

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：32692

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700483

研究課題名（和文） 生体膜融合特性をもつ蛍光金属錯体型糖鎖の創製と癌細胞ターゲティングへの展開

研究課題名（英文） Application of Fluorescent Metallo-Glycolipid for Targeting Cancer Cells

研究代表者

岡田 朋子 (OKADA TOMOKO)

東京工科大学・片柳研究所・研究員

研究者番号：60409795

研究成果の概要（和文）：

生体膜融合能を持たせた新規な金属錯体型糖脂質をデザイン・合成し、この分子を組み込んで生体膜を模倣したリポソームを作製する手法を確立した。このリポソームを用いて、膜上の糖鎖が示すレクチン認識能を、蛍光偏光法で評価する手法を確立した。また、蛍光金属錯体型糖鎖の癌細胞への取り込みを蛍光顕微鏡で明らかにし、癌細胞ターゲティングへの発展性を示した。

研究成果の概要（英文）：

A novel metallo-glycolipid was designed and synthesized for giving a fluorescent carbohydrate probe that was potentially incorporated into a biological membrane. The metallo-glycolipid was succeeded in giving a fluorescent liposome with carbohydrates placed on a biomimetic liposomal membrane. The liposome was used for evaluating recognition ability of carbohydrate to lectin. Specific binding events between lectin and carbohydrates on the liposomal surface was proved by the affinity evaluation with a fluorescent polarization analysis. Moreover, uptake of the metallo-glycocluster by HeLa cell was observed by fluorescent microscopy. These results suggest application of the metallo-glycolipid to a targeting agent for a cancer cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学、生体材料学

キーワード：糖脂質、蛍光金属錯体、膜融合、癌細胞

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖の生体分子に対する認識能を評価するためのプローブ分子として、蛍光金属錯体

型糖鎖は有用である。しかし、蛍光錯体に修飾した糖鎖分子の環境は、生体内におけるそれとは大きく異なる。糖鎖は、生体内におい

て糖脂質や糖タンパク質として細胞膜表面に存在している。そのため、その膜上糖鎖に類似の環境下において、分子認識能評価を可能にする手法の開発が求められている。また、糖鎖の分子認識能を利用した癌の診断法や治療法も、人類の癌対策のために求められている技術である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、既存の蛍光金属錯体型糖鎖に、新たに生体膜融合特性を付与した分子を創製し、この分子を用いて、従来よりも生体内に近い環境下で、糖鎖が示す分子認識能評価を可能にすることである。また、癌細胞に対するターゲティングを可能にする新たな手法の開発を目指し、癌細胞膜に選択的に融合する、新規な蛍光金属錯体型糖脂質を創製することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 生体膜融合特性を有する金属錯体型糖脂質のデザインと合成

基本骨格として、三つの構成パーツを組み込んだ分子をデザインした(図 3-1)。構成パーツは、分子認識能を付与するための糖鎖部分、蛍光特性を付与するための金属錯体中心部分、生体膜融合能を付与するための脂質部分、とした。得られた錯体は、核磁気共鳴法(NMR)および質量分析法(MALDI-TOF-MS)で同定した。

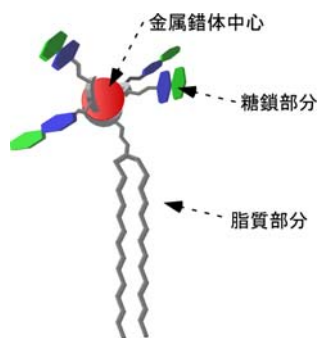


図 3-1 基本構造

### (2) 脂質を導入した金属錯体型糖鎖を含むリポソームの作製および蛍光特性評価

糖脂質である金属錯体型糖脂質とリン脂質(DPPC: dipalmitoyl-phosphatidylcholine, DOPC: dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-choline)を混合し、凍結乾燥法とエクストルージョン法を用いてリポソームの形成条件を検討した。作製したリポソームの粒径分布は、電気抵抗ナノパルス法で分析した。また、蛍光特性を蛍光分光計で分析した。

### (3) 糖鎖の分子認識能評価

金属錯体型糖脂質を含むリポソームとレクチン(RCA: *ricinus communis agglutinin*, PNA: *peanut agglutinin*, WGA: *wheat germ agglutinin*)を混合し、蛍光偏光度の値から、膜上糖鎖の分子認識能を評価した。リファレンスには、金属錯体型糖鎖を加えずに作製したリポソームを使用した。励起波長は 465 nm とした。

### (4) 癌細胞への取り込み評価

HeLa 細胞を金属錯体型糖鎖とともに 37°C CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。一定時間培養した後、上澄みを除去して洗浄し、共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡で細胞の画像を記録した。励起波長は 488 nm とし、蛍光フィルターは LP505 nm を用いた。得られた画像の輝度解析から、金属錯体型糖鎖に対する HeLa 細胞の取り込み特性を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 糖鎖を導入した配位子(bpy-2Lac)と、脂質を導入した配位子(bpy-DPPE)を合成した。得られた配位子は、核磁気共鳴法と質量分析法で同定できた。続いて、得られた bpy-2Lac を [Ru(DMSO)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] に対して 2 equiv. 加えて錯形成し、続いて 1 equiv. の bpy-DPPE を加えて還流し、錯形成させた。RuCl<sub>3</sub> を用いても錯形成は起こらず、ジメチルスルホキシド(DMSO)で活性化させた [Ru(DMSO)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] を使用し、配位子を逐次に錯形成させることで、目的の非対称な金属錯体型糖脂質を得ることができた。逐次錯形成は、重水中において核磁気共鳴法で確認できた。また、得られた錯体の質量スペクトル(ピーク値:  $m/z = 3415.6$ )は、理論値( $M = C_{149}H_{220}N_{19}O_{63}PRu$ ,  $[M-H]^+$  3415.6)および同位体パターンともよく一致した(図 4-1)。

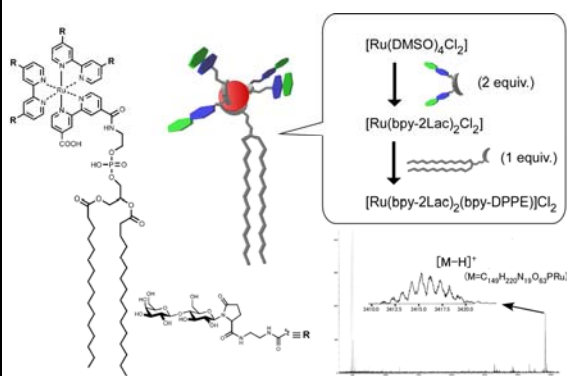


図 4-1 合成スキームおよび質量分析結果

(2) 異種の脂質 (DPPC, DOPC, cholesterol) を混合し、エクストルージョン法を用いて、安定なリポソームを形成する条件を確立した (図 4-2)。膜の構成成分に、リン脂質だけでなくコレステロールも混合し、脂質の混合比率を 6:3:4 とすることで、安定なリポソームを得ることができた。ポアサイズが  $\phi$  200 nm のメンブレンフィルターを用いて作製したリポソームの平均粒径は、175 nm であった。また、金属錯体型糖脂質の含有率を脂質膜に対して 10 mol% として作製したリポソームが、親和性評価に適していると判断できた。

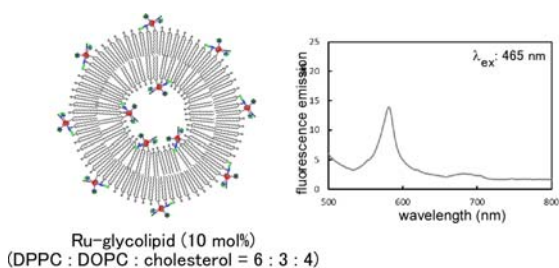


図 4-2 リポソームの概略図および蛍光スペクトル

得られたリポソームを、アルカンチオールで修飾した金基板表面に反応させて膜融合させた。その基板表面を光電子分光法 (XPS) で観察したところ、脂質由来元素のリン (P) は検出できたが、金属錯体型糖脂質由来であるルテニウム (Ru) のシグナルは現れなかった。基板上で単分子膜となっており、含有率も低いために、Ru は検出できなかつたと推察した。

(3) レクチン (RCA, PNA, WGA) を、蛍光金属錯体型糖脂質を含むリポソームの溶液に加えると、蛍光偏光度はそれぞれ増加した (図 4-3)。それら偏光度の増加率は、RCA を混合した場合に最も大きかった。糖鎖を含まないリポソームをリファレンスとして用いているため、この増加率は、糖鎖 (Lac) が RCA に対して高い親和性を示したことに起因することが示された。Lac が RCA に対して高い親和性を示すことは、表面プラズモン共鳴法 (SPR) や等温滴定熱測定法 (ITC) でこれまでも確認されており、これらの報告例とも一致した。類似の金属錯体型糖鎖で、脂質を含まないものを用いた場合は、RCA よりも PNA に対して高い親和性を示した。Lac は、溶液中では PNA に対して親和性を示すことが報告されているが、膜上では親和性が低下することが、同じく SPR や ITC などでも報告されている。これらのことから、リポソームに組み込んだ金属錯体型糖脂質を利用することで、より生体内に近い環境で糖鎖の分子認識能を評価できることを確認できた。

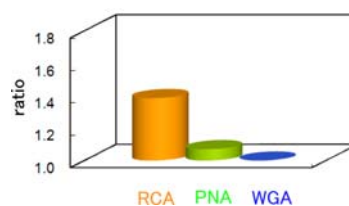


図 4-3 レクチン混合による蛍光偏光度の増加率

(4) 脂質を導入していない蛍光金属錯体型糖鎖 (5  $\mu$ mol/L) を、HeLa 細胞とともに培養した。蛍光顕微鏡観察で得られた画像を図 4-4 に示す。Ru 錯体由来の蛍光を観察できたことから、金属錯体型糖鎖が細胞内に取り込まれたことを確認できた。また、共焦点顕微鏡による z 軸方向の分析から、細胞内部への取り込みを確認できた。蛍光金属錯体型糖鎖の濃度を 100  $\mu$ mol/L にして同様の実験を行ったところ、細胞へのダメージが観られた。従って、5  $\mu$ mol/L 程度の金属錯体型糖鎖では細胞毒性は観察されないが、高濃度では細胞への毒性を示すことが示された。



図 4-4 金属錯体型糖鎖を取り込んだ HeLa 細胞の蛍光顕微鏡画像

## 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 4 件)

- ① T. Okada, A. Kimura, H. Miura, T. Nishiyama, M. Mori, J. Suzuki, M. Ogiso, K. Matsuoka, T. Sato, K. Hatanaka, N. Minoura. "Intricate Recognition of Glycolipid-like Compounds by HIV-1 Envelope Proteins Evaluated with Surface Plasmon Resonance Imaging" *J. Carbohydr. Chem.*, 査読有, 2012, 31(7), 584 - 597.  
DOI: 10.1080/07328303.2012.682190

- ② T. Okada. “Application of Functionalized Metallo-glycoclusters” *Trends in Glycosci. and Glycotechnol.*, 査読有, 2011, 23 (134), 284 - 291.  
DOI: 10.4052/tigg.23.284
- ③ T. Okada, N. Minoura. “Fluorescence Emission and Polarization Analyses for Evaluating Binding of Ruthenium Metalloglycoclusters to Lectins and Tetanus Toxin C-Fragment” *J. Biomed. Opt.*, 査読有, 2011, 16 (3), 037001.  
DOI: 10.1117/1.3558727

[学会発表] (計 8 件)

- ① 田野倉大智、今泉竜一、岡田朋子、箕浦憲彦, “脂質を持つ新規なルテニウム錯体型糖鎖プローブ分子を利用した分子認識能評価” 日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25 日、慶応大学 (神奈川県)
- ② 田野倉大智、今泉竜一、岡田朋子、箕浦憲彦, “糖鎖とレクチン間の相互作用を評価するためのルテニウム錯体型糖脂質の創製” 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 12 日、つくば国際会議場 (茨城県)
- ③ T. Okada, T. Makino, N. Minoura, “Application of ruthenium metalloglycocluster for affinity evaluation between carbohydrates and lectins by fluorescence emission and polarization”, Pacificchem 2010, Dec. 19. 2010, Kamehameha Halls (Honolulu, USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 朋子 (OKADA TOMOKO)  
東京工科大学・片柳研究所・研究員  
研究者番号: 60409795