

平成 28 年 10 月 14 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350543

研究課題名(和文)水溶性フラーレン誘導体の腫瘍ターゲティングを利用した新規がん音響化学療法の開発

研究課題名(英文)Sonodynamically Induced Anticancer Targetting by Functionalized fullerenes

研究代表者

弓田 長彦 (Yumita, Nagahiko)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40191481

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、外部エネルギーである超音波と音響化学的に抗腫瘍活性化する水溶性の機能性フラーレン誘導体を組み合わせた新たな腫瘍ターゲティングシステムの開発を行うことを目的とした。超音波単独、または水酸化フラーレンとの併用による単離または固形腫瘍細胞に対する抗腫瘍作用の増強を確認した。さらに、活性酸素種除去剤添加の殺細胞作用に対する影響を検討したところ、一重項酸素の除去剤であるヒスチジンの添加が、超音波と水酸化フラーレン併用処置の殺細胞効果を著しく抑制することを認め、その作用機序における一重項酸素の関与を推定した。また、抗腫瘍効果におけるアポトーシスの寄与も確認した。

研究成果の概要(英文)：Functionalized fullerenes, such as polyhydroxy fullerenes (PHF), have attracted particular attention due to their water solubility and their potential application to tumor imaging and therapy as carbon nanomaterials. In this study, the sonodynamically induced antitumor effect of PHF was investigated. Both in vitro and in vivo antitumor effects were tested in combination with ultrasound at 2 MHz. The rate of ultrasonically induced damage on isolated sarcoma 180 cells in air-saturated suspension was enhanced by twice with 80 micro M PHF. This enhancement was significantly inhibited by histidine, which may suggest it was mediated by ultrasonically induced oxidation. The coadministration of 25 mg/kg PHF followed by ultrasonic exposure at 2 MHz suppressed the growth of implanted colon 26 tumors at an intensity with which ultrasound alone showed only a slight antitumor effect. The induction of apoptosis is observed after the combination treatment of PHF with ultrasound.

研究分野：医用工学

キーワード：音響化学療法 水溶性フラーレン 腫瘍ターゲティング ナノ粒子 超音波 一重項酸素 アポトーシス 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

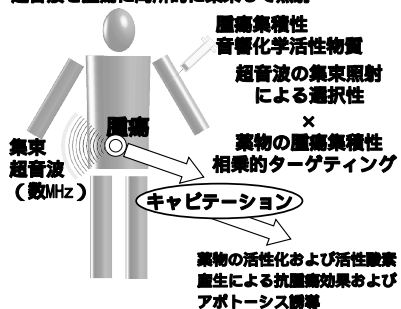
がん治療において、薬物粒子を高分子などの皮膜で被覆した微粒子、リポソーム、高分子ミセル、高分子カプセルなどの薬物送達法 (DDS) が提案されている。一方で、目的とする場所に薬物が分布・結合する前に貪食されることや血中のアルブミン吸着が誘引となる内包薬物の漏れ、またはこれら薬物の徐放性の制御や細胞内導入の難しさが、薬物のがん細胞への選択的ターゲティングを困難にする課題として残されている。これらの解決には、新たなキャリアの素材の開発とともに、他分野の要素技術を応用した新たな治療方法の開発が必要と考えられる。例えば、外部エネルギーを用いた治療システムを DDS と融合することにより、薬物の放出性やがん組織における濃度の向上、細胞内への薬物導入の促進が期待される。

2. 研究の目的

超音波は生体において深達性に優れ、集束して局所的に照射ができるため外部エネルギーとして用いれば、生体深部にある患部にもピンポイントで適用することができる。さらに、超音波の音圧に感応して周波数特異的に共振するナノ微粒子でがん組織を標的化すると、ナノ微粒子が目的部位に集積したかどうかを超音波画像診断によって可視化し確認できる。そして、図1に示すように薬物の集積を確認した上で、超音波を照射し、ナノ粒子を音響化学的に活性化させることで、選択的に抗腫瘍効果を発現することができる。そこで、本研究では、DDS 単独の技術的な限界を克服することを目的に、遠隔作用力を持つ外部エネルギーである超音波と音響化学的に抗腫瘍活性化するナノ粒子である水溶性フラレン誘導体を組み合わせた新たな治療システムの開発を行うことを目的とする。

図1 音響化学療法概念

投与した薬物が腫瘍内で最高濃度に達したときに超音波を腫瘍に局所的に集束して照射



3. 研究の方法

本研究では、血管壁を漏出し腫瘍組織に到達可能で、超音波照射により抗腫瘍作用を発現するナノ粒子として水溶性フラレン誘導体を用いた腫瘍組織選択的がん音響化学療法の開発を目指した。最初に、超音波単独、または微粒子との併用による抗腫瘍効果を、培養細胞で確認した。超音波と併用すること

により殺細胞効果が発現、または増強される微粒子のスクリーニングを行った。殺細胞効果は、細胞膜の色素透過能に基づくトリパンブルー排除法によって判定した。次に colon26 腫瘍を移植した動物に、これらの微粒子を投与し、微粒子が腫瘍組織において治療効果が得られる濃度に達した時点で患部に超音波照射を行い微粒子の音響化学的活性化による抗腫瘍効果の発現を確認した。最後に、これら微粒子の音響化学活性化機序における活性酸素種の関与および、細胞死におけるアポトーシス誘導の寄与を調べた。

4. 研究成果

最初に、超音波単独、または微粒子との併用による抗腫瘍効果を、sarcoma 180 細胞を用い細胞膜の色素透過能に基づくトリパンブルー染色法によって確認したところ単独では細胞毒性が発現しなかったのに対し超音波と水溶性フラレン誘導体併用処置が有意な細胞毒性を示した (図2)。

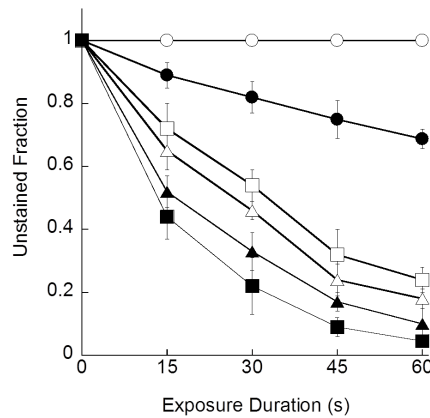


図2 In vitro effect of PHF and/or ultrasound on isolated sarcoma 180 cells. ○, PHF alone; □, ultrasound alone; △, 20 μM PHF + ultrasound; ▲, 40 μM PHF + ultrasound; ■, 80 μM PHF + ultrasound. Each point and vertical bar represent the mean ± SD of four insonation experiments.

このことにより水溶性フラレン誘導体が超音波により活性化し細胞毒性を発現していることが示された。さらにヒスチジン、トリプトファンなどの活性酸素消去剤の添加によりその細胞毒性は有意に低下したことから細胞毒性における活性酸素の関与が示された。

次に colon26 固形腫瘍を移植した動物に、水溶性フラレン誘導体 25 mg/kg を投与し、十分に薬剤が患部に到達すると想定される時間に薬物の活性化治療に適した超音波を照射した。単独は抗腫瘍効果を示さなかったのに対し超音波と水溶性フラレン誘導体併用処置が有意な増殖抑制を示した。このことにより水溶性フラレン誘導体が超音波により活性化し細胞毒性を発現していることが示された。抗また処置後の腫瘍に HE 染色を行ったところ、腫瘍組織に細胞の壊死が観察されたこれらの結果から固形腫瘍にお

いても水溶性フラレン誘導体を超音波により活性化し抗腫瘍効果を発揮できることが示された。

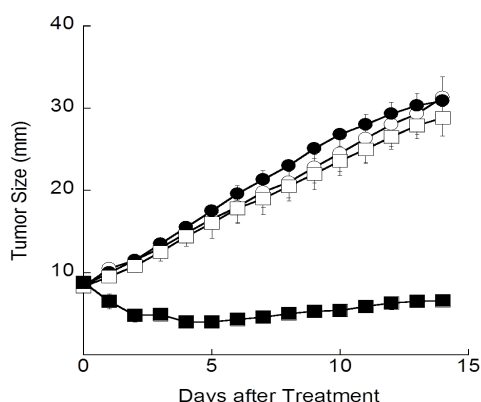


図 3 Effect of PHF and/or ultrasound on growth of colon26 solid tumor. ●, Control; □, PHF alone; △, ultrasound alone; ■, PHF + ultrasound. Each point and vertical bar represent the mean ± SD of four mice.

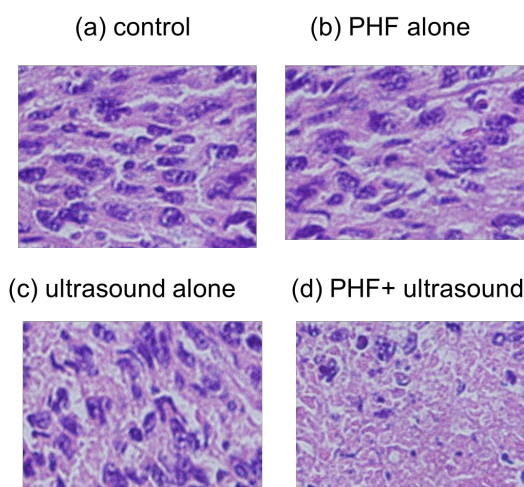


図 4 Effect of ultrasound and/or PHF on colon 26 carcinoma. Histologic sections (x 400) of the tumors are compared for (a) control, (b) PHF alone, (c) ultrasound alone, and (d) PHF+ ultrasound.

電子スピン共鳴(ESR)で水溶性フラレン誘導体水溶液に超音波を照射したときの、一重項酸素などの活性酸素種の産生を測定した。

さらに活性酸素種に特異的な活性酸素スカベンジャ-添加による阻害効果により一重項酸素寄与を確認した。

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4件)

- 1 . Iwase Y, Nishi N, Fujimori J, Fukai T, Yumita N, Ikeda T, Chen F, Momose Y,

Umemura S Antitumor effect of sonodynamically activated pyrrolidine tris-acid fullerene Japanese Journal of Applied Physics 54, 07HD05 (2015).

- 2 . 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, Japanese Journal of Applied Physics 54, 07HF16 (2015).
- 3 . Yumita N, Iwase Y, Watanabe T, Nishi K, Kuwahara H, Shigeyama M, Sadamoto K, Ikeda T and Umemura S, Involvement of Reactive Oxygen Species in the Enhancement of Membrane Lipid Peroxidation by Sonodynamic Therapy with Functionalized Fullerenes Anticancer Res. 35:6481-7 2014
- 4 . Yumita N, Iwase Y, Imaizumi T, Sakurazawa A, Kaya Y, Nishi K, Ikeda T, Umemura S, Chen F, Momose Y Sonodynamically Induced Anticancer Effects by Functionalized fullerenes. Anticancer Res. 33, 700-6, 2013

[学会発表](計3件)

- 1 . Yumiko Iwase, Nagahiko Yumita, Kiyomi Sadamoto, Koji Nishi, Shin-ichiro Umemura Photodynamically Induced Apoptosis by Enoxacin in Ultraviolet A Exposed HL-60 Cells The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, Aichi, 2015.10.8. ~ 2015.10.10.
- 2 . 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-acid fullerene The 36th Symposium on UltraSonic Electronics (USE2015), Tukuba, Ibaraki, 2015. 11. 5. -2015. 11. 7.
- 3 . Nagahiko Yumita, Sonodynamically induced apoptosis, necrosis, and active oxygen generation by functionalized fullerenes. The Society for Redox Biology and Medicine's (SFRBM's) 22nd Annual Meeting 2015, Westin Boston, Waterfront, Boston, Massachusetts, USA
- 4 . Nagahiko Yumita , Yumiko Iwase , Junya Fujimori, Toshihiko Ikeda SONODYNAMICALLY INDUCED ANTICANCER EFFECTS BY FUNCTIONALIZED FULLERENES the 75th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2015

Düsseldorf, Germany, 29 September – 3
October 2015.

〔図書〕(計1件)

池田敏彦、弓田長彦、奥平和穂、西弘二、岩
瀬由未子、佐古兼一
基礎からの薬物動態学、みみずく舎 (2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弓田 長彦 (YUMITA Nagahiko)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40191481

(2) 研究分担者

岩瀬 由未子 (IWASE Yumiko)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00521882

梅村 晋一郎 (UMEMURA Shin-ichiro)

東北大学・工学部・教授

研究者番号：20402787