

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592379

研究課題名(和文) 前立腺がん治療への応用を目指した磁性体ナノ粒子と関連遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of magnetic nanoparticles and the related gene for prostate cancer therapy

研究代表者

渡邊 昌俊 (Watanabe, Masatoshi)

横浜国立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90273383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、磁性体ナノ粒子を前立腺癌治療への治療展開を見据えた研究である。本研究で使用した磁性体ナノ粒子はマグネタイトナノ粒子(MgNPs)で、強い磁性力とヒドロキシルラジカルの生成が特徴であり、温熱療法や化学療法等を組み合わせた治療への応用が考えられる。同粒子と抗癌剤ドセタキセルの併用により、抗癌作用の増強を認めた。同粒子の表面をカルボキシル基修飾により、より分散能を向上させ、併用による抗癌作用の増強を認めた。非修飾MgNPsとカルボキシル基修飾MgNPsはROS産生の有無および標的が異なる事を明らかにした。ZyxinはROS産生によるstress fiber生成への影響の可能性を認めた。

研究成果の概要(英文)：Magnetite nanoparticles (MgNPs), have a unique property of superparamagnetism and reactive oxygen specimens (ROS) production, which can enhance the delivery and treatment efficiency of anti-cancer drugs. In this study, we have shown that in vitro enhanced effects of bare/surface modified MgNPs combined with docetaxel in comparison with docetaxel in prostate cancer cells via different mechanisms. In addition, effect of MgNPs on zyxin expression may be related with ROS production.

研究分野：腫瘍学、医工学

キーワード：前立腺癌 ナノ粒子 抗癌剤

1. 研究開始当初の背景

前立腺がんの基礎・臨床上的研究課題の一つは、ホルモン不応性獲得後の治療である。不応性獲得は前立腺がん患者に不幸な結末をもたらすことになる。化学療法等の更なる改善により、予後も変わりうると思われる。ナノテクノロジーを医学・医療に応用するナノメディシンもホルモン不応性獲得後の治療に寄与すると考えられる。ナノメディシンの一つの重要なツールがナノ粒子である。本研究グループは Fe_3O_4 磁性体ナノ粒子 (MgNPs) による前立腺癌細胞株における活性酸素種 (ROS) の生成が高い事を認め、活性酸素種増強を組み合わせた化学療法の可能性に着眼した。活性酸素種のさらなる増強は癌細胞を apoptosis に誘導する事は知られている。また、MgNPs による P-糖タンパク質の発現に影響するなど未知の機構が報告されている。抗がん剤ドセタキセル (DTX) に MgNPs を併用する事により、約 20% 程度の効果増強を得る事が判明した。また細胞内骨格に集積する事が判明した。MgNPs の DU145 細胞に曝露時に、ZYXIN (アクチン重合調節タンパク質) の発現に注目した。別実験では、Zyxin は脂肪細胞由来の conditioned medium (CM) では発現が上昇した。脂肪由来の CM では、DU145 細胞は増殖・浸潤能の亢進が認められた。同遺伝子はアクチン重合調節因子であり、細胞骨格に関係し、運動、抗癌剤感受性等に関連すると言われている。大腸がん、膀胱がんでは高発現しており、腫瘍マーカーとして報告されている。

2. 研究の目的

本研究は化学療法の効果の改善のために MgNPs の併用効果にかかわる機序の解析および MgNPs 曝露に関連する遺伝子の基礎的解析と診断・治療への応用展開を図る。具体的には、(1) MgNPs の抗がん剤感受性上昇の機構について解析、(2) カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子 (MgNPs-COOH) の効果と抗がん剤感受性の機構についての解析、(3) 前立腺がんにおける MgNPs 曝露と遺伝子 Zyxin の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 前立腺がん細胞株における抗がん剤ドセタキセル (DTX) および磁性体ナノ粒子 (MgNPs) 併用時の抗がん剤効果上昇の機構の解明: プレートリーダーやフローサイトメトリーを用いて、併用処理時の DU145 を中心に前立腺がん細胞株における cell viability, apoptosis, 細胞周期の解析を行う。また、併用処理時の前立腺がん細胞株における細胞膜損傷、ミトコンドリア膜損傷等の解析を行い、作用機序の解析を行った。

(2) 前立腺がん細胞株における DTX および MgNPs-COOH 併用時の抗がん剤効果上昇の機構の解明: (1) と同様に行う。

(3) 磁性体ナノ粒子曝露時における Zyxin 遺伝子の発現の確認: mRNA レベルでの発現

を検討する。

4. 研究成果

(1) MgNPs と MgNPs-COOH 曝露における前立腺癌への影響について: MgNPs と c-MgNPs の物理的性状として、平均 2 次粒子径とゼータ電位は、 226.1 ± 58.0 [nm], -12.0 [mV] と 85.2 ± 20.5 [nm], -64.3 [mV] であった。MgNPs の前立腺癌への影響として、細胞内 ROS 産生と 8-OHdG を測定した。前立腺癌細胞株 (DU145, PC-3, LNCaP) のいずれにおいても、曝露濃度依存的に ROS 産生は上昇し、8-OHdG 生成も同様であった。また、DU145 および PC-3 において、LNCaP より ROS 産生は高度であり、細胞株の種類により異なる事を認めた。しかしながら、各細胞株の cell viability は濃度依存的に減少するも、有意差は認めなかった。MgNPs-COOH の前立腺癌細胞株 DU145 への影響として、細胞内 ROS 産生を測定したが、曝露濃度を増加させても、ROS 産生は増加を認めなかった。表面修飾がナノ粒子の細胞毒性の一つの原因である ROS 産生を抑制出来る可能性を示唆したと思われる。

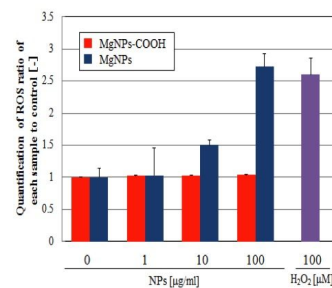


図1 MgNPs と MgNPs-COOH の細胞内 ROS 産生について

(2) MgNPs の抗がん剤感受性上昇の機構について解析: 既に MgNPs と DTX の併用により、DTX 単剤で処理した場合より、cell viability の低下、apoptosis の誘導を報告している。ROS 産生を介した効果の増強機構を考え、ミトコンドリア膜電位、細胞内カルシウムイオンの測定、NFκB タンパク質の発現について解析した。ミトコンドリア膜電位は、DTX 単剤に比べ、DTX および MgNPs 併用により、有意にミトコンドリア膜電位の低下を認め、ミトコンドリア膜損傷の可能性が考えられた。細胞内カルシウムイオンの測定も同様に DTX および MgNPs 併用時に増加を認めた。また、NFκB タンパク質の発現量は DTX および MgNPs 併用時に、濃度依存的に減少する事を認めた。これら結果より、DTX および MgNPs 併用は、ROS 産生を介したミトコンドリア膜損傷、ER ストレスの発生による内因性 apoptosis 経路の誘導と NFκB の発現量低下による生存シグナル経路の抑制と言う複合的な作用機序で、cell viability の低下、apoptosis の増加をもたらす、抗腫瘍効果の増強をもたらしたと考えられた。

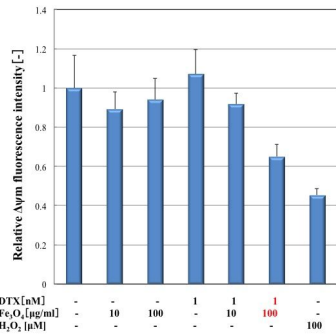


図2 ミトコンドリア膜電位の測定

(3)(2) MgNPs-COOH の抗がん剤感受性上昇の機構について解析: MgNPs-COOH と DTX の併用により, DTX 単剤で処理した場合より, cell viability の低下, apoptosis の誘導が認められた. MgNPs-COOH は DU145 細胞に曝露した時に 細胞内 ROS 産生は認められない事より, MgNPs とは異なる機構で, cell viability の低下, apoptosis の誘導すると考えられた. DTX および MgNPs 併用時と同様に NFκB タンパク質の発現量は DTX および MgNPs-COOH 併用時に濃度依存的に減少する事を認めた. また, LDH (乳酸脱水素酵素) assay により, MgNPs-COOH の曝露濃度依存的に LDH 漏出量の増加を認めた. 細胞膜損傷を含めて, MgNPs-COOH は MgNPs と異なる機構で, cell viability の低下, apoptosis の増加をもたらし, 抗腫瘍効果の増強をもたらしたと考えられた.

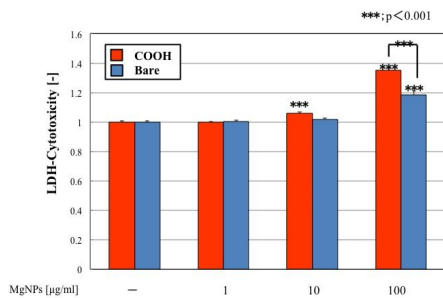


図3 LDH 漏出量の測定

(4) 磁性体ナノ粒子曝露時における Zyxin 遺伝子の発現について: MgNPs の曝露時, zyxin の発現量が減少する事を認めた. 過酸化水素の MCF-7 細胞に曝露時, stress fiber が減少し, 遊走能が抑制される事が報告されている. 同様に, MgNPs による ROS 産生により, zyxin の発現の抑制がもたらされた可能性があり, 更なる研究が必要と考える.

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8件)

- 1) 岩崎有由美, 岡本大樹, 遠藤宣弘, 渡邊昌俊. 前立腺癌治療へのナノ粒子の応用. 医学のあゆみ, 査読無, 252, 303-308, 2015.
- 2) D. Kami, T. Kitani, T. Kishida, O. Mazda, M.

Toyoda, A. Tomitaka, S. Ota, R. Ishii, Y. Takemura, M. Watanabe, A. Umezawa, S. Gojo. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer. Nanomedicine, 査読有, 10,1165-1174,2014. doi: 10.1016/j.nano.2014.03.018.

3) Y. Totsuka, K. Ishino, T. Kato, S. Goto, Y. Tada, D. Nakae, M. Watanabe, K. Wakabayashi. Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice. via Inflammatory Response. Nanomaterials, 査読有, 4, 175-188, 2014. doi:10.3390/nano4010175

4) S. Ota, Y. Takahashi, A. Tomitaka, T. Yamada, D. Kami, M. Watanabe, Y. Takemura. Transfection efficiency influenced by aggregation of DNA/polyethylenimine max/magnetic nanoparticle complexes. J. Nanopart. Res., 査読有, 15, 1653-1664, 2013. doi:10.1007/s11051-013-1653-y

5) M. Watanabe, M. Yoneda, A. Morohashi, Y. Hori, D. Okamoto, A. Sato, D. Kurioka, T. Nittami, H. Hirokawa, T. Shiraishi, K. Kawai, H. Kasai, Y. Totsuka. Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. Int.J.Mol.Sci. 査読有, 14, 15546-15560, 2013. doi: 10.3390/ijms140815546.

6) A. Sato, N. Itcho, H. Ishiguro, D. Okamoto, N. Kobayashi, K. Kawai, H. Kasai, D. Kurioka, H. Uemura, Y. Kubota, M. Watanabe. Magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death. Int J Nanomed., 査読有, 8, 3151-60, 2013. doi: 10.2147/IJN.S40766.

7) T. Kato, Y. Totsuka, K. Ishino, Y. Matsumoto, Y. Toda, D. Nakae, S. Goto, S. Masuda, S. Ogo, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Matsuda, M. Watanabe, K. Wakabayashi. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. Nanotoxicology, 査読有, 7, 452-461, 2013. doi: 10.3109/17435390.2012.674571.

8) 栗岡大輔, 佐藤明子, 岩崎有由美, 深井瑛美, 岡本大樹, 渡邊昌俊. 前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果. 化学工業, 査読無, 64, 67-73, 2013.

[学会発表](計15件)

1) 岡本大樹, 古田奈緒, 岩崎有由美, 山口創, 栗岡大輔, 新田見匡, 河井一明, 葛西宏, 石黒齊, 窪田吉信, 上村博司, 渡邊昌俊. 前立腺癌細胞におけるカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果とその機構について. 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日, 横浜, 神奈川.

2) 岩崎有由美, 橋本紗歩, 山口創, 古田奈緒, 岡本大樹, 深井瑛美, 栗岡大輔, 新田見匡, 河井一明, 葛西宏, 渡邊昌俊. 前立腺癌細胞における磁性体ナノ粒子と各種化学療法剤の併用効果(II). 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日, 横浜, 神奈川.

3) 古田奈緒, 岩崎有由美, 山口創, 岡本大樹, 栗岡大輔, 新田見匡, 河井一明, 葛西宏,

石黒齊, 窪田吉信, 上村博司, 渡邊昌俊. 前立腺癌細胞における磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果とその機構について. 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日, 横浜, 神奈川.

4) 山口創, 橋本紗歩, 古田奈緒, 岩崎有由美, 岡本大樹, 深井瑛美, 栗岡大輔, 新田見匡, 渡邊昌俊. 磁性体ナノ粒子の前立腺癌におけるドキソルピシンによる治療への効果. 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日, 横浜, 神奈川.

5) 渡邊昌俊. ナノテクノロジーの光と影: ナノメディシンとナノトキシコロジー. 第4回前立腺生物学シンポジウム 伊勢志摩 2014, 2014年6月26日, 鳥羽, 三重.

6) N. Furuta, S. Yamaguchi, A. Iwasaki, D. Okamoto, A. Sato, Y. Endo, D. Kurioka, T. Nittami, H. Ishiguro, H. Uemura, Y. Kubota, M. Watanabe. Combined effects of docetaxel-magnetic nanoparticles with different surface modifications on prostate cancer cells. Annual Meeting 2014, AACR, 2014年4月9日, San Diego, USA.

7) M. Watanabe, Y. Endo, D. Kurioka, A. Sato, A. Iwasaki, D. Okamoto, N. Watanabe. Nanomedicine in prostate cancer therapy. 101st Indian Science Congress, 2014年2月5日, Jammu, India.

8) 岩崎有由美, 古田奈緒, 山口創, 岡本大樹, 深井恵瑛美, 佐藤明子, 河井一明, 葛西宏, 石黒齊, 上村博司, 窪田吉信, 渡邊昌俊. 前立腺癌細胞における磁性体ナノ粒子と各種化学療法剤の併用効果. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日, 横浜, 神奈川.

9) 岡本大樹, 古田奈緒, 山口創, 岩崎有由美, 佐藤明子, 河井一明, 葛西宏, 渡邊昌俊. 前立腺癌細胞におけるカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果 (11). 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日, 横浜, 神奈川.

10) 古田奈緒, 山口創, 岩崎有由美, 岡本大樹, 佐藤明子, 河井一明, 葛西宏, 戸塚ゆ加里, 渡邊昌俊. 高濃度曝露の磁性体ナノ粒子は A549 細胞における抗酸化システムを阻害し, 細胞毒性をもたらす. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日, 横浜, 神奈川.

11) M. Watanabe, A. Sato, D. Okamoto, D. Kurioka, H. Ishiguro, H. Uemura, Y. Kubota. Synergistic effect of carboxyl-modified magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells in vitro. Annual Meeting 2013, AACR, 2013年4月8日, Washington DC, USA.

12) 佐藤明子, 諸橋彩香, 岩崎有由美, 石黒齊, 上村博司, 窪田吉信, 渡邊昌俊. 磁性体ナノ粒子は前立腺癌に対するドセタキセルの効果を増強する. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日, 札幌, 北海道.

13) 岡本大樹, 深井瑛美, 岩崎有由美, 佐藤明子, 白石泰三, 河井一明, 葛西宏, 石黒齊, 渡邊昌俊. 前立腺癌におけるカルボキシル基

修飾磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日, 札幌, 北海道.

14) 諸橋彩香, 佐藤明子, 岩崎有由美, 河井一明, 葛西宏, 石黒齊, 古林直人, 渡邊昌俊. 磁性体ナノ粒子が曝露したがん細胞における抗酸化酵素遺伝子および活性酸素種産生の変化について. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日, 札幌, 北海道.

15) A. Sato, D. Kurioka, H. Ishiguro, H. Uemura, Y. Kubota, M. Watanabe. Synergistic effect of magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells in vitro. Annual Meeting 2012, AACR, 2012年4月1日, Chicago, IL, USA.

〔図書〕(計1件)

1) 上大介, 渡邊昌俊, 五條理志. 磁性ナノ粒子を用いた遺伝子導入法. 第6章遺伝子の導入技術における適切なプロトコールとトラブル対策 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発. 技術情報協会. 2014年5月31日, pp.278-282.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 昌俊 (WATANABE, Masatoshi)
横浜国立大学・工学研究院・教授
研究者番号: 90273383

(2) 研究分担者

白石 泰三 (SHIRAISHI, Taizo)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 30162762