



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第2029号
学位記番号	第412号
氏名	LIU JIN
授与年月日	令和6年3月22日
学位論文の題名	光温熱療法用中空金ナノ粒子とジエチルジチオカルバミン酸銅を用いた新規がん治療法の開発
論文審査担当者	主査： 湯浅 博昭 副査： 尾関 哲也，平嶋 尚英，梅澤 直樹

光温熱療法用中空金ナノ粒子とジエチルジチオカルバミン酸銅を用いた
新規がん治療法の開発

令和5年度（2024年3月）

名古屋市立大学大学院薬学研究科

創薬生命科学専攻

薬物送達学分野

LIU JIN(劉 進)

本論文は、2024年2月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 教授 湯浅 博昭

副査 教授 尾関 哲也

教授 平嶋 尚英

教授 梅澤 直樹

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1. J. Liu, T. Tagami, K. Ogawa, and T. Ozeki.

Development of hollow gold nanoparticles for photothermal therapy and their cytotoxic effect on a glioma cell line when combined with copper diethyldithiocarbamate .*Biol Pharm. Bull* 47,272-278(2024)

本論文の基礎となる研究は、尾関 哲也教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物送達学分野において行われた。

【略語表】

AgNO₃ (Silver nitrate, 硝酸銀)

BBB (Blood-brain barrier, 血液脳関門)

DDTC-Cu (Copper diethyldithiocarbamate, ジエチルジチオカルバミン酸銅)

DSF (Disulfiram, ジスルフィラム)

HAuCl₄ (Chloroauric acid, 塩化金酸)

HGNPs (Hollow gold nanoparticles, 中空金ナノ粒子)

NIR (Near-infrared, 近赤外線)

NPL4 (Nuclear protein localization-4, 核局在化タンパク質-4)

PDI (Polydispersity index, 多分散性指数)

PTT (Photothermal therapy, 光熱療法)

PVP (Polyvinylpyrrolidone, ポリビニルピロリドン)

TEM (Transmission electron microscopy, 透過型電子顕微鏡)

HSP (Heat shock proteins, 熱ショックタンパク質)

LSPR (Localized Surface Plasmon Resonance, 局在表面プラズモン共鳴)

PBS (Phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水)

1. 研究背景

グリオーマは中枢神経系の脳腫瘍であり、原発性脳腫瘍の約 80%を占める [1, 2]。グリオーマは神経膠腫であり、グレード IV の膠芽腫は、予後不良で再発率および死亡率が高い。化学療法は、手術および放射線療法とともに、グリオーマに対する必須の治療手段である。しかし、腫瘍部位への効率的な薬物送達は、薬物分子を含む様々な物質の脳内輸送を制御する血液脳関門 (BBB) によって妨げられている。現在、ドラッグデリバリー技術の研究が行われており、効率的な薬物送達のためのアプローチがいくつか報告されている。例えば、BBB に特異的なリガンドを添加した薬物/ナノメディシン [3]、マイクロ/ナノバブルと超音波の併用、BBB を脱出するための鼻から脳への経路アプローチ [4] などが提案されている。その一方でカルムスチンウェハーのような局所化学療法剤は、抗がん剤を腫瘍部位に直接送達することができ、BBB を通過する必要がないため、腫瘍部位に高濃度の薬物を投与することができる。しかし、薬物の浸透性が悪く、化学療法抵抗性があるため、その応用には限界があるのが現状である [5]。

ナノメディシンは、脳腫瘍細胞などを標的とするように設計された、ナノテクノロジーを応用した医薬品、またはナノ粒子・ナノ材料ベースの医薬品であり、抗がん剤やナノキャリアを必要な時間、必要な部位、必要なタイミングで効率的に送達することを可能にするものとして期待されている [6-9]。従来型のナノメディシンは、生体親和性の高い、生体膜と同じ構成成分であるリン脂質からなるナノカプセルであるリポソームや血清タンパクのアルブミンを構成成分とするアルブミンナノ粒子、そして生体内に多く存在する鉄を構成成分とするナノ粒子がよく知られている。最近では、それ以外にも鉄以外の金属ベースのナノ粒子や無機物ナノ粒子が新しいナノメディシンとして期待されており、臨床試験が行われて

いる[10]。これらは、従来型のナノメディシンにはない特性を有しており、例えば、イメージングが可能な光学的性質を有している。生体内に投与するため、細胞毒性や体内動態などの詳細な検査が必要である一方で、がんなどの難治性疾患を治療する場合において、リスク・ベネフィットの観点で、これらの次世代型のナノメディシンが有効になるかもしれない。

光温熱療法 (Photo Thermal Therapy、PTT) は、がん細胞を光で加熱する低侵襲な治療法であり、PTT を利用した様々なナノメディシンが研究されている[11-15]。例えば、近赤外線 (NIR) 光 (700~1000 nm または 1100 nm) は、血液や組織による光吸収に影響を与える可視光線と比較して、体組織を深く透過することができる。NIR レーザーと吸収剤を用いた併用療法ががん治療のために研究されており、さまざまなナノ材料や化合物による効率的な光吸収とそれに対する PTT の効果も研究されている。各種吸収剤を使用した PTT の研究例として、グラフェンナノシート[16、17]、インドシアニンググリーン[18]、ホウ素ジピロメテン誘導体[19]が挙げられる。また、大きなアスペクト比を持つ金ナノ粒子 (金ナノロッド[20、21]、ナノスター[22、23]、ナノシェル[24、25]、ナノケージ[26、27]など) は、可視光よりも長い波長の光を吸収することができるため、PTT に関する研究が行われている (Fig. 1)。

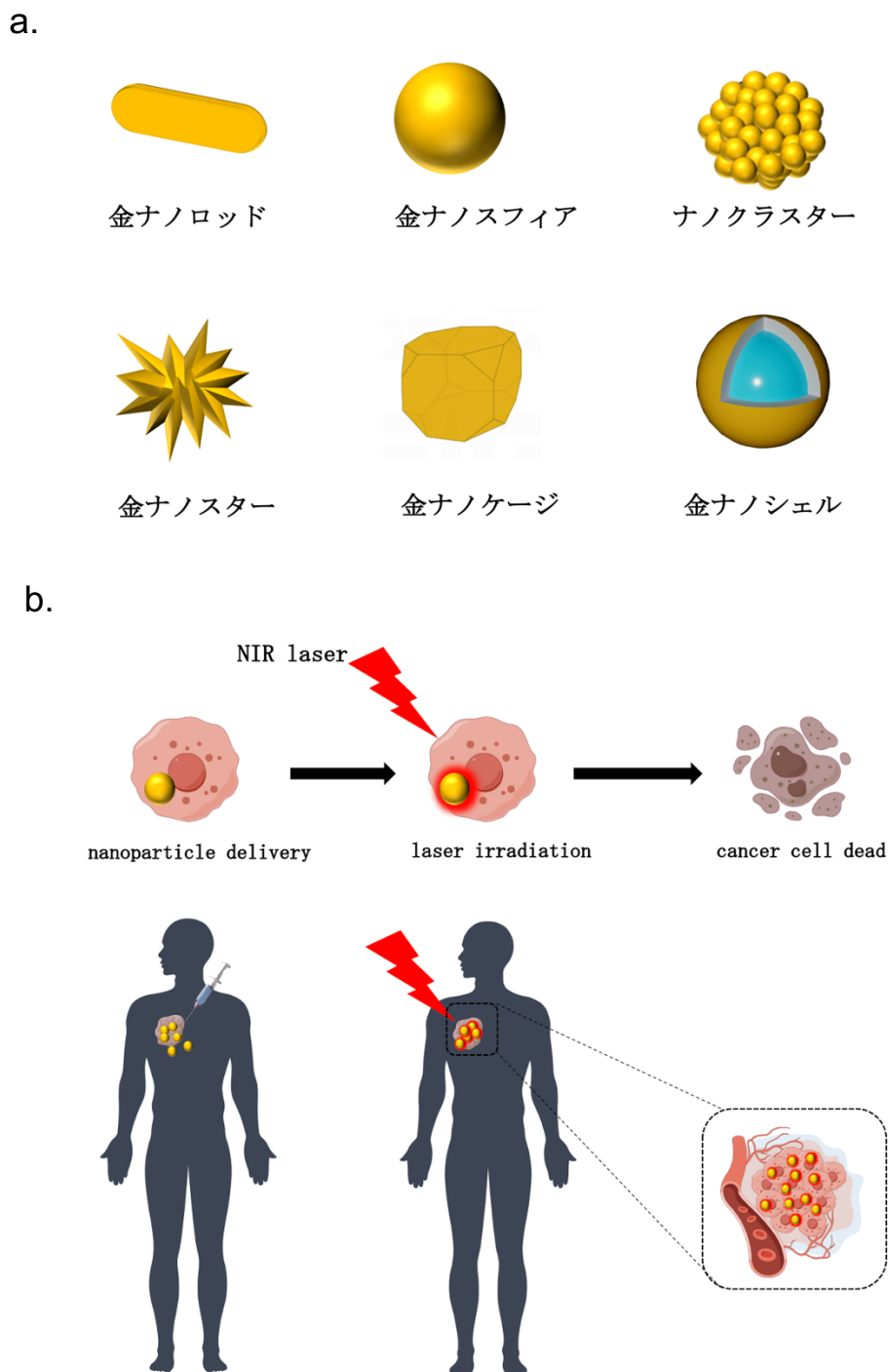


Fig. 1. (a) Different types of gold nanoparticles, and (b) the application of PTT in the treatment of cancer.

中空金ナノ粒子 (HGPN) は、金ナノシェルやナノケージと同様に、各ナノ粒子に空洞を持ち、広い範囲 (550~950 nm) で調整可能な吸収帯を持つ機能性金ナノ粒

子の一種である[28]。いくつかのタイプの HGNP は、ナノ孔を有した表面構造を有している。HGNP のワンステップ調製が報告されており[29]、これは費用対効果の観点から有利であるだけでなく、簡便に作製できるため実用化にも有利である。事前の文献調査によると、HGNP は薬学以外の異分野で多くの研究が行われてきた。例えば、HGNP は、高い触媒特性を示すことから、燃料電池触媒としての有用性が研究されている[29]。HGNP はまた、4-ニトロフェノールの還元による環境浄化のための触媒的研究[30]や、次世代蓄電デバイスのための電気化学的スーパーキャパシタとしても研究されている[31]。金ナノ粒子で装飾された中空およびコアシェル金属ナノ粒子は、光触媒にも使用されると報告されている[32, 33]。医療分野における HGNP の応用としては、バイオアッセイ用センサー[28]やドラッグデリバリーにおける PTT への用途[34, 35]などが報告されている。金ナノ粒子の PTT 特性は、局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) と、エンクロージャーの内部と外部の間の強いプラズマ結合から生じる[36]。HGNP はポーラス（「ホットスポット」）と突起（「チップスポット」）構造をもち、プラズモニック結合によって HGNP に生成される様々な電磁的「ホットスポット」と粒子表面「チップスポット」が、超高効率の光-熱変換効率を実現している[37]。

しかしながら、熱ショックタンパク質 (HSP) は PTT 治療においてしばしば過剰発現され、がん細胞の熱ストレス耐性を高め、PTT 効果の悪化をもたらす[38, 39, 40]。抗がん剤は高温の熱と相乗効果を示すため、PTT で発生した熱は直接的に薬剤の殺細胞効果を高め、より高い細胞毒性を示す[41]。したがって、PTT の効果を高め、副作用を軽減するためには、PTT と化学療法を組み合わせることで、

HSP の発現を抑え、がん細胞の熱感受性を高め、抗がん効果を向上させることができる。

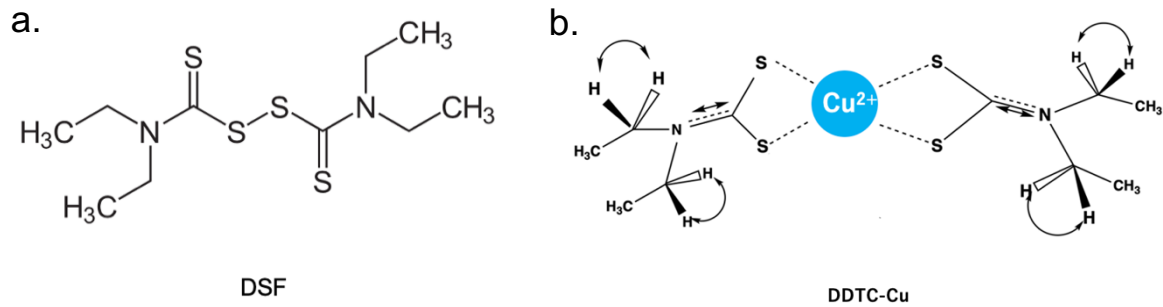


Fig. 2. (a) Structure of disulfiram (DSF), and (b) the structure of DDTC-Cu.

今回の検討では、ドラッグリポジショニング/ドラッグリパーパス薬であるジスルフィラム(DSF) (Fig. 2a)に焦点をあてた。ドラッグリポジショニング/ドラッグリパーパス薬は、もともと従来研究開発されてきた医薬品において、別の薬理効果が確認されたものについて、その治療薬として使用されているものである。ミノキシジルを例にすると、もともとミノキシジルは高血圧の薬として研究開発されていたが、発毛の薬として現在販売されている。また抗ウイルス薬であるレムデシビルやアビガンのような薬が、新型コロナウイルス感染症のくすりとして期待されていたのは記憶に新しい。抗がん剤を含む新薬の探索には絶えまない努力が払われているが、新しい抗がん剤の開発には、成功のために多額の投資が必要である。また、従来の抗がん剤は、薬剤耐性のために治療効果が妨げられる。このため、ドラッグリポジショニング/ドラッグリパーパス薬は、ある程度安全性が担保されていることから、医薬品開発プロセスに有効な戦略としてスポットが当てられている。がんに対するドラッグリポジショニング/ドラッグリパーパス薬として、例えば、コレステロール低下剤であるスタチン[42]、抗マラリア薬であるアルテミシニン[43]、骨粗鬆症、ページェット病の治療薬であるアミノビスホス

ホネート[44]、2型糖尿病の第一選択薬であるメトホルミン[45]などが抗がん剤として研究されている。

DSF はアルコール依存症の治療に用いられる嫌酒薬である。DSF は、食品医薬品局 (FDA) が推奨する用量で、安全性と治療効果が確立されている [46]。DSF は、ドラッグリポジショニング/ドラッグリパーパス薬として、がんを含むいくつかの疾患に対して有望であり、抗がん効果を有している。DDTC は DSF の代謝産物であり、銅との複合体(DDTC-Cu)化によりがん治療薬として研究されている。DSF と DDTC による銅のキレート化には強力な抗がん作用があり、薬剤耐性を改善することができるだけでなく、活性酸素種の産生を誘導し、がん遺伝子のシグナル伝達経路 (マイトジェン活性化プロテインキナーゼ、核内因子 κ B など) を制御する [47, 48]。Skrott らは、DDTC-Cu が核局在化タンパク質-4 (NPL4) と結合して凝集を誘導し、重要な p97-NPL4-ユビキチン融合分解タンパク質 1 経路を無効にして細胞死を引き起こすことを報告している [49]。また、DDTC-Cu はナノメディシンの研究において、リン脂質からなるリポソームやナノ粒子に組み込まれて検討された例があるが情報が少ないのが現状である [50, 51]。

DSF および DSF と銅を併用した治療は、グリオーマを含む様々ながんの治療薬として臨床試験が行われている (Table 1)。DSF と Cu の併用が GBM に有効であるという十分な前臨床エビデンスがある [52]。しかしながら、Huang らの研究では、化学放射線療法後に診断されたグリオーマの治療にジスルフィラムとテモゾロミドを併用する第 I 相試験の研究が行われている。この結果より、ジスルフィラムはテモゾロミドと安全に併用できるが、可逆的な神経毒性を引き起こす可能性があることがわかった [53]。単剤治療と比較すると、2 つ以上の治療モダリティを使用するマルチモーダル併用療法は、個々の治療法の利点を活かし、より低用量の治療薬で高い抗がん効果をもたらす、高用量の薬物を使用することにより生じる人体組

織への副作用を軽減する[54]。複数の治療様式を通じて腫瘍を相乗的に治療することができ、その結果、治療効果の向上と副作用の軽減という目標を達成することができる。したがって、DDTC-Cuによる毒性副作用を減らし、PTTの効果を高めることで、本研究はHGNPによるPTTとDDTC-Cuによる化学療法を併用した。

Clinical trials of DSF or DSF/Cu in patients with cancer.					
Model	Compound	Study	Start Year	Status	Clinic trial ID
Breast Neoplasm Female Metastatic Breast Cancer	DSF, Cu	Phase II	2017	Recruiting	NCT03323346
Prostate Cancer	DSF	Phase I	2010	completed	NCT01118741
Prostate Cancer	DSF,Cu	Phase I	2017	terminated	NCT02963051
Metastatic Pancreatic Cancer	DSF,Cu	Phase II	2019	terminated	NCT03714555
Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma Refractory Malignant Solid Neoplasm Stage IV Pancreatic Cancer AJCC v8	DSF , Gemcitabine Hydrochloride	Phase I	2016	Active, not recruiting	NCT02671890
Refractory Solid Tumors Involving the Liver	DSF,Cu	Phase I	2008	completed	NCT00742911
Non-small Cell Lung Cancer	DSF	Phase II/III	2006	completed	NCT00312819
Germ Cell Tumor	DSF	Phase I	2019	completed	NCT03950830
Multiple Myeloma	DSF,Cu	Phase I	2021	terminated	NCT04521335
Relapsed Sarcomas	DSF,Cu,Doxil	Phase I	2023	Recruiting	NCT05210374
Melanoma	DSF,chelated zinc	Phase II	2010	completed	NCT02101008
Metastatic Melanoma	DSF,Arsenic trioxide	Phase I	2006	terminated	NCT00571116
Stage IV Melanoma	DSF	Phase I/II	2002	completed	NCT00256230
Glioblastoma	DSF,Cu,TMZ	Early Phase I	2013	completed	NCT01907165
Glioblastoma ,Glioblastoma Multiforme	DSF,Cu,TMZ	Phase II	2018	terminated	NCT03363659
Glioma,Glioblastoma	DSF,Cu,Alkylating Agents	Phase II/III	2017	completed	NCT02678975
Glioblastoma	DSF,Metformin	Early Phase I	2018	terminated	NCT03151772
Recurrent Glioblastoma	DSF,Cu,TMZ	Phase II	2017	completed	NCT03034135
Glioblastoma Multiforme	DSF,Cu,TMZ	Phase I/II	2016	Active, not recruiting	NCT02715609
Glioblastoma	DSF,TMZ	Phase I/II	2016	completed	NCT02770378

Table 1. Clinical trials of DSF or DSF/Cu in patients with cancer .

(ClinicalTrials.gov において、“Disulfiram”, “cancer”, “copper”で検索
(2024 年 1 月現在) 。文献 47 の表を参考に新しい臨床試験を新たに構成した。)

2. 本研究の目的

以上の研究背景から、本研究では、PTT に有用な HGNP の調製に焦点を当て、実験条件を変化させた場合に形成される粒子の物理化学的、光学的、光熱特性を評価し、単一工程で HGNP を調製した場合、粒子の形成において起きている現象を理解することに努めた。次に、ドラッグリポジショニング薬として注目されている DSF の代謝物である DDTC-Cu に着目し、グリオーマ細胞株に対する *in vitro* 条件における殺細胞効果を評価し、HGNP による PTT と DDTC-Cu によるグリオーマに対する併用療法に関する研究は、我々が知る限りまだ研究されていない。今回の研究においては、HGNP による PTT と DDTC-Cu を併用することによる、グリオーマに対する効果を明らかにすることを目的とする。

3. 材料と機器

3.1 試薬

塩化金酸 (HAuCl_4):FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan

ポリビニルピロリドン K30 (PVP Wt. 40000) :Tokyo Chemical Industry,
Tokyo, Japan

ジエチルジチオカルバミン酸銅(II) :Tokyo Chemical Industry, Tokyo,
Japan

塩化銅(II) :Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan

ハイドロキノン :Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan

硝酸銀(AgNO_3) :Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan

亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3) :Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan

N,N-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム三水和物 (DDTC) :Wako Pure
Chemical Industry, Osaka, Japan

クロロホルム :Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan

C6 ラットグリオーマ細胞株 :ATCC, Rockville, MD, USA

D-MEM :Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan

牛胎児血清 :Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA

ペニシリン :FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan

Cell Counting kit-8 :Dojindo, Kumamoto, Japan

3.2 機器

紫外可視分光光度計 (UV-1800; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

動的光散乱装置 (ZetaSizer Nano series; Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

凍結乾燥機 (FD-1000; EYELA, Tokyo, Japan)

マイクロプレートリーダー (Nivo 3S; PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA)

透過型電子顕微鏡 (TEM) (JEM-1400Plus; JEOL, Tokyo, Japan)

660 nm レーザー (MDL-XD-660-3W、Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd., Changchun, China)

サーモカメラ (CPA-0170; CHINO Corporation, Tokyo, Japan)

4. 方法

4.1 中空金ナノ粒子の調製

以前に報告された HGNP を合成するためのワンステップテンプレート法を、以前の文献を参考にして作製した[28]。AgNO₃ (10 mM, 600 μL)、ハイドロキノン (90 mM, 400 μL)、および PVP 溶液 (1%, 45 mL) をビーカー中で攪拌しながら、0°C (氷浴) で 3 分間混合した後、600 μL の HAuCl₄ (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM) を制御された速度 (50 μL/min, 100 μL/min, 150 μL/min または 200 μL/min) で滴下し、サンプルをさらに 30 分間攪拌した。その後、1 mL の濃アンモニア水 (25%) を加え、AgCl テンプレートを除去した。溶液を 5000rpm で 5 分間遠心し、サンプルを回収して水で 2 回洗浄した。特に、20mM の HAuCl₄ を 50 μL/min の速度で滴下して調製した HGNP を、その後の実験で評価した。比較検討として金ナノスターを使用した。調製方法は以前の文献に従った[23]。

4.2 粒子径と表面電荷測定

HGNP サンプルの平均粒子径と多分散性指数 (PDI) は、動的光散乱法により測定した。水に分散させた HGNP (800 μL) 試料をキュベットにロードし、ZetaSizer を用いて測定を行った。試料を 25°C に設定した温度で測定した。また、サンプルのゼータ電位の測定も行った。

4.3 光学特性

プレートマイクロプレートリーダー (Nivo 3S) を使用してサンプルの吸光度を 400 nm から 1000 nm までスキャンすることによりサンプルの紫外可視吸光スペクトルを得た。

4.4 透過型電子顕微鏡 (TEM)

水に分散したサンプルをカーボンコーティングされたグリッドにロードし、TEM (JEM-1400Plus) によって観察した。

4.5 660 nm レーザーの照射およびサーモグラフィによる温度モニタリング

1.5mL マイクロチューブに入れた HGNP 試料 (500 μ L。6.3、12.4、18.4、24.5 または 36.6 μ g/mL) を固定し、660 nm のレーザー (MDL-XD-660-3W) を 1.5W/cm² で 10 分間照射した。マイクロチューブ内の試料の温度を測定するため、サーモカメラ (CPA-0170) を用いて 30 秒間隔で記録した。

間欠的・断続的なレーザー照射では、HGPN 試料に 660 nm のレーザーを 5 分間照射した後、試料を室温で自然に冷却し、再びレーザー光を照射した。このレーザー照射の「on と off」のサイクルを、3 回行った。

4.6 細胞培養

C6 ラットグリオーマ細胞は、抗生物質と 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地を入れた細胞培養ディッシュで維持され、CO₂ インキュベーター内で 37°C で培養された。

4.7 WST-8 アッセイ

C6 細胞を 1 ウェル (100 μ L) 当たり 1×10^4 個の密度で播種し、24 時間前培養した。DDTC、DDTC-Cu、HGPN、または HGPN と異なる濃度の DDTC-Cu の混合物を添加し、1 時間インキュベートした。細胞をレーザー光で処理するため、レーザー (660 nm、1.5W/cm²) を 2~5 分間照射した後、細胞を PBS で洗浄し、24 時間培養した。細胞生存率は、Cell Counting Kit-8 を用い、製造元のプロトコールに従っ

て測定した。サンプルの吸光度は、プレートリーダー (Nivo 3S ; 波長 450 nm) を用いて測定した。

4.8 統計処理

データ分析は Graphpad Prism 9.0 を用いて行った。P<0.05 を有意差とみなした。(t 検定と one-way ANOVA を実行した)

5. 結果と考察

5.1 HGNP の合成と実験条件の影響

ここでは、HGNP について、Fig. 3 に示すような AgCl テンプレート法を用いて合成した[29]。多孔性ナノ構造を有する材料を作製する方法としては、化学エッチング (chemical etching)、ガルバニック置換 (galvanic replacement)、脱合金化法 (de-alloying)、自己組織化 (self-assembly)、テンプレート法 (鋳型法。template)、電気化学法 (electrochemical) が知られている[30]。今回は、簡便、単一工程でかつ、通常の実験温度で合成ができる多孔性ナノ粒子の合成法としてテンプレート法を採用した。

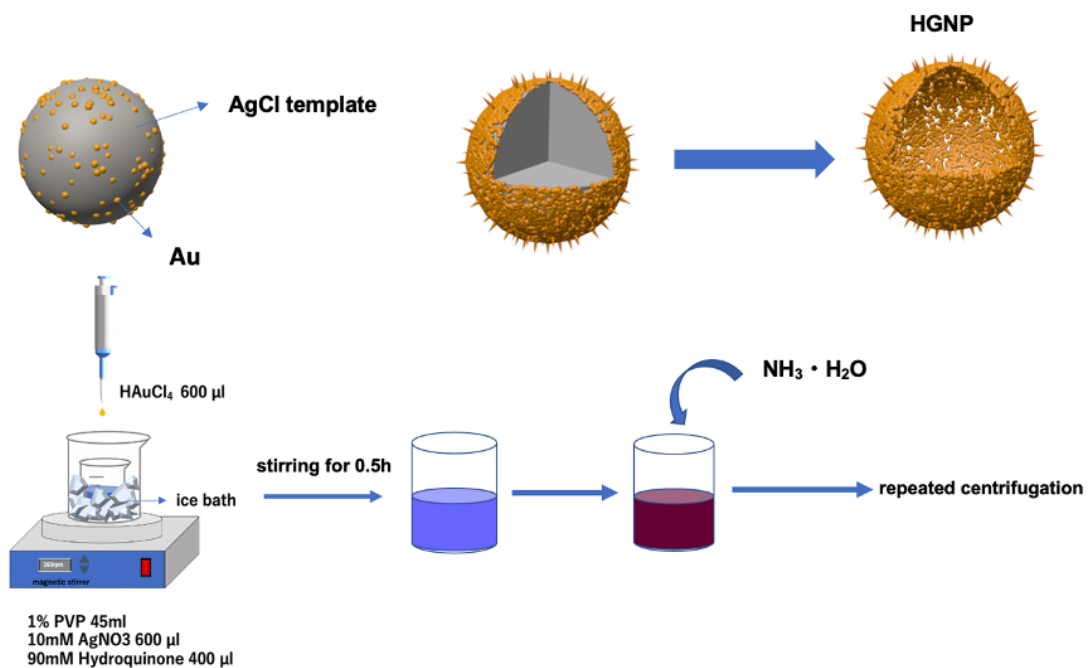


Fig. 3. The process of synthesis of HGNP.

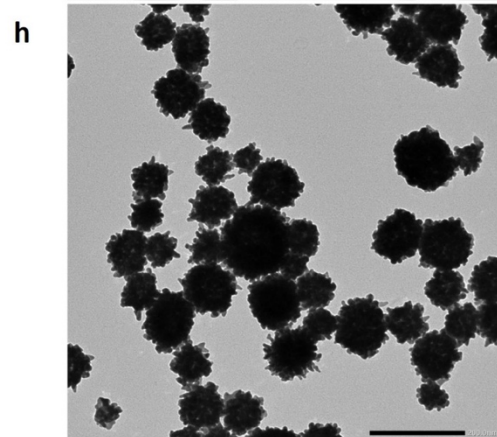
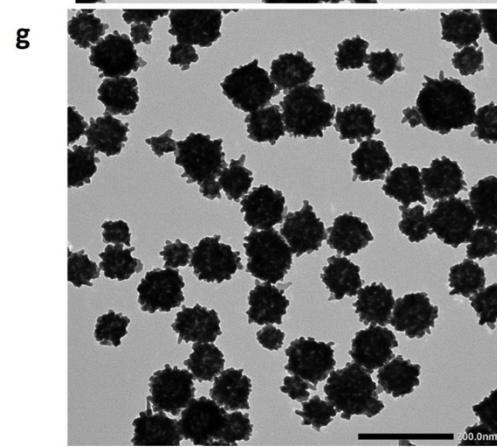
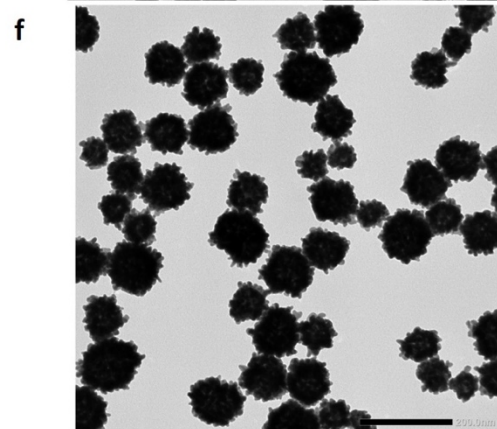
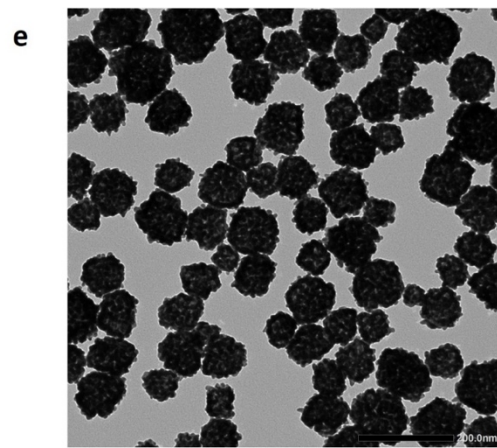
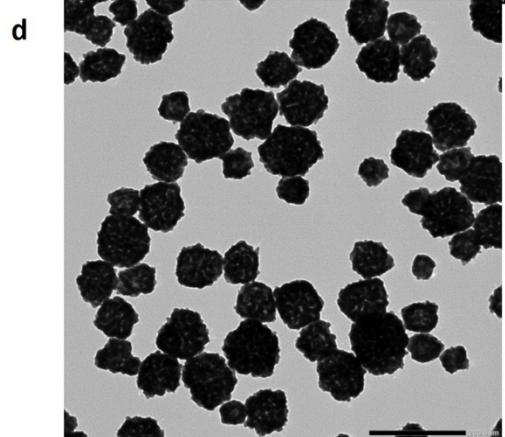
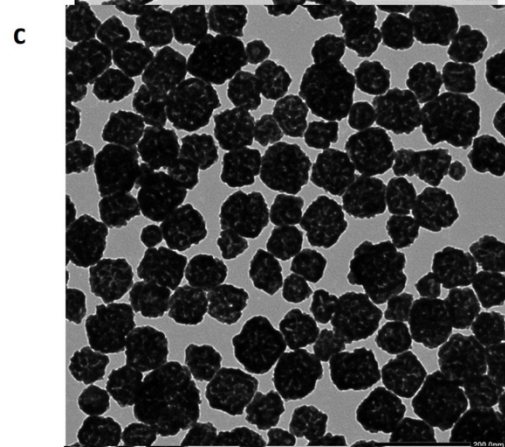
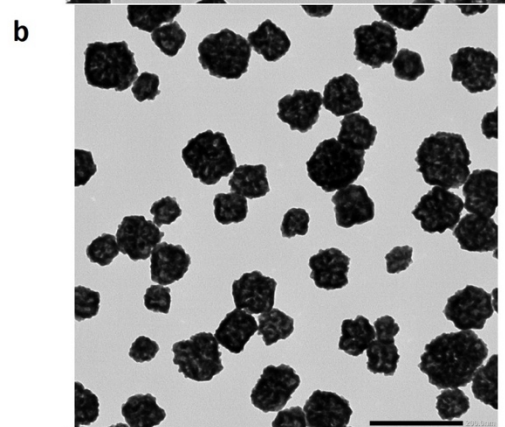
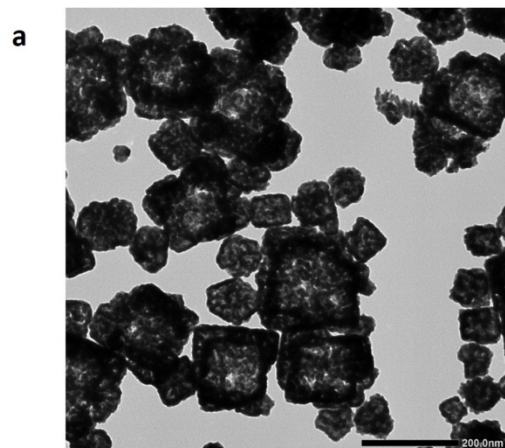
この方法では、銀イオンと塩化物イオンとの化学反応により、AgCl が生成し、さらに粒子表面では、界面活性剤である PVP によって被覆されていることが想定される (鋳型)。また、粒子表面では、還元剤であるヒドロキノンによって金

イオンが還元し、金の核形成が生じていることが想定される。その後、濃アンモニア溶液と洗浄操作によって鑄型が除去されることにより HGNP が得られる。

本研究で使用した方法は、簡便な調製のために単一工程で行う調製法を採用している。硝酸銀、ヒドロキノン、PVP を含む溶液に塩化金酸を添加しており、溶液内では、AgCl の核形成と Au の核形成がほぼ同時に起きることが想定される。HGNP の形成が複雑に起きていると想定されるため、今回の方法を用いて実際に形成された粒子を評価する必要があると考えた。

Condition	Conc of H ₂ AuCl ₄ (mM)	Dropping rate (μL/min)	Particle size (nm)	PDI	Peak wavelength (nm)
1	10	50	ND	ND	ND
2	10	100	98.2 ± 2.6	0.113 ± 0.016	660
3	10	150	94.9 ± 2.1	0.116 ± 0.011	643
4	10	200	101.3 ± 4.5	0.104 ± 0.012	661
5	20	50	106.9 ± 4.6	0.089 ± 0.017	716
6	20	100	111.6 ± 4.4	0.094 ± 0.017	693
7	30	50	121.7 ± 5.6	0.085 ± 0.020	702
8	40	50	130.7 ± 7.6	0.129 ± 0.016	606

Table 2. Experimental conditions for the preparation of HGNP. The mean particle size and PDI for the HGNP (n=4) and the peak wavelength of light absorbance. ND, No data.



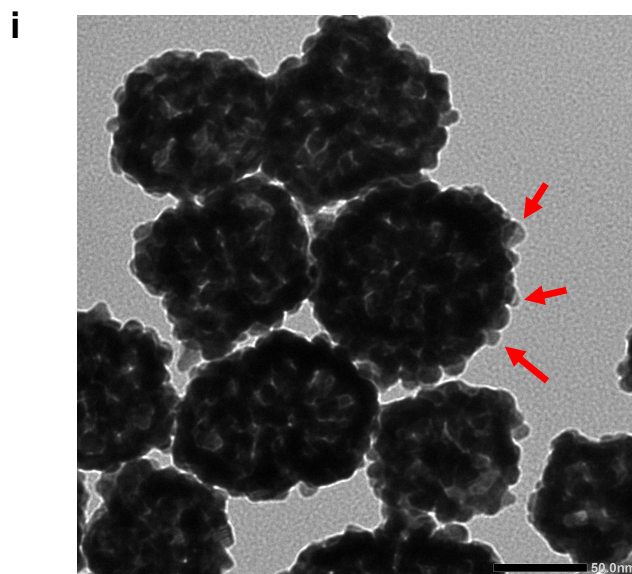


Fig. 4. (a-h) Morphology of HGNP prepared using condition 1-8 (described in **Table 2**) as observed in TEM images (scale bars are 200 nm). (i) TEM images (scale bar is 50 nm) of HGNP under condition 5. The detailed preparation of HGNP is described in **Materials and Methods**.

上記の調製方法から、 HAuCl_4 を添加することにより反応が進行するため、 HAuCl_4 の添加過程が大きく HGNP の形成に影響すると考え、Table2 のように HAuCl_4 の濃度 (10、20、30、40 mM) と滴下速度 (50, 100, 150, 200 $\mu\text{L}/\text{min}$) の実験条件を変えて得られる HGNP を評価した。得られた HGNP の粒子径、PDI、および外観を Table2 および Fig. 4 に示した。今回検討したほとんどの条件で、HGNP が得られ、粒子径は、100~130 nm、PDI は約 0.1 であり、単分散の HGNP が得られた。条件 1 (添加濃度 10 mM、添加速度 50 $\mu\text{L}/\text{min}$) は、最も遅い滴下速度と最も低い濃度の HAuCl_4 を使用した条件であり、沈殿を確認した。TEM の観察からは、粒子は不均

一であり、角ばった形状の粒子が確認された。考察としては、 HAuCl_4 の量が不足しているため、立方体結晶である AgCl の成長を抑えるだけの量がまかなえず、結果として、不均一かつ角ばった粒子の形成につながったと考えられる。角ばった粒子の内部は比較的透過性が高い画像であり、中空構造は形成されている可能性があると考えている。将来的には、ガス吸着法により、各サンプルの比表面積や粒子の孔径を測定することでより詳細な情報を得られると考えている。

次に注目すべき結果として、高濃度の HAuCl_4 を添加した場合（条件 5-8、添加濃度 20-40 mM、Fig. 4e-h）、金ナノスター（金ナノアーチンとも呼ばれる粒子表面に突起状を有する形状の粒子[22, 23]）のような顕著な突起構造を持つ HGNP が得られたことが挙げられる。これは、ナノ粒子表面の特定の結晶面において金の成長が進み、突起が形成されたことを示唆している。条件 5~7 で得られた HGNP は、条件 2~4 で得られた HGNP よりも長波長の吸収ピークを示していることから（Table2）、TEM 画像で確認された粒子表面の突出構造は光の吸収波長に影響を与える可能性があると考えられている。また、突起状をもった構造のためか、条件 5~7 で得られた HGNP は、条件 2~4 で得られた HGNP よりも、わずかに粒子径が増大する傾向を示した。対照的に、最も高濃度の HAuCl_4 （条件 8、添加濃度 40 mM）を用いて調製した HGNP は、条件 2-7 のサンプルと比較して、粒子径と PDI がわずかに大きく、調製したサンプルの中で最も低い波長吸収ピークを示した。塩化金酸濃度が高いことから、金の核形成が多くなり、相対的に AgCl の核形成が少なくなったため、中空構造がうまく形成されなかったと推察しており、その結果中空構造の少ない粒子が得られ、長い波長側にピークがシフトしなかった可能性があると考えられる。

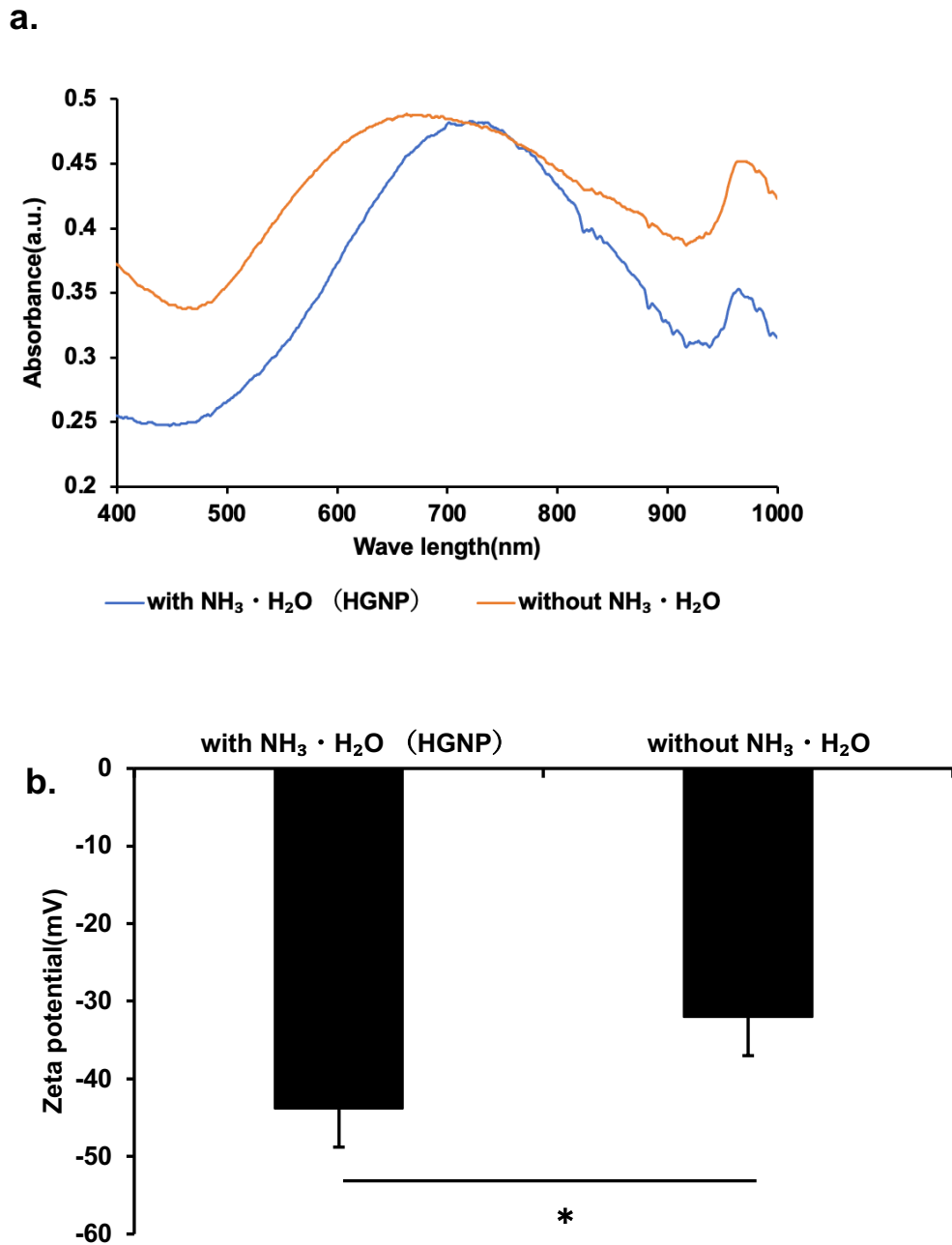


Fig. 5. Preparation of HGNP treated with $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and without $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (a)

Absorption spectrum from 400 nm to 1000 nm. (b) Zeta potential of HGNP treated with $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and without $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. The data represent the mean \pm SD (n = 3, *p < 0.05)

本調製方法では濃アンモニア水を用いて AgCl テンプレートを除去する。AgCl テンプレートの除去を確認するため、濃アンモニア水で処理する前と処理した後の粒子の吸収スペクトル (400 nm から 1000 nm) と表面電荷 (ゼータ電位) を測定した。Fig. 5 が示した結果より、濃アンモニア水で処理した後の HGNP は吸収長い波長側にピークがシフトした。そして、ゼータ電位がさらにマイナスになった。以上より、AgCl テンプレートを除去したことによる影響を確認することができた。

波長 660 nm のレーザーを使用したのは、この波長が以前、光増感剤 (タラポルフィンナトリウム) を用いた光線力学療法に使用され、臨床現場でグリオーマや脳腫瘍の治療に使用されていたことによる [55, 56, 57]。この治療法では、まず水溶性の光増感剤であるタラポルフィンナトリウムを注射する。その後、タラポルフィンが効率的に腫瘍に集積することが知られている。次に、半導体レーザーをがん組織部位 (肺がん、悪性脳腫瘍、食道がん) に照射すると、664 nm に吸収ピークをもつタラポルフィンナトリウムが励起状態となり、腫瘍組織内の酸素と反応して活性酸素を産生することで治療効果を発揮する。将来的には、このような光増感剤との併用が悪性脳腫瘍の治療に有用になる可能性があると考えている。その一方で、レーザー出力は本研究で使用したものと異なるため、光増感剤と PTT を併用する場合は、レーザー出力に関するさらなる実験が必要であると考えている。

今回の結果では、条件 2, 4, 5, 6, 7 では、より長い波長 (>660 nm) の光を吸収する良好な HGNP を得ることができた。前述の通り、光増感剤に対する脳腫瘍の光線力学療法では 660 nm 付近のレーザーが使用されるが、本研究では、最も

極大吸収波長が長かった条件 5 (716 nm) で調製した HGNP に焦点をあて、その後の実験に使用した。波長が長いほど体内組織への透過性の点で有利であり、将来性が高いと考えた。

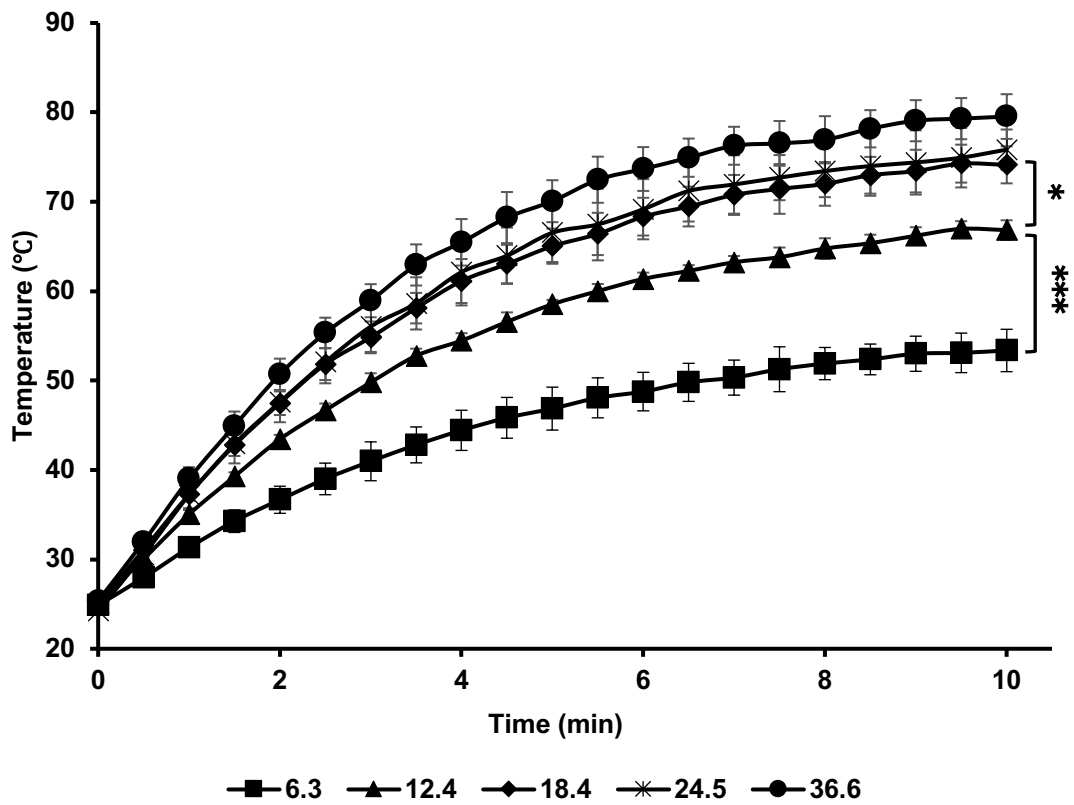
HGNP の実験条件の検討においては、別の論文[29]においても検討されている。その論文では、ハイドロキノンの濃度が検討されており、その条件下では、得られた HGNP の粒子径は濃度と逆相関していた (270~450 nm) [29]。得られた粒子径は、今回得られた 100 nm のものと比較して顕著に大きかったため、実験条件を同時に比較することは難しいかもしれないが、この先行報告と今回の結果を踏まえると、少なくとも AgCl 粒子と Au 粒子の成長速度のバランスが、HGNP の形成に影響し、粒子径や多孔性、そして HGNP の吸収ピークに影響を与えることが示唆された。その他にも形成される粒子に影響を与えるものとして、調製で用いる硝酸銀濃度が挙げられる。銀イオンの初期濃度によって、形成する AgCl テンプレートの量が異なるため、粒子中に形成される中空の程度に影響を与えることが予想される。また AgCl の溶解度積の平衡を変えるような実験条件 (HCl の添加、攪拌する温度) で調製を行うと形成される粒子に影響を与えることが予想される。最後に PVP の濃度や PVP 以外の界面活性剤の選択も、形成される粒子の大きさに影響を与えるものと思われる。このように考えると、さらなる実験は必要であるが、660 nm に吸収ピークをもつ HGNP は、限定された実験条件で調製可能であることが示されており、本研究の実験結果は HGNP の調製において有用な情報を提供しているものと考えられる。

5.2 HGNP の PTT 効果

HGNP が PTT に有用かどうか評価するために、660 nm レーザーを *in vitro* 条件で照射を行った。各種濃度の HGNP サンプルを調製し、レーザー照射が HGNP サンプルの温度上昇に与える影響を調べた (Fig. 6)。温度上昇は HGNP 濃度に依存しており、また照射時間を長くするにつれて温度の上昇が確認された。例えば、HGNP 濃度が 12.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合、温度は 2 分で 43.4 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 、3 分で 49.8 ± 1.0 $^{\circ}\text{C}$ 、4 分で 54.5 ± 0.8 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分で 58.5 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ であった。12.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において、10 分照射したところ、最終的に 60°C から 80°C まで温度の上昇が確認することができた。この温度は、加熱による不可逆的ながん細胞損傷 ($> 50^{\circ}\text{C}$)、および加熱によって引き起こされるがん細胞のアポトーシス ($41\text{--}45^{\circ}\text{C}$) の誘導に効果的である [58]。高濃度の HGNP 試料を照射した場合、温度上昇は 80°C 付近で止まったが、これはおそらく周囲の環境温度のためだと考えている。実際の脳腫瘍に対する PTT 治療においては、レーザー照射による温度上昇をモニターし、過剰に加熱することを防ぐ工夫をすることが必要であると考えられる。脳内の正常細胞を加熱すると傷害が生じる可能性があるためである。脳腫瘍細胞は、ナノサイズの細胞を取り込む貪食能力がある細胞が多く存在する。このため、HGNP を腫瘍細胞に十分に取り込ませた後、レーザー照射することで治療効果が得られるかもしれないと考える。その一方で取り込まれなかった HGNP においては、洗浄操作をして HGNP を除去する、または脳腫瘍部位以外へのレーザー照射をしないようにする、などといった工夫が必要になるかもしれない。以上より、これらの結果は、現在の実験条件が PTT によるがん治療に適している可能性を示唆している。また、DDTC-Cu の吸光度に関しては、447 nm 付近と紫外領域 (< 300 nm) にピークがあることから [59]、DDTC-Cu に対する近赤外レーザーの影響は最小であると考えられる。

また、HGNP のポーラス構造が温度上昇に影響するかどうか確認するため、660 nm レーザーにおいて中空構造の HGNP と中空構造を持たない金ナノスター[23]を比較した。ともに吸収度を 0.2 に調整し、660 nm レーザーを 10 min を照射して、温度上昇を測定した。Fig. 6b から HGNP は GNS より光-熱転換率が高いのはわかった。これは HGNP のポーラスと表面突起構造で強いプラズモン共鳴を起こったためだと考えられる[37]。

a.



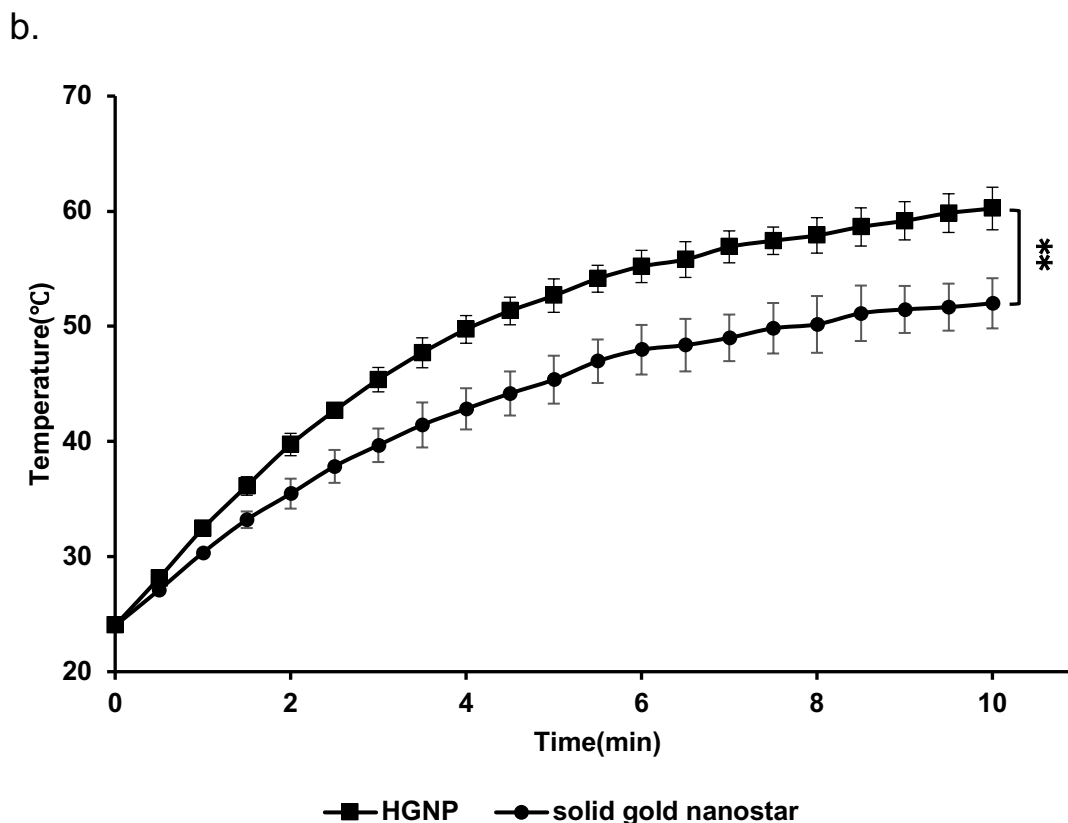


Fig. 6. (a) Temperature of HGNP samples of different concentrations (6.3-36.6 $\mu\text{g/mL}$) under NIR irradiation. (b) Temperature of HGNP and solid gold nanostar ($A=0.2$ at 660nm) under 660nm laser irradiation. The data represent the mean \pm SD ($n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, the data at 10 min).

さらに、HGNPの安定性を理解するために、660 nm レーザーを複数回照射し、温度上昇に及ぼす影響を調べた (Fig. 7)。その結果、温度上昇は2回目、3回目の照射をした場合も、ほぼ同様に開始温度より約 30°C 近くまで上昇することを確認した。その一方で、2回目と3回目の温度上昇のピークは、1回目のサイクル (30°C、5分) と比べて、それぞれ 9% と 15.6% 低かった。HGNP が 660 nm レーザー

照射によく耐えたことを示している一方、温度上昇の減少した原因としては、660 nm レーザー照射によって HGNP のナノ構造がわずかに変化し、光から熱への変換効率が低下したためと考えられる。

今回の結果は総じて、PTT の複数回照射が可能であることを示唆している。レーザーを複数回照射する実際の治療法については、可能性の域を出ないが、脳腫瘍の摘出手術を行ったときに HGNP を投与し、脳腫瘍細胞に取り込ませた後、その後、加熱しすぎないようにレーザー照射をある時間間隔で複数回照射し、脳腫瘍細胞に細胞死を誘導することを想定している。今回は、3 回照射で合計 1 時間弱の投与スケジュールで行ったが、照射間隔をより長くしたり、後述の DDTC-Cu の併用投与などを行ったりするとさらに長い時間の治療になってしまうことが想定される。

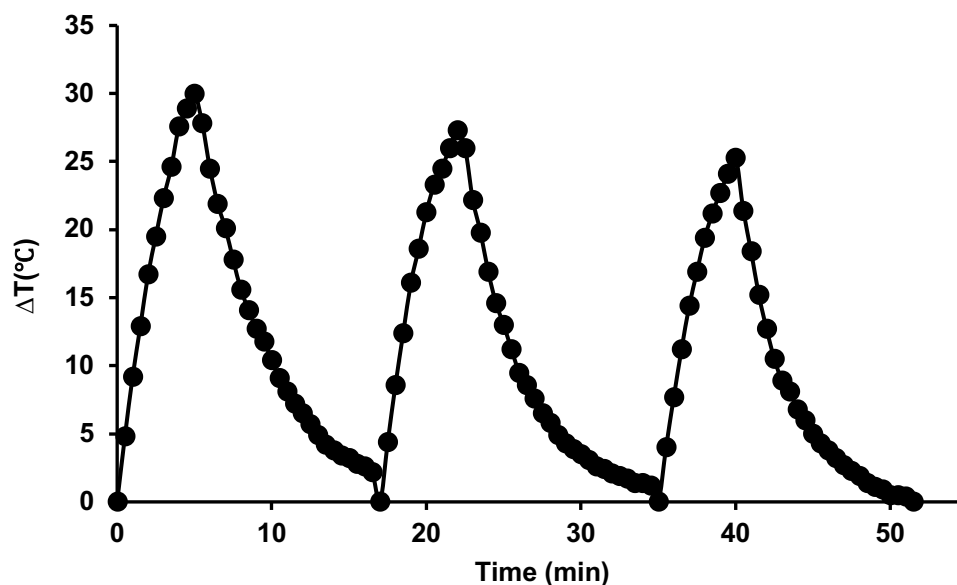


Fig. 7. The temperature change of HGNP under intermittent NIR laser irradiation. The concentration of the HGNP was set to 12.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.3 HGNP ベースの PTT による治療、DDTC-Cu ベースの化学療法、およびそれらの組み合わせによる脳腫瘍細胞に対する *in vitro* 殺細胞効果

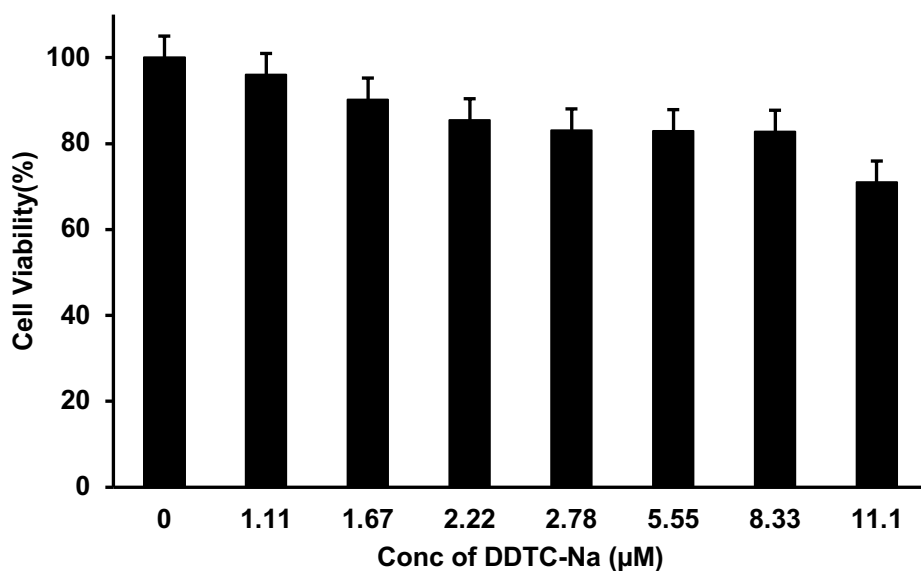
DSF の代謝産物である DDTC は、グリオーマを含むがん細胞の増殖を阻害することで知られており、先述の通り、脳腫瘍をはじめとするがん治療薬として期待されている。DDTC による処理は、C6 グリオーマ細胞に対して、今回の実験条件下で濃度 11.1 μM の DDTC-Na において中程度の細胞毒性を示したが、それ以外は大きな細胞毒性はなかった。(Fig. 8a、8b)。次に銅イオンの影響を理解するために、DDTC-Cu による処理が C6 細胞の生存率に対する効果を評価した (Fig. 8c)。DDTC は、銅のような二価金属イオンの強力なキレーターであり [51]、DSF は Cu によるキレート化により抗がん効果が改善することが期待されていることから [60]、主な代謝産物である DDTC-Cu においても顕著な効果が期待される。DDTC-Cu は、比較的高い濃度で細胞毒性効果を示した (48.3%, 2.78 μM ; 15.4%, 5.55 μM)。

次に金ベースのナノ粒子のキャリアとしての生体適合性を理解するために、グリオーマ細胞 C6 を用いて 660 nm レーザー照射なしの HGNP の毒性を評価した (Fig. 8d)。生体内にほとんど存在しない無機化合物や金属化合物は、固有の毒性を有することから、*in vitro* における細胞毒性だけでなく、*in vivo* においては、体内動態の理解と毒性の理解が将来的に重要である。今回は、*in vitro* において HGNP の急性毒性を知るため、WST アッセイにより評価を行っている。検討の結果、今回の実験条件における最高濃度では細胞生存率 (90.8%、24.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) がわずかに低下して、細胞毒性は観察された。この結果は、HGNP 単体では、細胞に対する毒性が少ないことを示唆している。しかしながら、金をベースとする HGNP が脳組織で効率的にクリアランスされない場合、何らかの毒性・後遺症の原因に

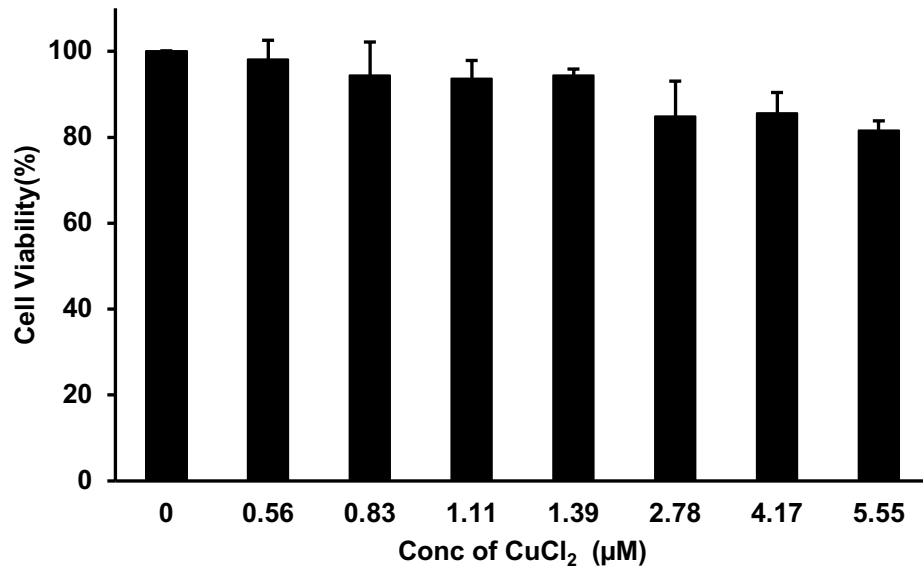
なる可能性があるため、引き続き *in vivo* における HGNP の毒性に関する調査が必要であると考えられる。

対照的に、660 nm レーザーを照射しないで DDTC-Cu と HGNP の混合物は、DDTC-Cu の濃度に依存して細胞毒性を示した (Fig. 8e)。この原因については不明な点が多い。一つの可能性として、DDTC-Cu と HGNP の混合は高濃度で凝集を引き起こす傾向があったことから、適度な凝集は複合体の総サイズを増大させ、DDTC-Cu の細胞内取り込み量を増加させる可能性があると考えている。金ナノ粒子と DDTC-Cu が複合体を作るという文献が、異分野の論文において報告されている [59]。細胞内に取り込まれた DDTC-Cu や HGNP の量が増加した結果、グリオーマ細胞に対する顕著な殺細胞効果をもたらす可能性が示唆された。

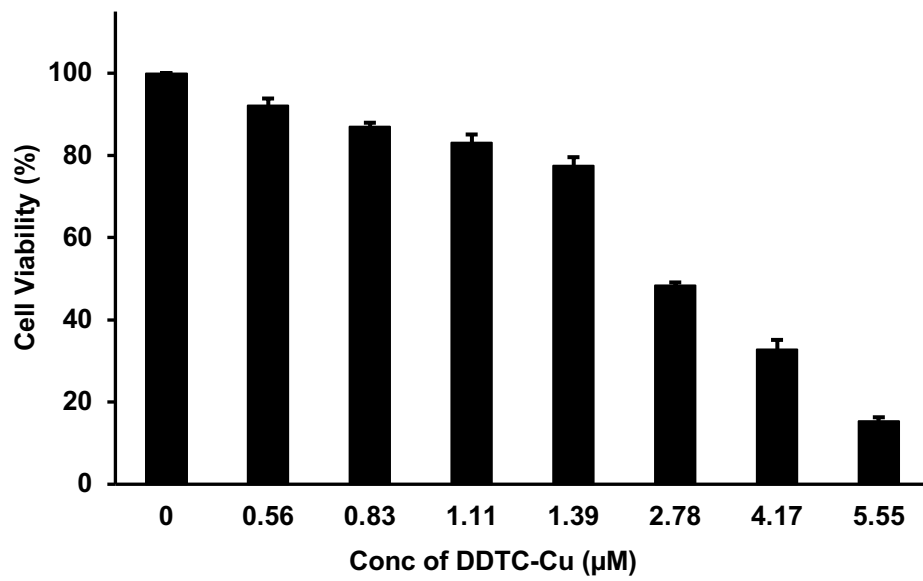
a.



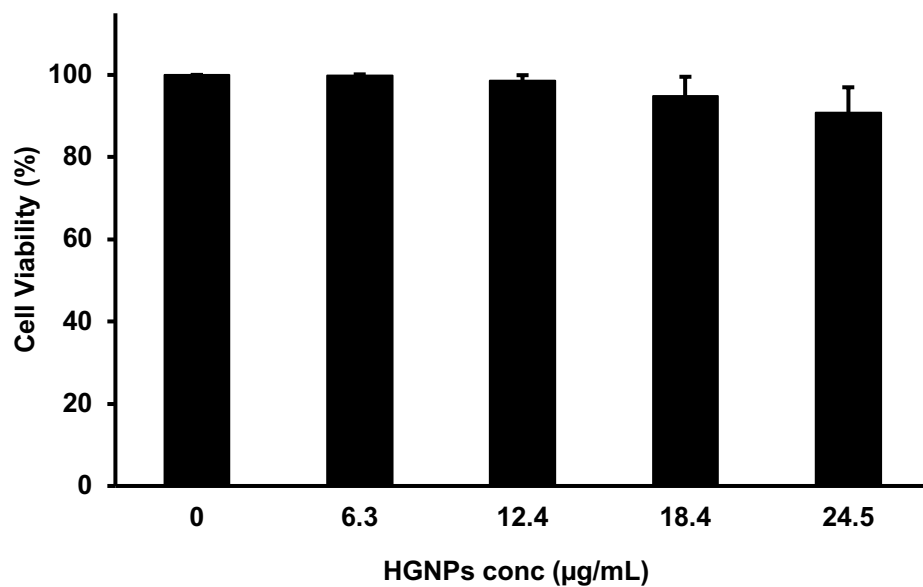
b.



c.



d.



e.

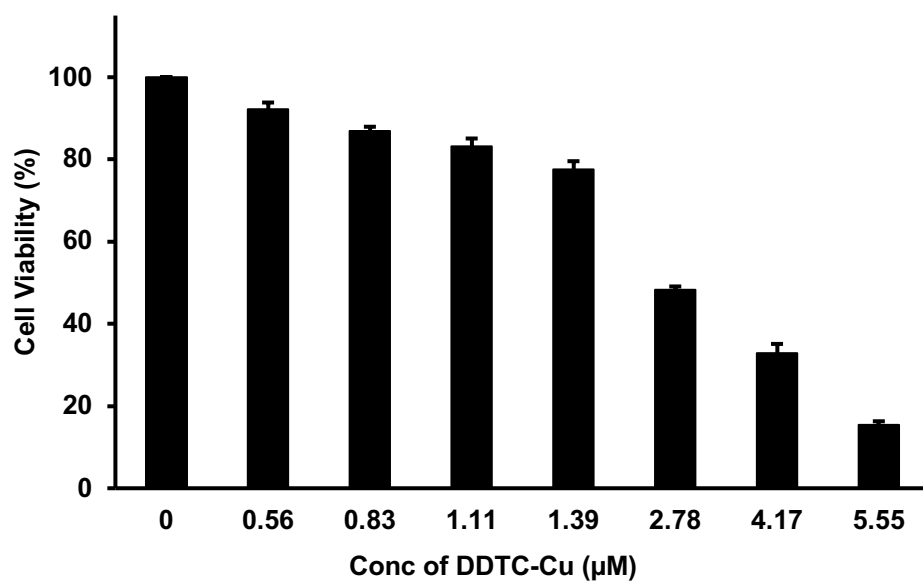
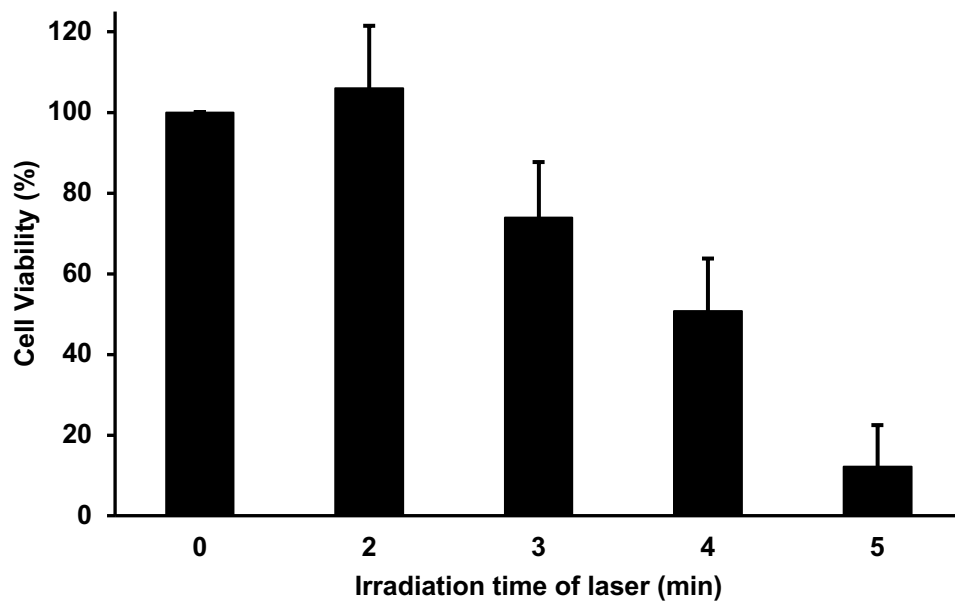


Fig. 8. Viability of C6 cells treated with (a) DDTc-Na, (b) CuCl₂, (c) DDTc-Cu, (d) HGNT (without 660 nm laser irradiation) and (e) mixture of HGNT (12.4 µg/mL) with different concentrations of DDTc-Cu. The data represent the mean ± SD (n = 3).

660 nm レーザーを照射し、HGNP を用いた PTT による殺細胞効果の結果を Fig. 9a に示す。細胞の生存率は照射時間に依存し低下した (73.8%、3 分 ; 50.7%、4 分 ; 12.2%、5 分) 。レーザーエネルギーの吸収と熱への変換による温度上昇 (Fig. 6) が、PTT による効果につながったと考えられる。その一方で、660 nm レーザーを照射しなかった、HGNP 単体の処理では顕著な細胞毒性を示していない (Fig. 8d) 。DDTC-Cu と PTT を組み合わせた結果、Fig. 9b に示すように、明確な細胞毒性効果 (< 20 %) を示した。DDTC-Cu と HGNP (Fig. 8e, 660 nm レーザー照射なし) や PTT 単独 (Fig. 9a) では中程度の細胞毒性効果を示さなかったことと対照的である。この顕著な殺細胞効果が得られた原因は明らかでないが、Ly NH らは DDTC-Cu と Au が Au-S で結合できることを提案した [59]、一つの可能性として、DDTC-Cu と HGNP の組み合わせは、上述したように凝集傾向があり、複合体が細胞への取り込みを増加させることで殺細胞効果が向上したと考えられる。別の可能性としては、殺細胞効果は PTT による化学療法に対する感受性の増加によるもので、Fig. 9b の結果と同様に顕著な殺細胞効果をもたらしたのかもしれない。実際の脳腫瘍治療においても検討が必要であるが、もし DDTC-Cu と HGNP を共存させる条件を実現させることができれば、同様の効果が期待できるかもしれないと考えている。また、PTT によるレーザー照射時間を延長させることで (例えば 5 分間の 660 nm レーザー照射) 高い効果があると推測している。PTT と DDTC-Cu による併用療法による今回の *in vitro* の結果は、グリオーマの治療に有望であると考えている。また、グリオーマと DSF-Cu による臨床試験が経口投与で行われていることから [52-53]、DSF-Cu を服用した後に、HGNP による PTT を行うという治療法の選択も可能になるかもしれない。

a.



b.

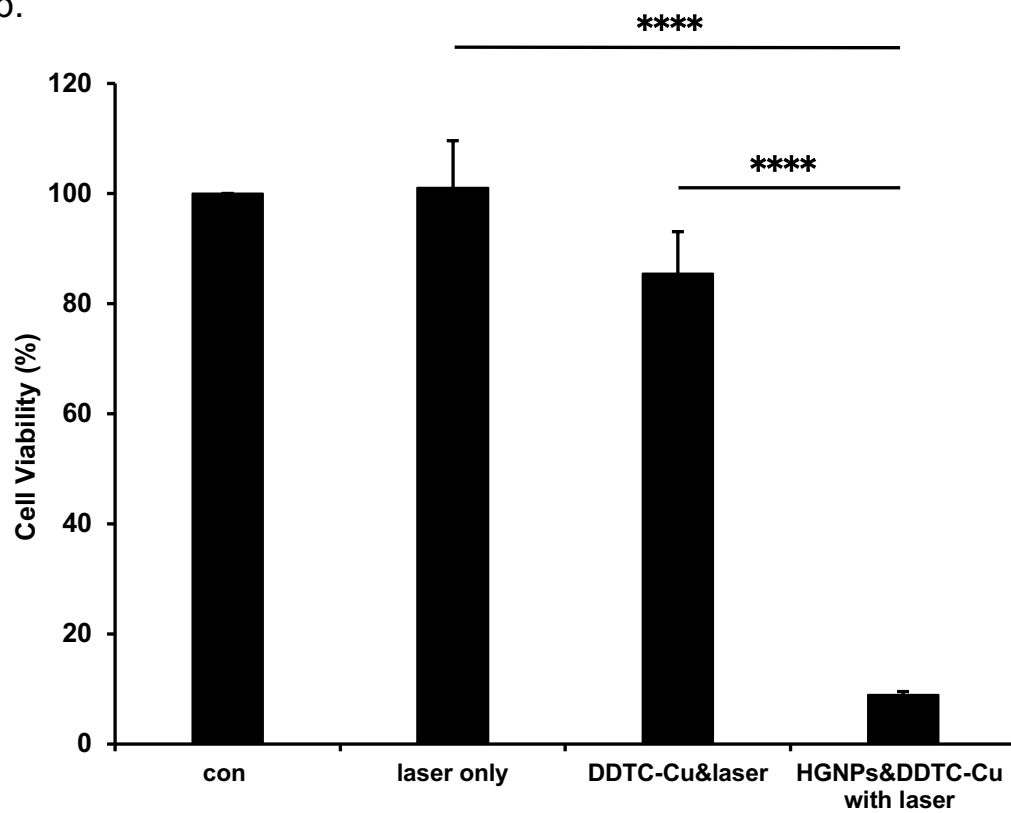


Fig. 9. (a) Viability of C6 cells treated with HGNP and different laser irradiation durations (660 nm, 1.5 W/cm²). (b) Viability of C6 cells treated with laser only, DDTC-Cu under 660 nm laser irradiation, HGNP (12.4 µg/mL) under 660 nm laser irradiation and in the presence of DDTC-Cu (0.56 µM). The data represent the mean ± SD (n = 3, ****p<0.0001)

将来のグリオーマ治療では、正常細胞への影響を避けるため、グリオーマ細胞に HGNP が取り込まれた後に、ナノ粒子を用いた PTT を行うことになるかもしれない。外科的切除を伴う局所療法は効果的であることから、本治療法は、脳腫瘍の外科的切除の後に、NIR のレーザー照射による PTT を、脳組織の温度モニタリングを行いながら実施される可能性を想定している。PTT を成功させるには、いくつかの障壁を克服しなければならないと考えられる。グリオーマは非がん組織に浸潤していることが多く、グリオーマを完全に除去することは難しい。一つの画期的な方法として、イメージングと治療を同時に兼ね備えたセラノスティクス

(Theranostics。Therapeutics と Diagnostics の造語) 用のナノメディシンを用い、ナノ粒子の分布を可視化し、正確な治療につなげる治療様式が提案されている [58]。また NIR レーザーを用いた PTT は、体内組織への透過性の点で限界がある。このため、より深い領域に到達できるファイバータイプの NIR レーザーの開発は、グリオーマに対するレーザー照射において役立つかもしれない。さらに PTT を他の化学療法と組み合わせることで、腫瘍細胞を破壊し、治療成績を改善できる可能性があると考えている。

6. 結論

本研究では、簡便なワンステップ法を用いて HGNP を調製することから検討を始めた。検討の結果、 HAuCl_4 の滴下速度と濃度を制御することによって変化することから、 AgCl と Au の形成のバランスが、HGNP の粒子径や表面形状、空隙率に影響することを見出した。また、PTT に有用な、球状の金ナノ粒子の吸収波長よりも高波長側に吸収ピークをもつ HGNP が得ることができた。

660 nm レーザーを用いた PTT に適しており、がん細胞を死滅させるのに十分な温度上昇を示し、複数回の照射による制御が可能であることが示された。加えて DDTC-Cu の存在下では、*in vitro* でグリオーマ細胞に対する顕著な細胞毒性効果が観察された。このアプローチの治療効果と安全性を評価するためには、さらに *in vivo* 実験が必要であるが、本研究の結果は、DDTC-Cu を用いた化学療法と HGNP とレーザーを用いた PTT の併用によるグリオーマの新しい治療法として有用な情報を提供するものであると考えられる。

7. 生成系 AI の使用について

今回、日本語の文章に翻訳し、文章を流暢にする目的として、DeepL と Google を使用している。

8. 謝辞

本研究の一部は、JST SPRING、助成金番号 JPMJSP2130 の助成を受けました。深く感謝申し上げます。

四年間の博士課程の生活はあっという間でした。この博士論文を完成させるにあたり、これまでにお世話になったすべての方々に心から感謝の意を表したいと思います。まず、名古屋市立大学という素晴らしい学習環境の中で、継続的に自分を成長させてくれたことに心から感謝します。特に恩師である尾関哲也教授は、私に挑戦し続け、自分を鍛える機会を与えてくれ、大変感謝しています。次に、田上辰秋先生には、私の実験計画や問題解決に対する多くの貴重なご意見やご指摘をいただきました。そして、小川昂輝先生には、英語論文のレビューおよび編集校正に対してアドバイスをいただきました。大学院生活における私自身の成長は、尾関先生、田上先生と小川先生のご指導と励ましとは切っても切り離せないものです。博士課程での生活や研究について様々な手助けをしてくれた研究室のメンバーに感謝します。

また、学位論文の審査に携わった先生方には、貴重なご意見を頂き、研究内容を見直す機会を与えていただきありがとうございました。

最後に、苦楽を共にしてくれた友人たちに感謝します。皆様と一緒に過ごした日々はいつまでも忘れず、記憶に留めておきたいと思います。

9 参考文献

1. Zeng Z, Chen Y, Geng X, Zhang Y, Wen X, Yan Q, Wang T, Ling C, Xu Y, Duan J, Zheng K, Sun Z. ncRNAs: Multi-angle participation in the regulation of glioma chemotherapy resistance (Review). *Int J Oncol*, **60**,76 (2022).
2. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro Oncol*, **16**, 896-913 (2014).
3. Tagami T, Taki M, Ozeki T. Nanoparticulate Drug delivery systems to overcome the blood–brain barrier. *Nanomaterials in Pharmacology*. Springer, New York, pp 333–347 (2016).
4. Ogawa K, Kato N, Kawakami S. Recent strategies for targeted brain drug delivery. *Chem Pharm Bull*, **68**, 567–582 (2020).
5. Saito, R. Chemotherapy for glioma. *No Shinkei Geka*, **49**, 588-596 (2021).
6. Zhao M, van Straten D, Broekman MLD, Pr at V, Schiffelers RM. Nanocarrier-based drug combination therapy for glioblastoma. *Theranostics*, **10**, 1355-1372 (2020).
7. Li T, Li J, Chen Z, Zhang S, Li S, Wageh S, Al-Hartomy OA, Al-Sehemi AG, Xie Z, Kankala RK, Zhang H. Glioma diagnosis and therapy: Current challenges and nanomaterial-based solutions. *J Control Release*, **352**, 338-370 (2022).
8. Farheen M, Akhter MH, Chitme H, Akhter MS, Tabassum F, Jaremko M, Emwas AH. Harnessing folate-functionalized nasal delivery of Dox-Erlo-loaded biopolymeric nanoparticles in cancer treatment: development, optimization, characterization, and biodistribution analysis. *Pharmaceuticals*, **16**, 207 (2023).
9. Anwar F, Al-Abbasi FA, Naqvi S, Sheikh RA, Alhayyani S, Asseri AH, Asar TO, Kumar V. Therapeutic potential of nanomedicine in management of Alzheimer's disease and glioma. *Int J Nanomedicine*, **18**, 2737-2756 (2023).
10. Tagami, T. and T. Ozeki. Recent Trends in Clinical Trials Related to Carrier-Based Drugs. *J Pharm Sci* **106**, 2219-2226 (2017).
11. Overchuk M, Weersink RA, Wilson BC, Zheng G. Photodynamic and photothermal therapies: synergy opportunities for nanomedicine. *ACS Nano*, **17**, 9, 7979–8003 (2023).
12. Gupta N, Malviya R. Understanding and advancement in gold nanoparticle targeted photothermal therapy of cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, **1875**, 188532 (2021).
13. Sztandera K, Gorzkiewicz M, Klajnert-Maculewicz B. Gold nanoparticles in cancer

- treatment. *Mol Pharm*, **16**, 1-23 (2019).
14. Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol*, **7**, 626–634 (2003).
 15. Wang Y, Black KCL, Luehmann H, Li W, Zhang Y, Cai X, Wan D, Liu SY, Li M, Kim P, Li ZY, Wang LV, Liu Y, Xia Y. Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment. *ACS Nano*, **7**, 2068-77 (2013).
 16. Wang Y, Wang K, Zhao J, Liu X, Bu J, Yan X, Huang R. Multifunctional mesoporous silica-coated graphene nanosheet used for chemo-photothermal synergistic targeted therapy of glioma. *J Am Chem Soc*, **135**, 4799–4804 (2013).
 17. Wang Y, Leng S, Huang J, Shu M, Papavassiliou DV. Modeling of cancer photothermal therapy using near-infrared radiation and functionalized graphene nanosheets. *Int J Numer Method Biomed Eng*, **36**, e3275 (2020).
 18. Gao S, Liu Y, Liu M, Yang D, Zhang M, Shi K. Biodegradable mesoporous nanocomposites with dual-targeting function for enhanced anti-tumor therapy. *J Control Release*, **341**, 383-398 (2022).
 19. Zou J, Wang P, Wang Y, Liu G, Zhang Y, Zhang Q, Shao J, Si W, Huang W, Dong X. Penetration depth tunable BODIPY derivatives for pH triggered enhanced photothermal/photodynamic synergistic therapy. *Chem Sci*, **10**, 268-276 (2019).
 20. Xu XJ, Li Y, Hui H, Liu CL, Fu Y, Yang HY, Dual-targeting multifunctional hyaluronic acid ligand-capped gold nanorods with enhanced endo-lysosomal escape ability for synergetic photodynamic-photothermal therapy of cancer. *Biotechnol Bioeng*, **120**, 2333-2344 (2023).
 21. Zhang J, Yin J, Lai R, Wang Y, Mao B, Wu H, Tian L, Shao Y. Machine learning predicting optimal preparation of silica-coated gold nanorods for photothermal tumor ablation. *Nanomaterials*, **13**, 1024 (2023).
 22. Yuan H, Fales AM, Vo-Dinh T, TAT peptide-functionalized gold nanostars: enhanced intracellular delivery and efficient NIR photothermal therapy using ultralow irradiance. *J Am Chem Soc*, **134**, 11358-61 (2012).
 23. Kondo Y, Tagami T, Ozeki T. Fabrication of photosensitizer-polyethylene glycol-conjugated gold nanostars for simultaneous photothermal and photodynamic cancer therapy under near-infrared laser irradiation. *J Drug Deliv Sci Technol*, **66**, 102892 (2021).
 24. Lee SY, Shieh MJ. Platinum(II) drug-loaded gold nanoshells for chemo-photothermal therapy in colorectal cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*, **12**, 4254–4264 (2020).

25. Grabowska-Jadach I, Kalinowska D, Drozd M, Pietrzak M. Synthesis, characterization and application of plasmonic hollow gold nanoshells in a photothermal therapy—New particles for theranostics. *Biomed. Pharmacother*, **111**, 1147-1155 (2019).
26. Wang S, Song Y, Cao K, Zhang L, Fang X, Chen F, Feng S, Yan F. Photothermal therapy mediated by gold nanocages composed of anti-PDL1 and galunisertib for improved synergistic immunotherapy in colorectal cancer. *Acta Biomater*. **134**, 621-632 (2021).
27. Zhang H, Gao Z, Li X, Li L, Ye S, Tang B, Multiple-mRNA-controlled and heat-driven drug release from gold nanocages in targeted chemo-photothermal therapy for tumors. *Chem Sci*, **12**, 12429-12436 (2021).
28. Wang QL, Cui HF, Li CL, Song X, Lv QY, Li ZY. A multimode aptasensor based on hollow gold nanoparticles and structure switching of aptamer: Fast and sensitive detection of carcinoembryonic antigen. *Sens Actuators Rep*, **2**, 100021 (2020).
29. Pedireddy S, Lee HK, Tjiu WW, Phang IY, Tan HR, Chua SQ, Cedric Troadec C, Ling XY, One-step synthesis of zero-dimensional hollow nanoporous gold nanoparticles with enhanced methanol electrooxidation performance. *Nat Commun*, **5**, 4947 (2014).
30. Guo M, He J, Li Y, Ma S, Sun X. One-step synthesis of hollow porous gold nanoparticles with tunable particle size for the reduction of 4-nitrophenol. *J Hazard*, **310**, 89-97 (2016).
31. Bahar N, Ekinici D. Hollow porous gold nanoparticle/reduced graphene oxide composite films for electrochemical supercapacitor applications. *Electrochim Acta*, **337**, 135844 (2020).
32. Lu B, Liu A, Wu H, Shen Q, Zhao T, Wang J. Hollow Au–Cu₂O core–shell nanoparticles with geometry-dependent optical properties as efficient plasmonic photocatalysts under visible light. *Langmuir*, **32**, 3085–3094 (2016).
33. Xia W, Mei C, Zeng X, Fan G, Lu J, Meng X, Shen X. Nanoplate-built ZnO hollow microspheres decorated with gold nanoparticles and their enhanced photocatalytic and gas-sensing properties. *ACS Appl Mater Interfaces*, **7**, 11824–11832 (2015).
34. Li Y, He D, Tu J, Wang R, Zu C, Chen Y, Yang W, Shi D, Webster TJ, Shen Y. The comparative effect of wrapping solid gold nanoparticles and hollow gold nanoparticles with doxorubicin-loaded thermosensitive liposomes for cancer thermo-chemotherapy. *Nanoscale*, **10**, 8628-8641 (2018).
35. Lu W, Melancon MP, Xiong C, Huang Q, Elliott A, Song S, Zhang R, Flores LG, Gelovani JG. Effects of photoacoustic imaging and photothermal ablation therapy

- mediated by targeted hollow gold nanospheres in an orthotopic mouse xenograft model of glioma. *Cancer Res*, **71**, 6116-21 (2011).
36. Bardhan R, Grady NK, Ali T, Halas NJ. Metallic Nanoshells with Semiconductor Cores: Optical Characteristics Modified by Core Medium Properties. *ACS Nano*, **4**, 6169–6179 (2010).
 37. Song J, Yang X, Yang Z, Lin L, Liu Y, Zhou Z, Shen Z, Yu G, Dai Y, Jacobson O, Jeeva Munasinghe, Bryant Yung, Gao-Jun Teng, Xiaoyuan Chen. Rational Design of Branched Nanoporous Gold Nanoshells with Enhanced Physico-Optical Properties for Optical Imaging and Cancer Therapy. *ACS Nano* **11**, 6102-6113 (2017).
 38. Bei-Ke Wang, Xue-Feng Yu, Jia-Hong Wang, Zhi-Bin Li, Peng-Hui Li, Huaiyu Wang, Li Song, Paul K Chu, Chengzhang Li. Gold-nanorods-siRNA nanoplex for improved photothermal therapy by gene silencing. *Biomaterials*, **78**, 27–39 (2016).
 39. Liu W, Di J, Ma Y, Wang S, Meng M, Yin Y, Xi R, Zhao X. Mitochondria-Mediated HSP Inhibition Strategy for Enhanced Low-Temperature Photothermal Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, **15**, 26252-26262 (2023).
 40. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol*, **17**, 5317–5327 (1997).
 41. Zheng K, Zhou D, Wu L, Li J, Zhao B, Zhang S, He R, Xiao L, Zoya I, Yu L, Zhang Y, Li Y, Gao J, Li K. Gold-nanoparticle-based multistage drug delivery system for antitumor therapy. *Drug Deliv*, **29**, 3186-3196 (2022).
 42. Jiang W, Hu JW, He XR, Jin WL, He XY. Statins: a repurposed drug to fight cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, **40**, 241 (2021).
 43. Augustin Y, Staines HM, Krishna S. Artemisinins as a novel anti-cancer therapy: Targeting a global cancer pandemic through drug repurposing. *Pharmacol Ther*, **216**, 107706 (2020).
 44. La-Beck NM, Liu X, Shmeeda H, Shudde C, Gabizon AA. Repurposing amino-bisphosphonates by liposome formulation for a new role in cancer treatment. *Semin Cancer Biol*, **68**, 175-185 (2021).
 45. Kirtonia A, Gala K, Fernandes SG, Pandya G, Pandey AK, Sethi G, Khattar E, Garg M. Repurposing of drugs: An attractive pharmacological strategy for cancer therapeutics. *Semin Cancer Biol*, **68**, 258-278 (2021).
 46. Lanz J, Biniiaz-Harris N, Kuvaldina M, Jain S, Lewis K, Fallon BA. Disulfiram: mechanisms, applications, and challenges. *Antibiotics*, **12**, 524 (2023).
 47. Li H, Wang J, Wu C, Wang L, Chen ZS, Cui W. The combination of disulfiram and copper for cancer treatment. *Drug Discov Today*, **25**, 1099-1108 (2020).

48. Ge EJ, Bush AI, Casini A, Cobine PA, Cross JR, DeNicola GM, Q. Dou P, Franz KJ, Gohil VM, Gupta S, Kaler SG, Lutsenko S, Mittal V, Petris MJ, Polishchuk R, Ralle M, Schilsky ML, Tonks NK, Vahdat LT, Aelst LV, Xi D, Yuan P, Brady DC, Chang CJ. Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia. *Nat Rev Cancer*, **22**, 102–113 (2022).
49. Skrott Z, Mistrik M, Andersen KK, Friis S, Majera D, Gursky J, Ozdian T, Bartkova J, Turi Z, Moudry P, Kraus M, Michalova M, Vaclavkova J, Dzubak P, Vrobel I, Pouckova P, Sedlacek J, Miklovcova A, Kutt A, Li J, Mattova J, Driessen C, Dou QP, Olsen J, Hajduch M, Cvek B, Deshaies RJ, Bartek J. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adapter NPL4. *Nature*, **552**, 194–199 (2017).
50. Ren L, Feng W, Shao J, Ma J, Xu M, Zhu BZ, Zheng N, Liu S. Diethyldithiocarbamate-copper nanocomplex reinforces disulfiram chemotherapeutic efficacy through light-triggered nuclear targeting. *Theranostics*, **10**, 6384-6398 (2020).
51. Paun RA, Dumut DC, Centorame A, Thuraisingam T, Hajduch M, Mistrik M, Dzubak P, Sanctis JBD, Radzioch D, Tabrizian M. One-step synthesis of nanoliposomal copper diethyldithiocarbamate and its assessment for cancer therapy. *Pharmaceutics*, **14**, 640 (2022).
52. Karamanakos PN, Trafalis DT, Papachristou DJ, Panteli ES, Papavasiliopoulou M, Karatzas A, Kardamakis D, Nasioulas G, Marselos M. Evidence for the efficacy of disulfiram and copper combination in glioblastoma multiforme - A propos of a case. *J BUON*, **22**, 1227-1232 (2017).
53. Huang J, Campian JL, Gujar AD, Tran DD, Lockhart AC, DeWees TA, Tsien CI, Kim AH. A phase I study to repurpose disulfiram in combination with temozolomide to treat newly diagnosed glioblastoma after chemoradiotherapy. *J Neurooncol*, **128**, 259-266 (2016).
54. Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, **8**, 38022–38043 (2017).
55. Akimoto J, Haraoka J, Aizawa K. Preliminary clinical report on safety and efficacy of photodynamic therapy using talaporfin sodium for malignant gliomas. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **9**, 91-99 (2012).
56. Muragaki Y, Akimoto J, Maruyama T, Iseki H, Ikuta S, Nitta M, Maebayashi K, Saito T, Okada Y, Kaneko S, Matsumura A, Kuroiwa T, Karasawa K, Nakazato Y, Kayama T. Phase II clinical study on intraoperative photodynamic therapy with talaporfin sodium and semiconductor laser in patients with malignant brain tumors. *J*

- Neurosurg*, **119**, 845–852 (2013).
57. Laserphyrin for injection 100 mg, Medicine Specification URL: https://www.info.pmda.go.jp/go/pack/4299404D1028_1_11/
 58. Bastiancich C, Silva AD, Estève MA. Photothermal therapy for the treatment of glioblastoma: potential and preclinical challenges. *Front Oncol*, **10**, 610356 (2021).
 59. Ly NH, Nguyen TD, Zoh KD, Joo SW. Interaction between diethyldithiocarbamate and Cu(II) on gold in non-cyanide wastewater. *Sensors*, **17**, 2628 (2017).
 60. Zong W, Cao S, Xua Q, Liu R. The use of outer filter effects for Cu²⁺ quantitation: a unique example for monitoring nonfluorescent molecule with fluorescence. *Luminescence*, **27**, 292–296 (2012).