

令和 7 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K07771

研究課題名（和文）簡便かつ革新的な表面修飾DDSを応用した全がん対応の放射線増感ナノ粒子の開発

研究課題名（英文）Development of radiosensitized nanoparticles for all cancers using simple and innovative surface-modified DDS

研究代表者

赤坂 浩亮（Akasaka, Hiroaki）

神戸大学・医学研究科・特命助教（PD）

研究者番号：20707161

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、放射線増感効果を有する過酸化チタンナノ粒子に抗CD44抗体を表面修飾する新手法を開発した。タンニン酸を用いることで、抗体を非共有結合的に簡便に固定可能とし、CD44陽性細胞に対する親和性はin vitroで約2倍、in vivoで約2倍に向上、細胞内への取り込みも促進された。腫瘍への集積量や放射線増感作用も約2倍に高まり、がん細胞の増殖を約50%抑制した（ $p < 0.05$ ）。さらに、in vivoにおいても標的化機能が維持され、高い有用性が示された。本手法は今後、がんの精密医療への応用が期待され、他のナノ材料への展開も可能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

この研究成果の学術的意義は、抗体をナノ粒子表面に効率的に修飾する新手法を確立したことである。この手法は、放射線増感効果を持つナノ粒子の標的化を実現し、がん治療の精密医療に寄与する可能性がある。タンニン酸を利用した抗体の非共有結合的修飾法は、簡便でありながら強力な標的化能力を示し、他のナノ材料にも応用可能と考えられる。

社会的意義としては、この技術ががん治療の新たなアプローチを提供し、放射線治療とナノテクノロジーを組み合わせた治療法を実現する可能性がある。放射線感受性向上により、がん患者の治療効果を高め、副作用の軽減が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, a novel method for surface functionalization of titanium peroxide nanoparticles with anti-CD44 antibodies was developed to enhance radiation sensitization. Tannic acid was used to non-covalently and efficiently attach the antibodies to the nanoparticles, allowing for versatile molecular interactions. The antibody-functionalized nanoparticles (PPN-PAATiOx) exhibited approximately 2-fold higher affinity for CD44-positive cells in vitro and approximately 2-fold higher affinity in vivo, with enhanced cellular uptake. Tumor accumulation and radiation sensitization were also increased by about 2-fold, leading to a significant 50% inhibition of cancer cell growth ($p < 0.05$). Moreover, the targeting function was maintained in vivo, demonstrating high efficacy. This method shows promise for precision medicine in cancer therapy and can be extended to other nanomaterials.

研究分野：放射線科学

キーワード：ナノ粒子 放射線増感剤 DDS

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、手術や化学療法と並ぶがん治療の柱であるが、放射線抵抗性を示す難治性腫瘍、特に切除不能腫瘍などでは治療成績が依然として不良である。放射線治療の効果は主に活性酸素種 (ROS) による細胞障害に基づくが、多くの難治がんは抗酸化物質を高発現しており、ROS を除去することで治療効果を減弱させている。申請者らは、従来の金属ナノ粒子とは異なり、放射線照射により大量の ROS を産生する過酸化チタンナノ粒子を世界で初めて開発し、その放射線増感効果を明らかにしてきた。一方で、投与されたナノ粒子の腫瘍集積性や持続性に課題があり、その改善が必要であった。これに対し、がん特異的抗体を結合可能なポリペプチド-ポリフェノールネットワーク (PPN) を構築し、抗体を過酸化チタンナノ粒子表面に修飾することで、がん細胞への選択的集積を可能とする技術の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PPN-過酸化チタンナノ粒子の臨床応用に向け、①過酸化チタンナノ粒子への修飾が可能な PPN の合成、②各種がん細胞への特異的集積性、③放射線との併用による増感効果、④生体安全性の評価を行うことである。従来の DDS とは異なり、PPN はナノ粒子表面を直接コーティングする方式であるため、粒子サイズの自由度が高く、複数のナノ粒子を複合化した次世代型放射線増感剤の開発も視野に入る。本研究は、がん治療とナノメディシン分野の融合による新たな治療戦略を提案するものであり、高い独創性と発展性を有している。

3. 研究の方法

まず、がん幹細胞に多く発現している抗 CD44 抗体を用いて PPN を合成し、過酸化チタンナノ粒子に修飾させる。次に、これらの PPN-過酸化チタンナノ粒子を用いて、*in vitro* では蛍光標識による共焦点顕微鏡観察、*in vivo* では IVIS を用いた担癌マウスでの集積性評価を実施する。放射線増感効果の検証には、細胞コロニー形成アッセイを行い、その効果を解析する。さらに、安全性評価として、げっ歯類を用いた血液生化学検査を実施し、臨床応用に向けた基礎データの確保を図る。

4. 研究成果

R4 年度から R6 年度にかけての研究期間において、過酸化チタンナノ粒子にドラッグデリバリーシステム (DDS) 機能を付与することを目的とし、ポリフェノールを用いた抗体修飾を行い、その機能について *in vitro* および *in vivo* の両面から検討を行ってきた。本研究期間における主な成果を以下に示す。

(1) 抗体修飾過酸化チタンナノ粒子の合成および特性評価：(図 1)

PAATiO_x NPs (過酸化チタンナノ粒子) をコアとし、ポリフェノールおよび抗体を用いて修飾を行った抗体修飾過酸化チタンナノ粒子 (PPN-PAATiO_x NPs) の合成プロトコルを確立した。透過型電子顕微鏡 (TEM) 像において良好な分散が確認され、ゼータ電位測定においても同様に良好な分散性が示された。また、粒径およびゼータ電位に関して、抗体修飾の有無による有意な差は認められず、抗体修飾が過酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性に影響を及ぼさないことが示

唆された。

さらに、抗体修飾が活性酸素種 (ROS) 生成に及ぼす影響を調べるため、プレートリーダーを用いた ROS 生成量の評価を実施した。その結果、抗体修飾を行っても、PAATiOx NPs によるヒドロキシラジカルおよび過酸化水素の生成量に有意な減少は認められず、抗体修飾が ROS 生成能に影響を与えないことが確認された。

(2) 抗体修飾過酸化チタンナノ粒子の cell targeting 評価 (in vitro) : (図2)

抗体で表面修飾を行ったナノ粒子の cell targeting 能を評価するため、in vitro における細胞取り込み実験を実施した。使用した抗体は抗 CD44 抗体であり、CD44 陽性細胞として MDA-MB-231 細胞および MIAPaCa-2 細胞、CD44 陰性細胞として BT-474 細胞を使用した。各細胞の CD44 発現量は、事前にフローサイトメトリーにより確認した。

フローサイトメトリーの結果、PPN-PAATiOx NPs は CD44 陰性細胞 (BT-474 細胞) には取り込まれず、CD44 陽性細胞 (MDA-MB-231 細胞、MIAPaCa-2 細胞) には有意に多く取り込まれることが確認された。また、蛍光顕微鏡による評価においても、同様に CD44 陽性細胞において有意な取り込みの増加が認められた。以上より、抗体修飾による cell targeting 機能が in vitro 環境下において有効に機能していることが確認された。

(3) 抗体修飾過酸化チタンナノ粒子の抗腫瘍効果評価 (in vitro) : (図3)

Cell targeting 能を確認した後、PPN-PAATiOx NPs が放射線増感効果を保持しているかを評価するため、コロニーアッセイを用いた細胞生存率測定を実施した。その結果、PPN-PAATiOx NPs は、CD44 陽性細胞に対して有意な放射線増感効果を示すことが確認された。

(4) 抗体修飾過酸化チタンナノ粒子の生体安全性評価 (in vivo) : (表1)

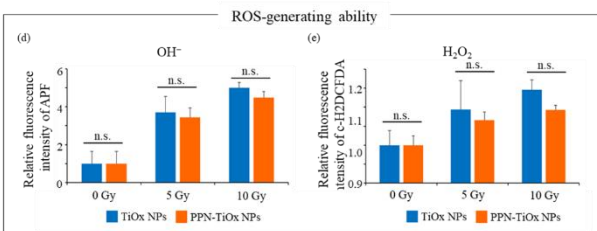
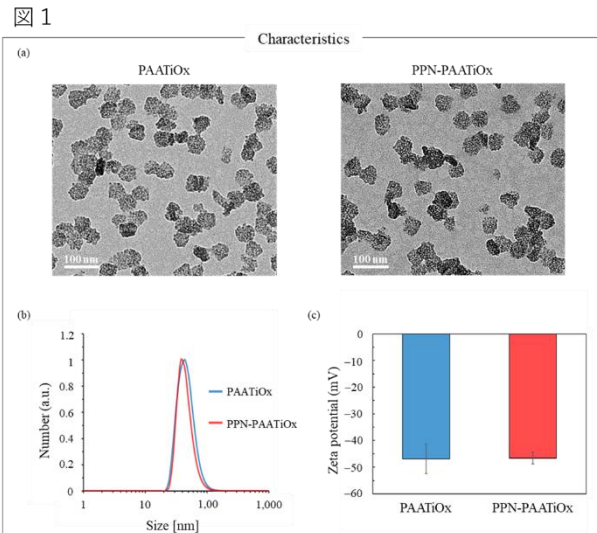
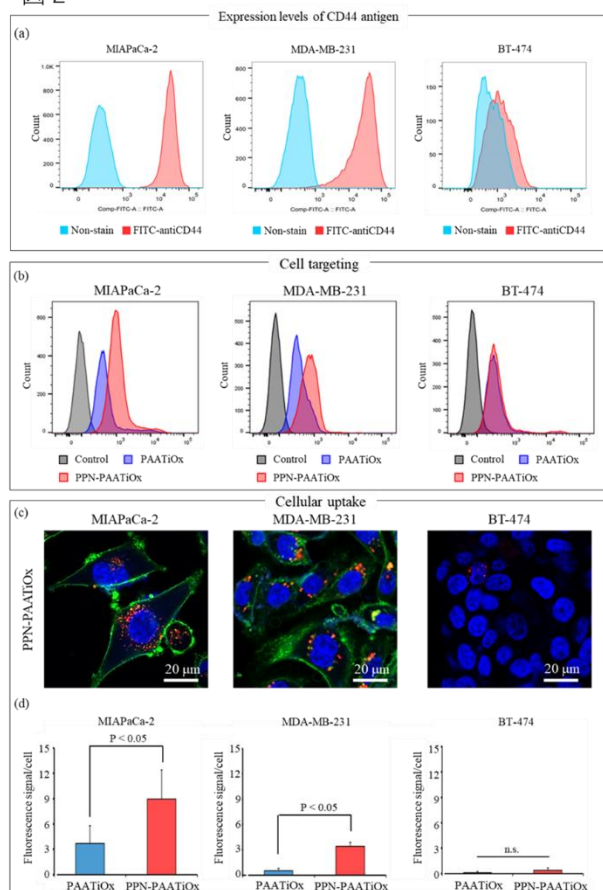
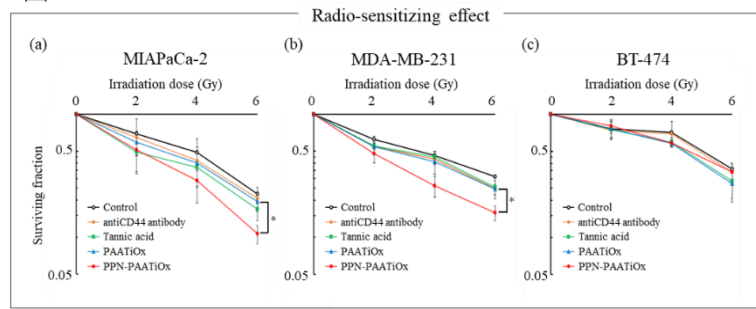


図2



Cell targeting 能を確認した後、in vivo における生体安全性を評価するため、ヌードマウスに PPN-PAATiOx NPs を尾静脈より投与し、一定時間経過後に採血を行い、生化学検査を実施した。その結果、肝機能および腎機能に異常は認め

図 3



られず、コントロール群と同程度の値を示した。以上より、PPN-PAATiOx NPs は生体に対して良好な安全性を有することが示された。

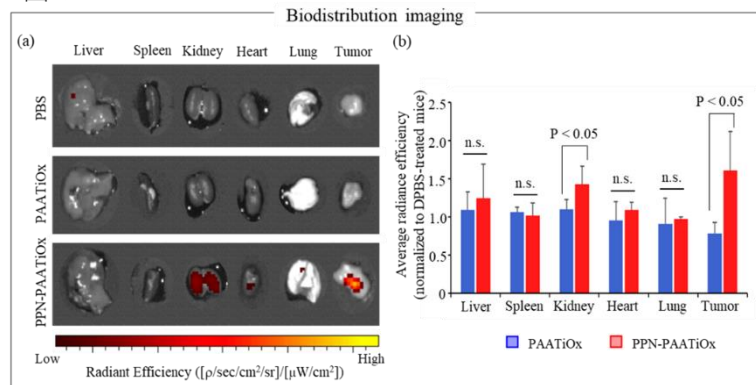
表 1

Parameter	Treatment group				
	Control	PAATiOx NPs	p-value (vs. Control)	PPN-PAATiOx NPs	p-value (vs. Control)
Renal function					
UN(mg/dL)	19.5 ± 2.3	18.5 ± 0.9	n.s.	19.0 ± 2.4	n.s.
CRE(mg/dL)	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02	n.s.	0.12 ± 0.02	n.s.
Liver function					
AST(IU/L)	150 ± 61	129 ± 54	n.s.	144 ± 69	n.s.
ALT(IU/L)	64 ± 18	39 ± 10	n.s.	40 ± 10	n.s.
ALP(IFCC)(IU/L)	104 ± 11	119 ± 9	n.s.	96 ± 30	n.s.
LDH(IFCC)(IU/L)	394 ± 80	278 ± 89	n.s.	273 ± 83	n.s.
LAP(IU/L)	40 ± 2	40 ± 2	n.s.	39 ± 1	n.s.
γ-GT(IU/L)	< 3	< 3	n.s.	< 3	n.s.

(5) 抗体修飾過酸化チタンナノ粒子の cell targeting 評価 (in vivo) : (図 4)

最後に、MDA-MB-231 細胞を移植した担癌マウスモデルを用いて、PPN-PAATiOx NPs の腫瘍ターゲティング性能を評価した。腫瘍がマウス体内に生着した後、尾静脈よりナノ粒子を投与し、一定時間経過後に IVIS (in vivo imaging system) によりマウス体内の

図 4



ナノ粒子分布を評価した。その結果、肝臓、脾臓、心臓、肺への集積は、抗体修飾の有無にかかわらず同程度であったが、腎臓および腫瘍への集積量については、PPN-PAATiOx NPs の方が PAATiOx NPs よりも有意に高い値を示した。以上より、本研究の目的である in vivo における PAATiOx NPs の標的デリバリーが達成されたことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Oki Yuya, Akasaka Hiroaki, Uehara Kazuyuki, Mizonobe Kazufusa, Sawada Masanobu, Nagata Junya, Harada Aya, Mayahara Hiroshi	4. 巻 Jan 24
2. 論文標題 Evaluation of robustness of optimization methods in breast intensity-modulated radiation therapy using TomoTherapy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Physical and Engineering Sciences in Medicine	6. 最初と最後の頁 1, 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13246-023-01377-7	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 Akasaka Hiroaki, Mizonobe Kazufusa, Oki Yuya, Uehara Kazuyuki, Nakayama Masao, Tamura Shuhei, Munetomo Yoshiki, Kawaguchi Haruna, Ishida Jun, Harada Aya, Ishihara Takeaki, Kubota Hikaru, Kawaguchi Hiroki, Sasaki Ryohei, Mayahara Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Fiducial marker position affects target volume in stereotactic lung irradiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Clinical Medical Physics	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acm2.13596	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 Sisin Noor Nabilah Talik, Rashid Raizulnasuha Ab, Abdullah Reduan, Razak Khairunisak Abdul, Geso Moshi, Akasaka Hiroaki, Sasaki Ryohei, Tominaga Takahiro, Miura Hayato, Nishi Masashi, Rahman Wan Nordiana	4. 巻 2
2. 論文標題 Gafchromic [®] EBT3 Film Measurements of Dose Enhancement Effects by Metallic Nanoparticles for 192Ir Brachytherapy, Proton, Photon and Electron Radiotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiation	6. 最初と最後の頁 130 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/radiation2010010	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 Kitayama Yukiya, Yamada Takuya, Kiguchi Kentaro, Yoshida Aoi, Hayashi Shuhei, Akasaka Hiroaki, Igarashi Kazunori, Nishimura Yuya, Matsumoto Yu, Sasaki Ryohei, Takano Eri, Sunayama Hirobumi, Takeuchi Toshifumi	4. 巻 10
2. 論文標題 <i>In vivo</i> stealthified molecularly imprinted polymer nanogels incorporated with gold nanoparticles for radiation therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6784 ~ 6791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2tb00481j	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 Salah Mohammed, Akasaka Hiroaki, Shimizu Yasuyuki, Morita Kenta, Nishimura Yuya, Kubota Hikaru, Kawaguchi Hiroki, Sogawa Tomomi, Mukumoto Naritoshi, Ogino Chiaki, Sasaki Ryohei	4. 巻 41
2. 論文標題 Reactive oxygen species-inducing titanium peroxide nanoparticles as promising radiosensitizers for eliminating pancreatic cancer stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-022-02358-6	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 Mizonobe Kazufusa, Akasaka Hiroaki, Uehara Kazuyuki, Oki Yuya, Nakayama Masao, Tamura Shuhei, Munetomo Yoshiki, Kubo Katsumaro, Kawaguchi Hiroki, Harada Aya, Mayahara Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Respiratory motion tracking of spine stereotactic radiotherapy in prone position	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Applied Clinical Medical Physics	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acm2.13910	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 Nakayama Masao, Akasaka Hiroaki, Sasaki Ryohei, Geso Moshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Titanium Dioxide-Based Nanoparticles to Enhance Radiation Therapy for Cancer: A Literature Review	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Nanotheranostics	6. 最初と最後の頁 60 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jnt5020004	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 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 Tsunemine Shogo, Ozawa Shuichi, Nakao Minoru, Miura Hideharu, Onishi Takashi, Ichiki Mamoru, Sugimoto Satoru, Inoue Tatsuya, Oki Yuya, Akasaka Hiroaki, Hanmura Masahiro, Harada Hideyuki, Nishimura Tetsuo, Murakami Yuji, Nagata Yasushi	4. 巻 132
2. 論文標題 Improved stoichiometric model for megavoltage computed tomography number conversion and dose calculation within the TomoTherapy delivery system	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Physica Medica	6. 最初と最後の頁 104915 ~ 104915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmp.2025.104915	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

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 1.Hiroaki Akasaka, Kazufusa Mizonobe, Yuya Oki, Kazuyuki Uehara, Shuhei Tamura, Yoshiki Munetomo, Aya Harada, Masao Nakayama, Haruna Kawaguchi and Hiroshi Mayahara
2. 発表標題 Association of Fiducial Marker Position with Target Volume in Stereotactic Lung Irradiation: A Cross-Sectional Study
3. 学会等名 AAPM (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 2.Haruna Kawaguchi, Jun Ishida, Chihiro Shindo, Hiroki Horinouchi, Kazuki Terashima, Hiroshi Mayahara, Hiroaki Akasaka, Kazufusa Mizonobe, Masahiko Fujii
2. 発表標題 Safety and Efficacy of Transvenous Fiducial Marker Placement for Stereotactic Body Radiotherapy of Malignant Lung Tumors
3. 学会等名 JRS
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 3.Hiroaki Akasaka, Kazufusa Mizonobe, Yuya Oki, Kazuyuki Uehara, Shuhei Tamura, Yoshiki Munetomo, Takeaki Ishihara, Haruna Kawaguchi, Jun Ishida and Hiroshi Mayahara
2. 発表標題 The position variation between fiducial marker and tumor according to respiratory motion of 250 patients treated by CyberKnife
3. 学会等名 JSMP
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 4. Shogo Tsunemine, Shuichi Ozawa, Minoru Nakao, Hideharu Miura, Daisuke Kawahara, Akito Saito, Yasuhiko Onishi, Takashi Onishi, Mamoru Ichiki, Satoru Sugimoto, Tatsuya Inoue, Hiroaki Akasaka, Yuya Oki, Hidetoshi Yamasaki, Tsutomu Maruta, Yuji Murakami and Yasushi Nagata
2. 発表標題 Development of Stoichiometric calibration method for MVCT to MD table on Tomotherapy
3. 学会等名 JSMP
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 5. Kazufusa Mizonobe, Kazuyuki Uehara, Hiroaki Akasaka, Yuya Oki, Syuhei Tamura, Yoshiki Munetomo, Hiroshi Mayahara
2. 発表標題 Clinical log file analysis for assessing the tracking accuracy of stereotactic spinal radiosurgery in prone position
3. 学会等名 JSMP
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤坂浩亮
2. 発表標題 細胞ターゲティングを付加した過酸化チタンナノ粒子の将来展望
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 赤坂 浩亮、富田哲也、街道亮斗、米田洋介、齋藤正英、高橋侑大、谷本祐樹、中林匡、本間大晴、松永卓磨、南佳孝	4. 発行年 2024年
2. 出版社 日本医学物理学会	5. 総ページ数 43
3. 書名 測定ベースのIMRT QAにおける許容限界及び方法論 米国医学物理学会治療物理委員会タスクグループ218 勧告 日本語訳	

〔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	荻野 千秋 (Ogino Chiaki) (00313693)	神戸大学・工学研究科・教授 (14501)	
研究分担者	佐々木 良平 (Sasaki Ryohei) (30346267)	神戸大学・医学部附属病院・教授 (14501)	
研究分担者	宮脇 大輔 (Miyawaki Daisuke) (30546502)	神戸大学・医学部附属病院・特命准教授 (14501)	
研究分担者	中山 雅央 (Nakayama Masao) (60582004)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (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)	
研究分担者	清水 康之 (Shimizu Yasuyuki) (80824234)	神戸大学・医学部附属病院・特命技術員 (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