



無機とバイオの融合ナノ粒子による新しいがん治療戦略

The Cancer Treatment Strategy with the Inorganic/Bio-Complex Nanoparticle

西村 勇哉¹, 森田 健太², 鈴木 貴弘², 萩野 千秋³, 近藤 昭彦³
Yuya NISHIMURA¹, Kenta MORITA², Takahiro SUZUKI², Chiaki OGINO³, Akihiko KONDO³

¹ 神戸大学科学技術イノベーション研究科 特命助教

² 神戸大学工学研究科 ³ 同 教授

¹ Assist. Professor, Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University, JAPAN

² Graduate School of Engineering, Kobe University, JAPAN

³ Professor, Graduate School of Engineering, Kobe University, JAPAN

抄 録

B型肝炎ウイルスのエンベロープタンパク質は肝細胞を特異的に認識する機能を有している。我々はこの機能を応用して、がん細胞などを特異的に認識可能とするバイオ中空ナノ粒子（BNC）の開発に成功している。一方で、100 nm程度の大きさの過酸化チタン・ナノ粒子に、放射線照射依存的にラジカルや過酸化水素を発生する能力を有することも明らかにしてきている。併せて、この無機ナノ粒子をBNCに包含する事にも成功しており、担癌マウスを用いた実験において、放射線照射依存的にがん組織の退縮効果を獲得することに成功している。本稿では、これまでの研究成果について紹介したい。

ABSTRACT

A bio-nanocapsule (BNC) that is composed of the L protein of the hepatitis B virus (HBV) surface antigen and a lipid bilayer shows high specificity for human hepatocytes. Therefore, we have developed various specificity-altered BNCs for cancer cell types by gene engineering. While at the same time, we have demonstrated that titanium peroxide nanoparticle (TiOx) shows anticancer effect in combination with X-ray irradiation. Therefore, we tried to encapsulate the TiOx in the BNC and deliver this complex particle into the target tumor. As a result, we succeeded in demonstrating antitumor effect against mouse xenograft model with a combination of the complex particle and X-ray irradiation.

1 はじめに

がんの放射線治療は、高エネルギーを与えることによって活性酸素種（ROS; Reactive Oxygen Species）を生成させ、がん細胞にダメージを与えることによって治療する。体内には溶存酸素があり、これ

に放射線照射を行うと、電離しヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）等の活性酸素種を生成する。ROSは反応性が高く、DNA近傍で生成するとDNA鎖を切断する。正常細胞の場合は、DNA修復が即座に行われるが、がん細胞は修復能が低く、その場合は細胞死を誘導することができる（Baskar R. et al., 2012）。しかし、

一般的に使用されている X 線では身体深部の腫瘍や一部のがんには効果が小さいという欠点がある。X 線は透過率が高いと言われているが、線源から離れるにつれてエネルギーは減衰し、身体自体も減衰の障害となるので、身体内部には十分な放射線量が届かない。また、がん細胞は、爆発的な増殖によって低酸素状態となっているので、放射線で電離すべき酸素が欠乏している。以上より、身体内部の腫瘍の放射線治療は難しいとされており、現在、放射線照射には以下に述べる薬剤等の併用による、新しい治療法の提案がなされている。

放射線増感治療：X 線を用いた放射線療法の改善策として、「放射線増感剤」を用いた放射線増感療法がある。「放射線増感剤」とは、放射線の効果を向上させる薬剤である。上述のように、腫瘍内は酸素欠乏状態なので、放射線の電離作用で生じる ROS が減少し、放射線抵抗性を持つ。それを解消するために、放射線照射に先駆けて腫瘍内に放射線増感剤を蓄積させ、その上で放射線照射することで、がん細胞に対して本来の放射線の傷害効果を与えさせることができる。

過酸化水素を用いた放射線増感治療：過酸化水素は強力な酸化剤であり、医療用の外用消毒剤として利用され、オキシドールとしても使われている。過酸化水素は不安定で、酸素を放出しやすく、ヒドロキシラジカルを生成しやすい。また、生体内ではエネルギー代謝の際に発生し、細胞内の酵素（ペルオキシダーゼやカタラーゼ）によって酸素に分解される。過酸化水素を腫瘍内に供給すれば、腫瘍内で酸素を発生させることができる。また、発生したラジカルを消去しようとする酵素の働きを阻害することができる。以上の効果を活かして、過酸化水素を導入して酸素を発生、抗酸化酵素を阻害した状態で放射線照射を行い、放射線治療効果を向上させる治療法が確立されている（KOUTUC）（Ogawa Y. et al., 2008; Kariya S. et al., 2009）。しかしながら、長期的な照射治療において、過酸化水素自体は液体であり、容易に拡散するために、長時間、生体の特定の組織や領域で保持することは困難である。

2 内容

2.1 放射線励起可能な無機ナノ粒子の探索

放射線増感剤として、原子番号の大きな（高 Z）元素から構成される金属ナノ粒子を用いた方法が研究されている。高 Z 元素金属ナノ粒子に放射線を照射すると、原子の内殻吸収限界を越え、オージェ電子が発生する。このオージェ電子は、生体内（の細胞）においては 1 本鎖 DNA 及び 2 本鎖 DNA を破壊し、細胞死を引き起こす。また、オージェ電子による ROS の間接的な誘導によって、組織内にダメージを増幅させることができる。その代表的な例として、金ナノ粒子や銀ナノ粒子がある（Su X.Y. et al., 2014）。金ナノ粒子は、比較的小さい粒子で、生体適合性もよく、化学修飾がしやすい。そのため、金ナノ粒子に関する多くの報告がなされている（Mesbahi A., 2010）。銀ナノ粒子も、抗腫瘍効果が得られており、金ナノ粒子と同様の性質を示す（Su X.Y. et al., 2014）。他にゲルマニウムやプラチナなども研究されている。しかし、その詳細なメカニズムは未だ解明されておらず、腎毒性などの副作用も報告されており、今後の研究課題である。

一方、二酸化チタンは光触媒としてよく認知されており、紫外線照射との併用により環境浄化や防汚コーティング、色素増感太陽電池などの多方面で応用展開されている。さらには、発生した ROS によって微生物等を死滅させるという研究や、がん細胞を特異的に損傷させる研究も進んでいる。当研究グループでも以前に、抗体修飾二酸化チタン・ナノ粒子と紫外線の併用でがん細胞を特異的に傷害することに成功する（Matsui K. et al., 2010）など、医療応用の分野にも研究が進められている。また、医療用に紫外線による光触媒能だけでなく、放射線照射によってもラジカル発生能が確認されている。また、二酸化チタン表面の多孔質なアモルファス構造を利用した、薬剤を送達するキャリアとしての研究もなされている。

2.2 無機ナノ粒子と放射線照射の併用によるがん治療の提案

以上の研究背景より本研究グループでは、放射線照射によって効果的に ROS を発生可能な金属ナノ粒子（及び酸化金属ナノ粒子）を探索し、二

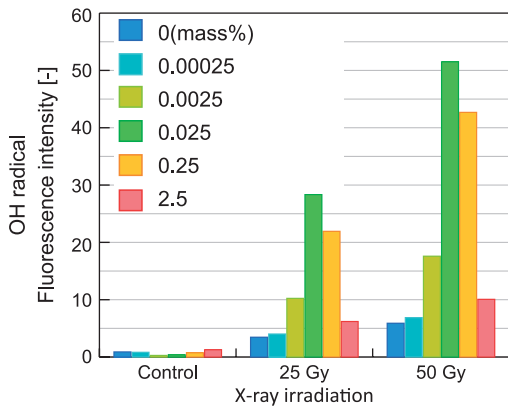


図1 過酸化チタン・ナノ粒子とX線照射によるラジカル発生

Fig. 1 Radical generation by X-irradiated titanium peroxide nanoparticle

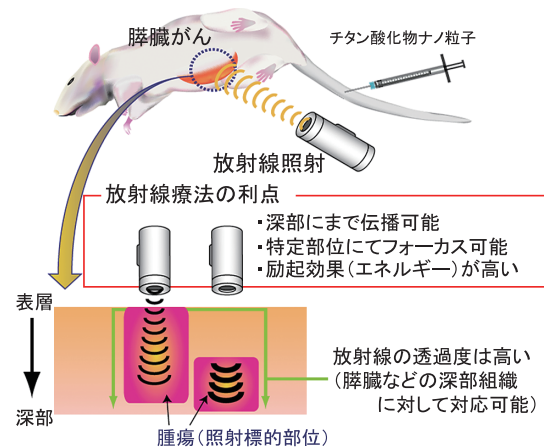


図2 提案する「過酸化チタン/放射線併用治療」

Fig. 2 The cancer treatment with a combination of titanium peroxide nanoparticle and radiation

酸化チタンを過酸化水素で処理した“過酸化チタン”にその機能を有する事を見出すことに成功した (Nakayama M. et al., 2016)。

過酸化チタンは、酸素を発生させて抗酸化酵素を阻害する性質を持つ過酸化水素と、放射線照射によってラジカルを発生させ、細胞傷害することができる性質を持つ二酸化チタンを組み合わせた機能を有すると考えられ、既存の放射線増感剤より大きい細胞傷害効果が期待できると考えている。高エネルギーで生体深部まで透過できる放射線と、過酸化チタン・ナノ粒子を併用することができれば、過酸化チタン・ナノ粒子は将来有望な放射線増感剤になり

えると考えた (図1)。

さらにはナノ粒子と放射線照射の併用による“過酸化チタン/放射線併用治療法”によって、難治療性や深部に存在する腫瘍 (がん細胞) の効率的な死滅誘導が可能になるのではないかと考えた (図2)。

構築したポリアクリル酸修飾過酸化チタン (PAA-TiO_x) の特性: N,N-ジメチルホルムアミドとポリアクリル酸の混合溶液に、アナターゼ型酸化チタン (TiO₂) 懸濁液を添加し十分攪拌した。この混合液を水熱反応器に入れ、高温高圧下で反応させ、ポリアクリル酸修飾を施した。その後、粒子の洗浄を行った後に、構築したナノ粒子を蒸留水に分散させ、過

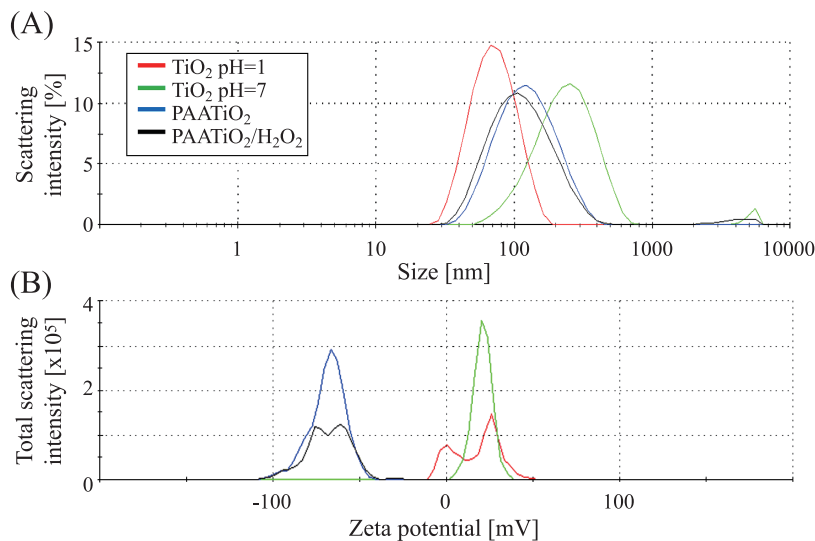


図3 過酸化チタン・ナノ粒子の (A) 粒径と (B) 表面電荷

Fig. 3 (A) Particle diameter and (B) zeta potential of titanium peroxide nanoparticle

酸化水素と混合することで、過酸化チタン・ナノ粒子を構築し、得られた淡黄色の懸濁液をポリアクリル酸修飾過酸化チタン (PAA-TiO_x) とした。

構築した TiO₂ ナノ粒子 (NP), PAA-TiO₂ NP, PAA-TiO_x NP について DLS で粒径を調べた結果を図 3A, Z ポテンシャルを調べた結果を図 3B に示す。PAA-TiO_x NP の原料である TiO₂ NP は硝酸酸性中で分散しており、その粒径は 75 nm であった。表面を PAA 修飾した PAA-TiO₂ NP, PAA-TiO_x NP はそれぞれ、135, 124 nm となり、元の TiO₂ NP よりも少し大きな直径となった。

それぞれの粒子の Z ポテンシャルも併せて測定した。その結果、PAA 未修飾の粒子はほぼ中性に近いカチオン性粒子で、PAA を修飾すると PAA のカルボキシル基の影響で大きくアニオン性 (負電荷帯電) となる。PAA 修飾粒子が中性の塩溶液中で良好な分散性を示すのはこの大きな表面電荷によると考えられる。

ポリアクリル酸修飾過酸化チタン (PAA-TiO_x) から生成する ROS (活性酸素種): 放射線を粒子分散液に照射し、発生した ROS を APF と反応させ、生じた Fluorescein の蛍光を測定することで検出した。その結果、PAA-TiO₂ NP, PAA-TiO_x NP 分散液中で発生する ROS の量は純水中とほとんど変わらなかった。さらに、ROS のひとつである OH を DMPO にトラップさせ、DMPO-OH の量を EPR で測ることで、OH の量を調べた。その結果、PAA-TiO_x NP 分散液は X 線未照射でも DMPO-OH を生成しており、PAA-TiO₂ NP や純水中に比べて、X 線照射時間を増やしてもラジカル量があまり増えなかった。このことから、放射線照射による活性酸素種の発生ではなく、複数の機構が活性酸素種の生成に関与していることが明らかとなった。

担癌マウスを用いたマウス内でのナノ粒子の生体内分布: MIAPaCa-2 (ヒト膵臓がん細胞株) を移植した担癌マウスに、PAA-TiO_x を局所注射および尾静脈注射の 2 方法で行った。そして、注射から一定時間後に臓器等の分画を取り出し、ICP-AES で各分画における Ti 含有量を測定した。

局所注射および尾静脈注射における、各分画の Ti 含有量の経時変化を示す (図 4, および図 5)。局所注射 (図 4) によって注射初期には腫瘍への主要な粒子の蓄積が確認できたが、特性が無いために、時

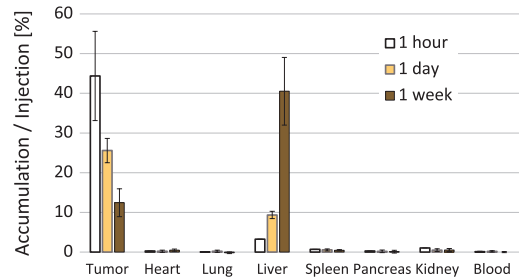


図 4 過酸化チタン・ナノ粒子の局所注入による体内分布

Fig. 4 Biological distribution of PAA-TiO_x via local injection

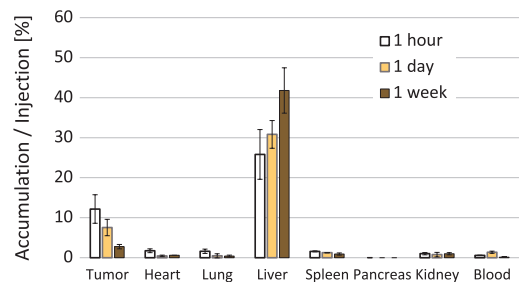


図 5 過酸化チタン・ナノ粒子の尾静脈注入による体内分布

Fig. 5 Biological distribution of PAA-TiO_x via tail vein injection

間経過とともに流出し、肝臓で蓄積量が増加していることが確認できた。また尾静脈注射によって (図 5)、腫瘍に対して、他の臓器とは有意な蓄積が確認できた。このことから、粒子が受動的に腫瘍へと送達されたと考えられ、腫瘍への送達能を有していることが示唆された。しかしながら、図 4 と同様に、経過とともに肝臓への蓄積が顕著となった。これらの結果より、ナノ粒子を腫瘍特異的に留まらせて、治療効果を向上させるには、腫瘍を異性的に認識する機能を粒子に付与させる必要があると考えられる。

2.3 Bio-Nano Capsule (BNC) とは

上述の項では放射線で ROS を生成可能なナノ粒子に関して報告を行ったが、そのナノ粒子を特定臓器に送達するには、ナノ粒子の送達に向けたドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System: DDS) 技術の開発が必要である。我々はその運搬体として、B 型肝炎ウイルス (HBV) の外皮タンパク質と脂質二重層から成る中空ナノ粒子 (Bio-nanocapsule: BNC) に関して研究を推進してきている (図 6)。

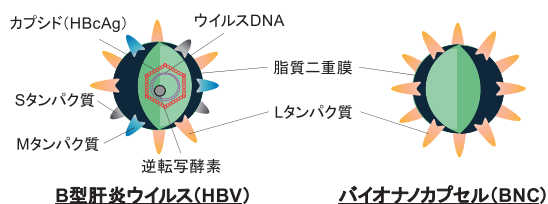


図6 バイオナノカプセルの模式図
Fig. 6 Schematic diagram of Bio-nanocapsule

BNCの主成分であるHBVの外皮タンパク質は、226アミノ酸から成るSタンパク質、Sタンパク質のN末端側にさらに55アミノ酸（pre-S2領域）が付加したMタンパク質、さらにMタンパク質のN末端にさらに108アミノ酸、もしくは119アミノ酸（pre-S1領域）が付加したLタンパク質の3種類がある。BNCの外皮タンパク質はLタンパク質であり、Lタンパク質のpre-S1領域には肝細胞認識部位があるため、BNCはHBV同様に肝細胞特異性を有する。

以下にBNCがDDSキャリアとして優れている点を挙げる。

- 1) 高い導入効率：BNCはHBVと同様にウイルス由来の感染経路を用いる。
- 2) 高い安全性：BNCはアデノウイルスなどのウイルスキャリアと異なり、ウイルス由来のDNAやタンパク質を含まない。
- 3) 生産系の確立：製造承認済の遺伝子組み換え酵母由来B型肝炎ワクチンと基本的に同じ構造を有することから、GMP準拠の医薬品として大量生産が可能である。

このような特徴を持つBNCはこれまでの研究で、遺伝子やモデル薬剤を肝細胞特異的に送達し、機能を発現させることに成功している（Yamada T. et al.,

2003）。さらに、薬剤の封入方法（Jung J. et al., 2008; Nishimura Y. et al., 2012a）や精製方法（Nishimura Y. et al., 2013a）も検討されている。

BNCによる薬剤送達の可能性：BNCのpre-S1領域にある肝細胞認識部位周辺を遺伝子工学的手法により生体認識分子や機能性分子に置換することで、BNCの特性を改変する研究が進んでいる。これまでにサイトカインの1つである上皮成長因子（EGF）（Yamada T. et al., 2003）や膜透過ペプチド（Shishido T. et al., 2009）に置換したBNCなどが開発され、新たな特性を付与することに成功している（図7）。

本研究グループでは生体認識分子であるAffibodyを提示したBNCの研究に注力している。AffibodyとはStaphylococcus属由来Protein AのBドメインを改変したの結合性タンパク質（Zドメイン）であり、3つのαヘリックス構造を持ち、そのうちの2つのαヘリックス内の13箇所のアミノ酸配列を変えることで結合対象を改変できる。また、全長が58アミノ酸残基であり抗体（約150 kDa）よりも非常に小さく単純な構造を形成する。Affibodyは高温条件下やpHの変化が激しい環境においても安定であり、優れた生体認識分子であると言える。ワイルドタイプのZドメインは抗体のFc領域の結合ドメインであり、Zドメインをタンデムに導入したZZ提示BNCは抗体と共存させることで抗体の特異性を付与することに成功している（Kurata N. et al., 2008）。

さらには、乳癌や卵巣癌の腫瘍マーカーであるHER2を特異的に認識する変異を導入したAffibodyを表層提示したBNC（Z_{HER2}-BNC）の構築にも成功している（Shishido. et al., 2010）。

これら改変型BNCを用いることで、外毒素

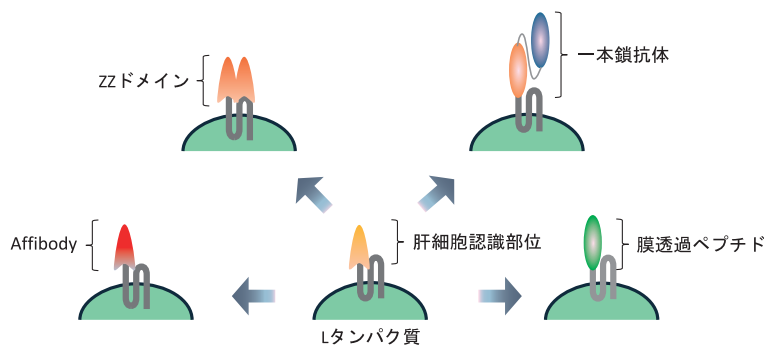


図7 遺伝子工学的手法によるBNCの特異性改変
Fig. 7 Specificity-altered BNCs through gene engineering

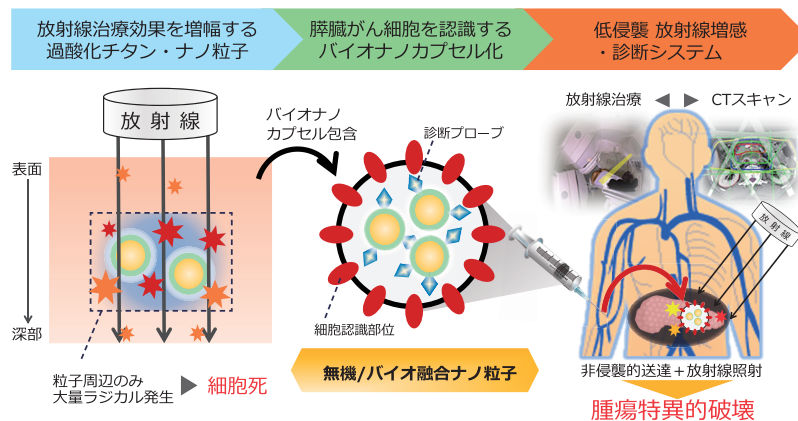


図8 提案する放射線増感治療・診断システム

Fig. 8 Development of radiosensitization therapy and imaging system

(Nishimura Y. et al., 2012b) や siRNA (Nishimura Y. et al., 2013b) などを送達する事にも成功しており、上述の無機ナノ粒子との融合によって、放射線治療における新しいがん治療のプラットフォームを構築する事が期待できる。

3 おわりに

無機ナノ粒子/BNC と放射線照射の併用による分子標的型のがん治療提案：上述のように、我々は放射線照射によって励起可能な“過酸化チタン・ナノ

粒子”の構築と、そのナノ粒子をがん組織に送達可能とするウイルス由来のBNCの開発に成功している。この技術を融合する事で、放射線治療・無機ナノ粒子・ドラッグデリバリーシステムを組み合わせた、すい臓がんの診断と治療を同時に実現する放射線増感治療・診断システムの構築を提案する(図8)。そして、現在すでのがん治療のひとつとして確立されている「放射線治療」にナノ粒子を併用する事で、これまで難しいとされている膵臓などの放射線低感受性組織における難治性がんの飛躍的な治療向上を目指していく。

References

- 1) Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W., Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions, International Journal of Medical Sciences, 9(3) (2012) 193-199.
- 2) Jung J., Matsuzaki T., Tatematsu K., Okajima T., Tanizawa K., Kuroda S., Bio-nanocapsule conjugated with liposomes for in vivo pinpoint delivery of various materials, Journal of Controlled Release, 126(3) (2008) 255-264.
- 3) Kariya S., Sawada K., Kobayashi T., Karashima T., Shuin T., Nishioka A., Ogawa Y., Combination treatment of hydrogen peroxide and X-rays induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells, International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics, 75(2) (2009) 449-454.
- 4) Kurata N., Shishido T., Muraoka M., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A., Specific Protein Delivery to Target Cells by Antibody-displaying Bionanocapsules, The Journal of Biochemistry, 144(6) (2008) 701-707.
- 5) Matsui K., Karasaki M., Segawa M., Hwang S.Y., Tanaka T., Ogino C., Kondo A., Biofunctional TiO2 nanoparticle mediated photokilling of cancer cells using UV irradiation, Medicinal Chemical Communications, 1(3) (2010) 209-211.
- 6) Mesbahi A., A review on gold nanoparticles radiosensitization effect in radiation therapy of cancer, Reports of Practical Oncology and Radiotherapy, 15 (2010) 176-180.
- 7) Nakayama M., Sasaki R., Ogino C., Tanaka T., Morita K., Umetsu M., Ohara S., Tan Z., Nishimura Y., Akasaka H., Sato K., Numako C., Takami S., Kondo A., Titanium peroxide nanoparticles enhanced cytotoxic effects of X-ray irradiation against pancreatic cancer model through reactive oxygen species generation in vitro and in vivo, Radiation Oncology, 11(91) (2016) DOI: 10.1186/s13014-016-0666-y.
- 8) Nishimura Y., Shishido T., Ishii J., Tanaka T., Ogino C., Kondo A., Protein-encapsulated bio-nanocapsules

- production with ER membrane localization sequences, *Journal of Biotechnology*, 157(1) (2012a) 124–129.
- 9) Nishimura Y., Ishii J., Okazaki F., Ogino C., Kondo A., Complex carriers of affibody-displaying bionanocapsules and composition-varied liposomes for HER2-expressing breast cancer cell-specific protein delivery, *Journal of Drug Targeting*, 20(10) (2012b) 897–905.
 - 10) Nishimura Y., Takeda K., Ishii J., Ogino C., Kondo A., An affinity chromatography method used to purify His-tag-displaying bio-nanocapsules, *Journal of Virological Methods*, 189(2) (2013a) 393–396.
 - 11) Nishimura Y., Mieda H., Ishii J., Ogino C., Fujiwara T., Kondo A., Targeting cancer cell-specific RNA interference by siRNA delivery using a complex carrier of affibody-displaying bio-nanocapsules and liposomes, *Journal of Nanobiotechnology*, 11(19) (2013b) DOI: 10.1186/1477-3155-11-19.
 - 12) Ogawa Y., Ue H., Tsuzuki K., Tadokoro M., Miyatake K., Sasaki T., Yokota N., Hamada N., Kariya S., Hitomi J., Nishioka A., Nakajima K., Ikeda M., Sano S., Inomata T., New radiosensitisation treatment (KORTUC I) using hydrogen peroxide solutionsoaked gauze bolus for unresectable and superficially exposed neoplasms, *Oncology Reports*, 19(6) (2008) 1389–1394.
 - 13) Shishido T., Yonezawa D., Iwata K., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A., Construction of arginine-rich peptide displaying bionanocapsules, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (2009) 1473–1476.
 - 14) Shishido T., Mieda H., Hwang S.Y., Nishimura Y., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A., Affibody-displaying bionanocapsules for specific drug delivery to HER2-expressing cancer cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20 (2010) 5726–5731.
 - 15) Su X.Y., Liu P.D., Wu H., Ning G., Enhancement of radiosensitization by metal-based nanoparticles in cancer radiation therapy, *Cancer Biology & Medicine*, 11 (2014) 86–91.
 - 16) Yamada T., Iwasaki Y., Tada H., Iwabuki H., Chuah M.K., Driessche T.V., Fukuda H., Kondo A., Ueda M., Seno M., Tanizawa K., Kuroda S., Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes, *Nature Biotechnology*, 21 (2003) 885–890.

〈著者紹介〉



西村 勇哉 Yuya NISHIMURA

〔経歴〕 2013年神戸大学大学院工学研究科博士後期課程修了。引き続き近藤昭彦教授のバイオ生産工学研究室のポスドクを経て、2015年から特命助教。2016年に現行へ再置換。

〔専門〕 生物工学 学生時代からドラッグデリバリーシステムの研究に取り組んでいる。最近では、合成生物分野の研究にも取り組んでいる。

〔連絡先〕 nyuya@landscape.kobe-u.ac.jp



荻野 千秋 Chiaki OGINO

〔経歴〕 1997年神戸大学大学院自然科学研究科博士後期課程修了。金沢大学での助手を経て、2007年から神戸大学の准教授に。2016年から教授。

〔主な研究〕 バイオマス資源からのバイオ燃料、化学原料生産・コンビナトリアルに関する研究。インテリジェントバイオリクターおよびドラッグデリバリーシステムの開発。

〔連絡先〕 ochiaki@port.kobe-u.ac.jp



近藤 昭彦 Akihiko KONDO

〔経歴〕 1988年京都大学大学院工学研究科博士後期課程修了。九州工業大学で講師と助教授を経て、1995年から神戸大学の助教授に。2003年から同大学の教授、2016年から同大学の科学技術イノベーション研究科長。

〔主な研究〕 バイオマス資源からのバイオ燃料、化学原料生産・合成生物工学に関する研究、機能性微粒子材料に関する研究。

〔連絡先〕 akondo@kobe-u.ac.jp