

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870707

研究課題名(和文) 転移制御を目指したがん細胞特異的な新規・金属ナノ粒子による放射線併用療法の創出

研究課題名(英文) Development of cancer cell-specific gold nanoparticles for radiation therapy

研究代表者

余語 克紀 (YOGO, Katsunori)

北里大学・医療系研究科・講師

研究者番号：30424823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療と金ナノ粒子を併用し、原発巣とその周りの潜在的な転移巣へも十分な効果をもたらす治療法の提案を目指した。従来よりも少ない投与量で金ナノ粒子が効果を発揮するように、がん細胞へ特異的に集積する金ナノ粒子の開発に必要な基本要件を調べた。

金ナノ粒子の放射線増強の効果をDNAの切断能力の違いとして評価するため、プラスミドDNAの放射線による形状変化を電気泳動法で定量化した。放射線誘発DNA損傷に対する金ナノ粒子の増強効果は、粒子表面の性質と溶液条件の影響を受けることが分かった。がん細胞特異的な金ナノ粒子の開発に向け、粒子径、標的への結合法、ブロッキング剤の改善が必要ではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to combine radiation therapy with a dose sensitizer to provide sufficient treatment against potential metastasis around a primary lesion. Our potential candidate material was gold nanoparticles (GNPs). We examined the basic requirements for the development of GNPs that would specifically integrate into cancer cells. Breaks in DNA caused by radiation were detected as form changes in the plasmid DNA and were quantified by electrophoresis to evaluate the effect of enhancement of the GNP. We investigated the enhancement effect by changing test conditions, such as the surface charge and particle size of the GNPs. Addition of positively charged GNPs promoted single-strand breaks in the DNA. The GNP effects on radiation-induced DNA damage were influenced by the GNP surface properties and the solution conditions. Particle size, binding method to the target, and blocking agents were important considerations for the development of cancer cell-specific GNPs.

研究分野：医学物理学

キーワード：放射線治療 放射線生物学 放射線増感剤 金ナノ粒子 医学物理学

1. 研究開始当初の背景

がん治療では、原発巣のみでなく転移巣をいかに制御するかが成功のカギである。放射線治療は原発巣のみでなく転移の確率が高い領域に予防的な照射ができる。また高齢者でも十分に許容できる副作用の治療法である。従来の放射線治療は原発巣へビームを集中させることでがんの制御率を上げてきた。しかし、現在の方法では、原発巣周りの潜在的な転移巣にまでは十分な線量を投与できず、十分な制御率が得られていない。したがって、治療成績のさらなる向上には、潜在的な転移巣にまで十分な線量を投与できる新しい治療法の開発が必要である。

本研究では、原発巣を放射線の集中照射で制御し、同時に周囲の潜在的な転移巣は、その時発生する散乱線を積極的に利用する治療法の提案を目指した。MV オーダーの治療ビームを原発巣へ集中して照射した場合、周囲へはエネルギーが低下した散乱X線が増え、単独では線量が不十分となっていた。そこで、ナノメートルサイズの金粒子と放射線の併用による線量増強に着目した。金粒子は、治療ビーム (MV オーダー) のエネルギーよりも低エネルギー (kV オーダー) で放射線増感作用が強い。したがって、原発巣周りの転移巣へ金粒子を導入することで、むしろエネルギーが低下した散乱X線を効率よく治療に用いることができ、十分な線量を投与できると考えた。また金という材質は、化学変化が少なく医学の他の分野でも使用実績があり安全性が高い。

2. 研究の目的

金粒子と放射線治療との併用については、マウスでの先行研究がある[1]。しかし、治療効果の出る金粒子の投与量が半数致死量 (LD50) に近く、いかに効率よく腫瘍へ集積させ、かつ放射線の効果を増強させるかが課題となっている。臨床応用に際しては越えるべき壁があり、少量の投与量で同等の治療効果が得られるような課題の克服が必要である。

本研究では、放射線治療と金粒子を併用し、原発巣とその周りの潜在的な転移巣へも十分な効果をもたらす治療法の提案を目指し

た。金粒子が、従来よりも少ない投与量で効果を発揮するように、がん細胞へ特異的に集積する金ナノ粒子の開発に必要な基本要件を調べた。

3. 研究の方法

金粒子の放射線増強の効果を DNA 分子の切断能力の違いとして定量化し、条件を変えて効果を比較した。DNA 切断は、基質に超らせん状 DNA を用いることで、DNA 電気泳動法で高感度に検出した (図 1)。金属粒子と超らせん状 DNA を混ぜて放射線を照射し、DNA 電気泳動を行う。DNA 2 本鎖切断は直線状、1 本鎖切断は開いた環状、切断なしは超らせん状 DNA のバンド (図 1) となり、照射前後の割合をとる。

線量を増加させ、超らせん状 DNA の減少と直線状 DNA の増加の傾きから、 G' (SSB) と G' (DSB) を計算した。各条件での増感効果の指標として Dose modifying factor = G 値 (+GNP) / G 値 (control) を求めた。Dose modifying factor は試薬なしのコントロールに対する G' 値の比として計算した。

金ナノ粒子は、数社から表面電荷や粒子径の異なる製品を購入し、使用条件を検討した。溶液条件は、トリスバッファー (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA) とリン酸バッファー (PBS, pH 7.4) を用いた。

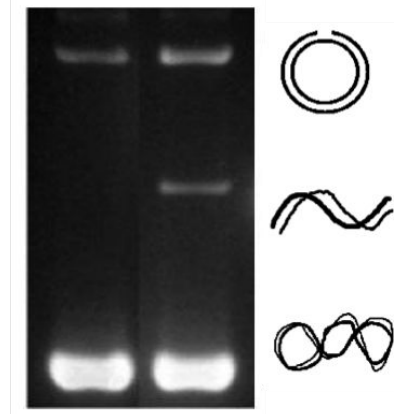


図 1. DNA 電気泳動法による放射線の増強作用の高感度検出法の概念図 (Yogo et al., 2012 より改変引用)

4. 研究成果

(1)放射線誘発 DNA 損傷の電気泳動での評価
金粒子の放射線増強の効果を DNA 分子の切断能力の違いとして定量化する方法として、プラスミド DNA の放射線による形状変化を電気泳動法で定量化する方法を立ち上げた。放射線による DNA 切断は、基質に超らせん状 DNA を用いることで、DNA 電気泳動法によって、とくに一本鎖切断を高感度に検出可能となった。DNA 電気泳動条件や蛍光色素による染色法を検討し、定量化を行った。金粒子と超らせん状 DNA を混ぜて放射線を照射し、DNA 電気泳動を行った (図 2)。

(2)金ナノ粒子の性質と増強効果への影響

金ナノ粒子は、数社から表面電荷や粒子径の異なる製品を購入し、使用条件を検討した。表面が正電荷に帯電した金ナノ粒子の添加によって DNA 1 本鎖切断が増えたことを示唆するデータを得られた (図 2, 3)。一方で表面電荷のない金ナノ粒子では増強効果が見られず、金ナノ粒子の表面電荷によって結果に違いが生じた。これは、DNA のリン酸骨格が負に帯電しているため、金ナノ粒子が正に帯電することで近づき、DNA 損傷が起きやすかったのではないかと考えられる。

しかし、さらなる増強効果を期待し金粒子濃度を上げたところ、バンド全体の輝度が減少した。これは何かしらのアーチファクトが生じている可能性がある。バンドが全体的に減少したのは、金ナノ粒子と DNA が凝集し、DNA が沈殿したために DNA 量が全体的に減少した可能性があると考えられる。

図 3 に、超らせん状 DNA の割合変化のグラフを示す。線量の増加に伴い、超らせん状 DNA の割合が減少した。これは、線量増加により、DNA の 1 本鎖切断と 2 本鎖切断が増えたことを示している。金ナノ粒子を添加した場合、超らせん状 DNA の減少割合が増えた。グラフの傾きから 1 本鎖損傷に対する G 値を求めた。増感効果の指標として $\text{Dose modifying factor} = G \text{ 値 (+GNP)} / G \text{ 値 (control)}$ を求めたところ、約 1.4 であった。先行研究[2]では、2.3 (直径 5 nm 金ナノ粒子) であった。

図 4 に、直線状 DNA の割合変化のグラフを示す。線量の増加に伴い、直線状 DNA の割合がやや増加した。これは、線量増加により 2 本鎖損傷が増えたことを示している。金ナノ

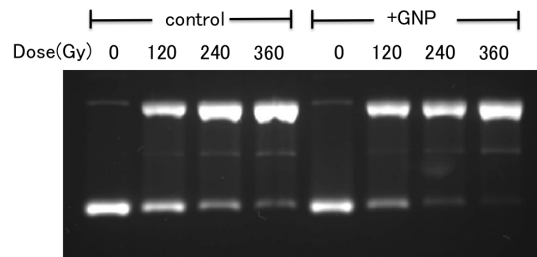


図 2. DNA 電気泳動像の変化

(control: 対照, GNP(+): 正電荷金ナノ粒子)

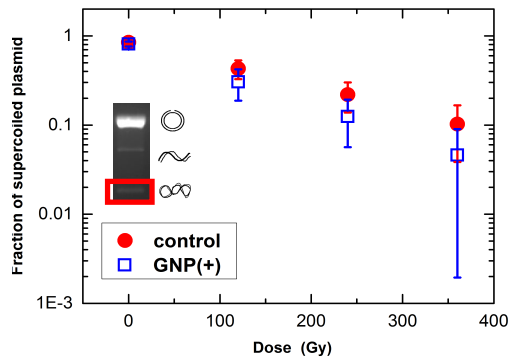


図 3. 超らせん状 DNA の割合変化

(control: 対照, GNP(+): 正電荷金ナノ粒子)

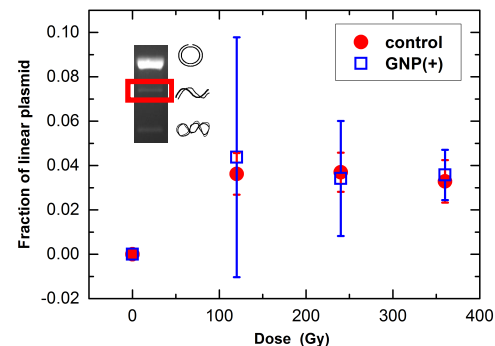


図 4. 直線状 DNA の割合変化

(control: 対照, GNP(+): 正電荷金ナノ粒子)

粒子を添加した場合と対照では、ばらつきが多く有為な差が見られず、本研究では増感効果を確認できなかった。

(3)照射時の溶液条件

金ナノ粒子による増強効果は、トリスバッファ中で見られたが、トリスバッファでは照射線量が多く必要であり、時間のかかる一因となった。X 線による DNA 切断は、溶液 (バッファ) 条件に大きく依存することが分かった。トリスバッファ (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA) では、~300 Gy でも一本鎖切断 (SSB) が増える程度であったが、リン酸バッファでは SSB とともに二本鎖切断 (DSB) が見られた。また金ナノ粒子は、溶液

条件の変化により、凝集しやすいことが分かった（塩濃度の上昇で溶液が赤紫色に変化）。リン酸バッファ下で金粒子を加えたところ、DNA切断効果は増強されずにむしろ減少した。これは先行研究[2]にて報告されているが、はっきりとしたメカニズムは分かっていない。金粒子の凝集が関係している可能性があり、今後の課題である。

放射線誘発 DNA 損傷に対する金ナノ粒子の増強効果は、1)粒子表面の性質と2)溶液条件の影響を受けること、3)高線量が必要であることが分かった。がん細胞特異的な金ナノ粒子の開発に向け、1)粒子径、2)標的への結合法、3)ブロッキング剤の改善が必要ではないかと考えられる。

(4)放射線防護剤候補の評価への応用

本研究で確立した、放射線誘発 DNA 損傷の電気泳動法による評価法を、放射線防護剤の開発へ応用し、成果を得られつつある。放射線防護剤の併用によっても、がん細胞への線量増加と治療成績の向上が可能と考えられる。

以上のことから、本研究で進めた放射線誘発 DNA 損傷の電気泳動法による評価法は、放射線増感剤および放射線防護剤の開発に有効であり、がん細胞特異的な金ナノ粒子の開発に必要な基本要件が明らかになった。

[1] J. D. Hainfeld et al., *Phys. Med. Biol.* **49**, N309 (2004)

[2] K. T. Butterworth et al., *Radiat. Res.* **170**, 381-387 (2008).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

余語克紀、村山千恵子、望月大樹、藤澤義樹、松下明弘、伊藤太斉、平山亮一、炭素線による DNA 損傷に対するアミノ酸の防護効果と作用機序解明、平成 27 年度放射線医学総合研究所 共同利用研究報告書、2016、印刷中（査読なし）

Ogawa T, Yogo K, Furuike S, Sutoh K, Kikuchi A, Kinoshita K Jr., Direct observation of DNA overwinding by reverse gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**:7495-500 (2015). (査読あり)

村山千恵子、余語克紀、吉川正信、平山亮一、鶴澤玲子、松本謙一郎、古澤佳也、重粒子線治療成績向上を目的とした正常組織

障害防護薬の研究開発 炭素イオン線による DNA 損傷に対するメチオニンの防護効果、平成 26 年度放射線医学総合研究所 共同利用研究報告書、2015、p.52-53. (査読なし)

Hasegawa T, Hanada T, Yorozu A, Ito H, Masuda S, Kawahara M, Yogo K, Hayakawa K., Microfocus X-ray imaging of the internal geometry of brachytherapy seeds. *Appl Radiat Isot.* **86**:13-20 (2014). (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

余語克紀他、重粒子線による DNA 損傷に対するメチオニンの防護効果、第 111 回日本医学物理学会学術大会（パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市））、2016.4.14

余語克紀他、重粒子線による DNA 損傷に対するメチオニンの防護効果、第 18 回癌治療増感研究シンポジウム（奈良県文化会館（奈良県・奈良市））、2016.2.6

余語克紀他、電子線線量分布のリアルタイム可視化による品質管理ツール開発、日本放射線腫瘍学会第 28 回日本高精度放射線外部照射研究会（国立京都国際会館（京都府・京都市））、2015.5.30

余語克紀他、重粒子線治療成績向上を目的とした正常組織障害防護薬の研究開発、平成 26 年度 HIMAC 共同利用研究成果発表会（ホテルポートプラザちば（千葉県・千葉市））、2015.4.20

余語克紀他、プラスチックシンチレータによる電子線線量分布の可視化、第 109 回日本医学物理学会学術大会（パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市））、2015.4.19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

余語 克紀 (YOGO, Katsunori)
北里大学・大学院医療系研究科・講師

研究者番号：30424823