

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282129

研究課題名(和文)近赤外発光貴金属ナノクラスターによる乳癌蛍光イメージング技術の開発

研究課題名(英文)Development of breast tumor imaging using near-fluorescent novel-metal clusters

研究代表者

神 隆 (Jin, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー

研究者番号：80206367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体蛍光イメージングのために牛アルブミンで保護された近赤外発光金ナノクラスターを合成した。リン酸緩衝液中での、金ナノクラスターの蛍光ピークは700 nmにあり、蛍光の量子収率は1.7%であった。乳がん腫瘍の蛍光イメージングのために抗HER2抗体(ハーセプチン)をカルボジイミドカップリングによって金ナノクラスターに結合させた。ハーセプチン結合金ナノクラスター(HER2-AuNCs)のヒト乳がん細胞表面への特異的結合は、共焦点蛍光顕微鏡およびFACSにより確認した。ヒト乳がん細胞を移植したヌードマウスに対して、HER2-AuNCsを用いて乳がん腫瘍の近赤外発光イメージングを達成した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared near-infrared (NIR) emitting gold nanocluster (AuNCs) protected by bovine serum albumin (BSA) for in vivo fluorescence imaging. The emission maximum of the NIR-emitting AuNCs was 700 nm, and its fluorescence quantum yield was 1.7 % in phosphate buffered saline. For breast tumor imaging, anti-HER2 antibody (Herceptin) was conjugated to the AuNCs by using carbodiimide coupling. NIR fluorescence imaging of the breast tumors was achieved for human breast cancer cell implanted nude mice using HER2-AuNCs

研究分野：ナノバイオマテリアル

キーワード：生体イメージング 近赤外 蛍光 乳がん 貴金属ナノクラスター

1. 研究開始当初の背景

MRI、PET は癌の早期発見や病変部位の非侵襲イメージング法として、医療診断分野で広く普及している。しかし、現在のところ光(蛍光)イメージング技術は臨床レベルでの実用化に至っていない。非侵襲な生体蛍光イメージングの実用化には、生体毒性のない高輝度発光近赤外蛍光プローブと生体組織で多重散乱される光の画像再構成技術の開発が必須である。生体では、様々な内在性色素が存在するため可視部の光に対してはほとんど透過性を示さない。唯一透過性に優れているのは、波長領域 700-900 nm (生体の光学窓) の近赤外光である。そのため生体組織を蛍光イメージングするには、高輝度発光する近赤外蛍光プローブが必要である。しかし、従来知られている近赤外蛍光プローブのほとんどがシアニン系の有機色素で発光輝度が低く水中で不安定である。たとえば、現在、臨床レベルで認可されている近赤外蛍光試薬にシアニン系色素であるインドシアニングリーン(肝機能検査試薬や眼底血管造影剤)は、発光の量子収率は血液中でわずか 1% であり、乳癌蛍光イメージング用の高感度近赤外蛍光プローブとしては適していない。一般的にシアニン系などの有機色素による近赤外蛍光プローブでは、発光の量子収率および水中での分散安定性が低いという大きな欠点がある。また高輝度近赤外蛍光プローブとして半導体量子ドットや蛍光タンパク等の利用が考えられるが、生体(免疫)毒性の観点からヒトへの臨床応用は困難である

ヒトを対象とした光イメージングにおいて必要とされる蛍光プローブの条件は、まず第 1 に生体毒性がなく、体内で分解され一定時間後には体外に排出されること、第 2 に近赤外領域で高輝度発光すること、第 3 に抗体やリガンドなどの標識により分子プローブの作製が可能なこと、第 4 に安価で大量合成できることである。我々は、これまでに貴金属ナノクラスターを利用することにより、細胞毒性がなく近赤外領域で高輝度発光する蛍光プローブの合成法を見いだしている(図 2、*Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 431-435, 2011)。本研究では、これら貴金属ナノクラスターをもとにヒ

ト乳癌腫瘍の生体イメージング技術の開発をおこなう。

蛍光性貴金属ナノクラスターを用いた生体蛍光イメージング用プローブの開発は、国内外とも研究が緒についたばかりである。これまでに蛍光性貴金属ナノクラスターを癌や疾患の生体イメージング用分子プローブとして応用した例はない。近赤外発光の貴金属ナノクラスターは、毒性の観点から生体イメージング用プローブとしてのポテンシャルが高く、ここ数年の間にプローブ開発が急速に進むものと考えられる。本研究により、近赤外発光貴金属ナノクラスターを生体蛍光イメージング用プローブとして実用化できれば、臨床医学分野での乳癌診断に多大な貢献をもたらすものと期待できる。

2. 研究の目的

「生体の光学窓」と呼ばれる波長 700-900nm における近赤外蛍光イメージングは、比較的表層にある乳癌などの早期発見・診断に有効であると期待されている。現在、医療現場で認可されている近赤外蛍光試薬はインドシアニンググリーン(シアニン系有機色素)のみであるが、発光の量子収率が低い(血中で 1%程度)、生体蛍光イメージング用分子プローブとしては適していない。生体蛍光イメージングを医療診断で実用化するためには、高輝度な近赤外蛍光プローブが必要である。

本研究では、「生体の光学窓」と呼ばれる波長 700-900nm における早期乳癌非侵襲イメージング用近赤外蛍光プローブを開発する。そのための近赤外蛍光材料として、量子ドット、有機系色素(シアニン系、ポルフィリン系などの長い共役結合を有する有機化合物)、カーボンナノチューブ、グラフェンなど考えられるが、ヒトを対象とした生体イメージングにおいては、生体毒性(免疫毒性)、発光輝度、生体中での蛍光の持続性(安定性)の問題などからこれら蛍光材料はプローブとしてヒトに応用することは難しい。本研究では、蛍光造影剤として近赤外発光貴金属ナノクラスターを合成し、乳がん腫瘍、センチネルリンパ節等の生体イメージング法を開発する。

3. 研究の方法

1) 近赤外貴金属ナノクラスターの合成

従来、可視部で発光する蛍光性貴金属（金、銀）ナノクラスターの合成には、デンドリマーなどの人工ポリマーが用いられてきたが、2009年にYingらによって牛アルブミンを用いた新規合成法が報告された（JACS, 131, 888-889, 2009）。我々は、これまでにこの方法をさらに改良発展させ、ヒトアルブミンを用いて近赤外領域（750 nm）で発光する新規蛍光性金ナノクラスターの合成法を見いだしている。また、同様な方法で蛍光性白金ナノクラスターの合成にも成功している（論文投稿準備中）。これらの反応では、金や白金の化合物をヒトアルブミン中で還元して、原子数が数十個程度のナノクラスターが合成される。反応に用いる貴金属化合物とヒトアルブミンのモル比、反応温度、反応時間によってはさらに大きなサイズのナノクラスターの合成が可能である。本研究では、これまでの合成技術をもとに生体イメージングに必要な近赤外発光貴金属ナノクラスター（発光波長は700-900nm）を開発する。

2) 乳癌イメージング分子プローブの開発

生体光イメージングにおいて最も期待されているのが、比較的表層にあるサイズ5mm以下の乳癌の蛍光検出である。本研究では、近赤外発光貴金属ナノクラスターを用いて生体蛍光イメージング用乳癌分子プローブを開発する。分子プローブとして機能させるためには、貴金属ナノクラスター表面に乳癌細胞を特異的に認識するマーカーで修飾する必要がある。ヒト乳癌細胞では、その20-30%にHER2（ヒト上皮成長因受容体）が過剰発現していることが知られており、臨床レベルではHER2がマーカーとして用いられている。本研究では、HER2修飾による乳癌腫瘍イメージング用近赤外蛍光プローブを開発する。

新規蛍光性金ナノクラスターの有効性確認試験としてヒト乳がん腫瘍を播種した実験マウスを用い、その蛍光検出を行う。そのための光造影剤として、金ナノクラスター表面に乳がん細胞を特異的に認識する抗体、生体毒性の少ない表面化合物等を修飾する。

3) 近赤外貴金属ナノクラスターの毒性

ヒトを対象とした生体イメージングのプロ

ーブの特性として、生体毒性がなく一定時間経過後体内で分解されるか腎クリアランスにより体外に排出される必要がある。これまでの予備実験で金ナノクラスター濃度が100 nM以下では細胞毒性がないことは確認済みである。ヒトでの臨床応用を目指すためには広い濃度領域での細胞毒性の試験、マウス等の小動物を使った個体レベルでの毒性試験（体内動態、臓器への集積）をおこなう。

4. 研究成果

1) 近赤外蛍光貴金属ナノクラスターの合成

生体での非侵襲蛍光イメージングをおこなうため、近赤外で蛍光発光する金ナノクラスターの精密合成法の開発をおこなった。従来の蛍光性金ナノクラスターでは、700nm以上の近赤外領域で蛍光発光する例はなかったが、反応に用いる鑄型タンパク質、pH、反応時間などを精密に制御することにより、再現性のある近赤外蛍光性金ナノクラスターの合成法が確立できた。水中での蛍光の量子収率は2-5%であった。

2) 乳癌イメージング分子プローブの開発

近赤外蛍光性金ナノクラスターを用いた乳がん蛍光イメージング用の分子プローブを開発した。分子プローブとして機能させるために、金ナノクラスター表面に乳癌細胞の20-30%に発現しているHER2（ヒト上皮成長因受容体）抗体を結合させた分子プローブの開発に成功した。蛍光プローブの活性は、HER2過剰発現乳がん細胞の蛍光イメージングにより確認した。また蛍光プローブをヒト乳がん移植ヌードマウスに尾静脈より注入し、48d時間後に乳がん腫瘍へのプローブの集積が確認できた。

3) 近赤外貴金属ナノクラスターの毒性

QMTT法を用いて、近赤外蛍光性金ナノクラスターおよび近赤外半導体量子ドット（CdSeTe/CdS）の細胞毒性を比較した。近赤外蛍光性金ナノクラスターの場合、10-100nMの濃度領域で24時間インキュベーション後のCos-7細胞に対する毒性はほとんど見られなかった。一方、CdSeTe/CdS半導体量子ドットの場合では、24時間インキュベーション後、Cos-7細胞の生存率は、10nMで約60%、10nMで約40%であった。近赤外蛍光性金ナノクラスターは半導体量子ドットに比べ極めて細胞毒性の低い蛍光プローブであることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件) すべて査読あり

- 1) Yoshihiro Morishita, Ken-ichi Hironaka, Sang-Woo Lee, Takashi Jin, and Daisuke Ohtsuka, “Reconstructing 3D deformation dynamics for curved epithelial sheet morphogenesis from positional data of sparsely-labelled cells”, *Na. Commun.*, 8, Article number: 15, 2017.
- 2) Makoto Oura, Johtaro Yamamoto, Takashi Jin, and Masataka Kinjo, “Investigation of pH dependent photophysical property of quantum nanocrystals revealed by fluorescence correlation spectroscopy”, *Opt. Express*, 25(2):1435-1443, 2017.
- 3) Yukio Imamura, Sayumi Yamada, Setsuko Tsuboi, Yuko Nakane, Yoshikazu Tsukasaki, Akihito Komatsuzaki, and Takashi Jin, “Near-Infrared Emitting PbS Quantum Dots for in Vivo Fluorescence Imaging of the Thrombotic State in Septic Mouse Brain”, *Molecules*, 21(8), 1080, 2016.
- 4) Takashi Jin, Setsuko Tsuboi, Akihito Komatsuzaki, Yukio Imamura, Yoshinori Murakami, Takao Sakata and Hidehiro Yasuda, “Enhancement of aqueous stability and fluorescence brightness of indocyanine green using small calix[4]arene micelles for near-infrared fluorescence imaging”, *Med. Chem. Commun.*, 7, 623-631, 2016,
- 5) Takashi Jin and Yukio Imamura, “Applications of Highly Bright PbS Quantum Dots to Non-invasive Near-Infrared Fluorescence Imaging in the Second Optical Window”, *ECS J. Solid State Sci. Technol.*, 5, R3138-R3145, 2016.
- 6) Johtaro Yamamoto, Makoto Oura, Taro Yamashita, Dengkuan Liu, Shigehito Miki, Takashi Jin, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Zhen Wang, Hirotaka Terai, and Masataka Kinjo, “Rotational diffusion measurements using polarization- dependent fluorescence correlation spectroscopy based on superconducting nanowire single-photon detector”, *Opt. Lett.*, 23, 32633-42, 2015.
- 7) Tatsuya Ohyanagi, Tomohiro Shima, Yasushi Okada, Yoshikazu Tsukasaki, Akihito Komatsuzaki, Setsuko Tsuboi and Takashi Jin, “Compact and stable SNAP ligand-conjugated quantum dots as a fluorescent probe for single-molecule imaging of dynein motor protein”, *Chem. Commun.*, 51, 14836-14839, 2015.
- 8) Akira Sasaki, Johtaro Yamamoto, Takashi Jin and Masataka Kinjo, “Raster image cross-correlation analysis for spatiotemporal visualization of intracellular degradation activities against exogenous DNAs”, *Sci. Rep.*, 5:14428, 2015.
- 9) Akira Takai, Masahiro Nakano Kenta Saito, Remi Haruno, Tomonobu M. Watanabe, Tatsuya Ohyanagi, Takashi Jin, Yasushi Okada, and Takeharu Nagai, “Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112, 4352-4356, 2015.
- 10) Akira Sasaki, Yoshikazu Tsukasaki, Akihito Komatsuzaki, Takao Sakata, Hidehiro Yasuda and Takashi Jin, “Recombinant protein (EGFP-Protein G) coated PbS quantum dots for dual fluorescence (visible and second-NIR) imaging of breast tumor in vitro and in vivo”, *Nanoscale*, 7, 5115-5119, 2015.
- 11) Akihito Komatsuzaki, Tatsuya Ohyanagi, Yoshikazu Tsukasaki, Yukihiro Miyayama, Masahiro Ueda and Takashi Jin, “Compact Halo-Ligand-Conjugated Quantum Dots for Multicolored Single-Molecule Imaging of Overcrowding GPCR Proteins on Cell

- Membranes”, *Small*, 12, 1396-1401, 2015.
- 12) Y. Tsukasaki, A. Komatsuzaki, Y. Mori, Q. Ma, Y. Yoshioka and Takashi Jin, “A short-wavelength infrared emitting multimodal probe for non-invasive visualization of phagocyte cell migration in living mice”, *Chem. Commun.* 50, 14356-14359, 2014.
 - 13) T. Ichimura, Takashi Jin, H. Fujita, H. Higuchi, T.M. Watanabe, “Nano-scale measurement of biomolecules by optical microscopy and semiconductor nanoparticles”, *Front Physiol.* 2014 Jul 29;5:273. doi: 10.3389/fphys.2014.00273.
 - 14) Y. Tsukasaki, M. Morimatsu, G. Nishimura, T. Sakata, H. Yasuda, A. Komatsuzaki, T.M. Watanabe, Takashi Jin, ” Synthesis and optical properties of emission-tunable PbS/CdS core-shell QDs in vivo fluorescence imaging in the second near-infrared window”, *RSC Adv.*, 4, 41164-41171, 2014.
 - 15) Yurika Saitoh, Nobuo Terada, Nobuhiko Ohno, Akie Hamano, Nobuo Okumura, Takashi Jin, Ikuo Saiki, Shinichi Ohno, “Imaging of thrombosis and microcirculation in mouse lungs of initial melanoma metastasis with in vivo cryotechnique”, *Microvasc Res.*, 91, 73-83, 2014.
 - 16) K. Higashi, Takashi Jin and E. Takahashi “Oxygen sensitive quantum dots for possible nano-scale oxygen imaging in cultured cells”, *Adv. Exp. Med. Biol.* 789, 379-383, 2013.
 - 17) T.M. Watanabe, F. Fujii, Takashi Jin, E. Umemoto, M. Miyasaka, T. Yanagida, “Four-dimensional spatial nanometry of single particles in living cells using polarized quantum rods”, *Biophys. J.* 105, 555-564, 2013.
 - 18) Kohei Tahara, Shiho Fujimoto, Fumihiko Fujii, Yuichi Tozuka, Takashi Jin and Hirofumi Takeuchi, “Quantum Dot-Loaded Liposomes to Evaluate the Behavior of Drug Carriers after Oral Administration”, *Journal of Pharmaceutics*, Article ID 848275, 2013.
 - 19) Y. Nakane, Y. Tsukasaki, S. Takao, H. Yasuda and Takashi Jin, “Aqueous synthesis of glutathione-coated PbS quantum dots with tunable emission for non-invasive fluorescence imaging in the second near-infrared biological window (1000-1400 nm)”, *Chem. Commun.*, 49, 7584-7586, 2013.
- 〔学会発表〕(計4件)
- 1) Takashi Jin
“Applications of Highly Bright PbS Quantum Dots to Non-Invasive Near-Infrared Fluorescence Imaging in the Second Optical Window”, PRiME 2016, Oct2-7, Honolulu (Hawaii)
 - 2) Takashi Jin
“Rare-earth conjugated nanoprobe for dualmodal deep-tissue imaging”, Rare Earths 2016, Hokkaido University (Sapporo), 6/5, 2016.
 - 3) 野村保友、若井 凌、大和 滉、坂田裕太郎、友 亮人、今村行雄、神 隆
「第2近赤外光学窓を利用した生体部イメージング」, 第13回バイオオプティクス研究会, 2016年12月1日(栃木、前橋工科大学)
 - 4) 神 隆
「生体の第2光学窓で利用可能な蛍光プローブとこれによる非侵襲蛍光イメージング」, 第358回蛍光体同学会講演会、2015年6月5日(東京、化学会館ホール)
- 〔図書〕(計5件)
- 1) Takashi Jin, Akira Sasaki, and Yukio Imamura, “Deep imaging in tissues and biomedical materials”, Chap.7, p 203-220, Edited by Lingyan Shi and Robert Alfano, Pan Stanford Publishing, 2017 年
 - 2) 今村行雄、神 隆, 「第2光学窓近赤外蛍光プローブによるマウス脳の非侵襲イメージング生体の第2光学窓におけ

る非侵襲近赤外蛍光イメージング」バイオインダストリー、Vol.34, No.1, p8-18, 2017年

- 3) 神 隆, 「生体の第2光学窓における非侵襲近赤外蛍光イメージング」日本レーザー医学会誌、Vol.36, No.2, p195-200 2015年
- 4) 神 隆, 「近赤外生体蛍光イメージング用量子ドット」, 次世代蛍光体材料の開発、シーエムシー出版、p159-169, 2016年.
- 5) 神 隆, 「量子ドット蛍光プローブ」発光の事典 (基礎からイメージングまで)、朝倉書店, p547-557, 2015年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：カリックスアレーン誘導体
発明者：神 隆
権利者：理化学研究所
種類：特許
番号：特願 2015-063326
出願年月日：平成 27 年度 3 月 25 日
国内外の別： 国内

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.qbic.riken.jp/japanese/research/outline/lab-04.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神 隆 (JIN Takashi)
国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー
研究者番号：80206367

(2) 研究分担者

塚崎克和 (TSUKASAKI Yoshikazu)
国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員
研究者番号：70452381