

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390346

研究課題名(和文)半導体ナノ結晶と中空ファイバを活用した脳腫瘍の診断・治療一体型デバイスの開発

研究課題名(英文)Development of diagnosis and therapy-integrated medical devices with liposomes containing quantum dots and hollow nanofibers against brain tumors.

研究代表者

水野 正明(Mizuno, Masaaki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院教授

研究者番号：70283439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、悪性脳腫瘍の完治を目指し、MRIでは検出できない腫瘍摘出腔の辺縁から1-3cmの領域に残存する浸潤がん細胞を、細胞レベルで正確に検出し、取り除く技術の開発を行った。その結果、半導体ナノ結晶(トランスフェリン固定化量子ドット(QD-Tf))をリポソームに包埋し、中空ナノファイバーを活用することで脳腫瘍細胞の選択的高感度検出を可能にした。合わせて可視化に使用する半導体ナノ結晶から自由電子、ラジカル、イオン等を発生させ、細胞死を誘導する技術を確認し、診断・治療一体化医療デバイスの開発につながる基盤を作上げた。

研究成果の概要(英文)：Malignant brain tumors are difficult to remove completely due to their cellularity characteristics with borderless diffusion, thus the eradicating brain tumor at the cellular level is strongly desired to obtain a good prognosis. In this study, we first assessed the efficiency of Quantum Dots (QDs) conjugated with Transferrin (Tf) (QDs-Tf) and hollow nanofibers for specific imaging of tumor cells. As a result, we found that imaging brain tumor cells using QDs-Tf is effective in detecting tumor cells at the cellular level with clinical applications. Moreover, we developed another technique to pick up free electron from QDs and then we confirmed that it could induce tumor cell death. These data suggest that the diagnosis and therapy-integrated medical devices with liposomes containing QDs and hollow nanofibers are useful for the treatment against formidable malignant brain tumors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍 半導体ナノ結晶 中空ファイバ 診断 治療

1. 研究開始当初の背景

がんは、日本人の死亡原因の第1位であり、年間30万人もの命を奪っている。現在、最も治療が困難ながんとして悪性脳腫瘍、膵臓がん、腎細胞がんがあげられる。中でも脳実質から発生する悪性脳腫瘍は、集学的治療法や我々が積極的に進めている手術中MRIと高度な脳画像ナビゲーションを活用した先進的手術手技によりQOL(Quality of Life)の改善は得られるようになってきたが、平均生存期間が2年以下と厳しい状況が続いている。その最大の原因が、手術では摘出できない浸潤がん細胞の残存にある。一方、再燃・再発する部位は、通常ランダムではなく腫瘍摘出腔の辺縁からわずか1-3cmの範囲に限定されている。したがってMRIでは検出できない辺縁から1-3cmの領域に残存する浸潤がん細胞を、細胞レベルで正確に検出できる技術が確立できれば、それを基にした新しい治療の開発が可能になり、悪性脳腫瘍を含む難治性がんの治療成績を著しく向上できるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍摘出腔の辺縁から1-3cmに存在する浸潤がん細胞を、生体親和性の高いオリジナルの半導体ナノ結晶とナノレベルで構造を制御した中空コアファイバ技術を用いて可視化するとともに、可視化に使用する半導体ナノ結晶から自由電子、ラジカル、イオン等を発生させる新規技術を開発することにより細胞特異的に浸潤がん細胞を死滅させる戦略を確立し、診断と治療を一体化した医療デバイスの開発につなげることを目的としている(図1)。なお、中空コアファイバとは、中空コアの周囲を微細な空孔の格子配列によって囲んだ新しい構造のファイバである。

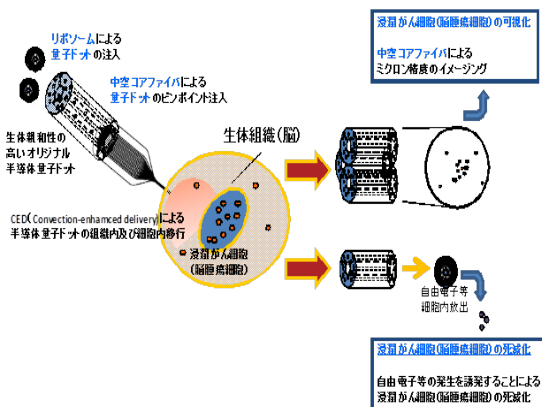


図1 本研究の概要

3. 研究の方法

本研究は、図2に示す研究体制の下、2つの課題、すなわち(1)浸潤がん細胞を可視化するための技術の確立と(2)浸潤がん細胞

を死滅させるための技術の確立をそれぞれ目指した。

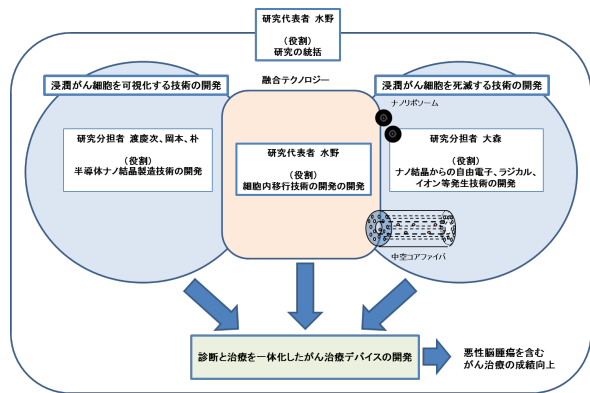


図2 本研究の実施体制

(1) 浸潤がん細胞を可視化するための技術の確立

生体組織で高い透過性を示す近赤外領域に蛍光波長を有する半導体ナノ結晶製造技術の開発:

近赤外の領域に発光ピークを有する半導体ナノ結晶の合成を行った。材料としてはCdTe、CdSeやSiが候補としてあるが、生体への安全性を考え、Siを主に検討を進めた。検討項目には、粒子径、水分散性、抗体固定化方法をあげ、その最適化を目指した。

ナノリポソーム法とCED(Convection-enhanced delivery:脳内対流伝達)法並びに中空コアファイバ技術を活用したナノ結晶の細胞内移行技術の開発:

リポソーム作製技術とCEDを活用して半導体ナノ結晶をリポソームに包埋する技術を確立し、半導体ナノ結晶の対リポソーム脂質量の培養細胞系(in vitro)における最適化を図った。

ナノレベルで構造を制御した中空コアファイバを用いた浸潤がん細胞検出技術の開発:

がん細胞の検出に適した波長帯の中空コアファイバの設計および試作技術の確立を目指した。中空コアファイバ1本でフィルタリング効果を確認し、中空コアファイバの設計と試作を行い、中空コアファイバの特性を最適化した。

(2) 浸潤がん細胞を死滅させるための技術の確立

浸潤がん治療のためのナノ結晶からの自由電子、ラジカル、イオン等発生技術の開発:

半導体ナノ結晶(量子ドット)には、平均粒径4、5.3、8.1nmの球状と6×12nmの楕円体状の4種類のCdSe/ZnSコアシェルドットを用いた。がん細胞に導入された半導体ナノ結晶に紫外光を照射し自由電子、ラジカル、イオン等をがん細胞内で発生させてがん細胞にダメージを与える治療法を検討した。具体的には、照射する紫外線の波長、光パワー

と自由電子の発生量などの関係を調べた。一方、ナノ結晶を取り込んだ腫瘍細胞に紫外線を照射して活性酸素を発生させてがん細胞にダメージを与える検討も行った。

4. 研究成果

(1) 浸潤がん細胞を可視化するための技術の確立

生体組織で高い透過性を示す近赤外領域に蛍光波長を有する半導体ナノ結晶製造技術の開発：

生体組織で高い透過性を示す近赤外領域に蛍光波長を有する半導体ナノ結晶の製造技術の開発を進めた。その結果、鉛等の有害重金属で構成されない In, Cu Zn より構成される量子ドットの合成に成功し、従来の市販量子ドットよりも低毒性であることを明らかにした。

ナノリポソーム法と CED (Convection-enhanced delivery : 脳内対流伝達)法並びに中空コアファイバ技術を活用したナノ結晶の細胞内移行技術の開発：

リポソーム作製技術と CED を活用して半導体ナノ結晶をリポソームに包埋する技術を確立し、半導体ナノ結晶の対リポソーム脂質量の培養細胞系 (in vitro) における最適化を図った。

その結果、開発した量子ドットをリポソーム化することで、腫瘍細胞への取り込みの増大に成功した。さらにリポソームの組織内注入を可能にする中空コアファイバの開発に関しては、ファイバ先端部分をテーパ加工し、直径を 125 μm から 50 μm に縮小する技術並びに、中空コアファイバの中途部分の一部について、内部の空孔が露出するように外側の石英を除去する技術をそれぞれ確立し、量子ドット注入針の作製を可能にした (図 3)。

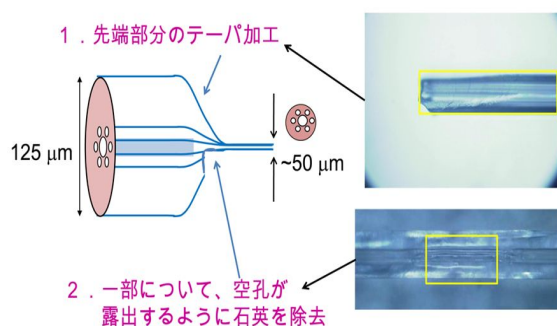


図 3 炭酸ガスレーザーを用いた中空コアファイバ加工技術

ナノレベルで構造を制御した中空コアファイバを用いた浸潤がん細胞検出技術の開発：

量子ドット (QD) による脳腫瘍細胞の選択的ラベリング化の検討を実施した。用いた脳腫瘍細胞 (U87) はトランスフェリン受容体を

高発現しているが、正常グリア細胞 (NHA) にはトランスフェリン受容体の高発現は認められないことを明らかにした。この知見をもとに、トランスフェリン固定化量子ドット (QD-Tf) を作製し、U87 および NHA に投与した結果、U87 を選択的に QD-Tf でラベリングできることを証明した。

以上の結果より、当初の研究計画通り、我々の作製した QD-Tf を利用することで、脳腫瘍細胞の選択的高感度検出を達成し、細胞レベルでの可視化を可能にした。

(2) 浸潤がん細胞を死滅させるための技術の確立

浸潤がん治療のためのナノ結晶からの自由電子、ラジカル、イオン等発生技術の開発：

コロイド量子ドット中からの自由電子を取り出す技術の開発を行った。その結果、量子ドット外部に自由電子を効率良く取り出すためには、表面欠陥の少ない量子ドットを作製する必要があることを見出し、今後の課題とした。

半導体ナノ結晶からの自由電子、ラジカル、イオンなどの発生技術の基礎研究として、様々な種類のコロイド量子ドットへの電界印加による光物性評価を行った。量子ドットは、平均粒径 4、5.3、8.1 nm の球状と 6 × 12 nm の楕円体状の 4 種類の CdSe/ZnS コアシェルドットを用いた。図 4 に示すようにそれぞれのドットの蛍光ピーク波長はサイズが小さいものから順に 553、589、626、649 nm となっている。

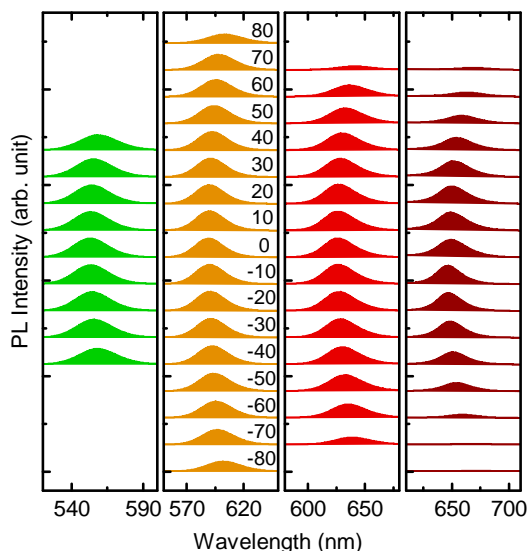


図 4 4 種類のコロイド量子ドットに対する電界印加時の蛍光スペクトル。図中の数字は電界強度 (kV/cm) を表す。

電界印加用の試料は、ITO 透明電極を蒸着した石英基板上に樹脂にコロイド量子ドットを混ぜた溶液をスピコートし、その薄膜

上に Al 電極を蒸着することでコンデンサ状の素子を作製した。ドットを含む樹脂薄膜の厚さはおよそ 500nm で、Al 電極の面積は 1mm² である。各量子ドットに電界を印加した蛍光スペクトルの測定結果を図 4 に示す。測定時の試料温度はすべて室温で、励起光源には波長 405nm の半導体レーザーを用いた。どのドット試料も電界印加に伴いピーク波長が長波長側にシフトしている様子が分かる。

次に蛍光ピークの電界によるシフトをまとめたものを図 5 上に示す。蛍光ピーク 553nm のドットを除いて他の 3 種類のドットはサイズが大きいくほどシフト量が多くなっており、量子閉じ込めシュタルク効果の理論的な予想と一致していた。553nm のドットだけ傾向が異なったのは薄膜試料の厚さ不均一に起因しているものと考えている。図 5 上の実線は各データを理論式の 2 次関数でフィットしたもので、どのドットもフィット関数とよく一致していた。

図 5 下に示す蛍光強度の電界依存性からドットサイズの大きいものほど蛍光強度が電界強度の増加に伴って早く減衰していた。これは、ドット表面積が大きくなると表面欠陥も多くなることから、それによる非発光再結合が蛍光強度を大きく低下させている要因になっているものと考えられた。

この電界印加時のキャリアダイナミクスを詳しく調べるために、蛍光ピーク 626nm と 649nm のドットに対して蛍光寿命の測定を行った。図 6 に示すように両ドットとも電界印加に対して蛍光寿命が短くなる結果となった。これは、電界によって電子と正孔が分離し、量子ドットのシェル表面に押し付けられ、表面欠陥などの非発光センターに捕獲される確率が増したことによると考えられた。また、単純な指数関数減衰のカーブではないことから、いくつかの非発光成分が多数関与していることを示唆する結果となっており、表面欠陥以外にもトンネル効果により電子正孔がドット表面に流出している可能性も考えられた。

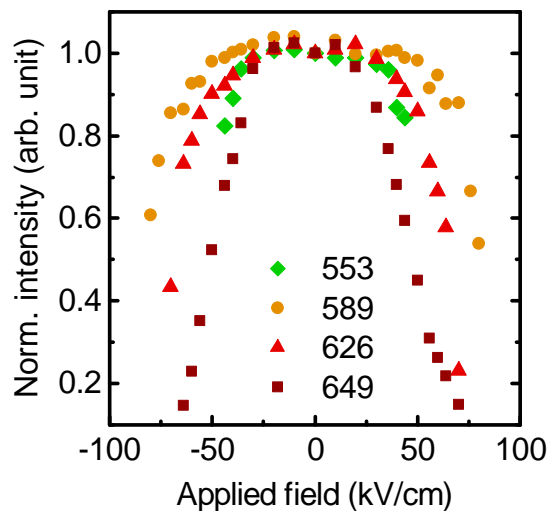
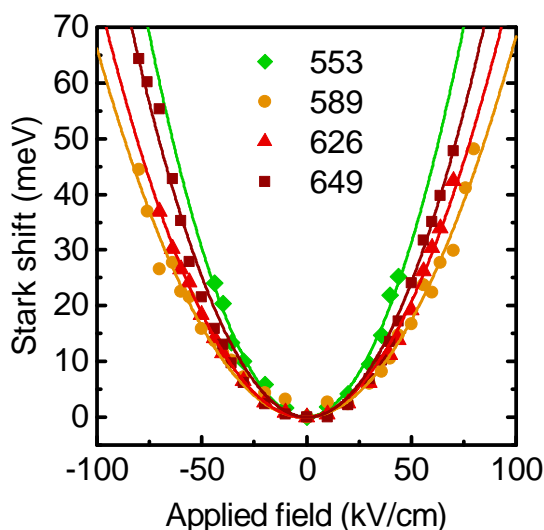


図 5 各ドットの試料の印加電界に対する蛍光ピークシフト(上)と蛍光強度(下)変化。

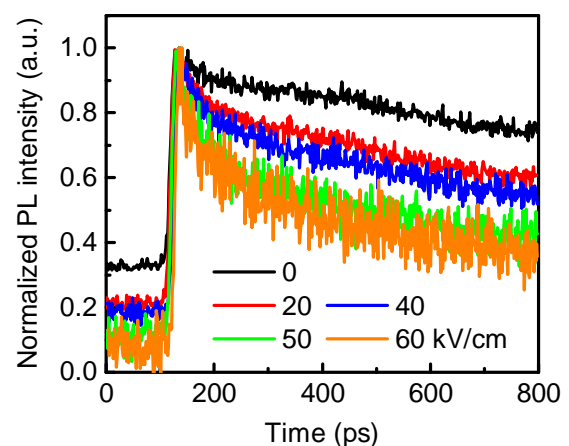
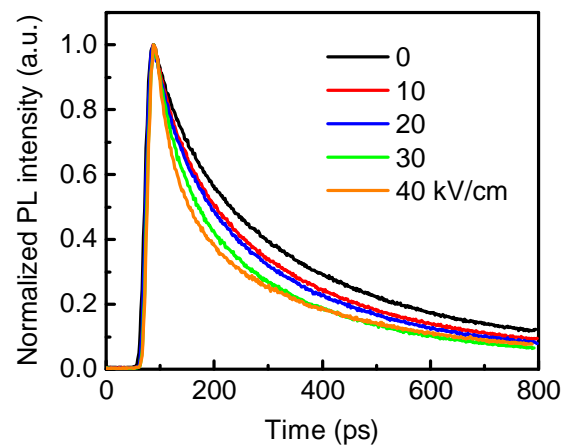


図 6 蛍光ピーク波長 626nm(上)と 649nm(下)のドット試料の時間分解蛍光測定結果。

以上の結果から、量子ドット内で発生した電子を電界印加によって外部に取り出すためには、表面欠陥によるキャリアの消失を最

小限に抑制させる必要があることが分かった。それには表面パッシベーションや表面修飾材料の工夫など量子ドットの作製方法を工夫し、より詳しいドット内でのキャリアダイナミクスの評価が今後の課題となるものと考えられた。

上記研究成果から、悪性脳腫瘍の完治を目指し、MRI では検出できない腫瘍摘出腔の辺縁から 1-3 cm の領域に残存する浸潤がん細胞を、半導体ナノ結晶(トランスフェリン固定化量子ドット(QD-Tf))をリポソームに包埋し、中空ナノファイバーを活用する手法によって選択的高感度に検出できることがわかった。合わせて可視化に使用する半導体ナノ結晶から自由電子、ラジカル、イオン等を発生させ、細胞死を誘導する基盤技術を確立できた。これらの成果は、悪性脳腫瘍を対象にした診断・治療一体化医療デバイスの開発につながるものと考えられた。

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4件)

すべて査読あり

Yukawa H, Tsukamoto R, Kano A, Okamoto Y, Tokeshi M, Ishikawa T, Mizuno M and Baba Y. Quantum Dots Conjugated with Transferrin for Brain Tumor Cell Imaging, J Cell Sci Ther 4: 10000150-7, 2013

Takaha N, Nakanishi H, Kimura Y, Hongo F, Kamoi K, Kawachi A, Mizuno M, Yoshida J, Wakabayashi T, Miki T. Significant induction of apoptosis in renal cell carcinoma cells transfected with cationic multilamellar liposomes containing the human interferon- γ gene through activation of the intracellular type 1 interferon signal pathway. Int J Oncol. 40(5):1441-6, 2012

Arata J, Tada Y, Kozuka H, Wada T, Saito Y, Ikedo N, Hayashi Y, Fujii M, Kajita Y, Mizuno M, Wakabayashi T, Yoshida J, Fujimoto H. Neurosurgical robotic system for brain tumor removal. Int J Comput Assist Radiol Surg. 6:375-385, 2011

Eshita Y, Higashihara J, Onishi M, Mizuno M, Yoshida J, Takasaki T, Yoshioka H, Kubota N and Onishi Y. Mechanism of the Introduction of Exogenous Genes into Cultured Cells Using DEAE-Dextran-MMA Graft Copolymer as a Non-Viral Gene Carrier. II. Its Thixotropy Property. J Nanomedic Nanotechnol 2:1-8, 2011

[学会発表](計5件)

湯川 博、塚本涼子、岡本行広、水野正明、加地範匡、馬場嘉信:腫瘍細胞を選択的に標

識可能な量子ドットの開発,第39回日本臓器保存生物医学学会学術総会,2012/11/16-17,コラッセふくしま(福島県福島市)

中尾早織、朴蓮洙、岡本行広、加地範匡、水野正明、渡慶次学、馬場嘉信:量子ドットを用いた腫瘍細胞イメージング,日本化学会第92春季年会,2012年3月25日~28日,慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス,東京

田中俊成、大森雅登、榊裕之, "CdSe/ZnSコロイド量子ドットの電界中の蛍光特性",第59回応用物理学関係連合講演会,早稲田大学,2012年3月17日,17p-E1-12.

NAKAO Saori, PARK Yeon-Su, OKAMOTO Yukihiro, KAJI Noritada, MIZUNO Masaaki, TOKESHI Manabu, BABA Yoshinobu: Tumor Cell Imaging Using CuInS₂/ZnS Quantum Dots, International Symposium on Innovative Nanobiodevices ISIN 2012, 2012年3月21-22, 国立京都国際会館,京都

Saori Nakao, Yukihiro Okamoto, Masaaki Mizuno, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, IMAGING TECHNIQUE OF BRAIN TUMOR CELLS USING LIPOSOMES CONTAINING QUANTUM DOTS, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS 2011), 2011年5月22日~26日, 国立京都国際会館,京都

[図書](計1件)

湯川 博、小野島大介、馬場嘉信: 東京化学同人,現代化学,量子ドットのバイオ応用最前線 2012, No.498, pp.31-35

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 正明 (MIZUNO MASA AKI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院教授
研究者番号:70283439

(2)研究分担者

渡慶次 学 (TOKESHI Manabu)

北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号:60311437

岡本 行広 (OKAMOTO Yukihiro)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・講師
研究者番号:50503918

朴 蓮洙 (Yeon-Su Park)

名古屋大学・大学院工学研究科・研究員
研究者番号:50543534

(平成23年度)

湯川 博 (YUKAWA Hiroshi)

名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター・特任講師

研究者番号:30634646

(平成24~25年度)

大森 雅登 (OHMORI Masato)
豊田工業大学・工学(系)研究科(研究院)・
嘱託研究員
研究者番号 : 7045444