

DNA 標的型金ナノ粒子と放射線治療併用による がん細胞増感制御法

名古屋大学大学院

医学系研究科 総合保健学専攻 助教 余語克紀

産業技術総合研究所

生命工学領域 主任研究員 三澤雅樹

1. 研究の背景・目的

放射線治療は、体への負担が少なく機能温存が可能であり、高齢化が進むわが国のがん治療で有効である。しかし、潜在的な転移巣に対して単独での治療効果は必ずしも十分でなく辺縁からの再発が起り得る。したがって、治療成績のさらなる向上には、原発巣周りの潜在的な転移巣にまで十分な線量を細胞レベルで投与する方法の開発が必要である。原発巣を放射線の集中照射で制御し、同時に周囲の潜在的な転移巣は、その時発生する散乱線を積極的に利用する方法として金ナノ粒子の併用が有望である[1-3]。従来は、十分な治療効果の増強を得るのに、致死量に近い高濃度の金ナノ粒子を必要とし、臨床応用への壁となっていた。放射線によるがん細胞の死滅は、DNA 損傷が引き金になる。我々は、金ナノ粒子に正電荷を修飾し、DNA 指向性を持つ金ナノ粒子を開発した。中間エネルギー帯の γ 線(高線量率小線源治療;380keV)による DNA 損傷に対して、DNA 標的型金ナノ粒子の増強効果を調べたところ、従来より、1,000 倍薄い濃度で十分な DNA 損傷の増強効果(約 1.5 倍)を得られ、金ナノ粒子の用量を減らすための解決の糸口を得た[4]。しかし、DNA 標的型金ナノ粒子と、現在の放射線治療の主流で高エネルギーMV X 線の併用に対して、DNA 実験、細胞実験での実証データはまだない。本研究では、DNA 標的型金ナノ粒子と高エネルギーMV X 線との併用に対して、DNA レベル、および細胞レベルで治療効果上積みの検証を行い、次の動物実験や臨床応用への橋渡しのためのデータを得ることを目的とする。

2. 研究の対象ならびに方法

金ナノ粒子にアミノ基を修飾し、表面をプラス電荷にすることで、DNA 標的型金ナノ粒子とした(粒径 1.4nm)。比較として用いた従来型の金ナノ粒子は、合成の過程で用いたクエン酸により、表面電荷がマイナスとなっている(粒径 2.0nm)。金ナノ粒子は、走査型透過型電子顕微鏡(STEM)による観察、ゼータ電位の測定、動的光散乱法による測定から特性を評価した(粒径、表面電荷など)。一例として金ナノ粒子の STEM 像を図 1 に示した。

DNA 標的型金ナノ粒子の DNA 損傷に対する増強効果を、高エネルギー X 線による DNA 分子の切断能力の違いとして定量化し、比較した。プラスミド DNA と DNA 標的型金ナノ粒子(64 ng/ml)を混合したバッファー溶液を 0.5ml エッペンチューブに封入して高エネルギー X 線照射を行った。効果判定は、X 線によるプラスミド DNA の form 変化を DNA 電気泳動により分離し定量化して行った。DNA 二本鎖切断(DSB)は直線状、一本鎖切断(SSB)は開いた環状、切断なしは超らせん状 DNA のバンドとなるため、照射前後のそれぞれの割合を算出した。金ナノ粒子によって生成された活性酸素種(ROS)を、ROS 蛍光試薬で測定した。

DNA 標的型金ナノ粒子による放射線の増強効果を、細胞レベルで定量化して比較、および細胞毒性を調べた。放射線照射後の培養細胞の生存率を定量化した。細胞の生存率は、蛍光試薬を用いて測定した。DNA 標的型金ナノ粒子のあり/なしで生存率曲線の変化を比較した。効果を検証するがん細胞として、ヒト由来の HeLa(子宮頸がん)を選んだ。

高エネルギー MV X 線は、愛知県がんセンターのリニアック(放射線治療機)からの 6 MV X 線を用いた。

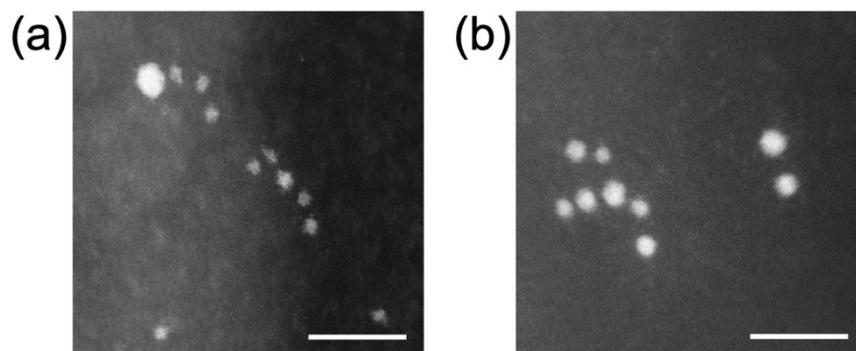


図 1. 金ナノ粒子の走査型透過型電子顕微鏡(STEM)像
(a)DNA 標的型 (b)従来型 スケールバー10nm

3. 研究結果

DNA 損傷に対する効果の実証

DNA 標的型金ナノ粒子は、少量でも高エネルギーX線誘発のDNA損傷(一本鎖および二本鎖切断)に対して有意な増強効果を示した(図2)。DNA標的型金ナノ粒子(+AuNP)のDose enhancement factor(DEF)は、一本鎖切断で 1.4 ± 0.2 、二本鎖切断で 1.2 ± 0.1 であった。一方で、マイナスの金ナノ粒子も、高エネルギーX線によって生じる活性酸素種(ROS)は同様に生成していることが分かった(図3)。これにより、DNA標的型金ナノ粒子(プラスの金ナノ粒子)がマイナスのDNAに結合することで、低い薬剤濃度でも効果的に増強している可能性が示唆された(論文発表1)。

細胞実験の環境整備、X線の照射条件を検討

本研究助成金のもと、細胞実験を行うための研究環境を整備することができた。細胞実験の基本手技を習得し、細胞実験に必要な機器、消耗品、試薬などの購入を進めた。効果を検証するがん細胞として、ヒト由来のHeLa(子宮頸がん)、A549(肺がん)、MIAPaCa2(膵がん)を選び、入手した。細胞への照射法を検討した結果、96 well プレートの水等価プラスチックで挟む方法を採用した。照射した線量が均一であること、照射線量の正確さを、プレート下に置

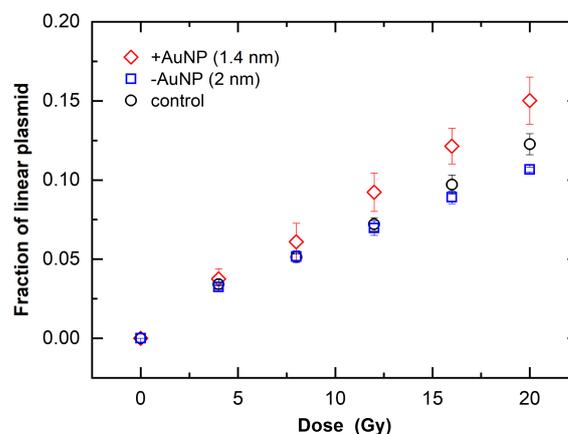


図2. X線照射によるDNA二本鎖損傷

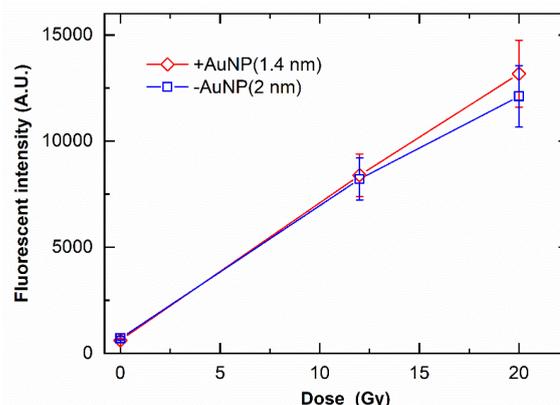


図3. 活性酸素種(ROS)の生成量

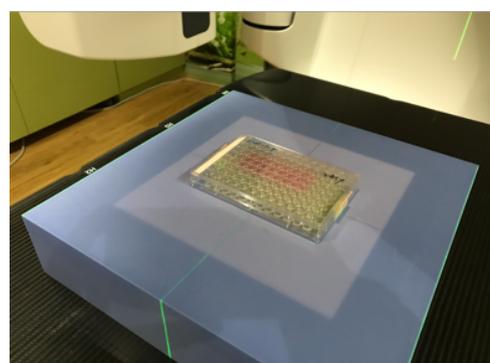


図4.がん細胞へのX線照射の様子

いたフィルムで確認した。実際の照射の様子を図4に示す。

がん細胞への効果検証を開始

まず DNA 標的型金ナノ粒子(+AuNP)の細胞に対する毒性試験を行った。細胞の生存率は、1.4nm 金ナノ粒子(200 ng/ml)では、3日間では80%であったが、5日間では0%であった。核膜孔を通過可能と考えられる粒径の小さな金ナノ粒子は細胞毒性が強いことが分かり、この濃度あたりが最大濃度と考えられる。X線を照射し、線量を変えて、金ナノ粒子併用による細胞の生存率の測定を開始した。まだプレリミナリーなデータで

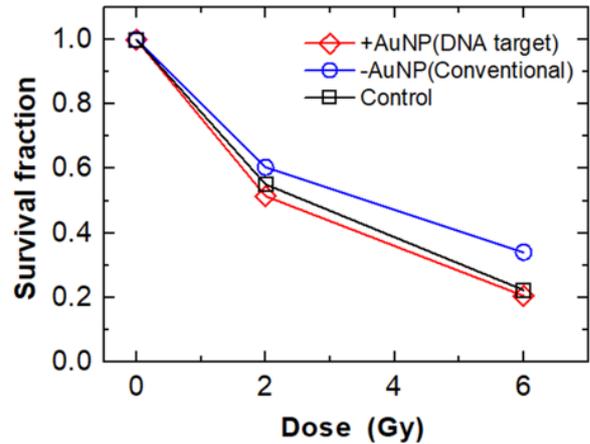


図5. X線照射後の細胞生存率

あるが、残念ながら、現在までのところ、DNA 標的型金ナノ粒子(+AuNP)と従来型金ナノ粒子(-AuNP)、および対象(Control)との間に、有意な効果増強は見られていない(図5)。

4. 考察

本年度は、本研究助成金のもと、高エネルギーMV X線を用いた研究を開始し、研究環境を整備することができた。DNA 標的型金ナノ粒子と高エネルギーMV X線の併用によって、X線誘発のDNA損傷に対して増強効果の実証データを得られた。高エネルギーX線は現在の放射線治療の主流であり、本提案手法が多くのがん患者へ適応できる可能性を示すことができた(論文発表1)。

細胞実験の環境整備を進め、がん細胞に対する治療上積みの検証実験を開始し、プレリミナリーなデータが出始めた。残念ながら、現在までのところ、DNA 標的型金ナノ粒子による有意な効果増強はまだ見られていない。今後、DNA 標的型金ナノ粒子の投与の最適化、さらにデータ数の追加を行い、実験データを固めていく予定である。もし増強効果が十分でない場合は、がん細胞への集積性などを評価し、課題を明らかにする。DNA 標的型金ナノ粒子の粒径、濃度、投与のタイミングおよび培養時間を変えて、金ナノ粒子の局在を調べ、細胞への集積、細胞内取

込みと核近傍への移行、いずれに課題があるのか明らかにする。金ナノ粒子をさらに機能修飾することで課題の解決を目指したい。

本研究助成のもと、高エネルギーMV X線を用いた細胞実験の立ち上げを行うことができた。また金以外の新規ナノ粒子の研究(放射線ナノメディスンの開発)にも発展しており、今後数年でいくつかの成果へつながると考えられるデータを得ている。さらに学内研究費(1件)や学外資金(2件)の獲得につながった。共同研究者の支援の輪も広がっており、今後、中・大型予算の獲得につなげていきたいと考えている。最後に、貴重な研究の機会をいただきました本助成、また評価いただきました審査員の先生方、サポートいただきました事務局の方々に、心から感謝申し上げます。

5. 文献

1. JF Hainfeld, FA Dilmanian, DN Slatkin, HM Smilowitz, Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *J Pharm Pharmacol* (2008), 60: 977-985.
2. P Retif, S Pinel, M Toussaint, C Frochet, R Chouikrat, T Bastogne, M Barberi-Heyob, Nanoparticles for radiation therapy enhancement: the key parameters. *Theranostics* (2015), 5: 1030-1044.
3. Y Chen, J Yang, S Fu, J Wu, Gold nanoparticles as radiosensitizers in cancer radiotherapy. *Int J Nanomedicine* (2020), 15: 9407-9430.
4. K Yogo, M Misawa, M Shimizu, *et. al.*, Effect of gold nanoparticle radiosensitization on plasmid DNA damage induced by high-dose rate brachytherapy, *Int J Nanomedicine* (2021), 16: 359-370.

6. 論文発表

1. K Yogo, M Misawa, H Shimizu, T Kitagawa, R Hirayama, Ishiyama, H Yasuda, S Kametaka and S Takami, Radiosensitization Effect of Gold Nanoparticles on Plasmid DNA Damage Induced by Therapeutic MV X-rays, *Nanomaterials* (2022), 12(5): 771.
2. 余語克紀、平山亮一、保田浩志、三澤雅樹、総説「プラスミド DNA 損傷を指標とした放射線保護剤/増感剤の探索-放射線治療併用のアミノ酸と金ナノ粒子を中心として-」、

放射線生物研究 *Radiation Biology Research Communications* 56(3), 260-279, 2021

3. 余語克紀ほか、がん治療用 X 線による DNA 損傷に対する金ナノ粒子の放射線増感効果、第 69 回応用物理学会 春季学術講演会、相模原、2022 年 3 月 22-26 日ハイブリッド開催；オンライン参加、口頭発表
4. 余語克紀ほか、Radiosensitization effect of gold nanoparticles on plasmid DNA damage induced by therapeutic MV X-rays、第 3 回 CIBoG リトリート (第 14 回 NAGOYA グローバルリトリート)、2022 年 2 月 19 日 オンライン開催；オンライン参加、口頭発表
5. 余語克紀ほか、放射線誘発の DNA 損傷を指標とした放射線防護剤・増感剤の探索、広島大学 第 3 回 放射線災害・医科学研究拠点 ワークショップ、2022 年 2 月 8 日、オンライン参加、口頭発表 (招待)