

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：22604

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26886012

研究課題名(和文) 金ナノクラスターの薬理活性の探索：副作用の少ない新規抗がん剤を目指して

研究課題名(英文) Research for pharmacological activity of gold nanocluster for a new anticancer agent

研究代表者

藤田 隆史 (Fujita, Takashi)

首都大学東京・都市環境科学研究科・特任助教

研究者番号：30737565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：種々の酸化物担体に担持した金ナノ粒子触媒の癌細胞に対する細胞毒性について調査した。実験を行った金ナノ粒子触媒の内(Au/SiO₂、Au/TiO₂、Au/Fe₂O₃、Au/ZnO、Au/ZrO₂)、金ナノクラスターを担持したAu/ZnOがHeLaやMiaPaca-2に対して、高い細胞毒性を示すことが明らかになった。ZnO自体も、他の酸化物と比較すると高い細胞毒性を示すが、金ナノクラスターを担持することによって、この細胞毒性がさらに増加することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Cytotoxicity of oxide-supported gold nanoparticulate catalysts toward cancer cell lines were investigated. Among the investigated catalysts (Au/SiO₂, Au/TiO₂, Au/Fe₂O₃, Au/ZnO, and Au/ZrO₂), Au/ZnO showed high cytotoxicity for HeLa and Mia Paca-2. Although simple ZnO also exhibits relatively high cytotoxicity compared to other oxides, this cytotoxicity further increased by deposition of gold nano clusters.

研究分野：触媒化学、分析化学

キーワード：金クラスター 細胞毒性 ナノ毒性

1. 研究開始当初の背景

白金錯体を用いた抗癌剤、シスプラチンは、前立腺、膀胱、肺、結腸、脳などの固形癌に対して有効性の高い抗癌剤のひとつである。しかし、その副作用は非常に厳しく、患者の生活の質を著しく損なうことが大きな問題となっている。そのため、幅広い癌に対して高い抗癌作用を示しつつも、副作用が小さい次世代の抗癌剤の開発が求められている。

近年、1価や3価の金イオンを含む錯体が、シスプラチンと比較して、高い抗癌特性を示しつつも正常細胞に対する毒性が小さいことが、細胞実験の段階であるが、複数の研究グループから示されている(A. Casini et al. *Dalton Trans.*, 43, 4209-4219 (2014)など)。このため、金錯体は次世代の抗癌剤として注目されている。しかし、金イオンは元来、酸化力が高く、細胞毒性の低減は難しいため、副作用を招く可能性が高いと予想される。

その反面、0価の金は、化学的に安定であり、高い酸化力を持つ金イオンよりも生体適合性が高く、細胞毒性が低いと考えられている。実際に、数十 nm の金ナノ粒子は、バイオセンシング用のトレーサーや、ドラッグデリバリーシステムなどの、生体系への応用研究に数多く用いられてきた。しかし、これらは、化学反応性を示さないが故に、抗癌作用などの細胞毒性は期待できない。

一方で、0価の金であっても、直径 5 nm 以下の微小な金ナノ粒子として、酸化物に担持すると、触媒活性が発現することが 1987 年に初めて報告された。以来、この金の触媒作用の研究が、CO 酸化などの気相反応を中心として精力的になされ、近年では液相反応にまでその応用の幅を拡大している(M. Haruta et al., *Advances in Catalysis*, 55, 1-126 (2012))。金の触媒作用の特徴の一つは、常温・常圧・水中といった温和な環境においても、酸素分子を活性化することができることである。その結果、グルコースの酸化反応などへの触媒活性が高いことがよく知られている。また、この金の触媒作用は、金の原子数や、金を固定・安定化する担体や、有機分子を組み合わせることで、化学反応性を変化させることができることがこれまでの研究から示唆されている。特に金ナノ粒子の直径が 2nm 以下の内、特定の原子数を持つ金ナノクラスターは、これまでの研究報告例から、優れた触媒活性を示すことが知られている。

2. 研究の目的

酸化物担持型金ナノ粒子触媒の持つ触媒作用は、生体内の環境(37℃、水が豊富に存在する)という環境においても、失われのないのではないか、という仮説を立てた。すなわち、0価の金であっても微小な金ナノ粒子や金クラスターとして触媒作用を発現させることで、体内にありふれて存在する酸素や水などの分子を活性化させることができ、その結果、抗癌作用などの細胞毒性を示すのでは

ないかと着想した。そこで、本研究では、酸化物担持型金ナノ粒子触媒の癌細胞への細胞毒性を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 金ナノ粒子触媒の調製と触媒活性の評価

金ナノ粒子触媒の活性は、固定化する担体の種類、構造や金と担体の相互作用によって大きく変化する。種々の酸化物を担体とする金ナノ粒子触媒を、共沈法や析出沈殿法を用いて調製した。また、調製時の触媒焼成条件も詳細に検討した。調製した触媒は、触媒の評価において基本的な気相 CO 酸化反応により触媒活性の評価を行った。CO 酸化反応における触媒の活性は、金の粒径、酸化数、担体の種類や金と担体の相互作用などに強く依存する。このため、CO 酸化反応の結果を調製した触媒の一次評価に用いた。また、CO 酸化反応において高活性が得られた触媒については、透過型電子顕微鏡(TEM)や X 線吸収微細構造(XAFS)解析などを行い、金の状態を観察した。

(2) 金ナノ粒子触媒の細胞毒性

培養細胞に対して、金ナノ粒子触媒の細胞毒性を試験した。細胞には、HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌由来)や Panc-1、Mia Paca-2(ヒト膵癌由来)を用いた。これらを 12 well plate に播種し、CO₂ インキュベータ培養し、対数増殖期に金ナノ粒子触媒を添加した。その後、3~6 日間、触媒共存下で培養を行い、生細胞数の計数を行った。計数には、トリパンブルー染色法を用いた。細胞株は、HeLa(ヒト子宮頸がん由来)、Mia Paca2、PANC-1(ヒト膵がん由来)を用いた。

(3) 表面プラズモン共鳴分析装置の作製

上述したトリパンブルー染色法は、作業効率が悪いため、多種試料のスクリーニングには向かない手法である。また、細胞数の経時変化を連続的に観察することができない。そこで、表面プラズモン共鳴分析装置(SPR)によるスクリーニング法を検討した。SPR とは、分子の相互作用の反応場を再現したセンサーチップに対して、表面プラズモン共鳴を用いることで、金薄膜表面の屈折率変化を、表面プラズモンの共鳴角変化として検出する方法であり、非標識に相互作用を高感度に測定できる手法である。この原理を細胞に適用すると、細胞死に伴うミトコンドリア内膜の分極率変化が信号として観測されることになることが小名らによって報告され(T. Ona et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 1889-1897 (2008)など)、SPR によって抗がん薬の迅速なスクリーニングを行える可能性が示唆された。そこで、本研究では、この報告を参考に、SPR 装置の作製を行った。

4. 研究成果

(1) 金ナノ粒子触媒の作製

析出沈殿法や共沈法を用いて、様々な酸化物質に金を担持した。一次選定として、それぞれの金触媒を用いて CO 酸化反応を行った。これら種々の酸化物質担体の影響を見積もるために、金ナノ粒子の担持による触媒活性の向上（金ナノ粒子触媒の活性と担体酸化物質の触媒活性の差）という観点で比較したところ、貴金属酸化物質を担体とした場合、金ナノ粒子の担持による触媒活性の向上がほとんど観察されなかった。一方で、卑金属酸化物質の内、ZnO や TiO₂、ZrO₂ などが金の担持による活性の向上が大きかった。すなわち、これらの酸化物質は、金ナノ粒子の担持による化学状態の変化が大きい担体であると考えられる。

これらの内、酸化亜鉛は共沈法で作ることができるため、金の担持量を容易に 10wt% 程度まで多くすることができる。そこで、金/ZnO (Au/ZnO と表記: 金担持量: 11wt%) を対象に、焼成条件を系統的に変え、CO 酸化活性との関係性を詳細に検討した。その結果、金と亜鉛の共沈物を水素雰囲気下 250 ~ 300 で焼成すると、-20 以下の低温においても CO 酸化活性が極めて高い Au/ZnO 触媒を調製することに成功した。TEM で金の粒子径を計測したところ、平均粒径は 1.7nm (金クラスター領域) であり、その粒径分布は非常に小さかった。また、XAFS 解析により、金がすべて 0 価であることを確認した。この低温活性の高さを検証するために、アレニウスプロットを作製したところ、-20 以下で活性化エネルギーの劇的な低下 (20kJ/mol → 3kJ/mol) が観察された。この副産物的に得られた興味深い現象は、金ナノ粒子触媒の低温活性の向上と関連性があると考えられるため、今後の研究の課題としたい。

(2) 金ナノ粒子触媒の細胞毒性

以上の検討から、ZnO、TiO₂ を、金担持の影響が高い酸化物質担体として、細胞毒性の実験に用いた。また、担体自体が不活性な SiO₂ も用いた。

これらの酸化物質を担体とする金ナノ粒子触媒の細胞毒性を HeLa 細胞に対して、トリパンブルー染色法により観察したところ、その序列は 11wt% Au/ZnO > 1wt% Au/TiO₂ > 1wt% Au/SiO₂ となり、100µg/ml 投与で比較した場合、細胞生存率はそれぞれ、1.9%、47%、88% となった。特に、Au/ZnO が際立って高い細胞毒性を示した。そこで、Au/ZnO と、金の担持されていない ZnO の細胞毒性を比較した。その結果、20µg/ml 投与では、それぞれの細胞毒性に差異は観察されなかったが、50µg/ml 以上の濃度では、Au/ZnO の方が 2~10 倍程度細胞毒性が高かった。ZnO は、Zn²⁺ が溶出し、これが細胞内の活性酸素種の生成に関与し、細胞毒性を示すことが知られている。従って、ZnO と Au/ZnO の高い細胞毒性は、第一に Zn²⁺ の溶出に起因すると考えられる。しかし、Au

の担持による細胞毒性の増加はこれだけでは説明ができない。現段階では、Au の担持によって、ZnO の表面積が増大することや ZnO の構造が不安定化し、Zn²⁺ の溶出が促進されたため、細胞毒性が増加したと推察しているが、更なる検証が必要である。また、Au/TiO₂、Au/SiO₂ に対しても、金を担持していない TiO₂、SiO₂ との比較を行った。どちらの結果も金を担持した方が、細胞毒性が高い傾向があったが、その差異はわずかであり、有意な差があるとは言えなかった。今後、これらの酸化物質に対しては金の担持量を増やすことによって、また実験数を増やすことによって差異があるか否かを検証していく予定である。

膵癌は難治性癌であり、新規抗癌剤の開発が求められている。そこで、膵癌由来である Panc-1、Mia Paca-2 に対しても細胞毒性の試験を行った。Panc-1 に対して、Au/ZnO と Au/TiO₂ はそれぞれ 25µg/ml の投与で、細胞生存率 50% 程度であった。Au/TiO₂ の場合、TiO₂ のみと比較して、細胞毒性に有意な差は見られなかったため、この Au/TiO₂ が示した毒性は TiO₂ に起因するものと考えられる。また Au/ZrO₂ や Au/Fe₂O₃ は、80% 程度で細胞毒性が比較的 low だった。一方で、Mia Paca-2 に対して、Au/ZnO は他の金ナノ粒子触媒と比較して、特に高い細胞毒性を示した (100µg/ml の投与で、細胞生存率 8% 程度であった、他の金ナノ粒子触媒では概ね 40~50% の細胞生存率であった)。

以上の結果をまとめると、Au/ZnO は非常に高い細胞毒性を示すことがわかった。ZnO 自体も、他の酸化物質と比較すると高い細胞毒性を示すが、金ナノクラスターを担持することによって、細胞毒性が増加する傾向にあることがわかった。一方で、細胞の種類によっても細胞毒性の強さが変化することがわかった。多様なパラメータが介在する複雑な系であるため、現段階では触媒活性と細胞毒性の相関関係は議論できていないが、今後 Au/ZnO を中心に系統的な実験を進めていくことで、金ナノクラスター担持による細胞毒性の向上効果を追跡していきたいと考えている。

(3) 表面プラズモン共鳴分析装置の作製

上述した細胞毒性試験は実験に手間を要する上に再現性良く実験することが難しい。そこで、クレッチマン配置の表面プラズモン共鳴分析装置による細胞毒性試験システムの構築を試みた。現段階では、表面プラズモン共鳴の現象を金蒸着膜において確認した。しかし、現段階で細胞毒性を評価する段階には至っておらず、検出感度の向上や、温度を制御できるステージや位相差顕微鏡への組み込みを行っている段階である。表面増強ラマン散乱法や質量分析法との組み合わせにも挑戦しており、今後、多角的に細胞応答を追跡できる分析法の開発を検討している。

以上の結果より、金ナノクラスターを担持した Au/ZnO が HeLa や MiaPaca-2 に対して、

高い細胞毒性を示すことが明らかになった。しかし、現段階では十分な検討を行えておらず、その機構解明は今後の課題である。また、予期しかつたことであり当初の目的とは外れるが、今回新しく調製した Au/ZnO が極めて高い低温 CO 酸化活性を持つことも明らかになった。

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1件)

K. Shibamoto, Y. Nishimura, T. Fujita,
“Study of Surface Plasmon-assisted
LDI-MS Measurement with Attenuated
Total Reflection”, Chem. Lett. 査読
有, 2016, 45(3), 262-264.

[学会発表](計3件)

藤田 隆史, 春田 正毅, “酸化亜鉛を担
体とした金クラスター触媒の低温 CO 酸
化” 第 116 回触媒討論会, 2015.9.16,
三重大学, 三重県津市

芝本 幸平, 藤田 隆史, “金ナノ粒子の
高秩序二次元配列体の作製と SERS 測定
における再現性の向上” 日本分析化学
会第 64 年会, 2015. 9. 11, 九州大学,
福岡県福岡市

芝本 幸平, 安室 駿輔, 堀内 剣太郎,
寺岡 拓麻, 藤田 隆史, “金ナノ粒子の
二次元配列体の光センサー応用のため
の表面プラズモン励起による高秩序配
列化支援に関する検討” 日本分析学会
第 75 回分析化学討論会, 2015. 5.24, 山
梨大学, 山梨県甲府市

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

研究代表者

藤田 隆史 (Fujita Takashi)

首都大学東京 都市環境科学研究科 分
子応用化学コース 特任助教

研究者番号：30737565