

平成 30 年度 実用化研究報告

「がん細胞を高感度・安全に可視化・治療する有機－無機協奏機能ナノ結晶の実用展開」

国立大学法人 長岡技術科学大学 物質材料工学専攻 准教授 多賀谷 基博

1. 研究概要

従来の診断技術によって見つかった腫瘍は外科手術により完全に摘出できない場合が多く、結果として再発・転移する。そのため、増殖・転移が遅い超早期段階において、腫瘍を細胞レベルで高感度・安全に（体に優しく）診断・治療する技術が必要である。そこで、現在、特定の細胞を安全に可視化するバイオイメーキング材料の開発が求められており、「生体親和性」「強い発光」「効率的な細胞への取り込み」などの特性が必要とされている。バイオイメーキングとは、肉眼では見ることのできない細胞を蛍光物質によって標識し、細胞の動態を生きたままリアルタイムに可視化して観察する技術である。この技術によって、病気の発現に関わる細胞を検出する診断技術へつながるものと期待されている。現在、バイオイメーキングに用いられている材料は、生体親和性と発光効率がトレードオフの関係にあり、例えば、発光効率の高い材料では毒性のある元素が含まれている問題があった。

本研究では、生体組織と相互作用しない波長領域の光で励起／発光する生体親和性の高いナノ結晶を創製し、生体内・外の腫瘍を細胞スケールで高感度無侵襲にイメーキング・治療する技術を開発し、超早期がん診断・治療用材料へ実用展開を図った。

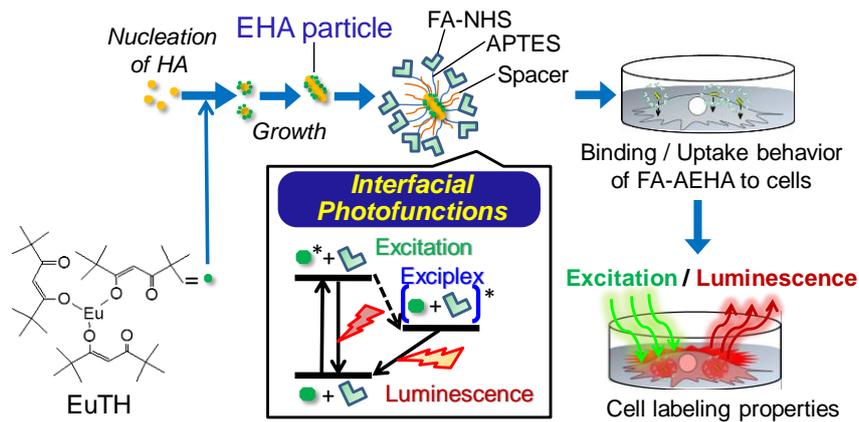
2. 水酸アパタイト / Eu 錯体複合ナノ結晶への葉酸誘導体固定と細胞標識機能化

特定細胞を安全に可視化する材料開発において、生体親和性に加えて発光強度と水分散性の向上といった課題に対して、我々は、生体親和性に優れた水酸アパタイト (HA) と Eu 錯体 (トリス(2, 2, 6, 6-テトラメチル-3, 5-ヘプタンジジオナト)ユロピウム(III): EuTH) を複合 (EHA) し、HA の光機能化を実現した。細胞標識機能を発現させるためには EHA の表面状態を設計する必要がある。そこで、本実用化研究においては、がん細胞と特異結合する葉酸活性化エステル (FA-NHS) をアミノプロピルシラン (APTES) を介して EHA へ固定した。FA-NHS の固定量を調整し、葉酸-EHA 間の相互作用を制御し (Scheme 1)、FA-NHS 固定に伴った光物性、及び、細胞標識能を評価した。

EHA は K_2HPO_4 水溶液へ $CaCl_2$ 水溶液と EuTH/エタノール溶液を滴下して晶析させた。Ca に対する Eu 濃度は 5.0 mol% とし、Ca/P 比を 1.65 とした。EHA へ APTES をスペーサー分子と共修飾し (Scheme 1)、次いで FA-NHS を固定した。FA-NHS の分子占有断面積から、EHA 表面の葉酸分子占有率 $Y(\%)$ が $Y=0, 5, 25, 50, 100$ となるようにし、試料名を $FAY-AEHA$ とした。評価は PL と

内部量子効率 (η_{int}) により行った。水分散性はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で電気抵抗ナノパルス法により粒度分布を評価した。HeLa 細胞の標識能も評価した。

EHA の PL 結果 (Fig. 1) から、ナノ結晶は赤色発光を示した。具体的に、FA-NHS 分子占有率が 3~5 %において、Eu(III)イオンの $f-f$ 遷移に由来した発光に加え、518 nm 付近に発光帯が観測された。類似発光帯は FA-NHS 水溶液においてプテリンとイミン部位の π 電子共役系の S_1-S_0 間電荷移動に起因して 550 nm に観測される。FA-NHS を低濃度に固定した場合、EuTH-FA (モノマー) 間で電荷移動が起こり、両分子間で励起錯体を形成したと考えられる。更に、FA-NHS の固定に伴って η_{int} が増大した。特に、励起波長 464 nm における FA10-AEHA の η_{int} は固定前に比して 12 倍増加した。PBS での粒度分布結果 (Fig. 2) から、EHA の平均粒径 144 nm から固定に伴って 115-125 nm に減少し、変動係数が増大した。正電荷をもつ FA-NHS の固定によりナノ結晶表面の電荷が反発する方向に働き、分散が促進された。60 時間培養した HeLa 細胞に FA5-AEHA を添加した結果 (Fig. 3)、添加から 1 時間での細胞標識を実現した。以上により、葉酸分子の固定に伴う EHA の光機能化、及び、迅速な細胞標識を実現した。ナノ結晶表面の FA 分子の状態が重要であることを見出した。



Scheme 1. Illustration of the preparation and evaluation processes of the FA-AEHA nanocrystals for cell-labeling in this study.

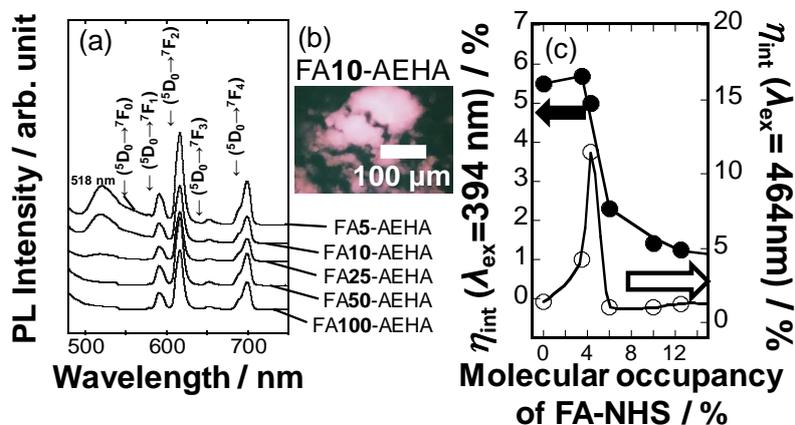


Fig 1. (a) PL spectra (excitation wavelength (λ_{ex}) at 464 nm) of the FA-AEHA nanocrystals and (b) the representative luminescent image, and (c) η_{int} value changes (λ_{ex} at 394, 464 nm) with the FA-NHS molecular occupancy.

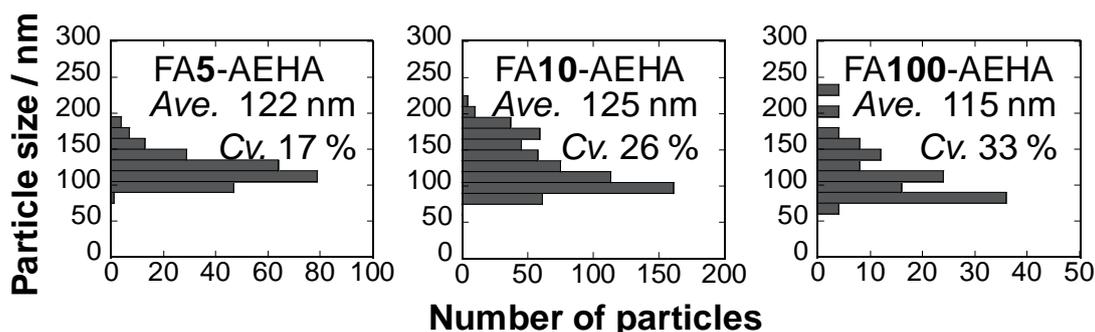


Fig 2. Particle size distributions of the FA-AEHA nanocrystals dispersed in PBS (the particle concentrations: 50 ng/ml).

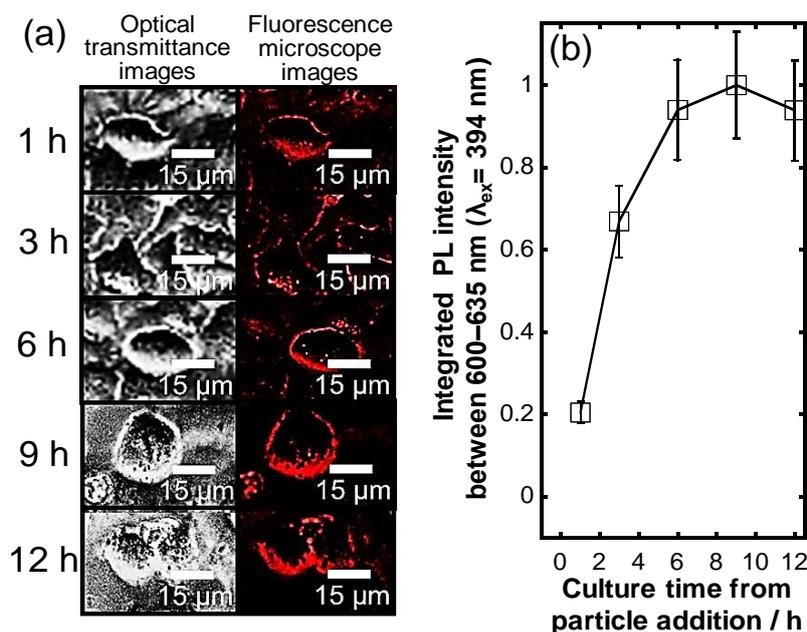


Fig. 3. (a) Optical and fluorescence microscope images of the cells reacted with FA5-AEHA (particle concentration: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The addition timing was after the culture for 60 h, and the photographs were subsequent cultured for 12 h. (b) Integrated luminescence intensity changes of the cells reacted with FA5-AEHA with the culture time.

3. クエン酸を含有した発光性アパタイトナノ結晶の新規開発

2で行った開発内容に対して、生体親和性に加えて発光強度と水分散性の向上を目指した。具体的に、本実用化研究では、内部・無機相と表面・有機相との相互作用によって発光過程(励起状態と緩和)を制御できると考え、 Eu^{3+} 含有 HA (Eu:HA) とクエン酸 (Cit) 分子の複合ナノ結晶 (Cit-Eu:HA) を新規合成し、Citの複合化に伴うナノ結晶の無機/有機界面相互作用による発光特性と水分散性への影響について考察した。

Cit-Eu:HA ナノ結晶の合成は、Citを超純水へ溶解させてリン酸源を溶解させ、 $\text{pH}=12$ に調整した。そこに、 $\text{Eu}/(\text{Ca}+\text{Eu})$ が2.5 mol%の濃度となるように EuCl_3 と CaCl_2 の混合水溶液を滴下した。

ここで、モル比 (Cit/(Eu+Ca) X は、0、0.6、1.0、1.2、1.8 とした。40 °C で加熱還流を施して洗浄し、100 °C で乾燥した。試料名は X Cit-Eu:HA とした。評価は、粉末 X 線回折 (XRD)、フーリエ変換型赤外分光光度計 (FT-IR)、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で電気抵抗ナノパルス法による粒度分布測定、ゼータ電位測定、蛍光分光光度計 (PL)、及び、内部量子効率 (η_{int}) 測定により行った。

XRD より、Cit-Eu:HA ナノ結晶は HA 単相であった。FT-IR 結果 (Fig. 4 (a)) から、Cit 由来の C=O の吸収帯の低エネルギーシフトが観測され、HA の Ca サイトと Cit が相互作用をして複合化したと考えられた (Fig. 4 (b))。PBS 中での粒度分布 (Fig. 5) から、Cit 添加に伴い平均粒径 (Ave.) と変動係数 (Cv.) が減少した。Cit は HA 表面へ吸着し、分散性の高い複合ナノ結晶として水溶液中に存在していると推測された。ゼータ電位測定をした結果、Eu:HA ナノ結晶は -2.7 mV を示し、Cit-Eu:HA ナノ結晶では -25 mV 以下の値を示した。負電荷を持つ Cit の存在によりナノ結晶表面の電荷が反発し、分散が促進されたと考えられる。PL 結果 (Fig. 6 (a)) から、ナノ結晶は Eu(III) イオンの $f-f$ 遷移に由来した赤色発光を示した。更に、Cit 添加量増加に伴って η_{int} 、及び、Eu 1 mol 当たりの PL 強度が増大した (Fig. 6 (b))。特に、0 Cit-Eu:HA に比して 1.0 Cit-Eu:HA の η_{int} 及び Eu 1 mol 当たりの PL 強度は 3.5 倍増加した。Eu:HA/Cit の界面相互作用が発光に影響すると考えられる。また、Cit の過剰添加によって、それらは減少した。合成時の Cit が過剰に存在した場合、Cit-(Ca, Eu) 間において、結晶核と別にキレートが生成し、HA の結晶形成を抑制したため、安定な複合ナノ結晶形成に至らなかったと考えられる。以上により、Eu:HA/Cit 界面相互作用が発光挙動及び水分散性へ影響することが判明した。クエン酸は、イメージングと同時にがん細胞の増殖抑制効果があることも分かっており、今後、学術雑誌において報告予定である。

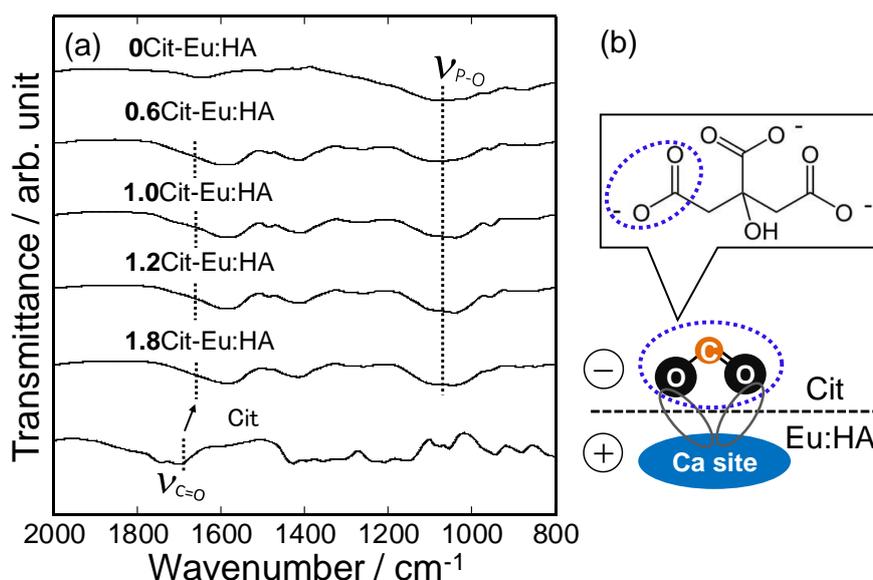


Fig. 4 (a) FT-IR spectra of the Cit-Eu:HA nanocrystals and (b) possible illustration of the interfacial state between Cit and Eu:HA of this study.

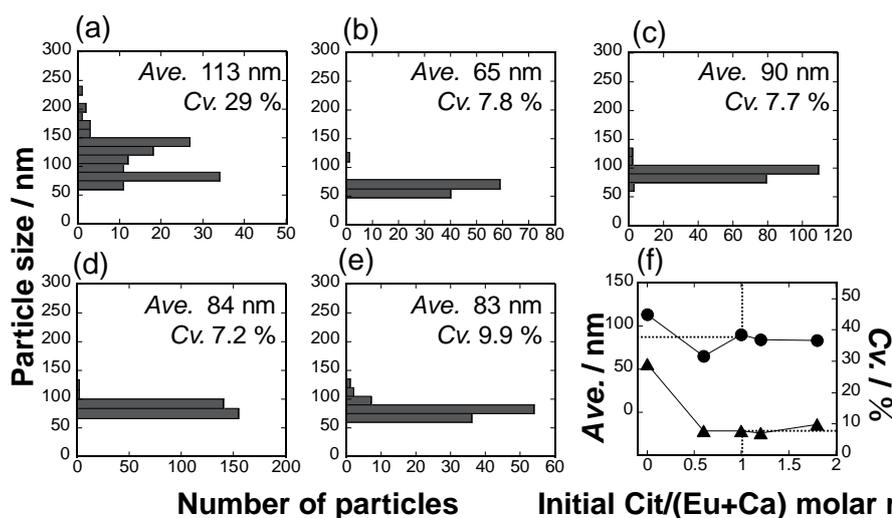


Fig. 5 (a–e) Particle size distributions of the (a) 0Cit-Eu:HA, (b) 0.6Cit-Eu:HA, (c) 1.0Cit-Eu:HA, (d) 1.2Cit-Eu:HA and (e) 1.8Cit-Eu:HA nanocrystals dispersed in PBS (particle concentrations: 100 ng/mL), and (f) their Ave. and Cv. value changes with the initial Cit/(Eu+Ca) molar ratio.

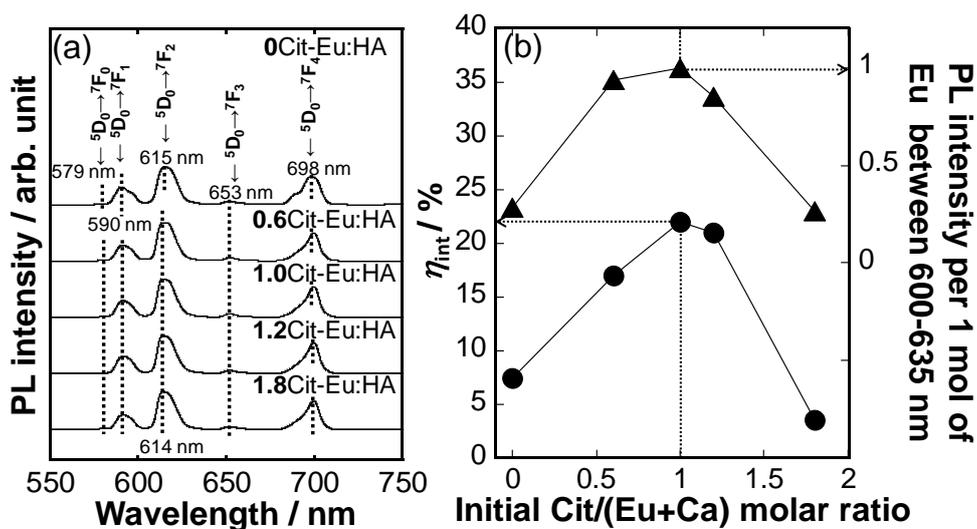


Fig. 6 (a) PL spectra (excitation wavelength (λ_{ex}) at 394 nm) of the particles and (b) η_{int} (λ_{ex} at 394 nm) and PL intensity changes with the initial Cit/(Eu+Ca) molar ratio.

4. 総括と今後の展望

本研究では、有機分子とアパタイトを協奏機能させた材料創製に関する世界初の研究であり、ナノバイオ材料分野とフォトニクス材料分野の融合と新原理が実現した。その結果、光で腫瘍を細胞スケールで高感度・安全に診断・治療するナノ結晶材料を見出した。本成果については、受理済論文3報、国際会議発表1件、国内学会発表3件を発信している。

今後、イメージングと同時に細胞を治療するナノ結晶としての開発を引き続き進める。今回紹

介したクエン酸は、がん細胞の増殖を抑制する効果を伴う。そのため、現在、本ナノ結晶ががん細胞イメージングと同時にがん細胞の増殖抑制効果が発現することを評価している。最終的に、がん細胞の診断と治療を両立するセラノティクスナノ結晶として実用することを目指しており、当研究室では、バイオ・医療分野における発光ナノ素材として幅広い活用が期待される革新的新素材開発を推進していく予定である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご協力下さいました共同研究者の皆様、ならびに本研究助成を賜りました公益財団法人インテリジェント・コスモス学術振興財団の皆様に、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

本研究助成によって創出された研究業績 (平成30年度)

学 術 論 文 3 報

1. Takuya Kataoka; Shigeaki Abe; Motohiro Tagaya, “Surface-engineered Design of Efficient Luminescent Europium (III) Complex-based Hydroxyapatite Nanocrystals for Rapid HeLa Cancer Cell Imaging” *ACS Applied Materials & Interfaces*, in press (2019) [doi: 10.1021/acsami.8b22740] *Impact Factor* 係数: 8.097
2. Takuya Kataoka; Shigeaki Abe; Motohiro Tagaya, “Synthesis of Europium(III) Complex-based Hydroxyapatite Nanocrystals for Biolabeling Applications.” *Key Engineering Materials*, Vol. 782, pp 41–46 (2018) [doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.782.41].
3. Kota Shiba; Takuya Kataoka; Motohiro Tagaya, “Preparation of Eu(III) Acetylacetonate-doped Well-defined Titania Particles with Efficient Photoluminescence Property.” *Dalton Transactions*, 47, 1972–1980 (2018).

国 際 会 議 発 表 1 件

1. Takuya Kataoka; Shigeaki Abe; Motohiro Tagaya “Synthesis of Europium(III) Complex-based Hydroxyapatite Nanocrystals for Biolabeling Applications.” [発表番号 (ポスター): P-39] 30th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine – Bioceramics 30, 2018年10月27日 (Higashiyama Campus, Nagoya University, Japan).

国 内 発 表 3 件

2. 片岡 卓也、多賀谷 基博 「水酸アパタイト/Eu 錯体複合粒子への葉酸誘導体固定と細胞標識機能化」 [口頭発表、発表番号: O-25] 公益社団法人日本セラミックス協会 第22回生体関連セラミックス討論会、2018年11月30日 (東京都 港区 東京工業大学 田町キャンパス・イノベーションセンター (CIC) 1階 国際会議室).
3. 片岡 卓也、多賀谷 基博 「アパタイト/Eu 錯体複合粒子の葉酸誘導体修飾による光機能化」

[12 有機分子・バイオエレクトロニクス (12。1 作製・構造制御)、口頭発表、発表番号:18p-G205-4] 第 65 回 応用物理学会関係連合講演会、2018 年 3 月 18 日 (早稲田大学西早稲田キャンパス)。

4. 片岡 卓也、多賀谷 基博 「水酸アパタイト／有機ユウロピウム(III)錯体の複合構造構築と物性評価」[発表番号：Y-7] 第 26 回無機リン化学討論会、2017 年 8 月 24-25 日 (千葉工業大学 (津田沼キャンパス))。