

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21396

研究課題名(和文) 新奇な光刺激応答性高分子ゲル基板による細胞挙動の解析

研究課題名(英文) Development of Upconversion Photoactivatable Polymer Gel Substrate

研究代表者

上村 真生 (Kamimura, Masao)

東京理科大学・基礎工学部材料工学科・助教

研究者番号：80706888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近赤外光励起によって可視発光を示すアップコンバージョンナノ粒子を合成し、このナノ粒子が発する可視発光を利用した高分子の光重合や光増感剤の活性化を行うことで、近赤外光照射によって弾性が制御可能な細胞培養基板の作製や、生体深部の光線力学療法が可能になることを見出した。今後、高分子ゲル構造中への複合化や、in vivo実験を進めることで、作製した材料の実用化が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the synthesis of near-infrared to visible upconversion nanoparticles and its application for near-infrared light induced photopolymerization and activation of photosensitizer. The upconversion light induced photopolymerization was successfully performed. Furthermore, the photosensitizer immobilized upconversion nanoparticles also generated reactive oxygen species under near-infrared excitation. These obtained nanoparticles can be applied for near-infrared stimuli responsive materials.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：生体材料 アップコンバージョン 光重合 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

細胞運動は癌の転移などにも関与しており、細胞骨格と基質との間における力や、細胞が移動する際に基質にかかる力などの重要性が注目を集めている。そのため、その制御機構を解明するために弾性を自在に制御できる細胞培養基材の開発が期待されている。弾性を制御可能な材料として、紫外(UV)光照射で架橋構造を切断することで弾性率が低下する光分解性ゲルや、UV光照射によってポリマー重合を行うことで弾性を高くすることが可能な基板材料などが報告されているが、基板上で細胞を培養した状態で光照射により弾性を変化させる場合、長時間の連続UV光照射が必要とされ、細胞に重大なダメージ(光毒性)を与えてしまうため、細胞の挙動を経時的に観察することは極めて難しい。

一方で近年、赤色光(600nm)以上の波長域の光は、UV光(<400nm)と比べて低エネルギーであるため、光照射が細胞培養にほとんど影響を与えないことがよく知られているため、長波長励起光を利用した弾性制御材料の開発が期待されている。代表者らはこれまでに、多段階励起過程により、励起波長よりも短い波長の発光が得られるアップコンバージョン(UC)発光(UC)・希土類含有セラミックスナノ粒子(UCNP)を用いて、生体内外の目的分子・部位を観察する蛍光バイオイメージングの研究を行ってきた。UCNPは励起光源に赤色光以上の長波長域の光を用いるため、UV光励起が必要な他の発光材料と比較して細胞へのダメージを大幅に軽減することができる。そのため、UCNPを含有した基板材料を開発することができれば、細胞にダメージを与えることなく、細胞培養基板の弾性を制御できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではまず、近赤外(NIR)光励起・可視発光が可能なUCNPを合成し、このUCNPが発する可視発光を利用して、UCNP表面上でポリマーの重合を行うことを目指した。NIR光励起でナノ粒子表面上におけるポリマー重合を進めることができれば、NIR光照射下で弾性が増大する基板への応用が期待できる。

さらにこの他に、近赤外(NIR)光励起下でUV発光が可能なUCNPを合成し、UV光にตอบสนองして切断可能なリンカーをゲルネットワーク構造中に有し、赤色光照射によって架橋部を切断することで、任意の弾性に制御可能な赤色光刺激応答性ゲルを開発することも目指した。これらの光刺激応答性基板を用いた細胞培養実験によって、足場の弾性が細胞に与える影響を調べることで、基材の弾性と細胞運動の挙動との関係を明らかにする。これにより、これまでに観察することが困難であった弾性が変化し続ける基板上における細胞の挙動を明らかにできる可能性がある。

これは、足場の弾性が細胞運動の挙動に与える影響を直接的に評価する手段として、新規性が高く、学術的に極めて重要である。また将来的には、癌細胞の浸潤・転移といった機構の調査や、薬剤効能の評価への応用といった展開も期待できる。このように本研究内容は、細胞運動の挙動の解明を支援する新たな足場材料として、生命科学の発展や生体材料の開拓をもたらすことが期待される。

また、UCNPを使った研究の応用展開として、ナノ粒子表面に可視(赤色)光にตอบสนองする光増感剤を導入し、NIR光から可視光へのアップコンバージョン発光を利用した光線力学療法(フォトダイナミックセラピー: PDT)への展開も検討した。光照射下において光増感剤が発生する一重項酸素($^1\text{O}_2$)を用いてがん治療を行うPDTは、臨床においては光源として主に可視光を用いる場合が一般的であるが、可視光は組織透過性が低く、体内深部の腫瘍組織の治療が困難であることが問題となっている。そこで近年、組織透過性の高い近赤外光を励起光とするUCNPのPDTへの応用が注目されている。またUCNPは、近赤外光励起時に可視UC発光を示すと同時に、波長1000nmを超える近赤外(OTN-NIR)蛍光を示すため、体内深部の蛍光イメージングを同時に行うことも期待できる。そこで本研究では、近赤外光(980nm)励起によりと赤色(660nm)の可視UC発光およびOTN-NIR発光(1550nm)を示すUCNPである Yb^{3+} 、 Er^{3+} 共ドープ NaYF_4 ナノ粒子の表面に、赤色光にตอบสนองして $^1\text{O}_2$ を発生する光増感剤であるChlorin e6(Ce6)を固定し、さらに生理条件下での分散安定性を向上させるためにpoly(ethylene glycol)(PEG)を修飾することで、体内深部におけるPDTと蛍光イメージングを同時に行うためのセラノスティクスナノ粒子を作製し、その機能評価を行った。

3. 研究の方法

本研究ではまず、熱分解法を用いて、 Yb^{3+} 、 Er^{3+} 含有 NaYF_4 ナノ粒子を合成した。次にこの NaYF_4 ナノ粒子表面において、UC発光を利用した光重合によってポリマー重合を行うことを試みた。作製した NaYF_4 ナノ粒子(粒径60nm)とスチレン、光重合開始剤をTHF中で混合し、系全体にNIR励起光(980nm)を照射(12h)することでUC光重合をおこなった。その後、試料を遠心洗浄(20000G, 10min, 3回)し、フーリエ変換赤外分光法(FT-IR)測定及びTEM観察により試料の表面分析をおこなった。

また、水熱合成法を用いて、ナノ粒子表面にポリエチレンイミン(PEI)が配位した Yb^{3+} 、 Er^{3+} 共ドープ(PEI-) NaYF_4 ナノ粒子を合成し、UCNP表面への光増感剤の導入と、UC発光を利用したPDTへの応用展開を検討した。合成したPEI- NaYF_4 ナノ粒子の表面に、アミド結合によって光増感剤であるクロリンe6(Ce6)を固定した。さらに、PEGの側鎖にポリアク

リル酸のブロック構造を有するポリマー(PEG-b-PAAc)を静電的に吸着させることで、PEG と Ce6 を共固定したナノ粒子(PEG/Ce6-UCNP)を作製した。作製したナノ粒子を用いた PDT の効果は、WST 法によって評価した。

4. 研究成果

熱分解法を用いて NaYF₄ ナノ粒子を合成したところ、粒径が約 40 nm のナノ粒子を得ることに成功した(図 1)。このナノ粒子は、NIR 励起光(980 nm)を照射すると、550 nm, 660 nm の可視 UC 発光および 1550 nm の OTN-NIR 蛍光を示した。次に、このナノ粒子の表面に UC 発光を利用した光重合によって、ポリスチレン(PSt)層を形成することを試みた。FT-IR 測定の結果より、NIR 励起光照射によって PSt のベンゼン由来である吸収が増大していることがわかった。さらに光重合後の TEM 観察結果より、ナノ粒子表面上に厚さ 7 nm 程度のシェル層が形成されていることが明らかとなった(図 2)。モノマーを添加しなかった試料ではシェル層形成は見られなかったことから、UC 光重合によって、NaYF₄ NPs 表面に PSt シェル層が形成できたことが示唆された。

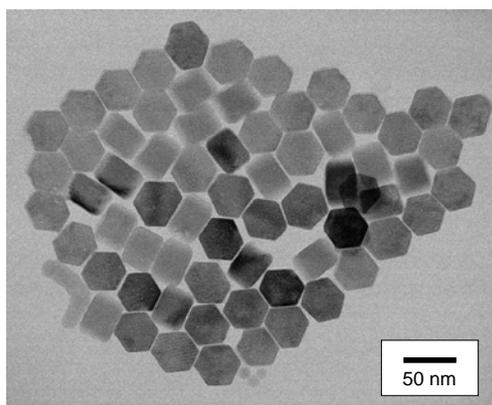


図 1. NaYF₄ ナノ粒子の TEM 観察像。

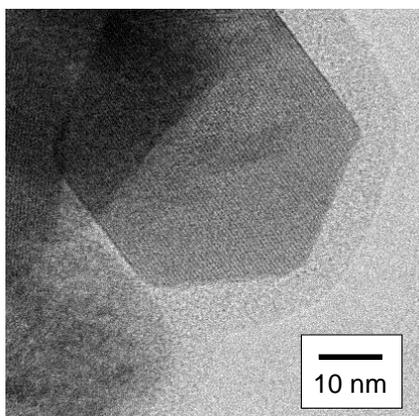


図 2. UC 光重合によって形成された NaYF₄ ナノ粒子表面上の PSt 層。

これらの結果から、UC 発光を利用することでナノ粒子表面においてポリマー重合を行うことができると明らかになった。今後、様々なモノマーを用いた重合を検討することで、NIR 光照射下におけるポリマー重合を用いた細胞培養基板の弾性制御への応用が期待される。

さらに、水熱合成法で作製した平均粒径 100 nm の PEI-NaYF₄ を用いて、UC 発光を利用した PDT への応用を検討した。PEG と Ce6 を共固定したナノ粒子である PEG/Ce6-UCNP を培養細胞に添加し、その細胞毒性と近赤外光照射下における PDT の効果を評価した。この結果、PEG/Ce6-UCNP を添加し、近赤外光照射を行わなかった場合には、顕著な細胞毒性がみられないのに対し、PEG/Ce6-NPs を添加して近赤外光を照射した場合は、高い細胞毒性を示すことがわかった。また PEG/Ce6-UCNP は、水中において強い OTN-NIR 発光を示すこともわかった。これらの結果から、作製した PEG/Ce6-NPs は PDT と OTN-NIR 蛍光イメージングを同時に行うことが可能な、新たなセラノスティクス材料としての利用が期待される(図 3)。

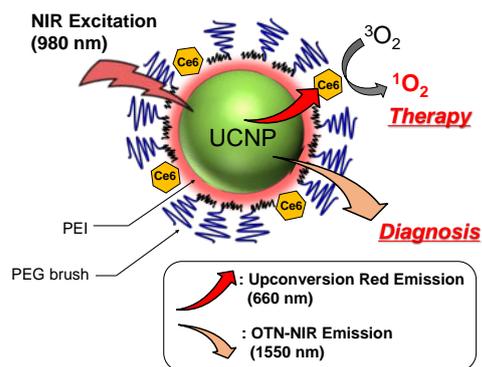


図 3. UCNP を用いたセラノスティクス。

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 Masao Kamimura, Ayumu Omoto, Hsin-Cheng Chiu, Kohei Soga, Enhanced Red Upconversion Emission of NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺, Mn²⁺ Nanoparticles for Near-Infrared Induced Photodynamic Therapy and Fluorescence Imaging, Chemistry Letters, (DOI: 10.1246/cl.170322) 査読有。
- ② Masao Kamimura, Taiki Matsumoto, Satoru Suyari, Masakazu Umezawa, Kohei Soga, Ratiometric Near-Infrared Fluorescence Nanothermometry in the OTN-NIR (NIR II/III) Biological Window Based on Rare-Earth Doped β -NaYF₄ Nanoparticles, Journal of Materials Chemistry B, (2017) 5,

- 1917-1925. (DOI: 10.1039/C7TB00070G) 査読有.
- ③ Yoshihisa Shimizu, Masao Kamimura, Shota Yamamoto, Shima A. Abdellatif, Kazuo Yamaguchi, Jun Nakanishi, Facile Preparation of Photoactivatable Surfaces with Tuned Substrate Adhesiveness, *Analytical Science*, (2016) 32, 1183-1188. (DOI: 10.2116/analsci.32.1183) 査読有.
- ④ Masao Kamimura, Rie Saito, Hiroshi Hyodo, Kosuke Tsuji, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, Kohei Soga, Over-1000 nm Near-infrared Fluorescence and SPECT/CT Dual-modal in vivo Imaging Based on Rare-earth Doped Ceramic Nanophosphors, *Journal of Photopolymer Science and Technology*, (2016) 29, 525-532. (DOI: 10.2494/photopolymer.29.525) 査読有.
- ⑤ Masao Kamimura, Michiko Sugawara, Shota Yamamoto, Kazuo Yamaguchi, Jun Nakanishi, Dynamic control of cell adhesion on a stiffness-tunable substrate for analyzing mechanobiology in collective cell migration, *Biomaterials Science*, (2016), 4, 933-937. (DOI: 10.1039/c6bm00100a) 査読有.
- ⑥ 曾我 公平、上村 真生、OTN 近赤外蛍光バイオイメージングシステムの開発、*生物物理*、(2017) 57, 81-84. (DOI: 10.2142/biophys.57.081) 査読有.
- Near-infrared Bioimaging, 20th Anniversary International Symposium of the Korean Society for Biomaterials 2016, 2016年9月29-30日, KIST, Seoul, Korea
- ⑥ 上村 真生、高廣 祥子、吉田 萌、曾我 公平、近赤外蛍光高分子ミセルによる波長1000nmを超える in vivo イメージング、第65回高分子討論会、2016年9月14-16日、神奈川大学横浜キャンパス
- ⑦ Masao Kamimura, Kohei Soga, Near-Infrared Dye-Loaded Polymer Micelles for Over-1000 nm Fluorescence in vivo Imaging, *Biointerfaces International 2016*, 2016年8月23-25日, University of Zurich, City Campus, Zurich, Switzerland
- ⑧ Masao Kamimura, Kohei Soga, Over-1000 nm NIR Luminescence Thermometry at the Nanoscale: An Analytical Technique for Mechanobiology, 2nd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 2016年7月27-28日, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan
- ⑨ Masao Kamimura, Kohei Soga, Biocompatible Polymer-conjugated Inorganic Nanophosphors for Near-infrared in vivo Imaging in the Second Biological Window, 9th International Conference on High Temperature Ceramic Matrix Composites (HTCMC9) and Global Forum on Advanced Materials and Technologies for Sustainable Development (GFMAT2016), 2016年6月26日-7月1日, Toronto Marriott Downtown Eaton Center Hotel, Toronto, Canada
- ⑩ Masao Kamimura, Rie Saito, Hiroshi Hyodo, Kosuke Tsuji, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, Kohei Soga, Over-1000 nm Near-infrared Fluorescence and SPECT Dual-modal in vivo Imaging Based on Rare-earth Doped Ceramic Nanophosphors, 2016年6月24-26日, The 33rd International Conference of Photopolymer Science and Technology, Makuhari Messe, Chiba, Japan
- ⑪ 上村 真生、曾我 公平、「第2の生体の窓」における近赤外蛍光 in vivo イメージング、バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ 2016, 2016年6月22-23日, 大阪大学吹田キャンパス 银杏会館
- ⑫ 上村 真生、曾我 公平、1000 nm を超える近赤外光バイオイメージングに向けた蛍光プローブの開発、第76回分析化学討論会、2016年5月28-29日、岐阜薬科大学
- ⑬ 上村 真生、高廣 祥子、曾我 公平、1000 nm を超える近赤外光バイオイメージングのための蛍光ポリマーミセルの設計、第65回高分子年次会、2016年5月25-27日、神戸国際会議場・展示場
- ⑭ Masao Kamimura, Kohei Soga,

〔学会発表〕(計 20 件)

- ① Masao Kamimura, Kohei Soga, Over-1000 nm Near-Infrared Fluorescent Probes for Deep Tissue in vivo Imaging, 第26回日本MRS年次大会, 2016年12月19日~22日, 横浜開港記念館, 神奈川
- ② Masao Kamimura, Kohei Soga, Over-1000 nm Near-Infrared Luminescent Polymeric Micelles for in vivo Imaging, The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), 2016年12月13日~16日, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan
- ③ Masao Kamimura, Kohei Soga, Over-1000 nm Near-Infrared Fluorescent Probes for Non-Invasive Deep Tissue Bioimaging, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (ICBS2016), 2016年11月28日~30日, The University of Tokyo, Tokyo, Japan
- ④ Masao Kamimura, Kohei Soga, Over-1000 nm Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes for in vivo Bioimaging, 8th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, IWAMSN 2016, 2016年11月8日-12日, Ha Long City, Vietnam
- ⑤ Masao Kamimura, Development of Fluorescence Nanoprobes for Over-1000 nm

Polymer/inorganic phosphor nanocomplex for near-infrared biophotonics in the second biological window, 10th World Biomaterials Congress, 2016年5月17-22日, Palais des congrès de Montréal, Montreal, Canada

- ⑮ 上村 真生、曾我 公平、近赤外蛍光ナノ粒子を利用するナノ温度イメージング、日本化学会 第96春季年会、2016年3月24-27日、同志社大学京田辺キャンパス、京都
- ⑯ Masao Kamimura, Taiki Matsumoto, Satoru Suyari, Kohei Soga, Nanothermometry in the Second Biological Window Based on Temperature Dependent Near-infrared Fluorescence of Rare-earth Doped Ceramic Nanophosphors, 2015年12月15-20日, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii
- ⑰ 上村 真生、松本 泰来、須鎗 聡、曾我 公平、第2の生体の窓を利用する近赤外蛍光ナノ温度イメージング、第37回日本バイオマテリアル学会、2015年11月9-10日、京都テルサ、京都
- ⑱ 上村 真生、光を利用するバイオマテリアルの研究 -基礎研究から診断・治療への展開-、第26回バイオマテリアル若手研究会、2015年10月30-31日、八王子セミナーハウス、東京
- ⑲ 上村 真生、松本 泰来、須鎗 聡、曾我 公平、PEG化セラミックスナノ粒子を用いた近赤外蛍光ナノ温度計、第64回高分子討論会、2015年9月15-18日、東北大学川内キャンパス
- ⑳ 上村 真生、松本 泰来、須鎗 聡、曾我 公平、希土類含有セラミックスナノ粒子の近赤外発光を用いたナノ温度イメージング、日本分析化学会第64年会、2015年9/8-11日、九州大学伊都キャンパス

[その他]

ホームページ等

<http://sogalabo.jp/jp/>

http://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/index.php?696d

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 真生 (Kamimura Masao)

東京理科大学 基礎工学部 材料工学科

助教

研究者番号 : 80706888