

学位論文題名

Novel Photodynamic and Sonodynamic Therapy using Water-dispersed TiO₂-polyethylene Glycol Compound: Evaluation of Anti-tumor Effect on Glioma Cells

(グリオーマ細胞に対する水散性二酸化チタンを用いた
光線力学・超音波力学療法の検討)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】光線力学療法(Photodynamic therapy; PDT)は悪性新生物に対する治療の補助療法の一つの候補として認知されつつある。悪性脳腫瘍、なかでも特に予後不良である悪性神経膠腫に対しても応用が模索されている。さらに、PDT から由来した治療法である音響力学療法(Sonodynamic therapy; SDT)は PDT の弱点を克服する新たな治療法として大いに期待されている。SDT は触媒物質の励起に超音波(US)を用いることで、光励起で問題となる励起エネルギーの組織深達度を大幅に改善できる可能性があり、かつ、理論的には US エネルギー焦点の集中も可能なため、これまで PDT では困難であった脳腫瘍などの腫瘍で、かつ切除困難な深部腫瘍を標的にできる可能性がある。

二酸化チタン(TiO₂)は光触媒物質の一つであり、紫外線(UV)で励起させることにより水溶液中で非常に強力な酸化ラジカルを発生することが知られている。この物質を PDT に用いる試みは以前から研究されていた。この TiO₂ が US によっても同様に酸化ラジカルを発生させることが最近報告された。さらに、TiO₂ は元来水溶液中で凝集してしまう不溶性の物質であり生体内への投与に不向きであったが、TiO₂ 粒子にポリエチレングリコール(PEG)を修飾することで、水溶液中で約 50nm の大きさで安定した非凝集性ナノ粒子の作成に成功した。本研究の目的は、この新規製剤を用いた PDT や SDT に関して glioma 細胞を用いて *in vitro* で検証することである。

【材料と方法】PEG で修飾された TiO₂ ナノ粒子(TiO₂/PEG)の基本的な特性と神経膠腫細胞に対する細胞障害性を確認するため、C6 rat glioma 細胞とその Spheroid モデルを用い、UV を励起方法として PDT に関する実験を行った。TiO₂/PEG との共培養時間は治療前 3 時間とし、単層培養における生存率測定には MTT assay を使用、Spheroid モデルではその直径を測定することによる成長曲線にて抗腫瘍細胞効果を評価した。細胞障害機序は Annexin V-FITC と Propidium iodide(PI)を用いた蛍光免疫染色によって評価した。

SDT に関しては、ヒト膠芽腫細胞である U251 を使用して、PDT との比較検討にて行った。US 照射装置は民生機である SONICMASTER® (OG Giken, 1.0 MHz, 1.0W/cm²)を使用した。単層培養における細胞障害の評価は、TiO₂/PEG 溶液を 100 μg/ml、共培養を治療前 3 時間とし、生存率測定は治療後 24 時間で MTT assay を用いて行った。さらに、細胞障害機序解明のため様々な蛍光免疫染色を行い、PDT との比較検討を行った。また、細胞障害における酸化ラジカル関与を検討する目的で、酸化ラジカル阻害剤である glutathione を用いて PDT・SDT における細胞障害抑制効果を検討した。

【結果】1000 μ g/ml までの TiO₂/PEG 溶液と C6 細胞は 24 時間の共培養で毒性は確認されなかった。TiO₂/PEG を蛍光色素 Rhodamine で標識して C6 細胞と共培養させ、細胞への取り込みを蛍光顕微鏡にて確認したところ、TiO₂/PEG は細胞膜上もしくは細胞質内に存在することが示唆された。細胞障害効果は、単層培養では TiO₂/PEG の濃度、UV の照射強度、両者に依存して増強することが確認され、500 μ g/ml の TiO₂/PEG において 13.5J/cm² の UV 照射により 90%以上の細胞が死滅した。Spheroid モデルにおいては、control 群と比較し、PDT 群において成長抑制効果を得ることができたが、成長を完全に止めることはできなかった。蛍光免疫染色では、PDT 群において 6 時間後から Annexin V-FITC で染色される細胞が出現、引き続いて PI で染色される細胞が増加することが確認された。

SDT においては、US 照射単独でも軽度の細胞障害が出現したが、TiO₂/PEG 共培養による US 照射の場合は殺細胞効果が著明に増強された。また、PDT と SDT の単層培養細胞に対する細胞障害の比較検討においては、両群で細胞障害機序の相違が認められた。蛍光免疫染色を用いた細胞障害の観察では、SDT 群において、治療直後から細胞膜の viability が消失している細胞が出現することが確認され、これは PDT 群では認められない現象だった。さらに酸化ラジカル阻害剤である glutathione を添加して UV・US 照射を行ったところ、PDT では細胞障害が完全に抑制されたのに対し、SDT では細胞障害抑制効果は十分ではなかった。

【考察】TiO₂/PEG には、非励起状態では細胞障害がないこと、神経膠腫細胞に水溶液中で細胞内へ取り込まれる可能性があることが判明した。水溶液中で約 50nm で安定した拡散性を有している同製剤は、生体内で EPR 効果 (Enhanced permeability and retention effect) により脳腫瘍内への移行が期待される。一方で、正常脳組織には BBB (Blood brain barrier) が存在し、理論的には同製剤は脳組織内への移行はないことになる。腫瘍細胞選択性という観点からも TiO₂/PEG の可能性が示唆された。

TiO₂/PEG は UV 励起によって神経膠腫細胞に対する細胞障害効果があることが確認でき、US 照射でも細胞障害を著明に増強し、同剤を用いた SDT の可能性を示すことができた。また、SDT の細胞障害機序は PDT によるものとは異なるものであることが推測された。これまでにも光感受性物質である porphyrin 関連製剤を用いた SDT の基礎実験において、PDT と SDT の細胞障害機序の相違点は指摘されていた。本研究では、この相違点を明確に検出するために免疫染色を使用した。その結果、PDT における細胞障害は酸化ラジカルを介した反応によるアポトーシスが主であると考えられ、これは治療から一定の時間が経過してから細胞障害を惹起した。一方、SDT における細胞障害は、酸化ラジカルを介した反応だけではなく、治療直後から細胞膜に対して強い障害を与える反応が関与していることが推測された。治療直後からの細胞膜障害は US 照射単独ではほとんど起こらないため、TiO₂/PEG の関与は確かである。SDT における細胞障害は励起された触媒物質による細胞膜の物理的損傷が強く関与していることが報告されており、これは触媒物質と細胞の距離が近いことが重要であると言われている。TiO₂/PEG は腫瘍細胞膜上に存在、または細胞質内に取り込まれることが予想され、この物理的細胞損傷が SDT における重要な作用機序と推測された。

【結論】新規製剤である水散性 TiO₂/PEG を用いて神経膠腫細胞に対する PDT や SDT の可能性を in vitro で示した。両治療法による細胞障害機序が異なっていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 伸 哉
副 査 教 授 三 輪 聡 一
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 石 川 正 純
副 査 教 授 寶 金 清 博

学位論文題名

Novel Photodynamic and Sonodynamic Therapy using Water-dispersed TiO₂-polyethylene Glycol Compound: Evaluation of Anti-tumor Effect on Glioma Cells

(グリオーマ細胞に対する水散性二酸化チタンを用いた
光線力学・超音波力学療法の検討)

本研究では、悪性神経膠腫細胞に対して、新規製剤である二酸化チタン化合物を用いた光線力学療法・音響力学療法の基礎実験を行い、その治療効果を検討した。二酸化チタンは従来から光線力学療法に対して有用視されていたが、光を励起方法に用いるにあたり、その深達度が問題点として挙げられていた。本研究では、ポリエチレングリコール(PEG)を二酸化チタン粒子に重合させた製剤を新規に用い、従来までの二酸化チタン製剤と同様に、光触媒効果を介した殺細胞効果が得られることを示し、さらに励起方法を超音波に変更してもその触媒効果が発揮されて殺細胞効果が得られることを示した。また、光触媒による殺細胞効果と超音波触媒による殺細胞効果が異なっていることを蛍光免疫染色などの手法等を用いることにより明瞭に示した。脳腫瘍を含めた深部腫瘍に対する新規補助治療の一つとして音響力学療法が検討されているが、その際に用いる超音波触媒物質のひとつの候補として、本製剤が挙げられることが期待される。

本研究では、細胞障害に関して、光励起の場合は触媒効果により二酸化チタンから発生した酸化ラジカルを介した apoptosis が主であることが示された。一方、超音波励起の場合には apoptosis に加えて、二酸化チタン粒子の microcavitation などが引き起こされることによる物理的細胞障害も起こっている可能性が示された。光線力学療法の細胞障害機序の検討はこれまでも報告されているが、apoptosis が主であるという報告や necrosis が主であるという報告など様々である。これは励起方法である光エネルギーの強度にも大きく依存すると考えられる。本研究では比較的弱い光エネルギー (5.0mW/cm²) を使用したために、apoptosis が主体となった細胞障害が出現したと考察した。また、超音波を励起方法として用いる場合、超音波エネルギーそのものによる細胞破壊や超音波により発生した熱によって生じる細胞障害が問題となる。この点に関しては、本研究で使用した超音波

照射装置が市販の簡易的な超音波照射装置を用い（照射装置の reading output で 1.0 W/cm^2 ）、超音波のエネルギーとしては比較的小さいこと、さらに超音波照射による実験系の温度上昇を避ける目的で、照射装置と細胞の間に buffer (6% acrylic-acid gel) を用いたことで、細胞に与える実際の照射エネルギーが出力エネルギーから 75%程度減弱していたこと、などから、超音波そのものによる細胞障害を可能な限り回避したと考察した。しかしながら、実際に二酸化チタンを用いなかった場合にも音響力学療法の場合にはある程度の細胞障害が起こっていたことは事実であり、さらに弱い超音波エネルギーでの実験も考慮される必要があった。また、予備実験においては、腫瘍細胞だけではなく正常神経細胞においても二酸化チタンを用いた光線力学療法や音響力学療法では細胞障害が認められた。正常組織に対する細胞障害が懸念される結果となったが、本製剤(二酸化チタンと PEG の化合物) は水溶液中で約 50nm 強で安定して存在することが示されており、この粒子径であれば、EPR 効果 (enhanced permeability and retention effect) によりある程度の腫瘍細胞選択性が期待できるため、正常組織障害は回避できるのではないかと考察された。

音響力学療法については、現在徐々に臨床応用が進みつつある。音響力学療法の利点としては、超音波を励起方法と使うことによって組織深達度が優れていることと、エネルギーの焦点化を行えることにある。実際、婦人科領域では high focused ultrasound (HIFU) という超音波照射装置を用いて、子宮筋腫の治療などに応用されている。これらの現在臨床応用されている治療方法は超音波により治療標的部位の温度を上げ、その熱エネルギーで組織障害を起こすことを目標としている。この超音波エネルギーは非常に強く、厳密には申請者が目指す超音波力学療法とは異なっている。しかし、この超音波を標的に集中させる技術を応用し、周囲脳組織に障害を与えない弱いエネルギーを腫瘍組織に与え、同時に腫瘍細胞内に選択的に超音波感受性物質が存在していることで、効果的な音響力学療法を行うことが出来るのではないかと考察された。

この論文は、腫瘍治療において新規補助治療である超音波力学療法における基礎的な論文となりうる可能性があり、今後の in vivo 研究や臨床研究への発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。