

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00857

研究課題名(和文)腫瘍環境内における機能性ナノ複合体の性能評価・高度機能制御技術の開発

研究課題名(英文) Investigations and control of functional nanocomplexes in tumor environment

研究代表者

都 英次郎 (Miyako, Eijiro)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：70443231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、量子ビーム(ガンマ線)架橋技術を用いて、Ga-In合金から成る液体金属表面に様々な生体高分子がコートされ、安定な状態を保つことができるコア-シェル型のユニークな構造を有するナノ粒子の作製に成功した。得られた生体分子-液体金属ナノ粒子は、EPR効果によって大腸がんを移植したマウス体内の腫瘍内に集積し、生体透過性の高い近赤外レーザー光により、がん患部の可視化と光熱変換による治療が可能であることを実証した。さらに、細胞毒性試験と生体適合性試験を行い、いずれの検査からも生体分子-液体金属ナノ粒子が生体に与える影響は極めて少ないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの成果は、本研究の最終目標に掲げた腫瘍血管内部観察用のナノ粒子として十分に機能を発現できると期待している。また、今回開発した生体高分子のナノ粒子コーティング技術が、革新的がん診断・治療法の基礎に成り得ることを示すだけでなく、ナノテクノロジー、光学、量子ビーム工学といった幅広い研究領域における材料設計の技術基盤として貢献することを十分期待させるものである。

研究成果の概要(英文)：Due to their unique characteristics, gallium-based liquid metal (LM) nanoparticles have been applied in various research fields. LM nanoparticle surface-modification design is essential for enhancing the original LM properties and physicochemical multifunctionalization. Besides, standard cancer treatments are currently limited to surgery, radiation, and chemotherapy. Unfortunately, all three methods risk damage to normal tissues or incomplete eradication of the cancer. Development of LM-based nanomedicinal technology is challenging area for exploring new and innovative applications in the advanced cancer treatments. We have created a cancer optotheranostics using functional eutectic gallium-indium (EGaln)-based LM nanoparticles that were successfully synthesized by various biomolecules (gelatin, DNA, lecithin, and bovine serum albumin), sonication, and quantum beam (γ -ray) radiation (Figure 1).

研究分野：生体医工学

キーワード：ナノ粒子 がん ドラッグデリバリー レーザー ナノテクノロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで高分子ミセルやリポソームを活用するナノテクノロジーを駆使した様々ながん療法ならびに画像診断法が開発されてきた。しかし、従来のナノテクノロジーは、がんの早期発見を目指した高感度検出や抗がん剤の副作用低減を目的とした治療法の開発に主眼が置かれており、生体内におけるナノ材料そのもののリアルタイムでの直接的な性能評価(挙動観察)や機能制御に関する研究は皆無である。例えば、正常な血管内皮細胞とは異なり、がん組織や炎症部位の血管内皮細胞間には200 nm程度の広い隙間が開いており、100 nm程度にサイズが制御されたナノ粒子ががん組織に特異的に集積するEPR効果(Enhanced Permeation and Retention Effect)が広く知られている。多くの研究者の支持もあり、EPR効果自体は疑いの余地はほとんど無い。しかし、EPR効果によってナノ粒子が、いったいどのような挙動で腫瘍血管内に取り込まれるのか、また、ナノ材料はその場でどのように機能するのか、まだ誰も見たことが無い。つまり、特にEPR効果に関わるナノ材料を利用したがん研究は、結果ありきで理論が組み立てられ、想像だけでナノ材料の機能を評価しており、それらを検証する術が無い。この点が問題の核心である。すなわち、もし生体内におけるナノ材料の直接評価・機能制御技術が確立できれば、まさに“ナノスケールのロボット”の遠隔操作による分子レベルでの究極の手術が可能となる。結果として手術に対する患者の負担は極限まで低減されるだけでなく、個々の病態に即した究極のテーラーメイド医療が可能となる。

2. 研究の目的

がんは世界の死因のトップクラスである。がんの発症や進行に関わるメカニズムの解明を目指した高精度ながん細胞検出技術ならびにがん細胞を根絶可能な治療法の開発は、がん医療における究極の目的の一つである。

これまで、ナノ材料を活用した画像診断や治療法が報告されている。しかし、従来技術は、がん細胞の高感度検出や効果的な治療法の開発に力が注がれており、生体内におけるナノ材料自身の性能評価(挙動観察)には殆ど目を向けられていない。つまり、従来技術におけるナノ材料の機能・性能というのは、得られた結果につじつまを合わせた、言わば『想像』に過ぎず、ナノ材料そのものが、はたして生体内でどのように機能しているのか、実際の挙動に関わる情報に乏しいのが現状である。

本研究では、このような現状を打開するために、腫瘍血管内における機能性ナノ材料の直接観察ならびに機能制御技術の開発を目的とする。本研究によって、生体内における“real”でかつ“live”なナノ材料の性能評価・制御技術が実現できれば、がんの発症や進行に関わるより詳細なメカニズムの解明に貢献できるだけでなく、次世代ナノ医療材料を活用した分子レベルでの革新的ながん療法・診断技術が構築できる。

3. 研究の方法

本研究では、最終構想にマウス生体内の腫瘍血管内部におけるナノ複合体のリアルタイム性能評価・機能制御技術の開発を目指す。

本最終構想を達成するために、まずは、コア技術となる機能性ナノ複合体の開発を行った。次に、当該ナノ複合体を細胞培地中に分散し、近赤外レーザーにより生体外におけるがん細胞機能制御ならびに殺傷効果を検証した。最後に、ナノ複合体を腫瘍モデルマウスの尾静脈に注射し、レーザー照射に伴う生体内でのがん細胞機能制御・排除効果を調査した。また、本ナノ複合体の生体適合性評価を実施した。

4. 研究成果

(1) 機能性ナノ複合体の開発

ガリウム・インジウム(Ga/In)合金からなる室温で液体の金属(液体金属)は、高い生体適合性と優れた物理化学的特性を有することが知られており、とりわけナノ粒子化した液体金属をバイオメディカル分野に応用する研究に大きな注目が集まっている。

液体金属をナノ粒子化するためには煩雑な合成プロセスが必要であり、ナノ粒子化した液体金属の構造や機能を溶媒中で安定的に保持させることは難しい。そこで、液体金属をがん患者まで送り、がん細胞内に取り込ませるために、液体金属表面に生体高分子(ゼラチン、DNA、レシチン、牛血清蛋白質)を吸着させたコア-シェル型ナノ粒子の作製を試みた(図1)。Ga/In液体金属と生体分子の混合物に超音波照射することで、コア-シェル型ナノ粒子を形成できることを見出したが、そのままではナノ粒子の構造を水中で安定的に維持させることはできなかつ

簡便かつ水中で構造や機能を安定的に保持可能なLMナノ粒子化法

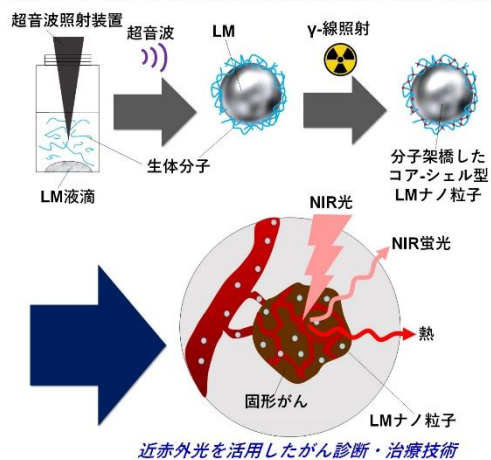


図1. ガンマ線を利用した生体分子-液体金属ナノ複合体の合成と当該ナノ粒子を活用した光がん療法の概念。LM: 液体金属、NIR: 近赤外。

た。

この問題を解決するために、ナノ粒子表面の生体高分子がバラバラにならないよう、量子ビーム（ガンマ線）架橋反応を利用すれば、架橋剤などの細胞毒性を有する薬剤を用いることなく、生体高分子の特性を保持したまま安定化できると考えた。この方法でガンマ線架橋したゼラチン-液体金属ナノ粒子は、30日以上の粒径安定性を有していること、細胞に対し高い膜浸透性を有し毒性が無いこと、近赤外レーザー照射により発熱が起こることが確認できたため、がん患部の可視化と治療効果について試験を行った。

（2）がん細胞機能制御ならびに殺傷効果の検証

大腸がんを移植して10日後のマウスに、近赤外蛍光色素（IRDye800）を修飾したゼラチン-液体金属ナノ粒子を投与し、4時間後に740~790 nmの近赤外光を当てたところがん患部だけが蛍光を発している画像が得られ、当該ナノ粒子がEPR効果によりがん組織に取り込まれていることが分かった（図2（左））。そこで、当該ナノ粒子が集積した患部に対して808 nmの近赤外レーザー光を照射したところ、光熱変換による効果で26日後には、がんを完全に消失させることに成功した（図2（右））。

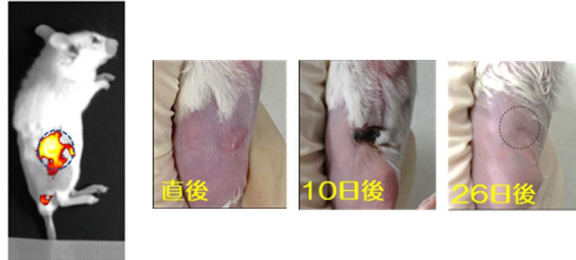


図2. ナノ粒子をがん患部に集積・可視化（左）し、光照射によりがんを治療（右）。

さらに、ゼラチン-液体金属ナノ粒子の細胞毒性と生体適合性を評価した。2種類の細胞 [マウス大腸がん由来細胞 (Colon-26)、ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞 (MRC5)] を培養する培養液中に、ゼラチン-液体金属ナノ粒子を、添加量を変えて投与・分散させ、24時間後に細胞内小器官であるミトコンドリアの活性を指標として細胞生存率を測定した結果、細胞生存率の低下は見られず、細胞毒性はなかった（図3）。また、ゼラチン-液体金属ナノ粒子をマウスの静脈から投与し、生体適合性を血液検査（1週間調査）と体重測定（約1ヵ月調査）により評価したが、いずれの項目でもゼラチン-液体金属ナノ粒子が生体に与える影響は極めて少ないことがわかった。

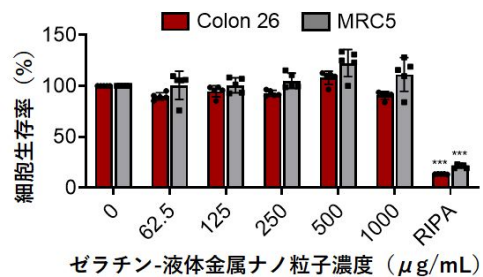


図3. CCK-8法によるゼラチン-液体金属ナノ粒子の細胞毒性評価。
赤：マウスの大腸がん細胞、グレー：ヒトの正常細胞、RIPA: Radioimmunoprecipitation Buffer（細胞や組織の溶解に使用される緩衝液、本実験の陽性対照に利用）

これらの成果は、本研究の最終目標に掲げた腫瘍血管内部観察用のナノ粒子として十分に機能を発現できると期待している。また、今回開発した生体高分子のナノ粒子コーティング技術が、革新的がん診断・治療法の基礎に成り得ることを示すだけでなく、ナノテクノロジー、光学、量子ビーム工学といった幅広い研究領域における材料設計の技術基盤として貢献することを十分期待させるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sheethal Reghu, Eijiro Miyako	4. 巻 22
2. 論文標題 Nanoengineered Bifidobacterium bifidum with optical activity for photothermal cancer immunotheranostics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 1880-1888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.1c04037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Qi Yun, Atsushi Kimura, Mitsumasa Taguchi, Eijiro Miyako	4. 巻 26
2. 論文標題 Sonication- and -ray-mediated biomolecule-liquid metal nanoparticlization in cancer optotheranostics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Materials Today	6. 最初と最後の頁 101302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.apmt.2021.101302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishant Kumar, Sajid Fazal, Eijiro Miyako, Kazuaki Matsumura, Robin Rajan	4. 巻 51
2. 論文標題 Avengers against cancer: A new era of nano-biomaterial-based therapeutics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Today	6. 最初と最後の頁 317-349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matmod.2021.09.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eijiro Miyako	4. 巻 2
2. 論文標題 Convergence of liquid metal biotechnologies for our health	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Accounts of Materials Research	6. 最初と最後の頁 858-862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/accountsmr.1c00126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matteo Andrea Lucherelli, Yue Yu, Giacomo Reina, Gonzalo Abellan, Eijiro Miyako, Alberto Bianco	4. 巻 59
2. 論文標題 Rational chemical multifunctionalization of graphene interface enhances targeting cancer therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 14034-14039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201916112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sheethal Reghu, Hui You, Kalaivani Seenivasan, Shun Nishimura, Toshiaki Taniike, Eijiro Miyako	4. 巻 2
2. 論文標題 Design and control of bioinspired millibots	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Intelligent Systems	6. 最初と最後の頁 2000059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/aisy.202000059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xi Yang, Eijiro Miyako	4. 巻 23
2. 論文標題 Soap bubble pollination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yue Yu, Xi Yang, Sheethal Reghu, Sunil C. Kaul, Renu Wadhwa, Eijiro Miyako	4. 巻 11
2. 論文標題 Photothermogenetic inhibition of cancer stemness by near-infrared-light-activatable nanocomplexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17768-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xi Yang, Satoru Komatsu, Sheethal Reghu, Eijiro Miyako	4. 巻 37
2. 論文標題 Optically activatable photosynthetic bacteria-based highly tumor specific immunotheranostics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nano Today	6. 最初と最後の頁 101100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nantod.2021.101100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yue Yu, Xi Yang, Ming Liu, Masahiro Nishikawa, Takahiro Tei, Eijiro Miyako	4. 巻 11
2. 論文標題 Amphiphathic nanodiamond supraparticles for anticancer drug loading and delivery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 18978-18987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.9b04792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yue Yu, Jia Wang, Sunil Kaul, Renu Wadhwa, Eijiro Miyako	4. 巻 9
2. 論文標題 Folic acid receptor-mediated targeting enhances the cytotoxicity, efficacy and selectivity of Withania somnifera leaf extract: In vitro and in vivo evidence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2019.00602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yue Yu, Xi Yang, Ming Liu, Masahiro Nishikawa, Takahiro Tei, Eijiro Miyako	4. 巻 2
2. 論文標題 Multifunctional cancer phototherapy using fluorophore-functionalized nanodiamond supraparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 3693-3705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.9b00603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yue Yu, Xi Yang, Ming Liu, Masahiro Nishikawa, Takahiro Tei, Eijiro Miyako	4. 巻 1
2. 論文標題 Anticancer drug delivery to cancer cells using alkyl amine-functionalized nanodiamond supraparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 3406-3412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9NA00453J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Eijiro Miyako
2. 発表標題 Bio Symphonic System Using Functional Materials
3. 学会等名 第11回ナノカーボンバイオシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 都英次郎
2. 発表標題 光合成細菌の光機能を活用する癌診断・治療法の創出
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 (2022) (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 がんの治療薬又は診断薬	発明者 都英次郎	権利者 国立大学法人北 陸先端科学技術 大学院大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-128089	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	フランス国立科学研究センター			