

令和元年9月3日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01381

研究課題名(和文)超音波と薬剤修飾カーボンナノチューブを用いた腫瘍ターゲティング

研究課題名(英文) Sonodynamically Induced Anticancer Targetting by PEG-modified CNTs

研究代表者

弓田 長彦 (Yumita, Nagahiko)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40191481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超音波とPoly ethylene glycol -modified carbon nanotubes (PEG-modified CNTs)を組み合わせた新たな腫瘍ターゲティングシステムの開発を行うことを目的とした。超音波およびPEG-modified CNTs併用による単離または固形腫瘍細胞に対する抗腫瘍作用の増強を確認した。さらに、活性酸素種消去剤添加の殺細胞作用に対する影響を検討したところ、一重項酸素の消去剤であるヒスチジンの添加が、超音波とPEG-modified CNTs併用処置のみが殺細胞効果を著しく抑制することを認め、その作用機序における一重項酸素の関与を推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は超音波とPEG-modified CNTsなどの音響化学物質を併用することにより腫瘍を選択的に単離または固形腫瘍細胞に対する抗腫瘍作用を確認することができた。これは、副作用が少なく腫瘍およびその周辺部位に対し選択的治療効果を示す治療法の開発に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Poly ethylene glycol -modified carbon nanotubes (PEG-modified CNTs) have attracted particular attention due to their potential application to tumor imaging and therapy as carbon nano materials. In this study, the sonodynamically induced antitumor effect of PHF was investigated. Both in vitro and in vivo antitumor effects were tested in combination with ultrasound at 2 MHz. The rate of ultrasonically induced damage on isolated sarcoma180 cells in air-saturated suspension was enhanced by twice with 80 microM PHF. This enhancement was significantly inhibited by histidine, which may suggest it was mediated by ultrasonically induced oxidation. The coadministraion of 25 mg/kg PEG-modified CNTs followed by ultrasonic exposure at 2 MHz suppressed the growth of implanted colon 26 tumors at an intensity with which ultrasound alone showed only a slight antitumor effect. The induction of apoptosis observed after the combination treatment of PHF with ultrasound.

研究分野：医用工学

キーワード：超音波 薬剤修飾カーボンナノチューブ ナノ粒子 音響化学活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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。外部エネルギーを用いた治療システムを DDS と融合することにより、薬物の放出性やがん組織における濃度の向上、細胞内への薬物導入の促進が期待される。

2. 研究の目的

超音波は生体において深達性に優れ、集束して局所的に照射ができるため外部エネルギーとして用いれば、生体深部にある患部にもピンポイントで適用することができる。さらに、超音波の音圧に感応して周波数特異的に共振するナノ微粒子でがん組織を標的化すると、ナノ微粒子が目的部位に集積したかどうかを超音波画像診断によって可視化し確認できる。そして、図1に示すように薬物の集積を確認した上で、超音波を照射し、ナノ粒子を音響化学的に活性化させることで、選択的に抗腫瘍効果を発現することができる。そこで、本研究では、DDS 単独の技術的な限界を克服することを目的に、遠隔作用力を持つ外部エネルギーである超音波と音響化学的に抗腫瘍活性化するナノ粒子である Poly ethylene glycol -modified carbon nanotubes (PEG-modified CNTs)(図1)を組み合わせた新たな治療システムの開発を行うことを目的とする。

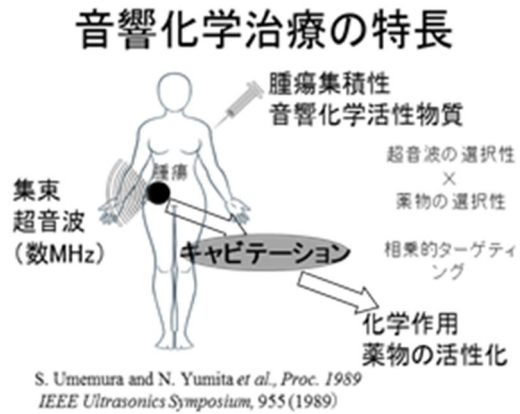


図1

3. 研究の方法

本研究では、血管壁を漏出し腫瘍組織に到達可能で、超音波照射により抗腫瘍作用を発現するナノ粒子として PEG-modified CNTs を用いた腫瘍組織選択的がん音響化学療法の開発を目指した。最初に、超音波単独、または微粒子との併用による抗腫瘍効果を、培養細胞で確認した。超音波と併用することにより殺細胞効果が発現、または増強される微粒子の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ブルー排除法によって判定した。次に colon26 腫瘍を移植した動物に、これらの微粒子を投与し、微粒子が腫瘍組織において治療効果が得られる濃度に達した時点で患部に超音波照射を行い微粒子の音響化学的活性化による抗腫瘍効果の発現を確認した。最後に、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

最初に、超音波単独、または微粒子との併用による抗腫瘍効果を、sarcoma 180 細胞を用い細胞膜の色素透過能に基づくトリパンブルー染色法によって確認したところ単独では細胞毒性が発現しなかったのに対し超音波と PEG-modified CNTs 併用処置が有意な細胞毒性を示した(図2)。このことにより PEG-modified CNTs が超音波により活性化し細胞毒性を発現していることが示された。さらにヒスチジン、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。

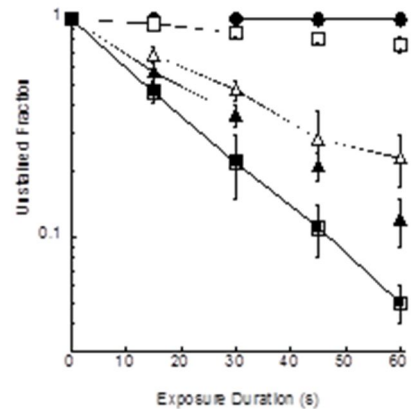


図2 In vitro effect of ultrasound with and without PEG-modified CNTs on isolated sarcoma 180 cells. PEG-modified CNTs, PEG-modified CNTs alone; , ultrasound alone; , 25 μM PEG-modified CNTs + ultrasound; , 50 μM PEG-modified CNTs + ultrasound; , 100 μM M PEG-modified CNTs + ultrasound. Each point and vertical bar represent the mean±SD of four insonation experiments.

次に colon26 固形腫瘍を移植した動物に、PEG-modified CNTs 25 mg/kg を投与し、十分に薬剤が患部に到達すると想定される時間に薬物の活性化治療に適した超音波を照射した。単独は抗腫瘍効果を示さなかったのに対し超音波と PEG-modified CNTs 併用処置が有意な増殖抑制を示した。このことにより PEG-modified CNTs が超音波により活性化し細胞毒性を発現している

ことが示された。抗また処置後の腫瘍に HE 染色を行ったところ、腫瘍組織に細胞の壊死が観察されたこれらの結果から固形腫瘍においても PEG-modified CNTs を超音波により活性化し抗腫瘍効果を発揮できることが示された。

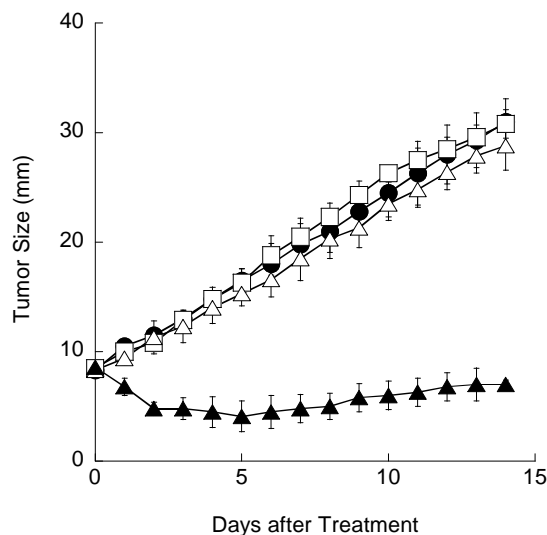


図 3 Effect of PEG-modified CNTs and/or ultrasound on growth of colon26 solid tumor. , Control; , PEG-modified CNTs alone; , ultrasound alone; , PEG-modified CNTs + ultrasound. Each point and vertical bar represent the mean \pm SD of four mice.

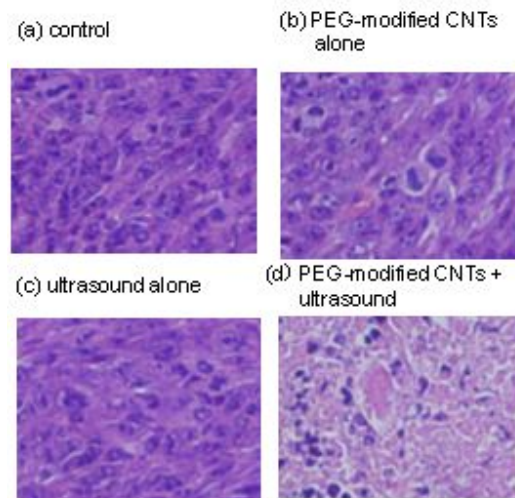


図 4 Effect of ultrasound and/or PEG-modified CNTs on colon 26 carcinoma. Histologic sections (x 400) of the tumors are compared for (a) control, (b) PEG-modified CNTs alone, (c) ultrasound alone, and (d) PEG-modified CNTs + ultrasound.

電子スピン共鳴(ESR)で PEG-modified CNTs 水溶液に超音波を照射したときの、一重項酸素などの活性酸素種の産生を測定した。

さらに活性酸素種に特異的な活性酸素スカベンジャー-添加による阻害効果により一重項酸素寄与を確認した。外部エネルギーである超音波の音響化学作用とアポトーシス誘導を融合した治療技術の臨床応用は、深部がん治療の低侵襲化により患者の Quality of Life を大幅に改善するだけでなく、壊死に伴う副作用を抑えた治療を可能とし、がん治療に大きく貢献するのみならず、物理エネルギーを利用するがん治療の分野にも大きなインパクトを与えられられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- 1 . 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. DOI: 10.21873/anticancerres.12094 (2017)
- 2 . Koji Nishi, Megumi Kato, Saki Sakurai, Ayako Matsumoto, Yumiko Iwase, Nagahiko Yumita. Enoxacin with UVA Irradiation Induces Apoptosis in the AsPC1 Human Pancreatic Cancer Cell Line Through ROS Generation. *Anticancer Res.* 37, 6211-6214. DOI: 10.21873/anticancerres.12071 (2017)
- 3 . 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 *Japanese Journal of Applied Physics.*55 (2016)
- 4 . 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 (2016).
- 5 . 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 (2016).

〔学会発表〕(計 5 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, 金沢, 2018.3.25~2018.3.28.
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, 金沢, 2018.3.25~2018.3.28.
3. 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, Phoenix, Arizona, United States of America, 2017.10.11-2017.10.14.
4. Nagahiko Yumita, Koji Nishi, Yumiko Iwase, Shin-ichiro Umemura, Involvement of Reactive Oxygen in Sonodynamically Induced Apoptosis by pyrrolidine tris-acid fullerene The Society for Redox Biology and Medicine's Annual Meeting (SFRBM2016), 米国・サンフランシスコ, 2016. 11. 16. -2016. 11. 19.
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, 中国・南京, 2016.7.3. ~ 2016.7.8.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩瀬 由未子

ローマ字氏名：IWASE Yumiko

所属研究機関名：横浜薬科大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 00521882

研究分担者氏名：梅村 晋一郎

ローマ字氏名：UMEMURA Shin-ichiro

所属研究機関名：東北大学

部局名：工学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20402787

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。