

令和元年6月20日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14468

研究課題名(和文) ナノ粒子をビルディングブロックとした"大きくて小さい"ケージ型キャリアの創製

研究課題名(英文) Development of "large but small" caged carriers using nanoparticles as building blocks

研究代表者

太田 誠一(Ohta, Seiichi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：40723284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：金属や半導体など、非生分解性のナノ粒子を生体内で用いる際、粒子が体外に排泄されるためには粒径がシングル nm以下であることが必要だが、腫瘍組織への集積には100 nm程度が望ましい。このサイズのジレンマを解消するため、本研究では金ナノ粒子と有機半導体ポリマー蛍光ナノ粒子をビルディングブロックとして使用し、100 nm程度のナノ粒子集積体を作製した。作製された集積体は腫瘍環境に反応して一次粒子の状態まで分解した。これにより、腫瘍集積後の速やかな排泄が期待される。さらに、光増感剤を蛍光ナノ粒子中に封入することで、その光機能や抗腫瘍効果を腫瘍環境に反応して発現させられることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非生分解性ナノ粒子の腫瘍への集積と対外への排泄の両立は、医療分野での応用において共通した課題であった。本研究で開発された手法はビルディングブロックの粒子の種類によらず適用可能であると考えられるため、機能性ナノ粒子を画像診断や薬物送達などに応用していく上で、汎用的なプラットフォームとして発展していくことが今後期待される。

研究成果の概要(英文)：While nanoparticles with the diameter of ca. 100 nm are preferable for efficient tumor accumulation, their diameter needs to be single nm for renal clearance. For overcoming this size dilemma, in this study, we developed nanoparticle assembly with the diameter of ca. 100 nm using gold and semiconducting polymer fluorescent nanoparticles as building blocks. The formed assemblies were disassembled in response to tumor environment, which is expected to enable efficient renal clearance. By encapsulating photosensitizers, their tumor-specific activation of photo- and antitumor effect was demonstrated.

研究分野：医用化学工学

キーワード：ナノ粒子 アッセンブリ ビルディングブロック DDS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

金属や半導体、磁性体をはじめとする無機ナノ粒子は、ナノサイズに起因するプラズモン共鳴などの特異的な機能から、画像診断や薬物送達の方法として盛んに検討されている。しかし、これらの多くは生分解性がなく、体内における長期残存のリスクがあることが、実用上の課題となっている。これを回避する方法として、腎臓からの排泄が可能な 5 nm 以下まで粒径を小さくすることが挙げられる。しかし一方で、腫瘍に集積するために適切なサイズは数十~100 nm 程度であると言われており(EPR 効果)、5 nm では排泄が速過ぎて、腫瘍への集積に必要な滞留時間を十分に稼ぐことができない。両者の要求を満たすためには、この 1 オーダーの最適サイズのギャップを埋める必要がある。

2. 研究の目的

上記のサイズのジレンマを解消するため、本研究ではシングルナノメートルの粒子をビルディングブロックとし、これらをリンカー分子によって組み上げることで、100 nm 程度のケージ型粒子集積体の作製を検討した。リンカーに環境応答性の分解部位を導入することで、標的に集積するまでは 100 nm 程度の集積体構造を保ち、その後リンカーの分解によって一次粒子の状態に戻り腎排泄される、新規のキャリアを開発することを目指した。

3. 研究の方法

ビルディングブロックとして、金ナノ粒子及び有機半導体蛍光ナノ粒子の合成を行った。金ナノ粒子は、既往の報告に従い塩化金(III)三水和物をクエン酸およびタンニン酸で還元することで合成した。また、有機半導体ポリマーである MEH-PPV と、分散安定剤であるポリスチレン/ポリアクリル酸のブロック共重合体を有機溶媒である THF に溶解し、貧溶媒である純水中に滴下することで、表面がポリアクリル酸で被覆された MEH-PPV ナノ粒子を合成した。

続いて、腫瘍で過剰に存在する酵素である MMP で分解される性質を持つゼラチンをリンカーとして使用し、粒子の集積体化を検討した。金ナノ粒子分散液と豚皮由来ゼラチンを混合後、1 日振とうし、正に帯電したゼラチンと負に帯電した金ナノ粒子との静電相互作用によって、金ナノ粒子表面にゼラチンを修飾した。その後、MEH-PPV ナノ粒子に対し過剰量のゼラチン修飾金ナノ粒子を添加し、カルボジイミド反応によって MEH-PPV ナノ粒子表面のカルボキシ基とゼラチン中のアミノ基とのアミド結合させることで、MEH-PPV ナノ粒子表面に金ナノ粒子を集積させた。作製された粒子集積体の構造は、透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した。さらに、粒子集積体に対して MMP の一つであるコラゲナーゼを添加し、添加前後での構造と光学特性の違いを TEM 及び蛍光光度系で評価することで、腫瘍環境特異的な集積体の一次粒子への分解を検証した。

さらに、作製したナノ粒子集積体が薬物キャリアとして機能することを示すために、光線力学的療法で使用される光増感剤である Ce6 を MEH-PPV ナノ粒子内に封入し、同様に集積体を作製した。励起光照射下での Ce6 封入 MEH-PPV ナノ粒子からの一重項酸素生成能を、ADMA を用いて測定した。さらに、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa に対して粒子集積体(15.5 µg/mL)を暴露して励起光を照射し、コラゲナーゼの存在の有無による増殖抑制効果の違いを WST アッセイで評価することで、腫瘍環境特異的な抗腫瘍効果の発現を検証した。

4. 研究成果

既往の報告に従い、直径 3、6、15 nm の 3 種類の金ナノ粒子を合成した。さらに、蛍光を示す新規の機能性ナノ粒子として、MEH-PPV ナノ粒子を合成した。合成の際の分散安定剤の種類や粒子の合成条件により、粒径は 10~100 nm 程度の範囲で制御可能であった。また、MEH-PPV ナノ粒子の最大吸収波長は 492 nm、蛍光波長は 583 nm であった。

得られた MEH-PPV ナノ粒子と金ナノ粒子を用いて作製した集積体の TEM 像を Fig. 1 上段に示す。どの粒径の金ナノ粒子を用いた場合でも、MEH-PPV ナノ粒子の表面に金ナノ粒子が集積していることが TEM 観察から確認された。さらに、腫瘍で過剰発現するゼラチン分解酵素であるコラゲナーゼと反応させた結果、この集積体が一時粒子の状態に分解している様子が観察された(Fig. 1 下段)。この結果から、作製された集積体が腫瘍環境に応答して一次粒子の状態に戻る可能性が示唆された。

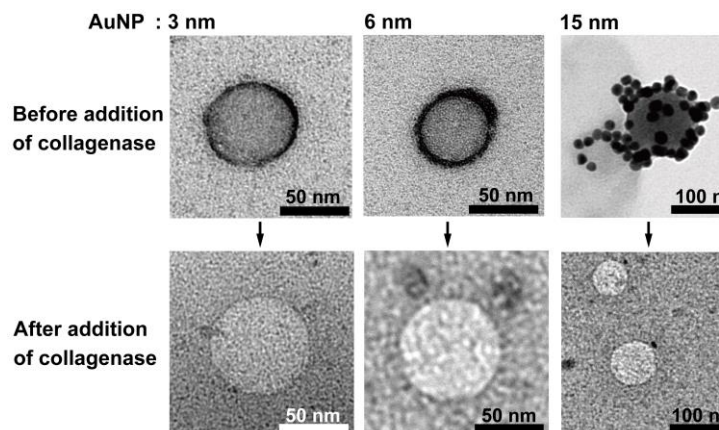


Fig.1 (上段) Ce6 封入 MEH-PPV ナノ粒子とサイズの異なる金ナノ粒子を用いて作製した集積体の TEM 像 (下段) コラゲナーゼと混合後の集積体の TEM 像

金ナノ粒子は蛍光のクエンチャーとして働くため、集積体の状態では MEH-PPV ナノ粒子由来の蛍光はクエンチされる一方で、これが一次粒子の状態に分解すると、クエンチ効果がなくなり MEH-PPV ナノ粒子由来の蛍光が発現すると想定される。これにより、腫瘍環境に応答した光機能の ON/OFF 制御が可能になると期待される。これを検証するため、集積体の蛍光スペクトルをコラゲナーゼ添加の前後で測定した結果を Fig. 2 に示す。どの粒径の金ナノ粒子を用いた場合でも、コラゲナーゼの添加によって集積体の蛍光強度が増大することが確認された。また、金ナノ粒子の粒径が小さいほど分解前後での蛍光強度の変化比は大きくなり、3 nm の粒子で 4.1 倍程度の増強が見られた。金ナノ粒子の粒径が大きいほど、立体障害により MEH-PPV ナノ粒子表面に密に結合することが困難になるためだと考えられる。これらの結果を踏まえ、以下の治療効果の検討では粒径 3 nm の金ナノ粒子で作製した集積体を用いた。

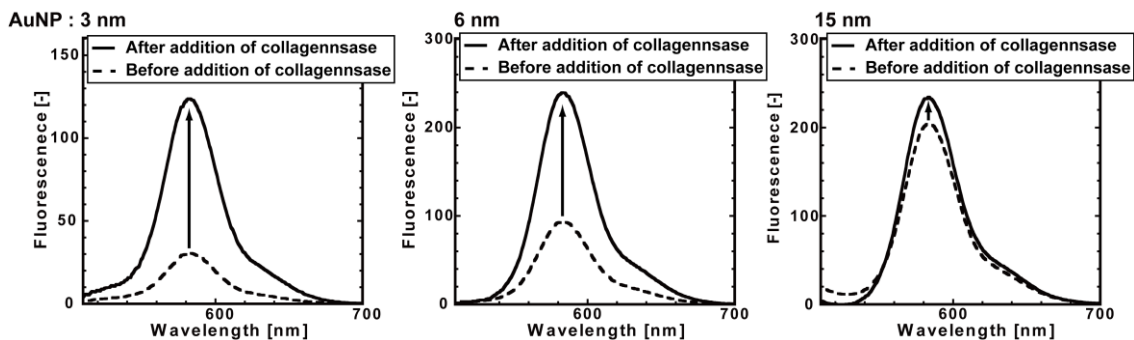


Fig.2 集合体のコラゲナーゼ添加前後における蛍光スペクトルの変化

続けて、本研究で作製されたナノ粒子集積体が薬物キャリアとして機能することを示すために、光線力学的療法に用いられる光増感剤である Ce6 を MEH-PPV ナノ粒子の内部に封入した。光増感剤は光線力学的療法で使用される薬剤であり、光照射によって励起されると一重項酸素を生成し、これが細胞を傷害する。光増感剤の吸収波長と蛍光ナノ粒子の蛍光波長が重なるように設計を行うことで、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) による効率的な一重項酸素生成が期待される。Fig. 3 に Ce6 封入 MEH-PPV ナノ粒子の吸収、蛍光スペクトルを示す。Ce6 の添加量の増加に伴って Ce6 由来の吸収ピークの上昇が確認され、Ce6 が内部に封入されていることが確認された。さらに、これを MEH-PPV の励起波長で励起した際、Ce6 の封入量の増加に伴い MEH-PPV 由来の蛍光が減少し、Ce6 由来の蛍光の上昇が見られたことから、粒子内で FRET が起こっていることも示唆された。粒子からの一重項酸素生成量を評価した結果を Fig. 4 に示す。励起光の照射に伴い一重項酸素が産生されていることが確認され、光増感剤のキャリアとして機能していることが示された。

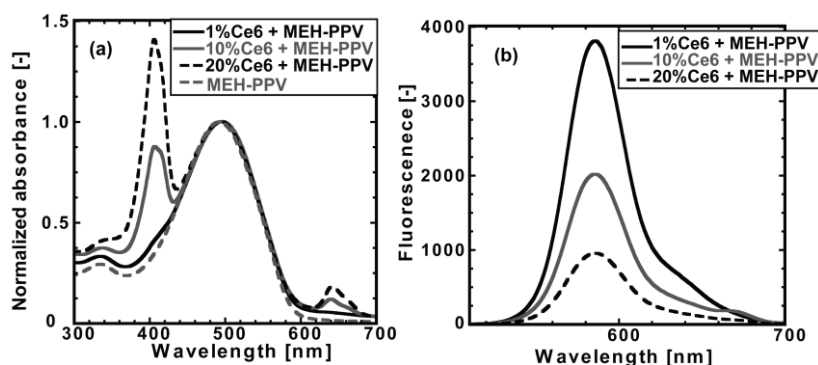


Fig.3 Ce6 封入 MEH-PPV ナノ粒子の (a) 吸収 (b) 蛍光スペクトル

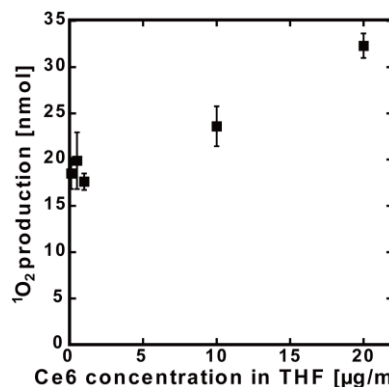


Fig.4 Ce6 封入 MEH-PPV ナノ粒子の一重項酸素生成量

さらに粒子集積体の抗腫瘍効果を実証するために、集積体を含む培地を HeLa 細胞に曝露し、励起光を照射した際の細胞生存率をコラゲナーゼの有無で比較した。Fig. 5 に HeLa 細胞に集合体を曝露した際の各条件における細胞生存率を示す。集合体および集合体とコラゲナーゼのみでは、細胞への毒性は見られなかった。一方で、集積体に光を照射した系では細胞生存率が低下し、さらにコラゲナーゼの添加により細胞生存率は有意に低下した。コラゲナーゼを添加することで集合体の分解が促進され、金ナノ粒子へのエネルギー移動による活性の抑制が起こりにくくなったためだと考えられる。この結果から集積体の腫瘍環境に応答した抗腫瘍効果の増大が示唆された。副作用が少なく高効率な光線力学的療法の薬物キャリアとして、将来の応用が期待される。

本研究では、金ナノ粒子と有機半導体ポリマー蛍光ナノ粒子をビルディングブロックとしてナノ粒子集積体を作製し、これが腫瘍環境で過剰発現しているコラゲナーゼに反応して一次粒子の状態まで分解することを示した。さらに、これが薬物キャリアとして使用できることを示し、光機能や抗腫瘍効果を腫瘍環境で選択的に発現できる可能性を示した。今後 *in vivo*での動態などを検証し、薬物キャリアとしてさらに開発を進めていく予定である。本研究で開発された手法はビルディングブロックの粒子の種類によらず適用可能であると考えられるため、機能性ナノ粒子の機能と排泄性を両立するための汎用的なプラットフォームとして、今後発展していくことが期待される。

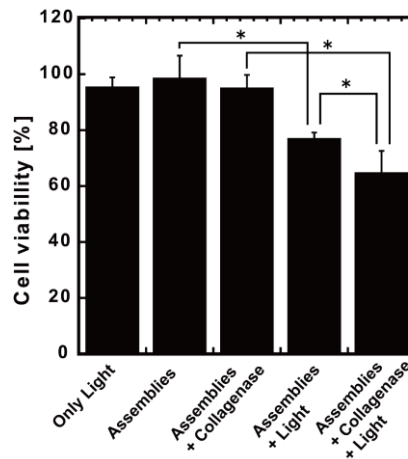


Fig.5 HeLa 細胞に集積体を曝露した際の各条件における細胞生存率 (* : p < 0.05)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. (査読あり) Dylan Glancy, Yuwei Zhang, Jamie L. Y. Wu, Ben Ouyang, Seiichi Ohta, and Warren C. W. Chan
“Characterizing the protein corona of sub-10 nm nanoparticles”
Journal of Controlled Release 304 (2019) 102.
DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.04.023.

[学会発表] (計 8 件)

1. 太田誠一 ”粒子形状による生体との相互作用制御を志向した新規医用微粒子の開発”
化学工学会 第 84 年会 (2019 年)
2. 田中伸明・太田誠一・伊藤大知 “腫瘍環境特異的に活性を発現する光増感剤封入有機半導体ポリマーナノ粒子/金ナノ粒子集積体の開発” 化学工学会 第 84 年会 (2019 年)
3. 田中伸明・太田誠一・伊藤大知 “光線力学的療法のための有機半導体蛍光ポリマーを用いた新規光増感剤封入ナノ粒子の開発” 先端医療シーズフォーラム 2019 (2019 年)
4. 田中伸明・太田誠一・伊藤大知 “光線力学的療法のための有機半導体ポリマーナノ粒子の作製と活性のオン/オフ制御” 化学工学会 室蘭大会 2018 (2018 年)
5. 田中伸明・伊藤大知・太田誠一 “貧溶媒添加法による光増感剤封入有機半導体ポリマーナノ粒子の合成” 化学工学会 第 83 年会 (2018 年)
6. 太田誠一 “ナノ粒子の精密設計による送達効率向上の試み” 日本薬学会関東支部 第 42 回学術講演会 (2017 年)
7. Seiichi Ohta “Nanoparticle Assemblies with Dynamic Structural Change for Imaging/Drug Delivery” Frontiers 2016 Symposium (2016 年)
8. Seiichi Ohta “Dynamic nanoparticle assemblies for biomedical applications” YABEC2016 (2016 年)

[図書] (計 1 件)

1. 太田誠一
”新規医用ナノ粒子の創製とその集合体化による機能制御”
化学工学会 バイオ部会 News Letter No. 46 (2017) 14-19.

[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

http://www.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/itolab/profile_ohta.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(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。