

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650294

研究課題名(和文) 抗がん剤耐性を示すがん幹細胞へ集積する超音波応答性ナノ粒子を用いたがん根治療法

研究課題名(英文) Targeted sonocatalytic cancer cell injury using avidin-conjugated titanium dioxide nanoparticles

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織の中には“がん幹細胞”とよばれる少数の細胞が存在し、大多数の“分化”したがん細胞を殺傷しても、このがん幹細胞が生き残っている限り、がんは再発すると言われている。がん幹細胞は無限の増殖を示し、また薬剤排出能も高いため抗がん剤に対する抵抗性が高い。よって、がん幹細胞をいかに死滅させるかが、がんを根治するための鍵といえる。本研究では、がん幹細胞に特異的に集積する「標的化二酸化チタンナノ粒子」と後述する「超音波触媒法」とを融合した、非侵襲的かつ臓器機能温存型の新規がん治療法を構築した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied sonodynamic therapy to cancer cells based on the delivery of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles (NPs) modified with avidin protein, which preferentially discriminated cancerous cells from healthy cells. Subsequently, hydroxyl radicals were generated from the TiO₂ NPs after activation by external ultrasound irradiation (TiO₂/US treatment). Although 30% of the normal breast cells (human mammary epithelial cells) exhibited the uptake of avidin-modified TiO₂ NPs, over 80% of the breast cancer cells (MCF-7) exhibited the uptake of avidin-TiO₂ NPs. Next the effect of the TiO₂/US treatment on MCF-7 cell growth was examined for up to 96 h after 1-MHz ultrasound was applied (0.1 W/cm², 30 s) to cells that incorporated the TiO₂ NPs. No apparent cell injury was observed until 24 h after the treatment, but the viable cell concentration declined to 68% compared with the control at 96 h.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波 二酸化チタン ナノ粒子 OHラジカル がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡原因の第一位であり、その約3分の1を占めているのががんである。しかし、現在がんに対する画期的な治療法はまだ確立されていない。その原因の一つとしてがん細胞と正常細胞を識別することが困難であることが挙げられる。これまで、当研究室では、二酸化チタン/超音波触媒法 (TiO₂/U.S.法) によるがん細胞増殖抑制効果を実証してきた。これは、二酸化チタン粒子存在下で超音波を照射すると、強い酸化力をもつOHラジカルの発生が促進することを利用した方法である。しかしながら、OHラジカルには腫瘍部位選択性がないため、投与したTiO₂粒子を腫瘍部位に集積させる必要があった。

本研究では腫瘍細胞に特異的に結合するタンパク質としてアビジンに着目し、アビジン修飾TiO₂ナノ粒子(avi-TiO₂)の作製と、それを用いたTiO₂/U.S.法によるがん細胞増殖抑制効果の評価することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) TiO₂/U.S.法

二酸化チタン(TiO₂)は、常温常圧では酸、アルカリ、有機溶媒に溶解せず、フッ化水素、塩素、硫化水素などの反応性の強いガスとも反応しない、極めて安定な物質である。また、耐久性、耐摩耗性、経済性、安全性、実用性などで多くの利点を持っていることから、光触媒として主に使用され、研究されている。光触媒反応は光触媒体の表面でのみ反応が進行し、さらに紫外線が照射された部位のみで反応が進行するという特徴を持つ。二酸化チタンに390 nm以下の近紫外線領域の光が照射されると、価電子帯にある電子が励起して伝導帯に移動する。電子が元々あった場所には正孔が生じる。この電子と正孔はそれぞれ非常に強い還元力、酸化力を持っており、酸素や水と反応することによってOHラジカルやスーパーオキサイドアニオンなどの活性酸素種を生じる。中でもOHラジカルの酸化力は特に大きい。このように光を照射することで、二酸化チタン表面に生成した活性酸素種の強い酸化力によって、分解困難な有機化合物質や有害物質・環境汚染物質の分解、大腸菌をはじめとする細菌類の殺菌・抗菌作用などへの応用が期待されている

しかしこれらの特徴は水の浄化や体の深部のがん治療を考えた際は、そのすべての部位に光を照射することは困難であり必ずしも利点とはならない。そこで、二酸化チタン粒子に、光ではなく超音波を照射することでOHラジカルが発生されることが当研究室で確認されている(Fig. 1)。また、超音波の縦波が液中に伝搬すると音圧の高低により液体中に密度の粗の部分と密な部分が生じるため、キャビテーションが起こり、さらにOHラジカルの発生が促進される。

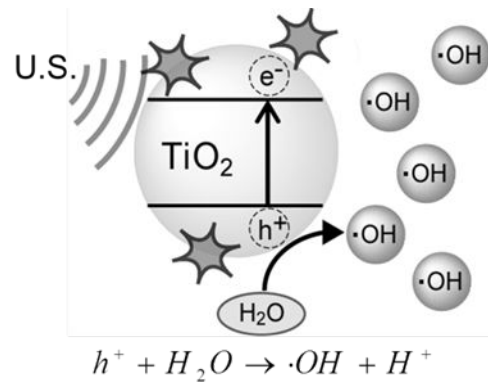


Fig. 1 Schematic drawing of TiO₂/U.S. method.

(2) 腫瘍細胞表面のレクチン

レクチンとは、糖と特異的に結合するタンパク質もしくは糖タンパク質の総称であり、糖質の構造を厳密に認識して結合する。様々な腫瘍細胞や悪性組織にはレクチンが存在しており、その糖鎖結合能や分子の大きさ、抗原性は正常な細胞や組織に含まれるレクチンと同等であり、その著しい配列相同性も確認されている。細胞によってその量は異なるものの、がん遺伝子の導入やレトロウイルスによって正常細胞が形質転換された後に増加することが近年の研究で実証された。また転移能の高いものほど細胞表面に多くのレクチンが発現していることも確認されている。これまでに細胞表面の糖鎖をもつ分子は形質転換後に修飾されることが多くの研究で報告されているが、それに伴い糖鎖結合性のタンパク質の細胞表面の発現量も変化すると考えられる [1]。

(3) アビジンによる腫瘍組織標的化

アビジンは生卵白中に含まれる分子量約68,000の低分子の糖タンパク質の一種である。1分子が4個のサブユニットから構成され、各サブユニットは1分子のビオチン(ビタミンH)と結合するため、1分子に4つのビオチンを配位することができる。アビジンの糖鎖にはマンノースおよびN-アセチルグルコサミンが含まれており、これらの糖鎖はレクチンに結合することが確認されている [2]。

アビジンに含まれる糖鎖がレクチンと結合する性質に着目し、分子標的化の観点からアビジンによる腫瘍細胞の標的化を行った研究が報告されている [3]。この研究では、マウスの腹腔内に投与されたアビジンは、迅速に腫瘍部位に集積され、非腫瘍に対する腫瘍標的化の割合は、最大で400倍を示している。さらに、腫瘍に集積したアビジンは長く腫瘍に留まり続けるわけではなく、24h後にはほとんど腫瘍表面には存在しないことも示された。また、アビジンが迅速に腫瘍細胞中に内在化されることが示唆されたため、様々な

がんの診断や治療においてアビジンが放射性同位体や薬剤、遺伝子を運ぶ有用な手段となりうることを期待される。

以上を踏まえ、アビジンを腫瘍組織の標的化に用いることは (1) 安価で入手が容易な生体分子を使用するため患者の経済的負担を軽減できる、(2) 迅速に腫瘍組織に集積するため治療時間を短縮できる、(3) 化学修飾が容易なため応用の幅が広いなどの利点を持つと考えられる。

本研究では、アビジン修飾二酸化チタンナノ粒子を作製しがん腫瘍組織に集積させ、さらに局所的に超音波を照射することで、がん細胞のみを殺傷するというメカニズムの非侵襲的ながん治療を目指した基礎実験を行う (Fig. 2)。

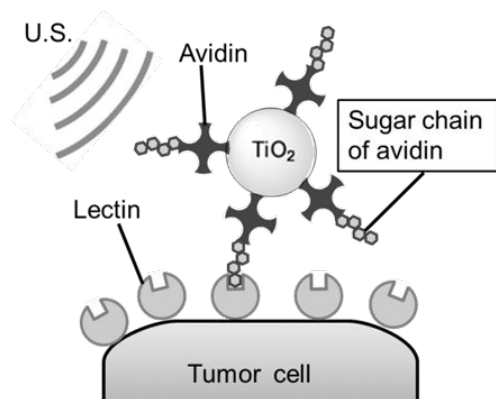


Fig. 2 Schematic drawing of mechanism of this study.

3. 研究の方法

(1) 使用細胞

本研究では、ターゲット細胞としてヒト乳がん由来細胞 MCF-7 を用いた。また、比較細胞として正常ヒト乳腺上皮細胞 HMEC を用いた。実験では全て対数増殖期にあたる細胞を用いた。

(2) 二酸化チタンナノ粒子分散液の調整

TiO₂ の等電点は pH 6.1 付近であり、生体内の環境及び培地 (pH 7.5) 中に懸濁すると凝集してしまう。そこで本研究では TiO₂ の分散性を高めるために、TiO₂ 表面にポリアクリル酸を修飾した二酸化チタン (PAA TiO₂) を用いた。PAA TiO₂ は中性付近では表面にカルボキシル基を有するため、マイナスの電荷に帯電しており、静電的な反発力によって分散する。

TiO₂ 定量 作製した PAA TiO₂ の濃度は、TiO₂ 吸光度 (吸光波長: 250 nm) を分光光度計を用いて測定し、検量線を用いて算出した。

(3) アビジンの TiO₂ ナノ粒子への固定化

アビジンの TiO₂ ナノ粒子への固定化は、アビジン表面のアミノ基と、PAA TiO₂ 表面のカルボキシル基のアミノカップリング反応により行った。

avi-TiO₂ の作製 まず 0.4 M EDC 溶液 0.25 mL と 0.1 M NHS 溶液 0.25 mL を混合し、1.5 wt% PAA TiO₂ 溶液 2.5 mL に加えた。次

にゲルろ過カラム PD-10 にて未反応の EDC / NHS を分離させ、PAA TiO₂ は 20 mM HEPES 3.5 mL で溶出し、溶出液に 2 mg/mL アビジン溶液を 2.5 mL 加え、室温にて 4 h ~ 一晩緩やかに攪拌させながら反応させた。その後 0.1 M モノエタノールアミンを 1 mL 加え、室温にて 30 min 緩やかに攪拌させながら反応させた。また、未反応のアビジンは限外ろ過で除去した。

アビジンの定量 作製した avi-TiO₂ のアビジンの定量法として Bradford 法を用いた。Bradford 法とは色素溶液中のクマシーブリリアントブルー (CBB) が試料中のタンパク質と結合すると最大吸収波長が 465 nm から 595 nm に移動することを利用し、この波長を吸光度計で測定することによりタンパク質濃度測定を行う方法である。

(4) avi-TiO₂ の細胞への結合

蛍光物質フルオレセインを修飾した flu/avi-TiO₂ を作製し、がん細胞と正常細胞のそれぞれに結合させた後に、蛍光顕微鏡による観察とフローサイトメトリーの二つの方法によって結合評価を行った。

flu/avi-TiO₂ の作製 50 nmol/mL biotin-fluorescein を 1 mL 調整し、avi-TiO₂ を 5 mL に希釈したものに加え、室温で一晩緩やかに攪拌させながら反応させた。その後、未反応の biotin-fluorescein は限外ろ過で除去した。

細胞への結合 MCF-7 と HMEC を 40 mm dish にそれぞれ 4 × 10⁵ cells で播種し 2 days 培養、5 × 10⁴ cells で播種し 4 days 培養したものに、1.5 wt% flu/avi-TiO₂ を 200 μL ずつ添加し、37 °C、5% CO₂ にて 1 h インキュベートした。

結合評価 細胞を PBS(-) で 3 回洗浄を行った後、蛍光顕微鏡で観察した。その後、細胞を剥離し、フローサイトメーターで解析した。

(5) 超音波を用いた細胞損傷効果検討

今回作製した TiO₂ 粒子を用いた TiO₂/U.S. 法の効果を検証するため、超音波を用いた実験による培養がん細胞の細胞数の変化を観察した。

細胞への結合 MCF-7 を 40 mm dish に 4 × 10⁵ cells で播種し 1 day 培養したものに、1.5 wt% avi-TiO₂ を 200 μL ずつ添加し、37 °C、5% CO₂ にて 1 h インキュベートした。

超音波照射 細胞を PBS(-) で 3 回洗浄し、新しい培地を 2 mL 添加する。その後、1 MHz、50% Duty 比、0.1 W / cm²、30 s 超音波を照射した。

細胞数測定 超音波照射後、37 °C、5% CO₂ にてそれぞれの経過時間までインキュベートし、Trypan blue 染色法を用いて生細胞数を測定した。

4. 研究成果

(1) アビジンの TiO₂ ナノ粒子への固定化評価 作製した avi-TiO₂ の限外ろ過後の残液、

ろ液、洗浄ろ液についてアビジンを定量した結果を Fig. 3 に示す。これより、限外ろ過後の残液中にアビジンが検出されたため目的の avi-TiO₂ が完成したことが確認できた。また、ろ液や洗浄ろ液にはアビジンが検出されなかったことから、今回の方法で avi-TiO₂ を作製した場合は、添加したアビジンが全て TiO₂ ナノ粒子に固定化されたと考えられる。

また、得られた avi-TiO₂ の二酸化チタン濃度とアビジン量から、TiO₂ ナノ粒子一個あたりに修飾されたアビジンは、約 2150 個と計算された。

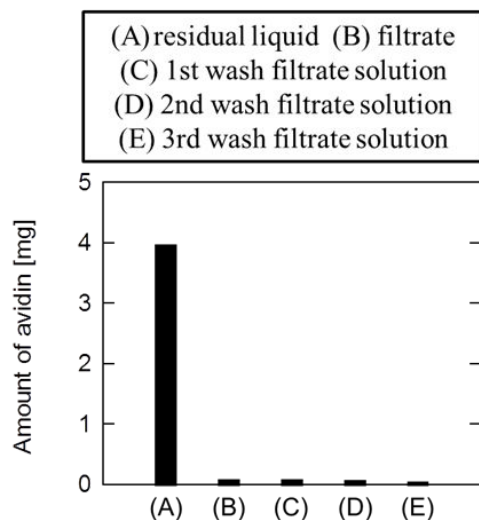


Fig. 3 Amount of avidin after ultrafiltration

(2) avi-TiO₂ のがん細胞への特異的結合

flu/avi-TiO₂ を MCF-7 と HMEC のそれぞれに結合させ、蛍光顕微鏡で観察した結果、MCF-7 には多量の蛍光が、HMEC には若干の蛍光が見られた。

また、これらの細胞をフローサイトメーターで測定した結果を Fig. 4、Fig. 5 に示す。どちらの図も flu/avi-TiO₂ を添加することで細胞数ピークが右にずれていることから、どちらも蛍光強度の大きい細胞数が増加していることがわかる。つまり、MCF-7 にも HMEC にも flu/avi-TiO₂ が結合してしまっていることがわかる。ここで、flu/avi-TiO₂ がどれだけ割合で結合したかを比較するため、それぞれの図について、flu/avi-TiO₂(-) のヒストグラムよりも右側に含まれる蛍光強度の大きい細胞群を flu/avi-TiO₂ の結合した細胞と見なし、細胞数の割合を算出すると、Fig. 4 より MCF-7 では 82.4 %、Fig. 5 より HMEC では 46.8 %となった。このことから、MCF-7 の方が HMEC よりも flu/avi-TiO₂ が結合した細胞が多いことがわかる。したがって、正常細胞よりもがん細胞の方が avi-TiO₂ 結合量が多いと考えられ、これは蛍光顕微鏡による評価の考察と一致する。

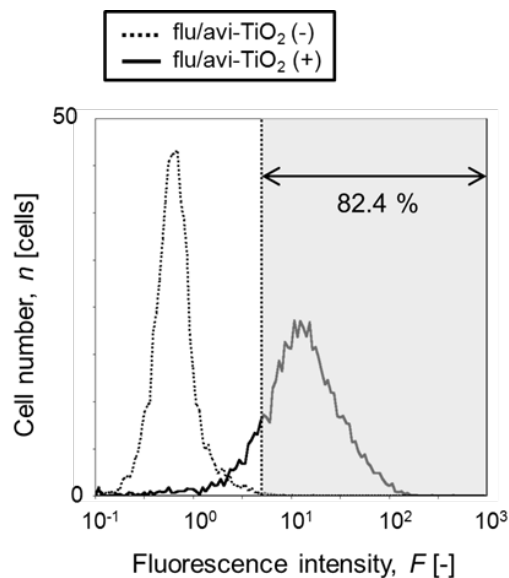


Fig. 4 Flow cytometry assay for the binding of flu/avi-TiO₂ with MCF-7 cells

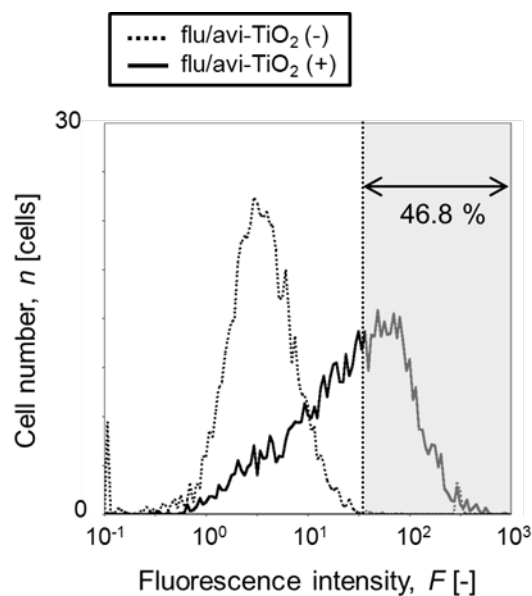


Fig. 5 Flow cytometry assay for the binding of flu/avi-TiO₂ with HMEC cells

(3) TiO₂/U.S.法によるがん細胞損傷効果

avi-TiO₂ を結合させた MCF-7 に超音波を照射してからの培養時間経過による細胞数の変化を Fig. 6 に示す。今回示した以外に、アビジン未修飾の TiO₂ ナノ粒子を添加したものについても検討したが、これは Fig. 6 の(A)と大きな差は見られなかった。これより、TiO₂ のみを本実験条件の濃度で添加し、1 h 細胞と結合させることによる細胞毒性はほとんどないことがわかった。さらに、Fig. 6 の(A)と(B)にもほとんど差が見られないことから、本実験の条件で超音波を照射するだけでは細胞損傷効果はないことがわかる。

Fig. 6 の(A)と(C)、(D)をそれぞれ比べると、どちらも超音波照射後 48 h から細胞増殖が抑制され、超音波照射後 96 h では、(A)に対して(C)は約 80 %、(D)は約 60 %しか細胞が生存していないことがわかる。このことから、アビジンを添加したことで細胞に取り込まれた TiO₂ ナノ粒子量が増大し、細胞毒性が起こったと考えられる。

しかしながら、(D)の細胞増殖抑制が著しいことは明らかであることから、TiO₂/U.S.法による細胞増殖抑制効果が確認できた。また、その効果が超音波照射直後には見られず時間を追うごとに増大していることから、TiO₂ / U.S.法によって生じたOHラジカルは超音波照射直後に細胞膜などに深刻なダメージを与えネクロシスを誘導するほどの高濃度ではなく、照射から 48 h 経過後に細胞死を誘導する程度に損傷を起こし、アポトーシスを誘導していると示唆される。

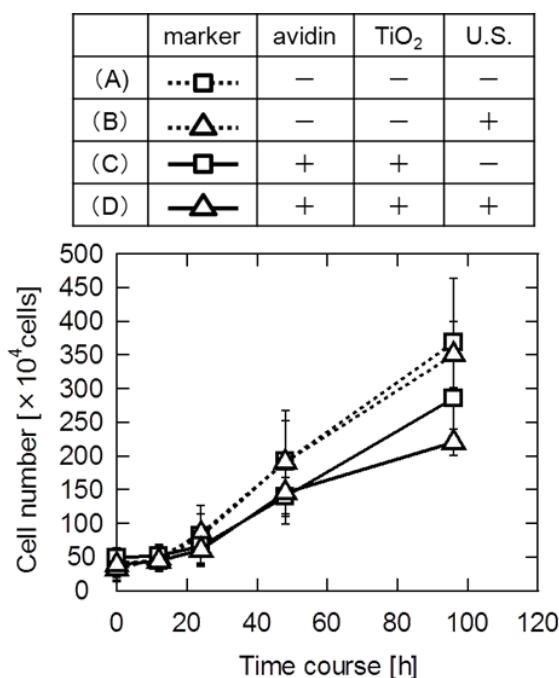


Fig. 6 Effect of TiO₂/U.S. method

引用文献

- [1] R. Lotan, A. Raz. Lectins in cancer cells, *Ann N Y Acad Sci*, 551, 385-398 (1988)
- [2] R. Townsend, P. Stahl. Isolation and characterization of a mannose/N-acetylglucosamine/fucose-binding protein from rat liver, *Biochem J*, 194, 209-214 (1981)
- [3] Z. Yao, M. Zhang, H. Sakahara, T. Saga, Y. Arano, J. Konishi. Avidin targeting of intraperitoneal tumor xenografts, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 90, 25-29 (1998)

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 8 件)

1. Kazuaki Ninomiya, Aya Fukuda, Chiaki Ogino, and Nobuaki Shimizu, Targeted and sonocatalytic cancer cell injury using avidin-conjugated TiO₂ nanoparticles, *Ultrason. Sonochem.*, 査読あり in press (2014) Sep. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2014.03.010
2. Kazuaki Ninomiya, Takahiro Yamashita, Shinya Kawabata, and Nobuaki Shimizu, Targeted and ultrasound-triggered drug delivery using liposomes co-modified with cancer cell-targeting aptamers and a thermosensitive polymer, *Ultrason. Sonochem.*, 査読あり 21(4), 1482-1488 (2014) July. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.12.023
3. Kazuaki Ninomiya, Ryuji Yamada, Hitomi Meisaku, Nobuaki Shimizu, Effect of ultrasound irradiation on bacterial internalization and bacteria-mediated gene transfer to cancer cells, *Ultrason. Sonochem.*, 査読あり 21(3), 1187-1193 (2014) May. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.12.005
4. Kazuaki Ninomiya, Shinya Kawabata, Hiroyuki Tashita, and Nobuaki Shimizu Ultrasound-mediated drug delivery using liposomes modified with a thermosensitive polymer. *Ultrason. Sonochem.*, 査読あり 21(1), 310-316 (2014) Jan DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.07.014
5. Kazuaki Ninomiya, Kyohei Noda, Chiaki Ogino, Shun-ichi Kuroda, and Nobuaki Shimizu. Enhanced OH radical generation by dual-frequency ultrasound with TiO₂ nanoparticles: its application to targeted sonodynamic therapy. *Ultrason. Sonochem.*, 査読あり 21(1), 289-294 (2014) Jan. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.05.005
6. Kazuaki Ninomiya, Tatsuo Ishijima, Masatoshi Imamura, Takayuki Yamahara, Hiroshi Enomoto, Kenji Takahashi, Yasunori Tanaka, Yoshihiko Uesugi, Nobuaki Shimizu, Evaluation of extra- and intracellular OH radical generation, cancer cell injury, and apoptosis induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet, *J.*

Phys. D: Appl. Phys., 46(42), 査読あり 425401 (2013) Oct. DOI: 10.1088/0022-3727/46/42/425401

なし

7. Kazuaki Ninomiya, Chiaki Ogino, Shinya Kawabata, Kentaro Kitamura, Teruya Maki, Hiroshi Hasegawa, Nobuaki Shimizu. Ultrasonic inactivation of Microcystis aeruginosa in the presence of TiO2 particles, J. Biosci. Bioeng., 査読あり 116(2) 214-218 (2013) Aug. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.10.007
8. 仁宮一章, 清水 宣明: がん細胞と特異的に結合する超音波刺激応答性リポソームの創製, 超音波テクノ, 査読なし, 25(5), 46 - 51, (2013) Oct.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 仁宮一章, 山田龍治, 清水宣明: 微生物をキャリアとした遺伝子導入法における超音波照射の効果, 日本ソノケミストリー学会 第22回討論会, 松本, 信州大学, 2013年10月25 - 26日
2. 山下貴宏, 仁宮一章, 清水宣明: 超音波刺激で気化するPFC内包リポソームを用いたDDS型がん治療, 日本ソノケミストリー学会 第22回討論会, 松本, 信州大学, 2013年10月25 - 26日
3. 丸山裕慎, 仁宮一章, 清水宣明: 超音波照射による二酸化チタンプレート表面での細胞傷害効果, 日本ソノケミストリー学会 第22回討論会, 松本, 信州大学, 2013年10月25 - 26日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

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

仁宮 一章 (NINOMIYA, Kazuaki)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・准教授

研究者番号: 10379125

(3) 連携研究者