

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19510117

研究課題名(和文) 新規な多機能バイオナノシリカ粒子による細胞への  
選択的ターゲティング研究課題名(英文) Selective targeting of novel multifunctionalized  
bionanosilica particles to cells.

研究代表者

中村 教泰 (NAKAMURA MICHIMIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10314858

研究成果の概要：新しい多機能バイオナノシリカ粒子を作製し、標的とする細胞へターゲティングを検討した。粒子作製においてサイズ分布が均一なナノ粒子、様々な蛍光シグナルや表面電荷を持つ粒子、抗体を表面に結合した粒子の作製が可能となった。多機能バイオナノシリカ粒子は粒子サイズや粒子表面特性の違いにより様々な様式で細胞へターゲットすることが電子顕微鏡などの形態学的評価で確認できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ多機能材料

## 1. 研究開始当初の背景

機能性ナノ粒子は医療応用、特に標的分子の検出や治療において最も重要な材料の一つである。機能性ナノ粒子に要求される条件として生体親和性が高く、蛍光や磁気などのシグナル分子による幅広い内部機能化、並びに抗体などのバイオ分子による表層機能化が可能であると共に自在に粒子サイズの調整が可能なナノ粒子の開発が期待されている。

申請者は医療応用を目指した抗体工学として遺伝子工学的技術を駆使した人工抗体の選択や作製、機能改変の研究と共にシリカを材料とした多機能シリカ粒子の作製・応用

に関する研究、並びにそれらを融合した新規有用技術の研究を行っている。

申請者らはシリカ粒子に効率よく蛍光色素を含有させる内部機能化の研究において有効な成果を得ることができた。さらに新規シリカ粒子の開発を進め、表層機能化に関してチオール基など反応性と応用性の高い官能基を表面に密集させた粒子の作製に成功した。この新規なシリカ粒子はバイオ分子による表層機能化が極めて良好であった。また新規シリカ粒子のサイズ制御良好な作製法の開発においても成果を得ることができた。これらの成果を踏まえ新規シリカ粒子を標的細胞に選択的にターゲットが可能である



多機能バイオナノシリカ粒子として発展させるべく、粒子のサイズや表面の特性に関して検討し、細胞へのターゲッティングの解析を行い、標的細胞への選択的ターゲッティング技術の開発を行うこととした。

## 2. 研究の目的

標的細胞への選択的ターゲッティング技術を確立すべく多機能バイオナノシリカ粒子の作製を行う必要がある。粒子がサイズにより細胞にどの程度、どの様にターゲッティングされるかといった”粒子サイズ-細胞ターゲッティング相関”ならびに表層機能化に使用したバイオ分子の違いにより粒子が細胞にどの程度、どの様にターゲッティングされるかといった”粒子表層機能化-細胞ターゲッティング相関”を体系的に研究し明らかにする。そして細胞に対して高効率かつ選択的にターゲッティングされる粒子の最適な表層機能化並びに速度論的特長を決定する。さらに非選択的ターゲッティングを抑制できる条件に関しての検討も行う。得られた結果についてシリカ粒子-細胞ターゲッティング相関データベースとしてバイオイメージング診断用薬剤や薬剤ターゲッティングシステムのキャリアーとして用いる際のサイズ並びに表層機能化の条件決定の指標となるようにまとめる。以上を目的として粒子作製の検討を行うと共に選択的ターゲッティングの研究を行なった。

## 3. 研究の方法

### (1) 多機能バイオナノシリカ粒子の作製

多機能バイオナノシリカ粒子のサイズ制御において平均粒径 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 nm のシリカ粒子を作製する。シリカ粒子のサイズとサイズ分布の評価は透過型電子顕微鏡、動的光散乱法等にて行う。サイズ収率 20% 以内の粒子を作製する。内部機能化においては、シグナル分子としては蛍光有機色素であるローダミン、フルオロセインを用いる。蛍光含有の評価は蛍光顕微鏡を用いて行い、粒子蛍光が有意に観察できることを基準とする。表層機能化では抗体、その他蛋白質やポリエチレングリコールなどを用いて表層機能化を行う。抗体としては抗 Epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体などの腫瘍細胞に対する抗体を用いて表層機能化を行う。表面機能化の評価のため表層機能化前後にて粒子のゼータ電位を測定し、値とその変化を確認すると共にターゲッティング実験の参考指標の一つとする。

### (2) 多機能バイオナノシリカ粒子の選択的ターゲッティング

マウス腹腔より採取したマクロファージや培養細胞を用いてターゲッティングの研究を行なう。20 nm から 1,000 nm のサイズ

にて、フルオロセインまたはローダミンを含有させた粒子を用いて”粒子サイズ-細胞ターゲッティング相関”を検討する。また抗 EGFR 抗体などの抗体で表層機能化を行った粒子や表面電荷の異なる粒子を用いてターゲッティングへの影響を評価する。

## 4. 研究成果

標的細胞への選択的ターゲッティング技術を確立すべく有用な多機能バイオナノシリカ粒子の作製を行なった。多機能バイオナノシリカ粒子の作製について、サイズ制御、内部機能化、表層機能化を検討した。サイズ制御においては”粒子サイズ-細胞ターゲッティング相関”を検討するために様々なサイズの粒子の作製を検討した。シリカ粒子のサイズとサイズ分布の評価は透過型電子顕微鏡、動的光散乱法等にて行った。平均粒径 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 nm のシリカ粒子を作製できた。反応条件の検討によりサイズ収率 20% 以内の粒子の作製が可能となった(図 1)。

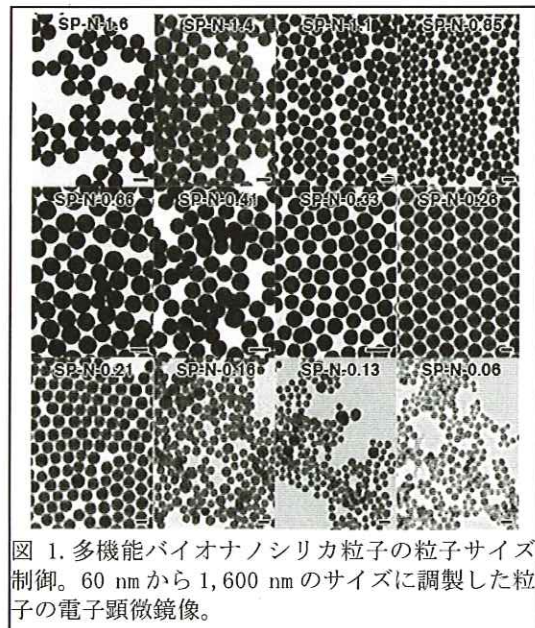


図 1. 多機能バイオナノシリカ粒子の粒子サイズ制御。60 nm から 1,600 nm のサイズに調製した粒子の電子顕微鏡像。

内部機能化においては粒子にシグナル分子を含有させ内部機能化を行なった。シグナル分子として蛍光有機色素であるローダミン、フルオロセイン、ルテシウムを用いて内部機能化に成功した。多種の蛍光色素の併用、蛍光強度の調整によるバーコード化粒子の作製にも成功した(図 2)。表層機能化においては”粒子表層機能化-細胞ターゲッティング相関”を検討するためにバイオ分子を用いて表層機能化の検討を行った。GFP、抗体、アルブミン、ストレプトアビジン、ポリエチレングリコールなどにて表層機能化を行なった。表層機能化の評価をフローサイトメトリーを用いて行い、表層機能化に用いた蛋白質に対する蛍光標識抗体などで粒子表面に



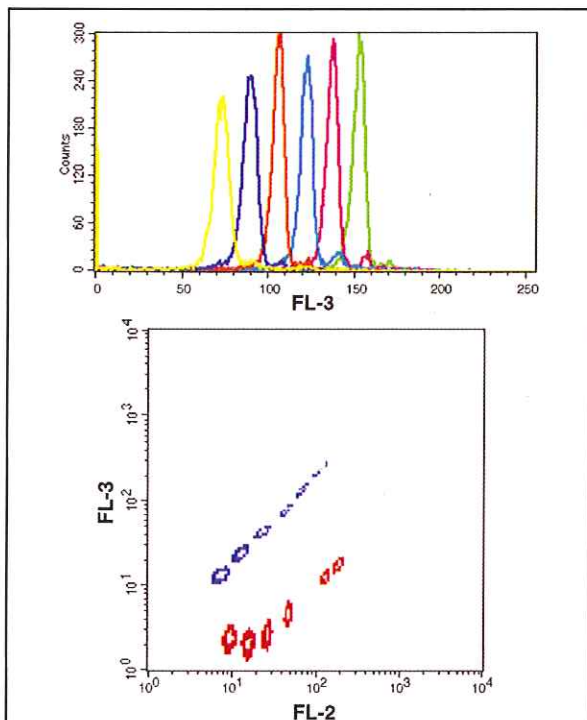


図 2. 多機能バイオナノシリカ粒子の内部機能化によるバーコード化。多機能バイオナノシリカ粒子の内部機能化によってフローサイトメトリーにより蛍光強度が段階的に区別できるバーコード化粒子の作製に成功した。

結合した蛋白質を確認することができた。さらに粒子のゼータ電位を測定し、その変化や値から表層機能化の評価も行った。

粒子がサイズにより細胞にどの程度、どの様にターゲティングされるかといった”粒子サイズ-細胞ターゲティング相関”ならびに表層機能化に使用したバイオ分子の違いにより粒子が細胞にどの程度、どの様にターゲティングされるかといった”粒子表層機能化-細胞ターゲティング相関”を体系的に検討し以下の結果を得た。食食能の強いマクロファージを標的細胞として研究を進めた。in vivoにおいて粒子のサイズとその影響の評価法を確立した。粒子サイズにより組織内、細胞内への取り込まれやすさが変化することが確認できた。またマクロファージ内における粒子の細胞内局在に関して粒子表面の特性に応じた変化を観察し、粒子サイズのみならず表面電位の重要性を見いだした(図3)。さら腫瘍細胞への選択的ターゲティングとして腫瘍細胞に特異的に発現する抗原を標的とした抗体を用いて研究を進めた。腫瘍細胞に選択的に結合する多機能ナノ粒子の作製を行なうことができた。形態学的評価として多機能バイオナノシリカ粒子を添加した培養細胞に対して蛍光顕微鏡を用いて粒子の細胞への接着、細胞内への取り込み等を観察し動画として撮影することに成功した。さらに電子顕微鏡において粒子の

細胞内局在を観察し、細胞内におけるナノ粒子の多様な存在様式を詳細に明らかにした。これらの成果は今後、ナノ粒子を用いたイメージングやドラッグデリバリーシステムの研究において標的とする分子や細胞をどの様なサイズの粒子を用いるべきか、また粒子表面の特性を検討するために有意義であると考えられる。

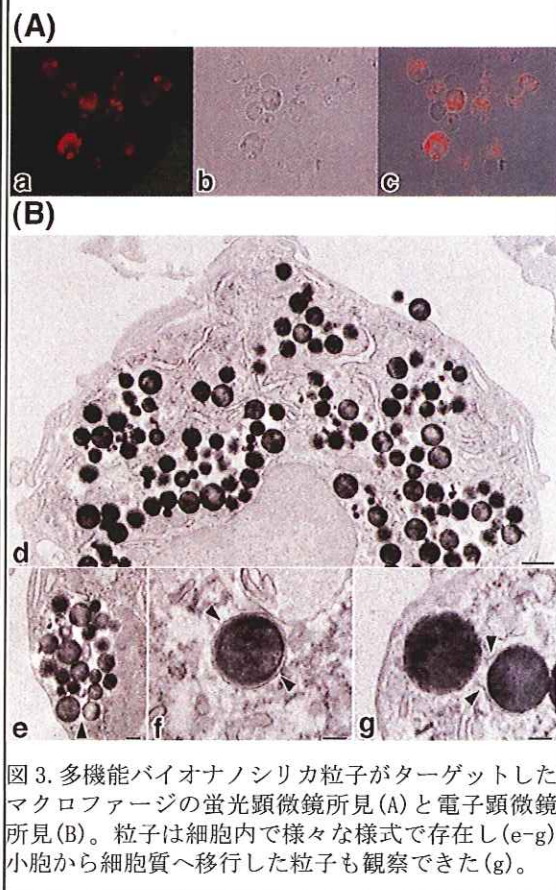


図 3. 多機能バイオナノシリカ粒子がターゲットしたマクロファージの蛍光顕微鏡所見(A)と電子顕微鏡所見(B)。粒子は細胞内で様々な様式で存在し(e-g)小胞から細胞質へ移行した粒子も観察できた(g)。

#### 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) Nakamura, M., Ishimura, K. (2008). Size-controlled, One-pot Synthesis, Characterization, and Biological Applications of Epoxy-Organosilica Particles Possessing Positive Zeta Potential as Prepared. *Langmuir*. 24, 12228-12234. 査読有

(2) Nakamura, M., Ishimura, K. (2008). One-pot synthesis and characterization of three kinds of thiol-organosilica nanoparticles. *Langmuir*. 24, 5099-5108. 査読有

(3) Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. (2007).

Novel drug delivery system of hollow mesoporous silica nanocapsules with thin shells: Preparation and fluorescein isothiocyanate (FITC) release kinetics. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 58, 180-187. 査読有

(4) Nakamura, M., Ishimura, K. (2007). Synthesis and characterization of organosilica nanoparticles prepared from 3-mercaptopropyltrimethoxysilane as the single silica source. Journal of Physical Chemistry C. 111, 18892-18898. 査読有

(5) Nakamura, M., Shono, M., Ishimura, K. (2007). Synthesis, characterization, and biological applications of multicolor fluorescent silica nanoparticles. Analytical Chemistry, 79, 6507-6514. 査読有

(6) Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. (2007) Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. International Journal of Cancer. 120, 2527-2537. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

(1) 中村教泰 (2009年2月18日～20日) 有機シリカ粒子と有機シリカ粒子技術、nano tech 2009 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議, 東京ビッグサイト (東京都江東区有明)

(2) 中村教泰, 石村和敬 (2008年11月1日) 有機シリカ粒子技術による新規なイメージングプローブの開発、第17回日本バイオイメージング学会, 千葉大学けやき会館 (西千葉地区)

(3) 中村教泰, 石村和敬 (2008年6月29日、30日) 新規な有機シリカナノ粒子の作製とDDSへの応用、第24回日本DDS学会, 六本木アカデミーヒルズ (東京都港区六本木)

(4) 中村教泰, 石村和敬 (2008年6月14日) 新規な有機ナノシリカ粒子の作製と光線力学的治療への応用、第18回日本光線力学学会, テレピアホール (愛知県名古屋市東区東桜)

(5) 中村教泰, 石村和敬 (2008年5月7日) 新規な有機ナノシリカ粒子の作製と多機能化、ナノ学会第6回大会, 九州大学医学部百

周年記念講堂

(6) Michihiro Nakamura, Masayuki Shono, Kazunori Ishimura. (September 1-6(5), 2007) Preparation and characterization of novel biofunctionalized fluorescent silica nanoparticles and their possibility for photodynamic therapy. 12th Congress of the European Society for Photobiology, University of Bath, U.K.

(7) 中村教泰, 石村和敬 (2007年12月11日(火)～15日(土) (14日) 蛍光色素含有ナノシリカ粒子の作製と評価、BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会) パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

(1) Nakamura, M. (2009). Approaches to Biofunctionalization of Spherical Silica Nanomaterials. In: Kumar C.S.S.R., editor. Nanomaterial for Life Sciences Volume 2: Nanostructured Oxides. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany; 109-161

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

(1) 名称: ナノ機能性シリカ粒子およびその製造方法

発明者: 中村教泰

権利者: 徳島大学

種類: 国際出願

番号: PCT/JP2008/72285

出願年月日: 2008年12月8日

国内外の別: 外国

(2) 名称: フローサイトメトリーによる生体分子の定量又は細胞の検出・分取に用いる蛍光シリカ粒子、及び複数個の蛍光シリカ粒子を組み合わせたキット

発明者: 會澤英樹、大久保典雄、中村教泰、三好弘一

権利者: 徳島大学、古河電気工業株式会社

種類: 国内出願

番号: 特願 2008-177413

出願年月日: 2008年7月7日

国内外の別: 国内

(3) 名称: フローサイトメトリーによる細胞の検出・分取システム、及び検出・分取方法

発明者: 會澤英樹、大久保典雄、中村教泰、三好弘一

権利者: 徳島大学、古河電気工業株式会社



種類: 国内出願  
番号: 特願 2008-177409  
出願年月日: 2008 年 7 月 7 日  
国内外の別: 国内

(4) 名称: 多機能性を有する新規なナノシリカ粒子の製造方法と用途

発明者: 中村教泰  
権利者: 徳島大学  
種類: 国内出願  
番号: 特願 2007-316466  
出願年月日: 2007 年 12 月 6 日  
国内外の別: 国内

(5) 名称: 新規なナノシリカ粒子の製造方法と用途

発明者: 中村教泰  
権利者: 徳島大学  
種類: 国際出願  
番号: PCT/JP2007/61587, WO-2007-142316  
出願年月日: 2007 年 6 月 7 日  
国内外の別: 外国

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 教泰 (NAKAMURA MICHIIHIRO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号: 10314858

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者