

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500569

研究課題名(和文)音響化学とナノ・マイクロ技術を融合した新規がん治療方法の開発

研究課題名(英文)Development of the new sonodynamic cancer therapy combined with nano or micro technology

研究代表者

岩瀬 由未子(Iwase, Yumiko)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00521882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超音波によって音響化学的に活性化され抗腫瘍効果を示すフラーレン誘導体のスクリーニングを行った。Sarcoma 180細胞に対する殺細胞作用は、polyhydroxy fullerenes (PHF) および pyrrolidine tris-acid fullerenesで著しく増強された。PHFを用いて超音波併用時マウスに移植したcolon 26腫瘍細胞の増殖抑制を確認した。この殺細胞作用増強に対する活性酸素の関与を活性酸素消去剤およびESRの測定により確認した。これらの結果から、水溶性フラーレン誘導体と超音波を併用した音響化学療法のがん治療への応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the sonodynamically induced antitumor effect of functionalized fullerenes. The antitumor effects of functionalized fullerenes in combination with ultrasound at 2 MHz were screened. The ultrasonically induced damage on isolated sarcoma 180 cells was enhanced significantly with polyhydroxy fullerenes (PHF) or pyrrolidine tris-acid fullerenes (PTF). In the experimental treatment, the combined with ultrasonic exposure and PHF inhibited the growth of the inoculated colon 26 tumors. The significant reduction by histidine of ultrasonically induced cell damage enhanced by PHF suggests that the enhancement was due to sonodynamic generation of active oxygen such as singlet oxygen by functionalized fullerenes. The involvement of singlet oxygen was also confirmed by ESR spectrometry. These results support the possibility of clinical application of sonodynamic treatment using water soluble functionalized fullerene.

研究分野：人間医工学

科研費の分科・細目：医用システム

キーワード：アポトーシス ドラッグデリバリーシステム ナノ粒子 マイクロ微粒子 超音波

1. 研究開始当初の背景

超音波は、生体に対し低侵襲的かつ深部到達性に優れており、照射強度の調整により超音波到達部位までの距離を比較的容易に調節可能である。また、超音波は放射線と異なり、治療の際、必要に応じて繰り返し照射可能である。

超音波を水溶液中に照射することにより微小気泡が発生し、気泡内部に超音波のエネルギーを瞬時に蓄積し、次いで崩壊するキャピテーション現象が生じる。この気泡崩壊の際の衝撃波および局所的高温・高圧の結果として物理的作用・化学的作用が生じる。また、この気泡崩壊の際、様々な活性酸素種が生成される。これらの活性酸素種も細胞障害性を有している。このため、超音波単独で殺細胞効果を生じる強度の超音波であると、正常細胞も障害を受けることになる。これが、副作用の一因となっている。しかし、正常細胞に影響の出ない超音波強度では、殺細胞効果が減弱してしまう。これまでに、マイクロバブルの併用によりキャピテーションが誘導され、殺細胞効果が増強することが知られている。そこで、がん細胞選択的な殺細胞効果を増加させるため、超音波単独では殺細胞効果持たない条件下、音響化学的に活性化される薬剤の併用を検討してきた。現在の抗がん剤を用いた治療は、薬剤によるがん細胞への障害作用は強いが、薬物の腫瘍集積性が低いという問題点を抱えている。強い細胞障害性を有する抗がん剤は、分化速度の速いがん細胞に優位に作用するが、正常細胞も薬剤に暴露されることにより障害を受ける。そこで、抗がん剤ではなく、粒子径の小さいナノ粒子に着目した。細胞障害性を示さないナノ粒子を、細胞障害性を示さない強度の超音波と併用し、音響化学的にナノ粒子を活性化させ、殺細胞効果を発現させる。この実現は、腫瘍組織以外に存在する薬物の効果を無視できると考えられ、現在のがん治療における問題点を改善できる。そこで、超音波の特徴を生かした超音波と薬物の相乗作用による悪性腫瘍の治療方法を提案し、音響化学療法 (sonodynamic therapy) と名付け研究を行っている。

2. 研究の目的

現在のがん治療が抱える副作用の問題を回避したがん治療法を開発することを目的としており、超音波照射により音響化学的に抗腫瘍活性化するナノ粒子の同定、抗腫瘍効果の発現に關与する活性酸素種の確認、また、抗腫瘍効果を期待できるかについて検討した。

3. 研究の方法

単離腫瘍細胞を用いて超音波照射により音響化学的に活性化されるナノ粒子として

フラーレン誘導体のスクリーニングを行った。Sarcoma 180 細胞懸濁液にフラーレン誘導体を添加後、超音波を照射した。照射後の細胞生存率をトリパンブルー染色法および細胞の形態学的変化を顕微鏡にて観察した。

次に、音響化学的に活性化を受けたナノ粒子および超音波併用時に増強した殺細胞効果、殺細胞効果発現に活性酸素種生成の關与の有無を活性酸素種に特異的な阻害剤である、マンニトール、SOD、ヒスチジン、トリプトファン等を用いて阻害効果の評価および一重項酸素の発生を確認するため、一重項酸素に特異的なスピントラップ剤である 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy を用い生成されたスピニアダクト(4-oxo-TEMPO)を電子スピン共鳴 (ESR) により測定した。

さらには、固形腫瘍に対する水酸化フラーレンを併用した音響化学療法の抗腫瘍効果をマウス皮下に移植した Colon26 を用いて調べた。抗腫瘍効果の判定は、腫瘍の増殖抑制と HE 病理染色によって行った。

4. 研究成果

Sarcoma 180 cells を用いて *in vitro* で超音波併用により抗腫瘍効果が発現するかナノ粒子であるフラーレン誘導体でスクリーニングを行った結果、polyhydroxy fullerenes (PHF) および pyrrolidine tris-acid fullerenes (PTF) で優れた増強効果を認めた。この効果は、薬剤濃度に依存して増強された。またこの効果は、一定の超音波強度以上の強度領域でのみ認められたことにより、キャピテーションに特有の現象であるといえる。この結果から、薬剤活性化にキャピテーションが深く關与することが示唆された。これらのことから、*in vitro* においてフラーレン誘導体が音響化学的に活性化し、抗腫瘍効果を発現することが示された。超音波キャピテーションには、物理的作用と化学的作用とがある。化学的作用には活性酸素種生成が考えられるため、活性酸素種除去剤添加時の殺細胞作用に対する変化を検討した。この結果、ヒドロキシラジカルの消去剤であるマンニトールおよびスーパーオキシドラジカルの消去剤である SOD の添加は、超音波および薬剤併用時の殺細胞効果に対し、有意な抑制作用を示さなかった。一方、一重項酸素の消去剤であるヒスチジンの添加時は、著しい殺細胞効果抑制を示した。これにより、超音波および薬剤併用時に観察された殺細胞作用は一重項酸素の発生によるものであることが示唆された。さらに、超音波が照射された水溶液中に生成する一重項酸素を特異的なスピントラップ剤を用いスピニアダクトである 4-oxo-TEMPO を電子スピン共鳴 (ESR) により測定できたことから、一重項酸素生成が確認された。一重項酸素の生成の確認および消去剤による阻害効果が確認されたため、超音波および PHF 併用時に観察された殺細胞

作用に一重項酸素が関与していると推定した。

PHF を用い、マウス皮下に Colon26 を移植し、この実験腫瘍を対象に薬物の音響化学療法の効果を調べた。PHF を直接腫瘍に注入後超音波照射を行った。超音波照射後の病理サンプルは HE 染色により評価した。超音波・PHF それぞれ単独では殺細胞作用を示さない条件下で PHF と超音波を併用することにより腫瘍の増殖を抑制できることが確認された。以上の結果から、in vivo において、PHF で音響化学的に抗腫瘍活性化されていることが示された。

In vitro および in vivo の結果、ナノ粒子の一つであるフラーレン誘導体の PHF と超音波との併用は発生した一重項酸素による殺細胞効果を発現し、抗腫瘍効果を示すことが確認された。このことから、ナノ粒子と超音波を併用した音響化学療法が、がん治療に有用であると考えられる。

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 7 件)

Iwase Y, Yumita N, Imaizumi T, Sakurazawa A, Kaya Y, Nishi K, Ikeda T, Umemura S, Chen F, Momose Y Sonodynamically Induced Anticancer Effects by Water-soluble Fullerene Derivative Drug Metabolism Reviews 45; 98-98, 2014

Yumita N, Iwase Y, Imaizumi T, Sakurazawa A, Kaya Y, Nishi K, Ikeda T, Umemura S, Chen F, Momose Y Sonodynamically Induced Anticancer Effects by Functionalized fullerenes Anticancer Res. 2013; 33:700-6, 2013. 査読有

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

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

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-formyloximeethylidene-3-hydroxyl-2-vinyl-deuterio-Porphynyl (IX)-6-7-diaspartic acid (ATX-S10). Biochemistry & Analytical Biochemistry S2, 2-7, 2012. 査読有

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). Anticancer Res. 31:501-6, 2011. 査読有

Yumita N, Iwase Y, Onodera K, Nishi H, Takeda K, Fukai T, Umemura S, Okudaira K, Momose Y, Sonodynamic Antitumor Effect of Zinc Phthalocyanine Tetrasulfate on Murine Solid Tumor colon 26, Pharmacometrics, 2011; 80: 13-20, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Nagahiko Yumita, Saeko Nakamura, Yumiko Iwase, Toshio Fukai, Toshihiko Ikeda, Shin-ichiro Umemura. Involvement of Reactive Oxygen Species in Apoptosis Induced by Sonodynamic Therapy with Chloroaluminum Phthalocyanine Tetrasulfonate, SFRBM's 20th Annual Meeting, 2013.11.19.-2013.11.26., サンアントニオ

Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase, Takahiro Imaizumi, Ai Sakurazawa, Yuka Kaya, Koji Nishi, Shin-ichiro Umemura, Fu-Shin Chen, Yasunori Momose, Yoshihiko Ikeda. Sonodynamically Induced Anticancer Effects by Functionalized fullerenes, 10th International ISSX Meeting, 2013.9.29.-2013.10.3., トロント

Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase, Koji Nishi, Toshihiko Ikeda, Toshio Fukai, Shin-ichiro Umemura. Sonodynamically Induced Antitumor Effect of Novel Porphyrin Derivative, 第73回世界薬学大会(FIP2013), 2013.8.31-2013.9.5., ダブリン

弓田長彦, 岩瀬由未子, 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, ATX-S10 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, 2012.3.29., 札幌

Yumiko Iwase, Kazuho Okudaira, Shin-ichiro
Umemura, Nagahiko Yumita, Sonodynamically
induced apoptosis by ATX-S10 in HL-60 cells,
日本癌学会, 2011.10.4., 名古屋

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩瀬 由未子 (IWASE YUMIKO)
横浜薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：00521882

(2)研究分担者

梅村 晋一郎(UMEMURA SHIN-ICHIROU)
東北大学・工学部・教授
研究者番号：20402787

弓田 長彦 (YUMITA NAGAHIKO)
横浜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40191481