

「脂肪幹細胞を用いたドラッグデリバリーシステムによる新規がん治療法」
 神戸大学医学部附属病院 整形外科 川上洋平

1 研究の背景と目的

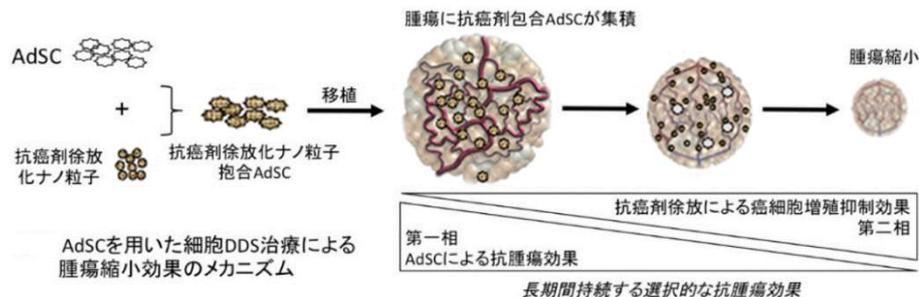
骨肉腫は小児がんの8大がんに加えられ、bone cancerの約20%に及ぶ。現在、骨肉腫の治療は腫瘍周囲正常組織とともに切除する手術加療（広範切除）と、術前後の全身化学療法により予後は改善傾向にあるが、再発・転移症例に対する化学療法の効果は十分ではない為、未だ予後不良である。また、現行の化学療法は、重篤な全身性副作用を伴うことも多く、患者は多大なる苦痛を伴い、治療継続困難になることもある。したがって、抗がん剤をいかに効率よく腫瘍組織に集積・作用させ、正常組織への影響を最小限にとどめるかが重要である。

我々はこれまで、腫瘍集積性のある骨髄由来血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell:EPC）を抗がん剤の担体として腫瘍組織に集積させる治療法の開発研究を行ってきた。抗がん剤（ピラルビシン/テラルビシン）ナノ粒子包含EPCの担がんマウス（骨肉腫細胞株皮下腫瘍モデル）に対する効果の検討で、対照群に比べて有意な腫瘍縮小効果をもつことを確認した。本研究に於いては、臨床応用を視野に入れてEPCよりも低侵襲的かつ大量に組織から分離できる体性幹細胞として脂肪組織由来幹細胞（adipose-derived stem cell: AdSC）を抗がん剤の担体として用いた。これまでに経静脈的に投与されたAdSCsが、炎症部位に集積し局所の抗炎症効果や抗線維化効果を引き起こす事が報告されている。さらに、AdSCは単球・マクロファージと共通の性質としての貪食能を有しているため、PLGA ナノ粒子を細胞質内に取り込む現象も確認できている。近年AdSCはがん細胞の増殖抑制・アポトーシス誘導効果を有することも報告されている。

本研究では、このようなAdSCの性質を利用し、抗がん剤を徐放させることのできるPoly lactic/glycolic acid (PLGA)ナノ粒子をAdSCに包含させて腫瘍に効率よく集積させることで、抗がん剤を局所的にがん組織に作用させる事が可能となり、AdSCの抗腫瘍効果に加えて抗がん剤の選択的デリバリーとの相乗効果による、骨肉腫への新たな細胞治療戦略について検討した。

本研究の概要を以下に示す。（図1）まず抗がん剤徐放化ナノ粒子包含AdSC移植で細胞が腫瘍に集積する。次に、腫瘍内に集積したAdSCの腫瘍に対する細胞増殖抑制・アポトーシス誘導効果が現れる（第一相の治療効果）。そして、AdSCから徐放的に放出される抗がん剤の時間差効果によって、さらに腫瘍細胞死が惹起され長期間にわたり抗腫瘍効果が持続することで高い腫瘍縮小効果が得られる（第二相の治療効果）ことが予想される。薬剤DDSによる化学療法と細胞移植によるがん治療をフュージョンさせた新しいハイブリッド型治療法の開発研究という点が独創的な点であり、今後のがん研究分野において革新的な領域となり得る点で意義深いものと考えられた。

図 1



2 研究方法・研究内容

今回我々は、腫瘍集積性のある脂肪組織由来幹細胞（AdSC）を抗がん剤の担体として、抗がん剤（ピラルビシン/テラルビシン（Therarubicin））を徐放させることのできる PLGA ナ

ノ粒子包合を作製し、AdSCに抱合させ、担がんマウス（骨肉腫細胞株皮下腫瘍モデル）に対して移植治療実験を行った。

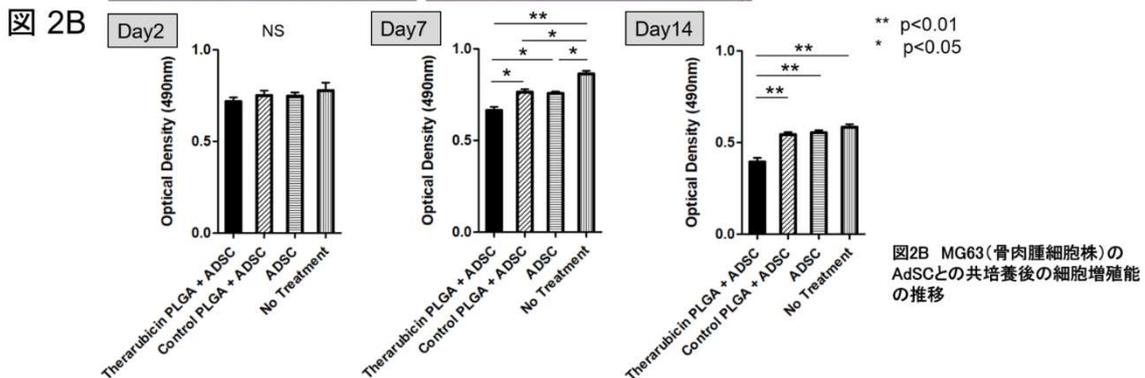
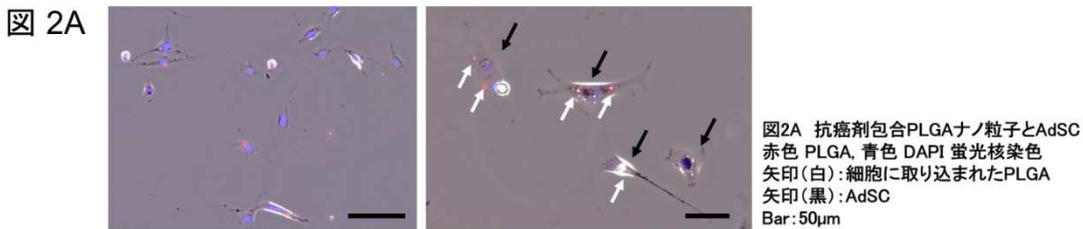
腫瘍細胞はヒト由来の骨肉腫細胞株(MG63)を使用し、マウス由来 AdSCは8~12 週齢の C57BL6 マウスの皮下脂肪より採取し、コラゲナーゼ処理し、遠心分離法を用いて AdSC を分離した。PLGA ナノ粒子と抗がん剤（ピラルビシン/テラルビシン）の封入体（封入率（濃度）3-4%・平均粒子径 300-400nm）を合成し、AdSC と共培養することで AdSC 抗がん剤抱合体を作成した。

In vitro では、AdSC 自体の細胞死、骨肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果を確認し、*In vivo* ではヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて徐放化抗がん剤ナノ粒子包合 AdSC 移植による腫瘍縮小効果を適切な対照群を設定して画像診断と摘出腫瘍重量と体積の経時的推移によって評価した。ヒト骨肉腫細胞 (MG63) 1×10^6 と $100 \mu\text{L}$ の Matrigel(BD Bioscience)を混合した細胞溶液をヌードマウス(BAL B/cAJcl-nu/nu, CLEA Japan, Inc. male 10wk old)の背側皮下に局所注射により移植した。移植 2-3 週間後、マウスの背部に形成される腫瘍が径 5 mm になった時点で固形がんのモデルとして実験に使用し、抗がん剤（ピラルビシン/テラルビシン）内包 PLGA 抱合 AdSC (5×10^5) を移植した T 群、薬剤非内包の PLGA のみ抱合させた AdSC (5×10^5) を移植した A 群、PBS 移植の P 群の 3 群に分けてに分けて経静脈内投与し腫瘍の縮小効果等を検討した。(各群 $n=10$) IVIS *in vivo* imaging system を用いて移植した AdSC の腫瘍への集積を確認した。移植細胞数は予備実験から、 5×10^5 /マウスの用量で投与した。

腫瘍縮小効果のメカニズムを解明するため、治療後の腫瘍組織を免疫組織化学的及び分子生物学的に解析し、臨床試験のために重要な治療効果についてのメカニズムの解明を行った。治療後 35 日目の時点で腫瘍組織を摘出して組織標本作製した。細胞増殖に関しては抗 Ki67 抗体を用いた免疫組織化学的に解析を行う。また、腫瘍組織内アポトーシスについては TUNEL 染色法、腫瘍内繊維化定量はマッソントリクローム染色によって定量解析を行った。

3 研究成果

治療前に顕微鏡で抗がん剤内包 PLGA 粒子は AdSC との 24 時間の共培養で適切に細胞内に取り込まれている事が確認された。(図 2A) *In vitro* で AdSC 抗癌剤抱合体は抱合後 2 日まで EPC 自体の増殖能や遊走能に影響なく抗がん剤が徐放されることを確認し、抗がん剤徐放率は培養後 5-7 日でピークを認めた。MG63 細胞との共培養では 7 日目以降で細胞増殖抑制効果を認めた。(図 2B)



In vivo では IVIS in vivo imaging で移植した AdSC が腫瘍部に集積している事を確認した。(図 3B) 腫瘍サイズの経時的評価では、T 群 (抗がん剤抱合 AdSC 移植群) で有意な腫瘍増大抑制効果を確認、AdSC のみを移植した A 群では腫瘍の増大効果は一時的なものであり、腫瘍の再増大を確認した。(図 3B)

図 3A

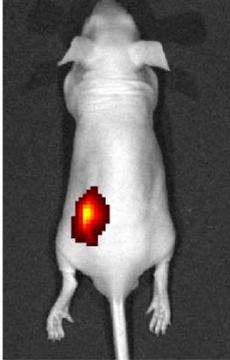


図3A XenoLightDiRで標識したAdSCが腫瘍部に集積している事はIVISで確認された(移植後1週)

図 3B

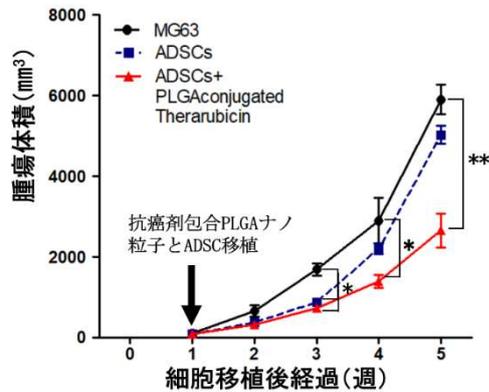


図3B 皮下腫瘍(MG63:骨肉腫細胞株)体積推移

また、組織学的評価では術後 5 週では、T 群で A 群及び P 群と比較して、Ki67 陽性細胞数の減少を確認した。(図 4A) マッソントリクローム染色では T 群と A 群で細胞移植のない P 群と比較して腫瘍の線維化抑制効果が確認された。(図 4B) TUNEL 染色でも、同様に T 群で優位なアポトーシス陽性細胞を確認、抗がん剤の効果を示唆された。(図 4C)。

図 4A

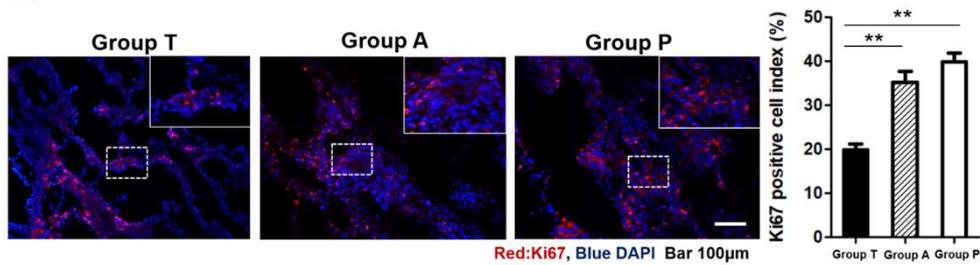


図 4B

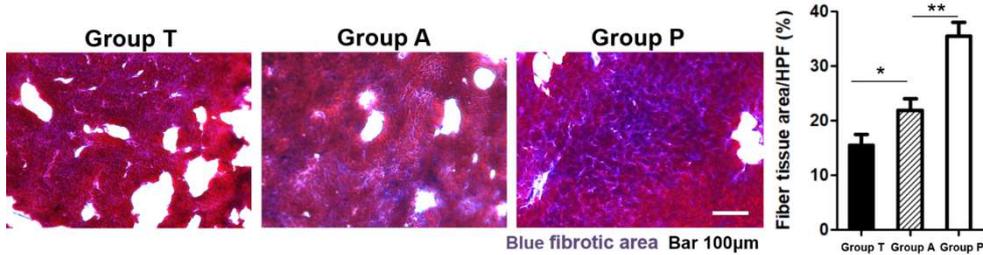


図 4C

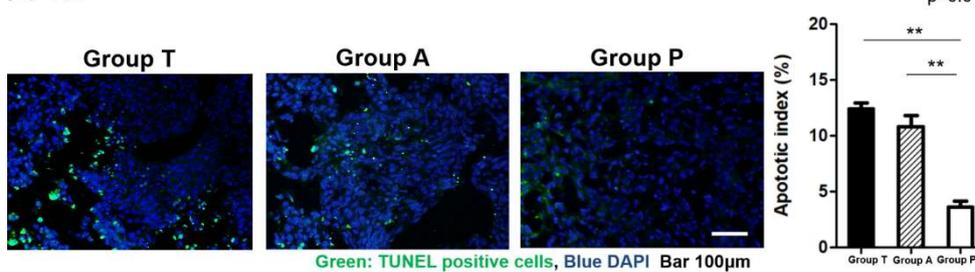
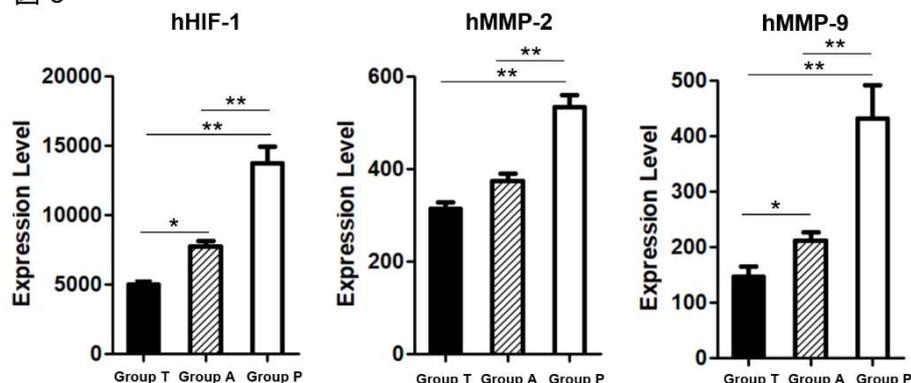


図4C 抗がん剤内包PLGA抱合AdSC移植群(T群)で腫瘍部の有意なアポトーシスの誘導効果が確認された(移植後5週)

また、術後5週の腫瘍組織を用いた qPCR では、T 群と A 群では HIF-1、MMP、MMP9 の発現低下を認め、腫瘍内低酸素状態の改善が確認された。(図 5) AdSC 移植により、局所での腫瘍の線維化抑制、抗炎症効果を引き起こし、腫瘍内低酸素化の改善、抗がん剤の腫瘍内への集積が改善された可能性が示唆された。

図 5



本研究の結果から AdSC 抗がん剤包合体が骨肉腫に対し、線維化の抑制作用を介した抗腫瘍効果を認めることが明らかとなった。骨肉腫に対する新たな Drug delivery system として AdSC の有用性が示唆された。

4 生活や産業への貢献および波及効果

腫瘍選択的 DDS の開発は次世代のがん治療には欠かせない研究分野である。本研究は新しいがん治療法の開発を目的とし、他のがん種への応用や様々な薬剤への応用が期待される。これまでに経静脈的に投与された AdSCs が、炎症部位に集積し抗炎症効果や抗線維化効果を引き起こす事が報告されている。さらに、AdSC は単球・マクロファージと共通の性質としての貪食能を有しているため、PLGA ナノ粒子を細胞質内に取り込む現象も確認できている。本研究では、多分化能を有し種々の組織再生を目的とした自己細胞移植治療のソースとして注目されている AdSC を用いた徐放化抗がん剤包合細胞移植治療という新しいがん治療法の開発の可能性が示された。今後のがん治療研究分野において革新的な領域を創造することになると考えられた。