

# TiO<sub>2</sub> ナノ粒子と超音波触媒法を併用したがん治療法の *in vitro* および *in vivo* 評価

大島周平<sup>1</sup>・仁宮一章<sup>2</sup>・清水宣明<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学

<sup>2</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学環日本海域環境研究センター

Shuhei OSHIMA<sup>1</sup>, Kazuaki NINOMIYA<sup>2</sup> and Nobuaki SHIMIZU<sup>2</sup>:

*In vivo* and *in vitro* evaluation of sonodynamic cancer therapy coupled with TiO<sub>2</sub> nanoparticles

## 1. 緒言

光触媒として知られている二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)は強い酸化力や超親水性といった特性からさまざまな分野で利用されている。本研究では TiO<sub>2</sub> に超音波を照射すると、活性酸素であるヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )の生成が促進され、大腸菌やレジオネラなどに対し効果的な殺菌効果が得られることを報告した<sup>[1]</sup> (二酸化チタン/超音波触媒法 (TiO<sub>2</sub>/U.S.法))。そこで、がん細胞に対しても同様の効果があると考え、TiO<sub>2</sub>/US 法のがん細胞への適用について検討を行った。また、がん治療では薬剤による副作用の問題があげられる。これは薬剤が正常な細胞にも送達され、損傷することが主な原因と言われている。そのため効率よく薬剤を患部のみに送達させること (Drug Delivery System : DDS) が不可欠である。そこで DDS の観点から、モデルタンパク質として B 型肝炎ウイルスの持つ肝細胞認識部位である preS1/S2 タンパク質に注目した。これまでの研究で、モデルタンパク質である B 型肝炎ウイルス由来タンパク質 (preS1/S2) を TiO<sub>2</sub> ナノ粒子表面に修飾することで、肝細胞を特異的に認識する粒子の構築に成功している (preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub>)。

本研究の目的は構築した preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> を用いて、*in vitro* での培養がん細胞に対する細胞損傷効果の確認およびその機構の解析、さらに *in vivo* での担がんマウスに対する抗腫瘍効果を検討することである。

## 2. 理論

### 2.1 TiO<sub>2</sub> / U.S. 法

TiO<sub>2</sub> は光によって励起され活性酸素種を発生させることが知られている。TiO<sub>2</sub>/U.S.法とは、その二酸化チタンに超音波を照射すると、強い酸化力をもつ化学種 ( $\cdot\text{OH}$ ) が発生することを利用した方法である。この原理を応用し、二酸化チタンを細胞内に取り込ませた後、超音波を照射することで、腫瘍細胞を死滅させることができると考えられる(Fig.1)。

また、光触媒としての二酸化チタンは励起エネルギーとして紫外光照射を必要とするため、ラジカルの発

生は紫外光が到達可能な表面近傍でのみしか起こらないと考えられる。しかし本研究で提案する TiO<sub>2</sub> / U.S. 法によりラジカルを発生させれば、皮膚組織などの表面部位だけでなく臓器深部の腫瘍組織においても治療が可能となり、非侵襲的ながん治療法を開発できる。

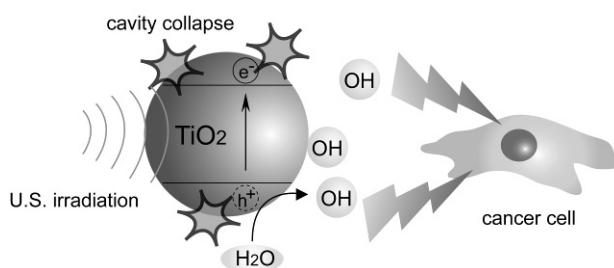


Fig. 1 Schematic illustration of TiO<sub>2</sub>/U.S. method.

### 2.2 B型肝炎ウイルスエンベロープ

B型肝炎ウイルスエンベロープは、B型肝炎ウイルスからウイルスゲノムを除去した外皮タンパク質が、宿主由来の脂質二重膜上に膜タンパク質として存在し直径約 100 nm の中空粒子を形成したものである(Fig. 2)。この粒子はウイルスが本来持つ肝臓への高い感染力を保持しつつも人体に危険性のないことが明らかになっている。本研究では、この B型肝炎ウイルスの肝細胞認識タンパク質 (preS1/S2) を大腸菌遺伝子組換え生産系を用いて作製し、二酸化チタンナノ粒子表面に修飾した。また、B型肝炎ウイルスエンベロープの分子認識部位を他の臓器を特異的に認識する分子に置き換えることで、任意の臓器に遺伝子や薬剤を送達することが可能であると考えられる。

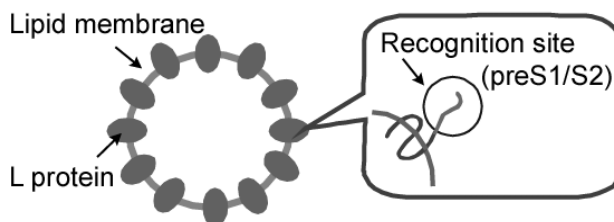


Fig. 2 Hepatitis B virus envelope.

### 3. 実験

#### 3.1 TiO<sub>2</sub>/ U.S. 法による細胞損傷効果

4×10<sup>5</sup> cells/dish になるように 3.5 cm dish に 2 ml ずつ細胞懸濁液を播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub> で 24 時間培養した。その後、TiO<sub>2</sub> 濃度 0.1% (w/v) の preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> を 200μl 添加し、さらに 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 6 時間培養し細胞に取り込ませた。培養がん細胞に TiO<sub>2</sub> を取り込ませた後、超音波照射を行った (周波数 1 MHz, 照射強度 0.1 W/cm<sup>2</sup>, 照射時間 30 sec)。その後、超音波照射直後から 96 時間後までの生細胞数をトリパンブルー染色により計測した。また、それに伴い細胞の形態変化を顕微鏡を用いて観察した。

#### 3.2 細胞死メカニズムの解析

細胞死はアポトーシス、ネクローシスという 2 つのメカニズムにより起こると考えられており、がん治療への応用を目指す場合アポトーシスを誘発させることが望ましい。そこで TiO<sub>2</sub>/U.S.法適用時に見られる細胞死メカニズムの解析を行うため、上記と同様の方法で培養がん細胞に対して TiO<sub>2</sub>/U.S.法を適用した後、ミトコンドリア膜電位の低下、核の凝集、膜のリン脂質の局在変化について検討を行った。Fig.3 にアポトーシスおよびネクローシスの仕組みについて簡潔に示す。

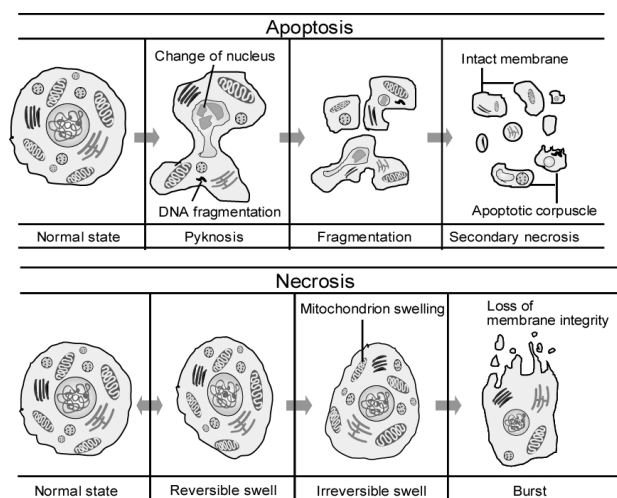


Fig.3 Scheme of apoptotic and necrotic process.

#### 3.3 担がんマウスを用いた抗腫瘍効果

抗腫瘍効果を検討するため、ヌードマウスにヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を移植し、xenograft model を作製して実験を行った<sup>[2]</sup>。マトリゲルと細胞懸濁液を混合し、細胞濃度を 5×10<sup>6</sup>~1×10<sup>7</sup> cells/ml となるように調整し、ヌードマウス (5 週齢) の背中側の皮下に注射した。約 1 ヶ月後、腫瘍の形成を確認した。ペントバルビタールナトリウムを 1 mg/匹の濃度で腹腔内に投与することで麻酔を行い、0.1% (w/v) の preS1/S2 固定

化 TiO<sub>2</sub> を腫瘍部位に 100μl 注入した。投与して 2 分後、約 37℃ の水槽内にマウスの腫瘍部位を浸し、超音波照射を行った。TiO<sub>2</sub> 投与および超音波照射 (周波数 1 MHz, 強度 0~2.0 W/cm<sup>2</sup>, 照射時間 30~60 sec) を行った時点を 0 日目とし、3 回/ week の頻度で TiO<sub>2</sub> の投与および照射を行い、腫瘍体積および体重を測定した。腫瘍体積は 1/2×(長径)×(短径)<sup>2</sup> (mm<sup>3</sup>) より算出した。

### 4. 結果および考察

#### 4.1 TiO<sub>2</sub>/ U.S. 法による細胞損傷効果

周波数 1 MHz, 強度 0.1 W/cm<sup>2</sup>, 照射時間 30 sec の条件で超音波をそれぞれ照射したところ、どの細胞群でも照射直後から 12 時間後までは細胞数に有意差は見られなかった。超音波照射を行っただけの細胞群では 96 時間後までコントロールと同様に正常に細胞数が増殖しているのに対し、preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> を添加した細胞群では超音波照射後 24 時間から徐々に細胞損傷効果が現れ始めた。その効果は時間を追う毎に増大し、96 時間後の時点で TiO<sub>2</sub>/ U.S.法で処置した細胞群は細胞数がコントロール群の 1/2 程度までしか増殖しなかった(Fig.4)。この実験より、TiO<sub>2</sub>/ U.S.法を適用した細胞には細胞増殖抑制効果が現れ、その効果は時間が経過するごとに増大していくことを確認した。超音波照射を行っただけでは細胞損傷効果を確認することはできなかったことから、TiO<sub>2</sub>/U.S.法によって起こる細胞損傷効果は超音波照射による物理的な影響は少ないと考えられる。つまり TiO<sub>2</sub>/U.S.法を用いた細胞は細胞膜などに超音波による物理的な損傷を受けた結果細胞死に至ったのではなく、OH ラジカルなどの化学種の酸化作用により損傷を受け細胞死をひき起こしたと考えられる。

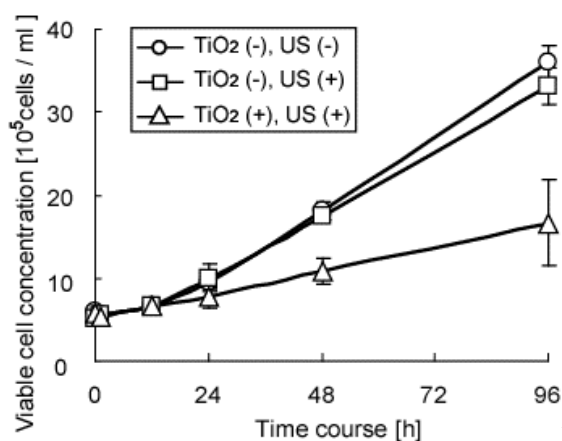


Fig.

4 Effect of TiO<sub>2</sub>/ U.S. method on cell proliferation after U.S. irradiation.

細胞の形態に関しては、照射直後では細胞破裂などは観察されずどの細胞群でもコントロールと同様の結果となった。一方、照射 24 時間後では TiO<sub>2</sub> / U.S.法を適用した細胞群では付着性細胞である HepG2 が dish から剥離し縮小する様子が観察された(Fig.5)。

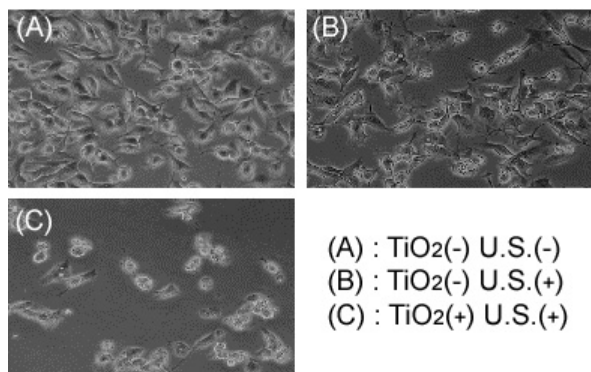


Fig.5 Alteration of cellular morphology at 24 h after U.S. irradiation.

#### 4.2 細胞死メカニズムの解析

以下に TiO<sub>2</sub> / U.S.法適用時に見られた細胞死メカニズムの解析結果を示す。

ミトコンドリア膜電位の低下 ミトコンドリアはいくつもの生体内プロセスにおいて重要な役割を果たしており、その 1 つがアポトーシスへの関与である。ミトコンドリア膜電位の低下は比較的アポトーシス初期の段階で起こるといわれている。そこでミトコンドリア膜電位の低下を蛍光色素 JC-1 を用いて検出した。その結果、超音波照射後 1 時間からアポトーシス細胞のシグナルである緑色蛍光が観察されはじめ、照射後 6 時間の段階でも観察することが出来た(Fig.6)。つまり本実験条件では照射後 1 時間から 6 時間の間にアポトーシスが起り始めると考えられる。

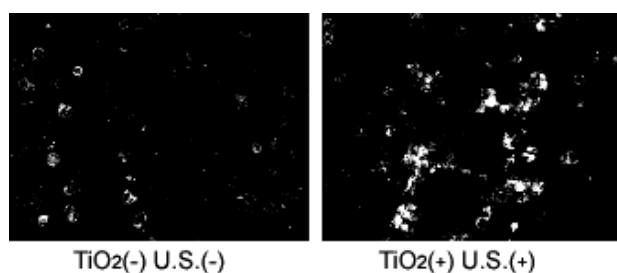


Fig.6 JC-1 staining of HepG2 at 6 h after U.S. irradiation.

核の凝集 細胞がアポトーシスを誘導するシグナルを分泌した後、細胞内では核内のクロマチンの凝集が起こる。クロマチンの凝集は不帰点と呼ばれる不逆

逆点の通過を意味し、最終的な実行機構である DNA 断片化などを経て食食され死滅していくと考えられる。そこで 4%パラホルムアルデヒドによって細胞を固定し、4,6-diamino-2phenylindole(DAPI)によって細胞核を染色し観察を行ったところ、超音波照射後 6 時間から核内のクロマチンの凝集が確認でき、その現象は 24 時間後にさらに顕著に観察できた(Fig.7)。

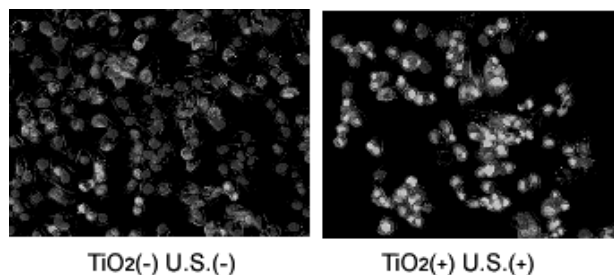


Fig.7 Nuclear condensation cells at 24 h after U.S. irradiation.

膜のリン脂質の局在変化 リン脂質の局在変化に伴い phosphatidylserine (PS)が細胞膜上に露出する。この PS は蛍光色素 Annexin V / FITC を使用することで検出することができる。また、アポトーシスが進行するにつれ膜の透過性が変化し、生細胞の膜は透過できない propidium iodide (PI)が透過できるようになる。Annexin V / FITC, PI を用いて二重染色を行った結果、超音波照射後 24 時間の段階でリン脂質の局在変化に伴う PS の細胞膜上への露出を検出することが出来た(Fig.8)。さらに PI によっても染色されたことから照射後 24 時間ではアポトーシス後期のステージであることが明らかとなった。

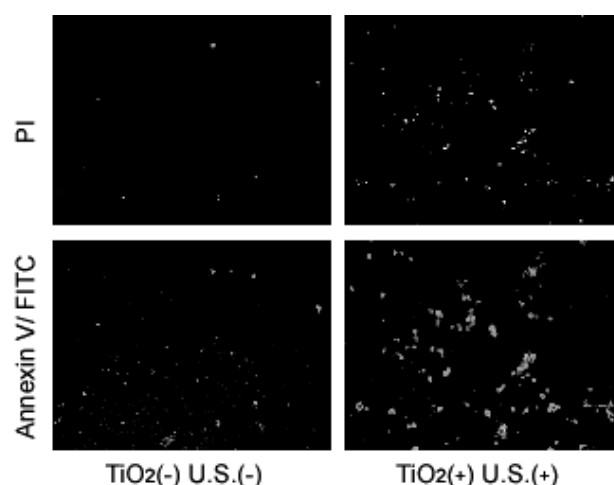


Fig.8 Fluorescence microscopy images stained with Annexin V / FITC and PI.

以上の結果から TiO<sub>2</sub>/U.S.法を適用した細胞群は、超音波照射後 24 時間までの間に様々なアポトーシスシグナルを観察することが出来た。つまり細胞はアポトーシスを誘導した結果、最終的に死に至ると考えられる。

#### 4.3 担がんマウスを用いた抗腫瘍効果

TiO<sub>2</sub>/U.S.法による抗腫瘍効果の確認および最適な超音波照射条件の検討を行った。抗腫瘍効果の評価にあたり、マウス個々の腫瘍体積の経時変化を指標とすることでマウスの個体差も考慮した実験結果を得ることが出来た。

まずはじめに TiO<sub>2</sub> / U.S.法による抗腫瘍効果を検討するため、1 MHz, 1 W/cm<sup>2</sup>, 1 min, Duty 連続という条件で超音波照射を行った(Fig.9)。これまでの研究でマウス個体に対して 0.1% (w/v) の preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> 粒子の毒性はなく、実験に対する影響はないということを確認している。そこでコントロール, TiO<sub>2</sub> (-) U.S. (+), TiO<sub>2</sub> (+) U.S. (+) という 3 つの条件で実験を行った。コントロールの系では、時間経過と共に腫瘍は大きくなり約 1 ヶ月後には実験開始時の 2~6 倍まで成長した。実験全体を通して、腫瘍体積比・体重比どちらにも言えるが、コントロールの系である程度腫瘍の成長速度にばらつきが見られることから、この程度のばらつきは個体差として扱えると考えられる。超音波照射のみを行った系では、コントロールの系と同様に腫瘍の成長が確認された。一方、TiO<sub>2</sub>/U.S.法を適用した系では 6 匹中 4 匹のマウスにおいて腫瘍の成長が抑制された。つまり、超音波のみでは腫瘍の成長を抑制することは出来ないが、TiO<sub>2</sub>/U.S.法を適用することにより抗腫瘍効果が現れると考えられる。

TiO<sub>2</sub>/U.S.法による抗腫瘍効果が確認されたので、最適な超音波照射条件の検討を行った。照射強度が 0.5 W/cm<sup>2</sup> の場合、コントロールの系と同様、腫瘍が成長し抗腫瘍効果を確認することは出来なかった。1 W/cm<sup>2</sup> の場合、4 匹中 3 匹のマウスにおいて腫瘍体積が半分程度まで縮小することを確認した。2 W/cm<sup>2</sup> の場合、マウスが実験途中で死亡もしくは衰弱し実験の続行が不可能となった。これは、TiO<sub>2</sub> 粒子と超音波を併用したことによる毒性が現れたのではなく、週に 3 回という高頻度かつ 2 W/cm<sup>2</sup>, 1 min という超音波照射条件がマウスにとって非常に強力であったため足を損傷し衰弱したと考えられる。以上の結果から、照射強度 1 W/cm<sup>2</sup> がマウスに対してストレスもなく腫瘍の成長抑制を可能にする最適な照射強度であると考えられる。さらに

照射時間について検討を行った。照射強度 1 W/cm<sup>2</sup> の条件下で照射時間を 30 sec に短縮して照射を行ったところ 3 匹中 2 匹のマウスにおいて腫瘍の成長が抑制された。しかし照射時間 30 sec という条件では実験のサンプル数が少ないため抗腫瘍効果があるとは言いきれない。つまり現段階では 1 MHz, 1 W/cm<sup>2</sup>, 1 min, Duty 連続が最適な超音波照射条件であり、最も有意に抗腫瘍効果を示すと考えられる。本実験系では腫瘍の成長を抑制することはできたが、腫瘍細胞を完全に死滅させることはできないため、継続して処置する必要があると考えられる。

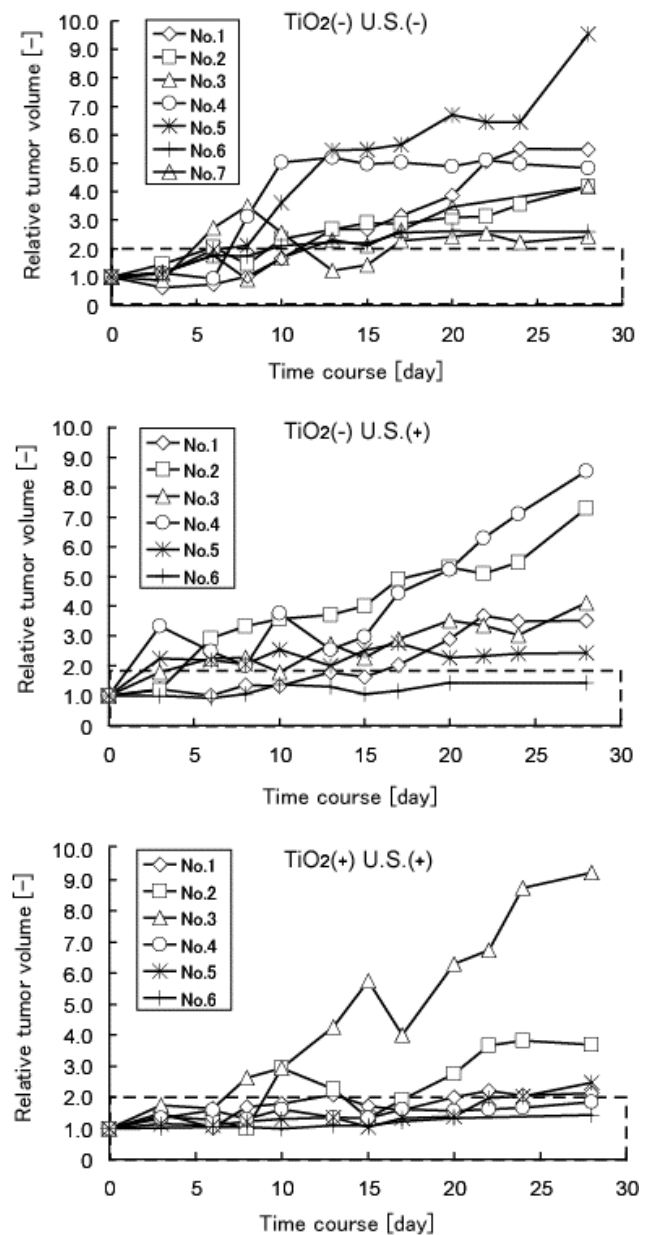


Fig.9 Anti-tumor effect of TiO<sub>2</sub>/U.S. method.  
Condition of U.S. irradiation : 1 W/cm<sup>2</sup>, 1 min

## 5. 結言

本研究によって、以下の結論が得られた。

1. 照射強度  $0.1 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間 30 秒で  $\text{TiO}_2/\text{U.S.}$  法を適用した場合、細胞増殖抑制を確認することができ、その効果は照射後 24 時間から時間の経過とともに増大する。
2. 細胞の形態変化を観察したところ、 $\text{TiO}_2/\text{U.S.}$ 法を適用した細胞群では HepG2 が接着能を失い培養液中に浮遊する様子が観察することができた。
3. ミトコンドリア膜電位の低下、核の凝集、膜のリン脂質の局在変化の解析により、 $\text{TiO}_2/\text{U.S.}$ 法適用時に見られる細胞損傷機構はアポトーシス誘導に起因する。
4. 超音波照射のみでは腫瘍の成長を抑制することはできないが、 $\text{TiO}_2/\text{U.S.}$ 法を適用することで抗腫瘍効果が現れる。
5. 週 3 回の頻度で超音波照射を行う場合、照射強度  $1 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間 1 min が最適な照射条件である。

*In vivo* の実験ではマウスの個体差による影響が大きいため、抗腫瘍効果を確認するにはさらに試行回数を増やす必要がある。今後は体内動態の評価として、尾静脈から  $\text{TiO}_2$  ナノ粒子を投与し肝細胞認識能などを詳しく調べる必要がある。

## Literature cited

1. S. D. Terzakis, M.S. Fountoulakis, D. Mantzavinos, T. Manios, *Ultrason. Sonochem.* (2009) 629-634.
2. J. O. Larkin, G. D. Casey, M. Tangney, J. Cashman, C. G. Collins. *Ultrasound Med. Biol* 34 (2008) 406-413