

「緑茶成分でコートした金ナノ粒子による効率的な乳がん放射線治療法の開拓」

神戸大学大学院工学研究科

大谷 亨

1 研究の背景と目的

乳がんは、女性のがんの中で最も多いがんであり、死亡率も増加傾向にある。乳がん治療は臨床病期に応じて選択されるが、乳房部分切除術等の手術を選択した場合は、温存した乳房やリンパ節での再発の危険性を低くするために、放射線治療が行われることが多い。しかしながら、総線量で50グレイの照射が行われ、正常組織への負担も大きい。そこで本研究では、光電子効果（放射線によって放出されるエネルギーの大きさ）の大きい金粒子に着目し、がん組織へ選択的に取り込まれる緑茶成分を金粒子にコートし、これをがん組織へ集積化させることで、低線量でかつ低負荷での乳がん放射線治療法の確立を目的とした。具体的には、緑茶に含まれる分子（(-)-エピガロカテキン-3-ガレート(EGCG)）を認識する受容体のがん細胞に高発現していることに着目し、これを新たに金粒子に固定化させることで金粒子を生体内のがん細胞に高濃度で蓄積させることが可能かどうかを検証した。さらに、培養乳がん細胞へEGCG-金ナノ粒子(Fig. 1)を取り込ませ、X線照射後の細胞死への影響についても検証した。

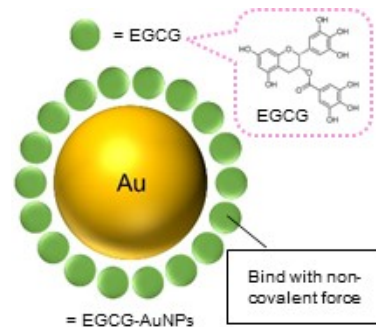


Fig.1 Image of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-coated gold(Au) nanoparticles.

2 研究方法・研究内容

① EGCG 被覆金ナノ粒子 (EGCG-Au) の調製と物性解析

EGCGの水溶液(9mlの超純水中に1mg、2mg、4mg、10mgおよび20mgのEGCGをそれぞれ溶解)を調製し、続いて、1mlの塩化金酸溶液(4mM)を攪拌下でそれぞれのEGCG溶液に滴下した。これらによりEGCG:金ナノ粒子の混合質量比が1:2、1:1、2:1、5:1、および10:1とした。EGCG-Auのサイズは、動的光散乱(DLS)によって解析し、粒子表面のゼータ電位測定からも被覆状態を評価した。また、紫外可視吸収スペクトル測定を行い、金ナノ粒子の凝集状態に応じた表面プラズモン状態を考察した。さらにEGCG-Auの形態を、透過型電子顕微鏡(TEM)観察からも評価した。粒子1mg当たりのEGCG含量は高速液体クロマトグラフィーから定量し、金含量は誘導結合プラズマ発光分光分析(ICP-AES)から定量した。

② 培養細胞による金ナノ粒子の取り込み評価

がん細胞として、緑茶成分EGCGを特異的に認識する受容体を過剰に発現していることが知られているヒト乳腺癌由来細胞(MDA-MB-231細胞)およびヒト子宮頸癌由来細胞(HeLa細胞)を用い、対照としてこの受容体を発現していない正常細胞(NIH3T3細胞)を用いた。それぞれの細胞を、24時間のインキュベーション後、培地を含むEGCG被覆金ナノ粒子(10uM、EGCG当量)に置き換えた。細胞を3時間または24時間処理した後、緩衝液で3回すすぎ、トリプシン処理後、細胞数をカウントし、この細胞懸濁液王水で消化し、超純水で希釈して、ICP-AES測定を行った。

③ 担がんマウスを用いた体内動態評価

BALBc nu/nu 雌 6 週齢マウスの背側皮下に MDA-MB-231 株を移植した。約 3 週間後に皮下腫瘍組織の生着増大を確認し、EGCG-Au 投与実験を行った。マウスの尾静脈より EGCG-Au 溶液 (10mg/ml, 100 μ l) を注射投与した。30 分、1 時間、24 時間の後、各マウスをサクリファイスし評価臓器を採取した。このとき、評価する臓器：血、心、肺、肝、脾、腎、脳 と 腫瘍(右、左)とした。各臓器を王水で消化し、ICP-AES 測定を行った。

④ X線照射による培養乳がん細胞死への影響

MDA-MB-231 細胞を PMI 1640 培地とともに 24 時間インキュベートし、その後、培地を、クエン酸塩処理-Au (10 μ g)、EGCG-Au (1 : 2) (10 μ gAu 濃度) を含培地と交換した。24 時間後、細胞を D-PBS で洗浄し、次に 1ml の新鮮な培地を加えた。細胞に 160kV、3.0 mA の X 線 (放射線源とウェルの間の距離 : 300 mm) を照射した。これは、1 回の分割で 0~8 Gy の総線量 (0.608 Gy / min) に相当する。照射後、細胞を洗浄し、トリプシン処理し、96 ウェルプレートにウェルあたり 5×10^3 細胞の密度で播種した。細胞を 1 日間インキュベートして、細胞接着させ、細胞生存率を算出した。

3 研究成果

1. EGCG 被覆金ナノ粒子 (EGCG-Au) の調製と物性解析

混合質量比が 1 : 2 から 10 : 1 に増加すると、EGCG-Au の色は赤から青に変化し、絶対サイズは 37~135 nm の範囲で増加し、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察から、形態は球状からウニ形状へと変化した (Fig.2)。粒子 1mg 当たりの EGCG 含量は高速液体クロマトグラフィーから定量したところ、EGCG 導入量は、飽和値として 0.72~0.84mg / mg 粒子であることがわかった。また、動的光散乱 (DLS) 測定から EGCG-Au (1 : 2) が最も安定性が高いことを実証した。

2. 培養細胞による金ナノ粒子の取り込み評価

ICP-AES 測定から、正常 (NIH3T3) および癌性 (HeLa および MDA-MB-231) 細胞における EGCG-Au およびクエン酸塩処理-Au の細胞内取り込みを評価した (Fig.3)。EGCG を有していないクエン酸塩処理-Au は、癌性細胞への取り込みが低い傾向がみられた。EGCG-Au については、HeLa 細胞と NIH3T3 細胞での取り込みを比較すると、EGCG 濃度が高くかつ粒径の大きな EGCG-Au (5 : 1 と 10 : 1, ~135nm) が容易に取り込まれた (Fig.3)。EGCG は HeLa 細胞表面には EGCG 受容体が存在しており、この受容体を介した取り込みがあるものの、10-100 nm 程度の粒子系の Au ナノ粒子は、エキソサイトーシス機構により細胞外へ排泄されるとの報告があることから、粒径の大きな EGCG-Au (5 : 1 と 10 : 1, ~135nm) は、エキソサイトーシス率が低く細胞に留まるのではないかと

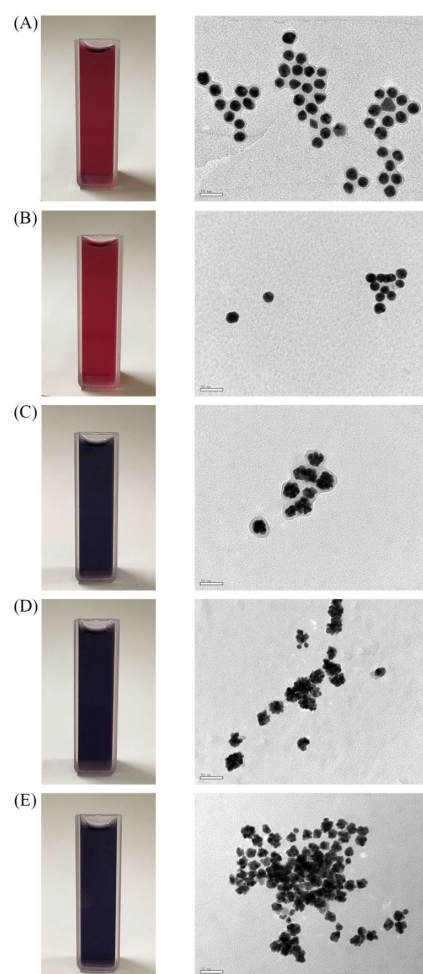


Fig.2 Appearance and transmission electron microscopy micrographs of EGCG-Au prepared at different ratios of EGCG and gold. (A) 1:2, (B) 1:1, (C) 2:1, (D) 5:1, (E) 10:1.

考えられた。

一方、MDA-MB-231 細胞では、粒子サイズの小さい EGCG-Au (1:2, ~37nm) が3時間で最も多く取り込まれていた (**Fig. 3**)。MDA-MB-231 細胞では、MDA-MB-231 細胞に特別なエンドサイトーシスメカニズムが存在していることが報告されており、30nm の粒子はクラスリンおよびカベオラを介したエンドサイトーシスを介して取り込まれる。このことから、乳がん細胞に関しては EGCG-Au (1:2, ~37nm) が適切であることを見出し、これを動物実験に用いることとした。

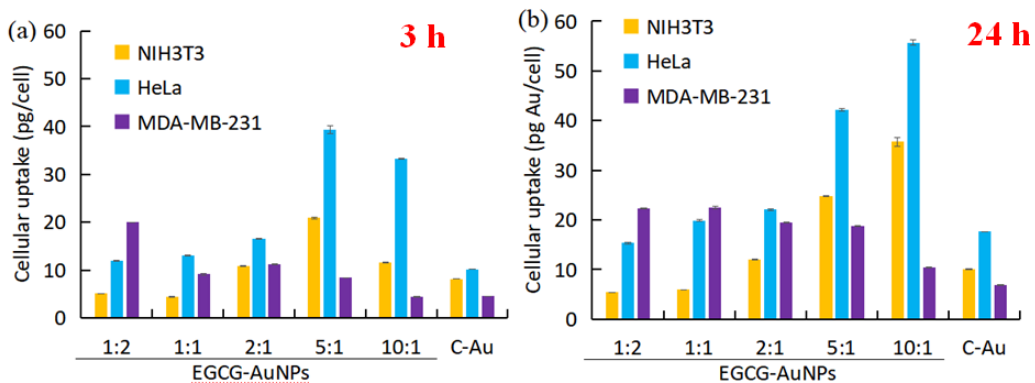


Fig.3 Cellular uptake of EGCG-Au or Citrate-AuNPs (C-Au) in NIH3T3, HeLa or MDA-MB-231 cells after (a) 3 h or (b) 24 h

3. 担がんマウスを用いた体内動態評価

尾静脈より血管内投与した EGCG-Au (1:2) は、30 分後に肺, 脾に最も集積した (その後漸減した)。一方、肝組織の集積は僅かで、皮下腫瘍の集積は十分に認められた。これまでの研究報告では、(金属)ナノ粒子は肝臓のクッパー細胞、脾臓のマクロファージによる取込みが多く、腫瘍への取り込まれないため、いかに腫瘍細胞へデリバリーするかが、放射線増感剤の開発研究の課題であった。粒子径が 100nm を超えると肝/脾臓への集積が増加するため、動物を用いる研究では、静脈投与ではなく腫瘍内投与や経口/腹腔内投与が用いられてきた。EGCG-Au (1:2) は、肺や脾臓への取込みは多いものの、血液内濃度より腫瘍内濃度(集積)が高く、肺や脾臓を避けた放射線照射療法において、十分期待できる結果が得られた。

4. X線照射による培養乳がん細胞死への影響

MDA-MB-231 細胞への X 線照射を実施し、EGCG-Au (1:2)、クエン酸処理-Au が放射線増感を増強したかどうかを検証した。このときの濃度は、 $10 \mu\text{M}$ の EGCG-AuNP (1:2) 添加後も MDA-MB-231 細胞が 90%以上の生存率を維持できたことを予備的に確認していたため、細胞取り込み用の Au の量は $10 \mu\text{g}$ に固定した。

コントロール (D-PBS)、EGCG-AuNP (1:2)、クエン酸処理-Au で処理した MDA-MB-231 細胞の細胞生存率 (Surviving Function: SF) (%) を、さまざまな 0-8Gy の線量照射で行ったところ、6, 8Gy の線量において EGCG-AuNP (1:2) がクエン酸処理-Au よりも有意に SF (%) を減少させた (**Fig. 4**)。さらに、EGCG-AuNPs (1:2) の効果は、クエン酸塩-AuNPs の効果よりも大きかった。コントロール (D-PBS) においても SF (%) は 65%まで減少していたことから、放射線照射による細胞へのダメージもあるが、EGCG-AuNP (1:2) での約 40%までの SF (%) の低下は、MDA-MB-231 細胞への EGCG-AuNPs (1:2) 取り込み効果によるものと考えられる。

5. 今後の課題

動物実験のデータからは EGCG-Au (1:2) は、肺や脾臓への取込みが多い傾向が見られた。これは血液中での血中成分の吸着により粒子径が増大している可能性が考えられる。よって、血中でのタンパク質等の吸着を抑制する手法の開発が課題と考えている。

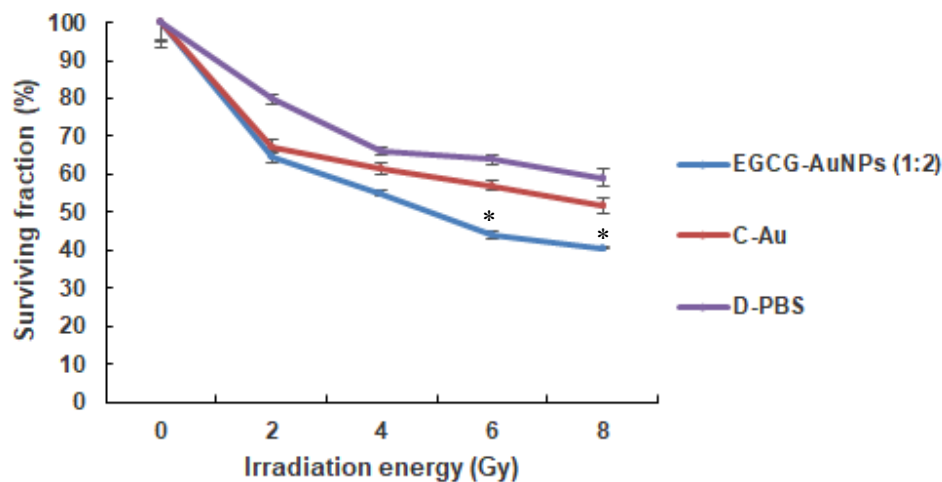


Fig.4 Surviving fraction of MDA-MB-231 cells after x-ray irradiation to study the radiation dose enhancement by EGCG-Au (1:2) (18.25 μ g, including AuNPs 10 μ g and EGCG 8.25 μ g), Citrate-AuNPs (10 μ g of Au), or D-PBS to MDA-MB-231 cells (Mean \pm S.E., n=7-10) (*p<0.01 vs C-Au).

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究により、乳がん組織に選択的に放射線増感作用のある Au ナノ粒子を送達する知見が得られた。乳がんをはじめとして転移再発後のがん治療で、完治を得られる治療方法は今だ確立していない。また、放射線治療は、疼痛緩和など支持療法の側面が強い。それは皮膚など体表組織や腫瘍周囲の正常組織へ被ばく障害を認め、その治療効果に限界があるためである。本知見は化学的なアプローチと物理的な放射線治療のアプローチを融合した新しい治療法への展開が期待できる。また、乳がんのみならず、放射線の局所療法が適用可能な脳腫瘍、頭頸部がん、食道がん、肺がん、前立腺がん、子宮頸がんなどへの適用が見込める。

【成果発表】

1. Ning Gan, Sachiko Inubushi, Tomonari Kunihisa, Sachiko Mizumoto, Motoi Baba, Hirokazu Tanino, Tooru Ooya, Size-Dependency of Selective Cellular Uptake of Epigallocatechin Gallate-Modified Gold Nanoparticles for Effective Radiosensitization, *submitted*.