



Gold Nanoparticles Enhance EGFR Inhibition and Irradiation Effects in Head and Neck Squamous Carcinoma Cells

Kashin, Masahiko

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2021-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7937号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007937>

※ 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)

学位論文の内容要旨

Gold Nanoparticles Enhance EGFR Inhibition and Irradiation Effects in Head and Neck Squamous Carcinoma Cells

金ナノ粒子は頭頸部扁平上皮癌細胞に対する
EGFR 阻害薬と放射線の作用を増強する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

歯科口腔外科学

(指導教員：明石 昌也教授)

可信 雅彦

【緒言】

頭頸部癌の 90%以上が扁平上皮癌であり、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）の 90%以上が上皮成長因子受容体（EGFR）を過剰発現している。EGFR の過剰発現は、生存率の低下、放射線治療（RT）抵抗性および局所再発の増加と相関している。現在セツキシマブが唯一、EGFR 受容体阻害薬（EI）として HNSCC の放射線治療と組み合わせて用いられているが、**monotherapy** では期待される効果が得られていない。更に効果的な EGFR 発現 HNSCC に対する治療戦略が求められている。

近年ナノ粒子（NP）の RT 増感効果については広く研究されており、特に金ナノ粒子（AuNP）は、さまざまなサイズや形状に簡単に合成出来、生体における安全性が十分に確立されているため、放射線増感剤として期待されている。また AuNP は抗体やペプチドなど、癌を選択的に認識するためのプローブとして使用できる多くの生物学的リガンドと容易に結合させる事が可能である。

したがって、抗 EGFR 抗体と結合した AuNP は、HNSCC などの EGFR 過剰発現腫瘍の治療に有用である可能性がある。なお、AuNP と結合した抗 EGFR モノクローナル抗体（EGFRmAb）は、喉頭扁平上皮癌および乳癌細胞のアポトーシスを誘導する可能性があるが過去に報告されているが、HNSCC 細胞における放射線+EGFR 阻害薬-AuNP の影響は不明である。この組み合わせの有用性を cell counting assay、measurement apoptosis、proliferation assay および wound healing assay を用いて評価した。

【対象と方法】

ヒト HNSCC 細胞株 HSC3 を培養し、初代培養から 2~10 継代の細胞を使用した。AuNP は 60nm 径を使用し、EGFR 阻害薬としてチロシンキナーゼ阻害薬の AG1478 を使用した。

• AuNP と AG1478 の吸着

表面増強ラマン分光（SERS）を行い評価した。SERS 測定において、分子が貴金属の表面に吸着する事で、バルク分子と比較しラマン散乱の強度が大幅に増幅される。この特性を利用し AuNP と AG1478 の吸着を評価した。

AG1478 溶液、AG1478+AuNP 溶液、AuNP 溶液をラマン分光器 RAM100S にセットし SERS 測定を行った。

• TEM 画像を用いた細胞内への AuNP の取り込み評価

AG1478 と吸着した AuNP の細胞内への取り込みを、TEM で評価した。

・ AuNP を添加

・ AuNP と AG1478 の混合物を添加

それぞれを培養し、固定後切片を作成し TEM を用い、デジタル画像を撮影した。

• 実験群

HSC3 細胞を培養し

- ・ 試薬の添加なし
- ・ AuNP を添加
- ・ AG1478 を添加
- ・ AuNP と AG1478 を添加
- ・ 試薬の添加なし+4Gy 照射
- ・ AuNP を添加+4Gy 照射
- ・ AG1478 を添加+4Gy 照射
- ・ AuNP と AG1478 を添加+4Gy 照射

の計 8 群を作成した。放射線の照射は試薬の添加から 37℃、24 時間のインキュベート後行った。更に細胞を 37℃で 48 時間インキュベートした後、各実験を行った。

- Cell count assay

35×10mm ポリスチレン組織培養皿にマイクロガラスを留置した上で細胞を培養し、上記の実験群を作成した。24 時間のインキュベート後に放射線照射を行い、更に 48 時間後に固定、ブロッキング等の処理後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色し検体を FluorSave に包埋した。検体を BZ-X 700 蛍光顕微鏡で観察し、ランダムに撮影した 10 枚の画像の DAPI 陽性細胞の数をカウントし平均値を得た。

- Measurement of apoptosis

Cell count assay と同様の実験群で細胞培養を行い、24 時間のインキュベート後に放射線照射、更に 48 時間後に固定、ブロッキングを行った。

1 次抗体として caspase3 を用い、対応する 2 次抗体としての Cy3 と DAPI で染色を行った。検体を FluorSave に包埋し、BZ-X 700 蛍光顕微鏡で観察し、10 枚の画像をランダムに撮影した。全細胞数の内、アポトーシス細胞の割合を求め平均値を得た。

- Proliferation assay

生細胞数は、CCK-8 を用いて評価した。細胞を 96 ウェルプレートに懸濁し、AG1478、AuNP を各ウェルに添加し 8 つの実験群を作成した。24 時間のインキュベーション後、細胞に放射線を照射した。照射の 48 時間後に細胞に CCK-8 溶液を加え、マイクロプレートリーダーを使用して 450nm で吸光度を測定した。

- Wound healing assay

細胞を 6 ウェルプレートで培養し、70～80%の confluence まで増殖させ、AG1478、AuNP を添加し、8 つの実験群を作成した。放射線は 24 時間のインキュベート後に照射し、更に 48 時間後、細胞単層を滅菌済みの 200μL 使い捨てプラスチックピペットチップでこすり落とし、PBS で洗浄した。こすり落とした部分の創傷治癒を 37℃で 0、4、8、12、16、20、24 時間後に顕微鏡で観察した。

画像は BZ-X700 蛍光顕微鏡で撮影し、創傷部分の面積は分析ソフトウェア BZ-H4M で算出した。

【結果】

- AuNP と AG1478 の吸着

AuNP+AG1478 群では AuNP 単独群、AG1478 単独群とは明らかに異なるスペクトラムが観察された。

- TEM 画像による評価

TEM 画像において、細胞内に取り込まれた AuNP が観察された。細胞内に取り込まれた AuNP の数は AuNP 単独を添加した群と AuNP+AG1478 を添加した群で有意差は認めなかった。

- Cell counting assay

control および AuNP 単独添加群と比較し、他の 6 群はすべて細胞数の有意な減少を示した。AuNP、AG1478 の添加および 放射線照射の組み合わせにより、細胞数が大幅に減少した。

- Proliferation assay

AuNP を単独で添加した群と比較し、AuNP+AG1478 を添加した群では、放射線の照射、非照射に関わらず有意に減少した。

- Measurement of apoptosis

AuNP を添加し、放射線照射を行った群はその他の条件群と比較しアポトーシス細胞の数が増加することが示された。

AuNP+AG1478 を添加し、放射線照射を行った群では、AuNP を単独で添加し放射線照射を行った群と比較して更にアポトーシス細胞の数が増加する事が示された。

- Wound healing assay

AG1478 を単独で添加した群と比較し、AuNP を添加、または放射線を照射、もしくはどちらも追加することで細胞の運動性は低下した。

【考察】

SERS 測定により、AuNP+AG1478 群ではその他の群と比較し明らかに異なるスペクトラムが観察され、AG1478 と AuNP の吸着が示唆された。

AuNP + AG1478 +放射線照射の組み合わせが細胞数を最も減少させることが示された。AG1478 が吸着した AuNP を添加する事による細胞数の減少は細胞増殖の抑制による事が示され、AuNP+放射線による細胞数の減少はアポトーシスの誘導による事が示された。

AuNP + AG1478 を添加した群では、AG1478 のみを添加した群と比較して細胞遊走活性が低下した。過去にも報告されているように、EGFR 阻害薬を単独で添加した場合と比較し、表面への EGFR 阻害薬の吸着により抗癌効果を増強した AuNP を添加することで引き起こされたと考えられた。

AuNP の細胞内への取り込みは TEM で分析したが、AG1478 を使用した場合と使用しない場合の AuNP に有意差は認めなかった。共凝集法では 60nm 未満の AuNP の測定が困難であるため、本研究では 60nm の AuNP を使用した。ただし過去の報告では AuNP に結合した HER2 阻害薬が効率的に細胞に内在化され、細胞毒性メカニズムに影響を与える可能性があるとされており、同研究では 40～50 nm の AuNP が

最も効果的であると報告されている。本研究では、細胞への AuNP の内在化が TEM で確認されたが、AG1478 の添加が AuNP の内在化に影響を与えなかった理由は今後の研究課題である。

AuNP+放射線照射によりその他の群よりもアポトーシス細胞の割合が増加する事が認められた。また、AuNP+AG1478+放射線照射によりアポトーシス細胞の割合は更に増加した。なお、過去の報告では AuNP に結合した EI が DNA 損傷に多大な影響を与え、細胞損傷とアポトーシスの増加に起因する事が示唆されている。

ただし、ROS 産生を始めとするアポトーシス以外の細胞の生存率に影響を与えうる要因については更なる評価が必要である。

本研究では、AuNP の添加による *in vitro* での AG1478 の細胞毒性と放射線照射増感効果が示されたが、*in vivo* での研究が必要である。また、AuNP は、代謝と排泄の方法が確立されていないため、半永久的に体内に残る可能性がある事も今後の研究課題ではあるものの、AuNP や EI を併用しての治療は、腫瘍への直接注射や超選択的動注療法等の範囲を絞った治療法を用いる事が出来るため、頭頸部扁平上皮癌、特に口腔癌の治療法として期待されると考えられる。