

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870836

研究課題名(和文) 癌細胞上の受容体と結合する形態制御無機ナノ粒子による腫瘍悪性化抑止効果の実現

研究課題名(英文) Development of well-defined inorganic nanoparticles with controlled morphology toward effective suppression of tumor growth

研究代表者

柴 弘太 (Shiba, Kota)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・ICYS研究員

研究者番号：20638126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療に資する無機ナノ粒子の実現に向け、新規ナノ粒子合成法を確立した。この手法により、多様な特性の無機ナノ粒子を合成することが可能となった。次いで、同様の手法により作製した発光粒子を用いて、細胞-粒子間相互作用に関する検討を行った。その結果、従来の薬剤送達やバイオイメージングに一石を投じる「徐放による間接的送達」という新たな概念を創出した。加えて、上記発光粒子の気中および液中における特異的な発光挙動を見出すなど、今後のバイオ応用を加速する材料開発指針を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：To realize functional inorganic nanoparticles that are useful for cancer treatment, a novel synthetic approach was developed based on controlled sol-gel reaction using a microfluidic platform. Taking advantage of the present approach, various types of inorganic nanoparticles with different functionalities were obtained. Cell-particle interaction was investigated in detail with the fluorescent inorganic particles which were synthesized by the microfluidic approach. Consequently, a new concept, i.e. indirect and gradual molecular delivery, was proposed, demonstrating various merits over conventional drug delivery and/or bio-imaging techniques in terms of cytotoxicity, for example. The fluorescent inorganic particles also showed a characteristic luminescence property. Specifically, luminescence intensity varies reversely in air or in phosphate buffered saline depending on the amount of the fluorescent dye. These results provide a guideline on material design for various bio-applications.

研究分野：ナノ材料科学、ナノバイオ、ナノメカニカルセンサ

キーワード：ナノ粒子 機能性 単分散 無機有機ハイブリッド マイクロリアクタ 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、癌細胞に特異的な受容体を認識し、作用する抗体医薬の開発が進められている。選択性が高く、副作用が少ないことから抗体医薬への期待は大きい。1. 抗体医薬の生産にはマウス等の動物を利用するため、生産量が少ない割に時間とコストがかかる。2. 適用可能な癌種に限られており（主に乳癌、大腸癌）、世界的に死亡数の多い肺癌等に有効な抗体医薬が無い。以上の2点を解決可能な、既存の抗体医薬に代わる革新的な手法の開発は急務であり、今後ますます膨らみ続ける医療費削減の観点からも必要不可欠である。

(2) 上記課題を解決するための鍵は、適切に設計された無機材料の利用にあると考える。つまり、第一の課題は、工業的に確立している種々の無機材料の生産体制に倣うことで、生産性、時間、コストの問題を一挙に解決可能である。第二の課題には、癌細胞増殖のきっかけとなる、受容体への増殖因子の結合を、無機ナノ粒子を用いて阻害することにより対応する。申請者は、この無機ナノ粒子を用いた解決策に関して、近年盛んに行われている、バイオ分野への無機材料利用の試みに着目した。最新の研究において、無機ナノ粒子の表面凹凸や、粒子そのものの形状（球状、棒状など）が、ウイルス認識や細胞への粒子取り込みに密接に関わる可能性が指摘された。また、特定のペプチド配列が特定の無機酸化物表面を認識することも報告されている。これらの事実は、無機化合物と生体関連物質との間に、一定条件下で発現する親和性が存在することを示唆している。以上の背景を根拠に、形状やサイズ、表面を精密に設計した無機ナノ粒子を作製することで、例えば抗原と抗体の関係のように、特定の生体関連物質を対象とした特異的な反応が実現可能になる、との着想に至った。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、生体親和性が高く、工業的にも広く使われているシリカおよびチタニアを主成分とする粉体材料設計に従事し、10 nm~2000 nm 程度の範囲においてサイズの揃った真球状粒子の合成と組成設計（表面改質、異種元素ドーピング）に成功した。申請者がこれまで培ってきた材料の精密設計技術を駆使することで、癌細胞に特異的な受容体を狙い撃ちする独自の無機ナノ粒子を作ることができれば、癌治療に大きく貢献する成果となる。安価に量産可能な無機材料をベースにナノ粒子を精密設計し、抗体医薬の課題であるコスト・時間を抑えつつ、最終的には個々人の病状に合わせたテーラーメイド医療までもが実現できれば、創薬の在り方にパラダイムシフトをもたらすことが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞表面の受容体と結合しうるサイズ・形状・表面を有する無機ナノ粒子を設計・合成することが、本研究の目的達成に向けて最も重要である。この観点に基づき、様々な組成のナノ粒子を、サイズを揃えて合成する手法を確立する。そのためには、単分散粒子形成の鍵となる核形成と粒子成長過程を分離することに加え、異方的な粒子成長を誘起することなども重要となるであろう。これに関して、経験のあるシリカ、チタニアをはじめとする組成のバリエーションに加え、マイクロ流路を利用した均一/不均一核形成制御、さらには多段階反応の構築をキーワードに総合的な検討を重ね、解決につなげる。

(2) 上記無機ナノ粒子合成法が確立した後は、細胞を用いた実験に取り組む。粒子と細胞との相互作用を検証するため、粒子存在下における細胞の増殖挙動など、多角的な視点から検討を進める。

4. 研究成果

(1) 申請者が以前に確立した単分散粒子を得るための合成手法を発展させ、様々な表面特性を有する無機ナノ粒子を作製することに成功した。具体的には、マイクロ流路を用いた多段階反応機構を構築することにより、核形成、核の包接、成長を逐次的に行い、コアシェル型のハイブリッドナノ粒子を得るというものである（図1）。この手法により、チタニアおよびシリカからなるサイズ分布の狭いハイブリッドナノ粒子が得られることを報告した。

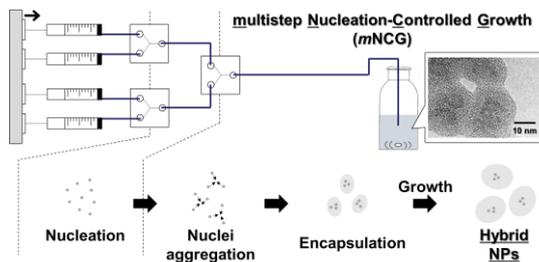


図1 無機ナノ粒子を合成するためのマイクロ流路を用いた多段階反応の模式図。反応初期に形成するチタニア核を利用することにより、異種成分を核表面に堆積・成長させることができる。

また、同手法は様々な機能性ハイブリッドナノ粒子の合成へ展開可能であることも確認した。一例として、図2に示すように、アミノプロピル基で表面修飾されたハイブリッドナノ粒子を得ることができる。これらの粒子は、平均サイズが10 nm程度で、狭いサイズ分布を有することを確認した。水晶振動子表面へ塗布することにより、汎用の親水性ポリマーと比較してきわめて良好な水蒸気に対する応答を示すことから、センシング用途への利用も見込める。

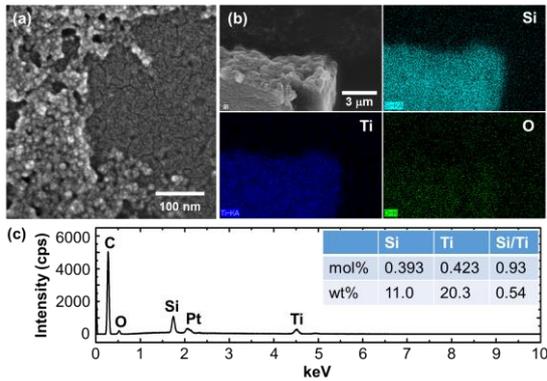


図 2 (a) アミノプロピル基で修飾したナノ粒子の SEM 像。(b) 同ナノ粒子の元素マッピング。(c) 同ナノ粒子の EDX スペクトルと組成。

(2) 細胞-ナノ粒子間相互作用を検討する上で、その評価をどのように行うかは重要である。発光特性を付与することにより、粒子をプローブとして利用可能とすることは、一つの有効なアプローチと考えられる。申請者は独自に開発した単分散粒子合成手法を適用することにより、蛍光色素の一種であるフルオレセインを含有した単分散チタニア系ハイブリッド粒子を合成することに成功した。合成条件を検討した結果、平均粒子サイズを一定に保ったままフルオレセインの含有量を調節できることが分かり、これらを用いて発光特性の詳細な検討を行った。その結果、図 3 に示すように、大気中とリン酸緩衝液中とで、フルオレセイン含有量に応じて異なる発光挙動を示すことを見出した。

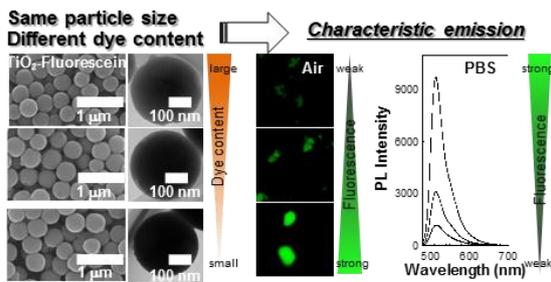


図 3 フルオレセイン含有チタニア系ハイブリッド粒子の SEM 像、TEM 像、蛍光顕微鏡像および発光スペクトル。大気中とリン酸緩衝液中とで、フルオレセイン含有量に対して発光強度順が逆転している。

この結果は、大気中および液中においてフルオレセイン含有チタニア系ハイブリッド粒子を利用する際に、強い発光を実現する最適なフルオレセイン含有量を定めるための指針を与えるものであり、バイオイメージング等の応用において有用である。

(3) 上述のように、単分散発光粒子の作製法を確立したため、これらを用いて細胞-ナノ粒子間相互作用を評価するための予備的な検

討を実施した。図 4 に示すように、フルオレセイン誘導体含有した単分散チタニア系ハイブリッド粒子を合成し、これらを細胞培養液に添加することで、細胞に与える影響を評価した。

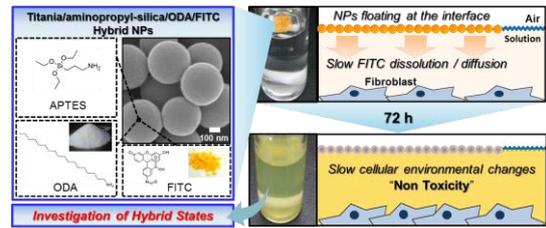


図 4 フルオレセイン誘導体含有単分散チタニア系ハイブリッド粒子を用いた細胞との相互作用検討実験の概念図。

細胞実験に先がけ、上記粒子をイソプロピルアルコールで洗浄した際、フルオレセイン誘導体のわずかな溶出が見られた。洗浄を繰り返すと、洗浄回数に応じて少量ずつ溶出することを確認した。そこで、異なる洗浄回数の粒子を調製し、リン酸緩衝液に添加後、攪拌しながら 72 時間かけて様子を観察した。そうしたところ、洗浄回数に応じてフルオレセイン誘導体の溶出量を制御できることを見出した。これはゲスト分子の徐放量を制御できるという点で、薬剤送達に応用できる可能性がある。次いで、上記洗浄回数の異なる粒子を細胞培養液に添加し、細胞増殖挙動に与える影響を評価した。その結果を図 5 に示す。

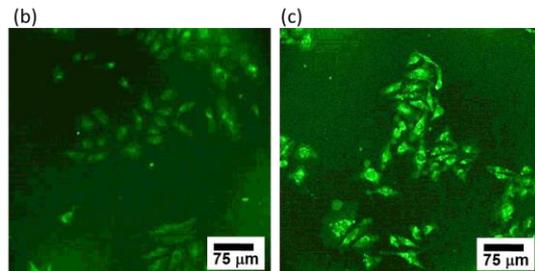
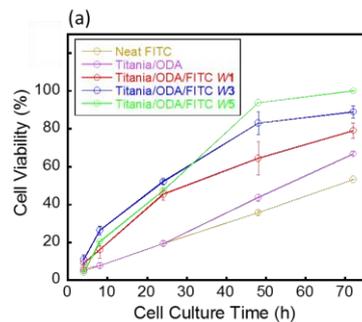


図 5 (a) 粒子存在下における線維芽細胞の生存率。フルオレセイン誘導体のみ、あるいはフルオレセイン誘導体を含まないチタニア系粒子を添加した場合と比較して、フルオレセイン誘導体含有粒子を添加した場合の生存率が高い。(b) フルオレセイン誘導体、および(c) フルオレセイン誘導体含有粒子を添加した場合の線維芽細胞の蛍光顕微鏡像 (48 時間経過後)。

図 5(a)から分かるように、フルオレセイン誘導体含有粒子を添加した場合、洗浄回数によらず、高い細胞生存率を示した。また、フルオレセイン誘導体のみの場合と比較して、上記粒子を添加した場合、より鮮明な蛍光像を得ることができた (図 5(b, c))。これは、フルオレセイン誘導体のみを添加した場合、誘導体がリン酸緩衝液に溶解して均一溶液を形成するため、コントラストがつきにくいに対し、フルオレセイン誘導体含有粒子を用いた場合には、粒子から徐放される少量の誘導体と、誘導体を含む粒子そのものがイメージングに参与するため、コントラストがつきやすくなったことによると考えられる。すなわち、液中に溶解・拡散してエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる誘導体と、細胞表面に濃集される誘導体含有粒子との協奏的な発光によるものと考えている。ここで、粒子そのものは疎水的な表面を有するため、リン酸緩衝液をはじめとする水系溶媒に分散しにくいことを確認しており (少量は分散する)、今回の場合、気液界面に滞留する粒子から徐放されたフルオレセイン誘導体の効果が支配的である可能性が高い。ナノ粒子等の取り込みにより発現する細胞毒性に関して、今なお統一的な見解が得られていない状況を踏まえると、ここで示すような「徐放による間接的送達」という新たなアプローチは、薬剤送達やバイオイメージングに一石を投じる重要な成果と言える。

(4) 癌細胞表面に発現する受容体の特定の結合部位にはまり込むような粒子を得るためには、異方的な形状を有する粒子を設計する技術も重要となる。そこで申請者は、生体親和性を有する水酸アパタイト (HAp) に着目し、その異方性粒子形成に関する検討も行った。図 6 に概要を示す。

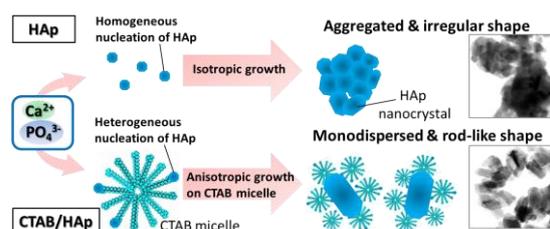


図 6 水酸アパタイト (HAp) 形成過程における陽イオン性界面活性剤 (CTAC) の効果。CTAC 存在下では HAp の特定の結晶面の成長が誘起されるため、ロッド状の異方性粒子が形成する。

その結果、HAp 合成時に陽イオン性界面活性剤 (CTAC) を共存させることで、ロッド状の異方性粒子が形成することを確認した。これについて、実験および計算科学的手法により詳細に検討したところ、HAp における a 面上のカルシウムイオンと、c 面上の水酸基およびリン酸基が、CTAC 中のアンモニウム基を構成する窒素とイオン性および共有結

合性の強い相互作用を有することが分かり、異方性粒子の形成機構推定を可能とした。今後は上記異方性粒子を用いたバイオ応用を推進すると同時に、他の物質系における異方性粒子設計にも計算科学的手法を適用していく予定である。

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 17 件)

- 原著論文
- [1] K. Shiba, S. Motozuka, T. Yamaguchi, N. Ogawa, Y. Otsuka, Z. Xu, K. Ohnuma, and M. Tagaya, “Effect of Cationic Surfactant Micelles on Hydroxyapatite Nanocrystal Formation: An Investigation into the Inorganic-Organic Interfacial Interactions”, *Crystal Growth & Design* **16**, 1463-1471 (2016) DOI: 10.1021/acs.cgd.5b01599. 査読有り
- [2] K. Shiba, M. Tagaya, T. Sugiyama, and N. Hanagaya, “Preparation of Luminescent Titania/Dye Hybrid Nanoparticles and Their Dissolution Properties for Controlling Cellular Environments”, *RSC Advances* **5**, 104343-104353 (2015) DOI: 10.1039/C5RA23026H. 査読有り
- [3] K. Shiba, T. Sugiyama, T. Takei, and G. Yoshikawa, “Controlled growth of silica-titania hybrid functional nanoparticles through a multistep microfluidic approach”, *Chemical Communications* **51**, 15854-15857 (2015) DOI: 10.1039/C5CC07230A. 査読有り
- [4] K. Shiba, M. Tagaya, and N. Hanagata, “Synthesis of Cytocompatible Titania/Fluorescein Hybrid Nanoparticles and their Surface Molecular State Effect”, *ACS Applied Materials & Interfaces* **6**, 6825-6834 (2014) DOI: 10.1021/am500636d. 査読有り
- [5] K. Shiba, M. Tagaya, and S. Motozuka, “Experimental study and DV-X α numerical analysis of nucleation/growth processes in the synthesis of inorganic particles toward development of nano-biotechnology applications”, *Bulletin of the Society for Discrete Variational X α* **27**, 121-125 (2014) DOI is not provided. 査読無し
- [6] 柴弘太, “ナノ粒子曝露が真皮中の繊維芽細胞に与える影響の定量的リアルタイム解析”, *コスメトロジー研究報告* **22**, 106-111 (2014) DOI is not provided. 査読無し
- 総説、解説
- [1] 柴弘太, 多賀谷基博, “ナノバイオニクスを切り拓くシリカおよびチタニアナ

ノ粒子技術”, *ケミカルエンジニアリング* **60**, 61-66 (2015) DOI is not provided. 査読無し

- [2] K. Shiba, M. Tagaya, S. Samitsu, S. Motozuka, “Effective Surface Functionalization of Carbon Fibers for Fiber/Polymer Composites with Tailor-Made Interfaces”, *ChemPlusChem* **79**, 197-210 (2014) DOI: 10.1002/cplu.201300356. 査読有り

〔学会発表〕(計 15 件)

- [1] K. Shiba, “Development of versatile receptor layer materials for nanomechanical sensor-based detection/discrimination”, MANA International Symposium 2016 (Epochal Tsukuba, Japan, March 9th-11th 2016, Poster).
- [2] K. Shiba, “Synthesis of oxide-based inorganic-organic hybrid nanoparticles and their application toward versatile receptor layers on nanomechanical sensor surfaces”, ICYS Workshop 2015 (Hotel Grandeco Resort, Fukushima, Japan, January 23rd 2015, Oral).

〔図書〕(計 2 件)

- [1] 多賀谷基博, 柴弘太, 『シランカップリング剤の調整・処理条件 事例集 第 9 章「シランカップリング剤による微細構造形成技術」・第 2 節「マイクロパターン構造形成プロセスにおけるシランカップリング剤の活用と機能」』, 株式会社技術情報協会, 金原繁 監修, 2016 年 1 月 29 日 発刊, 7 頁 分担.
- [2] K. Shiba, G. Imamura, G. Yoshikawa, “Chapter 4.3 Nanomechanical Sensors”, in *Biomaterials Nanoarchitectonics*, edited by M. Ebara (Elsevier B. V., Amsterdam), pp.177-196 (2016).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 8 件)

名称: 母材と粒状材料を混合した受容体層を被覆したセンサ

発明者: 柴弘太、吉川元起、今村岳

権利者: 国立研究開発法人 物質・材料研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2015-038190

出願年月日: 平成 27 年 2 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: 粒状材料を受容体層として有するセンサ

発明者: 柴弘太、吉川元起

権利者: 国立研究開発法人 物質・材料研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2015-013271

出願年月日: 平成 27 年 1 月 27 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴 弘太 (SHIBA, Kota)

国立研究開発法人 物質・材料研究機構・

国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点・

ICYS 研究員

研究者番号: 20638126