

厚生労働科学研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業  
ナノメディスン分野

生体超微細 1 分子可視化技術によるナノ DDS と  
がん標的治療に関する研究 (H18-ナノ-一般-001)

平成18年度 総括・分担研究年度終了報告書

主任研究者 大 内 憲 明

平成 19 (2007) 年 3 月

# 目次

## I. 総括研究報告

- 生体超微細 1 分子可視化技術によるナノ DDS とがん標的治療に関する研究 ..... 1  
大内 憲明

## II. 分担研究報告

1. 共焦点レーザー顕微システムを用いた *in vivo*, *in vitro* における細胞内信号伝達計測手法の確立に関する研究 ..... 15  
渡邊 朋信
2. 高感度ナノ粒子によるナノ DDS とがん標的外科治療に関する研究 ..... 18  
武田 元博、亀井 尚、甘利 正和、仲田 栄子
3. PDT 応用のための光線感作物質の吸収スペクトル高精度計算 ..... 25  
川添 良幸、水関 博志
4. がん転移に関わる細胞運動の *in vitro* 及び *in vivo* イメージングに関する研究 ..... 29  
権田 幸祐
5. 音響光学効果を利用した超音波タグ蛍光イメージング法に関する研究 ..... 32  
小林 正樹
6. シリカカプセル化粒子の作製法の開発とその造影能評価に関する研究 ..... 37  
小林 芳男、粕谷 厚生
7. 超臨界 *in-situ* 表面修飾法を用いたハイブリッドナノ粒子合成に関する研究 ..... 41  
名嘉 尚
8. Q-dot を用いた体内時計タンパク検出に関する研究 ..... 43  
石田 直理雄

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

- 別紙 1 雑誌論文 ..... 45
- 別紙 2 学会発表 ..... 50
- 別紙 3 特許・新聞報道 ..... 54

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 55

# I. 総括研究報告

生体超微細 1 分子可視化技術によるナノ DDS とがん標的治療に関する研究

（主任）研究者 大内 憲明 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

機能性ナノ粒子を用いた単粒子イメージングを実現すべく、新規開発した高感度計測装置による計測を中心として、以下の研究を行った。

1. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRI ナノマーカの開発

①. ナノサイズヨウ化銀ビーズの体内分布を X 線 CT、TEM で初めて観察、肝細胞への取り込みを認めた (Breast Disease, 2006)。

②. MRI 造影剤としてガドリニウムナノ粒子を作製した (Breast Disease, 2006)。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細 in vivo イメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察

①. 量子ドットでラベルした抗乳がん抗体トラスツズマブの in vivo 単粒子イメージングに初めて成功した (Cancer Res, 2007)。

②. 量子ドットを用いた診断の際に障害となる、明滅や非特異的結合の抑制に成功した (Biochem Biophys Res Commn, 2006)。

3. 生体における腫瘍タンパク分子標的マッピング技術に基づく外科治療の確立

①. 深部組織蛍光マーカー検出に不可欠な超音波蛍光検出法の開発に成功した (Appl. Phys. Lett, 2006)。

今回、生体内における量子ドット結合抗腫瘍抗体の一分子の動態観察に初めて成功した。この手法により、生体内および細胞内における薬物の動態や作用、さらに生体のシグナル伝達を直接観察し得ることから、生体の様々な分子機構やメカニズムの解明に大きく寄与できるものと考えられる。また、がんの分子標的マッピングに基づく外科治療を行う際に不可欠な、深部に位置する病変を蛍光計測で検出し得る技術が開発されたことは大きな進歩と言える。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名：渡邊朋信（東北大学先進医工学機構）、武田元博（東北大学工学研究科、助教授）、川添良幸（東北大学金属材料研究所、教授）、粕谷厚生（東北大学学際科学国際高等研究センター、教授）、小林正樹（東北工業大学、教授）、水関博志（東北大学金属材料研究所、助教授）、石田直理雄（産業技術総合研究所、グループ長）、名嘉 尚（東北大学多元物質科学研究所、助教授）、権田幸祐（東北大学先進医工学機構）、小林芳男（茨城大学工学部、教授）、

亀井 尚（東北大学病院、助手）、甘利正和（東北大学病院、助手）、仲田栄子（東北大学保健学科、助手）多田 寛（東北大学病院、医員）、魚森昌彦（東レ・ダウコーニング（株））

A 研究目的

現在様々な機能を持つナノ粒子が作製され、実に多様な医療応用が試みられている。我々はこれまで機能性ナノ粒子の作製から、単粒子イメージング、外科治療への応用を目指し、装置開発を行って

きた。機能性ナノ粒子の一つとして、ナノサイズシリカコーティングヨウ化銀ビーズを作製し、有用性を示してきた。我々は、次の段階としてシリカコーティングヨウ化銀ビーズの血管内投与後の体内動態や、安全性の検証が必要と考えた。一方、機能性ナノ粒子を対象とした高感度な計測装置として、単粒子蛍光イメージングが可能な三次元リアルタイム共焦点顕微鏡システムおよび超音波変調蛍光計測システムの開発に取り組み、ナノ粒子1粒子並びに深部の対象の計測を実現可能とした。今回、機能性ナノ粒子の体内動態の解明、および機能性ナノ粒子の機能を最大限に生かす計測システムの構築を主な目的に据え、研究を進めた。

## B 研究方法

上記目的のために、ナノマーカー開発グループ（川添、水関、粕谷、小林芳ら）、単粒子検出グループ（渡邊、権田、多田ら）、臨床応用グループ（武田、小林正樹、甘利、亀井、仲田、石田ら）をそれぞれ形成し、下記のテーマについて研究を行った。

1. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRIナノマーカーの開発（小林芳男、名嘉、川添、水関、粕谷ら）：これまで我々が作製した、シリカコーティングヨウ化銀ビーズの体内動態、安全性を確立するため、静脈内投与後、CT撮影、ならびに透過型電子顕微鏡（TEM）を用い、肝、腎、心、肺、脾についてヨウ化銀ビーズの存在を確認した。ヨウ化銀ビーズはシリカコーティングにより特異な二重構造をと

っているためTEMによる観察が容易である。また安全性試験として、ナノサイズヨウ化銀ビーズの量を変えて静脈投与し、死亡率を評価した。

がんの光線力学療法剤として亜鉛pyridinoporphyrazine、亜鉛フタロシアニン、亜鉛poly(benzo)-poly(3,4-pyrido) porphyrazinesなどが用いられるが、これらは光照射によって活性酸素を生成し、ナノ粒子に有用な機能を付与する有力な候補物質である。今回、ポルフィリン誘導体について密度汎関数理論(DFT)と半経験的手法により物性計算を行い、物性の予測を行い、最適な計算方法を求めた(川添、水関)。計算法は、TDDFT、ZINDO/S、PM3を用いた。

新たなMRI造影剤として、2つの異なる手法によりガドリニウムナノ粒子の作製を試みた。1つは小林芳らのStober法によるもので、もう1つは名嘉らの超臨界法に基づく方法である。Stober法ではガドリニウムはコロイドを形成し難いため、まずシリカナノ粒子を形成し、その表層にガドリニウムを沈着させる方法でナノ粒子を作製した。超臨界法は、超臨界in-situ表面修飾法を用い、ガドリニウム水酸化物の表面修飾ナノ粒子を合成した。

また、蛍光造影剤として、超臨界in-situ表面修飾法によりBaSnO<sub>3</sub>ナノ粒子の合成を試みた。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細in vivoイメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察（渡邊、多田、権田）：抗がん剤DDS研究のモデルとして、HER2タンパク陽性乳がん細胞を

移植したマウスに量子ドット結合抗HER2抗体トラスツズマブを投与し、三次元リアルタイム共焦点顕微鏡システムを用い、dorsal skin fold chamberを形成して腫瘍を窓越しに観察可能とし、腫瘍血管、腫瘍組織、腫瘍細胞をそれぞれ経時的に観察した。

また、量子ドットを用いた蛍光計測において明滅は連続測定妨げとなる。本研究では抗酸化剤を用いて明滅の抑制を試みた。また、量子ドットは細胞タンパクに非特異的に結合するため、標的細胞と非標的細胞のコントラストが低下する。そのため、非特異的な結合を抑制する目的で、カゼイン、アルブミン等を組織固定液中に混入し、その効果を検討した。

### 3. 生体における分子標的腫瘍タンパクマッピング技術に基づく外科治療の確立 (武田、小林正樹、甘利、亀井、仲田ら) :

悪性腫瘍に対する外科治療の基本は完全な切除である。そのため、従来の悪性腫瘍に対する手術は腫瘍病巣に正常組織をある程度つけた状態で切除して完全な切除を目指す。しかし、時に悪性腫瘍は肉眼には見えない浸潤によって周囲に拡がり、肉眼的に切除し得たと判断しても、病理診断で断端陽性となることもしばしばである。このように肉眼で切除範囲を決定するには精度の限界があり、近年求められているテーラーメイドメディスンの遂行のために、手間と時間をかけても病理診断が欠かせないものとなっている。手術の段階で病理診断に匹敵するがんの検出方法があれば手術時間の短縮だけでなく、病理医の負担を軽減させるこ

ともできる。そのためには腫瘍を微細なレベルまで可視化する必要がある。ほとんどの腫瘍は体表より深部に存在しているため、腫瘍のマーキングには蛍光法が有力な方法である。しかしながら従来の蛍光計測法は最も蛍光の強い量子ドットを用いた場合でも深部方向の計測限界が1cm程度であり、臨床応用を阻むひとつの要因であった。生体に蛍光計測を行うに当たり病巣は必ずしも計測表面に存在するわけではないので、深部に存在する蛍光色素を検出する新たな技術が必要である。今回、超音波変調蛍光検出法の開発に取り組み、水槽にイントラリピッドと蛍光標的を入れた模擬生体を用い、その深部にある蛍光色素の検出実験を行った。

また、量子ドットと抗HER2抗体の結合物を作製し、in vitroでの結合を確認する一方、現在の形状では非特異的な結合によりコントラストが低下するため、量子ドットに対するコーティングの最適化を検討した。

### 倫理面への配慮

本研究は現在までのところ、動物実験による有効性、安全性の検証が主目的である。動物を用いた実験はすべて全身麻酔下に行っており苦痛を伴うものではない。また本研究における動物実験計画は本学の動物実験委員会に実験計画書を提出し、認可されている。

### C 研究結果

1. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRIナノマーカの開発 (小林芳男、名嘉、川添、水関、粕谷ら) : ポルフィリン誘

導体の計算と実際の実験値を比較した結果、TDDFT計算は溶媒中のこれらの錯体の可視、紫外領域のスペクトル計算として十分有効であることがわかった。

ヨウ化銀ビーズの体内動態について、ラットにヨウ化銀ビーズを静脈注射直後にX線CTで撮像し、造影効果を確認した後、安楽死させ、各臓器を摘出して透過型電子顕微鏡でヨウ化銀ビーズの分布を観察した。その結果、投与直後は肺、肝、腎、脾臓とも血管内にヨウ化銀ビーズを確認できたが、その後は肝細胞にのみ取り込みが見られ、それ以外の臓器にヨウ化銀ビーズは認められなかった。(Breast Disease, 2006; 日本外科学会, 2006)

新たなMRI造影剤として、まずStober法によりガドリニウム内包シリカコーティングビーズの作製を試みた。さらに、金コロイドを同様にシリカコーティングした。ガドリニウム内包シリカコーティングビーズはMRIで撮像し、水と比較して造影効果を確認できた。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細in vivoイメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察(渡邊、多田、権田)：ハーセプチンは細胞膜上のHER2に結合した後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた。細胞内に取り込まれたハーセプチンを含む小胞は細胞膜に沿ってしばらく輸送された後、突然方向を変化させ核へ一気に到達し、核内へ移行した。核内へ移行したハーセプチンは核周辺領域(perinuclear region)に濃縮され、ここで蛋白質分解を受けていることが

予想された。

細胞膜に沿った輸送はミオシンVI(アクチン系モーター蛋白質)が、細胞膜から核に向かう輸送はダイニンが担っていると考えられる。上記光学系計測装置を用いて、核に向かって輸送される小胞を観察してみると、小胞は進行方向に8nmのステップを繰り返しており、in vitroで観察されたダイニンのステップの大きさと一致した。

次に乳がん細胞株KPL-4を用いたin vitro実験において、細胞運動時の糸状仮足先端の量子ドットの軌跡を1フレーム33msで観察した。得られた粒子の軌跡を平均2乗変位という粒子の拡散係数を求める方法で解析した(この解析法では粒子が方向性を持たない拡散性(=ランダムな)の動きをしている場合は1次関数の直線で近似することが出来、一方、方向性(=法則性)を持つ運動は一次関数とならず、後者の場合はある目的を持った運動とみなすことができる)。その結果、拡散係数は $43\text{nm}^2/\text{ms}$ として求めることが出来た。

3. 生体における分子標的腫瘍タンパクマッピング技術に基づく外科治療の確立(武田、小林正樹、甘利、亀井、仲田ら)：量子ドットの最適なコーティングとして、これまでに高分子PEG、MPCなどを有力な候補として見出した。

図2にアガロース生体模擬試料を用いて画像化した結果を示す。また測定後に縦方向に切断した生体模擬試料の断面写真を図3に示す。試料中央に蛍光体が包埋されている様子がわかる。図2において、中心付近に蛍光強度ピークが明瞭に

検出され、そのサイズは実際の蛍光体のサイズにほぼ一致した。

図4は市販のローズハムによる2次元画像計測結果である。このときの走査分解能は0.5 mmである。走査範囲の中心付近に蛍光変調信号のピークを確認することができる。また図5はピークを含む光軸方向の蛍光強度プロファイルであるが、信号強度ピーク的位置は挿入された蛍光体の位置にほぼ一致した。半値幅は4~5mmであった。

その他の生体試料として牛脂ブロック、豚ロース肉を用いた場合についても、同様に蛍光変調信号のピークを確認することができた。

#### D 考察

本研究の目的は機能性ナノ粒子を用いた単粒子イメージングであり、本年度はトラスツズマブ結合量子ドットの単分子イメージングに世界で初めて成功した。本手法は今後、生体内の薬物動態や信号伝達の研究を大きく進歩させるものになると考えられ、革新的な成果である。また、新たなナノサイズマーカーとしてヨウ化銀ビーズの体内動態の検討を行い、およその排泄経路を定性的ではあるが特定することができた。臨床応用を目指すナノ粒子の実用化にあたり、安全投与量の決定ならびに体内動態、排泄経路の解明は避けて通ることができない。多くのナノ粒子が有用性のみ強調される一方で、体内動態・排泄経路が明確に示されていない現状を考えると本研究はその点でも極めて意義深いものである。

以下各項目について述べる。

#### 1. 高感度計測を可能とする蛍光・X線・MRI ナノマーカーの開発 (小林芳男、名嘉、川添、水関、粕谷、武田、甘利、亀井) :

今回施行したポルフィリン誘導体のシミュレーション実験の結果から、この手法によって候補材料を選別し得ることが示された。これにより、沢山の候補材料の合成と検討の手間を省くことができ、より早く最も有望な材料の具体的な実験に着手することができる。本手法は物質選別の時間的、費用的コストを大きく削減させ得る技術といえる。

これまでシリカコーティングヨウ化銀ビーズが造影剤として有用であることを示してきたが、今回はじめて各主要臓器におけるシリカコーティングヨウ化銀ビーズの存在を、TEMにより観察した。その結果、従来の造影剤に比べ長期にわたって造影効果を持続し、数日後に排泄されることがわかった。排泄経路として、胆汁排泄が関与すると考えられ、腎排泄は否定的な結果を得た。また血管内では凝集等も起こらず、短時間では血栓形成等の重大な障害も観察されなかった。したがって、シリカコーティングヨウ化銀ビーズは長時間造影効果を維持したい病変の描出に有効であり、がんの場合EPR (extended permeability and retention) 効果によって腫瘍に長時間にわたって蓄積、造影効果を維持することが期待される。

現在の問題として、従来のX線造影剤に比べて造影効果がやや不足であることが挙げられる。今後さらにヨウ化銀の濃度を上げるなどの改善策が望まれるが、



濃度を上げた場合、凝集などの問題が生じやすくなることから、種々の凝集を防ぐ工夫も同時に行う必要がある。

2. 高速共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた超微細in vivoイメージング法の確立と細胞内タンパクの動態観察（渡邊、多田、権田）：

ハーセプチンがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、核内に移行するまでの一連の過程を観測できた。その結果、ハーセプチンがどのような経路を辿って核に至るのかを明確に知ることができた。今後は本研究で開発した装置を使って、(1)ハーセプチンの蛋白質分解経路を阻害した場合、薬剤効果にどのような影響を与えるのか、(2)がんの要因となっているHER2のリサイクル機構にハーセプチンがどのように関わっているのか、(3)HER2のキナーゼ活性に対するハーセプチンの関与などをリアルタイムにイメージングすることを考えている。また、装置の高速化・位置高精度化、分解能向上を図り、ハーセプチンの細胞内動態をさらに詳細にイメージングすること、装置を担がんマウスの腫瘍細胞イメージングへ応用すること等を試みる予定である。本研究によって開発された「がん転移のin vivoイメージング技術」の精度をさらに発展させると共に、非運動性細胞との比較により、今回得られた拡散係数の持つ意義を明らかにして有用性を示し、最終的に抗がん剤のがん転移への効果を1細胞レベルでリアルタイム観察する技術に応用したい。

3. 生体における分子標的腫瘍タンパクマッピング技術に基づく外科治療の確立（武田、小林正樹、甘利、亀井、仲田ら）：

今回、従来の蛍光計測法の計測限界である1cm以上の深さの蛍光色素の検出に初めて成功した。本方法はセンチネルリンパ節の検出に有用なだけでなく、蛍光色素でマーキングした腫瘍組織の検出にも大きく貢献し、腫瘍を完全に切除し得る精密な外科手術法を確立する上で欠かせない技術として期待できる。現在の装置は試作機であるため、今後更に改良を重ね、生体で使用し得る装置を作製したい。さらに、高感度な蛍光計測を生体に応用するためには量子ドットが最も好ましいが、その多くは脾臓に非特異的に取り込まれ、効率的な計測ができない。生体内の量子ドットの非特異的結合を効率的に抑制し、かつ安全性を確保し得るコーティング技術を早急に開発したい。また、金ナノ粒子の造影剤の開発も試みており、安全性を確認しつつ、最適な応用法を検討している。

## E 結論

本研究の結果、生体内において単粒子レベル、すなわち一分子の動きをナノメートルオーダーで蛍光計測可能であることが世界で初めて示された。この手法は今後、癌の細胞レベルでの診断や、薬物動態、シグナル伝達の解明など臨床に直結する基礎研究への応用が期待される。また、蛍光計測を従来に比べて深部まで観察し得る技術は蛍光計測法を病巣検出、センチネルリンパ節検出等、医療応用する上で画期的な技術と言える。

## F 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

## G 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tada H, Higuchi H, Watanabe TM, Ohuchi N. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res*, 2007; 67: 1138-1144.
- 2) Toba S, Watanabe TM, Yamaguchi-Okimoto L, Toyoshima YY, Higuchi H. Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 5741-5745.
- 3) Li-Shishido S, Watanabe TM, Tada H, Ohuchi N. Reduction in nonfluorescence state of quantum dots on an immunofluorescence staining. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, 351: 7-13.
- 4) Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Takeda M, Enomoto M. Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging. *Applied Physics Letter*, 2006; 89: 1811022.
- 5) Park YS, Liz-Marzán LM, Kasuya A, Kobayashi Y, Nagao D, Konno M, Mamykin S, Dmytruk A, Takeda M and Ohuchi N, X-ray Absorption of the Gold Nanoparticles with Thin Silica Shell. *J Nanosci Nanotechnol*, 6 (11): 3503-06, 2006
- 6) Sakurai Y, Takeda M, Kobayashi Y, Ohuchi N. Generation of nanosized silver-iodide beads for medical application. *In: M Esashi, K Ishi, N Ohuchi, N Osumi, M Sato, T Yamaguchi, (eds), Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp. 505-508, 2006.*
- 7) Cong Liman, Kobayashi Y, Takeda M, Ohuchi N. Development of silica coated silver iodide nano-particles in different sizes for novel x-ray contrast media. *In: M Esashi, K Ishi, N Ohuchi, N Osumi, M Sato, T Yamaguchi, (eds), Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp. 311-315, 2006.*
- 8) Kawai M, Higuchi H, Watanabe TM, Tada H, Ohuchi N. In vivo visualization of metastasis of human breast cancer cells labeled with Quantum dots in mice. *In: M Esashi, K Ishi, N Ohuchi, N Osumi, M Sato, T Yamaguchi, (eds), Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp. 369-376, 2006.*
- 9) Li S, Higuchi H, Ohuchi N. Effects of Trastuzumab and paclitaxel in

- HER2-overexpressing breast cancer. *In: M Esashi, K Ishi, N Ohuchi, N Osumi, M Sato, T Yamaguchi, (eds), Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp. 395-400, 2006.*
- 10) Nakajima M, Takeda M, Kobayashi M, Ohuchi N. Nano-sized fluorescent particles as new tracers for sentinel node detection: an experimental model for decision of appropriate size and wavelength. *In: M Esashi, K Ishi, N Ohuchi, N Osumi, M Sato, T Yamaguchi, (eds), Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp. 465-472, 2006.*
- 11) Tada H, Higuchi H, Watanabe T, Ohuchi N. In vivo breast cancer cell imaging using quantum dot conjugated with anti-her2 antibody. *In: M Esashi, K Ishi, N Ohuchi, N Osumi, M Sato, T Yamaguchi, (eds), Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp. 515-520, 2006.*
- 12) Ohuchi N, Nakajima M, Tada H, Ishida T, Takeda M, Higuchi H. Nano-sensing capsules for medical application: nano-particles for sentinel navigation and quantum dots conjugation with anti-her2 antibody for molecular imaging of cancer. *In: M Esashi, K Ishi, N Ohuchi, N Osumi, M Sato, T Yamaguchi, (eds), Future Medical Engineering Based on Bionanotechnology. Proceedings of the Final Symposium of the Tohoku University 21st Century Center of Excellence Programme. Imperial College Press, pp. 245-259, 2006.*
- 13) Tada H, Higuchi H, Watanabe T, Ohuchi N. imaging of tumor-targeting quantum dot in breast cancer of living mice. *Breast Disease, 2006; 25: 43-43.*
- 14) Ohuchi N, Takeda M, Nakajima M, Sakurai Y, Kawai M, Ishida T, Higuchi H. Application of nanotechnology for breast cancer research: Nano-DDS and molecular imaging based on visualization of single particle in vivo. *Breast Disease 2006; 25: 47-47.*
- 15) Takeda M, Kobayashi Y, Sakurai Y, Cong L, Ishida T, Suzuki A, Amari M, Ohuchi N. Detection of Sentinel lymph nodes by novel MR contrast media. *Breast Disease 2006; 25: 47-47.*
- 16) Sakurai Y, Takeda M, Kawazoe Y, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei T, Nakajima M, Ohuchi N. Nanosized silver iodide beads as new contrast media for sentinel lymph node navigation surgery. *Breast Disease 2006; 25: 55-56.*
- 17) M. Kobayashi, T. Kasamatsu, Y. Shibuya, M. Enomoto, Optical visualization of ultrasound pressure fields in turbid media based on a coherent

- detection imaging technique. *Jpn J Appl Phys* 2006; 45(A3): 1836-1840.
- 18) R. van Wijk, M. Kobayashi, E. van Wijk. Anatomic characterization of human ultra-weak photon emission with a movable photomultiplier and CCD imaging. *J Photochem Photobiol B: Biol* 2006; 83: 69-76.
- 19) Nemykin VN, Belosludov RV, Mizuseki H, Kawazoe Y. Modeling of the Vertical Excitation Energies in the Structural Isomers of Pyridinoporphyrazines and Their Structural Analogues Using TDDFT, PCM-TDDFT, ZINDO/S, and PM3 Methods. *J of Porphyrins and Phthalocyanines* 2006; 10: 792.
- 20) Oishi K, Ohkura N, Ishida N. Adrenal gland-dependent augmentation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Thrombosis and Haemastasis* 2006; 4: 1566-1574.
- 21) Oishi K, Ohkura N, Wakabayashi M, Shirai H, Sato K, Matsuda J, Atsumi G, N.Ishida, CLOCK is involved in obesity-induced disordered fibrinolysis in *ob/ob* mice by regulating *PAI-1* gene expression. *Journal of Thrombosis and Haemastasis* 2006; 4: 1774-1780.
- 22) Ohno T, Onishi Y, Ishida N. A novel E4BP4 element drives circadian expression of *mPeriod2*. *Nucleic Acids Research* 2007; 35(2): 648-655.
- 23) Ishida N. Circadian clock, cancer and lipid metabolism. *Neuroscience Research* 2007; 57(4): 483-490.
- 24) 大内憲明、武田元博、石田孝宣、手術と放射線、山田章吾編「早期のがん治療法の選択 放射線治療」、金原出版株式会社 2006 : 46-51。
- 25) 中島護雄、武田元博、大内憲明。蛍光ナノ粒子による癌センチネルリンパ節検出とナノ医療の展望。日本機械学会誌 2006年2月 小特集号「医療工学 -工学による医療の再編-」2006 ; 109 (1047) : 90-92。
- 26) 桜井 遊、武田元博、小林芳男、中島護雄、亀井 尚、粕谷厚生、川添良幸、大内憲明、新規ナノサイズヨウ化銀ビーズを用いた造影効果とX線センチネルリンパ節生検への応用。乳癌基礎研究 2006 ; 16 : 43-47。
- 27) 樋口秀男、渡邊朋信、多田寛、武田元博、大内憲明。バイオナノイメージングとナノ医療。応用物理 2006 ; 75(6) : 695-698。
- 28) 大内憲明。＜概論＞ナノテクノロジーのがん医療への期待。バイオテクノロジージャーナル 2007 ; 7 (1) : 22-24。
- 29) 樋口秀男、渡邊朋信、李松花、多田寛、大内憲明。蛍光性量子ドットによるがん細胞の単一分子ナノイメージング。バイオテクノロジージャーナル 2007 ; 7 (1) : 30-35。
- 30) 武田元博、小林芳男、小林正樹、桜井遊、中島護雄、大内憲明。ナノサイズセンシングクラスターの新規開発と外科治療への応用。バイオテクノロジージャーナル 2007 ; 7 (1) : 36-40。
- 31) 多田寛、樋口秀男、渡邊朋信、大

内憲明。抗HER2抗体標識量子ドットを用いたマウス腫瘍内での単粒子イメージング、可視化情報26(1): 181-182、2006

## 2. 学会発表

(国際会議)

- 1) Ohuchi N, Takeda M, Nakajima M, Sakurai Y, Kawai M, Ishida T, Higuchi H. Application of nanotechnology for breast cancer research: Nano-DDS and molecular imaging based on visualization of single particle in vivo. The 25th Congress of the IABCR, Montreal, September 15-48, 2006.
- 2) Takeda M, Kobayashi Y, Sakurai Y, Cong L, Ishida T, Suzuki A, Amari M, Ohuchi N. Detection of Sentinel lymph nodes by novel MR contrast media. 25th Congress of the IABCR, Montreal, September, 2006.
- 3) Sakurai Y, Takeda M, Kawazoe Y, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei T, Nakajima M, Ohuchi N. Nanosized silver iodide beads as new contrast media for sentinel lymph node navigation surgery. 25th Congress of the IABCR, Montreal, September 2006.
- 4) Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Enomoto M, Takeda M, Fluorescence Tomographic imaging using the Ultrasound Tagging Technique. The 9th International Conference on Optics within Life Sciences, Taipei, Taiwan, November, 2006.
- 5) Y. Kobayashi, K. Misawa, M. Takeda, N. Ohuchi, A. Kasuya, M. Konno, Control of Shell Thickness in Silica-Coating of AgI Nanoparticles The 4th International Conference on Advanced Materials (ICAMP-4), Hamilton, New Zealand, December, 2006.
- 6) Gonda, K., Watanabe, T.M., and Higuchi, H, Imaging of membrane protrusion of cellular migration in tumor using quantum dots. International Symposium on Bio-nanosystems, Matsushima, Japan, September, 2006
- 7) Watanabe TM, Sato T, Gonda K, and Higuchi, H. Three dimensional nanometry moving vesicle in a living cell. 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, November, 2006.
- 8) Gonda, K., Watanabe, T.M., and Higuchi, H. Imaging of membrane protrusion of cellular migration in tumor using quantum dots. 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa, Japan, November, 2006.
- 9) Higuchi H and Watanabe TM, Single molecule imaging of motor proteins in living cells. The 7<sup>th</sup> international conference on systems Biology. Yokohama, Japan, October 2006.
- 10) Park YS, Dmytruk A, Dmitruk I, Noda Y, Kasuya A, Ohuchi N. Aqueous-Phase Synthesis of Ultra-Stable Small CdSe Nanoparticles. GJ-NST2006, Gwangju, Korea, December 2006

- 11) Kawai M, Higuchi H, Ohuchi N. Imaging of EGFR for biological study. The 8<sup>th</sup> International Symposium of Future Medical Engineering based on Biomanotechnology, Singapore, December 4-5, 2006.
- 12) Sakurai Y, Takeda M, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei T, Amari M, Cong L, Ohuchi N. Nano size silver iodide beads as novel contrast media and their in vivo distribution. The 8<sup>th</sup> International Symposium of Future Medical Engineering based on Biomanotechnology, Singapore, December 4-5, 2006.
- 13) Tada H, Higuchi H, Watanabe T, Ohuchi N. In vivo cancer targeting and imaging with quantum dots conjugated with anti-Her2 antibody. The 8<sup>th</sup> International Symposium of Future Medical Engineering based on Biomanotechnology, Singapore, December 4-5, 2006
- 14) Sakurai Y, Takeda M, Kasuya A, Kobayashi Y, Kamei t, Amari M, Cong L, Ohuchi N. Nano size silver iodide beads as novel contrast media for sentinel lymph node navigation surgery. The 9<sup>th</sup> International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.
- 15) Tada H, Higuchi H, Watanabe T, Ohuchi N. In vivo imaging using quantum dots in mice. The 9<sup>th</sup> International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.
- 16) Li-Shishido S, Watanabe MT, Tada H, Kawai M, Higuchi H, Ohuchi N. Reduction in nonfluorescence state of quantum dots on an immunofluorescence staining. The 9<sup>th</sup> International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.
- 17) Kawai M, Higuchi H, Ohuchi N. Imaging of EGFR with quantum dots. The 9<sup>th</sup> International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.
- 18) Cong L, Takeda M, Ohuchi N. Silica coated nano-particles for biomedical contrast imaging. The 9<sup>th</sup> International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.
- 19) Kawai M, Higuchi H, Ohuchi N. Trastuzumab regulates receptor recycling on cancer cell. The 9<sup>th</sup> International Symposium of Future Medical Engineering based on Bio-manotechnology, Sendai, January 7-9, 2007.
- (国内会議)
- 1) 桜井 遊、武田元博、小林芳男、中島護雄、亀井 尚、粕谷厚生、川添良幸、

- 大内憲明、新規ナノサイズヨウ化銀ビーズを用いた造影効果と体内動態の検討。第106回日本外科学会定期学術集会、3月29-31日、東京。
- 2) 中島護雄、武田元博、大内憲明、他。蛍光ビーズを用いたセンチネルリンパ節生検法の検討。第106回日本外科学会総会、2006年3月29-31日、東京
  - 3) 武田元博、大内憲明、他。ガドリニウムナノ粒子を用いた新規MRI造影剤の基礎的検討。第106回日本外科学会総会、2006年3月29-31日、東京
  - 4) 河合賢朗、樋口秀男、渡辺朋信、多田寛、大内憲明。抗EGFR抗体標識量子ドットを用いたヒト乳癌細胞のマウス *in vivo* イメージング。ナノ学会第4回大会、2006年5月19-21日、京都
  - 5) 桜井遊、武田元博、小林芳男、中島護雄、亀井尚、粕谷厚生、川添良幸、大内憲明。新規ナノサイズヨウ化銀ビーズを用いたセンチネルリンパ節の造影効果と体内動態の検討。第14回日本乳癌学会総会、2006年7月、金沢。
  - 6) 多田寛、樋口秀男、渡辺朋信、大内憲明。Quantum dot を用いたHER2発現乳癌担癌マウス腫瘍内での蛍光単粒子イメージング。第14回日本乳癌学会総会、2006年7月7-8日、金沢
  - 3) 清水直樹、小林芳男、武田元博、大内憲明、今野幹男、X線造影用AgI/SiO<sub>2</sub>コア-シェル型複合粒子の合成。第8回化学工学会学生発表会、2006年3月、一関。
  - 4) 水本喬、武田元博、榎本幹、小林正樹、音響光学効果を利用した生体計測のための超音波タグ蛍光イメージング法。第61回応用物理学会東北支部学術講演会、2006年12月、仙台。
  - 5) 多田寛、樋口秀男、渡辺朋信、大内憲明。抗HER2抗体標識量子ドットを用いたマウス腫瘍内での単粒子イメージング。第34回可視化情報シンポジウム、2006年6月、東京
  - 6) 樋口秀男、渡辺朋信、権田幸祐、細胞およびマウス内の1分子ナノイメージング。第15回日本バイオイメージング学会 2006年10月31日~11月2日、盛岡
  - 7) 権田幸祐、渡辺朋信、樋口秀男、マウス腫瘍内の細胞運動の解析。日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006年12月、名古屋
  - 8) 権田幸祐、渡辺朋信、樋口秀男、量子ドットを用いたマウス腫瘍内細胞運動のイメージング。2007年生体運動合同班会議、2007年1月、金沢
  - 9) 樋口秀男、渡辺朋信、権田幸祐 「細胞及びマウス内1分子ナノイメージング」日本バイオイメージング学会 2006年11月1日、盛岡
  - 10) 樋口秀男、渡辺朋信、多田寛、大内憲明 「機能性ナノ粒子を用いたがん細胞の単一粒子ナノイメージング」第65回日本癌学会学術総会、2006年9月、横浜
  - 11) 樋口秀男\*, 渡辺朋信\*, 多田寛\*\*, 大内憲明. 光学顕微鏡技術を用いた、タンパク質・細胞・マウス内単一分子のイメージング。第61回日本体力医学会、2006年9月、神戸
  - 12) 武田元博、中島護雄、小林芳男、小林正樹、桜井遊、亀井尚、叢莉蔓、甘利正和、粕谷厚生、石田孝宣、鈴木昭彦、大内憲明、機能性ナノ粒子を用い

たセンチネルリンパ節イメージング 該当なし  
第 65 回日本癌学会学術総会、2006 年 (国外特許)  
9 月、横浜 該当なし

II. 知的財産権の出願登録状況  
(国内特許)



## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

共焦点レーザー顕微システムを用いた *in vivo*, *in vitro*における細胞内信号  
伝達計測手法の確立に関する研究

（分担）研究者 渡邊 朋信 東北大学医工学研究機構 助手

研究要旨

分子標的抗ガン剤であるハーセプチンの薬剤効果を増強させる方法の探索を目的として、ハーセプチンを蛍光量子ドットで標識し、このプローブを用いてハーセプチンの細胞内動態を調べた。蛍光粒子の3次元位置をレーザー共焦点顕微鏡で330ms毎に計測できる新しい装置を開発し、ハーセプチンの細胞内イメージングを行った結果、ハーセプチンが細胞表面に結合している輝点が観察され、その後エンドサイトーシスによって細胞内に小胞として取り込まれた粒子の位置の経時変化を3次元的に測定することに成功した。さらに、焦点位置を止めて、2次元運動を確認したところ、ハーセプチンを含む小胞はアクチン繊維から微小管繊維に乗り換える過程が明らかとなった。これらの研究により、抗体医薬品の挙動が初めてナノメートル分解能で明らかとなった。

A 研究目的

分子標的抗ガン剤であるハーセプチン(抗HER2抗体)の細胞内動態を調べ、ハーセプチンの薬剤効果を増強させる方法を検討する

B 研究方法

実験にはHER2(Human Epidermal growth Factor Receptor 2)高発現株であるヒト乳がん培養細胞KPL-4を用いた。KPL-4のHER2をラベルするプローブを作製するために、高輝度で退色時間が長い量子ドットを多粒子化した。その後、この粒子にHER2に対する抗体医薬品であるハーセプチンをEDC(クロスリンカー)を用いて結合させた。次に、このプローブでKPL-4をラベルし、下

記の装置を用いて、ハーセプチンの動態をリアルタイムイメージングした。

【イメージングシステム】IX71落射照明顕微鏡(オリンパス)に、CSU-10共焦点ユニット(横河)、ピエゾアクチュエータ(ナノコントロール)、EM-CCD(アンドール)を組み合わせ、これらを独自のプログラムでコンピューター制御することにより、三次元リアルタイム共焦点顕微鏡システムを開発した。上記システムでは、共焦点顕微鏡における対物レンズをピエゾアクチュエータにより高速に操作し、330ms間に9枚の共焦点画像を取得できる。

倫理面への配慮

本研究は現在のところ、人体を対象と

した実験を行っていないため倫理的問題は生じない。

### C 研究結果

ハーセプチンは細胞膜上のHER2に結合した後、細胞内にエンドサイトーシスされた。エンドサイトーシスされたハーセプチンを含む小胞は細胞膜に沿って輸送され、突然、運動方向を核に換えて、一気に核にまで輸送された。核に輸送されたハーセプチンは核周辺領域(perinuclear region)に濃縮され、ここで蛋白質分解を受けていることが予想された。

細胞膜に沿った運動はミオシン VI (アクチン系モーター蛋白質)が、細胞膜から細胞核に向かう輸送はダイニン(微小管系モーター蛋白質)が担っていると考えられる。上記光学系を用いて、核に向かって輸送される小胞を観察してみると、小胞は進行方向に 8nm のステップを繰り返しており、*in vitro* で観察されたダイニンのステップの大きさと一致した。

### D 考察・結論

ハーセプチンがエンドサイトーシスされ、核に輸送されるまでの一連の過程を観測できた。その結果、ハーセプチンがどのような経路を辿って蛋白質分解に至るのかを理解することができた。今後は本研究で開発した装置を使って、(1)ハーセプチンの蛋白質分解経路を阻害した時薬剤効果にどのような影響を与えるのか、(2)がんの一因となっているHER2のリサイクル機構にハーセプチンがどのように関わっているのか、(3)HER2のキナーゼ活性へのハーセプチンの関与などをリアルタイ

ムイメージングすることを考えている。また、装置の高速化・高位置精度化を図りハーセプチンの細胞内動態をさらに詳細にイメージングすること、装置を担がんマウスの腫瘍細胞のイメージングへ応用することなどを試みる予定である。

### E 健康危惧情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

### G 研究発表

- 1) Toba S, Watanabe, TM, Yamaguchi-Okimoto L, Toyoshima, YY, Higuchi H. Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 5741-5745.
- 2) Tada, H., Higuchi, H., Watanabe, T.M., Ohuchi, N. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. Cancer Res 2007; 67: 1138-1144.
- 3) Li-Shishido, S., Watanabe, T.M., Tada, H., Ohuchi, N. Reduction in nonfluorescence state of quantum dots on an immunofluorescence staining. Biochem Biophys Res Commun 2006; 351(1):7-13.

### 2. 学会発表

- (1) Higuchi H and Watanabe TM, Single molecule imaging of motor proteins

in living cells. The 7<sup>th</sup>  
international conference on  
systems Biology. Yokohama. Japan.  
2006.10

- (2) 樋口秀男、渡邊朋信、権田幸祐。細胞及びマウス内 1 分子ナノイメージング。日本バイオイメージング学会 2006 年 11 月
- (3) 樋口秀男、渡邊朋信、多田寛、大内憲明。機能性ナノ粒子を用いたがん細胞の単一粒子ナノイメージング。第 65 回日本癌学会、横浜、2006 年 9 月
- (4) 樋口秀男、渡邊朋信、多田寛、大内憲明。光学顕微鏡技術を用いた、タンパク質・細胞・マウス内単一分子のイメージング。日本体力医学会、神戸 2006 年 9 月

II. 知的財産権の出願登録状況  
準備中