

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

HER2-targeted gold nanoparticles potentially overcome resistance to trastuzumab in gastric cancer

(金ナノ粒子を用いた HER2 標的療法によるトラスツズマブ耐性胃癌への治療)

久保田哲史、黒田新士、金谷信彦、森廣俊昭、青山克幸、垣内慶彦、菊地覚次、西崎正彦、香川俊輔、田澤 大、藤原俊義

Nanomedicine 14(2018): 1919-1929,2018

平成 27 年 4 月 American Association for Cancer Research 2015 Annual Meeting に発表

平成 27 年 7 月 第 31 回 日本 DDS 学会に発表

平成 28 年 4 月 American Association for Cancer Research 2016 Annual Meeting に発表

平成 28 年 10 月 第 74 回日本癌学会に発表

平成 28 年 5 月 第 37 回癌免疫外科研究会に発表 研究奨励賞受賞

平成 29 年 4 月 第 117 回日本外科学会に発表

主 論 文

HER2-targeted gold nanoparticles potentially overcome resistance to trastuzumab in gastric cancer

(金ナノ粒子を用いた HER2 標的療法によるトラスツズマブ耐性胃癌への治療)

【緒言】

トラスツズマブ (Tmab) は、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) に結合し、腫瘍増殖を抑制するヒト化モノクローナル抗体である。HER2 陽性乳癌および胃癌に臨床使用されているが、耐性の獲得や、陽性率が 20~30% という問題点もある。Tmab 耐性を有する HER2 陽性乳癌に対しては、トラスツズマブエムタンジン (T-DM1)、ラパチニブおよびペルツズマブなどの新規 HER2 標的治療剤が開発され、既に臨床使用されているが、胃癌ではいずれの薬剤も臨床試験で有効性を示せず、Tmab 耐性 HER2 陽性胃癌に有効な HER2 標的化治療剤は存在しない。

ナノテクノロジーは、薬物送達の改善など医療分野の進歩に大きく貢献している。腫瘍組織は血管漏出性とリンパ排水能が低下から、ナノサイズ (10~200nm) の粒子が蓄積しやすい EPR 効果がある。また、AuNP は生体内での高い安定性、様々な分子との結合性、広い表面積などの特性を有し、薬物送達に理想的なナノ粒子の一つである。

本研究では、Tmab を AuNP の表面に結合させて新規 HER2 を標的とする AuNP (T-AuNPs) を作製し、抗腫瘍効果および細胞毒性機構を *in vitro* および *in vivo* で調べた。

【方法】

Tmab 搭載金ナノ粒子(T-AuNPs)の合成

T-AuNPs は基本的に、Kumar らによって報告された方法で合成した。Tmab 単剤、Tmab および C-AuNPs (Tmab +C-AuNPs) の混和物、抗ウサギ IgG 抗体 (IgG-AuNPs) と結合した AuNPs、PEG (C-AuNPs) のみで覆われた AuNPs をコントロール薬とした。合成された AuNPs の表面のプラスモン共鳴 (SPR) を分光光度計で測定し、サイズと表面の電荷は、dynamic light scattering (DLS) で測定した。

細胞株および細胞培養

ヒト胃癌細胞系 MKN7 (HER2 陽性、Tmab 抵抗株)、MKN74 (HER2 陰性)、NCI-N87 (HER2 陽性) とヒト肺線維芽細胞線 NHLF を使用した。胃癌細胞系は 10%胎児牛血清 (FCS) を補充した RPMI 培養液で培養し、NHLF 細胞は 10%FCS を補充した FBM 培養液で培養した。

組み換え型アデノウイルス

HER2 の細胞外ドメイン (ECD) を発現するアデノウイルスベクター (Ad/HER2-ECD) を用

いて MKN74 に HER2-ECD を過剰発現させた。

細胞生存分析

MKN7、MKN74、NCI-N87 および NHLF 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、T-AuNPs、コントロール薬で 3 日間処理し cell viability assay を施行した。

Lipid Hydroperoxide (LPO) assay

細胞の脂質過酸化を測定することで酸化ストレスを評価した。細胞生存分析同様に 2 日間処理した MKN7 と NCI-N87 細胞を回収し LPO assay kit を用いて調べた。

ウエスタンブロット

PARP, 微小管関連蛋白 light chain 3 (LC3), AKT, pAKT, mTOR, pmTOR, HER2, pHER2, EGFR, PTEN and β -actin の蛋白の発現を測定した。 β -アクチン分析によって試料が等量充填されていることを確認した。

暗視野顕微鏡

MKN7 細胞を T-AuNPs または PBS で 24 時間処理し、U-DCD 暗視野コンデンサーを備えた顕微鏡を用いて観察した。

共焦点蛍光顕微鏡

MKN7、NCI-N87 および MKN74 細胞を Alexa Fluor 647 で標識した T-AuNPs または Alexa Fluor 647 で標識した Tmab とリソソームで染色し 4、12、24 時間で共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察した。

電子顕微鏡

T-AuNPs は、透過型電子顕微鏡 (TEM) および走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて画像化し、10nm の金結合ヤギ抗マウス IgG で標識することで T-AuNPs 表面の Tmab 結合を確認した。

In vivo

NCI-N87 および MKN7 細胞を、BALB/c ノードマウスおよび NOD/SCID マウスの脇腹に皮下注射して皮下腫瘍を形成し、NCI-N87 移植マウスを 5 群 (PBS、T-AuNPs、コントロール薬) (n = 5-7) および MKN7 マウスを 3 群 (PBS、Tmab および T-AuNPs) (n = 5-7) に分け、腫瘍内に 3 回/週の注射をした。各腫瘍の直径を 31 日目まで週 2 回測定し、腫瘍体積 (mm^3) = $a \times b^2 \times 0.5$, (a は最長直径、b は最短直径) で計算した。また、別実験で NCI-N87 皮下腫瘍に対して 3 回皮下注射した 3 日後に腫瘍を採取し、LC3 の発現を免疫組織染で評価した。

統計分析

すべてのデータを平均±SDとして表す。グループ間の差異を Student's *t* 検定で有意性について調べた。P 値<0.05 を有意とした。

【結果】

T-AuNPs の特性

DLS 分析は、T-AuNPs、C-AuNPs、AuNPs のサイズが $85.39 \pm 0.68 \text{ nm}$ 、 $94.12 \pm 0.32 \text{ nm}$ 、 $78.60 \pm 0.34 \text{ nm}$ であり、z 電位が $39.43 \pm 0.85 \text{ mV}$ 、 $94.12 \pm 0.32 \text{ nm}$ 、 $-43.70 \pm 0.10 \text{ mV}$ を示した。分光光度計で、AuNPs と T-AuNPs 間の SPR における数 nm のピーク波長シフトを確認した。TEM および SEM 画像で、50~80nm の T-AuNPs が安定して媒体中に分散していることを示し、免疫電子顕微鏡画像は、10nm の AuNPs で標識されたいくつかの Tmab が T-AuNPs の表面上にあることを示した。

胃癌細胞株に対する T-AuNPs の細胞傷害活性

NCI-N87 細胞に対する C-AuNPs、Tmab、T-AuNPs での 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は、T-AuNPs で C-AuNPs よりも 4.5 倍、Tmab よりも 6 倍高い細胞毒性活性を示した。次に、全細胞株でコントロール薬と T-AuNPs を比較し、T-AuNPs は HER2 選択的に高い細胞毒性を示した。さらに Tmab 耐性 MKN7 細胞株では Tmab が効果を示さなかったが、T-AuNPs は強力な細胞毒性を示した。

T-AuNPs の細胞毒性機構

ウェスタンブロット分析で T-AuNPs が強い LC3-II 発現を誘導し、独自の細胞障害性を有することを確認した。オートファジー阻害剤である 3-メチルアデニン (3-MA) を添加すると、T-AuNPs による細胞障害性が有意に遮断され、T-AuNPs によるオートファジー誘発が証明された。LPO assay で T-AuNPs による酸化ストレスの誘導が観察された。また、ウェスタンブロット分析により、T-AuNPs が HER2 シグナル伝達の下流タンパク質である AKT のリン酸化を阻害し、mTOR のリン酸化も阻害することを確認した。

T-AuNPs の細胞内への取り込みと局在

暗視野顕微鏡により T-AuNPs 処理した細胞でより多くの金粒子が観察された。次に TEM で、処理の 24 時間後に T-AuNPs が実際に細胞内に内在化していることを確認した。さらに、赤色蛍光色素で標識した Tmab を用いて共焦点顕微鏡法により Tmab と T-AuNPs の細胞内位置をモニターした。細胞内に取り込まれた Tmab の多くは、リソソームに局在していたが、細胞内に内在化した T-AuNPs の多くはリソソームに内包されなかった。

HER2 陰性胃癌細胞における T-AuNPs と人工 HER2 過剰発現との併用療法

低い HER2 陽性率を克服するために、MKN74 に Ad / HER2-ECD で HER2 過剰発現させ T-AuNP の併用療法を試験した。Tmab は MKN74 と HER2 過剰発現させた MKN74 細胞とも細胞障害性を示さなかったが、T-AuNPs は HER2 過剰発現後の MKN74 細胞の細胞増殖阻害に有効であった。共焦点蛍光顕微鏡は、T-AuNPs が HER2 過剰発現 MKN74 細胞に処置後 24 時間で細胞質に効果的に内在化されることを示したが、MKN74 細胞には内在化しなかった。

マウス皮下腫瘍モデルに対する T-AuNPs の抗腫瘍効果

T-AuNPs の腫瘍内注入は、Tmab および Tmab + C-AuNPs を含む対照と比較し、NCI-N87 腫瘍の増殖を有意に抑制し、Tmab 耐性 MKN7 腫瘍の増殖も有意に抑制した ($p < 0.05$)、一方で Tmab は抗腫瘍効果を示さなかった。オートファジーマーカー LC3-II による NCI-N87 皮下腫瘍の免疫染色は、T-AuNPs が対照と比較して強力なオートファジーを誘導したことを示した。

【考察】

現在、乳癌とは対照的に Tmab 耐性を有する転移性胃癌に対して効果的な HER2 標的化治療剤は存在せず有効な新規治療薬の開発が望まれる。本研究で T-AuNPs は効果的であった。ヒトにおける AuNPs の安全性の観点から見ると、金化合物は関節リウマチの治療薬として使用されている長い歴史 (80 年以上) があり、AuNPs を用いるのは臨床適用に適している。AuNP 含有薬物は臨床的に承認されていないが、PEG 化コロイド金ナノ粒子の表面に組換えヒト腫瘍壊死因子 α (rhTNF) を結合させた CYT-6091 は、臨床試験で明らかな副作用なしに全身に安全に投与されたことが最近証明された。

T-AuNPs は、胃癌細胞株に対して強い HER2 選択的細胞傷害活性を発揮し、Tmab 耐性 MKN7 細胞系に対しても強力な細胞傷害活性を示した。この効果は、オートファジーの誘発を通じてもたらされたと考えられた。この autophagy 誘導は T-AuNPs のインターナリゼーションによって引き起こされると考えられ、TEM および共焦点蛍光顕微鏡法によりリソソームによってカプセル化されずに細胞質内で独立して散乱されるという興味深い発見があった。この現象と細胞障害活性の関係を明らかにするためにさらなる研究が必要である。T-AuNPs の細胞毒性機構には HER2 シグナルへの影響、酸化ストレスによる影響も示唆されており、さらなる研究が必要である。

一方で T-AuNPs には課題もある。1 つは全身投与である。NCI-N87 皮下腫瘍マウスモデルに尾静脈をして T-AuNPs の生体分布を調べたところ、ほぼ肝臓に蓄積し腫瘍組織ではわずかしら観察されなかった。本研究では、以前の報告に基づきナノ粒子の内在化で有利な 50nm の AuNPs を使用したが、全身投与するためにはより小さい系のナノ粒子が有効と報告されており、粒子径の検討は薬剤化を目指すうえで課題である。もう一つは、免疫と T-AuNPs の効果に関する実験の欠如である。抗体ベースの治療の細胞毒性機構の 1 つは抗体依存性細胞障害 (ADCC) であり、免疫能力のあるマウスのような免疫系が働いている環境で T-AuNPs がどのような効果をもたらすか、今後の課題である。

【結論】

T-AuNPs は細胞内に内在化することによって誘発されるオートファジーを介して、Tmab 感受性および Tmab 耐性胃癌細胞の両方に対して強力な細胞毒性効果を発揮することを実証し、HER2 陰性胃癌細胞に対しても HER2-ECD 過剰発現と組み合わせると有効であることが証明された。全身投与による腫瘍への到達ができないため、臨床使用に最適な HER2 標的剤ではないことは明らかであるが、Tmab 送達に AuNPs を使用するという概念は、Tmab に対する獲得した耐性を克服することが期待される新しい HER2 標的療法剤開発において新たな道を切り開く可能性を秘めていると考えられた。