

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650293

研究課題名（和文） 光熱特性制御型 dendrimer-金ナノハイブリッドのワンポット作製と癌治療への展開

研究課題名（英文） One-pot preparation of dendrimer-gold nanohybrids with controlled photothermal property and their application to cancer therapy

研究代表者

河野 健司 (KONO KENJI)

大阪府立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90215187

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ジスルフィド結合をコア部にもつポリエチレングリコール修飾ポリアミドアミン dendrimer 共存下で金ナノロッドを調製することで dendrimer-金ナノロッドハイブリッドを作製することによって、近赤外光照射によって強く発熱する微小サイズのハイブリッドを作製した。このハイブリッドを取り込んだ癌細胞は近赤外光照射下、効果的に殺傷されたことから、このハイブリッドの癌光熱治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we attempted to develop dendrimer-gold nanorod hybrids with controlled size and photothermal property. The hybrids with small size and high photothermal property were prepared by formation of gold nanorod in the presence of polyethylene glycol-modified polyamidoamine dendrimers with disulfide bond at the core. Cancer cells taking up the hybrids were killed effectively under near infrared light irradiation and hence these hybrids might be potentially useful as a nanodevice for photothermal therapy for cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料

キーワード：ナノバイオ、dendrimer、金ナノ粒子、癌治療

1. 研究開始当初の背景

光熱癌治療は、光照射によって発熱体粒子を発熱されることで癌病巣を選択的に加熱して攻撃する治療法であり、癌に対する非侵襲治療法として有用である。この治療法の確立には、①生体への浸透性の高い近赤外光による励起と高効率な光発熱特性、②生体内で安定に循環できるナノサイズ、③標的腫瘍病巣に効率よく集積する機能性、を兼ね備えた、高性能光発熱体の開発が必要である。癌光熱療法のための発熱体として金ナノロッドが最適である。金ナノロッドは、界面活性剤の共存下で金を異方的に成長させることで得られる、短径 10 数 nm、長径 100nm 程度のロッド状金ナノ粒子であるが、その粒子サイ

ズ（特に nm オーダーの粒径に小さくすること）や光熱特性を、再現性よく自在に制御することが困難であり、また生体内で用いるためには、界面活性剤の除去、ポリエチレングリコール（PEG）等による表面安定化、などのさらなる修飾反応が必要であるなど、多くの問題点がある。

2. 研究の目的

本研究では、①分子形状が厳密に規定でき、②生体内安定性を持ち、③金表面と反応するジスルフィドコアをもつ、各種世代（サイズ）の機能性 dendrimer を、金ナノロッドの成長過程において反応させることで、金ナノ粒子の異方的成長を制御し、理想的なサイズと金赤外光による高効率の発熱挙動を有する、

金- dendrogrammer-nanohybridをワンポットで作製する手法の開拓を試みた。また、 dendrogrammer-金nanohybridの光熱治療への応用の可能性について検討した。

3. 研究の方法

本研究では、第2世代～第4世代のジスルフィド結合をコア部に有するポリエチレングリコール修飾ポリアミド dendrogrammerを合成して、これを、金nanorod成長過程において種々のタイミングで反応させることで、生体適合性 dendrogrammer-金nanohybridを作製した。 dendrogrammerの世代数及び金nanorodへの反応のタイミングと生成する hybrid粒子のサイズ、光吸収特性、発熱特性と hybrid粒子の相関関係を明らかにすることで、 hybrid中の金粒子の特性制御原理を確立し、金赤外光照射で強く発熱する生体適合性 nanohybridの作製を試みた。また、得られた hybridnanoparticleの癌光熱治療への応用の可能性を検討するために、癌由来 HeLa 細胞を用いて、細胞への hybridnanoparticleの取込みと金赤外光による抗腫瘍効果を調べた。

まず、第2世代～第4世代のシスタミンをコア部とするジスルフィドコアポリアミド dendrogrammerの末端アミノ基にポリエチレングリコールモノメチルエーテルをウレタン結合で結合させて生体適合性 dendrogrammerを合成した。

次に、合成したジスルフィドコアポリエチレングリコール修飾 dendrogrammerと金との hybridを作製した。通常金nanorodの作製では界面活性剤の存在下、塩化金酸をアスコルビン酸で還元して、経時的に成長させる。この過程において種々のタイミングでジスルフィドコア温度応答性 dendrogrammerを加え反応させることで、サイズの制御を行う。ここでは、金nanorodの成長過程で dendrogrammerが結合して成長を抑制することによって、微小サイズの金nanorodを作製した。 hybrid粒子のサイズと形態は、動的散乱や透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡等を用いて調べた。また、光吸収特性は、紫外可視近赤外分光光度計を用いて調べた。さらに hybrid粒子の光発熱挙動は、近赤外光レーザー(804nm)を用いて、 nanohybrid水溶液のレーザー光照射による昇温を調べることで評価した。

さらに、生体適合性 nanohybridの癌光熱治療への適用を目指し、 nanohybridと HeLa 細胞との相互作用について検討した。 HeLa 細胞に nanohybridを加えてインキュベートし、細胞に取込ませた。そして、 nanohybridを取り込んだ細胞に近赤外光を照射することで光発熱による癌細胞殺傷効果を調べた。

4. 研究成果

ジスルフィドコアをもつポリアミド dendrogrammer(G2～G4) dendrogrammerの末端アミノ基にポリエチレングリコールモノメチルエーテル(PEG、分子量 2000)をウレタン結合で結合させて PEG 修飾 dendrogrammerを合成した。金nanorodの作製プロセスにおいて、種々のタイミングでジスルフィドコア PEG 修飾性 dendrogrammerを加え反応させることで、サイズの異なる PEG 修飾 dendrogrammer-金nanorod hybridを作製した(図1)。

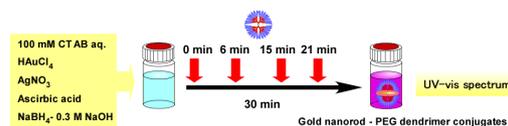


図1. dendrogrammer-金nanohybridの作製スキーム。

hybrid粒子の光吸収特性を調べた(図2)。 dendrogrammerを初期の段階から加えて作製した nanohybridは若干吸収極大波長が短波長にシフトしたが、その程度はわずかであることがわかる。

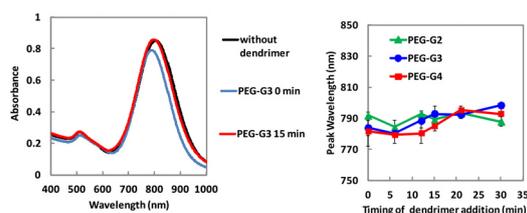


図2. 種々のタイミングで dendrogrammerを添加して作成した nanohybridのスペクトル吸収スペクトル。

また、 dendrogrammer-金nanohybridの形態を透過型電子顕微鏡で調べた。 dendrogrammerを加えずに作製した nanorodは、24nm程度の大きさであったが、 dendrogrammerを周期の段階から加えて作製した nanohybridでは、 nanorodは18-20nm程度であった。このことは、 dendrogrammerの複合化によって、生成する金nanoparticleのサイズを減少できることを示している。

さらに、原子間力顕微鏡および動的散乱を用いて nanohybridの形態とサイズを調べた(図3)。 PEG 修飾 G2 dendrogrammerと金nanorod hybridは、粒径 25nm程度の rod状粒子であった。 dendrogrammerが小さいため、 nanorodの形状が反映されているものと思われる。 PEG 修飾 G3 dendrogrammerと金との hybridは、粒径が 31nm程度の球状の形態をもつことがわかる。より大きな dendrogrammerが nanorod表面を覆う

ため、球状の形態になったものと考えられる。一方、PEG 修飾 G4 デンドリマーを用いたナノハイブリッドでは、約 80nm 程度の粒径を有し、ハイブリッドが凝集している形態を示した。デンドリマーのサイズがさらに大きいため、金ナノロッド表面に十分に結合できず安定性が低かったものと考えられる。これらの結果から、適度な分子サイズを有する G3 デンドリマーを用いることで、PEG 修飾デンドリマーに十分覆われ安定化された微小なナノハイブリッドが作製できることがわかった。

PEG デンドリマーによって効果的に安定化された G3 デンドリマーナノハイブリッドを用いて、癌細胞に対する光殺傷効果について検討した。このハイブリッドおよび未修飾ナノロッドを HeLa 細胞に加えてインキュベートすることで細胞に取り込ませた。未修飾ナノロッドとインキュベートした細胞は、生存率が著しく低下したが、PEG デンドリマーハイブリッドとインキュベートした細胞はほとんど低下しなかった。生体適合性の PEG 鎖によってナノロッドの表面が効果的に覆われ

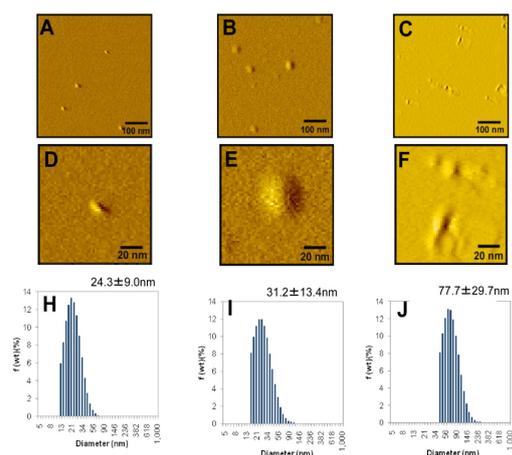


図 3. PEG 修飾デンドリマー-金ナノハイブリッドの AFM 画像と動的散乱による粒径評価。A, D, H : G2 デンドリマーハイブリッド。B, E, I : G3 デンドリマーハイブリッド。C, F, J : G4 デンドリマーハイブリッド。

ていることによるものと考えられる。さらに、ハイブリッド粒子を取り込んだ HeLa 細胞に対して 808nm のレーザー光を照射したところ、照射領域の細胞だけが、効果的に殺傷された。細胞内において、近赤外光照射によってハイブリッドが強く発熱し、細胞を殺傷したのと考えられる。

本研究において、簡便な手順によって微小なサイズと近赤外光照射による発熱特性を有するハイブリッドナノ粒子を作製できることを示した。このハイブリッドは近赤外照射によって強く細胞殺傷活性を示した。この様

な特性を踏まえると、PEG 修飾デンドリマー-金ナノハイブリッドは光熱癌治療のための効果的なデバイスとして応用が期待される。

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 C. Kojima, H. Kawabata, A. Harada, H. Horinaka, K. Kono, Design of a novel drug carrier with photo-responsive properties: drug-encapsulated and alkanethiol-modified gold nanoparticle-loaded PEGylated dendrimer, Chem. Lett., 査読有, in press

② X. Li, Y. Haba, K. Ochi, E. Yuba, A. Harada, K. Kono, PAMAM dendrimers with oxyethylene unit-enriched surface as biocompatible temperature-sensitive dendrimers, Bioconjugate Chemistry, 査読有, Vol. 24, 2013, pp. 282-290

③ S. Iwashita, Y. Hiramatsu, T. Otani, C. Amano, M. Hirai, H. Minematsu, H. Kitagawa, K. Oie, E. Yuba, K. Kono, M. Miyamoto, K. Igarashi, Assemblies of polyamidoamine dendron-bearing lipids with various generations: their morphologies and abilities of gene transfection, J. Biomaterials Applications, 査読有, Vol. 27, 2012, pp. 445-456

④ K. Kono, Dendrimer-based bionanomaterials produced by surface modification, assembly, and hybrid formation, Polymer Journal, 査読有, Vol. 44, 2012, pp. 531-540

⑤ K. Kono, R. Ikeda, K. Tsukamoto, E. Yuba, C. Kojima, A. Harada, Polyamidoamine dendron-bearing lipids as a non-viral vector: influence of dendron generation, Bioconjugate Chemistry, 査読有, Vol. 23, 2012, pp. 871-879

⑥ E. Yuba, Y. Nakajima, K. Tsukamoto, S. Iwashita, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, Effect of unsaturated alkyl chains on transfection activity of poly(amidoamine)dendron-bearing lipids, J. Control. Release, 査読有, Vol. 160, 2012, pp. 552-560

[学会発表] (計 11 件)

① K. Kono, K. Takeda, X. Li, E. Yuba and A. Harada, Dually Functionalized Dendrimers by Temperature-Sensitive Surface Modification and Gold Nanoparticles Loading for Photothermal Therapy, 2nd International Conference on

Biomaterials Science in Tsukuba, 2013 年 3 月 21 日、つくば

② X. Li, E. Yuba, A. Harada, K. Kono, Preparation of poly(ethylene glycol)-modified PAMAM dendrimers-gold nanorod conjugates and their photothermal properties, 9th SPSJ International Polymer Conference, 2012 年 12 月 14 日、神戸

③ 是枝李香, 李小杰, 武田啓志, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, PAMAM デンドリマーと金ナノロッドとのハイブリッド形成、第 61 回高分子学会年次大会、2012 年 9 月 11 日、名古屋

④ 河野健司, 李小杰, 是枝李香, 武田啓志, 弓場英司, 原田敦史, デンドリマーと金ナノ粒子の複合化による光熱治療のための機能性ナノハイブリッドの構築. 2012 年 9 月 11 日、名古屋

⑤ X. Li, K. Takeda, E. Yuba, A. Harada, K. Kono, Biocompatible temperature-sensitive dendrimers encapsulating gold nanoparticles for photothermal therapy, IUPAC 8th International Conference on Novel Materials and Synthesis, 2012 年 6 月 26 日、America

⑥ Kenji Kono, Stimuli-sensitive liposomes for drug delivery, CIMTEC2012, 2012 年 6 月 14 日、Italy

⑦ 李小杰, 武田啓志, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, オリゴエチレングリコール修飾 PAMAM デンドロン-金ナノロッドコンジュゲートの作製と光熱特性. 第 61 回高分子学会年次大会、2012 年 5 月 30 日、横浜

⑧ K. Kono, K. Takeda, E. Yuba, A. Harada Preparation of Stimuli-Responsive Dendrimer-Gold Nanoparticle Hybrids for Biomedical Applications, The 12th Pacific Polymer Conference, 2011 年 11 月 15 日、Korea

⑨ K. Kono, Design of Stimuli-sensitive Dendrimers, Dendrimer-gold Hybrids and Dendrimer-based Assemblies for Biomedical Applications, The 7th International Dendrimer Symposium, 2011 年 6 月 28 日、America

⑩ 河野健司, 刺激応答性ナノキャリアの開発、第 60 回高分子学会年次大会、2011 年 5 月 27 日、大阪

⑪ 武田啓志, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, 金ナノロッドコア PEG 修飾 PAMAM デンドリマーの作製と光発熱特性. 第 60 回高分子学会年次大会、2011 年 5 月 27 日、大阪

[図書] (計 1 件)

① 河野健司 (分担執筆)、先端バイオマテリ

アル、エヌ・ディー・エス(2012). pp. 347-357

[産業財産権]

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/ohka9/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 健司 (KONO KENJI)

大阪府立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90215187