

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月9日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500444

研究課題名（和文） 音響科学活性を有するナノ微粒子を利用した腫瘍組織選択的がん治療法の開発

研究課題名（英文） Study on the sonodynamically induced antitumor effect of nano particles

研究代表者

弓田 長彦 (YUMITA NAGAHIKO)

横浜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40191481

研究成果の概要（和文）：超音波と併用することにより殺細胞効果が発現、または増強されるナノ粒子をスクリーニングした結果、フラーレン、水酸化フラーレン及びトリスフラーレンで優れた増強効果を認めた。活性酸素種消去剤添加の殺細胞作用に対する効果と ESR による活性酸素種の測定から、殺細胞作用機序における一重項酸素の関与を確認した。水酸化フラーレンを用い、マウス皮下に移植した実験腫瘍（Colon26）を対象に、音響化学療法の効果調べた。水酸化フラーレンを直接腫瘍に注入後超音波照射を行った。薬物・超音波それぞれ単独では効果を生じない投与量と強度において腫瘍の増殖を抑制できることが確認された。この結果から in vivo においてもフラーレン誘導体が音響化学的に抗腫瘍活性化されていることが示された。

研究成果の概要（英文）：The sonodynamically induced antitumor effect of fullerene derivatives such as pyrrolidine tris fullerenes (PTF) and polyhydroxy fullerenes (PF) was investigated. Both in vitro and in vivo antitumor effects were tested in combination with ultrasound at 2 MHz. The rate of ultrasonically induced damage on isolated sarcoma 180 cells in air-saturated suspension was enhanced by twice with 80 μ M fullerene derivatives. This enhancement was significantly inhibited by histidine, which may suggest it was mediated by ultrasonically induced oxidation. The coadministration of 25 mg/kg fullerene derivatives followed by ultrasonic exposure at 2 MHz suppressed the growth of implanted colon 26 tumors at an intensity with which ultrasound alone showed only a slight antitumor effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：医用システム・超音波医科学

キーワード：超音波、音響化学療法、ナノ粒子、フラーレン誘導体

1. 研究開始当初の背景

超音波は生体に対する深達性に優れるの

で、外部エネルギーとして用いれば、生体深部にある患部にも適用することができると

考えられる。さらに、超音波の音圧に感応して周波数特異的に共振するナノ微粒子でがん組織を標的化すると、このナノ微粒子が目的部位に集積したかどうかを超音波画像診断によって可視化し確認できる。そして、薬物の集積を確認した上で、超音波を照射し、ナノ微粒子を音響化学的に活性化させることで、抗腫瘍効果を発現することができる。また、細胞膜透過性の一過的増大による遺伝子等の標的細胞へのデリバリーも可能である。

2. 研究の目的

ドラッグデリバリーシステム(DDS)と、超音波などの外部エネルギーを用いた治療システムを融合することで、薬物放出機能や局所濃度の向上、細胞内誘導の促進が期待されている。本研究では、単独の技術的な限界を克服することを目的に、生体での深部到達性に優れる外部エネルギーである超音波と音響化学的に抗腫瘍活性化するナノ微粒子を組み合わせた新たな治療システムの開発を行うことを目的とする。ナノ微粒子として酸化チタンおよびフラーレン誘導体を用いることで、投与時には患部において超音波の物理エネルギーとナノ微粒子によるマイクロバブルを生成・破壊さらには、ナノ微粒子の抗腫瘍活性化作用を用いることにより、これまで困難であった腫瘍組織選択的ターゲットティングを目指すものである。

3. 研究の方法

本研究では、血管壁を漏出し腫瘍組織に到達可能で、超音波照射により抗腫瘍活性化するナノ微粒子を用いた腫瘍組織選択的がん音響化学療法の開発を目指す。ナノ微粒子には超音波によって音響化学的に活性化し超音波の音圧に感応して周波数特異的に共振する酸化チタンおよびフラーレン誘導体を用いる。最初に培養細胞を用いてこれらナノ微粒子の超音波による抗腫瘍活性化を確認する。次に腫瘍を移植した動物に、これらのナノ微粒子を投与し、ナノ微粒子が腫瘍組織において治療効果が得られる濃度に達した時点で患部に超音波を照射し、ナノ微粒子の音響化学的活性化による抗腫瘍効果の発現を確認する。最後に、ナノ微粒子の音響化学活性化機序における活性酸素種の関与および、細胞死におけるアポトーシス誘導の寄与を調べる。

4. 研究成果

超音波と併用することにより殺細胞効果が発現、または増強されるナノ粒子をスクリーニングした結果、フラーレン、水酸化フラーレン及びトリスフラーレンで優れた増強効果を認めた。活性酸素種消去剤添加の殺細胞

作用に対する効果とESRによる活性酸素種の測定から、殺細胞作用機序における一重項酸素の関与を確認した。水酸化フラーレンを用い、マウス皮下に移植した実験腫瘍(Colon26)を対象に、薬物の体内動態と音響化学療法の効果を調べた。水酸化フラーレンを直接腫瘍に注入後超音波照射を行った。薬物・超音波それぞれ単独では効果を生じない投与量と強度において腫瘍の増殖を抑制できることが確認された。この結果から *in vivo* においてもフラーレン誘導体が音響化学的に抗腫瘍活性化されていることが示された。最終年度にはナノ微粒子の活性化するための超音波を照射条件の詳細な検討とナノ微粒子の音響化学的活性化によるアポトーシスが誘導されることを確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Yumita N, Iwase Y, Nishi K, Ikeda K, Onodera K, Fukai T, Umemura S, Momose Y. Apoptosis of HL-60 Cells Induced by Sonodynamic Therapy with Zinc Phthalocyanine Tetrasulfonate. *Pharmacometrics*, 82, 75-83, 2012, 査読有
- ② Yumita N, Iwase Y, Nishi K, Komatsu H, Fukai T, Ikeda T, Umemura S, Momose Y. Involvement of Reactive Oxygen Species in Sonodynamically Induced Apoptosis by Novel Porphyrin Derivative, DCPH-P-Na(I). *Theranostics*, 2, 880-888, 2012, 査読有
- ③ Yumita N, Iwase Y, Nishi K, Ikeda T, Fukai T, Onodera K, Takeda K, Umemura S, Okudaira K, Momose Y. Involvement of Reactive Oxygen Species in Sonodynamically Induced Apoptosis by 4-formylloximeethylidene-3-hydroxyl-2-vinyl-deuterio-Porphyrinyl (IX)-6-7-diaspartic acid (ATX-S10). *Biochemistry & Analytical Biochemistry S2*, 2-7, 2012, 査読有
- ④ Yumita, N., Iwase, Y., Nishi, K., Ikeda, T., Komatsu, H., Fukai, T., Onodera, K., Nishi, H., Takeda, K., Umemura, S., Okudaira, K., Momose Y.: Sonodynamically induced antitumor effect of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6). *31, Anticancer Res*, 31, 501-506, 2011, 査読有
- ⑤ Yumita, N., Iwase, Y., Onodera, K., Nishi, H., Takeda, K., Fukai, T., Ikeda, T., Umemura, S., Okudaira, K., Momose Y: Sonodynamic Antitumor Effect of Zinc Phthalocyanine Tetrasulfate on Murine Solid Tumor colon 26, *Pharmacometrics*,

- 80,13-20, 2011, 査読有
- ⑥ Sugita, N., Iwase, Y., Yumita, N., Ikeda, T., Umemura, S.: Sonodynamically Induced Cell Damage by Rose Bengal Derivative, *Anticancer Res*, 30, 3361-3366, 2010, 査読有
- ⑦ Nishi, K., Fukunaga, N., Ono, T., Akuta, T., Yumita, N., Watanabe, H., Kadowaki, D., Suenaga, A., Maruyama, T., Otagiri, M.: Construction of an Expression System for Human $\alpha 1$ -Acid Glycoprotein in *E. coli*: the Roles of Oligosaccharide Moieties in Structural and Functional Properties, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 25, 200-207, 2010, 査読有
- ⑧ Yumita, N., Iwase, Y., Nishi, K., Ikeda, T., Umemura, S., Sakata, I., Momose, Y.: sonodynamically-induced Cell Damage and Membrane Lipid Peroxidation by Novel Porphyrin Derivative, DCPH-P-Na(I). *Anticancer Res*, 30, 2241-2246, 2010, 査読有
- ⑨ Yumita, N., Okudaira, K., Momose, Y., Umemura, S.: Sonodynamically Induced apoptosis and active oxygen generation by ATX-70, *Cancer Chemother Pharmacol*, 66, 1078-1076, 2010, 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 岩瀬由未子、弓田長彦、深井俊夫、武田収功、小野寺憲治、池田敏彦、梅村晋一郎、奥平和穂、百瀬弥寿徳、新規ポルフィリン誘導体 ATXS-10 の音響化学的活性化によるアポトーシス誘導、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28 日
- ② 岩瀬由未子、奥平和穂、梅村晋一郎、弓田長彦、Sonodynamically-induced apoptosis by novel porphyrin derivative, ATX-S10 in HL-60 cells、日本癌学会第 70 回学術総会、名古屋、2011 年 10 月 3 日
- ③ 岩瀬由未子、今泉貴博、茅優華、桜沢藍、弓田長彦、池田敏彦、深井俊夫、武田収功、小野寺憲治、西廣吉、奥平和穂、梅村晋一郎、百瀬弥寿徳、新規ポルフィリン誘導体 DCPH-P-Na (I) の音響化学的作用によるアポトーシス誘導、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28 日
- ④ 岩瀬由未子、奥平和穂、梅村晋一郎、弓田長彦、Sonodynamically-induced apoptosis by novel porphyrin derivative, DCPH in HL-60 cell、日本癌学会第 69 回学術総会、大阪、2010 年 9 月 28 日
- ⑤ 岩瀬由未子、杉田奈巳、弓田長彦、五十鈴川和人、西弘二、池田敏彦、マイクロバブルによるローズベンガル誘導体の音響化学的抗腫瘍効果の増強、日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月 30 日

[図書] (計1件)

- ① NEW パワーブック生物薬剤学第 2 版、青木正忠、伊賀勝美、岩城正宏、金尾義治、九川文彦、櫻井栄一、田中哲郎、鍋倉智裕、三嶋基弘、村上照夫、村上正裕、森本一洋、山崎啓之、弓田長彦、廣川書店、2011、分担

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弓田 長彦 (YUMITA NAGAHIKO)
 横浜薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：4 0 1 9 1 4 8 1

(2) 研究分担者

梅村 晋一郎 (UMEMURA SHIN-ICHIRO)
 東北大学・工学部・教授
 研究者番号：2 0 4 0 2 7 8 7
 岩瀬由未子 (IWASE YUMIKO)
 横浜薬科大学・薬学部・講師
 研究者番号：0 0 5 2 1 8 8 2