

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20115

研究課題名（和文）多臓器転移がんのin vivoリアルタイム観察を実現する近赤外蛍光トラッキング

研究課題名（英文）Development of near-infrared fluorescence tracking technique for real-time observation of cancer metastasis

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・講師

研究者番号：80706888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、有機蛍光色素を搭載した蛍光ポリマーナノ粒子と、セラミックスナノ粒子に機能性高分子を導入した蛍光ナノ粒子の、2種類の蛍光プローブを作製した。蛍光ポリマーナノ粒子は、親水性のシェルと疎水性のコアからなるコアシェル型ポリマーナノ粒子のコア部に有機蛍光色素を内包することで作製した。さらに、がん細胞に特異吸着するためのリガンド分子を容易に導入可能なプローブとして、希土類含有セラミックスナノ粒子の表面にポリエチレンイミン(PEI)が配位したナノ粒子を合成し、粒子表面のアミノ基を利用した機能化が可能な蛍光プローブを得ることができた。これらのプローブは、転移がん追跡に応用できると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、安価な材料と光観察による新たな転移がんの観察のための基盤技術を開発した。本技術の観察深度の深さやリアルタイム観察などの特徴は、既往のどの観察方法においても不可能であった困難な観察を可能とし、革新的な転移がん観察方法となる。また同様の蛍光ラベル化手法は、幹細胞の追跡にも応用可能であるため、再生医療研究への貢献も期待できる。このように、本研究の成果は、今後の転移がん研究における観察方法を大きく変化させる可能性を有しており、生体深部の細胞観察方法として一般化することができれば、生命・医学分野に大きく貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed two types of fluorescent probes, organic fluorescent dye loaded polymer nanoparticles and functional polymer modified ceramic nanoparticles. The fluorescent polymer nanoparticles were prepared by encapsulation of an organic fluorescent dye in the core of core-shell type polymer nanoparticles composed of a hydrophilic shell and a hydrophobic core. Furthermore, as a ligand installable fluorescent probe, polyethyleneimine tethered ceramic nanoparticles was also synthesized. The amine groups on the nanoparticle surface can be used for immobilization of ligand molecules, such as antibody for cancer cells. These probes are expected to be powerful tools for cancer metastasis imaging.

研究分野：生体医工学

キーワード：ナノ粒子 バイオイメージング 近赤外光 転移がん 高分子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の転移は、がんの症状悪化や治療が困難になる大きな原因であり、体内でがん細胞がどのように転移しているのかを観察・解明できる技術が求められている。がんの死亡率は現在、日本国内における死因の第1位であり、その症状悪化の主な理由として、がん細胞が原発巣から他の臓器へと転移することがあげられ、進行性がんにおける多臓器転移は特に深刻な問題となっている。そこで近年、基礎研究レベルで観察用のラベル化剤を導入したがん細胞を実験動物に移植し、がん細胞が体内で転移する様子を追跡する研究が盛んに行われている。代表的な手法として、蛍光マーカー(プローブ)を細胞内導入して観察する蛍光イメージング技術があり、観察対象の細胞の位置情報をリアルタイムに観察可能である。しかしながら、既往の蛍光イメージングの多くは、生体内物質の吸収が大きく組織透過性が低い紫外(UV)光(波長<400nm)または可視(VIS)光(波長400-700nm)を用いたものがほとんどであり、既往技術では皮下深度数百 μm 程度が現実的な観察の限界である。

2. 研究の目的

1. で述べた研究背景をふまえ、本研究では、生体組織透過性が極めて高い、波長1000nmを超える波長域の OTN-NIR 蛍光を発する高分子ナノプローブを合成し、生体深部におけるがん細胞の多臓器への転移挙動を追跡する技術を開発することを狙った。一般的に NIR 光(波長>700nm)は、紫外・可視光と比べて生体内物質の吸収が低いことから組織透過性が高く、生体内観察に有利であることがよく知られている。さらに近年、NIR 光領域の中でも OTN-NIR 光が特に高い生体組織透過性を示すことが知られ、皮下深度20mm程度まで透過可能である。実際に代表者は、OTN-NIR 蛍光を示すナノ粒子を用いてマウス体内の血流イメージングなどに成功している。このような背景のもと、本研究では生体適合性高分子と低分子有機蛍光色素、セラミックスナノ粒子を用いて、転移がんイメージングのための蛍光ナノプローブの作製に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 蛍光ポリマーナノ粒子の合成と in vivo イメージング

両親媒性で生体適合性を有する poly(ethylene glycol) (PEG) の片末端に polystyrene (PSt) のブロック構造を有するポリマー (PEG-b-PSt) と蛍光色素 (IR-1061) をそれぞれアセトニトリル (ACN) に溶解し、水中に滴下した後に攪拌・混合、続けて開放系で攪拌することで ACN を除去して蛍光ポリマーナノ粒子を合成した (Fig.1)。得られた蛍光ポリマーナノ粒子の特性は、動的光散乱 (DLS) による粒径分布の測定と生理条件下における蛍光スペクトルの経時変化測定 (励起波長: 980 nm) により評価した。またイメージング性能を評価するために、蛍光ポリマーナノ粒子をマウスの尾静脈に投与し、NIR イメージングシステム (SAI-1000, 島津製作所) を用いて蛍光観察をおこなった。

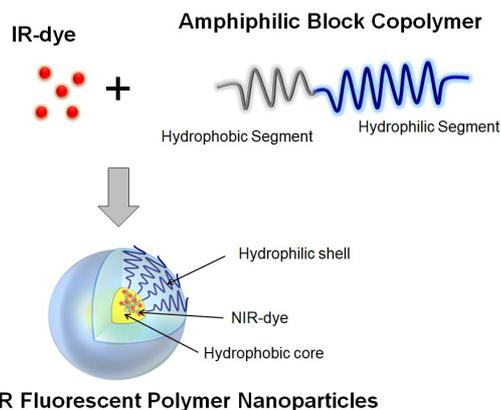


Fig.1 蛍光ポリマーナノ粒子の作製

(2) リガンド導入可能な高分子修飾セラミックスナノ粒子の合成と in vivo イメージング

ソルボサーマル合成法を用いて、粒子表面に polyethyleneimine (PEI) が配位した Yb^{3+} , Er^{3+} 含有 NaYF_4 ナノ粒子 (PEI-NPs) を合成した。得られた PEI-NPs の表面に、PEG の片末端に poly(acrylic acid) のブロック構造を有するポリマー (PEG-b-PAAc) をアミド結合によって導入した (Fig.2)。得られた PEG 修飾ナノ粒子の分散安定性は、リン酸緩衝液 (PBS) 中における吸光度の経時変化で評価した。また、PEG 修飾粒子の細胞毒性評価は

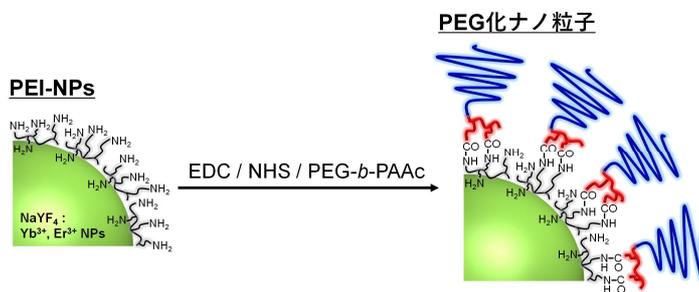


Fig.2 PEG 修飾セラミックス蛍光ナノ粒子の作製

water soluble tetrazolium salts (WST) 法を用いて行った。さらに、NIR イメージングシステム (SAI-1000) を用いて、マウスのイメージング実験を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光ポリマーナノ粒子の合成と in vivo イメージング

PEG-b-PSt と IR-1061 を用いて作製した蛍光ポリマーナノ粒子は、DLS 測定の結果から平均粒径が約 40 nm であり (Fig. 3)、水中において強い NIR 蛍光 (1100 nm) を示すことが観察された (励起波長: 980 nm)。また、蛍光強度の経時変化測定をおこなった結果、生理食塩水中において 3 日間以上、強い蛍光強度を安定して維持できることが明らかになった。これは、疎水コアに蛍光色素が安定に内包されていることが理由であると考えられる。

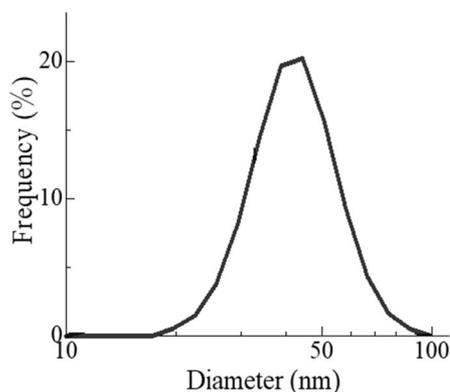


Fig.3 蛍光ポリマーナノ粒子の粒径分布

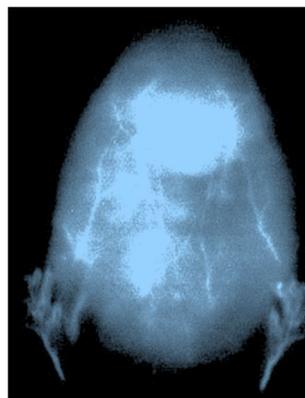


Fig.4 蛍光ポリマーナノ粒子を用いた in vivo イメージング。

つぎに、この蛍光ポリマーナノ粒子をマウスに尾静脈投与した (Fig. 4)。この結果、投与直後から 1 h において血管造影が可能であることがわかった。このように両親媒性ブロックポリマーを用いてミセル構造を形成し、コア部に NIR 蛍光色素を内包することで、生理条件下で長時間安定に使用可能な NIR 蛍光ポリマーナノ粒子を得ることができる。このナノ粒子は、リガンド分子を導入することで、転移がんイメージングに利用できると期待される。

(2) リガンド導入可能な高分子修飾セラミックスナノ粒子の合成と in vivo イメージング

ソルボサーマル法により作製した PEI-NPs に、アミド結合を用いて PEG-b-PAAc を修飾することにより、粒径 70 nm の PEG 化粒子を得た。得られた PEG 化粒子の PBS 中における分散安定性を評価した結果、長時間安定に分散状態を維持できることが明らかになった。次に、作製した PEG 化ナノ粒子の細胞毒性を評価した結果 (Fig.5)、PEI-NPs は粒子表面の PEI が強い毒性を示すために、濃度と時間に依存して細胞生存率が低下する様子が観察された。この一方で、PEG 化粒子は細胞毒性がほとんどみられず、高い生体適合性を有することがわかった。

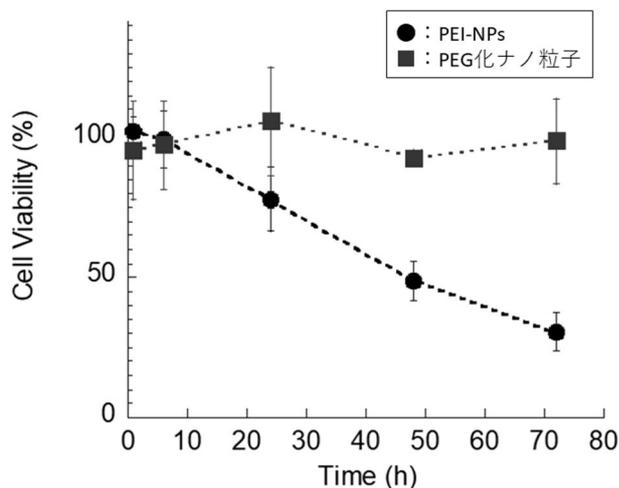


Fig.5 作製したナノ粒子の細胞毒性評価。

さらに、PEG 修飾ナノ粒子をマウスの尾静脈に投与して、in vivo イメージングを試みた結果、投与から 1 分後にマウスの血流を可視化することに成功した (Fig.6)。このナノ粒子表面は、PEG の導入密度とリガンド分子の導入量を制御可能であり、転移がんの特異的に吸着できるリガンド分子を PEG と共固定することによって、分散安定性と転移がんの特異的マーキング能の両方を有する蛍光プローブを作製することができる。と期待できる。

このように本研究では、ポリマーと蛍光色素、セラミックナノ粒子を用いて、転移がんの観察のための基盤技術となるプローブ材料を開発した。本技術が実用化されれば、観察深度の深さやリアルタイム観察など、既往の転移がん観察手法では不可能であった観察が可能になり、革新的な転移がん観察方法になると考えられる。また、このラベル化法は、幹細胞の蛍光標識にも利用可能であるため、がん診断・研究だけでなく、再生医療研究への貢献も期待される。



Fig.6 PEG 修飾ナノ粒子を用いた in vivo イメージング。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 上村真生	4. 巻 75
2. 論文標題 高分子複合化近赤外蛍光プローブによるin vivoイメージング	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 高分子論文集	6. 最初と最後の頁 468 ~ 474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1295/koron.2018-0017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上村真生、曾我公平	4. 巻 3
2. 論文標題 近赤外蛍光プローブによる生体内イメージング法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ぶんせき	6. 最初と最後の頁 114 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 11件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 上村 真生
2. 発表標題 Over-1000 nm (OTN) 近赤外光を用いた in vivo イメージング
3. 学会等名 第23回酸素ダイナミクス研究会・第26回医用近赤外線分光法研究会 合同研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村 真生
2. 発表標題 波長1000 nmを超える近赤外蛍光を用いる in vivoイメージング
3. 学会等名 第44回レーザー顕微鏡研究会 & シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masao Kamimura, Kohei Soga
2. 発表標題 Over-1000 nm Near-Infrared Phosphors for Nanotheranostics
3. 学会等名 4th International Bio/Medical Interface Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村 真生
2. 発表標題 体内深部を可視化する近赤外光バイオイメージング
3. 学会等名 第69回医用高分子研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村 真生、吉田萌、梅澤雅和、曾我公平
2. 発表標題 NIR-II蛍光ポリマーミセルによるin vivoイメージング
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masao Kamimura
2. 発表標題 Polymer Conjugated Nanophosphors for Over-1000 nm Fluorescence in vivo Imaging
3. 学会等名 1st G'Lowing Polymer Symposium in KANTO (GPS-K2018) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masao Kamimura
2. 発表標題 Polymer Conjugated Fluorescent Nanoparticles for Over-1000 nm Near-Infrared Bioimaging
3. 学会等名 第67回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masao Kamimura, Kohei Soga
2. 発表標題 Development of Polymer Conjugated Nanoparticles for Near-Infrared Triggered Theranostics in the Second Biological Window
3. 学会等名 International Conference on Advances in Polymer Science & Technology 2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masao Kamimura, Kohei Soga
2. 発表標題 Over-1000 nm Near-Infrared (OTN-NIR) (NIR-II/III) Fluorescence in vivo Imaging
3. 学会等名 18th International Union of Materials Research Societies International Conference in Asia（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村 真生、曾我 公平
2. 発表標題 波長1000 nmを超える近赤外(OTN-NIR)蛍光in vivoイメージング
3. 学会等名 第26回日本バイオイメージング学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村 真生、曾我 公平
2. 発表標題 波長1000nmを超える近赤外(OTN-NIR)蛍光ナノ粒子による生体内深部の観察
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村 真生、吉田 萌、橋本 祐介、梅澤 雅和、曾我 公平
2. 発表標題 生体内深部をリアルタイム観察するための近赤外蛍光高分子ミセルプローブ
3. 学会等名 第77回分析化学討論会(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	曾我 公平	東京理科大学・基礎工学部・教授	蛍光材料設計・イメージング
	(Soga Kohei)		
	(50272399)	(32660)	