

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300182
 研究課題名（和文）分子標的ナノ粒子を用いた診断と治療を同時に行う超音波力学的がん治療
 研究課題名（英文） Sonodynamic cancer therapy with molecular target TiO₂ nano-particles
 研究代表者
 清水 宣明（SHIMIZU NOBUAKI）
 金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授
 研究者番号：50019634

研究成果の概要（和文）： 肝細胞特異認識タンパク質 preS1/S2 固定化 TiO₂ ナノ粒子を用いて、培養がん細胞に対する細胞損傷効果および担がんマウスに対する抗腫瘍効果を解析した。その結果がん細胞が OH ラジカルなどの化学種の酸化作用により損傷を受け、アポトーシスを誘導し細胞死に至ること、周波数 1 MHz，照射強度 1 W/cm²，照射時間 1 min という条件で週 3 回担がんマウスに超音波照射を行い、有意な腫瘍の成長抑制を確認した。

研究成果の概要（英文）： The pre-S1/S2 protein from hepatitis B virus, which recognizes liver cells, was immobilized to the surface of TiO₂ nanoparticles using an amino-coupling method. After uptake of TiO₂ nanoparticles by HepG2 cancer cells, significant cell injury was observed at an ultrasound irradiation. Antitumor effect was further studied using tumor-bearing nude mouse. The significant antitumor effect was observed when irradiation of ultrasound was performed with the experimental condition of 1MHz, 1W/cm² and 1 min duration for 3 times per week.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2008 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医用生体工学、生物工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：二酸化チタン，超音波照射，ナノ粒子，肝がん細胞，DDS，担がんマウス，アポトーシス，OH ラジカル

1. 研究開始当初の背景

我々は光触媒として知られている“二酸化チタン”に超音波を照射すると活性酸素種（ラジカル分子）が生成する現象を明らかにした（二酸化チタン・超音波触媒法（TiO₂/US法）； Shimizu, *et al.*, 2006）。このような報告は国内・国外を通じて皆無であり、この現象を新規がん治療法として応用展開する。これまで超音波照射による二酸化チタンの励起メカニズムを解析した結果、超音波照射時に二酸化チタン表面近傍にキャビテーション気泡が生成し、これの圧壊時に生ずる高温・高圧場（>5000K、数100 気圧）による二酸化チタンの熱励起およびソノルミネッセンスとよばれる発光現象によってヒドロキシルラジカル(OHラジカル)が生成することを明らかにした。これまでTiO₂/US法を利用し、環境ホルモンの効率的分解をはじめ、大腸菌、日和見感染症原因菌のレジオネラ、さらにマウスリンパ腫由来培養がん細胞を有意に死滅させることに成功した（Ogino, C. *et al.*, 2006; Dadjour, M.F. *et al.*, 2006; 清水ら, 2006）。従来、光触媒として知られている二酸化チタンは励起エネルギーとして紫外光(UV)の照射が必要なため、ラジカル発生はUVが到達できる体表面近傍でしか起こらない。しかし、超音波は体内深部への伝播が可能であり、本研究で提案するTiO₂/US法は体表面近傍のみならず深部病変部位のがん治療も可能にする優位性を有している。

2. 研究の目的

前述のような背景より、本研究を皮膚組織などの表面だけでなく臓器深部のがん組織においても治療が可能な、非侵襲的がん治療を行う“二酸化チタン・超音波触媒

法による新規のがん治療システム”へと展開する。特に、紫外線照射では到達することが困難な深部がん病変部位に対する非侵襲的がん治療法を提案する。二酸化チタンを深部にまで浸潤したがん組織に正確に送達できれば、臓器（部位）特異的な非侵襲がん治療への展開が期待できる。本申請ではこの問題点も解決すべく、ナノサイズの二酸化チタン粒子の開発及び、我々が世界で初めて達成した「中空ナノ粒子」による生体内ピンポイント物質送達技術（Yu, D., *et al.*, 2005）に関する併せて研究を行い、TiO₂/US法との併用による相乗的ながん治療効果について最終的な評価を行う。

本申請研究では“二酸化チタン・超音波触媒法”のがん治療展開を実現化すべく、(1)「二酸化チタン・ナノ粒子のターゲティング技術」、(2)「TiO₂/US法を用いたがん細胞損傷法」、(3)「TiO₂/US法を用いたがん治療法」について検討した。

3. 研究の方法

3.1 TiO₂/US 法による細胞損傷効果

HepG2 細胞懸濁液（4×10⁵ cells/dish, 2 ml）を 37 °C、5 % CO₂ で 24 時間培養した。その後、TiO₂ 濃度 0.1 % (w/v) の preS1/S2 固定化 TiO₂ を 200・1 添加し、37°C、5%CO₂ 条件下で 6 時間培養した。超音波照射直後（周波数 1 MHz, 照射強度 0.1 W/cm², 照射時間 30 sec）から 96 時間後までの生細胞数をトリパンブルー染色により計測した。また、それに伴う細胞の形態変化を顕微鏡を用いて観察した。

3.2 細胞死メカニズムの解析

二酸化チタン・超音波触媒法適用時に見られる細胞死メカニズムの解析を行うため、上記と同様の方法で培養がん細胞に対して TiO₂/US 法を適用した後、ミトコンドリア膜

電位の低下、核の凝集、膜のリン脂質の局在変化について検討を行った。3.3 担がんマウスを用いた抗腫瘍効果

抗腫瘍効果を検討するため、ヌードマウスにヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を移植し、xenograft model を作製した。0.1% (w/v) の preS1/S2 固定化 TiO₂ 投与 (100 · 1) および超音波照射 (周波数 1 MHz, 強度 1.0 W/cm², 照射時間 1 min) を行った時点を 0 日目とし、3 回/week の頻度で TiO₂ の投与および照射を行い、腫瘍体積および体重を測定した。腫瘍体積は $1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ (mm³) より算出した。

4. 研究成果

4.1 TiO₂/US 法による細胞損傷効果

周波数 1 MHz, 強度 0.1 W/cm², 照射時間 30 sec の条件で超音波をそれぞれ照射したところ、どの細胞群でも照射直後から 12 時間後までは細胞数に有意差は見られなかった。超音波照射を行っただけの細胞群では 96 時間後まで対照群と同様に正常に細胞数が増殖しているのに対し、preS1/S2 固定化 TiO₂ を添加した細胞群では超音波照射後 24 時間から徐々に細胞損傷効果が現れ始めた。その効果は時間を追う毎に増大し、96 時間後の時点で TiO₂ / US 法で処置した細胞群は細胞数が対照群の 1/2 程度までしか増殖しなかった。これより、TiO₂ / US 法を適用した細胞群には細胞増殖抑制効果が現れ、その効果は時間が経過するにつれて増大することを確認した。超音波照射を行っただけでは細胞損傷効果を確認することはできなかったことから、TiO₂ / US 法によって起こる細胞損傷効果は超音波照射による物理的な影響は少ないと考えられる。つまり TiO₂ / US 法を用いた細胞は細胞膜などに超音波による物理的な損傷を受けた結果細胞死に至ったのではなく、OH ラジカルなどの化学種の酸化作用により損傷

を受け細胞死をひき起こしたと考えられる。

4.2 細胞死メカニズムの解析

以下に TiO₂ / US 法適用時に見られた細胞死メカニズムの解析結果を示す。

ミトコンドリア膜電位の低下 : ミトコンドリア膜電位の低下は比較的アポトーシス初期の段階で起こるといわれている。そこでミトコンドリア膜電位の低下を蛍光色素 JC-1 を用いて検出した。その結果、超音波照射後 1 時間からアポトーシス細胞のシグナルである緑色蛍光が観察されはじめ、照射後 6 時間の段階でも観察することが出来た。

核の凝集 : 細胞がアポトーシスを誘導するシグナルを分泌した後、細胞内では核内のクロマチンの凝集が起こる。4%パラホルムアルデヒドによって細胞を固定し、4,6-diamino-2phenylindole (DAPI) によって細胞核を染色し観察を行ったところ、超音波照射後 6 時間から核内のクロマチンの凝集が確認でき、これは 24 時間後にさらに顕著に観察できた。

膜のリン脂質の局在変化 : リン脂質の局在変化に伴い phosphatidylserine (PS) が細胞膜上に露出する。この PS は蛍光色素 Annexin V / FITC を使用することで検出することができる。また、アポトーシスが進行するにつれ膜の透過性が変化し、生細胞の膜は透過できない propidium iodide (PI) が透過できるようになる。Annexin V / FITC, PI を用いて二重染色を行った結果、超音波照射後 24 時間の段階でリン脂質の局在変化に伴う PS の細胞膜上への露出を検出することが出来た。さらに PI によっても染色されたことから照射後 24 時間ではアポトーシス後期のステージであることが明らかとなった。

以上の結果から TiO₂/US 法を適用した細胞群は、超音波照射後 24 時間までの間に様々なアポトーシスシグナルを観察することが

出来た。つまり細胞はアポトーシスを誘導した結果、最終的に死に至ると考えられる。

4.3 担がんマウスを用いた抗腫瘍効果

TiO₂ /US 法による抗腫瘍効果の確認及び最適な超音波照射条件の検討を行った。

まず TiO₂ /US 法による抗腫瘍効果を検討するため、周波数 1 MHz, 照射強度 1 W/cm², 照射時間 1 min という条件で超音波照射を行った。対照群では、時間経過と共に腫瘍は成長し約 1 ヶ月後には実験開始時の 2~6 倍まで増大した。超音波照射のみを行った系では、コントロールの系と同様に腫瘍の成長が確認された。一方、TiO₂ / US 法を適用した系では 6 匹中 4 匹のマウスにおいて腫瘍の成長が抑制された。つまり、超音波のみでは腫瘍の成長を抑制することは出来ないが、TiO₂ /US 法を適用することにより抗腫瘍効果が現れると考えられる。

これより照射強度 1 W/cm² がマウスに対してストレスもなく腫瘍の成長抑制を可能にする最適な照射強度であった。

本実験系では腫瘍の成長を抑制することはできたが、腫瘍細胞を完全に死滅させることはできないため、さらなる効果的な処置法などを検討する必要がある。

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 16 件)

1. 大島周平, 仁宮一章, 清水宣明 TiO₂ ナノ粒子と超音波触媒法を併用したがん治療法の *in vitro* および *in vivo* 評価. 金沢大学環日本海域環境研究センター 平成 21 年度年報, 掲載確定, 査読無
2. 仁宮一章, Rahman, M.R., 荻野千秋, 清水宣明 二酸化チタン/超音波触媒法を応用した有害生物殺菌システム. 超音波テクノ, 掲載確定, 査読無
3. Rahman, M.M., Ninomiya, K., Ogino, C.,

- Shimizu, N. Ultrasound-induced cell damage and membrane lipid peroxidation of *Escherichia coli* in the presence of non-woven TiO₂ fabrics. *Ultrason. Sonochem.*, 17 (2010), 738-743, 査読有
4. Shimizu, N., Ninomiya, K., Ogino, C., Rahman, M.M. Potential uses of titanium dioxide in conjunction with ultrasound for improved bacterial disinfection. *Biochem. Eng. J.*, 48 (2010), 416-423, 査読有
5. 大庭 達也, 仁宮一章, 清水宣明 二酸化チタン表面での超音波力学的 OH ラジカル生成機構の解析. 金沢大学環日本海域環境研究センター 平成 20 年度年報, (2010), 119-125, 査読無
6. 園家 史朗, 仁宮一章, 清水宣明 肝細胞特異認識能を有する二酸化チタン・ナノ粒子を用いた超音波力学的がん治療. 金沢大学環日本海域環境研究センター 平成 20 年度年報, (2010), 126-130, 査読無
7. 仁宮一章, 清水宣明, 荻野千秋 光触媒ナノ粒子と超音波技術をカップリングしたがん治療法. マテリアルインテグレーション 特集 マイクロ・ナノバブル(2) — マイクロバブルとソノプロセス, 22 (2009), 8-11, 査読無
8. Shimizu, N., Ogino, C., Dadjour, M.F., Ninomiya, K., Fujihira, A., Sakiyama, K. Sonocatalytic facilitation of hydroxyl radical generation in the presence of TiO₂. *Ultrason. Sonochem.*, 15 (2008), 988-994, 査読有
9. Kanehira, K., Banzai, T., Ogino, C., Shimizu, N., Kubota, Y., Sonezaki, S. Properties of TiO₂-polyacrylic acid dispersions with potential for molecular recognition. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 64 (2008), 10-15, 査読有
10. Ogino, C., Dadjour, M.F., Iida, Y., Shimizu, N. Decolorization of methylene blue in aqueous suspensions of titanium peroxide. *J. Hazard. Mater.*, 153 (2008), 551-556, 査読有
11. 清水宣明, 仁宮一章, 荻野千秋 二酸化チタン/超音波触媒法とその医療応用. 化学工学誌 特集「ソノプロセス」, 72

(2008), 636-638, 査読無

12. 笹井良祐, 荻野千秋, 清水宣明 機能性二酸化チタン・ナノ粒子を用いたがん治療への基礎研究. 金沢大学環日本海域環境研究センター 平成 19 年度年報, (2008), 129-134, 査読無

13. 崎山和亨, 荻野千秋, 清水宣明 二酸化チタン/超音波触媒法による過酸化水素生成機構の解析. 金沢大学環日本海域環境研究センター 平成 19 年度年報, (2008), 135-140, 査読無

14. Ogino, C., Kanehira, K., Sasai, R., Sonezaki, S., Shimizu, N. Recognition and effective degradation of 17 β -estradiol by anti-estradiol antibody-immobilized TiO₂ nanoparticle. *J. Biosci. Bioeng.*, 104 (2007), 339-342, 査読有

15. 高木圭子, 荻野千秋, 清水宣明 二酸化チタン・超音波触媒法による細胞死誘導. 超音波テクノ (特集 そのケミストリーの最新動向②), 19 (2007), 41-45, 査読無

16. 清水宣明, 荻野千秋, 藤平 敦司 二酸化チタン・超音波触媒法による OH ラジカルの生成と溶存希ガスの促進効果. 超音波テクノ, (特集 そのケミストリーの最新動向①), 19 (2007), 39-44, 査読無

[学会発表] (計 17 件)

1. 清水宣明, 二酸化チタン・超音波触媒法によるがん細胞傷害と増殖抑制, 第 3 回超音波分子診断治療研究会, 2010 年 3 月 6 日, 福岡大学 (福岡)

2. 清水宣明, 仁宮一章, 光触媒・超音波化学のカップリングとその医療応用, 平成 21 年度電気関係学会北陸支部連合大会, 2009 年 9 月 12 日, 北陸先端科学技術大学院大学 (金沢)

3. 大島周平, 仁宮一章, 荻野千秋, 黒田俊二, 清水宣明, TiO₂ ナノ粒子と超音波触媒法を併用したがん治療法の *in vitro* および *in vivo* 評価, 日本ソノケミストリー学会 第 18 回討論会, 2009 年 10 月 23-24 日, 長岡技術科学大学 (長岡)

4. Higuchi, Y., Takaki, K., Hashii, M., Ogino, C., Shimizu, N., Nanometer-sized

TiO₂ particles induce apoptosis associated with chromosomal DNA fragmentation and caspase-3 activation in L1210 leukemia cells. The 21th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB-2009-Congress), Shanghai International Convention Center, 2009.8. 2-7, Shanghai (China)

5. 高木圭子, 樋口善博, 橋井美奈子, 荻野千秋, 清水宣明, 二酸化チタンナノ粒子による細胞死誘導における細胞内関連物質の動態, 日本薬学会 第 129 年会, 2009 年 3 月 26-28 日, 国立京都国際会館 (京都)

6. 仁宮一章, 園家史朗, 大島周平, 荻野千秋, 黒田俊二, 清水宣明, TiO₂ ナノ粒子と超音波を併用した新規がん治療法構築のための基礎的検討, 化学工学会 第 74 年会, 2009 年 3 月 18-20 日, 横浜国立大学 (横浜)

7. 仁宮一章, 園家史朗, 大島周平, 荻野千秋, 黒田俊二, 清水宣明, TiO₂ ナノ粒子と超音波触媒法を併用したがん細胞傷害効果の評価, 日本ソノケミストリー学会 第 17 回討論会, 2008 年 12 月 5-6 日, 電気通信大学 (東京)

8. 大庭達哉, 仁宮一章, 荻野千秋, 清水宣明, 二酸化チタン/超音波触媒法による OH ラジカル生成に及ぼす超音波周波数の影響, 日本ソノケミストリー学会 第 17 回討論会, 2008 年 12 月 5-6 日, 電気通信大学 (東京)

9. Ninomiya, K., Sonoke, S., Oshima, S., Ogino, C., Kuroda, S., Shimizu, N., Evaluation of sonocatalytic cytotoxicity of cancer cells with incorporation of TiO₂ nanoparticles, The 14th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2008, 2008.11.29-12.1, Shibaura Institute of Technology, Toyosu Campus (Tokyo)

10. Ogino, C., Shimizu, N., Application of Biomolecule-Immobilized TiO₂ Nanoparticle for Mammalian Cell killing. American Society for Microbiology 108th General Meeting, 2008.6.1-5, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, (USA)

11. 笹井良祐, 園家史朗, 大島周平, 荻野

千秋, 黒田俊一, 清水宣明, 機能性二酸化チタン・ナノ粒子のがん治療への基礎研究, 化学工学会 第73回年会, 2008年3月17-19日, 静岡大学 浜松キャンパス (浜松)

12. 崎山和亨, 大庭達哉, 荻野千秋, 清水宣明, 二酸化チタンへの超音波照射による過酸化水素生成機構の解析, 化学工学会 第73回年会, 2008年3月17-19日, 静岡大学 浜松キャンパス (浜松)

13. Ogino, C., Sasai, R., Sonoke, S., Kuroda, S., Shimizu, N., Construction of biomolecule-immobilized TiO₂ nanoparticle for applying to new cell injuring method with ultrasound irradiation, International Symposium on Sonochemistry and Sonoprocessing 2007, 2007.12.6-9, Kyoto Research Park (Kyoto) (Invited lecture)

14. Shimizu, N., Ogino, C., Farshbaf-Dadjour, M., Ultrasonic facilitation of OH radical generation in the presence of TiO₂, International Symposium on Sonochemistry and Sonoprocessing 2007, 2007.12.6-9, Kyoto Research Park (Kyoto) (Invited lecture)

15. Sasai, R., Sonoke, S., Ogino, C., Kuroda, S., Shimizu, N., The cancer cell injury by combination of protein displayed titanium dioxide nanoparticle and ultrasound irradiation. International Symposium on Sonochemistry and Sonoprocessing 2007, 2007.12.6-9, Kyoto Research Park (Kyoto)

16. Sakiyama, K., Oniwa, T., Ogino, C., Shimizu, N., Analysis of H₂O₂ formation induced by ultrasonic irradiation with TiO₂. International Symposium on Sonochemistry and Sonoprocessing 2007, 2007.12.6-9, Kyoto Research Park (Kyoto)

17. Ogino, C., Sasai, R., Sonoke, S., Shimizu, N., Application of biomolecule-immobilized TiO₂ nanoparticle for chemical compound degradation and mammalian cell killing. The 13th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC)2007, 2007.10.20-22,

Korea University, Seoul (Korea)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: ヒト肝臓がん細胞 HepG2 に特異的な結合性を有する DNA アプタマー

発明者: 仁宮 一章, 清水 宣明

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-28012

出願年月日: 2010年2月10日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 宣明 (SHIMIZU NOBUAKI)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授

研究者番号: 50019634

(2) 研究分担者

黒田 俊一 (KURODA SYUN' ICHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号: 60263406

仁宮 一章 (NINOMIYA KAZUAKI)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教

研究者番号: 10379125

(3) 連携研究者

荻野 千秋 (OGINO CHIAKI)

神戸大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 00313693

(H19: 研究分担者)