

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16700

研究課題名(和文) エクソソームを利用した過酸化チタンナノ粒子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) Fundamental study of radiosensitization therapy with titanium peroxide nanoparticles using exosomes

研究代表者

岩下 和真 (Iwashita, Kazuma)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80850065

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(TiO_xNPs)をエクソソームに包含させるためにまず電気穿孔法を採用したが、エクソソームが細胞死を生じ、TiO_xNPsをエクソソーム内に包含出来なかった。TiO_xNPsを体内に運搬する別の方法としてAPSに着目した。APSとはタンニン酸とタンニン酸をタンパク質もしくは抗体が架橋し三次元的な構造を作るものである。APS修飾したTiO_xNPsの放射線増感効果について検討を行った。照射線量を増加した場合の細胞生存率を検討したところ、APS修飾したTiO_xNPsを投与した群が最も生存率が低く、放射線増感効果が高いことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の先行研究で開発した過酸化チタンナノ粒子は、X線照射によって大量のヒドロキシラジカルを発生し、担がんマウスを用いたin vivo実験において顕著な放射線増感効果を示すことが判明している。過酸化チタンナノ粒子は癌細胞に到達すれば放射線増感効果が期待できるが、ドラッグデリバリーの方法はまだ確立されていない。今回エクソソームを用いた運搬方法の確立は出来なかったが、APSを用いた新たな手法の確立に向けて基礎的な検討を行った。ナノ粒子を用いた新たな放射線増感療法の臨床応用に向けて引き続き検討を行う。

研究成果の概要(英文)：Electroporation was first employed to encapsulate titanium peroxide nanoparticles (TiO_xNPs) in exosomes, but the exosomes died and the TiO_xNPs could not be encapsulated in the exosomes.

We focused on APS as another method of transporting TiO_xNPs into the body, in which tannic acid and tannic acid are cross-linked by proteins or antibodies to form a three-dimensional structure. We have investigated the radiosensitizing effect of APS-modified TiO_xNPs. Cell survival after irradiation was lower in the group treated with APS-modified TiO_xNPs than in the group treated with non-APS-modified TiO_xNPs. Therefore, APS-modified TiO_xNPs have a high radiosensitizing effect.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：チタンナノ粒子 エクソソーム APS

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線治療は手術、化学療法と並ぶがん治療の3本の柱とされ、治療効果を高める様々な工夫がこれまでなされてきた。今日では強度変調放射線治療や定位放射線治療といった技術の登場により、副作用を軽減し腫瘍のみに絞って高線量を処方することが可能である。しかし膵臓がんなどの放射線抵抗性の難治がんでは従来の治療法のみでは治癒が難しい。膵臓がんは殆どの場合 III 期、IV 期の進行癌の状態で見られるため、手術不能例が多く5年生存率が著しく低い。ごく一部の外科切除可能例は根治が望めるが、大半を占める切除不能例に対する新規治療方法の開発が不可欠である。

(2) 放射線治療では照射によって生じる過酸化水素やヒドロキシラジカル等の活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) が細胞死を導く。一方、放射線抵抗性の腫瘍の多くでは ROS 除去作用を有するグルタチオン、カタラーゼ、SOD 等の抗酸化物質が過剰発現しているために放射線抵抗性を示す。そのため照射線量の増加だけでは限界があり、放射線増感剤の開発が期待されている。この解決策として我々のグループでは医工連携共同研究により強力な放射線増感効果を持つ過酸化チタンナノ粒子 (TiO₂NPs) を開発した。TiO₂NPs は二酸化チタンを原料として生成されるメタルナノ粒子である。すでに TiO₂NPs が X 線照射により過酸化水素やヒドロキシラジカル等の大量の ROS を発生させ、担癌モデルマウスにて X 線照射単独と比較して著明な抗腫瘍効果が得られることを報告している。TiO₂NPs が腫瘍に到達すれば強い放射線増感作用が期待できるが、腫瘍に対する指向性を有しなければ効率的な放射線増感が出来ず、ドラッグデリバリーが課題とされている。そこで我々は TiO₂NPs のドラッグデリバリー役としてエクソソームに注目した。エクソソームとは細胞から分泌される直径 50-150nm の顆粒状の物質で、細胞外小胞の一種である。エクソソームはエンドサイトーシスにより細胞内にできたエンドソームがさらに陥入して作られた膜小胞が細胞外に放出されたもので、由来細胞の細胞成分からなる。これまでの研究で腫瘍から放射線照射によって反応的に放出されるエクソソームに腫瘍に対する強い指向性があることを発見し、TiO₂NPs の運搬役になり得るのではないかとこの着想に辿り着いた。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的はエクソソームを用いて TiO₂NPs を効率的に腫瘍に到達、集積する新たなドラッグデリバリーの方法を確立することである。ナノ粒子の運搬役としてエクソソームを用いる試みは我々の調べた範囲では報告がない。潜在的に強い放射線増感作用を持つ TiO₂NPs のドラッグデリバリーの方法が確立すれば、ナノ粒子を用いた新たな放射線増感療法の研究が進み、膵癌を始めとする難治癌の治癒率向上につながると思う。

(2) 我々は放射線照射を受けた腫瘍細胞から放出されるエクソソームが、宿主細胞により効率的に取り込まれることを確認している。腫瘍細胞由来のエクソソームは TiO₂NPs の運搬役になり得ると考えるが、in vivo では静脈内投与を行うと、その多くが肝臓や脾臓などに取り込まれてしまい腫瘍への集積率が低下することが課題であった。しかし近年の研究により CD47 をエクソソーム膜に導入できれば単球やマクロファージなどの貪食作用を回避することが明らかになってきた (Sushrut K. et al. Nature 538:498-503,2017)。in vivo でも発癌遺伝子である KRAS を標的にした膵癌のエクソソーム治療が生存率を改善したと報告されている。今回申請者らは CD47 を発現させたエクソソームを利用することで肝臓、脾臓のマクロファージでの取り込みを回避して腫瘍への TiO₂NPs の取り込みを向上させる手法を確立する。

3. 研究の方法

(1) エクソソームの採取：エクソソームをヒト膵癌細胞 (Mia Paca-2) より採取し、膜タンパク質やナノサイトで確認する。

(2) エクソソーム内に TiO₂NPs を包含：採取したエクソソームに CD47 を発現させ、Xpack クローニングベクターを用いて TiO₂NPs をエクソソーム内に包含させる。

(3) エクソソーム・ナノ粒子結合体の腫瘍細胞への取り込みと放射線増感作用を確認：エクソソーム・ナノ粒子結合体と腫瘍細胞を共培養した上で、DiR 色素でエクソソームの取り込みを確認。その後 X 線照射し、コロニーアッセイを実施して、放射線増感作用を確認する。

(4) エクソソーム・ナノ粒子結合体を担癌モデルラットに投与：担癌モデルラットに対して、エクソソーム・ナノ粒子結合体を経血管的に投与し、腫瘍への集積は IVIS を用いて確認し、in vivo での放射線増感作用を評価する。

4. 研究成果

(1) エクソソームの単離：Mia Paca-2 細胞を T75FK 内培地で培養し、Exosome free 培地に交換して放射線照射を行った。48 時間後に 3200rpm で 10 分間遠心分離し細胞上清のみを回収した。その後超遠心機を用いて 30000RPM で 1 時間半遠心分離を 2 回行い、超遠心後の上清を捨てて底に残った PBS を回収した。タンパク定量を行いエクソソームの単離を確認した。

(2) エクソソームに過酸化チタンナノ粒子(TiO_xNPs)を包含：TiO_xNPs を採取したエクソソーム内に包含させるために、直接透過を促進する手法として電気穿孔法（エレクトロポレーション）を採用することとした。細胞に外部から電場を印加することで一時的に膜透過性を向上させ、エンドサイトーシスを介さずに物質を細胞内部に直接送達する手法のため、実現できれば高い送達効率が期待できる。TiO_xNPs 0.1mg/ml, エクソソーム 3 μg/well, Au 1 μ .ml を添加して数種類のサンプルを作成した。添加時間は 24 時間としすべての量を PBS で調整した。エレクトロポレーションあり、なしでそれぞれ観察を行った。エレクトロポレーションは Poring pulse として 100V 5msec 2 回、Transfer pulse として 20V 50msec 5 回を行った。結果としてはエレクトロポレーションを行うことでエクソソームが細胞死を生じてしまい、TiO_xNPs をエクソソーム内に包含することはできなかった（図 1）。またエクソソームのサイズが直径 50-150nm と一定でないこともあり、TiO_xNPs を体内に運搬する別の方法を検討した。

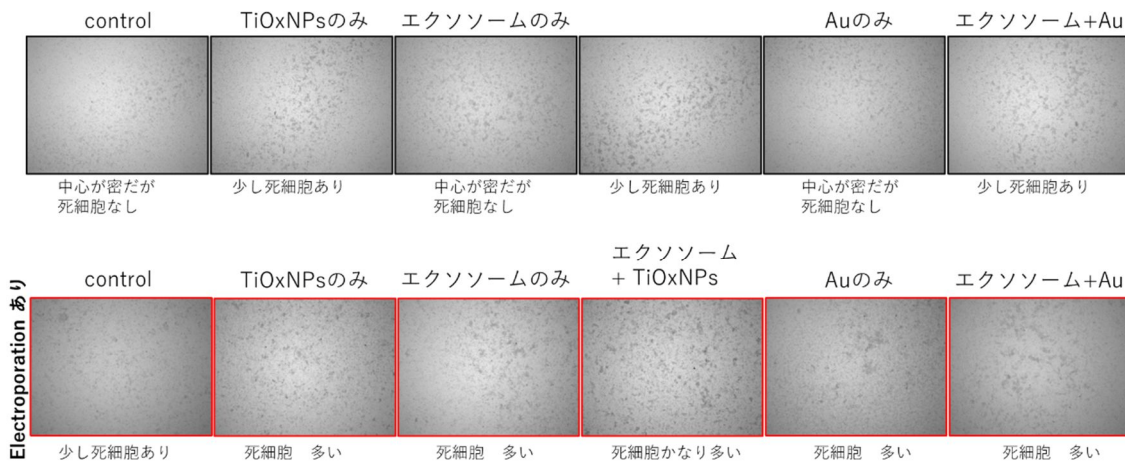


図1 エレクトロポレーション施行時の細胞観察

(3) APS(Antibody Polyphenol System)修飾した TiO_xNPs の精製：エクソソーム内に TiO_xNPs を包含することが困難であるため、TiO_xNPs を体内に運搬する別の方法として APS に着目した。APS とはタンニン酸とタンニン酸をタンパク質もしくは抗体が架橋し三次元的な構造を作るものである。放射線抵抗性のがん幹細胞の表面抗原を認識した選択的結合が他施設ですでに報告されている。特定の抗体やタンパク質を組み込んだ APS でナノ粒子をコーティングして、ナノ粒子に腫瘍への輸送機能や腫瘍滞留性向上機能を付加することができないか検討した。APS 修飾した TiO_x 精製についてまず検討を行った。

ポリアクリル酸-TiO_x をミリ Q で定量に調整し、タンニン酸溶液と蛍光標識した抗 CD44 抗体を加えて反応させ、セルロース透析を行って精製した。MDA-MB-231 細胞を用いて、APS 修飾を行ったポリアクリル酸-TiO_x と反応させた。細胞が浮遊状態か接着状態のどちらの条件が適切か共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）で評価したところ、細胞は浮遊状態の方が接着状態よりも多くの TiO_x を取り込んでいることが認められた（図 2）。

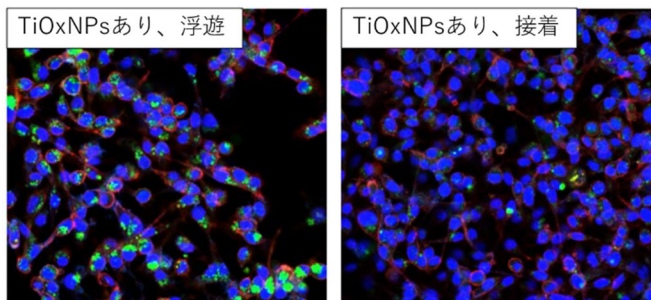


図2 CLSMでの観察（×20倍）

を取り込

(4) APS 修飾したチタンナノ粒子の放射線増感効果の検討：APS 修飾したチタンナノ粒子の放射線増感効果について検討を行った。MDA-MB-231 細胞に PBS、タンニン酸 (TA)、TiO_x、antiCD44、APS 修飾した TiO_x (APS-TiO_x) をそれぞれ添加して数種類のサンプルを作成した。これらに対して X 線照射を行い、線量を 2Gy、4Gy、6Gy と増加した場合の細胞生存率を検討した。APS-TiO_x を投与した群が最も生存率が低く、放射線増感効果が高いことが示された (図 3)。

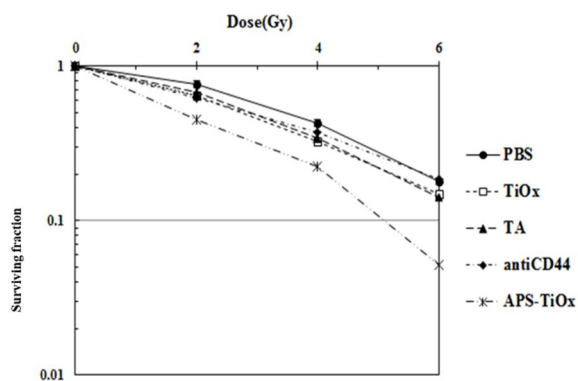


図3 APS-TiO_xの放射線増感効果の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 窪田 光、藤田 佳子、清水 康之、Mohammed Salah、岩下 和真、妹尾 悟史、川口 弘毅、小林 加奈、石原 武明、宮脇 大輔、吉田 賢治、西村 勇哉、荻野 千秋、佐々木 良平
2. 発表標題 過酸化チタンナノ粒子による免疫放射線治療増感効果の検討
3. 学会等名 第33回日本放射線腫瘍学会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------