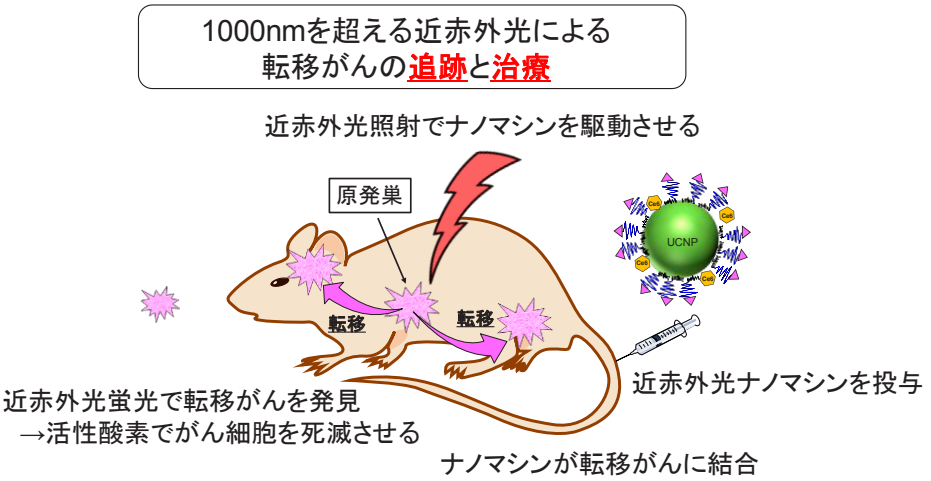
192　近赤外光駆動型ナノマシンによる転移がんの診断と治療	上村　真生

【目的】がん細胞の転移は、がんの症状悪化の大きな原因であり、迅速かつ精確な発見と治療が可能な技術の開発が求められている。そこで本研究は、生体透過性が極めて高い波長 1,000 nm を超える近赤外蛍光を発すると同時に、がん組織を破壊する機能を併せ持つ「近赤外光駆動型ナノマシン」を新規に作製し、体内深部の転移がんの発見と治療を実現する革新的技術を創出することを目的とした。

【方法】希土類含有セラミックスナノ粒子の代表的な合成方法である熱分解法を用いて、オレイン酸（OA）がナノ粒子表面に配位した希土類含有 $NaYF_4$（OA-$NaYF_4$）ナノ粒子を合成した。このナノ粒子の表面に、リガンド置換によって生体適合性高分子であるポリエチレングリコール（PEG）の片末端にポリアクリル酸（PAAc）のブロック構造を有するポリマー（PEG-*b*-PAAc）と光増感剤（Ce6）を修飾することで PEG／Ce6 修飾 $NaYF_4$ ナノ粒子を作製した。つぎにこの PEG／Ce6-$NaYF_4$ NPs を、マウス大腸がん由来 C-26 細胞上に播種し、細胞内にナノ粒子を導入した（NPs-C26 細胞）。細胞内への粒子導入は、NPs-C26 細胞を近赤外蛍光顕微鏡により観察することで評価した。さらに、がん細胞にナノ粒子を播種し、NIR 照射を行うことで、がん光治療の効果の評価を行った。

【結果】PEG／Ce6-$NaYF_4$ NPs を導入した C-26 細胞を NIR 蛍光顕微鏡により観察したところ、強い NIR 蛍光を観察できたことから、PEG／Ce6-$NaYF_4$ NPs を C-26 細胞に導入できていることが示唆された。また細胞毒性試験の結果より、ナノ粒子の添加によって、細胞生存率が変化することはなく、ナノ粒子自体は細胞にダメージを与えることがない安定な複合体を形成していることが明らかになった。さらに、細胞の生死評価を Live／Dead 染色により行った結果、ナノ粒子を添加していない細胞とナノ粒子を添加した細胞のいずれも、C-26 細胞はほとんど死滅することなく生存していることが明らかになった。この結果からも、本研究で作製したナノ粒子は、細胞の増殖や生存にほとんど影響を与えない安全性を有していることが明らかになった。さらに、PEG／Ce6-$NaYF_4$ NPs をがん細胞に播種し、NIR 光を照射した結果、がん細胞の増殖を抑制できることも明らかになった。これらの結果から、本研究で作製したナノ粒子は、転移がんの診断と治療のための「近赤外光駆動型ナノマシン」として、次世代のがん医療への応用が期待される。

本研究の概要



192. 近赤外光駆動型ナノマシンによる転移がんの診断と治療

上村　真生

東京理科大学 基礎工学部 材料工学科

Key words：近赤外光イメージング，がん光線力学療法，ナノ粒子，バイオマテリアル，セラノスティクス

緒　言

がんの死亡率は現在、日本国内における死因の第 1 位であり、その症状悪化の主な理由として、がん細胞が原発巣から他の臓器へと転移することがあげられ、進行性がんにおける多臓器転移は特に深刻な問題となっている。特に体内深部の転移がんはその発見と治療が極めて困難であるため、効果的な診断・治療方法の開発が求められている。そこで本研究では、生体深部に透過可能な波長 1,000 nm を超える近赤外（OTN-NIR）光を用いて、体内深部の転移がんの発見とその治療を同時に実現する「近赤外光駆動型ナノマシン」を開発し、革新的なナノ診断・治療技術を創出することを目的とした。近赤外（NIR）光（波長＞700 nm）は、紫外（UV）光（波長＜400 nm）や可視（VIS）光（波長 400～700 nm）と比べて生体内物質の吸収が低いために組織透過性が高く、生体内観察に有利であることが一般的によく知られている。さらに近年、NIR 光領域の中でも OTN-NIR 光が特に高い生体組織透過性を示すことが知られ、皮下深度 20 mm 程度まで透過することを可能としている。実際に我々は、OTN-NIR 蛍光を示すセラミックスナノ粒子を用いてマウス体内の血流イメージングに成功している［1～4］。

また、がん治療という観点では、近年、次世代のがん治療法である「光線力学療法（PDT）」が注目されている。PDT は、光照射によって活性酸素（ROS）を発生する光増感剤を患者に投与し、光照射をトリガーとしてがん治療を行う技術である。PDT は様々な腫瘍に治療効果を示しており、悪性脳腫瘍に対しても 2015 年に日本国内において保険適用になるなど、その高い治療効果が注目を集めている。しかしながら、PDT に使用される光増感剤は、組織透過性が低い可視光に応答して ROS を発生するため、脳内深部まで浸潤したがん細胞を治療することが難しい。

このような背景のもと、本研究では、NIR 光を励起光として、OTN-NIR 蛍光と同時に可視アップコンバージョン（UC）発光を示す希土類含有セラミックスナノ粒子を利用した、次世代の転移がん診断・治療技術を開発した。本研究では、NIR 光（980 nm）励起により、赤色（660 nm）の可視 UC 発光および OTN-NIR 発光（1,550 nm）を示す希土類含有 $NaYF_4$ ナノ粒子の表面に、赤色光に応答して $^1O_2$ を発生する光増感剤である Chlorin e6（Ce6）を固定し、さらに生理条件下での分散安定性を導入する poly（ethylene glycol）（PEG）を修飾することで、体内深部における PDT と蛍光イメージングを同時に行うための新たな「近赤外光駆動型ナノマシン」を作製し、転移がんの診断と治療技術への応用を検討した。

方　法

希土類含有セラミックスナノ粒子の代表的な合成方法である熱分解法を用いて、オレイン酸（OA）がナノ粒子表面に配位した希土類含有 $NaYF_4$（OA-$NaYF_4$）ナノ粒子を合成した。合成したナノ粒子の粒径は動的光散乱（DLS）および透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて評価した。このナノ粒子の表面に、リガンド置換によって生体適合性高分子であるポリエチレングリコール（PEG）の片末端にポリアクリル酸（PAAc）のブロック構造を有するポリマー（PEG-b-PAAc）と光増感剤（Ce6）を修飾することで PEG／Ce6 修飾 NaYF4 ナノ粒子を作製した。作製したナノ粒子の表面修飾は、ナノ粒子のゼータ電位の変化を測定することで評価した。つぎにこの PEG／Ce6-$NaYF_4$ NPs を、マウス大腸がん由来 C-26 細胞上に播種し、細胞内にナノ粒子を導入した（NPs-C26 細胞）。細胞内への粒子導入は、NPs-C26 細胞を近赤外蛍光顕微鏡により観察することで評価した。また、NIR 光照射時の制がん性能を、

WST アッセイを用いて評価した。続いて、がん細胞にナノ粒子を播種し、NIR 照射を行うことで、がん光治療の効果の評価を行った。

結果および考察

1. ナノ粒子の作製とがん細胞内導入

熱分解法を用いて合成したナノ粒子は、TEM 観察および DLS 測定により評価した。この結果、合成したナノ粒子は、粒径が 50 nm 程度であり、単分散状態で得られていることがわかった（図 1）。一般的に、100 nm 以下程度のナノスケールの粒子はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが知られており、得られたナノ粒子のサイズはがん細胞内に導入可能であると考えられる。

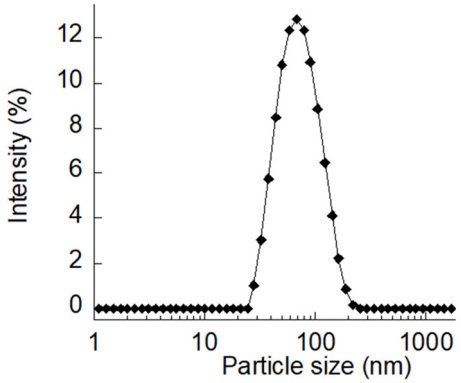


図 1. 合成したナノ粒子の DLS 測定結果
シクロヘキサン中で単分散状態を維持している。

つぎに、このナノ粒子を Colon-26 細胞に導入して NIR 蛍光顕微鏡によって観察した結果、細胞から強い NIR 蛍光が観察できたことから、ナノ粒子をがん細胞内に導入できていることが示唆された。さらに、WST アッセイの結果より、ナノ粒子の添加によって、細胞生存率が変化することはなく、ナノ粒子自体は細胞にダメージを与えることがない安定な複合体を形成していることが明らかになった。また、細胞の生死評価を Live／Dead 染色により行った結果、ナノ粒子を添加していない細胞とナノ粒子を添加した細胞のいずれも、Colon-26 細胞はほとんど死滅することなく生存していることが明らかになった（図 2）。この結果からも、本研究で作製したナノ粒子は、細胞の増殖や生存にほとんど影響を与えない安全性を有していることが分かった。

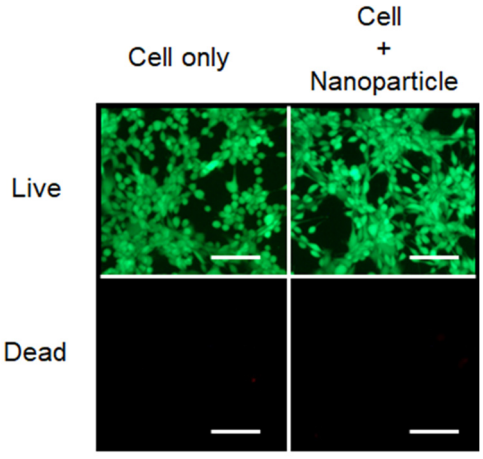


図 2. 合成したナノ粒子を添加した際のがん細胞の Live／Dead 染色結果
生細胞（緑色：Calcein-AM 染色）と死細胞（赤色：Propidium Iodide）の蛍光観察像。Scale Bars：100 μm。

2. がん光治療の評価

がん光治療の効果は WST アッセイ法により評価した（図 3）。この結果、NIR 光を照射した場合のみやナノ粒子のみを細胞に播種した場合には、顕著な細胞毒性はみられなかった。一方で、作製した未修飾ナノ粒子を細胞上に播種した後に近赤外光を照射しても細胞生存率は大きく低下しなかったのに対して、Ce6 を固定したナノ粒子を細胞上に播種した後に近赤外光を照射した場合は、細胞生存率が大きく低下することがわかった。これは、合成したナノ粒子のアップコンバージョン発光によって Ce6 が活性化されることで一重項酸素が発生し、がん細胞が死滅したためだと考えられる。さらに、Live／Dead 染色による細胞の生死評価を行った結果、Ce6 を固定したナノ粒子を添加し、NIR 光を照射した場合にのみ、顕著にがん細胞が死滅していることが確認された（図 3）。

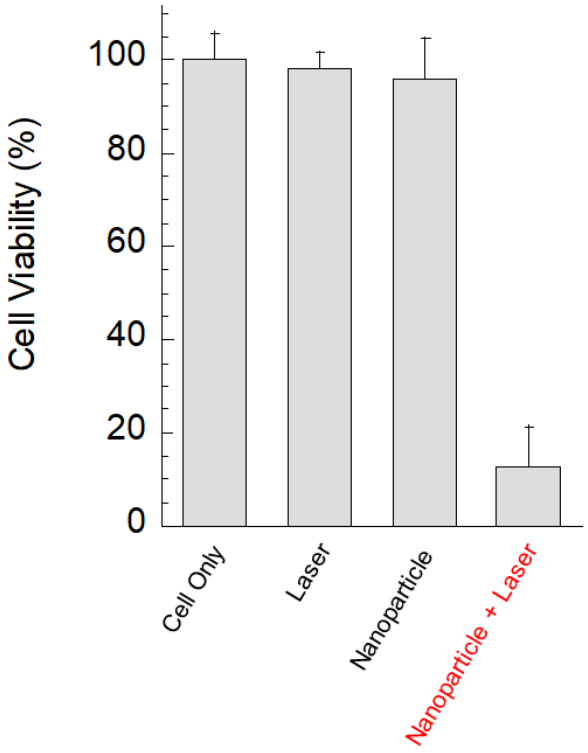


図 3. ナノ粒子を用いたがん細胞の光治療効果
WST アッセイの結果（n＝5、標準偏差 : SD）。

これらの結果から、本研究で作製した「近赤外光駆動型ナノマシン」は、転移がんを含めたがん診断と治療への応用が期待される。しかし、現在までに開発したナノ粒子は、がん細胞のみに到達する標的指向性が無いため、特定のがん細胞特異的な抗体などのリガンド分子をナノ粒子表面に導入することで、がん細胞のみに吸着するする性能を付与する必要がある。また、ナノ粒子自体の特性についても、蛍光強度を向上させることで、観察のしやすさや治療効果を向上できると考えられる。今後は、実際に担がんモデルマウスを用いた動物実験を行い、*in vivo* における性能評価を行うことで、臨床応用を視野に入れた応用展開を進めていく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京理科大学基礎工学部の曽我公平教授である。

文 献

1) Yeroslavsky G, Umezawa M, Okubo K, Nigoghossian K, Thi Kim Dung D, Miyata K, Kamimura M, Soga K. Stabilization of indocyanine green dye in polymeric micelles for NIR-II fluorescence imaging and cancer treatment. Biomater Sci. 2020 Apr 15;8(8):2245-2254. PMID: 32129330 DOI: 10.1039/c9bm02010a.

2) Chihara T, Umezawa M, Miyata K, Sekiyama S, Hosokawa N, Okubo K, Kamimura M, Soga K. Biological Deep Temperature Imaging with Fluorescence Lifetime of Rare-Earth-Doped Ceramics Particles in the Second NIR Biological Window. Sci Rep. 2019 Sep 5;9(1):12806. PMID: 31488857 DOI: 10.1038/s41598-019-49291-x.

3) Sekiyama S, Umezawa M, Iizumi Y, Ube T, Okazaki T, Kamimura M, Soga K. Delayed Increase in Near-Infrared Fluorescence in Cultured Murine Cancer Cells Labeled with Oxygen-Doped Single-Walled Carbon Nanotubes. Langmuir. 2019 Jan 22;35(3):831-837. Epub 2019 Jan 8. PMID: 30585494 DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b03789.

4) Kamimura M, Matsumoto T, Suyari S, Umezawa M, Soga K. Ratiometric near-infrared fluorescence nanothermometry in the OTN-NIR (NIR II/III) biological window based on rare-earth doped β-NaYF4 nanoparticles. J Mater Chem B. 2017 Mar 14;5(10):1917-1925. Epub 2017 Feb 9. PMID: 32263945 DOI: 10.1039/c7tb00070g.