

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19908

研究課題名（和文）生体透過性の高い近赤外線でガン治療をするためのヤヌス型金ナノ粒子の開発

研究課題名（英文）Development of Janus-shaped gold nanoparticles for cancer treatment using highly biopermeable near-infrared light

研究代表者

居城 邦治（Ijiro, Kuniharu）

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：90221762

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、近赤外（NIR）光を吸収し発熱する金ナノ粒子を温度応答性リガンドで被覆し、光熱変換により疎水性となり界面活性効果が発現することで、細胞膜を破壊するシステムを開発した。金ナノディスク表面に弱疎水性リガンドを修飾して温度応答性を付与した結果、金ナノディスクは加熱/冷却に応じて集合/脱集合を示し、良好な分散安定性を示した。続いて、同様のリガンドで修飾した金ナノロッドを培地中でガン細胞と混合しNIR光を照射して、細胞膜破壊の効果を評価した結果、NIR光照射で細胞の生存率が顕著に低下した。以上の結果から、金ナノ粒子の光熱変換能を用いるとNIR光でガン細胞の死滅を誘起できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、「第5のガン治療」として注目されている光免疫療法は、皮膚を透過する近赤外（NIR）光で色素を反応させ、ガン細胞を特異的に死滅させることができるが、細胞膜の破壊効率、色素分子の吸収波長、内在的な毒性の面で改善の余地がある。一方で、本研究により、金ナノ粒子の形状を制御することで、より生体透過性が高いNIR領域にプラズモン吸収波長を設定できることが明らかとなった。さらに、金ナノ粒子の光熱変換能により、NIR光でガン細胞の死滅を誘起できることが分かった。本研究で得られた成果により、標的細胞の破壊効率が高く、毒性を低減した新たな光免疫療法への応用展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this research, we aimed to develop a photothermal therapeutic system to disrupt cancer cell membranes with gold nanoparticles (AuNPs) that absorb near-infrared (NIR) light. The AuNPs were modified with temperature-responsive ligands to express surfactant effect that destroys cell membranes via photothermal conversion. Firstly, a disc (AuND) was modified with a weakly hydrophobic ligand to provide temperature responsivity. As a result, it showed assembly/disassembly according to heating/cooling with good dispersibility. Next, a rod (AuNR) was mixed with cancer cells in a culture medium and irradiated with NIR light to demonstrate cell membrane disruption. As a result, cell viability was significantly reduced with NIR light irradiation. These results revealed that the photothermal conversion of AuNPs enables to induce the death of cancer cells with NIR light efficiently.

研究分野：コロイド化学、高分子化学、ナノマテリアル

キーワード：金ナノ粒子 ヤヌス型ナノ粒子 自己集合 光免疫療法 近赤外 光熱変換

1. 研究開始当初の背景

近年、ガン治療法として、手術、放射線、抗がん剤、免疫療法に続き、光免疫療法が「第5のガン治療」として注目されている。この療法はガン細胞に結合する抗体に波長 700 nm で反応する色素分子を結合させたものを投与してガン細胞表面に色素を送り込み、皮膚を透過する近赤外光の照射により色素を反応させることで細胞の膜障害を誘起してガン細胞を特異的に破壊するものである。これは非常に画期的な手法であり積極的に臨床試験が進められているが、細胞膜の破壊効率、色素分子の吸収波長、内在的な毒性の点で改善の余地がある。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者がこれまで開発してきた2つの技術、即ち (1) 温度応答性リガンドで修飾した金ナノ粒子の集合化手法と、(2) 金ナノ粒子表面の上半分と下半分をそれぞれ親水性/疎水性リガンドで被覆するヤヌス型粒子の作製手法を組み合わせ、近赤外 (NIR) 光で活性化して細胞膜を破壊する金ナノ粒子の創製に取り組んだ。具体的には、細胞膜表面に吸着し留まりやすい形状の円盤状金ナノ粒子 (金ナノディスク) および棒状金ナノ粒子 (金ナノロッド) を親水性/弱疎水性リガンドで修飾して用いた。生体温度では金ナノ粒子は親水性を示すが、プラズモンニック波長である NIR 光を照射すると、光熱変換により局所的に温度が上昇し、温度応答リガンドが疎水性へと変化する。この作用により両親媒性が発揮され、界面活性効果によって標的細胞の細胞膜が破壊されると期待した。本手法の達成により、生体透過性が高い NIR 光を用いて、標的細胞の破壊効率が高く、毒性を低減した新たな光免疫療法が可能となる。

3. 研究の方法

(1) 金ナノ粒子 (棒状・円盤状) の調製とリガンド修飾

始めに金ナノロッド (AuNR) と金ナノディスク (AuND) を調製した。AuNR は既報の手順で作製した。AuND の作製は、まず塩化金酸 (Au^{3+}) を還元剤により金原子 (Au^0) にしてシード粒子を作製し、その後、界面活性剤を含む成長溶液中で異方的に成長させて、三角形の金ナノプレートを作製した。その後、塩化金酸 (Au^{3+}) を再添加して、三角形の鋭角を化学的にエッチングすることで AuND を調製した。エッチング時間を調整することで、2種のサイズ (直径 60 nm および 100 nm) の AuND を得た。これらの AuND に対して、透過型電子顕微鏡 (TEM)、動的光散乱 (DLS)、UV-Vis 吸収スペクトル測定を行った。

(2) 金ナノディスクへの温度応答性リガンド修飾と評価

得られた AuND の表面を温度応答性リガンドで修飾し、温度変化による AuND の集合/脱集合挙動を調査した (図 1)。表面修飾リガンド分子として、オリゴエチレングリコール (OEG) を有する2種類のアルカンチオールを用いた。具体的には、末端にメチル基を有する温度応答性リガンド (C1) と、カルボキシル基を有する分散性向上リガンド (COOH) を用い、様々な比率で混合して AuND に修飾した。続いて、得られた温度応答性 AuND の消光スペクトルを、温調機能を備えた UV-Vis 分光光度計で加温/冷却しながら測定し、AuND の集合/脱集合によるピークの変化を追跡した。

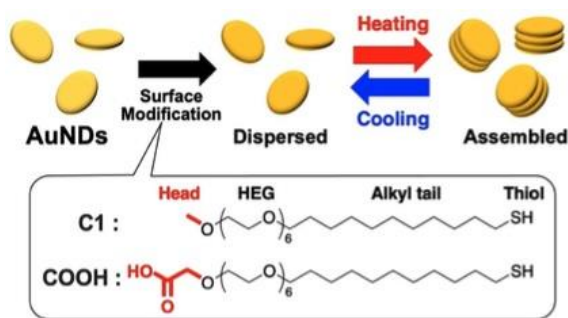


図 1 温度応答性リガンドを修飾した AuND の加熱/冷却による集合/脱集合

(3) 温度応答性金ナノ粒子を用いた細胞膜破壊能の評価

始めに、培地中での金ナノ粒子の安定性および温度応答性を確認した。具体的には、C1 リガンドで修飾した AuND と AuNR を DMEM 培地 (FBS (-)) に分散させ、UV-Vis 分光光度計で消光スペクトルを測定し評価した。続いて、Hela 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、24 時間の通常培養 (37°C、5% CO_2) の後、DMEM 培地 (FBS (-)) 中で AuNR を混合し 3 時間培養した。続いて、細胞を PBS バッファーで洗浄した後、DMEM 培地 (FBS (-)) 中で NIR 光照射 (LED 光源、波長: 810 nm, 76.6 mW) を所定時間行った。その後、細胞の生死を判定する試薬 (死細胞: Trypan Blue 染色、生細胞: CCK-8 アッセイ) を用いて、金ナノ粒子の細胞膜破壊能が光照射により誘起されたかを評価した。

4. 研究成果

(1) 金ナノディスクの調製とリガンド修飾

作製した AuND を TEM (図 2a,b) および DLS (図 2c) で評価した結果、直径 100 nm および 60 nm の均一な AuND が形成したことが分かった。また、UV-Vis 吸収スペクトル測定の結果、近赤外光領域にプラズモン吸収に起因するピークが確認され、直径が大きいほど長波長側に現れた (直径 60 nm : 吸収ピーク 715 nm、直径 100 nm : 吸収ピーク 827 nm)。この結果から、AuND のサイズを調整することで、近赤外光の吸収波長を制御できることが示された。

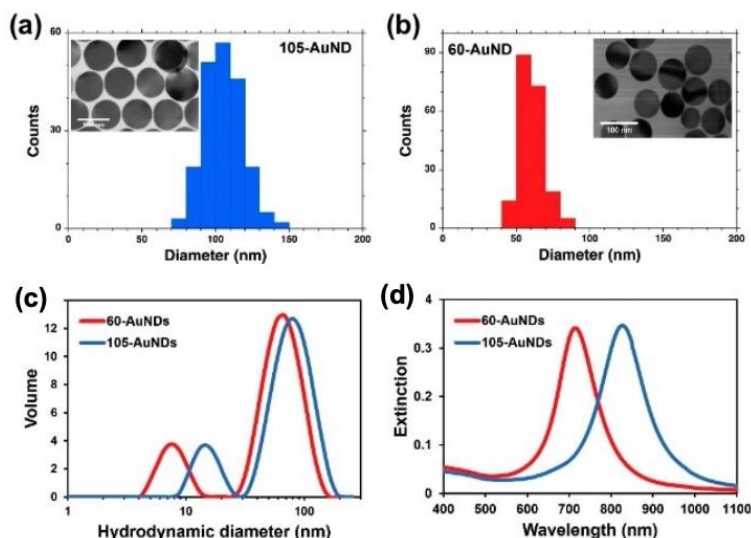


図 2 AuND の評価。(a,b) TEM 画像と直径のヒストグラム : (a) 直径 100 nm、(b) 直径 60 nm。(c) DLS および (d) UV-Vis 吸収スペクトル測定の結果。青 : 直径 100 nm、赤 : 直径 60 nm。

(2) 金ナノディスクへの温度応答性リガンド修飾と評価

続いて AuND の表面に、末端にメチル基を有する弱疎水性リガンド (C1) とカルボン酸を有する親水性リガンド (COOH) を混合して修飾し、温度応答性を付与した。その結果、カルボン酸リガンドを 1%~5% 加えることで、加熱/冷却に応じて集合/脱集合を示す金ナノディスクが調製できた (図 3a,b)。また、カルボン酸リガンドの比率を変えることで、集合温度を微調整できることが分かった。この温度応答性は可逆的で、繰り返し可能であった (図 3d)。特筆すべき点として、この温度応答性 AuND は、集合する温度 (T_A) は高く、脱集合する温度 (T_B) は低い、ヒステリシスを示した (図 3c)。これはカルボキシル基間で形成する水素結合の強さが、疎水的/親水的な環境で変化することに起因していると考えられる。この新たに見出した性質を利用して、医療応用も含めた機能性材料としての展開が期待できる。

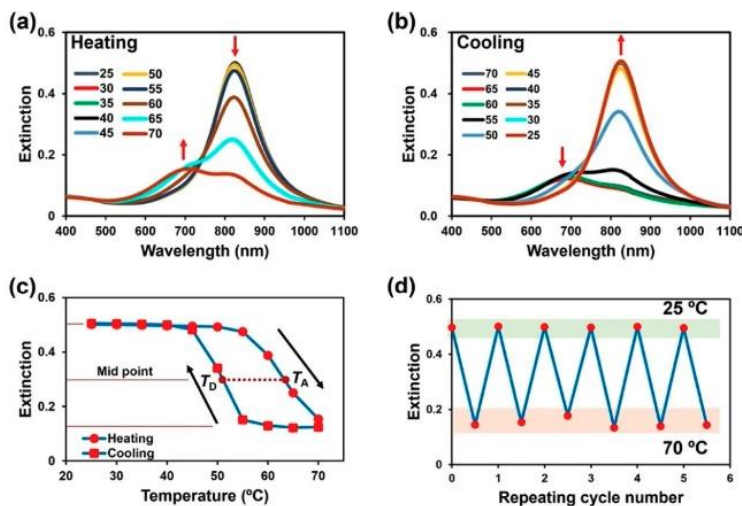


図 3 (a,b) 温度変化させた際の AuND (直径 100 nm) の消光スペクトル : (a) 加熱過程、(b) 冷却過程。矢印はピークの増減方向を示している。(c) 温度変化に対する消光ピーク強度の変化 (波長 : 827 nm)。矢印は加熱→冷却の過程を示している。(d) 加熱・冷却を繰り返した際の、消光ピーク強度の可逆的な変化 (波長 : 827 nm)。

(3) 温度応答性金ナノ粒子を用いた細胞膜破壊能の評価

まず温度応答性 AuND を用いて、生理条件下でガン細胞に対する膜破壊能の評価を試みた。しかし、DMEM 培地中で AuND を HeLa 細胞に添加すると AuND の凝集が起こり、正確な細胞膜破壊能の評価は困難であった。一方、AuNR を用いて弱疎水性リガンドとカチオン性リガンドを適切な比率で修飾することで、培地中でも安定に分散し温度応答性を示す AuNR を得ることができた。この AuNR を DMEM 培地中で HeLa 細胞とインキュベートし、NIR 光を照射して細胞膜破壊効果を評価した。Trypan Blue 染色 (図 4a) および CCK-8 アッセイ (図 4b) による細胞毒性を評価した結果、NIR 光の照射で細胞の生存率が顕著に低下した (照射無し : 76% → 照射有り : 36%)。この結果から、金ナノ粒子の光熱変換能により、生体透過性が高い NIR 光でガン細胞の死滅を誘起できることが分かった。今後は本システムの詳細な作用機序を解明し、in vivo での応用実験を検討してゆく。

本研究で得られた成果により、標的細胞の破壊効率が高く、毒性を低減した新たな光免疫療

法への応用展開が期待できる。

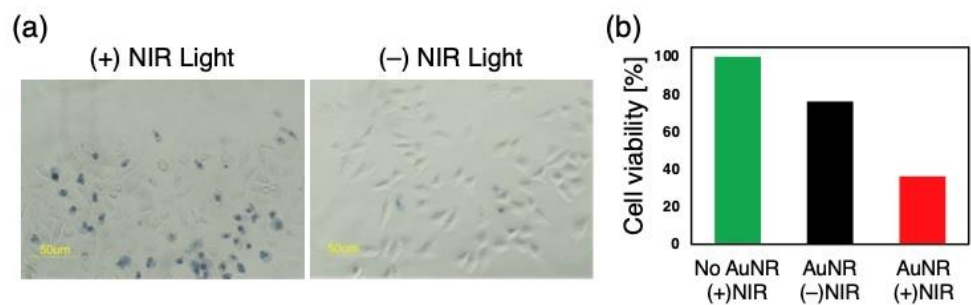


図4 (a) AuNR とインキュベート後、NIR 光を照射 (左) および非照射 (右) して Trypan blue 染色した HeLa 細胞の顕微鏡画像。(b) CCK-8 アッセイによる細胞毒性の評価。緑 : AuNR(-) NIR 光(+), 黒 : AuNR(+), NIR 光(-), 赤 : AuNR(+), NIR 光(+). NIR 光照射条件 : 波長 810 nm、76.6 mW、20 分間。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kong Li, Wang Luyang, Shi Yali, Peng Lin, Liang Xingguo, Wang Guoqing, Mitomo Hideyuki, Takarada Tohru, Ijio Kuniharu, Maeda Mizuo	4. 巻 5
2. 論文標題 DNA-Functionalized Silver Nanoparticles in an Alcoholic Solvent for Environment-Dictated Multimodal Actuation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 10321 ~ 10330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsanm.2c01493	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 該当する
1. 著者名 Nakano Miki, Miyashita Osamu, Joti Yasumasa, Suzuki Akihiro, Mitomo Hideyuki, Niida Yoshiya, Yang Ying, Yumoto Hirokatsu, Koyama Takahisa, Tono Kensuke, Ohashi Haruhiko, Yabashi Makina, Ishikawa Tetsuya, Bessho Yoshitaka, Ijio Kuniharu, Nishino Yoshinori, Tama Florence	4. 巻 9
2. 論文標題 Three-dimensional structure determination of gold nanotriangles in solution using X-ray free-electron laser single-particle analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optica	6. 最初と最後の頁 776 ~ 776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OPTICA.457352	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 該当する
1. 著者名 Mba Joshua Chidiebere, Mitomo Hideyuki, Yonamine Yusuke, Wang Guoqing, Matsuo Yasutaka, Ijio Kuniharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Hysteresis in the Thermo-Responsive Assembly of Hexa(ethylene glycol) Derivative-Modified Gold Nanodiscs as an Effect of Shape	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1421 ~ 1421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano12091421	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 該当する
1. 著者名 Lin Han, Mitomo Hideyuki, Yonamine Yusuke, Guo Zhiyong, Ijio Kuniharu	4. 巻 34
2. 論文標題 Core?Gap?Shell Nanoparticles@Polyaniline with Tunable Plasmonic Chiroptical Activities by pH and Electric Potential Dual Modulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry of Materials	6. 最初と最後の頁 4062 ~ 4072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemmater.2c00313	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 丹羽萌乃佳、三友秀之、熊 坤、与那嶺雄介、居城邦治
2. 発表標題 生体環境中における分散性改善に向けた温度応答性金ナノ粒子の表面分子デザイン
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊 坤、三友秀之、与那嶺雄介、居城邦治
2. 発表標題 金ナノ粒子表面のアルカンチオール交換による表面物性の再設計
3. 学会等名 第73回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xiong Kun, Hideyuki Mitomo, Honoka Niwa, Yusuke Yonamine, Kuniharu Ijiri
2. 発表標題 Surface Design of Thermo-Responsive Gold Nanoparticles Coated with OEG-Based Alkane Thiols for Medical Applications
3. 学会等名 The 22nd International Vacuum Congress
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丹羽萌乃佳、三友秀之、熊 坤、与那嶺雄介、居城邦治
2. 発表標題 フォトサーマルセラピー応用に向けた温度応答性金ナノ粒子の表面分子デザイン
3. 学会等名 第32回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Joshua Chidiebere Mba, Hideyuki Mitomo, Yusuke Yonamine, Yasutaka Matsuo and Kuniharu Ijiro
2. 発表標題 Hysteresis on assembly/disassembly of gold nanodiscs coated with thermo-responsive molecules
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山亮、三友秀之、与那嶺雄介、居城邦治
2. 発表標題 溶媒に依存して可逆的に形成する金ナノ粒子ベシクル
3. 学会等名 第32回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kuniharu Ijiro
2. 発表標題 Biomimetic self-assembly of nanoparticles in solutions
3. 学会等名 9th NaBIS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kuniharu Ijiro
2. 発表標題 Self-Assembly of Gold Nanoparticles in Solution
3. 学会等名 RIES-CEFMS Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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