

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620125

研究課題名(和文)細胞とのデジタルな相互作用を実現する新奇ナノ粒子の創製方法

研究課題名(英文)Preparation of nanoparticles that exhibit all-or-nothing interactions with cells

研究代表者

中西 淳(Nakanishi, Jun)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・独立研究者

研究者番号：60360608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：標的細胞で高発現する受容体に対するリガンドが斑に存在するパッチーナノ粒子を開発し、その表面状態(パッチー性、分子込み合い)に応じた細胞選択性の獲得を目指した。まず、表面上皮成長因子(EGF)と光分解性基を介してPEGを固定した金ナノ粒子を開発した。その結果、光照射依存的に分子込み合いが変化し、受容体との相互作用が増大していく様子が観察された。この際の受容体の細胞膜内分布を調べたところ、通常のsoluble EGFの場合と異なり、EGF受容体がラフトから脱出できなくなることが分かった。以上より、パッチーナノ粒子と細胞との相互作用に関する重要な基礎データを取得することができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to develop a method for the preparation of patchy nanoparticles, where ligand molecules are immobilized on the particle surface in a patchy fashion. We hypothesized that cells that abundantly express corresponding membrane receptors can be labeled with the patchy nanoparticles by precisely tuning the patchiness and molecular crowding of the immobilized ligands. As a proof-of-concept experiment, we functionalized gold nanoparticles with epidermal growth factor and photocleavable poly(ethylene glycol) (PEG). This particle exhibited photoirradiation-dependent increase in the interaction with the EGF receptor molecules. To further look into the interactions of EGF-immobilized gold nanoparticles with the cells, we isolated detergent-resistant membrane fraction on sucrose density gradients. We found the EGF receptors activated by the EGF-immobilized patchy particles exhibited distinct membrane trafficking from those of soluble EGF.

研究分野：生体分析化学

キーワード：ナノ粒子 がん パッチー 上皮成長因子 ポリエチレングリコール 分子込み合い ラフト

1. 研究開始当初の背景

生体組織の中からがん細胞を検出するように、複数種の細胞の中から特定細胞を"染め"分けすることは診断・治療において重要である。多くの場合、標的細胞に特徴的な表面抗原と相互作用するリガンドの分子認識能を利用するが、残念なことにこれら抗原は正常細胞にも発現しているため、所詮「選択的に」識別することしかできない。したがって、診断の疑陽性反応や薬剤の副作用の低下のためにも、細胞種選択性を格段に向上させ、デジタルな標識を実現する方法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、標的細胞の表層に高発現する受容体と相互作用するリガンドが斑に配列したパッチーな表面構造を有する新奇ナノ粒子を開発し、その表面状態(パッチー性、分子込み合い)を調節することで細胞種特異的なデジタル標識を実現することを目的とした。本研究期間においては、がん細胞で高発現する上皮成長因子(EGF)受容体を標的に、最初に(1)パッチーナノ粒子の合成方法の開発を行い、粒子表面でのEGF周りの分子込み合いを変化させたときの細胞への作用を調べた。つづいて(2)生化学的手法によって、EGF修飾ナノ粒子と細胞との相互作用を脂質マイクロドメインに注目した詳細に調べた。細胞種選択性の獲得への道筋を築くことをめざした。

3. 研究の方法

(1) EGF修飾パッチーナノ粒子の合成と評価

最初、DNAの鎖交換反応とナノ粒子の自己組織化反応を原理に、万能なパッチーナノ粒子の合成方法の開発に取り組んだが、至適条件の割り出しが容易でないことが判明したため、EGFに特化した方法の開発に取り組むように方針変更した。その合成方法を以下に述べる。市販の15nm(British BioCell International)の金ナノ粒子を

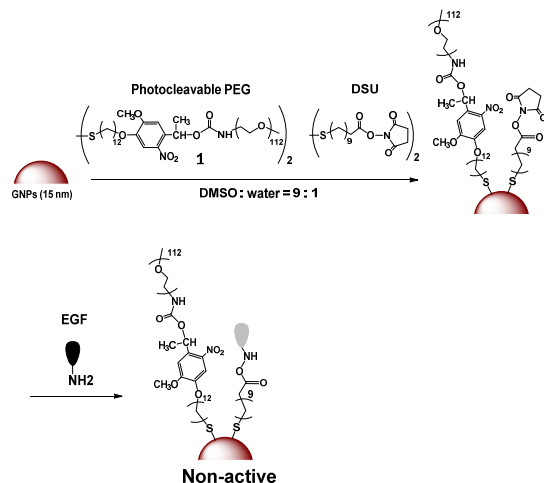


図1. 光応答パッチーナノ粒子の調製法

90%DMSO中で下記のDSU(Dojindo)と光分解性PEG(1)で修飾した後に、遠心精製、EGFを反応後、再び遠心精製を行い、目的のナノ粒子を得た(図1)。高圧水銀灯でこのナノ粒子に適量の光(=300-400nm)を照射しフィールドフローフラクショネーションによる粒径評価を行った。また細胞への作用を調べるために、EGF受容体の下流に位置するERKのリン酸化量を、Phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204)抗体(CST)を用いたELISA法で求めた。

(2) EGF修飾パッチーナノ粒子の細胞への作用点の探究

光解離性を有さないPEGを用いた以外は同じ条件でEGF修飾パッチーナノ粒子を合成した。次に、このナノ粒子の相互作用の様子を調べるべく、細胞膜成分を界面活性剤で可溶化後、Sucrose密度勾配超遠心分離法によりラフト画分の精製を行った。さらにラフトを積極的に破壊する目的で、シクロデキストリンを添加して同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1)最初に動的光散乱法で光照射による粒径を求め、光照射によるその変化を調べた。図2に示すように、元のEGF固定化ナノ粒子の粒径は46nmであったものに対し、光照射時間を3J、7Jとするにつれて、粒径が37nmと29nmと減少していく様子が観察された。これらの結果は、粒子表面からPEGが放出され光照射により、粒子表面上のPEG密度を変化させることを意味しており(図2B右)、EGF周りの分子クラウディングが低下する様子を示唆している。次にこれらのナノ粒子をHeLa細胞に作用させた際に、EGF受容体の下流に位置するリン酸化酵素ERKを活性化する様子を調べた。粒子の濃度を一定に保つと、光照射時間が長くなるにつれて、より大きな応答を示すことが分かった(図3)。この結果より、光解離性PEGによりナノ粒子表面におけるEGF周りの分子込み合いを変化させることで、ナノ粒子と細胞との反応性を変化させることができることが明らかになった。

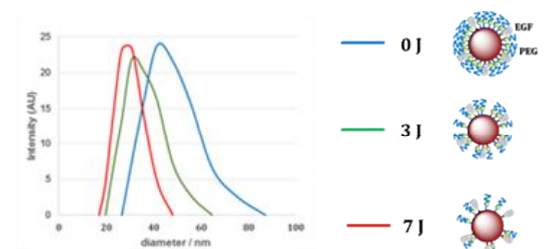


図2. EGF修飾パッチーナノ粒子における光応答的粒径変化

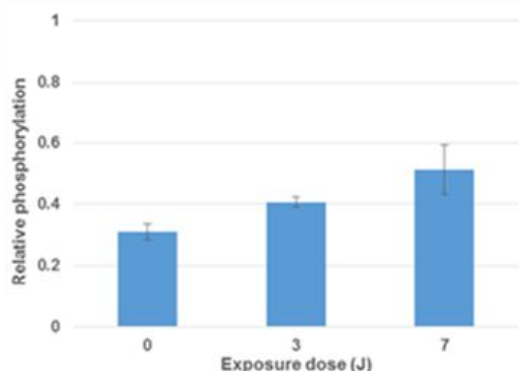


図3. EGF 修飾パッチーナノ粒子の光応答的な性質

(2) 調製したナノ粒子の粒径を動的光散乱法で調べたところ、上とほぼ同様に平均粒径が 48nm となった。次に、このナノ粒子の作用点を生化学的に求めるべく、HeLa 細胞膜上での EGF 受容体の分布を調べるために、非イオン性界面活性剤存在下でシヨ糖密度勾配遠心法により膜成分を分離したところ、EGF 受容体の半分近くがラフトに存在することが分かった。ここに(通常の) soluble EGF を作用させると、多くの EGF 受容体はラフトから脱出した。この結果は シクロデキストリンで脂質マイクロドメインを破壊した場合と同様であった。これに対して、上記パッチーナノ粒子を作用させた場合は、EGF 受容体がラフト内にとどまっていた(図4)。ラフト内では EGF 受容体が高密度に存在していることが予想されるため、ここで得られた結果は、EGF 受容体と相互作用したパッチーナノ粒子は Soluble EGF とは異なる膜トラフィッキングを示し、しかもそれが EGF 受容体の発現量や存在状態に依存することを示唆している。つまり、パッチーナノ粒子が、受容体発現量の異なる細胞をデジタルに"染め分け"できる可能性が示されたわけである。今後、実際に EGF 受容体の発現量の異なる細胞を用いることで、本手法を実践のステージへと進めていく。

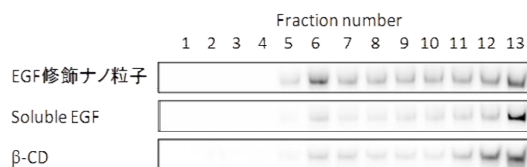


図4. Soluble EGF と EGF 修飾パッチーナノ粒子の脂質内作用点の違い

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)

S. Yamamoto, J. Nakanishi, K. Yamaguchi,* "Development and characterization of protein-gold-nanoparticle conjugates

bearing photocleavable polymers", *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 28: 269-272 (2015). , 2015年8月19日
DOI: 10.2494/photopolymer.28.269

[学会発表](計4件)

J. Nakanishi, S. Yamamoto, Y. Shimizu, K. Yamaguchi, "Study on cellular responses of epidermal growth factor immobilized to gold nanoparticles", Pacificchem 2015, 2015年12月15日, Hawaii

S. Yamamoto, Y. Shimizu, K. Yamaguchi, J. Nakanishi, "Possible involvement of lipid microdomains in unique response of epidermal growth factor upon conjugation to gold nanoparticles", International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 2015年7月29日, 筑波

S. Yamamoto, J. Nakanishi, K. Yamaguchi, "Development and Characterization of Protein-Gold-Nanoparticle Conjugates Bearing Photocleavable Polymer", 第32回フォトポリマーコンファレンス, 2015年6月24日, 千葉

山本翔太, 清水善久, 山口和夫, 中西淳, 「ナノ粒子に固定化された上皮成長因子が誘起する細胞応答に関する研究」, 第64回高分子年次大会 2015年5月27日, 札幌

[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

中西 淳 (NAKANISHI JUN)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国
際ナノアーキテクトゥクス研究拠点・独立
研究者

研究者番号：60360608

研究者番号：

(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：