

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04893

研究課題名（和文）がん治療や医療用検査デバイスに応用可能な新規ナノ材料の開発

研究課題名（英文）Development of new nanomaterials for application to cancer treatment and medical inspection devices

研究代表者

水木 徹（Mizuki, Toru）

東洋大学・バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター・研究助手

研究者番号：80408997

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：DDSの構築やナノ手術、温熱療法などを利用したがん治療や医療用検査デバイスへ応用可能な新規ナノ材料として、希少糖で修飾したナノ材料を独自に開発し、その機能性を解析・応用することを目的としている。本研究テーマでは希少糖で機能化された還元型酸化グラフェン（希少糖付与rGO）を合成し、その解析を中心に研究を進め、合成に適した条件、表面物性解析、生体適合性や細胞毒性など多くのデータを蓄積した。

一方、近年の研究環境の急激な変化から医療用検査デバイスの完成まで行うのは困難な状況となったため、一部の内容を希少糖含有糖脂質の合成と細胞に及ぼす影響の解析に切り替えて研究を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少糖は様々な機能性を有することから研究分野において高い関心を集めているが、近年では様々な食品や飲料に使用されるようになったことで一般的な生活の中でも目にすることが多くなっている。本研究では希少糖とその機能に注目し、医療応用可能な新材料の開発に役立てることを目的とした。

希少糖を用いた新規ナノ材料として希少糖付与rGOを開発し、その物性解析や生物に及ぼす影響の解析を進めた。これら蓄積した多くのデータは今後の機能性材料開発の際に重要な役割を果たしていくものとなり、学術的・社会的に意義のあったものであると考える。

研究成果の概要（英文）：We aim to develop nanomaterials modified with rare sugars, as a new nanomaterial that can be applied to cancer treatment and medical inspection device, and analyze their functionality. In this study, we synthesized and analyzed reduced graphene oxide functionalized with rare sugars (RSfGO). We obtained a lot of data on RSfGO such as conditions suitable for synthesis, analysis of surface physical characteristics, and biocompatibility/cytotoxicity.

The data accumulated in this research is important for the development of new materials using rare sugars in the future and their medical applications.

研究分野：バイオ・ナノサイエンス融合研究

キーワード：バイオナノ複合材料 グラフェン 希少糖 がん治療 新規ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

希少糖とは「自然界に存在する量が少ない単糖とその誘導体」のことである。がん細胞や寄生虫の生育抑制、抗酸化作用、食後血糖値の上昇抑制や脂肪吸収量の抑制などの機能が報告されたことで近年注目が集まっている。日本国内では様々な商品に希少糖が用いられ、目に付くようになったことからその注目度は研究分野のみならず一般的にも高いことがうかがえる。本研究では酸化グラフェン(**graphene oxide**, 以下 **GO**)を希少糖で還元することで新規ナノ材料を開発する。還元反応の際に **GO** の一部の側鎖に希少糖が付与される(図 1)。これにより還元型酸化グラフェン(**reduced graphene oxide**, 以下 **rGO**)と希少糖の機能を有する新規材料が開発出来ることを期待している。**rGO** は一部の性質で見たとき、グラフェンと **GO** の中間とも言える機能を有しており、導電性で有り且つ生体分子と結合しやすいことから、医療用ナノデバイス、がん細胞の熱処理、ドラッグデリバリーシステム(**Drug Delivery System**, 以下 **DDS**)用キャリアとしての素材として適している。

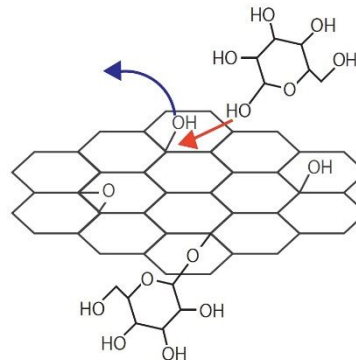


図 1. GO の還元および希少糖の付加

本研究テーマでは『希少糖の機能を他の材料に付与することはできるのか?』という研究代表者が抱いた学術的な問いを解明すべくスタートしたが、これまでにを行った研究結果から既に一部付与できる可能性を示している(**H. Kozakai, T. Mizuki, et al. ICMAT, 2015**)。一方、研究代表者が運営する研究室のこれまでの研究により、たった1ステップの行程で **GO** の還元および希少糖による機能化が可能となる方法を確立した。我々の開発した手法でこれまでに **13** 種類の希少糖を用いた **rGO** を作製した。**UV-VIS spectroscopy** によりピークのシフトから還元を確認するとともに、**XPS**、**FT-IR**、**Raman spectroscopy** での解析結果も同様に還元が進んでいることを示していた。また、その後の研究で **TGA** や **LC-MS** の結果から **rGO** に糖が付加されていることを示すデータも既に取得できている。

2. 研究の目的

本研究では、生体に対し様々な機能を有する希少糖を用いた新規ナノ材料の開発および医療分野(がん治療や医療用デバイス)への応用を目的としている。これまでの研究で既に作製方法は確立しており、後は詳細な解析を必要とするのみである。

期間内に以下の4項目を達成すべく研究に取り組んだ。

- (1) 作製した材料の表面解析および物性を解析する。それにより材料としてどのような性能を持つのか、明らかにするとともに応用出来る用途を探る。
- (2) 作製した材料について、培養細胞、血球、バクテリアなど様々な生物に対する適合性を解析する。特に医療応用を目指すにあたり培養細胞や血球への影響の解析は重要である。
- (3) 作製した材料が有する機能を解析する。特に希少糖の機能をそのまま有するのか、それとも機能に変化が起きるのか明らかにしていく。
- (4) 作製した材料の性質(上記1~3で解析)をもとに、がん治療および医療用検査デバイスの構築を行う。

3. 研究の方法

目的達成のため、以下(1)~(3)の内容に取り組んだ。

(1) 反応液の大容量化

本研究において希少糖による **GO** の還元は、希少糖、**GO**、アンモニアの混合液を加熱することで行っている。その際均一な加熱と攪拌によるグラフェンの分散が必要となるため、加熱に使用できる機器の種類に限られる。大容量化学反応用自動温度コントロールシステムを導入し、反応液の大容量化および均一な産物の取得を可能とする。

(2) 作製した材料の物性解析

これまでの研究でも作製した材料の表面解析は行ってきたが、サンプル量の問題で詳細な解析が困難であった。大量生産が可能になることで詳細に繰り返し解析が出来る。解析には東洋大学に設置されている **XPS**、**XRD**、**UV-VIS spectroscopy**、**FT-IR**、**Raman spectroscopy**、**NMR**、**TGA**、**LC-MS (ion trap)**、**MALDI-TOF/MS**、**SQUID**、**VSM**、**TEM** など本学およびバイオ・ナノエレクトロニクス研究センターに既存の装置を最大限に活用した。

(3) 作製した材料の生体適合性および細胞毒性の解析

培養細胞、血球、細菌、生体高分子を用いて生体適合性/細胞毒性を解析する。特に作製した材料存在下で各種細胞や生体高分子の安定性や相互作用、及ぼす機能や影響を解析した。これまでの研究で、希少糖付与 **rGO** を培養液に添加することで大腸菌(グラム陰性バクテリア)の生

育を阻害するが、一方でグラム陽性バクテリアである枯草菌の生育には全く影響を及ぼさない等の興味深い現象も確認できている。本実験で使用している **GO** のみを培養液に添加してもこの様な現象は起きないことから、希少糖が **rGO** 表面に付与することによる機能であると考えている。一方、これまでの研究で希少糖付与 **rGO** ががん細胞の生育に及ぼす影響を確認したところ、**rGO** に付与した希少糖の種類により異なる挙動を示していたため、今後 **NIR photothermal therapy** を用いたがん治療へ応用する際の重要な情報とすべく、他のがん細胞や正常細胞への影響も解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 大容量化学反作用自動温度コントロールシステムを導入、使用することで希少糖付与 **rGO** の合成が容易になった。これまでの反応系では一度の合成で **10 mL** までが限界であったが、本システムの導入により、一度の合成で最大 **125 mL**、つまり **10** 倍以上の合成が可能となった。一度に大量に合成できるようになったことから、表面物性、生体適合性、細胞毒性などの解析を行うために十分なサンプルが取得できたと判断した。一方、これまで合成してきた希少糖付与 **rGO** と若干の違いが確認されたため、再度表面物性の解析を行い以前のデータと比較した。

(2) 大量合成した希少糖付与 **rGO** を用い、表面物性の解析を行った。既存の小容量の合成方法で合成した希少糖付与 **rGO** で取得していたデータと比較するため、**Raman spectroscopy**、**UV-VIS spectroscopy**、**FT-IR**、**XPS** を中心に解析を行った。**Raman spectroscopy** ではグラフェンの特徴的なピークの一つである **G** バンドと構造の欠陥と乱れに起因する **D** バンドに着目し測定した。**GO** と希少糖付与 **rGO** の結果を比較すると **G** バンドの位置のシフトや **I_G/I_D ratio** の増加が確認できた。**UV-VIS spectroscopy** での測定においては図2に示すとおり希少糖付与 **rGO** のピークは **GO** のピークに比べて長波長側へ移動していることが確認出来る。これらの結果は **GO** が還元されたことを示している。一方 **XPS** を用いて **C-C** 二重結合、**C-O** 単結合、**C=O** 二重結合の解析を行った。取得した各データの面積比を **GO** と希少糖付与 **rGO** 間で比較すると、**C-O** 単結合の比率が増加し、**C=O** 二重結合の比率が減少した。これらのデータは還元した **GO** に単糖が側鎖として付与されたことを示している。**FT-IR** での測定結果は **C-C** 二重結合および **C-O** 単結合に着目して解析し、これらのデータが **XPS** で得たデータをフォローすることを確認した。

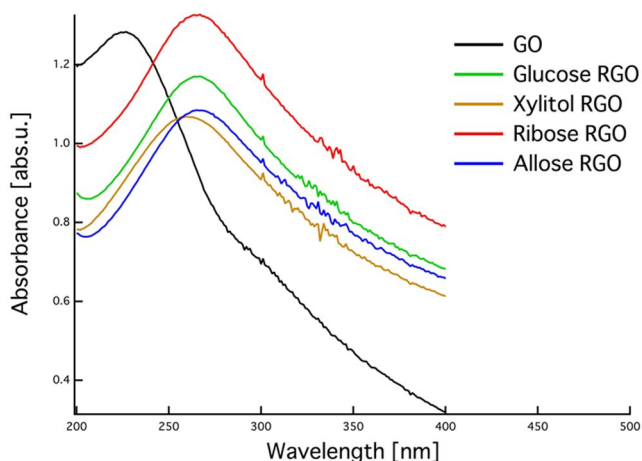


図2. **GO** および希少糖付与 **rGO** の吸収波長

大容量化学反作用自動温度コントロールシステムで合成した希少糖付与 **rGO** は小容量で合成した希少糖付与 **rGO** とは若干違いはあるものの、目的の産物は得られていることが確認出来た。また、温度コントロールをより厳密に出来るようになったためか、小容量で合成した産物に比べロット間での違いが極めて小さくなったことがわかった。

(3) 複数のバクテリア、赤血球、培養細胞に対する **GO** および希少糖付与 **rGO** の影響を測定、解析した。図3に綿羊全血より分離した赤血球に対する影響評価の結果を示す。

GO は比較的高い溶血活性を示すものの希少糖が付与することによりその活性が低下することが確認できた。一方で一部希少糖の添加により赤血球が安定になるデータも取得できており、本データは溶血活性の低下と希少糖の付与による赤血球の安定のどちらが影響した結果であるのかは今後明らかにしていく予定である。一方で **IM-9** (ヒト多発性骨髄腫細胞)、**DLD-1** (ヒト結腸がん細胞)、**CCD841CoN** (ヒト結腸正常細胞) を含む複数の培養細胞を用いて、増殖に対し **GO** および希少糖付与 **rGO** が及ぼす影響や、細胞毒性を解析したところ、側鎖として付与している希少糖の種類により及ぼす影響が大きく異なることが確認できた。特に、一部の希少糖付与 **rGO** においては細胞の増殖を促進することが確認出来ており、とても興味深い結果が得られた。これらのメカニズムについては今後詳細に解析を進めていく予定である。

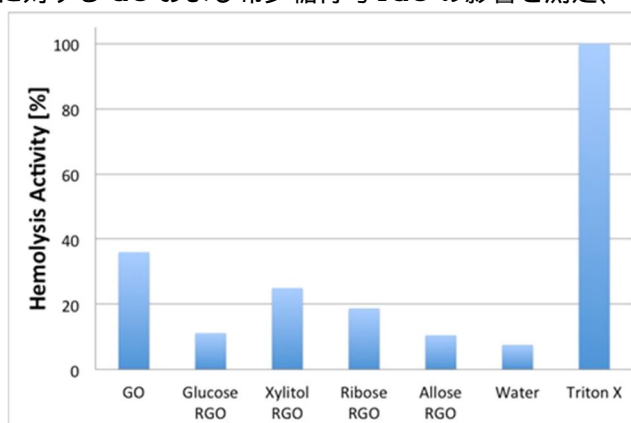


図3. **GO** および希少糖付与 **rGO** が赤血球に及ぼす影響

(4) 本研究においては、希少糖付与 **rGO** を用いての「がん治療への応用または医療用検査デバイスの作製」まで到達することを予定していたが、**COVID-19** による研究機関の一時閉鎖や

共同研究者の元への訪問の制限などが影響し進めることが出来なかった。そこで一部研究の予定を変更し、希少糖を用いた新材料の開発の一環として新規糖脂質 (**RSL**) の合成およびその性質の解析を行った。**RSLs** は希少糖とオクタン酸を酵素反応を用いて合成し、**TLC**、**MALDI-TOF/MS**、**FT-IR** などの手法を用いて産物の確認を行った。また、**IM-9**、**DLD-1**、**CCD841CoN** などの培養細胞に及ぼす細胞毒性および適合性の解析を行い、データを取得した。**RSLs** の細胞毒性はミセルの形成と関わりがある可能性を示すデータも得られており、今後の研究で明らかにしていく。

本研究では、希少糖を付与した新材料の開発、それらを用いたがん治療や医療用検査デバイス開発など将来的な応用に向け重要なデータが得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Hirata Keisuke, Uchida Takashi, Nakajima Yoshikata, Maekawa Toru, Mizuki Toru	4. 巻 4
2. 論文標題 Chemical synthesis and cytotoxicity of neo-glycolipids; rare sugar-glycerol-lipid compounds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00861 ~ e00861
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2018.e00861	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Toru Mizuki, Keisuke Hirata, Yoshikata Nakajima, Takashi Uchida, Toru Maekawa
2. 発表標題 Chemical Synthesis and Cytotoxicity of Neo-Glycolipids
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Mizuki, Keisuke Hirata, Yoshikata Nakajima, Takashi Uchida, Toru Maekawa
2. 発表標題 Synthesis and characterization of rare sugar functionalized graphene oxide
3. 学会等名 13th International Conference on Surfaces, Coatings and NanoStructured Materials（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toru Mizuki, Keisuke Hirata, Yoshikata Nakajima, Takashi Uchida, Toru Maekawa
2. 発表標題 Chemical Synthesis of Neo-Glycolipids and Analysis of Their Cytotoxic Mechanisms
3. 学会等名 IEEE-NANOMED 2018（国際学会）
4. 発表年 2018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
研究 分担者	中島 義賢 (Nakajima Yoshikata) (40408993)	大阪大学・ナノサイエンスデザイン教育研究センター・特任 准教授(常勤) (14401)	
研究 分担者	モハメッド シェイク (Sheikh Mohamed Mohamed) (50708609)	東洋大学・学際・融合科学研究科・准教授 (32663)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------