

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23685037

研究課題名(和文) 高分子ベシクルを用いた人工オルガネラの創製と細胞内配置技術の開発

研究課題名(英文) Development of artificial organelle through the controlled cellular uptake of polyion complex vesicles

研究代表者

岸村 顕広 (Kishimura, Akihiro)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70422326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円、(間接経費) 6,420,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Nano-PICsome(直径100-400 nmのポリイオンコンプレックス型高分子ベシクル)の技術を洗練させ、細胞内で作動するナノリアクター、即ち、人工オルガネラの創出を目指した。特に(1)酵素などの封入・精製法の確立と種々のナノリアクター作製及び機能確認、(2)ベシクル膜の物質透過性制御手法の確立と、支配因子の明確化、(3)ベシクル膜の性質などの諸物性を制御することによる細胞取り込み挙動の制御法確立、(4) Nano-PICsome表面へ細胞表面の受容体が認識するリガンドを導入する手法を確立し、細胞取り込みや小動物体内での動作確認などの成果を挙げた。

研究成果の概要(英文)：We have so far developed polyion complex vesicles (PICsomes) with well-controlled size in the size ranging from 100 to 400 nm. PICsomes are characterized by their biocompatibility and semi permeable vesicle membrane. Therefore, enzyme-loaded PICsomes are promising for enzyme-based nanoreactors, which can work inside of cells as an artificial organelle. In this research project, we tried to develop "artificial organelle" utilizing PICsomes. The preparation method of nano-reactors was successfully established through encapsulation of enzymes in PICsomes without deactivation. Also, we investigated the interaction between chemically-modified PICsomes and cells, and evaluated and found major factors for further cellular uptake. Results indicated that degree of cross-linking of PIC membrane and deformability of PICsomes contribute cellular uptake to some extent.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ポリイオンコンプレックス ベシクル ブロック共重合体 人工オルガネラ ドラッグデリバリーシステム 酵素 ナノリアクター

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーと医学・薬学・生物学の融合が進み、ナノデバイスを用いた治療法の開発が進んでいるが、特に、ナノ粒子のサイズ、形状、堅さや表面構造などの諸物性を変えることで、生命現象への寄与がそれぞれ異なることが徐々に明らかにされてきている。細胞内導入についても、これらのパラメタの制御により、その取り込みとその経路の制御を行っていくことができる。一方、タンパク質や核酸などの生体高分子、あるいはナノ材料を細胞内に持ち込み、疾患の治療や細胞の工学的な応用を見据えて細胞内機能の制御や改変を行う試みがなされている。その一つのアプローチが人工オルガネラであり、細胞内である一定期間動作するナノリアクターと定義できる。申請者は、先行研究(平成21・22年度若手研究(B))において、Nano-PICsome (粒径可変で生体適合性に優れたポリイオンコンプレックス型の高分子ベシクル)の技術を開発しており、これは、水溶液を単純混合するだけでタンパク質などをその機能を損なわず溶液時と近い状態で封入することができる。また、単分散かつ100-400 nmで粒径制御でき、一枚膜構造を有する(図1)。このPICsomeを構成するベシクル膜は、物質透過性を示すことが特徴であり、特に酵素などを内部に封入することで、外部から浸透してきた基質をベシクル内で生成物へと変換するナノリアクターとしての応用が期待できる。しかし、研究開始時点でそのような例は研究代表者のグループに限らず実現できていなかった。

2. 研究の目的

1. をふまえ、本研究では、先行研究(平成21・22年度若手研究(B))において確立された Nano-PICsome (図1)の技術をさらに洗練させ、内部に酵素などを内包し、細胞内で作動するナノリアクター、即ち、人工オルガネラの創出を目指した。特に、Nano-PICsome と細胞の相互作用の解析を中心的に分析し、これらナノリアクターを細胞内へ適切に配置する技術の開発を目指した。この時、これまで見出してきた

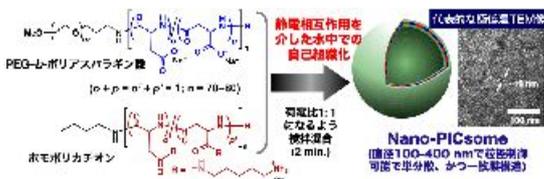


図1. Nano-PICsome の調製スキームと電顕(TEM)像。

Nano-PICsome のサイズ可変性に加え、中空粒子の堅さや表面構造、リガンドの配置などのパラメタを種々検討し、汎用性の高い手法の創出を狙った。より具体的には、下記の4つの研究項目を設定し、目的達成を目指した。(1)酵素などの封入・精製法を確立し、種々のナノリアクターを作製する。(2)ナノリアクターとしての物性のチューニングとして、膜の物質透過性に注目し、架橋率による透過性制御に加え、膜の化学的性質に応じた透過性制御を行う。(3)サイズ、表面の性質、ベシクル膜の性質などのベシクル諸物性を制御し、特に架橋率を変化させつつそれらの細胞との相互作用を明らかにする。(4) Nano-PICsome 表面へ細胞表面にある受容体が認識するリガンドや、エンドソーム(細胞内消化器官)からの脱出素子を導入する手法を確立し、細胞内動態のさらなる制御を試みる。また、リガンド導入は体内動態改善にもつながることから、小動物モデル(マウス)を用いた人工オルガネラの機能評価を検討する。

3. 研究の方法

前節、2. で挙げた4つの研究項目について、下記のように研究を実施した。

(1) Nano-PICsome 型ナノリアクターの作製と活性の確認: ポリエチレングリコールとポリアスパラギン酸からなるブロック共重合体型のポリアニオンと、ポリアスパラギン酸誘導体のホモポリカチオンを合成し、それぞれの荷電ポリマー上にある荷電性官能基(カルボン酸と一級アミン)の静電相互作用に基づくポリイオンコンプレックス形成を利用して PICsome の作製を行った。この時、タンパク質や酵素を封入し、種々の酵素封入型ナノリアクターを作製した。-COOH と -NH₂の縮合剤である EDC を用いて PIC 膜の架橋安定化を行い、適切な精製を行った後に活性測定を実施した。精製には、限外ろ過、ゲルろ過クロマトグラフィー(GFC)などを用いた。封入の確認として、蛍光相関分光(FCS)、クロマトグラフィーなどを組み合わせて行った。粒子形成の確認には、動的光散乱(DLS)と透過型電子顕微鏡観察(TEM)を併用した。活性測定には、酵素反応後に発色/蛍光/発光をプローブとして使用できる系を選択し、必要に応じて生成物の同定に質量分析や各種クロマトグラフィーを活用した。

(2) ナノリアクターに向けた PICsome の物質透過性制御: 物質透過性の詳細な制御法確立に向け、架橋率の制御、及び、ポリカチオン連鎖の側鎖構造のチューニングを行った。物質

透過性評価には、蛍光デキストランや PEG などをモデル化合物として選択し、これを封入した PICsome を作製してサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて徐放挙動の追跡を行った。

(3) 諸物性を制御した Nano-PICsome に対する細胞の応答評価、細胞内動態の検証：PICsome 膜内の架橋率に応じて、膜内に未架橋官能基(カルボン酸と一級アミン)があることが予想されるため、この影響の評価を中心に行った。また、これらの残存荷電性基に化学修飾を施し膜内荷電に偏りのある PICsome を作製した。培養細胞を用いた細胞取り込み実験を行い、取り込み量の比較をイメージングサイトメトリー(ICM)や共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いて定量評価した。

(4) Nano-PICsome 表面へのペプチドリガンド導入法の確立と機能評価：一部のがん細胞や新生血管の細胞表面に高発現している^{v 5}インテグリンなどのレセプターに結合するリガンドとしてよく知られる環状 RGD ペプチドを PICsome 表層に導入する手法の確立を目指した。具体的には、PICsome 表層に位置する PEG の末端にアセタール基を導入したポリアニオンを合成し、PICsome 形成後に環状 RGD ペプチド導入を行った。培養細胞として HUVEC、及び、U87MG を用いた評価を進めた。

4. 研究成果

(1) Nano-PICsome 型ナノリアクターの作製と活性の確認：穏和な条件で汎用性の高いタンパク質や酵素の封入手法を開発し、
-ガラクトシダーゼをはじめとする種々の酵素を封入した。荷電性基である-COOHと-NH₂の縮合剤・EDCを用いてPIC膜の架橋安定化し、限外ろ過などにより精製を行った後に、反応後に発光を示す基質を作用させたところ、酵素活性の維持が確認できた。これらナノリアクターは、生理条件でも失活しなかった。PICsome 型ナノリアクターの挙動を追う上で意義深い発光イメージングが利用可能な酵素としてルシフェラーゼに注目し、ルシフェラーゼ封入PICsome を作製して基質を作用させたところ、適切に化学発光が生じることを見出した。さらに、シトシンデアミナーゼを封入したPICsome が、基質である5-フルオロシトシンを、活性体である5-フルオロウラシルに変換する能力を有し、培養細胞に対して殺細胞効果を示すことを明らかにした。また、腫瘍モデルマウスを用い、皮下移植がんの成長抑制が可能

であることを実証した。このように、酵素封入型ナノリアクター作製について、適用範囲拡大可能な手法を確立することができた。

(2) ナノリアクターに向けた PICsome の物質透過性制御：物質透過性の詳細な制御法確立に向け、主に IR を用いて架橋率の算出し、EDC 添加量と架橋率が一対一対応することが明らかとなった。これを基に、物質透過性評価を行ったところ、架橋度や溶液の温度に応じて透過性が変わりうることを見出した。一方、PIC を形成するカチオン側鎖のアルキルスペーサーの長さを変えることで、物質透過性の制御が可能であることを見出した(図2)。特に、スペーサー炭素数が 4,5 の場合は透過性が高く、架橋度の変化により放出速度が制御可能であった。また、温度を高めることで、放出速度が高まることも見出した。

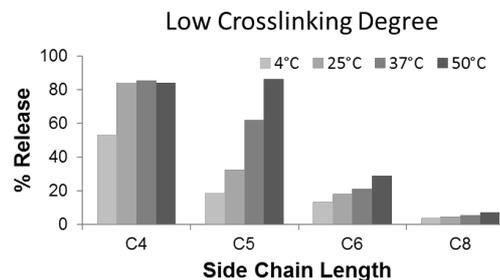


図2. 低架橋 PICsome における側鎖のスペーサー長と放出量の関係。温度依存性も表示。モデルゲストは PEG (分子量 12,000)。

(3) 諸物性を制御した Nano-PICsome に対する細胞の応答評価、細胞内動態の検証：人工オルガネラとしての評価の前に、Nano-PICsome 自身に対して細胞が示す応答の評価を行った。直径 100, 200 nm で架橋率を変えた Nano-PICsome について、蛍光標識を施し、共焦点レーザー顕微鏡による細胞内動態観察と、フローサイトメトリー、あるいはインセルアナライザーを用いた定量を行ったところ、架橋率が低い PICsome が有意に細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。この原因を探るべく、架橋後の PIC 膜内に残った未反応アミノ基を TNBS 法により定量し、残存アミノ基を定量した。続いて、この残存アミノ基に化学修飾を施す手法などを開発し、特にアミノ基、カルボキシル基を PIC 膜内に選択的に残す手法を確立した。これにより膜物性の異なる PICsome の構築が可能となった。その結果、PIC 膜内にアミノ基が残っている

場合のみ、細胞内への取り込みが著しく向上することが明らかとなった(図3)。この結果は、架橋率が低いPIC someが有意に細胞内に取り込まれている結果と対比して非常に興味深い。さらに、細胞内の環境変化として、pHに应答する修飾試薬の設計も行った。

一方、AFM 観察から、架橋度が低い場合には球状微粒子としての自律性が低く、基板に吸着しやすいことがわかった。これらの結果から、細胞に吸着しやすく、PIC 膜内にアミノ基が残っている場合に細胞取り込みが促進され、そうでない場合に抑制されることが明らかとなった。また、酸性環境にて開裂するような保護基を PIC 中のアミノ基に結合したところ、酸性環境に应答して取り込みが促進されることがわかった。

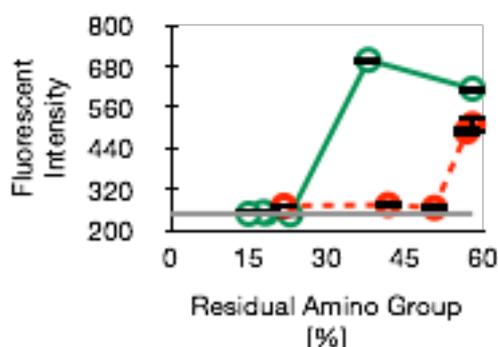


図3. PIC膜内のアミノ基残存量と細胞取り込みの関係。

(4) Nano-PICsome表面へのペプチドリガンド導入法の確立と機能評価: PICsome表層(PEG末端)への定量的cRGD導入法を確立した。HUVECやU87MGなどの培養細胞を用いて細胞取り込みの評価を行ったところ、取り込み時間の短縮効果があることが分かった。さらに、PICsome表面に導入した環状RGDペプチドが、培養細胞に対してのみならず、マウス体内の腫瘍組織に対しても機能しうることを確認した。

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10件)

Sayan Chuanoi, Wen-Fei Dong, *Akihiro Kishimura, Yasutaka Anraku, and *Kazunori Kataoka, Structural factors directing to nanosized polyion complex vesicles (Nano-PICsomes) from a pair of

block anioner/homo cationer: studies on anioner segment length and cationer side chain structure. *Polymer Journal*, **2014**, 46, 130-135. 査読有 (DOI: 10.1038/pj.2013.82)

Daisuke Kokuryo, Yasutaka Anraku, *Akihiro Kishimura, Sayaka Tanaka, Mitsunobu R Kano, Jeff Kershaw, Nobuhiro Nishiyama, Tsuneo Saga, *Ichio Aoki, and *Kazunori Kataoka, SPIO-PICsome: Development of a highly sensitive and stealth-capable MRI nano-agent for tumor detection using SPIO-loaded unilamellar polyion complex vesicles (PICsomes). *J. Control. Release*, **2013**, 169 (3), 220-227. 査読有 (DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.03.016)

Akihiro Kishimura, Development of Polyion Complex Vesicles (PICsomes) from Block Copolymers for Biomedical Applications, *Polymer. J.*, **2013**, 45 (9), 892-897. 査読有 (DOI: 10.1038/pj.2013.33)

Yasutaka Anraku, *Akihiro Kishimura, Atsushi Kobayashi, Makoto Oba, and *Kazunori Kataoka, Size-controlled long-circulating PICsome as ruler to measure critical cut-off disposition size into normal and tumor tissues. *Chem. Commun.*, **2011**, 47 (21), 6054-6056. 査読有 (DOI: 10.1039/C1CC11465D)

〔学会発表〕(計94件)

岸村 顕広、ブロック共重合体を用いたポリオンコンプレックス形成に基づくナノ構造制御とその応用、日本接着学会東北支部講演会 2013、2014年3月14日、東北大学片平キャンパス多元物質科学研究所、仙台。招待講演

岸村 顕広、ポリオンコンプレックス形成を利用した簡便なナノ構造形成とその応用、第14回リング・チューブ超分子研究会、2014年3月20日、九州大学伊都キャンパス WPI-I²CNER ホール、福岡。招待講演

岸村 顕広、ポリオンコンプレックス型ベシクル PICsome を用いた新規薬物送達システム開発、バイオマテリアル学会九州講演会 2013、2013年9月20日、熊本大学黒髪キャンパス、熊本。招待講演

岸村 顕広、ポリオンコンプレックス

型ベシクル PICsome の開発と薬物送達への応用、第 23 回日本 MRS 年次大会セッション N、2013 年 12 月 10 日、横浜市開港記念会館、横浜。招待講演

Akihiro Kishimura, Development of polymeric hollow nano-capsules “PICsomes” towards biomedical applications. Softinterface International Minisymposium on Biomaterials Science (SIMS2012), March 18th, 2012, University of Tsukuba, Tsukuba. 招待講演

岸村 顕広、水中での高分子の自己組織化を活かした中空ナノキャリア開発、第 51 回日本生体医工学会大会・オーガナイズドセッション「ナノキャリアーと物理エネルギーを融合したハイブリット標的化診断・治療」、2012 年 5 月 10 日、福岡国際会議場、福岡。招待講演

Akihiro Kishimura, Yasutaka Anraku, Arie Wibowo, Sayan Chuanoi, and Kazunori Kataoka, Control of nano-architectures based on polyion complexes using block copolymers of PEG-b-poly(amino acids). 2012 Collaborative Conference on Materials Research (CCMR), Seoul, Korea, June 26th, 2012. 招待講演

Akihiro Kishimura, DEVELOPMENT OF POLYION COMPLEX NANO-ARCHITECTURE TOWARD BIOMEDICAL APPLICATIONS. 9th International Symposium on Polyelectrolytes (ISP2012), Lausanne, Switzerland, July 11th, 2012. 招待講演 (Plenary Lecture)

Akihiro Kishimura, Development of Polyion Complex Vesicles, “PICsomes” as a Versatile Platform for Protein and Nano-material Delivery. 2012 Taiwan-Japan Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and Environmental Sciences (PT-BMES 2012), National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan, September 5th, 2012. 招待講演

岸村 顕広、水中で簡便に作製可能な高分子ナノ構造材、第 2 回 CSJ 化学フェスタ「化学で創る未来材料 - 若さで挑戦 -」、2012 年 10 月 15 日、東京工業大学大岡山キャンパス、東京。招待講演

Akihiro Kishimura, Development of Polymeric Hollow Nano-capsules “PICsomes” as a Functional Drug Carrier.

14th, Asian Chemical Congress 2011, S21. Medical Applications of Biopolymers, Bangkok, Thailand, September 8th, 2011. 招待講演

Akihiro Kishimura, Control of Polymeric Nano-architectures in Aqueous Media Based on Polyion Complex Formation toward Biomedical Applications. The 6th International Workshop on ADVANCED MATERIALS SCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, Ha Long City, Vietnam, November 1st, 2012. 招待講演 (Keynote Lecture)

〔図書〕(計 3 件)

松浦和則, 角五 彰, 岸村顕広, 佐伯昭紀, 竹岡敬和, 内藤昌信, 中西尚志, 舟橋正浩, 矢貝史樹, *有機機能材料 基礎から応用まで*, 講談社。(2014年3月) (分担執筆; 第10章、第12章担当)
ISBN978-4-06-156802-0

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 物質内包ベシクル及びその製造方法
発明者: 片岡 一則, 岸村 顕広, 安楽 泰孝, 後藤 晃範
権利者: 科学技術振興機構
種類: 特許
番号: 特願 2013-041186
出願年月日: 2013 年 3 月 1 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
九州大学大学院工学研究院応用化学部門片山研
URL: <http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~katayama/>
九州大学分子システム科学センター
Center for Molecular Systems (CMS)
<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~cms/english/>
バイオクリエーション研究会
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/CNBI/BC/index.html>
エキゾチック自己組織化材料 (ExOM)
<http://exotic.chemistry.or.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸村 顕広 (Kishimura Akihiro)

研究者番号：70422326

(2)研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

該当なし ()

研究者番号：