

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20574

研究課題名(和文) 口腔癌におけるチタンナノ粒子の有効性に関する研究

研究課題名(英文) Study on the efficacy of titanium nanoparticles in oral cancer

研究代表者

筧 康正 (KAKEI, YASUMASA)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：70772896

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)：臓器へのダメージを軽減しつつ、放射線の抗腫瘍効果を高めることは、口腔悪性腫瘍に対する放射線治療の重要な課題である。有望な放射線増感剤の一つが金ナノ粒子である。本研究では、金ナノ粒子が口腔がん細胞へのX線照射効果を増強する可能性があるかどうかを調べることを目的とした。結論として、AuNPとX線照射の併用は、アポトーシスの誘導を介してin vitroでヒト口腔癌細胞に対する細胞毒性効果を高めたが、細胞増殖の阻害は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金ナノ粒子併用の放射線療法は、放射線抵抗性を示す難治性の口腔癌患者に対する新たな治療法として期待される。またナノ粒子表面に口腔癌でも分子標的薬として臨床応用されている抗EGFR抗体などの生体分子を修飾することでより強い口腔癌細胞に対するターゲティング機能を付与することが可能になると共に、これまでにないin vivoナノイメージングへの展開も期待される。

研究成果の概要(英文)：Enhancing the antitumor effect of radiation while reducing organ damage is an important challenge of radiotherapy for oral malignancies. One of the promising radiosensitizers is gold nanoparticles. The aim of this study was to investigate whether gold nanoparticles could enhance the effect of X-ray irradiation on oral cancer cells. In conclusion, the combination of AuNP and x-ray irradiation enhanced the cytotoxic effect on human oral cancer cells in vitro via induction of apoptosis, but did not inhibit cell proliferation.

研究分野：口腔癌

キーワード：放射線増感剤 ナノ粒子 口腔癌 扁平上皮癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌において、放射線治療は、腫瘍の根絶を目指す根治治療から、術前に腫瘍の縮小や不活化を図る術前治療、術後に腫瘍の再発を防ぐ術後療法、腫瘍の根治は望まないが症状の緩和や QOL 改善を目的とする緩和的・姑息的治療とがある。特に口腔は治療による臓器温存が非常に重要な領域であり、口腔癌に対する放射線治療の汎用性は極めて高いのは言うまでもない。

現在放射線治療の主流となっている低 LET 放射線を用いた治療法は、人体中の水と放射線が相互作用をおこし、ヒドロキシラジカルやスーパーオキシドといった活性酸素種を発生させ、DNA の損傷を促すものである。しかし放射線抵抗性の癌では細胞自体が放射線照射による細胞障害に対し、既に防御機構を獲得しており既存の発想では腫瘍を治癒に導くことは難しい。その理由として、抵抗性腫瘍では放射線療法により局所で発生したラジカルに対してカタラーゼやグルタチオンといった還元系分子が過剰に発現しているため、放射線照射効果の主体であるヒドロキシラジカルが消去されてしまうことに起因すると考えられている。

近年、放射線治療効果を高める方法の一つに放射線治療増感剤として金ナノ粒子を始めとしたメタルナノ粒子が注目を浴びている。ナノ粒子を体内に入れる際、粒子径を 100nm 以下にすると体循環中へと肝臓の細網内皮系に捕捉されずに循環することが可能である。正常組織に比べ血管透過性が著しく亢進している腫瘍組織内の微小脈管網における Enhanced permeability and retention (EPR) effect により、腫瘍近傍へのナノ粒子の蓄積があるとも考えられている。金ナノ粒子は金原子がクラスター状に形成されたもので、X 線照射による相互作用がキレート剤のように一様に原子が分布している状態よりも多く起こる。表面修飾が容易で腫瘍細胞へ特異的に集積させることが可能であり、また金自体が人体に無害であることから増感剤として期待されている。

2. 研究の目的

近年、新しい放射線増感物質としての臨床応用や in vivo イメージングへの応用について各領域でナノ粒子研究が盛んに行われている。ナノ粒子化した金が X 線照射によって増感効果があるかどうかを検討するため、口腔癌細胞株に対して金ナノ粒子による放射線増感効果の有効性の評価を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

金ナノ粒子と X 線照射を行った。細胞は、35 × 10mm ポリスチレン組織培養皿内のマイクロカバ-ガラススリップ上の 2ml DMEM 中で 1 × 10⁵ 細胞/ml の密度で増殖させた。37 °C で 24 時間培養した後、AuNP をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈し、異なる濃度 [0 nM、0.1 nM (3.9 × 10⁻⁵ μg)、0.4 nM (1.6 × 10⁻⁴ μg)、1.0 nM (3.9 × 10⁻⁴ μg)、10.0 nM (3.9 × 10⁻³ μg)] の AuNP を各ディッシュに添加した。細胞の増殖とアポトーシスを評価するためのアッセイは、細胞と AuNP を 48 時間 (37 °C) インキュベートした後に行った。

未処理細胞では、MBR-1505R2 X 線発生装置 (日立、東京、日本) を用いて、以下の条件で X 線照射を行った。150 kV、4 mA、1 mm アルミニウムフィルター、室温で。細胞には固定の X 線照射量 (2、4 または 8Gy) を照射した。実験は X 線照射の 48 時間後に 37 °C でインキュベートして行った。

AuNP の効果をさらに評価するために、1.0 nM の濃度の DMEM と AuNP を細胞に添加し、細胞を直ちに X 線照射した。細胞を 37 °C で 48 時間インキュベートした後、実験を行った。

細胞の計数を行った。48 時間後処理 (AuNPs 添加または X 線照射) の時点で、細胞を PBS で洗浄し、PBS 中の 1%ホルムアルデヒドで 10 分間室温で固定した。固定した細胞を PBS 中の 0.2% Triton X-100 で室温で 5 分間透過させ、PBS で洗浄した。細胞を PBS 中の 1%ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) で室温で 30 分間ブロックした後、4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI; Thermo Fisher Scientific, Inc. PBS で洗浄した後、検体を FluorSave™ (Calbiochem; EMD Millipore, Billerica, MA, USA) に埋め込んだ。画像の取得は、BZ-X 700 蛍光顕微鏡 (キーエンス株式会社、大阪、日本) を用いて行った。総細胞数は、ランダムに選択された 5 つの独立した顕微鏡画像 (倍率、× 40) 中の DAPI 陽性核の数を数えることにより算出した。結果は、3 つの独立した実験の代表であった。細胞生存率の決定。X 線照射および AuNP の成長抑制効果を評価した。生存可能な細胞の数は、製造業者の指示に従って、セル・カウンティング・キット-8 (CCK-8; Dojindo Molecular Technology, Inc., 熊本, 日本) を用いて細胞代謝活性を測定することによって決定した。完全培地中の 5 × 10³ 個の細胞を 96 ウェルプレート (100 μl/ウェル) に 37 °C で懸濁した。細胞増殖の 24 時間後、記載された濃度のナノ粒子溶液を各ウェルに添加した。48 時間のインキュベーション後、細胞を X 線に曝露した。X 線照射 48 時間後に CCK-8 溶液 (10 μl) を細胞に添加した。プレートを室温で 1~4 時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm で吸光度を測定した。アポトーシスの測定 アポトーシス細胞を検出するために、In Situ Apoptosis Detection kit (タカラバイオ株式会社、大津市) を用いた末端デオキシヌクレオチ

ジルトランスフェラーゼ (TdT) 介在性ニックエンド標識 (TUNEL) アッセイを行い、DNA 断片化により生成した 3'-OH DNA 末端を標識した (11)。細胞を 4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液 (pH7.4) で室温で 30 分間固定し、PBS で洗浄した。内因性ペルオキシダーゼを、0.3%過酸化水素を含むメタノールを用いて、室温で 30 分間不活化した。氷上の細胞に合計 100 μ l の透過性緩衝液を 5 分間添加し、標識反応混合物の透過を促進した後、PBS で洗浄した。その後、50 μ l の標識反応混合物 [TdT 酵素 (5 μ l) と標識安全緩衝液 (45 μ l) からなる] をスライド上の細胞に添加し、室温で 1.5 時間インキュベートした後、PBS で洗浄した。検体を FluorSave™ に埋め込み、蛍光顕微鏡で観察した。アポトーシス細胞の数を総細胞数で割ってパーセンテージで表した。TUNEL 陽性のアポトーシス細胞および総細胞数を計測するために使用した方法は、上記の細胞数測定と同様の方法で行った。

4. 研究成果

最初に X 線処理を行わない 4 つの濃度の 5nm AuNP の効果を HSC-3 細胞において評価した。コントロール細胞と 0.1、0.4、1.0 または 10.0nM AuNP で処理した細胞との間には、総細胞数に有意な差は認められなかった。

対照的に、X 線照射のみでは、対照細胞と比較して、明らかに用量依存的に総細胞数が減少した (2Gy、 $P=0.869$; 4Gy、 $P=2.19 \times 10^{-4}$; 8Gy、 $P=1.28 \times 10^{-6}$)。

線量依存性は、被曝群間で有意な差を示した (2 対 4Gy、 $P=0.00342$ 、2 対 8Gy、 $P=1.28 \times 10^{-6}$ 、4 対 8Gy、 $P=5.60 \times 10^{-6}$)。

この結果から、細胞毒性を有する最小の放射線量は 4Gy であることが示唆された。さらに、分子遮断が放射線感受性を高めるかどうかを解析した先行研究でも、4Gy が適用されていた。

そのため、その後の実験では 4Gy の放射線量を選択した。その結果、1.0nM AuNP と 4Gy 照射の組み合わせは、4Gy 照射のみの場合と比較して、総細胞数を有意に減少させた ($P=2.95 \times 10^{-4}$)。DAPI による免疫蛍光染色の結果では、コントロール処置と AuNP の投与との間に明らかな差はなかったが、細胞核数は照射に伴って減少するように見えた。X 線照射と AuNPs の組み合わせによる総細胞数の有意な減少の根本的な原因を調査するために、増殖およびアポトーシスアッセイを実施した。細胞増殖は、1.0nM AuNPs 単独での処理では影響を受けなかった。さらに、4Gy 照射単独および X 線照射と AuNPs の組み合わせでも、HSC-3 細胞の細胞増殖に影響を与えなかった。

対照的に、TUNEL アッセイにおいて 1.0nM AuNPs と 4Gy X 線照射の組み合わせは、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞は、4Gy 照射単独のみの場合と比較して、有意に増加していた。

結論として、AuNP と X 線照射を組み合わせることで、in vitro でのヒト口腔癌細胞に対する細胞毒性効果は、アポトーシスの誘導を介して増強されたが、細胞増殖の抑制はされなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 SHUN TERAOKA ¹ , YASUMASA KAKEI ¹ , MASAYA AKASHI ¹ , EIJI IWATA ¹ , TAKUMI HASEGAWA ¹ , DAISUKE MIYAWAKI ² , RYOHEI SASAKI ² and TAKAHIDE KOMORI ¹	4. 巻 9
2. 論文標題 Gold nanoparticles enhance Xray irradiation induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIOMEDICAL REPORTS	6. 最初と最後の頁 415-420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2018.1142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----