

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12776

研究課題名(和文)細胞pH摂動現象と電界効果トランジスタを用いた高感度生体バリア評価法の開発

研究課題名(英文)Development of highly sensitive biological barrier evaluation method using cellular pH perturbation phenomenon and field-effect transistor

研究代表者

合田 達郎 (Goda, Tatsuro)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：20588347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜や上皮タイトジャンクションといった生体内に存在するバリア性の評価は、生理学的機能や、医用工学ナノ材料開発など、重要な研究対象である。しかし、既存法は問題点が多く、実用に耐えうるものではない。既存の膜障害性アッセイや上皮TJ評価の問題点である非侵襲・リアルタイム・多並列化・感度・時間分解能の問題を一挙に解決する技術が求められる。本研究では、近年、我々が開発した細胞pH摂動法を用いて、細胞膜および上皮TJといった生体バリア性を従来法では達成不可能な感度と選択性で評価できる新規手法の開発に成功した。今後、生命現象の解明といった基礎学問と産業応用双方での波及効果が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜やTJといった生体バリア評価の重要性は増しつつある。本研究では、細胞膜障害性やTJ破綻の評価に原理証明実験に取り組み、pH摂動法が真に有効な技術であることを検証できた。今後、本測定系は、がん浸潤・転移時の組織透過性の非侵襲計測といった基礎学問と、TJ標的型新規薬剤開発の促進や高スループット薬剤スクリーニング、高効率かつ安全なドラッグデリバリーナノキャリアの開発といった産業応用双方の観点から、数多くの波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：Evaluation of barrier properties existing in the living body such as cell membranes and epithelial tight junction (TJ) is an important research subject such as physiological functions and development of biomedical engineering nanomaterials. A new technology that allows non-invasive, real-time, multi-parallel, sensitive, and real-time measurements is required to overcome issues of existing assays for biomembrane injuries and tight junction breaches. In this study, we have recently succeeded in developing an original method that can evaluate biological barrier properties with sensitivity and selectivity that cannot be achieved by conventional methods, using induced pH perturbations. In the future, the new assay developed can be applied both in life science and biomedical engineering.

研究分野：生体医工学

キーワード：pH摂動 スタ タイトジャンクション 上皮バリア 生体バリア透過 高分子ナノキャリア バイオトランジスタ

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

細胞膜はリン脂質を主成分とする厚さ **6-10 nm** の自己組織化二分子膜であり、水、脂溶性分子、溶存ガスは透過するが、イオン、高分子は透過しない「半透膜」である。細胞膜を隔てた物質収支は膜トランスポーターやイオンチャンネル、イオンポンプを介して自律的に制御され、活動電位や細胞機能に関わる。一方、比較的大きな物質は、エンドサイトーシス経路にて膜輸送される。この際、脂質小胞体は細胞膜と融合するため、細胞内外の隔離は維持される。細胞膜が物理的に破れると、恒常性が破綻して急性のネクローシス細胞死を招く。こうした破滅的な細胞死は、生体内で急性の炎症応答や自然免疫応答を誘導し、周囲の組織にも多大な影響を及ぼす。したがって、アポトーシス等の「正常な」細胞死とは明確に区分され、その後の体内処理機構も異なる。

一方、上皮細胞間隙にも多細胞生物の恒常性維持を担う重要なバリア構造体が存在する。タイトジャンクション (**TJ**) と呼ばれる **Claudin** や **Occludin**、**ZO-1** 等からなるタンパク質複合体は、細胞骨格に裏打ちされた状態で頂端部側をぐるりと取り囲むように存在し、水やイオンを含む物質の無秩序な往来を防ぐ。したがって、**TJ** によって体の外側と内側が厳密に隔てられることで、病原菌の侵入防止や栄養吸収、イオン分配が可能となる。近年、**Claudin** の亜型ごとに異なるイオンや物質を透過させることが明らかとなった (*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, **2**, **285**)。また、**TJ** 異常は尿細管での再吸収障害、潰瘍、アレルギー疾患等に関係する。さらに、発生やがん細胞浸潤時の上皮間葉転換 (**EMT**) も、**TJ** 消失が関与する重要な形質転換である。

このように、細胞膜や上皮組織のバリア性の評価は、生体恒常性や生体防御といった生理学的機能のみならず、がん細胞の組織浸潤、医用工学分野におけるナノ材料開発など、重要な研究対象である (*Small*, **2010**, **6**, **12**)。しかし、これらの生体バリアの評価系は十分に開発されているとは言いがたい。近年、膜障害性にも様々な種類があることが明らかにされているが (*Analyst*, **2017**, **142**, **3451**)、一般的にはあまり認知されていない。これは、既存の膜障害性評価法ではそれらの違いを区別できないためである。細胞膜のわずかな乱れの検出や膜障害性の種類の判別は、ドラッグデリバリー系 (**DDS**) における高効率かつ安全な機能性キャリア材料の開発に必須の要件であるにもかかわらず、適切な評価技術の不在により、その分子科学的理解はほとんど進んでいない。また、**TJ** を標的とした新たな薬剤開発も進められているが、**TJ** に作用する候補化合物を高スループットかつ高感度、選択的にスクリーニングする手法は存在せず、効率的な薬剤開発は困難な状況にある。

2. 研究の目的

独自の技術である細胞 **pH** 摂動現象と電界効果トランジスタを用いた電気的イオンセンシング法を用いて、細胞膜および上皮 **TJ** といった生体バリア性を従来法では達成不可能な高感度で評価する **In vitro** アッセイを開発することを目的とした。生体内における物質透過性の制御や、細胞・組織バリア性の精密な測定は、医工学の進展に不可欠な基盤技術である。本課題達成後の波及効果として、高効率な **DDS** キャリア材開発の促進や、**TJ** 標的型新規薬剤開発の促進、培養細胞アレイ / 培養組織を用いた高スループット薬剤スクリーニング、がん浸潤・転移時の組織透過性の非侵襲計測、組織工学や再生医療における品質管理等が挙げられる。

3. 研究の方法

半導体型バイオセンサは微細化、高集積化に有利である。こうした特長を生かして、**1970** 年代以降、イオン応答性電界効果トランジスタ (**ISFET**) を用いた細胞代謝活性や神経活動の測定に応用されてきた。しかし、系のイオン濃度変化を受動的に計測するパッシブ計測法では経時的な信号ドリフトが問題となり、その細胞機能評価への応用は限定的であった。これに対し、近年、我々は **NH₄Cl** 水溶液を細胞に瞬間的に暴露させた際の **pH** 摂動という物理化学現象から細胞機能を評価する、全く新しい「アクティブ計測」法を見出した (*Acta Biomater.* **2017**, **50**, **502**)。これは、**NH₄Cl** 水溶液を添加した際に、**H⁺** や **NH₄⁺** といった非常に小さいサイズの電解質 (**R_H < 0.33 nm**) でも正常な細胞膜を透過しないことによって酸塩基平衡が乱れ、**pH** 摂動が生じるという単純な原理に由来する。生体膜の精緻な半透膜性を生かした本手法は、既存法である乳酸脱水素酵素 (**LDH**, **R_H > 4.6 nm**) 漏出試験では検知できないサブナノメートル (水素イオンの大きさ、**R_H ~ 0.3 nm**) の脂質二重膜の破れ・極微空孔を究極的な精度、低ノイズ、高い再現性で計測できる。さらに、**pH** 摂動現象は細胞膜のイオンバリア性に対し選択的であるため、膜障害性、細胞死の種類の違いを判別できる (*Analyst*, **2017**, **142**, **3451**)。そこで、将来の **In vitro** 細胞アレイへの応用や薬物の体内動態を微小流路デバイス内で再現する **Organ-on-a-chip** 応用を見据え、細胞膜や上皮組織のバリア性評価に関する原理証明実験をおこなう。

4. 研究成果

(1)細胞膜バリア性評価と応用:**TAT** や **R8** といったウイルス由来の細胞膜透過ペプチド (**CPP**) やナノ粒子をキャリアに用いた細胞治療・イメージングが注目されている。我々も、両親媒性リン脂質模倣高分子が生細胞膜を傷つけることなく透過する世界初の現象を見出しており

(*Biomaterials*, 2010, 31, 2380)、そのナノメディシン応用が期待される。これまで、細胞膜とナノ材料の相互作用は単純なリン脂質二重膜を用いた測定やシミュレーションによる評価に限定されてきたが、実証するための評価系が不在であった。そこで、**pH** 摂動法と従来法を併用し、ナノ材料と細胞膜との相互作用に起因する極微サイズの空孔形成の検出や膜障害機構の種別の判定をおこない、ナノ材料の細胞膜透過現象の分子機構を明らかにした。具体的には、細胞膜透過性ナノ材料であるリン脂質を模倣した両親媒性双性イオン高分子を用い、本ナノ材料が細胞膜を透過する際に極微空孔形成ではなく膜融合による透過であることを世界で初めて実験的に証明することに成功した (*Langmuir*, 2019, 35, 8167)。また、類似構造を有するスルホベタイン系の両親媒性双性イオン高分子についても同様の検討をおこない、膜透過現象が起こる条件についてポリマー骨格や双性イオンの分子構造ばかりでなく、分子量などの高分子としての性質が影響することを明らかにした (*Langmuir*, 2020, 36, 9977)。さらに、市販の核酸ナノキャリアがエンドサイトーシスで細胞に取り込まれた後に、いかにしてエンドソームから脱出するかを原理証明実験をおこなった。ナノキャリアは系の **pH** 酸性化に依存して空孔形成能を獲得し、高分子ベースに比べて脂質ベースのナノキャリアの方がより小さい分子サイズの空孔を形成することが明らかとなった (*J. Mater. Chem. B*, 2021, 9, 4298)。

以上、**pH** 摂動法を用いることで、ナノ材料と細胞膜との相互作用に起因する極微サイズの空孔形成の検出や膜障害機構の同定に世界で初めて成功し、今後の新たなナノキャリア開発のための唯一無二の評価手法であることを立証した。

(2)上皮組織バリア性評価と応用: 上皮組織バリアは腸管や尿細管、血液脳関門(BBB)等として生体内に存在する。これらの *in vitro* 評価系は、生理学、病理学、薬理学、創薬、再生医療といった幅広い分野でのニーズがある。そこで、まず、**pH** 摂動の変化量からモデル上皮細胞シートの成熟具合や **TJ** の破綻度合いを定量的に評価できるかについて検証をおこなった。ウェルシュ菌産生毒素を用いた **TJ** 破綻実験では、従来法であるインピーダンス法や透過率試験法と比較して、**10** 倍以上の感度を有することが判明した (*Anal. Chem.*, 2019, 91, 3525)。

同様に、**TJ** 形成評価試験では、従来法よりも厳密に **TJ** 形成を評価できることが明らかとなった。高感度化の理由は、最小分子水素イオンを透過の指標に用いていること、**pH** 摂動変化が **TJ** 形成 / 破綻に選択的に応答すること、に起因することが示唆された (*ACS Sens.*, 2019, 4, 3195)。

また、細胞膜透過性のリン脂質模倣高分子が上皮バリアをいかに透過するかについての原理証明実験として **pH** 摂動法を用いた。その結果、細胞膜空孔形成や **TJ** 破綻を伴わない細胞膜融合を介したトランスサイトーシスで上皮バリアをすり抜けることが明らかとなった。さらに、インスリンを担持したリン脂質模倣高分子が同様のトランスサイトーシス経路で上皮バリアをすり抜けてインスリンを送達することも証明した (*Acta Biomater.*, 2022, 140, 674)。

以上、**pH** 摂動法を用いることで、上皮バリアの破綻を世界最高の感度で検出することに成功し、組織工学や再生医療における品質管理や上皮バリア超越を目的とした高効率かつ安全な **DDS** キャリア材料の開発に応用できることを示した。

(3)まとめ: 細胞膜や **TJ** といった生体バリア評価の重要性は増しつつあるが、既存の測定法は問題点が多く、実用に耐えうるものではない。**pH** 摂動法は独自の技術であるばかりでなく、既存の膜障害性アッセイや上皮 **TJ** 評価の問題点である非侵襲・リアルタイム・多並列化・感度・時間分解能の問題を一挙に解決する待望の技術である。本研究にて細胞膜障害性や **TJ** 破綻の評価に関する原理証明実験に取り組み、**pH** 摂動法が真に有効な技術であることを検証できた。今後、本測定系は、がん浸潤・転移時の組織透過性の非侵襲計測といった基礎学問と、**TJ** 標的型新規薬剤開発の促進や高スループット薬剤スクリーニングといった産業応用双方の観点から、数多くの波及効果が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hatano Hiroaki, Meng Fanlu, Sakata Momoko, Matsumoto Akira, Ishihara Kazuhiko, Miyahara Yuji, Goda Tatsuro	4. 巻 140
2. 論文標題 Transepithelial delivery of insulin conjugated with phospholipid-mimicking polymers via biomembrane fusion-mediated transcellular pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 674 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2021.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Boonstra Eger, Hatano Hiroaki, Miyahara Yuji, Uchida Satoshi, Goda Tatsuro, Cabral Horacio	4. 巻 9
2. 論文標題 A proton/macromolecule-sensing approach distinguishes changes in biological membrane permeability during polymer/lipid-based nucleic acid delivery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 4298 ~ 4302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1TB00645B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Goda Tatsuro, Hatano Hiroaki, Yamamoto Masaya, Miyahara Yuji, Morimoto Nobuyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Internalization Mechanisms of Pyridinium Sulfbetaine Polymers Evaluated by Induced Protic Perturbations on Cell Surfaces	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 9977 ~ 9984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c01816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Goda Tatsuro, Miyahara Yuji, Ishihara Kazuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Phospholipid-mimicking cell-penetrating polymers: principles and applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7633 ~ 7641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0tb01520b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatano Hiroaki, Goda Tatsuro, Matsumoto Akira, Miyahara Yuji	4. 巻 4
2. 論文標題 Induced Proton Dynamics on Semiconductor Surfaces for Sensing Tight Junction Formation Enhanced by an Extracellular Matrix and Drug	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 3195 ~ 3202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.9b01635	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 合田達郎
2. 発表標題 プロトン漏出法による細胞膜透過性高分子のメカニズム解明
3. 学会等名 第50回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 合田達郎
2. 発表標題 リン脂質模倣両親媒性高分子による上皮バリア透過と物質輸送
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 合田達郎
2. 発表標題 リン脂質模倣細胞膜透過性ポリマーの展望
3. 学会等名 第28回次世代医工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 合田達郎
2. 発表標題 再生医療とバイオセンシングの接点
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 合田達郎
2. 発表標題 細胞pH摂動の現状と可能性
3. 学会等名 第27回次世代医工学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 波多野豊晃, 松元亮, 宮原裕二, 合田達郎
2. 発表標題 リン脂質模倣両親媒性ランダム共重合体の単層上皮細胞シート透過性
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 波多野豊晃, 松元亮, 宮原裕二, 合田達郎
2. 発表標題 pH摂動法による両親媒性リン脂質ポリマーの上皮透過評価
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 波多野豊晃, 合田達郎, 松元亮, 宮原裕二
2. 発表標題 弱酸刺激とpH応答性トランジスタとを組み合わせたpH摂動法によるタイトジャンクション形成評価法の開発
3. 学会等名 令和2年度E部門総合研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 波多野豊晃, 合田達郎, 宮原裕二, 森本展行, 山本雅哉
2. 発表標題 異なるカチオン構造を持つスルホベタインホモポリマーの細胞取り込みメカニズム評価
3. 学会等名 令和元年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Hatano, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Analysis of cellular internalization mechanism of sulfobetaine polymers with different cationic structures
3. 学会等名 4th International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eger Boonstra, Hiroaki Hatano, Tatsuro Goda, Satoshi Uchida, Horacio Cabral, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Mechanistic analyses of polymer/lipid-based gene transfection processes through membrane integrity assay using proton sensing transistor
3. 学会等名 4th International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Hatano, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Ultrasensitive assays for epithelial tight junction formation by monitoring proton leaks using ISFET
3. 学会等名 10th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE10) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 合田達郎
2. 発表標題 機能性表面の構築とバイオセンシング応用
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 波多野豊晃, 合田達郎
2. 発表標題 pH摂動法を用いたPMB30Wの上皮シート透過性評価
3. 学会等名 第26回次世代医工学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 波多野豊晃, 合田達郎, 松元亮, 宮原裕二
2. 発表標題 上皮タイトジャンクション形成の新規評価手法の開発
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 合田達郎, 波多野豊晃, 松元亮, 石原一彦, 宮原裕二
2. 発表標題 両親媒性リン脂質ポリマーの上皮細胞バリア透過挙動の解明
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 合田達郎, 石原一彦, 宮原裕二
2. 発表標題 pH摂動法を用いた両親媒性リン脂質ポリマー細胞膜透過機構の解明
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関