

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 腫瘍特異的な低線量放射線治療を実現する無機/有機ハイブリッドナノ粒子の有効性評価
(英語) Inorganic/organic hybrid nanoparticle for achieving tumor-specific and less-invasive radiation therapy
- 研究開発担当者 (日本語) 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 特命助教 西村勇哉
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe university.
Assistant Professor Yuya Nishimura
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) [項目 A] ハイブリ・ナノ粒子の放射線応答性
開発課題名： (英語) [A] Radioresponsiveness of hybrid nanoparticle
- 研究開発分担者 (日本語) 神戸大学大学院工学研究科 教授 荻野千秋
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Engineering, Kobe University. Professor Chiaki Ogino
- 研究開発分担者 (日本語) 千葉大学大学院理学研究科 准教授 沼子千弥
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Chiba University.
Associate Professor Chiya Numako
- 分担研究 (日本語) [項目 B] *in vitro* での放射線照射とハイブリ・ナノ粒子の併用効果
開発課題名： (英語) [B] Combination effect with hybrid nanoparticle and X-irradiation
in vitro
- 研究開発分担者 (日本語) 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 教授 近藤昭彦
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University.
Professor Akihiko Kondo

分担研究 (日本語) [項目 C] *in vivo* でのハイブリッド・ナノ粒子の体内分布と放射線条件の最適化
開発課題名 : (英語) [C] Biodistribution of hybrid nanoparticles and optimization of irradiation condition *in vivo*

分担研究 (日本語) [項目 D] がん細胞特異的な放射線治療に向けたスーパーハイブリッド・ナノ粒子の評価
開発課題名 : (英語) [D] Evaluation of super hybrid nanoparticle designed to tumor-specific X-ray therapy

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学医学部附属病院 特命教授 佐々木良平
所属 役職 氏名 : (英語) Kobe University Hospital. Professor Ryohei Sasaki

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学大学院医学研究科 特命助教 犬伏祥子
所属 役職 氏名 : (英語) Graduate School of Medicine, Kobe university.
Assistant Professor Sachiko Inubushi

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学大学院医学研究科 医学研究員 中山雅央
所属 役職 氏名 : (英語) Graduate School of Medicine, Kobe university.
Medical researcher Masao Nakayama

II. 成果の概要（総括研究報告）

[項目 A] ハイブリ・ナノ粒子の放射線応答性

荻野千秋教授（神戸大学 大学院工学研究科）、沼子千弥准教授（千葉大学 大学院理学研究科）らのグループとともに、ハイブリ・ナノ粒子（PAATiO_x）の粒子構造とラジカル種の同定を行った。粒径は約 100 nm で、血中においても凝集は見られず安定であった。結晶構造はアナターゼ型の酸化チタンと同様の構造をしており、ポリアクリル酸（PAA）修飾の影響は見られなかった。また、X 線照射時のヒドロキシラジカルを同定するために、ESR と APF で定量を行った。しかしながら、検出されたヒドロキシラジカルの量は水と同程度であった。つまり、細胞傷害性の原因はラジカルではなく、粒子に吸蔵されている過酸化水素の影響が示唆された。これを裏付けるように、過酸化水素の徐放を確認した。

また、従来の PAATiO_x に加えて、粒径の異なる粒子を合成するため、5 種類の酸化チタンを検討した。その結果、分散性が良好な約 20 nm の PAATiO_x を得た。PAA の修飾量も 1000 mg が最適であると示された。

[項目 B] *in vitro* での放射線照射とハイブリ・ナノ粒子の併用効果

近藤昭彦教授（神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科）らのグループとともに、ハイブリ・ナノ粒子の放射線増感作用を培養細胞系において証明した。X 線だけを照射した群、酸化チタンナノ粒子（PAATiO₂）と X 線を併用した群と比較すると、PAATiO_x と X 線を併用した群は明らかに細胞傷害性が増加することをコロニーアッセイにより確認した。この効果は 6 種類すべてのがん細胞株で示された。

[項目 C] *in vivo* でのハイブリ・ナノ粒子の体内分布と放射線条件の最適化

佐々木良平（神戸大学医学部附属病院）らのグループとともに、ナノ粒子の経時的な体内分布と X 線との併用による抗腫瘍効果をヌードマウス癌移植モデルを使用して確認した。まず、体内分布の測定では、1 時間・1 日・1 週間後の腫瘍や各臓器におけるチタンの集積量を ICP-AES で測定した。粒子濃度の検討では、濃度依存的に腫瘍への集積量向上が確認された。粒子径の検討では、100 nm と 20 nm の粒子で集積量に大きな影響は見られなかったが、クリアランスの速さへの影響が示唆された。Z_{HER2}-BNC をキャリアとして PAATiO_x を送達した場合（スーパーハイブリ・ナノ粒子）では、腫瘍への特異的な集積量向上が確認された。そして、集積量の向上が確認された高濃度の場合とスーパーハイブリ・ナノ粒子の場合では、X 線との併用によって抗腫瘍効果も確認され、放射線増感効果の有効性が *in vivo* においても示唆された。

[項目 D] がん細胞特異的な放射線治療に向けたスーパーハイブリ・ナノ粒子の評価

すい臓癌を標的化するために、EGFR を標的可能な Affibody:Z_{EGFR} を提示した BNC (Z_{EGFR}-BNC) と anti-EGFR 抗体を提示した PAATiO_x を開発した。今後はこれらの粒子をそれぞれ用いて、体内分布と抗腫瘍効果を確認する。

これらの結果から、PAATiO_x は吸蔵された過酸化水素を細胞内外に送達し、X 線との併用治療で抗腫瘍効果を増大させることを *in vitro* と *in vivo* の両方で証明することに成功した。

[A] Radioresponsiveness of hybrid nanoparticle

We analyzed particle structure and identified radical species of PAATiO_x. The particle size was 100 nm and stable in blood without aggregation. The crystal structure of PAATiO_x was similar to the pattern of anatase-type titanium dioxide and the surface modification of polyacrylic acid (PAA) had no effect. To identify hydroxyl radical produced by X-irradiation, we used ESR and APF. However, the amount of hydroxyl radical was equal to that of water. This result indicated that not radicals but hydrogen peroxide occluded into PAATiO_x is a factor affecting cellular cytotoxicity. The examination of sustained-release of hydrogen peroxide for PAATiO_x supported this idea.

In addition to existing PAATiO_x, we used five types of titanium dioxide to synthesize particles with different size. As a result, we developed highly dispersive PAATiO_x in a size 20 nm and showed the optimum amount of PAA for surface modification.

[B] Combination effect with hybrid nanoparticle and X-irradiation *in vitro*

We demonstrated radiosensitizing effect of PAATiO_x by using cell culture lines. Compared with the case of X-irradiation or PAATiO₂ with X-irradiation, that of PAATiO_x with X-irradiation showed a clear increase in cellular cytotoxicity from the all results of colony assay using six types of cancer cells.

[C] Biodistribution of hybrid nanoparticles and optimization of irradiation condition *in vivo*

We demonstrated time course of biodistribution and antitumor effect using mouse xenograft model. We measured the amount of titanium accumulated in each organ after 1 hour, 1 day and 1 week of tail vein injection by using ICP-AES. In the result of accumulation due to the effect of particle concentration, a dose-dependent increase was detected. The difference of particle size had no effect on the accumulation but seemed to have effect on the rate of clearance. PAATiO_x encapsulated in Z_{HER2}-BNC as a carrier showed tumor-specific accumulation. Furthermore, since combined therapy with X-irradiation and tail vein injection of PAATiO_x through high concentration or the use of Z_{HER2}-BNC showed antitumor effect, it was indicated that radiosensitization efficacy of PAATiO_x is available.

[D] Evaluation of super hybrid nanoparticle designed to tumor-specific X-ray therapy

To target EGFR of pancreatic cancer, we developed affibody: Z_{EGFR}-displaying bio-nanocapsule and anti-EGFR antibody-displaying PAATiO_x. We will evaluate biodistribution and antitumor effect of these particles.

These results indicated that PAATiO_x deliver occluded hydrogen peroxide in and around cancer cells, and enhance antitumor effect in combination with X-irradiation.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 3件）

1. 西村勇哉, 森田健太, 鈴木貴弘, 荻野千秋, 近藤昭彦. 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. 粉砕 THE MICROMERITICS No.60 2017. 2016, 60, 13-19.
2. Nishimura Y, Ezawa R, Ishii J, Ogino C, Kondo A. Affibody-displaying bio-nanocapsules effective in EGFR, typical biomarker, expressed in various cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017, 27(2), 336-341.
3. Morita K, Miyazaki S, Numako C, Ikeno S, Sasaki R, Nishimura Y, Ogino C, Kondo A. Characterization of titanium dioxide nanoparticles modified with polyacrylic acid and H₂O₂ for use as a novel radiosensitizer. *Free Radic Res*. 2016, 50(12), 1319-1328.
4. 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. *Radiat Oncol*. 2016, 11(91).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. (国内・ポスター) 西村勇哉、鈴木貴弘、森田健太、荻野千秋、近藤昭彦、HER2 受容体発現細胞を標的とした DDS キャリアの抗腫瘍効果の評価、生物学若手研究者の集い 夏のセミナー 2016、2016/7/16-17、ホテルコンチネンタル府中（東京都府中市）
2. (国内・ポスター) 森田健太、鈴木貴弘、西村勇哉、松本和久、沼子千弥、佐藤和好、中山雅央、佐々木良平、荻野千秋、近藤昭彦、すい臓がん治療に向けた新規放射線増感剤としての過酸化チタンナノ粒子の in vitro 評価、生物学若手研究者の集い 夏のセミナー2016、2016/7/16-17、ホテルコンチネンタル府中（東京都府中市）
3. (国内・ポスター) 鈴木貴弘、森田健太、西村勇哉、荻野千秋、近藤昭彦、担癌マウスを用いたポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の生体内分布の解明、生物学若手研究者の集い夏のセミナー2016、2016/7/16-17、ホテルコンチネンタル府中（東京都府中市）
4. (国内・ポスター) 森田健太、西村勇哉、鈴木貴弘、荻野千秋、近藤昭彦、ナノ粒子と X 線照射の併用による低侵襲がん治療法の開発、化学工学会第 48 回秋季大会、2016/9/6-8、徳島大学
5. (国内・ポスター) 鈴木貴弘、森田健太、西村勇哉、荻野千秋、近藤昭彦、新規放射線増感治療に向けた過酸化チタンナノ粒子のマウス体内分布特性の調査、化学工学会第 48 回秋季大会、2016/9/6-8、徳島大学
6. (国内・ポスター) 西村勇哉、鈴木貴弘、森田健太、荻野千秋、近藤昭彦、バイオナノカプセルとリポソームの複合粒子による in vivo での抗腫瘍効果、第 68 回日本生物工学会大会、2016/9/28-30、富山国際会議場-ANA クラウンプラザ富山

7. (国内・ポスター) 鈴木貴弘、森田健太、西村勇哉、荻野千秋、近藤昭彦、担癌マウスを用いた過酸化チタンナノ粒子の生体内分布の解明、第 68 回日本生物工学会大会、2016/9/28-30、富山国際会議場-ANA クラウンプラザ富山
8. (国外・ポスター) Nishimura Y, Suzuki T, Morita K, Nakayama M, Inubushi S, Numako C, Ogino C, Sasaki R, Kondo A. Less-invasive anticancer efficacy by a combination of bio-nanocapsule/liposome complex and radiation therapy. International Biotechnology Symposium 2016, 2016/10/24-27, Melbourne, Australia
9. (国内・口頭) 西村勇哉、森田健太、鈴木貴弘、荻野千秋、近藤昭彦、バイオナノカプセルと X 線による新規癌治療法の開発、化学工学会第 82 年会、2017 年 3 月 6-8、芝浦工業大学 豊洲キャンパス
10. (国内・ポスター) 森田健太、鈴木貴弘、西村勇哉、荒井優紀、沼子千弥、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治療の in vitro 評価、化学工学会第 82 年会、2017/3/6-8、芝浦工業大学 豊洲キャンパス

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし