

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420831

研究課題名(和文) 過酸化チタン・ナノ粒子とX線照射の併用による細胞損傷促進機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of titanium peroxide nanoparticles for cancer therapy application

研究代表者

荻野 千秋 (OGINO, Chiaki)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00313693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「過酸化チタン/放射線併用治療法」の提案を行い、がん細胞の効率的な死滅誘導の機構の解析を行った。本研究の実施によって、我々が見出した過酸化チタンナノ粒子の抗腫瘍効果を試験管レベル、および培養細胞レベルでも確認することができた。さらには、担癌マウスを用いた挙動解析でも、がん組織等への蓄積も見いだされた。

今後は、これらの結果を踏まえて、過酸化チタンナノ粒子の抗腫瘍効果を多様な培養細胞にて実施していくと同時に、その詳細な死滅機構を明らかにしていきたいと計画している。

研究成果の概要(英文)：Titanium peroxide nanoparticles (TiO_xNPs) was synthesized and their efficacy as novel agents that can potentially enhance the effects of radiation in the treatment of pancreatic cancer was investigated. The core structures of the PAA-TiO_xNPs were found to be of the anatase type. The TiO_xNPs and PAA-TiO_xNPs showed a distinct ability to produce hydroxyl radicals in response to X-ray irradiation in a dose- and concentration-dependent manner, whereas the TiO₂NPs did not. The combination of the PAATiO_xNPs and X-ray irradiation induced significantly stronger tumor growth inhibition compared to treatment with either PAA-TiO_xNPs or X-ray alone. In addition, bio-distribution of PAATiO_x in Xenograft mouse model was identified, and the evaluation method of effect of X-ray irradiation on cell line was also established. Together these findings, TiO_xNPs are potential agents for enhancing the effects of radiation on pancreatic cancer via hydroxyl radical production.

研究分野：生物化学工学

キーワード：放射線照射 チタン酸化物 活性酸素種 ナノ粒子 がん治療

1. 研究開始当初の背景

本研究では、現在、既にごん組織への治療の一つとして確立されている「放射線治療」にナノ粒子を併用する事で、これまで難しいとされている、膵臓などの「放射線低感受性組織」における難治性がんの飛躍的な治療向上を目指す。

膵臓がんの約8割はステージIVの最も進んだ状態で見つかり、これは、膵臓がんの早期発見の困難さと、ステージ進行後に発見されたがん組織に対する治療の困難さを意味している。膵臓がんの治療方法としては、外科的手術、化学治療、放射線治療があるが、上述のように膵臓がんと診断された7~8割は発見時に既に切除手術の対象とならないほど進行しており、その場合は、根治を断念し、症状改善のみを目指した姑息的な手術や処置とともに、抗がん剤による化学治療や放射線治療、またはその両者が行われる事が多い。しかし膵臓は、血流と血流中の溶存酸素濃度が他の臓器と比べると比較的少なく、放射線照射による活性酸素種(ラジカル)の産生量が少なく、放射線治療に対して感受性が低い事が明らかとなっている。

これまでに、我々は二酸化チタン・ナノ粒子に紫外線や超音波を照射する事で、効率的なラジカル発生システムの構築に成功してきている。しかしながら、これらの照射手法のデメリットとして、光や音波を体の深部臓器へと伝播する事が、困難である事が挙げられる。一方で、X線は体内を効率良く透過する線源であり、更には非常に高いエネルギーを有する利点を有している【図1】。

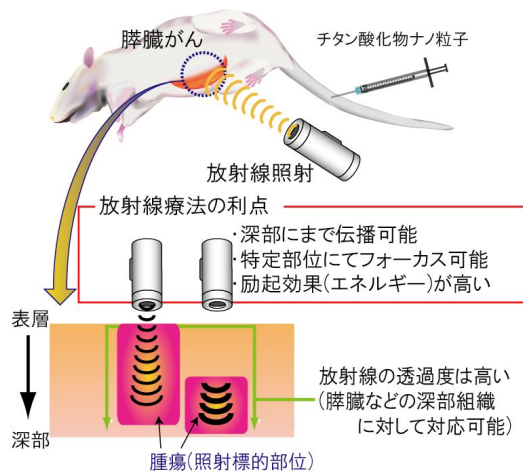


図1 提案する「過酸化チタン/放射線併用治療法」

これまでに多くの有機材料や無機材料で構成されるナノ粒子が構築されてきているが、如何なるナノ粒子を用いてもX線によって粒子が励起され、活性酸素(ラジカル)種を顕著に生成する組み合わせは報告されていない。

2. 研究の目的

この研究背景より、我々はさまざまな無機ナノ粒子を探索し、X線照射によって効率的にラジカルを発生させる事が可能な過酸化チタン・ナノ粒子を探索する事に成功し、国際特許出願の移行手続きを進行中してきた【図2】。

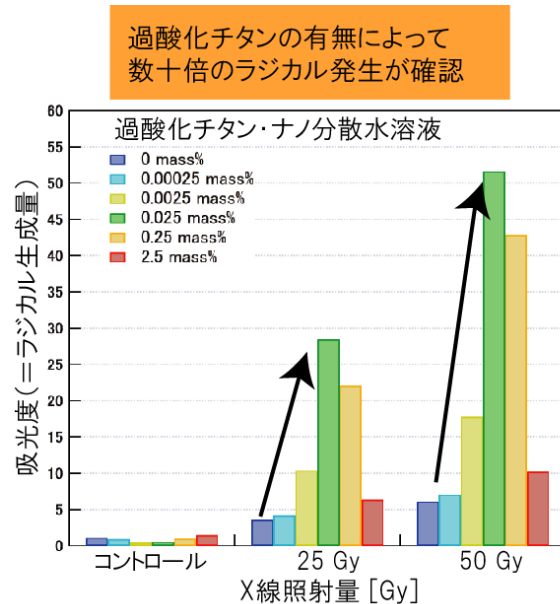


図2 過酸化チタン・ナノ粒子とX線照射によるラジカル発生

上記の研究背景とこれまでに研究実績を踏まえ、本研究では「過酸化チタン / 放射線併用治療法」の提案を行い、がん細胞の効率的な死滅誘導の機構の解析を行った。

3. 研究の方法

ポリアクリル酸修飾過酸化チタン (PAA-TiO_x)の合成

N,N-ジメチルホルムアミド; DMF(和光純薬工業株式会社)48.75 cm³ とポリアクリル酸; PAA(和光純薬工業株式会社) 0.5 g の混合溶液に、約 30 wt%のアナターゼ型酸化チタン (TiO₂)懸濁液 STS-01(石原産業株式会社、光触媒酸化チタン水分散体) 1.25 cm³ を添加し十分攪拌した。この混合液を水熱反応用密閉容器 HU-50(三愛科学)に入れ、150 °C で5時間反応させ、ポリアクリル酸修飾を施した。その後、クエンチングを行い、アセトン(和光純薬工業株式会社)150 cm³ に反応液を添加、遠心分離(5,000 × g, 20 min)により粒子と上澄みを分離し、上澄みをとり除き、粒子を少量の蒸留水で分散させた。さらに、これを99.5 wt%エタノール(和光純薬工業株式会社)150 cm³ に添加し、遠心分離(5,000 × g, 10 min)をし、上澄みを取り除いた。

この洗浄後の粒子に 10 cm³ の蒸留水を加え分散させた後、30 wt% 過酸化水素(H₂O₂) 2.5 cm³ を添加した。これを VIVASPIN20 10,000 MWCO PES(Sartorius stedim biotech)を用いて、5回水で限外濾過(5,000 × g, 20 min)を行なった。限外濾過で得られた懸濁液

を遠心分離(15,000 rpm, 30 min)し、上澄みを除いてから 12 cm³ の蒸留水を加え、超音波洗浄機で 30 分間分散させた。ここで得られた淡黄色の懸濁液をポリアクリル酸修飾過酸化チタン(PAA-TiO_x)と呼ぶ。

放射線照射後の粒子からのラジカル検出

APF は 5mg/ml の粒子と 96 ウェルプレートで混合した。サンプルに(0.60 Gy/min, 80 kVp, 1 mA)の条件で X 線照射し、APF の蛍光をプレートリーダーで読んだ。APF は 25uM を選択し、自然酸化を防ぐために水に溶解後は直ちに使用した。

担癌マウスを用い粒子の体内挙動解析

MIAPaCa-2(ヒト膵臓がん細胞株)を移植した担癌マウスに、PAA-TiO_x を局所注射および尾静脈注射の 2 方法で行った。そして、注射から一定時間後に臓器等の分画を取り出し、ICP-AES で各分画における Ti 含有量を測定した。

培養細胞での活性酸素種の評価

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞株に作製した粒子(PAA-TiO₂, PAA-TiO_x)を 0~10 mg/ml の濃度で添加し、24 時間 37 °C でインキュベートして粒子を曝露させた。その後、X 線照射装置(1 mA, 80 kV)で、培養細胞を 0~10 min 照射した。照射処理 1 週間後、細胞生存率をコロニーアッセイ法により、評価した。

4. 研究成果

合成した粒子の特性解析

TiO₂ NP, PAA-TiO₂ NP, PAA-TiO_x NP について DLS で粒径を調べた結果を図 3A, Z ポテンシャルを調べた結果を図 3B に示す。PAA-TiO_x NP の原料である TiO₂ NP は硝酸酸

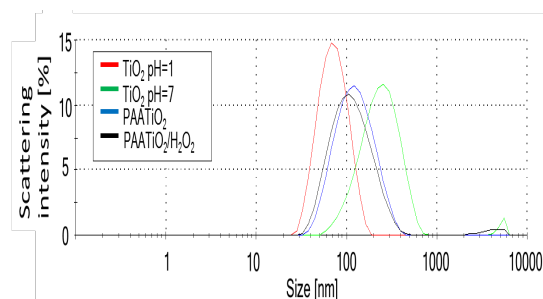


図 3A 過酸化チタン・ナノ粒子の粒径分布

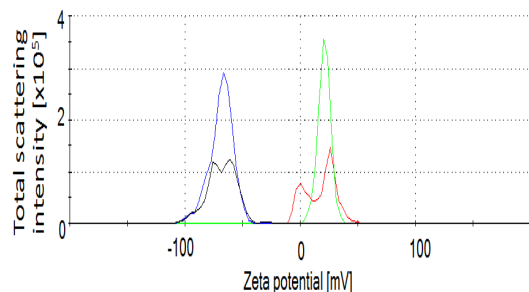


図 3B 過酸化チタン・ナノ粒子のゼータ電位

性中で分散しており、その粒径は 74.95 ± 27.27 nm。水酸化ナトリウムで中和して中性にすると、凝集が見られて動的粒径が大きくなった。表面を PAA 修飾した PAA-TiO₂ NP, PAA-TiO_x NP はそれぞれ、 135.2 ± 65.33 , 124.6 ± 64.52 nm となり、元の TiO₂ NP よりも少し大きな直径となった。

それぞれの粒子の Z ポテンシャルも測定した。PAA 未修飾の粒子はほぼ中性に近いカチオン性粒子で、PAA を修飾すると PAA のカルボキシル基の影響で大きくアニオン性になる。PAA 修飾粒子が中性の塩溶液中で良好な分散性を示すのはこの大きな表面電荷によると考えられる。

PAA 未修飾粒子と修飾粒子の代表として TiO₂ と PAA-TiO_x の SEM 像を図 3C に示す。過酸化水素処理、PAA 修飾いずれによっても、大きな morphology 変化は見られなかった。どの粒子も、数 nm の一次粒子が数十 nm の凝集体を形成し粒子として振舞っている様子が見られた。PAA 修飾粒子については、未修飾のものに比べると、若干大きな凝集体が多い印象を受ける。以上は DLS の結果と一致する。

TiO_x から発生する活性酸素種

PAA-TiO₂ は UV 照射によって ROS を生成し、細胞毒性を見せる。In vivo で放射線増感作用を持つ PAA-TiO₂/H₂O₂ も同様に放射線と相互作用し ROS を生成し、抗腫瘍効果の原因となっているのではないかと考えた。そこで、放射線を粒子分散液に照射し、発生した hROS を APF と反応させ、生じた fluorescein の蛍光を測定することで検出した。その結果、PAA-TiO₂ NP, PAA-TiO_x NP 分散液中で発生する hROS の量は純水中とほとんど変わらなかった。

さらに、hROS のひとつである OH を DMPO にトラップさせ、DMPO-OH の量を EPR で測ることで、OH の量を調べた。その結果、PAA-TiO_x NP 分散液は X 線未照射でも DMPO-OH を生成しており、PAA-TiO₂ NP や純水中に比べて、X 線照射時間を増やしてもラジカル量があまり増えなかった。このことから、放射線照射による活性酸素種の発生ではなく、複数の機構が活性酸素種の生成に関与していることが明らかとなった。

マウス内での生体内分布

局所注射および尾静脈注射における、各分画の Ti 含有量の経時変化を示す(図 4, および図 5)。局所注射(図 4)によって注射初期には腫瘍への主要な粒子の蓄積が確認できたが、特性が無いために、時間経過とともに流出し、肝臓で蓄積量が増加していることが確認できた。

また尾静脈注射によって(図 5)、腫瘍に対して、他の臓器とは有意な蓄積が確認できた。このことから、粒子が受動的に腫瘍へと送達されたと考えられ、腫瘍への送達能を有して

いることが示唆された。しかしながら、図 4 と同様に、経過とともに肝臓への蓄積が顕著となった。これらの結果より、ナノ粒子を腫瘍特異的に留まらせて、治療効果を向上させるには、腫瘍を異性的に認識する機能を粒子に付与させる必要があると考えられる。

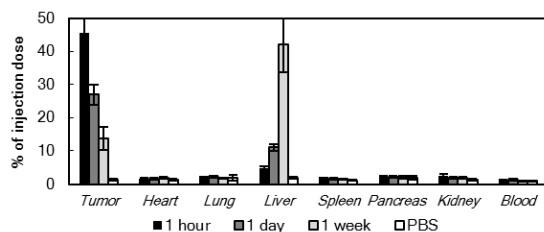


図 4 過酸化チタン・ナノ粒子の局所注入による体内分布

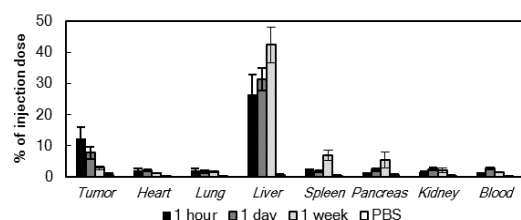


図 5 過酸化チタン・ナノ粒子の尾静脈注入による体内分布

培養細胞での活性酸素種の評価

培養細胞において放射線の照射効果を確認できる条件設定が完了した。今後、放射線照射による細胞死滅効果を、コロニーアッセイ法を中心として、評価していく。さらには、WST 法なども検討し、細胞死滅の機構に関して解析を詳細に実施していく計画である。

本研究の実施によって、我々が見出した過酸化チタンナノ粒子の抗腫瘍効果を試験管レベル、および培養細胞レベルでも確認することができた。さらには、担癌マウスを用いた挙動解析でも、がん組織等への蓄積も見いだされた。今後は、これらの結果を踏まえて、過酸化チタンナノ粒子の抗腫瘍効果を多様な培養細胞にて実施していくと同時に、その詳細な死滅機構を明らかにしていきたいと考えている。

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 0 件)

[学会発表](計 14 件)

鈴木 貴弘、森田 健太、西村 勇哉、荻野 千秋、近藤 昭彦、担癌マウスを用いたポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の生体内分布特性の調査、化学工学会 第 81 年会 (2016)、2016/3/13-15、関西大学(大阪府)

西村 勇哉、鈴木 貴弘、森田 健太、荻野 千秋、近藤 昭彦、Affibody 提示バイオナノカプセル/リポソーム融合粒子を用いた in vivo での抗腫瘍効果、化学工学会 第 81 年会 (2016)、2016/3/13-15、関西大学(大阪府)

鈴木 貴弘、森田 健太、西村 勇哉、荻野 千秋、近藤 昭彦、担癌マウスを用いたポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の生体内分布特性の調査、神戸大学若手フロンティア 2015、2015/12/25、神戸大学・百年記念館(兵庫県)

K. Morita, T. Suzuki, M. Nakayama, R. Sasaki, K. Sato, C. NUMAKO, C. Ogino, A. Kondo, Development of novel radiosensitizing cancer therapy: Combination of radiotherapy and titanium peroxide nanoparticle, Pachifichem2015, 2015/12/15-20, Hawaii convention center (Honolulu, USA)

C. NUMAKO ; S. Miyazaki ; K. Sato ; S. Takami ; C. Ogino ; A. Kondo、Characterization for metal-oxide nanoparticles generating radicals with X-ray irradiation, Pachifichem2015, 2015/12/15-20, Hawaii convention center (Honolulu, USA)

Y. Nishimura ; J. Ishii ; C. Ogino ; A. Kondo、Specific drug delivery for target cancer tumor using affibody-displaying bionanocapsule/liposome complex, Pachifichem2015, 2015/12/15-20, Hawaii convention center (Honolulu, USA)

鈴木 貴弘；森田 健太；西村 勇哉；荻野 千秋；近藤 昭彦、担癌マウスを用いたポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の生体内分布特性の調査、化学工学会第 47 回秋季大会、2015/9/9-11、北海道大学(北海道)

森田 健太、鈴木 貴弘、西村 勇哉、沼子 千弥、佐藤 和好、中山 雅央、佐々木 良平、荻野 千秋、近藤 昭彦、放射線治療と相乗効果を有するポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の作用機序解明、化学工学会第 47 回秋季大会、2015/9/9-11、北海道大学(北海道)

鈴木 貴弘、田野 亜都里、森田 健太、荻野 千秋、近藤 昭彦、担癌マウスへの

Ti ナノ粒子投与による生体内分布、第17回化学工学会学生発表会(徳島大会) 2015/3/7、徳島大学常三島キャンパス(徳島県)

西村 勇哉、江澤 僚将、石井 純、荻野 千秋、近藤 昭彦、pH 応答性ペプチド GALA を表層提示したバイオナノカプセルのエンドソーム脱出、第66回日本生物工学会大会、2014/9/9-11、札幌コンベンションセンター(北海道)

西村 勇哉、竹田 光一、江澤 僚将、石井 純、荻野 千秋、近藤 昭彦、pH 応答性膜融合ペプチド GALA を表層提示したバイオナノカプセルのエンドソーム脱出、生物学若手研究者の集い夏のセミナー、2014/7/12-13、神戸市立神戸セミナーハウス(兵庫県)

森田 健太、田野 亜都里、鈴木 貴弘、沼子 千弥、宮崎 世里加、佐藤 和好、中山 雅央、佐々木 良平、荻野 千秋、近藤 昭彦、放射線がん治療との併用に向けた酸化チタンナノ粒子の物性評価、生物学若手研究者の集い夏のセミナー、2014/7/12-13、神戸市立神戸セミナーハウス(兵庫県)

江澤 僚将、西村 勇哉、石井 純、荻野 千秋、近藤 昭彦、上皮成長因子受容体の特異的に認識する Affibody 提示バイオナノカプセルの開発、生物学若手研究者の集い夏のセミナー、2014/7/12-13、神戸市立神戸セミナーハウス(兵庫県)

森田 健太、田野 亜都里、沼子 千弥、佐藤 和好、中山 雅央、佐々木 良平、荻野 千秋、近藤 昭彦、新しい放射線治療をめざした過酸化チタンナノ粒子の物性研究、化学工学会第79年会、2014/3/18-20、岐阜大学柳戸キャンパス(岐阜県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称：放射線治療剤

発明者：荻野千秋、田中勉、佐々木良平、近藤昭彦

権利者：神戸大学

種類：特許

番号：特許 2012-500638

取得年月日：2014年10月21日

国内外の別：国内(国外はPCT出願移行中)

6. 研究組織

(1)研究代表者

荻野 千秋 (OGINO, Chiaki)
神戸大学・工学研究科・准教授
研究者番号：00313693

(2)研究分担者

佐々木 良平 (SASAKI, Ryouhei)
神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：30346267