

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20187

研究課題名(和文) Targeted delivery of photosensitizers to uterine cervical cancer using iron oxide nanoparticles as a vehicle for effective photodynamic therapy

研究課題名(英文) Targeted delivery of photosensitizers to uterine cervical cancer using iron oxide nanoparticles as a vehicle for effective photodynamic therapy

研究代表者

天野 創 (amano, tsukuru)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：20613467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：光感受性物質であるクロリンe6を効率的に癌細胞内へ送達させるために、酸化鉄核、ポリグリセロールコーティング、およびオクタリジン機能性(SPION-PG-Lys8)からなるナノキャリア(SPION-PG-Lys8/Ce6)を設計した。SPION-PG-Lys8/Ce6は暗所では低い細胞毒性を示し、癌細胞内ではミトコンドリア内に集積した。SPION-PG-Lys8/Ce6を取り込ませた癌細胞に光線を照射することで癌細胞を死滅させることに成功した。この成果をJournal of Materials Chemistry B誌に報告した。

研究成果の概要(英文)：In this work, a nanoparticle consisting of an Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core, a polyglycerol branching, and an octalysine functionality (SPION-PG-Lys8) has been synthesized and used to deliver a photosensitizer, chlorin e6 (Ce6), into cancer cells for photodynamic therapy (PDT) against cancer cells. In vitro experiment, SPION-PG-Lys8 is efficiently taken up by cancer cells, and showed low cytotoxicity. SPION-PG-Lys8/Ce6 is more easily taken up by the cells than free Ce6, and surprisingly, the internalized SPION-PG-Lys8/Ce6 is found to be enriched in the mitochondria. SPION-PG-Lys8/Ce6 exhibits almost no cytotoxicity under dark conditions, but strong photocytotoxicity due to the light-triggered production of reactive oxygen species (ROS) destroying the mitochondria. Our results highlight the great potential of SPION-PG-Lys8 as an efficient carrier of Ce6 for photodynamic cancer therapy.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：機能性ナノ粒子 光線力学療法 婦人科悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法(photodynamic therapy;PDT)は、近年手術療法、化学療法や放射線療法といった既存の癌治療とは全く異なる低侵襲の癌治療として注目を浴びている。PDTの原理は光感受性物質(photosensitizer;PS)を静脈内注射などの方法により投与して癌組織に蓄積させた後、特定波長の光線を照射することにより活性酸素種(reactive oxygen species : ROS)を発生させ酸化障害を与えて癌細胞を破壊するというものであり、実際に本邦においても早期肺がん、表在性食道がん、表在性早期胃がん、子宮頸部初期がんおよび異形成において保険適応となっており臨床応用されている。手術療法、化学療法や放射線療法と比較した場合、PDT独自の利点として光線を当てた部位のみに効果があり当てていない部位へは障害がないこと、PSが核内へ取り込まれることはなくDNAの変異を引き起こす機会が非常に少ないこと、PSが腫瘍の血管内皮細胞にも取り込まれるため腫瘍血管を破壊したり閉塞させたりする効果もあること、放射線治療後の再発癌や化学療法抵抗性の癌にも効果が期待できること、宿主の免疫を抑制しないこと、周辺臓器の機能温存が可能であること、蛍光を捉えることによりtherapyだけでなくimagingも可能であることなどが挙げられる。しかし既存のPSでは腫瘍への集積性や特異性が不十分であり、未だにPDTは早期癌における治療のひとつのoptionにすぎず、幅広く臨床で使用されるには至っていないのが現状である。

2. 研究の目的

我々は悪性腫瘍に対するより効率的な、効果的なPDTの実現を目的として種々の機能性ナノ粒子によるdrug delivery system(DDS)を利用して悪性腫瘍にPSを送達する方法論についての研究を行った。

3. 研究の方法

我々は効果的なPDTを実現するために京都大学小松直樹教授、蘇州大学Li Zhao 准教授らと共同で新規に酸化鉄ナノ粒子(10-PG-Lys8/Ce6)によるdrug delivery systemを考案・作製した。酸化鉄(iron-oxide:IO)の周囲にpolyglycerol(PG)をgraftさせ、水溶性及び生体内での安定性を飛躍的に向上させるとともにPGに多数存在する-OH基に様々なペプチドを結合させて機能性を持たせることを可能にさせた。本研究においては細胞膜透過性ペプチドとして知られているオクタリジン(Lys8)を結合させ10-PG-Lys8を作製しそれにPSの一種であるchlorin e6(Ce6)を静電的結合により担持させ10-PG-Lys8/Ce6を合成した(図)。我々はin vitroで子宮頸癌細胞株(Hela細胞: JCR9004)や卵巣癌細胞株(SKOV-3)を用いた培養細胞系にてfreeCe6及び

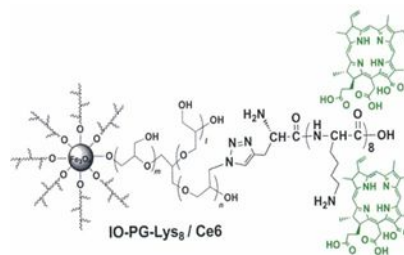
10-PG-Lys8/Ce6の細胞内への取り込み、imaging、PDT効果について共焦点レーザー走査顕微鏡、FACSCalibur、培養細胞へのレーザー照射実験にて検討した。

4. 研究成果

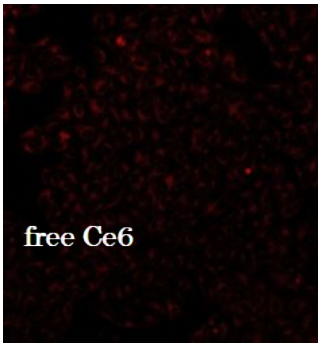
In vitroの実験系では明らかに10-PG-Lys8/Ce6の方が癌細胞内へ取り込まれやすく、PDTの効果も高かった。これらの結果からSPION-PG-Lys8は癌に対する光線力学療法におけるクロリン e6の効率的なキャリアになり得ることが明らかとなった。現在これらの細胞実験をもとにHela細胞皮下移植xenograft modelマウスを用いたin vivoの実験を継続して行っている。なおin vitroの研究成果は既にJournal of Materials Chemistry B誌に報告した。

また中国の蘇州大学Li Zhao 准教授との共同研究においてシリカナノ粒子と酸化鉄ナノ粒子を核とし多孔性と磁気特性を併せ持つナノハイブリットを開発しこれがクロリン e6を癌細胞内へ効率的に送達させることも明らかとした。この成果は2017年にMater Sci Eng C Mater Biol Appl. 誌にて発表した。

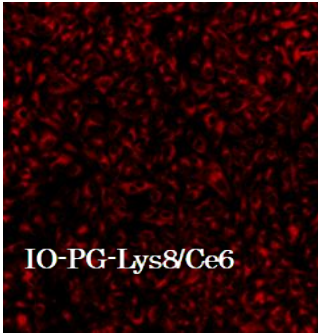
さらに癌に対する光線力学療法や化学療法、放射線療法の効果に、癌細胞におけるROSの代謝能力が大きく関わっていることに注目し、そのメカニズム解明のため実験を進めた。先行研究として、癌細胞のミトコンドリアにおける活性酸素代謝に関わる酵素、mitochondrial superoxide desmutase(SOD2)の発現と卵巣癌の予後に関するコホート研究を行った。SOD2の高発現はある特定の卵巣癌においては予後不良因子となることが明らかとなり(図)、その成果を現在論文にまとめcancer biomarker 誌に投稿中である。



図① IO-PG-Lys/Ce6の structure

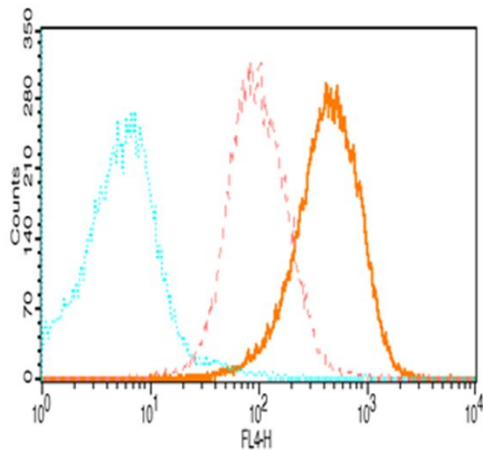


free Ce6



IO-PG-Lys8/Ce6

図②レーザー共焦点走査顕微鏡所見  
IO-PG-Lys8/Ce6の方がfree Ce6より多く細胞へ  
取り込まれている

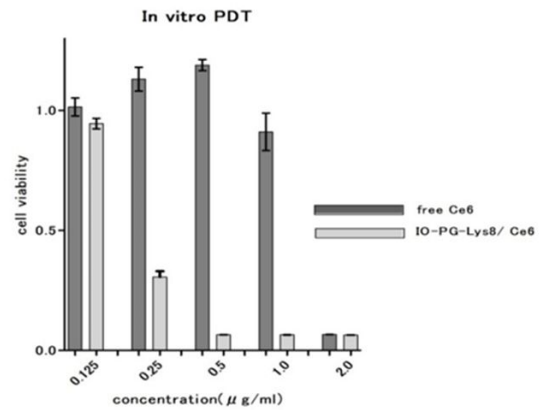


PBS

Free Ce6(2  $\mu$ g/ml)

IO-PG-Lys8/Ce6  
(2  $\mu$ g/ml as Ce6)

図③ FACS 所見 free Ce6と比較して IO-PG-Lys8/Ce6の方においてより多く細胞へ  
取り込まれていることがわかる



図④ WST-8assay  
free Ce6と比較して IO-PG-Lys8/Ce6の  
PDT効果が明らかに高いことがわかる

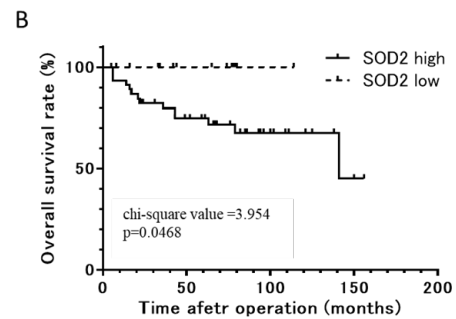
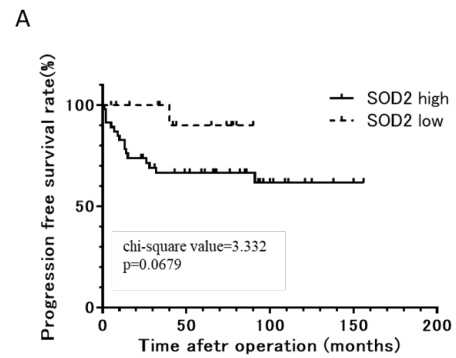


図 子宮内膜症関連卵巣癌における SOD2  
発現と無増悪生存期間、全生存期間との関連  
(Kaplan meier 解析)

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 2件)

1. Efficient delivery of chlorin e6 into ovarian cancer cells with octalysine conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for effective photodynamic therapy. Li Zhao, Hongkuan Yang, Tsukuru Amano, Hongmei Qin, Luyi Zheng, Akimasa Takahashi, Shiguang Zhao, Ikuo Tooyama, Takashi Murakami and Naoki Komatsu. J. Mater. Chem. B, 2016,4, 7741-7748

2. Polyglycerol mediated covalent construction of magnetic mesoporous silica nanohybrid with aqueous dispersibility for drug delivery. Yang X, Wen Y, Wu A, Xu M, Amano T, Zheng L, Zhao L. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017 Nov 1;80:517-525. doi: 10.1016/j.msec.2017.06.022. Epub 2017 Jul 4.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

天野 創 (amano tsukuru)  
滋賀医科大学 医学部 助教

研究者番号：20613467

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )