

20111018A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昭彦

平成24(2012)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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昭彦

平成24(2012)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. スーパーハイブリッド・ナノ粒子と放射線治療の併用による膵臓がん治療に関する研究

佐々木 良平 ----- 16

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 ----- 24

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 ----- 38

5. 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・曾我 公平 ----- 50

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 58

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 66

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

（総括）研究 平成23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

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）。

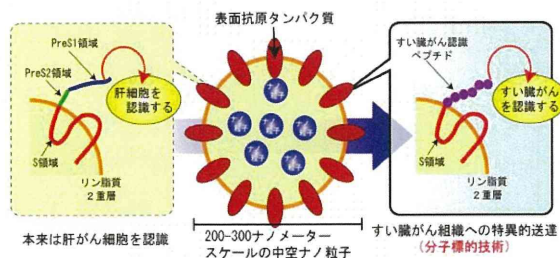


図1. 『スーパーハイブリッド・ナノ粒子』構築

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。

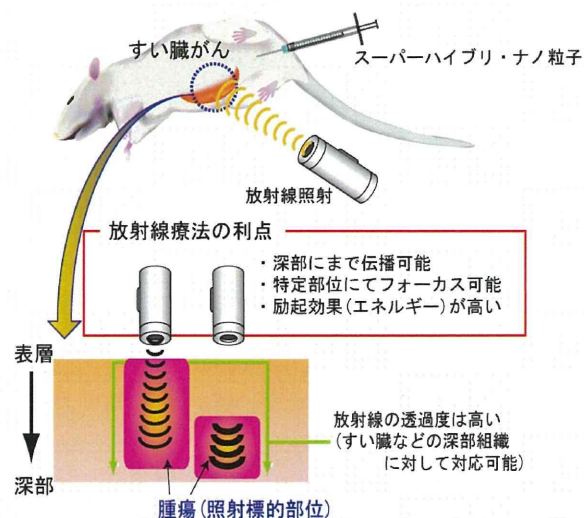


図 2. ナノ粒子・放射線療法の *in vivo*での併

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測

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。

$$[V=LW/2]^2$$

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℃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℃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23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 平成23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 神戸大学大学院工学研究科 准教授

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）。

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

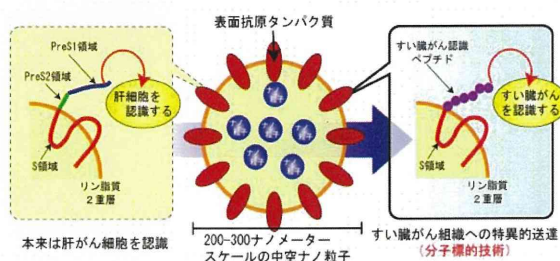


図1. 『スーパーハイブリッド・ナノ粒子』構築

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。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 ラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討

本実験では、チタン粒子を生細胞に作用させ、エネルギー照射によってガン細胞を傷害させることを *in vitro*で行い、生体内に入れる方法を検討し、最終的にチタン粒子を生体内で作用させることを目指す。培地と等濃度のグルコースを加えた20 mM HEPES溶液にチタン粒子を分散させて、APFを用いてラジカル発生量を測定した。K562浮遊細胞に、HEPES溶液を加えて懸濁し、チタン分散液を少量加え、UV照射 (0, 0.1, 0.25, 0.5 J/cm²) を行った。その後、細胞をRPMI培地で培養し、生細胞数を計測した。チタン分散液は調製したTiO₂、市販のSTS-01 TiO₂、調製したTiO_xを用いた。

② 乳癌細胞標的化を目指したAffibody提示コアタンパクナノ粒子の開発

薬剤投与による治療を行う際、従来の静脈注射や経口投与といった手

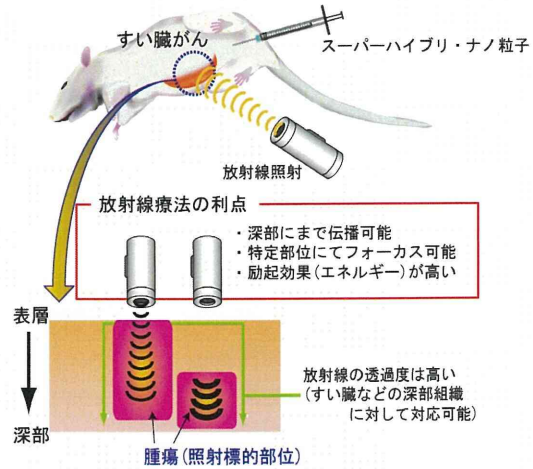


図2. ナノ粒子・放射線療法の *in vivo*での併用利用の利点

法では、薬剤が体内に拡散し、効果の減少や副作用が起こる場合がある。そこで近年、「必要最小限の薬剤を、必要な時に必要な部位へ選択的に送達する」技術であるドラッグデリバリーシステム (DDS) が注目されている。効果的なDDS技術のひとつとして、患部の標的組織のみに薬剤を送達するキャリアが挙げられる。

本研究では、DDS技術における新規キャリアとして、B型肝炎ウイルス (HBV) のコアタンパクナノ粒子 (HBc) に着目した。このHBcは、大腸菌により容易に大量生産可能な183アミノ酸からなるコアモノマーが自己会合した中空粒子である。また、このHBcコアモノマーのC末端側にはarginine-rich domainが存在し、この働きにより細胞への非特異的な結合及び取り込みが確認されている。

そこで本研究では、HBcの細胞への非特異的な結合能力を削除し、新たに細胞標的能力のある分子を提示させることで、標的細胞特異的なピン

ポイントデリバリーを可能にする新規キャリアの開発を目指した。新規標的分子として *Srphylococcus aureus*由来のProtein Aをベースとした結合性タンパク質Affibody; Zを用いた。その中で、乳癌細胞等に発現しているHER2レセプターに特異性を示すZHER2をHBcに表層提示することで、乳癌細胞への特異的な送達を試みた。

細胞への非特異的な結合を示すHBcコアモノマーのarginine-rich domainを含むC末端側(150~183アミノ酸残基)を削除した粒子(Δ HBc)を発現するプラスミドを構築した。次に、コアモノマーの粒子表面に位置する78~80アミノ酸残基にZHER2遺伝子を挿入したZHER2提示 Δ HBc(ZHER2- Δ HBc)発現プラスミドを構築した。このプラスミドを、*Escherichia. coli* BL21株に形質転換し、大量培養した。回収した菌体を超音波により破碎し、アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行い、ZHER2- Δ HBcを取得した(図3)。

精製ZHER2- Δ HBcをAlexa Flour 488標識し、HER2を発現している標的細胞のヒト乳癌由来細胞(SK-BR-3)、HER2を微量発現しているヒト乳癌由来細胞(MCF-7)、及び、HER2を発現していないヒト子宮頸癌由来細胞(HeLa)に添加し、3時間後に共焦点レーザー顕微鏡(LSM)及びフローサイトメトリー(FCM)による解析を行った。

(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 ラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討

チタン粒子を分散させる溶液として、グルコースを加えたHEPESは、培地よりも多量のラジカルをUV照射により生成することを新たに見出した。

ControlとTiO₂ 2種類と生細胞数の関係の結果をFig. 1および2に示す。UV照射を行わないもの(図4(A))では、

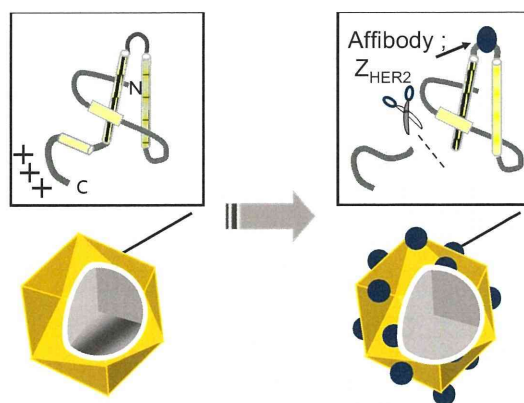


図3. Chimera construction from HBc to ZHER2- Δ HBc

チタンの有無に関わらず細胞数が増加している。これより、チタンの細胞毒性は少ないことが分かる。0.25J/cm²のUV照射を行ったもの(図4(B))では、STS-01を加えたものはcontrolより細胞数が減少している。また、調製したTiO₂を加えたものは、細胞の大幅な増加を防ぐことができ

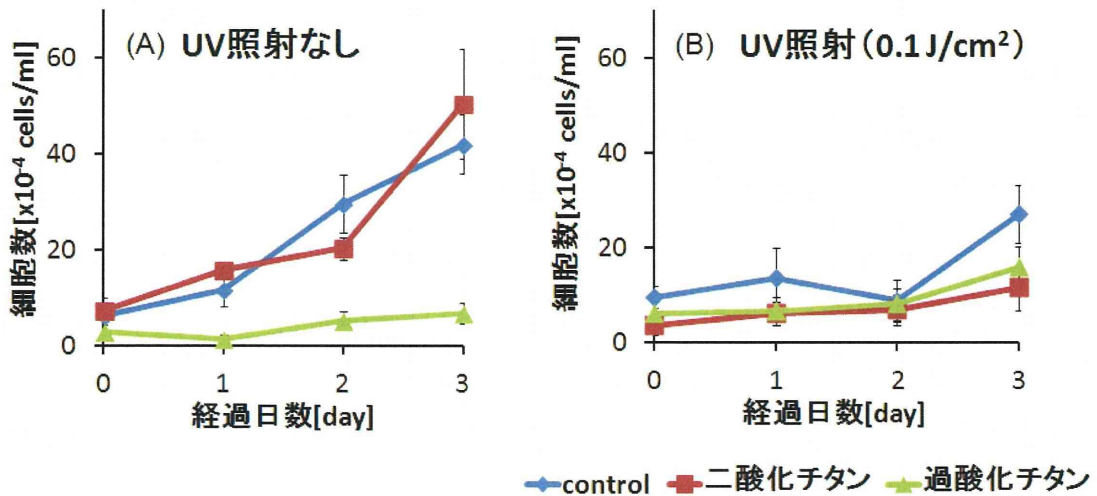


図 4. 培地中への照射によるラジカル発生条件の探索

た。以上より、培地に代わる細胞毒性の小さい溶液を用いて、チタンとUVの併用により、細胞数の増加を防ぐことに成功した。今後は、細胞を確実に傷害できる条件の検討をすすめる。

② 乳癌細胞標的化を目指した Affibody 提示コアタンパクナノ粒子の開発

ZHER2-ΔHBc をそれぞれの細胞に終濃度 10 μg/ml になるように添加し、LSM による観察を行った (図 5)。HER2 を発現している標的細胞 SK-BR-3 では、緑色蛍光が観察され、細胞への粒子の結合が確認された (図 5a)。HER2 を微量発現している細胞 MCF-7 では、若干の蛍光が観察された (図 5b)。HER2 を発現していない細胞 HeLa では、全く蛍光が観察されなかった (図 5c)。次に FCM 解析によって

ZHER2-ΔHBc の細胞への結合能力を評価した。SK-BR-3 では、ZHER2-ΔHBc の添加濃度依存的に蛍光強度が増加した。MCF-7 でも濃度依存的な蛍光強度の増加は見られるが、SK-BR-3 と比較すると明らかに低く、Fig.2 の結果と一致する。HeLa では細胞へ結合は全く見られなかった。これらの結果から、ZHER2-ΔHBc を HER2 が発現している乳癌細胞へ特異的に送達可能な

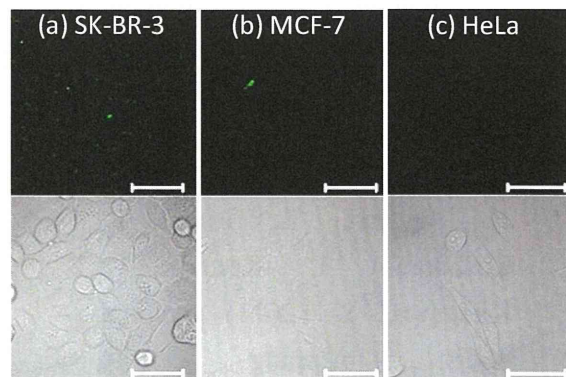


図 5. ZHER2-ΔHBc で処理した培養細胞の傾向顕微鏡増 (Scale bars: 50 nm)

ことが示された。また、興味深いことにその結合能力は、細胞の HER2 発現量に依存していることが示唆された。

以上の結果より、ZHER2-ΔHBc の乳癌細胞特異的なキャリアとしての有用性が示唆された。今後は、この粒子の内部に薬剤を封入し、in vivo への応用を目指したい。

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。また一方で、酸化物ナノ粒子をカプセル化できる可能性があるバイオ中空ナノ粒子の開発も進行しており、遺伝子工学的手法により表面に抗体様分子を提示したバイオ中空ナノ粒子の構築にも成功した。更には、細胞特異的な標的化も可能であることを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiraiwa, K., Ueda, M., Takeuchi, H., Oyama, T., Irino, T., Yoshikawa, T., Kondo, A., Kitagawa, Y. (2011) Sentinel node mapping with thermoresponsive magnetic nanoparticles in rats., *Journal of*

Surgical Research, in press

2. Fukutani, Y., Nakamura, T., Yorozu, M., Ishii, J., Kondo, A., Yohda, M. (2011) The N-terminal replacement of an olfactory receptor for the development of a yeast-based biomimetic odor sensor., *Biotechnology and Bioengineering*, in press
3. Matsumoto, T., Takase, R., Tanaka, T., Fukuda, H., Kondo, A. (2011) Site-specific protein labeling with amine-containing molecules using *Lactobacillus plantarum* sortase., *Biotechnology Journal*, in press
4. Nishimura, Y., Shishido, T., Ishii, J., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A. (2011) Protein-encapsulated bio-nanocapsules production with ER membrane localization sequences., *Journal of Biotechnology*, in press
5. Ninomiya, K., Ogino, C., Oshima, S., Sonoke, S., Kuroda, S., Shimizu, N. (2011) Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO₂ nanoparticles., *Ultrasonics Sonochemistry*, in press

6. Nagaoka, H., Sato, Y., Xie, X., Hata, H., Eguchi, M., Sakurai, N., Watanabe, T., Saitoh, H., Kondo, A., Sugita, S., Ohnishi, N. (2011) Coupling stimuli-responsive magnetic nanoparticles with antibody-antigen detection in immunoassays., Analytical Chemistry, in press
 7. Fukuda, N., Ishii, J., Kondo, A. G γ recruitment system incorporating a novel signal amplification circuit to screen transient protein-protein interactions., FEBS Journal, 278, 3086-3094 (2011)
 8. Fukuda, N., Ishii, J., Kaishima, M., Kondo, A. Amplification of agonist stimulation of human G-protein-coupled receptor signaling in yeast., Analytical Biochemistry, 417, 182-187 (2011)
 2. Characterization of Titanium oxide nano-particle suspension by XAFS technique C. Numako, K. Sato and S. Ohara, M. Umetsu, S. Takami, R. Sasaki, C. Ogino, and A. Kondo E-MRS ICAM IUMRS 2011 Spring Meeting 2011年5月9日～13日 Congress Center, Nice, France
 3. バイオナノカプセルを用いた細胞特異的ドラッグデリバリーシステム 近藤 昭彦、田中 勉、荻野 千秋 第 27 回日本 DDS 学会学術集会 2011 年 6 月 9 日～10 日 東京大学本郷キャンパス
 4. Affibody-BNC を用いた標的癌細胞への siRNA デリバリー 西村 勇哉 アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2011 2011 年 9 月 1 日～2 日 大阪大学コンベンションセンター
 5. 酵素を用いたタンパク質高機能化技術の開発 田中 勉 化学工学会第 43 回秋季大会 2011 年 9 月 14 日～16 日 名古屋工業大学
 6. Site - specific streptavidin - protein labeling
- 2. 学会発表**
1. Cancer cell killing system construction by combination of titanium oxide nanoparticle and bio-nano capsule Akihiko Kondo 第 50 回日本生体医工学会大会 2011 年 4 月 29 日～5 月 1 日 東京電機大学 神田キャンパス

- application using sortase A
Takuya Matsumoto Enzyme
Engineering XXI 2011年9月18
日～22日 Vail Marriott Resort
and Spa, Colorado. USA
7. Creation of
cellooligosaccharide - assimilati
ng E. coli by displaying active
BGL on the cell surface using
novel anchor protein Tsutomu
Tanaka Enzyme Engineering
XXI 2011年9月18日～22日
Vail Marriott Resort and
Spa, Colorado. USA
8. 生体分子融合ナノ粒子の生物
化学工学領域への高度応用に
関する研究 荻野 千秋 第63
回日本生物工学会大会 2011
年9月26日～28日 東京農工
大学
9. Sortase A-Catalyzed design of
multi-labeled macromolcular via
recombinant streptavidin Takuya
Matsumoto The 17th
Symposium of Young Asian
Biochemical Engineers'
Community 2011年10月7日
～9日 Get-Pearl Tower
10. Streptaivdin を用いた部位特異
的な異種タンパク質同時固定
化技術の開発
11. 松本 拓也 ・ 田中 勉 ・ 近
藤 昭彦 化学工学会第77年会
2012年3月15日～17日 工学
院大学新宿キャンパス
12. ソマトスタチンに対する新規
DNA アプタマーの選抜およ
びセンシングへの応用 荻野
千秋・網野智一・宮地佑典・
近藤昭彦 日本化学会第92春
季年会 2012年3月25日～28
日 慶応義塾大学
13. 原子間力顕微鏡を用いた細胞
表層におけるレセプター・リ
ガンド間相互作用測定系の構
築 竹中武蔵・荻野千秋・宮地
佑典・近藤昭彦 日本化学会第
92春季年会 2012年3月25日
～28日 慶応義塾大学

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

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 平成23年度終了報告書
スーパーハイブリッド・ナノ粒子と放射線治療の併用による膵臓がん治療
に関する研究

研究分担者 佐々木 良平 神戸大学大学院医学研究科 特命准教授

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がんなどの難治性がんの飛躍的な治療率向上を目指す。その一環として本分担研究では、ナノ粒子による放射線治療との併用について検討を行う。

放射線の生物に対する影響には、直接作用と間接作用がある。放射線によるDNA分子の電離が直接にDNAの化学結合を切断するような作用が「直接作用」である。一方「間接作用」とは、電離放射線によって水から反応性の高いOHラジカル（ヒドロキシラジカル）などの活性種（水和ラジカル、Hラジカル、過酸化水素）が生成され、これらがDNAと化学反応することで損傷を引き起こすことである。X線照射の場合、生物学的損傷の約1/3は直接作用、約2/3は間接作用の結果と考えられている。

このことから、本研究によりナノ粒子が“ラジカル発生源”になり放射線増感の機能を果たせば、従来と同等の抗腫瘍効果を維持した上で照射線量の低減が可能であり、その結果、腫瘍近傍の正常組織への非照射線量を低減でき、より低侵襲な非外科的新規治

療法を確立できると考えられる。

これまでの研究で、過酸化チタン（TiO_x）ナノ粒子が放射線照射により十分にラジカルを生成することを見出した。ただし、TiO_xナノ粒子自身は、細胞外液に近い組成であるリン酸バッファーをはじめ多くの溶媒中で凝集する性質があった。そこで、動物実験に適するよう、粒子表面をポリアクリル酸（PAA）で修飾した粒子を作成した。表面修飾を施した粒子でラジカルの生成を調べたところ、未修飾状態と同様にラジカルの生成が認められた。また、異なるロット間でのラジカル生成の再現性も確認した。

これらの結果から、本分担研究では、膵臓がんを導入した担がんマウスを用いて、TiO_xナノ粒子と放射線治療の併用によるがん組織の抗腫瘍効果を検証した。

B. 研究方法

1. X線照射によるTiO_xナノ粒子のラジカル生成能評価

ラジカルの検出にはAminophenyl Fluorescein (APF) 試薬（積水メディカル社製）を用いた。APFは中性溶液中でほとんど蛍光を持たないが、OHラジカルなどプローブが強い活性を持

つ活性酸素種と反応すると、強蛍光性化合物であるフルオレセイン（励起波長490nm、蛍光波長515nm）が生成し、蛍光強度の増大が観測される。これにより、蛍光を観測することで、ラジカルの発生量を測定できる。

96ウェルプレート上で100 μ Lの試料に5 μ MのAPFを添加し、X線照射を行った。X線照射には、細胞・小動物照射用のX線照射装置 MBR-1505R2（HITACHI社）を使用し、管電圧150kVp、管電流5mAとした。照射後、励起波長485nm、蛍光波長538nmで蛍光強度を測定した。

2. 細胞内でのラジカル生成評価およびラジカルの同定

細胞内でのラジカル生成をFACSで評価した。細胞はヒト膀胱癌由来であるMIAPaCa2細胞株を用い、血清を加えたRPMI-1640培地（Sigma-Aldrich社）中37°C、5%CO₂条件下で培養した。染色試薬として、OHラジカル検出にAPF、O₂⁻ラジカル検出にHE、H₂O₂検出にcDCFを用いた。培地を加えた96ウェルプレート上にMIAPaCa2を播種し、37°C、5%CO₂条件下で24時間インキュベートした。その後、TiO_xナノ粒子を100 μ l加え、2時間インキュベートした後に各染色試薬を添加し、X線を照射した。照射後、FACSで解析を行った。

3. TiO_xナノ粒子の酸化還元反応の評価

ラジカル発生機構解明のための評価の1つとして、TiO_xナノ粒子のカタ

ラーゼとの反応および二価鉄イオン（Fe²⁺）との反応を調べた。

カタラーゼとの反応は、酸素発生量を評価した。37°C条件下の酸素モニター用チェンバー内で2mlの0.6wt% TiO_xナノ粒子または0.1mM H₂O₂に50 μ l、50000U/mlのカタラーゼを反応させ、酸素発生量を測定した。

Fe²⁺との反応は、ESRを用いてラジカル生成を評価した。0.3wt% TiO_xナノ粒子または0.1mM H₂O₂に0.1mM FeSO₄および10mM DMPOを添加し、ESRにて測定を行った。

4. 動物実験による抗腫瘍効果の評価

担がんマウスモデルを作成し、TiO_xナノ粒子とX線の併用による抗腫瘍効果を評価した。

BALB/cヌードマウス（4週令オス）の大腿部皮下にMIAPaCa2細胞株（2×10⁶個）を移植した。移植後7日目に8.7wt%のPAA修飾TiO_xナノ粒子150 μ lを腫瘍局注し、その後X線5Gyを腫瘍に照射した。照射装置はMBR-1505R2を使用し、照射中、腫瘍部以外は鉛ブロックによりシールドされた。照射後一定期間、腫瘍体積を測定した。評価は、ナノ粒子X線併用群、ナノ粒子単独群、X線単独群、そして無処置（コントロール）群の4グループ（3匹/グループ）で行った。

5. 動物実験における組織評価

TiO_xナノ粒子の細胞内への取り込みを評価するため、マウスの腫瘍組織に対して病理学的評価および顕微鏡

的評価を行った。

BALB/cヌードマウス（4週令オス）の大腿部皮下にMIAPaCa2細胞株（ 2×10^6 個）を移植し、移植後7日目に8.7wt%のPAA修飾TiO_xナノ粒子150 μlを腫瘍局注した。局注24時間後に腫瘍を切除し、観察試料とした。病理学的評価は、ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色で行った。顕微鏡的評価には透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた。

6. 倫理面への配慮

本分担研究における動物実験は、神戸大学の動物実験倫理委員会の許可を得た上で、神戸大学の動物実験実施規則に基づいて実施する。なお、本分担研究に組換えDNA実験やヒト遺伝子解析研究等は含まれない。

C. 研究結果と考察

1. TiO_xナノ粒子のラジカル生成

図1は、X線照射を行ったTiO_xナノ粒子のAPFによる蛍光強度測定の結果を示す。X線線量およびナノ粒子濃度に依存した蛍光量の増加、すなわちラジカル生成が確認された。

図2は、PAA修飾を施したTiO_xナノ粒子のAPFによる蛍光強度測定の結果を示す。未修飾をしていない状態と同様にラジカルを生成することがわかった。

さらに、試料にラジカルスカベンジャーであるビタミンC（Vit.C）またはグルタチオン（GSH）を添加し、同様の測定を行った。その結果を図3に示す。スカベンジャーを入れていない群

ではラジカルの生成が見られたのに対して、Vit.C群およびGSH群では蛍光強度の増加は認めなかった。これは、スカベンジャーにより生成されたラジカルが酸化還元反応を起こしているためであると考えられる。

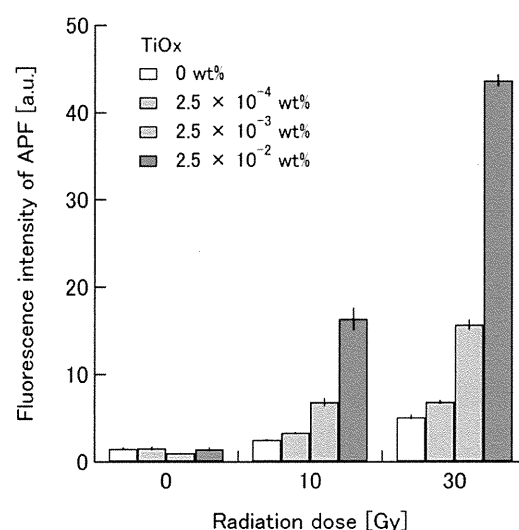


図1 TiO_xナノ粒子のラジカル生成

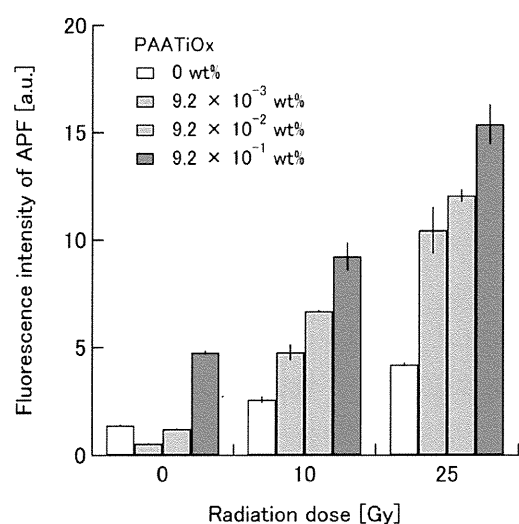


図2 PAA修飾TiO_xナノ粒子のラジカル生成