

令和元年6月6日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16442

研究課題名(和文)メタルナノ粒子を導入した幹細胞による新規放射線増感療法の基礎的検討

研究課題名(英文)Radiosensitization by stem cell stherapy using metal nanoparticles

研究代表者

原田 文 (HARADA, AYA)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：50610284

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)：本研究では、過酸化チタンナノ粒子と金ナノ粒子を用いてその放射線増感効果を中心に検討した。Cell-free系では、金ナノ粒子ではヒドロキシラジカルの産生が認められ、過酸化チタンナノ粒子では過酸化水素の発生が認められた。放射線照射によるアポトーシスの誘導は金ナノ粒子では僅かであり、過酸化チタンナノ粒子では増強が認められた。Xenograft腫瘍では腫瘍増殖抑制効果は過酸化チタンナノ粒子でより強く認められた。これらの結果は、過酸化チタンナノ粒子による過酸化水素の発生と放射線照射による過酸化水素の更なる発生に起因すると考えられる。間葉系幹細胞への導入を試みたが、良好な導入は確認出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過酸化チタンナノ粒子は金ナノ粒子と比較して、ROSの産生などの観点から、難治癌に対する治療戦略の中でより有望な候補物質といえる。動物実験では、腫瘍増殖抑制効果が認められたが、今後前臨床試験や臨床試験への移行するためには、ナノ粒子の均一な製造方法や表面修飾方法を更に検討していく必要があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Polyacrylic acid (PAA)-titanium peroxide nanoparticles (PAA-TiO<sub>x</sub>NPs) which were synthesized from commercial TiO<sub>2</sub> nanoparticles and modified with PAA showed a distinct ability to enhance radiation effects in comparison to gold nanoparticles (AuNPs). PAA-TiO<sub>x</sub>NPs showed more tumor growth inhibition after intra-tumoral injection into M1APaCa-2 human pancreatic cancer cells xenografted nude mice combined with by 5 Gy irradiation. PAA-TiO<sub>x</sub>NPs produces its radiosensitizing effects through the production of ROS (reactive oxygen species) mainly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide). Absorption to mesenchymal stem cell were not observed.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：Nanoparticle Radiosensitization Cancer

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

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療においては、照射によって生じるヒドロキシラジカルに代表される各種の活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) が細胞死を導く。しかしながら、難治癌においては還元系分子が強く発現しており、照射で発生したROSを中和し、放射線抵抗性を示す。金ナノ粒子に代表されるメタルナノ粒子は、X線照射によるROSの産生量を増加させる放射線増感剤として、研究が行われてきた。当教室では、さらに強力な放射線増感効果を持つメタルナノ粒子として、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ナノ粒子がX線照射によりヒドロキシラジカルを始めとする大量のROSを発生させることを発見した。さらに、担癌モデルマウスでの癌への直接注入モデルにおいて、過酸化チタンナノ粒子併用のX線照射が非併用の照射と比べて優位に腫瘍を縮小されることを報告している。しかしながら、先述の金ナノ粒子や当教室で開発したチタンナノ粒子を含め、メタルナノ粒子の臨床応用への大きな課題として、ドラッグデリバリーの問題がある。癌細胞は、周囲に繊維芽細胞や血管内皮細胞などからなる癌間質を形成しており、*in vitro* では有効な薬剤も現実には腫瘍細胞への到達が困難である。このドラッグデリバリーの画期的な解決策として、申請者らは間葉系幹細胞の腫瘍ホーミング効果に注目している。間葉系幹細胞は骨髄・脂肪などから容易に採取分離できる幹細胞であり、近年の研究では腫瘍に集積する性質を持つことが報告されている。また、特定の薬剤の存在下で、間葉系幹細胞に各種メタ

ルナノ粒子が取り込まれることも報告され、体内に投与した間葉系幹細胞のトラッキング目的などで、画像診断学の領域などでは研究が盛んに行われている。すなわち、放射線増感剤として大きな効果をもつメタルナノ粒子を、間葉系幹細胞をドラッグデリバリーシステムとして腫瘍に選択的に送り込むことで、難治癌に対する画期的な放射線増感療法となり得ると考えられる。

## 2. 研究の目的

メタルナノ粒子は放射線増感剤として以前より注目され、当教室でも新たなメタルナノ粒子を開発し、特許を取得している (特許2010-032055、PTC/JP2011/53348)。本研究ではメタルナノ粒子の臨床応用への大きな課題であるドラッグデリバリーの問題の画期的な解決策として、メタルナノ粒子を導入した幹細胞による新たな放射線増感療法を提案し、臨床応用に向けた基礎研究を行う。難治癌に対してもメタルナノ粒子が到達すれば強力な放射線増感作用を発揮するが、現実には癌細胞の周囲には豊富な癌間質が存在し、薬剤の到達が困難であり、臨床応用がなされていない。本研究によって、ドラッグデリバリーの問題が解決されれば、種々の難治癌に対する革新的な治療法となり、その医学的・社会的な意義は計り知れない。

## 3. 研究の方法

本研究計画では、メタルナノ粒子を導入した間葉系幹細胞による新規放射線増感療法の臨床応用に向けた基礎研究を行う。研究計画の進め方として、下記の項目に関して評価を行う。

1. メタルナノ粒子の幹細胞への導入。
2. *In vitro* での放射線増感作用の評価。
3. メタルナノ粒子導入幹細胞の*In vivo* での腫瘍ホーミング効果の確認
4. メタルナノ粒子導入幹細胞の*In vivo* での放射線増感作用の評価。
5. 正常組織への影響・毒性の評価

## 4. 研究成果

申請者らは独自に合成した過酸化チタンナノ粒子がX線照射により活性酸素種 (ROS) を生成し、

細胞・動物実験で放射線増感効果が得られることを報告した。そこで本研究では、過酸化チタンナノ粒子と金ナノ粒子を用いてその放射線増感効果を中心に検討した。Cell-free系（ナノ粒子と溶媒のみの系）での、双方のナノ粒子にX線を照射し、ROS特異性を持ついくつかの試薬を用いてROSの定量を行った。金ナノ粒子では放射線照射によるヒドロキシラジカルの産生が認められたが、過酸化水素の発生は過酸化チタンナノ粒子でより多量に認められた。いずれのナノ粒子においてもスーパーオキシドの発生は僅かであった。ナノ粒子の細胞内取り込みと増殖抑制の評価は、ヒト膵臓がん細胞株であるMIAPaCa2細胞を用いて放射線照射と併せて実施した。金ナノ粒子、過酸化チタンナノ粒子では共に細胞内の取り込みは認められたが、放射線照射によるアポトーシスの誘導は金ナノ粒子では僅かであり、過酸化チタンナノ粒子では増強が認められた。コロニーアッセイを用いた細胞増殖抑制効果に関してもアポトーシスの結果と一致して、過酸化チタンナノ粒子でより強く認められた。さらに、双方のナノ粒子をMIAPaCa2を用いたXenograftモデルの腫瘍に対して局注したが、X線照射併用による腫瘍増殖抑制効果は金ナノ粒子に比較して、過酸化チタンナノ粒子でより強く認められた。これらの細胞実験、動物実験の結果は、過酸化チタンナノ粒子による過酸化水素の発生と放射線照射による過酸化水素の更なる発生に起因すると考えられるが、それに反応するようにMIAPaCa2細胞にカタラーゼやグルタチオンなどの抗酸化系酵の誘導が確認出来た。間葉系幹細胞への導入を試みたが、良好な導入は確認出来なかった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計5件)

1. Ishihara T, Yamada K, Harada A, Yukiue H, Tanahashi M, Niwa H, Matsui T, Yokomura K, Ejima Y, Sasaki R. Stereotactic body radiotherapy for second primary lung cancer and intra-parenchymal lung metastasis in patients previously treated with surgery: evaluation of indications and predictors of decreased respiratory function. *Acta Oncol.* 2018 May 3;1-8. doi: 10.1080/0284186X.2018.1468088.
2. 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 Feb 7. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.012.
3. Nakamura M, Nishimura H, Mayahara H, Uezono H, Harada A, Hashimoto N, Ejima Y, Ishihara T, Nishikawa R, Sasaki R. Investigation of the efficacy and safety of CyberKnife hypofractionated stereotactic radiotherapy for brainstem metastases using a new evaluation criterion: 'symptomatic control'. *J Radiat Res.* 2017 Nov 1;58(6):834-839. doi: 10.1093/jrr/rrx042.
4. Nakayama M, Nishimura H, Mayahara H, Nakamura M, Uehara K, Tsudou S, Harada A, Akasaka H, Sasaki R. Clinical log data analysis for assessing the accuracy of the CyberKnife fiducial-free lung tumor tracking system. *Pract Radiat Oncol.* 2018 Mar - Apr;8(2):e63-e70. doi: 10.1016/j.prro.2017.10.014
5. Masaki Nakamura, Hideki Nishimura, Hiroshi Mayahara, Haruka Uezono, Aya Harada, Naoki Hashimoto, Yasuo Ejima, Takeaki Ishihara, Ryo Nishikawa and Sasaki R, Investigation of the efficacy and safety of CyberKnife hypofractionated stereotactic radiotherapy for brainstem metastases using a new evaluation

criterion: 'symptomatic control' Journal of Radiation Research, 2017 Nov 1;58(6):834-839. doi: 10.1093/jrr/rrx042. doi: 10.1093/jrr/rrx042

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 川口弘毅、馬屋原博、西村英輝、原田文、橋本直樹、北谷圭治、岩下和真、上原和之、石原武明、佐々木良平、転移性脳腫瘍に対するサイバーナイフの治療成績及び放射線脳壊死についての検討、日本放射線腫瘍学会第 31 回学術大会、2018.10.11-13、京都
2. 馬屋原博、西村英輝、原田文、橋本直樹、川口弘毅、北谷圭治、岩下和真、上原和之、中山雅央、妹尾悟史、石原武明、佐々木良平、前立腺癌に対する CT ベース画像誘導 IMRT における金マーカーの有無による治療成績の比較、日本放射線腫瘍学会第 31 回学術大会、2018.10.11-13、京都
3. 北谷圭治、馬屋原博、西村英輝、原田文、橋本直樹、岩下和真、石原武明、川口弘毅、妹尾悟史、上原和之、藤井正彦、佐々木良平、食道癌に対する根治的治療として IMRT を含む放射線治療を用いた症例に関する検討、日本放射線腫瘍学会第 31 回学術大会、2018.10.11-13、京都
4. 橋本直樹、馬屋原博、西村英輝、原田文、川口弘毅、北谷圭治、岩下和真、上原和之、妹尾悟史、石原武明、佐々木良平、消化管近接型肝細胞癌に対する定位放射線治療の治療成績、日本放射線腫瘍学会第 31 回学術大会、2018.10.11-13、京都
5. 岩下和真、西村英輝、馬屋原博、原田文、橋本直樹、川口弘毅、北谷圭治、上原和之、石原武明、藤井正彦、佐々木良平、脊椎転移に対する IMRT の治療成績と FDG-PET による局所評価、日本放射線腫瘍学会第 31 回学術大会、2018.10.11-13、京都
6. 川口弘毅、馬屋原博、岩下和真、北谷圭治、橋本直樹、原田文、西村英輝、佐々木良平、孤発性腹部・傍大動脈リンパ節転移に対する根治照射に関する検討、第 32 回高精度放射線外部照射部会学術大会、2019.3.2、東京
7. 川口弘毅、馬屋原博、西村英輝、原田文、橋本直樹、北谷圭治、岩下和真、上原和之、石原武明、佐々木良平、肝細胞癌に対するサイバーナイフによる体幹部定位放射線治療、第 42 回 神戸放射線腫瘍懇話会、2017.9.9、神戸
8. 馬屋原博、西村英輝、原田文、橋本直樹、川口弘毅、石原武明、妹尾悟史、中山雅央、津藤真司、上原和之、佐々木良平、肝細胞癌に対するサイバーナイフの初期成績と前向き臨床試験の準備状況、サイバーナイフ研究会第 11 回学術研究会、2017.3.11
9. 馬屋原博、西村英輝、原田文、橋本直樹、川口弘毅、当院における肝細胞癌に対する定位放射線治療の実際、第 3 回 肝サイバーナイフ治療セミナー、2017.9.3、福岡
10. 馬屋原博、橋本直樹、原田文、西村英輝、川口弘毅、上園玄、石原武明、西川遼、中山雅央、上原和之、佐々木良平、肝細胞癌に対するサイバーナイフによる体幹部定位放射線治療、第 42 回神戸放射線腫瘍懇話会、第 42 回 神戸放射線腫瘍懇話会、2017.9.9、神戸
11. 馬屋原博、原田文、西村英輝、橋本直樹、上園玄、川口弘毅、石原武明、西川遼、中山雅央、上原和之、佐々木良平、藤井正彦、胃癌切除術後の孤発性腹部リンパ節再発に対する強度変調放射線治療の初期経験、日本放射線腫瘍学会第 30 回学術大会、2017.11.17-19、大阪
12. 馬屋原博、西村英輝、原田文、橋本直樹、川口弘毅、上園玄、石原武明、中山雅央、上

- 原和之、佐々木良平、藤井正彦、1 期非小細胞肺癌に対するサイバーナイフの局所制御を予測する因子解析、日本放射線腫瘍学会第 30 回学術大会、2017.11.17-19、大阪
13. 川口 弘毅、西村 英輝、馬屋原 博、原田 文、橋本 直樹、宮脇 大輔、上園 玄、石原 武明、藤井 正彦、佐々木 良平、リンパ節転移に対する放射線治療の治療効果判定における PET-CT についての検討、日本放射線腫瘍学会第 30 回学術大会、2017.11.17-19、大阪

〔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：

国内外の別：

取得状況 (計 件)

〔その他〕

ホームページ等：特記事項無し

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。