

図10. メチレンブルーの近紫外-可視光吸収スペクトル (Nanosheetは{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子 (F : Ti = 1) 。 P25とST01は市販の光触媒用二酸化チタンナノ粒子)

合成した {001} 面を有するサイズの異なる二酸化チタンナノ粒子とP25及びST01ナノ粒子によるメチレンブルーの分解反応速度を図11にまとめた。合成した二酸化チタンナノ粒子は、

サイズが小さい程、反応速度が速いことが明らかとなった。また、殆どの {001} 面を持つ二酸化チタンナノ粒子は、市販品のP25及びST01より高性能であることが分かった。なお、P25とST01は市販の二酸化チタンナノ粒子の中でも、特に性能の良いものであり、サイズはP25は25 nm、ST01は数nmと、どちらも極めて小さい。しかしながら、その性能はサイズが120nmの {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子のものより低く、そのため、{001} 面は非常に高い触媒活性を有すると考えられる。

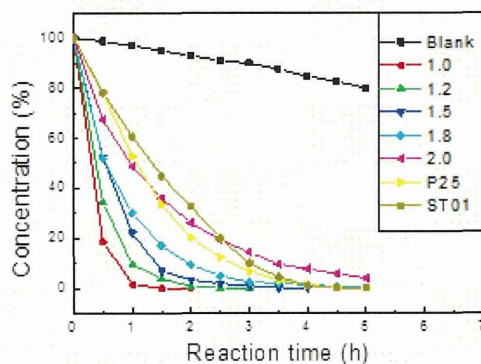


図11. 種々の二酸化チタンナノ粒子によるメチレンブルーの光分解

D. 考察

1. {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子の合成

フッ素が二酸化チタンの {001} 面に優先的に吸着するため {001} 面が保持できるとも考えている。そこで、フッ素の {001} 面への吸着量を検討した。

フッ素の吸着量は二つの方法で測定した。一つはEDS定量分析法で、もう一つは熱重量分析法 (TG-DTA) を用いた。図12に合成した二酸化チタンナノ粒子のTG-DTA結果を示す。二つの重量損失が確認できる。100℃前後の重量損失は表面に吸着した水分に由来するもの、また、200℃から700℃までの損失はフッ素に由来するものと考えられる。

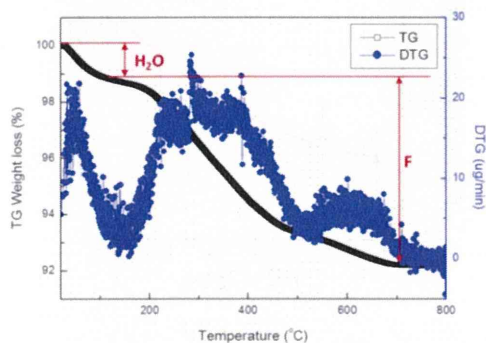


図12. 合成した二酸化チタンナノ粒子のTG-DTA曲線

これら二つ方法で測定したフッ素の吸着量を図13にまとめた。フッ素の吸着量は約5-10wt%であることが分かった。また、TG-DTA法を用いた場合、フッ素の吸着量はF/Tiの増大に伴い減少する傾向を示した。一方、EDSを

用いた場合、フッ素の吸着量はばらついた。そのためフッ素吸着量の定量分析にはTG-DTA法が適していると考えられる。

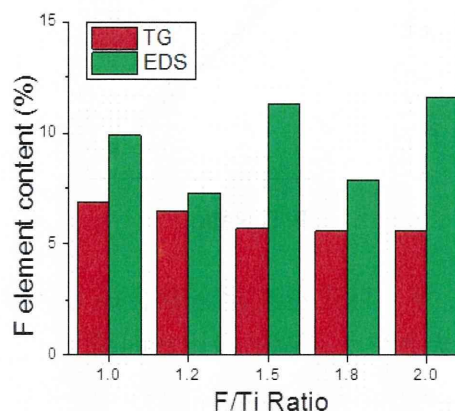


図13. F : Ti比を変化させ合成した二酸化チタンナノ粒子のフッ素吸着量

2. {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子のサイズ制御

比表面積が大きくなると、反応サイトが多くなり触媒性能は一般的に向上する。そこで、合成した二酸化チタンナノ粒子の比表面積を測定した。測定はBET法により行った。結果を図14に示す。F : Ti比が1の時、粒子サイズは約20nmであり、その比表面積は約120 m²/gであった。F : Ti比の増大に伴い、粒子サイズが大きくなり、比表面積も大きくなった。

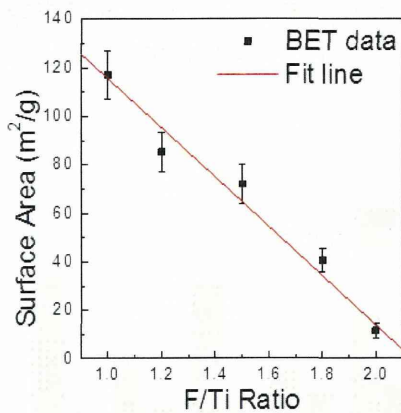


図14. F : Ti比を変化させ合成した二酸化チタンナノ粒子の比表面積

一般的に、{001}面は{101}面より表面エネルギーが高く、また、反応活性も高い。そのため、触媒性能への影響を考えると、{001}面の割合は非常に重要なパラメータである。そこで、ナノ粒子の全表面積に対して{001}面の占める割合を試算した。試算方法は、図15に示すように、高分解能TEMで一つ一つの粒子を観察しながら、粒子の各辺の長さを測定して面積を算出した。F : Ti比を変化させ水熱反応で合成した二酸化チタンナノ粒子の{001}の割合を図16にまとめた。粒子サイズの増大に伴い、{001}面の割合も増加することが分かった。20nmの粒子(F : Ti=1)は{001}の面積割合は約52%であり、また、550nmの場合(F : Ti=2)は76%であった。

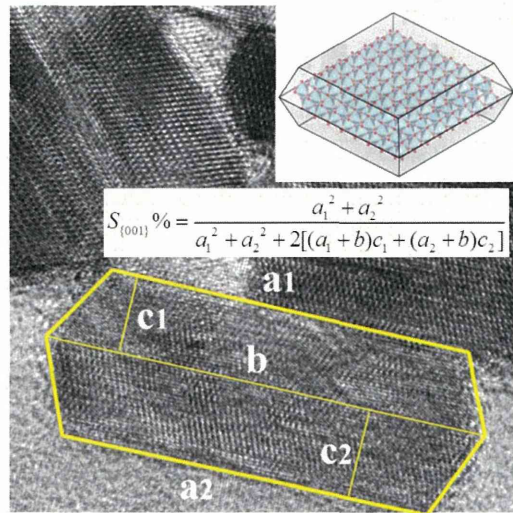


図15. ナノ粒子の高分解能TEM写真と面積の試算方法

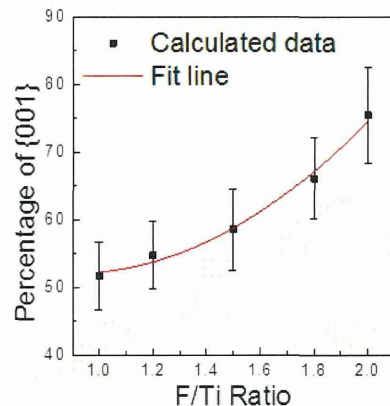


図16. F : Ti比を変化させ合成した二酸化チタンナノ粒子の{001}面の割合

3. {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子の触媒活性の評価

光照射で励起された電子と空孔は、通常は直ちに再結合し熱に変わり光反応の効率を下げってしまう。但し、空孔は {001} 面に、電子は {101} 面に優先的に存在するため、結晶面の空間的効果により電子と空孔の分離を促進し、光反応の効率を向上でき、そのためには、二酸化チタンナノ粒子の結晶面制御が極めて重要である。

有機色素分子が二酸化チタンナノ粒子の表面に吸着しないと分解反応は進まない。二酸化チタン表面への色素分子の吸着は、Langmuir-Hinshelwood modelで理論的に理解されている。それによれば、色素分子の濃度が非常に薄い場合、反応の動力学速度は下記の式で表される：

$$\ln(C_0/C) = kKt = K_{app}t$$

ここで、 t は反応時間、 C_0 は初期濃度、 C は反応時間 t 時の濃度、 K_{app} は擬一次速度定数である。各反応時間の色素濃度を測定することで、 K_{app} が導かれる。一般的に、二酸化チタンの光触媒の反応活性は、この擬一次速度定数により評価できる。

F : Ti 比を変化させ合成した二酸化チタンナノ粒子のメチレンブルーの光分解反応に関する $\ln(C_0/C)$ の経時変化を図 17 に示す。各直線の斜率は擬一次速度定数 K_{app} である。この図 17 より、{001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子は、市販の P25 と ST01 の触媒性能を凌駕することが再確認できた。

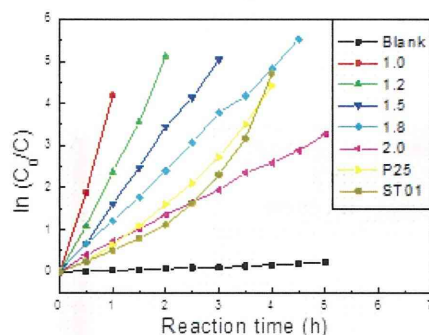


図 17. 種々の二酸化チタンナノ粒子の $\ln(C_0/C)$ と t の関係

また、触媒活性は比表面積と深く関係がある。図 17 より得られた K_{app} は重量当たりの値である。そこで、表面積当たりの性能比較も検討した。図 18 に、種々の二酸化チタンナノ粒子の比表面積 SA、 K_{app} 、 K_{app}/SA をまとめた。ST01 は比表面積が圧倒的に大きいにも関わらず、重量当たり (K_{app}) と表面積当たり (K_{app}/SA) の性能はどちらも相対的に低いものとなった。重量当たりの触媒性能に関しては、20nm サイズの {001} 面を持つ二酸化チタンナノ粒子 (F : Ti=1) が最も優れた。一方、表面積当たりの性能に関しては、550nm サイズのもの (F : Ti=2) が最も優れた。その理由としては、{001} 面の割合は最も多いためと考えられる。

図 19 には、20nm サイズの {001} 面を持つ二酸化チタンナノ粒子と市販の ST01 に関して、4 種類の有機色素に対する分解反応の K_{app} と K_{app}/SA を示した。これからも、合成した {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子は

ST01 より性能が優れていることが確認できた。

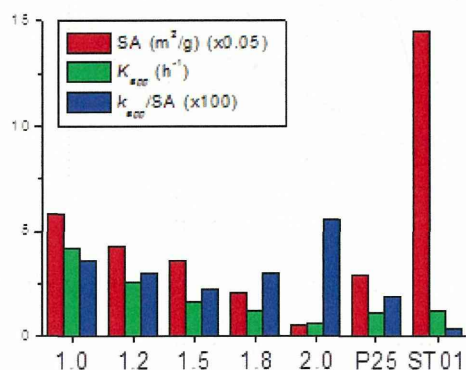


図 18. 種々の二酸化チタンナノ粒子の比表面積 SA、K_{app}、K_{app}/SA の比較

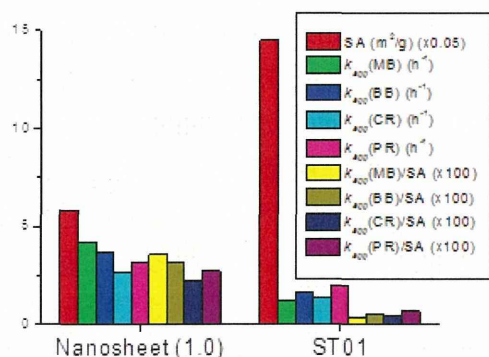


図 19. 4 種類の有機色素に対する分解性能 (Nanosheet は {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子 (F:Ti=1)。ST01 は市販の光触媒用二酸化チタンナノ粒子)

なお、応用の観点から触媒の安定性は非常に重要である。そこで本研究では、二酸化チタンの触媒安定性を検討した。安定性は一つのサンプルに関して繰り返し実験を 5 回行った。図 20 に示すように、サイズが 100nm 以下の

場合、合成したナノ粒子 (F:Ti=1.0, 1.2, 1.5) 及び市販のナノ粒子に関して、どちらも共に色素分解の半減期がほぼ一定に維持し、触媒としての高い安定性が確認できた。一方、サイズが 100nm 以上の二酸化チタン (F:Ti=1.8, 2.0) の場合、半減期が繰り返しサイクルが増加するに伴い長くなる傾向が明らかに見られた。

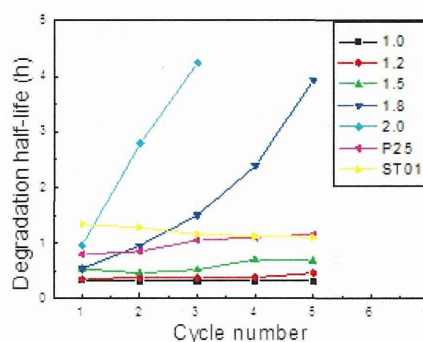


図 20. メチレンブルー分解に対する種々の二酸化チタンナノ粒子の安定性

さらに、それぞれ四種有機色素に対して、サイズが 20nm の {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子の触媒安定性を図 21 に示している。全ての色素に対して非常に高い安定性が確認された。

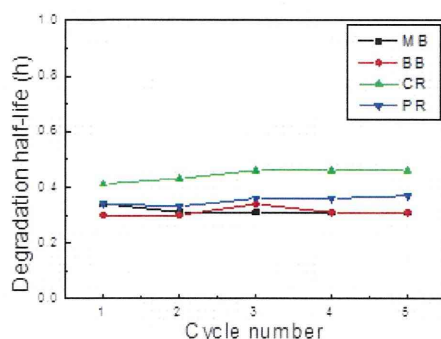


図 21. 4 種類の有機色素に対する {001} 面を持つチタニアナノ粒子 (サイズ = 20nm) の安定性

E. 結論

以上の研究結果と考察に基づいて、結論をまとめると以下の通りである。

1. 水熱反応プロセスを基盤とする二酸化チタンナノ粒子のサイズ・構造・結晶面制御に成功した。フッ素を含む有機物をキャッピング剤として水熱反応場に共存させた場合、{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子 (結晶構造はアナターゼ) の合成に成功した。また、フッ素とチタン原料の割合を変化させることで、20nmからサブミクロンまでのオーダーで、二酸化チタンナノ粒子のサイズ制御にも成功した。

2. 合成した {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子の有機色素に対する光分解の触媒性能を検討した。その結果、{001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子は市販のナノ粒子よりも優れた触媒性能を持つことを明らかにした。特に20nmサイズのものに関しては、世界最高の触媒性能が確認で

きた。そのため、二酸化チタンナノ粒子のサイズ・構造・結晶面制御により、放射線照射による過酸化チタンナノ粒子からのラジカル発生量の飛躍的な向上が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) J. Han, S. Ohara, K. Sato, H. Xu, Z. Tan, Y. Morisada, K. Kuruma, M. Naito, P. Shan, and M. Umetsu, “Directed Assembly of Metal Oxide Nanoparticles by DNA”, *Mater. Lett.*, 79, p.78–80, (2012).

2. 学会発表

(1) Z. Tan, T. Tanaka, C. Ogino, A. Kondo, and S. Ohara, “Hydrothermal Synthesis of Anatase TiO_2 Nanoparticles with Highly Exposed (001) Facets”, IUPAC 8th International Conference on Novel Materials and Synthesis & 22nd International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers, Xi’ An, China, October 14–19, (2012).

(2) S. Ohara, “Tailor-Made Ceramic Nanocrystals by Organic-Ligand-Assisted Supercritical Hydrothermal Synthesis”, 2012 Dasan Conference: Fluorine Chemistry to Environment and Health Aspects, Changwon, South Korea, November 14–16, (2012), [Invited lecture].

(3) Z. Tan, T. Tanaka, C. Ogino, A. Kondo, and S. Ohara, “Synthesis and Characterization of TiO₂ Nanoparticles with a large percentage of reactive (001) surface”, 2012 MRS Fall Meeting, Boston, USA, November 25-30, (2012).

(4) 大原智, “特異構造無機ナノクリスタルの合成とプロセス”, 科学技術交流財団研究会第3回「ナノ物質の高度集積化技術による新規機能性微粒子と革新的複合材料の創製」, 12月7日, (2012), 豊橋市, [招待講演].

(5) S. Ohara, Z. Tan, M. Umetsu, and T. Adschiri, “Fabrication of Pd-DNA and Pd-CNT Hybrid Nanostructures for Hydrogen Sensors”, 2012 Second International Conference on Small Science, Orlando, USA, December 16-19, (2012), [Invited lecture].

(6) 大原智, 山本和広, 裘南, 譚振権, 橋新剛, “特異構造無機ナノクリスタルの合成とプロセス”, 日本セラミックス協会第51回基礎科学討論会, 1月9-10日, (2013), 仙台市, [招待講演].

(7) S. Ohara, “Tailor-Made Ceramic Nanocrystals by Organic-Ligand-Assisted

Hydrothermal Synthesis”, The 3rd International Solvothermal & Hydrothermal Association Conference, Austin, USA, January 13-17, (2013), [Invited lecture].

(8) S. Ohara, Z. Tan, K. Yamamoto, N. Qiu, and T. Hashishin, “Tailor-Made Ceramic Nanocrystals by Organic-Ligand-Assisted Hydrothermal Synthesis”, The 20th Annual Meeting of Institute of Applied Plasma Science and The 6th International Workshop on Plasma Application & Hybrid Functionally Materials, Kuala Lumpur, Malaysia, March 8-11, (2013).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し。

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

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 特命教授

研究分担者 佐藤 和好 群馬大学大学院工学研究科 助教

研究分担者 沼子 千弥 徳島大学総合科学部 准教授

研究分担者 高見 誠一 東北大学多元物質科学研究所 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。なお、以下本分担研究の動物実験および細胞実験で使用したナ

ノ粒子は全てPAA修飾を施したTiO_xナノ粒子である。

B. 研究方法

1. 動物実験

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 μl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。

さらにマウスの腫瘍組織の病理学的評価を行うため、同様にMIAPaCa2細胞株を移植した別のマウス群に対して、1.5wt%のPAA修飾TiO_xナノ粒子150 μlを腫瘍局注し、その後X線10Gyを腫瘍に照射した。照射後24時間で腫瘍を切除し、ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色、TUNELアッセイを行った。

2. 細胞実験

TiO_xナノ粒子の作用により生成されるラジカル種の特等、動物実験において評価が困難であった項目に関して、in vitroでの評価を行った。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℃、5%CO₂条件下で培養した。

最初にTiO_xナノ粒子とX線の併用による殺細胞効果を評価した。24ウェルプレート上にMIAPaCa2を播種し、1.5wt%のTiO_xナノ粒子を100 μl加え、X線を照射した。照射後、遠心分離機により上清を除去し、5mlの培地で置換した。ディッシュ上に必要な細胞数を播種し、37℃、5%CO₂条件下で14日間インキュベートし、その後コロニーアッセイ法により細胞の生存数を評価した。また、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いてTiO_xナノ粒子の作用させた状態での顕微鏡的観察を行った。

次にTiO_xナノ粒子の作用により生成されるラジカル種の評価を用いて行った。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℃、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 μl加え、1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。

次にTiO_xナノ粒子の作用により生成されるラジカル種の評価を用いて行った。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℃、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 μl加え、1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. 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

1. 動物実験による抗腫瘍効果

担がんマウスモデルを用いてTiO_x粒子とX線の併用による抗腫瘍効果を評価した。図1は、X線照射後からの腫瘍体積の変化を示す。TiO_xナノ粒子とX線併用群は、X線照射のみ群と比べて

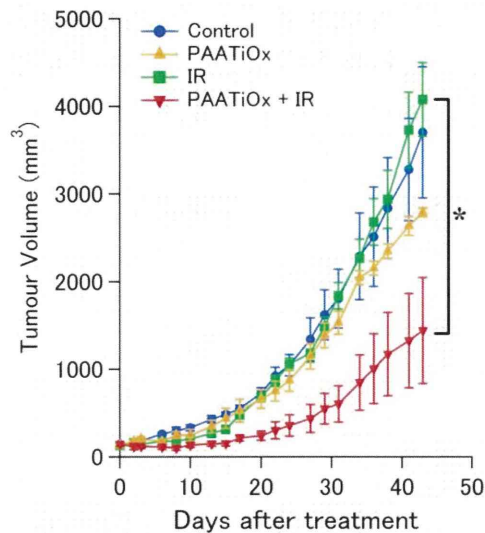


図1 動物実験によるTiO_xナノ粒子の抗腫瘍効果(腫瘍体積の変化)、* $p < 0.05$, IR=irradiation

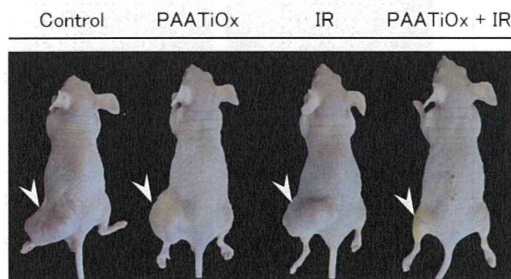


図2 動物実験によるTiO_xナノ粒子の抗腫瘍効果、処置後43日目における腫瘍サイズの比較(矢印)

有意な差がみられた。全観察期間は43

日間であり、処置中および観察期間中に死亡したマウスはいなかった。このことは、TiO_xナノ粒子に毒性がないことを示唆する。図2は照射後43日目の各群マウスの腫瘍の様子を示す。

次にコントロール群とTiO_xナノ粒子局注群において、腫瘍組織のHE染色像を比較した結果を図3に示す。TiO_x

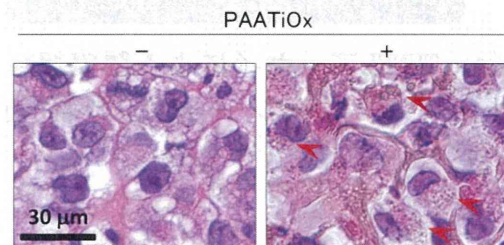


図3 腫瘍組織のHE染色像、左がコントロール群、右がPAA修飾TiO_xナノ粒子局注群。局注群において細胞内にナノ粒子が認められる(赤矢印)

ナノ粒子群では細胞内までナノ粒子が一樣に分布している様子が観察できる。

続いてTiO_x粒子とX線の併用によるアポトーシスの評価を行った。図4にTUNELアッセイの染色像、図5にTUNEL陽性の細胞をカウントした結果を示す。腫瘍体積の結果と同様に、この結果においても、TiO_xナノ粒子・X線の併用群ではX線照射単独群と比べて有意なアポトーシス細胞の増大がみられ、TiO_xナノ粒子の作用が抗腫瘍効果に寄与していることが示された。

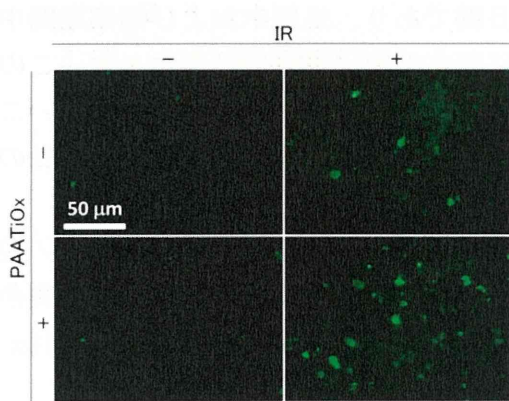


図4 TUNELアッセイによる腫瘍組織内のアポトーシス細胞の評価

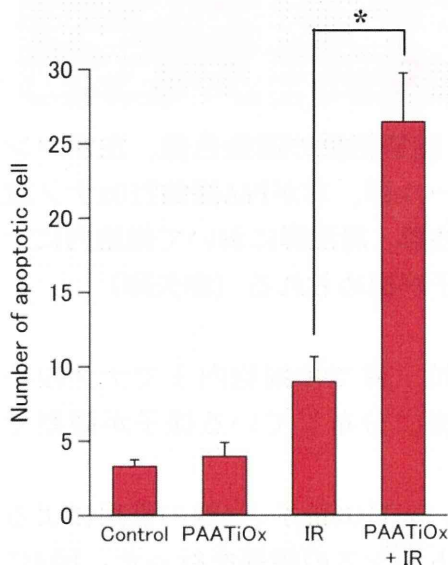


図5 TUNELアッセイによる腫瘍組織内のアポトーシス細胞の評価、TiOxナノ粒子・X線併用群でアポトーシス細胞の増大を認めた (* $p < 0.05$)

2. 細胞内でのラジカル生成評価

まずIn vitroにおけるTiOxナノ粒子とX線照射の併用による殺細胞効果を評価した。図6にコロニーアッセイの結果を示す。TiOxナノ粒子併用により細胞の生存率に差を認め、動物実験と同様にIn vitroにおいてもTiOxナノ粒

子とX線の併用による殺細胞効果が示された。

また、図7はIn vitroでTiOxナノ粒子を作用させた細胞のTEMイメージである。図3で示した結果と同様、TiOxナノ粒子が細胞内に十分に取り込まれていることが観察された。

In vitroにおいてTiOxナノ粒子の作用により生成するラジカル種の評価を行った結果を図8に示す。この結果から、TiOxナノ粒子とX線の併用によ

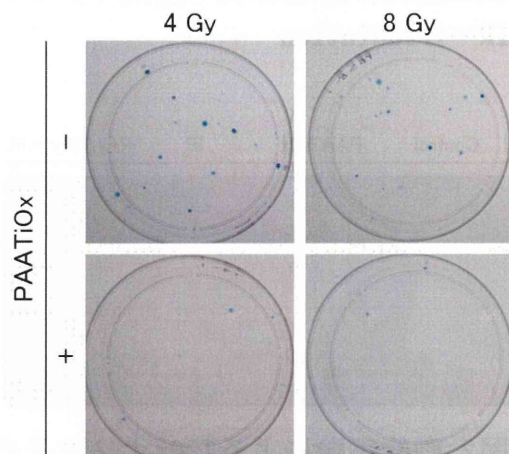
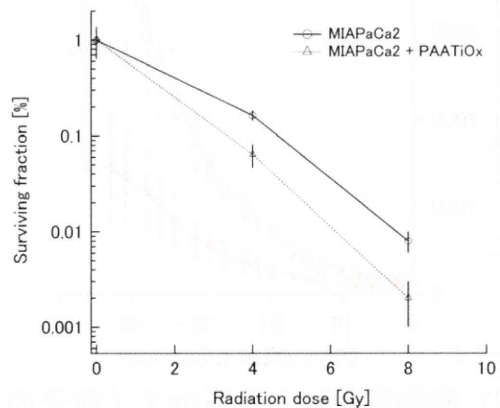


図6 In vitroにおけるTiOxナノ粒子とX線照射の併用による殺細胞効果、(上)細胞生存曲線、(下)コロニーの様子

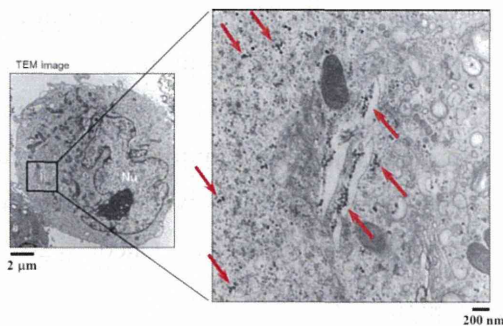


図7 細胞内のTiO_xナノ粒子、細胞内にナノ粒子が認められる（赤矢印）

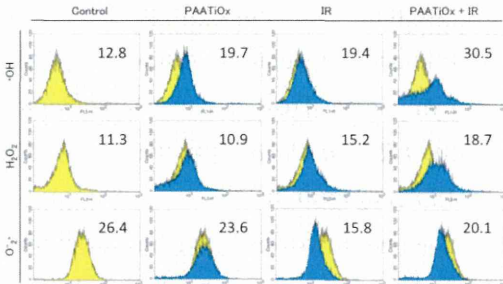


図8 TiO_xナノ粒子とX線照射の併用により生成するラジカル種の評価、図中の数値は分布の平均値を示す。

り細胞内でOHラジカルおよびH₂O₂が増強することが示された。H₂O₂に関しては、前年度の報告書で示したTiO_xナノ粒子のH₂O₂類似性との関連性が示唆される。

D. 考察

動物実験および細胞実験から腫瘍に投与されたTiO_xナノ粒子は細胞内に取り込まれ、X線照射により抗腫瘍効果を得るだけの十分なOHラジカルやH₂O₂を生成すると考えられる。また、本研究の動物実験においてTiO_xナノ

粒子の投与が原因で死亡したマウスはおらず、このことはTiO_xナノ粒子の急性的な毒性がないことを示唆する。

今後長期の長期的かつ厳密な毒性評価試験、投与方法の検討、そしてMIAPaCa2とは異なる複数の膵臓がん細胞株での抗腫瘍効果の検討などのさらなる実験が必要であるが、この併用療法が新しい治療法になり得る可能性があると考えられる。

E. 結論

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。TiO_xナノ粒子はX線照射により、抗腫瘍効果を得るだけの十分なラジカルを生成することを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Iwata H, Demizu Y, Fujii O, Terashima K, Mima M, Niwa Y, Hashimoto N, Akagi T, **Sasaki R**, Hishikawa Y, Abe M, Shibamoto Y, Murakami M, Fuwa N. Long-Term Outcome of Proton Therapy and Carbon-Ion Therapy for Large (T2a-T2bN0M0) Non-Small-Cell Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2013 Mar 1. [Epub ahead of print]
- Akasaka H, **Sasaki R**, Yoshida K, Takayama I, Yamaguchi T, Yoshida H, Mizushima Y. Monogalactosyl diacylglycerol, a replicative DNA polymerase inhibitor, from spinach enhances the anti-cell proliferation effect

- of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Nov 19. doi:pii: S0304-4165(12)00315-7. 1
3. Nishimura H, **Sasaki R.** Yoshida K, Miyawaki D, Okamoto Y, Kiyota N, Saito M, Otsuki N, Nibu KI. Radiotherapy for Stage I or II hypopharyngeal carcinoma. *J Radiat Res*. 2012 Nov 1;53(6):892-9
 4. Tamaki Y, **Sasaki R.** Ejima Y, Ogura M, Negoro Y, Nakajima T, Murakami M, Kaji Y, Sugimura K. Efficacy of intraoperative radiotherapy targeted to the abdominal lymph node area in patients with esophageal carcinoma. *J Radiat Res*. 2012 Nov 1;53(6):882-91
 5. Uehara K, Sasayama T, Miyawaki D, Nishimura H, Yoshida K, Okamoto Y, Mukumoto N, Akasaka H, Nishihara M, Fujii O, Soejima T, Sugimura K, Kohmura E, **Sasaki R.** Patterns of failure after multimodal treatments for high-grade glioma: effectiveness of MIB-1 labeling index. *Radiat Oncol*. 2012 Jun 26;7:104.
 6. Ishihara T, Yoden E, Konishi K, Nagase N, Yoshida K, Kurebayashi J, Sonoo H, Murashima N, **Sasaki R.** Hiratsuka J. Long-term outcome of hypofractionated radiotherapy to the whole breast of Japanese women after breast-conserving surgery. *Breast Cancer*. 2012 Feb 22. [Epub ahead of print]
 7. Terashima K, Demizu Y, Hashimoto N, Jin D, Mima M, Fujii O, Niwa Y, Takatori K, Kitajima N, Sirakawa S, Yonson K, Hishikawa Y, Abe M, **Sasaki R.** Sugimura K, Murakami M. A phase I/II study of gemcitabine-concurrent proton radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer without distant metastasis. *Radiother Oncol*. 2012 Apr;103(1):25-31.
 8. Hashimoto N, **Sasaki R.** Nishimura H, Yoshida K, Miyawaki D, Nakayama M, Uehara K, Okamoto Y, Ejima Y, Azumi A, Matsui T, Sugimura K. Long-term Outcome and Patterns of Failure in Primary Ocular Adnexal MALT Lymphoma Treated with Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012 Mar 15;82(4):1509-14
 9. Soejima T, Yoden E, Nishimura Y, Ono S, Yoshida A, Fukuda H, Fukuhara N, **Sasaki R.** Tsujino K, Norihisa Y. Radiation therapy in patients with implanted cardiac pacemakers and implantable cardioverter defibrillators: a prospective survey in Japan. *J Radiat Res*. 2011;52(4):516-21.
 10. Komatsu S, Fukumoto T, Demizu Y, Miyawaki D, Terashima K, Niwa Y, Mima M, Fujii O, **Sasaki R.** Yamada I, Hori Y, Hishikawa Y, Abe M, Ku Y, Murakami M. The effectiveness of particle radiotherapy for hepatocellular carcinoma associated with inferior vena cava tumor thrombus. *J Gastroenterol*. 2011 Jul;46(7):913-20.
 11. Komatsu S, Fukumoto T, Demizu Y, Miyawaki D, Terashima K, **Sasaki R.**

- Hori Y, Hishikawa Y, Ku Y, Murakami M. Clinical results and risk factors of proton and carbon ion therapy for hepatocellular carcinoma, *Cancer* 2011 Nov 1;117(21):4890-904.
12. **Sasaki R**, Yasuda K, Abe E, Uchida N, Kawashima M, Uno T, Fujiwara M, Shioyama Y, Kagami Y, Shibamoto Y, Nakata K, Takada Y, Kawabe T, Uehara K, Nibu K, Yamada S. Multi-institutional Analysis of Solitary Extramedullary Plasmacytoma of the Head and Neck Treated with Curative Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012 Feb 1;82(2):626-34.
- 2. 学会発表**
1. M. Nakayama, R. Sasaki, C. Ogino, T. Tanaka, M. Umetsu, S. Ohara, Z. Tan, K. Sato, C. Numako, A. Kondo. Novel Radiosensitization through Reactive Oxygen Species Generation using Titanium Peroxide Nanoparticle Compounds against Pancreas Cancer. ASTRO's 54th Annual Meeting, October 2012, Boston
2. M. Nakayama, R. Sasaki, C. Ogino, T. Tanaka, M. Umetsu, S. Ohara, Z. Tan, K. Sato, C. Numako, A. Kondo. Evaluation of Newly Developed Nanoparticles on Radiosensitization Effect in Pancreas Cancer Tumor Models. The 6th Japan-US Cancer Therapy International Joint Symposium, July 2012, Hiroshima
3. 中山雅央、佐々木良平、西村英輝、吉田賢史、宮脇大輔、赤坂浩亮、椋本成俊、田中勉、荻野千秋、近藤昭彦、「過酸化チタンナノ粒子を用いたヒト膵癌細胞に対する放射線増感の検討」、第25回日本放射線腫瘍学術大会、2012年11月、東京
4. 中山雅央、佐々木良平、西村英輝、吉田賢史、宮脇大輔、赤坂浩亮、椋本成俊、村岡 修、原田 文、ノル シャズリナ、上原和之、田中勉、荻野千秋、近藤昭彦、「過酸化チタンナノ粒子による放射線増感の検討」、第301回日本医学放射線学会関西地方会、2012年7月、大阪
- G. 知的所有権の取得状況**
- 1. 特許取得**
該当なし
- 2. 実用新案登録**
該当なし
- 3. その他**
該当なし

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）研究年度終了報告書

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

研究分担者 梅津 光央 東北大学大学院工学研究科 准教授
曾我 公平 東京理科大学基礎工学部 教授

A. 研究目的

抗体分子は分子量15万を超える巨大分子であるが、分子標的機能としては、可変領域断片と言われる分子量1～3万程度のドメインが役割を担っている。それらだけを独立して調製した抗体は低分子抗体と言われ、他のタンパク質との融合や積み木細工的分子デザインの単位ユニットとして用いることができる。また、完全長の抗体は、サイズが15 nmであり、10 nmを切るナノ材が提案されている現在では、ナノ材融合する分子としては、時には大きいことがある。本提案研究では、低分子抗体をバイオナノカプセルなどのナノ粒子を包容し生体内でデリバリーできるタンパク質カプセル表層に抗体の結合サイトを提示させるプロセスを開発する。

そこで本年度は、膵臓がんをはじめとする腫瘍がん組織細胞表面に過剰に発現している上皮増殖因子受容体(EGFR)に特異性を示す抗体分子を用いて低分子抗体を設計し、近赤外発光ナノ粒子を内包したリポソーム表層への提示し、がん細胞に対する特異性を評価した。

B. 研究方法

① 低分子抗体の調製

ヒト型化した抗EGFR抗体528(h528)の可変領域であるFv断片から一本鎖抗体scFvを作製した。一本鎖抗体は、重鎖(VH)のC末端にGGGSが三回繰り返したリンカーを介して軽鎖(VL)を融合し、さらにウェスタンブロットティングやフローサイトメトリーでの検出に使うC-mycタグとアフィニティー精製のためのポリヒスチジンタグ(HHHHHH)を融合した大腸菌発現ベクターを作製した。

scFvの調製は、まず、上記発現ベクターで大腸菌BL21(DE3)を形質転換することによって発現させた。そして、大腸菌をPBSに懸濁後超音波破碎を行い、目的蛋白質を含む上清液を得た。その後、上清液を金属イオンアフィニティーカラムとゲル濾過クロマトグラフィーによって精製することにより、目的scFvを調製した。

② マイクロカプセル化法によるNIR蛍光リポソームの調製

まず、リポソームの構成成分とするリン脂質(DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DSPE-PEG₂₀₀₀ (L- α -distearoyl-

phosphatidyl ethanolamine), DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS, コレステロール)に2000 DaのPEGを接合したリン脂質)を、濃度が30 μmol/mLとなるようにクロロホルムに溶解した。そして、その30 μmol/mLに調製したリン脂質/クロロホルム溶液中に希土類含有イットリアナノ粒子(RE-Y₂O₃)分散液を添加して超音波処理を行い、Water in Oilエマルジョンを形成させる。その後、大容量の水もしくは緩衝水溶液を強く攪拌した状態でエマルジョンを全て添加し、約30 min攪拌することでWater in Oil in Water型エマルジョンを形成させた後、攪拌を弱め、12 hr程度攪拌することでクロロホルムを揮発除去し、得られたリポソームを遠心分離操作で精製する。精製したリポソームは、動的光散乱法によって粒子径を評価した。

③ scFv修飾による標的特異性の付与
 マイクロカプセル化法により、NHS基がPEG末端に修飾されたNIR蛍光リポソームを作製した。得られたNIR蛍光リポソームとscFvを、NHS基と抗体中のNH₂基のmol比が10 : 1となるように20 mM HEPES バッファー (pH8.3, 150 mM NaCl) 中で混合し、12時間反応させることでscFv修飾NIR蛍光リポソームを作製した。得られたscFv修飾NIR蛍光リポソームを標的細胞であるA431細胞と非標的細胞であるJurkat細胞に添加し、それぞれの細胞についてNIR蛍光顕微鏡観察を行った。

④リポフェクションによる細胞内へ

のRE-Y₂O₃の導入

マイクロカプセル化法により、カチオン性NIR蛍光リポソームを作製した。得られたカチオン性NIR蛍光リポソームをHeLa細胞、Huh-7細胞に添加し、それぞれの細胞について経時的にNIR蛍光顕微鏡観察を行った。

C. 研究結果

①scFv修飾NIR蛍光リポソームの物性

様々なNHS基提示率でNIR蛍光リポソームに対してscFvを反応させた後の粒径変化を動的光散乱法で測定した(表1)。その結果、すべてのNIR蛍光リポソームにおいて、抗体分子を介してリポソーム同士が架橋してしま

表 1. scFv 修飾 NIR 蛍光イメージングの平均粒径

NHS (mol%)	Before (nm)	After (nm)
2.5	205 ± 90	215 ± 120
5.0	205 ± 70	200 ± 70
7.5	200 ± 90	200 ± 80
10	205 ± 65	210 ± 75

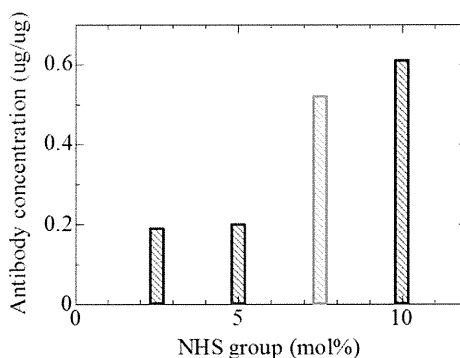


図 1. リポソーム表面の scFv 修飾量
 った結果測定される大幅な粒子径の増大は観測されなかった。

次に、リポソーム表面への抗体修飾量を評価したところ、NHS提示率が増加する程、scFvの修飾量も増加しており(図1)、NHS提示率を変化させることによって抗体の修飾量を変化させることが分かった。

②scFv修飾NIR蛍光リポソームの細胞特異性と近赤外イメージング

scFv修飾NIR蛍光リポソームの細胞特異性を評価するために、EGFR陽性A431細胞とEGFR陰性CTLL2細胞を対象として、フローサイトメトリーを用いてリポソームの結合評価を行った(図2)。その結果、すべてのscFv修飾NIR蛍光リポソームは、A431細胞にのみ結合し、さらにNHS提示率が高い(scFv修飾量が高い)ほど、その結合性を強いことが示された。

次に、赤外蛍光顕微鏡を用いて、scFv修飾NIR蛍光リポソームの細胞特異性を評価した(図3)。その結果、

EGFR陽性A431細胞に対して、scFv非修飾NIR蛍光リポソームはほとんど細胞表面に存在していなかったが、scFvを修飾したNIR蛍光リポソームを用いた場合、多くの細胞表面にRE-Y₂O₃由来の蛍光が観測された。一方、EGFR陰性CTLL2細胞に対しては、scFv修飾・非修飾に関わらず、RE-Y₂O₃由来の蛍光はほとんど観測されなかった。これから、EGFR陽性材棒特異的に吸着するNIR蛍光リポソームが作製できたといえ、さらに、近赤外イメージングにも用いることができるということが分かった。

さらに、マイクロカプセル化法により、カチオン性NIR蛍光リポソームを添加したHeLa細胞及びHuh-7細胞のNIR蛍光イメージングを行った。カチオン性NIR蛍光リポソームを添加したそれぞれの細胞は、7日経過後においてもNIR発光が確認できた。また、時間経過に伴って細胞一つ当たり

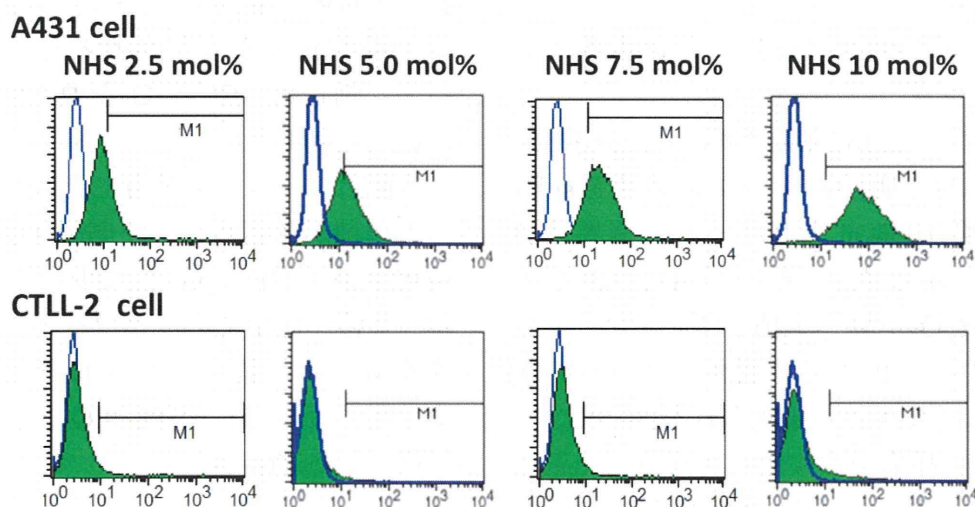


図2. 細胞に結合した scFv 修飾 NIR 蛍光リポソームの検出抗体による蛍光強度

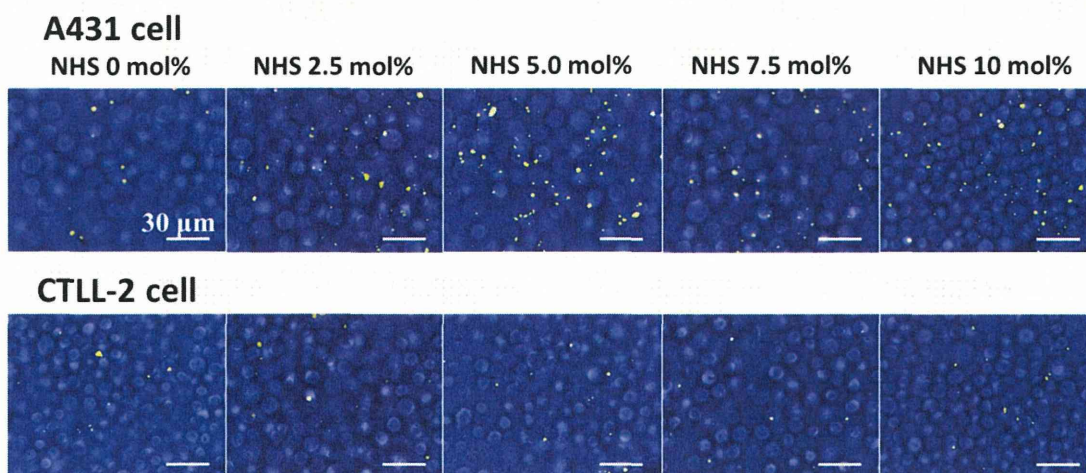


図 3. 細胞に結合した scFv 修飾 NIR 蛍光リポソームの NIR 蛍光像

の NIR 発光強度が減少することがわかった。これは時間経過に伴う細胞分裂の過程で、細胞一つ当たり導入されている RE-Y₂O₃ もそれぞれの細胞に分配されていくためであると考えられる。したがって、リポフェクションにより細胞内部に RE-Y₂O₃ が導入できたことがわかった。

③胆がんマウスを用いた近赤外イメージング

次に、A431細胞を用いて腫瘍を形成させた胆がんマウスに対する scFv 修飾 NIR 蛍光リポソームの特異性評価を行った。その結果、多くの RE-Y₂O₃ が肺へ集積してしまい、マウスにある状態では腫瘍への RE-Y₂O₃ の集積はうまく観測されなかった。そこで、腫瘍を取り出して観測したところ、わずかながら、RE-Y₂O₃ 由来の蛍光を観測することができた。

D. 考察

マイクロカプセル化法により RE-Y₂O₃ を導入したリポソームを作製した。そして、NHS 提示率を制御することによって、リポソーム間を会合させずに、かつ、scFv の導入量を変化させることに成功した。この scFv 修飾 NIR 蛍光リポソームは EGFR 陽性細胞に選択的に結合し、かつ、リポソームの帯電状況を変化させることによって、細胞内へ RE-Y₂O₃ を導入することにも成功した。

今回は、マウスに投与した際は、肺への集積が確認され、腫瘍領域までに運搬された RE-Y₂O₃ 量は少なかったが、今後、血中でのリポソームの安定性を向上する構造設計を行うことによって、より多くの RE-Y₂O₃ を腫瘍へ運搬できる期待される。

E. 結論

NIR 蛍光リポソームに scFv を修飾することで、非特異吸着を抑制しつつ、標的特異性を付与することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Daniel Oliveira, Do-Myoung Kim, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai, Tadafumi Adschiri, and Winfried Teizer, “The assembly of kinesin-based nanotransport systems”, *Journal of Applied Physics*, 112, 124703(1-8) (2012).
2. Aurélien Sikora, Daniel Oliveira, Kyongwan Kim, Andrew L. Liao, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai, Tadafumi Adschiri, Wonmuk Hwang, and Winfried Teizer, “Quantum Dot Motion on Microtubules”, *Chemistry Letters*, 41, 1215-1217 (2012).
3. Takamitsu Hattori, Mitsuo Umetsu, Takeshi Nakanishi, Satoko Sawai, Shinsuke Kikuchi, Ryutaro Asano, and Izumi Kumagai, “A high-affinity gold-binding camel antibody: Antibody engineering for one-pot functionalization of gold nanoparticles as biointerface molecules”, *Bioconjugate Chemistry*, 23, 1934-1944 (2012).
4. Jinghua Han, Satoshi Ohara, Kaduyoshi Sato, Hui Xu, Zhenquan Tan, Yoshiaki Morisada, Kazuo Kuruma, Makio Naito, Ping Shan, Mitsuo Umetsu, “Directed assembly of metal oxide nanoparticles by DNA”, *Materials Letters*,

79, 78-80 (2012).

5. Ryutaro Asano, Makoto Nakayama, Hiroko Kawaguchi, Tsuguo Kubota, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, Hiroki Hayashi, Yu Katayose, Michiaki Unno, Toshio Kudo, and Izumi Kumagai, “Construction and humanization of a functional bispecific EGFR CD16 diabody using a refolding system”, *FEBS Journal*, 279(2), 223-233 (2012).
6. Eva Hemmer, Hiroyuki Takeshita, Tomoyoshi Yamano, Takanori Fujiki, Yvonne Kohl, Karin Low, Nallusamy Venkatachalam, Hiroshi Hyodo, Hidehiro Kishimoto and Kohei Soga, “in vitro and in vivo investigations of upconversion and NIR emitting $Gd_2O_3:Er^{3+},Yb^{3+}$ nanostructures for biomedical applications,” *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 23, 2399-2412 (2012).
7. Kohei Soga, Kimikazu Tokuzen, Keisuke Fukuda, Hiroshi Hyodo, Eva Hemmer, Nallusamy Venkatachalm, Hidehiro Kishimoto, “Application of Ceramic/Polymer Conjugate Materials for Near Infrared Biophotonics,” *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 25, 57-62 (2012).

2. 学会発表

1. Mitsuo Umetsu, Asami Ueda, Takeshi Nakanishi, Kentaro Hashikami, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Protein engineering for site-specific

bioconjugation chemistry: Construction of multiple functional lowmolecular antibodies (低分子抗体が多機能化を可能とするピンポイント化学接合デザイン), 第50回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2012.9.22.

2. Mitsuo Umetsu, Smart Bio-Design from Protein Engineering in the Field of Nanobiotechnology, The 19th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2012, 2012.10.27.

3. Rui Todokoro, Mitsuo Umetsu, Hikaru Nakazawa, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Build up Design for Multivalent Antibodies on Multimeric Protein Platform (多量体タンパク質を利用した多価抗体分子の積み木細工

的デザイン), 2012.12.14.

4. Mitsuo Umetsu, Smart Bio-Design from Protein Engineering for interface molecules in nano world, AIMR International Symposium 2013, 2013.2.21.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし