

Fig. 2 Structure of 8-OHdG

動像はコメットに似て、そのテールは1本鎖DNA切断量と連動し、多くの遺伝毒性物質が1本鎖DNA切断を生じるので、非常に感度が高く、簡便で、偽陽性率の低い方法である。近年非常に使用されることが多くなっている。

3.6 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 測定

8-OHdGはDNAを構成する塩基の一つである deoxyguanosine (dG) の8位がヒドロキシル化されたものであり、DNA酸化損傷の指標の一つである (Fig. 2)。1984年に葛西らにより報告されて以来、生物学的重要性、疾患との関連性が明らかにされてきた。特に、8-OHdGはDNA複製時にGC-TAのtransversion型の変異を引き起こすことより、密接に発癌に関与する。一方、ヌクレオチドプール中のDNA合成基質が酸化的損傷を受けた時も、DNA複製の際に誤った塩基が取り込まれることや、DNA中の8-OHdGを取り除くhOGG1や、ヌクレオチド中に存在する8-OHdGTPを浄化するMTH1などの修復機構も含めて、評価する必要がある¹⁰⁾。8-OHdGの分析方法には、HPLC-ECD (電気化学検出器付きHPLC)法、GC-MS (ガスクロマトグラフィ/質量分析)法、LC-MS/MS (液体クロマトグラフ-タンデム質量分析)法、ELISA法等があり、それぞれ精度、感度、経済性等に長所・短所がある。

3.7 その他

不定期DNA合成試験、HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) 前進突然変異法、 γ -H2AX染色法などがある。不定期DNA合成試験は、主にラットの肝細胞が用いられ、DNA損傷を修復合成するために取り込まれる³H-チミジンを観察する。HPRT前進突然変異法は、は乳類雄性細胞(XY染色体)を用いて、同遺伝子の*in vitro*および*in vivo*での変異を評価する。同遺伝子はX染色体上にある。その欠損変異は、6-チオグアニン抵抗性を標識として容易に選別できる。 γ -H2AX染色法は、2本鎖DNA切断が生じた場合の最も早期の細胞応答の一つが核内の

DNAが巻き付いているヒストンたんぱく質H2AXの139番セリン部位のリン酸化を評価する。 γ -H2AX (リン酸化H2AX)に特異的な蛍光標識抗体を用いることで、細胞核内に生じる γ -H2AXを顕微鏡下で観察する。

3.8 ナノ粒子の遺伝毒性の評価

化学物質の遺伝毒性評価と同じように、単一の遺伝毒性試験で、遺伝子突然変異、染色体異常等全ての遺伝的变化を検出することは出来ない。現在、化学物質の遺伝毒性は、数種の遺伝毒性試験を組み合わせで評価される。遺伝毒性にかかわる法規・ガイドラインにより、Ames試験、染色体異常試験、小核試験等は、組み合わせ・利用法が異なる。例えば、年間100kg以上産生される新規化学物質に対して、労働安全衛生法では、Ames試験を必要項目とし、染色体異常試験はAmes試験陽性、かつ比活性1000以上で追加される。また、医薬品では、薬事法により、Ames試験、染色体異常試験、小核試験を標準の組み合わせとして総合評価する。OECDガイドラインでは、新規化学物質、医療用具に対して、Ames試験、染色体異常試験を標準として、小核試験は必要に応じて追加とされている。この評価と同様にナノ粒子も評価されていくと考えられる。

3.9 遺伝毒性のメカニズム

吸入、皮膚、口腔粘膜等から入り込んだナノ粒子が各種細胞に様々な機構で取り込まれる。その結果、核内に侵入したナノ粒子が直接DNAあるいはDNAに関連するタンパク質等に物理的損傷を与える場合が考えられる。酸化チタンやシリカのナノ粒子が核内に入り込み、核内タンパク質を凝集させ、DNA複製、転写、細胞増殖等に影響を与えていることが報告されている^{7,9)}。また、細胞分裂あるいは細胞内のホメオスタシス維持にかかわるタンパク質等に影響を与え、間接的にDNAに損傷を与える場合や、酸化ストレス、炎症、細胞内異常なシグナリングなどを引き起こし、その結果としてDNA障害を与える場合が考えられる。酸化ストレスは、生体における活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)と抗酸化システムのバランスであるが、遺伝毒性を引き起こす機構の中で重要な役割を果たすと考えられている。ROSは生体内において、DNA、脂質、タンパク質、酵素等の生体高分子と反応し、生体のホメオスタシスを乱す。ROSに誘導されるDNA損傷は、1本鎖DNA切断、2本鎖DNA切断、8-OHdG付加体形成、DNAクロソリンクがあり、発癌へ結びついている。

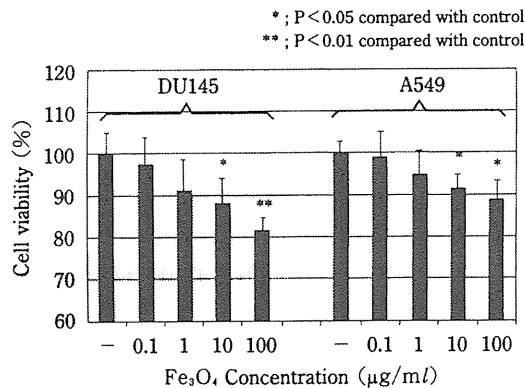


Fig. 3 Alamar Blue assay

4. 細胞依存性について

当研究室では、平成20年度より各種ナノ粒子等（マグネタイト Fe₃O₄、二酸化チタン TiO₂、フラーレン C₆₀、カーボンブラック Carbon black、カオリン Kaolin 等）のヒト細胞株（肺癌細胞株 A549、前立腺癌細胞株 LNCaP、DU-145、PC-3 等）への細胞毒性、および遺伝毒性の評価を行っている。細胞毒性評価として、透過型電子顕微鏡によるナノ粒子の細胞内局在、Cytology（細胞形態観察および免疫細胞化学的染色）、Alamar blue assay、LDH assay（損傷した細胞膜から漏出した乳酸脱水素酵素を測定）、H₂DCF-DA 検出を行い、遺伝毒性評価として、8-OHdG 測定、Comet assay、小核試験等を行っている。共同研究先では、*in vivo* 試験として *gpt* (*guanine phosphoribosyltransferase*) delta transgenic mice にナノ粒子を投与して、*gpt* 変異の解析を行っている¹⁰⁾。ここで、マグネタイト Fe₃O₄（以下 MNP）の異なる細胞株（A549 および DU-145 細胞株）への影響に関する実験結果の一部を紹介する。使用した MNP の 1 次粒子径は 10 nm で、MNP の 2 次粒子径（培養液中）は 180 nm 程度であった。培養液中では、ナノ粒子は凝集するもナノサイズが維持された状態で、細胞に曝露されていると考えられた。両細胞株とも Cell Viability は、濃度依存的に低下した（Fig. 3）。H₂DCF-DA を用いた細胞内の ROS 産生が、前立腺癌細胞株 DU-145、PC-3、LNCaP で確認された。Cytology では、非曝露群の細胞は個々の細胞が vivid で、分裂像も多数認められたが、曝露群の細胞は細胞質の変性、接着性の低下等が認められた。細胞増殖関連抗原 Ki-67 に対する抗体を用いた免疫細胞化学的染色でも、曝露群では Ki-67 陽性細胞の比率が低下し、増殖能の低下が認められた。これらの結果から、

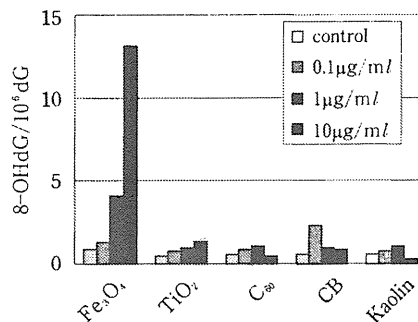


Fig. 4 8-OHdG levels in DNA from DU-145 cells

MNP はこれら細胞株に対して、細胞毒性があると考えられた。一方、MNP 曝露群・非曝露群の 8-OH-dG を測定したところ、DU-145 をはじめとする前立腺癌細胞株で 8-OH-dG 量の増加を認めた（Fig. 4）。これは、他のナノ粒子を曝露した時に比べて有意に高値であった。また、A549 肺癌細胞株では、他のナノ粒子と同様に有意な増加は認められなかった（Fig. 5）。Comet assay では、陽性コントロールとして使用した青石綿と同程度の DNA 損傷を認めている。これらの結果は、MNP が前立腺癌細胞に特異的に DNA 損傷を与えていると考えられた。MNP は前立腺癌細胞に特異的に細胞毒性および遺伝毒性を与えると推測される。臨床癌も含めて前立腺癌細胞株は、塩基除去修復遺伝子発現の欠損や抗酸化酵素の発現が変化していることが報告されている^{12,13)}。MNP が前立腺癌細胞株に ROS を産生させ、塩基除去修復能や抗酸化能が落ちるために、細胞毒性および遺伝毒性を引き起こすと考えられた。MNP 自体は既に生物・医学領域に広く応用展開されている。MNP 自体の毒性評価に関して、発表論文も少なく、比較的安全と考えられていたが、現在、毒性に関する論文が集積し始めている。MNP 自体は、いわゆる Fenton 反応（H₂O₂+Fe²⁺→Fe³⁺+HO⁻+HO*）を介して、ROS を産生すると考えられ

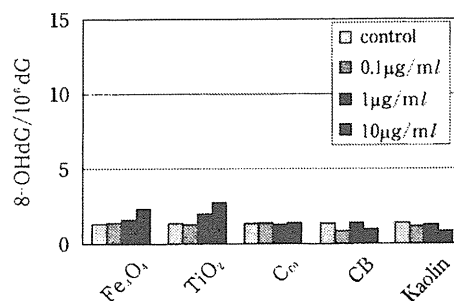


Fig. 5 8-OHdG levels in DNA from A549 cells

ている。必ずしも Fenton 反応のみではないが、ROS が産生され、酸化ストレスを生じ毒性を引き起こすと考えられている¹⁶⁾。酸化ストレスの癌細胞への影響は複雑である。多段階発癌の過程で、酸化ストレスは発癌にかかわり、発癌後も癌細胞を悪性度の増す方向へ誘導する¹⁹⁾。しかし、高度な酸化ストレスでは、逆に癌細胞は死滅し、癌治療にも利用されている。MNP を標的癌細胞に送り込むことにより、癌治療に相乗あるいは相加効果を与える可能性がある。われわれグループは前立腺癌を標的としているが、既に K562/A02 白血病細胞を標的にした治療法の報告がされている¹⁹⁾。

5. 結 言

現在まで、ナノ粒子の毒性評価のために、多くの

in vitro 試験の論文が出ているが、細胞株のみならず、培養液、あるいは assay 系への影響等と基本的な部分で注意しなければならないことが多い。細胞生物学的な機構の解明も視野にいて、注意深く細胞毒性および遺伝毒性の解析を行ってゆきたい。

[謝辞] 本研究は、平22年度厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業「ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究」およびグローバル COE プログラム「情報通信による医工融合イノベーション創生」からの研究助成を受けたことを記す。本内容は第46回夏期シンポジウムにて、発表した内容をもとに、解説に書き直したものである。

References

- 1) Yoshioka, Y., T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: "Nano-Safety Science for Assuring the Safety of Nanomaterials", *Japan. J. Hyg.*, **65**, 487-492 (2010)
- 2) Nakanishi, J.: "Nano-ryushinoanzensei: Nanozairyō 3busshitsu no Risukuhyōka", *Chem. Eng. Japan*, **74**, 647-649 (2010)
- 3) Morimoto, Y. and I. Tanaka: "Nanoryūshi no Yuugaisei-hyōka", *Sanneishi*, **50**, 37-48 (2008)
- 4) Boverhof, D. R. and R. M. David: "Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation", *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**, 953-961 (2010)
- 5) Hillaireau, H. and P. Couvreur: "Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery", *Cell Mol. Life Sci.*, **66**, 2873-2896 (2009)
- 6) Kroll, A., M. H. Pillukat, D. Hahn and J. Schnekenburger: "Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **72**, 370-377 (2009)
- 7) Singh, N., B. Manshian, G. J. Jenkins, S. M. Griffiths, P. M. Williams, T. G. Maffei, C. J. Wright and S. H. Doak: "Nano Genotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials", *Biomaterials*, **30**, 3891-3914 (2009)
- 8) Ng, C. T., J. J. Li, B. H. Bay and L. Y. Yung: "Current studies into the genotoxic effects of nanomaterials", *J. Nucleic Acids*, pii, 947859 (2010)
- 9) Zuan, W. and Y. Ogawa: "Comet assay: Idendokusei wo Kenshutsusurutamenō Kyōryōkuna Kaiseikihō", *Rōdōuanzenkenkyū*, **3**, 79-82 (2010)
- 10) Kawai, K. and H. Kasai: "Formation of 8-OH-dG by oxidative stress and response of repair enzyme", *Environ. Mutagen Res.*, **26**, 143-148 (2004)
- 11) Totsuka, Y., T. Higuchi, T. Imai, A. Nishikawa, T. Nohmi, T. Kato, S. Masuda, N. Kinai, K. Hiyoshi, S. Ogo, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, N. Fukumori, M. Watanabe, T. Sugimura and K. Wakabayashi: "Genotoxicity of nano/microparticles *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems", *Part. Fibre Toxicol.*, **6**, 23 (2009)
- 12) Bostwick, D. G., E. E. Alexander, R. Singh, A. Shan, J. Qian, R. M. Santella, L. W. Oberley, T. Yan, W. Zhong, X. Jiang and T. D. Oberley: "Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer", *Cancer*, **89**, 123-134 (2000)
- 13) Trzeciak, A. R., S. G. Nyaga, P. Jaruga, A. Lohani, M. Dizdaroglu and M. K. Evans: "Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145", *Carcinogenesis*, **25**, 1359-1370 (2004)
- 14) Shubayev, V. I., T. R. Pisanic II and S. Jin: "Magnetic nanoparticles for theragnostics", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 467-477 (2009)
- 15) Klaunig, J. E., L. M. Kamendulis and B. A. Hocevar: "Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis", *Toxicol Pathol.*, **38**, 96-109 (2010)
- 16) Cheng, J., W. Wu, B. A. Chen, F. Gao, W. Xu, C. Gao, J. Ding, Y. Sun, H. Song, W. Bao, X. Sun, C. Xu, W. Chen, N. Chen, L. Liu, G. Xia, X. Li and X. Wang: "Effect of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ and 5-bromotetrandrine on reversal of multidrug resistance in K562/A02 leukemic cells", *Int. J. Nanomedicine*, **4**, 209-216 (2009)

2. 前立腺癌化学療法における磁性体ナノ粒子の併用効果の基礎的研究 (総説)

一町 直樹*¹ 佐藤 明子*² 栗岡 大輔*¹ 米田 操*³
 広川 佳史*³ 白石 泰三*³ 渡邊 昌俊*⁴

* 1 横浜国立大学大学院工学府機能発現工学専攻物質とエネルギーの創生工学

* 2 横浜国立大学工学部物質工学科バイオコース

* 3 三重大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

* 4 横浜国立大学大学院工学研究院医工学

要旨：ナノテクノロジーは21世紀の最重要な技術の一つである。医療分野への展開が始まり、Nanomedicineとして認知されている。癌の分野では診断、治療、腫瘍マーカーの検出等に應用されている。その中で、磁性体ナノ粒子の特性を利用した癌治療がある。自験データより、ナノ粒子のReactive oxygen specimens (ROS) 産生を基盤とした前立腺癌治療の可能性があると考えられた。

key words 前立腺癌, ナノ粒子, 活性酸素種

I ナノオンコロジーの進歩

ナノテクノロジーは、ナノスケール (10^{-9} m) の超微小領域で物質を取り扱う技術であり、素材、

Basic study on effects of combination therapy using magnetic nanoparticles and chemotherapy drugs on prostate cancer cells : Review

Naoki Itcho*¹, Akiko Sato*², Daisuke Kurioka*¹, Misao Yoneda*³, Yoshifumi Hirokawa*³, Taizo Shiraiishi*³ and Masatoshi Watanabe*¹

Division of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan*¹; Division of Materials Science and Chemical Engineering, School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan*²; Pathologic Oncology, Division of Molecular and Experimental Medicine, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Japan*³; Medical Engineering, Division of Materials Science and Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan*¹

key words : Prostate cancer, Nanoparticles, Reactive oxygen species (ROS)

*1 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5 (045-339-3997)
〒240-8501

バイオ、医療等の産業に関わる。2000年1月に米国クリントン大統領の教書「国家ナノテクノロジー優先施策」が示され、2004年にNIHにおいては応用分野の一つとして「Cancer Nanotechnology Plan」が始まった事からも、21世紀の最重要な技術の一つであることは理解できる。一般にナノテクノロジーを医療に應用するものをナノメディシンと呼ぶ。この分野では、ナノスケールの粒子やデバイスを用いた新しい診断・治療法が研究され、一部実用化されている。ナノメディシンの中で、癌に関わる分野が「Cancer Nanotechnology」あるいは「Nanooncology」である。すでに金ナノ粒子や quantum dots 等の使用による癌診断、ナノセンサー使用による癌バイオマーカーの発見、Drug Delivery System、バイオイメージング等のように診断、治療あるいは「theragnostics」に應用されている^{1, 2)}。

II ナノ粒子メディシン

ナノ粒子メディシンは、ナノテクノロジーの中

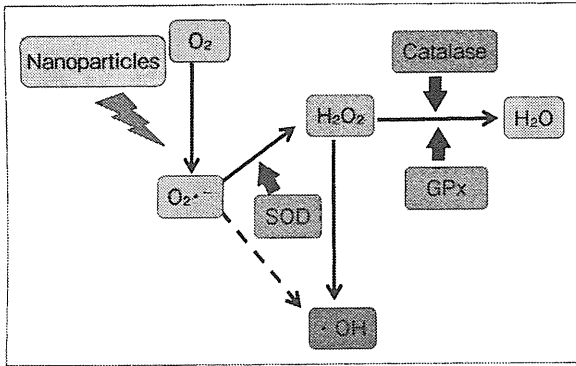


図1 Reactive oxygen species (ROS) metabolism and the antioxidant defense system

で重要な技術・素材であるナノ粒子と医療をあわせた造語である³⁾。ナノ粒子はバルクと異なり、活性度と反応性が飛躍的に高まり、その特性が電磁氣的、光学的、機械的性質などが大きく変わる事が知られている。

III ROS を利用した治療法とナノ粒子

Reactive oxygen species (以下、ROS) は second messenger として正常な細胞で重要な役割を果たしている。癌細胞では、ROS は増加し、oncogenic に働いている。逆に、ROS 産生は化学療法等の癌細胞を殺す重要な機構でもある。ROS 産生に関わる治療法として、Anti-oxidant therapy と Pro-oxidant therapy の2つが提唱されている⁴⁾。Anti-oxidant therapy には、食事等の anti-oxidants の摂取、ROS scavenging enzyme の増強等がある。Pro-oxidant therapy には、腫瘍細胞内での直接 ROS 産生、antioxidative enzyme 系を阻害する等がある。特に、抗癌剤と ROS 産生物質を組み合わせる治療法は“ROS+ROS concept”として提唱されている。

Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone) が DU145 に対する doxorubicin の効果を増強させる事を報告がされている⁵⁾。

磁性体ナノ粒子 (Fe₂O₃, Fe₃O₄) は、Fenton 反応 (H₂O₂ + Fe²⁺ → Fe³⁺ + HO⁻ + HO*) 等により ROS が誘導される事が報告されている (図1)。従来、磁性体ナノ粒子は比較的安全と考えられているが、それらの細胞毒性に関する論文が集積してきている。磁性体ナノ粒子 (Fe₃O₄) と daunorubicin や adrimycin 等の抗癌剤の組み合わせで、K562 白血病細胞株に対する効果が報告されてい

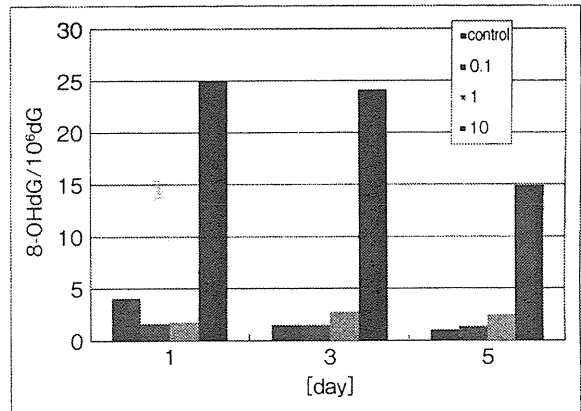


図2 8-OHdG levels in DNA from LNCaP cells

る。その効果は抗癌剤の細胞内集積増加や P-glycoprotein の発現抑制等によると推察されている^{6, 7)}。

IV ナノ粒子を利用した前立腺癌治療法

疫学、実験、臨床研究より、酸化ストレスは前立腺癌の発生・進展に関与すると報告されている。また、PC-3 および DU-145 において base excision repair の欠如および antioxidant enzymes の発現の変化が報告されている⁸⁾。われわれの実験結果からも、磁性体ナノ粒子の曝露で、他の細胞株に比較して、前立腺癌細胞株において 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 量の増大を認め、ROS により誘導された DNA 損傷と考えられた (図2)。その後、磁性体ナノ粒子量に依存的に ROS の産生の増加が認められた⁹⁾。したがって、この磁性体ナノ粒子を前立腺癌細胞に導入する事により、ROS を過剰に増生させることが出来、抗がん剤との併用で、作用の増強あるいは抗癌剤を減量させて使用できる可能性が考えられた。また、この磁性体ナノ粒子を特異的に前立腺癌細胞に取り込ませ、温熱療法を組み入れる事も出来る。

文 献

- Misra R, et al: Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. Drug Discov Today 15: 842-850, 2010
- Jain KK: Advances in the field of nanooncology. BMC Med 8: 83, 2010
- 渡邊昌俊: ナノ粒子メディスン はじめに、医学のあゆみ 230: 493, 2009
- Wang J and Yi J: Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. Cancer

Biol Ther 7: 1875-1884, 2008

- 5) Huang XZ, et al : Emodin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in prostate cancer cells : the mechanisms involve ROS-mediated suppression of multidrug resistance and hypoxia inducible factor-1. Cancer Biol Ther 7: 468-475, 2008
- 6) Chen B, et al : Reversal in multidrug resistance by magnetic nanoparticle of Fe₃O₄ loaded with adriamycin and tetrandrine in K562/A02 leukemic cells. Int J Nanomedicine 3: 277-286, 2008

- 7) Chen B, et al : Magnetic nanoparticle of Fe₃O₄ and 5-bromotetrandrin interact synergistically to induce apoptosis by daunorubicin in leukemia cells. Int J Nanomedicine 4: 65-71, 2009
- 8) Trzeciak AR, et al : Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. Carcinogenesis 25: 1359-1370, 2004
- 9) 一町直樹, 他 : 各種ナノ粒子の細胞への影響 : 細胞特異性とその応用. 粉体工学会誌 48: 25-31, 2011

