

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462988

研究課題名(和文)チタニアナノチューブにおける低次元ナノ空間の高次機能開拓とDDSへの応用展開

研究課題名(英文)High order functionalization using the low dimensional nano space of titania nanotubes and application to DDS

研究代表者

西田 尚敬(NISHIDA, Hisataka)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：70448116

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)：酸化チタンナノチューブ(TNT)を光線力学療法(PDT)に応用できる可能性を期待して、紫外線照射によりTNTから生成した活性酸素種(ROS)がHeLa細胞に与える影響を検討した。HeLa細胞へ与える酸化ストレスを可視化した結果、TNTから生成したROSは、HeLa細胞へ大きな酸化ストレスをもたらすことが明らかとなった。さらに、フローサイトメトリー解析により、細胞状態の解析と生細胞死細胞の判別をおこなった。TNT表面へのPEG修飾が細胞付着へ効果的であり、PEG修飾したTNTを培地に含有しUV照射をおこなうことでHeLa細胞へ大きな酸化ストレスを誘導しDNA修復を抑制することが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Since one of the potential applications of titanium oxide nano-tubes (TNT) is to photodynamic therapy (PDT), the effects of reactive oxygen species (ROS) formed by TNT irradiated with ultraviolet (UV) rays were evaluated in HeLa cells. An oxidative stress fluorescence probe was then used to visualize oxidative stress in HeLa cells, and revealed that the ROS formed by TNT led to oxidative stress in HeLa cells. A flow cytometric analysis was performed to characterize the cell status and distinguish between viable and unviable cells. Polyethylene glycol (PEG) modifications to the surfaces of TNT effectively facilitated adherence to cells, and the UV irradiation of HeLa cells during their incubation in culture medium containing PEG-modified TNT induced oxidative stress, thereby suppressing DNA repair.

研究分野：ナノ材料科学

キーワード：酸化チタン チタニアナノチューブ PDT DDS

## 1. 研究開始当初の背景

様々なナノ粒子が、がん治療やドラッグデリバリスシステムなどに応用する研究が盛んにおこなわれており、その中でがん細胞の酸化ストレスを能動的に高めてがん細胞を死滅させる治療法に関する研究開発が注目されている。酸化チタンナノチューブ (TNT) は、比表面積が大きいため光を効率よく吸収すると共にラジカル生成の反応活性点の数が増加することにより、酸化チタンナノ粒子よりもラジカルが多く発生する。また、光触媒材料を用いる利点として、紫外線照射および超音波照射したときのみ反応を起こすことができるため、容易に反応を制御できる。この光触媒材料の機能を効果的に利用すれば新しいがん治療の開発が期待できる。

## 2. 研究の目的

高機能触媒材料である TNT に紫外線を照射することにより細胞に対して毒性をもつ活性酸素種 (ROS) を発生させ、それによりがん細胞内に酸化ストレスを与え、細胞死を誘導させるというがん治療法の開発を目的とし、基礎的研究として In-vitro にて TNT への紫外線照射により発生させたラジカルが、HeLa 細胞に与える影響について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) TNT の合成

TNT は低温化学合成法により作製した。10M の水酸化ナトリウム水溶液 800ml を作り、そこに  $\text{TiO}_2$  粉末 (P25, NIPPON AEROSIL CO., LTD., Tokyo, Japan) 2g を加えた。そのボトルをオイルバスに入れ 115 で維持したまま、24 時間攪拌還流した。そして、得られたスラリーを吸引る過により個液分離をおこなった。そこに超純水を加え、再度吸引る過することにより粉末を洗浄し、この洗浄をろ液の導電率が  $70 \mu\text{S}/\text{cm}$  以下になるまで繰り返した。その後、0.1M の塩酸を加え、再び吸引る過による洗浄を導電率が  $5 \mu\text{S}/\text{cm}$  以下になるまでおこなった。白色粉末を回収し、超音波を用いて超純水中に分散させたのち凍結乾燥をおこない、TNT 粉末を作製した (図 1)。

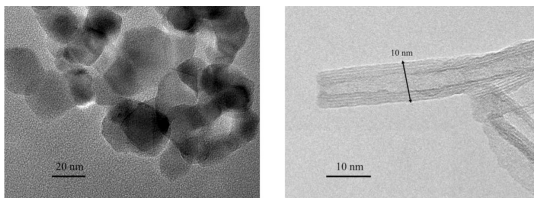


図 1  $\text{TiO}_2$  粉末 (左) と酸化チタンナノチューブ (右)

そして、作製した TNT を用いて、大気中 300 で 2 時間、熱処理した TNT (h-TNT) とポリエチレングリコール (PEG) を修飾した TNT (PEG-TNT) も作製した。0.25ml の DMF に同量の  $\text{CHCl}_3$  を混合し、そこに TNT を 15mg 加え、さらに、PEG (average molecular weight: 3000) を 15mg 加えた。その後、トリ

アジン系脱水縮合剤である DMT-MM23mg と NMM5.5  $\mu\text{l}$  を加え、室温で 24 時間、スターラーで攪拌した。攪拌終了後、遠心分離をおこない上澄み液を除去後、再度、超純水を加えて遠心分離を 3 回おこない、未反応の PEG を除去した。そして、凍結乾燥により PEG-TNT を得た。

### (2) 細胞観察

24 ウェルの培養プレートを使用し、各ウェルの底に  $5 \times 5\text{mm}$  のガラスプレートを置いた。そこに HeLa 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/ml 播種し、E-MEM 培地中にてサブコンフルエントになるまで、37 で 24 時間培養した。次に、TNT、h-TNT、PEG-TNT をそれぞれ添加し、30 分間インキュベートした。その後、培養プレートの底に置いてあるガラスプレートのみを取り出した。そして臨界点乾燥法により細胞を固定し、走査型電子顕微鏡 (SEM) を使用して、細胞観察およびエネルギー分散型 X 線 (EDX) 分析をおこなった。

### (3) 蛍光顕微鏡観察による酸化ストレスの検出

細胞はヒト子宮頸がん細胞である HeLa 細胞 (RIKEN BRC, Ibaraki, Japan) を用いた。細胞培養液には E-MEM (Wako, Osaka, Japan) を用いた。24 ウェルの培養プレートを使用して、各ウェルに  $5 \times 10^4$  cells/ml に調整した細胞混濁液を 1ml ずつ注入し、24 時間、37 で、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で培養した。細胞がサブコンフルエントになったあと、TNT、h-TNT、PEG-TNT をそれぞれ 50ppm の濃度で各ウェルに添加し、30 分間インキュベート後、紫外線照射器 (UV-mini1240, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) にて 30 秒 UV を照射した。TNT を添加せずに培養した細胞をコントロールとした。各ウェルに酸化ストレス検出試薬 (CellROX®Orange Reagent, Life Technologies Japan Ltd. Tokyo, Japan) を  $5 \mu\text{M}$  になるように加え、さらに核染色蛍光試薬 (Hoechst33342, Thermo Fisher Scientific K.K. Yokohama, Japan) を加えて、37、30 分間インキュベートした。その後、PBS にて 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡を用いて酸化ストレスを評価した。

### (4) フローサイトメトリー (FCM) 解析

酸化ストレスの蛍光染色の実験と同じ方法で、HeLa 細胞をサブコンフルエントになるまで培養し、50ppm の濃度で TNT、h-TNT、PEG-TNT をそれぞれ添加した。そして 30 分間インキュベートしたのち UV を 30 秒間照射し、酸化ストレス検出試薬 (CellROX®Orange Reagent, Life Technologies Japan Ltd. Tokyo, Japan) を  $5 \mu\text{M}$  になるように入れ、37 で 30 分間インキュベートした。その後、死細胞染色試薬 (SYTOX®Blue Dead Cell Stain, Life Technologies Japan Ltd. Tokyo, Japan) を各ウェルに  $1 \mu\text{l}$  混合し、さらに 15 分間イ

ンキュベートした。インキュベート終了後、トリプシンを用いて培養プレートから HeLa 細胞を剥がして回収し、Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) を用いてフローサイトメトリー解析をおこなった。

#### 4. 研究成果

SEM 画像と EDX 分析により TNT、h-TNT、PEG-TNT すべて細胞表面に付着することがわかった(図2、3)。TNT は酸化チタンに比べ、多くの水酸基を含有しており、含水量も約9倍を示す。そのため TNT は高い親水性を有し、その特徴が細胞付着に有利に働いたと考えられる。

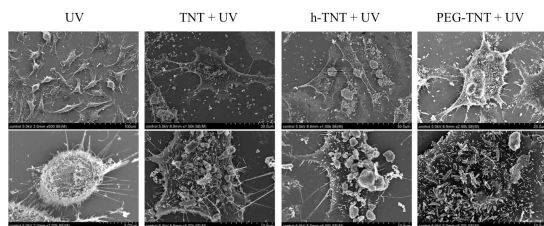


図2 各種 TNT 粉末を添加した培地で培養した HeLa 細胞の SEM 画像

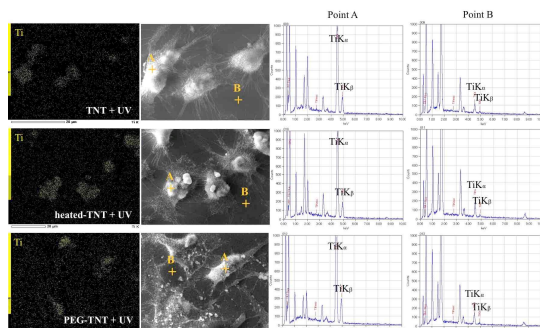


図3 各種 TNT 粉末を添加した培地で培養した HeLa 細胞の EDX 分析

酸化ストレス検出試薬を用いた蛍光顕微鏡観察において、HeLa 細胞に紫外線を照射した細胞からはほとんど酸化ストレスが検出されなかった。しかし、TNT、h-TNT、PEG-TNT を培地にそれぞれ添加して UV を照射した細胞からオレンジ色の蛍光シグナルが確認できた(図4)。TNT が一次元に長いチューブ構造を有するため比表面積が大きくなることから、生成した活性酸素種が安定して表面に長時間滞在できるようになり、その結果、活性酸素の寿命が長く生成量が多くなり、TNT が強い酸化力を示したためと思われる。特に PEG-TNT を添加して UV を照射した細胞から酸化ストレスの強いシグナルが認められた。体内投与において血中滞留性を高める目的で、PEG などによる化学修飾がよく用いられている。水溶性高分子である PEG 修飾により細網内皮系組織への取り込みを抑え、血中での滞留時間を延長することができる。血液滞留時間の増加の結果、標的細胞に到達する量が増大し、標的に作用する時間が延長することが期待できる。本実験では、この目的の他に、TNT 表面の親水性の向上による水溶液中での

分散性を向上させる目的で PEG 修飾をおこなった。TNT 表面へ PEG 鎖の高い生体適合性と分散安定性を付与したことで、HeLa 細胞へ効率的に表面に付着した可能性が考えられ、酸化ストレスが増大したものと思われる。しかし、PEG 修飾による enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) を利用して腫瘍細胞へ集積は可能であるが、PEG の水和層が細胞への結合の障害となるため細胞への導入効率が低下してしまう。そのため、がん細胞への取り込みを向上させるために、TNT 表面にターゲティング用リガンドなどを付加する必要がある。

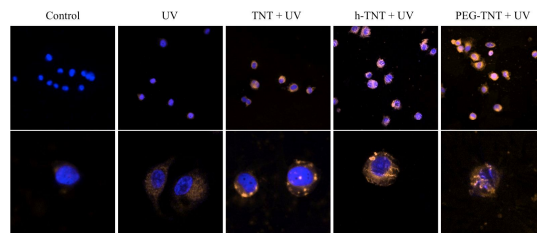


図4 蛍光顕微鏡を用いた酸化ストレスの検出

FCM とは試料中の細胞数、生細胞死細胞の割合、細胞の特徴(大きさ、形状、表面の腫瘍マーカーの有無)などを計測する方法である。SSC は核・顆粒などの細胞内構造に関する情報、FSC は細胞の大きさを示す。TNT、h-TNT、PEG-TNT を含有させた培地で培養した細胞すべてにおいて、SSC の高い細胞が多くみられた(図5)。PEG-TNT を添加した培地で培養した細胞では、細胞密度が低く、全体の細胞数が減少しているように見られた。図6は、TNT、h-TNT、PEG-TNT を添加して培養した細胞の密度プロット図を等高線プロットに変換した図を示す。SSC の光散乱強度の120K を基準にして上下に分け、細胞数をパーセントで表している。すると、PEG-TNT を添加して培養した細胞で、SSC の高い細胞が95.4%認められた。TNT、h-TNT を加えた細胞よりも PEG-TNT を加えた細胞の方が SSC の値がより高い細胞が多く存在することがわかった。このことから、TNT 表面に PEG 修飾することにより細胞内表面への TNT の付着あるいは細胞内への取り込みが容易になり細胞構造がより複雑になっていることが推察される。

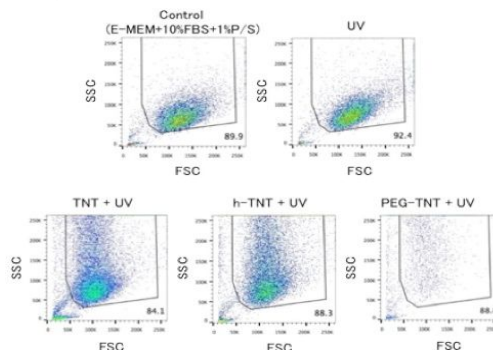


図5 SSC/FSC を用いた細胞密度プロットグラフ

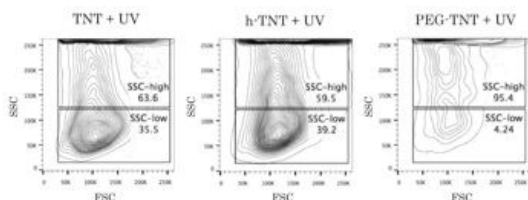


図6 細胞密度等高線グラフ

図7は、図5でゲーティングされた領域に存在する細胞における、酸化ストレス検出試薬(X軸)と死細胞染色試薬(Y軸)を用いた2色蛍光プロット図である。コントロールの細胞とUV照射のみをおこなった細胞は、死細胞がほとんどみられなかった。TNT、h-TNT、PEG-TNTを添加してUV照射をおこなったすべての細胞から死細胞が検出されたが、PEG-TNTを添加した細胞における死細胞の割合が特に高くなった。

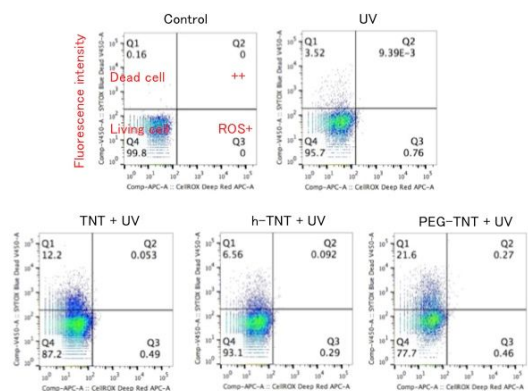


図7 酸化ストレス検出試薬(X軸)と死細胞染色試薬(Y軸)を用いた二色蛍光プロットグラフ

細胞内ではミトコンドリアで酸素を使ってATP産生を行うときに活性酸素が発生し、炎症があると炎症細胞から活性酸素が発生する。このようにして産生された活性酸素は細胞に酸化傷害を引き起こすが、細胞内には活性酸素を消去する抗酸化物質や抗酸化酵素による抗酸化力が存在し、酸化還元バランスを維持することによって酸化傷害の発生を防いでいる。活性酸素の量と抗酸化力の差が酸化ストレスとなる。がん細胞において酸化ストレスが増大すると、遺伝子変異の発生、細胞増殖の促進、アポトーシス抵抗性が誘導され、がん細胞の悪性進展や治療に対する抵抗性が高まる。さらに酸化ストレスが増大して、ある閾値を超えると、細胞やミトコンドリアなどの膜を酸化したり膜タンパクを架橋したりして、膜の輸送機能などを不活性化する。その結果、増殖が停止し、細胞のアポトーシスを誘導すると考えられている。しかし、がん細胞を死滅できるレベルに酸化ストレスを高めることができなければ、がんを悪化させるリスクがある。図5の結果からもわかるように、TNTから生成する活性酸素種は、特異的な一次元ナノ構造の優位性が発現した結果、酸化力が強くなり、HeLa細胞に大

きな酸化ストレスを誘導したと考えられる。そのためHeLa細胞が酸化還元状態を維持できなくなったことで細胞死を誘導したと思われる。

本実験により、TNTと紫外線照射を併用することにより生成した活性酸素種がHeLa細胞の酸化ストレスを誘導し、DNA修復を抑制することが確認できた。また、TNTのPEG修飾が細胞内導入および付着に効果的であることが明らかとなった。TNTから生成する活性酸素種により癌細胞のアポトーシスを誘導することが可能であることから、TNTの特異的なチューブ構造にタンパクや薬剤を導入することでDDSキャリア等への応用展開が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hisataka Nishida, Tomonari Tanaka, Yoshitomo Honda, Tomoyo Goto, Sunghun Cho, Tohru Sekino, Induction of Oxidative Stress in HeLa Cells with Reactive Oxygen Species Generated in Titanium Oxide Nano-tubes, Nano Biomedicine, 査読有, 8(1), 2016, 41-50 DOI: <http://doi.org/10.11344/nano.8.41>

〔学会発表〕(計10件)

西田尚敬, 関野徹, チタニアナノチューブによる酸化ストレスがHeLa細胞に与える影響, 日本歯科理工学会平成28年度春季第67回学術講演会, 2016年4月16日, 九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)

Hisataka Nishida, Tohru Sekino, The Effect of Oxidative Stress Caused by Titanium Oxide Nanotubes, The 19<sup>th</sup> SANKEN International Symposium, 2015年12月7日, 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館(大阪府・吹田市)

Hisataka Nishida, Tohru Sekino, Detection of Oxidative Stress in HeLa Cells by Titania Nanotubes, 14<sup>th</sup> International Union of Materials research Societies - International Conference on Advanced Materials, 2015年10月26日, Jeju (Korea)

西田尚敬, 関野徹, チタニアナノチューブがHeLa細胞へ与える酸化ストレスの検出, 日本セラミックス協会第28回秋季シンポジウム, 2015年9月17日, 富山大学五福キャンパス(富山県・富山市)

西田尚敬, 本田義知, 関野徹, チタニアナノチューブ表面へのポリエチレングリコール修飾, 日本歯科理工学会平成27年度春季第65回学術講演会, 2015年4月11日, 仙台情報・産業プラザ(宮城県・仙台市)

西田尚敬、本田義知、関野徹、酸化チタンナノチューブ表面への PEG 修飾、日本セラミックス協会 2015 年年会、2015 年 3 月 18 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

西田尚敬、酸化物ナノチューブの高次構造制御による機能展開、第 10 回ナノ・バイオマテリアル学会第 2 回名古屋大学エコトピア科学研究所・バイオマテリアルプロジェクトジョイントシンポジウム、2015 年 3 月 9 日、名古屋大学エコトピア科学研究所(愛知県・名古屋市)

西田尚敬、関野徹、酸化物ナノ構造体における間葉系幹細胞への影響、第 53 回セラミックス基礎討論会、2015 年 1 月 8 日、京都テルサ(京都府・京都市)

Hisataka Nishida、Tohru Sekino、The Potential for The Application to Biomaterial of Titanium Oxide Nanotube、The 18<sup>th</sup> SANKEN International Symposium、2014 年 12 月 10 日、コングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)

西田尚敬、関野徹、酸化物ナノ構造体における生体適合性、大阪大学産業科学研究所第 2 回アライアンス若手研究交流会、2014 年 11 月 26 日、大阪大学産業科学研究所(大阪府・茨木市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 尚敬(NISHIDA, Hisataka)  
大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)  
研究者番号: 70448116

### (2) 研究分担者

関野 徹(SEKINO, Tohru)  
大阪大学・産業科学研究所・教授  
研究者番号: 20226658

岡田 正弘(OKADA, Masahiro)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 70416220

本田 義知(HONDA, Yoshitomo)  
大阪歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 90547259