

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011

課題番号：23659197

研究課題名（和文） 体内の低酸素領域の分布と酸素分圧の定量化に向けた新たな MRI 造影剤の開発

研究課題名（英文） Development of a novel MRI contrast medium toward detection of hypoxic lesions and quantification of partial oxygen pressure

研究代表者 福本 学

(FUKUMOTO MANABU)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60156809

研究成果の概要（和文）：

がんの根絶には、低酸素細胞を標的としたがんの診断と治療法の確立が必要である。虚血低酸素状態に絞って、詳細な組織の様子を個体に侵襲を加えることなく経時的に観察する MRI 用血管造影剤となる酸化鉄ナノ粒子を開発し、その応用を図ることを目的とした。ヒト腫瘍培養細胞において低酸素にすると酸化鉄ナノ粒子は還元された細胞内に取り込まれ、殺細胞効果を現した。殺細胞効果については期待以上の効果が得られたため、今後その機構を解明するとともに、マウスへの移植腫瘍を用いた実験によって MRI 造影剤としての性能評価を行う。

研究成果の概要（英文）：

In order to eradicate cancer, we need establish diagnostic and therapeutic methods specially targeting hypoxic lesions. We intended to develop contrast medium for MRI composed of oxide iron nanoparticles which can seek for hypoxic lesions. In vitro study that these nanoparticles were ingested into cancer cells under hypoxic conditions and revealed cytotoxic property. Using transplanted tumors into mice, we will evaluate the in vivo potential of the oxide nanoparticles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：低酸素、ナノ粒子、MRI、がん幹細胞、がん治療

1. 研究開始当初の背景

日本人の二人に一人ががん罹患する時代となって、がん征圧は人類の悲願である。近年、がん組織は一様ながん細胞からなっているのではなく、少数のがん幹細胞と、それから派生するがん細胞からなっていること、がん幹細胞の根絶が治療の成否に関わることが明らかとなってきた。がん組織では正常組織に比べて極端な低酸素の部分が混在し、そこにがん幹細胞が潜在すると考えられている。また、血流が悪いと化学療法剤が送達しにくかったり、虚血によって腫瘍の悪性度の増悪や転移の亢進が起こるとされている。このように、腫瘍の低酸素領域の存在は、予後

決定に大きな問題となるが詳細は不明である。そのため、がんの根絶には、低酸素細胞を標的としたがんの診断と治療法の確立が必要である。

2. 研究の目的

組織の血流を時間的空間的に観察するためには MRI (magnetic resonance imaging) がある。本研究の目的は、虚血低酸素状態に絞って、詳細な組織の様子を個体に侵襲を加えることなく経時的に観察する MRI 用血管造影剤を開発し、その応用を図ることである。毒性の低い酸化鉄 (Fe_2O_3 , Fe^{3+} のみ) が Fe_3O_4 (Fe^{3+} と Fe^{2+} の混合状態) にな

ると磁性を発現し MRI の造影効果があがると考え、酸化鉄 (Fe_2O_3) ナノ粒子を合成した。さらに、低酸素集積性と殺細胞効果を持つ有機分子を複合化した鉄ナノ粒子を作成した。本研究では、我々が作成した鉄ナノ粒子を、培養ヒトがん細胞を用いて評価した。

3. 研究の方法

(1) がん幹細胞の濃縮

ヒト肝がん細胞株 HepG2 とヒトグリオーマ細胞株 A172 に 0.5Gy の X 線を 12 時間毎に 2 ヶ月半分割照射し、放射線耐性のがん幹細胞を濃縮した。がん幹細胞の細胞表面マーカー分子 CD133 の発現を抗 CD133 抗体で検出し、フローサイトメーターで定量し、濃縮度が 90%以上であることを確認した。

以下の実験は、親株細胞 HepG2 と A172 とそれぞれのがん幹細胞を用いて解析を行った。

(2) 鉄の測定

酸化鉄ナノ粒子をろ過滅菌し、5.27ug を培養液に加え、通常酸素状態と低酸素状態 (1% O_2) で 24 時間培養し、細胞内への鉄の取り込みを検討した。細胞外の鉄は、細胞膜非透過型の鉄キレート剤デフェロキサミンで洗浄し、取り除いた。鉄はフェナントロリンで比色し、吸光度計で 510nm の吸光度を測定し、求めた。標準線は、既知の濃度の第 1 鉄イオン標準液を使用して作成した。

(3) 鉄の染色

鉄染色剤 phen green SK で染色し、細胞内における鉄の局在を観察した。緑色の蛍光を持つ phen green SK は鉄と結合し、構造変化により蛍光を失う。細胞膜透過性の鉄キレート剤 (2,2-dipyridyl) の添加により、鉄は phen green SK から解離し、再び発色する。この蛍光の回復を利用し、細胞内の反応性を持つ鉄を検出した。

(4) 活性酸素 (ROS) の検出

ROS は、DCFDA 染色により検出した。蛍光を持たない還元型の DCFDA は ROS により酸化されることで発色する。DCFDA の酸化を指標に細胞内の ROS の量をフローサイトメーターで、定量した。

(5) 細胞死解析

細胞をエタノールで固定した。核をヘキストで染色した後、蛍光顕微鏡を用いて細胞の形態を観察し、死細胞を解析した。100 個以上の細胞を観察し、死細胞の割合を定量した。

(6) コロニーアッセイ

酸化鉄ナノ粒子の殺細胞効果をコロニー形成能を測定し、解析した。

4. 研究成果

我々は、酸化鉄ナノ粒子が低酸素集積性を持つかどうかを、ヒトがん細胞を用いて検討した。また、がん幹細胞、非がん幹細胞において低酸素集積性に違いが観察されるかどうかについての検討を行なった。鉄キレート剤デフェロキサミンで洗浄することで、細胞外の酸化鉄ナノ粒子の混入を抑制した。鉄アンモニウムをコントロールとして用いた結果、通常酸素状態においても、低酸素状態においても細胞内に鉄の蓄積は観察されなかった。一方、酸化鉄ナノ粒子は、低酸素状態において細胞内に蓄積されることを明らかにした。この酸化鉄ナノ粒子の低酸素集積性については、非がん幹細胞とがん幹細胞、どちらにおいても観察された。

この酸化鉄ナノ粒子は、以下の手法により合成を行った。回分式反応器を用い、硫酸鉄水溶液を 300°C、250 気圧の条件で加熱することで、酸化鉄ナノ粒子を含む生成物水溶液を得た。生成物水溶液を遠心分離処理し、固体成分を回収・洗浄することで酸化鉄ナノ粒子を得た。さらに本研究では、溶液中、細胞中での酸化鉄ナノ粒子の凝集を抑制するため、この表面に水溶性有機分子を結合させた。カテコール構造とカルボキシル基を持つ有機分子を硫酸鉄水溶液に溶解させ、同様の手法で酸化鉄ナノ粒子を合成することで、有機分子を表面に複合化させた酸化鉄ナノ粒子を合成した。

細胞内における酸化鉄ナノ粒子がキレートされているのかどうかを観察するために、反応性を持つ鉄を染色する鉄染色剤 Phen Green SK を用いて、細胞を染色した。通常酸素状態では、酸化鉄ナノ粒子を加えても Phen Green SK による染色は観察されなかった。一方、低酸素状態では、Phen Green SK による染色が観察され、酸化鉄ナノ粒子が細胞内でキレートされていない状態で存在することを明らかにした。染色は細胞内に均一に観察されることから、鉄の局在に特異性は観察されなかった。

フェントン作用で知られるように、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} は過酸化水素と反応し、それぞれヒドロキシラジカル、ヒドロキソドラジカルを発生する。これらのフリーラジカルは細胞に傷害性を持つ。酸化鉄ナノ粒子は、キレートされていない状態で存在することからフリーラジカルを生成し、殺細胞効果を持つことが期待される。酸化鉄ナノ粒子が、活性酸素(ROS)を生成するかどうかについては、DCFDA 染色により検討した。低酸素状態において特異的に鉄ナノ粒子により DCFDA の染色が観察されることから、低酸素細胞に集積した酸化鉄ナノ粒子が ROS を生成することを明らかにした。

酸化鉄ナノ粒子による細胞増殖への影響を解析した結果、低酸素において、酸化鉄ナノ粒子が細胞内に蓄積することで、細胞増殖が抑制されることを明らかにした。さらに、酸化鉄ナノ粒子の細胞毒性について、細胞死の解析とコロニーアッセイを行った。低酸素状態で酸化鉄ナノ粒子を取り込ませた細胞では、多くの細胞に核の形態異常が観察され、細胞死が誘導されることを明らかにした。顕微鏡下で観察から、酸化鉄ナノ粒子が誘導する細胞死はアポトーシスではなく、細胞分裂死であることが示唆された。さらに、コロニーアッセイにより、低酸素集積性の鉄ナノ粒子により、細胞の生存率が低下することを明らかにした。

以上の解析から、ヒトがん細胞を用いて本研究に用いた酸化鉄ナノ粒子の低酸素集積性と殺細胞効果を明らかにした。これらの作用は、培養系を用いて、がん治療で治療抵抗性のがん幹細胞においても有効であることを明らかにした。我々が作成した酸化鉄ナノ粒子はMRIにおける低酸素細胞のイメージングに利用できると同時に、殺細胞効果を有する。このため、低酸素がん細胞を標的とした治療に有効であることが期待される。

殺細胞効果については期待以上の効果が得られたため、今後その機構を解明する予定である。さらに、マウスへの移植腫瘍実験により、MRI造影剤としての性能を評価するとともに、生体内においても、同様の低酸素集積性、殺細胞効果を併せ持つのか検討を行う。

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 15 件、全て査読有)

- ① Shimura T, Noma N, Oikawa T, Ochiai Y, Kakuda S, Kuwahara Y, Takai Y, Fukumoto M: Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells. *Oncogenesis* 2012 (accepted for publication).
- ② 高橋 徹、阿部敬悦、麹菌を用いた生分解性プラスチックリサイクルシステム 月刊プラスチック (2012) in press
- ③ Tanaka M, Ishii K, Nakamura Y, Miyazato A, Maki A, Abe Y, Miyasaka T, Yamamoto H, Akahori Y, Fue M, Takahashi Y, Kanno E, Maruyama R, Kawakami K: TLR9-dependent activation of bone marrow-derived dendritic cells by URA5 DNA from *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 80: 778-786, 2012.
- ④ T. Togashi, S. Takami, K. Kawakami, H.

Yamamoto, T. Naka, K. Sato, K. Abe, T. Adschiri, "Continuous Hydrothermal Synthesis of 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic Acid-Modified Magnetite Nanoparticles with Stealth-Functionality against Immunological Response", *J. Mater. Chem.*, 22, 9041-9045, 2012.

⑤ M. Taguchi, S. Takami, T. Adschiri, T. Nakane, K. Sato, T. Naka, "Synthesis of surface-modified monoclinic ZrO₂ nanoparticles using supercritical water", *CrystEngComm*, 14, 2132-2138, 2012.

⑥ A. Sahraneshin, S. Takami, D. Hojo, K. Minami, T. Arita, T. Adschiri, "Synthesis of shape-controlled organic-hybridized hafnium oxide nanoparticles under sub- and supercritical hydrothermal conditions", *J. Supercrit. Fluids*, 62, 190-196, 2012.

⑦ Shimura T, Kakuda S, Ochiai Y, Kuwahara Y, Takai Y, Fukumoto M: Targeting the AKT/GSK3 β /cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway for eradication of tumor radioresistance acquired by fractionated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80 (2):540-8, 2011.

⑧ Shimura T, Kuwahara Y, Fukumoto M, Umata T: Activation of the EGFR, AKT and ERK1/2 by exposure to tritiated water in human tumor cells. *Fusion Sci Technol* 60 (3):1190-2, 2011.

⑨ Roudkenar MH, Halabian R, Bahmani P, Roushandeh AM, Kuwahara Y, Fukumoto M: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A new antioxidant that exerts its cytoprotective effect independent on Heme Oxygenase-1. *Free Radic Res* 45 (7):810-9, 2011.

⑩ Kuwahara Y, Oikawa T, Ochiai Y, Roudkenar MH, Fukumoto M, Shimura T, Ohtake Y, Ohkubo Y, Mori S, Uchiyama Y, Fukumoto M: Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy. *Cell Death Dis* 2:e177, 2011.

⑪ Uyama A, Kondoh T, Nariyama N, Umetani K, Fukumoto M, Shinohara K, Kohmura E: A narrow microbeam is more effective for tumor growth suppression than a wide microbeam: an in vivo study using implanted human glioma cells. *J Synchrotron Radiat* 18 (Pt 4):671-8, 2011.

⑫ Kinjo Y, Illarionov P, Pei B, Vela JL, Girardi E, Li X, Li Y, Imamura M, Rogers P, Uchiyama S, Khurana A, Ainge GD, Gibson D, Kawahara K, Nizet V, Yesilkaya V, Andrew P, Wong CH, Painter G, Kawakami K, Besra GS, Tsuji M, Zajonc DM, Kronenberg M:

Invariant NKT cells recognize glycolipids from pathogenic gram-positive bacteria. Nat. Immunol. 12: 966-974, 2011.

⑬ Yamamoto H, Abe Y, Miyazato A, Tanno D, Tanaka M, Miyasaka T, Ishii K, Kawakami K: Cryptococcus neoformans suppresses the activation of bone marrow-derived dendritic cells stimulated with its own DNA, but not with DNA from other fungi. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 63: 363-372, 2011.

⑭ 福本 学: 放射線病理学: トロトラスト症から. 病理と臨床. 29(7):761-8, 2011.

⑮ 桑原義和, 及川利幸, 落合泰史, 福本基, 栗原 愛, 野間直十, 大久保 恭仁, 志村勉, 福本 学: X 線照射後のがん細胞で見られる様々な細胞死. 放射線生物. 46(3):271-82, 2011.

[学会発表] (計 14 件)

① 高橋 徹, 阿部敬悦 糸状菌の界面活性タンパク質による生分解生プラスチックの新規分解促進機構とその応用, 日本化学会 92 春季年会 慶応大学日吉キャンパス 2012 年 3 月 28 日

② 高橋徹 村垣公英, 川上和義, 富樫貴成, 高見誠一, 阿尻雅文, 福本学, 阿部敬悦, 糸状菌由来免疫回避機能性素材を用いた新規医療用ナノ粒子の開発, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 22-26 日, 京都女子大学 (京都)

③ 福本 学 「X線蛍光分析法を用いて考察したトロトラスト沈着肝における代謝と発がんの関係」 ワークショップ: 量子ビームを用いた物質・生命科学の新展開 2011 年 12 月 20 日、21 日 仙台

④ 志村 勉 他 AKT 経路を標的としたがん幹細胞の放射線耐性の克服 日本放射線影響学会第 54 回大会 2011 年 11 月 17 日～19 日 神戸

⑤ 桑原 義和 他 臨床的放射線耐性細胞はなぜドセタキセルに耐性を示すのか? 日本放射線影響学会第 54 回大会 2011 年 11 月 17 日～19 日 神戸

⑥ 福本 学 脳腫瘍の放射線治療に伴う脳壊死 - 機序と対策 - 日本放射線腫瘍学会第 24 回学術大会 2011 年 11 月 17 日 神戸

⑦ 福本 学 放射線障害の病理学: トロトラスト症から臨床的放射線耐性へ 日本放

射線腫瘍学会第 24 回学術大会 (招待講演) 2011 年 11 月 17 日 神戸

⑧ Manabu Fukumoto Long incubation period of cancer induced by internal exposure is attributed to the uneven distribution of deposited radionuclides at the microscopic level The 6th International Symposium of Nagasaki University Global COE Program "Global Strategic Center for Radiation Health Risk Control" (招待講演) 2011, October, 20-22 長崎

⑨ 桑原 義和 他 Clinically relevant radioresistant cells are resistant to hydrogen peroxide 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日～5 日 名古屋

⑩ 福本 基 他 The effect of boron neutron capture therapy targeting tumor endothelial cells to clinically relevant radioresistant cell 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日～5 日 名古屋

⑪ 山本 陽一朗 他 Histological type of Thorotrast-induced tumors depends on the metabolic behavior of radionuclides 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日～5 日 名古屋

⑫ 福本 学 放射線被ばく総論 母子保健指導者研修会 (招待講演) 2011 年 9 月 18 日 盛岡

⑬ Fukumoto M et al. POS36-12. Clinically Relevant Radioresistant Cells are Established through Acquired Radioresistance by Exposure to Long-term Fractionated X-ray Radiation. 14th International Congress of Radiation Research 2011, August 28-September 1 Warsaw, Poland

⑭ Fukumoto M: The e-Pathologists Cancer Diagnosis Assistance System for Gastric Biopsy Tissues. 1st Congress of the International Academy of Digital Pathology 2011, August 3-5 Quebec City, Canada

[図書] (計 1 件)

福本 学: 放射線被ばくによる発癌: 特に内部被ばく発癌機構. 病気の分子形態学 (日本臨床分子形態学会編) 学際企画. 33-36, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福本 学 (FUKUMOTO MANABU)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60156809

(2) 研究分担者

高見 誠一 (TAKAMI SEIICHI)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：40311550

川上 和義 (KAWAKAMI KAZUYOSHI)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10253973

阿部 敬悦 (ABE KEIETSU)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：50312624

(3) 連携研究者

()

研究者番号：