

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：15K01343

研究課題名(和文) がん指向性ナノチューブによる音響化学的アポトーシス誘導を利用したがん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Antitumor Treatment by Sonodynamically Activated Cancer-oriented Carbon Nanotubes

研究代表者

重山 昌人 (Shigeyama, Masato)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90598327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*in vitro*で白血病由来細胞株HL-60細胞に対してポリヒドロキシカーボンナノチューブ(PHCN)と超音波照射の併用によりアポトーシスが誘導された。アポトーシス誘導は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。PHCNと超音波照射の併用により誘発されたアポトーシス細胞数は、PHCNまたは超音波単独処置に比べて有意に高かった。音響化学的に誘発されたアポトーシスおよびcaspase-3活性は、ヒスチジンにより阻害された。これらの結果は、HL-60細胞に対し、PHCNと超音波照射の併用により産生される活性酸素種がアポトーシス誘発に関与することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The present study aims to investigate sonodynamically-induced apoptosis using the Polyhydroxy Carbon Nanotube (PHCN). HL-60 cells were exposed to ultrasound in the absence and presence of PHCN. Apoptosis was analyzed by cell morphology and caspase-3 activity. The number of apoptotic cells showing membrane blebbing and cell shrinkage after combined treatment (ultrasound and PHCN) was significantly higher than following other treatments, including ultrasound alone and PHCN alone. Furthermore, Enhancement of caspase-3 activation was observed in cells treated with ultrasound and PHCN. Sonodynamically induced apoptosis and caspase-3 activation were significantly suppressed by histidine. These results indicate that the combination of ultrasound and PHCN induced apoptosis by reactive active oxygen in HL-60 cells.

研究分野：臨床薬剤学

キーワード：超音波 がん指向性カーボンナノチューブ アポトーシス 音響化学療法 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

がん治療に広く用いられている化学療法は、がん細胞(または組織)を正常細胞(または組織)と識別してアタックする能力において充分ではなく、このため、その現状における副作用は、臨床的に望ましいレベルに必ずしもとどまっていない。細胞がネクロシスを起こした際、細胞内容物が細胞外に流出し炎症などの副作用を起こす。一方、アポトーシスは、遺伝子に支配された遺伝子と言われ、生命の根幹に位置する細胞の自己消去機能と考えられている。アポトーシスは死というよりはむしろ生物が獲得した生への戦略手段であると考えられる。またがん細胞ではアポトーシス誘導能が、消失あるいは減弱しているために異常増殖すると考えられている。組織深部到達性に優れる超音波によって腫瘍集積性薬物を抗腫瘍活性化する音響化学療法によって腫瘍組織に局所的にアポトーシスを誘導することが可能であれば、ネクロシスを経由しない副作用の少ないがん治療が期待される。また、近年、いくつかのナノ粒子が超音波照射によって音響化学的に活性化することが分かってきている。

2. 研究の目的

組織深部到達性に優れる超音波によって腫瘍集積性薬物を抗腫瘍活性化する音響化学療法によって腫瘍組織に局所的にアポトーシスを誘導することが可能であれば、ネクロシスを経由しない副作用の少ないがん治療が期待される。また、近年、いくつかのナノ粒子が超音波照射によって音響化学的に活性化することが分かってきている。本研究では、腫瘍細胞に選択的にアポトーシスを誘導することを目的に、多機能型カーボンナノチューブを超音波照射により音響化学的に活性化しアポトーシスを誘導するがん治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

培養細胞を用いたナノカーボンチューブ誘導体の音響化学活性の評価

最初に、超音波と併用することにより殺細胞効果が発現、または増強されるナノカーボンチューブ誘導体 (PHCN) をスクリーニングを行った殺細胞効果は、細胞膜の色素透過能に基づくトリパンプル排除法によって判定した。

ナノカーボンチューブ誘導体の音響化学的抗腫瘍活性化によるアポトーシス誘導

超音波単独、またはナノカーボンチューブ誘導体との併用によるアポトーシス誘導を、アポトーシス誘導の判定は、蛍光顕微鏡による形態変化の観察とカスパーゼ3の活性化によって培養細胞で確認した。

4. 研究成果

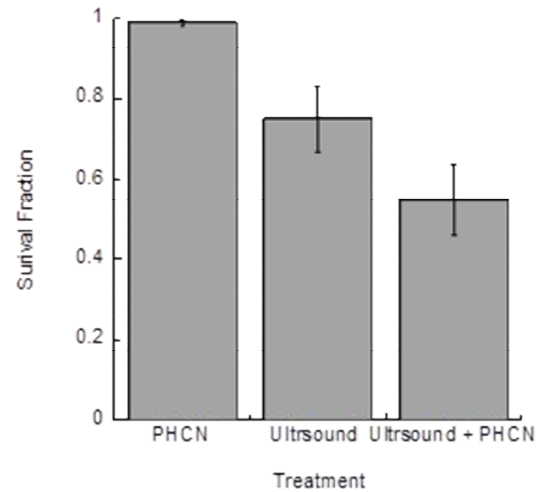


図1 超音波とPHCN併用による殺細胞効果

スクリーニングの結果、水酸化カーボンナノチューブで優れた増強効果を認めた。超音波単独、と比較して超音波と水酸化カーボンナノチューブ併用処置は、細胞の生存率を大きく低下させた。

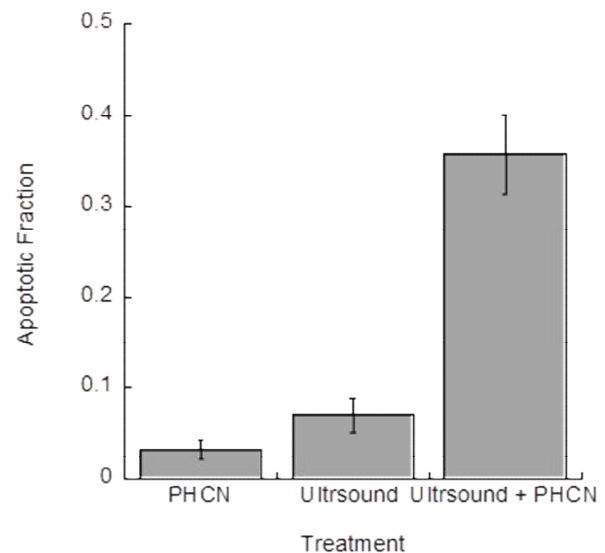


図2 ポリカーボンナノチューブと超音波併用処置時のアポトーシス誘導

形態変化、カスパーゼ3の活性化においてアポトーシスの有意な増加が認められた。またイニシエーター・カスパーゼであるカスパーゼ-3とイニシエーター・カスパーゼであるカスパーゼ8および9の活性化を経時的に測定した。超音波照射開始からカスパーゼ8

および9の活性化に伴いカスパーゼ-3の活性化が観察された。

次に活性酸素種に特異的な消去剤による阻害効果により活性酸素種の殺細胞作用における寄与を確認したところ、ヒスチジン、トリプトファンなどの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。

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

併用による膀胱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

重山 昌人 (SHIGEYAMA MASATO)
横浜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90598327

(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 (MEMURA SHINICHIRO)
東北大学・工学部・教授
研究者番号：20402787