

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26390017

研究課題名(和文) フラーレンを内包するリポソームのがん細胞に対する放射線増感効果

研究課題名(英文) Radiosensitization effect of liposome-encapsulated fullerenes on human melanoma

研究代表者

加藤 信哉 (Kato, Shinya)

三重大学・地域イノベーション推進機構・助教

研究者番号：40545547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： フラーレンの水溶性誘導体 Polyhydroxy small gap fullerenes (SGFs) を DOPC/DOPS 多重層リポソーム (Lpsm) に内包させ (LpsmSGFs)，ヒトメラノーマ細胞に投与して放射線増感効果を調べた。LpsmSGFs 投与後の X 線照射により、細胞増殖度は低下し、ミトコンドリア膜電位と細胞内活性酸素が増加し、DNA 酸化損傷も検出された。SGFs 水溶液の酸化還元電位が X 線照射により上昇した。リポソームに内包することで高濃度のフルーレンを細胞内に送達され、LpsmSGFs の放射線増感効果は、フルーレンが介在する酸化ストレスが寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： The polyhydroxy small-gap fullerenes (SGFs: C<sub>120</sub>O<sub>30</sub>(OH)<sub>30</sub>·30H<sub>2</sub>O·25Na<sup>+</sup>) were encapsulated in MLV liposomes (Lpsm) composed of DOPC and DOPS, which are designated as LpsmSGFs (DOPC/DOPS/SGFs = 35 mM:15 mM:246-445 μM, 141.2 nm, -potential-35.65 mV). Radiosensitization by LpsmSGFs under X-ray irradiation was evaluated on human melanoma HMV-II cells. On 7th day after X-ray irradiation, cell proliferation degree decreased on cells pretreated with LpsmSGFs than Lpsm or free-SGFs. LpsmSGFs obviously exhibited more augmented mitochondrial membrane potentials on perinuclear region of cells than Lpsm or free-SGFs. The oxidation-reduction potentials of SGFs aqueous solution increased by X-ray irradiation. These results suggest that LpsmSGFs-mediated generation of reactive oxygen species results in damages to cellular components such as mitochondria and DNA on cells, and thereby cell proliferation decreased. The LpsmSGFs has a potential as a pro-oxidative type radiosensitizer.

研究分野：応用生物化学

キーワード：リポソーム フラーレン 脂質過酸化

## 1. 研究開始当初の背景

がん放射線治療では、近年、ブロッグピークを利用した重粒子線治療が始まっているが、透過力に優れたエックス線照射治療の向上も取り組むべき価値があると考えられる。高線量の放射線 (エックス線) が照射された経路とがん組織の周辺では正常組織も損傷を受けることになる。放射線増感剤をリポソームに内包させることで、がん細胞の貪食による取込みと滞留性を向上させることができれば、放射線照射線量をできるだけ低線量とすることが可能となり、正常組織に対する細胞傷害 (副作用) を低減させ得ると考えられる。これまで抗がん剤についてはリポソーム化の効用が認められているが、放射線増感剤のリポソーム化については、研究例が少ない。また、放射線照射によるがん殺傷効果として、好氣的環境では水和ラジカル等が生じ、細胞傷害を引き起こすものの、嫌氣的な腫瘍組織では効能が低下した。光励起的性質を有するフラーレンでは放射線照射により豊富な  $\pi$  電子の一部を酸素に受け渡すことで、スーパーオキシドアニオンラジカルの生成を促進することが知られている。フラーレンの放射線照射との併用については、フラーレンの水溶性誘導体のラジカル消去能に基づく放射線防護効果が報告されているものの、がん細胞に対する放射線増感剤としての研究報告はほとんど見られない。我々は最近の実験でリポソームに内包させた放射線増感剤は、がん細胞への取込みによる効能増大を示し (Kato S. et al. 2012)、スクワレンに溶解したフラーレンは、放射線照射後のスクワレンの酸化を促すとともにミトコンドリア膜脂質の過酸化を介する放射線増感効果を示すことを見出した。

## 2. 研究の目的

フラーレンは低毒性の放射線増感剤としての可能性があるが、ほぼ未開拓である。本研究では、フラーレンならびに既存の放射線

増感剤 (BrdU) を比較対照とし、がん細胞における放射線 (エックス線) 増感効果を調べ、将来におけるがん放射線 (エックス線) 治療への応用可能性を調べる。

## 3. 研究の方法

当初は、未修飾のフラーレン-C60 の  $\beta$ -シクロデキストリン包接体を調製し、これを加熱してフラーレン-C60 をリポソーム脂質膜に取り込ませるという手順でのフラーレンを内包するリポソームを用いた。そして、このフラーレンを内包するリポソームをヒトメラノーマ細胞に投与してエックス線照射を行い、細胞増殖度を測定した (WST-8 法)。次に高次フラーレンの水溶性誘導体

Polyhydroxy small gap fullerenes (SGFs:

$C_{120}O_{30}(OH)_{30} \cdot 30H_2O \cdot 25Na^+$ ) を用いて、この比較的高濃度の水溶液をリポソームに内包させたものをヒトメラノーマ細胞に投与して、エックス線照射を行った。エックス線照射後の細胞増殖度を細胞内ミトコンドリア脱水素酵素の活性に基づく WST-8 法により測定し、ミトコンドリア膜電位の変化を Rhodamine123 により評価した。細胞内活性酸素を Dihydroethidium の蛍光により検出するとともに、DNA 酸化損傷を 8-OHdG 免疫染色により蛍光観察した。また SGFs 水溶液にエックス線照射を行った場合の酸化還元電位 (ORP) を測定した。

## 4. 研究成果

はじめに、フラーレン-C60 を内包するリポソームを調製し、これをヒトメラノーマ細胞に投与して、エックス線照射後の細胞増殖度を測定し放射線増感効果を調べた。まずフラーレン/ $\beta$ -シクロデキストリン (1:2 モル比) 包接体 [C60/CD2, C60 含有量: 約 1000 ~ 1200  $\mu$ M] を乳鉢を用いて手製で調製した。C60/CD2 と逆相蒸発法により調製した DMPC/DMPS (7:3 モル比) リポソームを混合して、電子レンジ処理 (約 80 ) し、透析

(MWCO 2000)して、遊離の C60/CD2 を除き、フラレーンを内包するリポソーム (DMPC/DMPS/C60 =700 μM:300 μM:127 μM)を調製した。リポソームは、エクストルーダー処理により粒子径調整 (100 nm)を行った。ヒトメラノーマ細胞に対して、エックス線照射前の 24 時間 (Before 投与)または照射時のみ(During 投与)にフラレーンを内包するリポソームまたはリポソームを投与した。エックス線照射後には培地交換を行い、フラレーンを内包するリポソームまたはリポソームを含まない通常培地で培養し、3 日後ならびに 5 日後の細胞増殖度を測定し、顕微鏡観察を行った。その結果、エックス線照射後のヒトメラノーマ細胞の増殖は、フラレーンを含まないリポソームと比べてリポソームを内包するフラレーンの Before 投与では細胞死がやや抑制され、During 投与ではわずかに抑制された。すなわちフラレーンを内包するリポソームはある程度の放射線防護の効果を示した。組成の異なるリポソームについて、ステアリルアミンを含むカチオン性リポソームや DMPG を含むアニオン性リポソームを用いて同様の実験を行ったが、フラレーンによる効果は見られなかった。

次に、フラレーンの水溶性誘導体 Polyhydroxy small gap fullerenes (SGFs:  $C_{120}O_{30}(OH)_{30}\cdot 30H_2O\cdot 25Na^+$ )を用いた。50 mM DOPC/DOPS (7:3) 多重層リポソーム (Lpsm) に 5 mM SGFs を内包させ (LpsmSGFs: 50 mM DOPC/DOPS = 7:3, 246 μM SGFs,  $\phi 141.2$  nm,  $\zeta$ -potential = -35.65 mV)、ヒトメラノーマ細胞に投与して放射線増感効果を調べた。エックス線照射後の細胞増殖度を細胞内ミトコンドリア脱水素酵素の活性に基づく WST-8 法により測定し、ミトコンドリア膜電位の変化を Rhodamine123 により評価した。細胞内活性酸素を Dihydroethidium の蛍光により検出するとともに、DNA 酸化損傷を 8-OHdG 免疫染色により蛍光観察した。また

SGFs 水溶液にエックス線照射を行った場合の酸化還元電位 (ORP)を測定した。

LpsmSGFs 投与後のエックス線照射により、ヒトメラノーマ細胞の細胞増殖度は投与量依存的に低下し、Lpsm 単独投与ならびに遊離 SGFs を有意に下回った。ミトコンドリア膜電位に対応する蛍光強度 (Rhodamine123) は、エックス線照射なしでは LpsmSGFs 投与と無投与でほぼ同じであったが、エックス線照射後には LpsmSGFs 投与で蛍光強度が上がり、一方、無投与では低下した。また LpsmSGFs 投与では、エックス線照射後の細胞内活性酸素を示す蛍光強度 (Dihydroethidium)が増加し、また DNA 酸化損傷も検出された。SGFs 水溶液にエックス線照射を行った場合、8 Gy まで ORP は上昇し、それ以上の照射線量では低下した。リポソームに内包することで、高濃度のフラレーンを細胞内に送達することが可能となり、LpsmSGFs の放射線増感効果は、多数の-OH が結合した水酸化フラレーンで-OH の一部がラジカル化するなどフラレーンが介在する酸化ストレスが寄与している可能性が示唆された。これらの研究の中でリポソームの膜脂質過酸化による生体分子への影響について検証する必要があると考えたので、DOPC/DOPS 多重層リポソームとタンパク質の混合系にエックス線照射を行い、膜脂質過酸化を介したタンパク質凝集が生じ得ることが示唆された。

## 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 1 件 )

- 1) Shinya Kato, Tetsuro Yoshimura, Nobuhiko Miwa, Radiosensitization by liposome-encapsulated fullerenes to mitochondria/DNA-damages on human melanoma cells., Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 18 (6), 3775-3786 (2018). 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- 1) フラーレンを内包するリポソームのヒトメラノーマ細胞に対する放射線増感効果、加藤 信哉、吉村 哲郎、三羽 信比古、第53回 アイソトープ放射線研究発表会 (2016年)
- 2) フラーレンを内包するリポソームのヒトメラノーマ細胞に対する放射線増感効果、加藤 信哉、吉村 哲郎、三羽 信比古、日本農芸化学会中部支部 第177回例会 (2016年)

〔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  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

加藤 信哉 (KATO, Shinya)  
三重大学・地域イノベーション推進機構・助教  
研究者番号：40545547

##### (2) 研究分担者

吉村 哲郎 (YOSHIMURA, Tetsuro)  
三重大学・工学研究科・特任教授(教育担当)  
研究者番号：30035472

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

三羽 信比古 (MIWA, Nobuhiko)  
県立広島大学・名誉教授