Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Gold nanoparticles enhance X-ray irradiation-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma in vitro

Teraoka, Shun

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2019-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7334号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007334

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Gold nanoparticles enhance X-ray irradiation-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma *in vitro*

頭頸部扁平上皮癌細胞のアポトーシスに対する金ナノ粒子の放射線増感性

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
口腔外科学
（指導教員：古森　孝英教授）

寺岡　駿

【緒言】

頭頸部癌は新規症例数が毎年50万を超える、国際的に懸念される疾患である。好発部位は口腔であり、病理学的には扁平上皮癌が最も一般的である。放射線療法は、頭頸部扁平上皮癌の現在の治療戦略において重要な役割を担っている。

放射線療法における最大の課題は、抗腫瘍効果を増強し、周囲の健康な組織への損傷を軽減することである。多くの研究が有望な放射線増感剤と見なされるAuの投与を始めとして、健康な組織に対する影響を最小限に抑えつつ、腫瘍の放射線感受性を増大させることを目指してきた。金ナノ粒子（AuNP）の放射線増感に対する細胞の生物学的応答は、活性酸素および酸化ストレス、DNA損傷の誘発、細胞周期効果およびバイスタンダー効果などによるものと報告されている。

様々な細胞株を用いたAuNPの放射線増感に関する研究が数多く存在するが、ヒト頭頸部癌細胞を用いた研究は希少である。ある研究では、ヒト頭頸部癌細胞におけるAuNPの局在依存性細胞傷害（localization-dependent cytotoxicity）について示しており、別の研究ではAuNPが細胞周期制御を介してヒト頭頸部癌細胞の化学療法感受性を増強すると報告されている。しかし、我々の知る限りではヒト頭頸部扁平上皮癌細胞におけるAuNPの放射線増感を評価した研究はない。本研究では、AuNPがヒト頭頸部癌細胞に対するX線照射の効果を増強する可能性を有するかどうかを検討した。

【材料と方法】

ヒト頭頸部癌腫細胞株HSC-3（舌癌）と直径5nmのAuNPおよびX線照射装置を使用した。37℃で24時間細胞を培養した後に、AuNP投与あるいはX線照射し、さらに48時間培養後に細胞数、細胞増殖およびアポトーシスを評価するための実験を行った。AuNPは濃度が0nM、0.1nM、0.4nM、1.0nM、10nMになるように投与し、X線照射線量は0Gy、2Gy、4Gy、8Gyとした。さらにAuNP1.0nM投与とX線照射4Gyの併用も行った。その場合は同様に24時間培養後AuNP投与し、投与直後にX線照射を行い48時間培養後に評価した。

まずDAPIによる染色を行いDAPI陽性核の数を蛍光顕微鏡にてカウントした。次にCCK-8溶液で細胞を処理し、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度測定し増殖阻害効果を評価した。さらにTUNEL法でアポトーシス細胞を検出、蛍光顕微鏡を用いてアポトーシス細胞の数を計測し、細胞の総数で割って比率を検討した。

未処理群、AuNP単独投与群、X線単独照射群、AuNP投与およびX線照射併用群について、一元配置分散分析およびTukey-Kramer多重比較試験を行い、有意水準を5%とした。

【結果】

DAPI染色により総細胞数を計測したところ、AuNP単独投与では濃度に関係なく細胞数に影響は認めなかった。X線単独照射では、濃度依存的に有意な細胞数減少を認めた。また、細胞傷害性を有する最も低いX線照射線量が4Gyであることが示されたため、AuNPとの相乗効果を確認する実験のX線照射線量を4Gyとした。AuNP1.0nM投与とX線照射4Gyの併用では、X線単独照射4Gyと

比較して細胞数を有意に減少させた。

さらに、X 線照射と AuNP 投与併用による総細胞数減少の背景機序を解明するために、増殖アッセイおよびアポトーシスアッセイを行った。細胞増殖は、AuNP 単独投与および X 線単独照射、AuNP 投与と X 線照射の併用による処理では影響を受けなかった。対照的にアポトーシスは AuNP1.0nM 投与と X 線照射 4Gy の併用では 4Gy 単独照射と比較し、TUNEL 陽性アポトーシス細胞数の有意な増加を認めた。

【考察】

頭頸部癌に対する治療が奏功し長期生存の可能性が増えた昨今、QOL 低下を防ぐため周囲組織への影響を重視する必要がある。健康な周囲組織における放射線の影響を最小限に抑えるための解決策の 1 つに、放射線増感剤が挙げられる。頭頸部癌は、放射線増感剤の開発が極めて有益な疾患の 1 つと考えられている。

過去の報告で AuNP は単独投与で細胞特性に影響を与えることが報告されている。AuNP それ自体が細胞傷害性を有する場合、臨床応用を検討する際に問題となる。AuNP 自身の細胞傷害性に焦点を当てた研究では、細胞障害性は AuNP の濃度および直径に依存すると報告されている。それらの報告をもとに、我々は比較的細胞傷害性が低いとされている直径 5nm の AuNP を選択し、HSC-3 細胞における低濃度での効果をまず測定した。それらの濃度における直径 5nm の AuNP 投与は培養後の総細胞数に影響を及ぼさず、HSC-3 細胞に対し細胞傷害性を認めなかった。

次に AuNP が放射線増感剤としての可能性を有するかどうかを決定するため、X 線単独照射および AuNP 投与と X 線照射との併用効果を評価した。増殖アッセイとアポトーシスアッセイの結果から、総細胞数の減少はアポトーシスの誘導に起因するものであり、細胞増殖率の低下に起因するものでないことが考えられた。HSC-3 細胞を用いた過去の報告によると、4Gy の X 線単独照射 48 時間後の細胞増殖能はコントロール群と比較して差がなかったことや、X 線単独照射群に比べ AuNP 高濃度投与および X 線照射 25Gy 併用群でアポトーシス細胞数が有意に高かったと報告されている。今回の結果では、AuNP1.0nM 投与と X 線照射 4Gy の併用が、X 線単独照射 4Gy と比較し、アポトーシス誘発効果の増強を示したため、AuNP1.0nM 投与が放射線誘発アポトーシスを増強するのに十分であり得ることを示した。放射線誘発アポトーシスは、放射線照射後の主要な細胞死のメカニズムの 1 つと考えられており、DNA 修復や細胞周期停止および細胞老化、アポトーシスに関連するとされている。しかし、X 線照射に対する組織特異的応答、X 線照射によって活性化されるアポトーシスの調節を決定する細胞因子、および特定の状況下での放射線誘発アポトーシスの背景機序は未だ解明されていない。

本研究は、X 線照射が HSC-3 細胞の培養物中の総細胞数を有意に減少させ、AuNP 投与が X 線照射の効果を増強することを明らかにした。また、X 線単独照射および AuNP 投与と X 線照射を併用による総細胞数の減少は、アポトーシスの誘導に起因し、細胞増殖の阻害によるものではないことが示された。

本研究の問題点は、活性酸素および酸化ストレス、DNA 損傷誘発、細胞周期効果およびバイスタンダー効果など、細胞増殖能およびアポトーシス以外の因子が評価されなかったことである。今後はそれらの因子に関してもさらなる研究が必要である。

【結論】

今回の研究で、AuNP は in vitro でヒト頭頸部癌細胞に対する X 線照射の細胞障害性を増強する可能性を有しており、この細胞傷害性の原因は細胞増殖の阻害ではなく、アポトーシスの誘導によるものであると示唆された。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2827 号	氏 名	寺岡 駿
論文題目 Title of Dissertation	Gold nanoparticles enhance X-ray irradiation-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma *in vitro* 頭頸部扁平上皮癌細胞のアポトーシスに対する金ナノ粒子の放射線増感性		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 村上 卓道 副 査 Vice-examiner 丹生 健一 副 査 Vice-examiner 赤 [illegible] 治人		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

頭頸部癌は新規症例数が毎年 50 万を超える、国際的に懸念される疾患で、病理学的には扁平上皮癌が最も一般的である。その治療において、放射線療法は重要な役割を担っているが、最大の課題は、抗腫瘍効果を増強し、周囲の健康な組織への損傷を軽減することである。これまで多くの研究が有望な放射線増感剤と見なされる Au の投与を始めとして、健康な組織に対する影響を最小限に抑えつつ、腫瘍の放射線感受性を増大させることを目指してきた。金ナノ粒子（AuNP）の放射線増感に関する研究が数多く存在するが、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞における AuNP の放射線増感を評価した研究はない。本研究では、AuNP がヒト頭頸部癌細胞に対する X 線照射の効果を増強する可能性を有するかどうかを検討した。

「材料と方法」

ヒト頭頸部癌腫細胞株 HSC-3（舌癌）と直径 5nm の AuNP および X 線照射装置を使用した。37℃で 24 時間細胞を培養した後に、AuNP 投与あるいは X 線照射し、さらに 48 時間培養後に細胞数、細胞増殖およびアポトーシスを評価するための実験を行った。AuNP は濃度が 0nM、0.1nM、0.4nM、1.0nM、10nM になるように投与し、X 線照射線量は 0Gy、2Gy、4Gy、8Gy とした。さらに AuNP1.0nM 投与と X 線照射 4Gy の併用も行った。その場合は同様に 24 時間培養後 AuNP 投与し、投与直後に X 線照射を行い 48 時間培養後に評価した。

染色は DAPI により行い DAPI 陽性核の数を蛍光顕微鏡にてカウントした。次に CCK-8 溶液で細胞を処理し、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度測定し増殖阻害効果を評価した。さらに TUNEL 法でアポトーシス細胞を検出、蛍光顕微鏡を用いてアポトーシス細胞の数を計測し、細胞の総数で割って比率を検討した。

未処理群、AuNP 単独投与群、X 線単独照射群、AuNP 投与および X 線照射併用群について、一元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較試験を行った。

「結果」

DAPI 染色により総細胞数を計測したところ、AuNP 単独投与では濃度に関係なく細胞数に影響は認めなかった。X 線単独照射では、濃度依存的に有意な細胞数減少を認めた。また、細胞傷害性を有する最も低い X 線照射線量が 4Gy であることが示されたため、AuNP との相乗効果を確認する実験の X 線照射線量を 4Gy とした。AuNP1.0nM 投与と X 線照射 4Gy の併用では、X 線単独照射 4Gy と比較して細胞数が有意に減少した。

さらに、X 線照射と AuNP 投与併用による総細胞数減少の背景機序を解明するために、増殖アッセイおよびアポトーシスアッセイを行った。細胞増殖は、AuNP 単独投与および X 線単独照射、AuNP 投与と X 線照射の併用による処理では影響を受けなかった。対照的にアポトーシスは AuNP1.0nM 投与と X 線照射 4Gy の併用では 4Gy 単独照射と比較し、TUNEL 陽性アポトーシス細胞数の有意な増加を認めた。

「考察」

AuNP 自身の細胞傷害性に焦点を当てた研究では、細胞障害性は AuNP の濃度および直径に依存す

ると報告されている。それらの報告をもとに、申請者らは比較的細胞傷害性が低いとされている直径 5nm の AuNP を選択し、HSC-3 細胞における低濃度での効果をまず測定した。それらの濃度における直径 5nm の AuNP 投与は培養後の総細胞数に影響を及ぼさず、HSC-3 細胞に対し細胞傷害性を認めなかった。

次に AuNP が放射線増感剤としての可能性を有するかどうかを決定するため、X 線単独照射および AuNP 投与と X 線照射との併用効果を評価した。増殖アッセイとアポトーシスアッセイの結果から、総細胞数の減少はアポトーシスの誘導に起因するものであり、細胞増殖率の低下に起因するものでないことが考えられた。HSC-3 細胞を用いた過去の報告によると、4Gy の X 線単独照射 48 時間後の細胞増殖能はコントロール群と比較して差がなかったことや、X 線単独照射群に比べ AuNP 高濃度投与および X 線照射 25Gy 併用群でアポトーシス細胞数が有意に高かったと報告されている。今回の結果では、AuNP1.0nM 投与と X 線照射 4Gy の併用が、X 線単独照射 4Gy と比較し、アポトーシス誘発効果の増強を示したため、AuNP1.0nM 投与が放射線誘発アポトーシスを増強するのに十分であることを示した。放射線誘発アポトーシスは、放射線照射後の主要な細胞死のメカニズムの 1 つと考えられており、DNA 修復や細胞周期停止および細胞老化、アポトーシスに関連するとされている。しかし、X 線照射に対する組織特異的応答、X 線照射によって活性化されるアポトーシスの調節を決定する細胞因子、および特定の状況下での放射線誘発アポトーシスの背景機序は未だ解明されていない。

本研究は、頭頸部扁平上皮癌細胞において、放射線感受性に対する生物学的応答を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった　金ナノ粒子の放射線感受性や細胞傷害性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。