

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22976

研究課題名(和文) ナノ粒子が誘起する局所膜電位増強で細胞膜にナノスケールの孔をあける挑戦

研究課題名(英文) Nanoparticle-induced local membrane potential enhancement to form nanoscale pore in cell membrane

研究代表者

仲村 英也(Nakamura, Hideya)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00584426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞にダメージを与えずに、細胞の中に化合物を効率よく送達できれば、究極の細胞内送達手法となる。本研究では、申請者が最近見出した「ナノ粒子が誘起する局所膜電位増強によって細胞膜にナノ細孔があく」新奇な現象を利用した低侵襲送達手法を提案し、そのコンセプトを実験により実証した。具体的には、ナノ粒子と送達化合物が共存した環境下に微弱な電場を印可することで、送達化合物が低侵襲で細胞膜を透過する可能性を、平面脂質膜(人工細胞膜)実験により検討した。その結果、ナノ粒子存在下で微弱な電場を印加することで膜の透過性が向上することを実証した。また、物質透過前後で膜の質が同等であり、低侵襲な膜透過が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の外から中に化合物を送達する技術は、再生医療用細胞やバイオ医薬品製造など多くの医工学分野において重要な技術である。この際、細胞にダメージを与えずに、送達化合物が細胞膜を透過し、細胞内に送達されることが理想である。本研究は、微弱な電位とナノ粒子の電荷を重ね合わせることで引き起こされる局所膜電位増強を利用して、ナノスケールの細孔を開け、低侵襲での細胞外物質送達を検討した。その結果、ナノ粒子存在下で微弱な電場を印加することで膜の透過性が向上することを観測した。また、物質透過前後で膜の質が同等であることから低侵襲な物質の膜透過が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have found that even by a weak electric field, charged nanoparticles (NPs) can translocate across the cell membrane via non-disruptive pathway due to local enhancement of the membrane potential by adhesion of charged NPs. In this study, we hypothesized that this local enhancement of the membrane potential can facilitate the translocation of an extracellular substance across a cell membrane. We investigated our hypothesis by experiments using an artificial cell membrane system. A phospholipid bilayer, which is a main component of biological cell membrane, was prepared by a droplet contact method. As a result, translocation of model delivery substance (dextran) was confirmed by using a weak external electric field, which was lower than the membrane breakdown potential, with charged nanoparticles. Consequently, it was suggested that by combining the weak external electric field with charged nanoparticles the cell membrane permeability can be enhanced.

研究分野：化学工学

キーワード：細胞膜透過 細胞内導入 ナノ粒子 細胞膜 ナノバイオ界面

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の外から中に化合物を送達する技術は、再生医療用細胞やバイオ医薬品製造など多くの医工学分野において重要な技術である。この際、細胞にダメージを与えずに、送達化合物が細胞膜を透過し、細胞内に送達されることが理想である。この究極の送達手法に繋がりうる成果として、申請者は「微弱な電場の印加によってナノ粒子が細胞膜を直接透過する」現象を初めて見出した(Shimizu, Nakamura et al., Nanoscale, 2016)。このナノ粒子透過経路では、はじめに帯電性ナノ粒子が細胞膜に付着した状態に、膜が破壊される臨界電場より十分に小さい微弱な電場を印可する。すると、ナノ粒子と膜との接触界面で膜を貫通するナノサイズの細孔が自発的に形成する。電場を印可し続けると、粒子がこの細孔を通じて膜内部に侵入し、最終的に細胞膜を直接透過する。さらに興味深いことに、粒子が細胞膜を透過した後、膜貫通細孔は縮小・消失する。すなわち、細胞膜は自己修復する。このナノ粒子透過経路は、粒子径が数 nm のナノ粒子において観察された。ここで、これより大きい帯電性ナノ粒子を用いれば、膜破壊電位より十分に小さい微弱な印加電位にも関わらず、ナノ粒子の近傍で細胞膜をナノスケールで穿孔できるのではと考えた。すなわち、微弱な電場の ON/OFF で、細胞膜にナノサイズの細孔をあけて化合物の細胞内送達を低侵襲で精密に制御することが可能となり、究極の送達技術に向けたブレイクスルーとなると考えた。この提案するナノスケール細胞膜穿孔手法のコンセプトを実証するため、以下を本研究の目的とした。

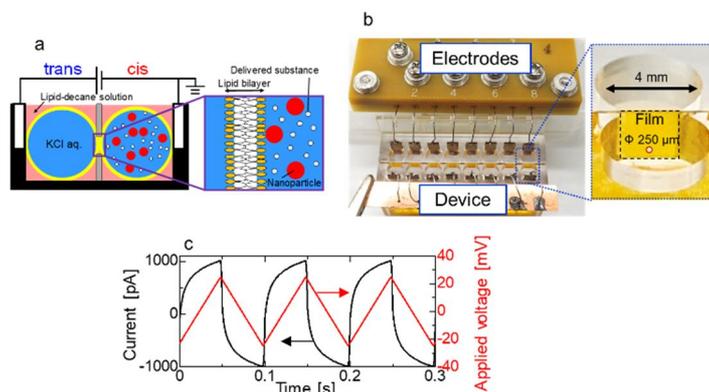
### 2. 研究の目的

提案するナノスケール細胞膜穿孔手法のコンセプトを実験により実証した。具体的には、ナノ粒子と送達化合物が共存した環境下に微弱な電場を印可することで、送達化合物が低侵襲で細胞膜を透過する可能性を、平面脂質膜(人工細胞膜)実験により検証した。さらに、微弱電位でも膜貫通細孔が形成する要因を探るために、ナノ粒子と細胞膜の接触界面電気現象を詳細に調べた。具体的には、分子動力学シミュレーションを用いて、ナノ粒子と細胞膜の接触界面における局所的な膜電位を計算した。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 人工脂質膜を用いた実験

Fig. 1a に作製した人工細胞膜の模式図を示す。リン脂質デカン溶液を各区画に注入し、その後 50 mM KCl 水溶液を注入して油中水滴を 2 個作製した。この油中水滴同士を接触させると、接触界面でリン脂質分子の疎水鎖同士を互いに向け合いリン脂質二重膜(人工細胞膜)が形成される。実験では cis 側(細胞外に相当)の液滴にナノ粒子とモデル送達物質を加え、一定電位を印加し trans 側(細胞外に相当)へのモデル送達物質の輸送を試みた。Fig. 1b に実験で用いたマルチウェルデバイスを示す。デバイスは直径 250  $\mu\text{m}$  の小孔が開いたフィルムを直径 4 mm の 2 つのウェルで挟み込んだ基本ユニットから成る(Fig. 1b)。この小孔で脂質二重膜が形成される。実験ではウェルに所定の電圧を印加した際に膜を介して流れる微小電流をアンプで測定し、得られる応答電流変化から膜の状態を定量的に評価した。具体的には Fig. 1c の赤線で示した三角波電圧を印加した際に測定される微小電流の矩形波(黒線)から、膜比容量を算出し、一定値以上であれば脂質二重膜が形成されていると判断した。リン脂質分子には双生イオン性の DOPC と負帯電性の DOPA を 3 : 1 に混合した脂質デカン溶液を用いた。ナノ粒子(濃度  $1.0 \times 10^6$  個/ $\mu\text{L}$ )には粒子径 55.1 nm、ゼータ電位 16.1 mV (50 mM KCl aq., 1mg/mL デキストラン共存下で測定)のポリスチレンラテックスを用いた。モデル送達物質には分子量 3000 ~ 5000 の蛍光標識デキストラン(FITC-Dex)を用いた。モデル送達物質の膜透過を評価する際は超微量分光光度計を用いた。trans 側の油中液滴をピペティングで採取したものを分光光度計に滴下し吸光度測定をした。



**Fig. 1.** Developed experimental set-up. (a) Schematic of droplet contact method. (b) Multi-well device and multi-channel electrode used in this study. (c) Applied voltage and measured current when bilayer was formed.

### 3.2 分子動力学シミュレーションを用いた接触膜電位計算

粗視化分子動力学法 (Coarse Grained-Molecular Dynamics: CG-MD) の計算結果を用いて、ナノ粒子と細胞膜の接触界面における膜電位を解析した。粗視化分子動力学法は、複数の原子をある 1 個の相互作用点 (粗視化サイト) で代表させ、この粗視化サイトのダイナミクスを追跡することで系全体の分子のダイナミクスを計算する手法である。これにより、本研究で必要となるナノ粒子、細胞膜、溶媒層からなる比較的大きな計算領域 (一辺が 20 nm 以上) を扱うことができる。粗視化サイト間の相互作用を規定する力場には、生体分子用に近年開発された MARTINI 粗視化モデル (Marrink et al., 2007) を用いた。モデル細胞膜には、生細胞膜の基本骨格である脂質二重膜を用いた。脂質二重膜は、両イオン性リン脂質および負帯電性リン脂質の 2 成分で構成し、一般に表面が負に帯電している実際の生細胞膜を模擬した。このモデル細胞膜を 2 つ配置し、互いに独立した 2 つの溶媒区画を設けて、これらを細胞の内外に見立てた。各溶媒区画には分極を考慮した粗視化水分子とナトリウムイオンおよび塩化物イオンを挿入し、生理食塩水と等張な 154 mM NaCl aq. とした。ナノ粒子には、正帯電性金ナノ粒子をモデルナノ粒子として用いた。ナノ粒子の粒子径は約 4 nm である。ナノ粒子は細胞膜の上部に配置し、計算の初期状態を得た。電場  $E$  の印加を計算に考慮するため、電荷  $q_i$  を有する系内の全粗視化サイトに外力  $F = q_i E$  を付与した。電場  $E$  は膜の法線方向下向きに印加した。粒子が細胞膜表面に付着した計算時間帯のデータから、全原子の軌跡を抽出した。これから、電荷密度分布を算出した。最後に、得られた電荷密度分布を入力値として、電位と電荷に関する基礎式 (ポアソン - ボルツマン式) を解き、最終的に界面の膜電位を算出した。

## 4. 研究成果

破壊強度以下の微弱な電位を印加して実験を行うために、はじめに膜が破壊される臨界電位を測定した。Fig. 2 に印加電位と応答電流の関係を示す。印加電位の増加に伴いある電位において急激に電流が増加した。このステップ状の電流変化が起こる臨界電位を膜破壊電位 ( $V_C$ ) とした。同様の電流測定を複数回行い、その中央値から膜破壊電位 ( $V_C$ ) を求めた結果、 $V_C = 459$  mV であった。

Fig. 3 に印加電位とデキストラン (Dex.) 透過割合の関係を示す。ここで透過割合は、cis 側のデキストラン初期濃度に対する一定電位印加後の trans 側のデキストラン濃度とした。印加電位が  $0.5V_C$  および  $0.7V_C$  の場合は、ナノ粒子の有無に関わらず約 25 % のデキストランが透過した。一方で  $0.3V_C$  を印加した場合はナノ粒子が存在しない系では一定電位印加後もデキストランが trans 側で検出されなかったのに対して、ナノ粒子共存下では約 22 % のデキストランが透過した。このことからナノ粒子の添加によって膜破壊電位の 3 割程度の微弱な電位でも膜透過性が向上することが分かった。

物質透過前後の膜の状態を評価するために、三角波電圧 ( $\pm 25$  mV) を印加した際の応答電流を示す (Fig. 4)。グラフ中の  $C$  は膜比容量を示している。膜破壊電位の 1.5 倍 ( $1.5V_C$ ) の一定電位を印加した場合 (Fig. 4a)、デキストラン透過後の応答電流は測定装置の上限に達した。これはデキストラン透過後に膜が破壊されたままであることを意味する。一方、膜破壊電位の 0.3 倍 ( $0.3V_C$ ) の微弱な一定電位を印加した場合 (Fig. 4b)、デキストラン透過後も応答電流は矩形波を示し、膜比容量もデキストラン透過前と同等であった。すなわち、デキストラン透過前後で同等の質の膜が観測された。このことから、低電位を印加した場合は低侵襲な物質の膜透過が起こることが示唆された。

Fig. 5 にデキストランの trans 側への透過を確認した膜に対して、種々の大きさの一定電位印加時の応答電流を観測した結果を示す。グラフより、時間 0 s で一定電位を印加すると同時に大きな電流 (突入電流) が流れていることが分かる。膜破壊電位の 1.5 倍の電位印加時は突入電流を観測した後に、電流が装置の測定下限に達していることが分かる。また、膜破壊電位の 0.7 倍の電位印加時は装置の測定限界に達するものの電流の絶対値が次第に減少していることが分かる。これは、脂質膜においてリン脂質が流動しており、そのことにより膜が局所的に破壊された部分が次

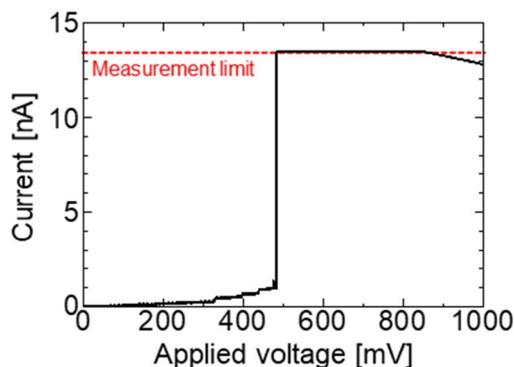


Fig. 2 Measured current as function of applied voltage.

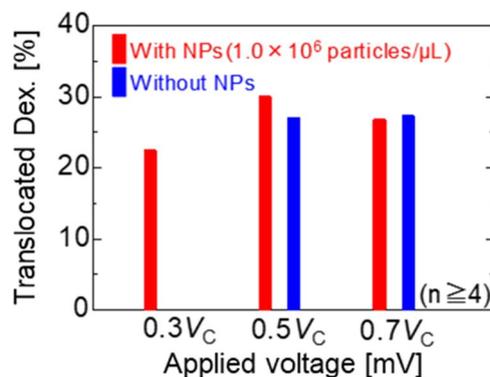


Fig. 3 Translocated Dex. vs. applied voltage.

第に小さくなったためと推察される。そして、膜破壊電位の 0.3 倍、0.5 倍の電位印加時は比較的小さい電流値を観測していることが分かる。このことから低電位ほど、膜に対するダメージが小さいことが示唆された。この得られた応答電流から、脂質膜の欠損を定量的に評価した。具体的には、脂質膜に生じた欠損をバルク水で満たされた 1 つの円柱状の細孔であると仮定して、脂質膜に生じた欠損の見かけの細孔径を算出した。その結果、膜破壊電位の 0.3 倍の電位を印加した際は、直径が 80 nm の細孔が形成されていると推定された。実験で用いたナノ粒子の粒径は 55 nm 前後であることから、この電位ではナノ粒子が透過するのは困難であることが示唆された。一方、デキストランの大きさについて考えると、分子量は 3000-5000 の場合、1 分子の大きさは最大で約 9-16 nm 程と推算された。この大きさの比較から、デキストランの方がナノ粒子より透過しやすいことが示唆された。また、膜破壊電位の 0.5 倍の電位を印可した際の細孔径の推算値は約 80 nm であったが、膜破壊電位の 0.7 倍の電位を印加した際の細孔径の推算値は約 230 nm であった。これより、印可電位を変化させることで膜の透過性を制御できる可能性が示唆された。

ナノ粒子と細胞膜表面の接触界面における局所的な膜電位を解析した (Fig. 6)。Fig. 6B に、ナノ粒子を含まない計算系に電場を印加した際の膜電位分布を示す。結果より、電位を印加しない場合、膜電位はおおよそ 0 mV であったのに対し (Fig. 6A)、電場を印加すると、印加膜電位 (この場合、184 mV) よりも高い約 300 mV の膜電位が発生することが分かった。これは、溶媒中のイオンの電気泳動による膜表面の電荷のインバランスに起因している。すなわち、外部電場の印加によって溶質イオンは電気泳動するが、細胞膜を透過できないため、カチオン ( $\text{Na}^+$ ) は細胞膜の上側 (外層) 表面に、アニオン ( $\text{Cl}^-$ ) は下側 (内層) 表面に局在する。その結果、細胞膜表面電荷のインバランスが生じ、付加的な膜電位が発生したと考えられる。Fig. 6C, D に、ナノ粒子が細胞膜表面に付着した際の膜電位分布を示す。結果より、ナノ粒子と細胞膜との接触界面においては、印可膜電位にナノ粒子の表面電位が重畳することで、膜電位が局所的に増強されることが明らかとなった (Fig. 6C の  $\Delta\psi_{\text{NP}}$ )。以上の結果より、ナノ粒子と細胞膜の接触界面においては局所的に高い膜電位が発生することが分かった。最後に、この接触界面における局所的膜電位と膜破壊が起こる臨界電位を比較すると、接触界面の膜電位は臨界電位を超えていることが分かった。すなわち、細胞膜の破壊が起こらない微弱な電場を印可したにも関わらず、ナノ粒子と細胞膜の接触界面における局所的な膜電位は、膜穿孔に必要な臨界電位を超えうることが示された。

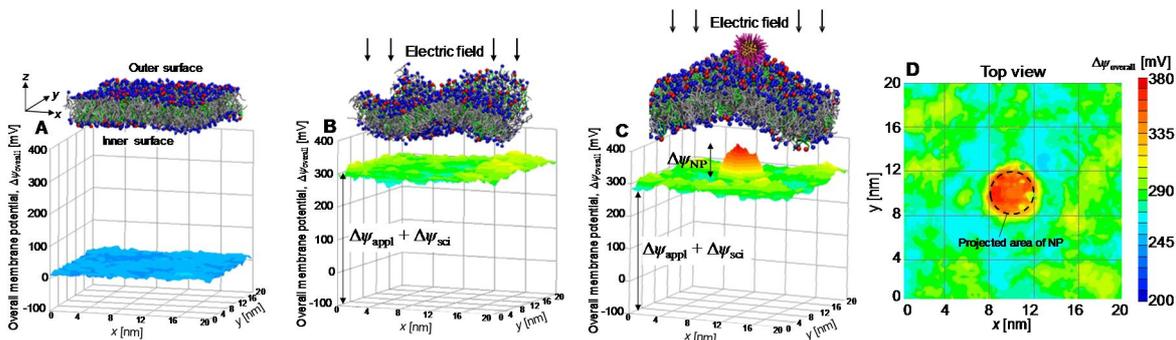


Fig. 6. Typical contour maps of the calculated overall membrane potential along the membrane surface: (A) without external electric field and without NP; (B) under external electric field without NP; (C, D) under external electric field with NP adhesion on the membrane surface.  $\Delta\psi_{\text{NP}}$  is the enhanced membrane potential arising from the NP adhesion.

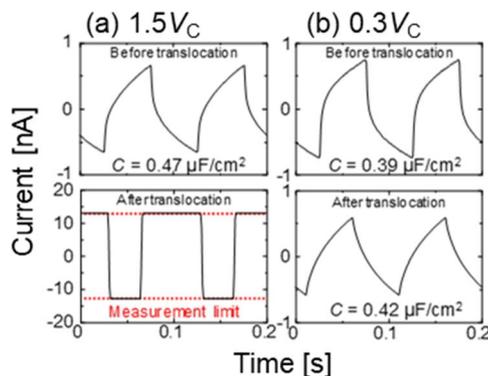


Fig. 4 Membrane states before/after translocation of Dex.

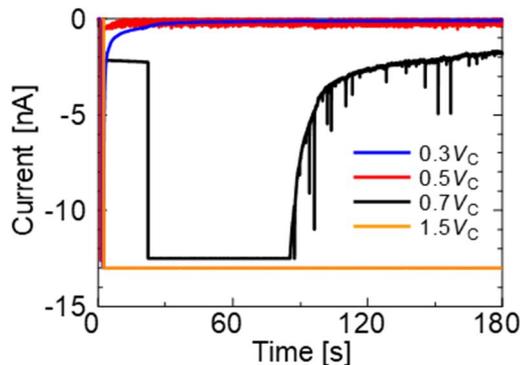


Fig. 5 Current response when applied constant voltage.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Hideya Nakamura, Kyohei Sezawa, Masataka Hata, Shuji Ohsaki and Satoru Watano	4. 巻 21
2. 論文標題 Direct translocation of nanoparticles across a model cell membrane by nanoparticle-induced local enhancement of membrane potential	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 18830-18838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9CP02935D	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 仲村英也	4. 巻 57
2. 論文標題 微弱な電場印加によるナノ粒子の細胞膜透過	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 粉体工学会誌	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4164/sptj.57.25	査読の有無 無
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 Yoko Ikeda, Hideya Nakamura, Shuji Ohsaki and Satoru Watano	4. 巻 23
2. 論文標題 Direct translocation of a negatively charged nanoparticle across a negatively charged model cell membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 10591 ~ 10599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0CP06278B	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8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 仲村英也
2. 発表標題 ナノ粒子の細胞膜直接透過現象の解析と制御
3. 学会等名 材料化学システム工学討論会2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲村英也
2. 発表標題 ナノ粒子の細胞膜透過性を評価します
3. 学会等名 APPIE産学連携フェア2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideya Nakamura, Kyohei Sezawa, Masataka Hata, Shuji Ohsaki, Satoru Watano
2. 発表標題 Direct translocation of nanoparticle across model cell membrane by nanoparticle-induced local enhancement of membrane potential
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Hata, Hideya Nakamura, Shyuji Ohsaki, Satoru Watano
2. 発表標題 Experimental investigation of nanoparticle translocation across cell membrane under weak electric potential
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Ikeda, Hideya Nakamura, Shuji Ohsaki, Satoru Watano
2. 発表標題 Direct translocation of negatively charged nanoparticle across negatively charged cell membrane
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡村拓海, 仲村英也, 大崎修司, 綿野哲
2. 発表標題 ナノ粒子と微弱な電場印加を利用した細胞膜透過性の向上
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡村 拓海, 仲村 英也, 大崎 修司, 綿野 哲
2. 発表標題 ナノ粒子と微弱な電場印加を利用した細胞膜透過性の向上
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝奥 朱音, 仲村 英也, 大崎 修司, 綿野 哲
2. 発表標題 アルカンチオール修飾金ナノ粒子の粒子設計と細胞膜透過との関係
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021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
研究協力者	綿野 哲  (Watano Satoru)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	大崎 修司  (Ohsaki Shuji)		

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