

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350550

研究課題名(和文) がん指向性多機能型カーボンナノチューブの音響化学活性化を利用した新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Antitumor Treatment by Sonodynamically Activated Hydroxyl Functionalized Carbon Nanotubes

研究代表者

深井 俊夫 (FUKAI, TOSHIO)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10057755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：機能性カーボンナノチューブが、光化学的励起し活性酸素を産生することが報告されている。そこで、本研究では、従来の治療法の技術的な限界を克服することを目的に、超音波と音響化学的に抗腫瘍活性化する水溶性の機能性カーボンナノチューブを組み合わせた新たな腫瘍ターゲティングシステムの開発を行うことを目的とした。本研究では、超音波単独、または水酸化カーボンナノチューブとの併用による単離腫瘍細胞に対する殺細胞作用と固形腫瘍に対する抗腫瘍効果の増強を確認した。さらに、活性酸素種の一重項酸素の消去剤であるヒスチジンの添加が殺細胞効果を著しく抑制することを認め、その機序における一重項酸素の関与を推定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the sonodynamically induced antitumor effect of hydroxyl functionalized carbon nanotubes (OH-CNT) was investigated. Sonodynamically induced antitumor effects of OH-CNT by focused ultrasound were investigated using isolated sarcoma 180 cells and mice bearing ectopically-implanted colon 26 carcinoma. Cell damage induced by ultrasonic exposure was enhanced by five-fold in the presence of 80 μ M OH-CNT. The combined treatment of ultrasound and OH-CNT suppressed the growth of the implanted colon 26 carcinoma. Histidine, a reactive oxygen scavenger, significantly reduced cell damage caused by ultrasonic exposure in the presence of CNT OH-CNT. These results suggest that singlet oxygen is likely to be involved in the ultrasonically induced cell damage enhanced by CNT.

研究分野：人間医工学

キーワード：アポトーシス 一重項酸素 活性酸素種 超音波 音響化学療法

1. 研究開始当初の背景

がんの治療は、外科手術、放射線治療、化学療法により行なわれてきたが、いずれも腫瘍選択性の観点において理想的と言えるものではなく、これらを腫瘍選択性に優れた新療法の実現が望まれている。我々は、これまでの基礎研究により、ナノ粒子であるカーボンナノチューブが超音波照射により顕著な抗腫瘍効果を発生することを発見した。上記薬物の薬物単独による毒性は、従来の抗癌剤に比べて無視できるほど小さく、また、超音波の集束性により超音波焦域外における音響化学効果発生を原理的にさらに小さく抑えることができるので、超音波を集束した患部以外における副作用が実質的に無視できる治療の実現を期待することができる。また、機能性フラレンおよび機能性カーボンナノチューブが、光化学的励起し活性酸素を産生することが報告されている。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、従来の治療法の技術的な限界を克服することを目的に、遠隔作用力を持つ外部エネルギーである超音波と音響化学的に抗腫瘍活性化する水溶性の機能性カーボンナノチューブを組み合わせた新たな腫瘍ターゲティングシステムの開発を行うことを目的とした。さらに、本研究では水溶性機能性カーボンナノチューブを併用し、殺細胞効果ならびに殺細胞効果発現とアポトーシス誘導の連について検討も行った。

3. 研究の方法

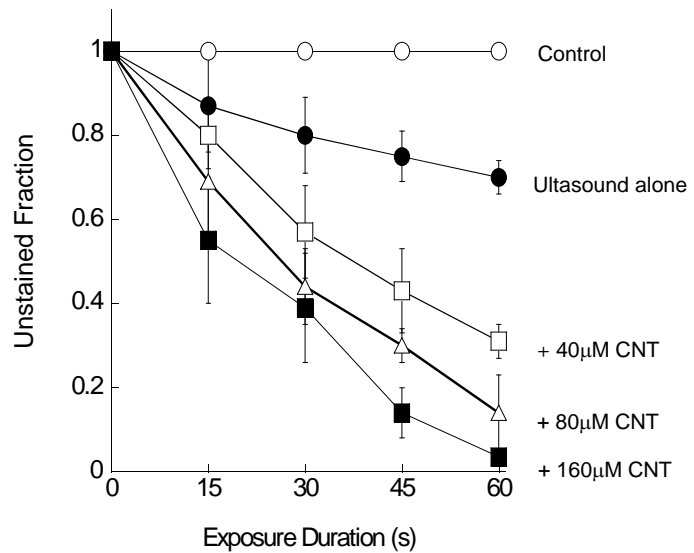
本研究では、血管壁を漏出し腫瘍組織に到達可能で、超音波照射により抗腫瘍作用を発現するナノ粒子として水酸化カーボンナノチューブを用いた腫瘍組織選択的がん音響化学療法の開発を目指した。最初に、超音波単独、または微粒子との併用による抗腫瘍効果を、培養細胞で確認した。超音波と併用することにより殺細胞効果が発現、または増強される微粒子のスクリーニングを行った。殺細胞効果は、細胞膜の色素透過能に基づくトリンプルー排除法によって判定した。次に col on26 腫瘍を移植した動物に、これらの微粒子を投与し、患部に超音波照射を行い微粒子の音響化学的活性化による抗腫瘍効果の発現を確認した。最後に、これら微粒子の音響化学活性化機序における活性酸素種の関与および、細胞死におけるアポトーシス誘導の寄与を調べた。

4. 研究成果

超音波と併用することにより殺細胞効果が発現、または増強されるナノ粒子をスクリーニングした結果、水酸化カーボンナノチューブで優れた増強効果を認めた。腫瘍細胞に対する殺細胞作用と薬物濃度との関係を図1に示す。水酸化カーボンナノチューブの

併用による腫瘍細胞に対する殺細胞作用の増強が濃度依存的に確認された。

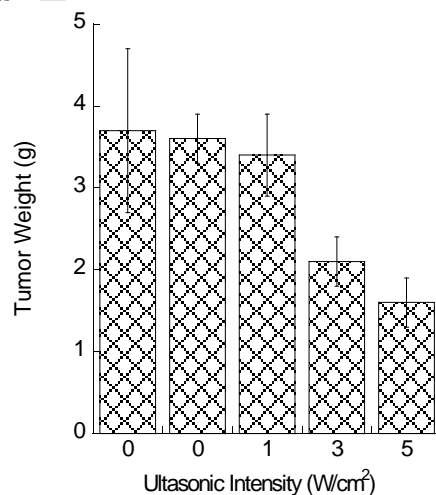
図1 腫瘍細胞に対する殺細胞作用と薬物濃度との関係



このことにより水酸化カーボンナノチューブが超音波により活性化し細胞毒性を発現していることが示された。さらにヒスチジン、トリプトファンなどの活性酸素消去剤の添加によりその細胞毒性は有意に低下したことから細胞毒性における活性酸素の関与が示された。

次に col on26 固形腫瘍を移植した動物に、水酸化カーボンナノチューブ 25 mg/kg を腫瘍内に投与し、十分に薬剤が患部に到達すると想定される時間に薬物の活性化治療に適した超音波を照射した。図2に投与量を 25 mg/kg 一定とし超音波強度を変化させた時の各処置後の腫瘍重量を示す。

図2 超音波強度を変化させた時の各処置後の腫瘍重量



薬物単独は抗腫瘍効果を示さなかったのに対し超音波と水酸化カーボンナノチューブ併用処置では閾値が観察され 3 W/cm² から有意な腫瘍重量の減少を認めた。これはキャビ

テーションに特有の現象であり、この抗腫瘍効果がキャビテーションに基因することを示すものである。このことにより水酸化カーボンナノチューブ誘導体が超音波により活性化し細胞毒性を発現していることが示された。抗また処置後の腫瘍に HE 染色を行ったところ、腫瘍組織に細胞の壊死が観察されたこれらの結果から固形腫瘍においても水酸化カーボンナノチューブを超音波により活性化し抗腫瘍効果を発揮できることが示された。

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 6 件)

Nishi K, Suzuki K, Sawamoto J, Tokizawa Y, Iwase Y, Yumita N, Ikeda T. Inhibition of Fatty Acid Synthesis Induces Apoptosis of Human Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res.* 36; 4655-60, 2016

Yumita N, Watanabe T, Chen FS, Momose Y, Umemura S. Induction of Apoptosis by Functionalized Fullerene-based Sonodynamic Therapy in HL-60 cells. *Anticancer Res.* 36; 5-74, 2016

Iwase Y, Nishi K, Fujimori J, Fukai T, Yumita N, Ikeda T, Chen FS, Momose Y and Umemura S. Antitumor effect of sonodynamically activated pyrrolidine tris-acid fullerene. *Jpn. J. Appl. Phys.* 55; 07KF02. 2016

Iwase Y, Yumita N, Nishi K, Kuwahara H, Fukai T, Ikeda T, Chen FS, Momose Y and Umemura S. Apoptosis induction by aluminum phthalocyanine tetrasulfonate-based sonodynamic therapy in HL-60 cells. *Jpn. J. Appl. Phys.* 54; 07HD05, 2015

Sugita N, Hosokawa M, Sunaga N, Iwase Y, Yumita N, Ikeda T and Umemura S. Sonodynamically-induced cytotoxicity by rose bengal derivative and microbubbles in isolated sarcoma 180 cells. *Jpn. J. Appl. Phys.* 54; 07HF16. 2015

Yumita N, Iwase Y, Watanabe T, Nishi K, Kuwahara H, Shigeyama M, Sadamoto K, Ikeda T, Umemura S. Involvement of reactive oxygen species in the enhancement of membrane lipid peroxidation by sonodynamic therapy with functionalized fullerenes. *Anticancer Res.* 34; 481-7. 2014

[学会発表](計 6 件)

Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase. Involvement of Reactive Oxygen in Sonodynamically Induced Apoptosis by pyrrolidine tris-acid fullerene. The Society for Redox Biology and Medicine's Annual Meeting SFRBM. 2016.11.15.-2016.11.19. 米国・サンアントニオ

Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase, Koji Nishi, Takahiro Watanabe, Junya Fujimori, Toshio Fukai, Hiroyuki Kuwahara, Shin-ichiro Umemura. Sonodynamically Induced Apoptosis by 5-Aminolevulinic acid. International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines. 2016. 7.2 . - 2016. 7. 8. 中国・南京

Yumiko Iwase, Koji Nishi, Junya Fujimori, Toshio Fukai, Nagahiko Yumita, Toshihiko Ikeda, Fu-shin Chen, Yasunori Momose, Shin-ichiro Umemura. Antitumor effect of sonodynamically activated pyrrolidine tris-acidfullerene. 第 36 回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム 2015. 11. 5.-2015. 11. 7. 筑波国際会館(エポカルつくば)

Yumiko Iwase, Nagahiko Yumita, Kiyomi Sadamoto, Koji Nishi, Shin-ichiro Umemura. Photodynamically Induced Apoptosis by Enoxacin in Ultraviolet A Exposed HL-60 Cells. 第 74 回 日本癌学会学術総会 2015. 10. 8-2015. 10. 10. 名古屋(名古屋国際会議場)

Yumiko Iwase, Nagahiko Yumita, Koji Nishi, Hiroyuki Kuwahara, Toshio Fukai, Toshihiko Ikeda, Shin-ichiro Umemura. Apoptosis Induction by Aluminum Phthalocyanine Tetrasulfonate-Based Sonodynamic Therapy in HL60 Cells. 第 35 回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (USE2014) 2014.12.3-2014.12.5. 東京(明治大学駿河台アカデミーコモン:東京都千代田区神田駿河台 1-1)

Nagahiko Yumita, Yumiko Iwase, Koji Nishi, Toshio Fukai, Toshihiko Ikeda, Fu-shih Chen, Yasunori Momose, Shin-ichiro Umemura. Involvement of Reactive Oxygen Species in Sonodynamically Induced Antitumor Effect by Water-solve Functionalized Fullerenes. Society for Free Radical Biology and Medicine's 21th Annual Meeting. (SFRBM2014) 2014. 11. 19. -

2014. 11. 23. Seattle,WA(Sheraton
Seattle)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深井 俊夫 (FUKAI TOSHIO)
横浜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：10057755

(2) 研究分担者

弓田 長彦 (YUMITA NAGHIKO)
横浜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40191481

岩瀬 由未子 (IWASE YUMIKO)
横浜薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：00521882

梅村 晋一郎 (MEMURA SHIN-ICHIROU)
東北大学・工学部・教授
研究者番号：20402787