

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07697

研究課題名(和文) アクティブターゲティングを利用した金ナノ粒子による放射線癌細胞死の増強

研究課題名(英文) Enhancement of radiation-induced cancer cell death using active targeting gold nanoparticles

研究代表者

近藤 隆 (Kondo, Taakshi)

富山大学・医学部・名誉教授

研究者番号：40143937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アクティブターゲティングナノ粒子を用いた放射線増強を目指して、EGFR抗体をリポソーム化して5nm金ナノ粒子を含むリポソーム製剤を作製した。金ナノ粒子をFITC、リポソームをローダミン標識して細胞に投与し、細胞1個あたりの蛍光強度を測定したところ、培養時間に比例して、細胞内への取り込みが増加した。細胞に対してはアクティブターゲティングナノ粒子の有効性を確認できた。一方、動物実験で静脈注射と腫瘍内注射による腫瘍内集積を検討したが、両者の差は殆どなかった。本法による放射線増強の可能性はあるが、腫瘍組織分布に関する課題が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金ナノ粒子と放射線との併用ではサイズや表面修飾の重要性が判明し、放射線増感効果の検証とメカニズムの解明は急務である。そこで、金ナノ粒子のアクティブターゲティングを利用した放射線癌細胞死の増強法を目指す。初めにサイズ、表面修飾の違いによる水溶液系での活性酸素種生成と細胞致死効果を調べる。次に細胞表面修飾の点から細胞死のメカニズムを検証する。また、分子レベルで相互作用と増強メカニズムの解明のため、超音波、大気圧プラズマや温熱との併用を目指すとともに、選択的な細胞死制御による放射線ナノメディシンの確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：For radio-sensitization using active targeting nanoparticles, liposomes with EGRF antibodies containing 5 nm gold nanoparticles were produced. When liposomes labeled with rhodamine containing FITC-gold nanoparticles were incubated in culture medium, both cellular incorporations were enhanced. On the other hand, almost no difference was found in tumors with intravenous injection or intratumor injection. Although there is a possibility of radio-sensitization using active targeting nanoparticles, drug delivery to intratumor tissues is still a major problem.

研究分野：放射線基礎医学

キーワード：金ナノ粒子 放射線 細胞死

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線治療は現がん治療において主要な治療法のひとつであり、手術療法や化学療法との併用を含めて広く用いられている。一方、放射線照射にともなう腫瘍組織の周囲にある正常組織への線量依存的な副作用の低減化が課題であり、より腫瘍特異的かつ低線量な放射線治療法の開発が期待されている。近年、放射線の線量を減少させるための放射線増感剤として金ナノ粒子が注目され、主に腫瘍細胞を対象として研究が進んでいる。金ナノ粒子に X 線や γ 線などの放射線を照射した際、光電効果やコンプトン効果によって、金属原子由来の 2 次電子が発生し、これが活性酸素を誘発し、数 μm の範囲で影響を及ぼし放射線治療効果を高めるとされている。

(2) 金ナノ粒子と放射線との併用ではサイズや表面修飾の重要性が判明し、放射線増感効果の検証とメカニズムの解明は急務である。特に、金ナノ粒子のアクティブターゲティングを利用した放射線癌細胞死の選択的増強法の実用化が急務である。

(3) ナノ粒子のナノメディシンへの応用可能性は広く、新たなナノ粒子の合成が必要とされる。

2. 研究の目的

(1) 金ナノ粒子含有抗体リポソームを調製し、細胞水準で金ナノ粒子の放射線増強効果を検討することを目的とした。

(2) 生体内でのアクティブターゲティングナノ粒子の分布を探るために 5 nm Au-EGFR-Cy5.5 標識金ナノ粒子を調製して、静脈内投与および腫瘍内投与の効果と比較した。

(3) ナノ粒子に関する効果を検討するため、新たなナノ粒子の合成をするとともにナノ粒子の効果について検討した。

3. 研究の方法

ナノ粒子の凝集を避けるため、原則として金ナノ粒子と抗体リポソームは別々に合成し、混合させて、内包されない金ナノ粒子を除去し使用した。金ナノ粒子を FITC、リポソームをローダミンで標識し、細胞 1 個あたりの蛍光強度を測定した。

細胞実験には HeLa 細胞を使用した。また、動物実験には皮膚扁平上皮癌 A431 細胞を移植した担癌マウスを用い検討した。

4. 研究成果

(1) 金ナノ粒子含有抗体リポソームの調製と細胞内取り込みの検討

アクティブターゲティングナノ粒子を用いた放射線増強を目指して、EGFR 抗体をリポソーム化して 5 nm 金ナノ粒子を含む製剤を作製した。当初、高濃度の金コロイドを直接、培

地に投与したが、凝集（塩析）するため、細胞には取り込まれないことが判明した。そこで、リポソームに包むことを考えた。また、リポソームに架橋剤を介して、抗体を接合し、抗体リポソームを合成し、金ナノ粒子を内包させた。金ナノ粒子と抗体リポソームを別々に合成し、混合させて、内包されない金ナノ粒子を除去した。1つの150nmサイズのリポソームに、数個の金ナノ粒子が含まれることを透過型電子顕微鏡で確認した。金ナノ粒子をFITC、リポソームをローダミン標識して細胞に投与し、細胞1個あたりの蛍光強度を測定したところ、培養時間に比例して、リポソームも、金ナノ粒子も、細胞内への取り込みが増加した（図1）。

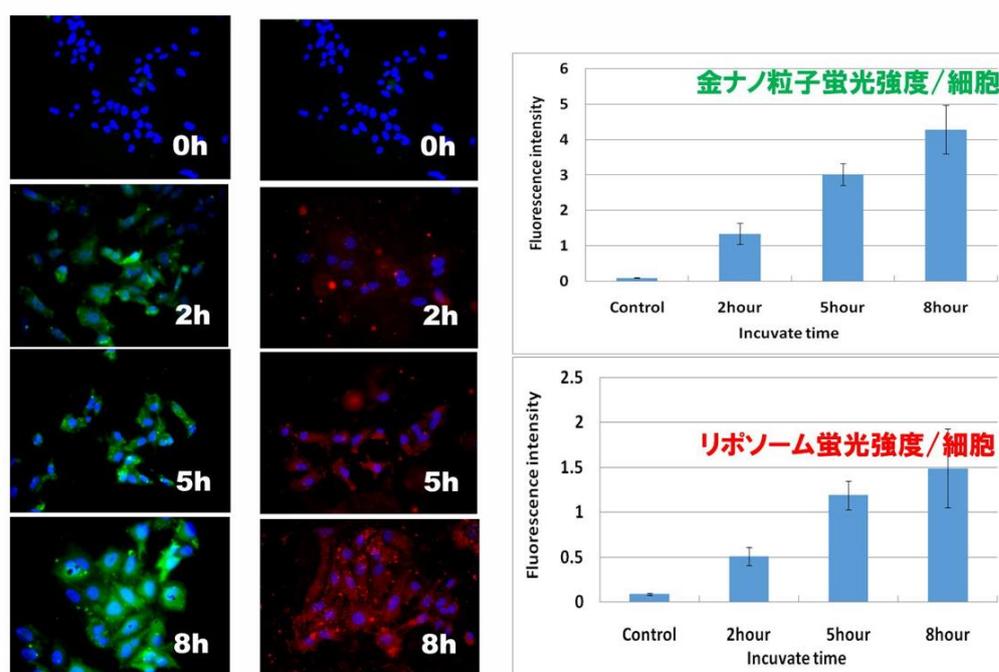


図1 金ナノ粒子および同含有抗体リポソームの細胞内取り込み

(2) アクティブターゲティングナノ粒子の腫瘍内取り込みの検討—静脈内投与と腫瘍内投与との比較

静脈注射と腫瘍内注射による生体内分布についてイメージング技術を用いて検討した。その結果、静脈内投与では腎臓、肝臓、肺に多く集積した。腫瘍内投与では腫瘍中の集積度は高かったが、静脈内投与時の腫瘍内集積度と大きな差はなかった。本検討では動物実験用の濃度を高めた抗体金ナノ粒子 (>10 mg/mL) は、相当量作るのが難しく、うまく動物に投与できるまでは至らなかった。その他、金ナノ粒子や他の金属ナノ粒子を用いて大気圧プラズマ等、他の物理的手法でも増感効果を期待して試行研究を実施した。

(3) 金ナノ粒子およびナノ粒子を用いた検討

金および白金ナノ粒子による放射線細胞死の修飾効果をはじめとして大気圧プラズマと金ナノ粒子の相互作用について報告した(1~4)。今回の研究を通じて金ナノ粒子による細胞内GSH修飾により放射線増強は可能であるが、腫瘍組織および腫瘍内血流に課題が判明した。ナノ粒子とHeプラズマとの相互作用ではマグネタイトナノ粒子併用で水溶液中のOHラジカル量の増加が認められた。また、研究分担者の延山らは蝶型ナノ粒子の合成に関して生成機序について検討し、結果を報告した(5)。

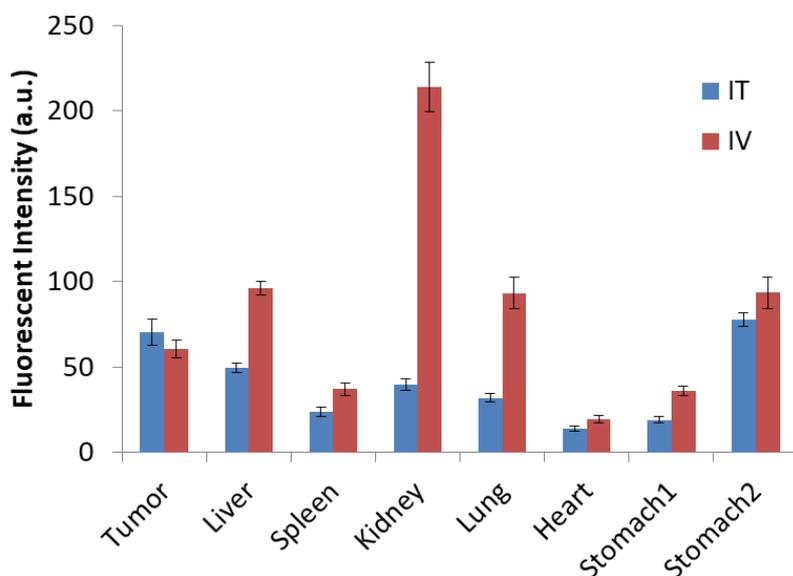


図2 静脈内投与および腫瘍内投与によるアクティブターゲティングナノ粒子の腫瘍および臓器内取り込み

5. 引用文献

- ① 三澤雅樹、近藤 隆. 放射線ナノメディシンの新展開：金および白金ナノ粒子による放射線細胞死の修飾効果. 放射線生物研究 Radiation biology research communications : 55 (4), 322-341, 2020
- ② Rehman MU, Jawaid P, Zhao QL, Kondo T, Saitoh J-I, Noguchi K. Physical and chemical enhancement of cancer cell death induced by cold atmospheric plasma. Jpn J Appl Phys. 2021; 60: 030501.
- ③ 近藤 隆, 清水忠道. 白金ナノ粒子と物理的治療因子との相互作用. 化学工業. 2021; 72: 275-280.
- ④ 近藤 隆. がん治療をめざした大気圧プラズマによるアポトーシス機構の解明—物理的・化学的増感をめざして—. プラズマ・核融合学会誌. 2021; 97: 129-133.
- ⑤ Nobeyama T, Takata K, Mori M, Murakami T, Yamada Y, Shiraki K. Synthesis of butterfly-like shaped gold nanomaterial: For the regulation of liquid-liquid phase-separated biomacromolecular droplets. Small. 2023 Dec;19(49):e2300362. doi: 10.1002/sml.202300362.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Uehara Takashi, Kurachi Masayoshi, Kondo Takashi, Abe Hitoshi, Itoh Hiroko, Sumiyoshi Tomiki, Suzuki Michio	4. 巻 12
2. 論文標題 Apocynin-Tandospirone Derivatives Suppress Methamphetamine-Induced Hyperlocomotion in Rats with Neonatal Exposure to Dizocilpine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 366 ~ 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm12030366	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 Furusawa Yukihiro, Kondo Takashi, Tachibana Katsuro, Feril Loreto B.	4. 巻 197
2. 論文標題 Ultrasound-Induced DNA Damage and Cellular Response: Historical Review, Mechanisms Analysis, and Therapeutic Implications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 662-672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-21-00140.1.S1	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 Li Peng, Zhao Qing-Li, Rehman Mati, Jawaid Paras, Cui Zheng-Guo, Ahmed Kanwal, Kondo Takashi, Saitoh Jun-Ichi, Noguchi Kyo	4. 巻 27
2. 論文標題 Isofraxidin enhances hyperthermia induced apoptosis via redox modification in acute monocytic leukemia U937 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 41-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2023.12928	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 近藤 隆, 橋爪 博司, 田中 宏昌, 石川 健治, 堀 勝	4. 巻 74
2. 論文標題 低温大気圧プラズマによるフリーラジカル生成とその生物学的意義 放射線との比較	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 120-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uehara T, Kurachi M, Kondo T, Abe H, Zhao QL, Sumiyoshi T, Suzuki M	4. 巻 3
2. 論文標題 Apocynin-tandospirone derivatives demonstrate antioxidant properties in the animal model of schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advances in Redox Research	6. 最初と最後の頁 100013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arres.2021.100013	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 Rehman MU, Jawaid P, Zhao QL, Kondo T, Saitoh J-I, Noguchi K	4. 巻 60
2. 論文標題 Physical and chemical enhancement of cancer cell death induced by cold atmospheric plasma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn J Appl Phys	6. 最初と最後の頁 30501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/abde55	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 近藤 隆, 清水忠道	4. 巻 72
2. 論文標題 白金ナノ粒子と物理的治療因子との相互作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 275-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤 隆	4. 巻 97
2. 論文標題 がん治療をめざした大気圧プラズマによるアポトーシス機構の解明 物理的・化学的増感をめざして	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 プラズマ・核融合学会誌	6. 最初と最後の頁 129-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤 隆, 趙 慶利, 水上達治, 齋藤淳一	4. 巻 37
2. 論文標題 温熱誘発細胞死 アポトーシスから新たなステージへ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thermal Med	6. 最初と最後の頁 63-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furusaw Y, Kondo T, Tachibana K, Feril LB	4. 巻 197
2. 論文標題 Ultrasound-induced DNA damage and cellular response: Historical review, mechanisms analysis, and therapeutic implications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiation Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-21-00140.1.S1	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10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Uchiyama H, Ishikawa K, Hori M, Kondo T
2. 発表標題 Low Temperature Plasma Chemistry of Volatile and Non-Volatile Solutes in Aqueous Solutions: e.p.r. and Spin Trapping Studies.
3. 学会等名 ISPlasma 2022/IC-PLANTS2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ishikawa K, Kondo T, Tanaka H, Hori M, Toyokuni S, Mizuno M
2. 発表標題 Biological effects of the combination with low temperature plasmas and nanoparticles-platinum and gold-.
3. 学会等名 GEC 2022(75th Annual Gaseous Electronics Conference), ICRP-11(11th International Conference on Reactive Plasma) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤 隆
2. 発表標題 大気圧プラズマによるフリーラジカル生成とその生物学的意義 -放射線との比較-
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤 隆
2. 発表標題 オンコサーミア”の特徴と臨床応用 細胞および移植腫瘍レベルから見た分子応答に関する温熱との比較
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第39回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Andocs Gabor, Mati Ur Rehman, 田淵圭章、齋藤淳一、近藤 隆
2. 発表標題 オンコサーミア(mEHT)、電磁波加温および温水加温による抗腫瘍効果および分子応答に関する比較研究
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第59回生物部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rehman MU, Jawaid P, Zhao QL, Saitoh J-I, Kondo T, Noguchi K
2. 発表標題 Size dependent effects of gold nanoparticles in combination with cold atmospheric plasma, radiation and ultrasound
3. 学会等名 ISPlasma (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kondo T
2. 発表標題 Free radical formation induced by radiation, ultrasound and cold-atmospheric plasma and its biological implications
3. 学会等名 7th Global Plasma Forum. Radicals at Air and Water Interfaces (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rehman MU, Jawaid P, Zhao QL, 齋藤淳一, 野口 京, 近藤 隆
2. 発表標題 Size dependent effects of gold nanoparticles in combination with cold atmospheric plasma, ultrasound and radiation
3. 学会等名 第58回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 隆
2. 発表標題 ソノケミストリー：医学・生物学の立場から見た30年の歩み
3. 学会等名 第30回ソノケミストリー討論会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishikawa K, Miron C, Kondo T, Tanaka H, Hori M
2. 発表標題 Plasma-biological reaction networks and aqueous radical chemistry
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会，プラズマライフサイエンス シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究分担者	三澤 雅樹 (Misawa Masaki) (60358083)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	齋藤 淳一 (Saitoh Jun-ichi) (70572816)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	
研究分担者	趙 慶利 (Zhao Qing-Li) (90313593)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	
研究分担者	古澤 之裕 (Furusawa Yukihiro) (80632306)	富山県立大学・工学部・准教授 (23201)	
研究分担者	延山 知弘 (Nobeyama Tomohiro) (20900294)	筑波大学・数理物質系・特別研究員 (PD) (12102)	

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