

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12083

研究課題名（和文）金属強化型生体膜組織の創製と細胞間シグナル伝達モデルの構築

研究課題名（英文）Development of metal-reinforced multicellular membrane structure for intercellular signaling model

研究代表者

松村 一成（Matsumura, Kazunari）

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：10348899

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ハチの巣状に配列した金属の多孔質体(ハニカム状金属フィルム)を二つの方法で作成し、それを支持体として細胞膜と同様のリン脂質膜の小胞構造(リポソーム)を生体組織のように多数配列させた多細胞型の脂質膜を作製した。作製した脂質膜が目的通りの構造と安定性を持っていることを蛍光顕微鏡で観察した。リポソームの融合現象を利用して、脂質膜への膜物質の導入手法を確立した。さらに孔内へのイオン透過現象を色素で可視化して顕微鏡で追跡した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって確立した手法によって、力学的に不安定で互いに融合しやすい脂質膜の小胞構造を規則的に配列させた多細胞型脂質膜を安定的に構築することに初めて成功した。また、その脂質膜に生体分子を導入し、その分子が機能していることも顕微鏡で観察することが可能となった。本研究の成果は人工脂質膜を用いた研究を従来の単細胞の段階から多数の細胞からなる生体組織の段階に前進させ、生命機能を人工的に模擬する技術の発展に寄与する。

研究成果の概要（英文）：Honeycomb-like metal films were prepared by using breath figure method ordered-beads template method, and multicellular lipid membranes supported by the metal films were prepared. Prepared phospholipid vesicles (liposome) is similar structure to the cell membranes which were arranged like biological tissues. The fluorescence microscopic study indicates that the prepared lipid membranes is the desired structure and high stability. We established a method to introduce membrane materials into lipid membranes by utilizing the liposome fusion phenomenon. Furthermore, the phenomenon of ion permeation into the pores was visualized with dyes and monitored by microscopy.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：リン脂質 リポソーム 細胞膜 人工細胞 多細胞型 自己組織化 ハニカム構造

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂質膜の球形の小胞であるリポソームは1961年に Alec D. Bangham によって発見された当初から人工のモデル細胞としての研究が行われてきた。現在は生体関連化学の進展に伴い、リポソームへの生体機能付与が更に精緻に行われている。リポソームの作製方法については Bangham の手法を始めとして様々な方法が研究・提案され、粒径の単分散性の高いリポソームを作製することも可能になっている。また、リポソームをマイクロ流路などで位置を操作したり、特定の場所に固定化したりする技術も進展している。

しかしながらリポソーム膜の分子構成は天然の細胞膜より単純化されており、また一般的には細胞外マトリックスを伴っていないため、他のリポソームと接触した際には膜融合を起こしやすい。従って、リポソームを生体組織のように多細胞的に機能させるのは単純なりポソーム構造では困難である。リポソームを強化する方法として、両親媒性高分子やセラミック構造を用いる手法も提案されているが、それらは細胞膜の構造(リン脂質二重膜)とは異なるため、膜タンパク質を導入するなどの生体膜を模倣する研究において問題が生じる。

本研究ではリポソームを多細胞的に支持・固定する支持体として図1のような特徴を持つハニカム状多孔質膜(ハニカム状フィルム)に注目した。ハニカム状フィルムは、そのユニークな構造から細胞培養基材等の再生医療用途として注目がなされているが、脂質膜支持体としての研究例はない。

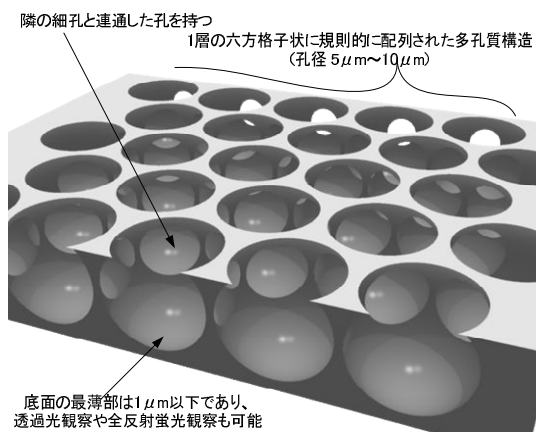


図1 本研究で用いるハニカム状フィルムの形状と特徴

### 2. 研究の目的

本研究はハニカム状フィルムを支持体として脂質膜小胞であるリポソームを生体組織のように多数配列させたハイブリッド構造を作成する。本研究の多孔質膜中に支持された人工生体膜組織は、i) 従来のリポソーム配列構造よりも機械的に安定に固定でき、ii) 脂質膜を化学的に固定化するリンカー分子を必要とせず、人工系として期待される簡便さと単純さを有しており、iii) 小胞内の物質が多孔質膜中の接続孔に存在する脂質膜を透過することによって隣接した小胞内へ物質移動可能であるという3つの特長を持つ。また、その接続孔の場所はハニカムフィルムの構造によって規定された規則的なものであり、各リポソーム間の物質移動を個別にかつ明確に追跡しやすい。得られた多細胞型の脂質膜構造の物性を評価し、任意の小胞内の酵素反応やイオン透過現象を色素で可視化することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 支持体(ハニカム状フィルム)の作製

Polystyrene (PS)、界面活性剤として N-Dodecylacrylamide と 6-Acrylamidohexanoic acid のラジカル重合体のクロロホルム溶液を用いた Breath Figure 法にてハニカム状フィルムを作製した。イオンコーターで Pt/Pd を被覆した後に無電解電鍍を行った。別の手法として、カバーガラス上に TEM 用銅メッシュを固着した基板を作成した後に、PS 粒子分散メタノール溶液を滴下してメッシュ枠内に二次元的にビーズを集積配列した。配列した PS 粒子を鋳型として無電解電鍍を行ったものも用いた。

#### (2) 多細胞型人工脂質膜の作製と溶液内包性の評価

Phosphatidyl Choline(PC)、蛍光試薬 Rh-PEのデカン溶液と、蛍光試薬カルセインとスクロースが溶解した HEPESバッファー(50mM、pH7.00)の溶液を超音波処理して乳液(w/oエマルジョン)を作製した。(1)で作製したハニカムフィルムをプラズマ処理した後にPC/Rh-PEのデカン溶液を浸漬し、さらに上記乳液を滴下して脂質膜展開を行った。Rh-PE、カルセイン両者の蛍光を蛍光顕微鏡にて観察した。

#### (3) 膜融合性リポソームを用いたイオノフォアの導入とイオン透過現象の蛍光追跡

ハニカム状フィルム上にpH5のPyranine溶液を内包させたRh-PE含有人工脂質膜を作成し、それに対しカチオン性脂質1,2-Distearoyl-3-Trimethyl ammonium Propane(DSTAP)とイオノフォアであるGramicidinを脂質膜に含有した粒径100nmの脂質膜小胞分散液を滴下して膜融合させることで、微細孔脂質膜部分にイオノフォアを導入した。イオノフォアの導入を確認するため金属強化型脂質膜小胞の外部pHを塩基性水溶液の滴下により上昇させ、小胞内部のピラニンの蛍光増感を蛍光顕微鏡の観察によって経時的に追跡した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ハニカム状フィルムの形状観察

二種の方法で作成した脂質膜の支持体の構造を SEM で観察した結果を図 2 に示す。

Breath Figure 法によるハニカム状フィルムの作製は広く行われているが規則性の高い多孔質構造の孔径は  $1\mu\text{m}$  前後のものが多く報告されている。脂質膜の支持体として光学顕微鏡観察するにあたっては孔径が数  $\mu\text{m}$  ~ 10 数  $\mu\text{m}$  であることが望ましい。本研究では両親媒性高分子を用いて条件最適化することで、規則性と大孔径を両立させたフィルムを作製することが出来た(図 2 a)。

図 2 b) で示したハニカム構造は、一定範囲の数だけ集積した PS 粒子を鋳型にすることで多細胞型脂質支持体としたものである。移流集積法などでビーズを平面基盤上に二次元的に規則配列させることは従来から広く行われてきたが、本法のような矩形孔に集積させた報告は殆どない。集積数を規定することは多細胞型人工脂質膜を進展させる上で様々な利点があるため、本法を新規に確立した意義は高いと考えている。

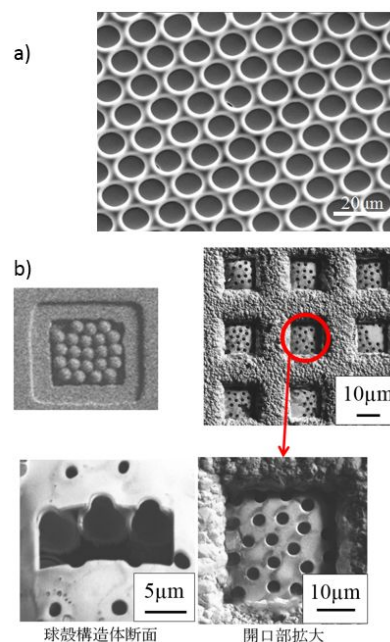


図 2. ハニカム状フィルムの SEM 観察結果 a) Breath Figure 法 b) PS 粒子鋳型法

##### (2) 多細胞型人工脂質膜の溶液内包性の評価

図 3 に顕微鏡に支持された人工脂質膜を蛍光顕微鏡で観察した顕微鏡像を示す。図 a) は乳液法で導入した水溶性蛍光指示薬(カルセイン/ピラニン)の緑色蛍光のスライス像/3D 像である。構造体の外部に遊離した指示薬の蛍光は消光させているため、孔内の各蛍光像は外部から脂質膜によって区画化されていることを示している。図 b) では脂質膜に含まれた Rh-PE の赤色蛍光と、脂質膜に内包されたカルセインの緑色蛍光をスライス像にて確認したものである。本結果は乳液導入法による脂質膜展開によるものであるが、人工細胞の支持体としてハニカム状フィルムを利用する際には、多様な脂質膜の展開法が可能である事が望ましい。エレクトロフォーメーション法(EF 法)の適用などによって、脂質膜の展開効率や単層(unilamellar)構造の形成効率の向上を目指して更に洗練された手法に発展させることが出来ると考えている。

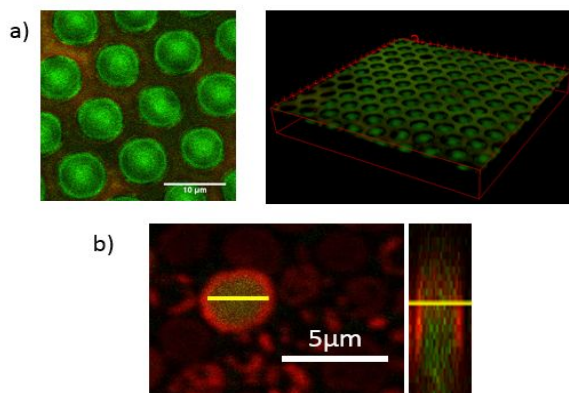


図 3. ハニカム状フィルムに展開した脂質膜のレーザー共焦点蛍光顕微鏡観察結果

##### (3) 膜融合性リポソームを用いたイオノフォアの導入とイオン透過現象の蛍光追跡

ハニカムフィルムに展開した脂質膜に膜融合性リポソームを用いて Gramicidin を導入し、そのイオン透過能を蛍光顕微鏡にて確認した。膜融合性の多細胞脂質膜への膜融合能も別途蛍光修飾脂質が導入したことで確認した。pH 変化に伴う蛍光増感を観察することによって Gramicidin 導入処理によるイオン透過現象を追跡することができ、その蛍光増感はいずれの開口部によって差があることが示された。

本法で作製した人工脂質膜がその支持体の開口部でリポソーム融合現象によって任意の膜物質を導入することが可能であることが示された。多細胞型人工脂質膜の応用可能性を高めるためには、任意の部位への膜物質・小胞内物質導入手法の開発が重要であり、マイクロマニピレータを用いた物質導入法の手法の確立も目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>大寄皓平、上野和真、松村一成             |
| 2. 発表標題<br>ハニカム状多孔質材料を用いた多細胞型人工脂質膜の作成 |
| 3. 学会等名<br>第28回インテリジェント・ナノ材料シンポジウム    |
| 4. 発表年<br>2018年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>OSAKI, Kohei; MATSUMURA, Kazunari  |
| 2. 発表標題<br>Preparation of Lipid Bilayer Membrane Supported by Micro-Honeycomb Porous Film |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第99回春季年会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>木村圭佑、矢野 瑠理亜、松村一成          |
| 2. 発表標題<br>ハニカム状多孔質体に支持された脂質膜小胞構造の調製 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第101回春季年会            |
| 4. 発表年<br>2021年                      |

〔図書〕 計1件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Ikuo Fujii                   | 4. 発行年<br>2018年 |
| 2. 出版社<br>The Japanese Peptide Society | 5. 総ページ数<br>231 |
| 3. 書名<br>Peptide Science               |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|