

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：55401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05354

研究課題名(和文) 癌転移機構解明に向けた近赤外発光・電顕併用白金ナノプローブと生体ナノ計測法の開発

研究課題名(英文) Development of a bimodal near-infrared luminescent/TEM Platinum nanoprobe for in vivo imaging: Toward a better understanding of cancer metastasis

研究代表者

田中 慎一 (Tanaka, Shin-ichi)

呉工業高等専門学校・自然科学系分野・准教授

研究者番号：30455357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療や高精細な医療診断技術の研究を進めるためには、生体内で機能する生体分子の挙動について分子レベルで観察し、評価する必要がある。そこで、本研究では化学的に安定で毒性の少ない白金で合成可能な近赤外発光性白金ナノクラスターの開発とそれらを利用したin vivoイメージングを実施した。合成した白金ナノクラスターはナノサイズでかつ細胞無毒で発光波長：600～800 nm、量子収率：1.0%程度であるだけでなく、電子顕微鏡でも観察できることから、抗体で修飾後、蛍光・電顕両用プローブとして乳癌細胞(SK-BR-3)や乳癌のモデルマウスへ投与し、蛍光観察及びin vivo イメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：Single molecule imaging technique reveals the molecular mechanism in living organisms and is powerful tool to provide for research in the biomedical field of cancer diagnosis and therapy. In this research, I developed the near-infrared emitting platinum nanoclusters, which possess the low cytotoxicity, highly photostability and high brightness, and applied them to single molecule in vivo imaging. The synthesized platinum nanoclusters exhibited the red emission (Em: 630 nm) and near-infrared emission (Em: 760 nm and 820 nm) and possessed about 1% quantum yield. Furthermore, I observed the scanning transmission electron microscope image of Pt nanoclusters to reveal the particle size and molecular structure. After conjugating with HER2 antibody, I labelled human breast cancer cell line (SK-BR-3) and observed the fluorescence on living cell. Finally, I conducted the in vivo imaging after injection of platinum nanoclusters and observed the fluorescence from cancer tissue in mice.

研究分野：生体1分子イメージング

キーワード：白金ナノクラスター 癌転移機構 in vivo イメージング 近赤外発光 蛍光・電顕併用プローブ 医療診断プローブ

### 1. 研究開始当初の背景

癌は日本人の死亡原因の第一位であり、男性では4人に1人、女性では6人に1人がこの病気で亡くなっている。癌の中でも、特に、女性の死亡原因の第一位である乳癌は転移しやすく、早期発見・早期治療を行っても、初期の段階ですでに遠隔転移している場合が多く根治や再発を防ぐことは大変困難である。そのため、乳癌をはじめとする多くの転移性の癌を治療するためには、分子レベルで癌転移のメカニズムを解明し、その知見を診断や治療へ応用することが急務となっている。

癌の転移は次の3つの段階で進行する機構が考えられている。(1)運動能の獲得：血管遠方に存在する癌組織から癌細胞が遊走し血管近傍に移動する。(2)癌細胞の浸潤：血管内浸潤後、血流に乗って全身を移動する。(3)癌の転移：血流中の癌細胞は、移動先の血管壁に接着し、その場でまた新たな癌組織を形成する。その上、癌組織は生体外で再現困難な複雑な構造をしていること、癌細胞をとりまく微小環境の変化やそこから生じる分子シグナル(癌転移活性化因子(PAR1))によって癌の転移が影響を受けることが明らかとなっているため、より詳細に癌転移やPAR1の分子機構を理解するためにはナノメートル精度の*in vivo*イメージング技術が必要不可欠である。

### 2. 研究の目的

癌転移のメカニズムの解明や高精細な医療診断技術を確認するためには生体組織に吸収・散乱されることなく生体の深部からでも観察可能な近赤外領域に蛍光特性を持ち、分子レベルで計測可能な生体分子プローブ及び生体1分子計測技術の構築が必要不可欠である。そこで、本研究では新規の蛍光・電顕分子プローブとしてナノサイズでかつ化学的に安定で毒性の少ない近赤外蛍光性白金ナノクラスターを開発し、それらを利用した実時間でかつナノスケールで*in vivo*イメージング可能な観察技術の構築及び癌転移分子機構の解明を目指す。本計測技術を構築することで、いまだに正確な理解が得られていない癌転移の分子機構だけでなく、多くの生命現象について可視化でき、癌診断・治療や再生医療などの研究を飛躍的に発展できると期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 近赤外蛍光性白金ナノクラスターの開発及びその光学特性評価

蛍光性白金ナノクラスターの合成はPAMAM dendrimerを鋳型分子として用いて実施した。サイズが1ナノメートル以下である白金ナノクラスターの蛍光特性は量子サイズ効果によって、白金ナノクラスターのサイズ(構成原子数)に依存する。そこで、本

研究では発光波長を制御して白金ナノクラスターを合成するために、鋳型分子(PAMAM dendrimer)のサイズを変えて合成を実施し、鋳型分子の大きさと合成される白金ナノクラスターのサイズ(構成原子数)や発光波長との相関性についても評価した。

白金ナノクラスターの合成ではまずPAMAM dendrimerと白金イオンを混合し、白金イオンがdendrimerを酸化せずdendrimer内に取り込まれるように低温下で1週間程度反応させた。続いて、還元剤(フルクトース)を白金イオンに対して100倍等量加え80~90°Cで2週間程度反応させた。白金ナノクラスターの合成後、超遠心分離機及び近赤外蛍光検出器を備えた高速液体クロマトグラフ(HPLC)を使用して不純物を取り除き白金ナノクラスターの単離・精製を行った。次に、3次元蛍光法と絶対量子収率測定法を用いて、白金ナノクラスターの光学特性(励起・発光波長と量子収率Quantum yield(QY))について評価した。白金ナノクラスターについて原子レベルでの空間分解能を持つ走査透過型電子顕微鏡を用いて観察し、乳癌細胞であるSK-BR-3を白金ナノクラスターの濃度が1~100 nMになるように調整した培地で12から48時間培養し自動セルカウンターを使用して細胞生存率(毒性)を評価した。

#### (2) 白金ナノクラスターの生体分子プローブへの応用と生体計測技術の開発

PAMAM Dendrimerは非常にかさ高い分子であるため生体分子の動的挙動を妨げることが懸念される。そこで、白金元素がアミノ基に対して高い親和性を持っていることを利用して、アミノ基を有する低分子を使用してリガンド交換を行い、PAMAM Dendrimer内から白金ナノクラスターを取り出した。続いて、これらアミン化合物のカルボキシル基とアダプタータンパク質ProteinAのアミノ基との間でカップリング剤(4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride n-Hydrate(DMT-MM))を用いて反応を行った後、乳癌細胞(SK-BR-3)に特異的に結合するHerceptin(HER2)抗体で修飾して蛍光プローブを調製した。

#### (3) 近赤外蛍光性白金ナノクラスターを利用した*in vivo*イメージング技術の開発及び癌転移機構の解明

白金ナノクラスター蛍光プローブを乳癌細胞(SK-BR-3)へ投与し、大阪大学生命機能研究科の共用設備である共焦点顕微鏡(FLUOVIEW FV1000, OLYMPUS)を利用して蛍光観察を実施した。観察後、電子顕微鏡観察を行うため細胞試料を樹脂包埋してから100 nm厚の試料切片を調製し、細胞の形状を観察しやすいように染色剤で染色した。電子顕微鏡観察は大阪大学 超高压電子

顕微鏡センターと大阪大学 医学部にそれぞれ設置されている電子顕微鏡を利用して遂行した。

続いて、体毛を持たないヘアレスマウスの皮下に白金ナノクラスターを投与し *in vivo* イメージングを行い、生体分子プローブとしての有用性について評価した。次に、免疫不全マウスへ乳癌細胞を移植し、乳癌のモデルマウスを作製した。作製したモデルマウスの尾静脈から白金ナノクラスター蛍光プローブを注入し、癌組織を蛍光標識した。白金ナノクラスター投与してから、12、24、48時間後に生体イメージングを実施した。*in vivo* イメージングについては、理化学研究所神研究室に設置されている *in vivo* イメージングシステム (In-vivo MS FX Pro, Bruker) を利用した。さらに、*in vivo* イメージング後、モデルマウスから癌組織や心臓、肺、肝臓、腎臓などの主要な臓器を摘出し、それらの組織の蛍光観察を行うだけでなく、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)も実施することで、癌組織への白金ナノクラスターの集積及び主要組織への非特異的な集積について評価した。

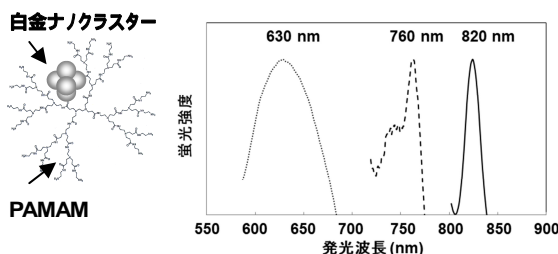


図1 PAMAM Dendrimer 中に合成した可視・近赤外蛍光性白金ナノクラスターとその蛍光スペクトル

#### 4. 研究成果

白金ナノクラスターの合成はサイズの異なる3種類のPAMAM Dendrimerを用いて実施した。合成された白金ナノクラスターの発光波長はPAMAM Dendrimerのサイズが大きくなるにつれて630 nm、760 nm、820 nmと長波長側へ移動しており、量子サイズ効果によってPAMAM Dendrimerのサイズに依存して粒径の異なる(大きい)ナノクラスターが合成されていることが確認された。(図1) また、合成した白金ナノクラスターの量子収率は1.0%程度で、一般的な近赤外蛍光性分子プローブと同程度であった。走査透過型電子顕微鏡観察では、カーボングリッド上に分散していた白金ナノクラスターをいくつか観察することができた。さらに、細胞毒性試験を実施したところ蛍光観察及び*in vivo* イメージングに必要な濃度条件(1~100 nM)において80%以上の生存率が確認されたことから、白金ナノクラスターは細胞毒性が少なく、白金ナノクラスターを利用した生細胞観察や

生体観察は可能であると期待される。(図2)

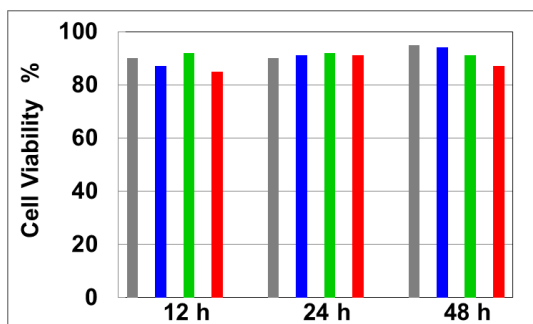


図2 蛍光性白金ナノクラスターの細胞毒性試験  
白金クラスター濃度 0 nM、1 nM、10 nM、100 nM

DMT-MMを用いて直接HER2抗体と白金ナノクラスターを反応させたところ、凝集体を形成してしまい、生理活性を維持した分子プローブの調整を行うことができなかった。そこで、抗体の活性を維持した白金ナノクラスター分子プローブを調整するために、アダプタータンパク質としてProteinAを使用した。リガンド交換後、DMT-MMを用いて白金ナノクラスターとProteinAをカップリングさせ、電気泳動によって白金ナノクラスターとProteinAとの結合について評価した。泳動後、得られたバンドについて蛍光観察(630 nm)とCBB(Coomassie Brilliant Blue)染色で観察したところ、白金ナノクラスター由来の蛍光バンドとタンパク質(ProteinA)のバンドが重なっていたため、ProteinAは白金ナノクラスターで標識できていることが確認された。次に、HER2抗体とProteinA-白金ナノクラスターと反応させ、分子プローブを調整した。その結果、少量の凝集体が形成されたが、HER2抗体で修飾された分子プローブを調整することができた。

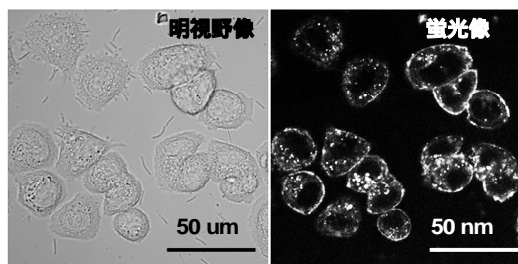


図3 蛍光性白金ナノクラスターでHER2受容体を標識した乳癌細胞の蛍光顕微鏡像

白金ナノクラスター蛍光プローブを乳癌細胞(SK-BR-3)へ投与したところ、細胞表面から白金ナノクラスターからの赤色蛍光(発光波長:630 nm)が観察され、HER2の特異的な標識及び、白金ナノクラスターの癌診断分子プローブとしての有用性について実証できた。(図3) 蛍光標識した細胞試料を樹脂包埋し、電顕試料を調整した後、透過

型電子顕微鏡観察を実施したところ、細胞表面において白金ナノクラスターによるコントラストを確認できなかった。今後、より感度の高い高角度散乱暗視野走査透過型電子顕微鏡(HAADF-STEM)を用いることを検討し、白金ナノクラスターの電子顕微鏡観察を遂行していきたい。

合成した白金ナノクラスターを体毛を持たないヘアレスマウスの皮下に投与し *in vivo* イメージングを行ったところ、マウスの皮下 3 mm から 600 ~ 700 nm の蛍光が観察された。

最後に作製した乳癌のモデルマウスへ白金ナノクラスター蛍光プローブを投与し、12、24、48時間後に蛍光観察を実施したところ、最初は肝臓に集積していた白金ナノクラスターが次第に癌腫瘍へ集積していく様子が観察された。蛍光観察後、主要な臓器を摘出し、臓器のみで蛍光観察を実施したところ、肝臓と癌腫瘍から白金ナノクラスターからの蛍光が観察され、それ以外の臓器への非特異的な集積はほとんど観察されなかった。各臓器中に集積した白金元素の量(濃度)についてICP-MSを測定し評価したところ、癌組織と肝臓から白金元素が検出されたが、癌組織に比べて肝臓の方が2~3倍の濃度で白金が含まれていた。これらの結果から、本研究で開発した白金ナノクラスター蛍光プローブは癌組織に対する特異性が認められたが、今後の課題として肝臓への非特異的な集積を少なくするため白金ナノクラスター分子プローブの調整条件や蛍光観察条件について検討していく。

#### 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 2 件)(査読有)

Terutake Hayashi, Yuki Ishizaki, Masaki Michihata, Yasuhiro Takaya, Shin-Ichi Tanaka “Nanoparticle Sizing Method Based on Fluorescence Anisotropy Analysis” *Measurement* **59** (2015) 382-388  
<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2014.08.048>

Terutake Hayashi, Yuki Ishizaki, Masaki Michihata, Yasuhiro Takaya, Shin-ichi Tanaka “Study on Nanoparticle Sizing Using Fluorescent Polarization Method with DNA Fluorescent Probe” *International Journal of Automation Technology* **9** (2015) pp. 534-540  
doi: 10.20965/ijat.2015.p0534

[学会発表](計 4 件)

#### 国際会議

Shin-ichi Tanaka, Hirohiko Niioka

“Development of Near-Infrared-Emitting Platinum Nanoclusters aimed at *in vivo* Imaging and Biomedical Application” the International Nanophotonics Symposium (INP-2017), August, 2017, Kawana Hotel, Ito, Japan

Shin-Ichi Tanaka, “Synthesis of biocompatible fluorescent metal nanoclusters and biomedical imaging” Pacificchem2015, December 2015, Hawaii Convention Center, Hawaii, USA

#### 国内会議(招待講演)

田中慎一 「生体適合性金属ナノ材料の開発及びその医療応用に関する研究」第17回OMIC事業推進セミナー 2018年3月 岡山大学鹿田キャンパス (岡山県 岡山市)

田中慎一 「生体適合性金属ナノ材料の開発及びその医療応用に関する研究」新技術説明会(ライフサイエンス分野) 2018年1月 JST東京本部別館ホール (東京都)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称:白金ナノ粒子含有組成物、白金ナノ粒子、及びそれらの製造方法

発明者:田中慎一

権利者:独立行政法人国立高等専門学校機構  
種類:特許

番号:特開2017-2336

出願年月日:2015年6月4日

国内外の別:国内

○取得状況(計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 慎一 (TANAKA, Shin-ichi)

独立行政法人国立高等専門学校機構 呉工業高等専門学校・自然科学系分野・准教授

研究者番号:30455357

(3)連携研究者

神 隆 (JIN, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号:80206367

新岡 宏彦 (NIIOKA, Hirohiko)

大阪大学・データビリティフロンティア機構・特任准教授

研究者番号:70552074