

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650261

研究課題名(和文)細胞内における生体直交性化学反応を基盤とする金属ナノ粒子の動態制御

研究課題名(英文)Regulating Intracellular Dynamics of Metal Nanoparticles by Bioorthogonal Chemical Reactions

研究代表者

伊藤 健雄 (ITO, Takeo)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80378801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ粒子を薬剤輸送材料として用いる試みは多いが、粒子が最終的に細胞内に蓄積、あるいは細胞外に排出される過程を定量的に調べた研究は少ない。加えて、ナノ粒子表面の化学構造がそれらの過程にどのような影響を及ぼすのかについては未解決の課題である。本研究では、生体直交性反応を基盤とする表面化学構造変換を細胞内で試み、その後のナノ粒子の細胞内挙動を経時的・定量的に調べた。その結果、細胞内で粒子表面に特定器官指向性分子を結合することにより、その局在を制御できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Artificially synthesized nanoparticles have been attracted much attention as novel material for drug delivery. However, little is known about the mechanisms of their accumulation in living cells and of excretion from cells. Especially, the effects of surface chemical properties of nanoparticles on the mechanisms are not clear. In this research, we have synthesized nanoparticles with cyclooctyne structure on the surface, and examined chemical conversion of the surface structures in living cells and direct observation of the reactions. We have successfully demonstrated the first example of controlling intracellular dynamics of the synthesized nanoparticles by modifying their surfaces with organ-homing molecules inside the cells.

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：ナノ粒子 ナノメディスン 生体直交性反応 細胞内動態 トランスロケーション

1. 研究開始当初の背景

ナノサイズの粒子はその大きさ、形状などに依存して、従来の材料とは異なる化学・物理的性質を示すために、バイオテクノロジー分野においても応用が期待されるが、ナノ粒子の生体内動態、細胞内挙動、および毒性に関する情報は未だ十分蓄積されておらず、とりわけナノ粒子の表面構造・物性と細胞内器官との親和性との相関については未解明である。

過去の報告では、表面修飾構造が表面電位を変化し、エンドサイトーシスなどの細胞内取り込み過程に影響を及ぼすことが示唆されている。例えば、表面が正に帯電したナノ粒子は、負に帯電した細胞膜と相互作用しやすいために、容易に細胞内に取り込まれると考えられている。他方、表面修飾構造がナノ粒子の細胞内動態および細胞外排出に及ぼす影響についてはわかっていない。細胞内タンパクなどの生体分子と親和性が高いナノ粒子は、細胞内で表面にコロナを生じるために、ナノ粒子の表面構造と細胞内挙動の相関を調べることは容易ではない。金属ナノ粒子の多くは細胞内蓄積が懸念されており、長期に亘って体内で酸化ストレスを生じる可能性があることから、取込過程のみでなく、細胞外排出までの動態を明らかにすることが重要である。

2. 研究の目的

金属ナノ粒子が細胞とどのように相互作用し、細胞内蓄積あるいは細胞外へ排出されるのかを明らかにすることを最終目標として、本課題では、ナノ粒子の表面修飾構造が、それぞれの過程へ及ぼす影響を、化学的手法を用いて定量的に調べることを目標とした。具体的には、

どのような表面修飾を施せばナノ粒子の細胞内動態が変化するのか、あるいは細胞外排出を制御できるのかについて初めての分子設計指針を得るために、粒子表面構造を細胞内で意図的に変化する技術の確立を目指した。ナノ粒子表面構造の種類によっては、細胞内への取り込みが起り難くなることから、細胞内での構造変換を実現することが重要となる。その後の、ナノ粒子の細胞内移動や、細胞外排出にどのような影響を及ぼすのかを蛍光顕微鏡などを用いて定量的に考察した。

上記の知見に基づき、表面構造および細胞内移動を外部刺激により制御できるナノ粒子を設計し、新たな細胞工学ツールとして応用することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、蛍光顕微鏡などを用いてナノ粒

子の細胞内局在の変化を定量的に観察するために、蛍光性ナノ粒子である量子ドット (QD) および蛍光色素を含むシリカナノ粒子を用いた (SNP)。表面修飾構造の変換のために、表面にジベンゾシクロオクテン構造 (DBCO) を導入したナノ粒子を合成し、種々のアジド化合物間の歪み解消環化付加反応を利用して、細胞内でナノ粒子表面化学構造の変換を試みた。これらの化合物は、生体分子と反応することなく (生体直交性反応) かつ迅速に付加環化することが報告されている。アジド化合物による粒子の表面構造変換に伴い、粒子の局在が変化する様子を、共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメーターなどを用いて観察した。

4. 研究成果

まず、希薄アンモニア水溶液中でテトラエトキシオルソシリケートおよびアミノプロピルトリエトキシシランを、フルオレセイン (FITC) 存在下で縮合し、粒径 70 ± 7 nm の蛍光性シリカナノ粒子 (SNP-NH₂) を作製した。分散性向上のために、ナノ粒子表面をアミノ末端含有ポリエチレングリコール (PEG-NH₂) で修飾した (SNP-PEG-NH₂)。Fmoc 定量法により 1 粒子あたりの表面アミノ基数を測定したところ、 6.8×10^4 個であった。アミド結合を介して DBCO を導入し、蛍光性シリカナノ粒子 (SNP-PEG-DBCO) を得た (Figure 1)。同様に、PEG-NH₂ で表面修飾された市販の QD を用いて、DBCO 被覆 QD (QD-PEG-DBCO) を作製した。

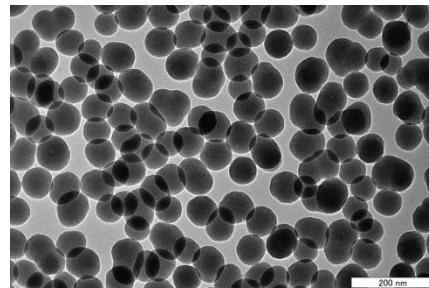


Figure 1. TEM image of SNP-PEG-DBCO.

SNP-PEG-DBCO または QD-PEG-DBCO の水溶液に蛍光性アジド化合物 (Cy3-N₃) を加えると、蛍光発光波長が粒子由来の緑色から Cy3 由来の赤色に変化したことから、ナノ粒子上の DBCO とアジド化合物の間で効率良く結合することがわかった。さらに SNP-PEG-DBCO 存在下で培養した A549 ヒト肺癌細胞に Cy3-N₃ を添加すると、蛍光共鳴エネルギー移動が観察されたことから、細胞内でもナノ粒子表面修飾反応が進行することが示唆された (Figure 2)。

次に、細胞内に取り込ませた SNP-PEG-DBCO の細胞膜への移動・集積を目的として、粒子表面を細胞内で脂質成分によ

り修飾することを試みた。SNP-PEG-DBCO と培養した A549 細胞に、アジド修飾したリン脂質であるホスファチジルアジドエタノール (PAE) を添加し、粒子の細胞内分布変化を蛍光顕微鏡観察したところ、ナノ粒子が時間とともに細胞膜周辺に局在化する様子が観察された。このことから、細胞内環境において、粒子表面の修飾構造変換が起きていることが明らかとなった。またこの反応は、エキソサイトーシスが起り難い低温培養環境下 (4 °C) でも進行し、細胞膜表面に局在したことから、粒子の集積が細胞膜内側で起きている可能性も考えられる。他方、QD-PEG-DBCO を用いた場合にも、粒子の膜局在は観察されたが、シリカナノ粒子の場合と比べて、実験の再現性が低かった。

そこで、細胞内ミトコンドリアへ集積性することが判っているトリフェニルホスフィン (TPP) にアジド基を導入した化合物 (TPP-N₃) を別途合成し、細胞内におけるナノ粒子表面への結合反応と SNP の移動挙動の観察を試みた。しかしながら A549 細胞に添加した SNP-PEG-DBCO はミトコンドリア以外に存在し、そこに TPP-N₃ 添加した場合には、ナノ粒子の細胞内局在の変化は確認できなかった。そこで SNP-PEG-DBCO と細胞を培養後にクロロキンを加えることにより、ナノ粒子をリソソーム・エンドソームから脱出させ、その後 TPP-N₃ を添加した。すると、表面変換反応後のナノ粒子の輝点の一部はミトコンドリアの領域と重なることが判った。このことは、SNP の一部が TPP-N₃ と反応して表面化学構造変換が起こった結果、ミトコンドリアへの指向性が高まったことを示唆している。また、前述の PAE で表面変換反応を行った場合には、クロロキンの添加

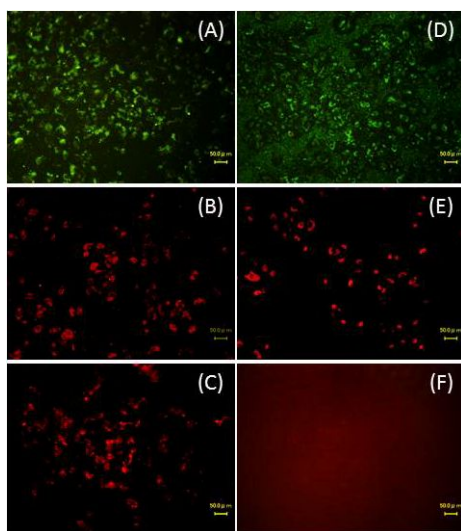


Figure 2. Fluorescence microscope images of A549 cells. Cells were incubated in the presence of (A, B, C) SNP-PEG-DBCO or (D, E, F) SNP-PEG-NH₂ at 37 °C, washed with the medium, and then incubated in the presence of Cy3-N₃. (A, D) FITC-, (B, E) Cy3-, or (C, F) FRET-filter was employed for the microscopic observation.

は不要であったことから、PAE 自身がリソソーム (エンドソーム) に作用し、ナノ粒子の脱出に参与している可能性も考えられる。

最後に、ナノ粒子表面化学構造の細胞内変換が粒子の細胞内滞留性に及ぼす影響を調べることを目的として、SNP-PEG-DBCO 存在下で培養した A549 細胞に種々のアジド化合物 [3-アジド-1-プロパンアミン (NH₂-C₃-N₃)、4-アジドブタン酸 (HOOC-C₃-N₃) など] を添加して、細胞内蛍光強度の時間変化をフローサイトメーターを用いて解析した。しかしながら、アジド化合物構造と SNP の細胞外排出速度との間に明確な差異は認められなかった。これらのアジド化合物による SNP 表面の細胞内構造変換が実際に起きているのかは確認できていないが、いずれの化合物も親油性が低いことから、化合物自体の細胞内浸透性にばらつきがある可能性もある。

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 1 件)

1. Kusaka, E.; Ito, T.; Tanabe, K.; Nishimoto, S. "Enzyme-Catalyzed Conversion of Chemical Structures on the Surface of Gold Nanorods" *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1435-1444.

[学会発表](計 6 件)

1. 伊藤健雄, 日下絵里子, 小倉麻衣子, 西本清一 「ナノ粒子表面の細胞内構造変換とその細胞内挙動に及ぼす影響」、ナノ学会第 10 回大会、平成 24 年 6 月 14 日、大阪大学会館

2. Ito, T.; Kusaka, E.; Ogura, M.; Nishimoto, S. Alteration of the Interactions between Nanoparticles and Biomolecules in Living Cells. 1st International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials (ICEAN 2012), Oct. 22, 2012, Brisbane.

3. 中村拓馬, 伊藤健雄, 栗原亮介, 日下絵里子 「細胞内ナノ粒子の表面構造変換に基づく生体分子 - 粒子間相互作用の制御」、日本化学会第 93 春季年会、平成 25 年 3 月 24 日、立命館大学びわこくさつキャンパス

4. 伊藤健雄, 中村拓馬, 栗原亮介, 日下絵里子, 田邊一仁 「シリカナノ粒子表面の細胞内化学修飾反応」、ナノ学会第 11 回大会、平成 25 年 6 月 6 日、東京工業大学

5. 中村拓馬, 伊藤健雄, 栗原亮介, 日下絵里子 「細胞内ナノ粒子の表面構造変換に基づく挙動変化」、第 35 回バイオマテリアル学

会大会、平成25年11月26日、タワーホール船堀

6. 中村拓馬, 伊藤健雄, 栗原亮介, 日下絵里子「ナノ粒子表面の化学構造変換が細胞内動態および細胞外排出挙動に及ぼす影響」、日本化学会第94春季年会、平成26年3月27日、名古屋大学

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
伊藤 健雄 (ITO TAKEO)
京都大学・工学研究科・助教
研究者番号：80378801

(2)研究分担者
()

なし
研究者番号：

(3)連携研究者
()
なし
研究者番号：