

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293268

研究課題名(和文) 光触媒と高密度焦点式超音波を併用した新しい癌治療法の確立

研究課題名(英文) Use of high intensity focused ultrasound and photocatalytic nanoparticles for cancer treatment

研究代表者

立花 克郎 (TACHIBANA, Katsuro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40271605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：光触媒チタニアシリカ水溶液と高密度焦点式超音波照射(HIFU)を併用すると、HIFUの強度と照射時間、またチタニアシリカ粒子(TiS)の濃度に比例して殺細胞効果が高くなることが確認できた。HIFUによってTiSが励起され、活性酸素により癌細胞破壊されていると考えられた。In vivoにてTiS+HIFU群で組織内の出血を病理学的に確認し、HIFUとTiSを併用することで大きな相乗効果が得られた。また、細胞質内にTiS複合体粒子の取り込みが認められ、細胞内にHIFUにより細胞膜に一過性にソノポレーションが関与していると予想される。マイクロバブルの添加によってさらに効果的な殺細胞効果が確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, effects of high intensity focused ultrasound (HIFU) combined with photocatalytic titanium dioxide Silica (TiS) nanoparticles on human oral squamous cell line HSC-2 were investigated. Viability of HSC-2 cells after HIFU irradiation with various intensities in the presence or absence of TiS was measured immediately after the exposures in-vitro. Immediate effects of HIFU combined with TiS on solid tumors were also examined by histological study. Cytotoxic effect of HIFU+ TiS in-vitro was significantly higher than that of TiS or HIFU alone with the tendency to increase for higher HIFU intensity, duration, and TiS concentration in the suspension. In-vivo results showed significant necrosis and tissue damage in HIFU and HIFU+ TiS treated samples. However, penetration of TiS nanoparticles into the cell cytoplasm was only observed in HIFU+TiO2 treated tissues.

研究分野：超音波治療

キーワード：超音波 酸化チタン 癌細胞 光触媒

1. 研究開始当初の背景

チタニア(二酸化チタン)は、代表的な光触媒としてよく知られている。光触媒は日本で発見され、様々な分野で商品化が進んできたことから、「日本発のオリジナル技術」といわれ、現在も日本が世界の光触媒技術を牽引し続けている。チタニアに光を当てると、OHラジカルなどの活性酸素を生じる。OHラジカルは、120kcal/mol 相当の大きなエネルギーを持っており、有機物を構成する分子中のC-C、C-N、C-H、O-H、N-Hなどの結合エネルギー100kcal/mol前後を大きく上回るため、有機物を完全に分解し、炭酸ガスや水などの無害な物質に変えることが可能である。また、OHラジカルは塩素、次亜塩素酸、過酸化水素などよりもはるかに強い酸化力を有しており、殺菌効果や抗腫瘍効果も報告されている。一方、超音波照射でもチタニアは励起され、メラノーマ細胞を殺傷することを近年、我々は発表した(Journal of Controlled Release 149, Issue 2, 20 (2011) 190-195)。液体中の気泡が超音波によって圧壊したときに起こる発光、“ソノルミネッセンス”が関係しているとも考えられている。

ナノ粒子の酸化チタンだけでは粒子同士が凝集する性質があり、生体内で問題を起す可能性がある。また、酸化チタンはpH6前後に等電点を有しているため、酸化チタン粒子は、中性付近の水系溶液中では凝集を生じてしまい、これを均一に分散させることは極めて難しい。そのため、酸化チタン自体を医薬品として使用することは非常に困難であるとされている。一方、チタニア・シリカ水溶液は、酸化チタンと酸化ケイ素が結合した過酸化結合を有するチタニア・シリカ複合体からなる高分散性の水溶液光触媒である。従来の酸化チタンのみの水溶液と違い、チタニア・シリカ複合体が溶液中で均一に分散し、沈殿しにくく、薬剤として物理・化学的に安定している。それゆえ静脈内注射、局所注射、塗布等、種々の投与方法が想定できる。このチタニア・シリカ水溶液ナノ粒子を高密度焦点式超音波で励起し、癌治療に応用する試みは研究開始前はなかった。

2. 研究の目的

本課題では、扁平上皮癌細胞株に対する酸化チタン・超音波併用療法による殺細胞効果の確認およびメカニズムの解明並びに口腔癌に対する酸化チタン・超音波併用療法確立を目標とした。さらにマイクロバブルの機械的ダメージは、酸化チタンを加えることによって影響があるか検討することが目的であった。

3. 研究の方法

(1)細胞および細胞培養

本実験には、口腔扁平上皮癌由来の細胞株であるHSC-2を使用した。細胞は10%ウシ胎児血清(Invitrogen社)およびMEM

medium(Wako社)にて、37°C、5%CO2存在下で培養した。

(2)薬剤

薬剤として高分散性チタニアシリカ粒子(TiS)(アサカ理研)R-A-TS(アナターゼ型)を使用した。

(3)超音波

超音波発生装置はSonoPore KTAC-4000(Nepagene社)、トランスデューサーとして、Fig.2に示すHIFUトランスデューサー(Nepagene社)を使用した。超音波を一点に集めることにより、その焦点で高いエネルギーを作る。



トランスデューサー (30mm 径) Fig. 1

(4) In vitro

HSC-2の細胞懸濁液(2×10⁶cells/ml) 500μlを24wellの底がフィルムになったプレートに入れ、“凍光”を添加した場合と、しない場合でHIFU(frequency, 3.5 MHz; burst rate, 100Hz; duty cycle, 50%)を照射した(Fig.3)。超音波強度は30、40、50、60Vの4種類、照射時間は0.1、1.0、3.0秒の3種類とした。チタニアシリカ粒子の濃度は1well中、5、10、15μlの3種類とした。細胞生存率の計測は、NucleoCounter(Chemometec社)を用いてヨウ化プロピディウム(PI)染色法で行った。

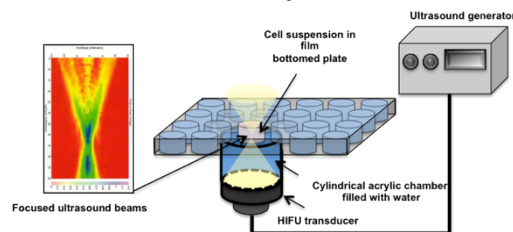
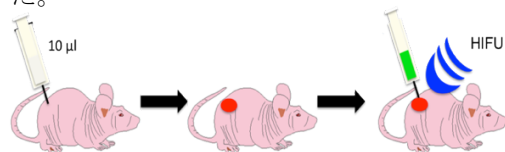


Fig. 2 In vitro 実験系の略図

(5) In vivo

5週齢メスのヌードマウス(BALB/c (nu/nu))を用いた。①コントロール群②HIFU群③チタニアシリカ粒子群④チタニアシリカ粒子+HIFU群の4群で検討した。

HIFUはIntensity210 W/cm²、3秒照射とした。HIFU照射後すぐに病理組織学的検討を行った。



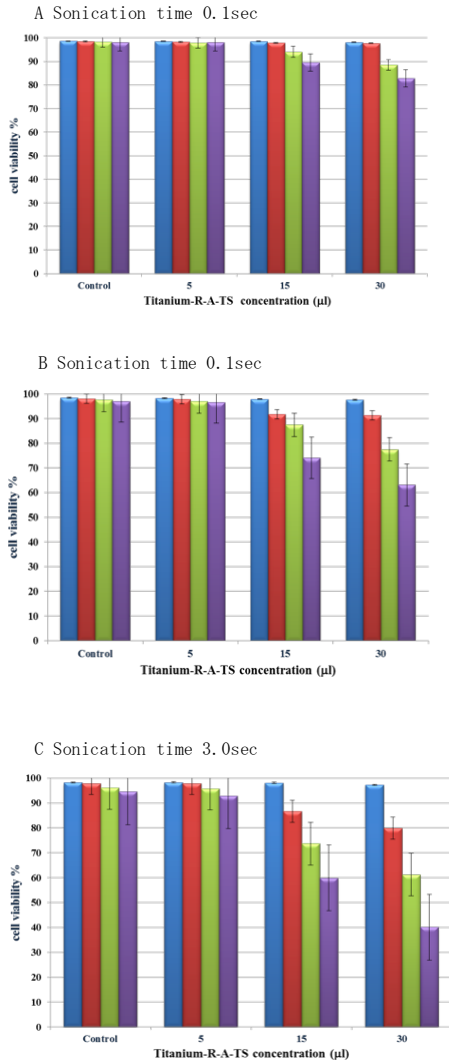
HSC-2 cells, 2 × 10⁷ in 0.1ml PBS, were subcutaneously injected into the right flanks of nude mice. Experiments were initiated 10 days after inoculation when tumors reached 4-5mm in size. RINKOH (10μl) were injected into tumor. After injection, mice were exposed to HIFU.

Fig. 3 In vivo 実験系の略図

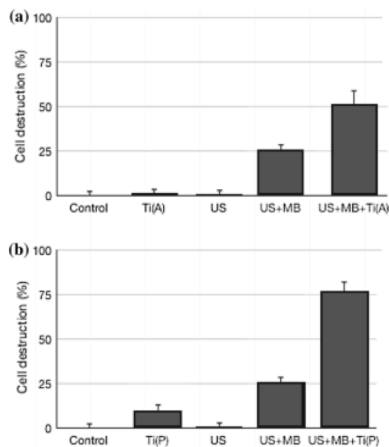
4. 研究成果

In vitro

HSC-2 に対する殺細胞効果は、“チタニアシリカ”と HIFU を併用した群が最も高かった。細胞生存率は、チタニアシリカ水溶液の濃度、HIFU の強度、照射時間に依存して減少した (Fig. 5, 6)。



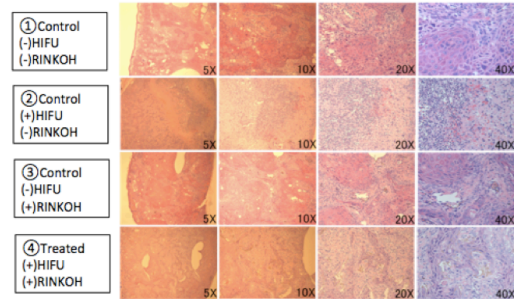
(Fig. 5) 各条件下での細胞破壊率の比較



(Fig. 6)

In vivo

腫瘍の組織切片を HE 染色した標本を光学顕微鏡で観察したところ、③凍光群④凍光+HIFU 群において茶褐色の粒子が認められた。また②HIFU 群④チタニアシリカ+HIFU 群において、出血が認められた。



チタニアシリカ水溶液と HIFU を併用すると、HIFU の強度と照射時間、またはチタニアシリカの濃度に比例して、殺細胞効果が高くなることが確認できた。HIFU によって、チタニアシリカ粒子が励起され、生成された活性酸素種により癌細胞が破壊されていると考えられる。

In vivo にて HIFU のみの治療群と、チタニアシリカ+HIFU 群で組織内の出血を確認した。HIFU のみでも、ある程度の殺細胞効果はあるが、チタニアシリカを併用することで、大きな相乗効果が得られると考えられる。

チタニアシリカ+HIFU 群でのみ、細胞質内にチタニアシリカ複合体粒子が取り込まれた。これは、HIFU がチタニアシリカ粒子を細胞内に通過させたと考えられる。そのメカニズムとして、HIFU によるキャビテーションジェットが細胞膜に一過性の微細孔を開けるソノポレーションが関与していると予想される。

さらにマイクロバブルを添加することによってさらに効果的な殺細胞効果が確認できた。実用化に向けた課題として、チタニアシリカ複合体水溶液は既に光触媒として商品化され、安価に大量生産がかるのであるが、局所駐車、静脈内注射による生体への安全性は未解明である。また、現在入手可能な市販の超音波治療装置は口腔内での使用は形状敵に適していないので、今後、専用の総理の開発研究が必要となる。口腔内または頸部から超音波をより効率的に照射するためには、超音波プローブの小型化が望まれる。

参考文献

1. P. Marmottant, S. Hilgenfeldt, Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles, *Nature* 423 (2003) 153-156.
2. S. Moosavi Nejad, S.H. Hosseini, H. Akiyama, K. Tachibana, Optical observation of cell sonoporation with low intensity ultrasound, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413 (2011) 218-23.

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4件)

1. Acute effects of sono-activated photocatalytic titanium dioxide nanoparticles on oral squamous cell carcinoma Ultrasonics Sonochemistry Moosavi N. S, Takahashi H, Hosseini H, Watanabe A, Endo H, Narihira K, Toshihiro Kikuta T, Tachibana K. 32:95-101, 2016(査読有)
2. Repairable Cell Sonoporation in Suspension: Theranostic Potential of Microbubble Theranostics Moosavi N. S, Hosseini H, Akiyama H, Tachibana K. 6(4):446-455, 2016(査読有)
3. Enhanced mechanical damage to in vitro cancer cells by high-intensity-focused ultrasound in the presence of microbubbles and titanium dioxide J Med Ultrasonics Tachibana K, Endo H, Feril LB Jr, Moosavi N.S, Takahashi H, Narihira K, Kikuta T. 42(2):449-455, 2015(査読有)
4. 超音波と薬物を併用した新しい治療法の基礎研究, 超音波医学 立花克郎 40(5):463-471, 2013(査読有)

[学会発表] (計6件)

1. (招待講演)「超音波治療の今後の展望」-セラノスティクス(theranostics)の応用- 日本音響学会 2016 年春季研究発表会 立花克郎 横浜 3/11, 2016
2. (シンポジウム) 臨床的アプローチ 強力集束超音波の臨床応用 「超音波治療の脳神経超音波への応用」第 34 回日本神経超音波学会総会 立花克郎 京都 6/4, 2015
3. 異なる周波数掃引超音波の照射による癌細胞殺細胞効果の比較 第 14 回日本超音波治療研究会 (JSTU) 渡邊晶子、ムサビ N. S.、遠藤日富美、フェリル ロリト、立花克郎 高知 11/28, 2015
4. Evaluation of mechanical damage to cancer cells by high-intensity focused ultrasound in the presence of microbubbles and titanium dioxide 第 14 回日本超音波治療研究会 (JSTU) Seyedeh Moosavi Nejad、立花克郎、成平恭一、喜久田利 高知 11/28, 2015

5. 第 13 回日本超音波治療研究会 酸化チタン光触媒、マイクロバブルと HIFU を併用した癌細胞殺傷効果の検討 立花克郎 仙台情報・産業プラザ 多目的ホール 11/15, 2014

6. JSUM 2014 日本超音波医学会第 87 回学術集会「分子基礎にたった超音波の治療応用」立花克郎 パシフィコ横浜 5/9-11, 2014

[図書] (計1件)

1. 「がんの分子イメージング」Part IV US 超音波イメージング概論 第 11 章超音波画像造影剤システムを活用したがん分子イメージング 立花克郎、(分担) 化学同人 立花克郎 98-107, 2015

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.fukuoka-u.ac.jp/research/data/researcher.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

立花 克郎 (TACHIBANA Katsuro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40271605

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：