

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02591

研究課題名(和文)近赤外増強ラマンナノプローブ法の開発と外場励起ガン細胞壊死機構解明への応用

研究課題名(英文) Development of Near-Infrared Enhanced Raman Nanoprobe Method and Application to Analysis of Mechanism; External Field Excitation Cancer Cell Necrosis

研究代表者

谷中 淳(Taninaka, Atsushi)

筑波大学・数理工学系・客員准教授

研究者番号：80400638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：シングルビーム誘導ラマン分光の開発を行い、液晶偏光子を組み込み、金を蒸着したガラスピペットにグルタチオンを滴下した試料で、著しいピーク強度の上昇が観察された。これにより探針増強赤外励起ラマン分光を実証した。スーパーコンティニウムレーザーを組み合わせ、低波数帯域の測定に有効なマルチプレックスコヒーレント・アンチストークスラマン散乱顕微鏡を開発した。これにより、硫黄結晶の相転移の空間変化と準安定状態を可視化した。

光線力学療法を施したガン細胞に対して原子間力顕微鏡を用いた局所弾性率測定を行い、弾性率の増加からアクチンフィラメントの状態を観察することで、細胞内機序の観察が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した近赤外増強ラマンナノプローブ法をさらに発展させれば、生体内において低波数振動を持つタンパク質や高分子のミクロ特性評価を進めることが可能になり、蛍光観察を行うことで細胞内基質にダメージを与えるような場合や活性酸素が蛍光プローブを失活させてしまうような実験に対して最適な手法の一つであり、アクチンフィラメントの定量や、測定が難しい細胞中の活性酸素量、および細胞が受けているストレスを弾性率の増加から見積もることが可能である。今後の展開において重要な役割を担うことが期待される。

研究成果の概要(英文)： We developed Single-beam induced raman spectroscopy, and a significant increase in peak intensity was observed in glutathione molecules dropped on a glass pipette deposited gold nanoparticles with a built-in liquid crystal polarizer. This demonstrated the feasibility of tip enhanced Near-Infrared raman spectroscopy. Then, we developed a multiplex coherent anti-Stokes raman scattering microscope in combination with a supercontinuum laser, which is effective for low wavenumber region. Spatial variation of a sulfur crystal phase transition with metastable states was visualized.

Local elastic moduli measurements using atomic force microscopy were performed on cancer cells treated with photodynamic therapy, and the increase in elastic moduli allowed observation of actin filaments and intracellular mechanisms.

研究分野：表面化学

キーワード：ナノ顕微技術 生体計測 ラマン分光 ナノプローブ ガン細胞の特性

### 1. 研究開始当初の背景

日本において死因の第一位はガンであり、その割合は年々増加しているため、対策が急務である。ガンは人体の免疫機構や修復機構が機能しないことから治療が困難であるため、確実な治療法が確立されておらず、多くの研究が行われている。近年、放射線治療や抗ガン剤治療に比べて非侵襲的で副作用の少ない、物理的な外場をガン細胞に印加することで、壊死に導く方法が実証されつつある。その治療方法は、光線力学的療法、交流電場腫瘍治療システム、ガン温熱治療などである。しかし、これらの治療法において、ガン細胞の壊死メカニズムは未解明である。従って、ガン治療にブレイクスルーを起こすには、どのような化学変化が細胞のどこで発生し、どのように細胞を破壊するかという、壊死に至る一連のプロセスの理解が急務であるが未解明ということであり、ガン治療のブレイクスルーに至らない原因である(図1)。具体的な例として、我々の先行研究の結果では、(1)交流電場腫瘍治療システムはガン細胞に数 kHz から数十 MHz の交流電場を印加することで、ガン細胞の増殖・浸潤の抑制や壊死させることができる治療方法である。しかし、現在考えられている、細胞分裂時に分裂部に電界が大きくかかり増殖を抑制するモデルは電場印加後の細胞の状態を説明できない。(2)光線力学的療法は光感受性物質をガン細胞に取り込ませ、特定波長のレーザーを照射すると活性酸素が発生しガン細胞のみ壊死させることができる治療法であるが、活性酸素の発生からガン細胞が膨張し破裂するプロセスについては未解明である。

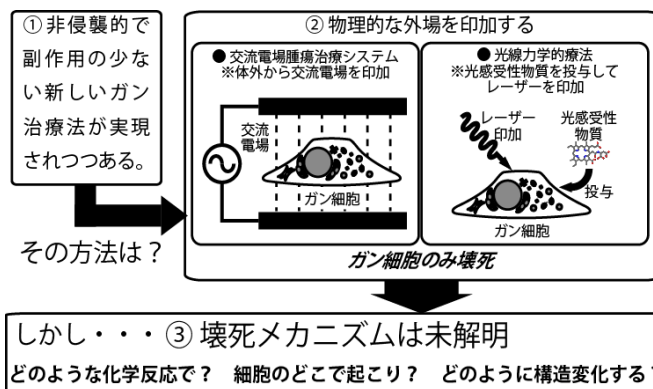
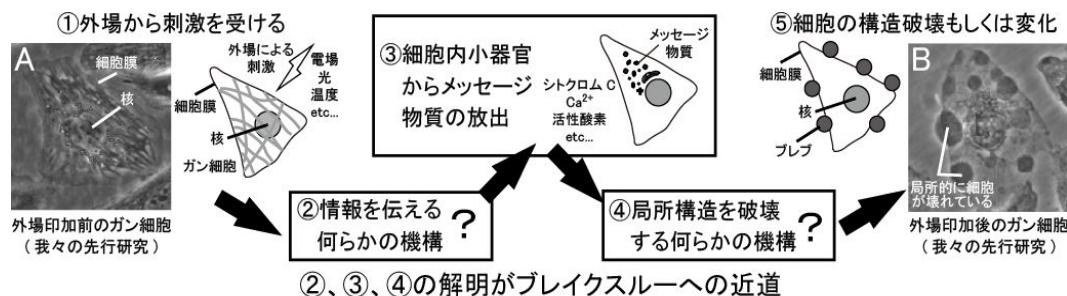


図1 ガンの新しい治療方法とブレイクスルーへの課題

### 2. 研究の目的

図2に示すとおり、細胞壊死までの一連のプロセスの解明がガン治療のブレイクスルーへの近道となるが、現在は、一部のプロセスを阻害、例えば活性酸素を分解する酵素を遺伝子操作で欠損させ、細胞死が起こるかどうかが逐次探索する方法であるため、極めて効率が悪く、細胞死に至る全体のプロセスを解明することが困難である。そこで、細胞表面をナノレベルで観察可能で、局所弾性率を測定可能な原子間力顕微鏡(AFM)と、無染色で細胞内分子の同定や化学変化を追跡できる近赤外励起ラマン分光法を組み合わせ、探針増強ラマン分光法を実現することで、細胞の微細構造観察と局所構造変化をリアルタイムで測定可能にする複合型顕微鏡を開発し、電場、光および温度によってガン細胞壊死を誘起し、細胞死に至る全体のプロセスをラマン分光による細胞内部の化学変化の観察とナノレベルの表面探索技術によって細胞死に至る一連のプロセスを効率的に解明し、新たなガン治療開拓のための基盤を確立する。



しかし、逐次探索する方法では効率が悪く、細胞死に至る全体のプロセスを解明することは困難

図2 先行研究で観察したガン細胞の様子と一連のプロセスの概要

### 3. 研究の方法

本研究では、図に示した複合型顕微鏡を開発し、先行実験で開発済みの外場印加システムにより電場、光および熱を印加した細胞を、AFMによる局所弾性率測定と近赤外励起ラマン分光測定を同時に行い、ガン細胞壊死に至るプロセスの解明を行った。

(1) AFMによる細胞の局所弾性率測定が可能なように倒立型顕微鏡を導入し、AFMの他のプローブ顕微鏡やラマン散乱光を集光あるいは励起光を入射できるように倒立型顕微鏡の改良および開発を行った。近赤外励起ラマン分光の開発は、使用するレーザーにあわせて逐次光学系を変更できるようにし、自発ラマン散乱、誘導ラマン散乱、マルチプレックスコヒーレントアンチストークスラマン散乱を順次測定できるように開発を行った。誘導ラマン分光が行えるようになったところで、探針増強用のカンチレバーとピペットを、金を蒸着することで作製し、液晶偏光子を用いて探針増強効果が得られるか実験を行った。また、金粒子にポルフィリンを化学修飾することで細胞内へ金粒子を導入し、金粒子による表面増強ラマン分光を行った。

(2) 近赤外励起ラマン分光の開発と平行して、外場印加システムにより電場、光および熱を印加したガン細胞の局所弾性率の変化を、AFMを用いて測定し、外場によって誘導される細胞内機序の観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 探針増強近赤外励起ラマン分光の開発と測定

倒立顕微鏡と赤外分光器を組み合わせ、励起光 1064nm における自発ラマン分光を測定した。470 $\text{cm}^{-1}$  付近にアモルファスシリコンの幅広いピークを観察できたが、ピーク強度が低く、ガン細胞では細胞壊死が起こるまでレーザー強度と測定時間を上げてみたもののピークを観察できなかったため、レーザーをフェムト秒 Ti サファイアレーザーに変更し、シングルビーム誘導ラマン分光 [1]の開発を行った。十分なピーク強度が得られたところで、光学系に液晶偏光子を組み込み、グルタチオンのラマンスペクトルを測定した。図 4 に結果を示す。金表面上にグルタチオンを滴下した場合、液晶偏光子あり/なしでピーク強度はわずかに上昇するに留まったが、液晶偏光子ありで、金を蒸着したガラスピペットにグルタチオンを滴下した場合には著しいピーク強度の上昇が観察された。このことから、探針増強赤外励起ラマン分光が可能であることを実証した。この成果をもって特許を取得した(特願 2019-085774号)。

探針増強赤外励起ラマン分光が可能になったものの、得られたラマンスペクトルは光の干渉などによるアーチファクトが現れており、また、スペクトルの波数範囲が狭く、細胞内の様々な物質のスペクトルを得ることが難しいことがわかったため、レーザーをスーパーコンティニウムレーザーへ変更し、マルチプレックスコヒーレントアンチストークスラマン分光(マルチプレックス CARS) [2]の開発を行った。スーパーコンティニウム光源と近赤外高感度 InGaAs ダイオードアレイを組み合わせることで、低波数帯域の測定に有効なマルチプレックスコヒーレント・アンチストークスラマン散乱顕微鏡を開発した。このシステムにより 55 $\text{cm}^{-1}$  までの低波数域を高感度で観測することが可能となった。これにより硫黄結晶の相転移の空間変化と準安定状態を可視化した(図 5)。以上の結果を Appl. Phys. Express 14, 122006 (2021)へ報告した [3]。開発した近赤外増強ラマンナノプローブ法をさらに発展させれば、生体内において低波数振動を持つタンパク質や高分子のミクロ特性評価を進めることが可能になる。

金蒸着したピペットを用い、マルチプレックス CARS で探針増強効果が得られるか実験を行ったが、ラマン散乱光の反射により強度は強くなるものの、増強効果は得られなかった。これはピペットに蒸着した金粒子は 1064nm で表面プラズモンを励起できないためだと考えられる。今後は 1064nm でプラズモン励起される金ナノロッドを探針先に修飾する、あるいは細胞内に導入し増強効果を実証する。

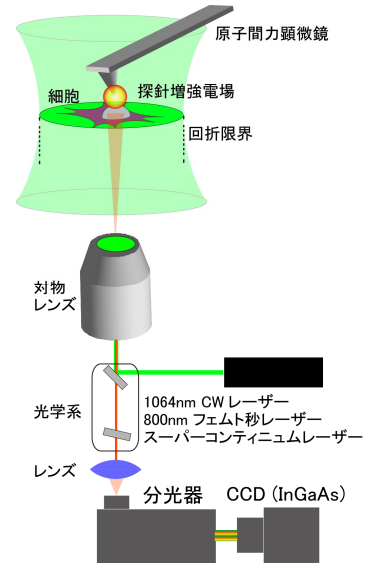


図 3 複合型顕微鏡概要図

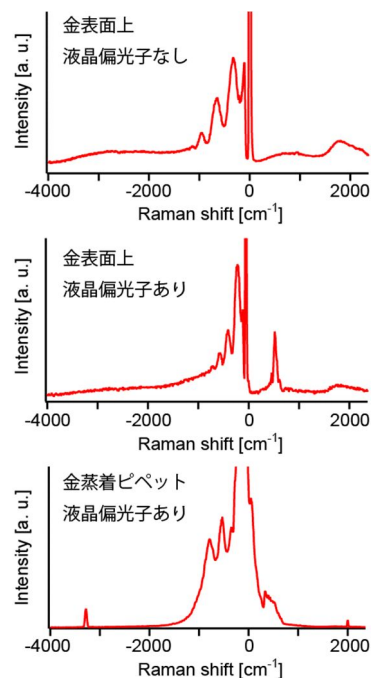


図 4 探針増強 CARS

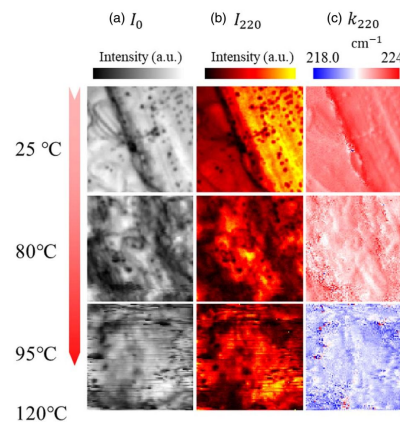


図 5 硫黄の相転移とラマンスペクトルの空間マッピング [3]

## (2) 外場印加によるガン細胞の局所弾性率の変化

培養したガン細胞にタラポルフィリンナトリウムを添加し、光線力学療法(Photo Dynamic Therapy:PDT)を行った後、AFM を用いた細胞の局所弾性率測定を行い、弾性率の増加から細胞内のアクチンフィラメントの状態を観察した。また、併せて、アクチンフィラメントの蛍光観察および細胞骨格制御に関わる制御因子である RhoA の濃度をウェスタンブロットによって測定し、アクチンフィラメント増産の様子を確認した。これら結果を比較検討することで、PDT によって細胞壊死と血流障害が生じる機序を明らかにすることを試みた。図 6 に PDT 前後における同一細胞の弾性率マップを示す。PDT 前後において、細胞核付近および細胞全体の平均弾性率は上昇

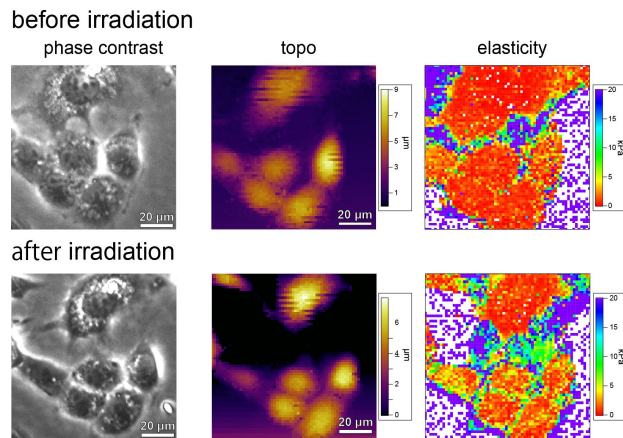


図 6 光照射前後におけるガン細胞の弾性率変化[4]

していることがわかった。PDT は光を照射すると活性酸素が発生しガン細胞のみ壊死させることができる治療法であるため、言い換えると、細胞の弾性率の増加から、測定が難しい細胞中の活性酸素量の測定および細胞が受けているストレスの定量化が可能であることを示している。また、蛍光観察から PDT 開始直後からアクチンフィラメントの増産が起こり始めていたが、弾性率は光照射後 5 分程度 37 でインキュベートしなければ上昇しないことがわかった。これは発生した活性酸素によって RhoA が活性化し、活性化した RhoA は ROCK と結合し、ミオシン活性化とアクチンフィラメントを産生する機序が動作し始める。活性酸素発生から活性 RhoA が ROCK と結合する時間は 1 分以内、ミオシン活性化とアクチンフィラメントが産生される時間は 5 分以上である。ミオシン活性化が過剰に促進された場合、プレビングを開始し、60 分程度で膨潤後、破裂する。これまでの間に、直接破壊されず、プレビングしなかった細胞だけがアクチンフィラメントの産生によって血流障害を引き起こすと考えられる。以上の結果を RSC Advances 2022, 12, 5878-5889 へ報告した [4]。

この手法は、蛍光観察を行うことで細胞内基質にダメージを与えるような場合や活性酸素が蛍光プローブを失活させてしまうような実験に対して最適な手法の一つであり、アクチンフィラメントの定量や、測定が難しい細胞中の活性酸素量、および細胞が受けているストレスを弾性率の増加から見積もることが可能である。今後の展開において重要な役割を担うことが期待される。

### <引用文献>

- [1] L. Ren, I. Hurwitz, D. Raanan, P. Oulevey, D. Oron, and Y. Silberberg, *Terahertz Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy*, *Optica* **6**, 52 (2019).
- [2] G. I. Petrov, V. V. Yakovlev, A. V. Sokolov, and M. O. Scully, *Detection of Bacillus Subtilis Spores in Water by Means of Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy*, *Opt. Express* **13**, 9537 (2005).
- [3] Y. Arashida, A. Taninaka, T. Ochiai, H. Mogi, S. Yoshida, M. Yoshimura, O. Takeuchi, and H. Shigekawa, *Low-Frequency Multiplex CARS Microscopy with a High-Repetition near-Infrared Supercontinuum Laser*, *Appl. Phys. Express* **14**, 122006 (2021).
- [4] A. Taninaka, S. Ugajin, H. Kurokawa, Y. Nagoshi, M. Kamiyanagi, O. Takeuchi, H. Matsui, and H. Shigekawa, *Direct Analysis of the Actin-Filament Formation Effect in Photodynamic Therapy*, *RSC Adv.* **12**, 5878 (2022).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yoshida Shoji, Arashida Yusuke, Hirori Hideki, Tachizaki Takehiro, Taninaka Atsushi, Ueno Hiroki, Takeuchi Osamu, Shigekawa Hidemi	4. 巻 8
2. 論文標題 Terahertz Scanning Tunneling Microscopy for Visualizing Ultrafast Electron Motion in Nanoscale Potential Variations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Photonics	6. 最初と最後の頁 315 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsp Photonics.0c01572	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 -
1. 著者名 Kurokawa Hiromi, Taninaka Atsushi, Shigekawa Hidemi, Matsui Hirofumi	4. 巻 -
2. 論文標題 The cytotoxicity of cyclophosphamide is enhanced in combination with monascus pigment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jc bn.20-197	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 -
1. 著者名 Arashida Yusuke, Taninaka Atsushi, Ochiai Takahiro, Mogi Hiroyuki, Yoshida Shoji, Yoshimura Masamichi, Takeuchi Osamu, Shigekawa Hidemi	4. 巻 14
2. 論文標題 Low-frequency multiplex CARS microscopy with a high-repetition near-infrared supercontinuum laser	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Physics Express	6. 最初と最後の頁 122006 ~ 122006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1882-0786/ac39b1	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 -
1. 著者名 Kurokawa Hiromi, Taninaka Atsushi, Shigekawa Hidemi, Matsui Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Dabigatran Etexilate Induces Cytotoxicity in Rat Gastric Epithelial Cell Line via Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2508 ~ 2508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10102508	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 -

1. 著者名 Kurokawa Hiromi、Taninaka Atsushi、Yoshitomi Toru、Shigekawa Hidemi、Matsui Hirofumi	4. 巻 27
2. 論文標題 Near-Infrared Light Irradiation of Porphyrin-Modified Gold Nanoparticles Promotes Cancer-Cell-Specific Cytotoxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1238 ~ 1238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27041238	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 -

1. 著者名 Taninaka Atsushi、Ugajin Shunta、Kurokawa Hiromi、Nagoshi Yu、Kamiyanagi Mayuka、Takeuchi Osamu、Matsui Hirofumi、Shigekawa Hidemi	4. 巻 12
2. 論文標題 Direct analysis of the actin-filament formation effect in photodynamic therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 5878 ~ 5889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1ra09291j	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 谷中淳、宇賀神駿太、黒川宏美、斎藤浩太郎、名越優、武内修、松井裕史、重川秀実
2. 発表標題 細胞の弾性率マップを用いた光線力学療法における局所効果の可視化
3. 学会等名 Laser Week in Kochi (第41回日本レーザー医学会総会、第30回日本光線力学学会学術講演会、第16回日本脳神経外科光線力学学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川宏美、宇賀神駿太、谷中淳、重川秀実、松井裕史
2. 発表標題 Porphyliipoproteinのがん特異的PDT効果と胆管がんに対するPDT効果のin vitro/ in vivo検証
3. 学会等名 Laser Week in Kochi (第41回日本レーザー医学会総会、第30回日本光線力学学会学術講演会、第16回日本脳神経外科光線力学学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 名越 優, 谷中 淳, 宇賀神駿太, 黒川 宏美, 武内 修, 松井 裕史, 重川 秀実
2. 発表標題 光線力学療法により生じるガン細胞の局所弾性率変化のAFM観察
3. 学会等名 2020年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇賀神 駿太, 谷中 淳, 黒川 宏美, 斎藤 浩太郎, 名越 優, 武内 修, 松井 裕史, 重川 秀実
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた酸化ストレスによるガン細胞弾性率変化の観察
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会 フリーラジカルスクール
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇賀神 駿太, 谷中 淳, 黒川 宏美, 斎藤 浩太郎, 名越 優, 武内 修, 松井 裕史, 重川 秀実
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた光線力学療法がガン細胞に及ぼす効果の解析
3. 学会等名 2019年 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Arashida, A. Taninaka, T. Ochiai, K. Saito, S. Ugajin, H. Kurokawa, H. Matsui, S. Yoshida, O. Takeuchi, M. Yoshimura, H. Shigekawa
2. 発表標題 Development of tip-enhanced single beam coherent anti-stokes Raman scattering microscopy
3. 学会等名 27th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM27) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上柳 舞弓花, 谷中 淳, 宇賀神 駿太, 名越 優, 黒川 宏美, 武内 修, 松井 裕史, 重川 秀実
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた光線力学療法における作用機序の解析
3. 学会等名 2021年第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M Kamiyanagi, A Taninaka, Y Nagoshi, S Ugajin, H Kurokawa, H Matsui, O Takeuchi, and H Shigekawa
2. 発表標題 Direct Observation of Effects of Photodynamic Therapy using Atomic Force Microscopy
3. 学会等名 29th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM29) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 観察システム、観察方法	発明者 重川 秀実、谷中 淳	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-085774	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 Observation system and observation method	発明者 H. Shigekawa, A. Taninaka	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/017681	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

筑波大学 重川研究室 <a href="https://dora.bk.tsukuba.ac.jp/">https://dora.bk.tsukuba.ac.jp/</a>
---



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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------