

201011023A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

チタン酸化物を含有するバイオハイブリッドナノ粒子の

放射線治療増感による難治性がんの新規治療法開発

(H22-低侵襲-一般-003)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昭彦

平成23(2011)年3月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

チタン酸化物を含有するバイオハイブリッドナノ粒子の
放射線治療増感による難治性がんの新規治療法開発

(H22-低侵襲-一般-003)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昭彦

平成23(2011)年3月

目 次

I. 総括研究報告	
チタン酸化物を含有するバイオハイブリッドナノ粒子の放射線治療増感による 難治性がんの新規治療法開発 近藤 昭彦	1
II. 分担研究報告	
1. チタン酸化物を含有するバイオハイブリッドナノ粒子の放射線治療増感による 難治性がんの新規治療法開発 近藤 昭彦・荻野 千秋・田中 勉	8
2. チタン酸化物を含有するバイオハイブリッドナノ粒子の放射線治療増感による 難治性がんの新規治療法開発 佐々木 良平	18
3. 酸化物ナノ粒子の高次構造と分散制御に関する研究 大原 智・譚 振権	30
4. 新規ナノ粒子の開拓と放射線励起によるラジカル生成機構解明に関する研究 佐藤 和好・沼子 千弥・高見 誠一	43
5. セラミックス基蛍光体のリポソームとの複合化及びその体内挙動 曾我 公平	49
6. イットリアナノ粒子へのPEG-b-PAAc修飾条件の最適化 曾我 公平	52
7. バイオナノカプセルへの分子標的化機能付加へ向けた抗体分子デザインと 提示プロセス開発 梅津 光央	54
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	61
IV. 研究成果の刊行物・別刷	69

チタン酸化物を含有するバイオハイブリッドナノ粒子の放射線治療増感による
難治性がんの新規治療法開発

研究代表者 近藤 昭彦 神戸大学大学院工学研究科 教授

A. 研究目的

本研究では「高精度放射線治療」にナノ粒子を併用し、有効な治療法の確立されていない膵臓癌などの難治性癌の飛躍的な治癒率向上を目指す。本研究では、[1]高いQOLを維持できる高精度放射線治療の効果を相乗的に増加させ、[2]細胞レベルでの癌の発見をも可能にする認識能を有する、スーパーハイブリッド・ナノ粒子の構築を目指し、ナノ粒子・放射線併用療法の確立を目指す（図1）。

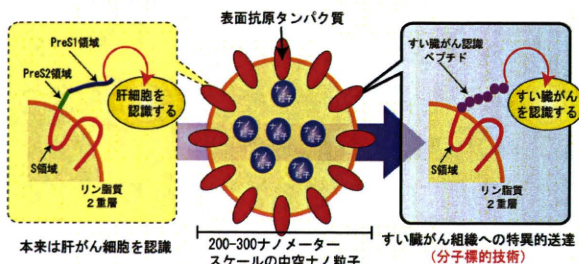


図1. 『スーパーハイブリッド・ナノ粒子』構築

本研究の特色は、多分野の専門的知識を融合させ、開発したバイオナノカプセル及びナノカプセル表面への標的分子提示技術、無機ナノ粒子、高精度放射線治療を階層的に組み合わせることによって、これまでの早期診断が極めて困難であった初期の膵臓癌の細胞レベルでの高感度診断と、高精度放射線治療とを同時に可能にし、癌

診断と治療の一体化を目指す。無機ナノ粒子を包括するバイオナノカプセルを表面加工するによって、膵臓癌細胞を特異的に認識可能になれば、MRIやCT等の診断技術を応用で、高感度な初期膵臓癌を診断に期待ができる。同時にナノ粒子が放射線の増感剤として機能すれば、相乗効果が期待でき、ナノ粒子に2役の効果を期待できる（図2）。今回提案する“スーパーハイブリッド・ナノ粒子と放射線療法による癌治療”において有効な相乗効果が発揮できれば、同等の抗腫瘍効果を維持した上で照射線量の低減も可能であり、腫瘍部近傍の正常組織への非照射線量を極力低減し、より低侵襲な非外科的・新規治療法を確立できる。その点で、同時に患者のQOL維持にも多いに寄与するものと考えられる。放射線治療は本邦だけでなく、世界中で広く利用されているがん治療法であり、更に、臨床応用に移行する際に機器的環境の拡充や予算を必要としない点も大きな特徴である。以上より、ナノテクノロジー技術を有効に非侵襲治療に適用するものであり、厚生労働行政のナノメディシン研究事業に非常に合致する。

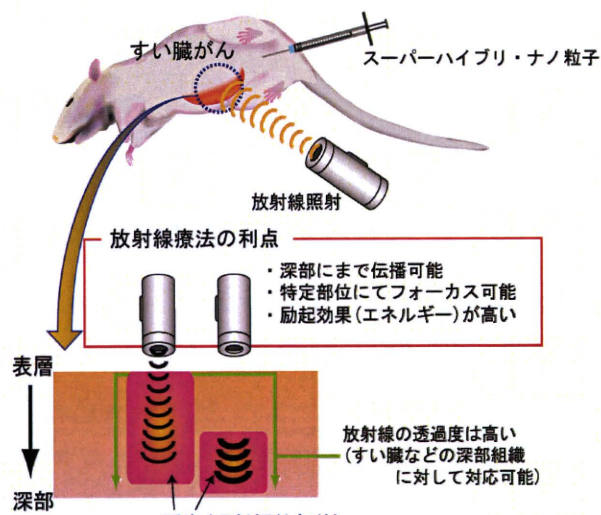


図 2. ナノ粒子・放射線療法の *in vivo* での併

B. 研究方法

詳細はそれぞれの分担者の項を参照

- 放射線照射によりラジカルを発生する粒子の探索とその評価

放射線を照射するとラジカルを発生する粒子は、候補として研究分担者である大原、佐藤グループが調製した粒子を用いた。照射により発生したラジカルは、APF (Aminophenyl Fluorescein) を用いてその量を相対評価した。

ポリアクリル酸 (PAA) 修飾過酸化チタンナノ粒子は、PAA修飾二酸化チタンナノ粒子とほぼ同様の調製方法にて調製した。

- ラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討

二酸化チタンナノ粒子は、紫外線照射によりラジカルを発生することが

既に知られている。本研究では、上記の放射線照射によるラジカル発生粒子の探索と並行して、取り扱いが容易な紫外線を用いて条件検討を網羅的に行い、実際にX線照射する際の指標を見出す事を目指した。

モデル細胞としてHeLa, MIAPaca-2, BxPc3細胞を用いた。それぞれ一般的な培養方法で培養し、wellに播種した後にPAA修飾過酸化チタンを加え、インキュベートした。その後、紫外線を様々な強度で照射し、洗浄後に細胞の生存率をWSTアッセイを用いて評価した。添加量やインキュベート時間等については様々な条件で行った。

- X線照射装置の物理的特性

本研究で使用したX線照射装置MBR-1505R2は培養細胞やマウスなどの小動物に対して大量のX線照射を必要とするときに簡便に利用できる。管電圧150kV、管電流5mAの最大定格で連続的にX線照射が可能である。

MBR-1505R2には複数の金属フィルターが付属しており、その選択によりX線のエネルギーや線量率が決まる。

本研究で行う細胞実験および動物実験を行うにあたり、適切な線量が照射されているか確認するため、照射装置の物理的な検証を行った。

管電流150kV、管電圧5mA、焦点標的間距離350mmの照射条件のもと、各金属フィルターに対してファントム中での相対的な深部線量を測定した。

- 異なるX線源でのラジカル発生

定

異なるX線源でもラジカル発生を確認するため、本研究で用いている照射装置MBR-1505R2とは別に、大型放射光施設SPring-8にて試料に照射を行った。110Gy/secの高線量率の白色X線を照射した。

・ラジカルの検出

FACSとH2O2ラジカル検出試薬c-DCFを用いてラジカル種の評価を行った。

Dishにヒト前骨髄性白血病由来の浮遊細胞HL60を 5.0×10^5 cells播種し、試料を添加した。24時間後にc-DCFを添加し、X線を10Gy照射した。照射1時間後にFACSで細胞のカウント数を計測した。

・動物実験

生体に対する毒性および放射線との併用効果を調べるため、動物実験を行った。動物はヌードマウスのオス、4週令を用いた。腫瘍細胞はヒトの膵臓腺癌由来細胞であるMIAPaCa-2細胞を用いた。MIAPaCa-2細胞 1.5×10^6 cellsをヌードマウス背部皮下へ移植し、生着させた。移植後14日目に試料約200 μ lを腫瘍に局所注射した。試料局注射後、腫瘍に対してX線を10Gy照射した。

X線照射は、管電圧150kV、管電流5mA、0.5mm金属フィルターを使用し、線量率約1.0Gy/minで行った。X線照射時、ヌードマウスにはネンブタール約100 μ lを腹腔内に注射し、鎮静させた。腫瘍部以外は鉛板で遮蔽し、限局した照射を行った。照射後、40日間以上観

察した。観察期間内は腫瘍体積と体重の変化を記録した。

腫瘍体積Vは以下で定義した。

$$[V=LW/2] \wedge 2$$

ここで、Lは腫瘍の長径、Wは腫瘍の短径である。腫瘍径の測定にはデジタルノギスを用いた。

・二酸化チタンナノ粒子の合成

二過酸化チタンナノ粒子の合成は水熱合成法等の液相プロセスで主に行った。

・過酸化チタンナノ粒子の合成

上記プロセスで合成した二酸化チタンナノ粒子を20mlの水に加え、超音波で分散させた。次に、5mlの過酸化水素（質量濃度 ~ 30 wt%）を添加し、攪拌下で2時間の酸化処理を行った。この反応により、乳白色の二酸化チタンは黄色へと変化し、過酸化チタンの生成が目視でも確認できた。限外濾過により生成物から未反応の過酸化水素を取り除き、最終的には過酸化チタンナノ粒子のみを得た。

・過酸化チタンナノ粒子のサイズ・形態制御

二酸化チタンから過酸化チタンへの合成ルートは、one-stepの酸化処理であり、その反応時のナノ粒子のサイズ・形態制御は非常に難しいことが予測された。そこでまず、二酸化チタンのサイズ・形態制御を試みた。具多的には、チタン前駆体の種類や濃度、水熱反応の時間、反応場に添加する有機

界面活性剤等の諸因子が二酸化チタンのサイズ・形態に及ぼす影響を検討した。

・過酸化チタンナノ粒子の表面修飾

未修飾な過酸化チタンナノ粒子は、高い表面ポテンシャルを持っているため、生体環境中（リン酸環境に近い液体中）では凝集しやすいことが予想された。そこで、放射線照射によるラジカル発生機能を保持したままで、凝集抑制可能なナノ粒子の表面修飾手法を検討した。表面修飾剤として用いた有機分子は、ドデシル硫酸ナトリウム（sodium dodecyl sulfate : SDS）、デオキシコール酸ナトリウム（sodium deoxycholate : SDC）、ポリアクリル酸（polyacrylate : PAA）等である。

・CaO₂およびZnO₂粒子の合成

0.2molのCaCl₂を410mlの蒸留水に溶解し、ここに25%の水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液をpHが11になるまで添加した。その後、30%のH₂O₂水溶液を90.1g添加して沈殿を得た。得られた沈殿は、蒸留水でpHが中性になるまでろ過洗浄し、エタノールで溶媒置換後80°Cで24時間乾燥させ、試料とした。

0.2molのZnCl₂を410mlの蒸留水に溶解し、ここに25%の水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液をpHが13になるまで添加した。その後、30%のH₂O₂水溶液を90.1g添加して沈殿を得た。得られた沈殿は、蒸留水でpHが中性になるまでろ過洗浄し、エタノール

ールで溶媒置換後80°Cで24時間乾燥させ、試料とした。

・CaO₂およびZnO₂粒子の構造ならびにラジカル生成特性評価

粉末の生成相をX線回折(Mac Science社製 M03XHF)で評価した。また、ピークの半値幅より生成相の結晶子径を見積った。X線源にはCuK α を用い、管電圧および管電流をそれぞれ40kV、30mAとし、ステップ角0.01°で2 θ =20-60°で測定を行った。

・放射光を用いた過酸化チタンナノ粒子の構造解析

過酸化チタンナノ粒子の微細構造解析は、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーのビームラインBL-9Aを用いたXAFS分析により行った。測定はライトル型検出器を用いた蛍光モードで行った。得られたXAFSスペクトルより、Ti-K吸収端のXANES領域の波形を、既知の化学状態を有するリファレンスと比較することにより、過酸化チタン中のチタン原子の価数や電子状態等を評価した。なお、リファレンスには金属チタン、TiH₂、Ti(OH)₄、TiO₂(アナターゼ)、TiO₂(ルチル)を用い、実試料には、沈殿法により合成した過酸化チタン粉末、水熱法で合成したTiO₂分散液をH₂O₂で処理した過酸化チタン分散水溶液(固体含有率0.36 wt%)ならびに、酸性および塩基性過酸化チタン錯体を用いた。

また、上記過酸化チタンナノ粒子分散液に連続的に100分間放射光X線を

照射しながらTi-K吸収端のXANESスペクトル測定を行い、放射線照射による構造の変化の有無を評価した。

・会合ペプチドユニットによる低分子抗体の提示プロセス

ナノ粒子を内包可能なタンパク質カプセルへの抗EGFR低分子抗体の提示プロセスの開発として、本年度は、抗EGFR抗体としては、可変領域がヘテロ二量体であるヒト由来抗体分子と比較して構造が単純であり、かつ、ヒトのVH断片と相同性が高い、可変領域が単量体であるラクダ由来抗体分子(VHH)を利用した。そして、タンパク質カプセルとしては、24個の分子量約21kDaのサブユニットが会合し、内部にナノ粒子を内包でき空孔を持つフェリチンタンパク質を利用した。

具体的には、コイルドコイル相互作用を利用して上皮増殖因子受容体(EGFR)特異的ラクダ抗体の可変領域断片(VHH)をクラスター化させるために、金属イオン依存的にヘテロコイルドコイル2量体を形成するペプチドの一方(pepA: EIEAHEQEHEAIEQEIEA HEQEHEA IEQ)をN末端に融合したフェリチンタンパク質と、もう一方のペプチド(pepB: IEAHKQKHEA IKQKIEAHKQKHEA IKQK)をC末端に融合した抗EGFR VHH断片を大腸菌発現によって調製し、ニッケルイオン存在下でクラスター化させた。

・クラスター化と機能評価

pepA融合フェリチンとpepB融合抗EGFR

R VHH断片を混合し、Ni²⁺イオンを添加することで複合体の作製を試みた。ゲル濾過クロマトグラフィーによって、フェリチンとVHHの複合体形成を評価した。

複合体形成を確認した条件については、A431細胞上のEGFRに対する結合活性を、フローサイトメトリーを用いて評価し、さらに、蛍光顕微鏡を用いたイメージングも行った。

(倫理面への配慮)

研究代表者及び研究分担者はそれぞれの施設における生命倫理規定、実験動物取り扱い規定に忠実に従い、生命倫理への配慮を十分に行って研究を進めた。

C. 研究結果

詳細はそれぞれの分担者の項を参照

・放射線照射によりラジカルを発生する粒子の探索とその評価

様々な粒子について放射線照射時におけるラジカル発生能を評価した。中でも過酸化チタンナノ粒子は放射線照射によりラジカルを発生することを初めて見出すことに成功した。

・ラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討

放射線照射における細胞傷害効果の最適条件を見出すため、取り扱いが容易な紫外線を用いて実験を行った。網羅的に条件検討を行った結果、細胞

傷害時における重要な因子の指針を見出すことに成功した。

- ・ X線照射装置の物理的特性

X線照射装置の基礎的なデータを解析し、実験動物に加えてナノ粒子等への照射効果を最大限に発揮できる条件を見出す事に成功した。

- ・ 異なるX線源でのラジカル発生の測定

様々な線源を用いて放射線を照射する事により、過酸化チタンナノ粒子のラジカル発生における基礎的な知見を得ることに成功した。

- ・ ラジカルの検出

FACSを用いて放射線照射後の細胞を解析することにより、過酸化チタンナノ粒子から生じるラジカル種についての知見が得られた。

- ・ 動物実験

マウスを用いて過酸化チタンナノ粒子の毒性を評価したところ、ポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子はマウスに対して毒性を示さず、安全な粒子であることが示された。

- ・ 過酸化チタンナノ粒子のサイズ・形態制御

チタン前駆体の種類や濃度、水熱反応の時間、反応場に添加する有機界面活性剤等の諸因子が二酸化チタンのサイズ・形態に及ぼす影響を検討する

ことで、チタンの形状や大きさを制御しつつ合成することに成功した。

- ・ 過酸化チタンナノ粒子の表面修飾

放射線照射によるラジカル発生機能を保持したままで、凝集抑制可能なナノ粒子の表面修飾手法を検討し、分散状態を保つ過酸化チタンナノ粒子の合成に成功した。

- ・ 放射光を用いた過酸化チタンナノ粒子の構造解析

過酸化チタンナノ粒子の微細構造解析は、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーのビームラインBL-9Aを用いたXAFS分析により行った。これにより、放射線照射による構造の変化の有無について重要な知見を得る事に成功した。

D. 考察

達成度について

以上の結果の項で示したように、平成22年度の研究は当初の計画通り進行し、有用な知見を得るとともに技術開発がなされているといえる。過酸化チタンナノ粒子を基盤とし、放射線照射と併用することで腫瘍細胞を特異的に傷害する技術が、メカニズム解明と技術開発の両面において確立されつつあると言える。

研究成果の学術的意義、社会的意義について

チタンナノ粒子と放射線照射を併用したガン細胞特異的傷害技術は、当

研究グループオリジナルであり世界初の技術である。この境界領域からなる研究は学術的、国際敵に見ても先進的なものである。この手法は非侵襲敵であるため、患者のQOLを維持したまま治療が可能であるという特長を持ち、その社会的な意義は極めて大きい。本年度は、チタンナノ粒子と放射線照射を併用したガン治療法の開発における重要かつ基礎的な成果が得られたといえる。本技術の実用化に大きな弾みがつくものと期待される。

今後の展望について

本年度得られた研究成果を基に、次年度以降も研究計画に従ってメカニズムの解明から条件の最適化、技術開発までを行っていく。両者の研究を融合させることで、実用化に向けて加速的に研究を進めることができると期待される。

E. 結論

本年度は、過酸化チタンナノ粒子に放射線を照射するとラジカルを発生することを見出し、これを基としたメカニズムの解明から動物実験にわたり基礎的な知見を得る事に成功した。今後も研究を進めることで、本技術を確立し実用化できると期待される。

F. 研究発表

論文発表及び研究発表は、分担者の項を参照。

G. 知的所有権の取得状況

知的所有権は、分担者の項を参照。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

（分担）研究年度終了報告書

チタン酸化物を含有するバイオハイブリッドナノ粒子の放射線治療増感による 難治性がんの新規治療法開発

研究代表者 近藤 昭彦 神戸大学大学院工学研究科 教授

研究分担者 荻野 千秋 神戸大学大学院工学研究科 准教授

研究分担者 田中 勉 神戸大学自然科学系先端融合研究環 助教

A. 研究目的

本研究では「高精度放射線治療」にナノ粒子を併用し、有効な治療法の確立されていない膵臓癌などの難治性癌の飛躍的な治癒率向上を目指す。本研究では、[1]高いQOLを維持できる高精度放射線治療の効果を相乗的に増加させ、[2]細胞レベルでの癌の発見をも可能にする認識能を有する、スーパーハイブリッド・ナノ粒子の構築を目指し、ナノ粒子・放射線併用療法の実現を目指す（図1）。

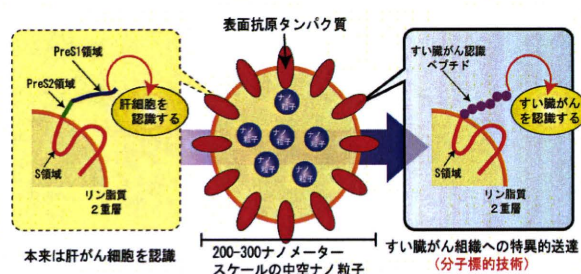


図1. 『スーパーハイブリッド・ナノ粒子』構築

本研究の特色は、多分野の専門的知識を融合させ、開発したバイオナノカプセル及びナノカプセル表面への標的分子提示技術、無機ナノ粒子、高精度放射線治療を階層的に組み合わせることによって、これまでの早期診断が極めて困難であった初期の膵臓癌

の細胞レベルでの高感度診断と、高精度放射線治療とを同時に可能にし、癌診断と治療の一体化を目指す。無機ナノ粒子を包括するバイオナノカプセルを表面加工することによって、膵臓癌細胞を特異的に認識可能になれば、MRIやCT等の診断技術を応用で、高感度な初期膵臓癌を診断に期待ができる。同時にナノ粒子が放射線の増感剤として機能すれば、相乗効果が期待でき、ナノ粒子に2役の効果期待できる（図2）。今回提案する“スーパーハイブリッド・ナノ粒子と放射線療法による癌治療”において有効な相乗効果が発揮できれば、同等の抗腫瘍効果を維持した上で照射線量の低減も可能であり、腫瘍部近傍の正常組織への非照射線量を極力低減し、より低侵襲な非外科的・新規治療法を確立できる。その点で、同時に患者のQOL維持にも多に寄与するものと考えられる。放射線治療は本邦だけでなく、世界中で広く利用されているがん治療法であり、更に、臨床応用に移行する際に機器的環境の拡充や予算を必要としない点も大きな特徴である。以上より、ナノテクノロジー技術を有効に非侵襲治療に

適用するものであり、厚生労働行政のナノメディシン研究事業に非常に合致する。

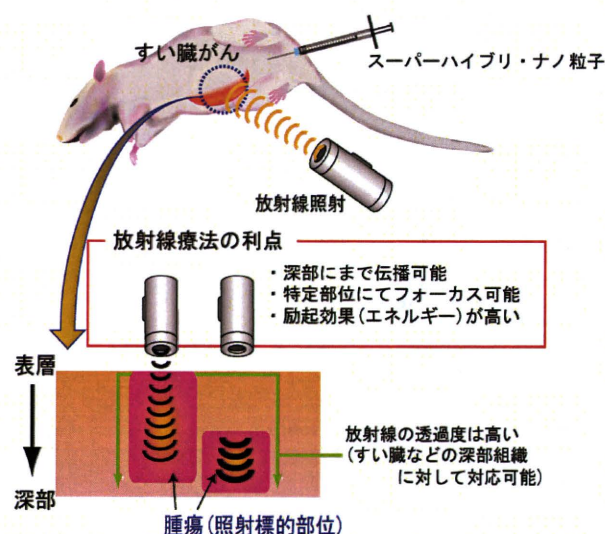


図 2. ナノ粒子・放射線療法の *in vivo* での併

本年度は、放射線を照射してラジカルを生成する粒子の探索とその評価、及びラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討を行った。

B. 研究方法

①放射線照射によりラジカルを発生する粒子の探索とその評価

放射線を照射するとラジカルを発生する粒子は、候補として研究分担者である大原、佐藤グループが調製した粒子を用いた。照射により発生したラジカルは、APF (Aminophenyl Fluorescein) を用いてその量を相対評価した。溶媒として水、DMEM培地、RPMI培地 (いずれも血清無し)、及び

PBSを用いて評価した。放射線の照射条件は、研究分担者である佐藤グループの実験条件と同じである。

ポリアクリル酸 (PAA) 修飾過酸化チタンナノ粒子は、PAA修飾二酸化チタンナノ粒子とほぼ同様の調製方法にて調製した。

②ラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討

二酸化チタンナノ粒子は、紫外線照射によりラジカルを発生することが既に知られている。本研究では、上記①の放射線照射によるラジカル発生粒子の探索と並行して、取り扱いが容易な紫外線を用いて条件検討を網羅的に行い、実際にX線照射する際の指標を見出す事を目指した。

モデル細胞としてHeLa, MIAPaca-2, BxPc3細胞を用いた。それぞれ一般的な培養方法で培養し、wellに播種した後、PAA修飾過酸化チタンを加え、インキュベートした。その後、紫外線を様々な強度で照射し、洗浄後に細胞の生存率をWSTアッセイを用いて評価した。添加量やインキュベート時間等については様々な条件で行った。

(倫理面への配慮)

本研究は本研究計画では、神戸大学遺伝子組換え実験実施規則、神戸大学動物実験実施規則を忠実に遵守し、細心の注意を払って行った。

C. 研究結果・D. 考察

①放射線照射によりラジカルを発生する粒子の探索とその評価

初めに、紫外線や超音波の刺激によりラジカルを発生することが知られている二酸化チタンナノ粒子（石原産業製）を用いて、放射線照射によるラジカル発生能を評価した。粒子径及び表面修飾の異なる2種類の二酸化チタンナノ粒子に放射線を照射した結果を図3に示す。

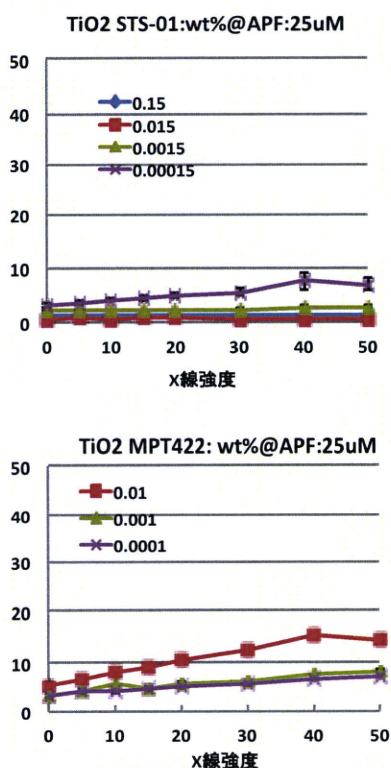


図3 二酸化チタンナノ粒子へ放射線を照射した際のラジカル発生量の評価

これより、放射線の照射強度を50 Gyまで照射してもAPF由来の蛍光は見られず、ラジカルを発生しないことが明らかとなった。また、粒子濃度を増

やしても蛍光強度は増加せず、やはり放射線照射によるラジカル発生は見られなかった。

そこで、本研究ではラジカルを発生する新しい粒子の探索を行った。様々な粒子を調製し（研究分担者：大原・佐藤グループを参照）、放射線照射によるラジカル発生能を評価した。図4に過酸化チタンの結果を示す。放射線照射量の増加とともにAPFの蛍光が増加し、また粒子濃度が増加するとともにAPFの蛍光が増加した。以上より、過酸化チタンナノ粒子は放射線照射によりラジカルを発生することを新たに見出した（特許申請済み）。

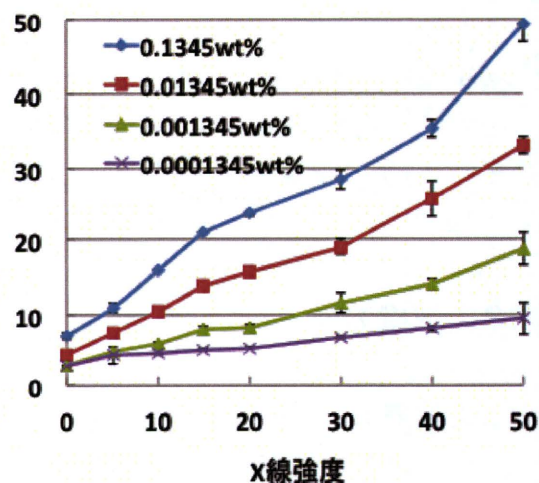


図4 過酸化チタンナノ粒子へ放射線を照射した際のラジカル発生量の評価

また、チタン以外のナノ粒子についても更に検討を進めた結果、カルシウム、バリウム、亜鉛、のそれぞれの酸化物で構成されている粒子においても（調製法は研究分担者：大原・佐藤グループを参照）、放射線照射に伴う

APFの蛍光が観察された（図5）。以後、これらの粒子においても同様の検討を進めていく予定である。

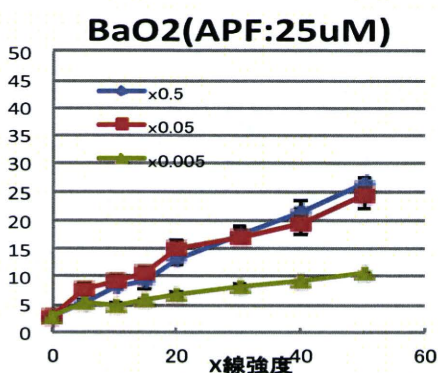
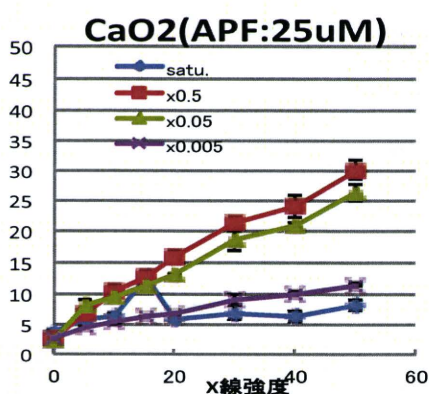
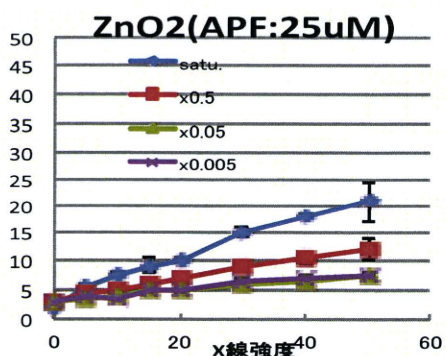


図5 金属ナノ粒子へ放射線を照射した際のラジカル発生量の評価

これらのナノ粒子は、その表面の特性により純水な溶液中では分散して

いるが、生理食塩水などのイオンが存在する溶液中では凝集して沈殿してしまい、生体内への応用は難しい。そこで本研究では、生体内でも沈殿せずナノ粒子として分散状態を保つことができる表面修飾法の開発を行った。表面修飾剤としてポリアクリル酸（PAA）を用い、表面修飾方法として熱処理を行った。この方法により、過酸化チタンナノ粒子の表面をポリアクリル酸高分子が覆う形になり、塩存在下での凝集を防ぐことができると期待される。予想通り、上記の方法で修飾した過酸化チタンナノ粒子は、PBSや培地中でも分散状態を保ち、沈殿しないことが明らかとなった。また、これらポリアクリル酸を修飾した過酸化チタンナノ粒子の放射線照射に同様にX線を照射したところ、粒子濃度及び照射強度に応じてラジカルを発生することが確認できた（図6）。

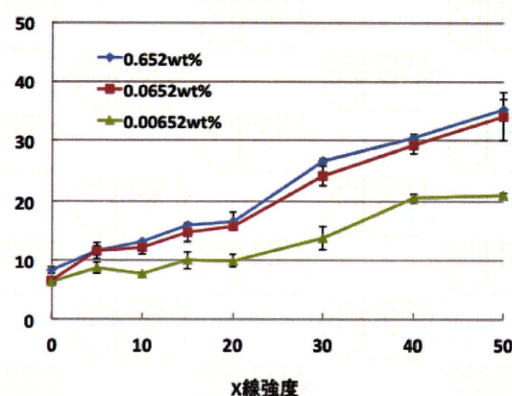


図6 PAA修飾過酸化チタンナノ粒子へ放射線を照射した際のラジカル発生量の評価

これより、生体条件下でも凝集せず分散性を保っている粒子を創製するこ

とに成功した。そのラジカル発生量は未修飾のチタンと比較してわずかに減少していたが、これはポリアクリル酸の影響によるものと考えられる。

続いて、PBS及び培地中でのラジカル発生量を評価した。DMEM培地及びRPMI培地中に未修飾の過酸化チタン粒子を添加すると、即座に凝集してしまうため利用できない。PAA修飾過酸化チタンナノ粒子は培地及びPBS中で分散状態を保っているため、この修飾粒子にX線を照射してそのラジカル発生能を評価した。すると、培地中ではAPFの蛍光の増加は見られないという結果になった。培地を水で段階的に希釈して測定するとわずかにラジカルが発生したという結果から考えると、培地中の何かしらの成分が、X線照射により発生したラジカルをトラップし、クエンチしている可能性が示唆された。一方で、二酸化チタンナノ粒子を培地に加え、紫外線を照射した場合にはラジカルが発生していることから、二酸化チタンに紫外線を照射して発生するラジカル種と、過酸化チタンナノ粒子にX線を照射して発生するラジカル種は異なるものである可能性が示唆された。

培地中ではラジカルがクエンチされてしまうため、同様の生理条件下となりうるPBSで検討を行った。その結果を図7に示す。PBSのみでバックグラウンドを測定した場合、チタンを添加していないにも関わらずAPFの蛍光が見られた。また、PBSを水で希釈するとその蛍光が押さえられたことか

ら、PBSの濃度依存的にラジカルが発生していることになる。更に、このPBSに過酸化チタンナノ粒子を添加してX線を照射しても、APFの蛍光の増加は見られなかった。今後、より生体に近い条件下でラジカルを大量に発生する条件の最適化を進めていく必要がある。

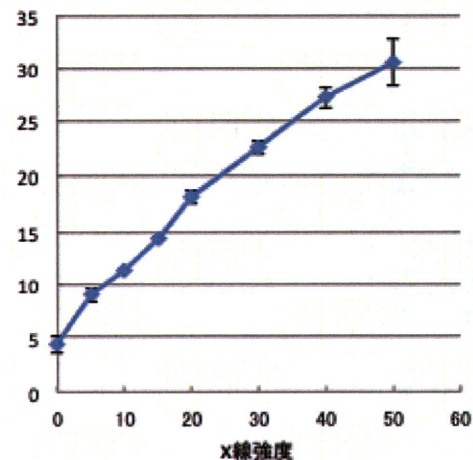
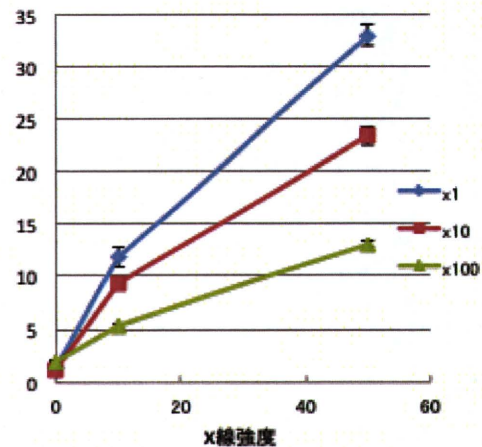


図7 PBSへPAA修飾過酸化チタンナノ粒子を添加していない場合(上図)及び添加した場合(下図)へ放射線を照射した際のラジカル発生量の評価

②過酸化チタンナノ粒子及び紫外線照射を併用した細胞殺傷効果の最適化

X線照射実験を行う前に、取り扱いが容易で実験を網羅的に行う事ができる紫外線照射を用いて細胞殺傷効果の条件検討を行った。過酸化チタンナノ粒子は、X線照射のみならず、紫外線照射においても同様にラジカルを発生することは確認済みである。また、その発生量は二酸化チタンナノ粒子と比較しておよそ1/10~1/100程度であった。

モデル細胞としてHeLa, 膵臓がん細胞のモデルとしてMIAPaca-2, BxPc3の3種類の細胞を用いた。これらの細胞に対して紫外線照射を行い、その生存率をWSTアッセイで評価した結果を図8に示す。

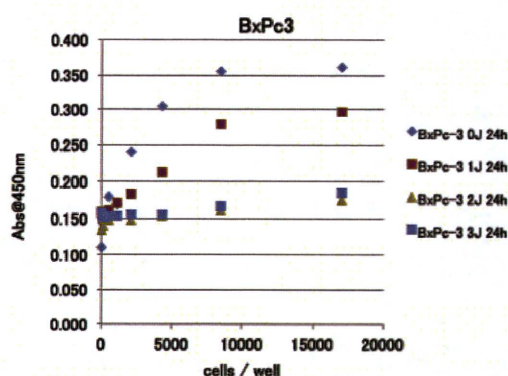
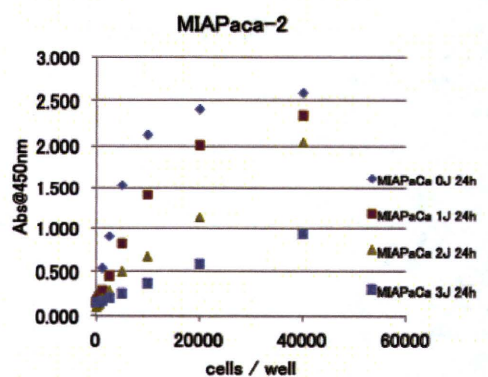
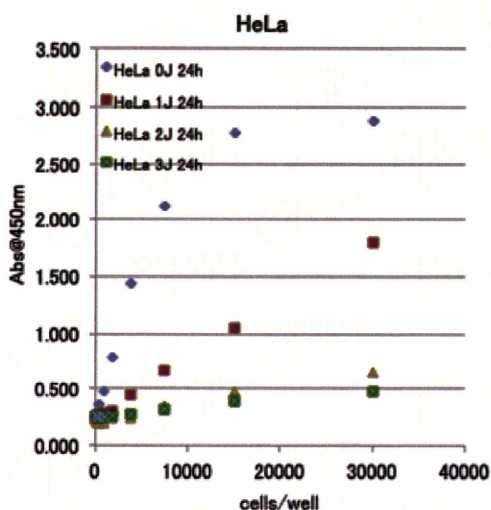


図8 紫外線照射時における生細胞の割合(生細胞数はWSTアッセイを用いて評価した)

この結果より、いずれの細胞においても紫外線照射量に依存して生細胞数が減少し、およそ2 J/cm²の照射量ではほぼ死滅する結果が得られた。

続いて、過酸化チタンナノ粒子を添加し、UV照射による細胞傷害効果について検討を行った。初めにチタンナノ粒子のみを添加し、WSTアッセイを行ったところ、洗浄操作によらずチタンがwellに残存してしまい、WSTのシグナルが増加する結果となった(図9)。

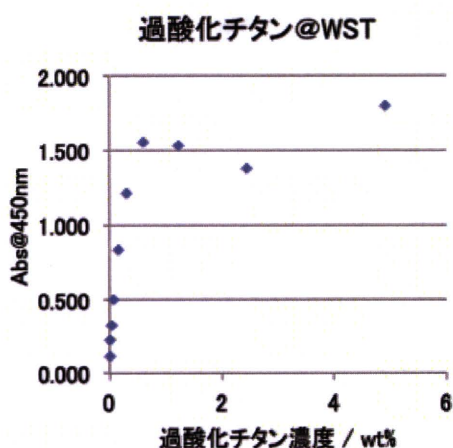


図9 過酸化チタンナノ粒子のみをwellに添加し、洗浄した後にWSTアッセイを行った結果(細胞は播種せず)

この結果より、過酸化チタンナノ粒子はwellに非特異的に吸着しやすい性質を持つことが示唆された。続いて96wellプレートに播種したHeLa細胞に過酸化チタンナノ粒子を添加し、UV照射をおこなった結果を図10に示す。

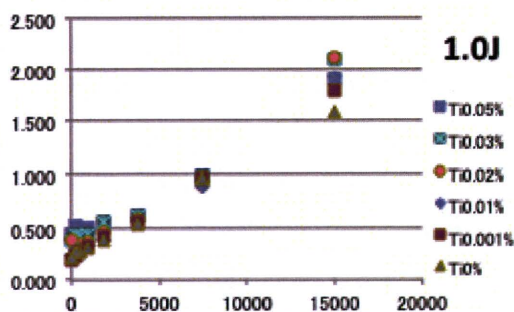


図10 HeLa細胞に過酸化チタンナノ粒子を添加し、UV照射を行った後にWSTアッセイで評価した結果

過酸化チタンナノ粒子を添加した条件では、UV照射の有無で生存率に差が見られなかった。これは上述のとおり、過酸化チタンナノ粒子がwell内に残存しており、そのシグナルがWSTアッ

セイで検出されてしまったためであると予想される。現在、実験条件及び評価方法を網羅的に検討することにより、チタンナノ粒子及び放射線照射を併用した細胞傷害効果の最適条件を見出していく予定である。

E. 結論

過酸化チタンナノ粒子に放射線を照射することでラジカルを発生することを見出す事に成功した。そのラジカル発生量は放射線の照射量、粒子濃度に依存していることが明らかとなった。更に、PAA修飾することで生理条件下で分散させることに成功した。しかし、培地中やPBS中では、ラジカルがトラップされてしまう可能性が示唆された。今後、過酸化チタンナノ粒子と放射線照射の併用効果についてより具体的に検討を進めていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsui, K., Karasaki, M., Segawa, M., Hwang, S. Y., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A. (2010) Biofunctional TiO₂ nanoparticle mediated photokilling of cancer cells using UV irradiation., MedChemComm, 1, 209-211
2. Miyachi, Y., Shimizu, N., Ogino, C., Kondo, A. (2010) Selection of

- DNA aptamers using atomic force microscopy., *Nucleic Acids Research*, 38(4), e21
3. Fukuda, N., Ishii, J., Tanaka, T., Kondo, A. (2010) The competitor-introduced G γ recruitment system, a new approach for screening affinity-enhanced proteins., *FEBS Journal*, 277(7), 1704-1712
 4. Ishii, J., Fukuda, N., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A. (Review) (2010) Protein-protein interactions and selection: yeast-based approaches that exploit guanine nucleotide-binding protein signaling., *FEBS Journal*, 277(9), 1982-1995.
 5. Shimizu, N., Ninomiya, K., Ogino, C., M. M. Rahman. (2010) Potential uses of titanium dioxide in conjunction with ultrasound for improved disinfection., *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 416-423
 6. Ogino, C., Shibata, N., Sasai, R., Takaki, K., Miyachi, Y., Kuroda, S., Ninomiya, K., Shimizu, N. (2010) Construction of protein-modified TiO₂ nanoparticles for use with ultrasound irradiation in a novel cell-injuring method., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(17), 5320-5325
 7. Shishido, T., Mieda, H., Hwang, S. Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., Ogino, T., Fukuda, H., Kondo, A. (2010) Affibody-displaying bionanocapsules for specific drug delivery to HER2 expressing cancer cells., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(19), 5726-5731
- ## 2. 学会発表
1. 過酸化チタンナノ粒子及び低線量X線照射を併用した深部ガンの非侵襲的治療法の開発
唐崎 美樹・松井 かずさ・佐藤 和好・大原 智・佐々木良平・田中 勉・荻野 千秋・近藤 昭彦 生物工学会62回大会 2010年10月 宮崎
 2. Affibody提示ナノカプセルを用いたHER2発現癌細胞特異的な薬物送達 三枝 宏彰・宍戸 卓也・西村 勇哉・田中 勉・荻野 千秋・近藤 昭彦

- 生物工学会 62 回大会 2010 年 10 月 宮崎
3. Sortase を用いた streptavidin の新規修飾技術の開発 松本 拓也・田中 勉・近藤 昭彦 生物工学会 62 回大会 2010 年 10 月 宮崎
 4. 1 細胞アッセイ技術に基づく GPCR 解析、アゴニスト探索法の開発 近藤 昭彦・石井 純・荻野 千秋 生物工学会 62 回大会 2010 年 10 月 宮崎
 5. 過酸化チタンナノ粒子及び低線量 X 線照射を併用した深部ガンの非侵襲的治療法の開発 唐崎 美樹・松井 かずさ・佐藤 和好・大原 智・佐々木 良平・田中 勉・荻野 千秋・近藤 昭彦 生物工学会 62 回大会 2010 年 10 月 宮崎
 6. ユビキチン分割体を用いた G 蛋白質共役型受容体二量体化検出システムとドメイン解析への応用 中村 泰之・石井 純・近藤 昭彦 生物工学会 62 回大会 2010 年 10 月 宮崎
 7. Biofunctional TiO₂ Nanoparticle-mediated Photokilling of Cancer Cells Using UV Irradiation Tsutomu Tanaka, Kazusa Matsui, Miki Karasaki, Chiaki Ogino and Akihiko Kondo, The 16th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, 2010. 11. 20-22, Taiwan.
 8. Site-Specific streptavidin-protein conjugation using sortase A Takuya Matsumoto, Shiori Sawamoto, Takayuki Sakamoto, Tsutomu Tanaka The 16th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, 2010. 11. 20-22, Taiwan.
 9. Selection of DNA aptamers using Atomic Force Microscopy, Chiaki Ogino, The 16th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, 2010. 11. 20-22, Taiwan.
 10. Enzyme-mediated site-specific antibody-protein conjugation using a ZZ domain as a linker.
 11. Takayuki Sakamoto, Tsutomu Tanaka^{2*} and Akihiko Kondo, The 16th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, 2010. 11. 20-22, Taiwan.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

出願日 : 2010年2月17日

出願番号 : 特願 2010-032055

発明の名称 : 放射線治療剤

出願人 : 国立大学法人神戸大学

発明者 : 荻野 千秋、田中 勉、佐々木 良平、近藤 昭彦

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し