

令和 7 年 5 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K07643

研究課題名（和文）微小気泡を利用したナノ粒子放射線増感治療法の高効率化

研究課題名（英文）Radioenhancement using ultrasound-stimulated microbubbles and nanoparticles

研究代表者

中山 雅央（Nakayama, Masao）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：60582004

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：膵がん細胞株を用いたin vitro実験において、マイクロバブル・超音波照射をX線照射と併用することにより殺細胞効果が増強されることが示された。その相乗的な放射線増感効果については細胞の種類やマイクロバブル濃度に依存することが示唆された。一方でそれらとナノ粒子との併用による放射線増感効果の増強は認められなかった。本研究の実施条件ではマイクロバブル・超音波照射の段階でマイクロバブル濃度に依存した有意な細胞死が生じていたため、ナノ粒子による追加の増強効果は見られなかったと推察される。ナノ粒子併用にあたっては最適なマイクロバブル・超音波照射条件の検討が必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロバブル・超音波照射による放射線増感効果、さらにナノ粒子との併用効果に関する過去の報告数は少なく、その有効性については不明であった。本研究の成果によりマイクロバブル・超音波照射の放射線増感効果の可能性が示されたとともに、新たな課題も明らかになり、今後マイクロバブルを用いたがん放射線治療の研究発展につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This in vitro study demonstrated significant cell-killing effects on pancreatic cancer cells when ultrasound-stimulated microbubbles and X-rays were used in combination.

The results suggest that ultrasound-stimulated microbubbles can enhance the therapeutic efficacy of radiation therapy additively, whilst the synergistic dose enhancement effects may be dependent on the cell type and microbubble concentration. However, they did not improve the efficacy of nanoparticle-induced radiosensitisation. As the ultrasound exposure settings used in this study were limited, further studies with different experimental settings are needed to confirm the effects of ultrasound-stimulated microbubbles on radiation therapy and nanoparticles.

研究分野：放射線治療

キーワード：マイクロバブル 超音波 放射線治療 ナノ粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線治療はがん治療における主要な治療法の1つであり、切らずに治す低侵襲治療として年々治療患者数は増加している。しかし一般的なX線を用いた治療では進行した癌やX線抵抗性をもつ癌には効果が低いという欠点があり、そのような腫瘍に対してはX線を照射するだけでは治癒へ導くことが難しい。これに対する1つの方法として腫瘍のX線の効果を局所的に高める放射線増感剤がある。

放射線増感剤の1つとして、金属ナノ粒子が注目されている。X線照射によりナノ粒子から生成される2次電子が生体内での活性酸素種 (ROS, Reactive Oxygen Species) を増加させることにより細胞死を増強することができる。多くの先行研究でナノ粒子の放射線増感効果は報告されており、我々のグループでも二酸化チタンをベースに独自合成した過酸化チタンナノ粒子を使用した細胞実験および動物実験で放射線増感剤としてのその有効性を報告してきた[1]。

しかし、課題としてナノ粒子の細胞内へ取り込み量が少なく、投与量に対してその増感効果が十分に発揮されていないことが挙げられる。実際、過酸化チタンナノ粒子を担癌マウスに血管投与した実験では、投与したナノ粒子の約10%しか腫瘍に集積していなかった[2]。

そこでマイクロバブルの利用に着目した。マイクロバブルは超音波診断の微小気泡造影剤として一般的に臨床現場で使用されているが、マイクロバブルに超音波照射すると生じるキャビテーションやソノポレーション現象により、隣接する細胞の細胞膜に一時的に孔を開け、細胞内への薬剤導入を促進することがいくつかの研究で示唆されている[3]。さらに超音波照射したマイクロバブル自体が放射線増感剤としても作用することも報告されている[4]。このマイクロバブルをナノ粒子に組み合わせることにより、がん細胞へのナノ粒子の取り込み量が増加し、相乗的な放射線増感効果が得られないかと考えた。

2. 研究の目的

膵臓がん細胞に対するマイクロバブルとナノ粒子のハイブリッド放射線増感療法の有用性を *in vitro* にて検証することを目的とした。膵がんは従来の放射線治療で難治性とされており、将来的に放射線増感剤の良い適応疾患になり得ると考え、本研究で使用した。最初にマイクロバブルと超音波照射での細胞毒性と放射線増感効果を調べ、その後にそれらとナノ粒子を組み合わせたときの放射線増感効果について調べた。

3. 研究の方法

マイクロバブルはソナゾイド (GEヘルスケアファーマ社製)、超音波装置はLOGIQ e、4C-RSプローブ (GEヘルスケアジャパン社製) を用いた。いずれも実臨床でも使用しているものであり、超音波の照射パラメータ (周波数、MI値および照射時間) は照射前後のマイクロバブルの変化をもとに最適化した。

細胞実験にはヒト膵がん細胞株である MIA PaCa-2、PANC-1 を使い、トリプシン処理により浮遊状態にして異なる濃度のマイクロバブルやナノ粒子を添加し、超音波照射を行った。放射線照射は 150 kVp の X 線、ナノ粒子は過酸化チタンナノ粒子を用いた[1]。処置後、Water-Soluble Tetrazolium (WST) アッセイおよびコロニーアッセイにより細胞の生存率を、Carboxy 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (c-H₂DCFDA) アッセイにより生成される ROS を評価した。

4. 研究成果

(1) 超音波照射パラメータの違いによるマイクロバブルへの影響

24 ウェルプレート上の 0.2% v/v マイクロバブルに対し周波数 2.0 ~ 5.5 MHz、MI 値 0.4 ~ 1.0 の超音波をプレート底部から一様に 1 ~ 5 分間照射した際のマイクロバブルの変化を観察したところ、4.0 MHz、MI 値 1.0、照射時間 3 分の条件下で平均 97.2% のマイクロバブルが超音波照射により圧壊されることが確認された (図 1)。本研究ではこのマイクロバブルの圧壊が細胞損傷に寄与すると仮定し、この照射パラメータを以下の細胞実験で用いることとした。

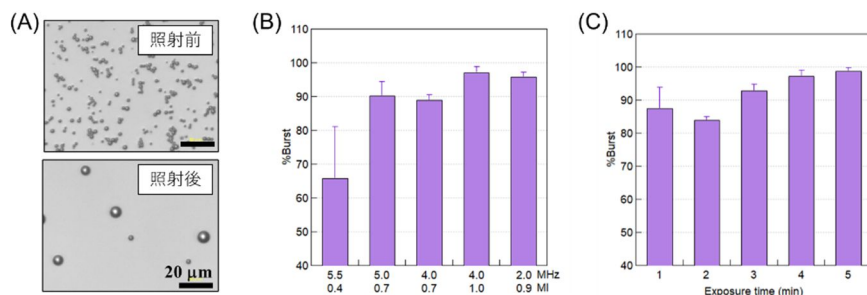


図 1. (A) 顕微鏡下で観察した超音波照射前後でのマイクロバブル。 (B) 異なる周波数、MI 値の超音波照射によるマイクロバブルの圧壊率。 (C) 4.0 MHz、MI 値 1.0 の超音波を用いた照射時間の違いによるマイクロバブルの圧壊率。

(2) マイクロバブルと超音波照射による細胞毒性

0~0.4% v/v のマイクロバブルを添加した MIAPaCa-2、PANC-1 細胞の処置後 24 時間での細胞生存率を WST アッセイで評価した。両細胞ともマイクロバブル単独では毒性を示さなかったが、そこに超音波照射を加えるとマイクロバブル濃度に依存した有意な殺細胞効果が認められた(図 2A、2B)。処置後 1 時間の細胞のトリパンブルー染色では、マイクロバブル+超音波照射群においてコントロール群やマイクロバブル単独群と比較して多くの細胞死が確認され(図 2C)、またこれらの細胞では細胞構造が破壊されている様子が観察された。マイクロバブルへの超音波照射により生じるキャビテーション現象等が隣接する細胞へ作用し、細胞死が引き起こされると考えられる。

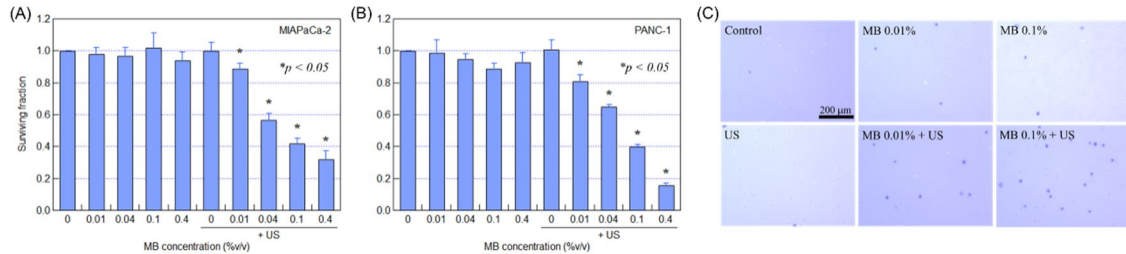


図 2. マイクロバブルと超音波照射による殺細胞効果。(A、B) 処置後 24 時間での MIAPaCa-2 および PANC-1 細胞の生存率、(C) MIAPaCa-2 のトリパンブルー染色像。MB：マイクロバブル、US：超音波照射。

(3) マイクロバブルと超音波照射による放射線増感効果

0.01%または 0.4% v/v のマイクロバブルを加えた細胞に対し超音波を照射後、3 Gy または 6 Gy の X 線を照射したときの細胞生存率をコロニーアッセイにより評価した。結果、MIAPaCa-2、PANC-1 ともマイクロバブル+超音波と X 線照射の併用群は X 線照射単独群と比べて有意に細胞生存率が低かった(図 3)。PANC-1 ではマイクロバブル濃度に応じた生存率の低下がみられたが、X 線 6 Gy を照射した MIAPaCa-2 においては 0.4% v/v マイクロバブル群より 0.01% v/v マイクロバブル群の方が有意に低い細胞生存率であった。

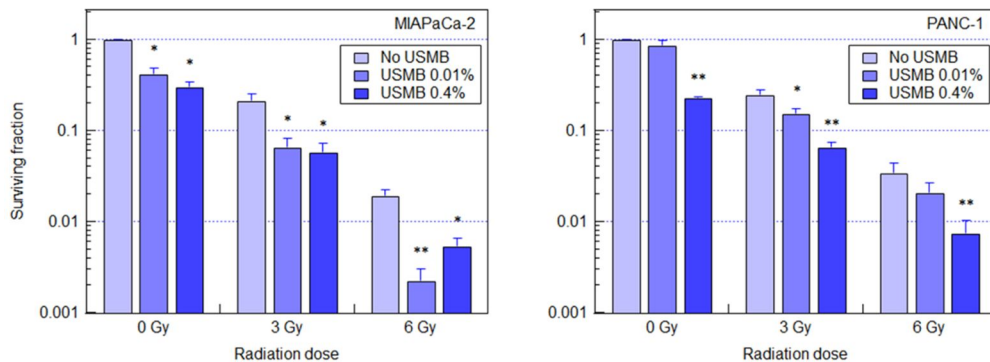


図 3. マイクロバブルと超音波照射後に X 線照射を追加したときの細胞生存率。(左) MIAPaCa-2、(右) PANC-1 細胞。USMB：マイクロバブルと超音波照射。*X 線単独群に対して $p < 0.05$ 、**マイクロバブル濃度間において $p < 0.05$ 。

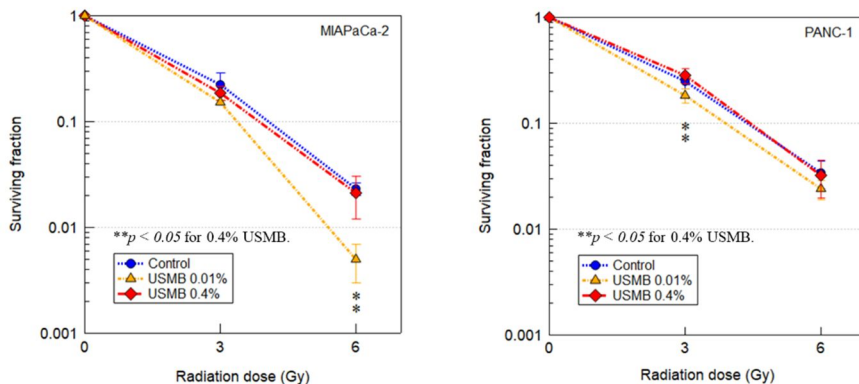


図 4. マイクロバブル+超音波照射による放射線増感効果。(左) MIAPaCa-2、(右) PANC-1 細胞。**マイクロバブル濃度間において $p < 0.05$ 。USMB：マイクロバブルと超音波照射。

各群 0 Gy の生存率で正規化した細胞生存率曲線により放射線増感効果を評価した。0.01% マイクロバブル + X 線 6 Gy 処置の MIAPaCa-2 細胞群では大きな相乗効果が見られた (Dose Enhancement factor (DEF) = 1.13) (図 5)。PANC-1 細胞においても同群で放射線増感効果の傾向が見られたものの、6 Gy 照射群で有意な差は見られなかった (DEF = 1.10)。また、両細胞とも 0.4% マイクロバブル + X 線群では放射線増感効果は見られなかった。この理由は、図 2 で示されたように 0.4% マイクロバブルへの超音波照射だけで十分な殺細胞効果が引き起こされており、そこに X 線照射を上乗せしても効果が少なかったためと考えている。

さらに 0.01% マイクロバブル + X 線 6 Gy 群に対する c-H₂DCFDA アッセイでは MIAPaCa-2、PANC-1 細胞とも 3 者併用群で有意な ROS の増加を認めた (図 5)。このことからマイクロバブル + 超音波照射による放射線増感効果のメカニズムには ROS が関与していることが示唆される。

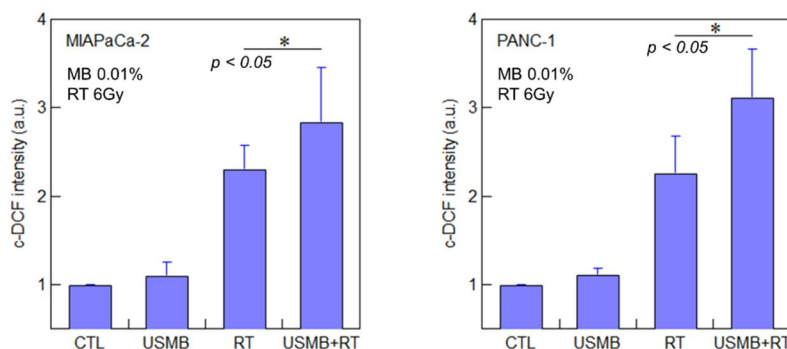


図 5. 0.01% マイクロバブルに超音波照射、6 Gy X 線照射後の ROS 生成量の評価。(左) MIAPaCa-2、(右) PANC-1 細胞。CTL: コントロール(処置なし)、USMB: マイクロバブルと超音波、RT: X 線照射、USMB + RT: マイクロバブル、超音波、X 線併用群。

(4) マイクロバブルと超音波照射にナノ粒子を加えた場合の放射線増感効果

同様の条件でナノ粒子を追加した場合の細胞生存率をコロニーアッセイで評価した。ナノ粒子の追加による生存率の低下は認められたものの、生存率曲線においては MIAPaCa-2、PANC-1 ともマイクロバブル + ナノ粒子の有無で放射線増感効果に差は見られなかった (図 6)。また蛍光標識したナノ粒子を用いてマイクロバブルと超音波照射処置を行った細胞に対するナノ粒子の細胞内への取り込みを観察したものの、多くの細胞で細胞構造が破壊されており、取り込み量の増加を評価することが困難であった。

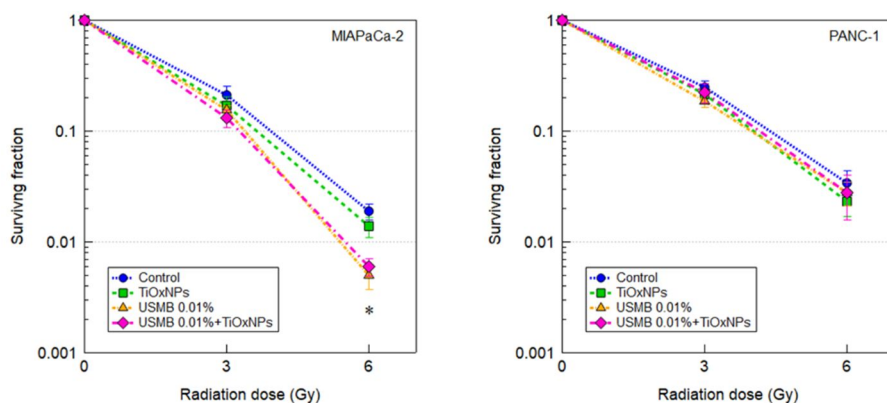


図 6. マイクロバブル、ナノ粒子、超音波照射による放射線増感効果。(左) MIAPaCa-2、(右) PANC-1 細胞。TiOxNPs: 過酸化チタンナノ粒子、USMB: マイクロバブルと超音波照射。

(5) 結語

本研究結果から X 線照射にマイクロバブルと超音波照射を併用することにより殺細胞効果が増強されることが示された。その相乗的な放射線増感効果にかんしては細胞の種類やマイクロバブル濃度に依存することが示唆された。一方で、本研究ではマイクロバブルの圧壊による細胞損傷に着目して実験条件を設定しており、マイクロバブルと超音波照射の段階で十分な殺細胞効果が認められた。そのため、それに続いて X 線照射やナノ粒子を加えてもその相乗効果は限定的であったと考えられる。ナノ粒子の細胞内への導入量を含めた放射線増感効果に最適なマイクロバブルおよび超音波照射の条件についてさらなる検討が必要である。

引用文献

1. Nakayama M, Sasaki R, Ogino C, et al. Titanium peroxide nanoparticles enhanced cytotoxic effects of X-ray irradiation against pancreatic cancer model through reactive oxygen species generation in vitro and in vivo. *Radiat Oncol*. 2016 Jul 7;11(1):91.
2. Morita K, Suzuki T, Nishimura Y, et al. In vivo tissue distribution and safety of polyacrylic acid-modified titanium peroxide nanoparticles as novel radiosensitizers. *J Biosci Bioeng*. 2018 Jul;126(1):119-125. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.012. Epub 2018 Feb 13.
3. Przystupski D, Ussowicz M. Landscape of Cellular Bioeffects Triggered by Ultrasound-Induced Sonoporation. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 23;23(19):11222.
4. McCorkell G, Piva T, Highgate D, Nakayama M, Geso M. Ultrasound-stimulated microbubbles to enhance radiotherapy: A scoping review. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2024 Sep;68(6):740-769.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakayama Masao, Noda Ayaha, Akasaka Hiroaki, Tominaga Takahiro, McCorkell Giulia, Geso Moshi, Sasaki Ryohei	4. 巻 49
2. 論文標題 Ultrasound-stimulated Microbubbles for Treatment of Pancreatic Cancer Cells with Radiation and Nanoparticles: In vitro Study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Medical Physics	6. 最初と最後の頁 326 ~ 334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/jmp.jmp_30_24	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 McCorkell Giulia, Piva Terrence, Highgate Declan, Nakayama Masao, Geso Moshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Ultrasound stimulated microbubbles to enhance radiotherapy: A scoping review	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 740 ~ 769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1754-9485.13740	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 McCorkell Giulia, Nakayama Masao, Feltis Bryce, Piva Terrence J., Geso Moshi	4. 巻 3
2. 論文標題 In Vitro Radioenhancement Using Ultrasound-Stimulated Microbubbles: A Comparison of Suspension and Adherent Cell States	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Radiation	6. 最初と最後の頁 153 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/radiation3030013	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 McCorkell Giulia, Nakayama Masao, Feltis Bryce, Piva Terrence, Geso Moshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Ultrasound-Stimulated Microbubbles Enhance Radiation-Induced Cell Killing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ultrasound in Medicine & Biology	6. 最初と最後の頁 2449 ~ 2460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2022.07.001	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masao Nakayama, Ayaha Noda, Hiroaki Akasaka, Takahiro Tominaga, Giulia McCorkell, Moshi Geso, Ryohei Sasaki
2. 発表標題 Radiation Dose Enhancement Effects on Pancreatic Cancer Cells by Ultrasound-Stimulated Microbubbles
3. 学会等名 International Conference on Medical Physics (ICMP) 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山雅央、野田文葉、赤坂浩亮、富永孝宏、佐々木良平
2. 発表標題 マイクロバブル超音波造影剤による放射線治療増感効果の検討
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会（JASTRO）第36回学術大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	石原 武明 (Ishihara Takeaki) (10546477)	神戸大学・医学部附属病院・特命講師 (14501)	
研究分担者	椋本 成俊 (Mukumoto Naritoshi) (70634278)	神戸大学・医学部附属病院・特命助教 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	野田 文葉 (Noda Ayaha)	広島国際大学・保健医療学部・大学院生 (35413)	
研究協力者	赤坂 浩亮 (Akasaka Hiroaki) (20707161)	神戸大学・医学研究科・特命助教 (14501)	

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			
オーストラリア	RMIT University			