

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21292

研究課題名(和文) 電場の印加によってナノ粒子が細胞膜を透過する現象の解析とその精密制御

研究課題名(英文) Understanding of direct permeation of a nanoparticle across the cell membrane under an external electric field and its control

研究代表者

仲村 英也 (Nakamura, Hideya)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00584426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：電場の印加によってナノ粒子が細胞膜を透過する現象に焦点を当てた。特に、人為的に操作可能な制御因子であるナノ粒子の物性と電場の印加条件の影響を、分子動力学(MD)シミュレーションを用いて解析した。その結果、微弱な電場の印加によってナノ粒子が細胞膜を直接透過する現象を初めて見出した。この透過経路では、ナノ粒子侵入時に膜貫通孔が自発的に形成し、これを通じて粒子が細胞膜を直接透過した。加えて、粒子の膜透過後に細胞膜は自己修復した。すなわち、細胞へのダメージが小さくてかつ高い送達効率を兼ね備えた、新奇で意義深い透過経路を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Nanoparticles (NPs) have been attracting much attention for biomedical and pharmaceutical applications. In most of the applications, NPs are required to translocate across the cell membrane and to reach the cell cytosol. Understanding of the mechanism underlying the direct permeation of NPs under an external electric field can greatly contribute to the realization of a technology for the direct delivery of NPs. Here we investigated the permeation of a cationic gold NP across a phospholipid bilayer under an external electric field using a coarse-grained molecular dynamics simulation. When a specific range of the electric field that is lower than the membrane breakdown intensity was applied, a unique permeation pathway was exhibited: the generated transmembrane pore immediately resealed after the direct permeation of NP. Our finding suggests that by applying an electric field in a suitable range NPs can be directly delivered into the cell with less cellular damage.

研究分野：化学工学

キーワード：ナノ粒子 細胞膜 細胞膜透過 分子動力学計算

1. 研究開始当初の背景

現在、ナノ粒子を利用した治療技術の開発が活発に行われている。治療効果を最大限に引き出すためには、適切な量のナノ粒子を標的とする細胞の内部に送り届ける必要がある。ナノ粒子が細胞内に送達されるためには、粒子は細胞を覆う細胞膜を透過しなければならない。従って、ナノ粒子が細胞膜を透過する現象を精密に制御する技術の開発は、ナノ粒子を利用した治療技術を実用化する際の重要な課題となる。ナノ粒子を細胞の中に送り届ける方法は、細胞自身の取り込み機能を利用する方法と、外力を付与して細胞膜に一時的な細孔を開け、粒子を細胞内に直接送達する方法の2つに大別できる。この内、外力を付与する方法は、細胞の種に固有の取り込み機能に依存しない、積極的な粒子送達が可能である。なかでも、電場を印加する手法は、エンドサイトーシスを介さずに物質を細胞内部に直接送達可能な手法であり、粒子を高効率で細胞内に直接送達できることが報告されている。一方で、過度な高電場の印加は、細胞死を引き起こすことが欠点となる。従って、電場印加環境におけるナノ粒子の細胞膜透過を適切に制御し、高い送達効率と低侵襲性を両立することが望まれる。しかしながら、電場印加時のナノ粒子の細胞膜透過メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、電場の印加によってナノ粒子が細胞膜を透過する現象に焦点を当てた。特に、人為的に操作可能な制御因子であるナノ粒子の物性と電場の印加条件の影響を、分子動力学(MD)シミュレーションを用いて解析し、原子・分子レベルで起こる現象を解析した。加えて、平面脂質膜法を用いてナノ粒子と人工細胞膜(平面脂質2重膜)との相互作用を実験からも評価・解析した。

3. 研究の方法

3. 1. 計算方法

粗視化分子動力学(CG-MD)法により、電場印加時のナノ粒子の細胞膜透過現象を解析した。Fig. 1に、本研究で用いた計算系の概要を示す。モデル細胞膜には、生細胞膜の基本骨格である脂質二重膜を用いた。脂質分子には、両性リン脂質 DPPC および負帯電性リン脂質 DPPG をそれぞれ用いた。モデル細胞膜が2つ配置された計算系とすることで、互いに独立した2つの溶媒区画を設けた。各溶媒区画は生理食塩水と同等な濃度である 154 mM NaCl aq. とした。モデルナノ粒子には、8-アミノ-1-オクタンチオール表面修飾正帯電性金ナノ粒子を用いた。本研究では、ナノ粒子-細胞膜表面間の親和性が粒子の細胞膜透過性に及ぼす影響を解析するため、帯電性および構造が異なる3種類の脂質二重膜(Fig. 1のLB-1~3)を作成した。各細胞膜の上部にナノ粒子を配置し、計算の初期状

態を得た。

電場 E の印加を計算に考慮するため、電荷 q_i を有する系内の全原子に外力 $F = q_i E$ を付与した。なお、 E は細胞膜法線方向下向きにのみ印加した。電場の印加により発生する膜電位の強度は、無次元膜電位 $V^* (=V/V_c)$ で表した。ここで、 V は印加膜電位、 V_c は膜の穿孔が起こり始める臨界電位(膜破壊電位)を表す。印加膜電位は $V = Ed$ により算出した。 d は細胞膜の膜厚であり、本研究では $d = 4$ nm で一定とした。また、各系の V_c は粒子を含まない条件で計算を行い、予め決定した

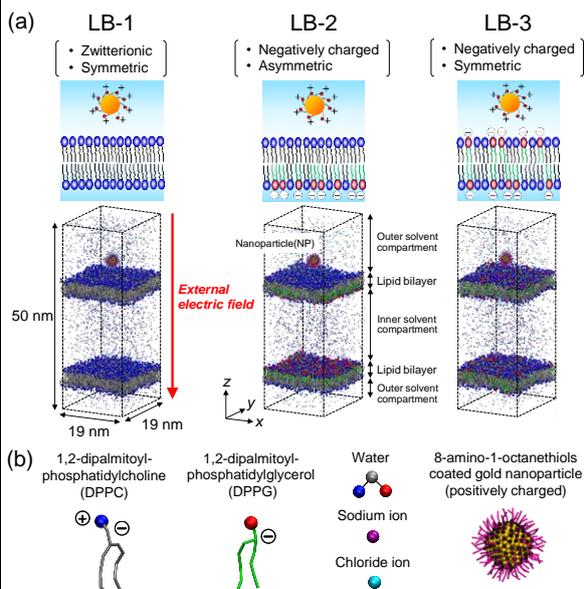


Fig. 1. (a) Schematic and initial configuration of each simulation system. (b) Individual molecules and NP used in this study.

3. 2. 実験方法

脂質分子には DPhPC、分散媒には 50 mM KCl 水溶液を用いた。ナノ粒子はクエン酸保護金ナノ粒子を用いた。粒子径は 5 nm で、表面は負に帯電している(ゼータ電位 = -35 mV)。

Fig. 2(a)に、用いた実験装置の概略図を示す。ノイズの重量を防ぐため実験装置全体をファラデーケージで囲い、その内部は除振台、スターラー、脂質膜を形成するチャンパー、チャンパーを拡大観察するための顕微鏡と光源から構成される。脂質を作成するチャンパー(Fig. 2(b))は KCl 水溶液で満たされており、これが、小孔(直径 200 μ m)の開いた隔壁により2つの区画に分けられている。この小孔に脂質二重膜をペインティング法で形成した。両区間の KCl 水溶液は塩橋を介して Ag/AgCl 電極と接続されている。電極はファンクションジェネレータおよびアンプと接続されており、これにより、任意の電圧を印加した際の脂質二重膜を介した荷電物質の移動が微小電流値として測定される。

脂質二重膜表面は帯電性を示す一方、内部は絶縁性を示す。これは、電気的にはコンデンサと類似しており、本実験系は抵抗とコンデンサとが並列に接続された RC 並列回路と見なせる。これを利用して、作成した脂質二

重膜を評価した。具体的には、任意の三角波電圧を印可した際に測定される矩形波電流から脂質膜の静電容量を算出した。その結果、測定値 ($0.377 \pm 0.023 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) は文献値 ($0.36 \pm 0.02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, Benz et al., Biochim. Biophys. Acta. 455, 721 (1976)) と良好に一致したことから、本研究で構築した実験系において脂質 2 重膜の形成が確認できた。

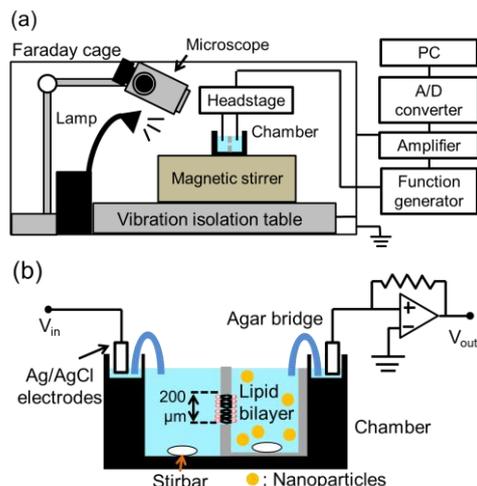


Fig. 2. Schematic diagram of planar lipid membrane system. (a) Over view of system and (b) Chamber.

4. 研究成果

4. 1. ナノ粒子の細胞膜透過の MD 解析

通常の電気穿孔法では、膜破壊電位を大きく上回る強度の電場を印加することで、膜を予め穿孔し、物質を細胞内部に送達する。そこではじめに、膜破壊電位と等しい電位 ($V^* = 1.0$) を印加した際のナノ粒子の挙動を解析した。Fig. 3(a)に、 $V^* = 1.0$ における粒子の細胞膜透過挙動を示す。計算系には Fig. 1(a)の LB-3 を用いた。計算開始直後、粒子は細胞膜表面に付着した。このとき、膜の構造が変形し、膜を貫通する親水性の細孔が生成した。その後、粒子は脂質分子に囲まれたり、脂質分子を膜から引き抜いたりすることなく、細孔を通じて膜を直接透過した。この計算結果は、ナノ粒子が細胞膜を直接透過する一方で、透過後は膜が穿孔されたままであるという、既往の電気穿孔において観察される典型的な粒子透過経路と同様であった。一方、膜破壊電位よりも低い電位条件では、粒子の細胞膜透過現象は大きく変化した。Fig. 3(b)に、 $V^* = 0.8$ における粒子の細胞膜透過挙動を示す。本条件でも、 $V^* = 1.0$ の場合と同様に、粒子は細胞膜を直接透過した。しかしながら、粒子の侵入により膜に生成した細孔は、粒子透過後に瞬時に縮小し、膜が自己修復することが分かった。この2つの透過現象における細胞膜破壊の度合いを定量的に評価するため、粒子の膜透過に伴う水分子の膜透過を解析した。Fig. 4に、 $V^* = 1.0$ および 0.8 における水分子の個数密度コンター図を示す。図は断面である。また、上図は初期状態で外側溶媒区画に存在していた水分子、

下図は初期状態で内側溶媒区画に存在していた水分子のみをそれぞれ示している。 $V^* = 1.0$ の場合、粒子の透過に伴って大量の水分子が膜を透過していることが確認できる。これは、粒子の透過後も膜に細孔が形成し続けるため、この細孔を通じて水分子が移動したためであると考えられる。一方、 $V^* = 0.8$ の場合、粒子の透過後に細孔が閉じ、膜が自己修復したため、水分子はほとんど膜を透過しなかった。この結果より、 $V^* = 0.8$ における粒子の細胞膜透過は、膜破壊の度合いが非常に小さいことが分かった。すなわち、この透過経路は、高い送達効率と低侵襲性を両立した経路であることが示唆された。

粒子-細胞膜表面間の親和性が粒子の細胞膜透過性に及ぼす影響に着目した。具体的には、3種類の細胞膜 (LB-1~3) に対する粒子の透過挙動を詳細に解析した。Fig. 5に、3種類の細胞膜の外側親水性表面に粒子が接近する過程の自由エネルギー変化を示す。このとき、系に電場は印加しなかった。LB-1 および 2 の場合、粒子が膜親水性表面に接近すると、自由エネルギーは増加した。すなわち、粒子は LB-1 および 2 の膜親水性表面に自発的に付着しないことが分かった。一方、LB-3 の場合、自由エネルギーは $\Delta z \approx 1.9 \text{ nm}$ で極小値を有した。この距離は粒子の半径 ($\approx 1.95 \text{ nm}$) とほぼ一致していることから、粒子は LB-3 の膜親水性表面には自発的に付着することが示された。この違いは、粒子-膜親水性表面間の静電相互作用に起因すると考えられる。LB-1 および 2 では、膜外側表面には両性リン脂質 DPPC のみしか存在せず、DPPC のコリン基由来の局所的な正電荷が正帯電性ナノ粒子と静電反発を引き起こす。一方、LB-3 では、膜表面に存在する負帯電性リン脂質 DPPG と正帯電性粒子との間に静電引力が働くと考えられる。以上より、本研究で用いたナノ粒子 (正帯電性) は DPPC および DPPG の両方が存在する膜表面と強い親和性を示すことが分かった。

次に、3種類の計算系それぞれに種々の強度の電場を印加する計算を系統的に行い、粒子挙動を解析した。その結果、粒子挙動は、①膜に付着しない、②膜外側親水性表面に付着、③粒子が直接透過後に膜が自己修復 (膜修復型の直接透過)、④粒子が直接透過後に細孔が維持 (細孔維持型の直接透過)、という4つのモードに分類された。Fig. 6に、3種類の計算系に種々の電位を印加したときの各モードの発生確率を示す。LB-1 では、 V^* の増加に伴って、粒子挙動が付着から細孔維持型の直接透過に移行した。また、膜修復型の直接透過はいずれの電位でも見られなかった。LB-2 では、膜修復型の直接透過が $V^* = 0.9$ においてのみ確認され、 $V^* = 1.0$ まで増加すると、細孔維持型の直接透過に移行した。LB-3 でも同様に、膜修復型の直接透過が $V^* < 1.0$ で見られた。しかしながら、付着から膜修復型の直接透過への移行が確認され始

めた電位 ($V^* = 0.8$) は、LB-2 に比べて低下した。本計算結果より、ナノ粒子-細胞膜表面間の親和性が高いほど、膜修復型の直接透過が広い電場強度の範囲で起こることが分かった。

最後に、ナノ粒子-細胞膜表面間の親和性の違いにより、膜修復の起こりやすさに変化する要因を解析した。Fig. 7(a)に、 $V^* = 0.9$ において、粒子が各細胞膜の中心を通過する瞬間に、細孔内部の空間に存在していた水分子数を示す。LB-1における細孔内部の水分子数は、LB-2および3に比べて多いことが分かった。Fig. 7(b)に、各細胞膜の中心を粒子が通過する瞬間のスナップショットを示す。LB-1では、粒子と細胞膜親水基間の間隙がLB-2および3に比べて明らかに大きい。この結果からも、LB-1では、粒子と細胞膜親水基との間に水分子およびイオンが多数存在していることが確認できた。LB-1のように、粒子と膜親水基間の間隙に溶媒分子が多数存在する場合、親水性の細孔が成長しやすくなるため、粒子透過後も膜は自己修復しなかったと考えられる。一方、LB-2および3のように、粒子が膜親水基に付着し、細孔中の溶媒分子が少なくなる場合、細孔の成長が抑制され、膜が自己修復したと考えられる。以上より、ナノ粒子が細胞膜表面に付着しやすい(すなわち粒子-膜表面間の親和性が高い)条件であるほど、粒子透過後に膜が自己修復しやすくなることを明らかにした。

本研究で見出した「微弱な電場の印加によってナノ粒子が細胞膜を直接透過する」現象に、ナノ粒子の物性が及ぼす影響についても解析した。具体的には、粒子の表面電荷密度・親水疎水性・サイズが及ぼす影響を解析した。その結果、ある物理化学的特性を有するナノ粒子において、細胞膜を直接透過できることを明確にした。

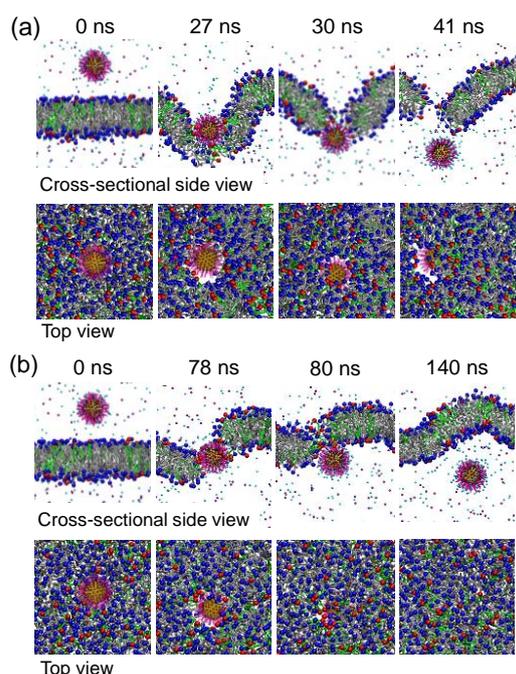


Fig. 3. Snapshots of NP permeation under (a) $V^* = 1.0$ and (b) $V^* = 0.8$.

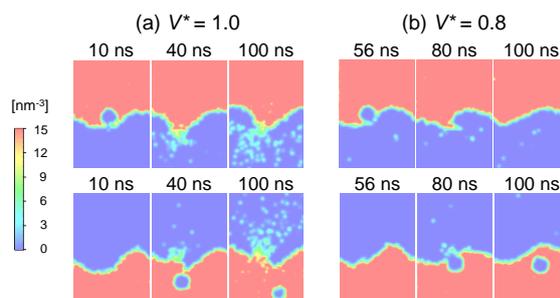


Fig. 4. Contour maps of number density of water molecules during NP permeation under (a) $V^* = 1.0$ and (b) $V^* = 0.8$.

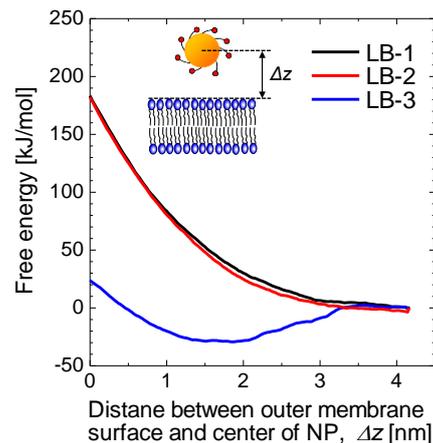


Fig. 5. Free energy profile as a function of distance between outer membrane surface and center of NP ($=\Delta z$ shown in the inset).

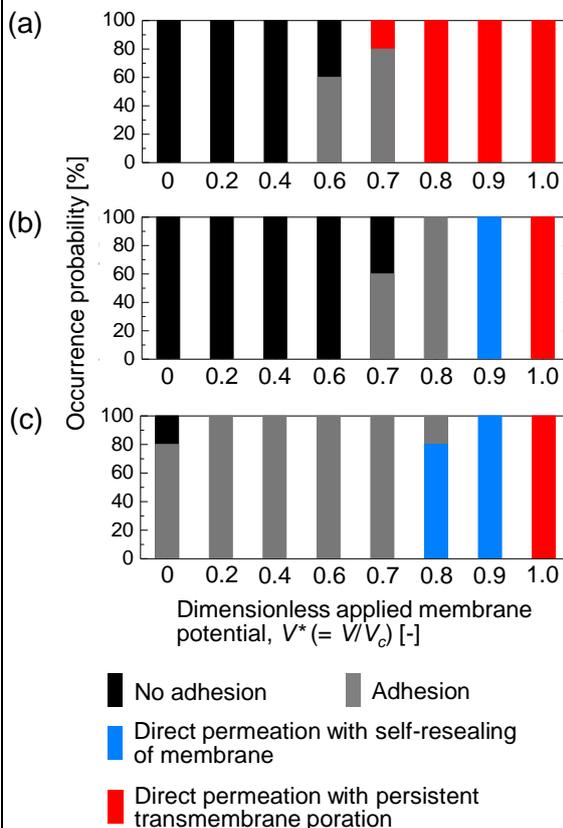


Fig. 6. Occurrence probabilities of four modes of NP behaviors as a function of applied membrane potential for (a) LB-1, (b) LB-2 and (c) LB-3.

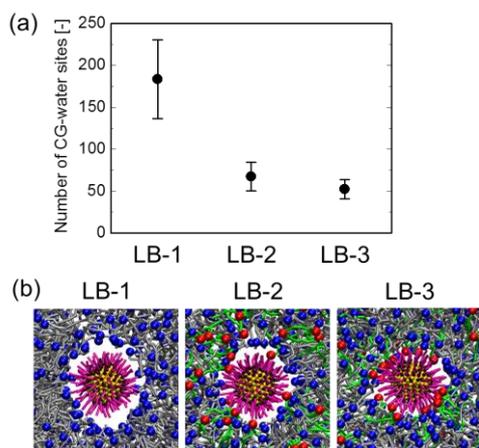


Fig. 7. (a) Number of water molecules existing in transmembrane pore and (b) snapshots of bottom view when NP passed center of bilayer under $V^* = 0.9$.

4. 2. 平面脂質膜実験の結果

Fig. 8 に種々のナノ粒子濃度における測定電流値の経時変化を示す。具体的には、時刻 100 s 以降に +100 mV の一定電圧を印加した際の測定電流を示している。ナノ粒子を加えない場合 (Fig. 8(a)) 電流値はほぼゼロであったが、粒子濃度の増加に伴い 0 pA を基準とした瞬間的な電流値の増加が見られた (Fig. 8(b))。さらに粒子濃度を増加させると、平均値が 0 pA 以上となり、電流が常時流れるようになった (Fig. 8(c) (d))。しかし、粒子を過剰に加えると、測定電流値が検出上限値まで瞬間的に増加し、脂質膜が破壊された (Fig. 8(e))。本実験においてゼロ以上の電流が測定されるということは、脂質膜を介して電荷を持った物質 (イオンもしくはナノ粒子) が移動したことを意味する。すなわち、粒子濃度の増加に伴い脂質膜に欠損が生じ物質が透過する様子を、Fig. 8 は示している。

Fig. 2(b) 右側の cis 区画に金ナノ粒子懸濁液を入れ、反対側の trans 区画のナノ粒子濃度を測定し、ナノ粒子透過率の定量化を試みた。しかしながら、透過率測定値は実験毎の変動が大きく、諸条件との相関関係を見出すまでには至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① K. Shimizu, H. Nakamura, S. Watano. MD simulation study of direct permeation of a nanoparticle across the cell membrane under an external electric field, *Nanoscale*, 8, 11897-11906, 2016, 査読有
10.1039/C6NR02051H
- ② H. Nakamura, Y. Nozaki, Y. Koizumi, S. Watano. Effect of number of hydroxyl groups of fullereneol C 60 (OH) n on its interaction with cell membrane. *Journal of the Taiwan Institute of*

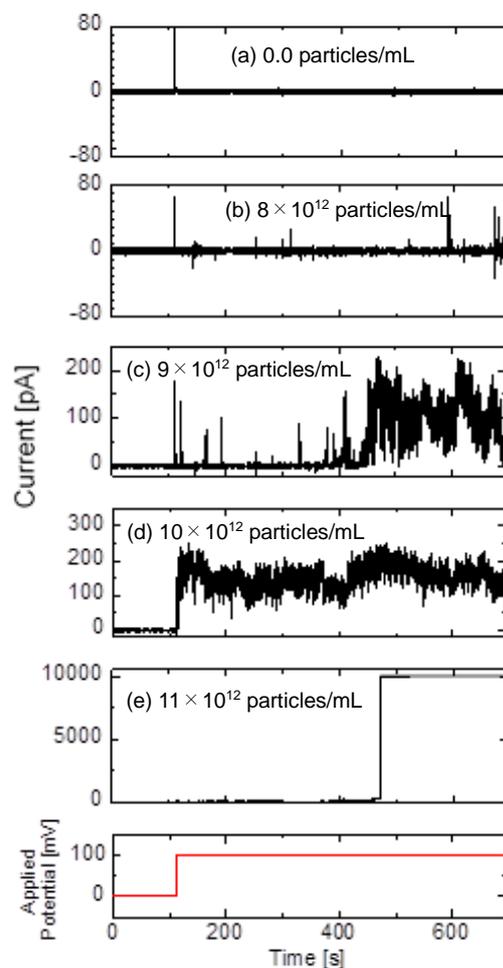


Fig. 8. Current measurements in voltage-clamp test at different concentrations of AuNP.

Chemical Engineers, in press, 2017, 査読有

10.1016/j.jtice.2017.11.016

- ③ H. Nakamura, S. Watano. Direct Permeation of Nanoparticles across Cell Membrane: A Review. *KONA Powder and Particle Journal*, 35, 49-65, 2018, 査読有
10.14356/kona.2018011

[学会発表] (計 21 件)

- ① 清水 健太, 仲村 英也, 綿野 哲, 正帯電性ナノ粒子の細胞膜透過メカニズムの解析, 粉体操作に伴う諸現象に関する勉強会, 2015 年
- ② 仲村 英也, ナノ粒子のリン脂質 2 重膜透過挙動: 分子シミュレーションによる解析, 第 66 回コロイドおよび界面化学討論会, 2015 年 (依頼講演).
- ③ K. Shimizu, H. Nakamura, S. Watano, Mechanism of Nanoparticle Permeation Across Cell Membrane, The 6th Asian Particle Technology Symposium, 2015 年.

- ④ 仲村 英也, 清水 健太, 綿野 哲, 電場の印加によってナノ粒子が細胞膜を透過するメカニズム: 分子動力学計算による解析, 化学工学会第 81 年会, 2016 年.
- ⑤ 瀬澤 恭平, 仲村 英也, 綿野 哲, 電場の印加によるナノ粒子の細胞膜透過現象の分子動力学解析: 粒子表面の親水疎水性の影響, 52 回粉体工学会夏期シンポジウム, 2016 年.
- ⑥ 仲村 英也, 清水 健太, 綿野 哲, 電場印加環境におけるナノ粒子細胞膜透過現象の分子動力学シミュレーション, 第 52 回粉体工学会夏期シンポジウム, 2016 年.
- ⑦ 瀬澤 恭平, 仲村 英也, 綿野 哲, 電場の印加によるナノ粒子の細胞膜透過現象の分子動力学解析: 粒子表面の親水—疎水性の影響, 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会, 2016 年.
- ⑧ 仲村 英也, 清水 健太, 瀬澤恭平, 綿野 哲, 電場の印加でナノ粒子が細胞膜を透過する現象, 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会, 2016 年.
- ⑨ H. Nakamura, K. Shimizu, K. Sezawa, S. Watano, MD Simulation Study of Direct Permeation of Nanoparticle Across Cell Membrane Under External Electric Field, AIChE Annual Meeting 2016, 2016 年
- ⑩ 野田 樹, 仲村 英也, 綿野 哲, 修飾分子のアルキル鎖長がナノ粒子の細胞膜透過に及ぼす影響, 化学工学会第 82 年会, 2017 年.
- ⑪ 瀬澤 恭平, 仲村 英也, 綿野 哲, 電場の印加によるナノ粒子の細胞膜透過現象の分子動力学解析 粒子サイズの影響, 化学工学会第 82 年会, 2017 年
- ⑫ H. Nakamura, K. Sezawa, S. Watano, Permeation of Nanoparticles across Cell Membrane: Insights from Molecular Dynamic Simulation Studies, 7th Asian Particle Technology Symposium, 2017 年
- ⑬ K. Sezawa, H. Nakamura, S. Watano, MD Simulation Study of Permeation of Nanoparticle across Cell Membrane by Applying Electric Fields: Effect of Particle Size, 7th Asian Particle Technology Symposium, 2017 年
- ⑭ 仲村 英也, ナノ粒子が細胞膜を透過する現象の解析, 第 107 回テクノラボツアー「夢を実現する工学—化学工学分野の最先端研究」, 2017 年
- ⑮ 野田 樹, 仲村 英也, 綿野 哲, 平面脂質膜を用いたナノ粒子と細胞膜の相互作用の解析, 2017 年度粉体操作に伴う諸現象に関する勉強会, 2017 年
- ⑯ 仲村 英也, ナノ粒子が細胞膜を透過する現象の理解, 化学工学会第 49 回秋季

大会, 2017 年 (依頼講演) .

- ⑰ 仲村 英也, ナノ粒子の細胞膜透過性を評価します, APPIE 産学連携フェア, 2017 年
- ⑱ 仲村 英也, 電場印加環境におけるナノ粒子の細胞膜透過: 分子シミュレーションによる解析, 粉体工学会・日本化学会新領域研究グループ合同セミナー, 2018 年 (依頼講演) .
- ⑲ 仲村 英也, 瀬澤 恭平, 大崎 修司, 綿野 哲, ナノ粒子の細胞膜透過における界面電気現象の分子動力学解析, 化学工学会第 83 年会, 2018 年
- ⑳ 秦 将貴, 仲村 英也, 大崎修司, 綿野 哲, 複数のナノ粒子の細胞膜透過現象: 分子動力学法による解析, 化学工学会第 83 年会, 2018 年

[図書] (0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

科学ニュースサイト (Atlas of Science)
<http://atlasofscience.org/nanoparticle-can-directly-permeate-across-cell-membrane-without-membrane-disruption/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲村 英也 (NAKAMURA, HIDEYA)

大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 00584426