

新規光造影剤を用いた早期乳癌の非侵襲近赤外蛍光検出法の開発

Development of a near-infrared noninvasive detection of early breast cancer tumors
using a novel contrast agent

2011009



研究代表者	(独) 理化学研究所 生命システム研究センター	チー ム リー ダー	神 隆
研究分担者	(独) 理化学研究所 生命システム研究センター	研究員	塚 崎 克 和
研究分担者	(独) 理化学研究所 生命システム研究センター	特別研究員	中 根 優 子

[研究の目的]

生体を個体レベルで非侵襲的にイメージングする方法として、MRI（核磁気共鳴画像法）、X線CT、ET（ポジトロン断層法）等が悪性腫瘍の検出や血管造影など臨床画像診断法としてすでに実用化されている。しかし、上記の非侵襲イメージング法を早期癌腫瘍の検出や免疫応答や癌転移など生体内における動的な生命現象の解析に応用する場合には、空間分解能および時間分解能が問題となる。たとえば、MRIは比較的高い空間分解能（50 μm ）を有するが時間分解能が低いため、細胞レベルの生命現象をとらえるのは困難である。また、X線CT、PETでは放射性同位体を含む造影剤による被爆の問題が避けられず、長時間にわたる生体現象の解析には適用できない。現在考えられる生体イメージング技術の中で、細胞レベルでの生命現象を非侵襲的に解析する方法としてあげられるのが、蛍光イメージングである。

生体での光特性として唯一高い組織透過性を示す光として知られているのが700-1100 nm付近の近赤外光（生体組織の光学窓）である。しかし依然近赤外光域は、ヘモグロビンなどによる吸収、自家蛍光があり、バックグラウンドノイズが高くなる領域である。そのため、より吸

収・発光効率の高い蛍光プローブの開発と、その波長域を長波長側に拡張することが不可欠である。上記技術開発によって、これまで不可能であった癌やウイルス感染を細胞レベルでの超早期診断への可能性が開ける。また、生体蛍光イメージング法は、MRIやPETのように大型でかつ施設の整備や維持管理に多額のランニングコストを必要しないので、非常に利便性、汎用性が高く、次世代の非侵襲生体イメージング技術として臨床医学および基礎生命科学分野で活躍する期待は大きい。本研究課題では、従来の二光子顕微鏡では計測不可能な生体深部（ $\sim 1\text{ cm}$ ）を高い空間分解能（細胞レベル）で近赤外蛍光イメージングするための高輝度近赤外蛍光プローブおよび近赤外蛍光イメージング装置の開発をおこなった。

[研究の内容、成果]

本研究課題では、近赤外蛍光生体イメージングを実用化するため基礎研究として以下の研究項目を実施した。1) 近赤外波長領域（700-1100 nm）において励起・発光特性を持つ高輝度蛍光プローブの開発：発光性金クラスター（図1）、2) 高輝度半導体量子ドットへの生体分子修飾による近赤外蛍光プローブの開発、3)

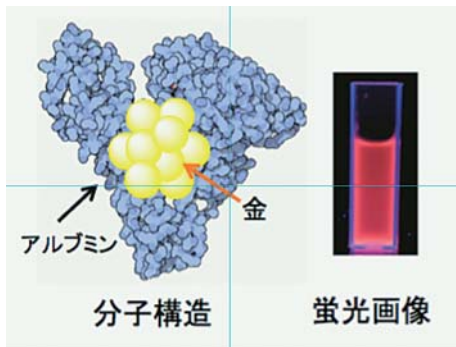


図1 近赤外蛍光発光金クラスター

Anti-HER2 抗体修飾（乳癌プローブ）、RNA、DNA 修飾、Anti-TLR（免疫細胞特異的プローブ）、4) 生体深部を観察できる近赤外励起（半導体レーザー）による近赤外蛍光イメージング装置の開発：蛍光検出波長 800–1500 nm。その結果、発光性金クラスターを蛍光プローブとして用いて、ヒト乳がん細胞（KPL-4）を移植しヌードマウスの乳がん腫瘍（直径約 5 mm）の近赤外蛍光イメージングに成功した。発光性金クラスター蛍光プローブの合成方法及びこれを用いた乳がん腫瘍（直径約 5 mm）の近赤外蛍光イメージングに関する研究成果が得られた。

1) 近赤外発光金ナノクラスターの開発

新規近赤外蛍光材料として、ヒトアルブミンを鋳型タンパク質とする発光性金ナノクラスターの合成方法を開発した。金のナノクラスターは、生理的緩衝液中非常に安定で、発光の量子収率が極めて高い（水溶液中で 2–20%）（図 2）。開発した近赤外発光金ナノクラスターは、アルブミンタンパク質中に形成されているため生体親和性が高く、抗体やリガンドなど様々な生理活性物質を修飾することが可能である。我々は同様な還元反応によって蛍光性の白金ナノクラスターも合成可能であることを確認した。

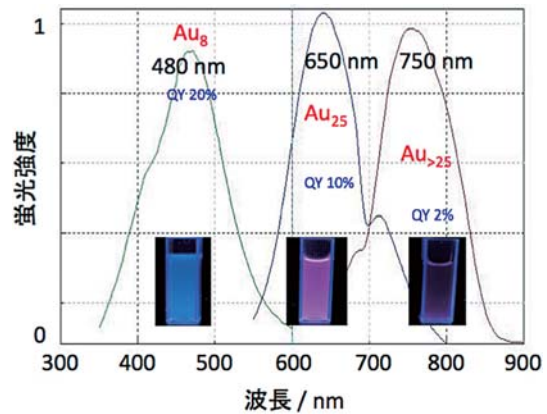


図2 可視、近赤外発光金ナノクラスターの蛍光スペクトル

2) 近赤外発光金ナノクラスターへの抗体修飾法の開発

アルブミン中に形成された金ナノクラスターに抗体を修飾するために、これまで2つの方法を検討した。第1の方法は、メルカプト酢酸により配位子交換をおこない、金ナノクラスターに表面修飾されるメルカプト酢酸のカルボキシル基に対して EDC などのカルボジイミドをクロスカップリング剤として抗体を結合させる方法である。この場合、配位子交換により金ナノクラスターの蛍光性が消失したため抗体修飾法としては不適であった。第2の方法としてアルブミンのアミノ酸残基のカルボキシル基に EDC カップリングにより抗体を結合させた。これによって、抗体の活性を維持したまま金ナノクラスターへ抗体を修飾する方法が確立できた。

3) 抗体修飾金ナノクラスターでのモデルマウスによる乳癌腫瘍の蛍光イメージング

乳癌細胞表面に過剰発現している HER2 受容体に対する抗体を修飾した金ナノクラスターをプローブとして、ヒト乳癌移植マウスにおいて腫瘍の近赤外蛍光イメージングに成功した。図 3 は、直径 5 mm 程度のヒト乳癌腫瘍を蛍光波長 700 nm の近赤外領域で蛍光イメージングした結果である。金ナノクラスターはマウス尾静脈より約 100 μ l（濃度 1 mM）を注入し、3

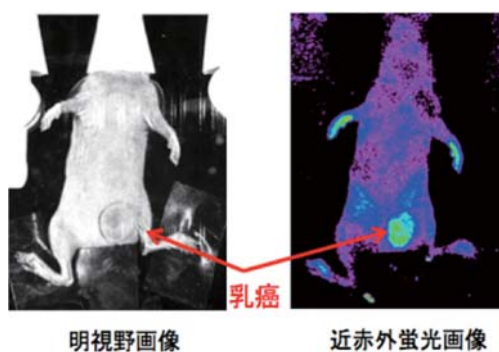


図3 乳がん蛍光イメージングの基礎データ
(励起 530 nm, 蛍光 700 nm)

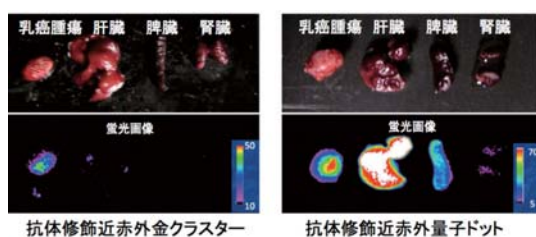


図4 近赤外金クラスターの乳がん腫瘍集積性

時間後に撮影した。この結果から、抗 HER2 抗体修飾金ナノクラスターが乳癌腫瘍の近赤外蛍光イメージング蛍光プローブとして有効であることが明らかになった。ここで、注目すべきは、金ナノクラスターの場合、量子ドットなどに比べ肝臓への集積が少なく腫瘍特異的な集積がみられたことである（図4）。

以上のように、早期乳癌の非侵襲近赤外蛍光イメージングのための新規光造影剤である近赤外発光金ナノクラスターの開発をおこない、動物実験レベルでの乳癌腫瘍の生体イメージングの実証試験に成功した。近赤外発光プローブはアルブミン中に形成される金ナノクラスターであり、ヒトアルブミンを使用しても合成することが可能である。抗体やリガンドなどの生体分子の修飾が容易なためテーラーメイドな近赤外発光分子プローブとして有望である。また、本研究課題では、組織深部（～1 cm）観察のため発光波長 700 nm から 1550 nm まで計測可能な近赤外蛍光実体顕微鏡システム（図5）の開発をおこなった。この蛍光イメージングシステムでは、市販の2光子蛍光顕微鏡 in vivo イメー

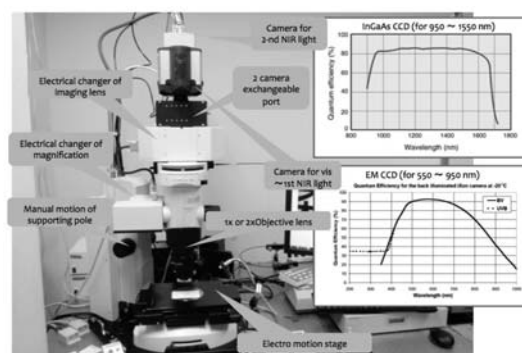


図5 近赤外蛍光実体顕微鏡システム（700-1550 nm）

ジング装置では実現が困難な組織深部での細胞イメージングが可能である。

〔今後の研究の方向，課題〕

ヒトを対象とした生体イメージングにおいては、プローブの生体毒性（免疫毒性）、蛍光輝度の持続性（安定性）の問題を詳細に検討する必要が有る。現在、生体毒性の低い近赤外蛍光プローブは有機系の色素を除くと限られており、ヒトへの応用を考えた場合、近赤外発光性金ナノクラスターは非常に有望なプローブ材料である。今後、近赤外発光金ナノクラスターを生体イメージング用蛍光プローブとして実用化し、ヒト生体での早期乳癌検出システムの開発をすすめていく予定である。

最後に、本研究課題を遂行するにあたり研究助成をいただいた立石科学技術振興財団に深く感謝申し上げます。

〔成果の発表，論文等〕

- 1) Y. Nakane, S. Sasaki, M. Kinjo, and T. Jin, "Bovine serum albumin-coated quantum dots as a cytoplasmic viscosity probe in a single living cell", *Anal. Methods*, 4, 1903-1905, 2012.
- 2) M. Ohmachi, Y. Komori, A. H. Iwane, F. Fujii, T. Jin, and T. Yanagida, "New fluorescence microscopy for simultaneous observation of 3D orientation and movement and its application to quantum rod-tagged myosin V", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109, 5294-5298, 2012.

- 3) Yurika Saitoh, Nobuo Terada, Sei Saitoh, Nobuhiko Ohno, Takashi Jin, Shinichi Ohno, "Histochemical analyses and quantum dot imaging of microvascular blood flow with pulmonary edema in living mouse lungs by "in vivo cryotechnique", *Histochemistry and Cell Biology*, 137 (2), 137-51, 2012.
- 4) Q. Ma, Y. Nakane, Y. Mori, M. Hasegawa, Y. Yoshioka, T. M. Watanabe, K. Gonda, N. Ohushi, and T. Jin, "Multilayered, core/shell nanoprobe based on magnetic ferric oxide particles and QDs for multimodality imaging of breast cancer tumors", *Biomaterials* (2012), [http: //dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.051](http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.051)