

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861000

研究課題名(和文) 過酸化チタンナノ粒子を用いた新規放射線増感療法の基礎研究

研究課題名(英文) Novel radiosensitization using titanium peroxide nanoparticles in vitro and in vivo study

研究代表者

中山 雅央 (NAKAYAMA, MASAO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・医学研究員

研究者番号：60582004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では二酸化チタンを原料として合成した過酸化チタンナノ粒子がX線照射により大量の活性酸素種(ROS)を生成することを利用して、その放射線増感効果を細胞実験および動物実験により調べた。細胞実験では過酸化チタンナノ粒子はX線照射により細胞内でも十分なROSを生成し、X線照射単独群に比べて有意な殺細胞効果を示した。担癌マウスを用いた実験では過酸化チタンナノ粒子を腫瘍に投与しX線照射をした群では、X線照射単独群に比べて著明な抗腫瘍効果が得られた。これらの結果から過酸化チタンナノ粒子は新たな放射線増感剤になり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of titanium peroxide nanoparticles (TiO<sub>x</sub>NPs) made from titanium dioxide in cancer therapy was investigated. The TiO<sub>x</sub>NPs showed a distinct ability to produce reactive oxygen species (ROS) upon X-ray irradiation in a dose- and concentration-dependent manner. TiO<sub>x</sub>NPs conjugated to polyacrylic acid (PAA-TiO<sub>x</sub>NPs) were stable for in vitro and in vivo study. The absorption of PAA-TiO<sub>x</sub>NPs enhanced DNA damage and resulted in higher cytotoxicity in response to X-ray irradiation in vitro. Growth inhibition of the tumor in the combination of PAA-TiO<sub>x</sub>NP and X-ray irradiation was significantly greater than single treatment subgroups in vivo. No apparent toxicity or weight loss was observed for 43-day observation period after irradiation. This study demonstrates that TiO<sub>x</sub>NPs have a potential to be a safe and distinct radiosensitizers for cancer therapy through the production of ROS.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線治療 ナノ粒子 チタン酸化物 活性酸素種 放射線増感

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療はがん治療で大きな役割を担っている一方で、難治癌では癌細胞自体が放射線照射を含めた細胞障害に対して既に防御機構を獲得しており、既存の治療法のみでは腫瘍を治癒に導くことが難しく、再発例や無効例が多い。放射線療法はヒドロキシラジカルなどの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) を局所に発生させる優れた局所治療であるが、その抵抗性腫瘍では多くの場合、グルタチオンやカタラーゼといった細胞内でのラジカル消去を担う還元系分子が過剰に発現しており、放射線によって生成されたヒドロキシラジカルを瞬時に消去してしまうことが難治性となっている原因である。新たな放射線増感療法の開発には、この ROS を増強させるか、還元系分子を減弱させるかのいずれかを達成し、がん細胞を死に誘導する必要がある。

我々はこれまでに多数の無機物ナノ粒子、有機化合物のライブラリーの中から、X線照射によって ROS の生成量が飛躍的に増加する物質を網羅的に探索してきた。その結果、二酸化チタンを原料として合成した過酸化チタンナノ粒子が X線照射により大量のヒドロキシラジカルを生成することを発見した。本研究では、この成果を放射線治療に応用することにより、チタン酸化物ナノ粒子を用いたこれまでにない放射線増感療法を開発し、膵臓癌などの難治癌に対する新たな治療戦略を提案することを目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では、過酸化チタンナノ粒子が新たな放射線増感剤として臨床応用に展開するための基盤研究となることを目的とし、細胞実験および動物実験により本ナノ粒子の有効性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 過酸化チタンナノ粒子の準備

本研究では合成した過酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) ナノ粒子の表面にポリアクリル酸 (PAA) を修飾した PAA-TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を用いた。これは細胞実験および動物実験で粒子同士の凝集を防ぐためである。PAA-TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の粒径や形状は、電子顕微鏡 (TEM) および動的分散法 (DLS) を用いて測定した。また cell-free 系での X線照射による ROS 生成量はラジカル検出試薬である APF を用いて測定した。

### (2) 細胞実験 (In vitro)

細胞実験にはヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 を用いた。細胞内でのナノ粒子の存在を確認するために細胞とナノ粒子を反応させた後、TEM 下での観察を行った。

細胞内での ROS (ヒドロキシラジカル、過

酸化水素、スーパーオキシドアニオンラジカル) 生成を確認するために、ナノ粒子を加えた細胞にそれぞれの ROS 検出試薬を添加し、X線照射を行った。照射後フローサイトメーター (FACS) を用いて測定を行った。

In vitro で X線照射による PAA-TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の ROS 生成により有効な殺細胞効果を示すか調べるために DNA の二重鎖切断を評価する H2AX アッセイおよび細胞の増殖能を評価するコロニーアッセイを実施した。

### (3) 動物実験 (In vivo)

MIA PaCa-2 を担癌させたヌードマウスを用いた。過酸化チタンナノ粒子を腫瘍に局注投与し X線照射を行った後、43 日間の観察でその抗腫瘍効果および急性毒性を調べた。

病理的な組織評価として処置後 24 時間で腫瘍を切除し、HE 染色にて観察を行った。また DNA 損傷の評価に H2AX アッセイ、細胞のアポトーシスの評価に TUNEL アッセイを実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 過酸化チタンナノ粒子の特性

TEM および DLS の結果から本研究で使用した過酸化チタンナノ粒子の粒径は約 50-70 nm であった (図 1)。Cell-free 系での X線照射による ROS 生成量は、粒子濃度および X線照射線量に依存して増加し、30Gy の照射において TiO<sub>2</sub> ナノ粒子では最大 8.5 倍の増加がみられた。PAA-TiO<sub>2</sub> ナノ粒子では未修飾と比較してその量はやや低下するものの、3.7 倍の増加が見られた (図 2)。

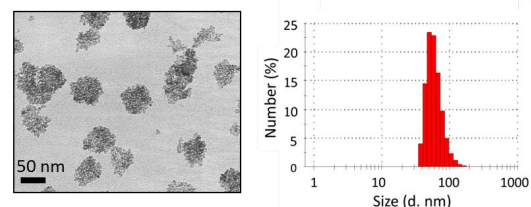


図 1. (左) PAA-TiO<sub>2</sub> ナノ粒子分散液の TEM イメージおよび (右) DLS により評価したサイズ分布

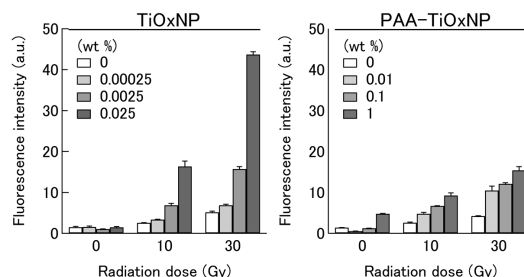


図 2. TiO<sub>2</sub> ナノ粒子、PAA 修飾 TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の X線照射によるラジカル生成能

## (2) 細胞内での ROS 評価

TEM 下での観察により細胞内に PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子が存在することを確認した (図 3)。FACS を用いた測定により PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子と X 線照射の併用を行った細胞群で非処理群と比べてヒドロキシルラジカルの量が 2 倍以上、過酸化水素の量が 1.6 倍以上増加していることが確認された (図 4)。

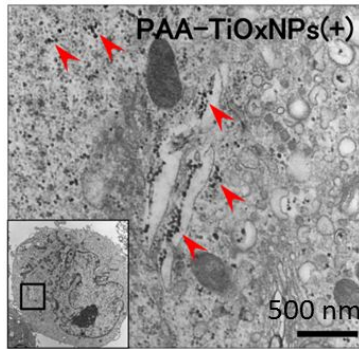


図 3. 細胞内での PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子の分布 (赤矢印)

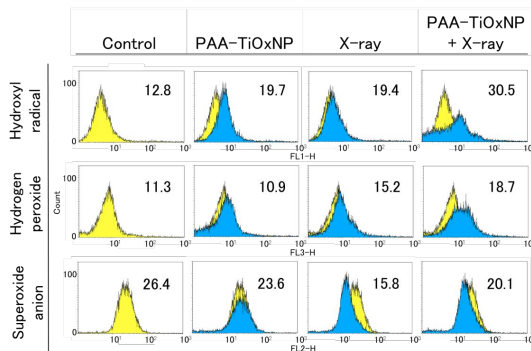


図 4. 細胞内でのラジカル生成能の評価、图中的な値は分布の平均値を表す

## (3) PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子と X 線照射併用による殺細胞効果 (In vitro)

H2AX アッセイの結果、X 線照射単独群と比べて PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子と X 線照射併用群では DNA 二重鎖切断を示す H2AX シグナルが有意に高かった (図 5)。同様にコロニーアッセイの結果も併用群において X 線照射単独群よりも有意な殺細胞効果を示した (図 6)。これらの結果から PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子は X 線照射により細胞内でも放射線増感のための十分な ROS を生成していると考えられる。

## (4) PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子と X 線照射併用による抗腫瘍効果 (In vivo)

担癌マウスを用いた 43 日間の観察において、PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子と X 線照射併用群は X 線照射単独群と比べて有意な腫瘍抑制が見られた (図 7)。併用群の平均腫瘍サイズは、X 線照射単独群の 35.4% であった。観察期間中、ナノ粒子を投与した群において死亡したマウスはおらず、コントロール群と比べて顕

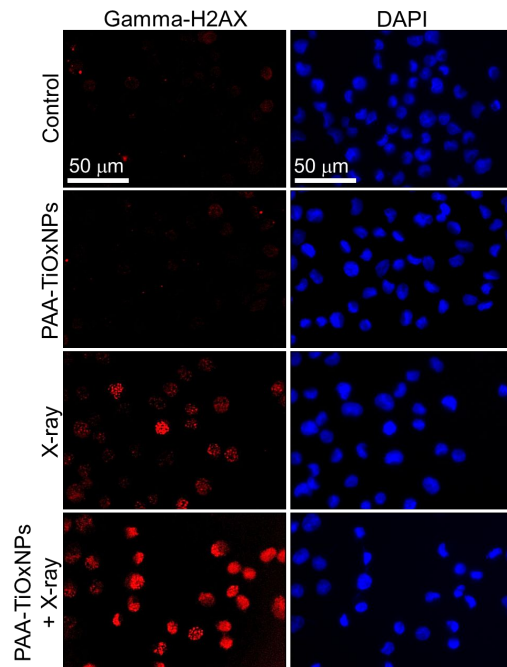


図 5. H2AX アッセイによる DNA 損傷の評価

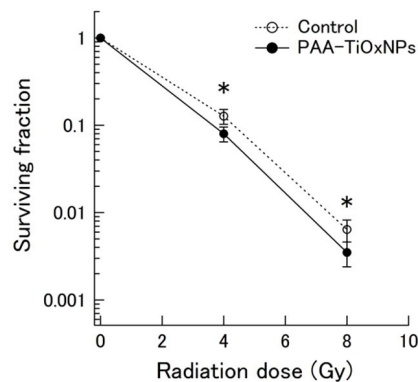


図 6. コロニーアッセイによる PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子と X 線照射併用での細胞生存曲線、\**p* < 0.05

著な体重変化や肉眼的変化も見られなかった。主要臓器の病理的観察や血液検査でも異常は認められず、このナノ粒子投与による急性毒性は低いと考えられる。

腫瘍組織の評価において、HE 染色像では腫瘍組織内に十分にナノ粒子が分布していることが確認できた (図 8)。H2AX アッセイの結果、PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子と X 線照射併用群は X 線照射単独群と比べて有意に高い H2AX のシグナルを認めた (図 9)。同様に TUNEL アッセイでは、併用群ではアポトーシスのシグナルが有意に高かった (図 10)。これらの結果から PAA-TiO<sub>x</sub> ナノ粒子は X 線照射との併用によりがん細胞の DNA 損傷やアポトーシスを増強し、抗腫瘍効果を得ていると考えられる。

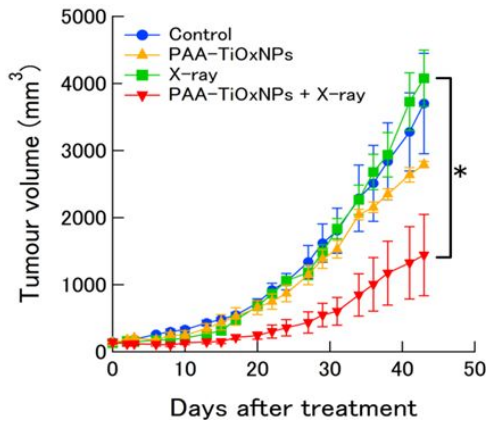


図7. PAA-TiOx ナノ粒子とX線照射併用による抗腫瘍効果（腫瘍体積の変化）  $p < 0.05$

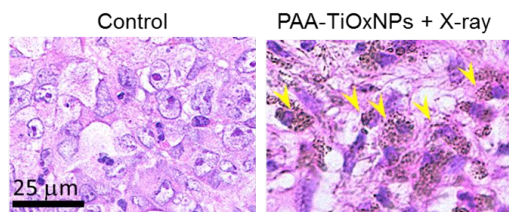


図8. 腫瘍組織のHE染色像でのPAA-TiOx ナノ粒子の分布（黄矢印）

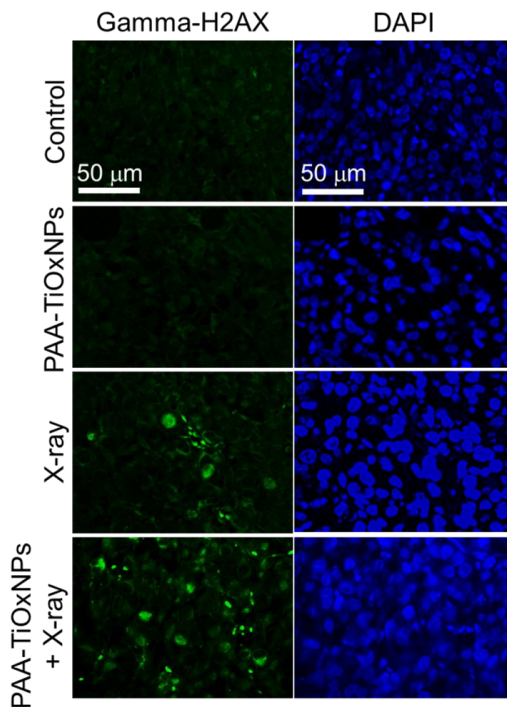


図9. H2AX アッセイによる腫瘍組織内のDNA損傷の評価

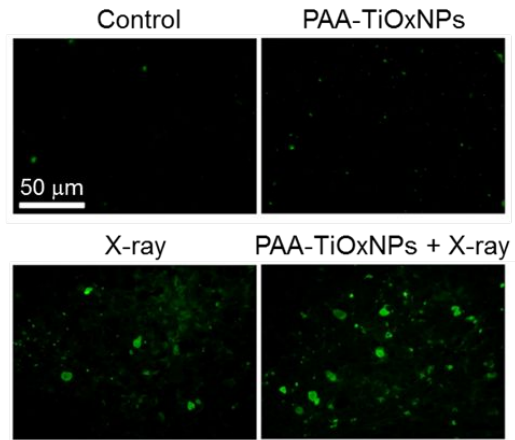


図10. TUNEL アッセイによる腫瘍組織内のアポトーシスの評価

以上の結果から PAA-TiOx ナノ粒子は X 線照射により ROS を生成し、これにより有意な抗腫瘍効果を示すと考えられる。今後長期の毒性評価やさらなる治療効果の検討が必要であるが、本研究により PAA-TiOx ナノ粒子が新しい放射線増感剤になり得る可能性が示唆された。

## 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)

Tan Z, Sato K, Takami S, Numako C, Umetsu M, Soga K, Nakayama M, Sasaki R, Tanaka T, Ogino C, Kondo A, Yamamoto K, Hashishin T, Ohara S. Particle size for photocatalytic activity of anatase TiO<sub>2</sub> nanosheets with highly exposed {001} facets. RSC Adv. 42(3):19268-271, 2013. DOI: 10.1039/C3RA43383H

〔学会発表〕(計2件)

Masao Nakayama, Ryohei Sasaki, Chiaki Ogino, Tsutomu Tanaka, Kenta Morita, Mitsuo Umetsu, Satoshi Ohara, Kazuyoshi Sato, Chiya Numako, Seiichi Takami, Akihiko Kondo. Titanium peroxide nanoparticles, as novel radiosensitizers, enhance antitumor efficacy in pancreatic cancer therapy. 15th International Congress of Radiation Research. 2015.05.25, 京都国際会議場, 京都.

Masao Nakayama, Ryohei Sasaki, Toru Mukohara, Chiaki Ogino, Kenta Morita, Mitsuo Umetsu, Satoshi Ohara, Kazuyoshi Sato, Chiya Numako, Seiichi Takami, Akihiko Kondo. Titanium

peroxide nanoparticles enhance  
antitumor efficacy through reactive  
oxygen species in pancreatic cancer  
radiation therapy. AACR Annual  
Meeting 2015. 2015.04.18,  
Philadelphia, US.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 雅央 (NAKAYAMA Masao)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・  
医学研究員

研究者番号: 60582004