

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390007

研究課題名(和文) タンパク質内包光開裂性ナノ粒子を用いた細胞内タンパク質の制御と病態モデルの構築

研究課題名(英文) Development of a control method of protein function within cell using photodegradable nanoparticles and its medical applications

研究代表者

加藤 大(Kato, Masaru)

東京大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30332943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内反応の詳細を調べるために、機能性物質を内包した状態で細胞膜を通過し、光照射によって内包物質を放出する光応答性ナノ粒子を開発した。本ナノ粒子を用いて、細胞内で機能するタンパク質の量を変化させ、細胞の応答反応の違いを比較した。機能性物質内包光応答性ナノ粒子は、細胞内反応の解析に有効なツールになることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To examine the cellular reaction, we developed photodegradable nanoparticles that penetrate cellular membrane with encapsulated molecule and released the encapsulated molecule by light stimulus. We compared the cellular response after releasing the different amount of protein within cell using the nanoparticles. Our results indicated that the nanoparticles is a useful tool for the study of cellular reaction.

研究分野：分析科学

キーワード：ナノ粒子 タンパク質 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

生体内反応に関わる主要な物質として、核酸 (DNA, RNA)、タンパク質、低分子代謝化合物などが知られており、これらの物質を網羅的に解析するゲノム、プロテオーム、メタボローム解析が、急速に進展し、生体内にある瞬間に存在する生体物質の量が測定され、生命活動に關与する生体物質の役割などが明らかとなってきている。生体内物質の役割を知る上で存在量の測定に加えて、その量を変動させた時の影響を知ることができると機能解明は大幅に進展する。

我々は、タンパク質を光応答性ナノ粒子に取り込むことで不活化し、光を照射することでナノ粒子を崩壊させ、内包されていたタンパク質を放出し、機能させるといふナノ粒子を用いたタンパク質の機能制御法を開発した。

## 2. 研究の目的

本研究では、光によって機能発現するタンパク質の「数量」も制御可能な手法を開発し、生体内反応の定量的な解析を行う。本研究により、細胞内反応の詳細が明らかとなり、生命活動の制御原理の解明や難治疾患の治療薬の開発につながることを期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 粒子径を制御したタンパク質内包ナノ粒子の調製法の開発

異なった条件でナノ粒子を調製し、DLS で粒子径や粒度分布を測定し、調製条件がナノ粒子の生成に与える影響を調べた。

(2) 機能性物質内包ナノ粒子の緩和な調製法の開発

新規モノマーとしてシリカ誘導体を開発し、本モノマーを利用して機能性物質内包ナノ粒子を調製した。本ナノ粒子を用いて、光照射による細胞内での物質の放出制御を試みた。

(3) ナノ粒子による細胞内カススペース量の調節

異なった量のカススペースを細胞内で放出した際の細胞の応答反応を比較した。

## 4. 研究成果

(1) 粒子径を制御したタンパク質内包ナノ粒子の調製法の開発

本検討では、タンパク質内包ナノ粒子の調製条件がナノ粒子の形成に与える影響について調べた。

**攪拌**：ナノ粒子の調製溶液を攪拌せず、静置すると粘性は増加したが、動的散乱装置 (DLS) ではナノ粒子の存在が確認できな

かった。攪拌 (ボルテックス) の強度を 2-10 の範囲で変化させ、20 分間攪拌した時に調製されるナノ粒子の大きさを比較すると強度の弱い 2 の時には 120nm 程度のナノ粒子に加え、40nm の粒子も存在し、粒子径の異なった 2 種類のナノ粒子が存在した。攪拌強度が 5 と 10 の時には、粒度分布が 1 つの山になり、それぞれ平均粒子径は 100 と 60nm であった。以上の結果から、強い強度での攪拌が粒子径の揃ったナノ粒子の調製には必要であり、攪拌強度が強いほど、粒子径の小さいナノ粒子が調製された。

**内包物の種類、量**：内包物質としてトリプシン、フルオレセインを選択し、トリプシンに関しては、その濃度も変化させた。比較のために何も内包していないナノ粒子も調製した。これらのナノ粒子の平均粒子径や粒度分布はほぼ同じであった。つまり、内包物の種類や濃度を変化させてもナノ粒子の平均粒子径や粒度分布は変化しなかった。つまり本ナノ粒子の場合は、内包物質の種類や量を変化させても、生成するナノ粒子の平均粒子径や粒度分布は変化しないことから、粒子径が同じで内包物のみが異なるナノ粒子の調製が容易であると考えられる。

**pH**：溶液の pH を 3-11 の範囲で変化させナノ粒子を調製した結果、いずれの溶液においてもナノ粒子が生成し、生成したナノ粒子の平均粒子径や粒度分布はほぼ同一であった。つまり本ナノ粒子は、広い pH 範囲で調製可能であり、調製時の pH はナノ粒子の生成に大きな影響を与えていない。したがって、広い pH 範囲で調製可能な本ナノ粒子は、いろいろな物質を内包したナノ粒子の調製が可能であると考えられる。

**モノマー濃度**：モノマー濃度を 0.2-0.3mg/mL の範囲で変化させたところ、モノマー濃度が 0.2mg/mL の時には粒子径 50nm のナノ粒子が調製された。一方、0.3mg/mL の時には粒子径 100nm のナノ粒子が調製された。つまりモノマー濃度が高くなるほど、調製されるナノ粒子の粒子径が大きくなった。つまりモノマー濃度は、ナノ粒子の粒子径に大きな影響を与えていた。

**APS 濃度**：ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS) 濃度を 15-30nm の範囲で変化させたところ、APS 濃度が濃くなるほど粒子径が大きくなった。つまり APS 濃度はナノ粒子の粒子径に大きな影響を与えていた。

**イオン強度**：イオン強度を 0.01-1M の範囲で変化させた。イオン強度の薄い 0.01M の条件では 130nm のナノ粒子が調製され、濃い 1M の条件では 50nm 程度のナノ粒子が調製された。イオン強度を 0.01M から 0.1M に 10 倍変化させた時と比較して、0.1M から 1M に変化させた時の方が粒子径は大きく変化した。つまり濃度によって、粒子径に与える影響が大きく変化した。イオン強度を 0.01-0.1M 付近では粒子径に大きな影響を与えないので、内包物質の濃度や種類を変化させても、生成す

るナノ粒子の大きさはほぼ同じと考えられる。一方、濃い濃度範囲(0.1-1M 付近)では、イオン強度によって粒子径が変化する傾向が見られた。

**静置温度**：反応液を攪拌後、冷蔵庫の中や 10 度で 15 分間静置しても DLS でナノ粒子の存在が確認できなかった。しかし静置温度を室温や 30 度にするると 50nm のナノ粒子が DLS で検出された。40、50 度と温度を上昇させると、粒子径が増加すると共に、平均粒子径の異なった 2 種類のナノ粒子が調製されるようになった。つまり温度を上げるほど粒子径は大きくなるが、ナノ粒子の粒度分布も広がった。

**静置時間**：攪拌直後(静置 0 分)の反応液を DLS で測定してもナノ粒子の存在が確認できなかった。静置時間を 20、30 分、1 時間と変化させたところ、30 分以上静置した反応液からナノ粒子が検出され、静置時間を長くするほど粒子径が大きくなった。つまり静置時にナノ粒子の成長が起こり、粒子径が大きくなった。静置溶液に水を添加すると、それ以後は静置しても、ナノ粒子の粒子径に変化は見られなかった。水の添加によって、未反応のモノマーが希釈され、ナノ粒子との反応が起こりにくくなり、その結果、ナノ粒子の成長が止まったと考えられる。

このように反応条件を調節することで、粒子径の揃ったタンパク質内包ナノ粒子を 20 - 200 nm の粒子径範囲で調製する手法を確立した。

## (2) 機能性物質内包ナノ粒子の緩和な調製法の開発

ラジカル重合反応によってこれまでナノ粒子の調製を行ってきたが、より緩和な条件でのナノ粒子の調製を目指し、脱水縮合反応でのナノ粒子の調製を試みた。

最初にローダミンを内包した光応答性ナノ粒子の調製を試みた。まずテトラエトキシシラン (TEOS) の加水分解反応により、粒子径 27 nm のシードナノ粒子を調製し、その後、ローダミン、光開裂性シラン、TEOS を添加することでローダミン内包光応答性シリカナノ粒子を作製した。比較のために、光開裂性シランを添加しない条件でもナノ粒子を調製した。調製したナノ粒子の大きさや形状を DLS や透過型電子顕微鏡 (TEM) で測定した。その結果、いずれも大きさ約 50nm で粒度分布の狭い、球形のナノ粒子であった。

次に、2 種類のナノ粒子に光を照射した際に放出されたローダミン量を比較した。光開裂性シランを含まないナノ粒子では、光の照射の有無に関わらず、ローダミンの放出はほとんど見られなかった。一方、光開裂性シランを含むナノ粒子は、光照射前にはローダミンの放出が殆ど見られなかったのに対して、光照射によって蛍光量が約 6.5 倍に増加した。放出されたローダミンは、ナノ粒子の調製時

にアルコキシシランの重合反応によって形成される網目構造によってナノ粒子に内包されると予想され、本ナノ粒子は様々な物質を内包し、光刺激によって放出することが可能であると考えられる。

次に本手法の汎用性を示すために、ラジカル重合反応によって退色し、光により放出制御が困難であったナイルブルーと propidium iodide (PI) の放出制御を試みた。ナイルブルーと PI も、光照射によってナノ粒子から放出され、放出量はそれぞれ 5、3 倍であった。このように従来の PEG を用いたゲルでは、制御が難しかった物質の制御も可能になり、本手法の汎用性が示された。

シリカナノ粒子自身は、細胞に取り込まれないため、シリカナノ粒子の表面に細胞に取り込まれるように膜透過ペプチドであるオクタアルギニン (R8) を修飾することで細胞内への導入を試みた。R8 未修飾と修飾したローダミン内包ナノ粒子を培地に添加し、細胞への取り込み量を比較した。R8 未修飾のナノ粒子を培地に添加しても細胞から蛍光信号が検出されないことから、未修飾ナノ粒子は細胞にほとんど取り込まれないと考えられる。一方で、R8 を修飾したナノ粒子の場合はほとんどの細胞から蛍光が検出されたことから、効率的に細胞に取り込まれた。次に、細胞内で光照射による内包物質の放出を試みた。PI 内包ナノ粒子は、細胞に取り込まれ、光照射前は細胞質で赤色の蛍光が観察された。光照射によって、これまでは赤色が見られなかった核内に蛍光が移動した。本来、PI は核内に移行し、DNA と結合するが、約 60nm のナノ粒子に内包されると、大きさが 10nm の核膜孔を通ることができないため、PI は細胞質に留まると考えられる。一方で、光照射によってナノ粒子から放出されると低分子化合物の PI は核膜孔を通過できるようになり、核に移行し、核内の DNA と結合し、赤色の蛍光を発すると考えられる。核から検出される赤色の蛍光は、光照射後すぐに検出されるようになり、10 分以内に一定値となった。したがって、PI のナノ粒子からの放出は、一過性のものであり、放出された PI は短時間で細胞内を移動し、核に到達していると考えられる。また光照射を受けていない細胞の場合は、赤い蛍光は細胞質内に留まったまま、変化しなかった。さらに細胞に本照射条件で光を照射しても、細胞は大きな変化を示さず、成長を続けたことから、光照射は細胞に深刻な悪影響は与えていないと考えられる。したがって、本ナノ粒子を用いることで、光照射によって細胞内の物質の放出制御が可能であると考えられる。

## (3) ナノ粒子による細胞内カススペース量の調節

最後に、調製したタンパク質内包ナノ粒子を用いて細胞内で放出されるタンパク質量

を変化させ、細胞が示す応答反応について調べた。本検討では、カスパーゼ内包ナノ粒子の培地に添加する量を変化させることで、細胞内に取り込まれるナノ粒子の量を変化させた。細胞の応答反応として、膜透過性に注目し、PIの取り込みによる細胞内の蛍光強度を指標に測定した。光照射前は、細胞からPI由来の赤い蛍光が見られず、照射後は濃度の異なった3種類のカスパーゼ内包ナノ粒子を添加した細胞のみから赤い蛍光が観察された。この変化は放出したカスパーゼに由来するものだと考えられる。一方、ナノ粒子を投与せず光照射のみを行った細胞、何も内包していないナノ粒子を高濃度に投与し、さらに光照射した細胞では、PI由来の蛍光が検出されなかった。観察した2時間では、カスパーゼ内包ナノ粒子を投与した細胞のみでPI由来の蛍光が観察され、その蛍光強度はナノ粒子の投与量が増加するほど、光照射からの経過時間が長くなるほど強度が増加した。つまりナノ粒子から放出されたカスパーゼによって、細胞膜の透過性が向上し、PIの細胞内への流入が起こり、細胞から蛍光が検出されるようになった。このように投与するナノ粒子の量を調整することで、細胞が示す応答反応の強度の制御が可能であることが示唆された。

#### 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 11件)

全て査読有

S. Murayama, B. Su, K. Okabe, A. Kishimura, K. Osada, M. Miura, T. Funatsu, K. Kataoka, M. Kato, "NanoPARCEL: A method for controlling cellular behavior with external light" *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 8380-8382.  
DOI: 10.1039/C2CC32718J

S. Murayama, F. Ishizuka, K. Takagi, H. Inoda, A. Sano, T. Santa, M. Kato, "Small-mesh-size hydrogel for functional photocontrol of encapsulated enzymes and small fluorescent probes" *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 1374-1379,  
DOI: 10.1021/ac2023603

S. Murayama, T. Nishiyama, K. Takagi, F. Ishizuka, T. Santa, M. Kato, "Delivery, stabilization, and spatiotemporal activation of cargo molecules in cells with positively charged nanoparticles" *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 11461-11463,  
DOI: 10.1039/C2CC35567A

S. Murayama, J. Jo, Y. Shibata, K. Liang, T. Santa, T. Saga, I. Aoki, M. Kato, "The simple preparation of polyethylene glycol-based soft nanoparticles containing dual imaging probes" *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 4932-4938.

DOI: 10.1039/C3TB20828A

S. Murayama, P. Kos, K. Miyata, K. Kataoka, E. Wagner, M. Kato, "Gene regulation by intracellular delivery and photodegradation of nanoparticles containing small interfering RNA" *Macromol. Biosci.*, 2014, **14**, 626-631.  
DOI: 10.1002/mabi.201300393

K. Takagi, S. Murayama, T. Sakai, M. Asai, T. Santa, M. Kato, "A computer simulation study of the network structure of a hydrogel prepared from a tetra-armed star pre-polymer" *Soft Matter*, 2014, **10**, 3553-3559.

DOI:10.1039/C3SM52908H

T. Amamoto, T. Santa, M. Kato, "Reduction of molecular leaching from a gel matrix for the precisely controlled release of encapsulated molecules by light stimulus" *Chem. Pharm. Bull.*, 2014, **62** 649-653.

DOI:10.1248/cpb.c14-00094

F. Ishizuka, X.S. Liu, S. Murayama, T. Santa, M. Kato, "Development a spatiotemporal control method of molecular function using silica-based photodegradable nanoparticles that can be prepared at a mild condition" *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 4153-4158.

DOI:10.1039/C4TB00536H

M. Kato, M. Sasaki, Y. Ueyama, A. Koga, A. Sano, T. Higashi, T. Santa "Comparison of the migration behavior of nanoparticles based on polyethylene glycol and silica using micellar electrokinetic chromatography" *J. Sep. Sci.*, 2015, **38**, 468-474.

DOI: 10.1002/jssc.201401086

Y. Shibata, T. Santa, M. Kato, "Surfactant-free aqueous preparation from a star polymer of size-controlled nanoparticles with encapsulated functional molecules" *RSC Advances*, 2015, **5**, 65909-65912.

DOI: 10.1039/C5RA12205H

T. Amamoto, Y. Hirata, H. Takahashi, M.

Kamiya, Y. Urano, T. Santa, M. Kato,  
"Spatiotemporal activation of  
molecules within cells using silica  
nanoparticles responsive to  
blue-green light" *J. Mater. Chem. B*,  
2015, **3**, 7427-7433.  
DOI: 10.1039/C5TB01165E

〔学会発表〕(計 68 件)

第 26 回バイオメディカル分析科学シン  
ポジウム "タンパク質内包ナノ粒子を用  
いた細胞の機能制御" (招待講演) 東  
京、2013 年 8 月

日本分析化学会第 64 年会 "モノリス型カ  
ラムによるナノメディシンの分離" (依頼  
講演) 福岡、2015 年 9 月

BK21Plus Symposium for Nanobio  
Materials and Advanced Analytical  
Techniques "Development of  
nanoparticles and their analytical  
method for medical application" (招待  
講演) 韓国、2016 年 1 月

日本薬学会第 135 年会 "ナノマテリアル  
の分離分析法の開発" (依頼講演) 横浜、  
2016 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/CNBI/kato/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 大 (KATO, Masaru)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任准教  
授

研究者番号：30332943