

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13321

研究課題名(和文) ナノ粒子のプラズモン共鳴を用いたオルガネラの温度場操作に基づく細胞機能制御の試み

研究課題名(英文) The first attempt at active control of cellular function based on organelle-level thermal handling using nanoparticles

研究代表者

森田 康之 (Morita, Yasuyuki)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90380534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん治療における新しいDDSキャリアの開発に成功した。そのキャリアナノ粒子は、Fe₃O₄をコアとし、多孔のSiO₂をシェルとするコア-シェル構造を有する。Fe₃O₄は磁性をもつため、交流磁場印加により発熱するハイパーサーミア効果を有し、体内深部のがんまで適用可能である。SiO₂は抗がん剤を担持する機能を有する。さらに、このナノ粒子表面に、tLyP-1ペプチドを修飾し、正常細胞には集積せず、がん細胞のみに集積し、機能を発揮するキャリアナノ粒子の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：A new DDS carrier has been developed for cancer treatment. The nanoparticles are core-shell structure which is Fe₃O₄ for the core material and SiO₂ for the porous shell material. The Fe₃O₄ is heated by applying alternating magnetic field, and brings out hyperthermia effect. The function of porous SiO₂ is for support of anti-cancer drug. Additionally, the surface of the nanoparticles developed were covered with tLyP-1 peptides which home only cancer cells not normal cells, thereby we have succeeded an active targeting DDS for cancer treatment.

研究分野：生体工学

キーワード：ナノ材料 ナノバイオ ドラッグデリバリーシステム 透過膜ペプチド EPR効果 がん治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 全ての細胞は異化・同化の化学反応、いわゆる代謝を通して恒常性を維持するとともに、様々な機能(遊走, 分裂, 分化, アポトーシスなど)を発現している. この化学反応は, 環境温度に極めて敏感である. その反応速度の指標として「 Q_1 値 (温度が 1°C 上昇したときの反応速度の変化)」が次式により定義されている.

$$Q_1 = k_{t+1} / k_t$$

ここで, k_t, k_{t+1} は温度 $t, t+1^\circ\text{C}$ のときのそれぞれの反応速度定数である. 上式から温度が 1°C 上昇することにより, Q_1 値は 8.7~9.6% 増加する. このことは, 温度場が細胞の機能制御に対して極めて重要な役割を果たしていることを示している.

(2) その細胞はがん細胞でも同じことである. すなわち, 何らかの手法で, 温度を上昇させることにより, がん細胞のアポトーシス・ネクローシスを誘導することができる (ハイパーサーミアあるいは温熱療法). しかし, 正常細胞に影響を与えることなく, がん細胞のみ選択的に加熱することは難しい.

(3) ドラッグデリバリーシステム (DDS; Drug Delivery System) で用いられるナノ粒子は, ナノ・マイクロレベルの複雑な構造体へ集積しやすい特性を有する (EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention effect)). がん組織/がん細胞は栄養供給のため, 微細な毛細血管を誘引する. そのため, その表面は複雑な構造を有している. したがって, ナノ粒子に加熱機能を付帯し, この EPR 効果の特性を利用すれば, がん細胞のみ選択的に加熱することが可能かもしれない. しかし, ナノ・マイクロレベルの構造を有する組織/器官は身体中多く存在するため, EPR 効果のみに依拠した, 理想的な選択的加熱は困難である.

(4) この EPR 効果を用いた選択的集積性は, 正常組織/器官にも集積する. そのため, 加熱による正常組織の熱損傷に加え, DDS 本来の目的であるナノ粒子に送達薬剤 (抗がん剤) などが担持されていたら, 顕著な副作用となって現れる. したがって, EPR 効果のみによる DDS には限界がある.

2. 研究の目的

(1) がん治療に応用できる新たな DDS のキャリアを開発する.

(2) そのキャリアは, 体内深部のがん組織までハイパーサーミアが適用できるよう, 励起源を交流磁場とする.

(3) ハイパーサーミア機能を有する DDS キャリアのため Fe_3O_4 をコア材とし, 抗がん剤を担持するためナノレベルの多孔を有する SiO_2 をシェル材とするコア-シェル構造

($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ と表記) とする.

(4) コア材の Fe_3O_4 ナノ粒子の直径は, 理論的発熱効率の高い, 12-15 nm を目指し, シェル構造も含めた $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ ナノ粒子の直径は EPR 効果を発揮する 100 nm 以下を目指す.

(5) 背景で述べたように, EPR 効果のみは正常組織/器官にも集積し, 副作用の原因となるため, がん細胞の細胞膜のみに存在する膜タンパク・ニューロピリン 1 (NRP1) に選択的に結合するペプチド tLyP-1 を $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ ナノ粒子表面に修飾し ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}$), がん細胞のみに選択的に集積する機能を付与する.

3. 研究の方法

(1) 熱分解法により, Fe_3O_4 ナノ粒子を作製する. ナノ粒子直径は, 交流磁場を印加した際, 最も発熱効率の高い 12-15 nm とする.

(2) 上記(1)で作製した Fe_3O_4 ナノ粒子をコア材とし, その周りに SiO_2 を被覆する ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$). この被覆 SiO_2 には, nm レベルの細孔を空ける.

(3) 上記(2)で作製した $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ ナノ粒子の細孔に, 抗がん剤 (CPT) を担持させる ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2(\text{CPT})$).

(4) 上記(3)で作製した $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2(\text{CPT})$ ナノ粒子表面に, がん細胞の細胞膜に存在する膜タンパク NRP1 に特異的に結合するペプチド tLyP-1 を修飾する ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}(\text{CPT})$).

(5) 作製したナノ粒子の特性を評価する (形状観察, 組成分析, 発熱特性など).

(6) 作製したナノ粒子のがん細胞 (Hela 細胞) への選択的集積性および毒性を評価する. また比較として, 正常細胞 (ヒト骨髄由来間葉系幹細胞) に対するナノ粒子の選択的集積性および毒性を評価する.

4. 研究成果

(1) 作製した Fe_3O_4 ナノ粒子の直径は, 14.3 ± 1.7 nm (平均値 \pm 標準偏差) であり, 交流磁場印加による理論的発熱効率が高くなる, 設計通りのナノ粒子作製に成功した.

(2) 作製した Fe_3O_4 ナノ粒子への SiO_2 の被覆に成功した ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$). そしてその SiO_2 は, ガス吸着法で測定した結果, 4 nm 程度の細孔を有していた. 抗がん剤のサイズは 1 nm 程度であるため, 得られた細孔は抗がん剤を担持するのに十分なサイズと言える. また, $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ ナノ粒子の直径は, 89.1 ± 13.9 nm であった. このサイズであれば, EPR 効果 (< 100 nm) も十分発揮する.

(3) 作製した $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ ナノ粒子が、磁気特性を有していることを確認した。また、交流磁場印加による発熱も確認し、正規化した比吸収率 (normalized SAR 値: 印加周波数・印加磁場に依存しないよう正規化されたナノ粒子 1g あたり 1 秒間の発熱量) も 2.2 と、先行研究と比較しても極めて高い発熱特性を付帯することに成功した。

(4) 抗がん剤を担持したナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2(\text{CPT})$) の抗がん剤放出能についても評価し、2 時間で担持量の 80% を放出する能力を有していることを明らかにした。

(5) 作製したペプチド tLyP-1 を修飾したナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}(\text{CPT})$) が、がん細胞のみに集積し、正常細胞の間葉系幹細胞へは全く集積しないことを確認した。すなわち、がん細胞のみをターゲットとする DDS キャリアの開発に成功した。

(6) 今回開発したナノ粒子をがん細胞 (Hela) に投与し、生存率を評価した。その結果、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}$ は約 75% の生存率を示し、ナノ粒子自体におおきな毒性はないことが示された。そこに抗がん剤を担持させると ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}(\text{CPT})$)、約 26% まで生存率が低下し、細胞内部に取り込まれたナノ粒子から放出される抗がん剤の影響が大きいことを示している。一方、抗がん剤を担持させてなくても、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}$ ナノ粒子が集積したがん細胞に交流磁場を印加すると、25% 程度まで生存率が低下し、抗がん剤と同じ効果を示した。これは、ハイパーサーミアの有効性を示している。最後に、抗がん剤を担持したナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}(\text{CPT})$) に交流磁場を印加すると、両者の効果により、生存率が約 18% まで減少し、開発したナノ粒子ががん治療に大きな効果を及ぼす結果を得た。

(7) 今回開発したナノ粒子を正常細胞である間葉系幹細胞に投与し、生存率を評価した。その結果、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}$ 、およびそれに交流磁場を印加しても、生存率は変化しないことがわかった。これは、間葉系幹細胞が交流磁場印加によるナノ粒子加熱の影響を受けていないため、細胞内にナノ粒子を取り込んでいないことを示すものである。しかしながら、抗がん剤を担持したナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}(\text{CPT})$) を導入すると、若干ではあるが 80% まで生存率が低下した。これは、間葉系幹細胞は抗がん剤の封入されたナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}(\text{CPT})$) を取り込まないが、培地中に浮遊するナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}(\text{CPT})$) から溶出する抗がん剤の影響を若干受けるためと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Y. Morita, A. Ishiguro, and Y. Ju, Experimental evaluation of the effect of deposited nanoparticle size on current enhancement of solar cells using the sputtering technique, *Advanced Experimental Mechanics*, Vol.1, pp.115-119, 査読有, (2016).
- ② Y. Morita, N. Kawase, Y. Ju, and T. Yamauchi, Mesenchymal stem cell-induced 3D displacement field of cell-adhesion matrices with differing elasticities, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol.60, pp.394-400, 査読有, (2016).
- ③ Y. Morita, S. Yamamoto, and Y. Ju, Development of a new co-culture system, the “separable-close co-culture system,” to enhance stem-cell-to-chondrocyte differentiation, *Biotechnology Letters*, Vol.37, No.9, pp.1911-1918, 査読有, (2015). DOI: 10.1007/s10529-015-1858-5
- ④ Y. Morita, T. Sato, S. Watanabe, and Y. Ju, In vitro experimental study for the determination of cellular characteristics of mesenchymal stem cells using a non-uniform deformation field, *Proceedings of the SEM 2015 Annual Conference and Exposition on Experimental and Applied Mechanics*, Paper No.306, USB, 査読有, (2015).

[学会発表] (計 11 件)

- ① 森田康之, 櫻井涼平, 脇本卓磨, 徳悠葵, 巨陽, $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2\text{-tLyP-1}$ ナノ粒子を用いた標的指向型 DDS の開発, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017.01.19-2017.01.20, ウィンクあいち.
- ② 森田康之, 脇本卓磨, 櫻井涼平, 徳悠葵, 巨陽, コアシェル型ナノ構造体を用いたがんターゲティング DDS の開発, 日本実験力学会 分科会合同ワークショップ 2016 -実験力学における計測・データ処理の問題点・ノウハウ・工夫-, 2016.12.02-2016.12.03, 伊良湖ビューホテル.
- ③ 森田康之, 櫻井涼平, 脇本卓磨, 巨陽, コアシェル型ナノ構造体を用いた機能性 DDS の開発に関する研究, 日本実験力学会 The 15th Conference on Biomechanics in Matsushima, 2016.03.19, パレス松洲.
- ④ 山下貴大, 森田康之, 徳悠葵, 巨陽, 機械的伸縮刺激による腱細胞分化に関する 1 細胞計測, 日本機械学会東海支部第 65 期総会・講演会, 2016.03.17-2016.03.18, 愛知工業大学.
- ⑤ 森田康之, 河瀬直樹, 巨陽, 山内崇司, DVC 法による分化時の細胞-細胞外マトリックス間の 3D 力学場計測, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会,

- 2016.01.09-2016.01.10, 東京工業大学.
- ⑥ 森田康之, 佐藤俊博, 巨陽, 機械的伸縮刺激における間葉系幹細胞の腱細胞分化に対するひずみ依存性の解明, 日本機械学会 M&M2015 材料力学カンファレンス, 2015.11.21-2015.11.23, 慶應義塾大学.
 - ⑦ Y. Morita, T. Sato, and Y. Ju, Rigorous optimal cyclic strain for differentiation of mesenchymal stem cells into tenocytes using an exhaustive strain field, International Conference on Advanced Technology in Experimental Mechanics 2015 (ATEM'15) & The 14th Asian Conference on Experimental Mechanics (ACEM14), 2015.10.04-2015.10.08, Loisir Hotel Toyohashi, Toyohashi, Aichi.
 - ⑧ 山内崇司, 森田康之, 巨陽, 河瀬直樹, 浸潤性がん細胞と非浸潤性がん細胞が細胞外マトリックスに及ぼす変位場の3D計測, 日本機械学会第26回バイオフィロンティア講演会, 2015.10.02-2015.10.03, 九州大学.
 - ⑨ 櫻井涼平, 森田康之, 巨陽, 徐百耀, がんのイメージングと温熱治療特性を付加した多機能 DDS の創製と評価, 日本機械学会 2015 年度年次大会, 2015.09.13-2015.09.16, 北海道大学.
 - ⑩ Y. Morita, T. Sato, S. Watanabe, and Y. Ju, In vitro experimental study for the determination of cellular characteristics of mesenchymal stem cells using a non-uniform deformation field, The SEM 2015 Annual Conference and Exposition on Experimental and Applied Mechanics, 2015.06.08-2015.06.11, Hilton Orange County/Costa Mesa, Costa Mesa, California, USA.
 - ⑪ 栗田史哉, 森田康之, 佐藤俊博, 巨陽, パターニング技術を用いた間葉系幹細胞の形態制御による腱細胞分化への試み, 日本機械学会東海支部第64期総会・講演会, 2015.03.13-2015.03.14, 中部大学.

[図書] (計1件)

- ① Y. Morita, T. Sato, S. Watanabe, and Y. Ju, In vitro experimental study for the determination of cellular characteristics of mesenchymal stem cells using a non-uniform deformation field, Experimental and Applied Mechanics, Volume 4 (ISBN 978-3-319-22448-0), Chapter 16, pp.131-137, Springer, (2015).
DOI: 10.1007/978-3-319-22449-7_16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 康之 (MORITA, Yasuyuki)

名古屋大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90380534