

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 05 月 31 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22510119

 研究課題名（和文） カーボンナノホーンのサイズ制御と化学修飾による標的がん治療薬剤の  
作製及び生体応用

 研究課題名（英文） Size-control and functionalization of carbon nanohorns  
For bioapplication

研究代表者

張 民芳 (ZHANG MINFANG)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・主任研究員

研究者番号：60518330

研究成果の概要（和文）：本研究では、CNH の集合体（100 nm）から個々のナノホーンあるいは微小 CNH の集合体（20-50 nm, S-CNH）を酸化分離法により大量分離することに成功した。分離した S-CNH の生体内環境での分散性、ステルス性、標的指向性を改善するために多重化学修飾を行った。細胞実験結果から、S-CNH をポリエチレングリコール修飾することにより、マクロファージの貪食を抑制させ、標的物質付加によるがん細胞内への取り込みを増進させることができた。さらに、抗がん剤シスプラチンを内包した S-CNH を多重化学修飾により多機能化させた S-CNH DDS を構築し、*in vivo* で、生体内動態を調べ、標的癌組織への取り込みと癌治療効果を評価した。

研究成果の概要（英文）：In this study, small-sized aggregates (20-50 nm) or individual carbon nanohorns (S-CNHs) have been successfully separated from 100 nm pristine CNH aggregates (L-CNHs) by oxidative exfoliation with a high yield. The obtained S-CNHs were functionalized by using phospholipid polyethylene glycol (PEG) and targeting agents to enhance their abilities of stealth and targeting. The *in vitro* results showed that the cellular internalization of S-CNHs was almost completely inhibited in macrophages by attaching PEG, but enhanced in cancer cells by functionalization of tumor-targeting agents. The targeting ability of functionalized S-CNHs with incorporation of anti-cancer drugs of CDDP inside has also been evaluated by using mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1000000	300000	1300000
23 年度	1000000	300000	1300000
24 年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

研究分野：総合理工

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノチューブ，ナノホーン，ドラッグデリバリーシステム，ナノバイオ

## 1. 研究開始当初の背景

がんは脳卒中、心臓病と併せて、わが国

の 3 大国民病であり、高齢化社会に移行するにつれ、患者数の急増が予想される。また、

がん治療技術が進歩しているにもかかわらず、日本人の死因の第一位を占め、3人に1人ががんで亡くなっているのが現状である。そのため、これまでの治療法とは異なり、がんに対する高い治療効果と低い副作用を併せ持つ、次世代型の治療法の確立と、その基盤になる医療産業の早期育成が強く望まれている。DDSは、薬物の体内動態を精密に制御し、薬物を生体内に存在する特異的な作用点に望ましい濃度-時間パターンのもとに送達させることによって、治療効果の最適化の実現を図るといふ、薬物投与における新しい概念を基盤とした創薬・治療技術である。現在DDSの研究は盛んに行われており、リポソームや高分子ミセルをキャリアとする抗がん剤は幾つか臨床試験が行われ、一部は実用化されつつある。しかしながら、これらのDDS製剤は、安定性が悪く、体内で容易に分解されるため、必ずしも患部に到達しないため効能及び効果に関して必ずしも十分とはいえず、難治性の肺がん、肝がん、胆がんなどに対して有効なDDSは未だ開発されていない。また製造コストが高い、製造規模を拡大するのが困難という現状である。標的指向性、安定性及び高生物活性の新しいドラッグキャリアの開発が学術分野や産業分野において広く期待されている。

CNT 状物質は高い物質吸着能力を持つため、キャリアーとしてDDSへの応用研究が注目されている。最近、欧米では主にsingle-wall carbon nanotube (SWNTs)をドラッグキャリアーとして、応用研究が盛んに行われ 1)、国内では我々の研究グループがcarbon nanohorn (CNH)集合体を用いたDDS研究を世界に先がけて実践している 2)。その結果、SWNTやCNH集合体を用いたDDSは、以下に示すような従来のDDS薬剤にはない利点を持つことが明らかになってきている。①高い安定性を有し、化学修飾をしても崩れることがない。②内部の空間の物質吸着能力が高い。③外部壁に薬剤及びその他の機能分子を担持できる。④可視光から近赤外光まで広い領域の光を吸収する性質を持つため光温療法薬としての利用も可能である。さらにSWNTと比較しても、CNH集合体は薬物の内包と徐放が容易である点や、金属不純物も含まれないため、生体内で安全に使用できる可能性が高い。またCNH集合体が大量合成が出来るため、将来CNH-DDSの大規模製造するのが可能である。しかしながらCNHが極めて安定であるため生体内に投与後分解しづらく、また集合体サイズ(約100nm)が大きいため体外排出するのが難しいという問題がある。更に、CNH集合体が血管内投与されると、異物と認識され、免疫細胞などに貪食されるため、がん組織等の病変部へ蓄積が難しくなっている。したがって従来のCNH集合体を更に

微小化・単離化が必要であり、それらのCNHの生体環境での分散性、ステルス性、標的指向性を改善するための多重化学修飾による新規DDS薬剤の作製が必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、CNH集合体の単離化によるサイズ制御とその単離したCNHへの化学修飾により、選択的に癌患部に到達可能な新機能性ナノカーボン材料の作製を試み、それらのin vitro、in vivo試験により、その癌治療の効果を検証する。

## 3. 研究の方法

高機能化CNH-DDSを創製するために、以下の検討を行った。(1) CNHのサイズ制御: 強酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>とHNO<sub>3</sub>)を用いてCNH集合体を処理することにより、微小集合体ナノホーンの大量分離を行った。(2) 多重化学修飾: ステルス機能を向上するため単離したCNHをリン脂質ポリエチレングリコール(PEG)で修飾した。さらに標的機能性を獲得するため、葉酸又は上皮増殖因子EGFにより多重修飾した。得られたCNH-DDSの毒性や、ステルス性及び標的癌治療効果を細胞・動物実験で評価した。

## 4. 研究成果

本研究は計画した通り進展し、目標とした四つの成果が得られた。

### 1) 微小ナノホーン集合体(S-CN)を大量分離する技術の確立

(22年度)本研究では、強酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>とHNO<sub>3</sub>)を用いてCNH集合体(L-CN)を処理することにより、微小集合体ナノホーンの大量分離に成功した。様々な実験を行い、CNHの壁が壊れずに、CNHの大量分離が出来る最適な条件を得た。電子顕微鏡(TEM)及びRaman分光測定により、元の集合体と比べ、分離したS-CNの構造は大きく損傷していないことを明らかにした。また、動的光散乱光度計で測定した結果により、分離したCNH集合体のサイズは20-50nmであることが分かった。

### 2) ステルス性を高める修飾に成功

(22年度)CNH集合体を化学修飾しないで血管内投与する場合は異物と認識され、免疫細胞などに貪食されるため、がん組織等の病変部への蓄積が難しい。本研究ではS-CNを生体適合性高いリン脂質ポリエチレングリコール(PEG)で非共有結合的に修飾した。マクロファージ貪食細胞を用いて、修飾したS-CNのステルス性をin vitroで検証した。分離したS-CN(20-50nm)はL-CN(100nm)より細胞への取り込み量が少ない。PEGで修飾することにより、S-CNはほとんどマクロファージ細胞に取り込まないことが分かった。

### 3) CNHの細胞内の取り込み量の定量化

(23年度) ナノカーボン物質の細胞内の取り込み量を定量するには、ナノカーボンに蛍光物質を付けて定量する方法が一般的である。蛍光物質付加は、そのナノカーボンの性質が変化させ、また、付加した蛍光物質はナノカーボンから離れる可能性があり、正確定量には問題がある。本研究では、まず、CNHが黒色であるという特徴を利用し、光学顕微鏡で細胞内に取り込まれたCNHの相対量を明らかにした。さらに、CNHの光吸収特性を利用した定量方法を確立した。細胞溶解剤と超音波破碎機を組み合わせ、最適な細胞—CNHの分散液を作製し、光吸収スペクトルにより細胞内のCNH量を正確に測定することが可能になった。

### 4) 標的指向性(能動的ターゲティング)機能の修飾とin vitro, in vivo 評価(23-24年度)

癌治療 DDS にとって、最も重要な機能はターゲティング又は標的指向性である。一般的にS-CNHは数十nmのサイズがあるため、EPR効果によって受動的ターゲティングの機能を示すと考えられるが、よりスマートなシステムを作るために癌細胞または癌組織へ選択的に集積する能動的ターゲティングが必要であり、標的分子を取り付ける必要がある。本研究では標的分子葉酸(またはEGF)を用いてCNHを修飾した。具体的に、葉酸(又はEGF)をDSPE-PEGと反応させ、合成した化合物(FA-PEG、またはEGF-PEG)を異なったサイズのナノホーン:S-CNHsとL-CNHsの表面に直接に吸着させ、非特異的に修飾した。多重修飾したFA-PEG-CNHs(又はEGF-PEG-CNH)のターゲティング機能を細胞レベルと動物実験で確認した。

まず、葉酸受容体が過剰発現するヒト癌KB細胞を用いて、合成したFA-PEG-S-CNHとFA-PEG-L-CNHの癌細胞内への取り込みについて検討した。光吸収スペクトル測定、共焦点レーザー顕微鏡とフローサイトメトリーにて定量的に細胞内の取り込み量を分析した結果、FA-PEG-S-CNHはマクロファージ細胞への取り込み量が少なく、KB細胞への取り込み量が大きくなるという優れた特性があることを見いだした(図1)。一方、L-CNHではPEG付加や葉酸付加の効果は小さかった。

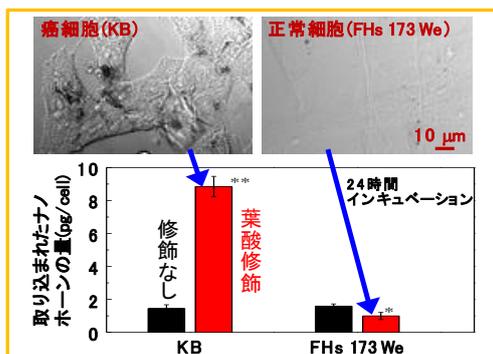


図1. 葉酸修飾した小さいカーボンナノホーンの癌細胞への選択的取り込み

次に、標的分子EGFとPEGを用いて、がん治療薬CDDPを内包したCNHを多重修飾した。修飾したナノホーンを担癌マウスに静脈投与することにより、癌組織に選択的に到達できるかどうかを確認し、がん治療効果を検証した。その結果、L-CNHを用いた場合と比べ、多重修飾したS-CNHの方ががん組織へ蓄積する量が大きく、腫瘍の増大速度が減少する傾向があった。今後、更に化学修飾方法を改良し、高機能CNHのDDS癌治療薬剤の創製と実用化を目指す。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① M. Zhang, T. Yamaguchi, S. Iijima, M. Yudasaka, "Size-dependent biodistribution of carbon nanohorns in vivo", *Nanomedicine*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.011>. In press.
- ② M. Zhang, M. Yudasaka. "Effect of Nanocarbon size on the cellular uptake", *Yakugaku Zasshi*, 133, 151-156 (2013).
- ③ M. Yang, M. Wada, M. Zhang, K. Kostarelos, R. Yuge, S. Iijima, M. Masuda, M. Yudasaka. "A high poly(ethylene glycol) density on graphene nanomaterials reduces the detachment of lipid-poly(ethylene glycol) and macrophage uptake", *Acta Biomaterialia*, 9, 4744-4753 (2012)
- ④ M. Zhang, X. Zhu, T.; S. Iijima, M. Yudasaka. "Small-sized carbon nanohorns enabling cellular uptake control", *Small*, 8, 2524-2531 (2012).
- ⑤ Y. Tahara, M. Nakamura, M. Yang, M. Zhang, S. Iijima S. M. Yudasaka, "Lysosomal membrane destabilization induced by high accumulation of single-walled carbon nanohorns in murine macrophage RAW 264.7", *Biomaterials* 33, 2762-2769 (2012).
- ⑥ Y. Tahara, J. Miyawaki, M. Zhang, M. Yang, I. Waga, S. Iijima, H. Irie, M. Yudasaka. "Histological assessments for toxicity and functionalization-dependent biodistribution of carbon nanohorns". *Nanotechnology* 22, 265106-265113 (2011).

〔学会発表〕(計10件)

- ① 張民芳、楊梅、Cyrill Bussy, Kostas Kostarelos, 飯島澄男、湯田坂雅子 “Biodegradation of single-wall carbon nanohorns” 第44回フラレン・ナノチューブ学会、東京(東京大学) 2013/ 3/11.
- ② 楊梅、張民芳、田原善夫、飯島澄男、湯田坂雅子、“Carbon nanohorns induced RAW264.7 apoptosis: Lysosomal membrane destabilization caused reactive oxygen species generation”, 第44回フラレン・ナノチューブ学会、東京(東京大学) 2013/ 3/11
- ③ 張民芳、田原善夫、楊梅、周シン、山口貴司、飯島澄男、湯田坂雅子 “Quantification of biodistribution of PEG-functionalized single wall carbon nanohorns in mice by using Gd labels” NT13 International Conference on the Science and Application of Nanotubes、ブリスベン、オーストラリア、2012/6/27.
- ④ 張民芳、田原善夫、Yang Mei、Zhou Xin、山口貴司、飯島澄男、湯田坂雅子、“The Fate of PEG-Functionalized Single Wall Carbon Nanohorns after Intravenous injection into mice”, 第42回フラレン・ナノチューブ学会、東京(東京大学)、2012/3/8
- ⑤ 楊梅、和田百代、張民芳、Kostas Kostarelos, 飯島澄男、増田光俊、湯田坂雅子、“Searching better lipid-PEG for nano-carbons dispersion in biological application” 第41回フラレン・ナノチューブ学会、東京(首都大学)、2011/ 9/5
- ⑥ 張民芳、周シン、飯島澄男、湯田坂雅子 “Small-sized aggregates of carbon nanohorns enabling cellular uptake control”, NT12 International Conference on the Science and Application of Nanotubes, Univ. of Cambridge, UK、2011/7/10.
- ⑦ 張民芳、周シン、飯島澄男、湯田坂雅子 “Size-dependent cellular uptake of carbon nanoparticles”, 第40回フラレン・ナノチューブ学会、名古屋(名城大学)、2011/ 3/10
- ⑧ 周 Xin, 張民芳、飯島澄男、湯田坂雅子 “Interaction between carbon nanohorns and amino acids” 第40回フラレン・ナノチューブ学会、名古屋(名城大学)、2011/ 3/10
- ⑨ 楊梅、和田百代、張民芳、Kostas Kostarelos, 飯島澄男、増田光俊、湯田坂雅子 “Evaluation of dispersant effectiveness of lipid-PEG for

nano-carbon using carbon nanohorns” 第40回フラレン・ナノチューブ学会、名古屋(名城大学)、2011/ 3/8

- ⑩ 張民芳、山口貴司、飯島澄男、湯田坂雅子、“Toxicology study of single wall carbon nanohorns with different sizes intravenously administered into mice” NT11 International Conference on the Science and Application of Nanotubes”, モントリオール、カナダ、2010/6/29.

〔図書〕(計1件)

- ① 中村真紀、張民芳、湯田坂雅子、カーボンナノチューブ・グラフェンハンドブック、“ナノホーン” 3.3.1、コロナ社、2011/05/01

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

張民芳 (Minfang Zhang)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・主任研究員

研究者番号：60518330