

令和元年9月13日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04557

研究課題名(和文)大食細胞への微粒子の付着・取込のメカニズム解明と制御技術の開発

研究課題名(英文) Mechanistic study of adhesion and uptake of particles onto/into macrophages

研究代表者

新戸 浩幸 (Shinto, Hiroyuki)

福岡大学・工学部・教授

研究者番号：80324656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞に対する粒子の付着量および取込量を単一粒子・単一細胞レベルかつハイスループットで解析可能なフローサイトメトリー技術を開発した。この付着量と取込量は、コロイドプローブ原子間力顕微鏡法によって測定された付着力、走査型電子顕微鏡によって観測された取込速度とそれぞれ定性的に一致した。

タンパク質で表面被覆または糖鎖で表面修飾された粒子を作製し、粒子の表面特性が大食細胞(マクロファージ)への粒子付着・取込の力、量・個数、速度に対して及ぼす影響を検討した。これら付着力・付着量はマクロファージ内部への粒子の取込速度と必ずしも相関しなかった。詳細なメカニズム解明のためには、さらなる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大食細胞(マクロファージ)への微粒子の付着・取込は、生体がもつ免疫系での一連のプロセスの最上流に位置し、複数の物理化学的および細胞生物学的な相互作用が関与する極めて複雑な現象である。この現象を理解することは、微粒子の生体影響評価、先端医療を支えるバイオマテリアルの表面設計など、多くの分野において極めて重要である。しかし、基礎的な理解がなされないまま、研究・開発が進められることが多い。本研究において開発された「細胞への粒子の付着・取込」に関する単一粒子・単一細胞レベルの観測技術およびモデル粒子の作製技術は、マクロファージへの粒子の付着・取込の詳細メカニズム解明に向けて、貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a flow-cytometry-based technique to analyze the adhesion/uptake amounts of particles onto/into cells at single-particle, single-cell level with high throughput. These adhesion and uptake amounts qualitatively agreed with the adhesion force measured by colloid-probe atomic force microscopy and the uptake rate observed by scanning electron microscopy, respectively.

Protein-coated or saccharide-modified particles were fabricated, and the effect of these particle surface properties on the force, amount, and rate of particle adhesion/uptake onto/into a macrophage was investigated. The force and amount of particle adhesion were not always correlated with the rate of particle uptake. Further study is necessary to elucidate the detailed mechanism of particle adhesion/uptake by macrophage.

研究分野：界面プロセス工学

キーワード：生体ソフト界面 タンパク質コロナ 相互作用 大食細胞 粒子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

粒子径が数 nm ~ 数  $\mu\text{m}$  の微粒子は、触媒や電子部品などの工業製品だけではなく、医薬品、化粧品、食品などにも利用されている。一方、PM2.5 などの浮遊性粒子状物質が、新興国から多量に大気排出されている。PM2.5 などを含めた微粒子がどのようにヒトや環境に影響を及ぼすのか、よくわかっていない。これらの問題は、現在、産業的にも社会的にも広く重要視されているため、微粒子の生体・環境影響を明らかにすることは緊急課題である。

そこで研究代表者は、特に基礎的で重要と思われる課題、すなわち、細胞 - 粒子間の付着力、細胞への粒子の取込・毒性を、界面に注目した系統的かつ定量的な評価により、理解することを目指して研究を進めてきた。培養細胞を用いた微粒子の毒性評価の研究報告は、最近 10 年間で増加傾向にあるが、研究代表者のような微粒子・生体膜間相互作用の系統的な研究は世界的に見ても少ない。

### 2. 研究の目的

大食細胞 (マクロファージ) への微粒子の付着・取込は、生体がもつ免疫系での一連のプロセスの最上流に位置し、複数の物理化学的および細胞生物学的な相互作用が関与する極めて複雑な現象である。この現象を理解することは、微粒子の生体影響評価、先端医療を支えるバイオマテリアルの表面設計など、多くの分野において極めて重要である。しかし、基礎的な理解がなされないまま、研究・開発が進められることが多い。この現状から脱却しなければ、ナノ材料の正確なリスク評価、生体関連材料の合理的開発などの今後の飛躍的な発展は期待できない。そこで本研究では、応募者がこれまで独自に開発してきた界面に着目した単一粒子・単一細胞レベルの観測技術をさらに発展させることによって、大食細胞への微粒子の付着・取込のメカニズム解明と制御技術の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞表面への微粒子の付着量を単一細胞レベルで評価する手法の確立を目指して、培養細胞に対する微粒子の曝露方法を工夫し、新規導入したフローサイトメーター (FCM) によって解析した。微粒子として、蛍光ラベル化された 100 nm の無修飾シリカ粒子を用い、大食細胞としてマクロファージ様細胞株 (J774.1) を用いた。生体由来タンパクとしてウシ血清アルブミン (Ab)、免疫グロブリン G (IgG)、フィブロネクチン (Fn)、人工高分子としてポリエチレンイミン (PEI) をそれぞれ用いた。これらの強固なタンパク層 (または人工高分子層) で被覆されたシリカ粒子の懸濁液を調製した。

(2) 上記(1)では、小さなサイズの蛍光粒子 (粒子径 100 nm) を用いたため、FCM では粒子 1 個 1 個を識別できず、細胞の自家蛍光値を差し引いた細胞 1 個あたりの蛍光強度値、すなわち「付着量に比例する値」しか得ることができなかった。そこで、種々の蛍光粒子 (粒子径: 200, 300, 500, 1000 nm; 粒子材質: ポリスチレン, シリカ) に対して、単一粒子レベルの FCM 解析を試みた。

(3) タンパク質で表面被覆された粒子だけではなく糖鎖 (マンノース誘導体 (Man), ガラクトース誘導体 (Gal)) で表面修飾された粒子を作製し、粒子表面の被覆「タンパク質」および修飾「糖鎖」の種類がマクロファージ様細胞への粒子の付着・取込の「力」、「個数」、「速度」、「メカニズム」に対して及ぼす影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 異なる表面被覆物質をもつシリカ粒子の J774.1 細胞への付着量は、IgG > Fn > PEI > Ab の順に大きかった。この結果は、IgG 被覆粒子を除けば、コロイドブロー原子間力顕微鏡法 (cpAFM) によるマイクロ粒子の接着力の測定結果 (Fn > PEI > IgG > Ab) と一致した。Ab 被覆粒子が最小の接着力・付着量を示した原因として、Ab は生物的に不活性のため J774.1 細胞表面と結合しにくかったことが考えられる。Fn と PEI による被覆粒子が大きい接着力・付着量を示した原因として、Fn は細胞接着性タンパク質の一種であるため細胞表面に存在するインテグリンと特異的に結合したこと、PEI は正電荷を有し、負帯電している J774.1 細胞表面と静電引力が働くこと、が考えられる。IgG 被覆粒子があまり大きくない接着力を示したものの、最大の付着量を示した原因として、IgG は J774.1 細胞表面に存在する Fc 受容体によって認識されるが、その結合力は (細胞接着に関与する結合と比較すると) 強くないことが考えられる。

(2) 単一粒子レベルの FCM 解析は、粒子径が 300 nm 以上であれば可能であること、媒体である水との屈折率の差が大きいポリスチレン粒子の方が容易であることがわかった。粒子径 1000 nm のカルボキシル修飾ポリスチレン (PS-COOH) 粒子を用いて実験をおこなった結果、異なる表面被覆物質をもつ PS-COOH 粒子の J774.1 細胞表面への付着数は、Fn > IgG > 無被覆 > Ab の順に大きかった。この結果は、粒子径 6000 nm の PS-COOH 粒子を用いて cpAFM によって得られた付着力に対する粒子の表面被覆物質の序列と一致した。

(3) cpAFM により、タンパク質で表面被覆または糖鎖で表面修飾されたシリカ粒子 (直径 5  $\mu\text{m}$ ) の J774.1 細胞表面に対する付着力を測定した。その付着力は、Fn > IgG > Man > Gal > Ab の順に大きかった。J774.1 細胞に対する蛍光ラベル化シリカ粒子 (直径 1  $\mu\text{m}$ ) の曝露方法を工夫した上で FCM 解析した結果、J774.1 細胞表面に対する粒子の付着量に対する粒子の表面被覆および表面修飾の物質の序列は、上記の結果と一致した。走査型電子顕微鏡観測および FCM

解析を行った結果、タンパク質で表面被覆または糖鎖で表面修飾されたシリカ粒子が J774.1 細胞内部に取り込まれる速度は、Man > (Fn, IgG, Gal) > Ab の順に大きかった。

(4) 上記(1)～(3)の結果は、マクロファージ細胞表面に対する粒子の「付着力」と「付着量」の間には高い相関関係が認められること、これら付着力・付着量はマクロファージ内部への粒子の取込速度と必ずしも相関しないことを意味する。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

新戸 浩幸, 深澤 智典, 液相中での帯電と計測, 粉体工学会誌, 査読無, 54 巻, 2017, 673-691

H. Shinto, T. Fukasawa, K. Yoshisue, N. Tsukamoto, Saki Aso, Y. Hirohashi, Hirokazu Seto, Effect of interfacial serum proteins on the cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, malignant melanocytes, and macrophages, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 査読有, 181 巻, 2019, 270–277

〔学会発表〕(計 22 件)

新戸 浩幸, 織田 真由美, 深澤 智典, コロイドプローブ AFM 法による動物細胞・材料間の接着力の直接測定, 粉体工学会第 52 回夏期シンポジウム, 2016 年 8 月

塚本 七海, 有田 拓哉, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 大食細胞へのマイクロ粒子の付着・取込に及ぼす粒子表面物性の影響, 粉体工学会第 52 回夏期シンポジウム, 2016 年 8 月

塚本 七海, 麻生 早紀, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 各種細胞への人工粒子の付着・取込に対する単一細胞・単一粒子レベルでの観測, 化学工学会第 48 回秋季大会, 2016 年 9 月

N. Tsukamoto, T. Arita, Y. Hirohashi, H. Seto, H. Shinto, Adhesion and uptake of protein-modified microspheres to macrophages, 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会, 2016 年 9 月

S. Aso, Y. Hirohashi, H. Seto, H. Shinto, Adhesion and uptake of saccharide-modified silica particles to macrophages, 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会, 2016 年 9 月

H. Shinto, Soft interface between materials and cells, 12th Japan-Korea Symposium on Materials & Interface, International Symposium on Frontiers in Chemical Engineering, 2016 年 11 月

塚本 七海, 有田 拓哉, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 大食細胞への微粒子の付着・取込に対する単一細胞・単一粒子レベルでの観測, 平成 28 年度物理化学インターカレッジセミナー兼油化学界面科学部会九州地区講演会, 2016 年 11 月

麻生 早紀, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 糖鎖修飾シリカ粒子のマクロファージへの付着と取込, 平成 28 年度物理化学インターカレッジセミナー兼油化学界面科学部会九州地区講演会, 2016 年 11 月

新戸 浩幸, 細胞への微粒子の付着・取込に対する単一細胞・単一粒子レベルでの観測, 粉体工学会 2017 年第 1 回ソフト粒子・界面研究会, 2017 年 2 月

塚本 七海, 竹本 聡, 柳場 俊亮, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, フローサイトメトリーによる細胞・ナノ粒子間の相互作用の評価, 化学工学会 第 82 年会, 2017 年 3 月

麻生 早紀, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 糖鎖修飾マイクロスフェアの大食細胞への付着と取込, 粉体工学会, 2017 年度春期研究発表会, 2017 年 5 月

新戸 浩幸, 生体ソフト界面の単一細胞・単一粒子レベルでの基礎研究, 粉体工学会 2017 年度春期研究発表会, 2017 年 5 月

瀬戸 弘一, 麻生 早紀, 山下 勝也, 塚本 七海, 廣橋 由美子, 新戸 浩幸, 糖鎖固定化微粒子を用いたマクロファージの飲食作用評価, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017 年 9 月

麻生 早紀, 塚本 七海, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 種々の生体物質が固定化された粒子に対するマクロファージの飲食作用の差異, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017 年 9 月

塚本 七海, 竹本 聡, 柳場 俊亮, 中島 可奈英, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, AFM および FCM の異種計測法による細胞・粒子間相互作用の評価, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017

年 9 月

新戸 浩幸, 瀧口 未歩, 泊 健人, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 酵母細胞に対するナノ粒子の付着・取込と毒性のフローサイトメトリー解析, 化学工学会第 83 年会, 2018 年 3 月

新戸 浩幸, 界面プロセス工学から見た粒子・細胞間相互作用, 化学工学会九州支部特別講演会, 2018 年 5 月

新戸 浩幸, 液相中の種々の細胞に対する粒子の付着、取込、毒性, H30 年度東北大学電気通信研究所共同プロジェクト研究会, 2018 年 9 月

新戸 浩幸, 塚本 七海, 中島 可奈英, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, フローサイトメトリーおよびコロイドプローブ原子間力顕微鏡法による細胞—粒子間相互作用の評価, 第 69 回コロイドおよび界面化学討論会, 2018 年 9 月

兒玉 碧, 増田 優太, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, 糖鎖修飾粒子のマクロファージへの付着・取込に対する単一粒子レベルでの観測, 化学工学会第 84 年会, 2019 年 3 月

熊谷 理奈, 増田 優太, 久保 幸毅, 東 将大, 深澤 智典, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, 新戸 浩幸, シリカ粒子の溶血作用のメカニズム解明, 化学工学会第 84 年会, 2019 年 3 月

新戸 浩幸, 塚本 七海, 麻生 早紀, 兒玉 碧, 増田 優太, 廣橋 由美子, 瀬戸 弘一, フローサイトメトリーおよびコロイドプローブ原子間力顕微鏡法による機能性粒子の細胞親和性の評価, 粉体工学会, 2019 年度春期研究発表会, 2019 年 5 月

〔図書〕(計 1 件)

N. Ishida, Y. Kusaka, T. Fukasawa, H. Shinto, Wiley, Atomic force microscopy for measuring interaction forces in biological materials and cells, In “Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science”, 2016, Volume 1, Chapter 4

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称： 細胞シートの製造方法及び細胞培養支持体

発明者： 中島学、櫛川舞、八尾滋、中野涼子、新戸浩幸、瀬戸弘一

権利者： 学校法人福岡大学

出願番号： 特願 2017-246221

出願年： 2017 年 12 月 22 日

公開番号： 特開 2018-102296

公開年： 2018 年 7 月 5 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

新戸 浩幸, 粒子間の相互作用研究から細胞と粒子の相互作用研究へ, Progresso, 20 巻, 2017, 8-9

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

瀬戸 弘一 (SETO, Hirokazu)

廣橋 由美子 (HIROHASHI, Yumiko)

塚本 七海 (TSUKAMOTO, Nanami)

麻生 早紀 (ASO, Saki)

川口 紗苗 (KAWAGUCHI, Sanae)

瀧口 未歩 (TAKIGUCHI, Miho)

竹本 聡 (TAKEMOTO, Satoshi)

柳場 俊亮 (YANABA, Syunsuke)

江藤 勇気 (ETO, Yuki)

河野 鷹春 (KAWANO, Takaharu)

鹿島 綾香 ( KASHIMA, Ayaka )  
中島 可奈英 ( NAKASHIMA, Kanae )  
泊 健人 ( TOMARI, Kento )  
山下 勝也 ( YAMASHITA, Katsuya )  
兒玉 碧 ( KODAMA, Aoi )  
熊谷 理奈 ( KUMAGAI, Rina )  
増田 優太 ( MASUDA, Yuta )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。