

令和元年6月8日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03844

研究課題名(和文) 搭載分子の放出を時空間制御できる温度応答性脂質ナノデバイスの開発

研究課題名(英文) Development of temperature-responsive lipid nano-devices for spatiotemporally controlled payload release

研究代表者

宗 慶太郎 (Sou, Keitaro)

早稲田大学・理工学術院・客員主任研究員

研究者番号：20318835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小空間で時間と位置を制御して搭載分子を放出できるナノデバイスを開発し、その機能を薬物などの機能性分子送達技術に応用することを目的とした。この目標達成に向け、特定の温度(温度閾値)まで加熱すると搭載分子を放出する温度応答性脂質ナノカプセルを開発し、温度制御によりこのナノカプセルに搭載した薬物の放出を生体内で制御できることを実証した。また、従来の温度計では計測できない微小空間の精密な温度制御に必要な温度モニタリング法についても成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体の中の細胞間情報伝達やがんの転移など様々な生命現象において、細胞が放出する超小型脂質カプセルによる分子送達の関与が明らかになってきた。本研究で開発した脂質ナノカプセルは、このような生命現象を人工的に再現するモデルとなり、学術的に意義のある研究対象である。また、この脂質ナノカプセルを薬物送達システム(DDS)に応用することで、次世代の安全な病気の治療法の開発への貢献が期待できる。微小領域の温度モニタリングの手法は、温度とナノサイエンスを融合する新しい境界領域の発展を支える研究ツールとして学術的に高い波及効果が期待できるとともに、治療における生体組織の精密な温度制御を可能にする。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop nano-devices that release a payload timely at a target region to apply them for delivery and controlled release of functional molecules such as drugs. To this end, temperature-responsive lipid nano-capsules that release the payloads when heated to a threshold temperature have been developed. These nano-capsules successfully released the drugs at target region by heating the tissue up to the threshold temperature in living organism. In addition, a technique for spatial temperature monitoring to precisely control the temperature at small space where the conventional thermometers can not be applied has been investigated.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：リポソーム ナノ粒子 薬物送達 神経伝達物質 蛍光温度センサー 温度応答性材料 脂質ベシクル ナノバイオテクノロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体の中では細胞と細胞の間で選択的に生体分子を交換することで、細胞間での情報伝達が行われていることが明らかになりつつある。通常 RNA やタンパク質などの生体分子は細胞外に放出されると速やかに酵素作用で生分解されるため、これらの分子を細胞の中まで届けるのは容易ではない。興味深いことに、細胞はこれらの生体分子を超小型脂質カプセル(粒子径; 30~100nm)に包んで細胞外に放出しており、この戦略で酵素作用による分解を回避していると考えられている。また、このような細胞間での生体分子の交換に使われる脂質カプセルは特異的で、例えば皮膚がんの一種のメラノーマ細胞が放出する脂質カプセルは骨髄細胞に選択的に取り込まれることが報告されている(H. Peinado et al., *Nature Medicine* 18, 883, 2012)。脂質カプセルに含まれるタンパク質や脂質が特定の骨髄細胞に対する目印になっていると考えられており、このような脂質カプセルを使った細胞間での生体分子の交換が、がんの増殖や転移に関与していることが示唆されることから、学術的にその仕組みを理解するとともに、治療への応用研究が続けられている。

ところで、細胞が脂質カプセルを放出していることはおよそ30年前には発見されていたが、細胞から放出される老廃物と考えられてきた。生体がこの脂質カプセルを洗練された機能分子の輸送システムのための道具(デバイス)として利用していることが認識されたのは2007年以降である(H. Valadi et al., *Nature Cell Biology* 9, 654, 2007)。現在ではエクソソームとして多くの研究者がこの脂質カプセルを研究の対象にしている。実は、エクソソームに形状が類似した脂質カプセルが試験管内で作成できることは、1964年には報告されている(A.D. Bangham et al., *J. Mol. Biol.* 8, 660, 1964)。この脂質カプセルはリボソームと命名され、その後工学的に様々な工夫と改良が加えられ、分子を安定に内包でき生体適合性に優れた超小型デバイスとして高い性能を実現しており、主要な薬物送達システム(DDS)技術の一つとなっている。しかしながら、“特定の場所に向けた分子送達”と“指定した場所での効果的な分子放出”においては未だ十分な性能が得られていない。この二つの性能を付加した脂質カプセルを開発すれば、機能分子の輸送システムにおける脂質カプセルの適応範囲が飛躍的に拡大することが期待される。

このような問題意識のもと、脂質カプセルを基盤として、特定の微小空間で自由自在に分子を放出できる超小型脂質デバイスの構築を目指している。このデバイスが実現すれば、生体内でのDDS技術のみならず、マイクロ流体デバイスの指定した場所における微細加工や化学反応の制御など、新しいナノ化学制御プロセスへの応用展開を実践できる。これまでの研究から、機能分子による脂質カプセルの表面修飾が“特定の場所に向けた分子送達”に有効であることを確認している(K. Sou et al. *Biomaterials*, 28, 2655, 2007; Y. Miyazaki et al., *Molecular Pharmaceutics*, 11, 4238, 2014; Y. Aoshima et al., *ACS Chemical Neuroscience*, 4, 1514, 2013)。さらに、研究者分担者と研究協力者らとの最近の共同研究により、温度に応答して内包物を放出する脂質カプセルの作成に成功し、“指定した場所での効果的な分子放出”の基盤となる技術の構築に向けた基本的概念を実証できた(S. Arai et al., *RSC Advance*, 5, 93530, 2015)。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、遠隔操作により脂質カプセルから時空間を制御しながら分子を放出する方法論・技術の確立を目指した。この脂質カプセルには薬物、生体分子、化学反応試薬などさまざまな分子を搭載できるので、生きた細胞や生体内で薬物や生理活性物質を放出するナノバイオ技術、あるいはマイクロ流体デバイスにおける微小領域での化学反応の制御に使えるナノ化学コンテナとして応用できる。光を熱に変換する分子システムを組込むことで、指向性の高い近赤外線レーザー照射による脂質カプセル局所での温度制御が可能になる。本研究では、脂質カプセルの機能拡張と高性能化を図るとともに、この分子放出制御システムを細胞や動物に適応して、生体機能の遠隔制御に使える一般的な基盤技術の開発を目的とした。併せて、微小空間での温度制御の定量的研究を進める上で必須となるナノ/マイクロスケールでの温度モニタリング手法の開発も本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 温度応答性脂質カプセルの放出制御と可視化

高濃度カルセイン(50 mM)を内包させた相転移温度の異なる3種の脂質カプセルを調製した。脂質粉末を水和後、エクストルージョン法により粒子径を制御し、超遠心分離法により未内包のカルセインを除去した。得られた脂質カプセル分散液、あるいは脂質カプセルを包埋したヒドロゲルを加温して、カルセインの蛍光強度の変化から放出率を算出した。ヒドロゲルの局所加温には近赤外線レーザー照射(波長: 980 nm)を使用し、三次元マトリクス中における蛍光の分布から閾温度を可視化する方法としての有効性を検証した。

(2) 温度応答性脂質カプセルの表面修飾による細胞標的化

薬物輸送担体にリガンド分子を取り付けることで、特定の細胞を標的化できる。そこで、温度応答性脂質カプセルの表面に任意のリガンド分子を簡便に取り付ける方法を検討した。水中で添加物を必要とせず、温和な条件で反応が進行するクリック反応に着目し、脂質カプセル

の表面にクリック反応性基を担持できる新しい両親媒性分子を合成し、葉酸で表面修飾した脂質カプセルを合成した。さらに脂質カプセルの動態を追跡するため、新規に合成した近赤外蛍光色素を温度応答性脂質カプセルの膜に搭載した。葉酸受容体を高発現する卵巣がん細胞 (SKOV-3) を対象として、細胞内に取り込まれた温度応答性脂質カプセルをマイクロプレートリーダーと共焦点顕微鏡による蛍光強度から定量解析し、本法での表面修飾による細胞標的化の効果を評価した。

(3) 神経伝達物質の放出制御による筋動作制御

抑制性神経伝達物質 (GABA) を温度応答性脂質カプセルに内包し、温度に反応した GABA の放出を確認した。この分散液をカブトムシの基節から注入した後、大腿部を 45°C に加温することで GABA の放出を制御した。伸筋を電気刺激した時の関節の偏位角度から、GABA の放出制御による筋弛緩への介入効果を評価した。本実験は、研究協力者 (Dr. Hirotaka Sato, Nanyang Technological University) との共同研究として実施した。

(4) 超高感度蛍光温度センシング

研究協力者 (Dr. Chi-Lik Ken Lee, Singapore Polytechnic) の協力を得て、温度応答性脂質カプセルの脂質二層膜に搭載できる新しい近赤外蛍光色素を合成した。この蛍光色素を搭載した相転移温度の異なる温度応答性脂質カプセルについて、蛍光分光光度計により、色素含量や脂質二層膜の相転移温度と蛍光強度の温度変化を詳細に検討した。また、分光学的データから、近赤外蛍光色素の消光と蛍光発光が脂質二層膜の相転移温度で変換する機構について解析した。研究分担者は、共焦点顕微鏡を使った蛍光イメージングにより、近赤外線レーザー照射による温度変化の検出について検討した。

4. 研究成果

(1) 温度応答性脂質カプセルの放出制御と可視化

脂質カプセルを高張溶液を内包し、この脂質カプセルの相転移温度以上に加温することで内包分子を効率高く放出できた。脂質カプセルの成分の選択により、具体的に 31 ± 1、39 ± 1、47 ± 1 °C で内包物を放出する脂質カプセルの合成に成功した (図 1)。近赤外線レーザー照射により、三次元マトリクス中で時空間を制御した温度制御による分子放出が可能であることを実証した。この実験では、高濃度カルセイン (消光) を内包した脂質カプセルをヒドロゲル中に固定し、近赤外線レーザー照射した部分だけ加温され、脂質カプセルの相転移温度に達した領域で脂質カプセルから放出されたカルセインの発光を観測した。これは、三次元マトリクス中で閾温度を可視化して検出する方法としても意味がある (*ACS Sensors*, 1(6), 650-655, 2016)。

(2) 温度応答性脂質カプセルの表面修飾による細胞標的化

脂質カプセルの表面に分子認識素子を取り付けることで、細胞内空間に脂質カプセルを高効率で導入する方法を検討した。具体的には、脂質カプセルの表面にシクロオクチンを配置し、これにアジド化した葉酸 (がん細胞は葉酸受容体を高発現している) をクリック反応で結合させ、卵巣がん細胞による取り込みを蛍光バイオイメージングにより解析した (図 2)。結果として、葉酸で表面修飾した脂質カプセルは未修飾の脂質カプセルに比較して卵巣がん細胞に多量に取り込まれ、細胞内空間に脂質カプセルを高効率で導入できるようになった (*ACS Applied Nano Materials* 1(3), 1009-1013, 2018)。クリック反応を利用した脂質カプセル表面の遠隔修飾法は、さまざまな分子認識素子を脂質カプセル表面に取り付ける方法として利用できるため、特異的な分子認識を利用して脂質カプセルを目的の場所に配置する方法論として広く応用できる。

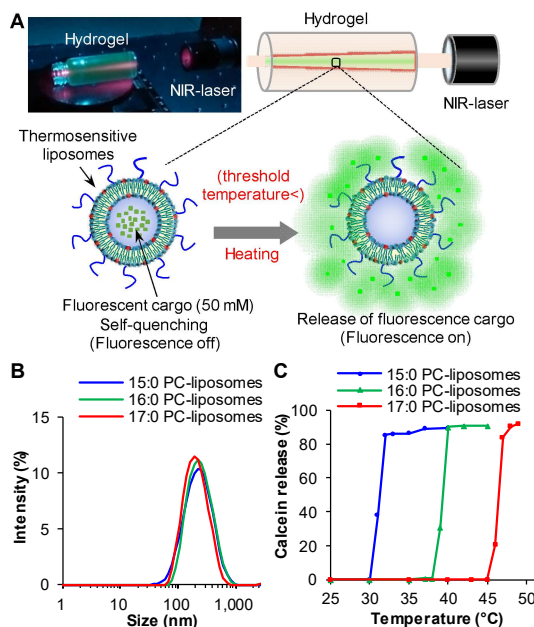


図 1. 温度応答性脂質カプセルの放出制御。A: 近赤外線レーザー照射による局所加熱による放出制御の模式図、B: 動的光散乱で計測した粒径分布、C: 温度に応答する内包物の放出。

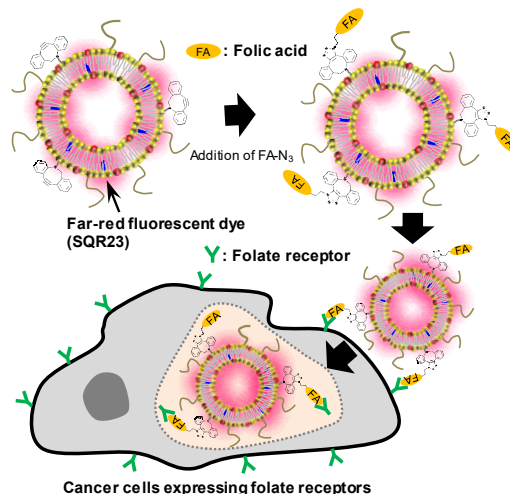


図 2. 温度応答性脂質カプセルの表面修飾によるがん細胞内への分子送達と蛍光色素による動態追跡。

(3) 神経伝達物質の放出制御による筋動作制御

神経細胞は、神経伝達物質とよばれる分子をオンデマンド方式で分泌して神経ネットワークの興奮と抑制を制御しながら、筋肉や脳の神経系のはたらきを調節している。温度応答性脂質カプセルからオンデマンド方式で神経伝達物質を放出すると、必要な時に必要な部位で神経ネットワークに非侵襲的に介入できることを、筋動作制御の観測から初めて実証して国際誌に報告した (*ACS Applied Materials & Interfaces* 10(44), 37812-37819, 2018)。光や磁場を照射してナノレベルで生体組織を精密に加熱する技術と組み合わせることで、運動機能制御、神経調節や神経変性疾患の治療への応用が期待される。本研究で得られた成果は、人工細胞外シナプス小胞 (Artificial Extracellular Synaptic Vesicles) への道を拓くもので、この展望をまとめた総説が国際学術誌Smallの表紙に掲載された(図3)。



図3. 光照射により温度応答性ナノカプセル (人工細胞外シナプス小胞) から神経伝達物質を放出して神経ネットワークに介入する概念図 (Small 15, 1970088, 2019)

(4) 超高感度蛍光温度センシング

微小領域での精確な温度計測法の開発は、温度とナノサイエンスを学術的に結びつける研究を進める上で喫緊の課題であり、脂質カプセル局所での温度制御にも微小領域での温度モニタリングが必要となる。まずは、温度感受性蛍光色素として知られるローダミンBの脂質誘導体を合成して、脂質カプセルの表面に温度感受性蛍光色素を固定する方式を試みた。この方式ではローダミンBの分子内環化開環反応によりpHや紫外線に応答する蛍光スイッチ機能が見られ、温度計測には適していなかった (*Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 332, 25-31, 2017)。

一方、温度応答性脂質カプセルのゲル相と液晶相の相転移に応答して、消光と蛍光発光が可逆的に変換する蛍光色素を見出した。この蛍光色素を脂質二重層に搭載すれば、蛍光強度の変化から温度応答性脂質カプセルの相転移温度に相当する温度を超高感度で検出できる。共焦点顕微鏡により温度変化を蛍光イメージングで観測できることも実証できた。温度応答性脂質カプセルの大きさは100 nm程度であるので、従来の温度計では計測が困難な生体組織の微小空間やマイクロ流体デバイスの中に設置することができる。この成果は、温度応答性脂質カプセル局所の温度モニタリングを可能にするだけでなく、超高感度蛍光温度センサの新しい設計原理を提案するもので、ナノ/マイクロスケールでの超高感度温度計測を可能にする新しいツールとして高い波及効果が期待できる (特許出願済、論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

1. Keitaro Sou, Duc Long Le, Hirotaka Sato, “Nanocapsules for programmed neurotransmitter release: Toward artificial extracellular synaptic vesicles” *Small* 15(17), 1900132 (2019). doi:10.1002/smll.201900132
2. 宗 慶太郎, “温度応答性リポソームの開発と薬物送達システムへの応用”, *人工血液*, 26(1), 51-58 (2018). <https://www.blood-sub.jp/kaisinituite.php>
3. Duc Long Le, Ferdinandus, Chin Kiat Tnee, T. Thang Vo Doan, Satoshi Arai, Madoka Suzuki, Keitaro Sou, Hirotaka Sato, “Neurotransmitter-loaded nanocapsule triggers on-demand muscle relaxation in living organism” *ACS Applied Materials & Interfaces* 10(44), 37812-37819 (2018). doi:10.1021/acsmi.8b11079
4. Sheng Dong, Joshua Ding Wei Teo, Li Yan Chan, Chi-Lik Ken Lee, Keitaro Sou, “Far-red fluorescent liposomes for folate receptor-targeted bioimaging” *ACS Applied Nano Materials* 1(3), 1009-1013 (2018). doi:10.1021/acsnm.8b00084
5. Keitaro Sou, Li Yan Chan, Chi-Lik Ken Lee, “Photo-switchable and self-erasable fluorescent nanoprobe” *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 332, 25-31 (2017). doi:10.1016/j.jphotochem.2016.08.001
6. Keitaro Sou, Li Yan Chan, Chi-Lik Ken Lee, “Temperature tracking in a three-dimensional matrix using thermosensitive liposome platform” *ACS Sensors*, 1(6), 650-655 (2016). doi:10.1021/acssensors.6b00222

[学会発表] (計4件)

1. Keitaro Sou, “Temperature sensing using fluorescent liposomes” 4th 3D Lab exchange symposium, 2018.3.6-8, Bonn Germany.
2. Keitaro Sou, Satoshi Arai, Li Yan Chan, Chi-Lik Ken Lee “Concomitant monitoring of local heating and heat-triggered cargo release from thermosensitive liposomes by fluorescence imaging”

5th International Symposium for Bioimaging, 2017.5.20-21, Singapore.

3. 宗 慶太郎, 新井 敏, Li Yan Chan, Chi-Lik Ken Lee, “細胞内薬物動態制御に向けた温度応答性リポソームの開発” 第 24 回日本血液代替物学会, 2017 年 12 月, 東京
4. Keitaro Sou, “Thermosensitive liposomes for controlled release with near-infrared light” 3rd 3D Lab exchange symposium, 2016.9.21-23, Pisa Italy.

〔図書〕 (計 1 件)

1. 宗 慶太郎, 田口和明, “リポソーム製剤の骨髄への DDS 応用”, In:DDS 先端技術の製剤への応用開発 第 6 章 6 節, 技術情報協会 360-368 (2017).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 生体分子の検出のための温度応答性蛍光粒子

発明者: 宗 慶太郎 他 4 名

権利者: 早稲田大学

種類: 日本国特許

番号: 特願 2019-100299

出願年: 2019 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

研究成果の国際誌表紙への掲載: Keitaro Sou, Duc Long Le, Hiroataka Sato, “Drug Delivery: Nanocapsules for programmed neurotransmitter release: Toward artificial extracellular synaptic vesicles” *Small* 15(17), 1970088 (2019). doi.org/10.1002/sml.201970088

アウトリーチ活動: シンガポールで日本の高校生、大学生に向けて国際的な研究活動とその成果を紹介 (8 件、2016~2017 年、早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所にて)



ホームページで成果を発信: <https://sites.google.com/site/soulabwabios/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 新井 敏

ローマ字氏名: (ARAI, Satoshi)

所属研究機関名: 早稲田大学

部局名: 理工学術院

職名: 次席研究員 (研究院講師)

研究者番号 (8 桁): 70454056

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 佐藤 裕崇, LEE, Chi-Lik Ken

ローマ字氏名: SATO, Hiroataka, LEE, Chi-Lik Ken

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。