

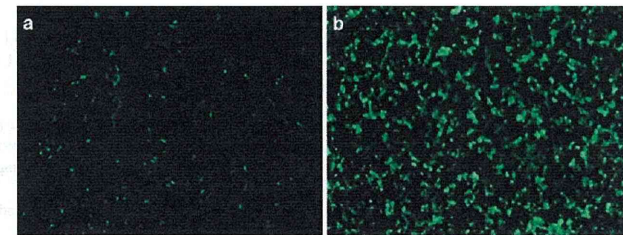
**Fig. 2** Characteristics of the deacylated polyethylenimine (PEI max)-nanoparticle: **a** The size of the PEI max-nanoparticles was measured with a laser light-scattering method using a fiber-optics particle analyzer (FPAR-1000, Otsuka Electronics) at 37°C. Secondary particle size of the PEI max-nanoparticles was approximately  $121.32 \pm 27.36$  nm. **b** PEI max-nanoparticles were induced to aggregate by a magnet (*a*) and were then dispersed (*b*). Asterisk indicates column-shaped neodymium magnet. **c** Cationic PEI max-nanoparticles (100 µg per tube) in deionized water or PEI max

solution (1 mg/ml) were reacted with anionic plasmid [pCAGGS-enhanced green fluorescent protein (EGFP)] by an ionic bond. PEI max-nanoparticles in deionized water and plasmid aggregated more easily than that in PEI max solution and plasmid. **d** To evaluate whether plasmid DNA attached to PEI max-nanoparticles in deionized water, PEI max-nanoparticles were reacted with plasmid DNA for 15 min at room temperature. Measuring the concentration of plasmid DNA in the upper layer (hyaline layer), the weight of PEI max-nanoparticles was reduced in a dependent manner

because PEI max-nanoparticle and plasmid DNA complexes are taken in by endocytosis. Thus, it might be difficult to take the large complexes into the cytoplasm by endocytosis. Furthermore, the expression level of the EGFP gene was also reduced under transfection during a prolonged time on the magnetic sheet (24 h) (Fig. 4b). This result may demonstrate a causal relationship between the cell division cycle and time on the magnetic sheet. Plasmid DNAs in the cytoplasm were transported into the nucleus when the nuclear membrane disappeared on cell division [24]. Thus, plasmid DNAs and

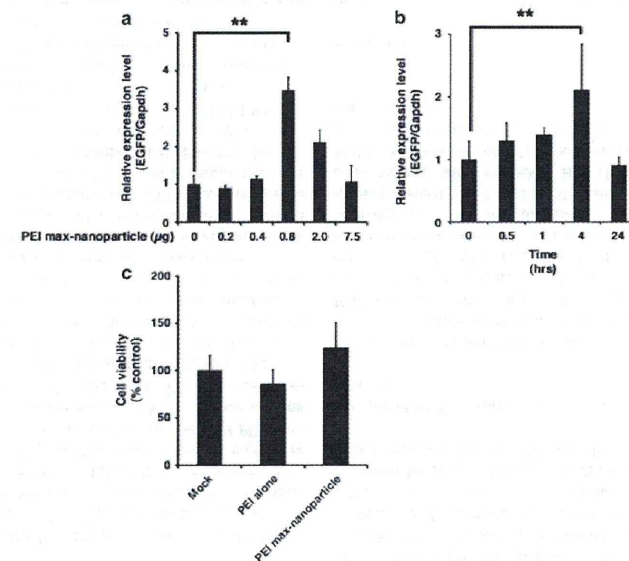
magnetic nanoparticle complexes might not be transported into the nucleus because they are drawn to the bottom of the cell by magnetic force.

We succeeded in producing PEI max-nanoparticles that enabled P19CL6 cells, which is derived from embryonic carcinoma transfected on a magnetic sheet. In addition, this method resulted in a highly efficient gene transduction compared with that of conventional transfection methods (Fig. 5a, c). This transfection method using PEI max-nanoparticles is a relatively low-cost and quick method of



**Fig. 3** Enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression in CL6 cells using deacylated polyethylenimine (PEI max)-nanoparticle and magnetic field. Phase-contrast fluorescent micrograph of CL6 cells

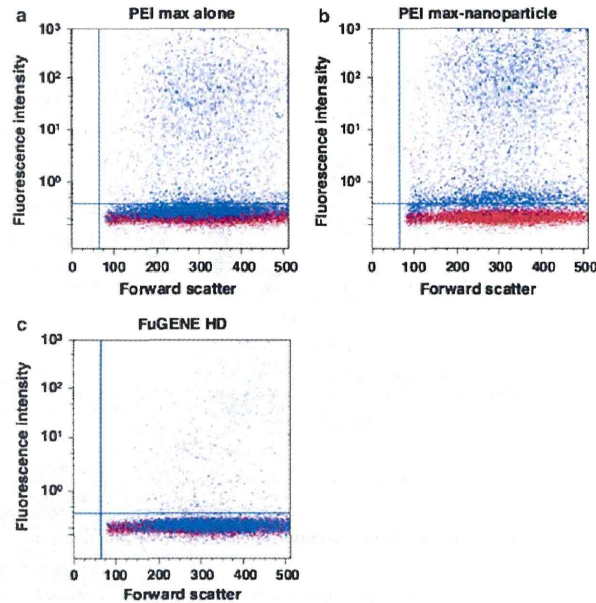
were transfected with pCAGGS-EGFP and PEI max as a control (*a*) and PEI max-nanoparticles (*b*). The numbers of EGFP-positive cells were further increased by PEI max-nanoparticles



**Fig. 4** Optimum condition for transfection of the deacylated polyethylenimine (PEI max)-nanoparticle. To optimize the transfection method, we examined PEI max-nanoparticles in terms of volume (*a*) and time (*b*) on the magnetic sheet. These results were evaluated by quantitative real-time reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression level of the CL6 cells treated with PEI max alone is regarded as 1. The optimal conditions for transfection using PEI max-nanoparticles were when the CL6 cells were treated with 0.8 µg of PEI max-nanoparticles and 2.0 µg of pCAGGS-EGFP for 4 h on the magnetic sheet. The double asterisks

indicate a significant difference ( $P < 0.05$ ). Cytotoxicities of PEI max and PEI max-nanoparticles were evaluated by Alamar Blue assay (*c*). After 48 h of PEI max or PEI max-nanoparticle exposure, there were no significant differences in cell viability between CL6 cells treated with PEI max and those with PEI max-nanoparticles. Mock: the CL6 cells treated without any treatment as a negative control. PEI max alone: the CL6 cells treated with PEI max. PEI max-nanoparticles: the CL6 cells treated with PEI max-nanoparticles (0.8 µg) for 4 h on the magnetic sheet. The relative absorbance of untreated CL6 cells is regarded as 100%

**Fig. 5** Transfection efficiency of the deacylated polyethylenimine (PEI max)-nanoparticle. Comparison of scattering properties of the untreated CL6 cells (mock, red dot) and with PEI max alone (a, blue dot, 42.2 ± 8.5%), PEI max-nanoparticles (b, blue dot, 81.1 ± 4.0%), or FuGENE HD (c, blue dot, 13.9 ± 1.1%) by flow cytometry



**Table 1** Comparison of transfection methods using the polyethylenimine and magnetic nanoparticles

Author	Year	Vector	Component	Cell	Transfection efficiency	Cell viability (% of control)	References
Kami	-	Plasmid	PEI max (MW 25k), MNP ( $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 70 nm), MF (0.2 T)	P19CL6	80% <sup>a</sup>	100	This paper
Zhang	2010	Plasmid	Branched PEI (MW 25k), SPION (30 nm), MF (1.2 T)	NIH3T3	64% <sup>a</sup>	100	[14]
Kievit	2009	siRNA	Branched PEI (MW 25k), SPION (30 nm), MF (1.2 T)	NIH3T3	77% <sup>a</sup>	100	[13]
		Plasmid	PEI (MW 25k), SPION (200 nm)	C6	90% <sup>a</sup>	10	
Scherer	2002	Plasmid	PEI (MW 25k), Chitosan, SPION (200 nm)	C6	45% <sup>a</sup>	100	[15]
		Plasmid	PolyMag (commercial magnification reagent), MF (1.2 T)	C6	32% <sup>a</sup>	66	
		Plasmid	PEI (MW 800k), SPION (200 nm), MF (1 T)	NIH3T3	5-fold <sup>b</sup>	-	
Adenovirus	-	PEI (MW 800k), SPION (200 nm), MF (1 T)	-	K562	100-fold <sup>b</sup>	-	-
		Retrovirus	PEI (MW 800k), SPION (200 nm), MF (1 T)	NIH3T3	20% <sup>a</sup>	-	

Transfection efficiency indicates optimal transfection condition

PEI polyethylenimine, PEI max deacylated PEI, MNP magnetic nanoparticle, SPION superparamagnetic iron oxide nanoparticle, MW molecular weight, MF magnetic force, T tesla

<sup>a</sup> Flowcytometric analysis

<sup>b</sup> Luciferase activity assay

introducing plasmid into target cells with increased efficiency. Furthermore, a major advantage of this method is its tolerability among cells. Other methods might be limited either by possible cytotoxic effects of the lipidic transfection reagent (lipofection) or simply by the directly

applied force on the cells (electroporation). In contrast, methods such as lipofection offer only a certain probability of hits between cargo and cells because of the three-dimensional motion of cells and transfection aggregates in a liquid suspension. Normally, transfection was inhibited

by serum using transfection reagent [25]. However, this method can also be performed in the presence of serum, which is a further benefit. Additionally, synergistic effects on transfection efficiency can arise from the possible combination of PEI max and nanoparticles. This technology might be an alternative to the currently used viral and nonviral vectors in gene therapy and gene transfer [26].

Our results suggest that PEI max-nanoparticles offer the ability to deliver various DNA formulations in addition to the traditional methods. Furthermore, gene transfer efficiency was not inhibited in the presence of serum in the cells. PEI max-nanoparticles may be a promising gene carrier with high transfection efficiency and low cytotoxicity.

**Acknowledgments** We express our sincere thanks to Koichiro Nishino (Department of Reproductive Biology, National Institute for Child Health and Development) for pCAGGS-EGFP. This study was supported by a Grant-in-Aid for the Global COE Program, Science for Future Molecular Systems from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (MEXT).

**References**

- Kimura T, Iwai S, Moritan T, Nam K, Mutsuo S, Yoshizawa H, Okada M, Furuzono T, Fujisato T, Kishida A. Preparation of poly(vinyl alcohol)/DNA hydrogels via hydrogen bonds formed on ultra-high pressurization and controlled release of DNA from the hydrogels for gene delivery. *J Artif Organs*. 2007;10:104–8.
- Moritake S, Taira S, Ichiyanagi Y, Morone N, Song SY, Hatanaka T, Yuasa S, Setou M. Functionalized nano-magnetic particles for an in vivo delivery system. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007;7:937–44.
- Tomitaka A, Koshi T, Hatsugai S, Yamada T, Takemura Y. Magnetic characterization of surface-coated magnetic nanoparticles for biomedical application. *J Magn Magn Mater*. 2010;323:1396–1403.
- Yokoyama M. Drug targeting with nano-sized carrier systems. *J Artif Organs*. 2005;8:77–84.
- Lauterbur PC, et al. Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. *Clin Orthop Relat Res*. 1973;1989:3–6.
- Nakamura H, Ito N, Kotake F, Mizokami Y, Matsuoka T. Tumor-detecting capacity and clinical usefulness of SPIO-MRI in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2000;35:849–55.
- Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Moller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21:1726–32.
- Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*. 2009;188:112–8.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:7297–301.
- Wang J, Gao L. Adsorption of polyethylenimine on nanosized zirconia particles in aqueous suspensions. *J Colloid Interface Sci*. 1999;216:436–9.
- Vancha AR, Govindaraju S, Parsa KV, Jasti M, Gonzalez-Garcia M, Ballesterio RP. Use of polyethylenimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. *BMC Biotechnol*. 2004;4:23.
- Thomas M, Lu JJ, Ge Q, Zhang C, Chen J, Klibanov AM. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:5679–84.
- Kievit FM, Veiseh O, Bhattarai N, Fang C, Gunn JW, Lee D, Ellenhorn RG, Olson JM, Zhang M. PEI-PEG-chitosan copolymer coated iron oxide nanoparticles for safe gene delivery: synthesis, complexation, and transfection. *Adv Funct Mater*. 2009;19:2244–51.
- Zhang H, Lee MY, Hogg MG, Dordick JS, Sharfstein ST. Gene delivery in three-dimensional cell cultures by superparamagnetic nanoparticles. *ACS Nano*. 2010;4:4733–43.
- Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, Gansbacher B, Plank C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther*. 2002;9:102–9.
- Bertram J. MATra—magnet assisted transfection: combining nanotechnology and magnetic forces to improve intracellular delivery of nucleic acids. *Curr Pharm Biotechnol*. 2006;7: 277–85.
- Arsianti M, Lim M, Marquis CP, Amal R. Polyethylenimine based magnetic iron-oxide vector: the effect of vector component assembly on cellular entry mechanism, intracellular localization, and cellular viability. *Biomacromolecules*. 2010;11:2521–31.
- Georgieva JV, Kalicharan D, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Hoekstra D, Zuhorn IS. Surface characteristics of nanoparticles determine their intracellular fate in and processing by human blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *Mol Ther*. 2011; 19:318–25.
- Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)*. 2008;3:703–17.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. 1991;108:193–9.
- Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods*. 1997;204:205–8.
- Namgung R, Singha K, Yu MK, Jon S, Kim YS, Ahn Y, Park IK, Kim WJ. Hybrid superparamagnetic iron oxide nanoparticle-branched polyethylenimine magnetplexes for gene transfection of vascular endothelial cells. *Biomaterials*. 2010;31:4204–13.
- Song HP, Yang JY, Lo SL, Wang Y, Fan WM, Tang XS, Xue JM, Wang S. Gene transfer using self-assembled ternary complexes of cationic magnetic nanoparticles, plasmid DNA and cell-penetrating Tat peptide. *Biomaterials*. 2010;31:769–78.
- Coonrod A, Li FQ, Horwitz M. On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther*. 1997;4:1313–21.
- Purow BW, Sundaresan TK, Burdick MJ, Kefas BA, Comeau LD, Hawkinson MP, Su Q, Kottiarov Y, Lee J, Zhang W, Fine HA. Notch-1 regulates transcription of the epidermal growth factor receptor through p53. *Carcinogenesis*. 2008;29:918–25.
- Davis ME. Non-viral gene delivery systems. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13:128–31.

各種ナノ粒子の細胞への影響：細胞特異性とその応用

Effects of Various Nanoparticles on Human Cells: Cell Specificity and its Application

一町 直樹<sup>a</sup>, 栗岡 大輔<sup>a</sup>, 河井 一明<sup>b</sup>, 葛西 宏<sup>b</sup>, 松本 幹治<sup>c</sup>, 渡邊 昌俊<sup>c\*</sup>

Naoki Itcho, Daisuke Kurioka, Kazuaki Kawai, Hiroshi Kasai, Kanji Matsumoto, Masatoshi Watanabe

Application fields of nanoparticles range from biomedicine such as imaging and drug delivery systems to various industrial products. Despite the rapid progress, the potential for nanotoxicity in human has not yet been established. Most methods for toxicity assessment were designed and standardized with chemical toxicology. The reliable toxicity test systems are needed. Here, we present an overview of current in vitro toxicity tests for nanoparticles risk assessment, and focus on genotoxicity, especially cell-specific genotoxicity and its application.

Keywords: Nanoparticle, Cytotoxicity, Genotoxicity, Cell specificity

1. 緒言

メートル)の超微小な領域において、物質を取り扱う技術である。ナノスケールは、例えばインフルエンザウイルスや筋肉を構成するアクチン、ミオシントナ...

2010年11月18日受付

a 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コース

(〒240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5) TEL 045-339-3997

Division of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Yokohama National University

(79-5, Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501, Japan)

b 産業医科大学 産業生態科学研究所 職業性腫瘍学

(〒807-8555 福岡県北九州市八幡西区生丘 1-1) TEL 093-691-7469

Department of Environmental Oncology, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health

(1-1, Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan)

c 横浜国立大学大学院 工学府 機能発現工学専攻 機能と安全分野 (医工学\*)

(〒240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5)

Division of Materials Science and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Yokohama National University

(79-5, Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501, Japan)

<著者紹介>



一町 直樹
2009年横浜国立大学 工学部卒業、横浜国立大学大学院 工学府 機能発現工学専攻 博士課程前期 現在に至る。



栗岡 大輔
2008年横浜国立大学 工学部卒業、2010年横浜国立大学大学院 工学府 機能発現工学専攻 博士課程前期修了。横浜国立大学大学院 工学府 機能発現工学専攻 博士課程後期 現在に至る。



河井 一明
1992年3月名城大学大学院修士課程修了、博士(薬学)。1993年4月名城大学 薬学部助手、2003年4月産業医科大学助教授(職業性腫瘍学)、2007年4月より同職教授 現在に至る。
専門: 酵化的 DNA 損傷、環境変異原



松本 幹治
1974年3月東京大学 工学部大学院博士課程単位取得退学、同年4月東京大学 工学部助手、1984年4月横浜国立大学 工学部助教授、1991年同職教授 現在に至る。
専門: 分離工学、粉体工学、生物化学工学



葛西 宏
昭和44年、学習院大学 理学部 化学科卒業;昭和53年、国立がんセンター研究所 生物学部研究員、同主任研究官、細胞生物学研究室長を経て平成5年、産業医科大学教授(職業性腫瘍学)。
専門: 酸化ストレスと発がん



渡邊 昌俊
1989年三重大学 医学部卒業、1993年三重大学大学院 医学研究科修了、同年国立がんセンター研究所レジデント、1997年三重大学 医学部助教授、同年米国国立環境衛生研究所客員研究員、2003年横浜国立大学大学院 工学府 機能発現工学専攻 現在に至る。

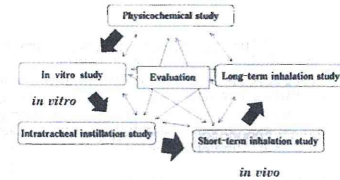


Fig. 1 Hazard assessment system for nanoparticles

ク質と同程度の大きさで、これらと比較しても扱う技術の超微細さが理解できる。2000年1月にクリントン米国大統領によって出された教書「国家ナノテクノロジー優先施策(National Nano-technology Initiative: NNI)」でも示されたように、ナノテクノロジーは素材、バイオ、医療などの産業の基盤にかかわるものであり、21世紀の最重要な技術の一つであるのは周知の事実である。ナノテクノロジーを支える重要なものであるナノ材料の研究開発は、これまでのバルク体に無い、サイズの縮小による細胞・組織への浸透性の増大、表面活性と反応性の向上、電磁氣的、光学的、機械的などの物理化学的特性から、その応用が注目されている。これらのナノサイズの特性を利用して、ナノ酸化チタン、フラーレン、ナノシルバー等が化粧品、スポーツ用品等に使用されている。医療分野では、ドラッグデリバリーシステム(DDS)や、生体組織構築技術などの応用研究が行われている。健康で安心・安全な社会を実現するため、ナノ材料はなくてはならないものと考えられる。しかしながら、同じ材質であっても、バルク体とは異なる特性を示すため、ナノ材料の生体への曝露あるいは環境放出による影響が問題となる。そのため、新規化学物質と同様に、ナノ材料のリスク評価・リスク管理が求められている。経済産業省の「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」(平成18~22年度)をはじめとして、厚生労働省等が有害性試験の結果の発表、報告を行っている。ナノ材料の人へのリスク評価は、ナノ材料のキャラクタリゼーションの後にナノ材料の有害性(ハザード)と同材料の間への曝露量と曝露経路の両面から評価される。有害性の評価として、in vitro 評価および in vivo 評価がある(Fig. 1)。ナノ材料の吸入曝露試験がヒトへの曝露状態を模擬している曝露手法で、生体影響のデータの信頼性が高い。吸入曝露試験よりは劣るが、気管注入試験により吸入曝露試験の代替や予備試験として行われるが、既知量による用

量反応関係を調べることができるので、一般的には有害性評価に有用な試験である。

ナノ材料の有害性の評価は、従来の化学物質の評価と同様に行い得ないのが重要なことである。in vivo あるいは in vitro 実験系において、ナノ粒子では凝集体として考えられる2次粒子として評価されることで、本来の1次粒子(ナノサイズ)の影響を評価していない等のいろいろな問題を抱えている。2,4。

本稿では、ナノ材料、特にナノ粒子の細胞毒性および遺伝毒性を評価する in vitro 試験についての紹介、これら in vitro 試験より得られた知見から示唆されたナノ粒子の細胞特異性について紹介する。

2. 細胞毒性試験について

ナノ粒子の有害性評価のために、in vitro 試験がある。これは、培養細胞にナノ粒子を曝露させ、細胞への影響を観察する細胞毒性試験である。培養細胞にナノ粒子を曝露させると、濃度勾配による拡散、Receptor mediated endocytosis, Caveolae-mediated endocytosis, Clathrin-mediated endocytosis 等の機序により、各ナノ粒子は細胞内に入り込む。使用される細胞は様々であるが、特に肺細胞の培養の難しさとして RAW 264.7 (Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line) や、肺上皮細胞として A549 (Human lung adenocarcinoma epithelial cell line) 等の肺癌細胞株が使用される。これらは、正常細胞の培養の難しさ、ナノ粒子の呼吸器系を介した曝露を想定した場合に、最初に遭遇し、肺組織での細胞-ナノ粒子の相互作用が生じると考えられることや in vivo 実験を考えた上で選択される。細胞毒性試験の評価法を、Table 1 に示す。ナノ粒子の吸着能や光学的性質等の特性がこれら試験に影響を与えていることも考えられており、注意が必要である。

細胞生存率 (Cell viability) は細胞毒性試験の最も一般的に調べられる内容であるが、異なる測定エンドポイントが利用されている。

2.1 MTT assay

テトラゾリウム塩のミトコンドリア内膜脱水素酵素による還元を伴うホルマザン色素の呈色反応を利用するアッセイである。色々改良され、現在では細胞毒性評価に多用され、他の評価法の検証にも使用されている。呈色反応に金属イオン、pH が影響するなど報告され、また、基質とナノ粒子が反応する等の問題が報告されている。

Table 1 Current *in vitro* cytotoxicity assays

Cytotoxicity assay	Detection principle
MTT	Colorimetric detection of mitochondrial activity
LDH	Colorimetric detection of LDH release
Annexin V/Propidium Iodide	Fluorimetric detection of Phosphatidylserine exposure (Apoptosis marker)/Propidium Iodide-staining of DNA (Necrosis marker)
Neutral red	Colorimetric detection of intact lysosome
Caspase-3	Fluorimetric detection of Caspase-3 activity (Apoptosis marker)
H <sub>2</sub> DCF-DA	Fluorimetric detection of ROS production
ELISA	Colorimetric detection of cytokine secretion

2. 2 Lactate Dehydrogenase (LDH) 活性測定  
生細胞に存在する LDH で、細胞膜の損傷に伴い細胞外へ遊離した LDH の活性を測定する。LDH 活性測定も、pH や金属イオンの影響を受けると報告されている<sup>9)</sup>。

2. 3 Annexin/propidium iodide を利用した測定  
正常では脂質 2 重層の内側に存在する負電荷をもった phosphatidylserine (PS) が、apoptosis の初期に外側に転移する現象がみられる。Annexin V は Ca<sup>2+</sup> 存在下で PS に対して強い親和性をもつため、Annexin V は PS が細胞表層に露出した apoptosis 細胞のみに結合し、apoptosis の検出が可能となる。necrosis 細胞も PS が露出するので、necrosis 細胞と apoptosis 細胞の鑑別のため、色素排除テストに使用される DNA 染色剤としての Propidium Iodide を同時使用する。

2. 4 Neutral red assay  
Neutral red (3-amino-7-dimethyl-amino-2-methylphenazine hydrochloride) は可溶性の色素で、生細胞のみ細胞内に取り込まれる。細胞に取り込まれた Neutral red を洗浄後に抽出して 540 nm の吸光度で測定する。

2. 5 Caspase-3 の検出  
活性型 Caspase-3 の検出は最も一般的に使用される apoptosis assay である。活性型 Caspase-3 は発色基質あるいは蛍光基質の分解物を比色 (分光光度計) または蛍光 (フルオロメーター) で測定することにより検出される。Caspase-3 は金属イオン、特に Zn<sup>2+</sup> により阻害される<sup>9)</sup>。

2. 6 活性酸素種 (Reactive Oxygen Specimens : ROS) の検出  
H<sub>2</sub>DCF-DA は、細胞内の ROS 検出のための蛍光プローブとして広く使用されている。生細胞の細胞質で酸化されるまでは、細胞透過性の非蛍光物質である。

生細胞に入り、ROS が存在すると、還元された色素が酸化され、色素が蛍光を発する。

2. 7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による炎症マーカーの検出  
Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) や Interleukins 等が ELISA により検出される。

### 3. 遺伝毒性評価について

ナノ粒子の安全性評価に関する論文の多くは、細胞毒性に関する内容である。しかし、ナノ粒子も DNA に障害を及ぼし、癌や遺伝性疾患を引き起こす可能性が考えられ、細胞毒性と同様に評価をしなければならない。

自然突然変異よりも高頻度で、突然変異を誘発する物理的、化学的、生物的要因の総称を環境変異原と呼ぶ。環境中には多種多様な化学物質があり、突然変異を誘発する化学変異原も少なくないことから、一般に変異原という化学変異原をさす場合が多い。当初は、変異原物質と遺伝毒性物質は同意であった。その後、変異原は DNA 損傷性を除く、遺伝子突然変異あるいは染色体異常を誘発する物質に対して用いられている。(日本環境変異原学会関連用語の解説 <http://www.j-ems.org/info/glossary.html#ha>)

遺伝毒性試験には、色々な機構で遺伝的な傷害を引き起こす物質を検出するための *in vitro* および *in vivo* 試験がある。これらの試験は、遺伝物質に対する毒性、すなわち DNA 損傷性から突然変異誘発性、染色体異常誘発性までを検出する。これらの意義は、後世代への遺伝性影響であり、また、発癌への関連性と考えられている。すなわち、遺伝毒性試験陽性の物質は、変異原物質や発癌物質である可能性があるが、また必ずしも変異原物質が発癌物質ではない。いずれにせよ、ナノ粒子の遺伝毒性と発癌性の評価は、重要な

Table 2 Current genotoxicity assays

Genotoxicity assay	Detection principle
Ames test	The application of mutagen leads mutations in many genes including the defective gene and some of those mutations cause the reversal of ability to synthesize histidine.
Chromosome aberration test	After exposure of cells to the test substance, they are treated with a metaphase-arresting substance, harvested, stained and metaphase cells are analysed microscopically for the presence of chromosome aberrations.
Mouse lymphoma test	Mutant cells, deficient in TK due to the forward mutation in the TK locus, are resistant to the cytotoxic effect of pyrimidine analogues such as trifluorothymidine.
Micronucleus test	Detection of chemicals which induce the formation of small membrane bound DNA fragments i.e. micronuclei in the cytoplasm of interphase cells
Comet assay	Measuring DNA single- and double-strand breaks at the level of individual cells
8-OHdG	Detection of 8-OHdG formation

課題である。遺伝毒性試験については、Table 2 に示す<sup>7,8)</sup>。

### 3. 1 微生物を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験)

本試験は、1972年に Ames 博士らにより変異原性を評価するために開発された。サルモネラ菌を用い、ヒスチジン (histidine) 要求性株が変異を起こし、ヒスチジン非要求株になり、寒天培地上でのコロニー数の変化を復帰突然変異として評価する。Ames 博士は、化学物質の持つ発がん性と変異原性の関係を明らかにしたなどの功績で、杉村博士とともに1997年の日本国際賞を受賞した。この他、大腸菌を用いて、トリプトファン (tryptophan) 要求性株が非要求性株になることを評価する。これら細菌を利用する復帰突然変異試験では、塩基置換変異、フレームシフト変異などの点突然変異が調べられる。Ames 試験は、簡便性、経済性および効率性に優れている。しかしながら、原核生物のデータを真核生物の評価へ移し替えることの難しがある。陽性であっても発癌性のない物質、陰性であっても発癌性のある物質があることも周知の事実である。

### 3. 2 ほ乳類動物細胞を用いる染色体異常試験

本試験は、チャイニーズハムスター肺細胞やヒト末梢血リンパ球を用いて、染色体の構造異常や数異常を評価する。有害物質の曝露された細胞は、染色体を構成する DNA やタンパク質が障害を受けて、細胞分裂中期の染色体異常として観察される。本試験が陽性

でも発癌性は示さない場合もあることや、cytology の技術が必要とされる。労働安全衛生法、化学物質審査規制法、薬事法などの法規制で実施が義務付けられている重要な試験である。

3. 3 Mouse Lymphoma 試験  
本試験は、マウスリンパ性白血病由来 L5178Y を用いて、チミジンキナーゼ tk 遺伝子上に生じる変異の有無を評価する。L5178Y 細胞はヘテロに tk 遺伝子をもち (tk<sup>+</sup>/-), 変異の誘発 (tk<sup>-</sup>/-) によりチミジンキナーゼの代謝拮抗剤、トリフルオロチミジンへの耐性変異コロニーとして観察される。本試験は、点突然変異から染色体レベルの欠失変異も捉えられることやほ乳類細胞を用いることで、Ames 試験より高次の試験と考えられる。

### 3. 4 Micronucleus Test (小核試験)

本試験は、げっ歯類に物質を投与して、その赤血球における小核形成を評価する。赤芽球の分裂成熟過程で、染色体の異常が誘発され、小核が形成され、脱核後に細胞質に取り残された小核を観察する。本試験は、*in vitro* 遺伝毒性試験で検出しにくい物質や *in vivo* 遺伝毒性試験で陽性になった物質の *in vivo* 評価のために実施される。

### 3. 5 Comet assay (単細胞ゲル電気泳動法)

本試験は、電気泳動によりアガロースゲル中で DNA を移動させることにより、単細胞レベルでの 1 本鎖 DNA 切断や 2 本鎖 DNA 切断を検出し、また、その切断量に基づき修復動態を評価できる<sup>9)</sup>。この泳

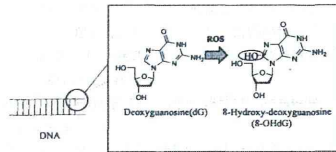


Fig. 2 Structure of 8-OHdG

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で、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<sup>10)</sup>。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、 $\gamma$ -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<sup>3</sup>H-チミンを観察する。HPRT前進突然変異法は、哺乳類雄性細胞(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。 $\gamma$ -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。 $\gamma$ -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 $\gamma$ -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ることで、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、小核試験を標準的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<sup>10)</sup>。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クロスリンクがあり、発癌へ結びついている。

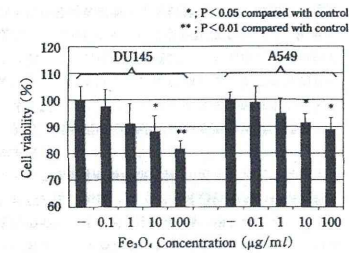


Fig. 3 Alamar Blue assay

### 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 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、二酸化チタン TiO<sub>2</sub>、フラーレン C<sub>60</sub>、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)、H<sub>2</sub>DCF-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<sup>10)</sup>。ここで、マグネタイト Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (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 10nm で、MNP の2次粒子径 (培養液中) は 180nm 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)。H<sub>2</sub>DCF-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 *in vivo* 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、

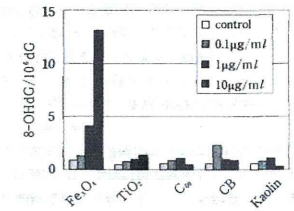


Fig. 4 8-OHdG levels in DNA from DU-145 cells

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<sup>12-14)</sup>。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蓄積し始めている。MNP 自体は、いわゆる Fenton 反応 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> → Fe<sup>3+</sup> + HO<sup>•</sup> + HO<sup>•</sup>) を介して、ROS を産生すると考えられ

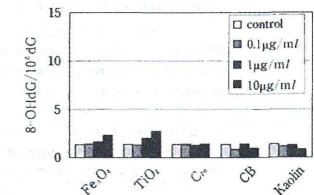


Fig. 5 8-OHdG levels in DNA from A549 cells

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<sup>10)</sup>。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<sup>10)</sup>。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<sup>10)</sup>。

### 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れて、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-ryushinonanzensei: Nanozairyou Bussushitsu no Risukuhyoka", *Chem. Eng. Japan*, 74, 647-649 (2010)
- 3) Morimoto, Y. and I. Tanaka: "Nanoryushi no Yuugaisei-hyoka", *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) Zuquan, W. and Y. Ogawa: "Comet assay: Idendokusei no Kenshutsusurutameno Kyouyryokuna Kaisekihoh", *Roudouanzenkenkyu*, 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. Kinae, 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 therapeutics", *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 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 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\*<sup>1</sup> 佐藤 明子\*<sup>2</sup> 栗岡 大輔\*<sup>1</sup> 米田 操\*<sup>3</sup>  
 広川 佳史\*<sup>3</sup> 白石 泰三\*<sup>3</sup> 渡邊 昌俊\*<sup>4</sup>

\*<sup>1</sup> 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

\*<sup>2</sup> 横浜国立大学工学部物質工学科バイオコース

\*<sup>3</sup> 三重大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

\*<sup>4</sup> 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用いられている。その中で、磁性体ナノ粒子の特性を利用した治療がある。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<sup>-9</sup>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\*<sup>1</sup>, Akiko Sato\*<sup>2</sup>, Daisuke Kurioka\*<sup>1</sup>, Misao Yoneda\*<sup>1</sup>, Yoshifumi Hirokawa\*<sup>2</sup>, Taizo Shiraishi\*<sup>3</sup> and Masatoshi Watanabe\*<sup>1</sup>  
 Division of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan\*<sup>1</sup>; Division of Materials Science and Chemical Engineering, School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan\*<sup>2</sup>; Pathologic Oncology, Division of Molecular and Experimental Medicine, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Japan\*<sup>3</sup>; Medical Engineering, Division of Materials Science and Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan\*<sup>1</sup>

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

\*<sup>1</sup> 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応用するものをナノメディスンと呼ぶ。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。ナノメディスンの中で、癌に関わる分野が「Cancer Nanotechnology」あるいは「Nan oncology」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」に応用されている<sup>1, 2)</sup>。

### II ナノ粒子メディスン

ナノ粒子メディスンは、ナノテクノロジーの中

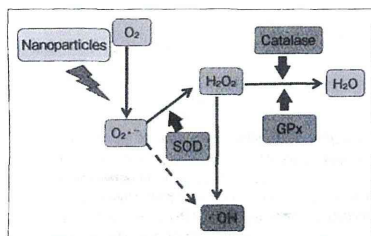


図1 Reactive oxygen species (ROS) metabolism and the antioxidant defense system

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<sup>3)</sup>。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<sup>1)</sup>。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-methylanthraquinone) 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<sup>5)</sup>。

磁性体ナノ粒子 ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) は, Fenton 反応 ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{HO}^*$ ) 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 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) 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

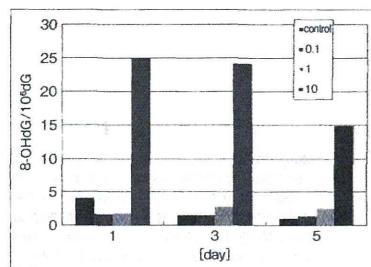


図2 8-OHdG levels in DNA from LNCaP cells

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<sup>6, 7)</sup>。

### 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<sup>8)</sup>。われわれの実験結果からも, 磁性体ナノ粒子の曝露で, 他の細胞株と比較して, 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<sup>9)</sup>。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

- 1) Misra R, et al: Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. Drug Discov Today 15: 842-850, 2010
- 2) Jain KK: Advances in the field of nanoncology. BMC Med 8: 83, 2010
- 3) 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
- 4) 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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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

## 前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果

Effects of magnetic nanoparticles on prostate cancer chemotherapy

渡邊昌俊、佐藤麻子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大樹、栗岡大輔

Masatoshi Watanabe<sup>1</sup>, Akiko Sato<sup>2</sup>, Ayumi Iwasaki<sup>3</sup>, Emi Fukui<sup>3</sup>, Daiki Okamoto<sup>3</sup> and Daisuke Kurioka<sup>2</sup>

横浜国立大学大学院工学研究院、同大学院工学部、同大学工学部

<sup>1</sup>Faculty of Engineering, <sup>2</sup>Graduate School of Engineering, and <sup>3</sup>School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan.

### Abstract

Prostate cancer is one of the most prevalent cancers in men in many countries, including Japan. Several management options are available when prostate cancer at an early stage is diagnosed, including surgery, cryosurgery, radiation therapy, hormonal therapy or watchful waiting. For advanced prostate cancer, the surgical or medical ablation of androgens is regarded as optimal first-line treatment, however unfortunately androgen ablation therapy is palliative. For castration-resistant prostate cancer, chemotherapy is used, however needs to be improved because of limitations by lack of specificity and systemic toxicity. Nanotechnology, especially, magnetic nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) have potential applications in drug delivery, cancer diagnosis and therapy. In this, we attempt to provide up-to-date information regarding prostate cancer and show our data about effects of magnetic nanoparticles on prostate cancer chemotherapy.

### 1. はじめに

がんは日本人の3大死亡原因疾患の一つである。本邦における前立腺がんは、生活、特に食生活の欧米化、高齢化及びProstate Specific Antigen (PSA)による診断方法の普及により増加しており、その罹患率の年次推移は、1975年以降増加している。2020年には、本邦男性の罹患率の第2位となり予想されている<sup>1)</sup>。死亡率の年次推移は、1950年代後半から90年代後半まで増加し、その後横ばい状態である。2009年では罹患率の第4位で、死亡率は第6位である<sup>2)</sup>。日本人の罹患率は、欧米諸国およびアメリカの日系移民より低く、欧米諸国の中ではアメリカ黒人の罹患率が最も高い傾向があり、人種に関わる特徴を有する<sup>3)</sup>。前立腺がんの治療法には、特別な治療をせず、経過観察する待機療法、手術療法、放射線治療、内分泌療法がある。前立腺がんの治療は病期、悪性度 (Gleason score) 等を参考に治療法が決定される。原発巣がT3 (被膜を越えて浸潤するがん)、T4 (精嚢以外の隣接臓器に浸潤するがん) に対して、内分泌療法単独あるいは他の治療法を併用して用いられる。内分泌療法は前立腺がん細胞の血液中の男性ホルモン (アンドロゲン、androgen) 依存性に増殖する性質を利用したものであり、両側の精巣摘除手術やLuteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) 製剤がアンドロゲン除去療法がある。しかし、男性ホルモンは副腎からもわずかに分泌されているため、副腎から分泌される男性ホルモンの働きは、抗アンドロゲン剤によりブロックすることができるため、アンドロゲン除去療法と抗アンドロゲン剤を併用することもある (複合アンドロゲン阻害療法、combined androgen blockade: CAB) もしくは最大アンドロゲン阻害療法、maximum androgen blockade (MAB)。治療開始当初は80%以上の患者で効果を認めるも、多くの場合数年で徐々に治療の効果がなくなり、病状が再び悪化 (再燃) する。このような状態の前立腺がんを再燃前立腺がんまたは内分泌治療抵抗性前立腺がんと呼ぶ。内分泌療法が有効でない症例や、内分泌治療の効果がなくなった時に主に化学療

法が行われる。他剤との併用で、ドセタキセルは再燃前立腺がん患者のPSA値を高い確率で低下させ、生存期間も延長させることが報告され<sup>4)</sup>、再燃前立腺がんに対する有効な化学療法として、ドセタキセル (docetaxel: DTX) が化学療法のfirst lineとして使用されるようになった。DTXは微小管タンパクの重合を促進する事により微小管の安定化、過剰形成を促し、紡錘体の機能を障害する事により細胞分裂を阻害して抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。しかし、DTXは骨髄抑制などの副作用を伴い、治療を重ねるにつれて徐々に副作用が強くなる等により治療可能な期間が限定される。加えて、治療中に、腫瘍はDTX抵抗性を獲得する。したがって、DTXは、他の薬剤との併用や、投与量の減量等が重要と考えられる。DTX投与後の再燃前立腺がんに対して、タキサン系抗がん剤のCabazitaxelの臨床試験が行われ、死亡リスクを30%低減させたと報告されている。このように新しい抗がん剤の開発、その投与方法等いろいろな工夫が行われている。

### 2. 前立腺がんにおける抗がん剤抵抗性について

前立腺がんの抗がん剤抵抗性は、いろいろな経路が関与する (Fig.1)<sup>5)</sup>。例えば、ATP-binding cassette transport proteinsの過剰発現がある。

これらのtransport proteinsはがん細胞内から抗がん剤を排出し、細胞内濃度を低減させる。transporter proteinsを調節する事は、抗がん剤抵抗性を克服する事が出来る。また、signalling intermediariesの一つとして、Phosphoinositide 3'-kinase (PI3K) / Akt / mammalian target of rapamycin pathway (mTOR)がある。PI3K/Akt/mTORは細胞の生存、細胞周期、悪性化に関与している。この経路を抑制するタンパク質がPTENである。前立腺がんの約80%

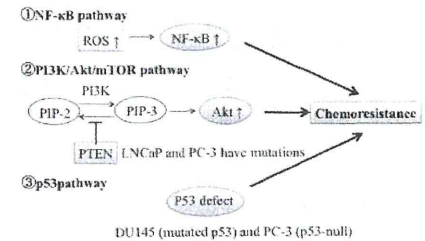


Fig.1 Pathways of chemotherapy resistance in prostate cancer

が同タンパクの機能喪失が報告されている。Aktはapoptosisを抑制し、PI3Kはmultidrug resistance protein 1 (MRP1)の発現を上昇させる等して抗がん剤抵抗性を獲得する。PI3KとAktはmTORを活性化し、さまざまながん遺伝子や増殖因子を過剰発現させる。その他には、apoptosis、inflammation、angiogenesis等にかかわる経路が関与する。

### 3. 前立腺がん細胞におけるナノ粒子、磁性体ナノ粒子の影響について

当研究室では、各種ナノ粒子等 (マグネタイト Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、二酸化チタン TiO<sub>2</sub>、フラーレン C<sub>60</sub>、カーボンブラック Carbon black、カオリン Kaolin 等) のヒト細胞株 (肺がん細胞株 A549、前立腺がん細胞株 LNCaP、DU145、PC-3、前立腺上皮細胞株 RWPE-1 等) への細胞毒性および遺伝毒性の評価を行ってきた<sup>6)7)</sup>。その中で、マグネタイトナノ粒子曝露による前立腺がん細胞株に濃度依存的な cell viability の低下および 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) の有意な増加を認めた。この結果より、少なくともマグネタイトナノ粒子が細胞特異的に、前立腺がん細胞株に対して細胞毒性および遺伝毒性を生じさせると考えられた。その後、マグネタイトナノ粒子は前立腺がん細胞株に活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の増加させる事が示された。臨床がんや前立腺がん細胞株は、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、redox state に大きな特徴がある事が報告されている。これらの事実より、同じマグネタイトナノ粒子に曝露された細胞間で、前立腺がん細胞のように ROS と抗酸化システムのバラ



NSが崩れやすい細胞に対して、ROS産生が上昇し、細胞毒性や遺伝毒性が生じると考えられた。マグネタイトナノ粒子は所謂 Fenton 反応( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO + HO^*$ )を介するも、その他の経路による ROS 産生も報告され、酸化ストレスが生じると報告されている<sup>1)</sup>。

#### 4.ROS を利用したがん治療法へ

ROS 自体は second messenger として正常細胞のシグナリングで重要な役割を果たしている。一般に、がん細胞では ROS 産生が上昇して、浸潤・転移等のがん細胞の挙動に大きく関わっている。一方、化学療法、放射線療法および光線力学的治療法において ROS の産生が細胞死をもたらす重要な役割を果たしている。これらのことから、

抗酸化がん治療法 (Anti-oxidant Cancer Therapy) と酸化促進がん療法 (Pro-oxidant therapy) の二つの治療法が考えられている<sup>1)</sup>。抗酸化療法は、Vitamins C&E 等の抗酸化物質の取り込み、glutathione peroxidase や catalase 等の ROS scavenger enzyme overexpression 等が該当する。

一方、酸化促進がん療法は、Arsenic や Imexon 等による ROS 産生、Glutathione(GSH) の消耗等が該当する。本研究室は、ROS 産生による酸化促進がん療法に注目した。ROS 産生を操作する事により、容易に細胞死をもたらす状況を作り、各種抗がん剤との併用で、その容量を減らして、同様の効果を得る事と副作用を軽減する事、すなわち、DTX とマグネタイトナノ粒子の併用療法により、DTX の容量を減らし、同程度の効果及び他剤との併用を可能にすることを旨とした。同時にマグネタイトナノ粒子は核磁気共鳴画像法のコントラスト造影剤として利用され、あるいはがんの温熱療法への応用の可能性もあることより、マグネタイトナノ粒子の theranostic application が考えられる<sup>1)</sup>。

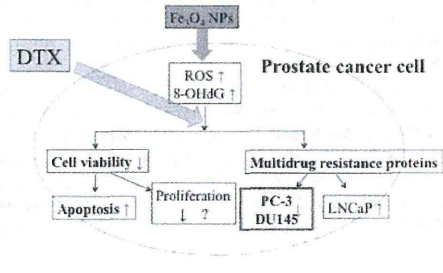


Fig.2 Effects of  $Fe_3O_4$  NPs and DTX on prostate cancer cell

#### 4.抗がん剤にマグネタイトナノ粒子を併用した時の前立腺がん細胞への効果

当研究室では、前立腺がん細胞株に first line で使用される DTX とマグネタイトナノ粒子を併用曝露し、DTX の使用量を減らし、その効果が維持できる事を報告している(Fig.2)<sup>110)</sup>。これはマグネタイトナノ粒子が細胞内に取り込まれ、細胞内で ROS 産生が確認され、所謂 ROS 療法となっていると考えられた。同時に inflammatory response factor や

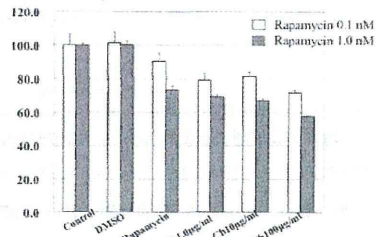


Fig.3 Effect of the combination treatment of  $Fe_3O_4$  NPs and Rapamycin on the cell viability in prostate cancer cells

multidrug resistance protein 発現への影響も確認された。このようにマグネタイトナノ粒子と DTX の併用は、細胞内で色々な細胞反応を呈すると考えられた。また、前立腺がんにおいて PI3K/Akt/mTOR シグナリング系は重要な働きをする事が知られている。現在これらを標的にした多くの分子標的薬の開発が進められている。特に、PI3K、mTOR 阻害剤の抗腫瘍効果が報告されている<sup>111)</sup>。mTOR は mTOR complex1 (mTORC1) と mTOR complex2 (mTORC2) からなる複合体で、マクロライド系抗生剤である

rapamycin によりこの mTORC1 は特異的に阻害される。しかし、PI3K/Akt/mTOR シグナリング系は PTEN により制御されているので、PTEN の有無により rapamycin の効果が異なる。ここで、二つの前立腺がん細胞株 DU145 および PC-3 に対して、rapamycin とマグネタイトナノ粒子を併用曝露し、その効果について評価を行った。DU145 細胞は PTEN 陽性細胞であり、mTORC1 を介した系が活性化していないため、その阻害効果が低く、PC-3 は PTEN 欠損細胞であり、mTORC1 を介した系が恒常的に活性化しているため、阻害効果はあると考えられている。通常使用される rapamycin の 1/10~1/100 量で使用しても、マグネタイトナノ粒子濃度依存的に cell viability の低下を認めた(Fig.3)。しかしながら、DU145 と PC-3 の細胞間に差は認められなかった。プラチナ製剤で、second line の使用が有望視されている carboplatin についても同様の評価を行った。その主たる作用機序はアルキル化作用で、DNA 二重らせんの架橋形成により、DNA 合成障害をもたらす<sup>112)</sup>。特にこの second line は DTX に対して抵抗性を持つようになった前立腺がんの治療に重要な位置を占める。carboplatin 10 μM で、マグネタイトナノ粒子と併用したが、マグネタイトナノ粒子濃度依存的に cell viability の低下を認めた。興味深い事に、カルボキシル基修飾したマグネタイトナノ粒子と非修飾ナノ粒子との間で、carboplatin の効果が異なる事が認められた(Fig.4)。今後、DTX と同様に rapamycin あるいは carboplatin とマグネタイトナノ粒子を組み合わせた時の細胞内のシグナリング等の解析が必要と考える。

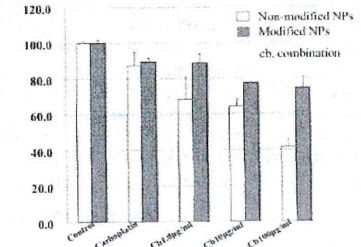


Fig.4 Effect of the combination treatment of  $Fe_3O_4$  NPs and Carboplatin on the cell viability in prostate cancer cells

#### 5.まとめ

抗がん剤とマグネタイトナノ粒子の併用曝露による前立腺がん細胞の細胞生物学的な評価を主体に報告した。現在までに、ナノ粒子の大きさ、表面修飾等が細胞への取り込み、細胞毒性等に重要な影響を与える事が報告されている。一方、ナノ粒子を取り込んだ後に細胞内における各種反応は、細胞の特性、特にがん細胞の特性に基づくと考えられる。比較的単純なマグネタイトナノ粒子であっても、細胞毎にその反応は異なり、また用いる抗がん剤により、その効果は異なる。ナノ粒子の特性と細胞における反応との関係について分子生物学的レベルで解析する事が必要と考える。

#### 6.文献

- [1] N. Tabata, Y. Ohno, R. Matsui, H. Sugiyama, Y. Ito, H. Tsukuma and A. Oshima, Jpn. J. Clin. Oncol., 38, 146-157 (2008).
- [2] 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター：がん情報サービス <http://ganjoho.jp/public/statistics/pub/statistics01.html>

## 前立腺がん化学療法への 磁性体ナノ粒子の応用

栗岡大輔<sup>\*1</sup>・佐藤明子<sup>\*2</sup>・岩崎有由美<sup>\*3</sup>  
深井瑛美<sup>\*4</sup>・岡本大樹<sup>\*5</sup>・渡邊昌俊<sup>\*6</sup>

- [3] M. Watanabe, T. Nakayama, T. Shiraishi, G.N. Stemmermann and R.Yatani, *Urol. Pncol.*, 5, 274-283 (2000).  
 [4] A. Felici, M.S. Pino and P. Carlini, *Front. Endocrinol.*, 3, 1-8 (2012)  
 [5] K.L. Mahon, S.M. Henshall, R.L. Sutherland and L.G. Horvath, *Endocri Related Cancer*, 18, R103-R123 (2011)  
 [6] Y. Totsuka, T. Higuchi, T. Imai, A. Nishikawa, T. Nohmi, T. Kato, S. Masuda, N. Kinae, K. Hiyoshi, S. Ogo, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, N. Fukumori, M. Watanabe, T. Sugimura, K. Wakabayashi, *Part. Fibre Toxicol.*, 6, 23 (2009)  
 [7] 一町直樹, 栗岡大輔, 河合一明, 葛西宏, 松本幹治, 渡邊昌俊, *粉体工学会誌*, 48, 145-151 (2011).  
 [8] J. Wang and J. Yi, *Cancer Biol. Ther.*, 7, 1875-1884 (2008)  
 [9] N. Ahmed, H. Fessi and A. Elaissari, *Drug Discovery Today*, 17, 928-934 (2012).  
 [10] A. Sato, A. Morohashi, A. Iwasaki, A. Ishiguro, H. Uemura, Y. Kubota, N. Kobayashi and M. Watanabe, *Proceeding of The 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association*, 122 (2012).  
 [11] G. L. Gravina, F. Maranpon, F. Petini, L. Biordi, D. Sherris, E. A. Jansini, V. Tombolini and C. Festuccia, *Endocri Related Cancer*, 18, 385-400 (2011).  
 [12] G. Colloca, A. Ventura and F. Ceccagliani, *Med. Oncol.*, 29, 776-785 (2012).

20102年10月14日受理

### 1. はじめに

がんは、日本人の3大死亡原因疾患の一つとして幅広く認知されている。本邦における前立腺がんは、食生活の欧米化や高齢化に伴って増加傾向にある。また、従来の直腸指診では困難であった早期発見が Prostate Specific Antigen (PSA) による診断法の普及によって可能となったことも増加要因の一つと考えられる。前立腺がん罹患率の年次推移は、1975年以降増加しており、2020年には、本邦男性罹患率の第2位となることが予想されている<sup>1)</sup>。前立腺がんにおける死亡率の年次推移は、1950年代後半から90年代まで増加傾向にあるが、その後横ばい状態となる。日本人の罹患率は、欧米諸国およびアメリカの日系移民より低く、欧米諸国の中ではアメリカ黒人の罹患率が最も高い傾向にあり、人種と深く関与している<sup>2)</sup>。

前立腺がんの治療法には、手術療法、放射線療法、内分泌療法、さらには特別な治療を実施せず、経過観察をする待機療法があり、病期、悪性度 (Gleason score) 等を参考にして治療法が決定される。前立腺がん細胞は、血液中の男性ホルモン (アンドロゲン, androgen) の刺激により増殖する。そこで、両側の精巣摘除や薬剤を用いて精巣から分泌される血液中の男性ホルモン値を低下させる

方法が内分泌療法 (アンドロゲン除去療法) と呼ばれ、転移性進行前立腺がんでは第一に選択される。しかし、男性ホルモンは副腎からもわずかに分泌されているため、副腎から分泌される男性ホルモンの働きを遮断することができる抗アンドロゲン剤を併用する複合アンドロゲン療法 (Combined androgen brockade: CAB) を行うこともある。これら内分泌療法は、治療開始当初は80%以上の患者で効果を認めるも、多くの場合数年で徐々に治療の効果がなくなり、病状が再び悪化 (再燃) する。このような状態の前立腺がんを再燃前立腺がんまたは転移性去勢抵抗性前立腺がんと呼ぶ。

内分泌療法が有効でない症例や、内分泌療法の効果がなくなった時に、主に化学療法が行われる。ドセタキセル (docetaxel: DTX) は、フェーズIIIの患者に対する臨床試験で再燃前立腺がん患者の PSA 値を高い確率で低下させ、生存期間の延長も認められたことから、2004年、米国食品医薬品局 (US Food and Drug Administration: FDA) によって、再燃前立腺がんに対する化学療法の First line として使用することが定められた<sup>3-5)</sup>。しかしながら、DTX 療法は、骨髄抑制などの副作用を伴い、長期間使用すると徐々に副作用が強くなることや、腫瘍が抗がん剤抵抗性を獲得することが報告されている。そこで、他の薬剤などを併用することで DTX の投与量を減量する治療法や、DTX に代わる新しい抗がん剤を探索する必要があり、幅広く研究されている。

### 2. 抗がん剤抵抗性の分子機構

前立腺がんにおける抗がん剤抵抗性の獲得には、

<sup>\*1</sup> Daisuke Kurioka 横浜国立大学大学院工学府

<sup>\*2</sup> Akiko Sato 横浜国立大学工学部物質工学科バイオコース

<sup>\*3</sup> Ayumi Iwasaki 同上

<sup>\*4</sup> Emi Fukui 同上

<sup>\*5</sup> Daiki Okamoto 同上

<sup>\*6</sup> Masatoshi Watanabe 横浜国立大学工学研究院 教授

博士 (医学)  
Application of Magnetic Nanoparticles to Chemotherapy for Prostate cancer