

C324

非侵襲性がん治療に向けた高機能性二酸化チタンナノ粒子の開発

(神大工)○(学)唐崎 美樹・(神大院工)(学)松井 かずさ・(学)瀬川 麻衣子・(神大研究環)(正)田中 勉・
(神大院工)(正)近藤 昭彦・(正)荻野 千秋*

【緒言】

ガン細胞を選択的に死滅させることができれば、ガン治療法として非常に有効である。そこで、本研究では、二酸化チタンを用いてガン細胞を特異的に死滅させる技術の開発を目指した。二酸化チタンは紫外光を照射するとラジカルを発生する性質を持つ。そこで、二酸化チタンをガン細胞特異的に集積させ、そこへ紫外光や放射線等のエネルギーを加えて局所的にラジカルを発生させることで、ガン細胞を特異的に死滅させることができると期待される。本研究では、ガン細胞を標的とする二酸化チタンナノ粒子の作製及びそのガン細胞特異性について検討した。

【実験方法】

2.1. 目的タンパク質の発現・精製

ラクダ由来の一本鎖抗 EGFR 抗体の遺伝子(1a)を pET32 に導入し、大腸菌 BL21(DE3)に形質転換した。これを LB 培地で 37°C、150 rpm で OD₆₀₀ = 0.8 になるまで本培養し、終濃度 0.5 mM になるように IPTG を加えた後、25°C で 16 時間発現を誘導した。その後、His タグによってアフィニティー精製し、抗 EGFR 抗体を得た。

2.2. タンパク質修飾ナノ粒子の調製

二酸化チタンの中性付近での凝集を防ぐため、粒子の表面にポリアクリル酸を固定化した PAATiO₂ を作製した。さらに、化学修飾法により抗 EGFR 抗体を固定化し、抗 EGFR 抗体修飾二酸化チタン (PAATiO₂-1a) を作製した。同様の方法を用いて GFP 修飾二酸化チタンも作製した。これらを SDS-PAGE を用いて評価した。

2.3. 抗 EGFR 抗体修飾二酸化チタンのガン細胞特異性及び UV 照射による細胞障害性

抗 EGFR 抗体修飾二酸化チタンの HeLa 細胞特異性及び UV 照射による影響を調べるため、蛍光顕微鏡により生細胞・死細胞の判別を行った。生細胞は calcein AM により緑色、死細胞は Ethidium homodimer-1 により赤色の蛍光で示される。二酸化チタンは STS-01 の粒子を用い、終濃度 1%(v/v) に調整し、添加した。粒子添加後、3 J/cm² あるいは 1 J/cm² で UV を照射し、生細胞・死細胞を蛍光顕微鏡にて評価した。

【結果と考察】

調製した抗 EGFR 抗体修飾二酸化チタンの粒子を、SDS-PAGE で評価したところ、抗 EGFR 抗体が固定化された粒子が濃縮ゲル相に凝縮されていることが確認できた。固定化後の抗 EGFR 抗体は抗体結合活性を有していることが確認され、また固定化後の粒子のラジカル発生能も確認された。

続いて、抗 EGFR 抗体修飾二酸化チタン (PAATiO₂-1a) を添加し、UV 照射を行った場合の蛍光顕微鏡像を Figure 1 に示す。UV は PAATiO₂-1a が最も多量のラジカルを発生する 3J/cm² を照射し、UV 照射後すぐに観察を行った。Figure 1(c)より、赤色の死細胞が観察されたことから、PAATiO₂-1a はガン細胞特異性を有し、UV 照射により発生したラジカルが細胞の生存に影響を与えることが確認された。また、Figure 1(a)の UV の照射のみの細胞や、Figure 1(b)の二酸化チタンと抗 EGFR 抗体の混合物を添加し UV を照射した細胞では、死細胞はほとんど見られなかった。さらに、UV 照射量を 1J/cm² とし、PAATiO₂-1a 添加 24 時間後に観察した場合も、死細胞が観察された。

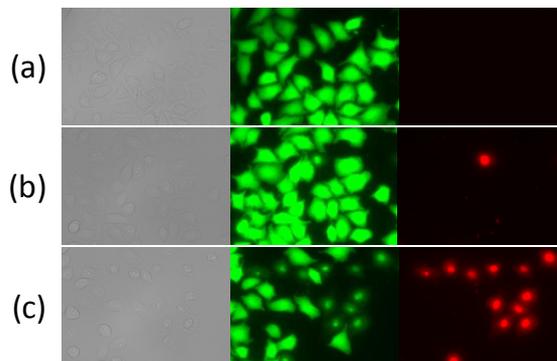


Fig.1. HeLa cell viability after UV irradiation.
(a) Untreated (b) PAATiO₂ + 1a (c) PAATiO₂-1a

【結言】

二酸化チタンナノ粒子に抗体を固定化し、ガン細胞特異性を付加する技術の開発に成功した。また、作製したナノ粒子と UV の照射を併用することで、細胞のみを特異的に死滅させる技術の開発に成功した。

*TEL 078-803-6193

E-mail : ochiaki@port.kobe-u.ac.jp