

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19007

研究課題名（和文）細胞膜ナノディスクを自発形成する高分子のデザインとナノキャリア応用

研究課題名（英文）Molecular design of the membrane-active polymers for spontaneous formation of cell-membrane nanodiscs and their application to nano carriers

研究代表者

安原 主馬（Yasuhara, Kazuma）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：90545716

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ナノキャリアを用いた細胞への分子輸送は、遺伝子治療や薬物送達システムなどの分子治療において重要な役割を担う技術である。本研究では、デザインされた高分子によって形成された脂質ナノディスクを用いて、特定の細胞小器官へ選択的に分子輸送するナノキャリアを構築することを目的とした。本研究で作成したナノディスクは、従来広く用いられているキャリアであるリポソームと比較して、高効率に細胞へと分子輸送できることが明らかになった。また、抗がん剤を内包したナノディスクを用いることで、その活性を促進できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質分子によって構成されるナノキャリアは、カプセル状のリポソームがこれまでその大半を占め、異なる形態を有する脂質分子集合体を用いたキャリア開発は限定的であった。本研究では、リポソームとは異なる形態を有するナノディスクを新たなキャリアとして用いるアプローチによって、リポソームをしのぐ分子輸送特性が実現された。本研究の知見は、年々その重要性を増している分子治療や薬物送達システムの確立において大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Molecular transport to cells using nanocarriers plays a crucial role in molecular therapies such as gene therapy and drug delivery systems. In this study, we aimed to construct nanocarriers that selectively transport molecules to specific cellular organelles using lipid nanodiscs formed by designed polymers. The nanodiscs developed in this study were shown to transport molecules to cells more efficiently compared to liposomes, which are widely used as a conventional carrier. Furthermore, it was revealed that encapsulation of anticancer drugs in nanodiscs enhanced their biological activity.

研究分野：生体高分子科学

キーワード：ナノディスク 両親媒性ポリマー 脂質二分子膜 ドラッグデリバリー 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

ナノキャリアを用いた細胞への分子輸送は、遺伝子治療や薬物送達システムなどの分子治療において重要な役割を担う技術である。近年では、臓器や組織といったマクロな輸送制御にとどまらず、細胞内において特定の小器官を標的とするミクロなスケールで動態を制御できる方法論が望まれている。これまでに、界面活性剤、ポリマー、無機ナノ粒子など、さまざまな材料が分子送達のためのナノキャリアとして利用されてきた。中でも、脂質分子を基本構成要素とするナノキャリアは、調製が容易であること、水に不溶な疎水性薬剤分子の高い封入効率を有すること、優れた生体適合性を示すことから広く研究が進められてきた。しかし、脂質分子によって構成されるナノキャリアは、カプセル状のリポソームがこれまでその大半を占め、異なる形態を有する脂質分子集合体を用いたキャリア開発は限定的であった。

研究代表者はこれまでに、カチオン性及び疎水性側鎖をもつ両親媒性のポリメタクリレート共重合体が、脂質分子と複合化することで自発的にナノディスクを形成することを見いだしている。従来のリポソームとは異なる形状を有する新たな脂質系ナノキャリアとして、両親媒性のポリメタクリレート共重合体が形成する脂質ナノディスクを用いた手法を開拓するため、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、デザインされた高分子によって形成された脂質ナノディスクを用いて、特定の細胞小器官へ選択的に分子輸送するナノキャリアを構築することを目的とした。研究代表者がこれまで開発した手法は、両親媒性ポリメタクリレート共重合体を脂質二分子膜に添加するだけで、直径 5~40 nm の均一なナノディスクを自発的に形成することができる。脂質ナノディスクは、その内部に脂質二分子膜構造を保持しており、疎水性コア部分において脂溶性低分子(薬剤など)を効率よく保持できるだけでなく、脂質系ナノキャリアの特徴である高い生体親和性が期待される。本研究では、ナノディスクによる分子輸送の基盤技術を確立するとともに、ナノディスク構造の制御によって、特定の細胞小器官へ選択的に分子輸送できるナノキャリアの実現を目指した。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、1)ナノディスク形成ポリマーの合成、2)脂質膜の断片化によるナノディスク形成と評価、3)ナノディスクの毒性評価と細胞小器官に対するデリバリー評価の3点に焦点を絞って研究を実施した。具体的な内容を以下に示す。

(1) ナノディスク形成ポリマーの合成

脂質分子と複合体を形成することで自発的にナノディスクを形成できるポリマーを合成した。具体的には、ポリメタクリレートを分子骨格として、親水性および疎水性側鎖を導入した種々のランダム共重合体をラジカル重合によって合成した。疎水性側鎖として、ブチル基を、親水性側鎖としてカチオン性のコリン基または双性イオン型のホスホコリン基を導入した。得られたポリマーは、¹H NMR によって同定を行った。

(2) 脂質膜の断片化によるナノディスク形成と評価

(1)で得られたポリマーを対象として、リン脂質リポソームの直接断片化によるナノディスク形成を行った。得られたナノディスクは、動的光散乱法(DLS)による粒径測定を行った後、ネガティブ染色 TEM および Cryo-TEM による可視化を行った。加えて、ナノディスクに内包された脂質膜の物性を示差走査熱量測定(DSC)によって評価した。

(3) ナノディスクの毒性評価と細胞小器官に対するデリバリー評価

作成したナノディスクを対象として、培養細胞(HeLa 細胞)に対する作用を試験した。はじめに、CCK-8 アッセイによる細胞生存率試験を行うことで、ナノディスクの細胞毒性を評価した。続いて、蛍光色素を標識したナノディスクを用いることで、細胞への取り込み量を定量化するとともに、共焦点レーザー顕微鏡観察によって細胞内動態の可視化を行った。さらに、抗がん剤であるパクリタキセル(PTX)を導入したナノディスクを作成し、実際に抗がん活性の誘導が可能であるかを確かめた。

4. 研究成果

(1) 両親媒性ポリメタクリレート誘導体の合成と脂質ナノディスクの形成

合成したポリマーの¹H NMR 測定より、数平均分子量約 5,800g・mol⁻¹、平均疎水性モノマー割合 0.49 のカチオン型両親媒性ポリメタクリレート誘導体および数平均分子量約 7,500g・mol⁻¹、平均疎水性モノマー割合 0.61 の双性イオン型両親媒性ポリメタクリレート誘導体を得たことを確認した。カチオン型ポリメタクリレート誘導体を 1, 2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospholcholine (DPPC) リポソームに添加したサンプルの DLS 測定を行ったところ、流体力学的直径(D_{hy})が十数ナノメートルの均一な分子集合体を形成することがわかった(図 1A)また、脂質に対して添加するポリマー量を増加することで、より小さな集合体を形成することを

DLS 測定によって確認した(図 1B)。得られた脂質-ポリマー混合試料の TEM 観察を行ったところ、均一なディスク状分子集合体の形成が確認された(図 1C)。縁方向に配向したディスクから見積もった厚みは約 5 nm であったことから、それぞれのディスクは単一の脂質二分子膜から形成されていることが示唆された。また、得られたナノディスク試料の DSC 測定を行ったところ、DPPC のゲル-液晶相転移に対応する吸熱ピークが観測された (図 1D)。これら一連の測定に関して、双性イオン型両親媒性ポリメタクリレート誘導体においても同一の結果が確認された。以上のことから、両親媒性ポリメタクリレート誘導体を用いることで、脂質二分子膜構造および膜物性を維持した脂質ナノディスクを形成できることを明らかにした。

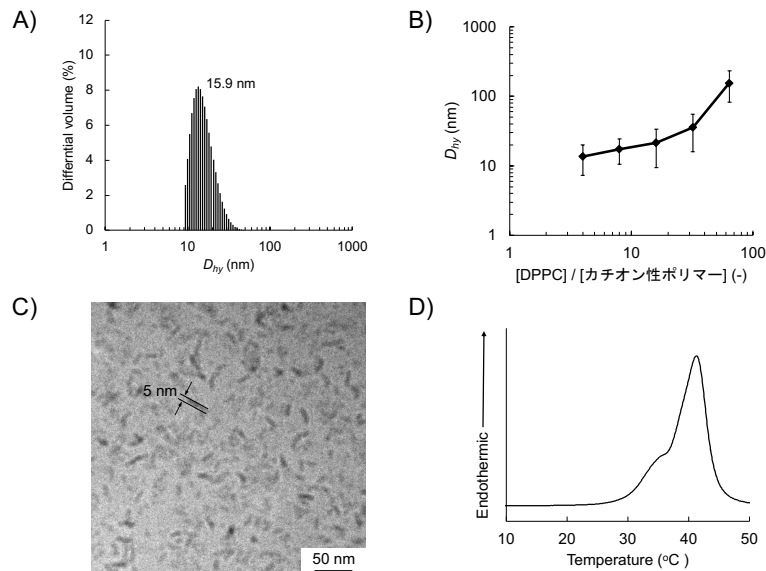


図 1. 脂質ナノディスクのキャラクタリゼーション

- A) DLS による $[DPPC] / [カチオン型ポリマー] = 8$ の粒径評価
- B) 流体力学的直径(D_{hy})の脂質/ポリマー比依存性
- C) $[DPPC] / [カチオン型ポリマー] = 8$ で形成されたナノディスクの cryo-TEM 像
- D) $[DPPC] / [カチオン型ポリマー] = 8$ で形成されたナノディスクの DSC サーモグラム

(2) ナノディスクの毒性と細胞取り込み評価

はじめに、ナノディスク自体が示す細胞毒性について HeLa 細胞を対象に CCK-8 アッセイにより評価したところ、ポリマー濃度換算の 50%致死濃度(LC₅₀)がカチオン型ナノディスクの場合 $6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、双性イオン型ナノディスクの場合は $>100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ となった。このことから、ナノディスクの毒性は用いるポリマーの親水基に依存することがわかった。続いて、蛍光色素を修飾したカチオン型ナノディスクを用いて細胞への取り込みを評価した。ナノディスクは細胞毒性を示さない低濃度であっても効率的に取り込まれることがわかった。細胞による取り込み効率は、ポリマーと脂質の混合比によって影響を受け、より小さなナノディスクほど高い取り込み効率を示すことがわかった(図 2A)。加えて、リポソームでは取り込みが誘導されない脂質濃度であってもナノディスクの取り込みが生じることを確認した(図 2B)。また、取り込みの温度依存性を評価したところ、37°Cおよび4°Cいずれの場合でも取り込みが見られ、前者の効率がより高くなることが確認された(図 2A)。このことから、ナノディス

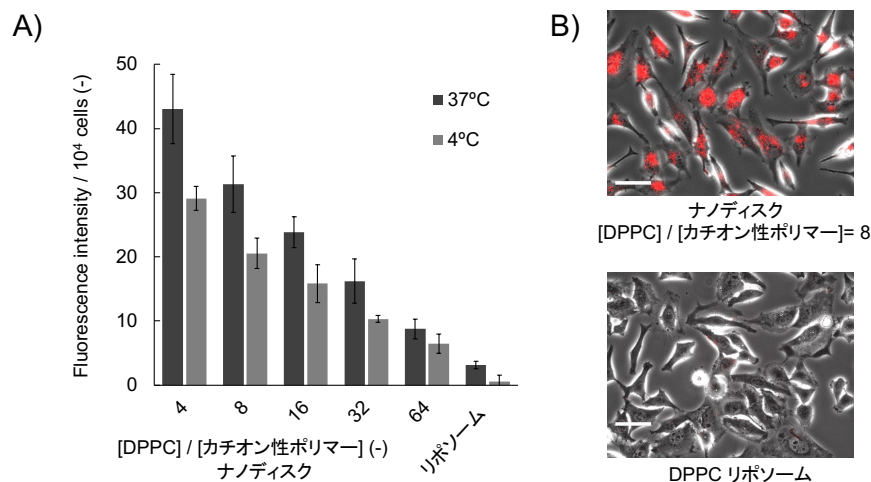


図 2. ナノディスクの細胞取り込み

- A) 蛍光測定による細胞取り込み評価, B)細胞取り込みの蛍光顕微鏡観察像

クはエンドサイトーシスをはじめとする ATP 依存的な取り込み経路のみならず、受動輸送によっても細胞内へと取り込まれることが確認された。

続いて、ナノディスクの細胞内局在について共焦点レーザー顕微鏡観察によって評価を行った。添加直後(5分後)は細胞質全体にナノディスクが分布した(図 3A)。一方で、添加1時間後においては細胞核近傍にナノディスクが局在することが明らかになった(図 3B)。また、より大きなナノディスクを用いたところ、核近傍への輸送は誘導されず、細胞質にナノディスクは留まることがわかった(図 3C)。これらの結果より、ナノディスクのサイズを調整することで、細胞内において特定の小器官(核)へと輸送可能であることが示唆された。

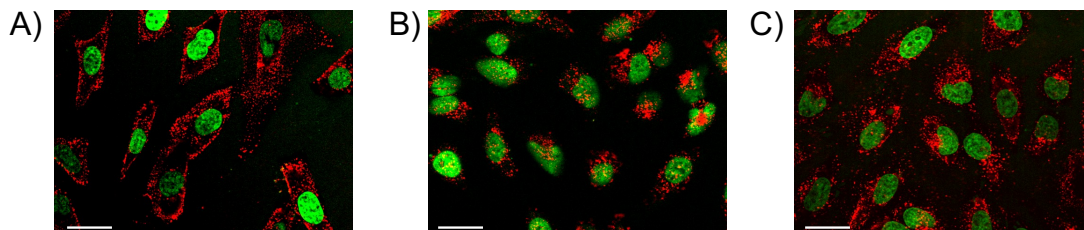


図 3. HeLa 細胞の共焦点レーザー顕微鏡像 (ナノディスクおよび細胞核を Rhodamine-DHPE(赤)および NucleoSeeing®(緑)によってそれぞれ染色)

- a) [DPPC]/[カチオン型ポリマー]=8 で形成されたナノディスクの添加 5 分後
- b) [DPPC]/[カチオン型ポリマー]=8 で形成されたナノディスクの添加 1 時間後
- c) [DPPC]/[カチオン型ポリマー]=32 で形成されたナノディスクの添加 1 時間後

(3) PTX 内包ナノディスクによる抗がん活性の誘導

はじめに、PTX 内包リポソームに対してポリマーを添加することで PTX 内包ナノディスクを作成した。PTX の内包によってナノディスクの形態が変化しないことを TEM 観察から、ナノディスク形成によって内包 PTX 量が変化しないことを紫外可視吸収スペクトルからそれぞれ確認した。これらの結果より、ナノディスクは高い薬剤分子保持能を示すことが明らかになった。PTX 内包ナノディスク及びリポソームを HeLa 細胞へ添加したところ、ナノディスクはリポソームと比較して顕著に低い細胞生存率を示した(図 4)。このことから、PTX をナノディスク化することにより、その抗がん活性を向上させることができることが明らかになった。

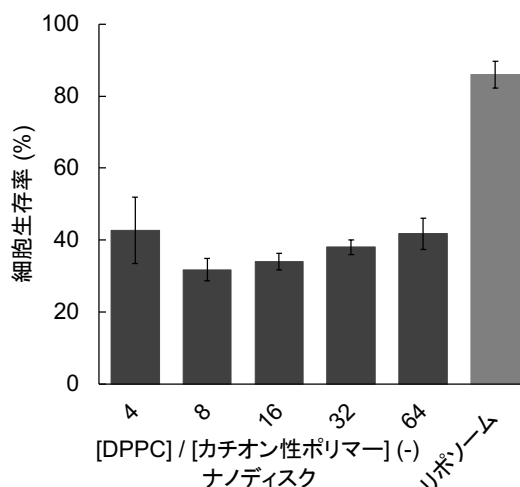


図 4. PTX 内包ナノディスクおよびリポソームによる抗がん活性の誘導

以上から、両親媒性のポリメタクリレートによって形成される脂質ナノディスクは、高い細胞取り込み能を示し、それに伴って内包薬剤分子の活性を促進できることが明らかになった。分子治療や薬物送達システムにおいて、本研究で評価したナノディスク技術は新しいキャリアとして将来重要な役割を果たす可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hao Jinyu, Ishihara Mika, Rapenne Gwenael, Yasuhara Kazuma	4. 巻 14
2. 論文標題 Lipid nanodiscs spontaneously formed by an amphiphilic polymethacrylate derivative as an efficient nanocarrier for molecular delivery to intact cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 6127 ~ 6134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3ra07481a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kazuma Yasuhara, Kenichi Morigaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Creation of supramolecular biomembrane by the bottom-up self-assembly: Where material science meets biophysics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e190043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v19.0043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Haruko, Sovadinova Iva, Yasuhara Kazuma, Vemparala Satyavani, Caputo Gregory A., Kuroda Kenichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Biomimetic antimicrobial polymers-Design, characterization, antimicrobial, and novel applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology	6. 最初と最後の頁 e1866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/wnan.1866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 安原主馬	4. 巻 7
2. 論文標題 生体膜に作用する機能性分子のバイオメティック・デザイン	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acc. Mater. Surf. Res.	6. 最初と最後の頁 83-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Manami, Zappala Emanuele, Caputo Gregory A., Kikuchi Jun-ichi, Najarian Kayvan, Kuroda Kenichi, Yasuhara Kazuma	4. 巻 37
2. 論文標題 Mechanistic Study of Membrane Disruption by Antimicrobial Methacrylate Random Copolymers by the Single Giant Vesicle Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 9982 ~ 9995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.1c01047	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 該当する

1. 著者名 Yasuhara Kazuma, Tsukamoto Manami, Kikuchi Jun-ichi, Kuroda Kenichi	4. 巻 -
2. 論文標題 An Antimicrobial Peptide-Mimetic Methacrylate Random Copolymer Induces Domain Formation in a Model Bacterial Membrane	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Membrane Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00232-022-00220-6	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 該当する

1. 著者名 安原主馬	4. 巻 46(1)
2. 論文標題 アミロイドタンパク質解析のための脂質ナノディスク	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 膜(MEMBRANE)	6. 最初と最後の頁 32 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 安原主馬	4. 巻 48(3)
2. 論文標題 脂質膜のナノディスク化技術と熱測定への応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 熱測定	6. 最初と最後の頁 108 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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14件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安原主馬
2. 発表標題 細胞膜の構造・機能を制御するバイオミメティック高分子の探索
3. 学会等名 最先端研究装置とデータの共有が創出するマテリアル研究（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Jinyu Hao, Gwenael Rapenne, Kazuma Yasuhara
2. 発表標題 Cellular uptake of spontaneously formed lipid nanodiscs and its size effect
3. 学会等名 第72回高分子学会年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安原主馬, Jinyu Hao, Rapenne Gwenael
2. 発表標題 脂質ナノディスクのドラッグキャリア応用
3. 学会等名 第33回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安原主馬, Jinyu Hao, Rapenne Gwenael
2. 発表標題 両親媒性高分子が形成する脂質ナノディスクによる分子デリバリー
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安原主馬, 山中諒, 菊池純一, 黒田賢一
2. 発表標題 両親媒性ポリマーによるジャイアントベシクル曲率の認識
3. 学会等名 第74回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安原主馬
2. 発表標題 合成高分子で膜タンパク質をつくる
3. 学会等名 第2回 発動分子科学サロン 「発動分子と分子集合体」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuma Yasuhara
2. 発表標題 Protein-mimetic design of membrane-active polymers
3. 学会等名 India-International Science Forum(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安原主馬
2. 発表標題 両親媒性高分子による膜活性ペプチドのミメティクス
3. 学会等名 分子サイバネティクス・超越分子システム合同シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安原主馬, Jinyu Hao, 光好佑磨, Rapenne Gwenaël
2. 発表標題 両親媒性高分子による脂質ナノディスク形成とナノキャリア応用
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安原主馬
2. 発表標題 Lipid nanodisc as a minimal model membrane formed with synthetic polymers
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安原主馬
2. 発表標題 細胞膜をあやつるポリマーをつくる -膜タンパク質をヒントにした人工分子のデザイン-
3. 学会等名 第177回 東海高分子研究会 講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安原主馬
2. 発表標題 細胞膜の構造・機能制御を目指した両親媒性分子のバイオミメティック・デザイン
3. 学会等名 第35回 九州コロイドコロキウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安原主馬
2. 発表標題 合成両親媒性分子による脂質膜プラットフォーム
3. 学会等名 分子サイバネティクス 第6回領域セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安原 主馬 岸本 直子, 光好 佑麿, 荒木田 臣, ラッペン ゲナエル
2. 発表標題 両親媒性ポリマーによる脂質二分子膜のナノディスク化と膜物性
3. 学会等名 第72回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 K. Yasuhara, K. Omoto, T. Nishino, G. Rapenne (Ed. O. Azzaroni, K. Ariga)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 589
3. 書名 Concepts and design of materials nanoarchitectonics	

1. 著者名 K. Yasuhara (Ed. S. Suetsugu)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 451
3. 書名 Plasma Membrane Shaping	

〔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			
米国	University of Michigan			
フランス	CEMES-CNRS	University of Toulouse		