

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00331

研究課題名(和文)単色X線とナノ粒子を用いたがんの新規放射線治療

研究課題名(英文)Novel cancer radiation therapy employing monochromatic X-rays and nanoparticles

研究代表者

玉野井 冬彦 (Tamanoi, Fuyuhiko)

京都大学・高等研究院・特定教授

研究者番号：10802283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでにがん細胞内で電子を発生させる新技術を開発した。ガドリニウムなどの高Z元素を取り込ませたがんスフェロイドに単色X線を照射することで、がんスフェロイド(がんの塊)が破壊される効果を見出した。本研究ではヨウ素担持ナノ粒子(IPO)を合成した。IPOを取り込んだがんスフェロイドにヨウ素のK殻吸収端エネルギーである33.2 keVの単色X線を照射すると、オージェ電子によりDNA二重鎖切断が起こり、アポトーシスが誘導されることでスフェロイド破壊効果が得られることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はがん細胞内で電子を発生させてがんを殺傷する新技術である。これまでAuger電子を用いたがん治療の試みは多数あるが成功していなかった。この原因は高Z元素が細胞質に拡散し、がん殺傷効果が低くなってしまったためである。我々はナノ粒子を用いることでHigh Z元素をスフェロイド内のがん細胞の核の近傍に蓄積させ、33.2 keVの単色X線を照射することでDNA二重鎖切断およびアポトーシスを誘導してがんスフェロイドを完全に破壊することができた。この成果はがん治療、量子物理学、ナノテクノロジーが融合した新学術分野を開拓できる可能性がある。また、新規がん治療法につながり可能性があり、社会的意義は大きい。

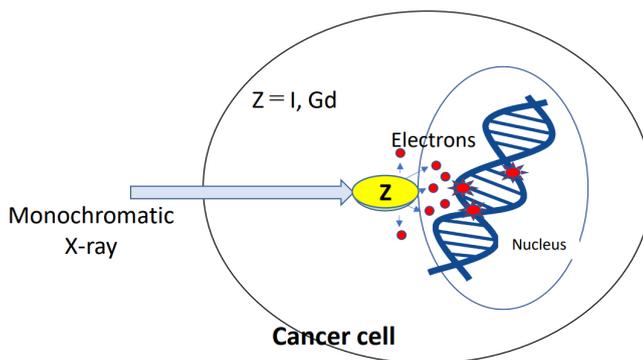
研究成果の概要(英文)：We have developed a novel type of technology that enables the release of electrons inside cancer cells. Cancer spheroids that incorporated high Z elements such as Gadolinium were completely destroyed by monochromatic X-ray irradiation. In this study, we synthesized iodine-containing porous organosilica (IPO) nanoparticles and investigated spheroid destruction of IPO-containing cancer spheroids by monochromatic X-ray irradiation. When 33.2 keV of monochromatic-X-ray was irradiated on cancer spheroids that contain IPO, we demonstrated that DNA double-strand breaks and apoptosis are induced resulting in spheroid destruction.

研究分野：ナノ医療

キーワード：高Z元素 単色X線 ナノ粒子 がんスフェロイド DNA二重鎖切断

1. 研究開始当初の背景

ガドリニウムやヨウ素などの高 Z 元素に X 線を照射するとオージェ電子や光電子が放出される。オージェ電子は飛距離が短い DNA 損傷力が強いのがん細胞内の DNA を損傷させてアポトーシスを引き起こすことができる。この現象はオージェ効果と言われこれを基にしたがん治療はいろいろ試みられてきたが有効なものはいなかった。この理由は、電子を多数保有する高 Z 元素が細胞内で拡散してしまうため、効果的な DNA 切断効果を得られなかったことにある。ガドリニウム(Gd)やヨウ素(I)といった高 Z 元素を高濃度で DNA 近傍に蓄積させることがオージェ治療成功へのカギとなる。この問題に関して、我々は多孔性シリカナノ粒子(MSN)を用いることでがん細胞の細胞核近傍に Gd を蓄積することに成功した。この Gd-MSN をがんの 3D モデルであるがんスフェロイドに取り込ませ、Spring-8 で Gd 原子の K 殻吸収端である 50.25 keV のエネルギーを持った単色 X 線を照射した場合、がんスフェロイドが完全に破壊される効果を見出し、我々はオージェ電子の発生をがん細胞の中で効果的に起こす新技術を開発した(図 1)。この知見からオージェ電子を用いたがんの新規放射線治療の可能性を見出している。スフェロイド破壊効果のメカニズムをさらに検討する必要がある。また Gd 以外の高 Z 元素、特に低いエネルギーの X 線を吸収するヨウ素などをがん細胞に蓄積することが求められる。



1. 高Z元素を高濃度で細胞核のすぐ近くに局在させる。
2. 単色X線で照射する。

図1 がん細胞内で電子を発生させる新技術

2. 研究の目的

X 線、中性子線、アルファ線などの様々な量子ビームが放射線治療に使われているが、我々はオージェ電子を用いる放射線治療の開発に力を入れてきた。本研究は量子ビームとナノ材料の研究を融合して新規の放射線治療の開発につなげていくものであるが、現在問題となる下記課題を解決することを目的とする。

- ・ Gd よりも K 殻吸収エネルギーの低いヨウ素を担持したナノ粒子(IPO)を開発する。
- ・ IPO ががん細胞に取り込まれること、またがんスフェロイドに満遍なく取り込まれるかを明らかにする。
- ・ IPO を取り込んだスフェロイドへの単色 X 線照射によるがんスフェロイド破壊効果を評価する。
- ・ 高 Z 元素を取り込んだがんスフェロイドの単色 X 線照射による破壊効果がアポトーシスによるものかどうかを明らかにする。さらに単色 X 線照射により DNA 切断が起こるかどうかについても検討し、がんスフェロイドが破壊されるメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) IPO の合成と分析

IPO の合成は Sol-gel 法を用いる。Gd-MSN を合成した場合、MSN の表面をアミノ基で修飾することでプラスに帯電させて、マイナスに帯電したガドペンテン酸と結合させた。それに対し、IPO は合成の段階で前駆体の (3-

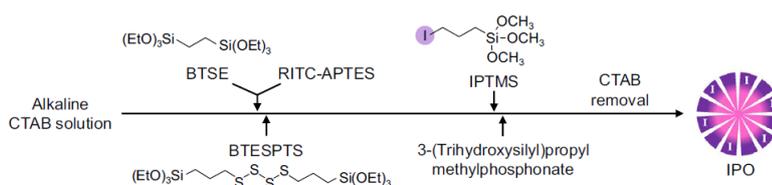


図2 IPOの合成法

iodopropyl)trimethoxysilane を用いて合成することでナノ粒子の骨格にヨウ素を担持させた。まず、cetyltrimethylammonium bromide(CTAB)を水酸化ナトリウム溶液中で 80°C で溶解した。一方で、ナノ粒子に赤い蛍光を持たせるため蛍光物質の Rhodamine-B isothiocyanate (RITC)

をエタノール中に溶解し、3-aminopropyltriethoxysilane を添加し混合したあと、CTAB 溶液と混合した。この溶液中に 1,2-bis(triethoxysilyl)ethane を添加後、100 μl の bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfide を滴下し混合した。その後、ヨウ素を担持させるために 3-iodopropyl)trimethoxysilane と表面に負のチャージを持たせるための 3-(trihydroxysilyl)propylmethylphosphonate 溶液を入れて混合した。この溶液は 80°C で 2 時間混合し、その後エタノールで三回遠心を繰り返して洗浄した。CTAB を除去するため、このナノ粒子は硝酸アンモニウムを滴下した蒸留水中で 80°C 条件下で還流させた。反応後、ナノ粒子はエタノールで 3 回洗浄し、完全に乾燥させた(図 2)。得られた IPO は FT-IR、ゼータ電位、DLS、SEM、TEM-EDX、窒素吸着分析、ICP-AES などで分析を行った。

(2) ナノ粒子のがんスフェロイドへの取り込み

50.25 keV の単色 X 線照射による Gd-MSN を取り込んだがんスフェロイド破壊効果は Gd-MSN がスフェロイド内に満遍なく取り込まれたことで引き起こされていた。このことから IPO もがんスフェロイド内に取り込まれるかどうかを検討した。低接着性の 96 ウェル U 底培養プレートに 5,000 cells/well となるように GFP を発現している卵巣がん細胞を播種し、2 日おきに培地を交換しながら 7 日間培養することで直径 300~500 μm のがんスフェロイドを作成した。このがんスフェロイドの培養液中にローダミン B で標識した IPO を添加し、24 時間培養することで取り込ませた。IPO を取り込ませたがんスフェロイドは 4%パラホルムアルデヒドで固定し、Hoechst 33258 で核染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(3) Spring-8 での単色 X 線照射実験

IPO が満遍なくがんスフェロイド内に取り込まれたため、このがんスフェロイド破壊が起きるかどうかが検討するために、作成したがんスフェロイドを PCR チューブに入れ、Spring-8 に持っていき、33.0 keV、33.2 keV、33.4 keV のエネルギーの単色 X 線を 30 分間照射した(図 3)。照射後、スフェロイドはインキュベータ内で 3 日間培養し、固定および核染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてスフェロイド破壊効果を観察した。

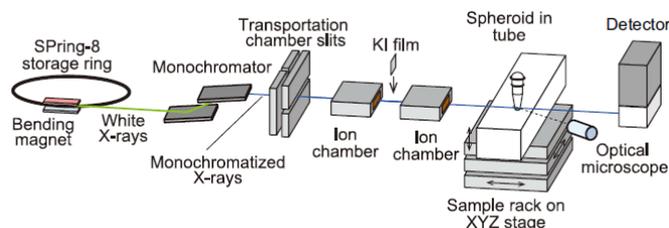


図3 Spring-8での照射実験

(4) 単色 X 線照射による DNA 切断とアポトーシス誘導評価

IPO を取り込ませたがんスフェロイドに 33.2 keV の単色 X 線を照射したところ高いがんスフェロイド破壊効果が見られたことから、単色 X 線照射によりがんスフェロイド内に取り込まれたヨウ素から DNA 切断効果の高いオージェ電子が放出されたと考えられる。このオージェ電子が DNA を切断することで誘導されるアポトーシスによりがんスフェロイドが破壊され消失するかどうかを検討した。初めに、がんスフェロイド破壊がアポトーシスによるものかどうかを TUNEL アッセイを用いて調べた。アポトーシスが誘導された細胞では DNA 切断面に多数の 3'ヒドロキシル末端が露出される。この末端を標識する Br-dUTP を持った末端デオキシヌクレオチド転移酵素(TdT)で標識することでアポトーシス誘導評価を行った。単色 X 線照射後 3 日間インキュベートしたがんスフェロイドをこの TdT で標識し共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。単色 X 線照射によるアポトーシス誘導が DNA 二重鎖切断によるものかどうかを $\gamma\text{H2AX foci}$ を用いて調べた。DNA 二重鎖切断が起きると DNA が巻き付いている H2AX ヒストンのリン酸化が起きることから、単色 X 線照射後のスフェロイドをすぐに固定し、リン酸化 H2AX に対する抗体で標識することで検出した。

4. 研究成果

本研究で得られた成果を下記に示す。

(1) ヨウ素を担持した IPO ナノ粒子の合成

IPO を SEM と TEM を用いて形態観察を行ったところ、直径は約 80 nm でほぼ均一な粒子であった。またナノ粒子には多数の孔が開くことも確認され(図 4-a, b)、窒素吸着分析、EDS-TEM を用いた IPO の原子マッピング、ナノ粒子の ICP 解析によるヨウ素原子の検出などの実験により IPO のヨウ

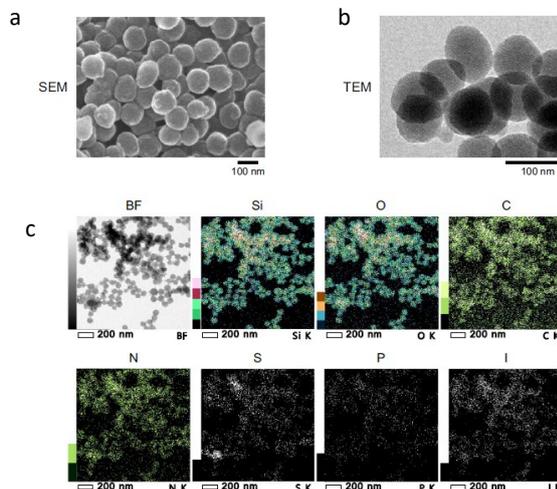


図4 IPOの合成法と分析

素担持を確認した(図 4-c)。

(2) IPO のがんスフェロイド内への取り込み

図 5-a に見られるように、IPO の赤い蛍光はスフェロイド全体に満遍なく広がっていた。さらに、共焦点レーザー顕微鏡の焦点深度を変えてスフェロイド全体を観察したところ、細胞核や GFP の蛍光と同様に IPO の赤い蛍光が検出されたことから、IPO はがんスフェロイド内に満遍なく取り込まれたことを明らかにした(図 5-b)。この結果から、ヨウ素をスフェロイド内に効率よく運搬できたと考えられる。

(3) 単色 X 線照射によるがんスフェロイドの破壊効果

図 6 に示すように、33.0 keV の単色 X 線を照射した場合にはスフェロイドは破壊されなかった。一方ヨウ素の K 殻吸収端に近い 33.2 keV の単色 X 線を照射した場合にはがんスフェロイドの高い破壊効果が観察され、がんスフェロイドの大部分が消失していた。さらにエネルギーを高くし、33.4 keV の単色 X 線を照射した場合にはがんスフェロイド破壊効果が 33.2 keV の単色 X 線を照射した場合と比較して低下した。このことから、IPO を取り込んだがんスフェロイドへの単色 X 線照射によるスフェロイド破壊効果は単色 X 線の最適なエネルギー範囲が存在すると考えられる。また、IPO を取り込んでいないがんスフェロイドに単色 X 線を照射してもスフェロイド破壊効果は見られなかったことから、単色 X 線による細胞への影響はないものと考えられる。

(4) 単色 X 線照射によりがん細胞の DNA 切断とアポトーシス誘導

図 7 に示すように、33.0 keV の単色 X 線を照射した場合には TUNEL アッセイでアポトーシスは観察されなかった。一方で、高いがんスフェロイド破壊効果が見られた 33.2 keV の単色 X 線を照射した場合にはアポトーシス誘導が検出された。33.4 keV の単色 X 線照射では弱い確認された。

図 8-a と図 8-b に示すように、0.1 keV ずつ単色 X 線照射のエネルギーを変えて照射することでエネルギーの違いにより DNA 二重鎖切断に違いがあるかどうかを検討した。33.0 keV の単色 X 線を照射した場合にはリン酸化 H2AX のシグナルは検出されなかった。一方、33.2 keV の単色 X 線で照射した場合には最も高いリン酸化 H2AX のシグナルが検出された。このピークは非常にシャープなものであり、その後さらに単色 X 線のエネルギーをあげていくとリン酸化 H2AX のシグナルは弱くなったことから、IPO を取り込ませたがんスフェロイドへの単色 X 線照射による DNA 二重鎖切断誘導は最適なエネルギー(ヨウ素の K 殻吸収端に最も近いエネルギー)の単色 X 線を照射する必要があることが明らかとなった。

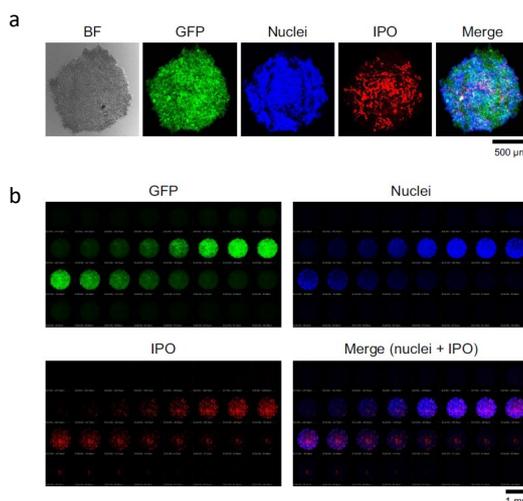


図5 IPOのがんスフェロイドへの取り込み

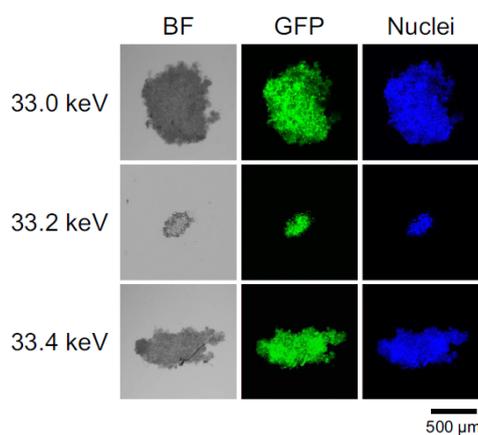


図6 単色X線照射によるがんスフェロイド破壊

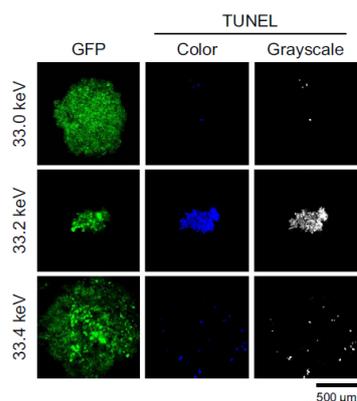


図7 がんスフェロイドのアポトーシスの検出

以上の研究結果から、(1)ヨウ素を含んだ IPO ナノ粒子を使うことでがんスフェロイドに効率よくヨウ素を運搬できた。(2)ヨウ素の K 殻吸収端近くの 33.2 keV のエネルギーを持つ単色 X 線照射により、高いスフェロイド破壊効果が示された。(3)単色 X 線照射によるがんスフェロイド破壊は DNA 二重鎖切断が起こり、2-3 日間インキュベートすることでアポトーシスが誘導され、最終的にスフェロイド破壊が起こることを明らかにした。

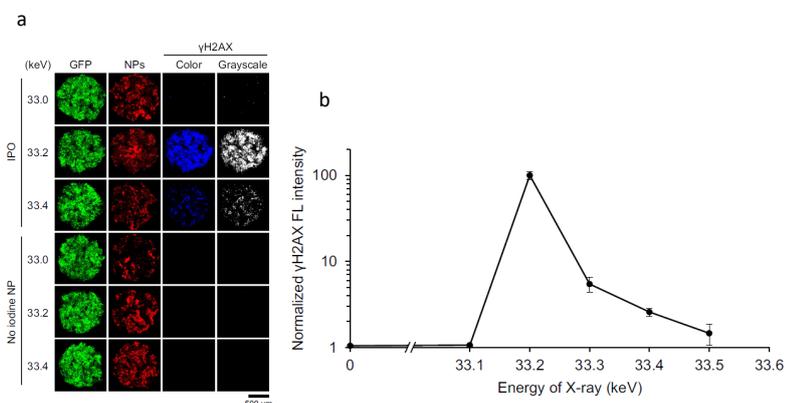


図8 がんスフェロイドでのDNA二重鎖切断の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Higashi Yuya, Matsumoto Kotaro, Saitoh Hiroyuki, Shiro Ayumi, Ma Yue, Laird Mathilde, Chinnathambi Shanmugavel, Birault Albane, Doan Tan Le Hoang, Yasuda Ryo, Tajima Toshiki, Kawachi Tetsuya, Tamanoi Fuyuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Iodine containing porous organosilica nanoparticles trigger tumor spheroids destruction upon monochromatic X-ray irradiation: DNA breaks and K-edge energy X-ray	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14192-14192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93429-9	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 該当する
1. 著者名 Higashi Yuya, Ikeda Shuji, Matsumoto Kotaro, Satoh Shinsuke, Komatsu Aoi, Sugiyama Hiroshi, Tamanoi Fuyuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Tumor Accumulation of PIP-Based KRAS Inhibitor KR12 Evaluated by the Use of a Simple, Versatile Chicken Egg Tumor Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 951 ~ 951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14040951	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 -
1. 著者名 Dat Mai Ngoc Xuan, Nguyen Le Uyen-Chi, Thuy Nguyen Linh Ho, Kieu Ta Hanh Thi, Van Nguyen Ha, Le Tri Minh, Phan Thang Bach, Thi Nguyen Lien-Thuong, Tamanoi Fuyuhiko, Le Hoang Doan Tan	4. 巻 315
2. 論文標題 Facile synthesis of biodegradable mesoporous functionalized-organosilica nanoparticles for enhancing the anti-cancer efficiency of cordycepin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microporous and Mesoporous Materials	6. 最初と最後の頁 110913 ~ 110913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micromeso.2021.110913	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 該当する
1. 著者名 Mai Ngoc Xuan Dat, Birault Albane, Matsumoto Kotaro, Ta Hanh Kieu Thi, Intasa ard Soontaree Grace, Morrison Kendall, Thang Phan Bach, Doan Tan Le Hoang, Tamanoi Fuyuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Biodegradable Periodic Mesoporous Organosilica (BPMO) Loaded with Daunorubicin: A Promising Nanoparticle Based Anticancer Drug	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 593 ~ 599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.201900595	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 該当する

1. 著者名 Tamanoi Fuyuhiko, Matsumoto Kotaro, Doan Tan Le Hoang, Shiro Ayumi, Saitoh Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Studies on the Exposure of Gadolinium Containing Nanoparticles with Monochromatic X-rays Drive Advances in Radiation Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1341 ~ 1341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano10071341	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 該当する

1. 著者名 Chinnathambi Shanmugavel, Tamanoi Fuyuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Recent Development to Explore the Use of Biodegradable Periodic Mesoporous Organosilica (BPMO) Nanomaterials for Cancer Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 890 ~ 890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics12090890	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 該当する

1. 著者名 Gisbert-Garzaran Miguel, Lozano Daniel, Matsumoto Kotaro, Komatsu Aoi, Manzano Miguel, Tamanoi Fuyuhiko, Vallet-Regi Maria	4. 巻 13
2. 論文標題 Designing Mesoporous Silica Nanoparticles to Overcome Biological Barriers by Incorporating Targeting and Endosomal Escape	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 9656 ~ 9666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.0c21507	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yue Ma, Yuya Higashi, Kotaro Matsumoto, Hiroyuki Saitoh, Ayumi Shiro, Fuyuhiko Tamanoi
2. 発表標題 Gadolinium-loaded mesoporous silica nanoparticles trigger destruction of tumor spheroids upon irradiation with monochromatic X-ray
3. 学会等名 日中ナノメディスン・シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 佑弥、松本 光太郎、齋藤 寛之、城 鮎美、馬 越、安田 良、河内 哲哉、玉野井 冬彦
2. 発表標題 単色X線とヨウ素担持シリカナノ粒子によるDNA切断とオージェ治療の可能性
3. 学会等名 量子生命科学会第3回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fuyuhiko Tamanoi
2. 発表標題 Nanotechnology drives new developments in Cancer Radiation Therapy
3. 学会等名 CPD Accredited 17th International Conference on Cancer and Cancer Therapy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tamanoi Fuyuhiko
2. 発表標題 Quantum Nano Medicine Research
3. 学会等名 First A-FNS Meeting (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tamanoi Fuyuhiko
2. 発表標題 Developing a novel radiation cancer therapy by employing monochromatic X-ray and nanoparticles
3. 学会等名 Iranian Biochemistry and Molecular Biology meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tamanoi Fuyuhiko
2. 発表標題 量子ビームとナノ材料研究により拓ける量子ナノ医療研究
3. 学会等名 第18回ナノ学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tamanoi Fuyuhiko
2. 発表標題 患者由来の鶏卵がんモデルと癌のオージェ治療
3. 学会等名 医学と数理, 第2回京大-ハイデルベルク大-理研ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tamanoi Fuyuhiko
2. 発表標題 Mesoporous silica nanoparticles, the Auger effect, novel Radiation Therapy
3. 学会等名 National Institute for Materials Science (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tamanoi Fuyuhiko
2. 発表標題 Mesoporous silica nanoparticles, Coronavirus capture, the Auger therapy
3. 学会等名 ISNM Special meeting on coronavirus (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 放射線治療のための医薬組成物、およびそれを用いた固形がんの治療方法	発明者 玉野井 冬彦、東 佑弥、松本 光太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-041624	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 多孔性シリカを含むナノ粒子およびその製造方法、ならびに放射線治療用医薬組成物	発明者 玉野井冬彦、松本光 太郎、齋藤寛之、瀬 ノ内鮎美、田島俊樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/ 36367	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	齋藤 寛之 (Saitoh Hiroyuki) (20373243)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・関西光科学研究 所 放射光科学研究センター・グループリーダー (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------