

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893232

研究課題名(和文)病態細胞の選択的可視化を目的とした新規環境応答性蛍光ポリマープローブの開発

研究課題名(英文)The development of environmentally responsive fluorescence polymer probes for visualizing pathological cells

研究代表者

蛭田 勇樹 (HIRUTA, YUKI)

慶應義塾大学・薬学部・助教

研究者番号：60710944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞などの病態細胞は、細胞内の反応活性が高く、正常細胞より熱生成が大きいことが知られている。さらに、正常組織と比べてがん細胞周辺は弱酸性環境となっていることが知られている。そこで、温度応答性ポリマーを基本構造とした温度応答性蛍光ポリマープローブとpH応答性蛍光ポリマープローブを開発した。温度応答性蛍光ポリマープローブは、わずか1℃の差を見分けて、細胞取り込みをコントロールすることが可能であり、pH応答性蛍光ポリマープローブは弱酸性条件の細胞のみに取り込まれることがわかった。これらの結果より温度やpHといった細胞の置かれた特定の環境を認識して選択的にイメージングできる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The discrimination of normal and pathological cells is attractive from a clinical viewpoint. Tumor cells might have higher temperatures than normal ones as a result of enhanced metabolic activities. In addition, tumorous extracellular pH is slightly lower than that of normal tissue. Therefore, We developed poly(N-isopropylacrylamide)-based temperature-responsive fluorescence polymer probe, and pH-responsive fluorescence polymer probe. The cellular uptake of temperature-responsive fluorescence polymer probe can be controlled within only 1℃. pH-Responsive fluorescence polymer probe exhibited a specific intracellular uptake only in weak acidic conditions. The ability for temperature-responsive and acidic environment selective intracellular uptake opens up the visualization of selective tumors at the cellular level.

研究分野：医歯薬学

キーワード：温度応答性高分子 高分子合成 機能性蛍光プローブ ナノ材料 細胞イメージング がん細胞

1. 研究開始当初の背景

蛍光イメージング法は、高感度な分析が可能であり、特定の生体物質を蛍光物質で標識することによって生体内での生命現象を可視化する手法として、薬学、医学、生物学といった分野の研究に欠かせない手法である。ノーベル賞を受賞した研究として有名な GFP を代表する蛍光タンパク質を標的分子に発現させる手法は最も汎用的方法である。しかし、タンパク質の遺伝子を改変しなければならず、タンパク質本来の性質が損なわれている可能性が指摘されている。また、蛍光タンパク質サイズの問題から、標的物質の性質、挙動を妨げているという可能性も指摘されている。それに対して、低分子型蛍光プローブは、蛍光タンパク質と比べてサイズが格段に小さく、標的生体物質の機能に与える影響が小さく、タンパク質のラベル化など蛍光イメージングにおいて広く用いられている。高分子化学分野においては、外部刺激に応答して、その構造性質を大きく変化させる機能性高分子の合成やその応用研究が盛んに行われ、再生医療、バイオ分析、DDS などの分野において実用化が進んでいる。本研究においては、刺激応答性ポリマーを蛍光物質で標識することによって、周辺環境に応答して特定の細胞を蛍光標識できる刺激応答性蛍光ポリマープローブを開発することで、病態細胞を選択的にイメージングすることを可能とする。

2. 研究の目的

日本人の死因の第一位であるがんは、活発な増殖・転移を繰り返すため、早期発見・早期治療が必要である。しかし、がん細胞は何らかの原因で正常細胞が変異を起こした細胞であり正常細胞と大きな違いがあるわけではなく、わずかに性質が異なるだけであるため正常組織の中に紛れ込んだがん組織を見つけ出すことは困難である。わずかな違いの例として、がん細胞は、細胞内の反応の活性が高く、正常細胞より熱生成（発熱）が大きいことや、正常組織 (pH 7.4) と比べて、がん細胞周辺 (pH 6.8 前後) は弱酸性環境となっていることが知られている。そこで本研究においては、

(1) ある温度以下では細胞に取り込まれず、ある温度以上になった時のみ細胞に取り込まれて、蛍光させることが可能な温度応答性蛍光ポリマープローブ

(2) 正常組織 pH では、細胞に取り込まれず、がん細胞周辺 pH になった時のみ細胞に取り込まれて、蛍光させることが可能な pH 応答性蛍光ポリマープローブの開発を行った。

3. 研究の方法

温度応答性高分子である poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) は、温度刺激に鋭敏に反応し、下限臨界溶解温度 (lower critical

solution temperature; LCST) である 32 度境に、迅速かつ可逆的に親水/疎水性変化を生じる。LCST は疎水性モノマーと NIPAAm を共重合させることによって低温側に、親水性モノマーと共重合させることによって高温側にシフトすることが知られており、任意の温度にコントロールすることが可能である。

(1) ラジカル重合により、poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) を基本構造として、下限臨界溶解温度 (LCST) の異なる温度応答性ポリマーを合成し、活性エステル化後、ポリマー末端に Fluorescein を結合し、温度応答性蛍光ポリマープローブ (PNIPAAm-FL) の合成を行った。疎水性の butylmethacrylate (BMA)、親水性の *N,N*-dimethylaminopropylacrylamide (DMAAAm) をコポリマーとして用いた P(NIPAAm-co-BMA3%) -FL、P(NIPAAm-co-DMAAAm2%) -FL に関しても同様に合成した (図 1)。疎水性モノマーを用いることで LCST を低温側、親水性モノマーを用いることで高温側にシフトさせることができ、PNIPAAm-FL の LCST は 32.8、P(NIPAAm-co-BMA3%) -FL は 27.7、P(NIPAAm-co-DMAAAm2%) -FL は 37.4 であった。蛍光ポリマープローブを用いて、培養温度によるマクロファージ様細胞 (RAW264.7) への取り込み能の違いについて評価した。

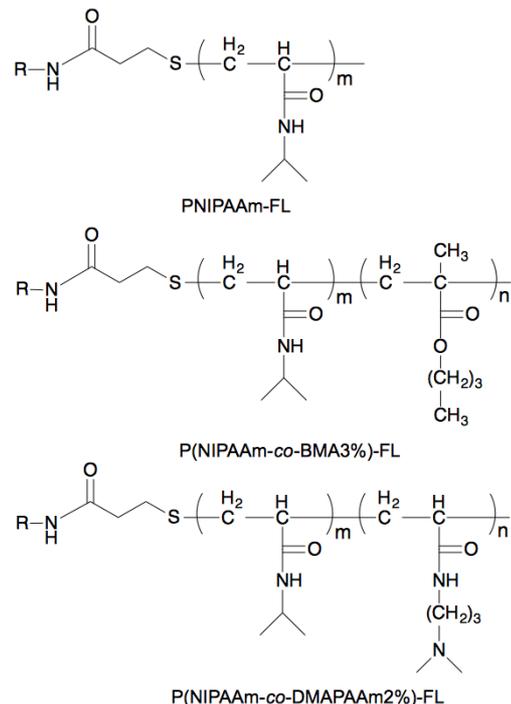


図 1 合成した温度応答性蛍光ポリマープローブの分子構造

(2) 温度に応答して相転移 (親水性 / 疎水性) する PNIPAAm、poly(*N,N*-dimethylacrylamide) (PDMAAm)、そして pH 応答性の sulfamethazine (SMZ) を共重合することで、pH によって相転移 (親水性 / 疎水性) 温度

が変化するポリマーを合成した(図2)。NIPAAmとより親水性のDMAAmの組成比を最適化することによって、正常組織のpH 7.4ではLCSTが体温(37)よりも高く、がん細胞周辺の弱酸性pHではLCSTが体温よりも低くなるような設計とした。このポリマーに蛍光色素をラベル化することでpH 応答性蛍光ポリマープローブとした。

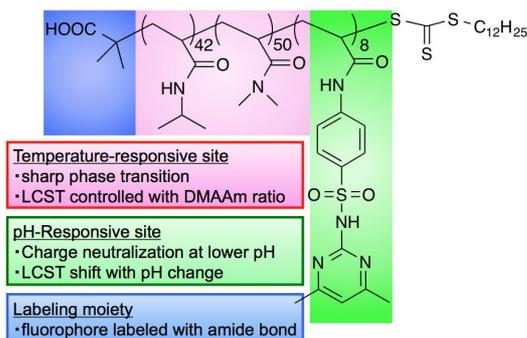


図2 合成した pH 応答性蛍光ポリマープローブの分子構造

4. 研究成果

(1)温度による細胞取り込み能を調べるために、25, 30, 34, 37, 38 で温度応答性蛍光ポリマープローブをRAW264.7 にインキュベーションし、蛍光顕微鏡により観察した(図3)。P(NIPAAm-co-BMA3%)-FL(LCST: 27.7)は25での蛍光がほとんど観察されないのに対して、30以上の温度では、はっきりとした蛍光が観察された。同様に、PNIPAAm-FL(LCST: 32.8), P(NIPAAm-co-DMAAm2%)-FL(LCST: 37.4)に関しても、LCST以下の温度での蛍光がほとんど観察されないのに対して、LCST以上の温度では、はっきりとした蛍光が観察された。これらの結果は、LCST以上になるとポリマー鎖の疎水性が増すために、細胞への取り込みが増大したためと考えられる。特にP(NIPAAm-co-DMAAm2%)-FLに関しては、37では蛍光が見られず、38では蛍光が見られるというようにわずか1の差を見分けて、細胞取り込みをコントロールできることが示唆された。

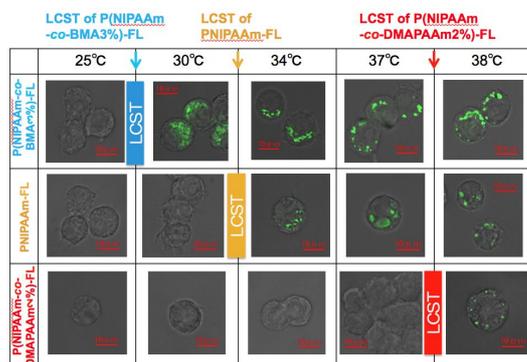


図3 異なった温度で温度応答性蛍光ポリマープローブをインキュベーションしたRAW264.7細胞の蛍光顕微鏡像

(2)pHによる細胞取り込み能を調べるために、pH 7.4とpH 6.8でpH 応答性蛍光ポリマープローブをヒト子宮頸癌由来(HeLa)細胞にインキュベーションし、蛍光顕微鏡により観察した(図4)。pH 7.4では、細胞取り込みは見られず、pH 6.8では取り込みが見られた。この結果は、pH 7.4ではポリマーが親水性を示し、細胞膜との相互作用が弱く取り込まれなかったのに対して、pH 6.8では、ポリマーが疎水性を示し細胞膜との相互作用が増大したために、細胞への取り込みが促進したと考えられる。pH 応答部位であるSMZは、pKaが7前後であり、pH 7.4では解離型でマイナス電荷を持ち、pH 6.8では非解離型となり疎水性が大きくなったことが考えられる。このように適度なpKaを持つpH 応答部位を導入することで、任意のpH変化において、細胞取り込みをコントロールできることが示唆された。

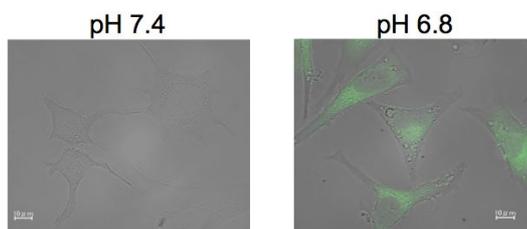


図4 pH 7.4とpH 6.8でpH 応答性蛍光ポリマープローブをインキュベーションしたHeLa細胞の蛍光顕微鏡像

これらの結果から、温度およびpH 応答性蛍光ポリマープローブは、温度およびpHといった細胞が置かれている環境を見分けて細胞取り込みをコントロールでき、任意の環境にある細胞のみを選択的に蛍光させることが可能であることが示唆された。環境応答型蛍光ポリマープローブによる特定の環境に置かれた病態細胞の選択的イメージングが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Yuki Hiruta, Yuhei Nagumo, Yuichi Suzuki, Takaaki Funatsu, and Hideko Kanazawa*, "The effects of anionic electrolytes and human serum albumin on the LCST of poly(*N*-isopropylacrylamide)-based temperature-responsive copolymers", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2015**, in press. 査読有
2. Yuki Hiruta*, Takaaki Funatsu, Minami Matsuura, Jian Wang, Eri Ayano, and Hideko Kanazawa*, "pH/temperature-responsive fluorescence polymer probe with pH-controlled cellular uptake", *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2015**, 207, 724-731. 査読有
3. Yuki Hiruta*, Takaaki Funatsu, Yutaro

- Maekawa, Minami Matsuura, Teruo Okano, and Hideko Kanazawa, "pH-Responsive Fluorescence Polymer for Tumor pH Targeting", *CRS Newsletter*, **2015**, 32, 10-11. 査読無
4. Yuki Hiruta, Mirai Shimamura, Yutaro Maekawa, Takaaki Funatsu Yuichi Suzuki, Eri Ayano, Teruo Okano, and Hideko Kanazawa*, "Temperature-Responsive Fluorescence Polymer Probes with Accurate Thermally Controlled Cellular Uptakes", *ACS Macro Letters*, **2014**, 3, 281-285. 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 蛭田勇樹、舟津孝明、松浦みなみ、王堅、石川裕貴、岡野光夫、金澤秀子「がん細胞の可視化を目指した pH 応答性蛍光ポリマープローブの開発」日本分析化学会第 6 3 年会、2014 年 9 月 19 日、広島大学
2. Yuki Hiruta, Takaaki Funatsu, Minami Matsuura, Teruo Okano, and Hideko Kanazawa "pH-Responsive Fluorescence Polymer Probe for Tumor pH Targeting" RSC Tokyo International Conference 2014, September 5, 2014, Makuhari, Japan
3. Arisa Yamada, Jian Wang, Yuki Hiruta, and Hideko Kanazawa "Development of Fluorescence Probe for Cellular Imaging utilizing a Temperature Responsive Polymer" RSC Tokyo International Conference 2014, September 5, 2014, Makuhari, Japan,
4. 蛭田勇樹、舟津孝明、松浦みなみ、王堅、石川裕貴、岡野光夫、金澤秀子「固形がん選択的ターゲティングを目指した pH/温度応答性ポリマーの創製と pH 応答性細胞取り込みの評価」第 3 0 回日本 DDS 学会、2014 年 7 月 30 日、慶應義塾大学薬学部
5. Yuki Hiruta, Takaaki Funatsu, Yutaro Maekawa, Minami Matsuura, Teruo Okano, and Hideko Kanazawa "pH-Responsive Fluorescence Polymer Probe for Tumor pH Targeting" 41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 14, 2014, Chicago, USA
6. Yuki Hiruta, Takaaki Funatsu, Minami Matsuura, Yutaro Maekawa, Teruo Okano, and Hideko Kanazawa "The development of pH-responsive fluorescence polymer probes for selective imaging of acidic tumor microenvironment" EUROPT(R)ODE XII, April 14, 2014, Athens, Greece

7. 蛭田勇樹、舟津孝明、松浦みなみ、前川祐太郎、岡野光夫、金澤秀子「がんイメージングを目指した pH・温度応答性蛍光ポリマープローブの開発」日本薬学会第 1 3 4 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本大学
8. 蛭田勇樹、松浦みなみ、前川祐太郎、鈴木優一、舟津孝明、岡野光夫、金澤秀子、「病態細胞の可視化を目指した温度応答性蛍光ポリマープローブの開発」日本分析化学第 6 2 年会、2013 年 9 月 10 日、近畿大学
9. Yuki Hiruta, Minami Matsuura, Takaaki Funatsu, Yuichi Suzuki, Yutaro Maekawa, Teruo Okano, and Hideko Kanazawa "Temperature-Dependent Cellular Uptake of Thermo-Responsive Fluorescence Polymer Probe" ASIANALYSIS XII, August 23, 2013, Fukuoka
10. Minami Matsuura, Takaaki Funatsu, Yutaro Maekawa, Yuki Hiruta, Teruo Okano, and Hideko Kanazawa "Dual Temperature- and pH-Responsive Fluorescence Molecular Probe for Cellular Imaging utilizing a Functional Polymer" 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 22, 2013, Hawaii, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称：アミノ酸誘導体蛍光ポリマー及びそれを利用した蛍光プローブ
発明者：金澤秀子、蛭田勇樹
権利者：セルシード(株)
種類：特許
番号：2014-064869
出願年月日：2014 年 3 月 26 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者
蛭田 勇樹 (HIRUTA YUKI)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号：60710944