

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16805

研究課題名（和文）無機ナノ粒子を利用した高輝度蛍光診断の研究と膀胱癌部位診断への応用

研究課題名（英文）Enhanced fluorescence diagnostic method using inorganic nanoparticles and its application for diagnosis of non muscle invasive bladder cancer

研究代表者

金平 幸輝（Kanehira, Koki）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50526390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では蛍光診断薬で染色され可視化した癌部位から発する蛍光を、高い屈折率で光の強散乱効果をもつ酸化チタンにより増大し、より可視化性能の高い診断技術につなげるための基礎研究を実施した。生体投与できるように分散させた酸化チタンナノ粒子と蛍光診断薬を併用投与するだけで、より明るい蛍光を長い時間保てることが膀胱癌細胞で示された。また、膀胱癌細胞に酸化チタンナノ粒子取り込まれて濃縮されることで効果を発揮するメカニズムが示された。本研究の取り組みにより、蛍光が弱い、すぐに消光するといった癌蛍光診断のもつ課題を、酸化チタンナノ粒子による蛍光増強効果によって改善可能である考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の取り組みにより、蛍光が弱い、すぐに消光するといった癌蛍光診断のもつ課題を改善可能なことが示唆された。本方法は酸化チタンナノ粒子と蛍光診断薬を併用投与するだけで蛍光増強効果が得られることから、様々な蛍光診断色素と併用することができ、より汎用性の高い手法となりうる。また、膀胱癌以外にも内視鏡検査の行われる胃がんや大腸がんなどへの応用も考えられる。さらに医療分野のみならず、蛍光で染色する環境中の菌数や菌種の検査の改良など、環境分野への応用可能性等もあると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that the “fluorescence enhancement effect” using the light scattering properties of titanium dioxide (TiO₂) to improve the strength and resilience of fluorescence in photodynamic diagnosis (PDD). Using 5-aminolevulinic acid (ALA) as a model PDD agent, we performed validation studies on the fluorescence enhancement effect of a mixture of polyethylene glycol-modified TiO₂ nanoparticles (TiO₂-PEG NPs) and protoporphyrin IX (PpIX) which is fluorescent metabolite of ALA, analysis of cellular-uptake of TiO₂-PEG NPs by bladder cancer cells, and the fluorescence enhancement effect on bladder cancer cells by the combined administration of TiO₂-PEG NPs and ALA. The results showed that the combined administration could enhance and prolong fluorescence in bladder cancer cells, similar to in the mixture alone. It was suggested that the enhancement was related to the accumulation of the NPs in cells, causing this effect. The method could be applicable for PDD.

研究分野：ナノバイオ 化学工学

キーワード：光線力学診断 5アミノレブリン酸 ALA 酸化チタン ナノ粒子 蛍光増強

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光線力学診断(PhotoDynamic Diagnosis, PDD)は、腫瘍選択性の蛍光色素を用いて通常では見つけにくい癌の病変部を可視化し、手術時の取り残しを減らせる。一方、手術中に蛍光が弱かったり、すぐに消光するなどして病変部の境界が見えにくくなる場合があり、より確実に手術するための課題があった。

そこで、腫瘍選択性の蛍光色素から発する蛍光を、高い屈折率で光の強散乱効果をもつ酸化チタンにより増大し、表層の微小な癌部位を鮮明に可視化することで、上述の課題を解決し、より可視化性能の高い診断技術につなげることを新たに発想した。生体適合性を高めた酸化チタン粒子と蛍光色素の組み合わせや投与法を決定し、可視化性能の指標として蛍光増強効果を定量的に実証するための研究を計画した。

2. 研究の目的

癌部位において腫瘍選択性の蛍光色素から発する蛍光を酸化チタンナノ粒子により増大し、癌部位が従来より鮮明に可視化できるという仮説について、以下の項目に従って実証することを目的とした。

(1) 粒子の材料基本設計と分散安定性確認および作製方法の確立

腫瘍選択性蛍光色素の決定・酸化チタンナノ粒子の散乱や細胞毒性に寄与する粒子径、表面処理等、基本設計の確立・粒子の分散安定性の確認。

(2) 腫瘍選択性向上と可視化性能の実証

内視鏡を想定した可視化性能に関わる蛍光測定のための光学測定装置の構築と各種癌細胞を用いた蛍光増強効果の実証。

(3) 酸化チタンナノ粒子による蛍光増強効果の作用機序解明

細胞取込みの機序と取込み状態の確認、蛍光増強効果との関連についての解析と考察。

3. 研究の方法

(1) 粒子の材料基本設計と分散安定性確認および作製方法の確立

膀胱癌の PDD における蛍光診断薬としてすでに臨床応用されている 5 アミノレブリン酸(5-Amino levulinic acid, ALA)をモデルとし、その代謝された蛍光色素である Protoporphyrin IX (PpIX)とともに用いた。

以前の我々の報告[1]で、約 100 nm の酸化チタンナノ粒子に PEG を修飾した TiO₂-PEG ナノ粒子が培養細胞へ与える毒性が低かった結果に基づき、約 100 nm の TiO₂-PEG ナノ粒子を準備した(詳細は本研究成果の公開特許広報に記載)。作製した TiO₂-PEG ナノ粒子における、粒子の投与条件である EMEM 培地中での TiO₂-PEG ナノ粒子分散安定性について、Z 電位と水力学的粒子径を動的光散乱法で測定した。TiO₂-PEG ナノ粒子の膀胱癌細胞に対する毒性を調べるため、培養した膀胱癌細胞へ TiO₂-PEG ナノ粒子を投与し、ATP アッセイによって生存率を測定した。

また、PEG 原料として、これまでのくし型ポリマーだけでなく、より汎用的な直鎖型ポリマーを用いて、TiO₂-PEG ナノ粒子の分散体を作製した(詳細は公開特許広報に記載)。

(2) 腫瘍選択性向上と可視化性能の実証

PDD における膀胱鏡などの内視鏡を想定し、同様に励起光を照射して、溶液や培養細胞等より発せられた反射方向の光を定量的に測定する系を構築した。LED 光源から光ファイバを通してコリメートレンズから上方より対象に向けて照射し、対象より発せられた反射方向の光を上方向に設置した別のコリメートレンズにより受光して、スペクトル検出器で分光されたスペクトル強度として検出した。

PpIX からの蛍光が TiO₂-PEG ナノ粒子で蛍光増強される効果を確認するため、上述の測定系を用いて PpIX 単独の溶液及び TiO₂-PEG ナノ粒子と PpIX の混合溶液における蛍光スペクトルを測定した。

次に、ALA と TiO₂-PEG ナノ粒子を併用投与した場合の蛍光増強効果を確認するため、蛍光顕微鏡を用いて ALA 単独投与及び TiO₂-PEG ナノ粒子と ALA の併用投与における膀胱癌細胞の蛍光像を観察した。さらに、上述の測定系を用いて同様に TiO₂-PEG ナノ粒子と ALA の併用投与における膀胱癌細胞の蛍光スペクトルを測定した。

(3) 酸化チタンナノ粒子による蛍光増強効果の作用機序解明

膀胱癌細胞へ投与したナノ粒子の挙動を解析するため、蛍光色素標識した TiO₂-PEG ナノ粒子を用意し、高解像度の蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。また、初期エンドソーム及び後期エンドソームを免疫染色し、エンドサイトーシスによりナノ粒子の取込みが生じるか観察した。さらに膀胱癌細胞に取込まれたナノ粒子の細胞内濃度を蛍光画像解析から得られたナノ粒子数を用いて算出した。

4. 研究成果

(1) 粒子の材料基本設計と分散安定性確認および作製方法の確立

作製した TiO₂-PEG ナノ粒子の水力学的粒子径を動的光散乱法で測定した結果、培地中でもほとんど粒子径が変化せず、良好な分散性を示すことが分かった。超純水中で強度基準において

123.8 nm であった。次に、粒子の投与条件である EMEM 培地中での TiO₂-PEG ナノ粒子の Z 電位と水力学的粒子径を動的光散乱法で測定、Z 電位は培地と混合後 2 時間で 0.17 mV、混合後 4 時間で 0.807 mV を示した。また、水力学的粒子径は、強度基準において混合後 2 時間で 127.2 nm、混合後 4 時間で 166.8 nm であり、粒子径は大きく変化することなく目視での凝集も観察されなかった。

次に、TiO₂-PEG ナノ粒子の膀胱癌細胞に対する毒性を調べた結果、粒子投与後も細胞は高い生存率を示し、PEG コートにより生体適合性を高めたことで本試験系においても問題なく用いることができることが示された。培養した膀胱癌細胞へ TiO₂-PEG ナノ粒子を投与し、ATP アッセイによって生存率を測定した結果、TiO₂-PEG ナノ粒子の投与濃度 5 µg/mL から 100 µg/mL で投与 4 時間後において、UMUC3 (human bladder cancer cell line) 細胞の生存率は 97% から 102%、T24 細胞 (human bladder cancer cell line) の生存率は 90% から 95% であった。

また、より汎用的な直鎖型ポリマーを用いて TiO₂-PEG ナノ粒子の分散体を作製した結果、これまでのくし型ポリマーと同様に酸化チタンナノ粒子の分散が可能であることが示された。PEG とドーパミンの結合率 92% と十分に結合していることが確認され、この PEG を用いて作製した粒子は超純水中で 149.4 nm と良好に分散していた。

(2) 腫瘍選択性向上と可視化性能の実証

(ii) NPs after ALA treatment

蛍光増強効果を確認するため、蛍光スペクトル測定系を用いて TiO₂-PEG ナノ粒子と PpIX を混ぜた溶液中で評価した結果、TiO₂-PEG ナノ粒子の濃度に依存して、10 µM PpIX から発せられた蛍光が光散乱により増強され、粒子濃度 1000 µg/mL において最大 1.7 倍程度になることがわかった (Fig. 1)。粒子有無における両者の蛍光スペクトルのピーク形状は同様だったことから、物理的な効果である光散乱によって蛍光が増強したと考えられる。また、励起光を照射した直後の蛍光が増強されることから、色素単独より強い蛍光示す時間が長く、消光時間を延ばせることも示された (Fig. 2)。

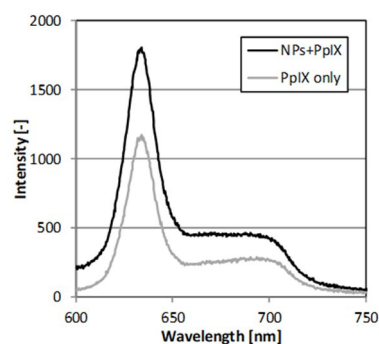


Figure 1. Spectrum intensity of the TiO₂-PEG NPs and PpIX mixture solution

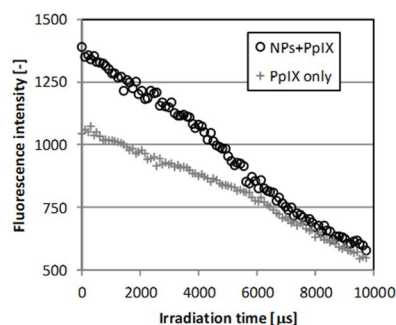


Figure 2. Time course of fluorescence intensity while irradiation to mixture solution

次に、UMUC3 細胞に対して蛍光増強効果の評価を行い、2 mM ALA を 2h 投与した細胞へ比較的低ドーズ量である 10 µg/mL 濃度にて TiO₂-PEG ナノ粒子を併用投与後 1h ~ 4h で PDD を行くと、単独投与に比べ粒子併用投与の蛍光像はより明るく示された (Fig. 3)。

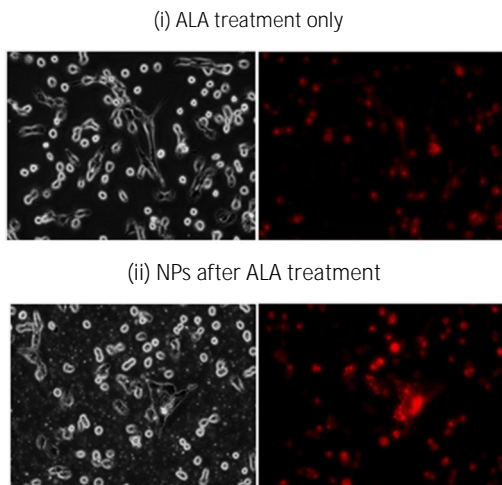


Figure 3. Fluorescence microscopic imaging of UMC3 cells at 630x magnification, administration of ALA only ((i), upper), combined administration of TiO₂-PEG NPs and ALA at 2 hours of NPs treated time ((ii), lower)

さらに、蛍光スペクトル測定では粒子作用時間に依存して蛍光が増強し、4h で最大 1.7 倍程度の蛍光増強効果があることが明らかとなった (Fig. 4)。

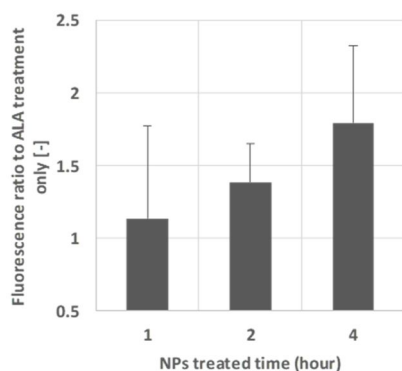


Figure 4. Evaluation of fluorescence ratio to administration of ALA only on treatment time of TiO₂-PEG NPs

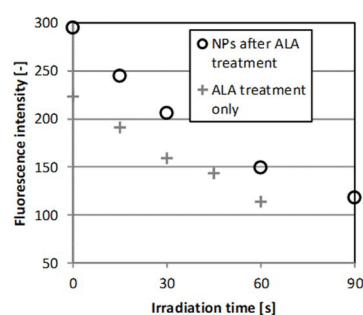


Figure 5. Time course of fluorescence intensity while irradiation onto cells

そして、溶液での結果と同様に、ALA 単独投与よりも強い蛍光を示す時間を長く、消光時間を延ばすことができることも示された (Fig. 5)。粒子有無における両者の蛍光スペクトルのピーク形状は同様だったことから、溶液中と同様に TiO₂-PEG ナノ粒子の光散乱で蛍光が増強したと考えられた。

(3) 酸化チタンナノ粒子による蛍光増強効果の作用機序解明

蛍光増強効果の機序に関して、細胞のエンドサイトーシスによって粒子が細胞内へ取込まれ、蛍光増強効果を示す濃度まで細胞内へ濃縮されることが初めて明らかとなった。

粒子投与後 30 分でナノ粒子は細胞表面に付着もしくは一部取込まれている様子が観察された (Fig. 6)。さらに、免疫染色法によってエンドソームと粒子が共存し、エンドサイトーシスにより

取り込まれていた。初期エンドソームと後期エンドソームの割合は粒子を投与して接触する時間に関わらずほぼ一定であったことから、エンドサイトーシスによる取り込みと細胞内でのエンドソーム移行は連続的に起こったと考えられた。

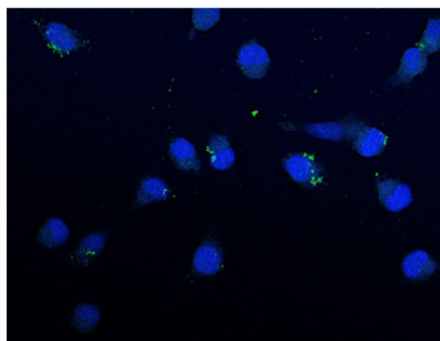


Figure 6. Fluorescence microscopic imaging of UMC3 cells at 30 min after administration of fluorescence labeled TiO₂-PEG NPs: blue indicated nucleus, green indicated of fluorescence labeled TiO₂-PEG NPs at 100x magnification

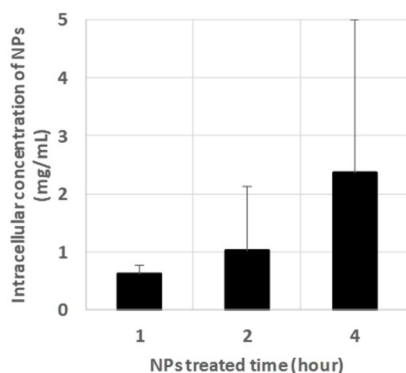


Figure 7. Intracellular concentration of TiO₂-PEG NPs (n=3, error bar mean+SD)

上述のようにエンドサイトーシスが経時的に進行した結果、粒子の細胞取込みが時間とともに進行したと考えられ、実施に細胞内へ粒子が投与濃度の 100 倍となる 1000 $\mu\text{g/mL}$ 以上に濃縮された (Fig. 7)。以上のことから、溶液中で効果のあった粒子濃度レベル (1000 $\mu\text{g/mL}$) に到達し、ALA から代謝された PpIX の発する蛍光を増強する効果を発揮したことが蛍光増強効果の作用機序であると考えられた。

まとめ

散乱によって蛍光増強する効果のある TiO₂-PEG ナノ粒子はエンドサイトーシスによって膀胱癌内へ取り込まれて濃縮され、ALA から代謝された PpIX の発する蛍光を増強して消光時間を延ばす効果があることが明らかとなった。本研究の取り組みにより、蛍光が弱い、すぐに消光するといった PDD のもつ課題を改善可能なことが示唆された。

本方法は TiO₂-PEG ナノ粒子と蛍光診断薬を併用投与するだけで蛍光増強効果が得られることから、従来の PDD 改良方法と併用、あるいは ALA 以外の他の蛍光診断色素と併用するなど、より汎用性の高い手法となりうる。また、医療分野のみならず、蛍光で染色する環境中の菌数や菌種の検査の改良など、環境分野への応用可能性等も考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

[1] Q Sun, K Kanehira, A Taniguchi “PEGylated TiO₂ nanoparticles mediated inhibition of cell migration via integrin beta 1” Science and technology of advanced materials 19 (1), 271-281, 2018 (査読あり)

[2] Q Sun, T Ishii, K Kanehira, T Sato, A Taniguchi “Uniform TiO₂ nanoparticles induce apoptosis in epithelial cell lines in a size-dependent manner” Biomaterials science 5 (5), 1014-1021, 2017 (査読あり)

[3] K Kanehira, Y Yano, H Hasumi, H Fukuhara, K Inoue, K Hanazaki, M Yao “Fluorescence Enhanced Effect by TiO₂ Nanoparticles and its Application for Photodynamic Diagnosis” (submitted to International Journal of Molecular Sciences) (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 4 件)

名称：腫瘍判別方法、腫瘍用診断薬、及び腫瘍診断用増感剤

発明者：金平幸輝、矢野佑希子、大竹敦子、窪田吉信

権利者：横浜市立大学、TOTO株式会社

種類：特許

番号：特願 2017-137499

出願年月日：平成 29 年 7 月 14 日

国内外の別：国内、国外 2 つ

名称：腫瘍判別方法、腫瘍用診断薬、及び腫瘍診断用増感剤

発明者：金平幸輝、矢野佑希子、大竹敦子、窪田吉信

権利者：横浜市立大学、TOTO株式会社

種類：特許

番号：特願 2018-132443

出願年月日：平成 30 年 7 月 12 日

国内外の別：国内 (特願 2017-137499 の優先権出願)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：矢尾 正祐、蓮見 壽史

ローマ字氏名：Masahiro YAO、Hisashi HASUMI

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。