

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300177

研究課題名（和文）腫瘍集積型光触媒ナノ粒子の創製と超音波力学的がん治療

研究課題名（英文）Sonodynamic cancer therapy with tumor targeting TiO<sub>2</sub> nanoparticles.

研究代表者

清水 宣明（SHIMIZU NOBUAKI）

金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授

研究者番号：50019634

研究成果の概要（和文）：がん細胞を特異的に認識・結合する生体分子（DNA アプタマー、アビジン）とポリアクリル酸を固定化した溶液分散型二酸化チタン（TiO<sub>2</sub>）ナノ粒子を作製した。TiO<sub>2</sub> に超音波を照射することにより生成する OH ラジカルの培養がん細胞に対する細胞傷害効果を検討した。その結果、がん細胞が OH ラジカルなどの化学種の強力な酸化作用により有意に損傷を受け、アポトーシスを誘導し細胞死に至ることを確認した。

研究成果の概要（英文）：A new sonodynamic therapy for cancer cells was proposed in this study. The delivery of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles (NPs) modified with avidin specifically recognizing cancer cells and subsequent generation of OH radicals from TiO<sub>2</sub> NPs activated by external ultrasound irradiation were studied. The uptake of TiO<sub>2</sub> NPs modified with avidin by MCF7 cells was clarified and apoptosis was observed at 6 h after the TiO<sub>2</sub>/US treatment. Although no apparent cell-injury was observed until 24 h after the treatment, the viable cell concentration had deteriorated to 46% of the control at 96 h.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2011 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医用生体工学、生物工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：二酸化チタン，超音波触媒，OH ラジカル，ナノ粒子，がん治療，機能性粒子，標的化，DNA アプタマー

1. 研究開始当初の背景

従来光触媒として知られている二酸化チ

タン (TiO<sub>2</sub>) は紫外光(UV)によって励起し、活性酸素種 (ラジカル分子) を発生することが報告されている。申請者らは光触媒として知られている二酸化チタンに超音波を照射することによっても活性酸素種が生成する現象を見出した (二酸化チタン・超音波触媒法; Shimizu, *et al.*, 2006)。このような報告は国内・国外を通じて皆無であり、この現象を新規がん治療法として応用展開した。これまで超音波照射による二酸化チタンの励起メカニズムを解析した結果、超音波照射時に二酸化チタン表面近傍にキャビテーション気泡が生成し、これが圧壊する際に生ずる高温・高圧場 (>5000K、数 100 気圧) による二酸化チタンの熱励起及びソノルミネッセンスとよばれる発光現象によってきわめて酸化力の強いヒドロキシル (OH) ラジカルが生成することを明らかにした。

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。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. 研究の目的

光触媒として注目されている二酸化チタンに超音波を照射すると極めて高濃度の OH ラジカルが生成することから、これをがん治療へ応用する点が本研究の第一の目的であり、また独創的な点でもある。二酸化チタン光触媒の応用は全て光の到達範囲内でしか有効でないが、本申請研究で提案する超音波

照射ラジカル発生法を適用することで光照射が困難な部位でのラジカル生成が可能となり、医療分野のみならず水質管理、環境保全分野などへの幅広い応用が可能となる。

がん細胞を特異的に認識し、高効率で細胞内へ取り込まれる機能性ナノ粒子を創製することも本申請研究の主要な目的である。二酸化チタンから発生する活性酸素は、本来特異的な標的部位をもたない。そこで二酸化チタンの粒子表面に生体分子を結合させることで、標的細胞 (がん病変部位) を認識させ、活性酸素ががん細胞のみを特異的に攻撃するようにはできる。このような特色を利用した「二酸化チタン・超音波触媒法」は、がん治療における外科的手術と放射線治療のような非侵襲的な治療の両者の利点を兼ね備えた治療効果が得られると期待できる。現在、外科的手術を必要としない非侵襲的な治療法として化学治療、放射線治療などが行われている。しかし、これらの治療法には副作用の問題が残されている。「二酸化チタン・超音波触媒法」では、がん特異的生体分子を二酸化チタンに固定化することでがん組織を特異的に認識させることができ、正常細胞への傷害を最小限にとどめることができる。また、二酸化チタンそのものは、化粧品・食品添加物などに使用される無害な物質であり、「二酸化チタン・超音波触媒法」は副作用のない画期的ながん治療法になると期待できる。

本研究で提案する機能性バイオ融合ナノ粒子を開発できれば、組織表層に存在している比較的初期のがん組織はもとより、より深部にまで浸潤した進行期のがんに対しても高い治療効果を得ることが期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用細胞

本研究では、ターゲット細胞としてヒト乳がん由来細胞 MCF-7 を用いた。また、比較

細胞として正常ヒト乳腺上皮細胞 HMEC を用いた。実験では全て対数増殖期にあたる細胞を用いた。

#### (2) 二酸化チタンナノ粒子分散液の調整

TiO<sub>2</sub>の等電点はpH 6.1付近であり、生体内の環境及び培地 (pH 7.5) 中に懸濁すると凝集してしまう。そこで本研究ではTiO<sub>2</sub>の分散性を高めるために、TiO<sub>2</sub>表面にポリアクリル酸(PAA)を修飾した二酸化チタン(PAA TiO<sub>2</sub>)を用いた。PAA TiO<sub>2</sub>は中性付近では表面にカルボキシル基を有するため、マイナスの電荷に帯電しており、静電気的な反発力によって分散する。

作製した PAA TiO<sub>2</sub> の濃度は、TiO<sub>2</sub> 吸光度 (吸光波長 : 250 nm) を分光光度計を用いて測定し、検量線を用いて算出した。

#### (3) アビジンの TiO<sub>2</sub> ナノ粒子への固定化

アビジンの TiO<sub>2</sub> ナノ粒子への固定化は、アビジン表面のアミノ基と、PAA TiO<sub>2</sub> 表面のカルボキシル基のアミノカップリング反応により行った。

① avi-TiO<sub>2</sub> の作製 まず 0.4 M EDC 溶液 0.25 mL と 0.1 M NHS 溶液 0.25 mL を混合し、1.5 wt% PAA TiO<sub>2</sub> 溶液 2.5 mL に加えた。次にゲルろ過カラム PD-10 にて未反応の EDC / NHS を分離させ、PAA TiO<sub>2</sub> は 20 mM HEPES 3.5 mL で溶出し、溶出液に 2 mg/mL アビジン溶液を 2.5 mL 加え、室温にて約 4 h 緩やかに攪拌させながら反応させた。その後 0.1 M モノエタノールアミンを 1 mL 加え、室温にて 30 min 緩やかに攪拌させながら反応させた。また、未反応のアビジンは限外ろ過で除去した。

② アビジンの定量 作製した avi-TiO<sub>2</sub> のアビジンの定量法として Bradford 法を用いた。Bradford 法では色素溶液中のクマシーブリアントブルー (CBB) が試料中のタンパク質と結合すると最大吸収波長が 465 nm から

595 nm に移動することを利用し、この波長を吸光度計で測定することによりタンパク質濃度測定を行う。

#### (4) avi-TiO<sub>2</sub> の細胞への結合

蛍光物質フルオレセインを修飾した flu/avi-TiO<sub>2</sub> を作製し、がん細胞と正常細胞のそれぞれに結合させた後に、蛍光顕微鏡による観察とフローサイトメトリーの二つの方法によって結合評価を行った。

① flu/avi-TiO<sub>2</sub> の作製 50 nmol/mL biotin-fluorescein を 1 mL 調整し、avi-TiO<sub>2</sub> を 5 mL に希釈したものに加え、室温で一晩緩やかに攪拌させながら反応させた。その後、未反応の biotin-fluorescein は限外ろ過で除去した。

② 細胞への結合 MCF-7 と HMEC を 40 mm dish にそれぞれ  $4 \times 10^5$  cells で播種し 2 days 培養、 $5 \times 10^4$  cells で播種し 4 days 培養したものに、1.5 wt% flu/avi-TiO<sub>2</sub> を 200  $\mu$ L ずつ添加し、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> にて 1 h インキュベートした。

③ 結合評価 細胞を PBS(-) で 3 回洗浄を行った後、蛍光顕微鏡で観察した。その後、細胞を剥離し、フローサイトメーターで解析した。

#### (5) 超音波を用いた細胞損傷効果検討

今回作製した TiO<sub>2</sub> 粒子を用いた TiO<sub>2</sub>/U.S. 法の効果を検証するため、超音波を用いた実験による培養がん細胞の細胞数の変化を観察した。

① 細胞への結合 MCF-7 を 40 mm dish に  $4 \times 10^5$  cells で播種し 1 day 培養したものに、1.5 wt% avi-TiO<sub>2</sub> を 200  $\mu$ L ずつ添加し、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> にて 1 h インキュベートした。

② 超音波照射 細胞を PBS(-) で 3 回洗浄後、新しい培地を 2 mL 添加した。その後、周波数 1 MHz、50 % Duty 比、強度 0.1 W / cm<sup>2</sup>、30 s 間で超音波を照射した。

③ 細胞数測定 超音波照射後、37 °C、5 % CO<sub>2</sub>にてそれぞれの経過時間までインキュベートし、Trypan blue 染色法を用いて生細胞数を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) アビジンの TiO<sub>2</sub> ナノ粒子への固定化評価

作製した avi-TiO<sub>2</sub>の限外ろ過後の残液、ろ液、洗浄ろ液についてそれぞれアビジンを定量した結果、限外ろ過後の残液中にアビジンが検出されたため目的の avi-TiO<sub>2</sub>を作製できたことが確認できた。また、ろ液や洗浄ろ液にはアビジンが検出されなかったことから、今回の方法で avi-TiO<sub>2</sub>を作製した場合は、添加したアビジンが全て TiO<sub>2</sub> ナノ粒子に固定化されたと考えられた。

また、得られた avi-TiO<sub>2</sub>の二酸化チタン濃度とアビジン量から、TiO<sub>2</sub>ナノ粒子一個あたりに修飾されたアビジンは、約 2150 個と計算できた。

##### (2) avi-TiO<sub>2</sub>のがん細胞への特異的結合

flu/avi-TiO<sub>2</sub>を MCF-7 と HMEC のそれぞれに結合させ、蛍光顕微鏡で観察した結果、MCF-7 には多量の蛍光が、HMEC には若干の蛍光が見られた。

また、これらの細胞をフローサイトメーターで測定した結果、flu/avi-TiO<sub>2</sub>を添加することで細胞数ピークが右にずれていることから、どちらも蛍光強度の大きい細胞数が増加していることが判明した。つまり、乳がん細胞 MCF-7 にも正常細胞 HMEC にも flu/avi-TiO<sub>2</sub>が結合した。ここで、flu/avi-TiO<sub>2</sub>がどれだけの割合で結合したかを比較するため、それぞれのフローサイトメトリーで、flu/avi-TiO<sub>2</sub>(-)のヒストグラムよりも右側に含まれる蛍光強度の大きい細胞群を flu/avi-TiO<sub>2</sub>の結合した細胞と見なし、細胞数の割合を算出すると、MCF-7 では 82.4 %、

HMEC では 46.8 %となった。このことから、MCF-7 の方が HMEC よりも flu/avi-TiO<sub>2</sub>が結合した細胞が多いことから、正常細胞よりもがん細胞の方が avi-TiO<sub>2</sub>結合量が多いと考えられ、これは蛍光顕微鏡による評価の考察と一致した。

##### (3) TiO<sub>2</sub>/U.S.法によるがん細胞損傷効果

avi-TiO<sub>2</sub>を結合させた MCF-7に超音波を照射してからの培養時間経過による細胞数の変化を検討した。対照としてアビジン未修飾の TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を添加したものについても同様に検討したが、TiO<sub>2</sub>のみを本実験条件の濃度で添加し、1 h 細胞と結合させることによる細胞毒性はほとんどないことがわかった。さらに、本実験の条件で超音波照射のみでは細胞損傷効果は観察できなかった。

対照実験(アビジン未修飾の TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を添加後、超音波照射)と比較すると、アビジン修飾の TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を添加群では、超音波照射後 48 h から細胞増殖が抑制され、超音波照射後 96 h では、対照群に対して約 60 % しか細胞が生存していないことが判明した。このことから、アビジンを添加したことで細胞に取り込まれた TiO<sub>2</sub> ナノ粒子量が優位に増大したこと、TiO<sub>2</sub>/U.S.法による細胞増殖抑制効果が確認できた。また、その効果が超音波照射直後には見られず時間経過とともに増大していることから、TiO<sub>2</sub> / U.S.法によって生じた OH ラジカルは超音波照射直後に細胞膜などに深刻なダメージを与えネクロシスを誘導するほどの高濃度ではなく、照射から 48 h 経過後に細胞死を誘導する程度に損傷を起こし、アポトーシスを誘導していると示唆される。

#### 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 17 件)

- ① Ninomiya, K., Noda, K., Ogino, C., Kuroda S., Shimizu, N. Enhanced OH radical generation by dual-frequency ultrasound with TiO<sub>2</sub> nanoparticles: its application to targeted sonodynamic therapy, 査読有, *Ultrason. Sonochem.*, in press.
- ② Ninomiya, K., Ogino, C., Kawabata, S., Maki, T., Hasegawa, H., Shimizu, N. Ultrasonic inactivation of *Microcystis aeruginosa* in the presence of TiO<sub>2</sub> particles, 査読有, *J. Biosci. Bioeng.*, in press.
- ③ Ninomiya, K., Kaneda, K., Kawashima, S., Miyachi, Y., Ogino, C., Shimizu, N. Cell-SELEX based selection and characterization of DNA aptamer recognizing human hepato- carcinoma, 査読有, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23(6), 1797-1802, 2013.
- ④ 岩倉 和希, 仁宮 一章, 清水 宣明 Cell-SELEX 法を用いたヒト乳腺がん細胞に対する DNA アプタマーの選抜, 査読無, 金沢大学環日本海域環境研究センター 平成 23 年度年報, 97-100, 2013.
- ⑤ 野田 恭平, 仁宮 一章, 清水 宣明 酸化チタン表面での超音波力学的 OH ラジカル生成と複合周波数の促進効果, 査読無, 金沢大学環日本海域環境研究センター 平成 23 年度年報, 101-104, 2013.
- ⑥ Ninomiya, K., Ogino, C., Oshima, S., Sonoke, S., Kuroda, S., Shimizu, N. Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles, 査読有, *Ultrason. Sonochem.*, 19(3), 607-614, 2012.
- ⑦ 大島周平, 仁宮一章, 清水宣明 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, 査読無, 金沢大学環日本海域環境研究センター 平成 21 年度年報, 126-130, 2011.
- ⑧ 河端伸哉, 仁宮一章, 清水宣明 超音波刺激応答型リポソームを用いたドラッグデリバリーシステムの構築, 査読無, 金沢大学環日本海域環境研究センター 平成 21 年度年報, 116-120, 2011.
- ⑨ 金田 亮彦, 仁宮 一章, 清水 宣明 Cell-SELEX 法を用いたヒト肝がん細胞に対する DNA アプタマーの選抜, 査読無, 金沢大学環日本海域環境研究センター 平成 21 年度年報, 121-125, 2011.
- ⑩ Ogino, C., Shibata, N., Sasai, R., Takaki, K., Miyachi, Y., Kuroda, S., Ninomiya, K., Shimizu, N. Construction of protein-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles for use with ultrasound irradiation in a novel cell-injuring method, 査読有, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20(17), 5320-5325, 2010.
- ⑪ Rahman, M. M., Ninomiya, K., Ogino, C., Shimizu, N. Ultrasound-induced cell damage and membrane lipid peroxidation of *Escherichia coli* in the presence of non-woven TiO<sub>2</sub> fabrics, 査読有, *Ultrason. Sonochem.*, 17, 738-743, 2010.
- ⑫ Shimizu, N., Ninomiya, K., Ogino, C., Rahman, M. M. Potential uses of titanium dioxide in conjunction with ultrasound for improved bacterial disinfection, 査読有, *Biochem. Eng. J.*, 48, 416-423, 2010.

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 川嶋聡、仁宮一章、荻野千秋、清水宣明 : Cell SELEX 法により選抜したヒト肝臓由来がん細胞に対する DNA アプタマーの評価、日本生物工学会 第 64 回大会, 神戸, 神戸国際会議場, 2012 年 10 月 23-26 日
- ② 清水宣明、仁宮一章 : タンパク質修飾光触媒ナノ粒子による超音波力学がん治療、第 51 回日本生体医工学会大会、福岡、福岡国際会議場、2012 年 5 月 10 日 - 12 日
- ③ Ninomiya, K., Oshima, S., Sonoke, S., Ogino, C., Kuroda, S., Shimizu, N. : Targeted sonodynamic therapy using protein modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles, Proc. the 20th Annual Meeting of the Japan Society of Sonochem. & The Int. Workshop on Adv. Sonochem, p.80-83, Nagoya (2011) Nov.
- ④ 岩倉和希、川嶋聡、仁宮一章、荻野千秋、清水宣明 : Cell SELEX 法により選抜したヒト肝臓由来がん細胞に対する DNA アプタマーの評価、日本生物工学会 第 63 回大会, 小金井, 東京農工大学 小金井キャンパス, 2011 年 9 月 26-28 日
- ⑤ 仁宮一章、川嶋聡、金田壱彦、荻野千秋、清水宣明 : Cell-SELEX 法によるがん細胞に対する DNA アプタマーの選抜とその特性評価、化学工学会 第 76 年回, 東京, 東京農工大学, 2011 年 3 月 22-24 日
- ⑥ 仁宮一章、前川幸、平尾敦、清水宣明 : がん幹細胞を含む細胞集団に及ぼす超音波による殺傷効果の解析、化学工学会 第 76 年回, 東京, 東京農工大学, 2011 年 3 月 22-24 日
- ⑦ 清水宣明 : 分子標的ナノ粒子と超音波技術の医療応用, 第 3 回超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム, 東京, 慶應義塾大学日吉キャンパス, 2011 年 1 月 22 日

- ⑧ 清水宣明 : 分子標的ナノ粒子による超音波力学がん治療, 第 9 回北陸ポストゲノム研究フォーラム- テクノロジー連携による創薬・医療新技術-, 金沢, 金沢大学, 2010 年 10 月 14 日

〔その他〕  
ホームページ等  
金沢大学大学院自然科学研究科 自然システム学専攻 バイオ工学コース  
[http://biotech.w3.kanazawa-u.ac.jp/?page\\_id=22](http://biotech.w3.kanazawa-u.ac.jp/?page_id=22)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 宣明 (SHIMIZU NOBUAKI)  
金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授  
研究者番号 : 50019634

### (2) 研究分担者

仁宮 一章 (NINOMIYA KAZUAKI)  
金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教  
研究者番号 : 10379125

### (3) 研究分担者

黒田 俊一 (KURODA SYUN' ICHI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号 : 60263406

### (4) 研究分担者

松本 邦夫 (MATSUMOTO KUNIO)  
金沢大学・がん進展制御研究所・教授  
研究者番号 : 90201780