

# Sonodynamic therapy of cancer using nano-sized TiO<sub>2</sub> particles with a selective affinity for hepatic cells

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-05<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/30179">http://hdl.handle.net/2297/30179</a>             |

# 肝細胞特異認識能を有する二酸化チタン・ナノ粒子を用いた 超音波力学的がん治療

園家 史朗<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 金沢大学大学院自然科学研究科

<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

Sonoke, S., Ninomiya, K., Shimizu, N.

Sonodynamic therapy of cancer using nano-sized TiO<sub>2</sub> particles with a selective affinity for hepatic cells.

## 1. 緒言

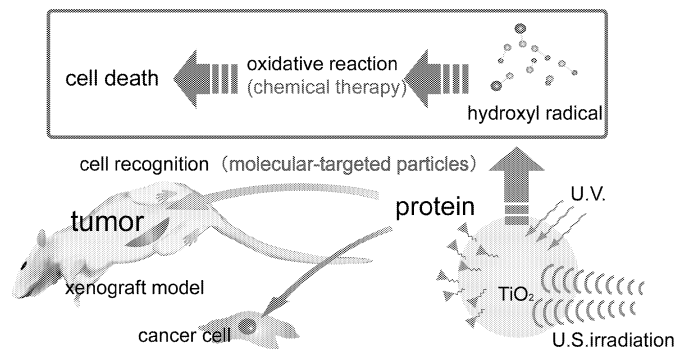
がん治療には外科的手術をはじめ放射線療法、化学療法等様々な治療法が試みられているが、これらの治療法は副作用による身体への負担が大きい。これは薬剤が正常な細胞にも送達されてしまい、毒性を発現することが主な原因と考えられる。このため、効率よく薬剤を必要な患部に、必要な量だけ送達させることが不可欠である。

本研究室では二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) ナノ粒子と B 型肝炎ウイルスの肝細胞認識部位である preS1/S2 タンパク質に着目した。TiO<sub>2</sub> ナノ粒子は、波長 380 nm 以下の紫外光を照射すると、酸化力を持つ活性酸素種が生成する光触媒として知られている。本研究室では、この TiO<sub>2</sub> ナノ粒子に超音波を照射すると、紫外光照射と同様に活性酸素種であるヒドロキシルラジカル (・OH) の生成が促進されることを確認した (二酸化チタン / 超音波触媒法 (TiO<sub>2</sub> / U.S.法))。これまでに、この TiO<sub>2</sub> / U.S.法を用いて大腸菌やレジオネラなどの効果的な殺菌効果が得られることが確認された。そこで本研究では、がん細胞に対しても同様の効果があると考え、TiO<sub>2</sub> / U.S.法を新規がん治療法として提案するため、TiO<sub>2</sub> / U.S.法のがん細胞への適用について検討した。これまでの研究によって、本研究室ではタンパク質を 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。本研究では構築した肝細胞認識二酸化チタン・ナノ粒子を用い、超音波照射下の培養がん細胞の死滅効果および担がんマウスに対する抗腫瘍効果を検討した。

## 2. 理論

### 2.1 二酸化チタン・超音波触媒法

光触媒として知られている TiO<sub>2</sub> は光によって励起し、活性酸素種を発生させることが報告されている。二酸化チタン・超音波法とは、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 (・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)。本来、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(UV)照射が必要なため、ラジカル発生は UV が到達できる表面近傍でのみしか起こらないと考えられる。しかし、二酸化チタン・超音波触媒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。

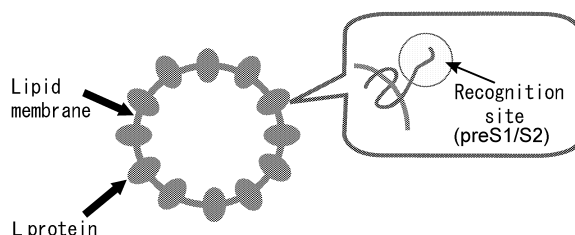


### 2.2 B 型肝炎ウイルスエンベロープ

B 型肝炎ウイルス (HBV) は、ウイルスゲノムをヌクレオカプシド (nucleocapsid) が包む直径約 27nm のコア粒子と、これを被う外殻 (エンベロープ、envelope) から成る二重構造をとっている。このウイルスゲノムがなく、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を B 型肝炎ウイルスエンベロープという (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<sup>[1]</sup>。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の送達が期待されている。既往の研究により、この肝細胞認識タンパク質(preS1/S2)を二酸化チタン・ナノ粒子表面に修飾することに成功している。

Fig. 2 Hepatitis B virus envelope.



### 3. 実験

#### 3.1 TiO<sub>2</sub> / U.S. 法適用後の細胞損傷効果の測定

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 °C、5 % CO<sub>2</sub> で 24 時間培養した。その後、TiO<sub>2</sub> 濃度 0.1 % (v/v) の preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> を 200μl 添加し、さらに 37 °C、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、1 MHz の超音波 (0.1 W / cm<sup>2</sup>、50 % Duty 比) を 30 秒間照射した。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測定した。

この実験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 24 時間ごとに適用し、その後の細胞数を測定した。

#### 3.2 TiO<sub>2</sub> / U.S. 法適用後の細胞の形態変化

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.法を用い、超音波照射直後および 48 時間後までの細胞の形態変化を顕微鏡を用いて観察した。同様に超音波照射後 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後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### 3.3 TiO<sub>2</sub> / U.S. 法による抗腫瘍効果

3.3.1 担がんマウスを用いた TiO<sub>2</sub> / U.S.法 マトリゲルと細胞懸濁液を混合し、細胞濃度を final 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。数週間後、腫瘍の形成を確認した後、0.1%(v/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、腫瘍局部へゲルを塗り 1 MHz の超音波を各条件 (2 W/cm<sup>2</sup>, 1 min×2、1 W/cm<sup>2</sup>, 2 min×2) で照射した。TiO<sub>2</sub> 投与および超音波照射を行った時点を 0 週として、その後経過日数毎にマウスの体重および腫瘍の大きさを測定した。TiO<sub>2</sub> 投与および超音波照射は 0 週から 1 週間ごとに行った。

3.3.2 高頻度で TiO<sub>2</sub> / U.S.法を適用することによる抗腫瘍効果 上記と同様の方法で xenograft model を作製し、腫瘍形成を確認した。ペントバルビタールナトリウムを 1 mg / 匹 で腹腔内投与により麻酔後、0.1%(v/v) の preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> を腫瘍部位に 100μl 注入した。投与 2 分後、約 37°C の水槽内にマウスの腫瘍部位を浸漬し、超音波を各条件 (1 W/cm<sup>2</sup>, 1 min、1 W/cm<sup>2</sup>, 30 min、0.5 W/cm<sup>2</sup>, 1 min) で照射した。TiO<sub>2</sub> 投与および超音波照射を行った時点を 0 日とし、3 回/week という頻度で TiO<sub>2</sub> / U.S.法を用い、腫瘍体積および体重を測定した。

### 4. 結果および考察

#### 4.1 TiO<sub>2</sub> / U.S. 法適用後の細胞損傷効果

1 MHz、50 % Duty 比、30 秒間、0.1 W / cm<sup>2</sup> 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-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. 3)。また、複数回照射によってその効果はさらに顕著になった。この実験より、TiO<sub>2</sub> / U.S.法で処置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。これらのことから 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ネクローシスが誘導されたのではなく、OH ラジカルなどの化学種の酸化作用により損傷を受け、アポトーシスを誘導し細胞死を起こした可能性が強い。

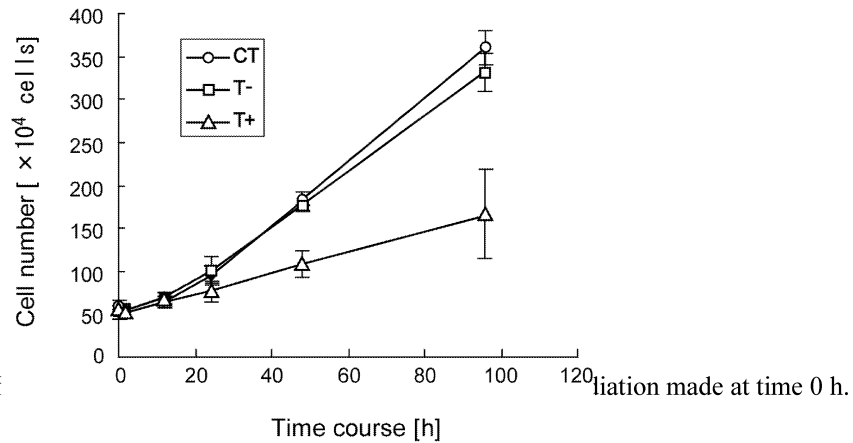


Fig. 3 Effect of

irradiation made at time 0 h.

#### 4.2 TiO<sub>2</sub> / U.S. 法適用後の細胞の形態変化

未処理の細胞群では48時間後まで接着性を保ったまま細胞増殖を続けている。それに対してTiO<sub>2</sub>/U.S.法を用いた細胞では超音波照射後時間が経過するにしたがって全体の細胞数も減少し、その形態は球形になり、24時間後には接着性細胞であるHepG2が培養液中に浮遊していた。また、48時間後には細胞数自体が激減しており、残存する細胞もメディウム中に浮遊していた。また、超音波を照射しただけの細胞では細胞数は減少しているものの、接着性は保持していた(Fig. 4)。さらにDAPI染色法から、TiO<sub>2</sub>/U.S.法を適用した細胞では超音波照射後6時間から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. 5-1,2)。つまりTiO<sub>2</sub>/U.S.法を用いた細胞は、超音波照射後6時間でクロマチンの凝集を起こし、結果として24時間後には細胞の接着性を失い培養液中に浮遊していると考えられる。従ってDAPI染色法によってもTiO<sub>2</sub>/U.S.法を用いた細胞はアポトーシスを誘導した結果その接着性を失い最終的に死にいたることが示唆された。

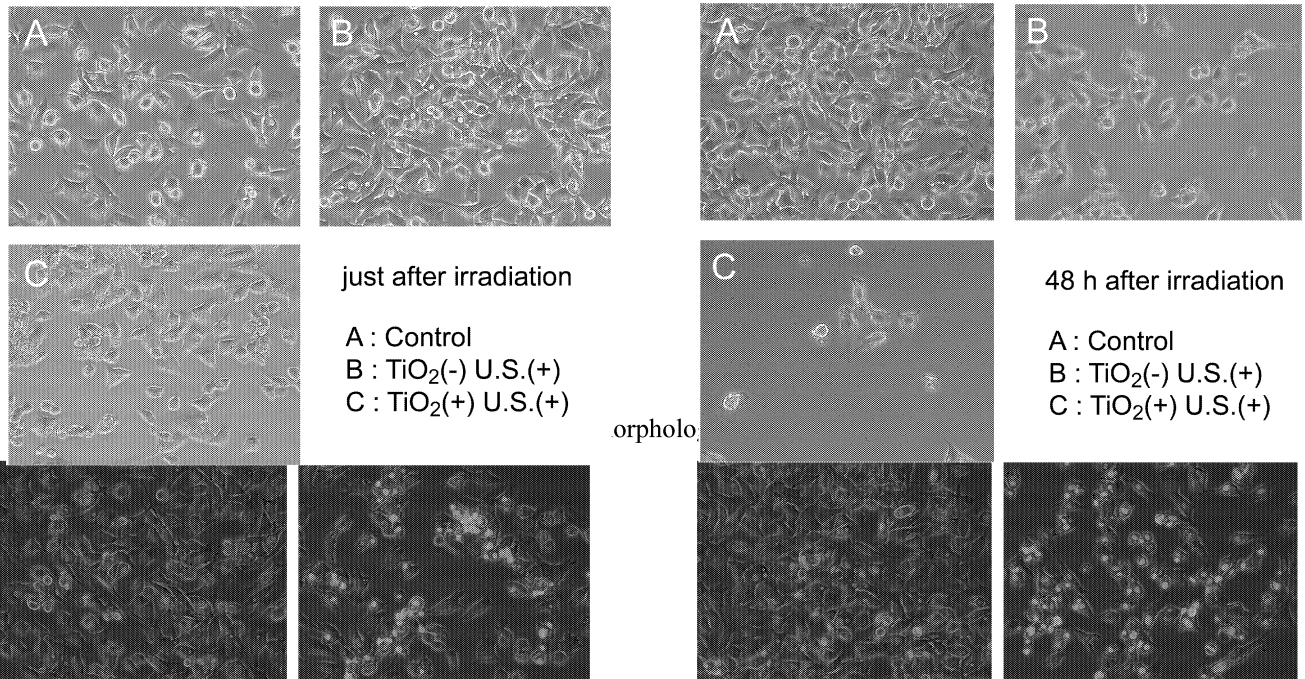


Fig.5-1 Nuclear condensation cells at 6 h after U.S. irradiation

Fig. 5-2 Nuclear condensation cells at 24 h after U.S. irradiation.

#### 4.3 TiO<sub>2</sub> / U.S. 法による抗腫瘍効果

4.3.1 担がんマウスを用いたTiO<sub>2</sub>/U.S.法 マウスにヒト肝臓がん由来細胞HepG2を移植し、担がんマウスを作製して実験を行った。腫瘍の大きさは $1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 (\text{mm}^3)$ として算出した。

TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を投与せず超音波も照射しない系では個体差はあるものの全てのマウスで腫瘍が成長していることが確認できた。また、同様にTiO<sub>2</sub>/U.S.法を用いた系のマウスにおいて、どの超音波照射条件でも腫瘍の成長が観察された(Fig. 6-1)。体重においても、TiO<sub>2</sub>/U.S.法を適用した系がコントロール群と同様の

傾向を示し元の体重の10%程度の減少がみられた (Fig.6-2)。これは腫瘍の成長が見られたことと一致する。今回の結果から、1 MHz, 2 W/cm<sup>2</sup>, 30 % duty, 1 min×2 回と、1 MHz, 1 W/cm<sup>2</sup>, 30 % duty, 2min×2 回という超音波照射条件では TiO<sub>2</sub> / U.S.法による抗腫瘍効果は確認できなかった。

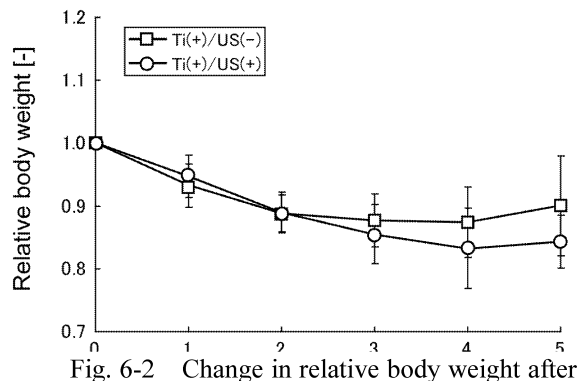
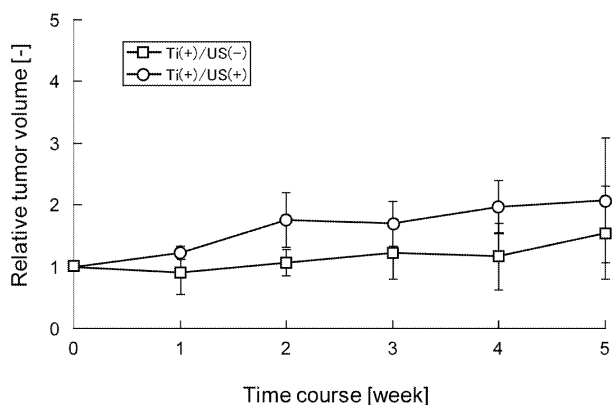


Fig. 6-2 Change in relative body weight after

U.S. irradiation condition : 2 W/cm<sup>2</sup>, 1 min×2

treatment of TiO<sub>2</sub> / U.S. method

#### 4.3.2 高頻度で TiO<sub>2</sub> / U.S.法を適用することによる抗腫瘍効果

前述の実験方法との大きな変更点は、超音波の照射方法である。4.3.1 ではゲルを塗布した後直接超音波を照射していたが、本実験では麻酔下のマウスを腫瘍部位まで水中に浸し、超音波照射を行うことで安定して照射することが可能となった。また、TiO<sub>2</sub> / U.S.法を以前の週に1回という頻度から週に3回と高い頻度で行った。

1 MHz, 1 W/cm<sup>2</sup>, 1 min, 連続照射という条件で超音波を照射したところ、超音波照射のみの群と TiO<sub>2</sub> 粒子を添加して超音波照射を行った群でマウスに対して強い障害およびストレスはみられなかった。さらに、コントロールの群、1 W/cm<sup>2</sup>, 1 min で超音波照射のみの群および TiO<sub>2</sub> 粒子を投与し 0.5 W/cm<sup>2</sup>, 1 min という条件で超音波を照射した群ではほとんどのマウスで腫瘍が成長した ( Fig. 7)。また、1 W/cm<sup>2</sup>, 1 min、では4匹中3匹、1 W/cm<sup>2</sup>, 30 sec では4匹中2匹の腫瘍体積が半分程度まで縮小した ( Fig.8)。以上の結果から、TiO<sub>2</sub> / U.S.法を用いる場合、超音波は 1 W/cm<sup>2</sup> という照射強度がマウスに対するストレスもなく腫瘍の縮小を可能にし、1 MHz, 1 W/cm<sup>2</sup>, 1 min, Duty 連続という照射条件が最も有意に抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。しかし、この実験ではサンプル数が同一条件全体で4匹と少なく、その中で抗腫瘍効果が認められたマウス、認められなかったマウスの両方が存在し、個体差が大きいため今後さらに試行回数を増やすべきと考えられる。

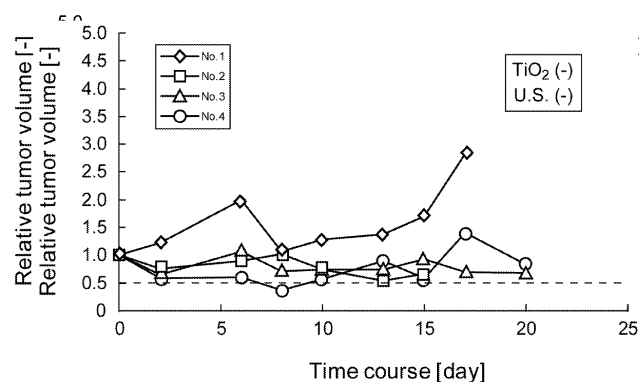


Fig. 7 Antitumor effect of TiO<sub>2</sub> / U.S. method

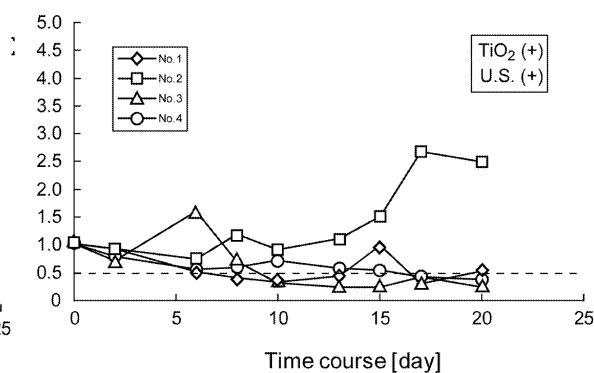


Fig. 8 Antitumor effect of TiO<sub>2</sub> / U.S. method.

U.S. irradiation condition : 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) 0.1 W/cm<sup>2</sup>, 30 秒間という照射条件で TiO<sub>2</sub> / U.S.法を適用した細胞群は超音波照射後 24 時間から徐々に細胞増殖抑制効果が現れ始め、その効果は時間経過と共に大きくなった。

2)  $0.1 \text{ W/cm}^2$ 、30 秒間の条件で 24 時間毎に継続して超音波を照射することで細胞増殖抑制効果は増大した。このことから *In vivo* での実験でも複数回  $\text{TiO}_2/\text{U.S.}$ 法を用いることが必要とである。

3) 超音波照射後の細胞の形態変化および DAPI 染色

法による結果から  $\text{TiO}_2/\text{U.S.}$ 法を適用した細胞群では超音波照射後約 6 時間でアポトーシスを誘導した結果、接着能を失い培養液中に浮遊するということが確認できた。

4) 担がんマウスに対して週に 3 回の頻度で超音波照射を行った場合、 $1 \text{ MHz}$ ,  $1 \text{ W/cm}^2$ ,  $1 \text{ min}$ , Duty 連続という照射条件が最も有意に抗腫瘍効果を示した。

*In vivo* での実験はまだ初期段階であり  $\text{TiO}_2/\text{U.S.}$ 法の抗腫瘍効果を確認するには試行回数が不足であると考えられる。また、今後超音波の照射条件だけではなく  $\text{TiO}_2$  ナノ粒子濃度条件の検討、尾静脈注射による  $\text{TiO}_2$  ナノ粒子の肝細胞認識能の評価などを行い、さらなる  $\text{TiO}_2/\text{U.S.}$ 法の抗がん作用を検討する必要がある。

#### 参考文献

T. Yamada, S. Kuroda et al., Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nature Biotech.* 21 (2003) 885-890.

D.C. Alvaro Jr., L. G. Mota, E. A. Nunan, et al., *Life Sci.* 80 (2007) 659-64.

H.-G. Zhang, K. Mehta, P. Cohen, C. Guha, *Cancer Lett.*, 271 (2008) 191-194.

W. Zhang, J. Liu, Y. Wu, F. Xiao, Y. Wang, R. Wang, H. Yang, G. Wang, J. Yang, H. Deng, J. Li, Y. Wen, Y. Wei, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 376 (2008) 10-14.

X.-L. Lu, X.-B. Jiang, R.-E. Liu, S.-M. Zhang, *Vaccine* 26 (2008) 5352-5357.