

令和元年5月14日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11641

研究課題名(和文)CNT/抗体複合体による温熱療法用スマート超分子ヒーターの創製

研究課題名(英文)Preparation of molecular heater hyperthermic device based on carbon nanotube and specific antibody complex

研究代表者

川口 稔 (Kawaguchi, Minoru)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：10122780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ガンの温熱療法用デバイスとしてのカーボンナノチューブ/抗体複合体プラットフォームの創製と評価を行った。本研究では高分子被覆したカーボンナノチューブの生体内環境下での分散安定性と温熱発現特性を評価した。被覆カーボンナノチューブはPBS溶液中で安定な分散安定性を維持し、近赤外線照射による制御可能な温熱発現性を示した。またマウスを用いて投与後の体内動態をラマン分析で解析したところ、2週間後ではいずれの臓器においても投与した被覆カーボンナノチューブの残留は認められなかった。このことから、被覆カーボンナノチューブは生体内で長期間残留することなく、排泄されるものと推察され、その有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガンの温熱療法は生体に対する侵襲が少なく、外科療法や化学療法と併用することで治療効果の向上や治療期間の短縮が期待できる。このためには効率的な温熱発現が可能なデバイスの開発が不可欠である。本研究で検討した被覆カーボンナノチューブは体外からの近赤外線の照射によって発熱し、その温熱は制御可能である点が大きな利点である。さらに被覆高分子に官能基を導入し、ガンの特異抗体を共有結合した複合体とすれば、ターゲットのガン細胞に特異的に結合し、周囲の正常組織への熱障害を最小限にした状態での温熱療法ができる。そのため基盤プラットフォームとして、被覆カーボンナノチューブは有効なデバイスであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Carbon nanotubes have been explored as heat-delivery vehicles for thermal ablation of tumors. To use single-walled carbon nanotubes (SWNT) as a “molecular heater” for hyperthermic therapy in cancer treatment, stable dispersibility and smart-targeting potential are necessary. The current study reports the dispersibility and exothermic properties with near-infrared (NIR) exposure for SWNT coated with a cross-linked polymer. The coated-SWNT showed stable dispersibility in PBS solution and exothermic potential with NIR exposure. Raman spectroscopy results revealed a coated-SWNT-derived Raman peak in mouse liver and spleen lysates for 7 days post-injection that disappeared by 14 days in all tissues (liver, spleen, heart, lung and kidney). These results suggested that the coated-SWNT did not accumulate in mouse organ tissues in the long-term. The results of this study demonstrate that the coated-SWNT is a useful platform for a “molecular heater” applicable to hyperthermic cancer therapy.

研究分野：歯科生体材料学

キーワード：カーボンナノチューブ 複合体 体内動態

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブはその優れた基本特性からバイオ領域への応用も積極的に検討されている。カーボンナノチューブはナノサイズでありながら、きわめて高効率な光熱転換作用を有しており、時に近赤外線照射により発熱応答性を示す。このことからカーボンナノチューブをガンの温熱療法に応用する研究が多く行われている。しかしながらカーボンナノチューブは凝集性が強いいため、水系中に分散させるために様々な可溶化方法が検討されてきた。温熱発現性を確保するためにはカーボンナノチューブの外層構造を破壊することなく可溶化させる必要がある。そこで、カーボンナノチューブを架橋高分子で被覆したハイブリッドを調製すれば、外層のグラフェン構造を維持しつつ、さらにはこの高分子層に抗体を結合させることも可能であると考えた。抗体分子を結合したカーボンナノチューブ/抗体複合体を調製できれば、標的のガン細胞に特異的結合し、体外から近赤外線を照射することによって、効率的な温熱付加を行うことができるため、温熱療法用デバイスとしての有用性が高いと判断した。

2. 研究の目的

上記の被覆カーボンナノチューブを温熱療法用デバイスのプラットフォームとするためには、ハイブリッドが生体内環境下で安定した分散性を維持できるか、近赤外線に対する発熱応答性は十分か、生体での投与後動態解析、温熱による標的細胞の熱障害の確認などが不可欠となる。そこで、本研究ではハイブリッドの上記基本特性を検討することによって、複合体用プラットフォームとしての有用性を評価した。

3. 研究の方法

1) 高分子被覆カーボンナノチューブの調製

共同研究チームである九州大学工学府の藤ヶ谷教授らが開発した単層カーボンナノチューブを *N*-isopropylacrylamide と polyethylenglycol methacrylate の共重合体で被覆したハイブリッドを調製して実験に使用した。

2) 分散安定性と温熱発現性評価

ハイブリッドの PBS 溶液の経時的な光透過性を測定することにより、分散安定性を評価した。また PBS 溶液に近赤外線を照射した際の温度上昇を測定することにより、照射光強度と発熱との相関性を評価した。

3) 体内動態の解析

ハイブリッドの PBS 溶液 (0.2 ml 中に 2 mg のハイブリッド含有) を ddY マウスの尾静脈より投与し、1、7、14 日後に臓器 (心臓、肺、肝臓、脾臓および腎臓) を摘出し、ホモジナイズした後にラマン分析を行い、各臓器中のハイブリッドを定量化した。

4) 温熱による細胞への熱障害性の評価

ddY マウスの腹腔内へハイブリッドの PBS 溶液 (6 ml 中に 2 mg のハイブリッド含有) を注入し、5 分後に 4 ml を回収した。そして溶液中からマクロファージ ($4-6 \times 10^4$ cell/ml) を分離し、24 ウェルのプレートに分注 (990 μ l) した。近赤外線を 20 分間照射し、CCK-8 を用いて生存するマクロファージ数から熱障害性を評価した。

4. 研究成果

1) 高分子被覆カーボンナノチューブの調製

Fig.1 にハイブリッドの透過型電子顕微鏡写真 (TEM) と原子間力顕微鏡 (AFM) の観察像を示す。比較のため、一般的な可溶化方法である強酸処理したカーボンナノチューブと DNA で可溶化したカーボンナノチューブの観察像も示した。ハイブリッドは他の可溶化カーボンナノチューブに比べて個々の全長が短くなっていることが観察された。またハイブリッドは凝集部分が全く認められず、十分な個別分散性を示していた。

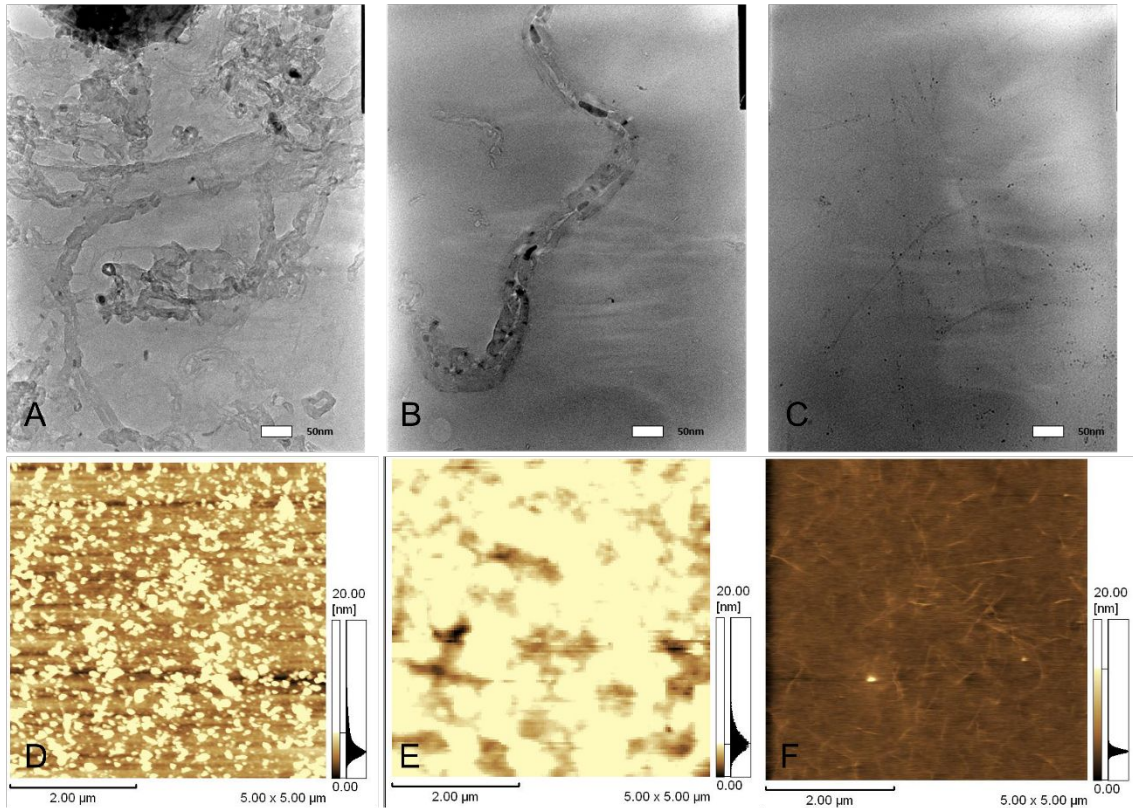


Fig. 1

Typical transmission electron microscopy images (upper) and atomic force microscopy images (lower) of the acid-treated SWNT (A and D), the DNA-SWNT (B and E), and the SWNT/PNIPAM-PEG hybrid (C and F).

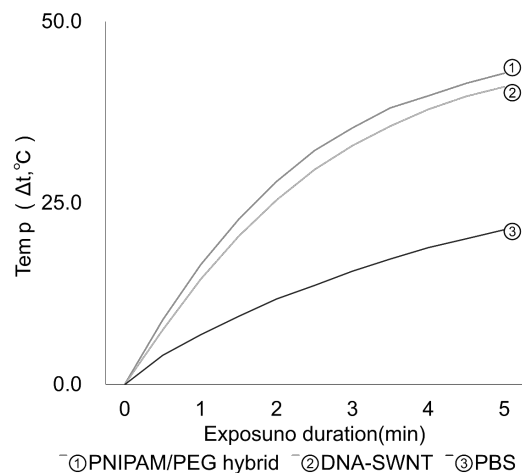
2) 分散安定性と温熱発現性評価

ハイブリッドはPBS中で凝集塊を形成せず、経時的に安定な分散性を維持していた。

また Fig.2 に示すように、ハイブリッドは近赤外線照射により迅速に温熱を発現し、5 分間の照射でおよそ 45 の温度上昇が認められた。おこの温熱発現は予備実験の結果から、照射する近赤外線の照射光強度に依存することが明らかとなり、これによって発現する温熱の制御が可能であった。

Fig. 2

In vitro exothermic heat generation of the DNA-SWNT and the SWNT/PNIPAM-PEG hybrid. The heat generation was dependent on the exposure time of the mean-infrared light.



3) 体内動態の解析

各臓器サンプルのラマンシグナル(カーボンナノチューブ由来のGバンドピーク)を Fig.3 のA(肝臓)とB(脾臓)に示す。投与後1日後では肝臓と脾臓でピークが認められるが、1週間後では肝臓におけるピークは消失し、脾臓のみでピークが観察された。それ以降はいずれの臓器においてもカーボンナノチューブ由来のピークは認められなかった。

また Fig.3 のC に示すように、投与量に対する検出量についてみると、肝臓では投与後1日の時点で53%、7日後の時点で93%の量が検出された。

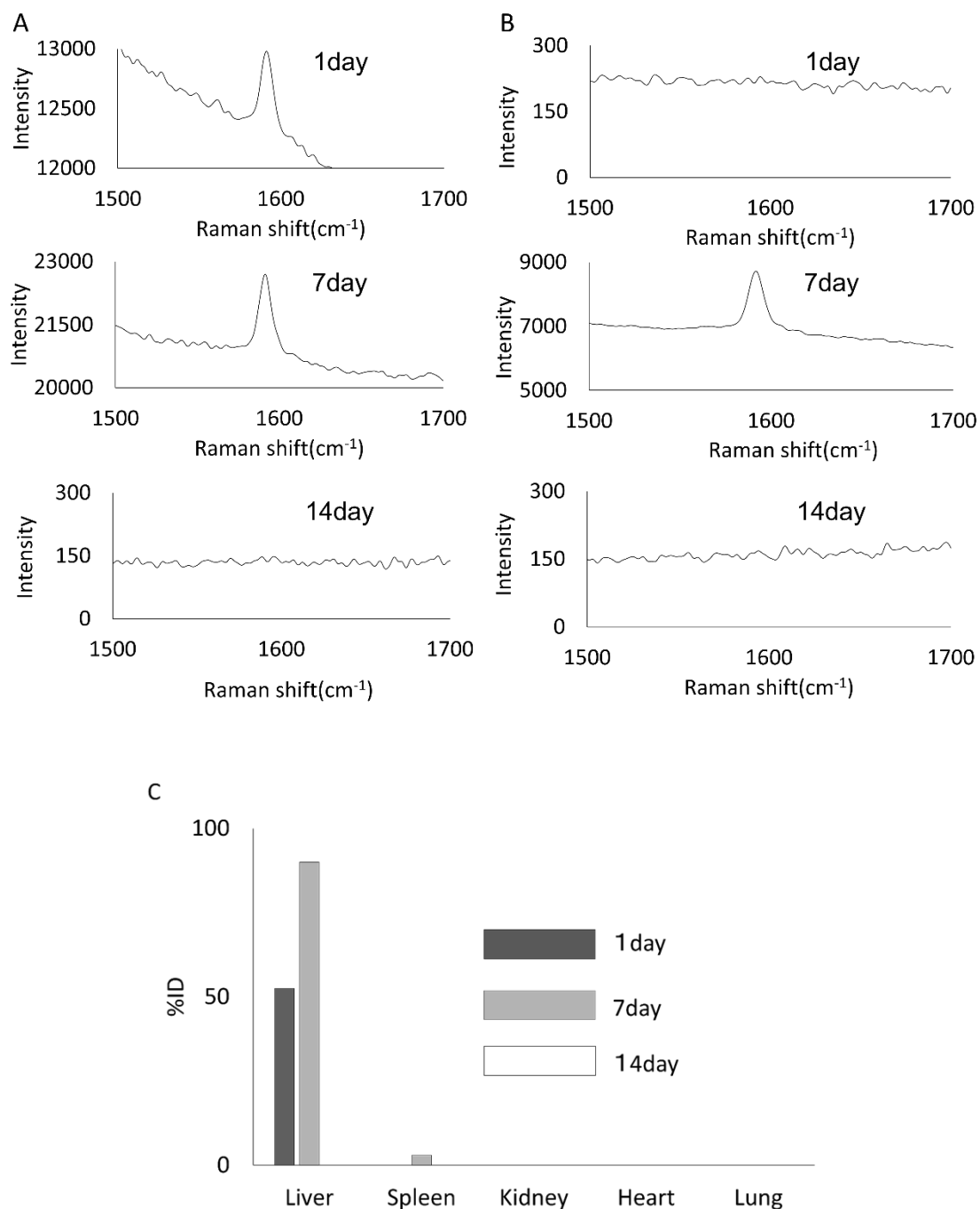


Fig. 3

Representative Raman spectra of the SWNT/PNIPAM-PEG hybrid in tissue homogenates of liver (A) and spleen (B), of mice at 1, 7, and 14 day post-injection. The value of %ID (injection dose) for each tissue of mice(C).

4) 温熱による細胞への熱障害性の評価

Fig. 4 に示すように、分離したマクロファージにはカーボンナノチューブ由来の G バンドピークが観察されることから、ハイブリッドがマクロファージに接触していることが示唆された。この接触がマクロファージ内部に取り込まれているのか、あるいは細胞表面に付着しているかは定かではないが、この状態で近赤外線照射を行うと、有意に細胞生存数が低下しており、温熱発現によるマクロファージへの熱障害性が明らかとなった。

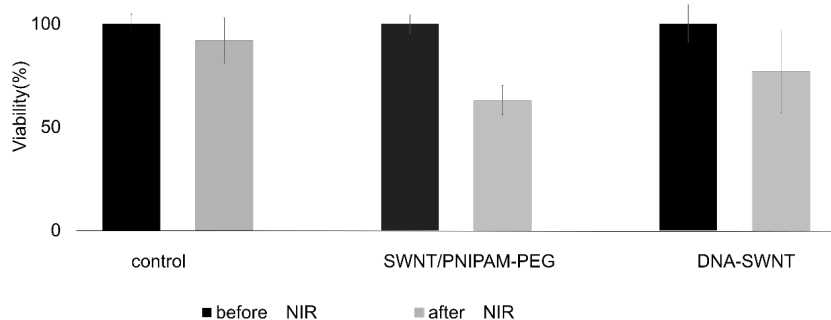


Fig. 4

Viability of mouse macrophages exposed to the DNA-SWNT and the SWNT/PNIPAM-PEG hybrid. Asterisk indicates a statistically significant difference compared to the control group (without mean-infrared light exposure).

【考 察】

以上の結果から、本研究で評価した高分子被覆カーボンナノチューブ（ハイブリッド）は生体内に導入しても、安定な分散性を維持し、十分な光応答型の温熱発現性を有することが明らかとなった。さらにはマウスを用いた体内動態評価から、特異的な臓器集積性は観察されず、投与後はおよそ2週間程度で排泄されるものと推察された。実際に糞便中に排泄されるかという点に関しては、本研究において糞便中のハイブリッドの定量化を試みたものの、夾雑物介在によるバックグラウンドノイズが大きく、定量化ができなかった。この点に関しては今後の検討課題であると考えている。

また細胞に与える熱障害性も確認することができたことから、生体外から照射する近赤外線による温熱療法モデルにも十分に対応可能であると考えられる。ハイブリッドは外層コーティング層が架橋高分子から形成されているため、イミド基などの適切な官能基を共重合成分として導入すれば、さまざまな抗体分子をハイブリッド表面に固定化できる。さらには標的細胞に適応する特異抗体分子を固定化すれば、ターゲットとなるガン細胞への特異的な結合性を持つスマート複合体としても応用が期待できる。本研究で評価したハイブリッドはこのスマート複合体用の基盤プラットフォームとして十分な機能と特性を有しており、今後のハイパーサーミア用ナノデバイスとしても期待できる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Kawaguchi M, Mori K, Goto K, Ishii A and Ikebe T. Tomographic evaluation of bone regeneration by photothermal stimulation in a rat calvarial defect. *J Oral Tissue Engin*, 16:57-64, 2018.
2. Mori K, Kawaguchi M, Fujigaya T, Ohno J and Ikebe T. Polymer-coated carbon nanotubes as a molecular heater platform for hyperthermic therapy. *J Hard Tissue Res*, 27:139-146, 2018.

〔学会発表〕(計4件)

1. 森紘一郎, 川口稔, 橋本憲一郎, 佐々木三奈, 平木昭光, 池邊哲郎. 単層カーボンナノチューブのがん温熱療法ナノデバイスの開発, 第35回日本口腔腫瘍学会, 2017年1月(福岡市).

2 森紘一郎, 川口稔, 安西寛真, 大林祐子, 首藤俊一, 池崎晶二郎, 田中文恵, 永嶌勝之, 勝俣由里, 池邊哲郎. がん温熱療法用ナノデバイスの開発 UPDATE、福岡歯科大学学会総会、2017年12月(福岡市).

3. 森紘一郎、川口稔、藤ヶ谷剛彦、堤優介、池邊哲郎. ガン免疫療法用温熱ナノデバイスの生体内動態、第67回日本歯科理工学会学術講演会、2017年4月(福岡市).

4. 川口稔、森紘一郎、藤ヶ谷剛彦、永井薫子. SWNT/抗体複合体によるガン温熱療法用ナノデバイスの創製. ナノテクノロジープラットフォーム事業平成30年度シンポジウム、2018年6月(千歳市).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大野 純

ローマ字氏名：Ohno Jun

所属研究機関名：福岡歯科大学

部局名：口腔歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 10152208

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。