

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19910

研究課題名(和文) 生体適合性酸化チタンを用いた歯周病・口腔がん治療システムの構築

研究課題名(英文) Development of treatment system for periodontal disease and oral cancer using bio-compatible titanium dioxide

研究代表者

荻野 千秋 (OGINO, CHIAKI)

神戸大学・工学研究科・教授

研究者番号：00313693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腫瘍外での蓄積抑制を目指し、新たな粒子分散修飾剤の検討を行った。具体的にはガン細胞で過剰発現するGlucose Transporter 1 (GLUT1)を標的とした、ポリフェノール配糖体であるGlucosylrutin (RutinG)を修飾した過酸化チタンナノ粒子(RutinG-TiO₂ NPs)の作製に成功した。RutinG-TiO₂ NPsには、PAAと同様に粒子分散を行う機能があり、放射線増感効果を高めるH₂O₂の徐放性が確認された。更に、*in vitro*で放射線増感効果を持つことが示し、GLUT1標的を駆動力とした粒子の細胞取り込み増加を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは二酸化チタンナノ粒子の分散のために、表面修飾材としてポリアクリル酸などの石油由来化学品を用いてきたが、体内での安定性や毒性を考えると必ずしも良い材料とは言えない。本研究では、この問題点を解決するために、完全に植物由来の成分を用いたナノ粒子表面修飾を達成する事が出来た。この技術は、将来ナノ粒子の医療応用を検討する際に、これまでにない安定化分散材になると考えられ、臨床応用への道を大きく展開するものであると期待できる。従って、ナノ粒子の医療応用に大きな意義を有する研究であると判断する。

研究成果の概要(英文)：In order to improve the retention of TiO₂ NPs in cancer tumors, alpha-Glucosylrutin (RutinG) was investigated as a new modifier to target GLUT1, which is overexpressed on cancer cells in this study. RutinG-TiO₂ NPs were prepared by following procedures: [1] Coating TiO₂ NPs with RutinG, and [2] Adding hydrogen peroxide. RutinG + PAA-TiO₂ NPs were also prepared by adding RutinG to PAA-TiO₂ NPs. Next, to verify the radiosensitizing effect of RutinG-TiO₂ compared to PAA-TiO₂ NPs, the amount of H₂O₂ adsorption and desorption was quantified by chemofluorescence method. These results suggest that GLUT1 is involved in the subcellular localization of RutinG-TiO₂. RutinG-TiO₂ NPs assumed to be used as a radiosensitizer by active targeting in cancer therapy with X-ray irradiation.

研究分野：生物化学工学

キーワード：二酸化チタンナノ粒子 過酸化水素 ポリフェノール修飾

1. 研究開始当初の背景

生体の深部に発生するがんは血管系が未発達で、血流が十分に供給されないことから、細胞中の溶存酸素分圧が低下し、低酸素症が発生する。それによってがん細胞の増殖速度が減少し、放射線の電離作用で生じるフリーラジカルも減少することから、放射線抵抗性が増大する。このようながんに対して、有効な効果を得るために、放射線増感治療と呼ばれる治療スキームが現在研究されている。これは、放射線照射に先駆けて腫瘍内に放射線増感剤を蓄積し、放射線単体で用いるより低線量の放射線を増感することで、腫瘍周囲の正常細胞に対する負荷を最小に抑えてがん細胞を傷害することができるものである。

放射線増感剤には大きく分けて二つの作用機序があり、一つは、腫瘍細胞の放射線抵抗性を解消し、通常の放射線治療の効果を期待するもので、酸素分圧を上げるために過酸化水素が用いられることがあるほか、2-ニトロイミダゾール誘導体が低酸素性細胞放射線増感作用を有することが知られている。もうひとつは、金属ナノ粒子を蓄積して放射線を照射し、重金属元素と放射線の相互作用で生じるオージェ電子などの二次電子線でDNAのDSB(Double Strand Breaks)を誘導し、細胞を死滅させるものである。

本研究グループで用いている過酸化チタンナノ粒子(PAA-TiOx)は、二酸化チタン粒子にポリアクリル酸(PAA)を修飾して血中で高分散化させたのち、過酸化水素を機能化させることによって得られる粒子であり、過酸化水素をデリバリーすることのできる世界初の粒子である。現在までに当研究グループでは先行研究において、担癌マウスに尾静脈投与されたPAA-TiOxはすい臓がん腫瘍に一定の蓄積し、放射線感受性を高め縮小を促したことをin vivoにて示している⁶。PAA-TiOxの機能性は粒子表面に吸着したH₂O₂と放射線により生じる活性酸素(ROS)に起因すると考えられている。しかしながら、PAA-TiOxは腫瘍のほかに肝臓を始めとした他の臓器にも蓄積が見られることがわかった。このことから、TiOxの過酸化水素の徐放性を有しつつも、その送達方法を最適化する必要があった。

標的器官へのナノ粒子に集積を促すことは、治療効果の最大化を促すだけでなく、正常組織へのナノ粒子の分配を回避できることから、正常組織への毒性を減少させることに繋がる。腫瘍へのナノ粒子の送達方法は大きく分けて2段階に分類され、受動的ターゲティングと、受動的ターゲティングの機構に基づいた能動的ターゲティングがある。

受動的ターゲティングとは、正常組織にはなく腫瘍組織だけが持つ enhanced permeability and retention (EPR) 効果の恩恵を活用したナノ粒子の受動的集積の促進方法である。がん細胞は自らを増幅するためだけに活動するので、腫瘍組織を形成する際に血管新生因子を過剰に発生し無秩序な血管を新生する。こうして作られた血管は潤沢な栄養を腫瘍細胞に供給するが、血管上皮細胞が完全に密でなく、数百 nm の物質でも透過してしまう。これを EPR 効果と呼ぶが、この効果により 50-200nm のナノ粒子は表面に腫瘍標的分子等を修飾しなくても、全身投与するだけで受動的に腫瘍組織に蓄積しやすくなるとされている。この EPR 効果の恩恵を用いたナノ粒子の受動的集積はガン腫瘍へのターゲティングの基本戦略である。しかしながらこれらの戦略のみでは、ナノ粒子の十分な腫瘍蓄積が困難である場合がある。そこで、EPR 効果によりガン腫瘍に到達するナノ粒子に対し、抗体、タンパク質、ペプチド、核酸、糖、およびビタミンなどの小分子でナノ粒子表面を機能化することで、ナノ粒子の腫瘍内滞留性をさらに促進させる手法である。この手法を能動的ターゲティングと呼ぶ。

ガン腫瘍への能動的ターゲティングのレセプターの一つとしてグルコーストランスポーター (GLUT) が挙げられる。GLUT ががん細胞で過剰発現するメカニズムは、好氣的解糖またはワーブルグ効果と呼ばれる、がん細胞が有酸素下においてもミトコンドリアによる酸化的リン酸化より、解糖系によって ATP を生産する現象に起因する。酸化的リン酸化の場合グルコース 1 分子から 36 分子の ATP を得ることができるが、解糖系ではわずか 2 分子しか得ることができない。つまりがん細胞は正常細胞と比較しより多くのグルコースを必要とする。そのため、グルコースの取り込みを増加させるために、多くのがん細胞はグルコーストランスポーターを過剰発現させるに至る。特に GLUT1 の発現は膵臓や幹細胞など多くの腫瘍細胞で確認されており、ドラッグデリバリーのターゲットとして多くの研究が行われている。これまでの研究において GLUT1 はグルコースだけでなく、ガラクトースやマンノースなど様々な糖及びその誘導体をリガンドとして認識しており、ナノ粒子にそれらの糖を修飾し、能動的ターゲティングを目指す研究が活発となっている。しかし、金属ナノ粒子を分散させるためによく使用される高分子修飾剤を糖官能化するには複数の複雑なステップが必須であり、簡潔なステップで糖官能化を達成する技術開発が必要とされている。

2. 研究の目的

ナノ粒子の機能素材の表面修飾の手法として近年ポリフェノール配糖体が注目されている。その中で、本研究で着目した α -Glucosylrutin (RutinG) はフラボノイド系フラボノール類のケルセ

チン(Quercetin)配糖体であるルチン(Rutin)を、糖転移酵素を用いることでグリコシル化した物質である。Quercetin はベンゼンの隣り合う 2 つの水素がヒドロキシ基に置換された構造であるカテコール基を有している。このいくつかのポリフェノールが持つカテコール構造は、Israelachvili らによって、水中において様々な金属、セラミック、合成ポリマー表面に付着することが明らかとなっている。また、RutinG はグリコシル化によって高い水溶性を有しており、水中で難溶性の食品添加物を包むようなナノクラスターを作製し、分散性を高める働きがあると明らかになっている。更に、RutinG で金ナノ粒子をコーティングした粒子に、グルコシド及びマンノシドに対して特異的吸着を見せるコンカナバリン A の優先的な吸着が確認されている。これらの事例から、RutinG は TiO_x NPs の水系溶媒中の分散性の確保による EPR 効果の適用と、グルコシド及びマンノシド部分による GLUT1 標的能力を付与できる修飾剤として活用できると考えられる。

本研究では過酸化水素を徐放する TiO_x NPs の新たな修飾剤を検討することで、がん腫瘍への能動的ターゲティングを達成し、放射線増感効果の増大と生体毒性の減少を目指している。そのため本研究では、TiO_x NPs の分散性の担保と TiO_x NPs のがん腫瘍内滞留性を向上させるため、 α -Glucosylrutin (RutinG)を修飾剤として検討した。RutinG でコーティングされた二酸化チタンナノ粒子をワンステップで調製し、H₂O₂ を機能化させることによって RutinG 修飾過酸化チタンナノ粒子(RutinG-TiO_x NPs)の調整を目指した。次に、PAA-TiO_x NPs と RutinG-TiO_x NPs の過酸化水素放出量や粒径等のドラッグデリバリーに関わる特性を比較し、TiO_x NPs の修飾剤として RutinG が有効であるかを検討した。そして、RutinG 修飾による TiO_x NPs の GLUT1 選択性の有無を検討し、RutinG-TiO_x NPs が能動的ターゲティングを行うことができる放射線増感剤として有用であるかを評価することを目的とした。

3. 研究の方法

3. 1 RutinG 修飾過酸化チタンナノ粒子の作製

1. RutinG 100mg を蒸留水 49.5 ml に溶かした水溶液に TiO₂ NPs 0.5 ml をマグネチックスターラーで攪拌しながら加えた。
2. 3,000 MWCO の限外ろ過フィルターに移し、蒸留水で限外ろ過(5,000×g, 30 min)を 5 回行った。
3. その後 PBS を添加し、分散した黄色の懸濁液を RutinG-TiO₂ NPs とした。
4. 作製した RutinG-TiO₂ NPs に 30 wt%の過酸化水素を 1 ml 添加した。
5. 3,000 MWCO の限外ろ過フィルターに移し、蒸留水で限外ろ過(5,000×g, 30 min)を 5 回行った。
6. その後蒸留水を添加し分散した黄色の懸濁液を RutinG-TiO_x NPs とした。

3. 2 PAA-TiO_x NPs 及び RutinG-TiO_x NPs の構築

1. DMF 48.75 ml と PAA(Mw=1,800)を 180 mg または PAA(Mw=5,000)を 500 mg の混合溶液に TiO₂ NPs 1.25 ml を添加し十分攪拌した。
2. 混合溶液を水熱反応用密閉容器 HU-50 に入れ、150 °Cを 5 時間反応させポリアクリル酸修飾を施した。
3. 反応容器を水に入れてクエンチングした後、アセトン 150 ml に反応液を添加し遠心分離(5000×g, 20 min)を行い、上澄みを取り除いた。
4. 粒子にエタノールを 150 ml に添加し、遠心分離(5000×g, 10 min)により、上澄みを取り除いた。
5. この洗浄後の粒子に 10 ml の蒸留水を加え分散させた後、30 wt%の過酸化水素を 2.5 ml 添加した。10,000 MWCO の限外ろ過フィルターに移しこれを蒸留水で限外ろ過(5,000×g, 30 min)を 5 回行った。
6. 限外ろ過で得られた懸濁液に遠心分離(10,000 rpm, 30 min)を行い、上澄みを取り除いてから 12 ml の蒸留水を加えた。
7. 超音波洗浄機で 30 min 分散させたのち、ここで得られた淡黄色の懸濁液を PAA-TiO_x NPs (Mw=1,800, 5,000)とする。
8. RutinG を 100 mg 蒸留水 35 ml に溶かした溶液に、PAA-TiO_x NPs (Mw=1,800, 5,000)を 0.5 ml 攪拌しながら加える。
9. 3,000 MWCO の限外ろ過フィルターに移し、蒸留水で限外ろ過(5,000×g, 30 min)を 5 回行った。
10. 得られた黄色の分散液を RutinG+PAA-TiO_x NPs(Mw=1,800, 5,000)とした。

4. 研究成果

4. 1 粒子作製

TiO₂ NPs を中性付近の水系溶媒中で分散させるために必要な RutinG 量を確認することを目指した。そこで、20 mg の TiO₂ NPs に対し、RutinG を様々な濃度で添加した混合液を、PBS で

1 mg/ml になるように希釈し、24 時間後の混合液の様子を確認した。そこで、7 mg 以上の RutinG を添加した系において 24 時間後も沈殿が生じないことが分かった(Fig. 1)。以後、RutinG/ TiO₂ の質量比が 7/20 以上になるように RutinG を添加することとした。

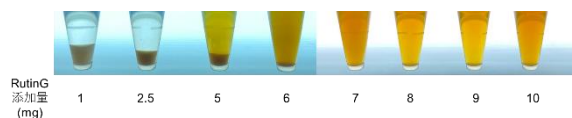


Fig. 1 Images of NPs dispersion and precipitation when RutinG was added to 20 mg of TiO₂ NPs at various concentrations.

次に、RutinG- TiO₂ NPs に過酸化水素を添加し TiO₂ の過酸化を目指した。RutinG- TiO₂ NPs を蒸留水または PBS で分散させた液に対し H₂O₂ を添加した場合、蒸留水で分散させた粒子は直ぐに沈殿が生じたのに対し、PBS で分散させた粒子は沈殿が生じなかった(Fig. 2)、これは分散液の pH に起因すると考えられる。30 wt%の過酸化水素水の pH は 3~4 付近であるため、過酸化水素水を粒子分散液に添加した場合、分散液の pH は酸性に近づく。RutinG のグルコシドは pH が中性付近で水溶性が高いことから、分散液が酸性になった場合分散力が弱まり、凝集が生じてしまうと考えられる。しかし、PBS 中に粒子を分散させた場合は PBS の緩衝効果により、過酸化水素水を添加した場合でも pH が中性付近に保たれるため、凝集することなく TiO₂ NPs の過酸化を進めることができると推測される。

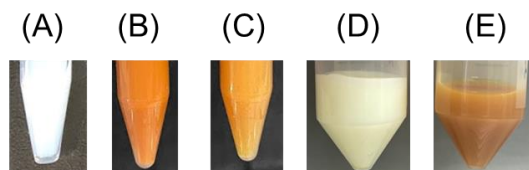


Fig. 2 Images of NPs dispersion liquid. (A) TiO₂ NPs, (B)RutinG- TiO₂ NPs, (C)RutinG-TiO_x NPs, (D)PAA-TiO_x NPs (Mw=5,000), (E)RutinG+PAA-TiO_x NPs (Mw=5,000)

4. 2 修飾粒子の過酸化水素吸着脱着の検証

これまでの研究において PAA-TiO_x NPs は過酸化水素で処理することで H₂O₂ を吸着し、周囲に H₂O₂ がない環境に移されると吸着した H₂O₂ を徐放することが明らかとなっている。そこで、本研究では RutinG- TiO₂ NPs に吸着・脱着する H₂O₂ 量を測定した。それにより、修飾剤による TiO₂ NPs の H₂O₂ の吸着・脱着への影響と、PAA-TiO_x NPs と比較した RutinG-TiO_x NPs の放射線増感剤としての効能について議論する。

24 時間後の過酸化水素を添加した PAA- TiO₂ 及び RutinG- TiO₂ NPs 分散液のろ液から、それぞれ 608, 206 $\mu\text{mol/g}$ の H₂O₂ が検出された。48 時間後もほぼ同様の結果が得られたことから、定常状態になったと判断した。24 時間のろ液の H₂O₂ 量から、PAA- TiO₂ 及び RutinG- TiO₂ NPs に吸着した H₂O₂ 吸着量は、390, 795 $\mu\text{mol/g}$ と算出される。PAA- TiO₂ NPs と比較し、RutinG- TiO₂ NPs は約 2 倍量の H₂O₂ を保持していることになる。

脱着に関しては、先行研究と同様に粒子表面に吸着された H₂O₂ がすべて脱着することはない。24 時間後において PAA- TiO₂ 及び RutinG- TiO₂ NPs 分散液からはそれぞれ、827, 245 $\mu\text{mol/g}$ の H₂O₂ が透析液に放出されたことから、PAA-TiO_x 及び RutinG-TiO_x NPs からそれぞれ、220, 40 $\mu\text{mol/g}$ の H₂O₂ が脱着した計算となる(Fig. 3)。つまり、RutinG 修飾を施した場合、PAA 修飾に比べが不可逆的に吸着していることが明らかになった。この理由として PAA 修飾による

影響が挙げられる。KORTUCIIではヒアルロン酸ナトリウムおよびヒドロゲルの高い保水能力によって過酸化水素の分散と分解を遅延させ、腫瘍組織内の酸素濃度を維持することに成功している。ここで、架橋された PAA はヒドロゲルの原料の一つであることに着目した。本研究で用いた PAA は架橋されていないものの、RutinG と比較すればゲルとしての性質を有していると考えられる。つまり、PAA-TiOx NPs に吸着したと考えられる過酸化水素の一部は、ゲル性の高い PAA にトラップされており、TiO₂ と反応していないため可逆的な放出が可能であると推測できる。

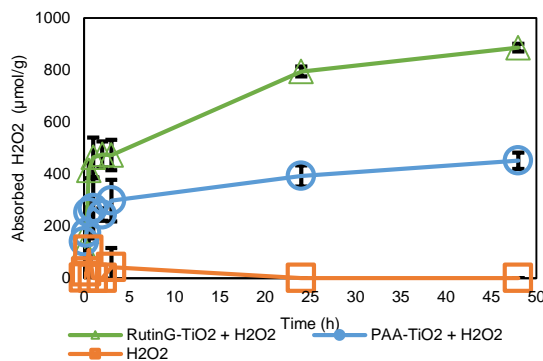


Fig. 3 Absorbed H₂O₂ concentration on titanium dioxide NPs when NPs and H₂O₂ were mixed in 1 mg/ml and 1000 μM, respectively. Data represent the mean ± STDEV derived from three series of individual experiments.

4. 3 *in vitro* における各修飾粒子の放射線増感効果の比較

これまでの研究で、*in vitro* において過酸化水素と放射線による細胞傷害における相乗効果を調べるうえで、コロニーアッセイ法が用いられてきた。コロニーアッセイでは決まった数のターゲット細胞をシャーレに播種し、接着を確認したのち放射線照射の処置を施す。その後細胞をはがし、新しいプレートにて再播種する。再播種された生細胞がコロニーを形成するのでエチレンブルーで染色を行い、計数する。このとき数えられたコロニー数によって **Plating efficiency(PE)** 及び **Survival Fraction(SF)** を算出する。SF は過酸化水素と放射線の処置を施した際のターゲットがん細胞生存率を示し、低いほどこの処置による細胞毒性が高いと考えることができる。

先行研究において、放射線照射のみの系に比べ PAA-TiOx NPs を添加し放射線照射を行った系において細胞生存率が大きく減少したことを示している。本研究では、RutinG 修飾による放射線増感効果への影響と、PAA-TiOx NPs 及び RutinG-TiOx NPs の放射線増感効果の差異を検証すべく、コロニーアッセイを行いその細胞生存率を算出・比較した。RutinG-TiO₂ 及び RutinG の SF の値が、Control の値と差異がなかった。つまり、RutinG は放射線治療効果に影響を及ぼさないことが分かった。

RutinG が持つ抗酸化作用によって放射線防護効果があると言われているが、TiOx 表面に付着した RutinG の量では放射線防護効果は現れないと考えられる。また、RutinG-TiOx と PAA-TiOx NPs では PAA-TiOx NPs の SF がより小さな値を示したことから、PAA-TiOx NPs の方がより高い放射線増感効果を示すことが分かった。この結果を過酸化水素徐放性の結果と照らし合わせて考えると、RutinG-TiOx よりも多くの過酸化水素が徐放される PAA-TiOx NPs は、より高い放射線増感効果を示したことが説明できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 K. Morita, Y. Nishimura, S. Nakamura, Y. Arai, C. Numako, K. Sato, M. Nakayama, R. Sasaki, C. Ogino, A. Kondo	4. 巻 198
2. 論文標題 Direct delivery of hydrogen peroxide into tumor cells using titanium oxide nanoparticles as radiosensitizers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloids Surf. B Biointerfaces.	6. 最初と最後の頁 111451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.colsurfb.2020.111451	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 M. Salah, H. Akasaka, Y. Shimizu, K. Morita, Y. Nishimura, H. Kubota, H. Kawaguchi, T. Sogawa, N. Mukumoto, C. Ogino, R. Sasaki	4. 巻 41(1)
2. 論文標題 Reactive oxygen species-inducing titanium peroxide nanoparticles as promising radiosensitizers for eliminating pancreatic cancer stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-022-02358-6	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
研究分担者	明石 昌也 (Akashi Masaya) (40597168)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	
研究分担者	西村 勇哉 (Nishimura Yuya) (40728218)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・客員准教授 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	筧 康正 (Kakei Yasumasa) (70772896)	神戸大学・医学部附属病院・特命講師 (14501)	

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