

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01342

研究課題名(和文)音響化学と分子標的治療を融合させた革新的がん治療法の開発

研究課題名(英文)Study on Combination of Sonodynamic therapy and Molecularly targeting

研究代表者

桑原 弘行(Kawahara, Hiroyuki)

横浜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10598642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、in vitroでCD20陽性ヒトバーキットリンパ腫由来細胞株Raji細胞培養株に対して抗ヒトCD20抗体リツキシマブ(RIT)と超音波照射の併用により抗腫瘍効果の増強を示した。HL-60細胞に対してRITと超音波照射の併用後のアポトーシス誘導を細胞の形態学的変化およびcaspase-3の活性化により、確認した。RIT存在下超音波照射により2倍に増強された細胞傷害作用はヒスチジンにより有意に阻害された。これは、RIT存在下、音響化学的に活性酸素種が産生されることを示唆している。これらの結果は、RITが固形腫瘍に対する音響化学的治療において、音響増感剤となりうることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, the sonodynamically induced antitumor effect of Rituximab (RIT) was investigated in CD20-positive human Burkitt's lymphoma-derived cell line, Raji cells. Apoptosis was examined after the combination of SDT and RIT in HL-60 cells. Apoptosis was analyzed by cell morphology and caspase-3 activity. The cell damage induced by sonication was enhanced by two-fold in the presence of RIT. Histidine significantly inhibited this enhancement. This inhibitory effect suggests that the sonodynamically induced antitumor effect was mediated by sonodynamically generated reactive oxygen species. These results suggest that PHF is a potential sonosensitizer for sonodynamic treatment of solid tumors.

研究分野：臨床薬剤学

キーワード：超音波 音響化学 分子標的薬 CD20抗原

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤は、細胞分裂の過程に直接作用し細胞傷害を目的として使用されるのに対し、分子標的治療薬は、がん細胞の増殖において特異的な役割を果たす腫瘍細胞あるいは関連細胞の抗原あるいは標的分子に特異的に作用する薬物である。近年その開発・臨床応用が急速に進み、様々な分子標的治療薬の登場によりがん治療は革新的な発展を遂げ、それらの使用実績も蓄積されてきている。しかしながら、抗体製剤の場合、分子標的治療薬の単独投与のみでは必ずしも十分な抗腫瘍効果が得られていないのが現状である。超音波がいくつかのポルフィリン誘導体とナノ粒子が、超音波で音響化学的に活性化することが知られている。また、分子標的治療薬は、がん細胞の増殖において特異的な役割を果たす腫瘍細胞の抗原あるいは標的分子に特異的に作用し抗腫瘍効果を発現する。薬物の音響化学的活性化によって細胞表面抗原の発現を修飾すること可能であれば、これと特異的に結合し抗腫瘍効果を発揮する分子標的治療薬の効果増強させることが期待される。

2. 研究の目的

近年、超音波照射によって細胞表面抗原の発現を変化させることが、報告されており、この抗体と分子標的治療薬を特異的に結合させ抗腫瘍効果を発揮させることが期待されている。さらに分子標的治療と音響化学療法を組み合わせると分子標的治療薬と抗原あるいは標的分子との結合、音響増感剤の組織集積性、および超音波の集束照射技術の3重のターゲティングが可能となる。本研究では、分子標的治療単独の治療限界を克服することを目的に、分子標的治療と超音波による薬物の抗腫瘍活性化を利用した音響化学療法を組み合わせた副作用の限りなく小さい新たな治療システムの開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

最初に、分子標的薬である抗ヒト CD20 抗体リツキシマブ (RIT) と音響化学療法との併用による抗腫瘍効果を、培養細胞で確認した。音響学的抗腫瘍効果を発現することにより抗腫瘍効果を増強するナノ粒子には、薬剤的分子修飾によって水酸基付加した水溶性フラーレンを使用した。殺細胞効果の判定は、CD20 陽性ヒトバーキットリンパ腫由来細胞株 Raji 細胞を用い MTX 法によって行った。さらに活性酸素種に特異的な消去剤による阻害効果によりそれらの殺細胞作用における寄与を確認した。次に、これら微粒子の音響化学活性化機序における活性酸素種の関与および、細胞死におけるアポトーシス誘導の寄与を調べた。

4. 研究成果

その結果、100 μM RIT と 80 μM 水酸化フラーレン (Polyhydroxy small gap hydrated fullerenes, PHF) を用いた音響

化学療法の併用処置が有意な細胞毒性を示した。このことにより水溶性フラーレン誘導体が超音波により活性化しリツキシマブと相乗的な細胞毒性を発現していることが示された。

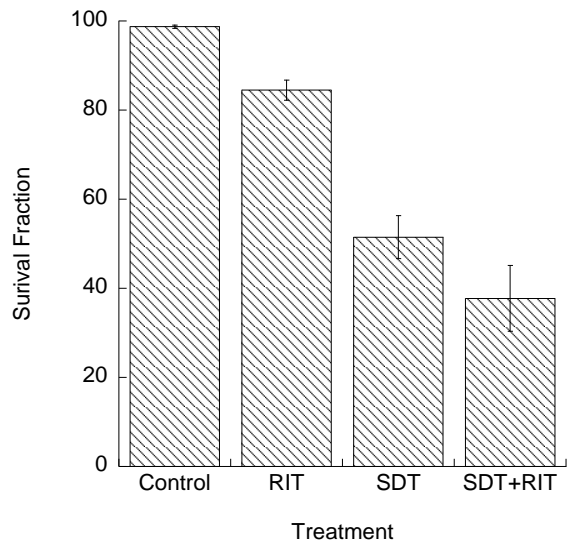


図1 腫瘍細胞に対する音響化学療法とリツキシマブ併用による殺細胞作用

さらに活性酸素種に特異的な消去剤による阻害効果によりそれらの殺細胞作用における寄与を確認した。さらに活性酸素消去剤の添加によりその細胞毒性は有意に低下したことから細胞毒性における活性酸素の関与が示された。

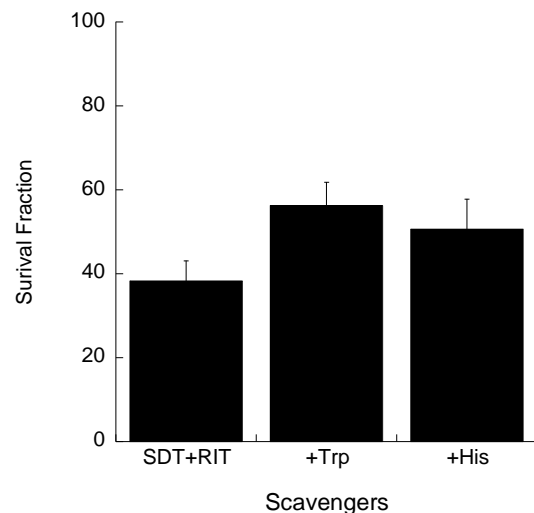
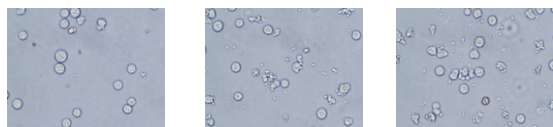


図2 音響化学療法とリツキシマブ併用による殺細胞作用に対する活性酸素消去剤添加の影響

このことにより 100 μM RIT と 80 μM PHF が超音波により細胞毒性を発現していることが示された。さらにトリプトファン (Trp)、ヒスチジン (His) 酸素消去剤の添加によりその細胞毒性は有意に低下したことから細胞毒性における活性酸素の関与が示された。

次に、これらの細胞死におけるアポトーシス誘導の寄与を調べた。アポトーシス誘導の判定は、位相差顕微鏡による形態変化の観察によって培養細胞で確認した。



Control

SDT

SDT+RIT

### 図3 腫瘍細胞に対する音響化学療法とリツキシマブ併用によるアポトーシス誘導

RITと水溶性フラーレンを用いた音響化学療法の併用処置が形態変化の活性化においてアポトーシスの増加が認められた。本研究では、*in vitro*でCD20陽性ヒトバーキットリンパ腫由来細胞株Raji細胞培養株に対して抗ヒトCD20抗体リツキシマブと低強度の超音波照射とナノ粒子を併用することにより抗腫瘍効果が増強されることを示した。さらにリツキシマブと低強度の超音波照射とナノ粒子を併用することによりアポトーシス誘導を*in vitro*で確認した。今後は、*in vivo*での小型動物に移植した固形がんに対する抗腫瘍効果の見積と病理的な検討と難治性がんである「すい臓がん」などへの医療応用が次の課題であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. Nishi K, Suzuki K, Sawamoto J, Tokizawa Y, Iwase Y, Yumita N, Ikeda T Inhibition of Fatty Acid Synthesis Induces Apoptosis of Human Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res.* 36; 4655-4660. 2018
2. Yumita N, Watanabe T, Chen FS, Momose Y, Umemura S. Induction of Apoptosis by Functionalized Fullerene-based Sonodynamic Therapy in HL-60 cells. *Anticancer Res.* 36; 2665-2674. 2018
3. Nakai S, Imaizumi T, Watanabe T, Iwase Y, Nishi K, Okudaira K, Yumita N. Photodynamically-induced Apoptosis Due to Ultraviolet A in the Presence of Lomefloxacin in Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Anticancer Res.* 37; 6407-6413, 2017
4. Nishi K, Kato M, Sakurai S, Matsumoto A, Iwase Y, Yumita N. Enoxacin with UVA Irradiation Induces Apoptosis in the AsPC1

Human Pancreatic Cancer Cell Line Through ROS Generation. *Anticancer Res.* 37; 6211-6214, 2017

5. Yumiko Iwase, Koji Nishi, Junya Fujimori, Toshio Fukai, Nagahiko Yumita, Toshihiko Ikeda, Fu-shin Chen, Yasunori Momose, and Shin-ichiro Umemura Antitumor effect of sonodynamically activated pyrrolidine tris-acid fullerene *Jpn. J. Appl. Phys.* 55; 2016

[学会発表] (計7件)

1. 品田 春佳, 岩瀬 由未子, 西 弘二, 弓田 長彦 エノキサシンと UVA 併用による光化学的作用を利用したアポトーシス誘導 日本薬学会第138年会 (2018)
2. 櫻井 咲希, 西 弘二, 岩瀬 由未子, 弓田 長彦 ニューキノロン系抗菌剤および UVA 併用による膵癌細胞のアポトーシス誘導に影響する構造特性の評価 日本薬学会第138年会 (2018)
3. Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase, Koji Nishi. Anticancer Effects of Functionalized Carbon Nanotubes Combined with Ultrasound Irradiation through Reactive Oxygen Species Generation. 24th Annual Meeting of The Society for Redox Biology and Medicine (SFRBM 2017) (国際学会) (2017)
4. Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase, Koji Nishi. Apoptosis Induction by Functionalized Fullerenes-based Ultrasound Sonodynamic Therapy in HL-60 cells. 2017 Biomedical Engineering Society Annual Meeting (国際学会) (2017)
5. Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase, Koji Nishi, Takahiro Watanabe, Junya Fujimori, Toshio Fukai, Hiroyuki Kuwahara, Shin-ichiro Umemura Sonodynamically Induced Apoptosis by 5-Aminolevulinic acid International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (国際学会) 2016. 7. 3. ~ 2016. 7. 8.
6. Yumiko Iwase, Nagahiko Yumita, Kiyomi Sadamoto, Koji Nishi, Shin-ichiro Umemura Photodynamically Induced Apoptosis by Enoxacin in Ultraviolet A Exposed HL-60 Cells. 第74回日本癌学会学術総会 2015. 10. 8. ~ 2015. 10. 10. 名古屋 (名古屋国際会議場)

7. Yumiko Iwase, Koji Nishi, Junya Fujimori, Toshio Fukai, Nagahiko Yumita, Toshihiko Ikeda, Fu-shin Chen, Yasunori Momose, Shin-ichiro Umemura  
Antitumor effect of sonodynamically activated pyrrolidine tris-acid fullerene  
第 36 回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (USE2015)  
2015. 11. 5. ~2015. 11. 7. つくば国際会館  
(エポカルつくば)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑原 弘行 (KUWAHARA HIROYUKI)  
横浜薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：10598642

### (2) 研究分担者

弓田 長彦 (YUMITA NAGAHIKO)  
横浜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：40191481

岩瀬 由未子 (IWASE YUMIKO)  
横浜薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：00521882

梅村 晋一郎 (UMEMURA SHINICHIRO)  
東北大学・工学部・教授  
研究者番号：20402787