

令和 2 年 4 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02097

研究課題名(和文)細胞膜を拡散透過するポリマーシャトルの創製と分子輸送による細胞機能の強化

研究課題名(英文)Preparation of a polymer shuttle that diffuses and permeates cell membranes and enhancement of cell functions by molecular transport

研究代表者

石原 一彦 (ISHIHARA, KAZUHIKO)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：90193341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：両親媒性ポリマーの新しい細胞膜透過機構として分子拡散を提案した。ポリマーに機能性官能基を結合することで、細胞特有の機能を強化するとともに高度に利用する基盤を構築した。電子輸送ポリマー(pMFC)をMPCとビニルフェロセン(VFc)より合成した。代謝改変を、酵母のグルコース嫌気解糖代謝を検証した。酸化体のpMFCが存在する条件下で酵母を嫌気培養したところ、エタノール発酵の変化量と電子輸送速度は良い相関を示した。pMFCにより、酵母の代謝改変の度合いが制御可能であることを示した。またヒト乳がん細胞を用いて、電子輸送ポリマーががん細胞選択的な増殖抑制手法として有用であることを見い出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物界に存在する高効率な化学反応による物質変換、エネルギー産生に着目して、その基本となる細胞内の電子移動反応を制御する新規ポリマー材料の創発に関連する研究を展開し、酵母による物質生産効率の向上や、光合成に関連したエネルギー産生、癌細胞の細胞死を誘引、細胞機能変換を実現した。これは人工材料の設計により医療のみならず、エネルギー・環境という世界規模での問題を解消する研究に挑戦した画期的な基盤研究と位置付けられる。

研究成果の概要(英文)：Molecular diffusion into living cells was proposed as a new mechanism of amphiphilic polymer permeation through cell membrane. By attaching functional groups to the polymer, enhancement of cell-specific functions was realized. An electron transport polymer (pMFC) was synthesized from MPC and vinyl ferrocene (VFc). Metabolic alterations were verified for glucose anaerobic glycolysis metabolism in yeast. Anaerobic cultivation of yeast in the presence of oxidized pMFC showed a good correlation between the change in ethanol fermentation and the electron transport rate. It was shown that the degree of metabolic modification of yeast can be controlled by pMFC. Otherwise, using human breast cancer cells, it has found that the electron transport polymer was significantly useful as a cancer cell-selective growth inhibition.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：電子輸送ポリマー MPCポリマー 両親媒性 細胞内輸送 酸化還元反応 エネルギー代謝 がん治療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内に物質が輸送され、機能を発現することで生命活動が継続される。この物質輸送機構として、水のようにサイズが小さい場合は、細胞膜に存在するアкваポリンに代表される膜タンパク質が集合して、細胞膜にチャンネルを形成し、この部分を透過するチャンネル機構が作動する。細胞機能の調節に欠かせないイオンに関しても、チャンネル形成タンパク質や輸送タンパク質により細胞膜の疎水性部位を透過する機構となる。しかしながら、輸送される分子サイズが大きいと、細胞膜の構造の大きな変化を伴うエンドサイトシス機構が生じる。すなわち、細胞内に薬剤のような生理活性分子や、タンパク質、あるいは核酸のようなバイオ分子を直接輸送することは極めて困難であり、これが細胞機能を改変しようとする際の大きな障害となっている。そのために、これらを効率良く輸送するキャリアー分子に関する研究がなされている。これらの多くはエンドサイトシス機構を基本として考案されているために、細胞内に導入した際に、エンドソーム(小胞体)から再度、細胞質内に放出される、いわゆるエンドソーム脱出の機能が必要となる。一部のキャリアーでは、エンドソーム内の pH が変化することを利用して、これを達成してきているものの、この過程の時間的、空間的調節が極めて困難であるために、最終的な細胞機能の制御が十分に達成されていない。エンドサイトシス機構は細胞膜構造を著しく変化させるために、膜タンパク質の消失や機能低下にも繋がるのが懸念される。これらの課題の解消は、バイオ分子の細胞内導入が求められる iPS 細胞や ES 細胞を利用した細胞工学を基盤とする組織再生医療の確立には欠かせない。

研究代表者は、細胞に対して影響を与えないポリマーに関する研究の中で、リン脂質極性基であるホスホリルコリン(PC)基を有する2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)と疎水性基を有するモノマーからなる両親媒性で水溶性のポリマーが、特異な溶液特性を示すことを見出した。しかしながら、この現象についての分子機構が全く不明である。一方、申請者は新たに PC 基を有する両親媒性ポリマーが細胞膜を双方向に拡散できること、さらにこの MPC ポリマーに細胞の特定部分を染色する蛍光色素を共有結合で担持させると、その蛍光色素の特性に対応する細胞内の特定の部分に濃縮されることを見出した。これは分子量が 50kDa 程度の合成ポリマーが濃度勾配のみで細胞膜を拡散透過する現象を見出した初めての事例である。すなわち、ホスホリルコリン基と疎水性基を同時に有する両親媒性の水溶性 MPC ポリマーは、従来の水溶性ポリマーでは見られない特異な細胞膜拡散透過を可能とすることが明らかとなった。

2. 研究の目的

細胞内への分子の輸送は、細胞工学を基盤とする組織再生医療、有用物質の産生、生物資源の有効利用など多くの分野で重要な鍵となる。通常は細胞小胞体を経由する細胞内取り込み機構が優先的に作用する。本申請研究では、新しい細胞膜透過機構として双方向の分子拡散を提案し、シャトル分子となりうるポリマーの構造を設計する。このポリマーシャトルは細胞膜内外で分子形態変化を起こすことが必要であるだけでなく、細胞膜疎水性領域に捕捉されない性質や細胞膜障害を誘引しない特性が求められるために、機能を明確に規制する精密合成が不可欠となる。さらに、ポリマーシャトルに機能分子団を結合することで、細胞内に効果的かつエネルギーを使うことなく分子輸送し、細胞機能を高度に利用する基盤を構築することを目的とする。すなわち、ポリマーシャトルが細胞膜中を双方向に拡散透過する性質を利用し、電子受容体や蛍光色素など機能分子団の細胞内輸送をポリマーシャトルに結合させることで実現する。これにより、細胞内反応を機能分子団の効果で調節できる系を考察する。最終的には、細胞内での物質産生効率を向上できるポリマー系を構築する。

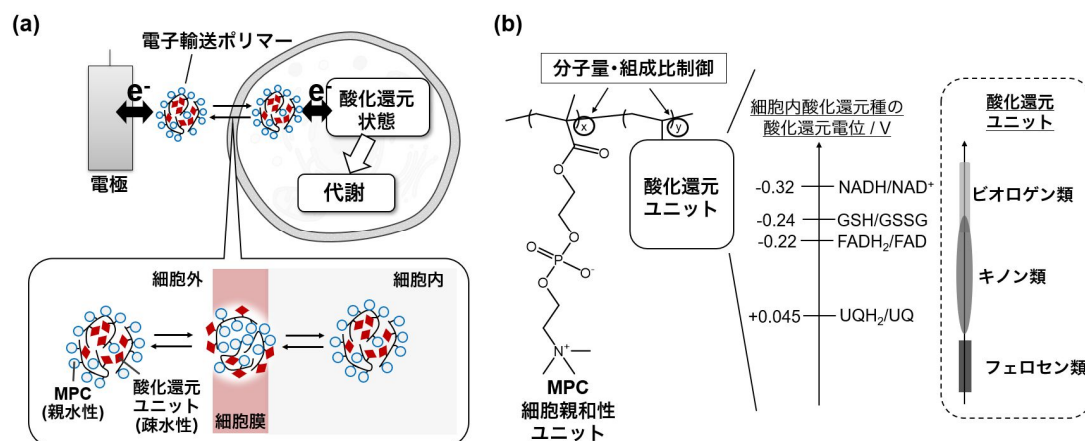


図 1. (a) 電子輸送ポリマーを用いた細胞内酸化還元状態制御の模式図、(b) 分子量・ユニット組成比の制御と酸化還元ユニットの選定による電子輸送ポリマーの分子設計。

3. 研究の方法

3.1 電子輸送速度に与える電子輸送ポリマーの構造の影響

機能を有するモノマーユニットを分子内に導入する MPC ポリマー合成を実施した。電子輸送効率を考え、まずはビニルフェロセン(VFc)と MPC のランダム重合反応により両親媒性を示す水溶性 MPC ポリマーを合成した。すなわち疎水性ユニット含有比 (R) と M_w (分子量) の異なる 3 種類の pMFc を合成した。3 種類の pMFc の比較により、各パラメータが電子輸送速度に与える影響を調査した。大腸菌と酵母を 3 極系電気化学セル内の最小培地に添加し、作用極に+0.60 V の電位を印加することで、グルコース代謝由来の代謝電流値の比較を行った。その結果、両者において、 R が電子輸送速度に対して大きな影響を及ぼすこと、また M_w が小さくなると電子輸送速度が大きくなることが確認された。次に、各 pMFc における電子輸送速度の大小に応じて、代謝改変の度合いが実際に変化するかを、酵母のグルコース嫌気解糖代謝 (エタノール発酵) をモデルケースとして検証した。酸化体の pMFc が存在する条件下で酵母を嫌気培養し、培地中のエタノール濃度を測定したところ、エタノール発酵の変化量と電子輸送速度は良い相関を示した。以上の結果は、pMFc の適切な分子設計により、電子輸送速度、ひいては酵母の代謝改変の度合いが制御可能であることを示している。

3.2 適切な酸化還元電位を有した酸化還元ユニットの選定による生細胞への電子注入の実現
微生物に対して電気化学的に還元力を供給し、その有用物質生産能を向上させる微生物電気合成は、余剰な電力を化学エネルギーへ固定化する効果的な方法であり、近年の再生可能エネルギーの急速な需要増加に伴い大きな注目を集めている。微生物電気合成の発展には、微生物に対して還元力を供給する手法の開発が極めて重要である。本研究では、新規電子輸送ポリマーの創製により、生細胞へ還元力を供給する手法の確立を試みた。これまで用いられてきた電子輸送ポリマー pMFc の酸化還元電位は、主要な細胞内酸化還元種よりも正であったため、生細胞への電子注入は不可能であった。ここでは、生細胞への電子注入の実現を目的として、ピオロゲン(Vi) を酸化還元ユニットとして利用した。AIBN を開始剤とするフリーラジカル重合により、より負な酸化還元電位を有する電子輸送ポリマー poly[MPC-*co*-*n*-butyl methacrylate (BMA)-*co*-Vi] (pMBVi) ($E = -0.28$ V) を新規合成した。 -0.40 V の電位を作用極に印加した状態で、pMBVi (電子供与体) と硝酸カリウム (電位受容体) の両方を含む 3 極系電気化学セル内の最小培地に大腸菌を導入したところ、還元電流が観測された。この電流は、大腸菌、pMBVi、硝酸のどれか一つでも欠けた場合には観測されなかった。この結果は、pMBVi を介して大腸菌細胞内へ電極から電子が注入されたことを示している。

3.3 電子輸送ポリマーを介した細胞内酸化還元状態の変調によるヒトがん細胞の増殖抑制
両親媒性 MPC ポリマーは、種々の哺乳類細胞の細胞膜を透過することが示されている。したがって、本研究で創製した電子輸送ポリマーは、哺乳類細胞に対しても適用可能であると考えられる。哺乳類細胞のモデルとして、ヒトがん細胞に注目した。近年、新規作用機序に基づく抗がん剤の創出が求められる中、細胞内レドックスバランスの変動に対するがん細胞の脆弱性に着目した抗がん剤開発が注目されている。こうした背景を踏まえ、電子輸送ポリマーを介してがん細胞内の酸化還元状態に摂動を与えることで、がん細胞の増殖を抑制できるという作業仮説をたてた。そこで電子輸送ポリマーを介した細胞内レドックス状態の変調による、がん細胞の増殖抑制の実現可否を検討した。pMFc の哺乳類細胞への細胞膜透過性を検討するため蛍光標識したポリマー (rho-pMFc) を、合成時に微量のローダミンモノマー (rho) を共重合することで得た。rho-pMFc を MDA-MB-231 (ヒト乳線がん) 細胞の培地に添加し共焦点顕微鏡により観察を行ったところ、細胞内からポリマー由来の蛍光が認められた。この結果は pMFc が MDA-MB-231 の細胞膜を透過することを示している。次いで、pMFc を介した電子排出が細胞生存率に及ぼす影響を検討するため、酸化体及び還元体の pMFc をそれぞれ MDA-MB-231 細胞を含む培地に添加した。その結果、還元体 pMFc を添加した系では細胞生存率の低下は見られなかった。一方で、電子を受け取ることが出来る酸化体 pMFc を添加した系では、細胞生存率が濃度依存的に低下した。次いで、酸化体あるいは還元体 pMFc 存在下で培養された細胞に対してアポトーシス解析を行った。その結果、酸化体 pMFc 共存下でのみ、細胞へのアポトーシスの誘導が認められた。以上の結果は、pMFc を介した細胞内からの電子排出により、MDA-MB-231 細胞にアポトーシスを誘導出来ること示している。

次に、電子輸送ポリマーの酸化還元特性と細胞増殖抑制の関係を検討するため、キノンを酸化還元ユニットとする [poly(MPC-*co*-3-(3,5,6-trimethyl-1,4-benzoquinon-2-yl)-propyl methacrylate)] (pMQ, $E = +0.07$ V)、poly(MPC-*co*-BMA-*co*-vinyl anthraquinone) (pMBAQ, $E = -0.29$ V) を、AIBN を開始剤とするフリーラジカル重合により合成した。続いて、酸化体の電子輸送ポリマー pMFc、pMQ、pMBAQ を MDA-MB-231、NHDF (正常ヒト皮膚線維芽細胞)、MCF 10A (正常ヒト乳腺上皮細胞) の培地に対して添加し、細胞生存率への影響を検討した。その結果、pMFc、pMBAQ を添加した場合は、MDA-MB-231 細胞だけでなく、正常細胞の生存率も低下した。pMFc は細胞内酸化還元種との反応性の高さ、pMBAQ は酸素との反応性の高さ起因して、非選択的な増殖抑制が誘引されたことが推測される。一方、pMQ を添加した場合は、がん細胞株 MDA-MB-231 のみ、ポリマー濃度の上昇とともに細胞生

存率が低下していく傾向が認められた。この結果から、pMQ ががん細胞の増殖を抑制するうえで適切な酸化還元特性を有していたことを示している。以上の結果は、電子輸送ポリマーの精密な分子設計により、がん細胞株の選択的増殖抑制が実現可能であることを示している。

4. 研究成果

本研究では、両親媒性で水溶性の MPC ポリマーの特徴を活用し、高度な細胞内分子反応制御を行うことを目的とした。ここで、細胞内酸化還元状態の制御を実現するうえで、重要となる電子輸送ポリマーの分子設計パラメータを提示した。

(1) 電子輸送ポリマー-pMFC の分子量・ユニット組成比を調節することにより電子輸送速度の制御を行うことに成功した。次に、ピオロゲン類を酸化還元ユニットとして利用し、電子輸送ポリマー-pMBVi を新規合成することで、生細胞への電子注入を実現した。

(2) 酸化還元ユニットの種類・ユニット比と分子量は互いに独立したパラメータであるため、本研究で得られた知見を基盤として、種々の酸化還元電位・電子輸送速度を有する電子輸送ポリマーライブラリーの創出が可能となる。

(3) がん細胞を用いて、電子輸送ポリマーの適用種が哺乳類細胞へと拡張可能であること実証し、電子輸送ポリマーががん細胞選択的な増殖抑制手法として有用であることを見出した。

本研究は、遺伝子操作によらず細胞内酸化還元状態、ひいては代謝を制御するマテリアル工学手法として、エネルギー・環境・医療といった生細胞が関与する諸分野への貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Haruka Oda, Kazuhiko Ishihara | 4. 巻 135 |
| 2. 論文標題 Determination of association constants between water-soluble phospholipid polymer bearing phenylboronic acid group and polyol compounds for reversible formation of three-dimensional networks | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Reactive and Functional Polymers | 6. 最初と最後の頁 113-120 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.12.003 | 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 Mingwei Mu, Tomohiro Konno, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara | 4. 巻 158 |
| 2. 論文標題 Solubilization of poorly water-soluble compounds using amphiphilic phospholipid polymers with different molecular architectures | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Colloids Surf B: Biointerfaces | 6. 最初と最後の頁 249-256 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.colisurf.2017.06.040 | 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 Masahiro Kaneko, Masahito Ishikawa, Kazuhiko Ishihara, Shuji Nakanishi | 4. 巻 20(|
| 2. 論文標題 Cell-membrane permeable redox phospholipid polymers induce apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biomacromolecules | 6. 最初と最後の頁 4447-4456 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biomac.9b01184 | 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15件（うち招待講演 8件／うち国際学会 10件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masahiro Kaneko, Kazuhiko Ishihara |
| 2. 発表標題 Molecular Design of of Amphiphilic Electron Shuttling Phospholipid Polymers for Inducing Apoptosis in Cancer Cells |
| 3. 学会等名 International Polymer Conference (IPC) 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuhiko Ishihara |
| 2. 発表標題 Cytocompatible smart polymer hydrogels for cell engineering |
| 3. 学会等名 Frontiers 2018 Symposium on NanoBio Engineering and Medicine (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuhiko Ishihara |
| 2. 発表標題 Water-soluble and amphiphilic phospholipid polymers as solubilizing and permeation enhancer of poorly-water soluble drugs |
| 3. 学会等名 Japan-Sweden Joint Symposium on Nanomedical Materials (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuhiko Ishihara, Kensuke Yoshie, Yuuki Inoue |
| 2. 発表標題 Hetero-shaped Polymer Nanoparticles Respond to Magnetic Fields for Stirring Inside of Living Cells |
| 3. 学会等名 4th Annual International Workshop on Materials Science and Engineering 2018(IWMSE2018) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuhiko Ishihara |
| 2. 発表標題 Functional polymeric nanoparticles for the in-cell nanomedicine |
| 3. 学会等名 International Conference of Advanced Polymers, Biomaterials & Nanomedicine (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuhiko Ishihara |
| 2. 発表標題 Bioinspired Polymers for Implantable Medical Devices |
| 3. 学会等名 The 5th International Biomaterials Symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuhiko Ishihara |
| 2. 発表標題 Cytocompatible and Multifunctional Polymeric Nanoparticles for Transportation of Bioactive Molecules into and within Cells |
| 3. 学会等名 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering (KSBB) Annual Meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuhiko Ishihara |
| 2. 発表標題 Nano-meter thick-layer with phosphorylcholine-based polymer on the medical devices improves biocompatibility |
| 3. 学会等名 International Conference on Nanomedicine (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ren Zhang, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara |
| 2. 発表標題 リン脂質ポリマーハイドロゲルネットワークに捕捉された細胞の増殖と組織化 |
| 3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 石原一彦 |
| 2. 発表標題 製剤におけるリン脂質ポリマー |
| 3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masahiro Kaneko、Shuji Nakanishi、Kazuhiko Ishihara |
| 2. 発表標題 Design of Cytocompatible and Redox-active Phospholipid Polymers for Electrochemical Control of Cellular Metabolism |
| 3. 学会等名 2017 Advanced Biomaterials and Medical Membranes Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金子真大、石川 聖人、石原一彦、中西 周次 |
| 2. 発表標題 レドックスポリマーを介した細胞内電子排出による細胞死誘導 |
| 3. 学会等名 2017年電気化学会秋季大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masahiro Kaneko、Masahito Ishikawa、Shuji Nakanishi、Kazuhiko Ishihara |
| 2. 発表標題 Development of Cell Membrane Permeable Redox Phospholipid Polymers for Suppression of Cancer Cell Growth |
| 3. 学会等名 Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society and the 7th Asian Biomaterial Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 金子真大, 石川 聖人, 石原 一彦, 中西 周次 |
| 2. 発表標題 細胞膜透過性レドックスリン脂質ポリマーを介した 細胞内レドックス状態の変調による乳がん細胞の選択的増殖抑制 |
| 3. 学会等名 電気化学会秋季大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金子真大, 石川 聖人, 石原 一彦, 中西 周次 |
| 2. 発表標題 乳がん細胞の選択的増殖抑制を指向した細胞膜透過性レドックスリン脂質ポリマーの創製 |
| 3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 石原研究室 http://www.mpc.t.u-tokyo.ac.jp/ 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻石原研究室 http://www.mpc.t.u-tokyo.ac.jp/ |
|--|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |