

令和元年5月24日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10395

研究課題名(和文) 腫瘍ターゲティング能を有した過酸化チタンナノ粒子による放射線増感治療の基礎研究

研究課題名(英文) Assessment of polyacrylic acid-modified titanium peroxide nanoparticles as radiosensitisers

研究代表者

中山 雅央 (Nakayama, Masao)

神戸大学・医学研究科・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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で過酸化チタンナノ粒子はX線照射により活性酸素種を生成することがわかってきたが、本研究ではX線照射の有無に関わらずこのナノ粒子自身から過酸化水素が除放されていることを明らかにした。同じくX線照射により活性酸素種を生成するが過酸化水素は生成しない金ナノ粒子と比較したところ、その抗腫瘍効果は過酸化チタンナノ粒子の方が優れており、過酸化水素が放射線増感効果に大きく寄与していることが示唆された。一方で、静脈投与では約1割のナノ粒子しか腫瘍に集積しておらず、その多くが肝臓に集積していることが判明し、効率的な投与方法の検討が今後の課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療はがん治療において大きな役割を果たしているが、放射線抵抗性をもつ癌細胞に対しては既存の放射線治療では完全に治癒することが難しく、再発例や無効例が多い。その中でナノ粒子は放射線増感効果をもつアプリケーションとして注目されており、金ナノ粒子をはじめ多くのナノ粒子が研究されているものの、いまだ臨床応用には至っていない。その中で過酸化チタンナノ粒子の過酸化水素を除放する性質は、これまでのナノ粒子には例がないものであり、より効果的な放射線増感治療法としてその応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies indicated that titanium peroxide nanoparticles (TiOxNPs) induced reactive oxygen species (ROS) when exposed to X-rays and enhanced radiation cytotoxic effect. In this study, the type and amount of ROS generated from TiOxNPs were investigated and compared to those generated by gold nanoparticles (GNPs). The results showed that the amount of ROS generated from TiOxNPs under X-ray irradiation was less than that of GNPs, however TiOxNPs had the ability to release H₂O₂ regardless of X-ray irradiation. The released H₂O₂ is assumed to be acted as a strong radiosensitising agent of TiOxNPs in vitro and in vivo set up. On the other hand, only 12% of the TiOxNPs dose had accumulated in the tumour 1 hour after an intravenous injection in vivo experiment. The liver had the largest accumulation of the injected nanoparticles. Future studies will be required to develop the strategies to enhance the tumour targeting ability of TiOxNPs.

研究分野：放射線治療

キーワード：ナノ粒子 放射線治療 活性酸素種 過酸化水素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は手術・抗がん剤に並ぶがん治療の三本柱の1つであるが、膵臓癌などの難治性癌では癌細胞自身が放射線照射に対する細胞障害の防御機構を獲得しており、既存の放射線治療のみでは治癒することが難しく、再発例や無効例が多い。放射線照射により細胞内外でヒドロキシラジカルをはじめとする活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) が発生することで細胞死を導くが、放射線抵抗性の腫瘍では多くの場合、グルタチオンなどの ROS 除去作用をもつ還元系分子が過剰発現しており、生成された ROS を除去してしまうことが難治性の原因の1つである。放射線増感にはこの生成される ROS を増強するか、還元系分子を減弱させるかのいずれかを達成し、がん細胞死を誘導させる必要がある。

我々はこれまでの医工連携共同研究により二酸化チタンを原料として合成した過酸化チタン (TiOx) ナノ粒子が X 線照射によりヒドロキシラジカルをはじめとする ROS を生成することを発見した。この特性を利用したヒト膵臓がん担癌ヌードマウスへの腫瘍局注投与による in vivo 実験において、過酸化チタンナノ粒子と X 線を併用した群では、X 線単独群に比べて有意に抗腫瘍効果が増強することを報告した。これらのデータは TiOx ナノ粒子が膵臓癌などの難治癌に対する放射線治療の新たな治療戦略となる可能性をもっていることを示唆しており、臨床応用に向けたさらなる研究展開が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、TiOx ナノ粒子を用いた新しい放射線増感治療法の開発と臨床応用に向けて、これまでの研究成果を発展させた基盤研究となることを目指す。In vivo 実験を中心として、腫瘍ターゲティング性能を付加させた TiOx ナノ粒子を用いた増感効果の評価、正常臓器への集積および毒性評価、生成される ROS の種類の同定、既存の金ナノ粒子との増感効果の比較評価を行う。

3. 研究の方法

3.1. 抗体修飾 TiOx ナノ粒子の効果

本研究では TiOx ナノ粒子の表面にポリアクリル酸 (PAA) を修飾した PAA-TiOx ナノ粒子を用いた。本項では腫瘍でのナノ粒子の集積率を上げるためにこの粒子に Anti-EGFR antibody 由来の一本鎖抗体を修飾し、その抗腫瘍効果および体内動態を評価した。ヒト膵癌細胞株 BxPC-3 を移植した担がんマウスに PAA-TiOx ナノ粒子 10 mg/ml を尾静脈投与し、腫瘍に対して 5 Gy の X 線照射を行った。処置後、腫瘍体積の変化を観察した。

またナノ粒子の体内動態を調べるために、同様にナノ粒子投与後 1 時間、1 日、1 週間で腫瘍および正常臓器を摘出し、誘導結合プラズマ発光分析 (ICP-AES) 法を用いて各組織の PAA-TiOx ナノ粒子の集積量を定量評価した。尾静脈投与に加え従来の腫瘍局所投与も行い、それぞれ比較した。

3.2. 生成される ROS の測定

PAA-TiOx ナノ粒子から生成される ROS の種類およびその量を化学蛍光法により評価した。反応性の高いヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、およびスーパーオキシドアニオン ($\cdot\text{O}_2^-$) に対し、それぞれ特異的に反応する下記の試薬・測定キットを用いて X 線照射前後での生成量を測定した。また放射線増感効果をもつナノ粒子として広く研究されている金ナノ粒子を比較試料として同様に測定した。

ROS	検出試薬
ヒドロキシラジカル	3'-(p-aminophenyl) fluorescein (APF, Sekisui Medical)
過酸化水素	BIOXYTECH H ₂ O ₂ -560 (OXIS International)
スーパーオキシドアニオン	Dihydroethidium (DHE, Invitrogen)

3.3. 金ナノ粒子を用いた比較評価

生成される各 ROS と放射線増感効果の関連性を調べるために、前項の結果を踏まえて in vivo および in vitro 実験により PAA-TiOx ナノ粒子と金ナノ粒子との増感効果の比較評価を実施した。In vivo 実験ではヒト膵癌細胞株 MIAPaCa-2 を移植した担がんマウスに各ナノ粒子を腫瘍局所投与後、X 線照射を行った。処置後、腫瘍体積の変化および腫瘍組織の病理学的評価を実施した。In vitro 実験では同様に MIAPaCa-2 細胞株を用いてコロニーアッセイ法によりナノ粒子投与および X 線照射後の細胞生存率を評価した。

3.4. ナノ粒子の体内イメージングの検討

放射線増感効果の評価とともにナノ粒子の腫瘍ターゲティングを評価するためにナノ粒子の体内でのイメージ化が課題として挙げられる。そこで本項では TiOx ナノ粒子の原料であり、同じ結晶構造をもつ二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子を用いてコンピューター断層撮影 (CT) および核磁気共鳴画像法 (MRI) でのイメージングの基礎的な検討を行った。TiO₂ ナノ粒子を装填したファントムを CT および MRI で撮影し、ナノ粒子の濃度による

CT 値、MRI の T1 値および T2 値の変化を測定した。

4. 研究成果

4.1. 抗体修飾 TiOx ナノ粒子の増感効果と体内動態

担がんマウスに抗体修飾 PAA-TiOx ナノ粒子を尾静脈投与し、X 線を照射、その増感効果を調べた。処置後 1 ヶ月の腫瘍体積の変化では、従来の PAA-TiOx ナノ粒子、抗体修飾 PAA-TiOx ナノ粒子でその抗腫瘍効果に差は見られず、さらにいずれも X 線照射単独群とも差はなかった (図 1)。ナノ粒子投与後の体内分布を調べた結果、正常臓器では肝臓に最も多く集積しており、腫瘍には一部集積が見られたが時間とともに大きく減少していることがわかった (図 2)。腫瘍局所投与では投与後 1 時間で約 45% が集積しているのに対し、静脈投与では約 12% しか集積しておらず、そのため静脈投与では X 線増感効果が見られなかったと考えられる。その一方で正常組織では肝臓に顕著にナノ粒子が集積していた。臨床応用に向けて腫瘍へのドラッグデリバリー技術が今後の重要な課題であることが強く示唆される。

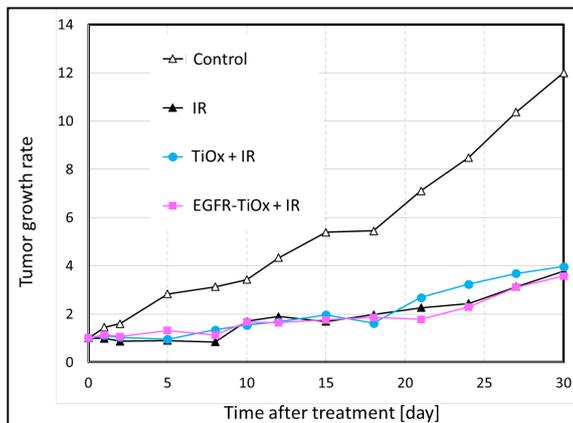


図 1. 抗体修飾ナノ粒子の尾静脈投与および X 線照射後の腫瘍体積の変化。IR = X 線照射 5 Gy、EGFR-TiOx = 抗体修飾 PAA-TiOx ナノ粒子。

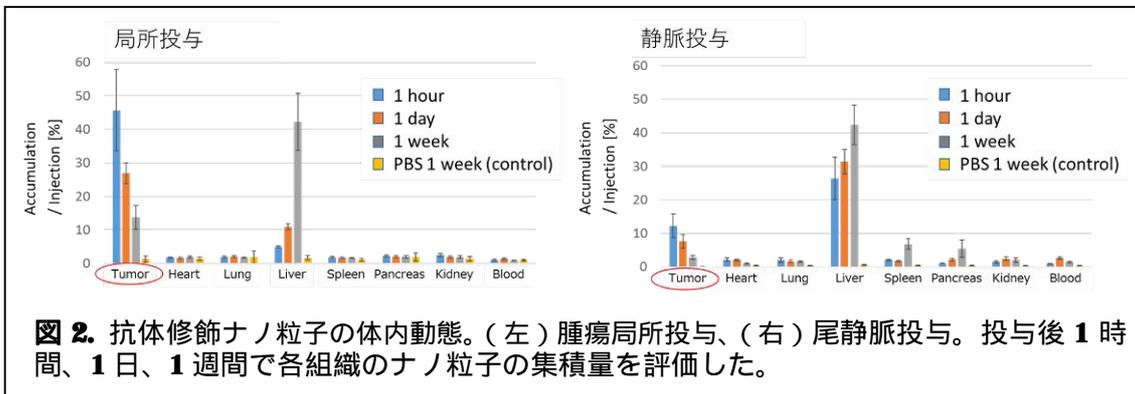


図 2. 抗体修飾ナノ粒子の体内動態。(左) 腫瘍局所投与、(右) 尾静脈投与。投与後 1 時間、1 日、1 週間各組織のナノ粒子の集積量を評価した。

4.2. 生成される ROS の同定

どのような ROS が X 線増感効果に関わっているのかを明らかにするため、TiOx ナノ粒子から生成される ROS 量およびその種類を評価した。比較試料として金ナノ粒子を用いた。その結果を図 3 に示す。X 線照射により TiOx ナノ粒子から $\cdot\text{OH}$ の生成が確認されたが、その生成量は金ナノ粒子と比べて有意に少なかった。一方で、TiOx ナノ粒子では X 線照射をしていなくても粒子自体から H_2O_2 が生成されていることがわかり、金ナノ粒子からはその生成は見られなかった (図 3 右)。 $\cdot\text{O}_2^-$ に関しては、TiOx ナノ粒子ではそのシグナルが X 線単独と比べて減少していた。これは TiOx ナノ粒子から H_2O_2 が生成されていると考えると、 H_2O_2 による Haber-Weiss 反応 ($\cdot\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$) が起こっているためと推測される。

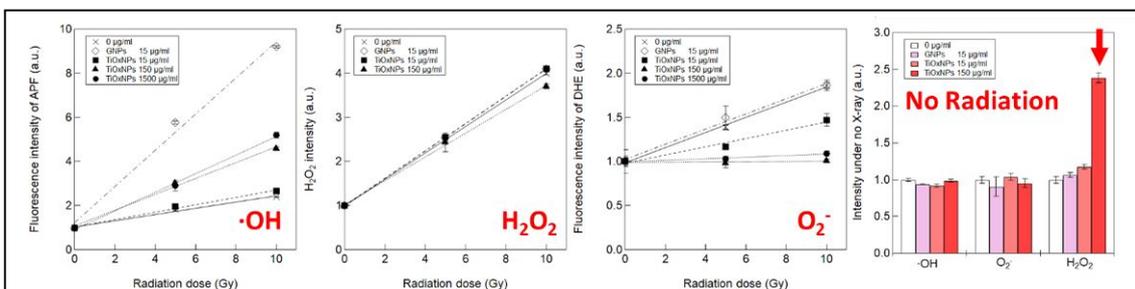


図 3. TiOx ナノ粒子 (1.5, 15, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および金ナノ粒子 (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) から生成される ROS。(左 右) X 線照射 5 Gy、10 Gy による $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 、および $\cdot\text{O}_2^-$ の生成量、(右端) X 線照射なしでの各 ROS の生成量。TiOx ナノ粒子は照射なしでも H_2O_2 を生成している (赤矢印)。GNPs = 金ナノ粒子。

4.3. 金ナノ粒子とのX線増感効果の比較

担がんマウスに **150 $\mu\text{g/ml}$ TiOx** ナノ粒子、**1.5 $\mu\text{g/ml}$ 金ナノ粒子**を腫瘍局所投与し、**X線 5 Gy**を照射した。処置後の腫瘍体積の変化を評価した結果、**TiOx** ナノ粒子 + X線併用群では、X線単独群および金ナノ粒子 + X線併用群と比べて有意な抗腫瘍効果を示した(図4)。一方、**TiOx** ナノ粒子単独で抗腫瘍効果は見られなかった。さらに腫瘍組織の病理学的評価では、**TiOx** ナノ粒子 + X線併用群でカタラーゼおよびグルタチオンペルオキシターゼが多く発現していた(図5)。前項の**ROS**測定の結果と合わせて、これらの結果は**H₂O₂**がX線増感効果に大きく寄与していることを示唆する。

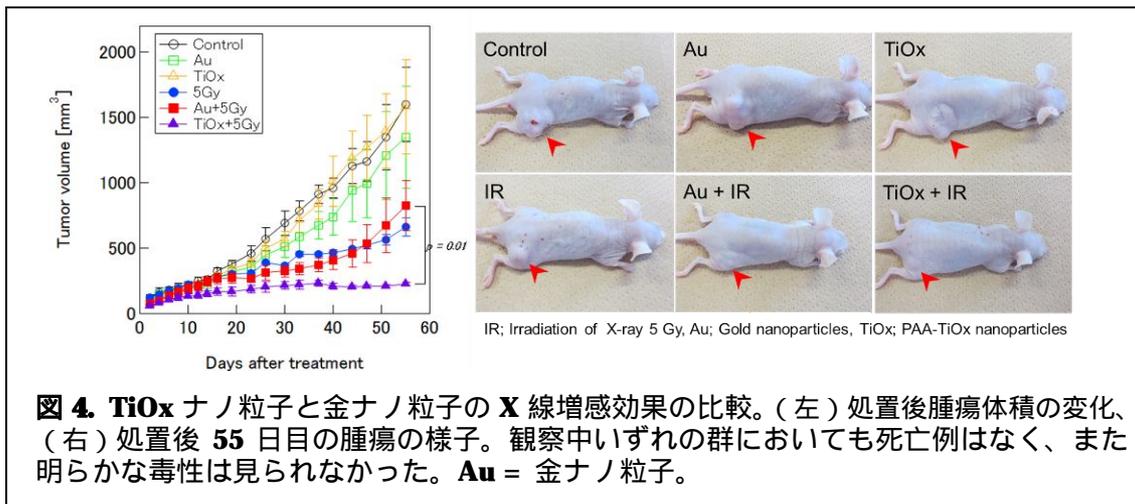


図4. TiOx ナノ粒子と金ナノ粒子の X 線増感効果の比較。(左) 処置後腫瘍体積の変化、(右) 処置後 55 日目の腫瘍の様子。観察中いずれの群においても死亡例はなく、また明らかな毒性は見られなかった。Au = 金ナノ粒子。

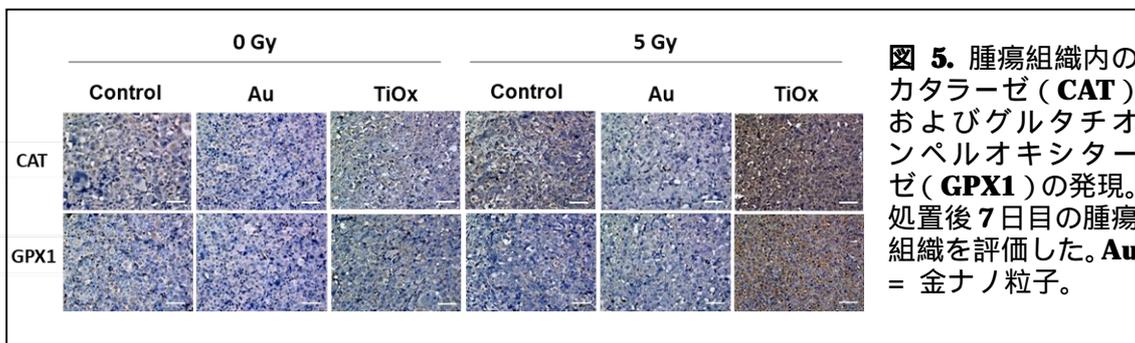


図5. 腫瘍組織内のカタラーゼ (CAT) およびグルタチオンペルオキシターゼ (GPX1) の発現。処置後 7 日目の腫瘍組織を評価した。Au = 金ナノ粒子。

In vitro 実験においては、**TiOx** ナノ粒子で処置した群でナノ粒子濃度に依存した細胞内での **H₂O₂** の増大が見られた。コロニーアッセイ法による細胞生存率の評価では、金ナノ粒子は X 線照射による $\cdot\text{OH}$ の十分な増大が見られていたが(図3)、本実験では有意な増感効果は得られなかった。これに対して、**TiOxNPs** では $\cdot\text{OH}$ の生成は少ないものの、有意な X 線増感効果を示した(図6)。これらの結果は **In vivo** 実験での結果と一致し、同様に **H₂O₂** が X 線増感効果に重要であることが示している。

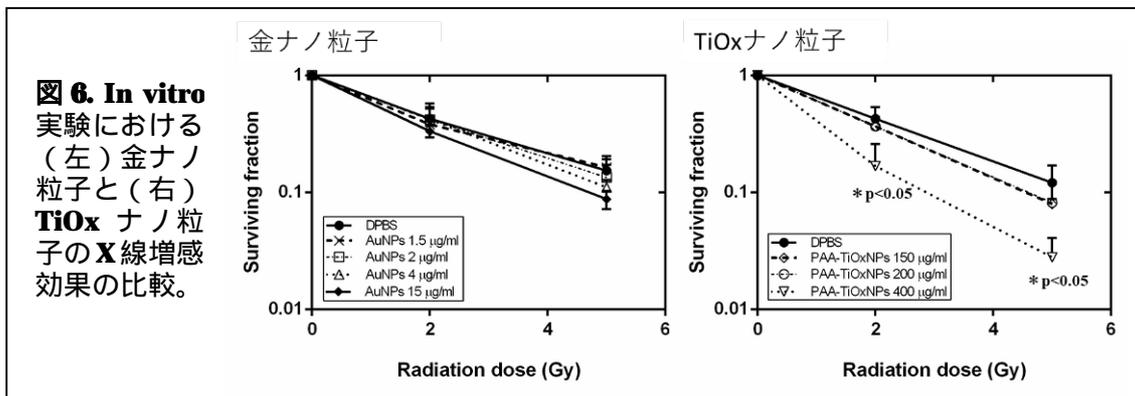


図6. In vitro 実験における(左)金ナノ粒子と(右)TiOx ナノ粒子の X 線増感効果の比較。

4.4. TiO₂ ナノ粒子の CT および MRI 像

ナノ粒子のイメージ化の基礎検討として、**TiO₂** ナノ粒子を **CT** および **MRI** にて撮像し、そのコントラストを評価した(図7)。CT 像では濃度によってわずかな CT 値の上昇があったものの、視覚的な濃度の差は見られなかった。一方 MRI 像では、**T2** 強調画像においてナノ粒子の濃度に応じたコントラストの差が観察された。本研究期間では初期検討しか実施できなかったものの、ナノ粒子の腫瘍集積を評価するツールとして **MRI** を利用できる可能性がある。

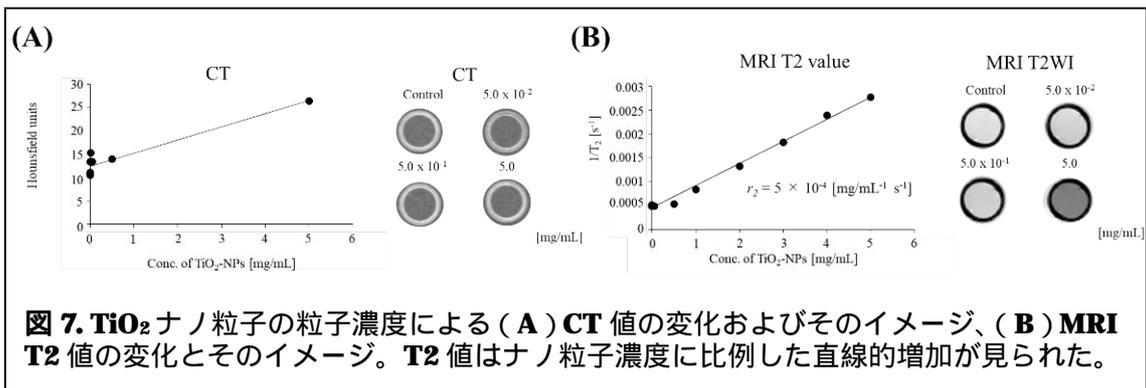


図 7. TiO₂ ナノ粒子の粒子濃度による (A) CT 値の変化およびそのイメージ、(B) MRI T₂ 値の変化とそのイメージ。T₂ 値はナノ粒子濃度に比例した直線的増加が見られた。

以上の結果から TiO_x ナノ粒子の放射線増感効果は粒子から生成される過酸化水素による寄与が大きく影響していると考えられ、さらにそれにより従来の金ナノ粒子よりも大きな増感効果が得られる可能性が示唆された。その一方で抗体修飾を行ったナノ粒子でも静脈投与による腫瘍集積率は低く、十分な増感効果が得られなかった。今後画期的な腫瘍ターゲティング方法の考案が課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Morita K, Suzuki T, Nishimura Y, Matsumoto K, Numako C, Sato K, **Nakayama M**, Sasaki R, Ogino C, Kondo A. In vivo tissue distribution and safety of polyacrylic acid-modified titanium peroxide nanoparticles as novel radiosensitizers. *J Biosci Bioeng*. 2018 Jul;126(1):119-125. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.012.
2. Shimizu Y, Akasaka H, Miyawaki D, Mukumoto N, **Nakayama M**, Wang T, Osuga S, Inubushi S, Yada R, Ejima Y, Yoshida K, Ishihara T, Sasaki R. Evaluation of a Small Animal Irradiation System for Animal Experiments Using EBT3 Model GAFCHROMIC™ Film. *Kobe J Med Sci*. 2018 Jan 17;63(3):E84-E91.
3. Akasaka H, Mizushina Y, Yoshida K, Ejima Y, Mukumoto N, Wang T, Inubushi S, **Nakayama M**, Wakahara Y, Sasaki R. MGDG extracted from spinach enhances the cytotoxicity of radiation in pancreatic cancer cells. *Radiat Oncol*. 2016 Nov 22;11(1):153. DOI: 10.1186/s13014-016-0729-0
4. **Nakayama M**, Sasaki R, Ogino C, Tanaka T, Morita K, Umetsu M, Ohara S, Tan Z, Nishimura Y, Akasaka H, Sato K, Numako C, Takami S, Kondo A. Titanium peroxide nanoparticles enhanced cytotoxic effects of X-ray irradiation against pancreatic cancer model through reactive oxygen species generation in vitro and in vivo. *Radiat Oncol*. 2016 Jul 7;11(1):91. DOI: 10.1186/s13014-016-0666-y.

[学会発表](計 3 件)

1. Alsayed M, **Nakayama M**, Akasaka H, Salah M, Nakahana M, Mukumoto N, Morita K, Nishimura Y, Ogino C, Sasaki R. A novel radiosensitizing method by titanium peroxide nanoparticles (TiO_xNPs). The 7th Japan-Taiwan Radiation Oncology Symposium, 2019.
2. **Nakayama M**, Akasaka H, Ogino C, Geso M, Sasaki R. Reactive oxygen species generated by titanium peroxide nanoparticles as a radiosensitizer compared to gold nanoparticles. Engineering Physical Sciences in Medicine (EPSM) conference, 2018.
3. 中山雅央、赤坂浩亮、棕本成俊、荻野千秋、西村勇哉、森田健太、佐々木良平. Effectiveness of titanium peroxide nanoparticles as radiosensitizers compared to gold nanoparticles. 日本放射線腫瘍学会 第 30 回学術大会, 2017.

[その他]

神戸大学大学院医学研究科 放射線腫瘍学分野ホームページ：
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/radonc/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：江島 泰生

ローマ字氏名：Ejima Yasuo

所属研究機関名：獨協医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：**70423233**

研究分担者氏名：吉田 賢史

ローマ字氏名：**Ejima Yasuo**

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：特命准教授

研究者番号（8桁）：**80351906**

(2)研究協力者

研究協力者氏名：赤坂 浩亮（神戸大学）

ローマ字氏名：**Akasaka Hiroaki**

研究協力者氏名：森田 健太（神戸大学）

ローマ字氏名：**Morita Kenta**

研究協力者氏名：**Mennaallah Alsayed**（神戸大学）

ローマ字氏名：**Mennaallah Alsayed**

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。