科技部補助專題研究計畫成果報告
期末報告

奈米化光動力療法標靶口腔癌幹細胞之轉譯研究

計 畫 類 別 ： 個別型計畫
計 畫 編 號 ： MOST 103-2314-B-040-017-
執 行 期 間 ： 103年08月01日至104年07月31日
執 行 單 位 ： 中山醫學大學牙醫學系（所）

計 畫 主 持 人 ： 余權航
共 同 主 持 人 ： 余承佳、周明勇
計畫參與人員： 此計畫無其他參與人員

處 理 方 式 ：
1.公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2.「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3.「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中 華 民 國 104 年 10 月 31 日

中 文 摘 要 ： 口腔癌為台灣男性癌症發生率及死亡率的第四位。90%的口腔癌為鱗狀細胞癌，其特性為容易復發及局部淋巴結轉移轉移之特性。近年來研究發現癌症幹細胞(cancer stem cells, CSCs)」，是造成口腔癌患者對治療產生抗藥性、腫瘤容易復發及癌症轉移的重要關鍵。為此，標靶癌幹細胞特性，在口腔癌輔助治療方面，或許是一個很好的方向。本轉譯計畫利用奈米藥物結合光動力療法，期待透過調降癌幹細胞特性，應用於口腔癌治療。我們主要利用溶熱法(solvothermal method)來製備鑭系元素摻雜的奈米粒子，而此奈米粒子具有能量上轉換(energy upconversion)的能力，可以吸收能量較低的近紅外光後，

同時放射出能量較高、波長較短的紫外光、藍光、紅光。接著我們在材料的合成上採用layer-by-layer (LBL)的策略，在奈米粒子表面修飾親水性的樹枝狀高分子，此外我們使用Lemieux-von Rudloff氧化法，將UCNP表面上的油酸分子(oleic acid)的C=C雙鍵氧化成COOH，這樣即可修飾為水溶性之UCNP。接著我們利用靜電吸附力將表面帶有64個NH2 基團的第四代G4 PAMAM 樹枝狀高分子固定在UCNP表面上。而帶有負電荷的三重態光敏感劑Ce6及碳六十衍生物，再藉由靜電作用力吸附在奈米粒子的最外圍，而得到具備光動力療法的複合材料。本研究強調基礎研究與臨床應用接軌的重要性，結合奈米藥物與光動力療法標靶癌幹細胞，期待有助於口腔癌的治療。

中文關鍵詞： 光動力療法

英 文 摘 要 ：

英文關鍵詞：

科技部補助專題研究計畫成果報告

（□期中進度報告/■期末報告）

計畫名稱:奈米化光動力療法標靶口腔癌幹細胞之轉譯研究

計畫類別：■個別型計畫　□整合型計畫
計畫編號：MOST 103-2314-B-040-017
執行期間：　103 年 8 月 1　日至 104　年 7　月 31　　日

執行機構及系所：中山醫學大學牙醫系(所)

計畫主持人：余權航
共同主持人：周明勇、余承佳
計畫參與人員：

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ___ 份：
□執行國際合作與移地研究心得報告
□出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：
   □非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢
   ■涉及專利或其他智慧財產權，□一年■二年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：■否 □是
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 ■否 □是，____（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中　華　民　國　104　年 10　月　31　日

計畫中文摘要

口腔癌為台灣男性癌症發生率及死亡率的第四位。90%的口腔癌為鱗狀細胞癌，其特性為容易復發及局部淋巴結轉移轉移之特性。近年來研究發現癌症幹細胞(cancer stem cells, CSCs)」，是造成口腔癌患者對治療產生抗藥性、腫瘤容易復發及癌症轉移的重要關鍵。為此，標靶癌幹細胞特性，在口腔癌輔助治療方面，或許是一個很好的方向。本轉譯計畫利用奈米藥物結合光動力療法，期待透過調降癌幹細胞特性，應用於口腔癌治療。我們主要利用溶熱法(solvothermal method)來製備鑭系元素摻雜的奈米粒子，而此奈米粒子具有能量上轉換(energy upconversion)的能力，可以吸收能量較低的近紅外光後，同時放射出能量較高、波長較短的紫外光、藍光、紅光。接著我們在材料的合成上採用 layer-by-layer (LBL)的策略，在奈米粒子表面修飾親水性的樹枝狀高分子，此外我們使用 Lemieux-von Rudloff 氧化法，將 UCNP 表面上的油酸分子(oleic acid)的 C=C 雙鍵氧化成 COOH，這樣即可修飾為水溶性之 UCNP。接著我們利用靜電吸附力將表面帶有 64 個 NH_2 基團的第四代 G4 PAMAM 樹枝狀高分子固定在 UCNP 表面上。而帶有負電荷的三重態光敏感劑 Ce6 及碳六十衍生物，再藉由靜電作用力吸附在奈米粒子的最外圍，而得到具備光動力療法的複合材料。本研究強調基礎研究與臨床應用接軌的重要性，結合奈米藥物與光動力療法標靶癌幹細胞，期待有助於口腔癌的治療。

Abstract

Oral cancer ranks the fourth leading malignancy and cancer death in male population in Taiwan. Metastasis to lymph nodes and distant sites is the major cause of mortality in patients with oral cancer. Most patients relapse within months after current therapeutic treatments. A subpopulation of cells called cancer stem cells (CSCs) possessing stemness properties was shown to enrich after therapy, resulting in the relapse and metastasis of tumors. Therefore, targeting CSCs appears to be a promising therapeutic modality for oral cancer. Based on the previous studies, the purpose of the translational study is to investigate that nanoparticle-mediated photodynamic therapy (PDT) enhances chemosensitization of oral cancer through eliminating CSCs property. We have prepared ce6 photosensitizer nanoparticles for PDT. UCNP-mediated PDT (UCNP-PDT) inhibited proliferation rated and cancer stemness marker in oral cancer stem cells. In the integration of basic and clinical translational research study, we expect to prove that UCNP-PDT may be a potential chemo-adjuvant therapy against oral cancer and will be developed as a target therapy drug for personal therapy.

研究計畫之背景及目的

1. 口腔癌

口腔癌是全世界人類第六大癌症，在開發中國家為發生率排名第三的癌症 (1)。根據統計資料顯示口腔癌於 2002 年全世界人口之發生率為 274,000 例，約佔所有癌症病例的 2.5％ (1)。於台灣行政院衛生署統計資料，口腔癌的發生率和死亡率，在男性佔第四位，於全人口則佔第六位，口腔癌之病因主要和嚼檳榔、吸菸和喝酒有關，台灣約有 200 萬以上人口有嚼檳榔之習慣，約 80％之口腔癌死亡病例和嚼檳榔習慣有關。雖然口腔癌可用手術切除、化學治療和放射線治療，或合併上述三種方法中任二者或三者加以治療，於台灣，口腔癌患者的存活率仍然很低。根據高雄醫學大學陳玉昆醫師等人之統計，第一期口腔癌患者之五年存活率為 72%，第二期口腔癌患者之五年存活率為 39%，第三期口腔癌患者之五年存活率為 27%，第四期口腔癌患者之五年存活率為 12%。因此尋找治療法有潛力成為對抗口腔癌的化療輔佐藥劑，期待可幫助降低口腔癌的復發率與增加病人存活

2. 奈米藥物

奈米技術在生醫領域有著廣泛的應用和發展前景，奈米藥物即為重要發展方向之一。奈米藥物通常是指運用奈米技術研究開發之新的藥物製劑，包括藥物的直接奈米化和奈米藥物載體系統。奈米藥物粒徑小、表面積大，物理、化學和生物學性都比較高，與傳統藥物相比，能有效提高藥效，降低不良反應，為目前生醫研究的熱門議題(2)。藥物經奈米化後，其物理化學性質如飽和溶解度、溶出速度、晶型、顆粒表面疏水親水性，物理響應性如光、電、磁場響應性、pH敏感性、溫度敏感性等，以及生物特性如分子親和力發生改變，進而影響藥物的吸收、分布、代謝和排泄等動力學特性，甚至達到緩釋/控釋與標靶傳輸的釋放功能(3-5)。現在常用的奈米藥物載體系統如下：(一): Solid lipid nanoparticles (SLN，固體脂質奈米顆粒)：以固態的天然脂質或合成的類脂為載體材料製備的奈米藥物載體。其特點是採用生理相容性好、低毒性的類脂材料，並可工業化生產。同時具有藥物控釋和靶向特性、較高的載藥量、改善藥物穩定性等優點。為了提高載藥量，防止類脂質結晶導致藥物突釋現象，近年來發展出奈米結構脂質載體(nanostructured lipid carriers)(6)。(二): Microemulsion (ME，微乳)：是由油、水、表面活性劑和助表面活性劑四部分組成，大小為 10~100 nm的乳滴分散在另一種液體中形成之熱力學穩定的膠體分散系統。可增加難溶性藥物的溶解性，增強水溶性藥物的穩定性，並大量生產。微乳因其高擴散性和皮膚通透性，在透皮吸收製劑的研究方面受到極大關注(7)。(三): Polymer nanoparticles (聚合物奈米顆粒)：包括聚合物奈米球和聚合物奈米囊，前者屬於基質骨架型，藥物吸附或偶連載奈米球表面，或溶解、分散、包封在實心球中；後者屬於膜殼型，由聚合物材料外殼和液狀內核構成，藥物主要溶解在液狀內核的油相或水相中，可改變藥物的體內分佈特徵(8)。(四): Polymeric micelles (高分子微胞)：由兩親性共聚物形成的載體系統。具有載藥量大、穩定性高、可修飾性強，對難溶性藥物有增溶作用、生物相容性等特點(9)。(五): Nanoliposome (奈米微脂體)：一般指大小在 20~80 nm的單室脂質體，由磷脂與膽固醇構成，用作載藥系統，具有增強藥物靶向性、延長藥物作用時間、提高藥物穩定性、降低藥物不良反應等特點。其應用廣泛，可作為抗腫瘤藥物的載體、靶向網狀內皮系統的藥物載體、抗菌藥物的載體等。適用的給藥途徑也非常多，可用於靜脈注射、皮下和肌肉注射、口服給藥、眼部給藥、經皮吸收給藥等(10)。(六): Dendrimers (樹狀大分子)：為一類三維、高度有序並且可以從分子水平對其大小、形狀、結構和功能基團進行設計的新型奈米藥物載體系統，具有生物相容性、無免疫排反應、末端氨基可進一步修飾等特點(11)。(七): Nanosuspension (奈米懸浮液)：為奈米級藥物藉由高壓均質方法使其均勻分布在界面活性劑溶液中。主要用於提高難溶性藥物的飽和濃度和溶出速度，提高生物利用度，減少用藥量，降低不良反應。由於化學合成的候選藥物有近 40%為低溶解性而無法進入臨床應用，奈米懸浮液可提高新藥研發的成功率，降低研發風險和費用(12)。整體而言，奈米藥物的優勢可歸類為以下幾點：增強藥物靶向性(更準確的針對特定組織或器官給藥)、增強緩控釋性(延長藥物半衰期)、提高藥物生物利用度、增加藥物穩定性、高療效低毒性、建立新的給藥途徑及減少副作用(13-16)。

3. 光動力治療

光動力治療(Photodynamic therapy)為新穎的癌症治療方式。光動力療法最主要的二個原素為光和光感物質(17)。施行此種療法時，患者通常先需服用一種光感物質製劑，讓腫瘤細胞吸收此種光感物質後，再以特殊波長的光，照射腫瘤細胞，加以激發及殺死腫瘤細胞。當腫瘤組織中的光感物質以特殊波長的光加以激發時，光會將其能量轉移至氧分子，導致形成活性氧物質，此活性氧物質即可將腫瘤細胞直接殺死，或可破壞腫瘤中的血管系統，形成血栓，造成腫瘤細胞壞死 (17)。也有學者認為光動力治療，可以激發人體的免疫系統，以進一步殺死腫瘤細胞。5-氨基酮戊（5-aminolevulinic acid, ALA）為新研發的第二代光感藥物（photosensitizer）。ALA光動力治療可以成功的用於診斷及治療人體的癌症或癌前病變。根據過去學者之研究，利用ALA之光動力治療，可用於治療食道癌、膀胱癌，皮膚癌和口腔癌 (17-22)。ALA本身並非光感物質，它是光感物質原紫質IX（protoporphyrin IX, PpIX）之前驅物質。通常全身性服用或局部塗抹ALA後，經過 1.5 至 6 個小時後，ALA會被代謝成PpIX，PpIX於腫瘤或變異上皮細胞中的濃度，通常會高於正常上皮細胞中的濃度，即可利用此種特性，以施行ALA媒介之光動力治療。ALA於服用後 48 小時內，可以被身體代謝清除乾淨，因此使用ALA之光動力治療，較無皮膚光過敏之問題存在。局部塗抹ALA相關的光感物質製劑，利用ALA之光動力治療是一種非侵入性的療法，它可以重複使用，而不會有累積的毒性，治療後外觀不會有太大的改變及結疤，且組織中PpIX的含量可以用螢光光譜偵測，如此我們可以知道，何時組織中之PpIX含量達到最高濃度，那個時間就是最佳的照光治療時間點。根據過去學者之研究，局部塗抹的ALA可以被口腔癌和口腔癌前病變組織選擇性的吸收，臺灣大學江俊斌教授及本人研究發現，ALA之光動力治療可以使用於口腔癌和口腔癌前病變臨床治療，其療效都令人滿意 (17-22)。 臺灣大學郭彥彬教授研究團隊證實ALA-PDT會透過NF-κB誘發口腔癌細胞株Ca9-22 走向細胞凋亡 (23)。微型RNA(microRNAs, miRNAs- 在腫瘤發展過程中，具有調節抑癌基因 (tumor suppressor genes, TSG) 或致癌基因 (oncogenes, OG) 的作用。光動力治療可調控HeLa細胞之miR-210 及miR-296 表現 (24)，但ALA之光動力治療於口腔癌幹細胞調控之微型RNA仍未知。近年來奈米藥物應用於疾病治療及診斷已是全球熱門趨勢， 因此本計畫欲利用奈米藥物結合光動力治療，期待應用於口腔癌防治。

4. 癌症幹細胞

癌症是指突變細胞不正常增殖，入侵周遭組織甚或轉移至體內其他器官的疾病。其源自於細胞基因突變導致正常細胞增生能力失控且永生不滅。在 1855 年，德國病理學家Rudolf Virchow提出癌細胞是來自於自身成熟組織中一些具胚胎特性但休眠中的細胞，受到刺激後激活所演變而來的 (25)。1983 年，Mackillop提出幹細胞假說，認為在所有的腫瘤中都可能存在著一小部份細胞具有類似幹細胞的特性 (26)，與傳統認為所有的癌細胞都會無止盡的分化的概念不同。到了 1994 年，加拿大多倫多大學的Lapidot與其同事自人類急性骨髓性白血病 (AML) 患者組織中，利用細胞表面蛋白標誌分離出移植到免疫缺乏的SCID小鼠體內後，能產生類似AML症狀的白血病起始細胞 (leukemia-initiating cells) (27)；該群細胞的數量相當稀少，約二十五萬顆癌症細胞中才存有一顆，且分化上相對不成熟，具有幹細胞的特性，提供了幹細胞假說實質的支持證據。之後，研究人員藉由細胞表面蛋白標誌陸續從乳癌 (28)，大腸直腸癌 (29)，腦癌 (30)，胰臟癌 (31, 32) 及前列腺癌 (33) 中分離出具幹細胞特性的癌症起始細胞群，稱之為癌症幹細胞。癌症幹細胞形成方式不只一種，可能來自於已分化的細胞突變，導致細胞去分化。而這些去分化的細胞若再進一步發生癌化突變，則有可能形成癌症幹細胞(34, 35)。例如Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)，一種從上皮細胞型態(epithelium) 轉變成間葉細胞(mesenchyme) 型態的特殊過程，是細胞去分化的作用。最初被定義為胚胎時期與器官發育現象相關，而近年來有許多文獻指出，EMT 參與癌細胞自良性腫瘤變成轉移性癌細胞的過程，可做為癌化的指標之一。另外癌症幹細胞也有可能來自於成體幹細胞突變：在經常進行細胞更新的組織，如小腸或皮膚，因這些組織的幹細胞經常自我更新 (self-renewal)，可能較易累積某些突變而癌化。或是因為幹細胞周遭環境改變，刺激幹細胞突變為癌症幹細胞。癌症幹細胞與一般幹細胞一樣，具有自我更新與分化的

能力，會不斷地生長且分化為不同種類的腫瘤細胞，然而不同於正常的幹細胞，其自我更新的能力不受正常地調控 (28, 36)，具有高度自我更新的能力。癌症幹細胞也與一般的癌症細胞不同，其擁有引起腫瘤發生的能力，只需要少數的癌症幹細胞便可以形成腫瘤。因癌症幹細胞具有上述的能力，癌症幹細胞的活化增生與腫瘤復發，腫瘤細胞的轉移及腫瘤的抗藥性間具有密切的關聯性(37)。傳統治療癌症的方法主要以殺死所有的癌細胞為目標，不論是使用化學藥物，放射線治療或是外科切除病灶的方法。然而這些方法都容易在幾個月或幾年後觀察到復發的情況，且復發增生的腫瘤會較先前的腫瘤細胞更具抗藥性，增生活性也更強。現已知道是源於癌症幹細胞的存在。其會表現較高ATP-binding cassette (ABC) 家族膜蛋白 (如P-glycoprotein MRP1、MRP2、及Bcrp1/ABCG2 (ATP-binding cassette transporter G2, ABCG2)，容易將傳統藥物排出細胞外，因此產生高度抗藥性 (37, 38)。此外癌症幹細胞平常處於不活化的狀態，生長速率遠低於較成熟的癌症細胞，甚至不分裂的狀態，對抑制生長週期的藥物不感威脅，對輻射的敏感度也較一般癌症細胞低，再加上其DNA修復機制優於一般的癌症細胞 (39)，造成其對抑制生長週期的藥物與放射線治療有高度的抵抗性，使傳統療法在治療癌症上遇到了很大的瓶頸。因此，近年來在治療癌症上，多半著手於消滅癌症幹細胞為主要方針，合併傳統癌症療法，冀以徹底消滅癌細胞。故深入了解癌症幹細胞與一般幹細胞不同的特性與其特殊的代謝增生機制為目前癌症研究的當務之急。目前分離癌症幹細胞的方法有三種: (一) 將固態腫瘤細胞培養在不含血清但含有特定生長因子如鹼性成纖維細胞生長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF) 的培養液中會促使癌症幹細胞形成球體 (spheres) 使癌症幹細胞保持在未分化的狀態(40, 41)。分離出之癌症幹細胞球體會大量表現幹細胞之標記基因 (Nanog, Oct-4, Nestin, CD133, CD117)，且具備高度致癌力 (42-44)。(二) 癌症幹細胞的細胞膜表面會高度表現ATP-binding cassette (ABC) 家族膜蛋白ABCG2，具有主動排出Hoechst 33342 染劑的能力。將癌細胞染上Hoechst 33342 染劑後，經由流式細胞儀分析出少數不帶有染劑的次族群細胞 (Side population, SP) (45)，此即為癌症幹細胞。(三) 根據特異性表現在癌症幹細胞的表面抗原，例如CD133 在腦癌 (46)，前列腺癌 (47)，大腸癌 (29)，肺癌 (48)，肝癌 (49) 及口腔癌症幹細胞 (Damek-Poprawa *et al*, 2011; Prince *et al*, 2007; Yang *et al*, 2010) 中。CD44 則是在卵巢癌 (50) 與頭頸部鱗狀癌症幹細胞 (51) 中被發現，接著利用流式細胞儀 (flow cytometry) 辨識癌症幹細胞上特殊細胞表面標誌，將癌症幹細胞分選出。從癌細胞中分選出癌症幹細胞後，進行體外培養將利於後續研究癌症發生，轉移，復發等分子機制調控，並可利用於藥物篩選平台之開發，甚或直接用於癌症治療上，故正確分離癌症幹細胞仍為研究癌症幹細胞中過程中重要的一環。癌症幹細胞對癌症起始、抗藥性及復發等關係密切，而口腔癌症幹細胞對口腔癌起始及化療阻抗性之角色已被驗證 (52, 53)，臨床病理意義上，口腔癌症幹細胞標記表性與腫瘤惡性程度呈正相關性，可用來當做口腔癌患者存活率之預後標記 (42, 54)。因此針對口腔癌症幹細胞發生與生長的調控機制進行研究，以利發展口腔癌突破性療法，將助於口腔癌症病患對傳統化療藥物之不適，提昇化療敏感性及病患存活率。

計畫結果

圖1.穿透式電子顯微鏡TEM分析

我們主要利用溶熱法(solvothermal method)來製備鑭系元素摻雜的奈米粒子，而此奈米粒子具有能量上轉換(energy upconversion)的能力，可以吸收能量較低的近紅外光後，同時放射出能量較高、波長較短的紫外光、藍光、紅光。一般合成條件簡述如下: 我們秤取 Y^{3+} (1.4 mmol)、Yb^{3+} (0.6 mmol)、Tm^{3+} (0.01 mmol)放入雙頸圓底燒瓶中，並加入油酸作為溶劑，利用氬氣除氧約 20 分鐘後，在真空下緩慢加熱至 120°C，維持 30 分鐘以除去水氣後降溫，並加入預先溶解於甲醇中的 NaOH(5.0 mmol)和 NH_4F(8.0 mmol)，維持 在 50°C 下均勻攪拌 30 分鐘。之後將溫度升到 70°C，以抽真空裝置除去甲醇，並維持 70°C 攪拌約 30 分鐘，接著快速升溫至 300°C，在氬氣下反應 30 分鐘。反應結束後，待溶液冷卻到室溫，加入過量乙醇得到固體沉澱，離心後，取固體回溶乙醇並反複上述步驟，得到最終產物:以 Yb 與

Tm 兩鑭系元素摻雜之 $NaYF_4$ 奈米晶體(以下簡稱 UCNP)。圖 1 為穿透式電子顯微鏡 TEM 的分析結果，我們發現藉由反應條件的控制，可以製備出球型與棒狀兩種不同型態的 UCNP 晶體。而從影像中也可以發現球型 UCNP 的粒徑約在 10~20 nm 左右。

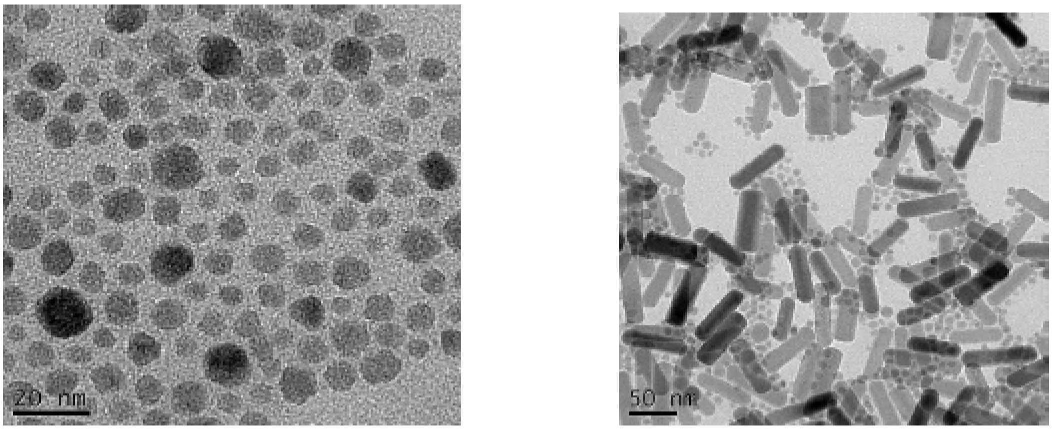


圖 2. (a) EDS 元素分析。以 980 nm 雷射光激發之上轉換螢光光譜圖(b)與照片(c) 。

接著我們對所製備出來的球型奈米粒子，進行EDS元素分析(圖2a)。結果發現Na、Y、F、Tm、Yb等元素各占的重量百分比例約為14%、29%、52%、2%、3%，大致符合組成成分。我們也利用自組裝的光學量測系統來觀察能量上轉換的行為。如圖2b所示，利用980 nm近紅外光雷射激發UCNP溶液後，成功產生能量上轉換而放射出不同波段的光，分別是紫外光(λ_{max} = 345, 360 nm)、藍光(λ_{max} = 450, 475 nm)、紅外光(λ_{max} = 645 nm)。

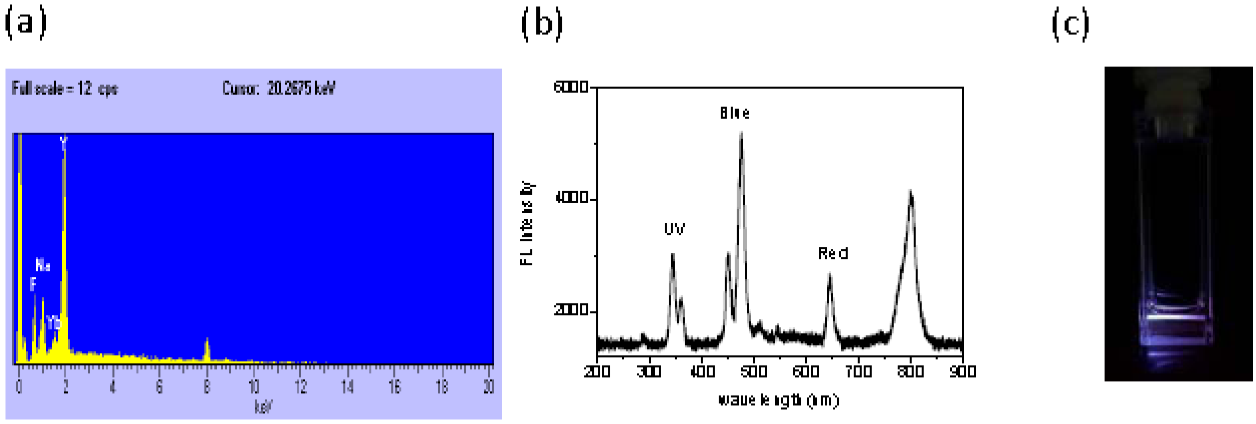


圖 3. 具有光動力療法功能之 UCNP 奈米粒子的合成。

由於一般光動力療法常使用的市售光敏劑，大都只能吸收紫外光或可見光。而為了提高激發光源對於細胞或組織的穿透力，可使用近紅外光來照射此 UCNP 材料，透過能量上轉換的機制，放射出三個特定波段的螢光，便可間接激發光敏劑而達到光動力療法的效果。但是我們所製備出的 UCNP 無法溶解在水中，而降低其在生物應用的可能性。因此，我們在材料的合成上採用 layer-by-layer (LBL)的策略，在奈米粒子表面修飾親水性的樹枝狀高分子。如圖 3 所示，我們使用 Lemieux-von Rudloff 氧化法，將 UCNP 表面上的油酸分子(oleic acid)的 C=C 雙鍵氧化成 COOH，這樣即可修飾為水溶性之 UCNP。接著我們利用靜電吸附力將表面帶有 64 個 NH_2 基團的第四代 G4 PAMAM 樹枝狀高分子固定在 UCNP 表面上。而帶有負電荷的三重態光敏感劑 Ce6 及碳六十衍生物，再藉由靜電作用力吸附在奈米粒子的最外圍，而得到具備光動力療法的複合材料。

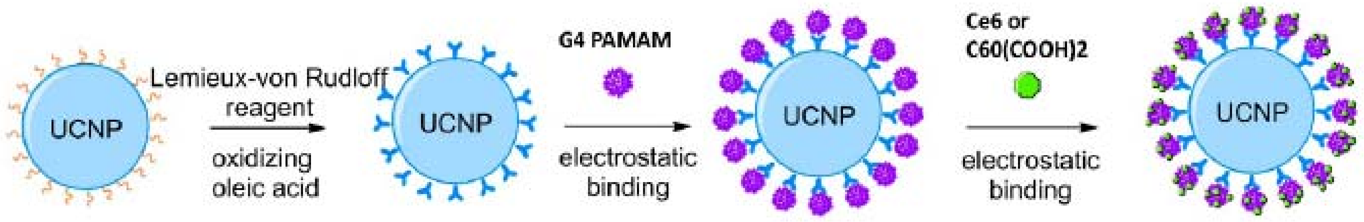
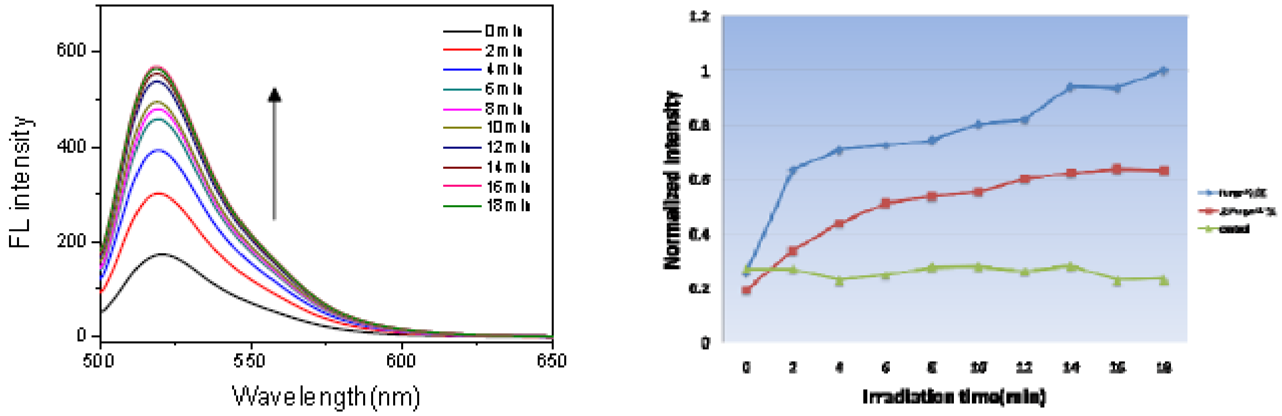


圖 4. (a) FCLA 螢光強度隨著照射時間增長而上升，證實活性氧分子的生成。(b) 增加系統內空氣含量可以有效提高此化驗法的靈敏度。

為了證實材料具備光動力療法的潛力，我們採用海螢螢光素分子(FCLA)來捕捉材料照光後生成的活性氧分子-單重態氧分子。當產生越多活性氧分子，FCLA在519 nm的螢光就會持續上升。而為了增加偵測靈敏度，我們也嘗試將空氣打入含有光敏劑的水溶液，以增加水中的含氧量。結果發現螢光強度約增加了兩倍左右。圖4為FCLA化驗法所得到的分析結果，隨著照光時間越長，螢光強度逐步上升，因此證實活性氧分子的生成。而相關生物實驗目前尚在進行中



參考文獻

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians. 2013;63:11-30.
2. Rosen H, Abribat T. The rise and rise of drug delivery. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:381-5.
3. Dufes C, Uchegbu IF, Schatzlein AG. Dendrimers in gene delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57:2177-202.
4. Moshfeghi AA, Peyman GA. Micro- and nanoparticulates. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57:2047-52.
5. Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. Drug Discov Today. 2003;8:1112-20.
6. Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. Adv Drug Deliv Rev. 2001;47:165-96.
7. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev. 2000;45:89-121.
8. Paszko E, Ehrhardt C, Senge MO, Kelleher DP, Reynolds JV. Nanodrug applications in photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2011;8:14-29.

9. Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux JC. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. J Control Release. 2005;109:169-88.
10. Cullis PR, Chonn A. Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. Adv Drug Deliv Rev. 1998;30:73-83.
11. Muller RH, Keck CM. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. J Biotechnol. 2004;113:151-70.
12. Keck CM, Muller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. Eur J Pharm Biopharm. 2006;62:3-16.
13. Kateb B, Chiu K, Black KL, Yamamoto V, Khalsa B, Ljubimova JY, et al. Nanoplatforms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: what should be the policy? Neuroimage. 2011;54:10.
14. Kozlowska D, Foran P, MacMahon P, Shelly MJ, Eustace S, O'Kennedy R. Molecular and magnetic resonance imaging: The value of immunoliposomes. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61:1402-11.
15. Torchilin VP. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. Aaps J. 2007;9:E128-47.
16. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. Clin Pharmacol Ther. 2008;83:761-9.
17. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. Nature reviews Cancer. 2003;3:380-7.
18. Chen HM, Chen CT, Yang H, Kuo MY, Kuo YS, Lan WH, et al. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. Oral oncology. 2004;40:630-7.
19. Chen HM, Yu CH, Tu PC, Yeh CY, Tsai T, Chiang CP. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia and oral leukoplakia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. Lasers in surgery and medicine. 2005;37:114-22.
20. Lin HP, Chen HM, Yu CH, Yang H, Wang YP, Chiang CP. Topical photodynamic therapy is very effective for oral verrucous hyperplasia and oral erythroleukoplakia. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2010;39:624-30.
21. Yu CH, Lin HP, Chen HM, Yang H, Wang YP, Chiang CP. Comparison of clinical outcomes of oral erythroleukoplakia treated with photodynamic therapy using either light-emitting diode or laser light. Lasers in surgery and medicine. 2009;41:628-33.
22. Yu CH, Chen HM, Hung HY, Cheng SJ, Tsai T, Chiang CP. Photodynamic therapy outcome for oral verrucous hyperplasia depends on the clinical appearance, size, color, epithelial dysplasia, and surface keratin thickness of the lesion. Oral oncology. 2008;44:595-600.
23. Chen HM, Liu CM, Yang H, Chou HY, Chiang CP, Kuo MY. 5-aminolevulinic acid induce apoptosis via NF-kappaB/JNK pathway in human oral cancer Ca9-22 cells. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2011;40:483-9.
24. Kushibiki T. Photodynamic therapy induces microRNA-210 and -296 expression in HeLa cells. Journal of biophotonics. 2010;3:368-72.
25. Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. Nature reviews Cancer. 2005;5:311-21.

26. Mackillop WJ, Ciampi A, Till JE, Buick RN. A stem cell model of human tumor growth: implications for tumor cell clonogenic assays. Journal of the National Cancer Institute. 1983;70:9-16.
27. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature. 1994;367:645-8.
28. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100:3983-8.
29. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature. 2007;445:106-10.
30. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature. 2004;432:396-401.
31. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer research. 2007;67:1030-7.
32. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell stem cell. 2007;1:313-23.
33. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. Cancer research. 2005;65:10946-51.
34. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 2007;318:1917-20.
35. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007;131:861-72.
36. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001;414:105-11.
37. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. The New England journal of medicine. 2006;355:1253-61.
38. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. Nature reviews Cancer. 2005;5:275-84.
39. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature. 2006;444:756-60.
40. Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1999;19:4462-71.
41. Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. Trends in neurosciences. 2003;26:125-31.
42. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14:4085-95.
43. Chen YS, Wu MJ, Huang CY, Lin SC, Chuang TH, Yu CC, et al. CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. PloS one. 2011;6:e28053.
44. Wu MJ, Jan CI, Tsay YG, Yu YH, Huang CY, Lin SC, et al. Elimination of head and neck cancer initiating cells through targeting glucose regulated protein78 signaling. Molecular cancer. 2010;9:283.
45. Song J, Chang I, Chen Z, Kang M, Wang CY. Characterization of side populations in HNSCC: highly

invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. PloS one. 2010;5:e11456.
46. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer research. 2003;63:5821-8.
47. Birnie R, Bryce SD, Roome C, Dussupt V, Droop A, Lang SH, et al. Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. Genome biology. 2008;9:R83.
48. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell death and differentiation. 2008;15:504-14.
49. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. Biochemical and biophysical research communications. 2006;351:820-4.
50. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. Cancer research. 2008;68:4311-20.
51. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007;104:973-8.
52. Yu CC, Chen YW, Chiou GY, Tsai LL, Huang PI, Chang CY, et al. MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumourigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation. Oral Oncol. 2011;47:202-10.
53. Lo WL, Yu CC, Chiou GY, Chen YW, Huang PI, Chien CS, et al. MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. The Journal of pathology. 2011;223:482-95.
54. Yang MH, Hsu DS, Wang HW, Wang HJ, Lan HY, Yang WH, et al. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. Nature cell biology. 2010;12:982-92.

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/10/31

科技部補助計畫	計畫名稱: 奈米化光動力療法標靶口腔癌幹細胞之轉譯研究
	計畫主持人: 余權航
	計畫編號: 103-2314-B-040-017- 學門領域: 牙醫學

無研發成果推廣資料

103年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：余權航	**計畫編號：**103-2314-B-040-017-
計畫名稱：奈米化光動力療法標靶口腔癌幹細胞之轉譯研究	

成果項目			量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）
			實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比		
國內	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
其他成果（無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。）	研發成果撰寫中 準備投稿至國際期刊						

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科教處計畫加填項目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估 ■達成目標 □未達成目標（請說明，以100字為限） 　　□實驗失敗 　　□因故實驗中斷 　　□其他原因 說明：
2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形： 論文：□已發表 □未發表之文稿 ■撰寫中 □無 專利：□已獲得 □申請中 ■無 技轉：□已技轉 □洽談中 ■無 其他：（以100字為限）
3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限） 本研究強調基礎研究與臨床應用接軌的重要性，結合奈米藥物與光動力療法標靶癌幹細胞，期待有助於口腔癌的治療。