

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670535

研究課題名(和文) ナノ粒子化したチタン酸化物を用いた新規放射線増感療法

研究課題名(英文) A Novel strategy of radiosensitization using titan peroxide nanoparticles

研究代表者

佐々木 良平 (SASAKI, RYOHEI)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30346267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化チタンナノ粒子は細胞実験系、動物実験系の双方の実験系において、X線照射により過酸化水素を中心とするROSを過剰に生成し、DNA損傷を介した有意な抗腫瘍効果を発揮することを見出した。今後は、本併用療法の長期の毒性の有無の評価や、更なる治療効果や分子メカニズムの検討が必要であるが、本研究の成果により独自に開発した金属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。

研究成果の概要(英文)：The tumor growth inhibitory effects of PAA-TiO<sub>x</sub> nanoparticles combined with X-ray irradiation was observed in vitro and in vivo experiments. The effect was induced by ROS generation followed by DNA damages in cancer cells. Evaluations of long-term toxicity and of molecular mechanisms need to be performed in the nearest future. This strategy might be a novel radiosensitization method using metal nanoparticles

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線増感 ナノ粒子

### 1. 研究開始当初の背景

難治癌では、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発想のみでは腫瘍を治癒に導くことが難しい。放射線療法はラジカル(酸化系)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いるため、放射線照射の間接効果の主役であるヒドロキシラジカルを瞬時に消去してしまうことに原因がある。放射線療法の治療効果比は、これらの酸化・還元系(レドックス)のバランスによって既定されるが、新たな放射線増感療法の開発には、この酸化系を増強するか、還元系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。

申請者らはこれまでに医工連携共同研究の中で、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、ROSの生成量の飛躍的に増加させる物質を網羅的に探索してきた。その中で、二酸化チタンを原材料にした過酸化チタンを独自の手法により50ナノメートルにナノ粒子化することにより、X線照射により数十倍以上の大量のヒドロキシラジカルを生成することを発見した。試験的に実施したヒト膵臓がん担癌ヌードマウスを用いたin vivo実験において、この過酸化チタンナノ粒子とX線照射を併用した群では、既にX線照射単独群に比べて著明な抗腫瘍効果を増強させることを確認した。

### 2. 研究の目的

我々は、ナノ粒子化したチタン酸化物が、X線照射によって大量のヒドロキシラジカルを発生することを発見し、国際調査を行った上で、新たな放射線増感剤として米国、欧州、中国等、世界5か国以上で国際特許(特許2010-032055、PCT/JP2011/53348)を申請し

ている。本研究では、この成果の臨床応用を目的とし、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。具体的には、Cell-free system(無機物質:ナノ粒子のみの環境)でのヒドロキシラジカル等のReactive Oxygen Species(ROS)生成メカニズムの解明。細胞実験(有機物質環境下)での抗腫瘍効果とROS動態に関する酸化還元システムの解明。ヒト癌細胞をヌードマウスに移植したin vivo環境での放射線増感とチタン酸化物ナノ粒子の毒性評価、がん細胞を特異的に認識するIn vivo tumor targetingを実現する生体分子修飾ナノ粒子の開発の4項目である。

### 3. 研究の方法

本研究計画は、過酸化チタンナノ粒子による放射線増感効果の有効性を明らかにするため、細胞および動物実験による放射線増感効果の評価を行うとともに、動物実験による毒性評価、がん細胞に特異的な生体分子修飾ナノ粒子の開発、ROS生成メカニズムの解明を行う。

細胞および動物実験による放射線増感効果の評価(担当:佐々木、中山)

過酸化チタンナノ粒子の放射線との併用による放射線増感効果の有効性を明らかにする。さらにこれまでの実験から、X線照射線量が同じ場合、過酸化チタンナノ粒子のヒドロキシラジカル生成量は粒子濃度に依存することがわかっているため、最適な粒子濃度に関しても決定する。

細胞実験では、主要ながん細胞の殺細胞効果を評価することによりナノ粒子・放射線の併用効果を評価する。また、電子顕微鏡下で細胞内でのナノ粒子の局在の確認、ヒドロキシラジカルプローブ試薬を用いた細胞内でのヒドロキシラジカル生成の評価も行う。これらの実験に必要ながん細胞の培養環境、放

射線装置、顕微鏡、フローサイトメーターなどの測定機器は神戸大学医学研究科および工学研究科に備わっており、問題なく実施可能である。一方、動物実験では、主要ながん細胞を皮下移植した担癌マウスモデルを作製し、ナノ粒子・放射線の併用による抗腫瘍効果を評価する。ナノ粒子の投与方法に関しては、腫瘍局注および尾静脈投与で検討する。観察期間は処置後約2ヶ月とする。また、処置後早期の腫瘍組織の免疫染色により、細胞のアポトーシス、ROS抑制物質であるカタラーゼやSOD(活性酸素消去酵素)、DNA-活性酸素結合体である8-OHdG等の発現を調べる。動物実験および管理は、神戸大学医学研究科附属の動物実験施設で行う。

動物実験による毒性評価(担当:佐々木、中山)

臨床応用へ展開するために過酸化チタンナノ粒子の投与による毒性を明らかにする必要がある。本項目では、担癌マウスおよび通常のマウスを用いてナノ粒子を腫瘍局注または尾静脈投与後、一定期間の観察を行い急性期および晩期有害事象、生存率を評価する。観察期間後に主要臓器(肺・肝・腎・心)を摘出し、肉眼的および組織学的に調べる。また、マウスから採血を行い、生化学検査を実施する。これらの評価はナノ粒子の濃度および投与量を変化させて行い、死亡例が出た場合は、上記の方法でその死因を解明する。神戸大学医学研究科附属の動物実験施設で行う。

がん細胞に特異的な生体分子修飾ナノ粒子の開発(担当:荻野)

本項目では、過酸化チタンナノ粒子表面にがん細胞を特異的に選択する生体分子の修飾を行う。低分子抗体をナノ粒子へ遺伝的に融合することで、高密度・高配向に抗体の結合サイトが提示された機能性タンパク質キャリアーをワンポットで細胞発現調製するプロセスを開発する。まず、主要ながん組織

細胞の表面に過剰に発現している上皮増殖因子受容体(EGFR)に特異性を示す抗体分子を用いてナノ粒子に最適な低分子抗体の構造設計を行う。具体的には、抗EGFR抗体としては、可変領域がヘテロ二量体であるヒト由来抗体分子以外に、ヒトと配列が非常に類似しており可変領域が単量体であるラクダ由来抗体分子が報告されている。そこで、それら分子から結合機能ドメインからなる低分子抗体をナノ粒子表面へ提示されるように遺伝的に組換えタンパク質を設計し、機能評価を行う。またその際に、ナノ粒子と低分子抗体を連結するペプチドリンカー配列については、分子進化学を利用して最適な長さ・構造をとるようにデザインする。作製された修飾ナノ粒子に対して、ROS生成量、放射線増感効果、および毒性を評価する。

ROS生成メカニズムの解明(担当:沼子、佐藤)

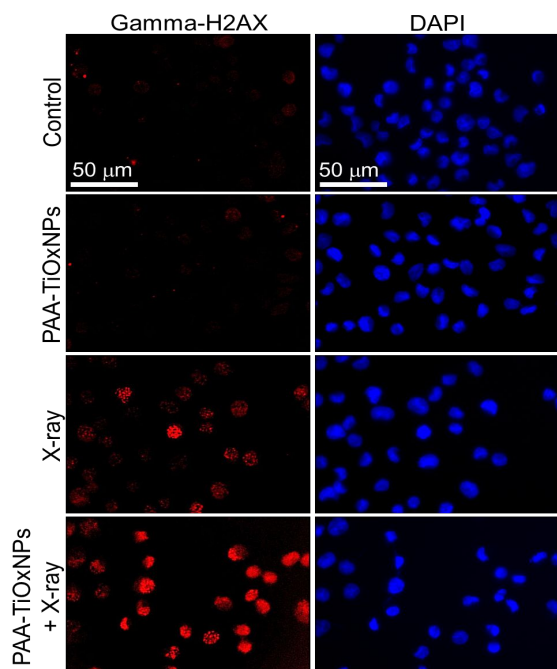
研究分担者の沼子・佐藤は、これまでシンクロトロン放射光を利用したX線分光法や蛍光X線分析により、金属元素に対する非破壊状態分析を行ってきた。これらの実績を踏まえ本研究では、放射線照射した過酸化チタンナノ粒子がヒドロキシラジカルを生成しているその場での非破壊状態分析を行い、過酸化チタンナノ粒子の局所構造、電子状態、および表面構造を明らかにする。

方法としてXAFS分析法を用いて、蛍光モードでのバルク測定および転換電子収量法の測定を行い、X線照射の前後での過酸化チタンナノ粒子の内部構造、表面状態を調べる。また、照射するX線の線量を変化させたときの過酸化チタンナノ粒子のESRスペクトルを測定することにより、X線照射線量とラジカル生成量の関連を調べる。

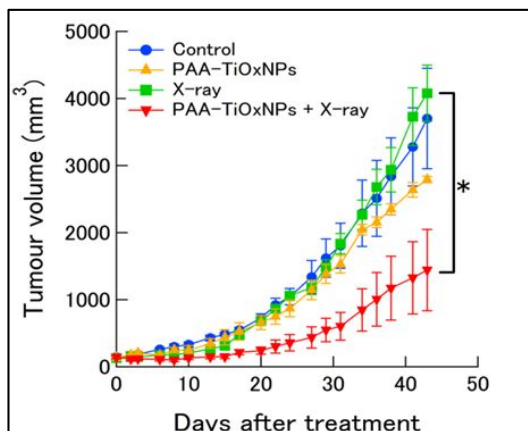
#### 4. 研究成果

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

ヒト膀胱がん細胞株 Miyapaka-2 を用いて細胞核内の H2AX foci を定量評価した所、X 線照射単独群と比べて PAA-TiOx ナノ粒子と X 線照射併用群では Foci を多く認める細胞の割合が高かった(下図)。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。これらの結果が in vitro の実験系において PAA-TiOx ナノ粒子は X 線照射による放射線増感誘導する多くの ROS を生成し細胞死に繋がっていると考えられる。



また、担癌マウスを用いた観察において(43日間)、PAA-TiOx 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。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(下図)。



腫瘍組織の評価において、HE 染色像では腫瘍組織内にナノ粒子が散在して分布していることが確認できた。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。これらの結果から PAA-TiOx ナノ粒子は X 線照射との併用により、in vivo 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。

#### 動物実験による毒性評価

担癌マウスの治療後の経過観察期間中、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。

#### 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。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 TiOxNPs では最大 8.5 倍の増加がみられた。PAA-TiOx では PAA 修飾により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。

#### 細胞内での ROS 評価

TEM での観察により細胞内に PAA-TiOx ナノ粒子が存在することを確認した。FACS を用いた測定により PAA-TiOx ナノ粒子併用の X 線照射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。

以上の結果から PAA-TiOx ナノ粒子は X 線照射により ROS を過剰に生成し抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。今後長期の毒性評価や更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7件)

1. Suenaga Y, Kitajima K, Ishihara T, Sasaki R, Otsuki N, Nibu KI, Minamikawa T, Kiyota N, Sugimura K. FDG-PET/contrast-enhanced CT as a post-treatment tool in head and neck squamous cell carcinoma: comparison with FDG-PET/non-contrast-enhanced CT and contrast-enhanced CT. *Eur Radiol.* 2016 Apr;26(4):1018-30. doi: 10.1007/s00330-015-3902-1.
2. Suenaga Y, Kitajima K, Kanda T, Otsuki N, Nibu KI, Sasaki R, Itoh T, Sugimura K. [(18)F]-FDG PET/CT imaging for detection of nodal metastases in patients with squamous cell carcinoma of the pharynx and larynx: comparison with CT. *Jpn J Radiol.* 2016 Mar;34(3):203-10. doi: 10.1007/s11604-015-0510-6.
3. Shinomiya H, Hasegawa S, Yamashita D, Ejima Y, Kenji Y, Otsuki N, Kiyota N, Sakakibara S, Nomura T, Hashikawa K, Kohmura E, Sasaki R, Nibu KI. Concomitant chemoradiotherapy for advanced squamous cell carcinoma of temporal bone. *Head Neck.* 2016 Apr;38 Suppl 1:E949-53. doi: 10.1002/hed.24133. Epub 2015 Jul 18.
4. Fujii O, Demizu Y, Hashimoto N, Takagi M, Terashima K, Mima M, Jin D, Nagano F, Katsui K, Okimoto T, Iwata H, Niwa Y, Yamashita T, Akagi T, Daimon T, Sasaki R, Hishikawa Y, Abe M, Murakami M, Fuwa N. Particle therapy for clinically diagnosed stage I lung cancer: comparison with pathologically proven non-small cell lung cancer. *Acta Oncol.* 2015 Mar; 54(3):315-21. doi: 10.3109/0284186X.2014.974828.
5. Ejima Y, Matsuo Y, Sasaki R. The current status and future of radiotherapy for spinal bone metastases. *J Orthop Sci.* 2015 Jul;20(4):585-92. doi: 10.1007/s00776-015-0720-x.
6. Yoshida K, Jastaniyah N, Sturdza A, Lindegaard J, Segedin B, Mahantshetty U, Rai B, Jürgenliemk-Schulz I, Haie-Meder C, Sasaki R, Pötter R. Assessment of Parametrial Response by Growth Pattern in Patients With International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage IIB and IIIB Cervical Cancer: Analysis of Patients From a Prospective, Multicenter Trial (EMBRACE). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015 Nov 15;93(4):788-96. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.08.007.
7. Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Satoh N, Kyotani K, Mizowaki T, Imahori T, Ejima Y, Masui K, Gini B, Yang H, Hosoda K, Sasaki R, Mischel PS, Kohmura E. Compensatory glutamine metabolism promotes glioblastoma resistance to mTOR inhibitor treatment. *J Clin Invest.* 2015 Apr 1;125(4):1591-602. doi: 10.1172/JCI78239

〔学会発表〕(計3件)

1. 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, Kyoto International Conference Center (Kyoto), Japan, 2015 May 25-29.

2. Hiroaki Akasaka, Yasuo Ejima, Kenji Yoshida, Daisuke Miyawaki, Takeaki Ishihara, Yoshiyuki Mizushina and Ryohei Sasaki, 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto International Conference Center (Kyoto), Japan, 2015 May 25-29.
3. 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, Philadelphia(USA), 2015 April 18-22

〔図書〕(計1件)

1. Non-woven Fabrics (ISBN 978-953-51-2271-5) Book edited by: Prof. Han-Yong Jeon, Medical Application of Nonwoven Fabrics: Intra-abdominal Spacers for Particle Therapy. Ryohei Sasaki, Hiroaki Akasaka, Yusuke Demizu, Sachiko Inubushi, Tianyuan Wang, Takumi Fukumoto. INTECH, 2016, 315( 205-214 ). DOI: 10.5772/61787.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

佐々木 良平 (SASAKI, Ryohei)  
神戸大学・医学部附属病院・特命教授  
研究者番号：30346267

### (2)研究分担者

1. 荻野 千秋 (OGINO, Chiaki)  
神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・  
准教授  
研究者番号：00313693
2. 佐藤 和好 (SATO, Kazuyoshi)  
群馬大学・その他(部局等)・助教  
研究者番号：40437299
3. 沼子 千弥 (NUMAKO, Chiya)  
千葉大学・理学(系)研究科(研究院)・  
准教授  
研究者番号：80284280
4. 中山 雅央 (NAKAYAMA, Masao)  
神戸大学・医学(系)研究科(研究院)  
・研究員  
研究者番号：60582004
5. 赤坂 浩亮 (AKASAKA, Hiroaki)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20707161

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：