

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 23 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度

課題番号：22592104

研究課題名（和文） ナノテクノロジーを用いた口腔悪性腫瘍の治療への検討

研究課題名（英文） Study of the treatment of oral malignant tumor using nanotechnology

研究代表者 三好 代志子 (Miyoshi Yoshiko)

神奈川県大学・歯学部・講師

研究者番号：70288075

研究成果の概要（和文）：

光触媒酸化チタン(TiO₂)は、化学的に反応だが光照射によりその表面に強い酸化力を持つことから、新しい癌治療への応用が期待されている。すでに、TiO₂と光の相互作用によりヒト膀胱癌細胞対し、殺細胞効果を確認され臨床応用の研究がすすめられている。そこで、TiO₂と光照射は表在性の癌治療に有望であることから、歯科・口腔領域の悪性腫瘍においてナノテクノロジーを用いたTiO₂と光照射効果による治療の可能性とその条件や機序を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Photo catalyst titanium oxide (TiO₂) is a reaction chemically. TiO₂ have the strong oxidation power on the surface by light irradiation. Application to new cancer treatment is expected. Already, The human bladder bladder cancer cell have been identified the cell killing effect by the interaction of light and TiO₂. Study of clinical application of these is recommended. TiO₂ and the light irradiation are promising for superficial cancer treatment. We have to clarify the mechanism and conditions and the possibility of treatment with light irradiation effect and TiO₂ using nano technology in malignant oral area tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学、光触媒酸化チタン、ナノテクノロジー、口腔悪性腫瘍、癌治療、光照射

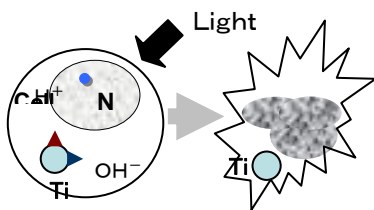
1. 研究開始当初の背景

酸化チタン(TiO₂)は光エネルギーを用いた水の分解が可能であることが明らかになり科学研究分野で話題になり1972年にNature誌で報告された。代表的な光触媒として知られる。酸化チタン(TiO₂)光触媒の研究は、TiO₂電極に光を当てることによって、水が酸素と水素に分解されるホムダーフジシマ効果の発見から(1972年にNature誌)始まった。酸化チタンはここで生じた電子が、表面吸着酸素と反応してスーパーオキサイドアニオン(・O₂⁻)、ペルオキシラジカル(HO₂・)を生成する。正孔は、触媒表面上の吸着水と反応しヒドロキシラジカル(・OH)が生じるか、そのまま表面補足正孔(h_{trap}⁺)となる。これらの活性酸素種により、強力な酸化分解、有機物の分解や殺菌などの光触媒作用が引き起こされるということがわかった。酸化チタン自体は化学的に極めて安定な物質であり、通常の状態においては生体や細胞内外の物質とは反応しない安全性の高い物質と確認されており、光触媒として知られる。

現在、TiO₂は、日常生活の中で注目され光の照射や温度によって瞬間的にOHラジカルなどの活性酸素が発生することを活用し、塩素・過酸化水素・オゾンなどよりはるかに強い消毒や殺菌などを行うことができる。この強い酸化力により水中や溶剤中の有害な化学物質や細菌の分解・無害化・不活化ができ、それらを利用することにより、

水処理・脱臭・排ガス処理・大気浄化・土壌処理・抗菌・抗カビ・汚れの分解(防汚)・シックハウス対策など環境分野などに実用化されてきている。「光触媒反応の生命体への応用研究」は、酸化チタンが化学的に安定して、光のOn-Offによって化学反応を制御できるうえに、注目され、研究がすすめられている。生体内に対して余計な反応を誘発せず、異物反応や副作用が少ないことが示唆され、光による反応をコントロールは、生体内外での制御機構を人工的に構築できる可能性が高いことを意味している。ヒト癌細胞(ヒト子宮頸癌細胞(HeLa細胞)、ヒト膀胱癌細胞(T-24細胞))にてTiO₂光触媒とUVA(340~350nm)光照射により、がもたされることが明らかになっており、またその機能も調べられている。

(*KubotaY, ShuinT, KawasakiC. *etal.* Photokilling of T-24 human bladder cancer cells with titanium dioxide. Br J Cancer. 1994;70, 1107-1111.)



から、新しい癌治療への応用が期待されている。すでに、TiO₂と光の相互作用によりヒト癌細胞に(ヒト子宮頸癌細胞(HeLa細胞)、ヒト膀胱癌細胞(T-24細胞))対し、殺細胞効果を確認され臨床応用の研究

がすすめられている。*)そこで、TiO₂と光照射は表在性の癌治療に有望であることから、歯科・口腔領域の悪性腫瘍においてTiO₂と光照射効果による治療の可能性とその条件、そして細胞死が誘導される機序を明らかにする。

医療分野においてTiO₂3大特徴(防汚、脱臭・消臭、殺菌)の応用により、医学材料や医療機材における殺菌や抗菌効果を示す薄膜コートした抗菌タイルは、院内感染防止の床や壁や手術室の空気清浄へ用いられた。大腸菌、緑膿菌、MRSA等に対して光照射後1時間で殺菌率99.9%という効果が得られている。これらにより、癌治療や癌予防への応用等、医学、医療に関連する周辺領域での効果の可能性や実現性への検討が始まってきている。歯科領域では変色歯の漂白、義歯の抗菌、合着セメントなどへの応用が試みている。

本研究では、このTiO₂を用いて口腔癌(悪性腫瘍・前癌病変(白板症)・前癌状態(扁平苔癬)など)治療への応用の可能性を考え、TiO₂と抗癌剤等の薬剤が組織への感受性を調整するモデルの効果が期待できることと今後さらに、より病変部にTiO₂と抗癌剤等の薬剤の特性が効果的に利用すれば新しい治療展開が開けることが明らかになって、癌治療の局所化も期待できる。これをもとに歯科領域悪性腫瘍に応用するに際して、実験動物などの検討を進める。すでに、膀胱癌治療において、横浜市立大学泌尿器科のグループで光照射の時にTiO₂薄膜上で培養した癌細胞は死滅したという報告をしている。これを基準に今回我々は、光触媒の歯科・口腔領域への応用の可能性に注目し

1) TiO₂により口腔領域癌細胞株を用いて *in vitro* 及び *in vivo* において導入しその後光照射することで細胞内の光化学反応を励起させることにより、口腔領域癌細胞株への殺細胞効果や抗腫瘍効果のメカニズムを検討する。

2) TiO₂の作用により、マウス皮下に移植した口腔領域癌の成長を抑制と腫瘍内血管新生を抑制することを確認する。

3) TiO₂により前癌病変への光触媒による癌化予防の検討を行う。

※歯科・口腔領域癌治療へのTiO₂の新しい応用の可能性を探ることと、生化学的や分子生物学的な手法でTiO₂が癌細胞にどのような変動が起り得るか目的とする。

※光触媒という新しい考えは今まで歯科・口腔領域の癌治療として応用されたことは無く、どのような応用が展開できるかはまったく未知である。有効な治療法が確立していない口腔癌の治療への応用をまず考え、これらに光触媒がうまく臨床応用できるか検討する目的である。

3. 研究の方法

口腔領域癌細胞にTiO₂を投与し細胞内の光を励起させると、TiO₂は細胞表面に分布するものと細胞内に pinocytosis により取り込まれるものとあり。光照射をうけるとその部で活性酸素やフリーラジカルが発生し、細胞死が誘導される。窪田らはTiO₂光照射反応の殺細胞効果は壊死によるものと報告しているが、その詳細な機序は明らかになっておらず今回口腔領域癌細胞で検索する。さらに、TiO₂の光触媒反応により、活性酸素分子種(・O₂⁻)、(H₂O₂・)を生成する。光触媒の抗腫瘍効果は、これらの活性酸素分子種の癌細胞に与えた刺激、フリーラジカルによるいわゆる環境ストレスによるものと予想される。適度な酸化ストレスはアポ

トーススを誘導するか。過度の酸化ストレスはネクロトーシスを誘導するかを検索し、それらのアポトーシス関連遺伝子 (MAPK, ASK1, JNK, p38, Bcl-2, TRAF2) との関連も検討する。TiO₂ 反応により (・O₂) (H₂O₂・) と (・OH) の生成は、TiO₂ 使用量と照射時間とともに進行している。そこで口腔領域癌細胞に対し TiO₂ と抗腫瘍効果のメカニズムを解明する。TiO₂ の反応程度をコントロールし、以下の実験を検討する。

[平成 22-23 年度]

口腔領域悪性腫瘍細胞の生存率と TiO₂ 反応の相関を検索する。酸化ストレスにより活性化されたタンパク質キナーゼ ASK1 やストレス反応性 MAPK キナーゼ経路を検討する。ASK1 の活性化によるアポトーシスの誘導とネクロトーシスの誘導の関連する JNK と p38 の活性化をみて検討する。

1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞を培養した後、TiO₂ 投与し照射後、トリパンブルー染色・コロニー形成法および MTT 法を用いて細胞の生死判定を検索する。照射時間を変え、殺細胞効果について比較検討する。(担当: ヒト癌細胞サンプリングー鈴木、細胞培養・照射一三好)

2) 光触媒反応による酸化ストレスの刺激を受けた細胞の形態変化を位相差顕微鏡により観察し、細胞を蛍光免疫染色したものも蛍光顕微鏡で観察する。(担当: 蛍光免疫染色・鏡検一窪田)

3) 光触媒反応で処理された細胞について、ASK1 の活性と JNK・p38 の活性およびそれらに關与する細胞シグナル伝達の変動を Western Blotting 法・免疫染色・アポトーシス DNA ラダーで検出する。(担当: 分子生物実験一三好)

4) 光触媒反応による酸化ストレスからアポトーシス調節因子である (Bcl-2) の変動とその関連遺伝子の発現を PCR 法などで検索を行う。(担当: 分子生物的検索一三好)

5) 強い酸化ストレスによるネクロトーシスの tumor necrosis factor receptor2 (TRAF2) と receptor interaction protein (RIP) の検索を Western Blotting 法・免疫染色・ELISA 法などで検索する。(担当: 分子生物的検索一三好、免疫染色および病理組織検索一窪田)

6) 正常ヒト口腔領域由来細胞株への照射による DNA 傷害からの酸化チタンによる防御作用について検討する。正常ヒト口腔領域細胞に紫外光・可視光を照射した後に DNA を抽出し、ピリミジンダイマーを認識する抗体を用いて ELISA 法にて (6-4) 型ピリミジンダイマー、シクロブタン型ダイマーの 2 種類のピリミジンダイマーを定量する。(担当: 分子生物実験一三好)

[平成 23-24 年度]

1) ノドマウスの皮下にヒト口腔扁平上皮癌細胞を移植し腫瘍形成した後、腫瘍が 0.5cm の時に TiO₂ を腫瘍に導入し、3 日後に腫瘍に光を照射する。無処置群、TiO₂ 単独群、照射単独群、TiO₂ + 照射群についてその後の腫瘍の増殖を比較検討する。

2) 腫瘍内導入された TiO₂ の分布や照射後の腫瘍や正常組織の状態を病理組織学的に検討する。TiO₂ が、組織内でどのように反応変化を示すか照射 On-Off によりコントロール出来るかを試みる。さらに、TiO₂ 照射を受けるとその部で活性酸素やフリーラジカルが腫瘍組織内で発せすることよりフリーラジカルを経時的に測定と腫瘍との相関とを検討する。(担当: ヒト癌細胞サンプリングー鈴木、分子生物実験一三好)

3) TiO₂ を導入し腫瘍組織内の血管新生を照射単独群、TiO₂ + 照射群に分け免疫組織学的 (CD31 など) に比較検討する。(担当: 蛍光, 免疫染色・鏡検一窪田)

[平成 24 年度]

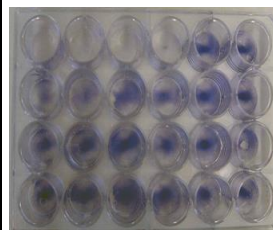
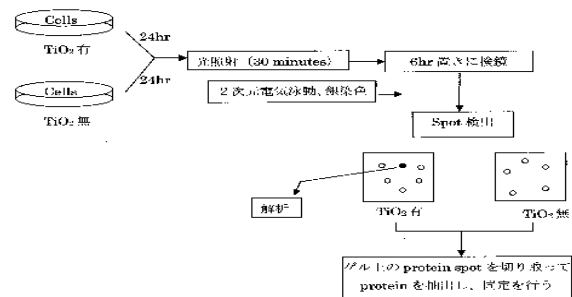
データの整ったものからまとめ国内外で発表 (学

会・論文) をする。

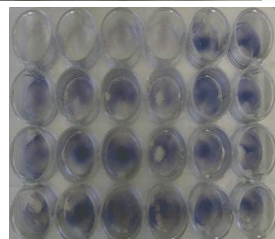
4. 研究成果

TiO₂ により口腔領域癌細胞株を用いて *in vitro* 及び *in vivo* において導入しその後後に照射することで細胞内の光化学反応を励起させることにより、口腔領域癌細胞株への殺細胞効果や抗腫瘍効果のメカニズムを検討した。

ヒト口腔扁平上皮癌細胞を培養した後、TiO₂ 投与し照射後、トリパンブルー染色・コロニー形成法および MTT 法を用いて細胞の生死判定を検索する。照射時間を変え、殺細胞効果について比較検討した。



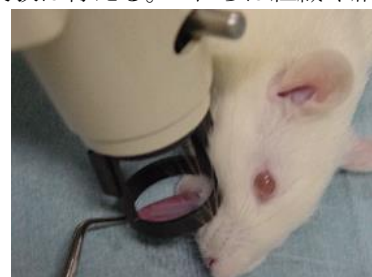
KB 細胞+ TiO₂ 後 UV (+)



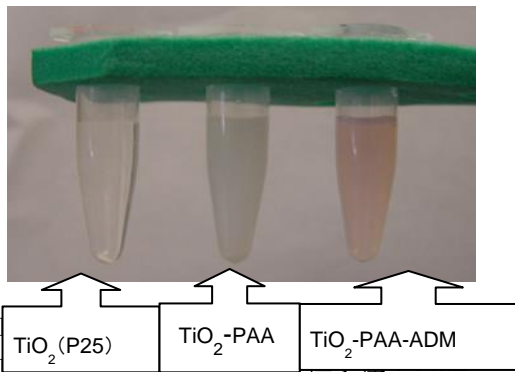
KB 細胞+ TiO₂ 後 UV (-)

光触媒反応による酸化ストレスの刺激を受けた細胞の形態変化を位相差顕微鏡により観察した。

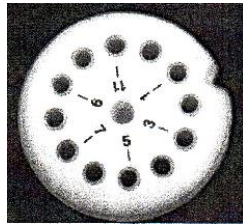
光触媒酸化チタン (TiO₂) 微粒子と制癌剤を dry 状態で細胞や生体に投入する方法では、制癌剤の効果の実験は行える。これらは組織や細



胞への遺伝子導入の方法の一つである。遺伝子銃を用いる方法での実験を行った。これは光触媒酸化チタン (TiO₂) を腫瘍組織や口腔粘膜組織などに効率良く導入するため、光触媒酸化チタン (TiO₂) ((株) 石原工業 ST-21 (P-25) 日本) 0.8mg を e1・金粒子 (Bio listic® 1.0Micron Gold Bio-Rad 日本) (φ1μm) 50mg に静電的に担持させた。さらに、この光触媒酸化チタン (TiO₂) 付着金粒子に制癌剤の一つである Adriamycin (アドリアマイシン) 薬剤を付着させた弾を作成した。



TiO₂ (P25) TiO₂-PAA TiO₂-PAA-ADM



遺伝子銃弾とルーレット

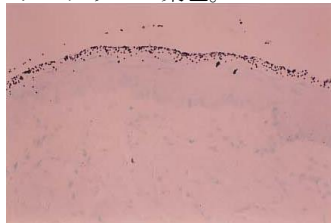
ラット口腔粘膜（舌）へのアドレマイシンと光触媒酸化チタン(TiO₂)の導入の結果。

WisterRAT♂舌 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後

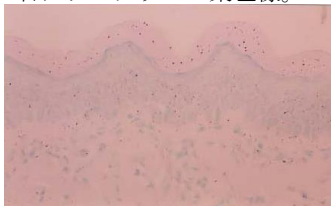


UV(-)直後肉眼像

WisterRAT♂舌 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(-)直後メチルグリーン染色。



WisterRAT♂舌 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(-)1日目メチルグリーン染色像。



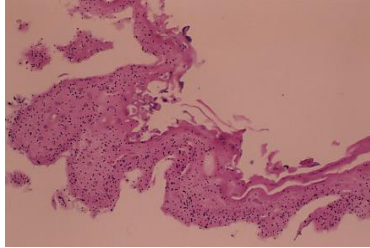
WisterRAT♂舌 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(+)
2日目肉眼像。



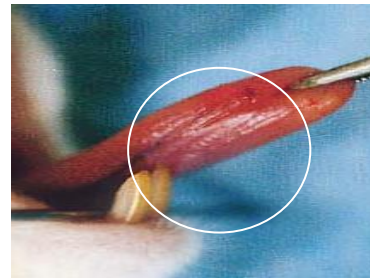
WisterRAT♂舌 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(-)2日目肉眼像。



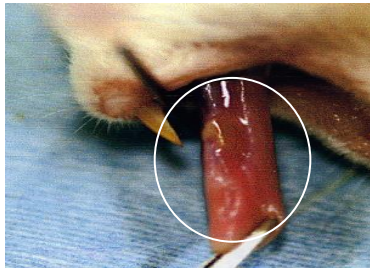
WisterRAT♂舌 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(-)2日目 HE 像。



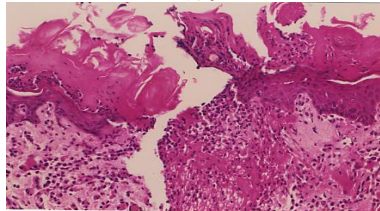
WisterRAT♂舌 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(+)
3日目肉眼像。



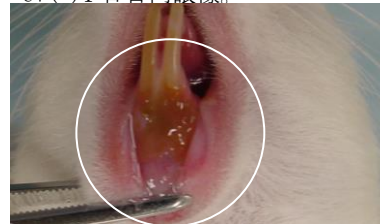
WisterRAT♂舌 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(-)
3日目肉眼像。



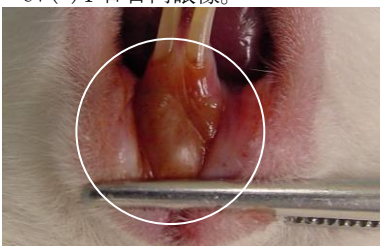
WisterRAT♂舌 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(-)
3日目 HE 像。



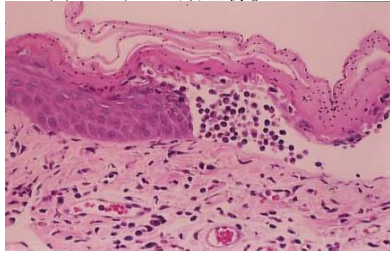
WisterRAT♂下口唇 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(+)
1日目肉眼像。



WisterRAT♂下口唇 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(-)
1日目肉眼像。



WisterRAT♂下口唇 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(-)1日目 HE染色像。



WisterRAT♂下口唇 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(+)3日目肉眼像。

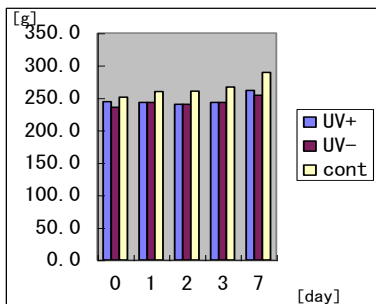


WisterRAT♂下口唇 TiO₂+ADM 遺伝子銃打込み後 UV(-)3日目肉眼像。



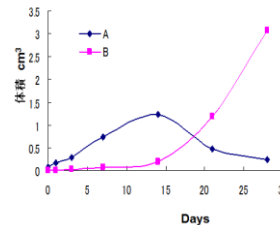
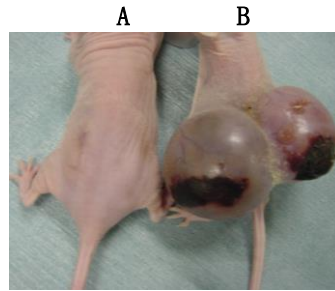
口腔粘膜肉眼的所見では、打ち込み後 UV 照射しない群において、1日目から3日目にかけ口腔粘膜に、びらん潰瘍形成および炎症が認められた。これらの群は5日目以降より治癒傾向し7日目にはほぼ完治した。UV照射した群は、肉眼的に何も変化は観察されなかった。病理組織学的所見では、組織標本において、抗癌剤と光触媒酸化チタン TiO₂ 付着金粒子は、ラット口腔粘膜上皮の角化層を中心に上皮全層と一部上皮下結合組織に抗癌剤と光触媒酸化チタン TiO₂ 付着金粒子が黒褐色の微小粒子として観察された。また、抗癌剤と光触媒酸化チタン TiO₂ 付着金粒子挿入した後 UV 照射した群は、病理組織学的に変化は認められなかった。抗癌剤と光触媒酸化チタン TiO₂ 付着金粒子挿入した後 UV 照射しなかったものは、病理組織学的にも1-2日後に上皮欠損（潰瘍所見）びらんが観察できた。

ラット体重変化では打ち込み後 UV 照射した群と UV 照射しない群とで図のごとく変化を示した。



UV 照射しなかった群は、コントロール群に比べ2日以降の体重増加が悪かった。口腔内の症状より摂食ができなかったと考えられる。

TiO₂ 担持金粒子光照射、腫瘍の大きさの違い



同じ条件内の A と B のマウスが21日目あたりで腫瘍の大きさが逆転している。A のマウスは21日目までは少しずつ腫瘍が大きくなってきたがその後かさぶたが出来、高さが無くなり平らになってきた。

ヌードマウス腫瘍では抗癌剤と光触媒酸化チタン金粒子を腫瘍へ導入後 UV 照射した群が UV 照射しない群と比較し腫瘍径の増殖が小さかった。結果より光触媒酸化チタン (TiO₂) は UV 照射 On-Off により抗癌剤等の薬剤の組織への作用を調節する効果が発揮期待できることが示唆された。今後さらに病変部における抗癌剤等の薬剤の局所的・効果的とその調節作用について応用検討する。

TiO₂-PAA-ADM の効果に対する光照射の影響 (ラット舌粘膜モデル) 光スイッチ
10%TiO₂-ADM 0.3ml、ラット舌粘膜下注射
光照射：UVA 光 2.5m Watt/cm² 30分



UV(-) 5時間後



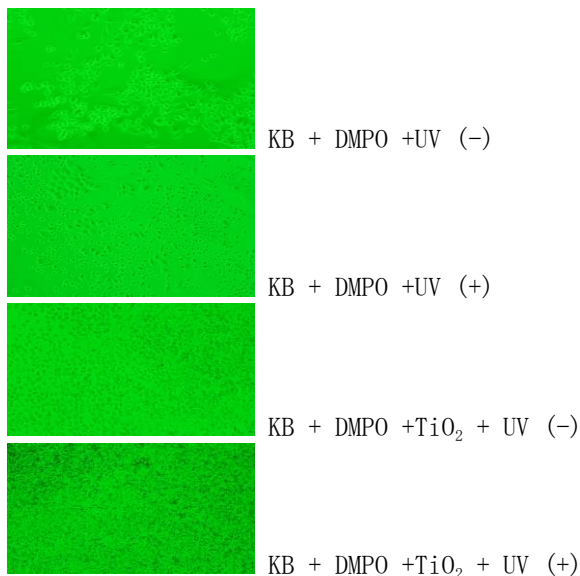
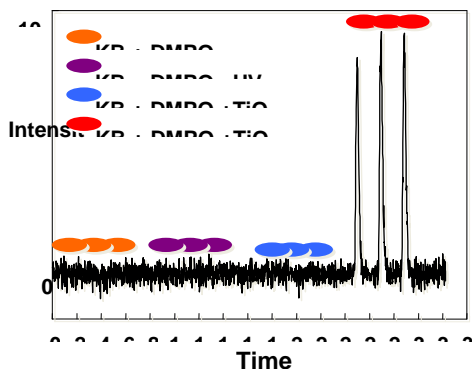
UV(+) 5時間後



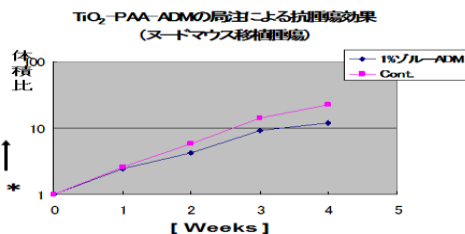
UV(-) 1日後



UV(+) 1日後



* TiO₂-PAA-ADM を 100 μ 腫瘍部に局注した (暗所)



* TiO₂-PAA-ADM は腫瘍局注

* 光照射 (2mWatt/cm² 45min)は局注直後に行なった

* 4週間後に腫瘍体積を算定

中性溶液 TiO₂-PAA-ADM において 1%ゾル UV 照射した群にのみヒドロキシルラジカルとスーパーオキシドどちらも検出されました。

中性溶液 TiO₂-PAA-ADM をヌードマウス移植腫瘍内に注入し、UV 照射した群と UV 照射しない群とで腫瘍体積を比較した結果、UV 照射した群において 10%ゾルより 1%ゾルの方が、腫瘍体積増加が遅く抗腫瘍効果がみられた。

中性溶液光触媒酸化チタン (TiO₂-PAA-ADM) は UV 照射 On-Off により抗癌剤等の薬剤の組織感受性を調整するモデル的効果発揮が期待できることが示唆された。

今後、中性溶液光触媒酸化チタンより、フリーラジカルとの相関や生体内での生理的機能を追及したい。さらに、病変部における抗癌剤等の薬剤が局所的・効果的について応用検討していきたい。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

○ Y. MIYOSHI¹, N. KUBOTA¹, K. SUZUKI², and K. TSUKINOKI

IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition 91st General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), which will be held in conjunction with the 42nd Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) and the 37th Annual Meeting of the Canadian Association for Dental Research (CADR) March 20-23, 2013,

The Washington State Convention Center, 800 Convention Place, Seattle, Washington, 98101, USA.

[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

三好 代志子 (Miyoshi yoshiko)

神奈川歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 70288075

(2) 研究分担者

窪田展久 (Kubota Nobuhisa)

神奈川歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 20234495

(3) 研究分担者

鈴木 健司 (Suzuki Kenzi)

神奈川歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 80350536

(4) 連携研究者

窪田 吉信 (Kubota Yoshinobu)

横浜市立大学・医学部・教授

研究者番号: 10106312