

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23107005

研究課題名（和文）バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス

研究課題名（英文）Transport nanodevice immobilized specific biomolecules

研究代表者

石原 一彦（ISHIHARA, KAZUHIKO）

東京大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：90193341

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 85,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内にナノ粒子を輸送する際、細胞膜の透過およびエンドソームは障害となる。まず、イメージング性能の向上を目指し、量子ドット(QD)をリン脂質ポリマーで内包する手法を確立し、高輝度化を実現した。さらに表面に結合させるバイオ分子の種類と組成に関して検討し、最適な条件を確立し、細胞に対して高い親和性、低い侵襲性を持ちながらも、細胞膜を透過するナノ粒子系を創製した。また、pH応答性のMPCポリマーの構造制御と機能化を、リビングラジカル重合を適用して実施し、これを利用したナノ粒子系を実現した。細胞内に取り込ませることで、細胞内pH環境を解析することに成功した。これは今後の薬物動体の解析などに重要である。

研究成果の概要（英文）：Polymer nanoparticles as functional in-cell devices were prepared using a cytocompatible phospholipid polymer. We have found that the polymeric nanoparticles embedding quantum dots (QDs) covered with the phospholipid polymers showed resistance to cellular uptake. On the other hand, when an arginine octapeptide (R8), which was one of the cell penetrating peptide, was immobilized at the surface of the nanoparticles, they could penetrate the membrane of HeLa cells effectively. We also investigated the surface functionalization of the nanoparticles and transportation of the nanoparticle into cells. the QDs covered with the pH-responsible phospholipid polymer could be obtained. The pH responsibility reflected inner circumstances of cells. Thus, we could determine the location and local pH circumstances using the QD/phospholipid polymer nanoparticles. The results provide useful information for delivering the bioactive reagents into cells.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：ナノ粒子 生体親和性 蛍光イメージング 細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

本研究では、細胞内の特異的な部位に、選択的にバイオ分子を輸送し、遺伝子発現や酵素反応に由来する細胞機能発現について分子科学的に理解をするとともに、疾病に対する有効なバイオ分子治療、細胞を基礎とする先進医療技術、さらには組織再生医療への高機能・高信頼細胞ソースの提供などの関連する基盤を開拓することを目指す。これを通して、細胞内での分子反応の理解と一義的考察を完成させる。研究代表者は、生体親和性ポリマー材料について研究を続けてきており、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)を一成分として含むポリマーを創製した。これを利用することで、細胞反応や組織反応を完全に阻止し、人工心臓、人工股関節などの生体内埋め込み医療デバイスの臨床使用を実現した。

MPC ユニット組成の増加により水溶性かつ両親媒性とすることができ、この水溶性 MPC ポリマーを利用することで、ポリマーナノ粒子を創製している。さらに、ナノ粒子表面にタンパク質を温和な条件で結合させるために、新たな反応性 MPC ポリマーを合成し、これにより酵素や抗体を固定化することに成功している。特に一つの粒子上に複数のバイオ分子を結合させ、これら分子間の協同的反応により標的分子の認識信号を増幅できることを明らかにした。これらの MPC ポリマーナノ粒子についての基礎知見と、その細胞応答を解析することで、細胞機能評価、解明するデバイスを構築する。

一方、両親媒性の MPC ポリマーが、細胞膜を分子拡散により通過し、細胞質内の特定部位に濃縮することを発見した。合成ポリマー(分子量 30KDa)の細胞膜拡散・透過現象は世界で初めての知見であるとともに、ポリマーに結合させたパイロット分子の役割を明確にイメージングすることに成功した。これらのポリマー分子構造に起因する分子設計

を基礎として、細胞内輸送に関連した事象を定量化するとともに反応パラメーターにより明確に表現することを目指す。

2. 研究の目的

MPC ポリマーの分子設計による生体親和性、超親水性の発現に関する研究成果を踏まえて、新しいバイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイスとしてのナノ粒子(直径数 nm~数百 nm)の設計とバイオ特異的表面機能化を実現することを目的とした。このナノ粒子に細胞に全く認識されない表面を実装し、さらに内部に簡便な分光学的方法で識別可能なプローブ(量子ドット: QD)と回収を容易にする磁性粒子を導入する。表面に特異的生理活性バイオ分子を結合することで、その分子の細胞機能に与える効果のみ明確に測定・判別する。細胞への取り込み、膜タンパク質への結合の時間分解解析を通して、分子の拡散、捕捉プロセスを解析し、反応速度、頻度因子などの算出により活性化エネルギーの見積もり、分子反応を理解できるようにする。

具体的には、(1)両親媒性を有し、水中で安定な会合体を形成できる MPC ポリマーの設計と合成、MPC ポリマー被覆ナノ粒子の創製と粒子特性の解析およびナノ粒子表面の解析を中心とした生体親和型ポリマーナノ粒子の創製、(2)ナノ粒子内部への機能性無機結晶(QD、磁性粒子)とナノ粒子表面へのバイオ分子の固定化条件の最適化、固定化したバイオ分子の活性と選択性の解析からなるバイオ特異性ナノ粒子プローブの創製、(3)ナノ粒子プローブと接触した場合の細胞応答・組織反応の追跡、バイオ分子特性と細胞機能との相関に着目した細胞応答解析に基づくバイオ分子機能評価から構成される。これらの解析を通して、バイオ分子反応を化学構造の観点から考察するとともに、反応速度定数、結合定数などを求め議論する。

3. 研究の方法

(1) 両親媒性ポリマーの合成

ナノ粒子を溶媒蒸発法にて作製するために、水中で安定な会合体を形成し、その内部に疎水性の核ポリマー溶液を可溶化できる両親媒性の MPC ポリマーを設計した。核の安定性を高め、量子ドットや磁性粒子を担持するためにもアルキル炭素数 12 あるいは 18 をアルキルメタクリレート中心に検討した。この際、MPC ポリマーの組成、分子量あるいは分子量分布を制御するために、リビングラジカル重合法も適用した。さらに、バイオ分子を温和な条件で反応させ、ナノ粒子表面に結合させるために活性エステル基の導入を行った。得られた MPC ポリマーを溶解した水溶液中に、ポリ乳酸の有機溶媒溶液を滴下して、超音波照射による乳化分散後、加熱、減圧することで MPC ポリマー被覆型ナノ粒子を作製する手法を開発した。このプロセスを、MPC ポリマーの種類、濃度などをパラメーターとして変化させて繰り返し、粒径 8-250nm の範囲で精密に制御する条件を決定した。

(2) バイオ特異性ナノ粒子プローブの創製

ナノ粒子に CdSe/ZnS 系量子ドット(QD)を導入して標識した。量子ドットは優れた蛍光特性を有するためにバイオイメージングへの応用が期待されている。しかしながら水系媒体では凝集して沈殿を生じる、また細胞毒性があると報告されている。これらの問題を解決するために、ポリマーナノ粒子内部への包括を検討した(内部機能化)。一方、細胞に対して選択的に反応するバイオ分子をナノ粒子表面に結合させる反応について、固定化量、バイオ分子の活性・安定性をパラメーターとして条件を検討した(表面バイオ機能化)。特に、細胞内への物質の移行に有効であると考えられている細胞膜透過ペプチドの役割とその透過機構を理解することは、バイオ関連で細胞に分子導入する際や、イメージング剤を導入する際に極めて重要となる。

そこで、細胞膜透過ペプチドの効果について、アミノ酸の化学構造、オリゴペプチドのシーケンス、さらには粒子に固定化した際の密度などを系統的に検討した。さらに、得られた知見を利用して、細胞内環境の観察ができるような、高機能性ナノ粒子を、ポリマーの精密合成とバイオ分子との複合化により実施した。

4. 研究成果

(1) QD を内包したポリ乳酸ナノ粒子を、MPC ポリマーで被覆した直径 20-30nm の安定なポリマー粒子が得られた。この粒子表面に存在する活性エステル基を利用することで、温和な条件でバイオ分子を結合することができる。そこで、細胞膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン(R8)を結合させたところ、細胞内への速やかな取り込みが見出された、一方で、最も単純な構造のアミノ酸であるグリシンの 8 量体ペプチド(G8)では、全く細胞内への取り込みが認められなかった。このことは、表面を MPC ポリマーで被覆することに起因しており、このような非特異的な細胞内取り込みを抑制できるナノ粒子は、これまでに全く存在しないことから、表面に結合したバイオ分子のみの効果を確実に捉えることのできるナノデバイスとなる。さらに、細胞内に取り込まれたナノ粒子は極めて安定に留まっており、細胞毒性も示さない。細胞が分裂する際に、その娘細胞、孫細胞に均一に分配されることが明らかとなった。この性質を利用すると、組織再生医療において移植した細胞と既存の生体組織との判別に利用できる新しい細胞工学用蛍光イメージングツールとして有望である。

(2) ナノ粒子表面修飾ポリマーの精密合成を、長鎖アルキル基を末端に有する可逆的付加-開裂連鎖移動(RAFT)剤 4-cyano-4-(dodecyl-sulfanylthiocarbonyl)sulfanyl pentanoic acid によるリビングラ

ジカル重合により実施した。モノマーとして MPC、2-(*N,N*-diethylamino)ethyl methacrylate (DEAEMA)、および 4-nitrophenyloxy carbonyl (poly(ethylene glycol) methacrylate (MEONP) を選択し、poly(DEAEMA)-*block*-poly(MEONP)-*block*-poly(MPC) (PDbNbM) を合成した。これを用いて粒径 20-30 nm のナノ粒子 QD/PDbNbM を調製した。周辺の pH 変化による poly(DEAEMA) セグメントの伸長・収縮に伴い、粒径が変化することを見いだした。QD と有機蛍光色素 Alexa との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を利用し、蛍光スペクトルの pH 依存性およびその FRET 効率との関連を明らかにした。Alexa を結合したナノ粒子の蛍光スペクトルは、pH に応答して変化することを確認し、この変化は、poly(DEAEMA) セグメントの pH 応答による QD と Alexa 間の距離の変化に起因することを示した。ナノ粒子表面に細胞膜透過性ペプチドである R8 を固定化した R8-QD/PDbNbM-Alexa ナノ粒子はエンドサイトーシス経路による細胞内移行、エンドソーム内での移動、さらにエンドソームから脱出する一連の過程を、FRET 現象の変化として捉えた。これは、エンドソーム内の pH 低下と、その後のプロトンスポンジ効果によるエンドソーム破壊を連続的に観察した初めての事例である。

(3) 光反応性タンパク質キャリアーとして MPC と、光照射により解離するユニットを利用して、光反応性リン脂質ポリマー (poly(MPC-*co*-BMA-*co*-PL) (PMB-PL)) を合成した。PMB-PL は光照射に反応し、1 分間以内に反応が完了した。PMB-PL を水溶液への分散剤として利用し、poly(L-lactic acid) (PLA) のナノ粒子を調製した。ナノ粒子のサイズは 130nm に制御することができた。タンパク質を PL ユニットに固定化し、光照射すると 1 分間で固定されたタンパク質の 90% 以上がナノ粒子から放出された。細胞培地に

PMB-PL/ PLA ナノ粒子を加え、6 時間培養したところ、細胞生存率は 97% 以上であり、PMB-PL/ PLA の細胞毒性が低いことがわかった。細胞透過性ペプチド、R8 を固定することにより、ナノ粒子は細胞に取り込まれた。この状態で、光照射するとタンパク質は細胞の中で脱離し、細胞質内全体に拡散することがわかった。すなわち、R8 を固定化した光反応性 MPC ポリマーに覆われたナノ粒子は、細胞質内へタンパク質を送達し、その場でタンパク質を放出できるスマートキャリアーとして有用である。

(4) 細胞機能として特定分子の核輸送に着目し、核輸送に必要な特性をキャリアーに付与するバイオ分子の化学構造と動態の関係を定量的に評価した。細胞膜透過性ペプチドである R8 と核移行シグナルペプチドである NLS を用いて、細胞膜透過性および核移行性を PMBN/PLA/QD ナノ粒子に付与した。核まで達するには、途中段階の細胞膜透過および細胞質移行を効率よく行うことが重要となる。そこで、NLS と R8 の組み合わせおよびポリエチレンジアミン (PEI) を用いて細胞膜透過および細胞質移行の効率化を評価した。さらに、細胞質から核への移行能およびその効率を調べるために、マイクロインジェクションにより直接的に細胞質に PMBN/PLA/QD ナノ粒子を注入し、核移行能および効率化に重要な要因を評価した。これより、R8 の割合の増加によりエンドソームからの脱出効率が高まることがわかった。また、PEI の共固定も有効であった。核への物質送達には細胞内において NLS の機能発現が必要である。NLS に加え R8 を固定化することで、核輸送に必要な細胞膜透過性および細胞質移行能をキャリアーに付与することが可能であることが示唆される。

従来の結果と合わせて考えると、表面を生体親和型のポリマーで被覆し、さらに細胞に特異的に作用するバイオ分子を固定化する

ことで細胞内に容易に導入することができ、表面修飾利用するポリマーに機能を導入すると、多岐にわたる細胞内観察、細胞への輸送、さらには細胞内に存在するバイオ分子を特異的に捕捉するなどが可能となることが結論できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 27 件) すべて査読あり

- 1.W. Chen, Y.Inoue, K.Ishihara, Preparation of photoreactive phospholipid polymer nanoparticles to immobilize and release protein by photoirradiation, *Colloid Surf B: Biointerfaces*, **135**, 356-370 (2015), DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.073
- 2.Y.Liu, Y.Inoue, K.Ishihara, Surface functionalization of quantum dots with fine-structured pH-sensitive phospholipid polymer chains, *Colloid Surf B: Biointerfaces*, **135**, 490-496 (2015), DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.001
- 3.X.Lin, K.Ishihara, Water-soluble polymers bearing phosphorylcholine group and other zwitterionic groups for carrying DNA derivatives, *J Biomater Sci Polym Edn*, **25**(14-15), 1461-1478 (2014), DOI:10.1080/09205063.2014.934319
- 4.X.Lin, T.Konno, K.Ishihara, Cell membrane-permeable and cytocompatible phospholipid polymer nanoprobe conjugated with molecular beacons, *Biomacromolecules*, **15**(1), 150-157 (2014), DOI: 10.1021/bm401430k
- 5.K.Ishihara, Y.Tsukamoto, Y.Goto, Y.Inoue, Enhanced and Specific Internalization of Polymeric Nanoparticles to Cells, *IFMBE Proceedings* **40** 262-265 (2013), 10.1007/978-3-642-32183-2_66

〔学会発表〕(計 58 件)

- 1.K.Ishihara, Nano-scaled and functional particles for nanomedicine molecular science, MANA International Symposium, 2016年3月11日, Epocal Tsukuba (茨城県つくば市)
- 2.Y.Liu, Y.Inoue, K.Ishihara, Quantum dots conjugated with a well-defined pH-responsive block-type MPC polymer as an intercellular fluorescence pH sensor, 5th Asian Biomaterials Congress, 2015年5月7日, Taipei(Taiwan)
- 3.W.Chen, Y.Inoue, K.Ishihara, Nanoparticles covered with photoreactive phospholipid polymer for intercellular delivery of bioactive proteins, International Polymer Conference(IPC) 2014, 2014年12月4日, Epocal Tsukuba (茨城県つくば市)
4. K.Ishihara, Y.Tsukamoto, Y.Inoue, Bioinspired and cytocompatible phospholipid polymer nanoparticles, 7th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, 2014年11月4日, Ha Long City (Vietnam)
- 5.K.Ishihara, Y.Inoue, Bioinspired fabrication of artificial cell membrane with phospholipid polymer and biomolecules for nanomedicine molecular science, Japan-China Nanomedicine Symposium, 2014年5月16日, 広島大学歯学部講堂 (広島県広島市)

〔図書〕(計 1 件)

- 1.K.Ishihara, Novel bio-inspired phospholipid polymer biomaterials for nanobioengineering, *Bio- and Bioinspired Nanomaterials*, pp369-389, Eds Daniel Ruiz-Molina, Fernando Novio, Claudio

Roscini (ISBN: 978-3-527-33581-7)
pp369-389, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
KGaA, Weinheim, Germany (2014),
DOI:10.1002/9783527675821.ch14

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページなど

<http://www.mpc.t.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石原一彦 (ISHIHARA, Kazuhiko)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：90193341

(2)研究分担者

井上祐貴 (INOUE, Yuuki)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：40402789

(3)連携研究者

なし