

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19710108
 研究課題名 (和文) In vivo アポトーシスの誘発と検出を目指したコア-シェル型金ナノ粒子の設計
 研究課題名 (英文) Design of Core-Shell Gold Nanoparticles for the Detection and Induction of apoptosis in vivo
 研究代表者 大石 基 (OISHI MOTOI)
 筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師
 研究者番号：90419242

研究成果の概要：

本研究では、生体適合性の高いポリエチレングリコール (PEG) 末端に蛍光ラベル化を施したカスパーゼ 3 の基質ペプチド (DEVD 配列) を結合させ、ポリアミン (ゲル) コアには蛍光消光剤である金コロイドを内包させた金コロイド内包型 PEG 化ナノ (ゲル) 粒子を調製し、薬物により誘発された細胞内アポトーシス (自発的細胞死) をイメージングすることで抗ガン剤治療における早期診断 (治療効果の予測) システムの開発を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	390,000	3,390,000

研究分野：医療高分子材料

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：金ナノ粒子、ポリアミン、ポリエチレングリコール、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

遺伝子解析技術・分子生物学の急速な進歩に伴い、既に多くの疾病に関与する遺伝子の存在が明らかになっており、理論上は疾病に関与する遺伝子の発現を自由に制御することができれば、ガンなどの多くの難治性疾患の治療法を開拓することが可能であると考えられる。近年、短い二本鎖 RNA (siRNA) を細胞内に導入し、RNA 干渉 (RNAi: 2006 年ノーベル医学生理学賞) を誘導して標的遺伝子の発現のみを特異的に抑制しうる方法は、これまでのアンチセンス法に比べて、標的 mRNA

を切断する効率が高く、低濃度で効果が得られ、また配列を比較的容易に選択できることから、最も盛んに研究がなされ医薬品としての開発も始まっている。このような研究と共に、これら siRNA など薬物による細胞内のシグナル変化をイメージングするナノデバイスの開発が注目を集めている。

2. 研究の目的

本研究のねらいは、siRNA などの薬物を体内のガン組織・細胞にのみ安定に送達し、細胞内の環境変化に応答してアポトーシスを

誘起し、同時にその治療効果（アポトーシス）を検出可能な、治療（Therapeutic）と診断（Diagnostic）を同時に行うセラノスティック・ナノデバイス（Theranostic Nanodevice）を創製することである。より具体的には、PEG 末端に蛍光ラベル化を施したカスパーゼ 3 の基質ペプチド（DEVD）を結合させ、ポリアミン（ゲル）コアには蛍光消光剤である金コロイドを内包させた金コロイド内包型 PEG 化ナノ（ゲル）粒子を調製し、siRNA などの薬物により誘発されたアポトーシスをイメージングすることで抗ガン剤治療における早期診断（治療効果の予測）システムの開発を目的としている（図 1）。

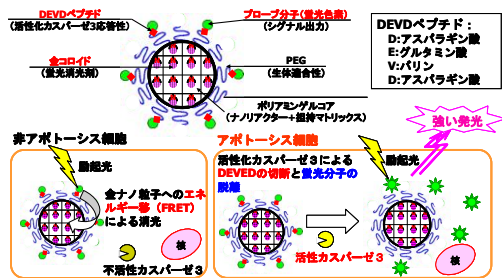


図 1. 細胞内アポトーシスをイメージングする金コロイド内包型 PEG 化ナノ（ゲル）粒子の概念

3. 研究の方法

本研究のような治療と治療効果の検出を同時に行うセラノスティック金ナノ粒子を構築するうえで以下のように研究を進めた。

- (1) 機能化 PEG/ポリアミンブロック共重合体の合成と PEG 化金コロイドの調製と評価:
- (2) 機能化金コロイド内包型 PEG 化ナノゲル粒子の調製と物理化学的評価:
- (3) 機能化金コロイド内包型 PEG 化ナノゲル粒子を用いた細胞内アポトーシスの検出:

以下「4. 研究成果」の項に上記項目に関する研究成果を記述する。

4. 研究成果

上述した「3. 研究の方法」に基づいた研究成果を示す。

- (1) 機能化 PEG/ポリアミンブロック共重合体の合成と PEG 化金コロイドの調製と評価:

ここでは、生体環境下においても高い分散安定性を示す金ナノ粒子を調製するための高分子設計を行った。生体適合性が高いことで知られているポリエチレングリコール (PEG) 及び金ナノ粒子 (蛍光消光剤) と相互作用を示すポリアミン (ポリジメチルアミノエチルメタクリレート: PAMA) に着目し、様々な鎖長 ($n=3, 6, 20, 40, 80$) の PEG-PAMA ブロック共重合体を精密合成した。

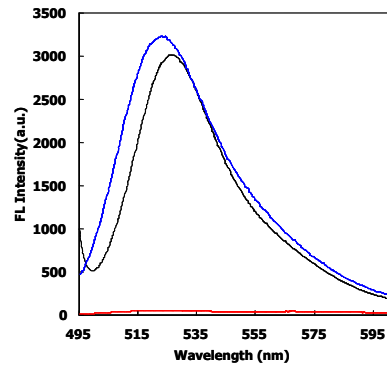


図 2. FITC-DEVD-nanogel (黒)、FITC-DEVD-nanogel-GNP (赤) および FITC-DEVD-nanogel-GNP をシアンエッチング処理した後(青)の蛍光スペクトル

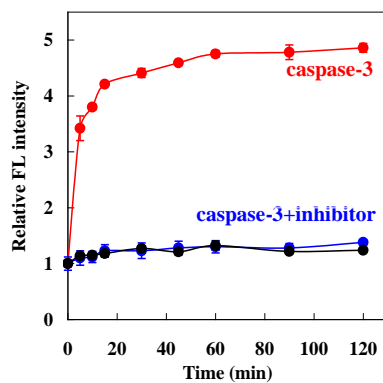


図 3. 反応時間に対する規格化した蛍光強度の変化。(赤) カスパーゼ-3 存在下、(青) カスパーゼ-3 および阻害剤存在下、および(黒) カスパーゼ-9 存在下

さらに、これらのブロック共重合体で調製した PEG 化金ナノ粒子は、PAMA 鎖長が短いほど安定に分散することが確かめられた。次に、この知見に基づき機能化金コロイド内包型 PEG 化ナノゲル粒子の調整を行った。(2) 機能化金コロイド内包型 PEG 化ナノゲル粒子の調製と物理化学的評価

PEG 末端にアセタール基を有する PEG 化ナノゲル粒子の合成は、既報に従って行った。また、FITC ラベル化 DEVD ペプチド (FITC-Lys-Gly-Gly-Asp-Val-Glu-Asp-Gly-Gly-Cys) のナノゲルへの結合は、PEG 末端のアセタール基をアルデヒド基に変換した後、アルデヒド基と FITC ラベル化 DEVD ペプチドのシステイン残基とのチアゾリン形成反応により行った。さらに、金コロイド内包型 PEG 化ナノゲル粒子 (FITC-DEVD-nanogel-GNP) の調製は、既報の自己還元法により行った。図 2 にペプチド導入型 PEG 化ナノゲル粒子 (FITC-DEVD-nanogel) および金コロイド内包型 PEG 化ナノゲル粒子 (FITC-DEVD-nanogel-GNP) の蛍光スペクトルを示す。FITC-DEVD-nanogel は、520 nm

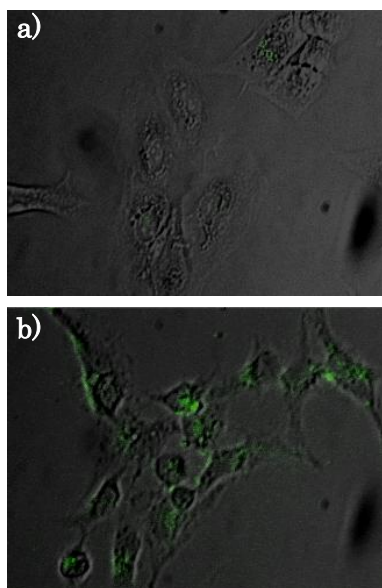


図 4. FITC-DEVED-nanogel-GNP 存在下での HuH-7 細胞の蛍光共焦点顕微鏡写真 a) 未処理、および b)スタウロスポリン (アポトーシス誘発剤) 処理後

付近に FITC 分子に基づく蛍光が観察されたが、FITC-DEVED-nanogel-GNP においては FITC に基づく蛍光がほとんど観察されず、このときの消光効率は 98%であった。さらに、FITC-DEVED-nanogel-GNP をシアンエッチング (金コロイドをイオン化) した後の蛍光スペクトルは、FITC-DEVED-nanogel の蛍光スペクトルとほぼ同様のものではあった。これらのことから、FITC-DEVED-nanogel-GNP の消光は、PEG 末端に導入した FITC 分子から金コロイドへの蛍光エネルギー移動 (FRET) によるものであることが示唆される。

(3) 機能化金コロイド内包型 PEG 化ナノゲル粒子を用いた細胞内アポトーシスの検出:

図 3 にカスパーゼと FITC-DEVED-nanogel-GNP を反応させたときの、時間に対する蛍光強度の変化を示す。その結果、カスパーゼ 3 との反応においては、5 倍近い蛍光強度の増大が観察された。一方、阻害剤存在下でのカスパーゼ 3 との反応においては、蛍光強度の上昇はほとんど観察されず、カスパーゼ 9 との反応においても同様であった。このことから、FITC-DEVED-nanogel-GNP は、カスパーゼ 3 と特異的に反応することで DEVED ペプチドが切断され、その結果 FITC 分子がナノゲルから離れることで FRET が解消され、蛍光を示したと考えられる。次に、FITC-DEVED-nanogel-GNP を取り込ませたヒト肝ガン由来 HuH-7 細胞に対してスタウロスポリンを用いてアポトーシスを誘発させ、共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した (図 4)。

その結果、アポトーシスを誘発させていない HuH-7 細胞では、蛍光はほとんど観察されなかった。一方、スタウロスポリンによりアポトーシスを誘発させた HuH-7 細胞においては、ほとんど全ての細胞において蛍光が観察され、アポトーシスのイメージングが可能であった。すなわち、この FITC-DEVED-nanogel-GNP は、薬物により誘発されたアポトーシスをイメージングするナノデバイスであることが示唆された。

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 2 件)

- ① Motoi Oishi, Atsushi Tamura, Takahito Nakamura, and Yukio Nagasaki, "A Smart Nanoprobe Based on Fluorescence-Quenching PEGylated Nanogel Containing Gold Nanoparticles for Monitoring the Cancer Response to Therapy" *Adv. Funct. Mater.* (2009) in press. 査読有り
- ② Daisuke Miyamoto, Motoi Oishi, Keiji Kojima, Keitaro Yoshimoto, and Yukio Nagasaki, "Completely Dispersible PEGylated Gold Nanoparticles under Physiological Conditions: Modification of Gold Nanoparticles with Precisely Controlled PEG-b-Polyamine" *Langmuir* (2008), 24, 5010-5017. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① 大石基、長崎幸夫「ナノプローブ粒子によるガンおよびアポトーシスのピンポイントイメージング」第 17 回バイオイメージング学会学術集会、千葉、2008 年 11 月 1 日
- ② 大石基、長崎幸夫「細胞内環境およびシグナルに応答する PEG 化ナノゲル粒子によるバイオイメージング」第 57 回高分子討論会、大阪、2008 年 9 月 24 日
- ③ Motoi Oishi and Yukio Nagasaki "pH-Responsive PEGylated Nanogels as a Smart Nanodevice for Cancer Diagnosis and Therapy" 236th ACS National Meeting (8th International Biorelated polymer Symposium), Philadelphia, USA, August 21, 2008.
- ④ 大石基「pH ではたらく機能性ナノゲル」高分子学会関東支部第 38 回茨城地区活動講演会、つくば、2008 年 7 月 4 日
- ⑤ 大石基、宮本大輔、中尾上純平、狩野光伸、長崎幸夫「PEG 化金コロイドによる siRNA 送達システムの構築」遺伝子・デリバリー研究会第 8 回 シンポジウム、

大阪、2008年5月9日

- ⑥ 山中千恵、宮本大輔、大石基、長崎幸夫「金ナノ粒子分散安定性向上のための N6PEG/金ナノ粒子複合化評価」第2回ポリスケールテクノロジーワークショップ、野田、2008年3月7日
- ⑦ 大石基、中尾上純平、長崎幸夫「胞内環境応答性 PEG 化金ナノ粒子による siRNA の細胞内デリバリー」第56回高分子年次会、京都、2007年05月29日

[図書] (計1件)

- ① Motoi Oishi and Yukio Nagasaki “Smart Hybrid Nanoparticles Based on Stimuli-Responsive PEGylated Nanogels Containing Metal Nanoparticles for Biomedical Applications” in the book entitled “Modern Trends in Macromolecular Chemistry” Edited by Frank Columbus Published by Nov Science Publisher Inc. New York in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 基 (OISHI MOTOI)

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師

研究者番号：90419242