力な寛解導入療法とその後の超大量化学療法を含む集学的治療を行っても長期生存率は 20～40%と低く、治癒した場合でも超大量化学療法に伴う臓器障害など治療関連毒性のため苦しむ患児も多い。本研究では、神経芽腫がん細胞を神経細胞へと分化誘導することが報告されている All-trans-retinoic acid (ATRA) に着目し、ATRA を抱合させたナノ粒子を用いることで腫瘍局所へ効率的にナノ粒子を到達させ、神経細胞への分化を誘導するための drug delivery system を開発することを研究目的とする。

【特色】

近年のがん治療は、がん細胞の特性や周囲の微小環境に対する理解が深まったことにより発展してきた。がん細胞により放出される血管内皮成長因子やブラジキニンにより誘導された新生血管は、隣接する内皮細胞間隙が広く周皮細胞を欠くため物質の透過性は亢進し、腫瘍内の間質では正常組織と比較してリンパ排泄の機能が低下している (enhanced permeability and retention; EPR)。一方、ナノ粒子の粒子径は、がん細胞の 1/100～1,000 と小さく、その体積に比して表面積が大きいという特徴があり、低分子薬剤を粒子に抱合させて輸送することができる。正常組織においては血管から組織へのナノ粒子の移行は見られないが、

EPR 効果により腫瘍内ではがん細胞周囲への移行が期待できる。本研究では、ATRA をナノ粒子に抱合させてマウスの神経芽腫モデルに投与し、腫瘍局所に高濃度の粒子が到達できるかどうか、神経細胞への分化を十分に誘導できるかどうかを検討し、有効な Drug delivery system の開発を目指す。また、ATRA、ATRA 抱合ナノ粒子、ATRA 非抱合ナノ粒子、無治療の 4 群を設定し、腫瘍の増殖抑制効果や副作用の発現頻度・重症度を比較する。

【予想される結果と意義】

in vitro 実験において、ATRA と ATRA 抱合ナノ粒子は、ATRA 非抱合ナノ粒子や無治療と比較して神経芽腫がん細胞の増殖抑制効果が高く、in vivo 実験においては、腫瘍局所により高濃度の ATRA が輸送されることで ATRA 抱合ナノ粒子の方が ATRA よりも高い腫瘍増殖抑制効果と低い副作用発現率を示すと予想される。

本研究の成果を実臨床に応用することで治療成績の向上が期待され、超大量化学療法を避けることができれば合併症の軽減にも寄与するものと考えられる。

本研究で使用するナノ粒子の作成は、高エネルギー医学研究センター清野泰教授、牧野颯准教授に依頼しすでに完成している。

研究の内容および成果

【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 μ M、1 μ M、0.1 μ M、0.01 μ M の濃度に調整した ATRA 入り培養液、1 μ M、0.1 μ M、0.01 μ M、0.001 μ 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)。

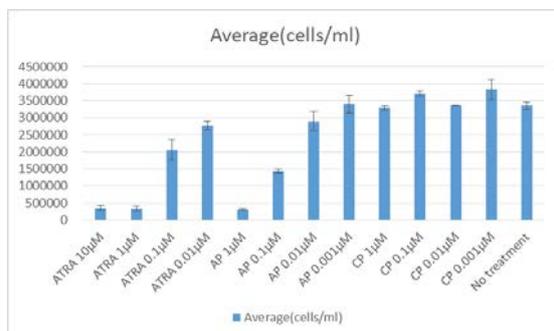


図 1. 細胞増殖抑制効果

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がん細胞の増殖抑制効果はナノ粒子による細胞障害ではなく、抱合された ATRA による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 (共同研究者が他施設で利用していた)。この NB2a 細胞を理化学研究所より購入し、治療の標的細胞として in vitro 実験を開始している。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

現時点では本研究に関連する発表論文なし。

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成 29 年度福井大学研究育成経費 40 万円

平成 30 年度科研費 (申請中)