

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05284

研究課題名(和文)細胞内送達ナノキャリアによるナノ材料の比較可能な細胞内安定性評価法の開発

研究課題名(英文) Development of comparable intracellular stability evaluation method for nanomaterials using intracellular delivery nanocarriers

研究代表者

佐々木 隆浩 (SASAKI, Takahiro)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：20714489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナノ材料の細胞内安定性を評価するため、被検ナノ材料を細胞内へ送達するナノキャリアの開発、並びに細胞内安定性が高いナノ材料に適した一次修飾分子の探索を目指した。ナノキャリア開発においては、ナノキャリア自体の細胞内安定性を高めるため母材である磁性ナノ粒子表面へシリカ殻形成を行った。続く多段階分子修飾におけるナノ粒子の分散安定性を改善するため、分散剤を新たに探索した。また、一次修飾分子の探索においてははじめに分散性、反応性の観点から選定し、良好なものについて細胞内環境に近い条件下での安定性試験を行い、候補化合物を絞り込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で目標とした細胞内送達ナノキャリアは期間内の完成には至らなかったが、開発過程で得られたナノ粒子の分散安定化に関する知見は、多くのナノ材料開発に役立つものと期待される。昨今、ナノ材料をコアとする技術・製品が次々と社会実装されており、これまで以上にナノ材料が身近になる社会にとって、生体内あるいは細胞内におけるナノ材料の安定性(安全性)の評価は重要になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to develop nanocarriers that deliver various nanomaterials into cells and evaluate their intracellular stability and to search for suitable ligands for nanomaterials with high intracellular stability. First, in the development of the nanocarriers, a silica shell was formed on the surface of magnetic nanoparticles, the base material of the nanocarriers, to enhance the intracellular stability of the nanocarriers themselves. Next, to prevent aggregation of the nanoparticles in a process of molecular modification, we searched for suitable dispersant that improve the dispersion stability of the nanoparticles. Finally, in the search for ligands, we first selected ligands in terms of dispersion stability of nanoparticles modified it and reactivity with amines, and for the superior ones, we conducted dispersion stability tests under the condition similar to the intracellular environment to narrow down the candidate compounds.

研究分野：分析化学

キーワード：細胞内送達ナノキャリア ナノ材料の細胞内安定性 磁性ナノ粒子 ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

近年、無機ナノ材料のバイオ応用研究が盛んである。バイオ応用のための無機ナノ材料は、多くの場合、ナノ粒子表面に分子修飾が施される。これは、生体内環境における分散安定化、免疫機構からの回避、さらに種々の機能発現を目的とする。この表面修飾分子が不安定化しナノ粒子表面から脱離すると、ナノ材料の母材表面が露出することとなる。これにより、ナノ粒子の凝集、機能の喪失、免疫機構による捕捉、脱離した分子やナノ粒子材質に起因する細胞への障害等が生じる可能性がある。したがって、ナノ材料の生体内安定性はナノ粒子の機能性及び細胞毒性の両面から非常に重要である。しかしながら、生体内におけるナノ材料の安定性評価には以下の問題点がある。

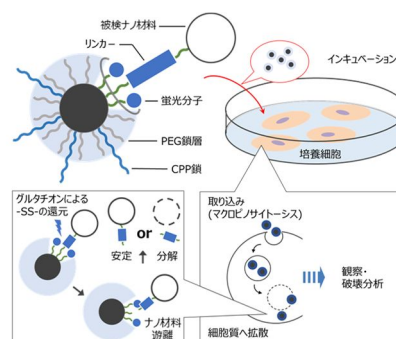
- ・標準的な評価法が確立されていない
- ・ナノ材料の表面特性が異なると細胞導入挙動が異なり、実験間あるいは材料間での比較が困難となる

これらの課題を解決し、実験間あるいは材料間で結果を比較することのできる評価法の確立が求められている。

また、表面修飾された無機ナノ材料には、ナノ材料表面に直接結合している分子(一次修飾分子)が存在する。種々の分子修飾は、この一次修飾分子を足掛かりとして段階的に行われることとなる。したがって、ナノ粒子表面と一次修飾分子の結合安定性が最も重要であり、生体内環境下で優れた安定性を示す一次修飾分子は、生体内安定性の高いナノ材料の設計に不可欠である。したがって、細胞内安定性評価法を確立し、さらにこの評価法により生体内安定性の高い一次修飾分子を探索することで、生体内安定性の高いナノ材料の効率的な開発が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ材料の新規細胞内安定性評価法として、一定の細胞内導入効率を有するナノ材料(細胞内送達ナノキャリア)へ被検ナノ材料を係留することで、一定効率で細胞内へ被検ナノ材料を送達することが可能となり、実験間及び材料間で比較可能な細胞内安定性評価が可能となるものと着想し、これに必要な細胞内送達ナノキャリアの開発を試みた(図1)。また、ナノキャリア合成の過程でナノ粒子の凝集が問題となったため、この解決に向けた分散剤の探索と分散安定化の機序について検討を行った。さらに、細胞内安定性の高い一次修飾分子の探索については、種々の一次修飾分子を修飾したナノ粒子(一次修飾ナノ粒子)について細胞外での安定性評価を行い、安定性の高い一次修飾ナノ粒子を選定し、続いて本研究で確立を目指す上記安定性評価法により細胞内安定性を評価することを目的とした。



任意のナノ材料をナノキャリアへ連結して細胞内へ送達する。被検ナノ材料は細胞内取込機能不要。

図1 細胞内送達ナノキャリアによる被検ナノ材料の細胞内導入の概要

3. 研究の方法

細胞内送達ナノキャリアの開発

カルボキシ基を表面に有する磁性ナノ粒子(MNP@COOH)を合成し、これを細胞内送達ナノキャリアの母材に用いることとした。ナノキャリア自体の細胞内安定性を向上させるため、ナノ粒子表面へシリカ殻を形成した。その後、被検ナノ粒子を係留するためのチオール基(SH)をナノ粒子表面の一点にのみ修飾した。続いてリンカー及び種々の分子修飾を行う予定であったが、分子修飾反応においてナノ粒子の凝集が著しいことから、ナノ粒子の分散安定化に関する検討を優先して行った。

ナノ粒子の分散安定化のための分散剤探索

MNP@COOH の分散安定化のため、低分子型分散剤の利用を検討した。低分子型分散剤として両性分子に着目し、類似構造を有する種々の候補化合物を選択し、この化合物の水溶液中におけるMNP@COOH の分散安定性を評価した。分散安定性の指標として、動的光散乱法(DLS)により測定した粒子径を用いた。

一次修飾分子の安定性評価(細胞外実験)

シリカ粒子(2~3 μm)表面に、リンカーを介して種々の一次修飾分子を表面修飾したMNP(一次修飾MNP)を固定した(SiO₂@MNP@Ligand)。その後、種々の溶液条件中でSiO₂@MNP@Ligand を24時間振とうした。振とう後、シリカ粒子表面に残存したMNP@Ligandの量を測定することで安定性を評価した。MNP@Ligandの残存量は、HCl処理により生じたMNP由来Feを原子吸光光度法(AAS)で測定し、評価した。

4. 研究成果

細胞内送達ナノキャリアの開発

MNP@COOH は、既知の方法によりオレイン酸修飾 MNP (MNP@OA) を合成し、一次修飾分子として 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA) を用いた配位子交換反応により MNP@DHPAA を得た。得られた MNP@DHPAA について赤外分光測定を行い OA 由来のシグナルの消失及び DHPAA 由来のシグナルの観測から OA が DHPAA へと交換されたことを確認した。MNP@DHPAA の粒子径は、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察より平均 14 nm であった。この MNP@DHPAA への SH 基導入及びシリカ殻形成を目的として、ジスルフィド結合および末端アミノ基を有し、Polyethylene glycol (PEG) からなるリンカーを表面にもつシリカ粒子 ($\text{SiO}_2\text{:PEG-SS-NH}_2$) に MNP@DHPAA を縮合反応にて固定した ($\text{SiO}_2\text{:PEG-SS-MNP@DHPAA}$)。続いて固定化 MNP@DHPAA と 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) の縮合反応を行った。本実験では化学量論に基づきあらかじめ定量した総カルボキシ基に対して APTMS 量を調整することで (0.5 ~ 2 eq) 最適なシリカ殻の厚さ制御を行った (図 2)。

2 eq の条件で 2 nm 程度の適度な厚さのシリカ殻が形成され MNP の化学的安定性が向上した ($\text{SiO}_2\text{:PEG-SS-MNP@silica-NH}_2$)。この MNP の末端 NH_2 を再度 COOH 基へと変換した後、還元することでナノ粒子表面一点にのみ SH 基を導入した MNP@silica-COOH(SH) を得た。続いて、種々の分子修飾を行う予定であったが、MNP の凝集により分子修飾は困難と判断し、MNP の分散安定化を優先して検討することとした。

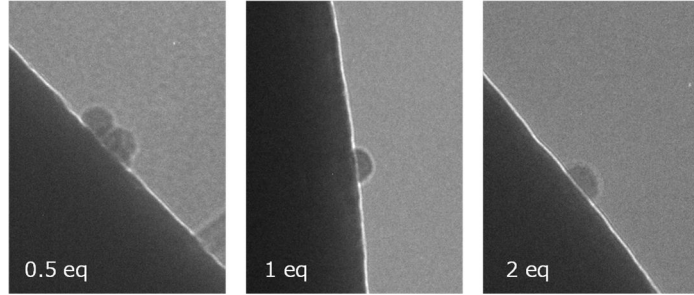


図 2 MNP 表面 COOH 量に対する APTMS 量 (0.5, 1, 2 eq) に依存したシリカ殻の厚さ比較

ナノ粒子分散安定化のための分散剤探索

ナノ粒子の分散安定化のための分散剤として、電気二重層様の分散安定化効果を期待して、2-aminoethanesulfonic acid (AES), 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) に着目し、これらの 50 mM 水溶液 (pH 7.4) 中での MNP@COOH の分散安定性を評価した。また、正と負の電荷による分散効果を検証するため、電荷の配置が異なる 2, 2'-(Piperazine-1, 4-diyl)di(ethane-1-sulfonic acid) (PBES), 正電荷を持たない 2-Hydroxyethanesulfonic acid (HES), 電荷が連結されていない NaCl についても同様に検討した (図 3)。配位子交換後の MNP@DHPAA 水分散液には微小な MNP や遊離の一次修飾分子が含まれている可能性が高いため、限外ろ過 (100 kDa) を行い精製するとともに上記水溶液への溶媒置換を合わせて行った。この結果、AES, MES, HEPES についてはメンブレンへの MNP の吸着が多少みられたもののそれぞれの MNP 分散液が得られた。一方、PIPES, HES については凝集し、分散液は得られなかった。したがって、ナノ粒子の分散安定化には正電荷と負電荷が分子内に存在する分子構造が重要であることが明らかとなった。また、50 mM NaCl (pH 7.4) 中でも分散安定化効果は低く、正・負電荷の連結も重要であることが示唆された。

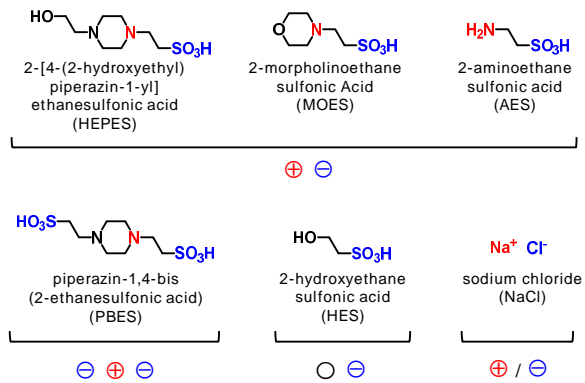


図 3 正電荷と負電荷を有する両性分子およびその類似化合物

AES をはじめとする $\oplus\text{-}\ominus$ 型両性分子が分散安定化に寄与することが示唆されたため、より適した分散剤の探索を目的として、類似構造を有する種々の化合物について分散安定化効果を評価した (図 4)。市販されていないものについては合成し、滴定により pK_a を決定した。化合物群は AES とその *N*-アルキル類縁体 (Group 1), HEPES とその分子鎖伸長類縁体 (Group 2), AES とその分子鎖伸長類縁体 (Group 3) の 3 つに分類し、分散安定化の指標には DLS 測定による水中の粒子径を用いた。粒子径が TEM 観察で得られた粒子径に近ければ分散性が良く、大きいほど凝集成分が含まれ分散性が悪いと評価した。また、得られた粒子径と両性分子の物性値のひとつである pK_a (アミノ基の共役酸) との関係性についても検討した。その結果、Group 1 において粒子径は $\text{DMAES} > \text{AES} > \text{MAES}$ の順となり両性分子のアミノ基

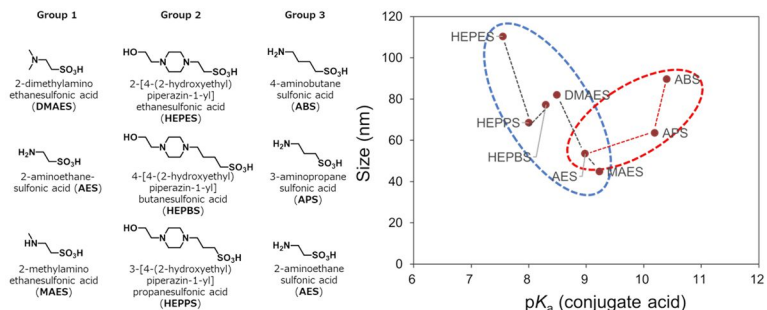


図 4 $\oplus\text{-}\ominus$ 型両性分子の pK_a と粒子径の関係

の pK_a の順 (DMAES<AES<MAES) に対して負の相関がみられた。また, Group 2 においても同様に粒子径は HEPES>HEPBS>HEPPS, pK_a は HEPES<HEPPS<HEPBS となり概ね負の相関がみられた。一方で Group 3 においては, 粒子径が AES<APS<ABS, pK_a が AES<APS<ABS となり正の相関がみられた。Group 1, 2 に対して Group 3 が真逆の挙動をとったことから, Group 3 について異なる粒子径測定法, 小角 X 線散乱法 (SAXS) にて再度粒子径測定を行った。その結果, AES, APS, ABS の粒子径は SAXS 値と DLS 値で大きく異なり, また TEM 値と近い値となったことから, 実際には AES, APS, ABS は MNP を良く分散していることが示唆された。一方, Group 1, 2 の DMAES 及び HEPPES は SAXS 値と DLS 値が同等となった。DLS 法は水溶液中の粒子の運動性に起因した散乱光の揺らぎに基づいて粒子径を算出するため, 大きく見積もられた場合, 粒子の運動性の低下が予想される。運動性低下の要因として, 水溶液の粘度が水と比較して増大している可能性が考えられた。そこで AES, APS, ABS の水溶液およびその MNP 分散液の粘度を測定したところ, いずれも水とほぼ同じ値であった。このことから, 粒子の運動性低下の要因は粘度ではないことが明らかとなり, これは AES, APS, ABS がナノ粒子表面近傍で電気二重層様の集合構造を形成することによるものと示唆された。したがって, 当初期待したようにナノ粒子は適した両性分子を用いることで低分子型の電気二重層を形成し, 安定化可能であると考えている (図 5)。今回見出した両性分子はいずれも一級アミノ基を有することから, 縮合反応には利用できないがそれ以外のジスルフィドカップリング, ジスルフィド還元, 反応後の精製, 及び保存といった多くの工程で利用可能であり, ナノキャリアをはじめとするナノ材料開発において重要な知見が得られた。

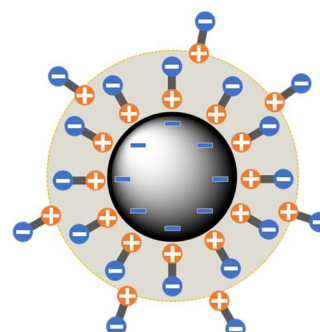


図 5 ⊕-⊖型両性分子による電気二重層様集合構造

細胞内安定性の高い一次修飾分子の探索 (細胞外実験)

細胞内安定性の高い一次修飾分子の探索のため, 無機ナノ粒子の一次修飾分子として知られる種々の化合物及びその類縁体を用いて MNP@OA への配位子交換反応を行った (図 6)。得られた種々の一次修飾 MNP 分散液を 4 で一か月保存し, 分散安定性を目視で確認したところ, カテコール配位型では DHBA, DHPAA, DHCA が, 酸性官能基配位型では PPA, GBPA が特に良好であった。これらの一次修飾 MNP について, 分子修飾を想定したアミノ基との反応性を確認したところ, MNP@DHPAA, DHCA, PPA の反応性が良好であった。これらについて, 細胞内環境と類似した 30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 37) をはじめ種々の溶液条件で配位子安定性試験を行った。試験法としては, シリカ粒子表面に修飾した末端アミノ基 PEG リンカーへ MNP@DHPAA, DHCA, PPA を固定し, 種々の溶液へ懸濁し 24 時間振とう後, 固定された MNP の残存量を測定した。その結果, これらの一次修飾 MNP はいずれの条件でも安定であることが示された。したがって, 細胞内安定性の高い一次修飾分子として DHPAA, DHCA, PPA が有望であると予想される。

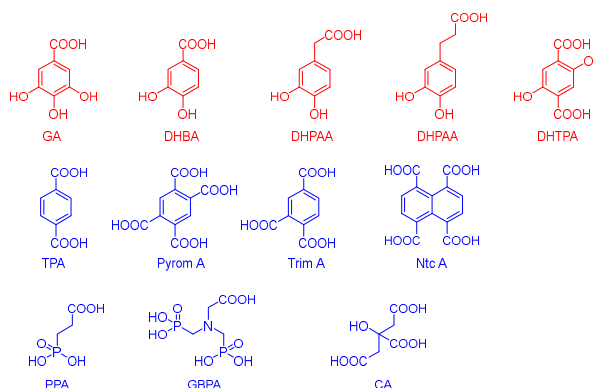


図 6 カテコール配位型 (赤) 及び酸性官能基配位型 (青) 一次修飾分子

今後は, 本研究課題で探索した分散剤を利用した分散安定化技術を活用してナノキャリア合成をすすめ, 比較可能かつ定量的なナノ材料の細胞内安定性評価法を確立し, 本研究課題で選定した有望な一次修飾 MNP の細胞内安定性を評価していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木隆浩、相原康希、後藤田芽衣、佐藤裕次郎、山城柚、橋本実歩、井上拓人、佐藤浩輔、村井毅
2. 発表標題 両性分子を分散剤に用いた酸化鉄ナノ粒子の水中分散安定性
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------