

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16854

研究課題名(和文)膵臓がん患者に対する金カプシドの光学特性を利用した新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new diagnostic and therapeutic methods for pancreatic cancer patients using the gold capsids

研究代表者

黒川 宏美 (Hiromi, Kurokawa)

筑波大学・藻類バイオマス・エネルギーシステム開発研究センター・主任研究員

研究者番号：30791496

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)：癌は本邦の死因の一位であり、未だ根治が困難な疾病である。治療法の一つに化学療法がある。多くの抗がん剤はがん特異性はなく正常組織に副作用を及ぼす。放射線療法に関しても正常組織への曝露は防ぐことができず、よりがん選択的な治療法が求められている。がん選択的な治療法を開発すべく、申請者はポルフィリン修飾金ナノ粒子(Au-HpD)を着想した。金は特定波長を照射することで熱やラジカルを発生させることができ、これにより組織を傷害できる。ポルフィリンはがん選択的な集積があり、Au-HpDを用いることでがん選択的な傷害が期待できると考えた。実際Au-HpDはがん特異的な集積、傷害効果があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金はインプラント等として治療に使用されており、ポルフィリンも光線力学療法で使用されていることから、これらを組み合わせたAu-HpDの安全性は極めて高く、臨床応用可能だと考える。Au-HpDはがん特異的な治療が可能であること、さらに表面プラズモン現象を生じるための波長は870 nmと近赤外光であることから、深部がんに対しても応用できる可能性が高い。深部がんに対するがん選択的な治療法は限られており、本研究の有用性が動物レベルで確認できれば新規治療法になりうる。

研究成果の概要(英文)：Cancer is the leading cause of death in Japan, and it is still a difficult disease to cure. Chemotherapy is one of the treatment methods. Many anticancer drugs have no cancer specific accumulation and have side effects in normal tissues. Radiation therapy also cannot prevent exposure to normal tissues, thus there is a need for more cancer selective treatment. In order to develop a cancer selective therapy, the applicant came up with the idea of porphyrin-modified gold nanoparticles (Au-HpD). Gold can generate heat and radicals when irradiated with specific wavelengths, which can damage tissues. Porphyrin have a cancer specific accumulation, and I thought that Au-HpD could be used to selectively damage cancer. In fact, Au-HpD was found to have cancer specific accumulation and injury effects.

研究分野：光生物学

キーワード：金粒子 ポルフィリン 表面プラズモン現象 がん特異的

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

種々の悪性新生物に対し、膵臓がんは5年生存率が男女ともに10%以下と非常に予後が悪いことが問題視されている。他のがん種に比べ膵臓がんの予後が悪い原因として早期発見が困難である上、外科的治療が困難な症例が散見すること、従来の化学療法では十分な治療効果が得られないことが挙げられる。したがって、従来の手法によらない新規診断法及び治療法による予後改善が望まれている。

膵臓がんに対する新規がん治療法として、これまでナノ粒子を用いた検討が行われてきた。ナノ粒子は enhance permeability and retention (EPR) 効果により血管構造が未発達かつ透過性の高まっている腫瘍組織に集積しやすい性質を有するとされる。これまで研究されてきているナノ粒子治療法の一部を Table 1 に示す。いずれの治療法も一定の治療効果が得られるものの、腫瘍特異的な送達や深部腫瘍に対し十分な治療効果が得られない点から上市に至っていない。ナノ粒子による治療法は低侵襲かつ副作用が少ないという点で他の治療法に対する有用性がある。したがって、「いかに腫瘍特異的な送達が行えるか、腫瘍特異的な傷害が誘導できるか」が重要なカギとなる。

Table 1 膵臓がんに対するナノ粒子治療法

ナノ粒子	特性
磁性ナノ粒子	・電磁誘導により熱を発生させ腫瘍組織を焼灼する
過酸化チタンナノ粒子	・活性酸素産生による傷害 ・放射線で励起することで治療の相乗効果を狙う
金ナノ粒子	・熱と活性酸素産生による傷害 ・診断ツールとしても使用可能

2. 研究の目的

本研究ではがん特異的な集積を達成するため、表面にポルフィリンを修飾した金粒子(以下、Au-HpD)(Figure 1)と近赤外(near-infrared: NIR)光を組み合わせた選択性の高いがん診断治療法の確立を目的とする。金粒子は形状により吸収波長が変化することから、深達度の高いNIR領域の光を励起源として使用できる利点がある。金粒子は励起により表面プラズモン共鳴を生じ、これにより熱やラジカル生成を行うことから、NIR光励起の達成は、深部がんに対する治療の可能性を示している。また、金粒子は光音響効果を利用することで診断にも応用でき、金カプシドの集積を確認することでがん領域の特定が可能になる。したがってAu-HpD投与後、内視鏡的にNIR光を照射することで膵臓がんの診断・治療が可能になる。さらに金カプシド励起は内視鏡的に行うため、患者に及ぼす侵襲性は低いと言える。金はインプラント等にも使用されていることから生体適合性が極めて高く、副作用もほとんどないことから本研究の有用性は高いと考える。

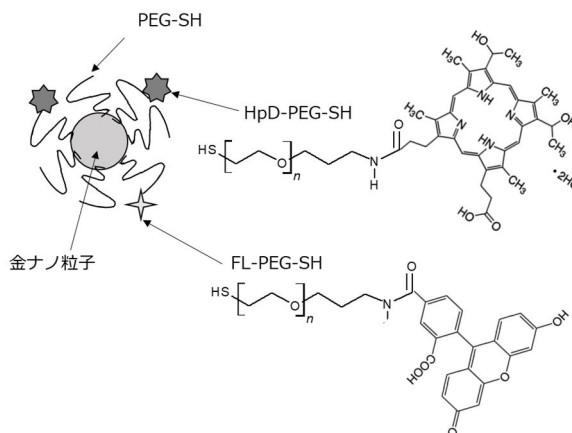


Figure 1 Au-HpD の構造

3. 研究の方法

金ナノ粒子の表面修飾は文献 [Langmuir 2016, 32, 5997 - 6009, DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b01289] を参考にした。金粒子に PEG-SH、HpD-PEG-SH と FL-PEG-SH を添加した。さらに TCEP を添加し室温で一時間静置した。反応後遠心分子で回収し、PB で 4 回洗浄し Au-HpD を得た。ナノ粒子の特性は動的散乱測定、吸光度測定、蛍光測定から明らかにした。

金ナノ粒子の in vitro 検証はラット胃粘膜正常細胞 RGM1 とそのがん様変異株 RGK1 で評価した。細胞は 12 well plate で播種し一晩培養した。その後 Au-HpD 含有培地で 24 時間培養した。培養後上清を除去しバッファーを添加して Au-HpD の蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。また Au-HpD 取り込み後の細胞を PBS で洗浄し、RIPA バッファーで細胞を破碎した。細胞破碎液の蛍光から、細胞内への Au-HpD の蓄積を評価した。さらに Au-HpD 蓄積後の細胞に 870 nm のレーザー光を照射し、照射後に細胞傷害性を顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

動的光散乱測定の結果、Au-HpD の流経は 58 nm であった (Figure 2 左)。さらに吸光度測定の結果から、530, 870, 880 nm に吸収があることが分かった (Figure 2 右)。

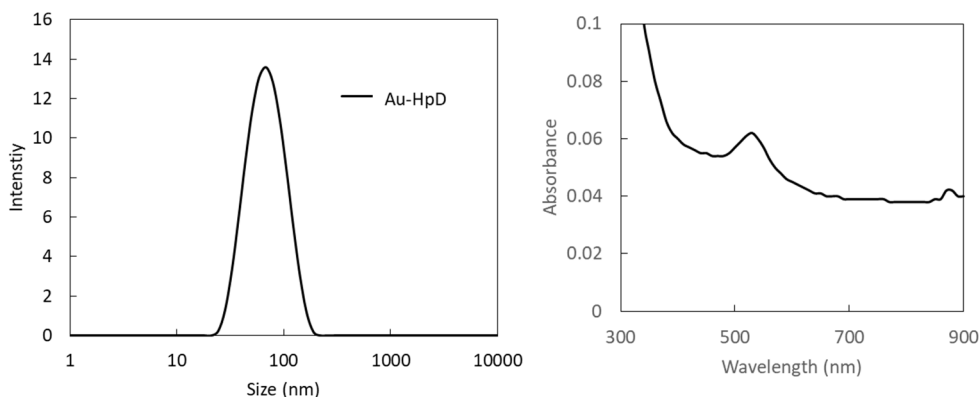


Figure 2. Au-HpD の特性。動的光散乱 (左) と吸光度 (右) 測定。

細胞内の Au-HpD 蓄積量の結果を Figure 3 に示す。Au-HpD の蓄積はがん細胞で有意に高いことが明らかになった。

さらに Au-HpD 取り込み 24 時間後、細胞に 870 nm のレーザー光照射をした。照射直後の状態を Figure 4 に示す。正常細胞に比べがん細胞では細胞傷害が誘導された。

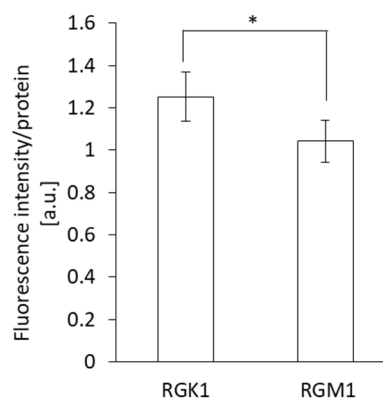


Figure 3. 細胞内からの Au-HpD の蛍光。

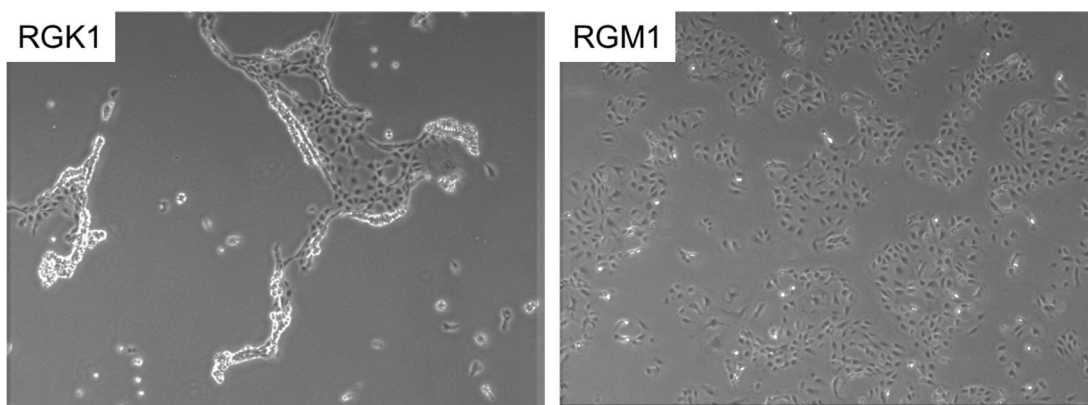


Figure 4. Au-HpD による細胞傷害。正常細胞 (右) に比べがん細胞では細胞傷害が有生じた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujita Toyohisa, Kurokawa Hiromi, Han Zhenyao, Zhou Yali, Matsui Hirofumi, Ponou Josiane, Dodbiba Gjergj, He Chunlin, Wei Yuezou	4. 巻 11
2. 論文標題 Free radical degradation in aqueous solution by blowing hydrogen and carbon dioxide nanobubbles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3068
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82717-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ito Hiromu, Kurokawa Hiromi, Matsui Hirofumi	4. 巻 700
2. 論文標題 Mitochondrial reactive oxygen species and heme, non-heme iron metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108695 ~ 108695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2020.108695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Terasaki Azusa, Kurokawa Hiromi, Ito Hiromu, Komatsu Yoshiki, Matano Daisuke, Terasaki Masahiko, Bando Hiroko, Hara Hisato, Matsui Hirofumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Elevated Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species via Hyperthermia Enhanced Cytotoxic Effect of Doxorubicin in Human Breast Cancer Cell Lines MDA-MB-453 and MCF-7	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9522 ~ 9522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21249522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kurokawa H, Taninaka A, Shigekawa H and Matsui H	4. 巻 未定
2. 論文標題 The cytotoxicity of cyclophosphamide is enhanced in combination with monascus pigment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 黒川宏美、松井裕史	4. 巻 未定
2. 論文標題 ミトコンドリア由来活性酸素と光線力学療法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 光アライアンス	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 名越優、谷中淳、宇賀神駿太、黒川宏美、武内修、松井裕史、重川秀実
2. 発表標題 光線力学療法により生じるガン細胞の局所弾性率変化のAFM観察
3. 学会等名 2020年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川宏美、宇賀神駿太、谷中淳、重川秀実、松井裕史
2. 発表標題 Porphyllipoproteinのがん特異的PDT効果と胆管がんに対するPDT効果のin vitro/ in vivo検証
3. 学会等名 LASER WEEK IN KOCHI
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷中淳、黒川宏美、宇賀神駿太、斎藤浩太郎、名越優、武内修、松井裕史、重川秀実
2. 発表標題 細胞の弾性率マップを用いた光線力学療法における局所効果の可視化
3. 学会等名 LASER WEEK IN KOCHI
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉富 徹 (Yoshitomi Toru)		
研究協力者	谷中 淳 (Taninaka Atsushi)		
研究協力者	松井 裕史 (Matsui Hirofumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------