

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651112

研究課題名（和文） 発熱誘導 DDS 用パーソナルバイオナノ粒子の創成と機能評価

研究課題名（英文） Fabrication of a tailor-made and heat generating bio-nanoparticle for DDS

研究代表者

岩堀 健治 (IWAHORI KENJI)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・研究員

研究者番号：90467689

研究成果の概要（和文）：

本研究において詳細にナノ粒子形成条件を検討する事により直径 12 nm の馬由来フェリチンタンパク質の内部空洞内（直径 7 nm）に温熱効果を発揮すると考えられる酸化鉄ナノ粒子の作製に成功した。作製した本ナノ粒子集合体はネオジウム磁石への吸着が肉眼で観察されるとともに、XRD や EDX 分析、高分解能電子顕微鏡観察等を行った結果、作製されたナノ粒子はマグネタイト (Fe_3O_4) であることが確認された。また、酸化鉄ナノ粒子以外にも詳細な検討作製条件検討によりフェリチン空洞内への CuS 及び FeS, タンタル (Ta) のナノ粒子の作製にも成功し、現在ひきつづき元素分析及び磁性観察を行っている。さらに最近、より DDS に適しているヒトの心臓由来のフェリチンタンパク質の作製と内部への酸化鉄ナノ粒子の作製にも成功した。今後はこれらの作製したナノ粒子の発熱実験とフェリチン表面への認識ペプチドの結合を行うことでバイオナノ粒子を作製し、機能評価を行う。

研究成果の概要（英文）：

I succeeded to synthesize iron oxide nano-particles (NPs) in a bio-template, apoferritin by some detail investigation of reaction conditions. A diameter of the synthesized NP in the apoferritin is about 5-6 nm and it can bind to Neodymium magnets. It is clear that the synthesized NP consist of Fe_3O_4 by the XRD, EDX analysis and HR-TEM observation. This NP is expected to generate heat for a hyperthermia effect. In addition, I also succeeded to synthesized CuS, FeS, and Ta NPs in the apoferritin cavity. The diameter of CuS NPs in the apoferritin cavity is 5 nm and it consists of Cu_2S by the XRD, EDX analysis. I perform an elemental analysis of the other cores and magnetic observation. Recently, I constructed a plasmid of another apoferritin protein from human heart and I synthesized iron oxide NPs in this apoferritin. Since this apoferritin included NP and is suitable for our DDS and various nanotechnology applications, I continue to elucidate the magnetic character and some improvement of these NPs in the apoferritin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ粒子・ナノチューブ、フェリチン、発熱、磁性、ハイパーサーミア

1. 研究開始当初の背景

近年、がん患者の肉体的、精神的及び治療費の軽減とがん撲滅を目指した多くのがん治療法の開発が行われている。その中で、最近のナノテクノロジー研究成果を利用してナノメートルサイズの籠（ナノケージ）内に治療薬を封入したものをターゲットがん細胞に結合し、薬剤を放出するというドラッグデリバリーシステム（DDS）の研究開発が進んでいる。実際にタンパク質、ウイルス、脂質、カーボンナノホーン、カーボンナノケージ、C60 フラーレンといったナノケージを用いた DDS の開発研究が進められてきている。しかし、これらの DDS 用ナノケージにはいくつかの課題があり、例えばフルラーレン等の炭素系ナノケージは、水溶液に対する不溶性や抗原抗体反応による生体不適合の問題がある。また、タンパク質やウイルスケージは体内で分解されたり、感染の問題がある。特に共通して薬剤徐放制御がネックとなっている。このようにナノケージを DDS ケージに実用化するためには多くの課題を解決する必要がある。

近年 DDS の薬剤徐放問題の解決のための一つの新技術として金属ナノ粒子をがん組織内に注入し、ラジオ波照射や高周波磁場によるナノ粒子振動発熱効果で通常細胞より熱に弱いがん細胞を死滅させるというナノ粒子温熱療法（ナノ粒子ハイパーサーミア）が注目されている。しかし、この画期的な方法も不溶性ナノ粒子の親水化や人体への影響や適合性が問題となっている。

2. 研究の目的

申請者は現在までに直径 12 nm で内部に 7 nm の空洞を保持する球殻状フェリチンタンパク質に種々の金属（Fe, Ni, Co, In 等）、及び化合物半導体（CdSe, ZnSe, CdS, ZnS, Ag₂S 等）ナノ粒子を作製してきた。また、種々の遺伝子変異フェリチンを用いてナノ粒子形成機構（バイオミネラル化機構）も明らかにしてきた（*Biochim. Biophys. Acta.*, **1800**, 846, (2010)）。さらに、フェリチン外表面への DNA やポリマーの修飾にも成功している。本申請研究は、このような成果を元に、患者自身もつフェリチンタンパク質内部に外部刺激により発熱する磁性ナノ粒子（発熱バイオナノ粒子）を作製し、それを DDS システムに用いることで生体不適合のないパーソナル発熱バイオナノ粒子のハイパーサーミア効果を利用したドラッグデリバリーシステム（PBN-DDS）を構築するものである。

3. 研究の方法

まず始めに、本研究ではフェリチン空洞内部に外部刺激によって発熱するナノ粒子作製

を目指した。フェリチンタンパク質はバイオテンプレートとして最も研究が進んでおりタンパク質構造解析も既に行われている馬の肝臓及由来のフェリチンを用い、直径 7 nm の内部空洞内に Fe からなる磁性ナノ粒子の作製を行った。現在までの Fe, Co 等の二価カチオンをソースとするナノ粒子作製条件を参考にし、これらの条件をより詳細に検討、改良することで Fe₃O₄ 他磁性ナノ粒子の作製を目指し、一溶液中で最もナノ粒子形成率が高い条件の探索を行った。

ナノ粒子の観察は 200 KV の加速電圧の透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて、フェリチンタンパク質内部を負染色することで直接観察を行い、ナノ粒子形成の評価を行った。ナノ粒子形成率の算出には市販の粒子解析ソフトを利用した。作製された新規のナノ粒子は高分解能透過型電子顕微鏡（HR-TEM）によるナノ粒子の結晶格子像観察および粉末 X 線回折装置（XRD）及び Electron Energy-Loss Spectroscopy（EELS）によるナノ粒子構成元素成分の分析により、空洞内部に形成されたナノ粒子の物質評価を行った。また内部に磁性ナノ粒子を作製したフェリチンタンパク質はネオジム磁石等の超強力磁石を作用させると集合体を作製し、肉眼で観察可能となることがすでに知見として得られていたために、磁性ナノ粒子-フェリチン複合体を作製後、イオン交換カラム、ゲル濾過カラム等で精製した複合体サンプルに対して作用させるという簡便迅速な方法により、まず、磁性の有無の観察を行った。

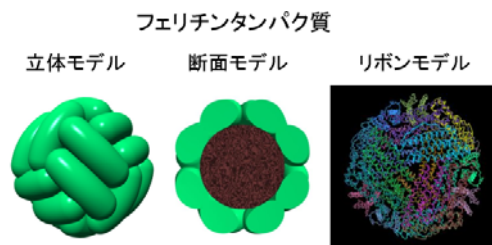


図 1. 馬由来フェリチンタンパク質の模式図とリボンモデル

DDS に用いる際に、より抗原抗体反応を防ぐためと患者個人個人に適した DDS 用ナノケージを利用するために、上記、馬由来フェリチンのみならず、アミノ酸配列が異なるヒトの心臓由来のフェリチンタンパク質を遺伝子工学的に作製し、このフェリチン内部への酸化鉄ナノ粒子作製も行った。また、磁性ナノ粒子の発熱測定は内部に酸化鉄を持つフェリチン複合体に対して外部刺激（高周波磁場）を照射することにより、赤外線照射型温度計により熱発生の有無と温度測定を行った。

4. 研究成果

(1) フェリチン内部に温熱効果を発揮する酸化鉄磁性ナノ粒子の作製を行った。3 mM 硫酸アンモニウム鉄を鉄ソースとして馬肝臓由来フェリチン内部へ酸化鉄ナノ粒子の作製条件検討を行った結果、90% 以上のコア形成率で効率良くナノ粒子を作製することが可能となった。しかし、作製されたナノ粒子の粉末 X 線回折装置による元素分析 (XRD) によりフェリハイドライト ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) であることが明らかになったため、再度、反応溶液の温度の上昇による鉄酸化促進と窒素ガスバブリングを併用した改良ナノ粒子作製法を開発した。本法により作製された鉄ナノ粒子はネオジウム磁石への吸着が肉眼で観察され、XRD や EDX 分析により、マグネタイト (Fe_3O_4) であることが確認された。

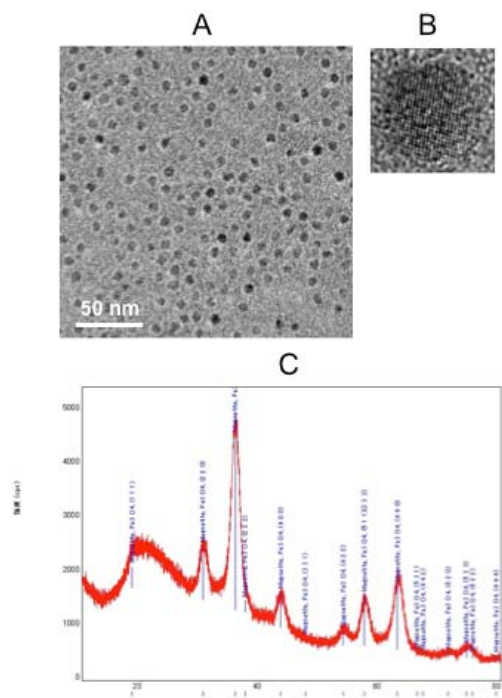


図 2. 作製した酸化鉄ナノ粒子の電子顕微鏡写真 (A), 高分解能 TEM 写真 (B), XRD 分析結果 (C)

現在、作製されたナノ粒子に対して高磁場環境下での発熱量測定を行っているが、残念ながら未だ発熱現象を観察できていない。この原因を探るべく、高分解能 TEM により作製ナノ粒子の結晶構造の観察を行った。その結果、作製したナノ粒子は一つ以上の小さな微粒子結晶の集まりである多結晶状態になっていることが確認されたため、これが一つの原因ではないかと現在考えている。

また、本研究においては酸化鉄ナノ粒子以外にも、作製条件の詳細な検討によりフェリチン内部へ CuS 及び FeS, Ta の磁性ナノ粒子の作製にも成功した。現在これらの元素分

析を行っており、今後磁性の有無の測定後、発熱試験を行う予定である。

(2) 当初の実験計画において、温熱効果を発揮する発熱ナノ粒子で磁性ナノ粒子以外のもう一つのターゲットである、金 (Au) ナノ粒子の作製に関しては、多くのナノ粒子作製条件の検討を行った結果、カチオンを内部に取り込みやすいフェリチンタンパク質に対してマイナス電荷を持つ金錯イオンを直接フェリチン内部空洞に Au ナノ粒子を作製するのは困難であるという知見が得られたため Au ナノ粒子の直接作製はあきらめた。代替方法として市販の金ナノ粒子のまわりに SH 基を保持させたフェリチンサブユニットを結合させることで球状にして機能を発揮させるという方法 (ポータープロテイン法) でフェリチン-金ナノ粒複合体を作製することができるようになった。実際に作製した複合体を TEM 観察すると金ナノ粒子の周りにフェリチンサブユニットが結合しているのが観察できたため、今後は作製した金ナノ粒子-フェリチン複合体の発熱実験も行う予定である。

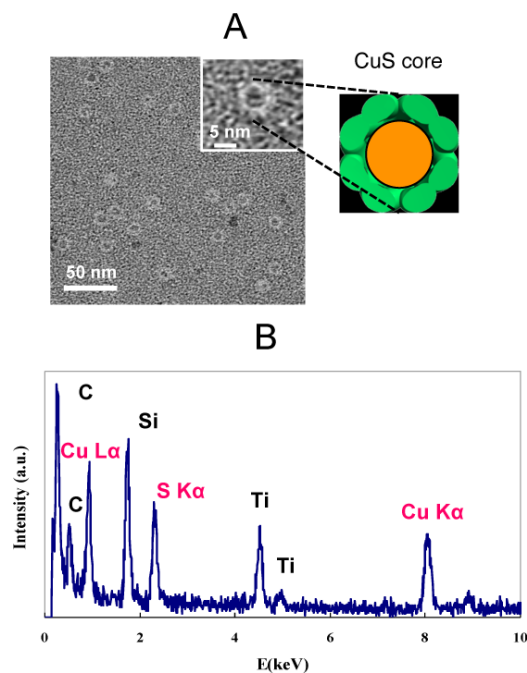


図 3. 作製した CuS ナノ粒子の電子顕微鏡像 (A) と コア成分の EDX 分析結果 (B)

(3) 馬由来フェリチンよりも DDS に適していると思われるヒトの心臓由来のフェリチン遺伝子を挿入したプラスミドの作製を行い、ヒト由来フェリチンの大量作製することに成功した。これらのヒトフェリチンを用いて、上記 (1) と同じように詳細なナノ粒子形成条件の検討を行い、フェリチン内部への酸化鉄ナノ粒子の作製にも成功した。今後は

作製したナノ粒子の元素分析と高分解能 TEM による結晶観察を行った後、発熱試験を行う予定である。

(4) 発熱バイオナノ粒子へのがん細胞認識機能ペプチドの修飾については、フェリチン表面に認識ペプチドを結合するために 24 個のシステイン残基を導入した SH-修飾リコンビナントフェリチン（結合ベースフェリチン）の作製に成功した。今後はこの部分へ認識ペプチド結合させる。これは今までフェリチンタンパク質に DNA 結合を行った際の研究知見と条件を参考にして条件の最適化を行う。

これらの研究結果をふまえて、今後はさらにナノ粒子作製方法を改良しながら効果的に発熱するナノ粒子を作製する。作製したナノ粒子に対しては温熱効果を確認しながら私的な発熱量と発熱量のコントロールを目指す。また、最終的にフェリチン外部に細胞認識ペプチドの結合を行い、発熱バイオナノ粒子の性能評価及び発熱コントロールなどの DDS 適用のための機能開発をおこなっていく予定である。

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 3 件)

① 岩堀健治, バイオテンプレートを用いたナノマテリアル作製と応用展開, 高分子 (POLYMERS), 査読無し, 62, 2013, 73-75
<http://www.spsj.or.jp>
(ISSN0454-1138)

② K. Iwahori, R. Takagi, N. Kishimoto, I. Yamashita, A size controlled synthesis of CuS nano-particles in the protein cage, apoferritin, Mater. Lett., 査読有り, 65, 2011, 3245-3247
doi:10.1016/j.matlet.2011.07.003

③ B. Zheng, M. Uenuma, K. Iwahori, et al., Sterically controlled docking of gold nano-particles on ferritin surface by DNA hybridization, Nanotechnology, 査読有り, 22, 2011, 275312 (pp 01-07),
doi:10.1088/0957-4484/22/27/275312

[学会発表] (計 4 件)

① K. Iwahori, N. Okamoto, T. Yoshida, I. Yamashita, C.H. Lin, J. Y. Wu, C.H. Chen, Y.S. Yang, Post-Fabrication Treatment of

Silicon Nanowire Field Effect Transistor for Biomedical Applications
Taiwan-Japan Workshop on Nano Devices 2013,
2013.03.05, Hsinchu, Taiwan

② N. Okamoto, T. Yoshida, K. Iwahori, Y.S. Yang, and I. Yamashita, Bio Panning of Silicon Oxide Specific Peptides for Si Nanowire Transistor, Taiwan-Japan Workshop on Nano Devices 2013
2013.03.05, Hsinchu, Taiwan

③ 岡本尚文, 岩堀健治, 浦岡行治, 山下一郎, 球殻状タンパク質フェリチンによるタンタルナノ粒子の作製, 第 73 回応用物理学会学術講演会, 2012 年 09 月 13 日, 愛媛大学, 愛媛県松山市

④ 岩堀健治, タンパク質-ナノ粒子複合体による新機能発現とナノ電子デバイス作製, 第 63 回日本生物工学会 (招待講演), 2011.9.26, 東京, 東京農工大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩堀 健治 (Iwahori Kenji)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・研究員

研究者番号: 90467689