

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651054

研究課題名(和文) アナターズ型酸化チタンと生理活性物質の併用による細胞死誘導効果増強の研究

研究課題名(英文) Study of cell death-inducing effect enhanced by combined use of anatase-type titanium dioxide and a physiologically active substance

研究代表者

吉見 陽児 (Yoshimi, Yoji)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：70609362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は酸化チタンの光触媒効果による細胞傷害の機構を解析し、これをがんの治療に役立てるための基礎研究を目的として行われた。研究内容は1)細胞傷害を誘導するための手法と測定方法の確立、2)誘導される細胞死の様式の解析、3)細胞死誘導の機序の検討の3つに分けられる。細胞を効果的に傷害する条件を見出し、測定する系を確立できた。また、各種指標から光触媒による細胞死はアポトーシスではないことが示唆された。さらに、細胞膜の脂質過酸化が顕著に起こされていることが確認された。光触媒による細胞死は光触媒効果により発生したROSが細胞膜の脂質過酸化を促し膜が崩壊することでネクローシスを起こすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study analyzes the mechanism of cell damage by photocatalytic effect of titanium dioxide, was done for the purpose of basic research in order to help in the treatment of cancer. Research is composed of three modes, 1) to establish the effective induction and measurement method for the cell cytotoxicity, 2) to classify the type of cell death, and 3) to analyze of the induction mechanism of the cell death. It was possible to establish a system in which they have found a condition that injury effectively the cell, to measure. Further, it was suggested that cell death by the photocatalyst is not a poptosis of various features. Furthermore, the lipid peroxidation of the cell membrane is caused remarkably was confirmed. It is considered that cell death by photocatalyst to cause necrosis by membrane collapses. ROS generated by photocatalytic effect has prompted the lipid peroxidation of the cell membrane.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：光触媒 酸化チタン 細胞死 活性酸素 酸化ストレス 脂質過酸化 ネクローシス

1. 研究開始当初の背景

酸化チタンはその有用な物性から、塗料、顔料、光触媒、太陽光電池の素材、食品添加物、化粧品および医薬品添加物等として産業界で広範に用いられている。化学的にきわめて安定で生体に対しては安全な物質と考えられている。しかしながら、これは粒径の大きな酸化チタンまたは光触媒活性の低いルチル型酸化チタンに対してのものであり、粒径の小さいナノパーティクルとしての酸化チタンや、同じ酸化チタンでも結晶構造の異なる光触媒活性の高いアナターズ型酸化チタンにおいては国際的に評価手法が定まっておらず調査が行き届いているとは言い難い。代表者らは細胞死の研究に携わる一方で、最近では酸化チタンの抗菌作用の評価研究にも関わる機会を得ている。こうした背景のもと、酸化チタンの安全性についての検討をするとともに、アナターズ型酸化チタンを用いて酸化ストレスによりがん細胞を効果的に抑制しようと考え本研究を立案した。

2. 研究の目的

酸化チタンは食品や化粧品添加物としても広く用いられている化学的に安定で生体に対して毒性のない物質とされる。ところが、近年ナノパーティクルとしての酸化チタンが細胞内酸化ストレスを惹起し細胞死を誘導することが確認されるなど、その生体に対する作用については検討すべき課題が残されている。本研究はアナターズ型酸化チタンの細胞死誘導活性について *in vitro* において検証するとともに、酸化チタンの生理活性促進物質としての新たな利用方法を確立する。酸化チタンを用いてがん細胞を効果的に抑制させうる可能性について評価を与えるものである。

3. 研究の方法

評価系確立のためのモデル細胞種としてヒト上皮がん由来細胞株(HeLa)を用い、細胞死判定はミトコンドリア酵素の活性を指標としWST-8アッセイを用いた。用いる酸化チタンの種類、照射する紫外線に関して下記項目の検討を行った。

A-1) 酸化チタン結晶型の差による有機物分解活性の比較

ルチル型(光触媒活性 低: PT-401M、PT-501R、CR-EL)

アナターズ型(光触媒活性 高: PT-501A、A100、P-25)

A-2) 酸化チタン粒径(粒径分布は光散乱法を用いて確認)による有機物分解活性の比較

粒径中(~ 250 nm: PT-401M、PT-501A、PT-501R、A100、CR-EL)

粒径小(~ 25 nm: P-25)

A-3) 酸化チタン添加

添加濃度、 処理時間

B) 紫外線照射

波長、 照射強度、 照射時間

C) 酸化チタンと併用する薬剤の効果

種類、 添加濃度、 作用時間

細胞死の様式について解析を行うために下記項目の解析を行った。

D) 細胞死誘導経路の解析

DNA ラダー観察、 カスパーゼ活性測定

E) 細胞膜脂質過酸化の検出:(過酸化脂質と反応し蛍光を発するプローブを利用した顕微鏡観察により行った。)

F) 核酸(DNA)の酸化の検出:(酸化型グアニンに反応する特異的抗体を用い、酸化処理の有無での染色性を顕微鏡観察により比較した。)

4. 研究成果

(1) 予備検討事項

酸化チタンの粒径測定

用いた 6 種類の酸化チタン(PT-401M、PT-501R、CR-EL、PT-501A、A100、P-25)の粒径を光散乱法により測定したところ、分散媒により違いはあるものの液中ではおよそ 500 ~ 700 nm 程度の凝集体として存在することが確認された。

酸化チタンの光触媒効果による有機物分解活性の比較

メチレンブルーおよびフェノールレッドの青または赤色消失を指標とし、用いた酸化チタンの有機物分解活性の比較を行った。6種のなかで最も効果的な有機物分解活性を有する酸化チタンはP-25であった。これ以降の実験ではP-25を用いることとした。

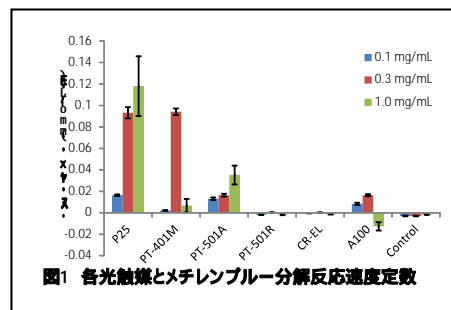


図1 各光触媒とメチレンブルー分解反応速度定数

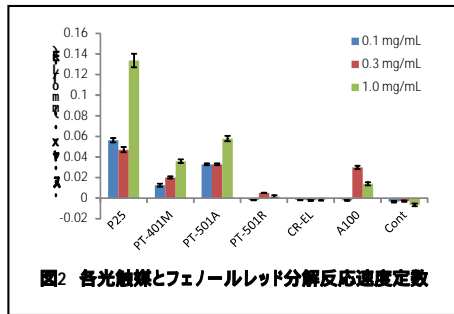


図2 各光触媒とフェノールレッド分解反応速度定数

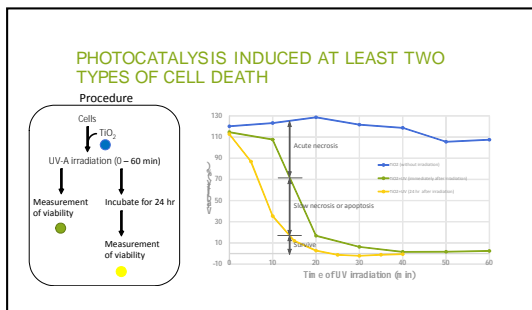
光触媒としての酸化チタンの作用条件

培養培地存在下で細胞に酸化チタンを作用させてもまったく細胞傷害活性を示さなかった。これは培地中に存在する糖、アミノ酸、タンパク質などの有機物が光触媒から生じた活性酸素種を細胞に届くより先に捕捉してしまうためと考えられる。無機塩をベースとした緩衝液(PBS)を用いることで、酸化チタンの光触媒効果を有効に細胞に及ぼし細胞が傷害されることが確認された。

(2) 効率的な細胞死誘導条件および測定方法の検討

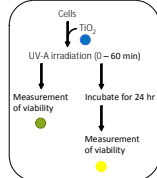
紫外線を照射しない条件での酸化チタンの細胞生存率へ与える影響について

紫外線を照射しない条件では、いずれの光触媒も濃度によらず大きな細胞傷害活性を示さなかった。光触媒としてではなくナノ粒子として見た場合の酸化チタンの細胞傷害性は低いと考えられる。最終的に培地を無機塩をベースとした緩衝液(PBS)に置き換えた状態で、酸化チタン(P-25)濃度 0.1 mg/ml、紫外線(UV-A)強度 0.65 mW/cm²、紫外線照射時間 20 分にて細胞(HeLa)はほぼ死滅分解させることができ、細胞の生存はWAT-8 アッセイにより簡便に測定できることが示された。また、紫外線照射時間を 10 ~ 15 分とすると半数の細胞は生存するが、生存した細胞もゆるやかに死へと向かい 24 時間でほぼ死滅する様子が観察された。このことは、条件によっては細胞死に急性のものと遅発性のものとが存在することを示している。



PHOTOCATALYSIS INDUCED AT LEAST TWO TYPES OF CELL DEATH

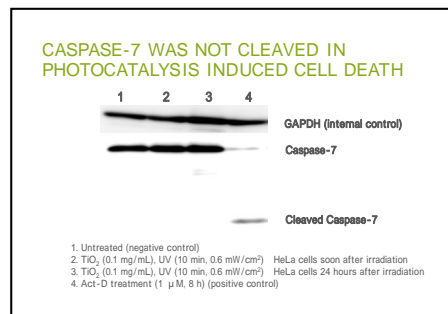
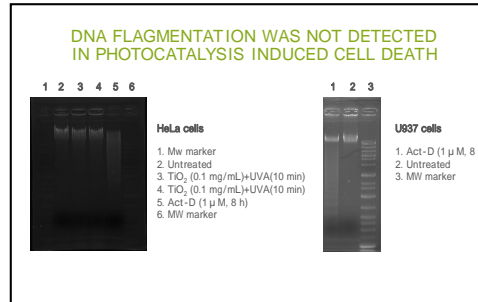
Procedure



(3) 細胞死の様式の解析

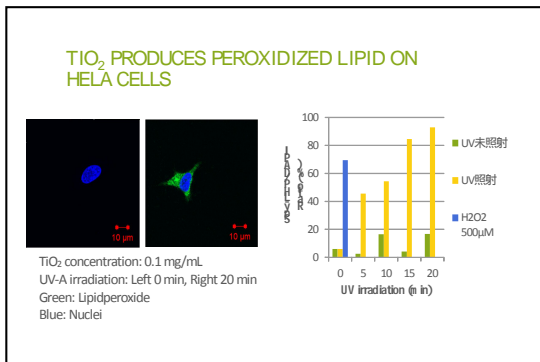
DNA ラダーの検出およびカスパーゼの開裂

紫外線照射 20 分以内に誘導される細胞死に関しては、ポジコンに見られる DNA ラダーやカスパーゼ 7 の開裂が確認されず、この細胞死がアポトーシスではないことが示唆された。



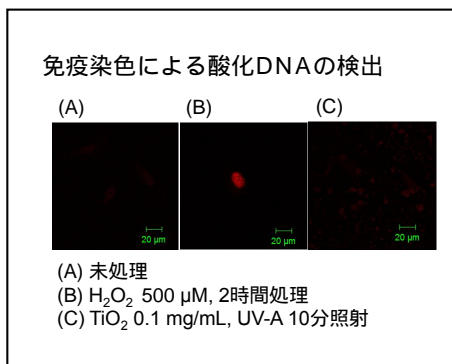
(4) 過酸化脂質生成

細胞死誘導時の細胞膜の傷害についての解析を行った。光触媒の効果により生じる過酸化脂質を過酸化脂質に反応する蛍光試薬と共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて解析したところ、紫外線照射後数分で細胞膜、核膜を含めた細胞の膜系全体に過酸化脂質が生じていることが明らかとなった。光触媒の効果による細胞死には膜における過酸化脂質の産生が大きく関与していると考えられる。この脂質過酸化は細胞を - トコフェロール(ビタミン E)で前処理することで抑制できることが確認できた。光触媒の代わりに過酸化水素を用いた場合にも脂質過酸化は観察されるが、光触媒処理では細胞が崩壊しデブリ状に変化分解するのに対し、過酸化水素処理では細胞は形状を維持していた。これらの結果は光触媒から過酸化水素より強力な酸化力をもつ活性酸素種、恐らくヒドロキシルラジカルの生成が関与していることを示している。



(5) DNA の酸化反応

DNA 中のグアニン塩基が酸化されて生じる 8-OHdG に対する特異的抗体を用いた染色を行うことで DNA の酸化を検出することが可能である。光触媒の効果により細胞膜より内部の酸化が起こるのか DNA の酸化を指標とした顕微鏡観察による評価を行った。過酸化水素処理では DNA の酸化が観察できるのに対し、光触媒では DNA の酸化は見られなかった。



(6) 総括

酸化チタンによる細胞傷害の測定方法の確立を目的とした基礎検討（酸化チタンの種類、濃度、紫外線強度および照射時間、測定指標など）についての調査を行い、酸化チタンによる細胞死誘導の実験系を確立した。続いて、この系により誘導される細胞死がアポトーシスに分類されるものか否か検討を加えた。DNA ラダー、カスパーゼの開裂について解析したところ、酸化チタンの光触媒効果によって誘導される細胞死はアポトーシスではないことが示唆された。光触媒効果により細胞が崩壊している様子が観察されたため、光触媒により発生した活性酸素が細胞膜を傷害していることが予

想される。光触媒効果による細胞膜の傷害についての解析を過酸化脂質の検出色素を用いて顕微鏡観察を行ったところ、実際に細胞膜の酸化が確認された。また、この細胞膜の酸化は脂質過酸化反応を阻害する -トコフェロールにより抑制されることが示された。以上の研究により、酸化チタンの光触媒効果により細胞死を誘導する系が確立され、その細胞死の誘導機序はアポトーシスではなく、細胞膜脂質過酸化に起因するネクローシスであることが示唆される。

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 2 件)

TiO₂ の光触媒効果が引き起こす細胞死誘導における細胞膜脂質過酸化解析

伊藤駿、小松原直人、吉見陽児、中田一弥、池北雅彦

光触媒、光機能材料研究会 第 20 回記念シンポジウム (東京 12 月 13 日)

光触媒効果による細胞死誘導機構の分子機構解析

小松原直人、吉見陽児、中田一弥、池北雅彦

光触媒、光機能材料研究会 第 20 回記念シンポジウム (東京 12 月 13 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〕

ホームページ等

[Http://www.rs.tus.ac.jp/nakata/](http://www.rs.tus.ac.jp/nakata/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉見 陽児 (YOSHIMI Yoji)

東京理科大学工学部応用生物科学科・助教

研究者番号: 70609362

(3)連携研究者

池北 雅彦 (IKEKITA Masahiko)
東京理科大学工学部応用生物科学科・
教授
研究者番号： 70138981

四宮 貴久 (SHINOMIYA Takahisa)
東京理科大学工学部応用生物科学科・
教授
研究者番号： 30196414