

令和元年6月13日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10413

研究課題名(和文) 高付加価値放射線治療を実現する金ナノ粒子増感剤の開発

研究課題名(英文) Development of a Goldnanoparticle Radiosensitizer for Advanced Radiotherapy

研究代表者

三澤 雅樹 (Masaki, Misawa)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：60358083

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)：5-26nmの金ナノ粒子を腫瘍細胞内に取り込ませた後、放射線照射して溶媒中の酸素励起によって活性酸素を発生させる放射線増感剤を開発した。抗EGFR抗体接合リポソームにPEG修飾金ナノ粒子を内包させた複合体を調整し、HeLa、B16等のがん細胞株等に投与し、細胞集積性を確認した。放射線照射後、細胞生存率測定と核損傷および脂質過酸化の評価を行った。26nm金ナノ粒子複合体から対照群の数倍の活性酸素発生を認めるとともに、金ナノ粒子の細胞質内拡散と一部の核内移行を確認した。10MVの治療用X線照射下で、過酸化脂質とDNAのAPsite形成を認めたことから、金ナノ粒子の放射線増感が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの放射線治療増感剤には標的指向性はなく、重篤な副作用が懸念されるため、臨床応用されたものはない。本研究の金ナノ粒子複合体は、腫瘍細胞の内外で標的指向性を持ち、X線照射されたときのみ活性酸素を発生して増感効果を発現するので、副作用を軽減できる特徴がある。また、本増感剤は細胞レベルで集積するので、腫瘍部の正確な感受性制御ができるため、正常組織の温存と、取り残しを回避して再発を防ぐ効果的な治療につながる。また、遊走浸潤に関わるインテグリンや低酸素誘導因子を標的とすることで、転移防止につながる。

研究成果の概要(英文)：Functions of goldnanoparticle (AuNPs) radiosensitizer were investigated after internalization of AuNPs in the tumor cells. A novel AuNP complex enveloped by liposome conjugated with anti-EGFR antibody as a targeting moiety was synthesized to generate reactive oxygen species near the nucleus only under irradiation. After irradiation, reduced cell viability and damaged on lipid bilayer and nucleus were observed, as a result of accumulation and partial penetration into the nucleus in cultured HeLa and B16 cells, indicating a promising sensitization capability of the present AuNP complex.

研究分野：放射線治療学

キーワード：増感剤 放射線治療 金ナノ粒子 活性酸素 DDS

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 金ナノ粒子の放射線増感効果を示唆する報告が特に海外で増えている。しかし、エネルギーレベル、粒子径、濃度、機能化法等のパラメータが大きく異なり、増感に寄与する活性酸素種と発生量が特定できず、標的細胞及び小器官への集積性が低いいため、効果的な増感作用が得られていない。

(2) 国内では、金ナノロッド等を使った温熱療法への適用が検討されているが、活性酸素発生に着目した放射線治療への適用事例は殆どない。陽子線照射による金ナノ粒子の放射化物測定を含む陽子線治療への適用は、提案者の知る限り、国内外で本研究が初めてである。X線、陽子線照射による金ナノ粒子からの活性酸素発生、細胞内分布、腫瘍細胞損傷等、治療に関わる生化学物理現象解明は、未解決の課題である。

### 2. 研究の目的

(1) X線照射によって、金ナノ粒子から電子が発生し、水溶液中で活性酸素発生を増強する現象を見出した。これを放射線治療に適用し、腫瘍集積性を高める機能修飾した金ナノ粒子を事前投与し、根本治療の難しいび慢性、浸潤性のがんを細胞レベルで除去することが可能な、高付加価値放射線治療を実現する。

### 3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞特異的に集積し、核またはミトコンドリアに金ナノ粒子を送達して、活性酸素による放射線増感作用を発現させるため、ペプチド接合金ナノ粒子を含む抗体リポソーム複合体を開発する。この複合体に、治療用リニアク X線及び陽子線を照射し、活性酸素発生及び腫瘍細胞生存率を調べる。

(2) 酸化ストレス、アポトーシス、DNA切断等の *in vitro* 生化学アッセイを行い、増感作用発現に到る一連の機序を解明する。これをもとに治療に最適な金ナノ粒子複合体の濃度、機能化法を決定する。また、動物レベルで腫瘍集積を大幅に高める粒子設計と最適な投与方法を合わせて考案し、抗腫瘍効果の基礎データを取得する。

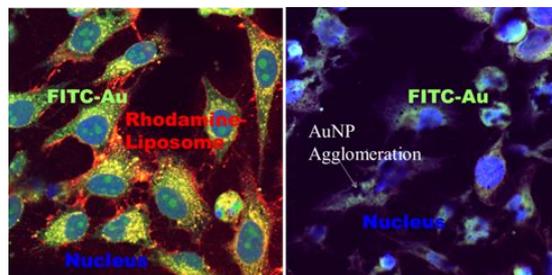
(3) 金ナノ粒子の細胞内局在を調べるため、X線ホログラフィによる可視化法を開発する。コヒーレント光源を用いたX線光学理論に基づき、波長限界を超える解像度を達成するための基本原理を確立する。

### 4. 研究成果

(1) リン脂質とコレステロールを用いて、直径150-180nmのリポソームをBangham法で合成し、抗EGFR抗体ヒンジ部のSS結合還元でSH基を露出させ、NHSエステルとマレイミド基をもつヘテロ架橋剤でリン脂質のアミノ基と還元抗体のSH基を接合した。金ナノ粒子は塩化金水溶液を攪拌沸騰させ、クエン酸で還元し、平均径26nmの金ナノ粒子を合成した。この金コロイドをリポソーム被覆フラスコに添加し、金ナノ粒子をリポソーム内に封入した。

SEM/TEM観察で、リポソーム1個あたり2-3個の金ナノ粒子が含有されていることを確認した。金ナノ粒子、リポソームの粒子径およびゼータ電位をDLS測定した結果、平均粒径は26nmと182nm、ゼータ電位は-44mVと-3.5mVであった。

細胞内取り込み増強とエンドソーム脱出を促進させるため、膜透過核局在シグナルペプチド(Tat、NLS)、ミトコンドリア輸送シグナルペプチド(MTS)を接合した金ナノ粒子を合成した。また、PEG鎖とアジド基を接合し、FITC標識したアルキン鎖ペプチドを結合させた。金ナノ単独での細胞内とりこみとシグナルペプチド接合金ナノ粒子の細胞内取り込み、核近傍への集積を比較した結果、核及びミトコンドリアへの送達率が向上した。



ローダミンB標識 抗体Liposomeあり 抗体Liposomeなし

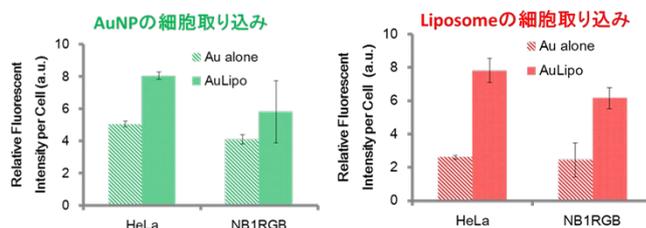


図1 抗体リポソームと金ナノ粒子の細胞内取り込み

(2) リポソームにローダミン B を標識し、培養時間を1~8時間、金コロイド濃度を0.1~3.0mg/mlで変

化させ、EGFR発現するHeLa細胞とEGFR発現の少ない正常繊維芽細胞NB1RGBに投与して細胞内取り込みをレーザー共焦点顕微鏡で観察した(図1)。HeLa細胞への集積が高く、細胞内小胞にリポソームの集積、細胞質内への金ナノ粒子拡散を確認した。エンドソームから金ナノ粒

子が細胞内に拡散した原因として、TAT 等膜透過ペプチドによるエンドソーム膜の透過が考えられる。

6 穴プレートでの HeLa 細胞に金ナノ粒子含有抗体リポソームを投与し、24 時間後に回収して質量分析を行った。粒子径を平均 20nm とすると、細胞あたり  $10^3 \sim 10^4$  個と推定される。エンドソーム内にトラップされた金ナノ粒子放出のため、低 pH 環境で開裂する脂質の導入により、さらに核近傍への集積が高まる傾向が見られた。

(3) 細胞内の金ナノ粒子局在を観察するため、X 線 Gabor ホログラフィを用いた微分干渉による超解像観察法を考案した。この方法では位相物体のホログラムを記録し、コンピュータ内で再構成する。1/2 位相をずらした波面干渉により、 $8\mu\text{m}$  の PS ビーズと細胞内微細構造が可視化できた。また、デジタル干渉コントラストに Wavelet 変換を適用することで再構成画像の分解能を向上させることができた。

(4) X 線照射実験に使った Elekta Synergy のフォトンと電子のエネルギースペクトルを、EGS5 モンテカルロコードで計算した結果、いずれも 1MeV 以下の低エネルギー成分が高く、フォトン束の約 1/100 の電子束があることが分かった。100-300keV 領域の成分が金ナノ粒子と相互作用して電子を発生させ、表面近傍で溶媒中の酸素を励起して活性酸素を発生させると考えられる。

陽子線照射では、低確率ではあるが  $^{196}\text{Au}$ 、 $^{198}\text{Au}$  等の同位体生成が予想されたため、Ge 検出器 (型式: GEM20P4-70) で同位体エネルギー帯の検出効率を、 $^{60}\text{Co}$  (1.17 MeV)、 $^{137}\text{Cs}$  (662 keV)、 $^{133}\text{Ba}$  (356 keV)、 $^{57}\text{Co}$  (122 keV) で校正した結果、1.33MeV から 0.276MeV の範囲で検出効率は 1.7% から 9.3% であった。金コロイド 5mg/ml、0.2ml に 200MeV、10Gy の陽子線を照射しスペクトル測定を行った結果、 $^{198}\text{Au}$  の 412keV 等同位体ピークは検出限界以下であり、照射後約 1 時間で Background レベルに低下することを確認した。

(5) 診断用 X 線照射下 (10Gy) で、金の質量濃度 56-85  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で、修飾なし金コロイドと ProteinA および PEG 修飾金コロイド (平均粒径 26nm) の ROS 発生を APF で比較したところ、20~80nm の粒子に対し、DW のみの場合に比べて 5~7 倍の ROS 発生が見られた。全体的に X 線のほうが陽子線に比べて大きいことがわかった。

金ナノ粒子 20% を培地に加え、24h 培養したあと、X 線照射の 2 時間前に ROS 試薬を添加し、

細胞内の酸化ストレス、スーパーオキシド、NO 発生を X 線照射 30 分後に測定した結果、細胞質内で酸化ストレスおよび NO 産生上昇が認められた。金ナノ粒子存在下での細胞膜損傷と核損傷を示す脂質過酸化と AP サイト数を評価した結果、10MV の治療用 X 線照射下で、細胞膜の過酸化脂質生成と DNA に多くの AP site 形成を認めたことから、放射線増感が示唆された (図 2)。放射線照射後の生存率曲線を LQ モデルでフィットし、最小不活化線量から増感率を求めたところ、上記範囲内では増感率は 1.1 から 1.4 の範囲であった (図 3)。

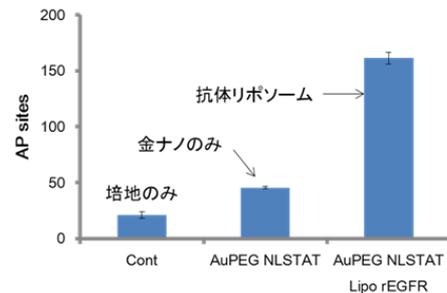


図 2 APsite で評価した核損傷

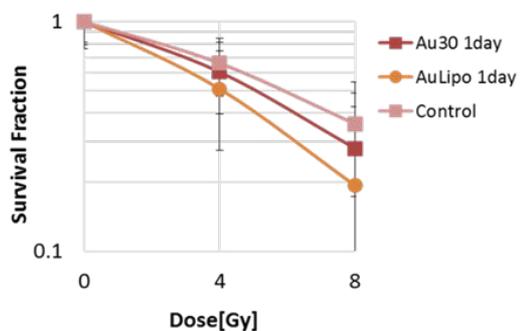


図 3 金ナノ増感剤による細胞生存率

(6) In vitro での増感効果と細胞取り込み

が確認できたことをうけて、動物モデルで AuNP の腫瘍集積を増強する in vivo 用金ナノ粒子を設計した。5nm および 26nm 金ナノ溶液にチオール PEG (MW5000) を混合して 24h 静置し、遊離 PEG を 10kDa のメンブレンで限外ろ過した。0.45 $\mu\text{m}$  および 0.22 $\mu\text{m}$  滅菌フィルターを通し、5nm および 26nm 金コロイド濃度はそれぞれ、36mg/mL および 15mg/mL であった。B16 メラノーマ担がんマウスと EGFR 過剰発現の A431 担がんマウスを作成し、濃度 36mg/mL および 15mg/mL の 5nm および 26nm 金ナノ粒子増感剤を 1.9mg/匹/50 $\mu\text{L}$  で投与し、48 時間後に 40MeV、0.6Gy/min. の陽子線を 20~25Gy 照射した。陽子線単独照射群に比べ、5nm および 26nm 金ナノ投与群で、より高い抗腫瘍効果が認められた。IT 投与群では 5nm の抗腫瘍効果が顕著で、26nm では 15 日以降再増殖が観察された。局所投与 1 時間および 24 時間後の腫瘍及び臓器内の金ナノ粒子蓄積を ICP-MS で測定したところ、投与量の 70-80% が臓器蓄積し、肝臓と腫瘍への集積が高かったことから、局所投与群での金ナノ粒子腫瘍集積が増感効果に寄与したと推察される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

JC Aguilar-Lopez, M.Misawa et al., Wavelet processing and digital interferometric

contrast to improve reconstructions from X-ray Gabor holograms, J. Synchrotron Rad. (2018) 25, pp.808-817.

DOI:10.1107/S1600577518004447.

K Matsuda, JC Aguilar-Lopez Juan Carlos, S Rehman, M Misawa et.al., Differential interference contrast microscopy for cells using hard X-ray holography, APPLIED OPTICS, (2018)57-17, pp.4795-4801.

DOI:10.1364/AO.57.004795.

MU Rehman, MA Hassan, QL Zhao, P Li, Y Miyamoto, M Misawa et al., Effect of platinum nanoparticles on cell death induced by ultrasound in human lymphoma U937 cells, Ultrason Sonochem. (2016) 31, pp.206-15.

DOI:10.1016/j.ultsonch.2015.12.013.

〔学会発表〕(計 16 件)

三澤 雅樹他、金ナノ粒子放射線増感剤の動物モデルにおける効果検証、2019.

三澤 雅樹他、金ナノ粒子放射線増感剤の B16 メラノーマ担がんマウスにおける増感効果、第 21 回 菅原・大西記念 癌治療増感シンポジウム in 奈良 2019.

三澤 雅樹他、金ナノ粒子放射線増感剤の開発と B16 マウスメラノーマに対する効果検証, つくば医工連携フォーラム 2019 2019.

三澤 雅樹他、抗体リポソームによる金ナノ粒子増感剤の細胞内送達と増感効果、第 34 回日本 DDS 学会学術集会 2018.

松本 孔貴、三澤 雅樹、分子標的型陽子線治療増感剤の胆がんマウスにおける治療効果検証, 第 3 回 TIA-TLSK ライフイノベーションワークショップ 2018.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: X 線微分干渉コントラスト顕微鏡

発明者: 松田 浄史、三澤 雅樹、安本 正人

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2018-028703 号

出願年: 2018/02/21

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 松本 孔貴

ローマ字氏名: (MATSUMOTO, yoshitaka)

所属研究機関名: 筑波大学

部局名: 医学医療系

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 70510395

研究分担者氏名: 布施 拓

ローマ字氏名: (FUSE, hiraku)

所属研究機関名: 茨城県立医療大学

部局名: 保健医療学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 10712648

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 大西 健

ローマ字氏名: (OHNISHI, ken)

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。