



Gold Nanoparticles Enhance the Tumor Growth-Suppressing Effects of Cetuximab and Radiotherapy in Head and Neck Cancer In Vitro and In Vivo

佐藤, 匠

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8776号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490001>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

Gold Nanoparticles Enhance the Tumor Growth-Suppressing Effects of Cetuximab and Radiotherapy in Head and Neck Cancer In Vitro and In Vivo

金ナノ粒子は頭頸部癌におけるセツキシマブと放射線療法の腫瘍増殖抑制効果を増強する

佐藤 匠, 笥 康正, 長谷川 巧実, 可信 雅彦, 寺岡 駿,
山口 明啓, 佐々木 良平, 明石 昌也

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
口腔外科学
(指導教員: 明石 昌也 教授)

Takumi Sato
佐藤 匠

Key words: oral squamous cell carcinoma, irradiation, cetuximab, Goldnanoparticles

(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Gold Nanoparticles Enhance the Tumor Growth-Suppressing Effects of
Cetuximab and Radiotherapy in Head and Neck Cancer In Vitro and In Vivo

金ナノ粒子は頭頸部癌におけるセツキシマブと放射線療法 of 腫瘍増殖抑制効果を増強する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

口腔外科学

(指導教員：明石 昌也 教授)

佐藤 匠

【緒言】頭頸部癌の治療法には、外科的手術、放射線療法、免疫療法があり、正常組織に影響を及ぼすことなく癌細胞の根絶が求められる。頭頸部癌は上皮成長因子受容体(EGFR)を発現しており、セツキシマブは EGFR に結合してその働きを阻害する IgG1 モノクローナル抗体で、頭頸部癌の治療法として承認されている。しかし一方でセツキシマブは反応性が低く、重篤な副作用を誘発することでも知られている。金ナノ粒子(AuNPs)は、正常細胞を傷害することなく、放射線療法の局所抗腫瘍効果を増強することが報告されている。今回の研究では、ヒト頭頸部癌細胞株である HSC-3 を用いて In Vitro では金ナノ粒子、セツキシマブ、放射線療法を単独で使った場合とそれらを組み合わせた場合における細胞数と細胞増殖能の低下、アポトーシスの促進を評価した。In Vivo ではヌードマウスに HSC-3 を注射し、担癌マウスを作製した。そのマウスに対し、金ナノ粒子、セツキシマブ、放射線療法を行い、コントロール群と比較し、腫瘍体積を評価した。また、走査型電子顕微鏡を用いた腫瘍組織への金ナノ粒子の存在確認と金ナノ粒子の正常組織への毒性の有無を評価した。

【対象と方法】細胞はヒト舌癌細胞株である HSC-3 を用いた。培養液は DMEM を用い、細胞は $35 \times 10 \text{mm}^2$ のディッシュで 37°C 下、 $5\% \text{CO}_2$ で加湿中のインキュベーターで培養した。In Vitro では、試薬の濃度はいずれも金ナノ粒子(0 または 1nM)、セツキシマブ(0 または 30nM)、放射線量は 4Gy で行った。各実験は 3 回独立して行った。細胞数カウントは金ナノ粒子とセツキシマブを添加し、24 時間後に放射線照射した。48 時間後にブロッキングを行い、 4°C 下で一晩培養した。免疫染色は 1 次抗体に E-cadherin、2 次抗体に DAPI、Cy3 で染色した。蛍光顕微鏡で無作為に 5 視野撮影し、DAPI 陽性の細胞核と E-cadherin 陽性の細胞間接合部をカウントし、平均値を計算した。細胞増殖能実験は 96 穴プレートに 1 穴あたり 5×10^3 個程度の細胞数を振り分け、24 時間培養し、そこに金ナノ粒子、セツキシマブを添加、24 時間経過後放射線照射した。48 時間後に CCK-8 を 1 穴あたり $10 \mu\text{L}$ 添加した。1~4 時間後、 450nm の波長でのマルチモードプレートリーダーで吸光度を測定した。アポトーシス実験はアポトーシス細胞を染色する caspase-3 を用いて免疫染色し、その細胞の割合を計算した。走査型電子顕微鏡での観察は反射電子組成像も撮影し、金ナノ粒子を観察した。ヌードマウスはオスで 4~6 週齢の個体を使用した。腫瘍を背部に打ち込み、4 週間経過し、腫瘍が増大したところで金ナノ粒子、セツキシマブを打ち込み、24 時間後に放射線照射した。その後、3 週間後まで腫瘍体積を測定し、サクリファイス後、腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は包埋、薄切、HE 染色し、断面を評価した。Tukey の多重比較検定を行い p 値は 0.05 以下を有意とした。

【結果】細胞数カウントでは、各群での平均値はコントロール群 374.4 個、金ナノ粒子群 324.1 個、セツキシマブ群 189.6 個、金ナノ粒子とセツキシマブ群 176.7 個

であった。そこに放射線照射した場合、それぞれ 148.6 個、122.7 個、100.2 個、59.5 個であった。アポトーシス実験では caspase-3 陽性の細胞割合はそれぞれの群で、0.4%、0.3%、4.3%、5.8%、4.1%、9.1%、25%、31%であった。細胞増殖能実験ではそれぞれの群で、吸光度は 102%、120%、77%、93%、88%、106%、51%、31%と金ナノ粒子とセツキシマブと放射線照射群では明らかに細胞増殖能が低下していた。マウスを用いた腫瘍増殖抑制効果の実験では、腫瘍体積の平均はそれぞれ、169.3mm³、170.2 mm³、65.7 mm³、62.4 mm³、82.6 mm³、60.3 mm³、50.2 mm³、39.8 mm³であった。それらの腫瘍断面も HE 染色にて観察し、体積減少していることを確認した。さらに、走査型電子顕微鏡にて細胞内に金ナノ粒子が存在することも確認した。正常組織は、肝臓、心臓、腎臓、肺を摘出し、コントロール群と金ナノ粒子群間で臓器の変性の有無を比較したところ、両群で著変が無いことを確認し、金ナノ粒子の細胞毒性が無いことが示された。

【考察】今回の研究で、金ナノ粒子とセツキシマブと放射線療法を組み合わせることによって腫瘍抑制効果が増強することが示された。金ナノ粒子は単独では腫瘍抑制効果は示さないため、その組み合わせが重要であり、セツキシマブの用量を増加させることでより強い腫瘍抑制効果は示されるだろうが、副作用も増加することが懸念されるため、細胞毒性を示さない金ナノ粒子を応用されることが期待される。その他の報告では、セツキシマブとトラスツズマブは金ナノ粒子を直接腫瘍に向かわせ放射線療法の効果を増強することやセツキシマブは切除困難な腫瘍に対しパクリタキセルのようなタキサン系抗癌剤と併用して臨床的に適用されている。これが癌の種類によって差異があるかどうかはまだ分かっていない。また、近年ではペムブロリズマブなどの免疫チェックポイント阻害剤、PDL1 標的療法が主要な治療選択肢となっている。これらはシスプラチンや他の抗癌剤と併用されている。より高い抗腫瘍効果を達成するためにこういった抗癌剤との併用療法の可能性を検討する必要がある。放射線治療の効果を高める金ナノ粒子は今後、臨床への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3347 号	氏 名	佐藤 匠
論 文 題 目 Title of Dissertation	Gold Nanoparticles Enhance the Tumor Growth-Suppressing Effects of Cetuximab and Radiotherapy in Head and Neck Cancer In Vitro and In Vivo 金ナノ粒子は頭頸部癌におけるセツキシマブと放射線療法 の腫瘍増殖抑制効果を増強する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner 丹生 博一 福山 隆司 掛地 昌弘		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

【緒 言】

頭頸部癌の治療法には、外科的手術、放射線療法、免疫療法があり、正常組織に影響を及ぼすことなく癌細胞の根絶が求められる。頭頸部癌は上皮成長因子受容体(EGFR)を発現しており、セツキシマブはEGFRに結合してその働きを阻害するIgG1モノクローナル抗体で、頭頸部癌の治療法として承認されている。しかし一方でセツキシマブは反応性が低く、重篤な副作用を誘発することでも知られている。

金ナノ粒子(AuNPs)は、正常細胞を傷害することなく、放射線療法の局所抗腫瘍効果を増強することが報告されている。今回の研究では、ヒト頭頸部癌細胞株であるHSC-3を用いてIn Vitroでは金ナノ粒子、セツキシマブ、放射線療法を単独で使用した場合とそれらを組み合わせた場合における細胞数と細胞増殖能の評価、アポトーシス細胞割合を評価した。In VivoではヌードマウスにHSC-3を注射し、担癌マウスを作製した。そのマウスに対し、腫瘍内外での抑制効果を期待するために金ナノ粒子、セツキシマブを直接打ち込み、放射線療法を行い、コントロール群と比較し、腫瘍体積と体重を評価した。また、走査型電子顕微鏡を用いた腫瘍組織への金ナノ粒子の存在確認と金ナノ粒子の正常組織への毒性の有無を評価した。

【対象と方法】

細胞はヒト舌癌細胞株であるHSC-3を用いた。培養液はDMEMを用い、細胞は $35\times 10\text{mm}^2$ のディッシュで 37°C 下、5% CO_2 で加湿中のインキュベーターで培養した。In Vitroでは、試薬の濃度はいずれも金ナノ粒子(0または1nM)、セツキシマブ(0または30nM)、放射線量は4Gyで行った。各実験は3回独立して行った。細胞数カウントは金ナノ粒子とセツキシマブを添加し、24時間後に放射線照射した。48時間後にブロッキングを行い、 4°C 下で一晩培養した。免疫染色は1次抗体にE-cadherin、2次抗体にDAPI、Cy3で染色した。蛍光顕微鏡で無作為に5視野撮影し、DAPI陽性の細胞核とE-cadherin陽性の細胞間接合部をカウントし、平均値を計算した。細胞増殖能実験は96穴プレートに1穴あたり 5×10^3 個程度の細胞数を振り分け、24時間培養し、そこに金ナノ粒子、セツキシマブを添加、24時間経過後放射線照射した。48時間後にCCK-8を1穴あたり $10\mu\text{L}$ 添加した。1〜4時間後、450nmの波長でのマルチモードプレートリーダーで吸光度を測定した。アポトーシス実験はアポトーシス細胞を染色するcaspase-3を用いて免疫染色し、その細胞の割合を計算した。走査型電子顕微鏡での観察は反射電子組成像も撮影し、金ナノ粒子を観察した。ヌードマウスはオスで4〜6週齢の個体を使用した。腫瘍を背部に打ち込み、4週間経過し、腫瘍が増大したところで金ナノ粒子、セツキシマブを腫瘍に直接打ち込み、24時間後に放射線照射した。その後、3週間後まで腫瘍体積を測定し、サクリファイス後、腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は包埋、薄切、HE染色し、断面を評価した。統計分析は一元配置分散分析とTukeyの多重比較検定を行いp値は0.05以下を

有意とした。

【結 果】

細胞数カウントでは、各群での平均値はコントロール群 374.4 個、金ナノ粒子群 324.1 個、セツキシマブ群 189.6 個、金ナノ粒子とセツキシマブ群 176.7 個であった。そこに放射線照射した場合、それぞれ 148.6 個、122.7 個、100.2 個、59.5 個であった。アポトーシス実験では caspase-3 陽性の細胞割合はそれぞれの群で、0.4%、0.3%、4.3%、5.8%、4.1%、9.1%、25%、31%であった。細胞増殖能実験ではそれぞれの群で、吸光度は 102%、120%、77%、93%、88%、106%、51%、31%と金ナノ粒子とセツキシマブと放射線照射群では明らかに細胞増殖能が低下していた。マウスを用いた腫瘍増殖抑制効果の実験では、腫瘍体積の平均はそれぞれ、169.3mm³、170.2 mm³、65.7 mm³、62.4 mm³、82.6 mm³、60.3 mm³、50.2 mm³、39.8 mm³であった。それらの腫瘍断面も HE 染色にて観察し、体積減少していることを確認した。さらに、走査型電子顕微鏡にて細胞内に金ナノ粒子が存在することも確認した。正常組織は、肝臓、心臓、腎臓、肺を摘出し、肉眼的形態を観察し、形、色、表面性状を評価した。コントロール群と金ナノ粒子群間で臓器の変性の有無を比較したところ、両群で著変が無いことを確認し、金ナノ粒子の細胞毒性が無いことが示された。

【考 察】

今回の研究で、金ナノ粒子とセツキシマブと放射線療法を組み合わせることによって腫瘍抑制効果が增強することが示された。金ナノ粒子とセツキシマブと放射線療法を併用した際の細胞数の減少はアポトーシスの誘導によるものであり、腫瘍抑制効果は細胞増殖の抑制によるものではないかと考えられた。金ナノ粒子は単独では腫瘍抑制効果を示さないため、その組み合わせが重要である。近年、セツキシマブは切除困難な腫瘍に対しパクリタキセルのようなタキサン系抗癌剤と併用して臨床的に適用されている。一方、免疫チェックポイント阻害剤も再発転移進行頭頸部癌に対する治療選択肢となり、シスプラチンや他の抗癌剤とも併用されている。より高い抗腫瘍効果を達成するためにこういった抗癌剤との併用療法の可能性を検討する必要がある。

【結 論】

本研究は金ナノ粒子の頭頸部癌に対する治療効果を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったセツキシマブと放射線療法の腫瘍増殖抑制効果を增強することを示した価値ある修正であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。