

# Pinpoint delivery of TiO<sub>2</sub> nano-particles to the cancer cells in vitro

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/17000">http://hdl.handle.net/2297/17000</a>

# 機能性二酸化チタン・ナノ粒子を用いたがん治療への基礎研究

笹井良祐<sup>1</sup>, 荻野千秋<sup>1</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

R. Sasai, C. Ogino, and N. Shimizu

Pinpoint delivery of TiO<sub>2</sub> nano-particles to the cancer cells *in vitro*

## 1. 緒言

近年、二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) を光触媒として用いたさまざまな分野での応用展開が注目されている。TiO<sub>2</sub> に 380 nm 以下の短波長の紫外光を照射すると、酸化力を持つ活性酸素種が生成され、この酸化力を用いて環境ホルモンなどの有害化学物質の分解処理、有害微生物の殺菌・抗菌が報告されている。また、紫外光照射により TiO<sub>2</sub> 表面が親水性になる機能を利用した防曇技術も様々な分野で活用されている。さらに、この光触媒反応を利用した新規がん治療としての研究も進められている。

本研究室ではこのような光触媒として知られている TiO<sub>2</sub> に超音波を照射すると、活性酸素種の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属菌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. 法によるがん細胞への影響について検討することで、新規がん治療としての可能性を評価する。超音波を利用したがん治療には、生体組織の超音波吸収による加熱作用を用いたものや、超音波振動による機械作用を用いたもの、超音波がひき起こすキャビテーション効果を利用して生体に投与した物質に化学反応を起こさせる音響化学療法などがある。また、がん細胞に超音波を照射すると、アポトーシスを誘導してがん細胞の増殖を抑制するという報告がなされている [1]。

本研究の目的は、B 型肝炎ウイルス外皮タンパク質を固定化した TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を用いて、*in vitro* での培養がん細胞への取込みおよび TiO<sub>2</sub> / U. S. 法によるがん細胞障害メカニズム、さらに *in vivo* での TiO<sub>2</sub> / U. S. 法によ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

超音波は縦波であるために分子が縦方向に振動し、高圧・低圧域ができる。低圧域で圧力が溶媒の蒸気圧より十分低くなると、溶媒分子が引き離され、内部に蒸気が取り込まれ気泡 (キャビティ) が生成する。この気泡は液体中の圧力変化に伴い、膨張・収縮を繰り返す、十分に大きく膨張し臨界状態に達すると急激に圧壊する。気泡の圧壊時には、局所的な高温場に伴い水分解が起こり •OH が生成することが報告されている。このような超音波からの •OH と TiO<sub>2</sub> に超音波を照射することで発生する •OH の両者によって腫瘍細胞膜を酸化し、死滅させることが可能である。また、光触媒としての TiO<sub>2</sub> 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範囲でしか起こらないが、本研究で提案する TiO<sub>2</sub> / U. S. 法でラジカルを生成させれば、皮膚組織などの表層部だけでなく臓器深部のがん治療も可能となり、非侵襲的な新規がん治療法を開発できる (Fig. 1)。

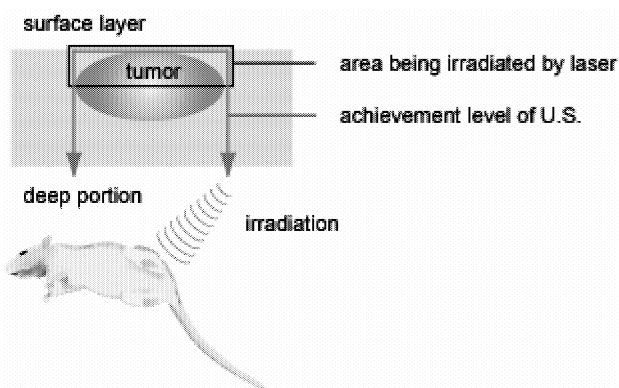


Fig. 1 Advantage of ultrasound irradiation (U.S.).

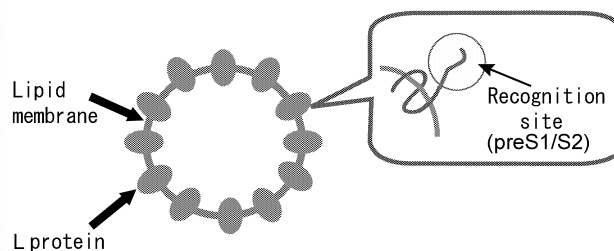


Fig. 2 Hepatitis B virus envelope.

### 3. 実験

#### 3.1 免疫染色法による粒子の特異性評価

培養細胞懸濁液を  $4 \times 10^5$  cells/dish になるように 3.5 cm dish に 2 ml ずつ播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  で 24 時間インキュベートした。その後、 $\text{TiO}_2$  濃度 0.1 % (v/v) の preS1/S2 固定化  $\text{TiO}_2$  あるいは  $\text{TiO}_2$ 、および preS1/S2 タンパク質を 200  $\mu\text{l}$  ずつ添加し、さらに  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  で 6 時間インキュベートし細胞に取り込ませた。その後、ターゲット粒子に特異的な 1 次抗体および蛍光標識した 2 次抗体により免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### 3.2 バルク中のラジカル測定

3.5 cm dish に  $2\mu\text{M}$  Aminophenyl Fluorescein 溶液を 2 ml ずつ添加した。その後、0.1 % (v/v) の  $\text{TiO}_2$  を 200  $\mu\text{l}$  /dish ずつ添加し、1 MHz の超音波発生器を用いてシャーレ下部より超音波 ( $0 \sim 1.8 \text{ W}/\text{cm}^2$ 、50 % Duty 比) を 30 秒間照射した。振動子は水中に、シャーレを水面に各々固定した (Fig. 3)。蛍光マイクロプレートリーダーを用いて生成されたラジカル量を蛍光として測定した ( $\text{Ex} = 490 \text{ nm}$ ,  $\text{Em} = 515 \text{ nm}$ )。

#### 3.3 トリパンプルー染色による $\text{TiO}_2$ / U.S. 法の細胞損傷効果の測定

上記と同様の条件で  $\text{TiO}_2$  を取り込ませた培養細胞に 1 MHz の超音波 ( $0 \sim 0.3 \text{ W}/\text{cm}^2$ 、50 % Duty 比) を 30 秒間照射した。その後、超音波照射直後および 24 時間後の生細胞数をトリパンプルー染色により測定した。粒子無添加で超音波を照射しない場合の生細胞数に対する生存生細胞数から細胞損傷効果を評価した。

#### 3.4 細胞膜の酸化

上記と同様の条件で  $\text{TiO}_2$  を取り込ませた培養細胞に 1 MHz の超音波 ( $0.3 \text{ W}/\text{cm}^2$ 、50 % Duty 比) を 30 秒間照射した。細胞濃度を調整した後、Diphenyl-1-pyrenyl phosphine (DPPP) 溶液を混合し、15, 30, 60 min 間暗所でインキュベートした。過酸化脂質と DPPP の反応により生成する酸化物を蛍光マイクロプレートリーダーを用いて蛍光として測定した ( $\text{Ex} = 350 \text{ nm}$ ,  $\text{Em} = 395 \text{ nm}$ )。

#### 3.5 担がんマウスを用いた $\text{TiO}_2$ / U.S. 法による抗腫瘍効果

マトリゲルと細胞懸濁液を混合し、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  $\text{TiO}_2$  を腫瘍部位に 100  $\mu\text{l}$  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 ( $2 \text{ W}/\text{cm}^2$ 、30 % duty 比) を 2 分間照射した。 $\text{TiO}_2$  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。 $\text{TiO}_2$  投与および超音波照射は 0 週時の単回のみ行った。

## 4. 結果および考察

### 4.1 免疫染色法による粒子の特異性評価

抗 preS1 抗体を用いた免疫染色法によって preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> の肝細胞認識能を調べた。preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> を添加した場合、ヒト肝臓がん由来細胞である HepG2 において強い赤色蛍光を示した。また、preS1/S2 タンパク質を添加した場合も、同じく赤色蛍光を示した (Fig. 4)。それに対し、ヒト大腸がん由来細胞である WiDr の場合、preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> および preS1/S2 タンパク質のいずれを添加しても赤色蛍光は示さなかった (Fig. 5)。以上の結果より、preS1/S2 タンパク質は肝細胞に特異的な領域を有するタンパク質であり、かつ preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> は肝細胞に特異的に取り込まれることが判明した。

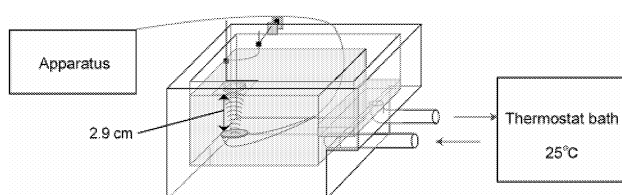


Fig. 3 Schematic illustration of U.S. exposure equipment.

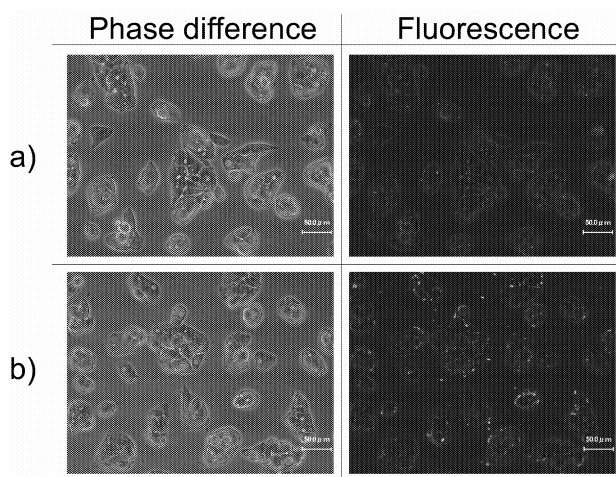


Fig. 4 Immunostaining of HepG2 cells by anti-preS1 antibody. a) preS1/S2 protein, b) preS1/S2 conjugated TiO<sub>2</sub>,

scale bar = 50 μm.

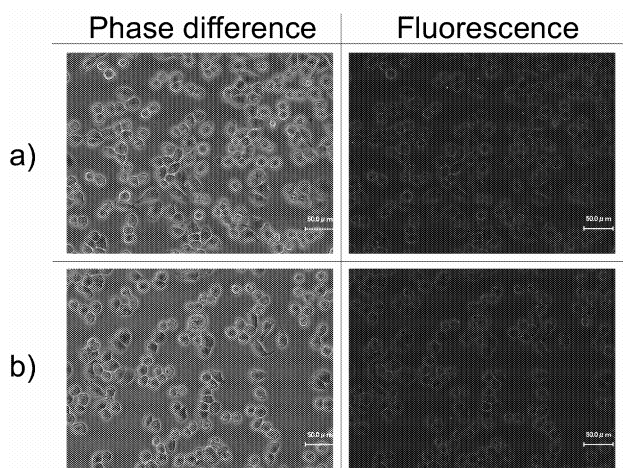


Fig. 5 Immunostaining of WiDr cells by anti-preS1 antibody. a) preS1/S2 protein, b) preS1/S2 conjugated TiO<sub>2</sub>, scale bar = 50 μm.

preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> においては主に細胞膜の周辺で蛍光が観察された。一方、preS1/S2 タンパク質においては点状の蛍光が見られたが、preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> と比較して蛍光量は少なかった。これは preS1/S2 タンパク質がそれ自体の大きさを上回る TiO<sub>2</sub> 粒子と結合することで、preS1/S2 タンパク質のみと比較して重力沈

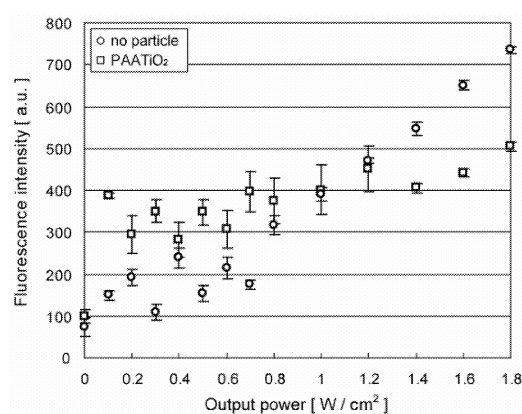


Fig. 6 Effect of U.S. irradiation intensity on ·OH radical formation.

降により細胞と接触する度が増すためではないかと思われる。

#### 4.2 バルク中のラジカル測定

TiO<sub>2</sub> / U. S. 法によって生成されるラジカル量の超音波照射出力による影響を調べた (Fig. 6) . 照射出力が 0~1.0 W/cm<sup>2</sup> においては, 粒子無添加の時と比較して, TiO<sub>2</sub> を添加した時の方が生成されたラジカル量が増加することが分かった. 一方, 1.0 W/cm<sup>2</sup> 以上の出力においては, TiO<sub>2</sub> を添加した時の方がラジカル生成量は抑制された. また, 粒子無添加の際, 出力に依存してラジカル生成量は増加した. これらのことから, 今回の照射条件において, 低出力の際に TiO<sub>2</sub> / U. S. 法の細胞損傷効果が発現するのではないかと考えられる.

#### 4.3 TiO<sub>2</sub> / U. S. 法の細胞損傷効果お検討

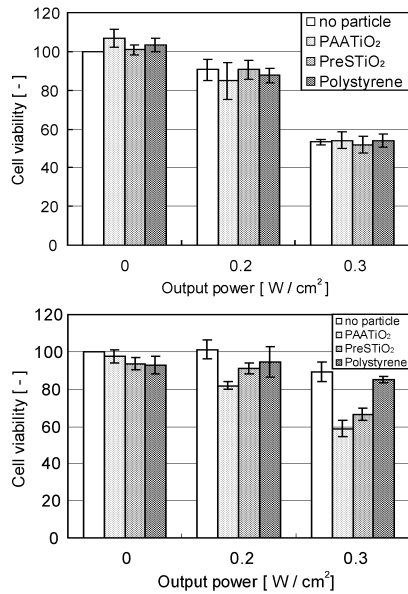
preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> の比較対照に, 表面にカルボキシル基を付与し単分散可能なポリアクリル酸固定化 TiO<sub>2</sub> (PAATiO<sub>2</sub>) およびポリスチレン粒子 (粒径 100 nm) を用いた (Fig. 7). 照射直後において, どの粒子を添加した際も生細胞数はほぼ一定であった. それに対して, 照射後 24 時間後においては, PAATiO<sub>2</sub> および preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> を添加し 0.3 W / cm<sup>2</sup> の出力で超音波を照射した場合, ポリスチレン粒子を添加した場合と比較して有意な細胞増殖の抑制効果が観察された. これより, 照射直後においては TiO<sub>2</sub> / U. S. 法により生成される OH ラジカルは細胞を壊死させるほどの酸化力はなく, むしろ細胞数の減少は超音波エネルギーによる効果の方が大きかったと考えられる. ただし, 照射後 24 時間後において TiO<sub>2</sub> を添加し超音波を照射した細胞が最も増殖の抑制効果が見られたことは, 24 時間の間に OH ラジカルの酸化力による細胞膜への影響により, アポトーシスによる細胞死が進行している可能性が考えられる. また, ポリスチレン粒子を添加し超音波を照射しても, 24 時間後の増殖抑制効果は TiO<sub>2</sub> 添加の時と比べて低い. これより, 増殖抑制効果は細胞内かまたは細胞表面に局在したナノ粒子と細胞との衝突などの物理的要因の影響および粒子が添加されたことによるキャビティの増大の影響は考えられにくい. さらに, TiO<sub>2</sub> を添加し超音波を照射しない場合, 増殖抑制効果はほとんど見られない. よって照射後 24 時間後の増殖抑制効果は, TiO<sub>2</sub> / U. S. 法により生じる OH ラジカルの酸化力による影響が大きいと考えられる.

#### 4.4 細胞膜の酸化

TiO<sub>2</sub> / U. S. 法による膜酸化の効果を調べた. 結果を Fig. 8 に示す. DPPP を 50 μM, 100 μM のいずれの濃度で反応させた場合も, 蛍光強度は DPPP と細胞との反応時間に無関係にほぼ一定であり, また粒子無添加の場合と比較して, TiO<sub>2</sub> / U. S. 法による細胞膜酸化の効果は見られなかった. preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> を添加した場合, 6 時間の取り込み時間では主に細胞膜において局在が確認されたが, PAATiO<sub>2</sub> の場合, 表面電荷により細胞内に取り込まれていることが予想される. 仮に細胞内に取り込まれているならば, 細胞膜ではなく細胞内小器官が酸化されていることも予想され, さらなる検討が必要と思われる.

#### 4.5 担がんマウスを用いた TiO<sub>2</sub> / U. S. 法による抗腫瘍効果

ヒト肝臓がん由来細胞株 HepG2 を移植した担がんマウスを用いて TiO<sub>2</sub> / U. S. 法による抗腫瘍効果についての検討を行った. 腫瘍体積は  $1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$  (mm<sup>3</sup>) によって求めた. 経過日数毎の腫瘍体積比と体重比の結果を示す (Fig. 9, 10).



照射直後

照射 24 時間後

Fig. 7 Effect of output power of U.S. irradiation on cell viability.

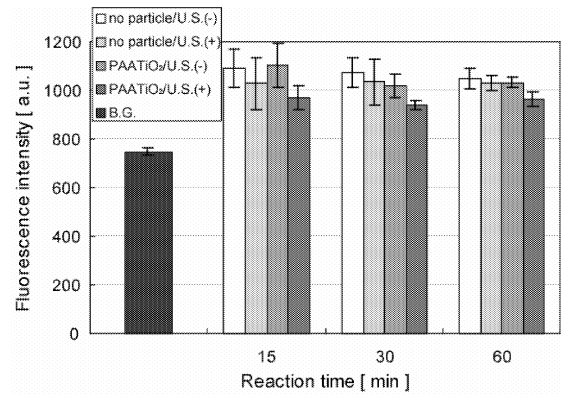


Fig. 8 Lipid peroxidation of cell membrane by TiO<sub>2</sub> / U.S. method.

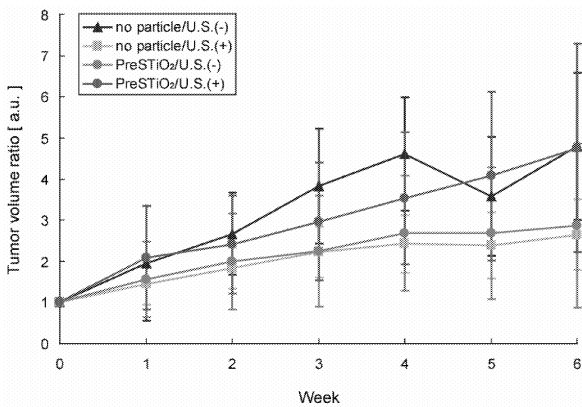


Fig. 9 Tumor volumetric assessment of the antitumor effect of TiO<sub>2</sub> / U.S. method on human hepatoma cell line HepG2 xenografts in nude mice.

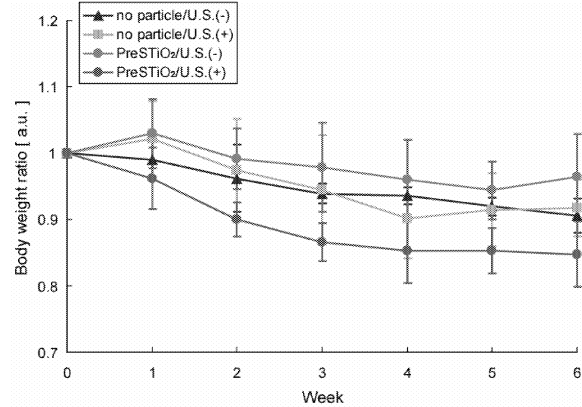


Fig. 10 Tumor weight assessment of the antitumor effect of mice. Xenografts in nude mice. TiO<sub>2</sub> / U.S. method on human hepatoma cell line HepG2

TiO<sub>2</sub> 粒子添加および超音波照射の有無に関わらず、時間経過とともに腫瘍は成長する結果となった。体重においては、TiO<sub>2</sub> を投与し超音波を照射した系がその他の系と比較してやや減少が見受けられたが、これは腫瘍の成長が見られたこととも一致すると考えられる。以上のことから、今回の TiO<sub>2</sub> 投与条件および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。In vivo においては in vitro と比較して TiO<sub>2</sub> 粒子の挙動および細胞や TiO<sub>2</sub> に対する超音波の影響が異なることが考えられる。また、解析方法によって有意な効果が得られることも考えられるので、さらなる検討が必要と思われる。

## 5. 結言

本研究において以下のことが明らかとなった。

- (1) preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> は肝細胞を特異的に認識する作用を持つことを確認した。
- (2) 1 MHz の超音波において、TiO<sub>2</sub> / U.S. 法によるラジカル生成の増大は低出力際で確認された。
- (3) TiO<sub>2</sub> 存在下における超音波照射によって、照射後 24 時間後において PAATiO<sub>2</sub> および preS1/S2 固定化 TiO<sub>2</sub> を添加し 0.3 W / cm<sup>2</sup> の出力で超音波を照射した場合、細胞増殖の抑制効果が観察された。これより、TiO<sub>2</sub>

/ U. S. 法によるアポトーシスによる細胞死が示唆された.

(4)  $\text{TiO}_2$  / U. S. 法によるラジカル生成に起因する細胞膜の酸化効果は確認できなかった.

(5) HepG2 を移植した担がんマウスを用いた  $\text{TiO}_2$  / U. S. 法による抗腫瘍効果は確認できなかった.

今後, *in vitro* においては,  $\text{TiO}_2$ /U. S. 法による細胞死をより詳細に解析すること, *in vivo* においては,  $\text{TiO}_2$  投与条件および超音波照射条件の検討が必要である. また, 今回作製した preS1/S2 固定化  $\text{TiO}_2$  粒子の肝細胞特異性および EPR 効果によるがん組織への集積の有無を確認するため, 粒子の体内挙動に関しても解析を行う必要があると思われる.

#### Literature cited

1) H.Honda, QL Zhao, T.Kondo. *Ultrasound in Med. & Biol.* 28, 673-682, 2002.

2) Dongwei Yu, Chie Amano, Takayuki Fukuda et al. *FEBS journal* 272, 3651-3660, 2005.