

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15316

研究課題名(和文) シグナル伝達の選択性を制御するナノ粒子複合体の光機能化

研究課題名(英文) Development of photofunctional nanoparticle-conjugates to control selectivity of signal transduction

研究代表者

山本 翔太 (YAMAMOTO, Shota)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・研究員

研究者番号：10785075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：通常、細胞増殖・分化を促進する上皮成長因子(EGF)は、金ナノ粒子に固定化されると細胞死(アポトーシス)を誘導する。そのため、このようなナノ粒子は新しい抗がん剤としての応用が期待されている。そこで本研究では、EGFナノ粒子の構造を最適化することで、がん細胞選択的に効能を示すナノ粒子複合体の開発を行なった。最適化したナノ粒子は、EGF受容体の発現量の多いがん細胞のアポトーシスを誘導し、正常細胞に対しては活性を示さなかった。さらに、ナノ粒子の詳細なアポトーシス誘導機構を調べることで、EGFナノ粒子が新たな抗がん剤として利用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮成長因子(EGF)担持ナノ粒子はがん細胞のアポトーシスを誘導するため、新たな抗がん剤となる可能性を秘めているが、その詳しいメカニズムは明らかとなっていなかった。本研究では、EGFナノ粒子が獲得するアポトーシス誘導活性の作用機構の解析を行うことで、特異な応答の鍵を握る細胞内タンパク質やシグナル伝達経路を明らかにした。これは、EGFの新たな作用機構の発見であり学術的意義がある。さらに、構造を最適化することでがん細胞選択的に作用するナノ粒子の開発にも成功しており、将来的な医療応用へ役立つ可能性もあることから社会的意義もある。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor (EGF) induces cell proliferation upon binding to EGF receptor on plasma membranes. However, EGF becomes to induce apoptosis upon conjugation to gold nanoparticle. These facts suggest the possible applications of EGF-conjugates for anti-cancer therapy. In this study, we studied the cell-type selective apoptotic responses to demonstrate the potential of the nanoparticle conjugate as a new anti-cancer drug. EGF-conjugates showed apoptotic activity against cancer cells with high EGFR expression levels, while they had no cytotoxic effect against normal cells regardless of EGFR expression levels. These facts suggest the possible applications of EGF-conjugates for therapeutic purposes.

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：ナノ粒子 上皮成長因子 アポトーシス がん細胞 メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

癌は、日本人の死因の第一位に当たり、その割合は増加傾向にある。そのため、低副作用と効率性をともに満たす抗がん剤の開発が喫緊の課題と位置付けられているが、依然として腫瘍部位への選択性の欠如や高濃度の薬剤使用による副作用のリスクなど改善すべき課題が多い。現在でも分子標的薬や、ドラッグデリバリーシステムなどの研究が盛んに行われていることから、新たな癌治療薬や方法論の開発が求められている。

主要な癌治療薬として、上皮成長因子受容体阻害薬は、細胞膜の受容体の活性を「抑制」することで効果を発揮する。これは、がん細胞に過剰発現した上皮成長因子受容体(EGFR)が制御不能な増殖を誘導していることに注目し、この活性を阻害することで浸潤や転移を抑える手法であり、非常に有用な抗がん剤である。しかしながら、当該受容体が多く発現している正常な皮膚の細胞に対する副作用や、徐々に耐性ができ治療に抵抗してしまうなどの課題点も挙げられる。それに対して近年、EGFRの活性を逆に「促進」することでがん細胞の細胞死(アポトーシス)を誘導するという新たな発想が提案された。通常、上皮成長因子(EGF)は細胞の生存を促進するが、興味深いことに、EGFをナノ粒子に固定化することで、その効果を突如“死”に切り替える。そのため、このようなEGFコンジュゲートは新たなナノ粒子抗がん剤として期待されているが、その作用機序は不明瞭であった。

2. 研究の目的

これまで申請者および所属グループは、EGFナノ粒子の奇妙なアポトーシス誘導活性に注目し、その作用機序を調べてきた。その中で、ナノ粒子がEGFRを脂質ラフトと呼ばれる細胞膜に存在するナノドメインに拘束し、部分的にEGFRの活性化を増強することでシグナル伝達の選択的活性化を制御する、いわゆる「シグナル凝縮現象」を発見した。これはナノ粒子がEGFRシグナル伝達の凝縮場として機能し、EGFの作用を成長から死へと変換するという興味深い結果であった。そこで本研究は、このシグナル凝縮現象を足がかりに、光機能化した上皮成長因子担持高分子ナノ粒子や金ナノ粒子を開発し、EGF担持ナノ粒子が獲得する特異的細胞応答の制御機構をより詳細に調べ、新たな抗がん剤としての応用の可能性を探究した。特に、EGF担持ナノ粒子によるシグナル凝縮現象は細胞膜上での反応が鍵を握るため、反応初期過程に注目して研究を実施した。

3. 研究の方法

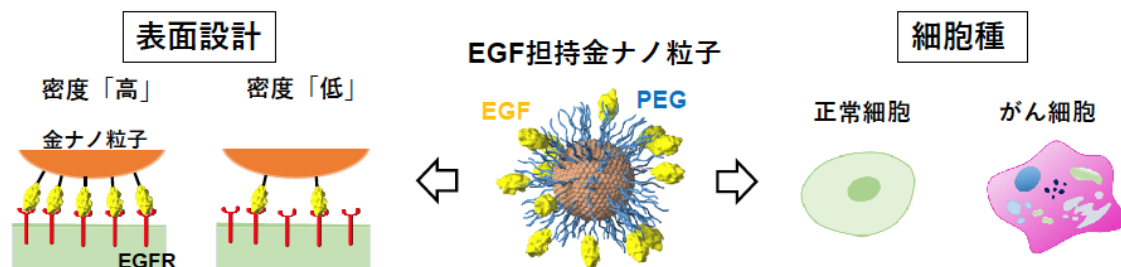


図1. 本研究の概要図

(1)アポトーシス誘導機構を調べるためのEGFナノ粒子複合体の開発

調製したEGFナノ粒子の表面EGF密度の最適化を行うため、EGF固定化量の異なる3種類のナノ粒子を調製した。20nmの金ナノ粒子にポリエチレングリコール(PEG)およびEGFを共固定することでEGF担持ナノ粒子を調製した。それぞれのEGFナノ粒子をHeLa細胞に投与し、EGFRおよびその下流のシグナル伝達経路であるAKT、ERKのリン酸化をウェスタンブロッティングにより調べた。その後、がん細胞であるHeLa細胞に粒子を投与し、72時間後のアポトーシス活性をAnnexinVによって調べた(図1)。

また、材料と細胞との界面で上皮成長因子を暴露する微小な空間を制限するため、EGF刺激の間隔を制御できるナノ粒子複合体を開発した。この材料を用いて上述した評価を行うことで、がん細胞に対する効能を調べた。

(2)細胞内動態を可視化するための光機能化したEGF担持ナノ粒子の開発

EGFナノ粒子のアポトーシス誘導機構を解明するために、内部に蛍光色素を封入した高分子ナノ粒子を用いてEGFナノ粒子を調製した。蛍光性高分子ナノ粒子の表面に、EGFおよびPEGを固定化することで光機能化EGF高分子ナノ粒子の調製を行なった。得られたナノ粒子の粒径を動的光散乱法(DLS)で、EGFの粒子固定化量をDirect ELISA法によって調査した。その後、得られたナノ粒子をがん細胞であるHeLa細胞に投与し、72時間後のアポトーシス活性を蛍光

観察により調べた。

(3)がん細胞および正常細胞に対する EGF 担持金ナノ粒子の効能評価

EGF ナノ粒子の将来的な抗がん剤への応用へ向け、がん細胞および正常細胞に対する効能を調査した(図 1)。EGF ナノ粒子を、EGFR の発現量の異なるがん細胞である A431 細胞(表皮がん)、HeLa 細胞(子宮頸がん)、および正常細胞である PHK16-10b 細胞(ケラチノサイト)、EA.hy926 細胞(内皮細胞)に投与し、同様にアポトーシスを検出することでその効能を評価した。その際、それぞれの細胞の EGFR 発現量をウエスタンブロットティングで調べ、発現量に対する EGF ナノ粒子の効果について調べた。

4. 研究成果

(1)アポトーシス誘導機構を調べるための EGF ナノ粒子複合体の開発

調製した 3 種類の EGF ナノ粒子の 1 粒子あたりの EGF 固定化密度を調べるため、反応前後の溶液に含まれる EGF 濃度を Direct ELISA によって測定した。反応後に溶液中に残存する EGF 濃度と、反応前の EGF 濃度の差分から、1 粒子あたりの固定化量を算出する方法である。計算の結果、調製した EGF ナノ粒子は、それぞれ 1 粒子あたり、13 個、51 個、70 個の EGF が固定化されていることが明らかとなり、表面密度の異なる EGF ナノ粒子の調製に成功した。続いて、この EGF ナノ粒子を HeLa 細胞に投与した後の EGFR の活性化(pY845)を調べたところ、EGF の固定化量の増加に依存して、EGFR の活性化量も高まることが分かった(図 2A)。これは、EGF 固定量の増加に伴い反応する細胞膜上の EGFR が増えたことが要因だと考えられる。次に、下流のシグナル伝達の活性化を調べるため、細胞の成長や死に関連する AKT および ERK を対象に実験を実施した。すると、AKT の活性化は EGF の固定化量の異なる粒子を投与しても有意差は認められなかった。しかしながら、同じ濃度の液性 EGF を加えた場合と比較すると、ナノ粒子が誘導する AKT の活性は半分程度に留まった(図 2B)。一方で、AKT とは異なる経路である ERK の活性化を調べると、AKT と同様に各粒子間での活性化量に違いは見られなかったが、液性 EGF と同程度のリン酸化量であることがわかった(図 2C)。これらの結果より、粒子上の EGF の定化量が増加するにつれて最上流の EGFR の活性化量は高まるが、下流のシグナル伝達パターンは変化しないことがわかった。

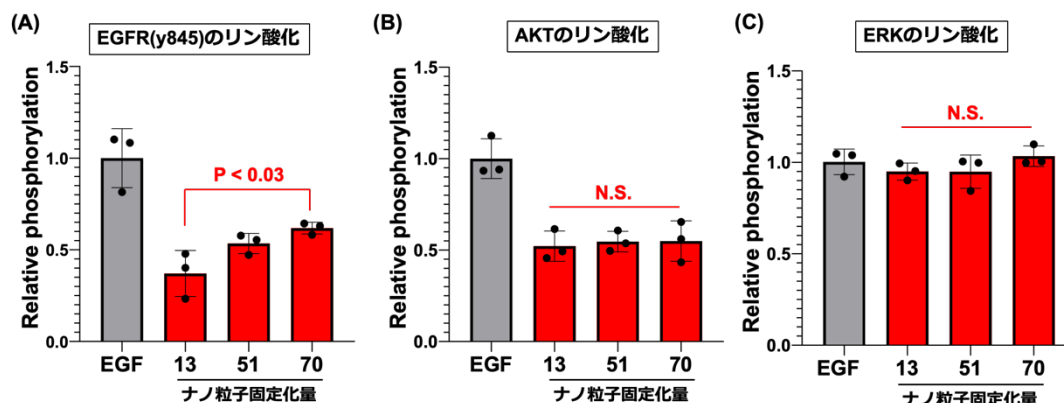


図 2. EGF ナノ粒子および液性 EGF を投与した際の、(A)EGFR(y845)のリン酸化、(B)AKT のリン酸化、(C)ERK のリン酸化

次に調製したナノ粒子を HeLa 細胞に投与し、72 時間後にアポトーシス細胞を検出した。すると、それぞれの EGF ナノ粒子は、投与後約 80% の HeLa 細胞をアポトーシスへと導き、液性 EGF の投与ではアポトーシスを誘導しなかった(図 3A)。またアポトーシス誘導活性も、リン酸化と同様に固定化量に対する変化はみられなかった。これは EGF 固定化量が少なく、かつ EGFR の活性化が低い場合でも、粒子によるシグナル凝縮が起こりさえすればアポトーシス活性が生まれることを示す結果である(図 3B)。

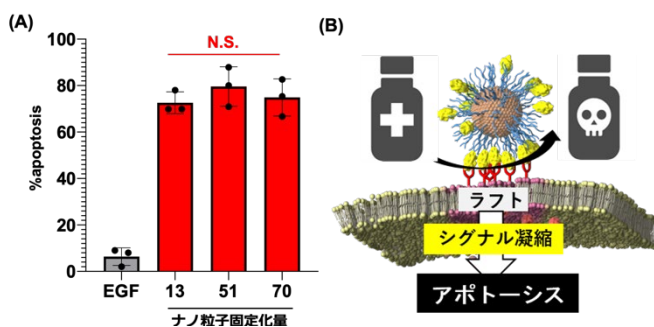


図 3 (A)アポトーシスの評価、(B)EGF ナノ粒子のアポトーシス活性獲得の予想図

また材料と細胞との界面で上皮成長因子を暴露する微小な空間を制限するため、EGF 刺激の間隔を制御できるナノ粒子複合体を開発し、その抗がん活性も調べた。すると、EGF による刺

激をナノサイズで制御するだけでがん細胞のアポトーシスを誘導することが分かり、今後、新しい切り口での EGF コンジュゲートの研究を継続していく予定である。

(2)細胞内動態を可視化するための光機能化した EGF 担持ナノ粒子の開発

これまで EGF ナノ粒子による抗がん活性に関する報告は、金ナノ粒子をコアに持つ粒子で実施されてきた。これは、金ナノ粒子の特徴である高い反応性や安定性により、調製が容易であるためと考えられる。しかしながら、EGF ナノ粒子の将来的な抗がん剤への応用や細胞内動態の可視化のためには、毒性が低く、かつ蛍光ラベル化が容易な高分子からなるナノ粒子が望ましい。そこで本研究では、蛍光色素が封入された高分子ナノ粒子を用いて EGF ナノ粒子を調製し、金ナノ粒子と同様に抗がん活性を示すのかどうかの基礎検討を行なった。調製方法としては、20 nm の高分子ナノ粒子を使用し、EGF および PEG を粒子表面に固定化させた。その後、得られたナノ粒子の粒径を DLS 測定により調べた結果、調製した EGF 高分子ナノ粒子は粒径 55 nm で、単分散であることがわかった。また Direct ELISA により 1 粒子あたりの EGF 固定化量を調べると、42 個の EGF が固定化されていた。この粒子を HeLa 細胞に投与し ERK の活性化を調べると、金ナノ粒子で調製した EGF ナノ粒子と同様に、液性 EGF と同程度の活性を示した(図 4A)。続いて抗がん活性を調べた。ここでは EGF 担持高分子ナノ粒子の他に、EGF が固定化されていない PEG ナノ粒子をコントロールとして用いた。すると、EGF ナノ粒子は HeLa 細胞のアポトーシスを誘導したのに対し、PEG ナノ粒子は刺激をしていない細胞とほぼ同程度であった(図 4B)。この結果から、金ナノ粒子だけではなく、高分子ナノ粒子でも同様のアポトーシス誘導活性を獲得することがわかり、生体適合性の高いナノ粒子を使った応用も可能であることを示した。

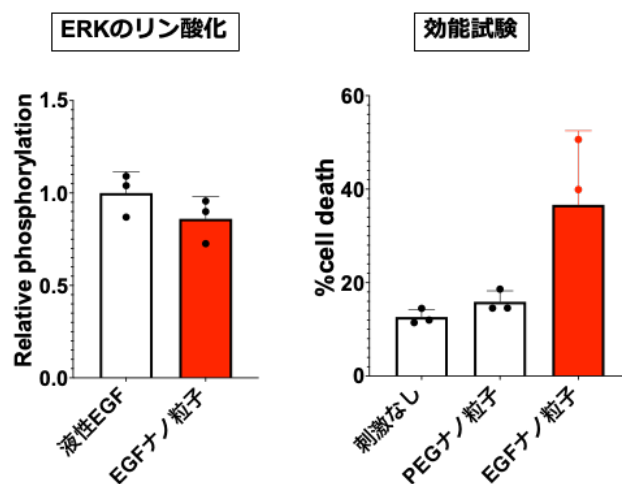


図 4. 高分子ナノ粒子を HeLa 細胞に投与した際の(A) ERK のリン酸化、(B) アポトーシス誘導活性の評価

(3)がん細胞および正常細胞に対する EGF 担持金ナノ粒子の効能評価

続いて、EGF ナノ粒子のがん細胞および正常細胞に対する効能評価を行なった。はじめに、使用するがん細胞である A431 細胞(表皮がん)、HeLa 細胞(子宮頸がん)、および正常細胞である PHK16-10b 細胞(ケラチノサイト)、EA.hy926 細胞(内皮細胞)の EGFR 発現量をウェスタンブロッティングにより調べた(図 5A)。すると、文献通り A431 細胞は EGFR が高発現しており、HeLa 細胞は中程度の発現であった。重要なこととして、ケラチノサイトである PHK16-10b 細胞は、正常細胞でありながら HeLa 細胞と同程度の発現量であった。続いて、これらの細胞に EGF ナノ粒子を投与し、アポトーシスを検出した。するとナノ粒子はがん細胞である A431 および HeLa 細胞に対してアポトーシス活性を示した。興味深いことに、EGFR の発現量が HeLa 細胞と同程度である正常細胞の PHK16-10b に対しては効能を示さなかった(図 5B)。このがん細胞選択性の詳しいメカニズムに関しては今後の課題ではあるが、この結果は、EGF ナノ粒子が新たなナノ粒子抗がん剤として利用できる可能性を示唆している。

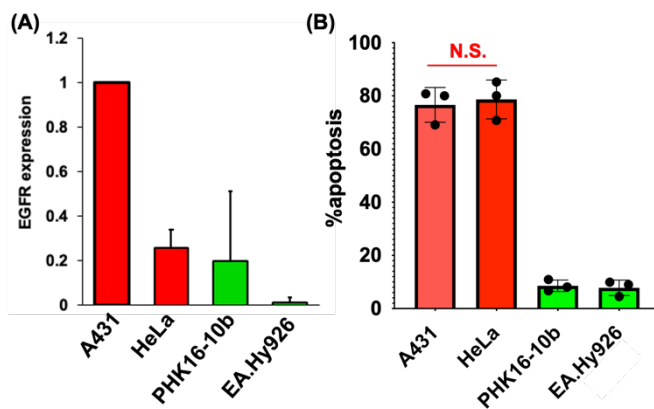


図 5 (A)各細胞における EGFR の発現量、(B)アポトーシスの評価

この結果は、EGF ナノ粒子が新たなナノ粒子抗がん剤として利用できる可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakanishi Jun, Yamamoto Shota	4. 巻 10
2. 論文標題 Static and photoresponsive dynamic materials to dissect physical regulation of cellular functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 6116 ~ 6134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2BM00789D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Shota, Nakanism Jun	4. 巻 37
2. 論文標題 Epidermal Growth Factor-gold Nanoparticle Conjugates-induced Cellular Responses: Effect of Interfacial Parameters between Cell and Nanoparticle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 741 ~ 745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20SCP16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本翔太、中西淳
2. 発表標題 貼付型抗がん剤を指向した上皮成長因子修飾ナノ構造体の開発
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本翔太、中西淳
2. 発表標題 がん細胞選択的にアポトーシス活性を示す上皮成長因子担持ナノ粒子複合体の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shota Yamamoto, Jun Nakanishi
2. 発表標題 Development of epidermal growth factor nanoconjugates as anticancer drugs
3. 学会等名 NIMS WEEK 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 複合体、局所貼付材、及び、上皮内がん治療方法	発明者 中西淳、山本翔太、 深田直樹	権利者 物質・材料研究 機構
産業財産権の種類、番号 特許、JP2022141991A	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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