

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670684

研究課題名(和文)膀胱上皮内癌の診断のための可視光応答型光触媒ナノ粒子の開発研究

研究課題名(英文)Development of visible light inducible photocatalytic nano-particles for the diagnosis of bladder cancer

研究代表者

窪田 吉信 (Kubota, Yoshinobu)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10106312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究では、可視光応答型光触媒を表面化学修飾によりナノサイズ微粒子化と、ヘマトポルフィリン類を付加することにより、膀胱癌の診断面に応用することを目的とした。研究成果として、可視光応答型を含む光触媒酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)粒子にポリエチレングリコール(PEG)の付加体を介してヘマトポルフィリン(Hp)が結合したPEG-TiO<sub>2</sub>-Hp化合物を作成できた。また、この化合物の基礎評価後に膀胱癌細胞へ投与し、細胞質内からHP単独投与よりも明らかに強い蛍光強度の蛍光を確認できた。蛍光強度は結合させる色素濃度及び作用時間依存的であった。今後、臨床応用に向け化合物の毒性評価を行い、最適な粒子を選択する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to construct a novel nano-composite which consisted of visible light sensitive photocatalyst and Hematoporphyrin (Hp), and apply it to in situ diagnosis of bladder carcinoma. As results 1. We could successfully make Polyethylene glycol (PEG) modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles (PEG-TiO<sub>2</sub>) and a complex of TiO<sub>2</sub>/PEG and Hp (PEG-TiO<sub>2</sub>-Hp nanoparticles). 2. The uptaken to human bladder cancer cells of these PEG-TiO<sub>2</sub>-Hp were confirmed and its fluorescence were around cytoplasm of the cells. The fluorescence intensity was stronger than when using Hp only. 3. The fluorescence intensity of treated cells were depended on treatment time and concentration of PEG-TiO<sub>2</sub>-Hp. These results suggested that PEG-TiO<sub>2</sub>-Hp could be potentially useful for apply to in situ diagnosis of bladder carcinoma. As future plan we will improve these compounds and will perform the toxic study of the conjugates for the application to human.

研究分野：泌尿器科学・光化学

キーワード：膀胱癌 光力学治療 光触媒 ヘマトポルフィリン 可視光応答型光触媒

1. 研究開始当初の背景

光触媒は、化学的に安定で安全性が高く、かつ光照射されたときのみ化学反応するため、光による制御機能をもった材料として、医療応用の際に望まれる優れた基本的特性を備えている。我々は、これまでの検討で光触媒機能による自己殺菌能を有する導尿管カテーテルの開発や環境ホルモンの分解に成功している。また、レーザー光照射により色調を変化できる銀担持光触媒のフォトクロミズム現象の発見や、可視光応答型光触媒の研究開発を進めてきた。

このような研究成果を発展させ、これまで例のないチャレンジングな試みとして光触媒の診断面への応用を計画した。開発された光触媒と、光線力学的診断に用いられるヘマトポルフィリン類をハイブリッド化し、膀胱癌の部位を術中に蛍光観察するための新たな診断用素子の開発を提案する。

2. 研究の目的

本研究では、可視光応答型光触媒を表面化学修飾によりナノサイズ微粒子化させ、ヘマトポルフィリン類を付加することにより、膀胱癌の診断面に応用することを試みる。

具体的には癌細胞に特異的に集積することで知られるヘマトポルフィリン誘導体に可視光応答型光触媒ナノ粒子を結合させたハイブリッド体を作製し、これにより、従来ヘマトポルフィリンを用いる際の欠点であった光過敏症の問題の克服と、光、特に使いやすい可視光による制御性を持たせる。そしてこれを用いて膀胱上皮内癌や浸潤性及び表面性膀胱癌に随伴する前癌病変の部位診断に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 光触媒ナノ粒子作製と分散安定化処理

各種光触媒ナノ粒子の分散体を得るため、湿式高圧処理プロセスで微粒化処理を行い、処理前後の粒子径変化を確認した。次に、ポリエチレングリコール (PEG) を化学結合させ、生体環境下でも安定している分散体を得られるか評価を行った。

また、当初の計画にはなかったが、ゾルゲル法で作製した真球状の酸化チタン粒子を用い、同様に PEG を化学結合してナノ粒子を作製し分散性評価を行った。

(2) 光触媒ナノ粒子とポルフィリン化合物とのハイブリッド体作製

PEG で分散化した真球状の酸化チタンナノ粒子にヘマトポルフィリン色素をリンカー分子ありなしで結合する検討を行った。リンカー分子として酸化チタン結合性のドーパミンを用い、ヘマトポルフィリン色素への結合を検討した。次にナノ粒子とヘマトポルフィリン色素を結合、精製してハイブリッド体を作製し評価を行った。

(3) ヒト膀胱癌細胞へのハイブリッド体集積と蛍光評価

ヘマトポルフィリン色素単体およびハイブリッド体をヒト膀胱上皮由来の膀胱癌細胞 T24 の培養液中に混合し、一定時間作用させて洗浄後に蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

(1)-① 光触媒ナノ粒子と分散化処理

まず、水に混合した各種光触媒粒子を高圧下で微粒化処理することで、分散体の作製が可能であることを確認した。

水中での高圧処理は、圧縮・せん断・衝撃・摩擦力等が加わって粒子の二次凝集をほぐし、水和を伴って微粒化と分散を促進する。高圧処理装置ナノマイザーNMS-200L (ナノマイザー) を用い、各粒子の水混合液を高圧下 (200 MPa) で狭小流路に通し、パス回数を10回まで増やして微粒化前後の水中状態観察 (レーザー顕微鏡) と DLS 法による粒子径測定を行った。各種光触媒粒子として、①アナターゼ型酸化チタン (和光純薬工業)、②白金ドーパ型酸化チタン MPT-623 (石原産業) ③酸化タングステン (和光純薬工業) を用いた。その結果、図1に示されるとおり、高圧処理により水中で微粒化が促進され、平均粒子径と PDI はそれぞれ、①141nm, 0.138 ②179.1 nm, 0.155 ③215.5 nm 0.199 と、100~200 nm 程度の分散体を得ることができた。

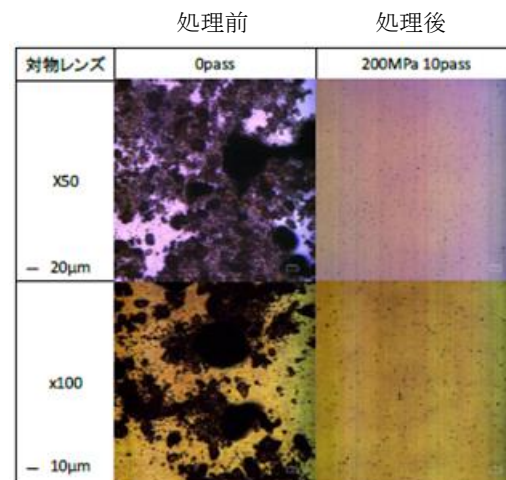


図1 微粒化処理前後のレーザー顕微鏡像 (②)

さらにポリエチレングリコール (PEG) を化学結合させ、光触媒ナノ粒子の分散性を安定化することに成功した。

PEG の化学結合は報告[1]をもとに行った。4-アミノサリチル酸を修飾した PEG を用意し、DMF 中で微粒化した粒子 0.5 wt% と PEG 5 mg/ml を混合し、130°C 加熱処理して PEG を結合した。減圧乾燥および遠心分離により DMF を除去して超純水への溶液交換を行った。

このようにして得られた各溶液を 0.01 wt% で血清入り細胞培養液 (DMEM+10%FBS、GIBCO)

に混合し、37°C遮光下で粒子径の変化を DLS 法で確認した。その結果、1 週間の粒子径変化率は①、②ともに 10%以内と安定した分散性を示した。一方で、③は一部沈降してしまい安定した分散性を得ることができなかった。この要因として、4-アミノサリチル酸を修飾した PEG が酸化チタンには強く結合して分散安定化に寄与するのに対し、③の酸化タングステンでは十分に結合せず分散性を保つことができなかったことが考えられる。

#### (1)-② 真球状酸化チタン粒子と分散化処理

(1)-①では微粒化と分散処理を行い、安定した分散体を作製できた一方で、PDI (多分散度) が 0.1 より大きく、様々な大きさの粒子が混在する状態だった。粒度分布のパラッキは目的作用の再現性や生産時の管理等に影響を及ぼすと考えられる。そこで、真球状の酸化チタン粒子 (富士化学) を用いて PEG を結合することで、図 2 に示すように形状と粒度分布がより均一なナノ粒子を作製することに成功した。

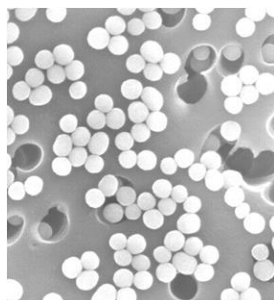


図 2 真球状酸化チタン粒子の SEM 像 (x30000)

(1)-①と同様にリンカーを介して PEG を酸化チタン表面に結合した。異なるサイズとなるよう作製された 3 種類の真球状酸化チタン粒子を用意し、粒子 0.5 wt% と PEG 1~3 mg/ml を混合し、加熱処理した。超純水置換後の真球状酸化チタン粒子は、多分散度=0.017 で単分散性を示した。さらに、それぞれを細胞培地中で分散させたところ少なくとも 1 週間大きな変化は確認されなかった。以上のことから、安定した分散性を示すより均一なナノ粒子の分散体作製を達成することができた。

#### (2) 光触媒粒子とポルフィリン化合物のハイブリッド体作製

(1)-②で分散化した真球状酸化チタン粒子にヘマトポルフィリン色素をリンカー分子ありなしで結合する検討を行い、リンカー分子なしでもある程度色素を結合できることが確認された。

まず、ヘマトポルフィリン色素 (和光純薬工業) と、ヘマトポルフィリン色素にリンカー分子を結合した色素を用意した。リンカー分子には、酸化チタン表面とイオンおよび共有的に結合する、ドーパミン (DA、和光純薬工業) を用いた。図 3 に示すように、カルボ

キシル基を介して、DA のアミノ基とアミド結合を試みた。ヘマトポルフィリン色素は水への溶解性が低いいため、PyBop および DMT-MM (いずれも和光純薬工業) を縮合剤に用いて DMF 中で反応効率の検討を行った。キャピラリー電気泳動および TLC を用いて DA 残量から反応効率を求め、さまざまな反応比を試した結果、色素および DA の 5 倍等量の DMT-MM と 3 倍等量の塩基 (N,N-ジイソプロピルエチルアミン) を用いたときにもっとも反応効率が高く、ほぼ 99%程度反応した。

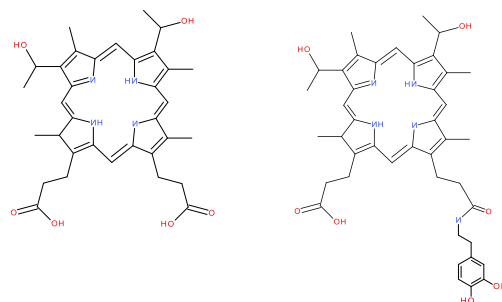


図 3 ヘマトポルフィリン色素および DA 結合ヘマトポルフィリン色素の構造

ヘマトポルフィリン色素と作製した DA 結合ヘマトポルフィリン色素について蛍光測定を行った。その結果、DMF 溶液中では蛍光強度に差を生じなかったが、水溶液 (20 mM ホウ酸緩衝液 (pH8.5)) 中ではいずれも蛍光の減少を認め、特に DA 結合ヘマトポルフィリン色素において大きく減少を示した。吸光係数に変化はなく、酸性 pH 下で蛍光が消失することから、溶解性によるものと考えられる。ヘマトポルフィリン色素自体、水溶液中で凝集して自己消光を起こすことが報告されている [2]。DA 結合によりカルボキシル基を失い水溶性が下がって、より凝集と自己消光を起こすのではないかと考えられる。

ヘマトポルフィリン色素および DA 結合ヘマトポルフィリン色素と酸化チタンの結合について検討を行った結果、リンカー分子なしでもある程度色素が結合することを確認した。(1)-②分散化した真球状酸化チタン粒子と色素を DMF 溶液中で一晩混合し、遠心分離して上清における色素濃度を測定して結合量を求めた。その結果、ヘマトポルフィリン色素単体は DMF 中でほぼ 100%結合したが、DA 結合ヘマトポルフィリン色素では DA の結合効率に相関して結合率が 80~30%程度と下がった。次に、DMF から超純水へ置換を行うと、ヘマトポルフィリン色素単体を用いた場合は超純水上清への溶出が目視で確認された一方で、DA 結合ヘマトポルフィリン色素では、超純水上清への溶出がなかった。溶出がなくなるまで超純水で置換を 6 回繰り返し、ハイブリッド体を作製した。

作製したハイブリッド体は、色素結合前と比べて粒子径や多分散度に大きな変化はなく、良好に分散していた。また、蛍光を確認したところ、DMF 溶液中に比べて水やホウ酸



緩衝液 (pH8.5) 中では蛍光が減少した (図 4)。



図 4 ヘマトポルフィリン色素結合した真球状酸化チタン粒子ハイブリッド体の蛍光観察

### (3) ヒト膀胱癌細胞へのハイブリッド体取込みと蛍光確認

培地中のヒト膀胱癌細胞に作製したハイブリッド体を作用させて蛍光顕微鏡で観察した結果、ヘマトポルフィリン色素単体より強い蛍光を示し、膀胱癌細胞をよく可視化できることが明らかになった。

増殖期にあるヒト膀胱癌細胞 T24 を 24 well plate に 210 cells/well となるよう播き、1 週間培養してコロニー形成した状態のものを評価に用いた。投与量はヘマトポルフィリン色素濃度換算でコントロールした。ヘマトポルフィリン色素単体およびハイブリッド体を色素濃度 50~6.25  $\mu\text{M}$  にて T24 に 30 分、および 2 時間作用させ、PBS (-) で洗浄して蛍光顕微鏡で観察した。濃度について検討した結果、図 5 に示されるように同濃度 (図 6 は 50  $\mu\text{M}$  濃度、2 時間) のヘマトポルフィリン色素単体よりもハイブリッド体は強い蛍光を示すことが確認された。真球状酸化チタン粒子のハイブリッド体では、ヘマトポルフィリン色素単体より 8 倍希薄な用量 (6.25  $\mu\text{M}$ ) でも同程度以上の視認性を示した。また、蛍光強度は投与濃度依存的に観測された。

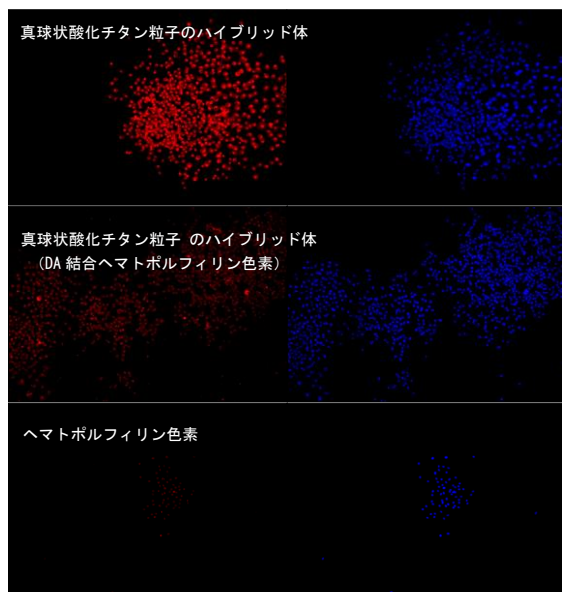


図 5 膀胱癌細胞 T24 におけるハイブリッド体の取込み蛍光観察 (50  $\mu\text{M}$  濃度、2 時間)

※赤色はヘマトポルフィリン色素由来、青色はヘキスト 33342 (同仁化学) による細胞核染色像

次に、真球状酸化チタン粒子のハイブリッド体 (色素 6.25  $\mu\text{M}$  相当) を用いて、細胞取込みの経時変化を比較した結果を図 6 に示す。30 分と 2 時間を比較すると、明らかに 2 時間において蛍光強度が強く、他の濃度においても経時的な変化が確認された。

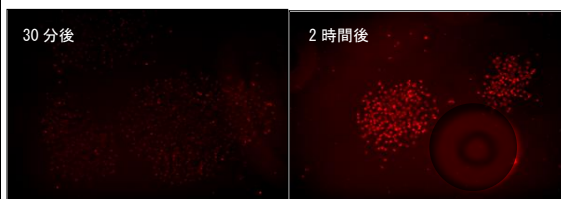


図 6 色素結合した真球状酸化チタン粒子ハイブリッド体の蛍光経時変化

DA 結合ヘマトポルフィリン色素を用いたハイブリッド体では、細胞の蛍光は色素単体と同程度だが培地中に明るい輝度を示す点が多数出現した。疎水性が高く、血清タンパク質等を強く結合して自己凝集してしまったため、このように輝点として観察されたものと考えられる。

同時染色したヘキストと比較すると、核が染色されるヘキストに対して、ヘマトポルフィリン色素由来の蛍光は少なくとも核ではなくそのまわりの細胞質付近によく観察された。これらのことから、ハイブリッド体は細胞内に取込まれ、細胞質内のいずれかに存在するものと考えられる。

以上のことから、色素結合したハイブリッド体は色素濃度および時間依存的に膀胱癌細胞と作用して、ヘマトポルフィリン色素単体よりも強い蛍光を示し、膀胱がん術中診断への適用可能性が示された。色素濃度および時間依存的に作用することから、粒子の細胞内取り込みが促進されている可能性が考えられる。

### (4) まとめと今後の方針

より均一な大きさや形状をもつ真球状の酸化チタン粒子を用いて色素結合を行い、まずは膀胱癌細胞の蛍光染色画像が得られるかどうか、その検討を行った。その結果以下のことが確認された。

異なる形状と大きさを有する酸化チタン粒子を、湿式高压処理プロセスを用いて準備し、PEG を用いて分散安定化が可能であった。さらに、真球状酸化チタン粒子を用いることで、より均一な分散体を得ることができた。

光触媒粒子に色素結合したハイブリッド体を得るため、PEG で分散安定化した真球状酸化チタン粒子を用いてヘマトポルフィリン色素をリンカー分子ありなしで結合する検討を行い、リンカー分子なしでもある程度色素を結合できることが確認された。

培地中の膀胱癌細胞に作製したハイブリッド体を作用させて蛍光顕微鏡で観察した

結果、ヘマトポルフィリン色素単体よりも強い蛍光を示し、膀胱癌細胞をよく可視化できることがわかった。

以上のことから、光触媒粒子に色素結合したハイブリッド体は色素濃度および時間依存的に膀胱癌細胞と作用して、ヘマトポルフィリン色素単体よりも強い蛍光を示し、膀胱癌術中診断への適用可能性が示された。

今後の方針や検討項目について以下に記載する。

色素結合についてより安定で強い蛍光を示すための改良が必要である。リンカー分子として DA を結合した色素も用いたが、疎水性の増大に伴う蛍光や結合量の減少等、ねらいとは逆の問題が発生した。ただし、ヘマトポルフィリン色素単体のチタン粒子結合は水溶液中では必ずしも強くないようなので、今後これらを考慮したリンカー・結合法を選択する。ハイブリッド体の蛍光は色素単体よりも低い結果であったが、光路長に配慮して蛍光強度の再測定を実施する。

また、対照として正常細胞を用い、選択性を確認することも重要である。微量金属分析を用いて取り込み量の定量化も必要だと考えられる。

ハイブリッド体の取り込み経路についても検討したい。ヘマトポルフィリン色素は、色素が親和性を示すリポタンパク質 (LDL、トランスフェリン、アルブミン) と結合し、それらの受容体を介して能動的に取り込まれることが報告されている [3]。これらの受容体の発現量や活性が亢進している腫瘍細胞への取込みが多いようだが、メカニズムについて詳細に確認することは現象を理解する上でも重要だと考えている。

毒性評価も必須である。上述の検討を経て投与経路や使用量を設定し、それらを考慮して試験系を選択する必要がある。

今後、これらの基礎検討を踏まえ、動物同所性腫瘍モデルなどを用いた非臨床、臨床試験へとつなげていきたいと考えている。

#### (5) Reference

- [1] S. Yamaguchi, et al., *Ultrasonics Sonochemistry*. 18(5) 1197-204 (2010)
- [2] Rotomskis R, et al., *J Photochem Photobiol B*. 3(3) 369-77 (1989)
- [3] Yuji Naitoh, et al., *Cell Structure and Function*. 11. 486 (1986)

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3件)

- ① Ishiguro, H., Yao, Y., Nakano, R., Hara, M., Sunada, K., Hashimoto, K., ... & Kubota, Y. (2013). Photocatalytic activity of Cu<sup>2+</sup>/TiO<sub>2</sub>-coated cordierite foam inactivates bacteriophages and Legionella

pneumophila. *Applied Catalysis B: Environmental*, 129, 56-61.

DOI: 10.1016/j.apcatb.2012.09.012

- ② Nakano, R., Hara, M., Ishiguro, H., Yao, Y., Ochiai, T., Nakata, K., ... & Kubota, Y. (2013). Broad spectrum microbicidal activity of photocatalysis by TiO<sub>2</sub>. *Catalysts*, 3(1), 310-323.  
DOI: 10.3390/catal3010310

- ③ Kawahara, T., Miyamoto, H., Ito, H., Terao, H., Uemura, H., Kubota, Y., & Matsuzaki, J. (2015). Discolored Ureteral Stents: Findings in Urinalysis and Urine Culture. *PLoS One*, 10(4), e0122984.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0122984

[学会発表] (計 2件)

- ① Yoshinobu Kubota, et al. (2013). Study on antiviral activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub>(IV). SIEMME19 (Beijing, China)
- ② Yoshinobu Kubota. (2014). Test methods for antiviral activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub>: ISO Protocol. SIEMME20 (Chengdu, China)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

窪田 吉信 (KUBOTA, Yoshinobu)  
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 10106312

##### (2) 研究分担者

矢尾 正祐 (YAO, Masahiro)  
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 10106312