

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12895

研究課題名(和文)凍結濃縮現象を利用した細胞内物質デリバリー

研究課題名(英文)Cytoplasmic delivery of biomolecules by using freeze concentration

研究代表者

松村 和明(MATSUMURA, Kazuaki)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：00432328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：凍結時に物質が氷晶より排除され、未凍結相が濃縮される凍結濃縮現象を利用して、細胞内に有用物質を送達する革新的技術を開発した。細胞を凍結保護物質存在下で凍結すると、まず細胞外の溶液が凍結し、残存水は濃縮される。あらかじめ細胞内に送達したい物質を、細胞膜との相互作用の高いキャリアに複合させて添加しておくことで、凍結時に細胞膜近傍に物質が濃縮されることになる。解凍後、濃縮されたキャリアは強い相互作用により、拡散せずにエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれ、エンドソームから脱出し、細胞質に移行して機能を発揮する。この手法により、タンパク質や遺伝子などの効率的な細胞内輸送法を提案した。

研究成果の概要(英文)：We developed an innovative technology to deliver useful biomolecules into cells by utilizing freeze concentration phenomenon in which substances are eliminated from ice crystals upon freezing and unfrozen phases are concentrated. When the cells are frozen in the presence of the cryoprotectant, the extracellular solution is first frozen and the residual water is concentrated. By adding a biomolecules to be delivered into a cell to a carrier with high interaction with the cell membrane, the complex is concentrated near the cell membrane at the time of freezing. After thawing, the concentrated carriers are taken into cells by endocytosis without diffusing due to strong interaction, escape from the endosome, transfer to the cytoplasm and exert its function. By this method, efficient intracellular transport method such as protein and gene was proposed.

研究分野：生体材料学

キーワード：ドラッグデリバリー 遺伝子デリバリー タンパク質デリバリー 凍結 凍結濃縮

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内にタンパク質や遺伝子などを導入する技術は、細胞治療や細胞の性質変換などにおいて重要である。これまで、ウイルスによる遺伝子導入や、高分子キャリアを用いた化学的手法、エレクトロポレーションなどによる物理的な手法など、様々な方法が開発されてきている。しかし、ウイルスにはガン化のリスクがあり、高分子キャリアでは導入効率が低い、物理的な手法では細胞毒性が高いなど、問題点も指摘されている。

そこで我々の研究室では、溶液を凍結する際に起こる凍結濃縮現象を用い、細胞周囲に導入したい物質を濃縮させることで取り込み向上を狙うという新手法を開発した。その際にこれまで我々が開発してきた高分子系凍結保護物質と細胞親和性のナノキャリアを利用することで効果の向上を狙った。

### 2. 研究の目的

凍結時に物質が氷晶より排除され、未凍結相が濃縮されることを凍結濃縮現象と呼ぶ。この現象を利用して、細胞内に有用物質を送達する革新的技術を開発する。細胞を凍結保護物質存在下で凍結すると、まず細胞外の溶液が凍結し、残存水は濃縮される。細胞は濃縮された残存水に存在し、濃縮相に暴露される(図1)。あらかじめ細胞内に送達したい物質を、細胞膜との相互作用の高いキャリアに複合させて添加しておくことで、凍結時に細胞膜近傍に物質が濃縮されることになる。解凍後、濃縮されたキャリアは強い相互作用により、拡散せずにエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれる。ナノキャリアに pH 応答性両性電解質高分子ナノ構造体を用いることで、エンドソームエスケープにより効率的に細胞質への取り込みを達成する。この手法を、抗原ペプチドや遺伝子の細胞内導入に利用する。

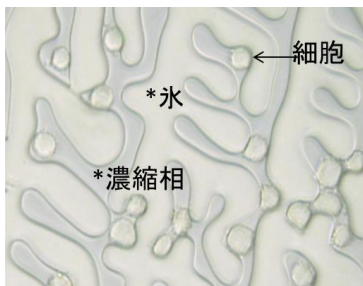


図1 凍結時(-1°C/min、-10°C(10%DMSO))の顕微鏡像。細胞は濃縮された液体中に存在し、膜近傍には物質が濃縮される。

### 3. 研究の方法

#### (1) タンパク質の複合化に優れた pH 応答性両性電解質高分子ナノキャリアの開発

我々はこれまで両性電解質としてポリリジンに無水コハク酸を反応させ、カルボキシル基を導入したカルボキシル化ポリリジンを合成し、細胞の凍結保護物質として報告している[1]。タンパク質や遺伝子のナノキャリアとして疎水化両性電解質高分子の自己組織化ナノ粒子を用い、タンパク質を静電相互

作用で吸着させ、キャリアとして用いることを試みる。さらにタンパク質の複合化量を増やす目的と、細胞膜との相互作用を向上させる目的で、リポソームを用いることを検討する。細胞内に取り込まれた際にエンドソームからの脱出を可能とするために、両性電解質高分子を複合化させた pH 応答性リポソームを検討する。

#### (2) 凍結濃縮の理解とそれを利用した細胞膜への両性電解質高分子の吸着促進と細胞内送達

凍結濃縮は、凍結速度、凍結保護物質の濃度などによりその度合いが異なる。既存保護剤である DMSO を加えた場合、凍結時に残存水が多いため、凍結濃縮の割合が低い。一方、高分子系の凍結保護物質の場合は、細胞への毒性が表れない範囲で十分な凍結濃縮が得られると考えられる。上記(1)で合成した細胞膜との相互作用を高めた両性電解質高分子キャリアを使用し、実際の細胞との相互作用を検討する。

#### (3) 凍結濃縮を利用した免疫細胞への免疫治療用抗原デリバリー法の開発

得られた最適なナノキャリア/複合体と凍結条件を免疫細胞へ応用する。抗原のモデルペプチドを用い、凍結融解により免疫細胞膜への吸着局在化を評価する。効率の測定は、フローサイトメトリーで細胞への吸着および T 細胞アッセイによる抗原提示能評価により行う。

#### (4) 凍結濃縮を利用した遺伝子デリバリー法の開発

非ウイルス性の遺伝子導入ベクターを用いた場合の導入効率向上は大きな課題である。そこで、凍結濃縮による遺伝子導入に挑戦する。この場合、特にエンドソームエスケープ能が問われることになる。さらにナノキャリアの最適分子設計、エンドソームエスケープの評価などを通して非ウイルス性ベクターとの組み合わせにより、革新的遺伝子導入技術の開発を進める。

[1]Matsumura K, Hyon SH, Biomaterials 30, 4842-4849, 2009.

### 4. 研究成果

#### (1) タンパク質の複合化に優れた pH 応答性両性電解質高分子ナノキャリアの開発

ポリリジン(PLL)に無水コハク酸(SA)を反応させる際に、一部、ドデシル無水コハク酸(DDSA)を添加し、C12 程度のアルキル鎖を導入した(PLL-DDSA-SA)(図2)。このとき、無水コハク酸の添加量で電荷を制御し、DDSAの添加量で疎水性をそれぞれコントロールすることで pH に応答して凝集体のサイズが変化するように設計した。この両性電解質高分子をリポソームに組み込み、pH 依存性のリポソームを作成し、デリバリーしたい物質を内包できる設計とした(図3)。このリポソームの表面電荷は動的な光散乱により調べ、弱アニオン性とすることで細胞毒性を低減した。

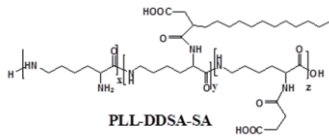


図2 自己組織化疎水性両性電解質高分子

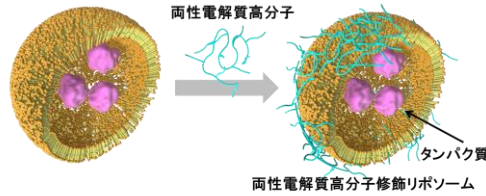


図3 薬物カプセル化両性電解質高分子修飾リポソーム (pH応答性リポソーム)

## (2) 凍結濃縮の理解とそれを利用した細胞膜への両性電解質高分子の吸着促進と細胞内送達

モデルタンパク質としてリゾチームを含有した両性電解質被覆リポソームおよび両性電解質高分子存在化で細胞懸濁液を凍結し、解凍後の細胞膜への吸着を共焦点顕微鏡で調べた。タンパク質とリポソームどちらにも異なる色の蛍光色素を標識し、凍結前の細胞にタンパク複合体キャリアを添加した時、解凍直後、播種後と、標識材料がどのように細胞に集積し、取り込まれるかを共焦点顕微鏡で観察した。図4は、L929細胞表面にリポソームおよびタンパク質が濃縮され、吸着している様子が観察されている。

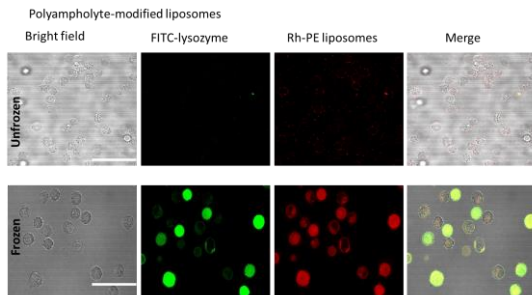


図4 凍結濃縮の有無による、細胞膜周囲へのタンパク質およびリポソームの集積。上段:未凍結。下段:凍結解凍後。明らかに凍結解凍後に細胞膜周囲に標識した蛍光強度の上昇が見られる。

その後、培養を続けることで、細胞が自発的にエンドサイトーシスでタンパク質を取り込むことも確認した。その後、エンドソーム中に取り込まれた両性電解質被覆リポソームが、エンドソームから脱出していることが確認された(図5)。

両性電解質高分子で修飾したリポソームでは、pH5.5の環境下でポリマーの電荷がプラスに偏るため、リポソームの凝集によるサイズ増加が確認されている。つまり、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた後、リポソームの凝集によりエンドソーム膜の不安定化を促しエスケープされたと考えられる。これらの結果より、両性電解質高分子被覆リポソームを用いることで、細胞へのタンパク質の取り込み向上が確認された (Ahmed S, et al., Nanoscale 2016)。また、凍結保護物質

としてジメチルスルホキシドよりも両性電解質高分子を用いた方が、凍結濃縮度が高くなるため、取り込み効果も高くなることが示された (Ahmed S, et al., Langmuir 2018)

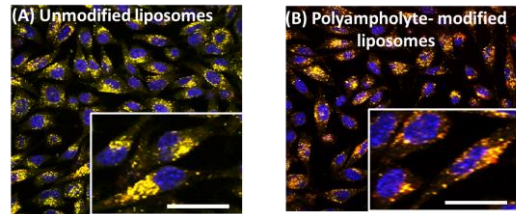


図5 タンパク質を(A)未処理リポソーム(B)両性電解質高分子被覆リポソームにそれぞれ担持し、凍結濃縮後に取り込ませた時のエンドソーム脱出能評価。(B)においてタンパク質とエンドソームが共局在していないため、エンドソームからの脱出が確認された。

## (3) 凍結濃縮を利用した免疫細胞への免疫治療用抗原デリバリー法の開発

がん免疫療法として、樹状細胞やマクロファージにがんの抗原を取り込ませ、抗原提示を行うことでT細胞のがんへの傷害活性を高める手法がある。一般には抗原を取り込ませる際にエレクトロポレーションなどを行うことが多いが、今回は、(2)で確立した、両性電解質高分子被覆リポソームにモデル抗原であるオボアルブミン(OVA)を担持させ、マクロファージ(RAW細胞)に凍結濃縮法により取り込み促進を行った。抗原提示能を確認したところ、同じくエンドソーム脱出が確認され、抗原提示能が向上したことが確認された。その際、インターロイキンなどの免疫活性化サイトカインの産生量も増加したことがわかり、抗原取り込み向上に伴うがん免疫療法への可能性も示唆された (Ahmed S, et al., Adv. Healthc. Mater. 2017)

## (4) 凍結濃縮を利用した遺伝子デリバリー法の開発

最後に、凍結濃縮法を利用した遺伝子導入についても検討した。一般的に非ウイルス性遺伝子導入薬として知られるポリエチレンジアミン(PEI)は、毒性が高いことも知られている。我々は、PEIのアミノ基を一部カルボキシル基に変換した、自己組織化両性電解質PEIを合成し、遺伝子のキャリアとして用いた。ホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドと複合体を形成し、両性電解質高分子凍結保護剤の添加のもと、凍結解凍によりHEK293細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、凍結解凍を行わなかった系に比べ10倍程度の導入効率を得ることが可能であった。市販のキット(リポフェクタミン3000)を用いた場合も、凍結解凍という作業を加えるだけで数倍の導入効率を得られた (Ahmed S, et al., ACS Biomater. Sci. Eng. 2017)。

また、金ナノ粒子の細胞内導入効率の向上についても調べ、その取り込み経路が金ナノ粒子の大きさにより異なる可能性があることを示す (Ahmed S., Biomater. Sci. 2018) など、汎用性の高い手法で有り、細胞と物質と

の相互作用についての基礎研究のツールとしても有用である。

本研究は、凍結濃縮という物理現象と、両性電解質高分子を利用したナノキャリアの組み合わせにより、タンパク質デリバリー、遺伝子デリバリーのみならず、siRNA デリバリーなど、*in vitro* での細胞内への物質取り込み促進全般の基盤技術となり得るものである。また、物質の取り込み機構などの基礎的研究も含んだ有用性と独自性の高い技術開発に関するものであり、新しい材料・手法の展開へとつながる研究であるといえる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Ahmed S, Okuma K, Matsumura K, Comparative analysis of the cellular entry of polystyrene and gold nanoparticles using the freeze concentration method. *Biomater Sci*, 査読有り in press.
  2. Ahmed S, Miyawaki O Matsumura K, Enhanced Adsorption of a Protein-Nanocarrier Complex onto Cell Membranes through a High Freeze Concentration by a Polyampholyte Cryoprotectant. *Langmuir*, 査読有り 34, 2352-2362 (2018)
  3. Ahmed S, Miyawaki O, Matsumura K, Role of cryoprotectants in freeze concentration technology for gene delivery process. *Cryoiol Cryotechnol.*, 査読有り 63, 147-154 (2017)
  4. Ahmed S, Nakaji-Hirabayashi T, Watanabe T, Hohsaka T, Matsumura K, Freezing Assisted Gene Delivery Combined with Polyampholyte Nanocarriers. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 査読有り 3, 1677-1689 (2017).
  5. Ahmed S, Fujita S, Matsumura K, A Freeze-Concentration and Polyampholyte-Modified Liposome-Based Antigen Delivery System for Effective Immunotherapy. *Adv. Healthc. Mater.* 査読有り 6, 1700207 (2017)
  6. Ahmed S, Matsumura K, Novel Concentration-Based Freezing Method for Efficient Protein Delivery. *Cryobiol. Cryotechnol.* 査読有り 62, 143-147 (2016)
  7. Ahmed S, Fujita S, Matsumura K, Enhanced Protein Internalization and Efficient Endosomal Escape Using Polyampholyte-Modified Liposomes and Freeze Concentration. *Nanoscale*, 査読有り 8, 15888-15901 (2016)
- [学会発表] (計 12 件)
1. Matsumura K, Rajan R, Ahmed S, Polyampholytes as biomaterials, Japan-India Symposium on Materials Science 2018, 2018/3/5, 北陸先端科学技術大学院大学 (石川県能美市)
  2. Matsumura K, Ahmed S, 両性電解質高分子皮膜リポソームを用いた凍結による細胞内への物質送達、第 27 回日本 MRS 年次大会、2018/12/6 横浜開港記念館 (神奈川県横浜市)
  3. Ahmed S, Matsumura K, Progressive freeze concentration based model system for delivery of biomolecules. 第 39 回日本バイオマテリアル学会、2017/11/21 船堀タワーホール (東京都)
  4. Matsumura K, Biomedical application of polyampholytes, Smart Information, Smart Knowledge, Smart materials 2017 Workshop, 2017/9/27(Bangkok, Thailand)
  5. Okuma K, Ahmed S, Matsumura K, Intracellular delivery of gold nanoparticles using freeze concentration. IUMRS-ICA, 2017/8/28 京都大学 (京都府京都市)
  6. Ahmed S, Matsumura K, Enhancement of gene delivery using effective combination of freeze concentration and polyampholyte nanoparticles. 12<sup>th</sup> International Conference on “Advanced Polymers via macromolecular Engineering”, 2017/5/21 (Ghent, Belgium)
  7. Okuma K, Ahmed S, Matsumura K, Delivery of gold nanoparticles into cells. JAIST Japan-India Symposium on Materials Science 2017, 2017/3/7, 北陸先端科学技術大学院大学 (石川県能美市)
  8. Ahmed S, Matsumura K, Use of freeze concentration and polyampholyte-modified liposomes for cancer immunotherapy. JAIST Japan-India Symposium on Materials Science 2017, 2017/3/7, 北陸先端科学技術大学院大学 (石川県能美市)
  9. 松村和明、凍結濃縮を利用した両性電解質高分子ナノキャリア/タンパク質複合体の細胞内デリバリー、第 4 回バイオ関連シンポジウム若手フォーラム、2016/9/6、もてなしドーム (石川県金沢市)
  10. 松村和明、Sana Ahmed, 凍結濃縮を利用したタンパク質デリバリー、第 61 回低温生物工学会、2016/6/26、東京電機大学 (埼玉県比企郡)
  11. Ahmed S, Matsumura K, Exploring the

intracellular pathways of liposome protein using polyampholyte modified liposomes and freeze concentration method, 10<sup>th</sup> World Biomaterials Congress. 2016/5/18 (Montreal, Canada)

12. Ahmed S, Matsumura K, Effective gene delivery by using freeze concentration method, 10<sup>th</sup> World Biomaterials Congress. 2016/5/18 (Montreal, Canada)

[図書] (計 1 件)

1. Kazuaki Matsumura, Robin Rajan, Sana Ahmed, Minkle Jain. Medical Application of Polyampholytes. In Biopolymers for Medical Applications. Ed. Juan M. Ruso, CRC Press, pp 164-181. (2017)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：遺伝子導入された細胞の製造方法及びポリエチレンイミンの置換体ポリマー

発明者：松村和明、サナアハマッド、中俊明

権利者：国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学、澁谷工業株式会社

種類：特許

番号：特願 2016-221047

出願年月日：2016 年 11 月 11 日

国内外の別：国内

6. 研究組織 (所属等は H30. 3. 31 時点)

Members as of March 31, 2018

(1) 研究代表者 Principal Investigator

松村 和明 (MATSUMURA KAZUAKI)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：00432328