

研 究 報 告 書

「光・環境応答型多層界面金ナノロッドの創製」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：新留 琢郎

1. 研究のねらい

ナノ材料の持つ独特な特徴を医療技術に応用し、次世代の治療システムを構築しようというナノメディシンという研究分野が注目されている。そういう中、金ナノロッドは機能性ナノ材料として期待されている。すなわち、金ナノロッドは生体組織透過性が高い近赤外域に吸収を持ち、吸収した光を熱に変換するというフォトサーマル効果を示す。さらに表面修飾が容易で、様々な機能化が可能である。この金ナノロッドを実際に様々な診断や治療システムに応用するためには、生体適合化、標的化、薬物のコントロールリリースなどといった複雑な機能を付与する必要がある。しかし、同時にこれらは同時に機能してはならず、必要な場所で、的確なタイミングで機能を発揮しなくてはならない。そこで、本研究では、金ナノロッドを機能性基で修飾する際、光あるいは組織内環境に応答する結合（界面）を利用することで、上記目的を達成し、さらに、複数の機能を必要に応じて独立に発現させるシステムの構築を本研究の目的とした。

2. 研究成果

2.1. 近赤外光照射に応答する界面の構築

二本鎖 DNA は加熱されると一本鎖に解離する。すなわち、金ナノロッドのフォトサーマル効果により二本鎖 DNA を解離させることが可能となり、解離する鎖に PEG 鎖を修飾すれば、光照射することにより PEG 鎖は金ナノロッド表面から離れ、金ナノロッドが凝集する、あるいは、マウス体内であれば、周辺組織へ吸着し、光照射した部位に集積すると期待される。また、解離する

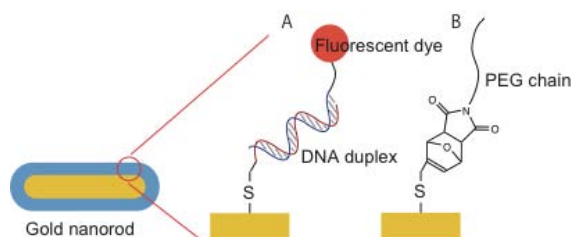


図1、フォトサーマル効果により解離するリンカー

DNA 鎖に薬物を修飾すれば、光照射した部位に限定した薬物放出が可能になる。ここではモデル薬物として、蛍光基を DNA 鎖に修飾し、フォトサーマル効果による二本鎖 DNA の解離を蛍光変化で評価した(図1A)。その結果、金ナノロッド表面で消光していた蛍光が、近赤外光を照射することにより回復する様子が観察できた。さらに、これは融点の高い二本鎖 DNA を修飾した場合、解離されにくくなったことから、金ナノロッドのフォトサーマル効果が蛍光基の放出をトリガーしていることが示された。さらに、この現象はマウス体内でも起こすことができることを確認した。

共役ジエンとアルケンが環化付加反応する Diels-Alder 反応は反応温度を上げることにより逆反応を起こすことができる。そこで、マレイミド基とフラン誘導体の環化付加物(逆 Diels-Alder 反応基)を解離基として利用することを試みた。ここでは、PEG 鎖を連結した逆 Diels-Alder 反応基を金ナノロッドに修飾した(図1B)。その結果、近赤外光照射することにより金ナノロッドの近赤外吸収スペクトルが大きく変化し、金ナノロッドが凝集することがわかった。これは、PEG 鎖が金表面から離れ、水溶液中に金ナノロッドが安定に分散できなくなったためである。

温度感受性ポリマーで修飾した金ナノロッドも作製した。これは、金ナノロッドのフォトサーマル効果により、このポリマー層が相転移を起こし、疎水性となり、水溶液中では金ナノロッドの凝集が起こるだろうと発想したためである。そして、動物体内では光照射部位に蓄積す

ることを期待した。具体的には、体温より高い温度で相転移を起こす *N*-イソプロピルアクリルアミドとアクリルアミドの共重合体を金ナノロッドに修飾した。これを担がんマウスに投与し、そして、がん部位に近赤外光を照射した結果、照射したがん部位への優位な金ナノロッドの蓄積が認められた。

2.2. 組織内環境に応答する界面の構築

ある種のがん組織内には特定のプロテアーゼが高発現していることが明らかにされている。この基質ペプチドをリンカーとして PEG 修飾あるいは薬剤修飾すれば、がん組織選択的に金ナノロッドを集積させる、あるいは、薬物を放出させるシステムが構築できると期待される。ここでは、がん組織に一般的に高発現しているプロテアーゼであるウロキナーゼ様プラスミノゲンアクチベーター (uPA) に注目し、この基質ペプチドを介して PEG 鎖を修飾した (図2A)。この金ナノロッドに uPA を作用させると、金ナノロッドは凝集したが、それは修飾する PEG 鎖の密度に大きく依存し、プロテアーゼの基質ペプチドへのアクセスと金ナノロッドの分散安定性は相反することがわかった。また、担がんマウスに投与した結果、ある程度の修飾密度をもつ金ナノロッドにおいて、優位ながん部位への集積が認められた。

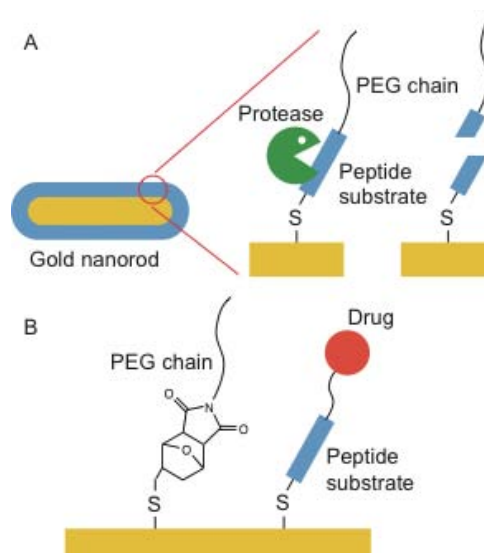


図2、プロテアーゼ活性により切断されるリンカー(A)と、光照射およびプロテアーゼ活性に応答する多機能性表面修飾

2.3. 多層界面をもつ金ナノロッドの設計

上記の複数の機能を組み合わせれば、各刺激あるいは環境に独立に応答する多次元の機能発現コントロールが可能になる。そこで例えば、逆 Diels-Alder 反応基を介した PEG 鎖と、薬物を結合させた基質ペプチドを金ナノロッドに修飾すれば (図2B)、光照射とがん組織内プロテアーゼという両者が揃った条件でのみ薬剤が放出するシステムとなり、より副作用の少ない制御された薬物デリバリーシステムへと発展すると期待される。そこで、実際に薬剤のかわりに蛍光基を修飾した多機能性表面修飾金ナノロッドを作製し、加熱処理前後のペプチド鎖のプロテアーゼによる切断効率を評価した。その結果、加熱処理により PEG 鎖が除かれると、むしろペプチド鎖が切断されにくくなるという結果が得られた。これは加熱処理による表面修飾構造の何らかの変化、あるいは、PEG 鎖が除去されたことによりペプチドが金表面と強く相互作用し、プロテアーゼがアクセスできなくなったことなどが考えられた。加熱条件や逆 Diels-Alder 反応基とペプチドの修飾比を変えることにより、あるいは、さらに金表面を小分子でマスクすることにより解決できると考えている。

2.4. その他

金ナノロッドのフォトサーマル効果により皮膚の物質透過性を亢進させ、高効率な経皮タンパク質デリバリーシステムが構築できないかと発案した。具体的には金ナノロッドとオブアルブミンを内部にもつソリッド-in-オイル (S/O) エマルジョンを調製し、皮膚に塗布し、そして、そこに近赤外光を照射した。その結果、オブアルブミンの皮膚内への顕著な移行が認められ、また、抗オブアルブミン抗体の産生も確認された。S/O エマルジョンの塗布と近赤外光照射による安価で簡便な経皮ワクチンシステムとして本手法は期待される。

3. 今後の展開

本研究で開発した光照射やプロテアーゼ活性に応答する界面のコンセプトは今後の金ナノロッドはもちろんのこと、他のナノ材料の標的組織への集積化や、これらを用いた薬物放出システムの構築のための基盤技術となる。ペプチドで修飾した金ナノロッドはがん組織に集積するが、これをさらに最適化を進め、がんのフォトサーマル治療システムの開発につなげていきたい。一方、二本鎖 DNA や逆 Diels-Alder 反応基等を利用した光照射に応答するシステムにおいては、体外からの光照射に応答する薬物放出システムの開発へと展開していきたい。そして、今回達成できなかった複数機能化修飾についても、今後検討を重ね、実証していく予定である。最終的には、金ナノロッドを用いる経皮デリバリーシステムも組み合わせ、がんや重篤な循環器疾患といった難治性疾患の新しい治療概念の創出につなげていきたい。

4. 自己評価

ナノ材料の表面に複数の機能を持たせる試みは金ナノ粒子に留まらず、酸化鉄ナノ粒子やポリマー粒子においても多くの報告があるが、複数の機能を必要に応じてそれぞれ発現させるというアイデアは現時点でも報告されていない。本研究では、金ナノロッド表面に光や環境に応答するいくつかのしくみを構築した。光照射に応答するシステム構築では、2本鎖 DNA と逆 Diels-Alder 反応基を利用し、実際に蛍光基の放出や PEG 鎖放出による金ナノロッドの凝集により実証することができ、この内容で特許も出願し、当初の目標を達成したと考えている。残念ながら、二本鎖 DNA を用いる光応答システムにおいては、米国のグループから先に報告されたが、マウス体内での実証は含まれておらず、今後急いで報告することで世界に先鞭をつけたい。

一方、プロテアーゼ活性に応答するシステムについては、動物実験においてその機能を実証することができ、学会や論文発表に加え、特許も出願し、十分にその目標を達成できたと考えている。

このように個々の光あるいは環境に応答する界面については、具体的な成果を得ることができたが、本研究課題にもある「多層界面」という言葉にあるように、複数の界面を組み合わせた、多機能化は概念を示すに留まり、実証することはできなかった。今後、検討を進めなければならない課題となった。

当初の研究計画を超える成果も得ることができた。温度感受性ポリマーを修飾した金ナノロッドにおいては、その相転移温度をコントロールすることに成功し、動物実験においてその効果を示すことができた。また、金ナノロッドの発熱効果を利用した経皮ワクチンシステムの構築に成功し、学会・論文発表、そして、特許出願も行い、本研究課題の重要な成果となった。

5. 研究総括の見解

赤外線照射による金ナノロッドのフォトサーマル効果を用いた「光応答型金ナノロッド」の研究は順調に成果を挙げている。また、できるだけ生体内での応答を計測しようとする姿勢も評価できる。申請時ヒアリングで本人が強調した「多層界面」の開発にはまだ成功するところまで辿りついていないので、今後のさらなる挑戦に期待したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1.	D. Pissuwan, K. Nose, R. Kurihara, K. Kaneko, Y. Tahara, N. Kamiya, M. Goto, Y. Katayama, T. Niidome, A solid-in-oil dispersion of gold nanorods can enhance transdermal protein delivery and skin vaccination, <i>Small</i> , 7(2), 215-220 (2011)
2.	A. Shiotani, Y. Akiyama, T. Kawano, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Active accumulation of gold nanorods in tumor in response to near-infrared laser irradiation, <i>Bioconjugate Chem.</i> , 21(11), 2049-2054 (2010)
3.	T. Niidome, A. Ohga, Y. Akiyama, K. Watanabe, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, Controlled

	release of PEG chain from gold nanorods: targeted delivery to tumor, Bioorg. Med. Chem., 18(12), 4453-4458 (2010)
	4. Y. Akiyama, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice, J. Control. Release. 139(1), 81-84 (2009)
	5. T. Kawano, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, PNIPAM gel-coated gold nanorods for targeted delivery responding to a near-infrared laser, Bioconjugate Chem., 20(2), 209-212 (2009)

(2)特許出願

研究期間累積件数: 9件

発 明 者: 新留琢郎、新留康郎、神谷典穂、後藤雅宏、片山佳樹、ダークロン・ピスワン、野瀬圭介、栗原亮介

発明の名称: 金ナノロッドを含有する S/O 製剤

出 願 人: 国立大学法人九州大学

出 願 日: 2010/6/15

発 明 者: 新留琢郎、新留康郎、片山佳樹、秋山泰之

発明の名称: 金微粒子被覆体とその製造方法、およびその用途

出 願 人: 国立大学法人九州大学、大日本塗料株式会社、三菱マテリアル株式会社

出 願 日: 2009/9/18

発 明 者: 新留琢郎、新留康郎、片山佳樹

発明の名称: ロッド状金微粒子構造体とその製造方法および用途

出 願 人: 国立大学法人九州大学、大日本塗料株式会社、三菱マテリアル株式会社

出 願 日: 2009/8/28

発 明 者: 新留琢郎、新留康郎、森 健、片山佳樹

発明の名称: 金微粒子被覆体とその製造方法、およびその用途

出 願 人: 国立大学法人九州大学、大日本塗料株式会社、三菱マテリアル株式会社

出 願 日: 2008/9/30

発 明 者: 新留琢郎、新留康郎、森 健、片山佳樹、丸山 厚、狩野有宏

発明の名称: 金微粒子とその製造方法

出 願 人: 国立大学法人九州大学、三菱マテリアル株式会社、大日本塗料株式会社

出 願 日: 2008/8/30

発 明 者: 新留琢郎、新留康郎、大賀 晃、森 健、片山佳樹

発明の名称: 金微粒子被覆体とその製造方法、およびその用途

出 願 人: 国立大学法人九州大学、大日本塗料株式会社、三菱マテリアル株式会社

出 願 日: 2008/6/30

発 明 者: 新留康郎、新留琢郎、本多加菜子

発明の名称: 分析用チップとその製造方法およびその分析方法



出 願 人: 新留康郎、新留琢郎、大日本塗料株式会社、三菱マテリアル株式会社
出 願 日: 2008/4/30

発 明 者: 新留康郎、新留琢郎
発明の名称: 生体の近赤外分光法とその装置
出 願 人: 大日本塗料株式会社、三菱マテリアル株式会社、新留康郎、新留琢郎
出 願 日: 2008/3/31

発 明 者: 新留琢郎、新留康郎、河野喬仁、森 健、片山佳樹
発明の名称: 理包微粒子とその調製方法、および用途
出 願 人: 国立大学法人九州大学、大日本塗料株式会社、三菱マテリアル株式会社
出 願 日: 2007/11/29

(3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

主要な学会発表

国内(招待)

1. 新留琢郎、金ナノ粒子と近赤外光を組み合わせた新しい診断・治療法, 日本学術振興会「未踏・ナノデバイステクノロジー」第 151 委員会研究会, 2011.01.31
2. 新留琢郎、塩谷 淳、ピスワン ダークロン、新留康郎、片山佳樹、金ナノロッドのフォトサーマル効果を利用したデリバリーと治療システム, 第31回 日本レーザー医学会 総会, 2010.11.13
3. 新留琢郎、河野喬仁、秋山泰之、大賀 晃、新留康郎、金ナノロッドと近赤外光を用いた診断・治療システム, 日本薬学会第 130 年会, 2010.03.29
4. 新留琢郎、金ナノロッド表面の機能性修飾とそれを使った診断・治療システム, 日本化学会第 90 春季年会, 2010.03.26
5. 新留琢郎、光あるいは電磁波に応答するマルチ機能性ナノデバイスの創製, 北海道大学公開シンポジウム、生体ナノ環境の時空間制御を目指して, 2010.01.05
6. 新留琢郎、診断・治療を支えるハイブリッド金ナノ粒子の創製, 第12回バイオテクノロジー一部会シンポジウム, 2009.09.13
7. 新留琢郎、金ナノロッドをフォトサーマル素子として利用したがん治療とDDS, 高分子学会九州支部フォーラム, 2009.08.22
8. 新留琢郎、金ナノロッドを用いたフォトサーマル治療とDDS, 第 25 回日本 DDS 学会, 2009.7.3

国際(招待)

1. Takuro Niidome, Atsushi Shiotani, Yasuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Functional gold nanorods for bioimaging and photothermal therapy, International Chemistry Congress of Pacific Basin Societies, 2010.12.15
2. Takuro Niidome, Development of Functional Gold Nanorods for Bioimaging and Photothermal Therapy, The 4th International Symposium on Atomic Technology, 2009.11.19
3. Takuro Niidome, Development of functional gold nanorods for photothermal therapy, The 2nd Yonsei University BK21/Kyushu University Global-COE Joint Synposium on "Frontier Molecular Systems", 2009.08.25
4. T. Niidome, Y. Akiyama, A. Ohga, T. Kawano, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama,



Development of tumor therapy system using gold nanorods with photothermal effect, 7th Asia 3 (China-Japan-Korea) foresight symposium on gene therapy and biomaterials, 2009.5.25

国際

1. Takuro Niidome, Atsushi Shiotani, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Active accumulation of gold nanorods in tumor mediated by their photothermal effect, International Conference on Biomaterials Science 2011, 2011.03.15
2. Takuro Niidome, Atsushi Shiotani, Yasuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Preparation of thermo-responsive polymer-coated gold nanorods and their accumulation to light irradiated site, 2010 Materials Research Society Fall Meeting, 2010.11.29
3. Takuro Niidome, Atsushi Shiotani, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Preparation of pNIPAM-modified Gold Nanorods and Their Delivery to Specific Tissue, 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2010.07.10
4. Takuro Niidome, Atsushi Shiotani, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Delivery of gold nanorods to tumor in response to near-infrared irradiation, The 9th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium on Gene Delivery and the International Workshop on Biomaterials 2010, 2010.06.21
5. Takuro Niidome, Atsushi Shiotani, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Targeted Delivery of Gold Nanorods Modified with Thermo-Sensitive Polymer, The 11th European Symposium on Controlled Drug Delivery, 2010.04.08
6. Takuro Niidome, Akira Ohga, Tsuyoshi Ando, Yasuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Protease-Triggered Targeted Delivery of Gold Nanorods into Tumor, 2009 Materials Research Society Fall Meeting, 2009.12.01
7. Takuro Niidome, Takahito Kawano, Akira Ohga, Yasuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Targeted Delivery Systems of Gold Nanorods Responding to Near Infrared Light Irradiation and Protease Activity, 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2009.7.20
8. Takuro Niidome, Yasuyuki Akiyama, Akira Ohga, Takahito Kawano, Yasuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Photothermal tumor therapy using gold nanorods and their targeted delivery, 8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, 2009.5.21
9. Takuro Niidome, Akira Ohga, Yasuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Gold nanorods for photothermal tumor therapy, 14th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, 2009.2.16
10. Takuro Niidome, Yasuyuki Akiyama, Kohei Shimoda, Takahito Kawano, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama and Yasuro Niidome, In Vivo Monitoring of Gold Nanorods and Tissue Damage Mediated with their Photothermal Effect, 2008 Material Research Society Fall Meeting, 2008.12.3
11. Atsushi Shiotani, Takahito Kawano, Takeshi Mori Yasuro Niidome, Yoshiki Katayama, Takuro Niidome, Preparation of N-Isopropylacrylamide Hydrogel-Coated Gold Nanorods, 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2008.7.16

受賞

Journal of Controlled Release Highest Cited Original Research 2006 Awards, Nov. 2008, PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications