

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350549

研究課題名(和文) ナノ粒子の音響化学活性化によるアポトーシス誘導を利用した新規がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cancer therapy using apoptosis induced by sonodynamically activated nanoparticles

研究代表者

岩瀬 由未子 (IWASE, YUMIKO)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00521882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、pyrrolidine tris-acid fullerene (PTF)と超音波により誘発される抗がん作用とその機序におけるアポトーシスの関与を調べた。生成された活性酸素種が殺細胞効果に与える影響を4oxoTEMPOの生成で調べた。この結果、一重項酸素の生成を確認し、その殺細胞効果への関与を認めた。次に、固形腫瘍にPTFと超音波の併用処置を行い、腫瘍増殖の抑制を確認した。さらに、HL-60において抗腫瘍効果におけるアポトーシスの関与を検討し、アポトーシスの特徴的な形態学的変化およびDNA断片化が認められた。これらから、音響化学的なアポトーシスのがん治療への応用が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the sonodynamically induced antitumor effect of pyrrolidine tris-acid fullerene (PTF) and in the involvement of apoptosis in the mechanism was investigated. Sonodynamically induced antitumor effects of PTF by focused ultrasound were investigated using sarcoma 180 cells and mice bearing ectopically-implanted colon 26 carcinoma. Cell damage induced by ultrasonic exposure was enhanced by five-fold in the presence of 80 μ M PTF. The combined treatment of ultrasound and PTF suppressed the growth of the implanted colon 26 carcinoma. 4oxoTEMPO generation caused by ultrasonic exposure in the presence of PTF. This suggests that singlet oxygen plays an important role in the antitumor effect. Next, we demonstrated sonodynamically-induced apoptosis in HL-60 cells, as evidenced by morphological changes and DNA ladder formation. The preliminary results reported here provide the support for the practical application of the induction of apoptosis by sonodynamic treatment using PTF.

研究分野：人間医工学

キーワード：アポトーシス 音響化学的活性化 活性酸素 超音波 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は生体が有する機能維持のためのアポトーシス能の低下が一因となり異常な細胞増殖をおこす。そこで、人為的にがん細胞にアポトーシスを誘発させることは、生体に対する負荷が少ない治療法の開発に有用であると考えた。そこで、我々は、外部エネルギーとして超音波に着目した。超音波は、照射強度を調整することにより、生体への負担を軽減させ、かつ生体深部まで到達させることが可能である。超音波のみでがん細胞への損傷効果を期待するには、高いエネルギーが必要となり、がん細胞、正常細胞の区別なく細胞に損傷を与えてしまう。そこで我々は、がん細胞のみにアポトーシスを誘発させるため、超音波照射によってのみ音響化学的に活性化される薬物の併用を検討してきた。本研究では、併用薬物としてナノ粒子に着目した。ナノ粒子の粒子径は数百 nm 程度までと著しく粒径が小さく、がん細胞への特異的集積性を有する。音響化学的に活性化された薬物が活性酸素種を生成し、生成された活性酸素によりアポトーシスが誘導されることが期待される。また、アポトーシスを介した抗腫瘍効果はがん治療に有用である。

2. 研究の目的

我々は、正常細胞への細胞障害に起因する副作用を軽減したがん治療法の開発を目的としており、超音波照射による音響化学的活性化で生じる殺細胞効果に活性酸素種の生成が関与するかを調べた。並びにマウス皮下に移植した固形腫瘍に対し、抗腫瘍効果が発現するかを調べた。PTF と超音波の併用による音響化学的活性化によりアポトーシスが関与する抗腫瘍効果が期待できるか、HL-60 培養細胞を用いて検討した。検討した点は、アポトーシス細胞に特徴的な形態学的変化の観察、DNA 断片化である。

3. 研究の方法

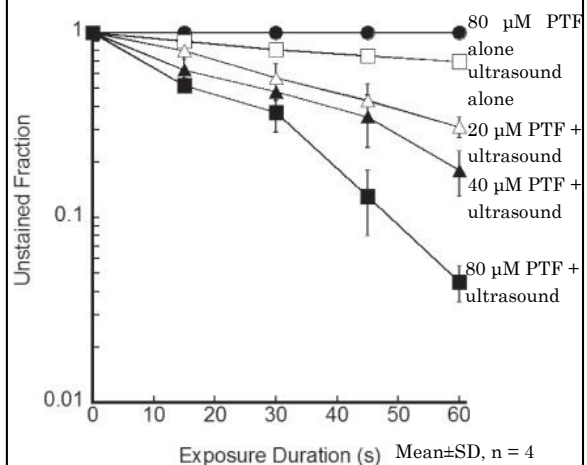
超音波併用により、殺細胞効果増強が確認できた高水溶性の pyrrolidine tris-acid fullerene (PTF) を用いて、PTF が音響化学的に活性化されたときの、殺細胞効果を調べた。また、この殺細胞効果について PTF 濃度依存的变化も調べた。殺細胞効果は、トリパンブルー染色法にて評価した。また、一重項酸素の生成を電子スピン共鳴(ESR)により確認した。また、この殺細胞効果発現に活性酸素種の発生が関与するかどうかについて活性酸素種に特異的な阻害剤を用いて阻害効果を評価した。続いて、固形腫瘍に対する PTF を併用した音響化学療法抗腫瘍効果をマウス皮下に移植した colon26 を用いて調べた。固形腫瘍に直接 PTF を注入し超音波を照射した。抗腫瘍効果の判定は、腫瘍径を測定した。最後に、PTF と超音波併用によりアポトーシスが関与する抗腫瘍効果が発現するかを HL-60 細胞で調べた。HL-60 細胞懸濁液

に PTF 添加後、超音波を照射した。アポトーシスを起こすと特異的な膜の形態学的変化をおこす。そこで、照射後の細胞の形態学的変化を顕微鏡で観察し評価した。また、アポトーシス細胞はカスパーゼ活性化 DNase により DNA がヌクレオソーム単位で切断され DNA 断片化が観察される特徴を有する。そこで、同様の条件で、DNA 断片化をアガロースゲル電気泳動法にて確認した。

4. 研究成果

まず初めに PTF と超音波を併用処置した時の殺細胞効果について調べた。未処置群、PTF 単独処置群、超音波単独処置群、超音波および PTF 併用群で比較したところ、超音波と PTF を併用した場合のみ明らかな殺細胞効果が図 2 に示す通り確認された。

図 2 In vitro における sarcoma-180 細胞生存率

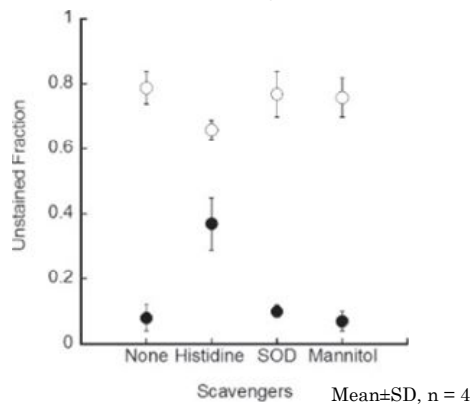


sarcoma-180 細胞を用いて未処置群、PTF 単独処置群、超音波単独処置群、超音波および PTF 併用群で細胞生存率の変化を調べた。

未処置群、PTF 単独処置群、超音波単独処置群ではほとんど殺細胞効果は確認されなかった。しかし、PTF と超音波を併用した場合のみ PTF 濃度依存的に殺細胞効果が増強された。以上のことから、PTF が超音波により音響化学的に活性化され殺細胞効果を示すことが確認できた。次に、PTF 存在下、超音波が照射された水溶液中に生成する一重項酸素生成を特異的なスピントラップ剤を用いた電子スピン共鳴(ESR)により確認した。超音波照射により生成される活性酸素種が殺細胞効果に関与するか活性酸素種除去剤を添加し殺細胞作用に対する変化を検討した。この結果、一重項酸素の消去剤であるヒスチジンの添加時のみ、著しい殺細胞効果の抑制を示した。これにより、超音波および PTF 併用時に観察された殺細胞作用は一重項酸素の発生によるものであることが確認された。結果を図 3 に示した。以上のことから、超音波照射により音響化学的に PTF が活性化されると活性酸素種の一つである一

重項酸素を生成し、殺細胞効果が示唆された。

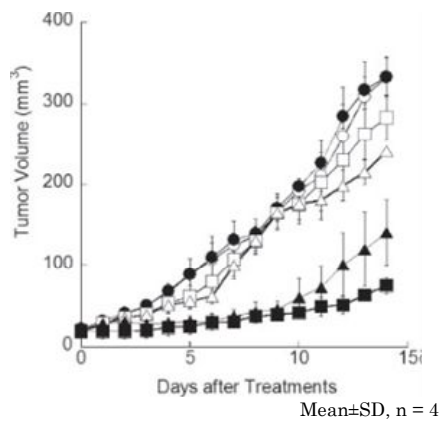
図3 殺細胞効果への一重項酸素の影響



超音波 60 秒照射後の 80 μ M PTF 存在下または、非存在下における活性酸素スカベンジャーの効果。○, 未処置群; ●, 25mg/kg PTF 単独処置群; ○, 超音波単独処置群; ●, 5mg/kg PTF および超音波併用群; ○, 10mg/kg PTF および超音波併用群; ●, 25mg/kg PTF および超音波併用群。

マウス皮下に移植した colon26 固形腫瘍を用いて *in vivo* での PTF と超音波を併用した音響化学的治療効果を未処置群、PTF 単独処置群、超音波単独処置群、超音波および PTF 併用群で検討した腫瘍径の変化は図 4 に示した。

図4 腫瘍径増殖抑制の変化



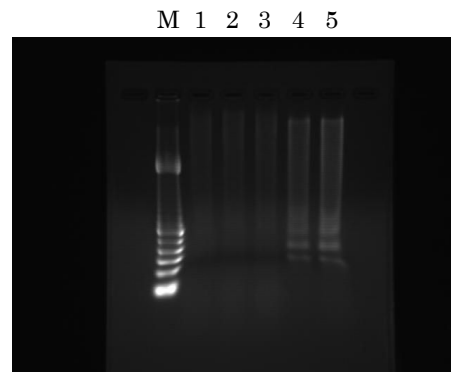
Colon 26 固形腫瘍の増殖に対する PTF の存在下または、非存在下における超音波の影響。○, 未処置群; ●, 25mg/kg PTF 単独処置群; ○, 超音波単独処置群; ●, 5mg/kg PTF および超音波併用群; ○, 10mg/kg PTF および超音波併用群; ●, 25mg/kg PTF および超音波併用群。

超音波および PTF は、それぞれ単独では殺細胞作用を示さない条件下で PTF と超音波を併用することにより腫瘍の増殖を抑制できることが確認された。以上のことから、PTF と超音波との併用は *in vitro* 実験において、一重項酸素を発生し、殺細胞効果を発現することと *in vivo* で抗腫瘍効果が確認された。

HL-60 細胞懸濁液を用いて未処置群、PTF 単独処置群、超音波単独処置群、超音波

および PTF 併用群で細胞の形態学的変化を調べた結果は、超音波および PTF 併用群でのみアポトーシス細胞特有の膜の blebbing を確認した。さらに、アポトーシス誘導が起きていることを確認するためアガロースゲル電気泳動法で確認した。音響化学処置後の DNA 断片化を図 5 に示した。この結果、超音波および PTF 併用群でのみ明瞭な DNA 断片化が確認された。これらの結果から、PTF と超音波を併用するとアポトーシスの誘導が示唆された。

図5 DNA断片化



PTF および/または超音波照射後 4 時間後の HL-60 細胞における DNA ラダー形成。レーン M、DNA サイズマーカー; レーン 1、未処置群; レーン 2、40 μ PTF 単独処置群; レーン 3、超音波単独処置群; レーン 4、20 μ M PTF および超音波処置群; レーン 5、40 μ M PTF および超音波処置群。

以上の *in vitro*、*in vivo* の結果から、PTF が超音波により音響化学的活性化を受け示す抗腫瘍効果にアポトーシスが関与する可能性があるため、音響化学療法はアポトーシスによるがん治療法となる可能性が出てきたと考える。

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 6 件)

Nishi K, Suzuki K, Sawamoto J, Tokizawa Y, Iwase Y, Yumita N, Ikeda T. Inhibition of Fatty Acid Synthesis Induces Apoptosis of Human Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res.* 36; 4655-60, 2016

Yumita N, Watanabe T, Chen FS, Momose Y, Umemura S. Induction of Apoptosis by Functionalized Fullerene-based Sonodynamic Therapy in HL-60 cells. *Anticancer Res.* 36; 5-74, 2016

Iwase Y, Nishi K, Fujimori J, Fukai T, Yumita N, Ikeda T, Chen FS, Momose Y and Umemura S. Antitumor effect of sonodynamically activated pyrrolidine tris-acid fullerene. *Jpn. J. Appl. Phys.*

55; 07KF02. 2016

Iwase Y, Yumita N, Nishi K, Kuwahara H, Fukai T, Ikeda T, Chen FS, Momose Y and Umemura S. Apoptosis induction by aluminum phthalocyanine tetrasulfonate-based sonodynamic therapy in HL-60 cells. Jpn. J. Appl. Phys. 54; 07HD05, 2015

Sugita N, Hosokawa M, Sunaga N, Iwase Y, Yumita N, Ikeda T and Umemura S. Sonodynamically-induced cytotoxicity by rose bengal derivative and microbubbles in isolated sarcoma 180 cells. Jpn. J. Appl. Phys. 54; 07HF16. 2015

Yumita N, Iwase Y, Watanabe T, Nishi K, Kuwahara H, Shigeyama M, Sadamoto K, Ikeda T, Umemura S. Involvement of reactive oxygen species in the enhancement of membrane lipid peroxidation by sonodynamic therapy with functionalized fullerenes. Anticancer Res. 34; 481-7. 2014

〔学会発表〕(計 6 件)

Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase. Involvement of Reactive Oxygen in Sonodynamically Induced Apoptosis by pyrrolidine tris-acid fullerene. The Society for Redox Biology and Medicine' s Annual Meeting SFRBM. 2016.11.15.-2016.11.19. 米国・サンアントニオ

Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase, Koji Nishi, Takahiro Watanabe, Junya Fujimori, Toshio Fukai, Hiroyuki Kuwahara, Shin-ichiro Umemura. Sonodynamically Induced Apoptosis by 5-Aminolevulinic acid. International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines. 2016. 7.2. - 2016. 7. 8. 中国・南京

Yumiko Iwase, Koji Nishi, Junya Fujimori, Toshio Fukai, Nagahiko Yumita, Toshihiko Ikeda, Fu-shin Chen, Yasunori Momose, Shin-ichiro Umemura. Antitumor effect of sonodynamically activated pyrrolidine tris-acidfullerene. 第36回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム 2015. 11. 5.-2015. 11. 7. 筑波国際会館 (エポカルつくば)

Yumiko Iwase, Nagahiko Yumita, Kiyomi Sadamoto, Koji Nishi, Shin-ichiro Umemura. Photodynamically Induced Apoptosis by Enoxacin in Ultraviolet A Exposed HL-60 Cells. 第74回 日本癌学会学術総会 2015. 10. 8-2015. 10. 10. 名古屋(名古屋国際会議場)

Yumiko Iwase, Nagahiko Yumita, Koji Nishi, Hiroyuki Kuwahara, Toshio Fukai, Toshihiko Ikeda, Shin-ichiro Umemura. Apoptosis Induction by Aluminum Phthalocyanine Tetrasulfonate-Based Sonodynamic Therapy in HL60 Cells. 第35回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (USE2014) 2014.12.3-2014.12.5. 東京(明治大学駿河台アカデミーコモン:東京都千代田区神田駿河台 1-1)

Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase, Koji Nishi, Toshio Fukai, Toshihiko Ikeda, Fu-shih Chen, Yasunori Momose, Shin-ichiro Umemura. Involvement of Reactive Oxygen Species in Sonodynamically Induced Antitumor Effect by Water-solve Functionalized Fullerenes. Society for Free Radical Biology and Medicine's 21th Annual Meeting. (SFRBM2014) 2014. 11. 19. - 2014. 11. 23. Seattle, WA (Sheraton Seattle)

6. 研究組織

(1) (1) 研究代表者

岩瀬 由未子 (IWASE YUMIKO)
横浜薬科大学・薬学部・講師
研究者番号: 00521882

(2) 研究分担者

弓田 長彦 (YUMITA NAGAHIKO)
横浜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 40191481

定本 清美 (SADAMOTO KIYOMI)
横浜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 00297673

梅村 晋一郎 (UMEMURA SHIN-ICHIROU)
東北大学・工学部・教授
研究者番号: 20402787