

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560220

研究課題名(和文) 長残光蛍光体ナノ粒子を用いた癌細胞の無励起光型バイオイメージング

研究課題名(英文) Persistent luminescence nanoparticles applicable for in vivo imaging of cancer

研究代表者

西 真弓(Nishi, Mayumi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40295639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：医療に応用できる革新的プローブの長残光蛍光体ナノ粒子の開発に取り組み、このナノ粒子を用いて癌細胞の無励起光型バイオイメージングを目指した。ヒト骨肉腫細胞(HOS)をスキッドマウスの背部皮下に注入移植し、抗体修飾した蛍光体ナノ粒子を蓄光させたものを尾静注し、IVIS Imaging Systemを用いてin vivoイメージングを行うことに成功した。

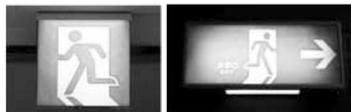
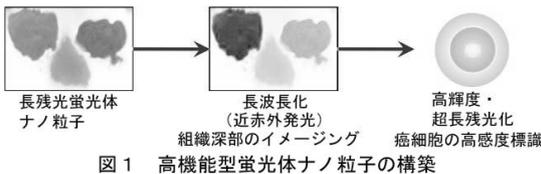
研究成果の概要(英文)：For developing the innovative probe of persistent luminescence nanoparticles applicable to medicine, we aimed at bioimaging without irradiation to visualize tumor cells in living animals. After transplanting human osteosarcoma (HOS) into subcutaneous of SCID mouse, antibody against HOS labeled with photactivated persistent luminescence nanoparticles was intravenously injected to this SCID mouse. We successfully performed in vivo imaging of HOS by using photocounting system, IVIS Imaging System.

研究分野：神経解剖学

キーワード：長残光蛍光ナノ粒子 in vivo イメージング 担癌マウス 無侵襲 低毒性

## 1. 研究開始当初の背景

ライフサイエンス分野における光を用いたイメージング技術の発達は著しい。それは、カメラやレーザーに代表される光学系技術と GFP に代表される機能分子に特異的なプローブの作製技術が両輪となって発達してきたことによる。このように著しい発展を遂げてきた光イメージング技術は、現在医療に応用されつつあるが、臨床に使えるプローブが少ないこと、組織深部の観察が難しいことなどの理由により、その技術を十分に活用できていない。しかしながら、医療の現場においては、生理学的・生化学的機能とその病態の検出のため、分子レベルから個体レベルまでの機能を非侵襲的にリアルタイムで計測する方法の確立が渴望されている。そこで応募者らは、医療に応用できる革新的プローブの開発に取り組んだ。近紫外～可視光を数分間照射すると数時間以上緑色などの可視光を発し続ける特異な光物性を示す物質であり、夜間安全表示や時計の文字盤などに広く使われている長残光蛍光体ナノ粒子を用いた無励起光型バイオイメージングを開発する着想に至った (図 1, 2)。



## 2. 研究の目的

医療に応用できる革新的プローブの長残光蛍光体ナノ粒子の開発に取り組み、このナノ粒子を用いて癌細胞の無励起光型バイオイメージングを目指す。研究の手順としては、まず遊星ボールミルで緑色長残光蛍光体をナノ粒子化し、シランカップリング試薬により表面を修飾した後、ナノ粒子表面のアミノ基を、癌細胞に特異的に結合する抗体で修飾する。さらに、臨床応用に不可欠な深部イメージングを目指し、より長波長の赤色～近赤外光発光体を開発する。そして癌特異抗体で標識した長残光蛍光体ナノ粒子を数分励起した後、担癌マウスに尾静注し、癌細胞の無侵襲かつ超低撓乱 *in vivo* イメージングを行うことを目的とする。また、近赤外励起発熱性を有する長残光蛍光体ナノ粒子の開発にも取り組み、蛍光体の発熱機能を高め、癌治療も

目指す。

## 3. 研究の方法

### <1>長残光蛍光体のナノ粒子化

遊星ボールミルを用いて独自に作製した緑色、赤色および近赤外発光を示す各長残光蛍光体をナノ粒子化し、シランカップリング剤でナノ粒子表面を化学修飾した。

### <2>長残光蛍光体ナノ粒子の物性評価: 上記

<1>で得られる長残光蛍光体ナノ粒子の毒性について、*in vitro* および *in vivo* の両側面から比較検討した。まず、MTT アッセイを用いた *in vitro* 毒性試験を行った。次に、マウスに長残光蛍光体あるいは量子ドット単体を尾静注により投与する。種々の投与量を用い、投与後の体重減少を経時的に観察し、投与後、1週間、1ヶ月、6ヶ月において肝臓等種々の臓器を摘出し、パラフィン切片を作製して HE 染色を行い、各臓器の組織を顕微鏡観察し、投与した分子による臓器の障害等を比較検討した。

<3>蛍光体ナノ粒子による担癌マウスイメージング: ヒト骨肉腫細胞 (Human Osteosarcoma; HOS) の細胞を用いて担癌マウスの作製を行った。

#### i) HOS の細胞培養および細胞シートの作製:

ヒト骨肉腫細胞 (HOS) で、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase; ALP) の発現が異なる 2 種類 (ALP high/ALP low) の細胞株を、T75 フラスコを使用して初期培養を行った。本実験における細胞培養は、Earle's minimal essential medium (MEM) に、15%牛胎児血清と抗生剤を加えたものを標準培養液として行った。2週間後、0.25% トリプシン/EDTA で処理後、HOS を細胞浮遊液として採取し、 $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> の細胞密度で 10cm 径培養皿に播種し、標準培養液に 10nM デキサメタゾン、82  $\mu$ g/ml アスコルビン酸を添加し 2 次培養を行った。2週間後コンフルエントに達したことを確認し、細胞シートとして採取した。長残光蛍光体ナノ粒子に修飾する骨型 ALP 抗体は、作製した 2 種類の細胞シートにおける ALP の免疫染色の染色性に差がある (ALP<sup>high</sup> で濃く染色された) ことをあらかじめ確認し、蛍光体の抗体修飾に用いた。

#### ii) 担癌マウスの *in vivo* イメージング:

採取した 2 種類の HOS 細胞シート (ALP high 一枚および ALP low 一枚/一匹) を、16G 注射針を使用して、スキッドマウス (C. B-17/lcr-scld/scldJcl) の背部皮下に注入移植した。HOS 細胞シート移植から 4 週間後

に抗体修飾した蛍光体ナノ粒子を 405nm のレーザー光で照射して蓄光させた後、尾静注し、京都大学 RI センターに設置の IVIS Imaging System を用いて in vivo イメージングによる評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### <1>長残光蛍光体のナノ粒子化

遠心沈降法により粒子径が約 50nm~300 nm のものを一旦粗分別した後、回転数の違いによりナノ粒子サイズ毎に分画した。また、液層合成法によるナノ粒子の直接合成プロセスを新たに構築することができた。

##### <2>長残光蛍光体ナノ粒子の物性評価

\* MTT アッセイを用いた in vitro 毒性試験を行ったところ、対照群に比べ有意な毒性は認めなかった。

\* In vivo の毒性に関して、肝臓において対照群に比して若干マクロファージの増加が認められたが、有意な組織構築の損傷は認めなかった(図 3)。

また、体重減少についても有意差を認めず、6ヶ月までにおける生存率にも有意差はなかった。

以上より、長残光蛍光体ナノ粒子に有意な毒性はないと判断された。

<3>蛍光体ナノ粒子による担癌マウスイメージング IVIS Imaging System を用いて in vivo イメージングにより、経時的に腫瘍のサイズを評価した結果、HOS 移植の骨肉腫において ALPhigh 群で有意に高い長残光蛍光体ナノ粒子の集積を認めた(図 4)。

図 3 肝臓 Liver

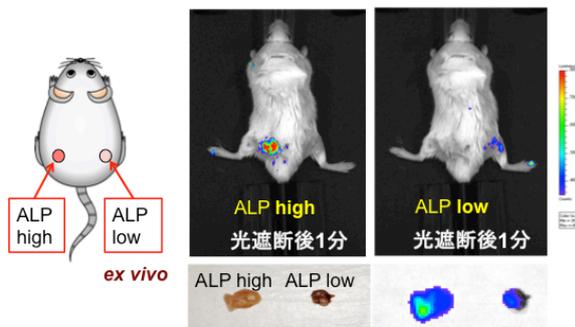
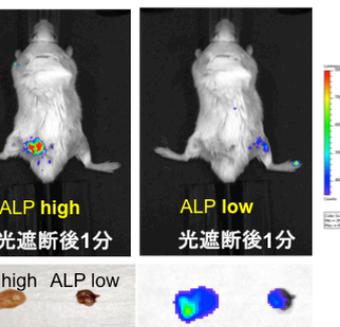


図 4 ナノ粒子の腫瘍への集積確認  
A. 肝臓の影響を全く受けない部位から腫瘍を検出。ALPの発現量に対応した発光強度の違いを確認。

#### 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 9 件)

① F. Ishiwari, H. Hasebe, S. Matsumura, F. Hajjaj, N. Horii-Hayashi, M. Nishi, T. Someya, T. Fukushima. Bioinspired Design of a Polymer Gel Sensor for the Realization of Extracellular Ca<sup>2+</sup> Imaging. **Scientific Report** 6: 24275, 2016. doi: 10.1038/srep24275.

② 堀井謹子、笹川誉世、西真弓. マウス脳に新たに同定した前視床下部脳弓周囲野 PeFAH と情動神経回路の関わり. **BIO Clinica** 31(3):76-81, 2016.

③ Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W, Nishi M\*. Developmental and structural variety of the chondroitin sulfate proteoglycans-contained extracellular matrix in the mouse brain. **Neural plasticity** 2015:256389. doi: 10.1155/2015/256389. Epub 2015 Nov 16.

④ Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Nishi M\*. A new area of the mouse anterior hypothalamus involved in septohypothalamic circuit. **Interdisciplinary Information Sciences, Interdisciplinary Information Science** 21: 243-251, 2015.

⑤ Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Hashimoto T, Kaneko T, Takeuchi K, Nishi M\*. A newly identified mouse hypothalamic area having bidirectional neural connections with the lateral septum: the perifornical area of the anterior hypothalamus rich in chondroitin sulfate proteoglycans. **Eur J Neurosci** 42: 2322-34, 2015.

⑥ Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on brain: implications from maternal separation models in rodents. **Frontiers in Neuroscience** doi: 10.3389/fnins.2014.00166, 2014.

⑦ Nishi M. Imaging of corticosteroid receptors in live cells. **Methods Mol Biol** 1204: 205-218, doi: 10.1007/978-1-4939-1346-6\_18, 2014.

⑧ Matsusue M, Horii-Hayashi N, Kirita T, Nishi M. Distribution of corticosteroid receptors in mature oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors of the adult mouse brain. **J Histochem Cytochem** 62: 211-226, 2014. DOI10.1369/0022155413517700

⑨ Shinohara Y, Kumai T, Higashiyama I, Tanaka Y, Takakura Y, Nishi M, Azuma C, Minami T, Tohno Y. Differences in elements between intact and disrupted human ligamentum caput femoris. **Biol Trace Elem Res** 160: 161-168, 2014. DOI10.1007/s12011-014-0036-2

[学会発表] (計 22 件)

① 堀井謹子、笹川誉世、橋本隆、西真弓: マウス脳に新たに発見・同定した視床下部領域について. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016.3.28-30、福島

② 東超、大石高生、東野義之、東野勢津子、南武志、西真弓: サル輪状軟骨の元素蓄積の

特徴 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016.3.28-30、福島

③ Mayumi Nishi, Takayo Sasagawa, Noriko Horii-Hayashi. Effects of early life stress on the brain. 第 89 回日本薬理学会年会 シンポジウム「幼少期ストレス負荷によるストレス脆弱性の形成と情動・高次機能障害」3.9-11. 2016、横浜

④ 笹川 誉世、堀井 謹子、奥田 哲教、西真弓：幼少期ストレスによる嗜好性食餌に対する摂食・欲求行動への影響について。第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2015.10.3-4、大阪

⑤ 笹川 誉世、堀井 謹子、奥田 哲教、西真弓：幼少期ストレスによる嗜好性食餌に対する摂食・欲求行動への影響について。第 42 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会、2015.9.18-19、仙台

⑥ Mayumi Nishi, Noriko Horii-Hayashi, Takayo Sasagawa. Effects of early life adverse experiences on the brain. 第 42 回日本神経内分泌学会企画国際シンポジウム「HPA 系をめぐる最新の話」9.18. 2015、仙台

⑦ Mayumi Nishi, Noriko Horii-Hayashi, Takayo Sasagawa. A new hypothalamic area enriched with perineuronal nets having bidirectional connections between the lateral septum. Parvo-and Magnocellular Symposium in Sendai—Creating a New Stream of Neuroendocrinology, Sendai, 9.17. 2015

⑧ Takayo Sasagawa, Noriko Horii, Mayumi Nishi: Effects of early life stress on feeding behavior for palatable foods. 第 38 回日本神経科学大会、2015.7.28-31、神戸

⑨ Noriko Horii, Takayo Sasagawa, Takashi Hashimoto, Mayumi Nishi: A newly identified hypothalamic area enriched with perineuronal net-positive neurons. 第 38 回日本神経科学大会、2015.7.28-31、神戸

⑩ Noriko Horii-Hayashi, Takayo Sasagawa, Takashi Hashimoto, Mayumi Nishi: A Newly-identified hypothalamic area enriched with perineuronal nets. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会合同大会、2015.3.21-23、神戸

⑪ Akinori Okuda, Noriko Horii, Takayo Sasagawa, Yasuhito Tanaka, Mayumi Nishi: Axon regeneration and motor function improvement with scaffold-free BMSC sheet transplantation to completely transected spinal cord rat. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会合同大会、2015.3.21-23、神戸

⑫ Mayumi Nishi, Noriko Horii-Hayashi, Takayo Sasagawa. Effects of early life adverse experiences on the brain: Implications from maternal separation models in rodents. 第 120 回日本解剖学会総会・第 92 回日本生理学会合同大会シンポジウム「The effect of perinatal

stress on brain function」神戸. 3.21-23. 2015

⑬ 西真弓. 「視床下部領域に新たに見いだしたペリニューロナルネット陽性神経細胞を有する領域」埼玉大学・理学部・大学院セミナー、埼玉. 11.12.2014.

⑭ 西真弓. 「幼少期ストレスが脳の可塑性におよぼす影響：母子分離モデルを用いた解析」つくばブレインサイエンスセミナー、筑波. 11.11.2014.

⑮ 清水隆昌、赤羽学、多喜正泰、田部勢津久、石田昭人、城戸顕、田中康仁、西真弓. 第 46 回日本臨床分子形態学会・学術集会、シンポジウム「長残光蛍光体を用いた無励起光新規イメージング技術の開発」、東京. 10.18. 2014.

⑯ 清水隆昌、赤羽学、多喜正泰、田部勢津久、石田昭人、城戸顕、田中康仁、西真弓. 第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、ワークショップ「Bioimaging histochemistry」座長 長残光蛍光体ナノ粒子を用いた無励起光バイオイメージング松本、9.27-28、2014.

⑰ Takayo Sasagawa, Noriko Horii-Hayashi, Takashi Hashimoto, Mayumi Nishi : Effects of early life stress on palatable feeding behavior. 第 37 回日本神経科学大会、2014.9.11-13、横浜

⑱ Takashi Hashimoto, Noriko Horii, Takayo Sasagawa, Mayumi Nishi : The effect of maternal separation in the nucleus of accumbens and the bed nucleus of stria terminalis of the adult

mouse: gene profiles after early life stress. 第 37 回日本神経科学大会、2014.9.11-13、横浜

⑲ 西真弓：長残光蛍光体ナノ粒子を用いた無励起光バイオイメージングイノベーション・ジャパン 2014 「知の融合 ～広がる未来～」2014.9.11-12、東京

⑳ Mayumi Nishi. A new hypothalamic area enriched with perineuronal nets having bidirectional connections between the lateral septum *abs#83*. 8<sup>th</sup> International Congress of Neuroendocrinology 2014. 2014. 8. 17-20, Sydney, Australia

㉑ 西真弓. 「幼少期のストレスが脳の可塑性におよぼす影響について：母子分離モデルによる解析」長崎大学大学院セミナー、長崎. 7.2.2014.

㉒ Mayumi Nishi. The 7<sup>th</sup> International Aldosterone Forum in Japan 「Hot Topic」 Dynamics of corticosteroid hormone receptors: implications from live cell imaging. Yokohama. 5. 31. 2014.

〔図書〕 (計 1 件)

西真弓. The Big Picture Gross Anatomy; Ed. David Morton, Kurt Albertine, Bo Foreman, McGraw Hill books 2014. 総ページ数：484 翻訳 (分担執筆：Section2: Torax 胸部・胸郭)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~1ana/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 真弓 (NISHI, Mayumi)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40295639

(2) 研究分担者

堀井 謹子 (HORII, Noriko)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80433332

(3) 連携研究者

多喜 正泰 (TAKI, Masayasu)  
名古屋大学・理学部・特任准教授  
研究者番号：70378850