

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12541

研究課題名(和文)細胞内部温度をナノスケールで測定可能な温感性蛍光ナノプローブの開発と評価系の構築

研究課題名(英文)Development of thermo-sensitive fluorescent nanoprobe capable of measuring cell internal temperature at nanoscale and construction of evaluation system

研究代表者

馬場 耕一 (Baba, Koichi)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：00436172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内部温度情報を把握することは多様な生命現象への理解を押し進める可能性を秘めている。本研究課題では、解析用ナノプローブとして、温度応答性ポリマーで被覆された蛍光性有機ナノ結晶の開発を目指した。その結果、温度温感性ポリマーの機能で蛍光がオンオフし、かつ水分散安定なナノ結晶化が可能であり、かつ温度応答性ポリマー被覆下で結晶成長が抑制される等の、一連の作製上のハードルを越えることは容易ではないことが分かった。これらの条件を満たさなければイメージングプローブには適していないと考えられた。今回明らかとなった課題と有益な知見を基に、今後のナノプローブの開発及び細胞内イメージングに繋げていきたい。

研究成果の概要(英文)：Grasping the cell internal temperature information has the potential to push forward the understanding of various biological phenomena. In this research project, we aimed to develop the nanoprobe where the fluorescent organic nanocrystals coated with temperature-sensitive polymers. As a result, it was revealed that the keeping the function of fluorescence turning on and off under temperature-sensitive polymer, the stable water dispersion of nanocrystals, and the suppressed crystal growth under the temperature-sensitive polymer coating were difficult to achieve. It turned out that it was not easy to beyond these hurdles, and then it was thought that it was not suitable for the imaging nanoprobe unless these conditions were satisfied. Based on the problems clarified and useful findings at this time, we would like to continue to develop nanoprobe and intracellular imaging as future work.

研究分野：有機ナノ結晶の創成と評価

キーワード：蛍光性ナノ結晶型ナノプローブ

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内部の温度情報の解析を試みる研究テーマが活発化し始めた。細胞内では生体分子が絶えず吸熱・発熱反応を行っており、細胞の生命活動が維持されている。そのため細胞内部温度情報を把握することは、細胞内小器官や生体分子が織りなす多様な生命現象への理解を一段深いレベルに押押し進める可能性を秘めており、その重要性への関心が高まっている。元来、科学的実証において、温度は重要な物理量の一つとして位置づけられる。そのため温度は、熱力学的観点から単一細胞の生命活動を解明・理解する上で必要不可欠なファクターであることは当然ともいえる。しかしながら現実問題として、細胞は十分に小さいサイズ(10^{-6} ~ 10^{-4} m程度)であるため、細胞内部の温度を精度良く測定する技術が近年までなかった。近年ようやく幾つかの細胞内温度計の研究開発が国内外で報告されて来ており、本分野への挑戦が魅力を増してきている。細胞内部の温度測定をテーマとする研究分野は今後世界的に精力的に進められ、飛躍的に発展すると予測される。本研究分野が生命科学上価値ある研究対象となることは、その重要性から十分に期待できる。

2. 研究の目的

未だ十分に明らかにされていない、細胞内部の温度測定による細胞内生命活動の熱力学的解明に向けた研究課題に取り組む。

具体的には、単一細胞内部の温度を、ナノスケールの解像度で測定可能な温度応答性蛍光有機ナノ結晶(温感性蛍光ナノプローブ)の研究開発を行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用い、単一細胞内部の細胞小器官の熱力学的解析を行う。

3. 研究の方法

温感性蛍光ナノプローブの作製には申請者らの独自技術である有機ナノ結晶の作製法、再沈法を利用した(Baba et al, Mol Pharmaceutics, 4, 289, 2007)。再沈法とは、ナノ結晶化の対象となる化合物を良溶媒に溶解させ、その溶液を対象化合物の貧溶媒である水に素早く注入することで生じる再沈澱効果を利用して、有機ナノ結晶を水中に析出・安定分散させ、同時に結晶サイズ・構造を制御する手法である。結晶サイズ(10-1000 nm程度)及び構造制御は溶液濃度・温度・溶媒種・分散安定剤・攪拌速度等の調整より行うことが可能である。ナノ結晶水分散液試料の粒子サイズ・結晶構造・水分散安定性および光学特性は、通常電子顕微鏡(SEM)、粉末X線回折測定装置、光散乱測定装置、および吸収・蛍光スペクトル測定装置等により評価する。対象となる有機色素分子を水と完全混合できる有機溶媒(アセトン、エタノール、DMSO等)に溶解させ、マイクロシリンジ等を用い適量(100~500 μ l)を攪拌している水

(10~20ml)に素早く注入した。この操作で生じる急激な溶解度差を用いてナノ結晶析出を行った。温度応答性ポリマーの添加については、ナノ結晶作製時または作製したナノ結晶分散液中に mM オーダーのポリマーを溶解させることで行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光性ナノ結晶の作製

申請者がこれまで検証した結果を整理すると、有機ナノ結晶はそれ自体が細胞内に特異的に局在する傾向がある(Baba et al, JJAP, 2009)。例えば有機ナノ結晶はその種類毎に、細胞質や細胞膜等に特異的に滞留する。よって各種の有機ナノ結晶を温度応答性ポリマーで被覆し温感性蛍光ナノプローブとして利用すれば、細胞内部の細胞小器官毎の温度を特異的に測定できる可能性が開ける。例えば、当該ナノ結晶が細胞膜内に滞留すれば、細胞膜上の物質透過・輸送・化学反応等で生じる温度変化を観測でき、従来全く知られていなかった熱力学的事実が明るみとなる可能性を秘める等、魅力は多い。

そこでまず蛍光性有機ナノ結晶の作製を試みた。その結果、幾種類かの蛍光性色素分子については、ナノ結晶化が上手くいくことが分かった。一方で、ナノ結晶化が上手くいかず水中で結晶成長する系が存在することも分かった。違いとしては、蛍光色素分子の水への溶解度にあると考えた。蛍光色素の水への溶解度が高い場合は、水中で結晶析出が生じる割合が低く、数少ない結晶核に対して結晶成長が生じると推測した。一方で、蛍光色素の水への溶解度が低い場合、再沈法操作時に、水中で多数の結晶核が生じ、その結晶核に対して個々の結晶成長が生じる為、一つひとつの結晶サイズは小さく、このことがナノ結晶化につながる事が考えられた。

(2) 温度応答性ポリマーによるナノ結晶の被覆

ナノ結晶の結晶表面を被覆するポリマーは、温度応答性ポリマーであるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)を選択した。本ポリマーは水温約32℃を境に、当該ポリマー環境の極性が親水性(32℃未満)から疎水性(約32℃以上)に変化する。そこで温度応答性ポリマーで被覆された温度応答性蛍光有機ナノ結晶群はコロイド水分散液の形態で得られれば、当該ポリマーに被覆された結晶表面が温度による環境変化(親水性/疎水性の相互変化)に鋭敏に反応し、その結果、極性場に依存したナノ結晶の蛍光特性が温度依存的・連続的に変化すると期待できる。

上述の様、温感性蛍光ナノプローブの作製は、蛍光ナノ結晶の表面を温度応答性ポリマーで被覆し、かつ、有機ナノ結晶が水中にコロイド状態できれいに分散された有機ナノ結晶水分散系の構築を得ることにある。しか

しながら、有機ナノ結晶水分散液の作製を試みた場合、上述の様、水中でナノ結晶の結晶サイズ成長が生じ凝集沈殿を生じる系が多数あることが判明し、同時にナノ結晶の結晶成長を抑制することが困難な状況に直面した。更に有機ナノ結晶と温度応答性ポリマー群との相性を検証したが、有機ナノ結晶の結晶成長を抑制することが難しいことが分かった。温感性蛍光ナノプローブの開発には、1. 水場のような極性場では蛍光しないが、温度温感性ポリマーで囲まれた疎水場では蛍光するような蛍光色素を対象とし、2. 且つその有機化合物のナノ結晶化が可能であり、またそのナノ結晶が水中で良質な分散系を取り、3. 温度応答性ポリマーで被覆されることでナノ結晶の結晶成長が抑制されるという一連の作製上のハードルを越えなければならぬことが分かってきた。これらの条件を満たすことは容易ではなく、これらの条件を満たした温感性蛍光ナノプローブでなければイメージングには適していないと考えられた。

(3) 蛍光性ナノ結晶の蛍光挙動

上述の様、温度応答性蛍光プローブの作製において、温度応答性ポリマーと蛍光色素ナノ結晶との組み合わせは、任意な組み合わせが可能ではないことが分かった。蛍光色素の蛍光挙動として、有機溶媒中に分子状態で分散した蛍光色素は蛍光を発するが、ひとたび水中等で蛍光色素が凝集する貧溶媒系では、蛍光色素が蛍光しない現象が観測された。色素分子が結晶構造を取ることで生じる格子振動によるエネルギー失活や濃度消光が考えられた。一方で、有機溶媒中の分子状態で蛍光し、かつ、ナノ結晶状態でも蛍光する有機蛍光色素が存在することも分かってきた。結晶状態にあっても蛍光を発する蛍光色素の種類は、そうでない蛍光色素の種類と比較すると、相対的に少ないと考えられた。ナノ結晶状態でも蛍光を発する蛍光色素は一見イメージングプローブとして有用であると考えられたが、現実的にはそうとは考え難かった。特に明らかになってきたことは、水中で結晶状態でも蛍光を発するような蛍光性ナノ結晶は、温度応答性ポリマーとブレンドしても水環境場での温度変化による蛍光挙動の劇的な変化を捉えることは難しいということであった。おそらく元々水中でも結晶状態で蛍光を発するため、温度応答性ポリマーによる温度依存的な親水・疎水環境場の影響を受けた蛍光挙動の変化が、蛍光性ナノ結晶では現れにくいと推測した。このことから有機溶媒中では蛍光を発し、水中では消光するような有機ナノ結晶の方が、温度応答性ポリマーとのブレンドには適しており、環境場の温度の変化に伴う温度応答性ポリマー由来の疎水・親水場の影響に感応し、蛍光挙動が変化すると考えた。しかしながら、水環境場において、温度応答性ポリマーで被覆

を試みたナノ結晶は、もともとのナノ結晶が蛍光を発しないため、温度応答性ポリマーの温度変化による親水・疎水変化の効果によっても、それほど顕著な蛍光強度の増幅を観察することが困難であった。上述の様、水環境場におけるナノ結晶状態において、良好な蛍光を発する蛍光色素は不可であるが、同時に、完全に消光してしまうようなナノ結晶もイメージングプローブとしては不適切であると考えられた。本課題を通して、イメージングプローブの開発として様々な課題が明らかとなった。今後の研究開発では本研究課題で得られた知見を元に、細胞内イメージングプローブの開発および細胞内イメージングに繋げていきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

馬場耕一(代表)

「有機ナノ結晶技術のバイオ分野への応用」
第14回 最先端医療イノベーションセンター
定例セミナー

2017年9月29日

大阪大学最先端医療イノベーションセンター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 耕一 (Baba Koichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授
研究者番号：00436172

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()