

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：23500570

研究課題名(和文)音響化学的アポトーシス誘導作用を有する薬物を利用した選択的がん治療法の開発

研究課題名(英文) Study on selective cancer therapy using apoptosis induced by sonodynamically activated drug

研究代表者

深井 俊夫 (Fukai, Toshio)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10057755

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)：本研究では薬物の音響化学的抗腫瘍活性化によるアポトーシス誘導を応用したがん治療法の開発を目的とした。超音波と併用することによりアポトーシスが誘発を増強するポルフィリン誘導体をスクリーニングを行った結果、ポルフィーマーナトリウム、ATX-70、ATX-S10、NPe6、DCPH-Naなどのポルフィリン誘導体がアポトーシス誘導することが確認された。また、これら薬物と超音波との併用処置においてカスパーゼ3の活性化、DNAラダーの形成および活性酸素種の生成増加も認められた。一重項酸素の消去剤であるヒスチジンによるアポトーシス誘導の阻害から、アポトーシス誘導機序における一重項酸素の関与を確認した。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have been studying antitumor activation of porphyrin compounds by ultrasound. The present study aims to the application of sonodynamically induced apoptosis by porphyrin compounds for cancer treatment. Cells treated with ultrasound and porphyrin compounds such as Porphimer Sodium, ATX-70, ATX-S10, NPe6 and DCPH-Na clearly showed membrane blebbing and cell shrinkage. Also, DNA ladder formation and caspase-3 activation were observed in cells treated with ultrasound and porphyrin compounds but not in order treatments. In addition, the combination of porphyrin compounds and ultrasound enhanced nitroxide generation measured by ESR. Sonodynamically induced apoptosis, caspase-3 activation, and nitroxide generation were significantly suppressed by histidine. These findings suggest that ultrasonically generated reactive oxygen species such as singlet oxygen is an important mediator of sonodynamically induced apoptosis.

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 一重項酸素 活性酸素種 超音波 音響化学療法

1. 研究開始当初の背景

超音波は、人体という媒体に適用するとき、その波長と減衰係数の関係が適切であり、フォーカスにより十分に補償できる範囲の減衰である。このため、腫瘍が体表から離れた深部にあっても、これに対して適切な深さと大きさをもち、かつ、必要な強度をもつフォーカスを比較的容易に形成できる。

超音波は、音響キャビテーションと呼ばれる現象を介して音響化学効果を導くことが知られている。音響キャビテーションは、超音波のエネルギーを時間的および空間的に蓄積したのち一気に放出するようにはたらし、その結果として化学的效果を発生することが可能となる。すなわち、液体中の微小な気泡は、超音波音場による圧力変動に従って膨張収縮を繰り返しながら成長し、超音波に共振する程度の大きさ(1 MHz において数 mm)に達すると崩壊する。このとき、超音波周期よりはるかに短時間に、超音波波長よりはるかに小さな寸法の空間にエネルギーを放出すると考えられている。音響化学効果発生メカニズムとして最も有力なホットスポット説に従えば、気泡中の気体が、気泡が壊れるとき断熱的に圧縮されて数千度の高温が発生し、その高温により化学的效果を生ずると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、前述した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)と名付けた。がん細胞ではアポトーシス誘導能が、消失あるいは減弱しているために異常増殖すると考えられている。組織深部到達性に優れる超音波によって腫瘍集積性薬物を抗腫瘍活性化する音響化学療法によって腫瘍組織に局在的にアポトーシスを誘導することが可能であれば、ネクローシスを経由しない副作用の少ないがん治療が期待される。本研究では、これまでの技術では困難であった腫瘍組織に選択的にアポトーシスを誘導することを目的に、超音波照射により音響化学的に活性化しアポトーシスを誘導する薬物を用い腫瘍選択性を備えた新規がん治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

最初に、超音波単独、またはポルフィリン誘導体との併用による抗腫瘍効果を、培養細胞で確認する。超音波と併用することにより殺細胞効果が発現、または増強されるポルフィリン誘導体をスクリーニングした。殺細胞効果の判定は、細胞膜の色素透過能に基づくトリパンブルー排除法とミトコンドリア内の酵素活性に基づく XTT アッセイ法によって行った。さらに活性酸素種に特異的な消去剤による阻害効果によりそれらの殺細胞作用における寄与を見積もった。超音波単独、

または薬物との併用によるアポトーシス誘導を、培養細胞で確認した。超音波と併用することによりアポトーシスを誘導、または誘導を増強する薬物をスクリーニングする。アポトーシス誘導の判定は、蛍光顕微鏡による形態変化の観察、DNA 断片化のアーガロース電気泳動による検出とカスパーゼ3の活性化によって行った。また、アポトーシスを誘導した細胞では、細胞膜リン脂質の非対称性の喪失がみられ、細胞膜の内側に存在する負電荷をもった phosphatidylserine(PS)が外側に転移する現象が認められる。今回の実験では Annexin V が PS が細胞表層に露出したアポトーシス細胞のみに結合ため、FITC 標識した Annexin V と PS の結合をフローサイトメーターで測定しアポトーシス細胞の検出を行った。Annexin V と PI の 2 重染色を利用することによって、早期のアポトーシスと後期のアポトーシスを区別した。

アポトーシス誘導におけるシグナル経路の同定を目的としてエフェクター・カスパーゼであるカスパーゼ-3 とイニシエーター・カスパーゼであるカスパーゼ8 および9の活性化を経時的に測定を行った。カスパーゼ-3、8 および9の阻害剤添加によるカスパーゼ-3、9 および8の活性化とアポトーシス誘導に対する阻害効果を調べた。

4. 研究成果

超音波と併用することによりアポトーシスが誘発を増強するポルフィリン誘導体をスクリーニングを行った。アポトーシスの誘発の判定は、形態観察により行った。ATX-S10、ポルフィーマーナトリウム、レザフィリン及び新規ポルフィリン誘導 DCPH などのポルフィリン誘導体がアポトーシス誘導することが確認された。また、これらのポルフィリン誘導体において電気泳動による DNA ラダーの形成、アポトーシス実行カスケードであるカスパーゼ3の活性化が認められた。形態観察および DNA 断片化のラダーの検出から上述した4種類のポルフィリン誘導体がアポトーシス誘導することが確認されたので、本年度は、超音波強度と薬物濃度を変化させ形態観察および DNA 断片化により、ポルフィリン誘導体のアポトーシス誘導を比較した。アポトーシス誘導には濃度および超音波強度依存性が認められた。アポトーシス誘導はある一定の強度(閾値)以上超音波を照射した時に認められた。

超音波の作用には物理作用と、キャビテーションを介して発生する活性酸素種による化学作用とがあると推定されるため、活性酸素種消去剤添加のアポトーシス誘導に対する影響を検討した。OH ラジカルの消去剤であるマンニトールとスーパーオキシドラジカルの消去剤である SOD の添加は併用によるアポトーシス誘導に対し有意な抑制作用を示さなかったのに対し、一重項酸素の消去剤であるヒスチジンの添加が、超音波とポ

ルフィリン誘導体併用処置のアポトーシス誘導を著しく抑制することを認め、アポトーシス誘導機序における一重項酸素の関与を確認した。次にアポトーシス誘導におけるシグナル経路の同定を行う目的でイニシエーター・カスパーゼであるカスパーゼ8および9の活性化を経時的に測定したところこれらの活性化が認められた。

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 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-Porphyrinyl (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

深井 俊夫 (FUKAI TOSHIO)

横浜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：10057755

(2)研究分担者

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

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