

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14098

研究課題名（和文）ナノ粒子への精密位置制御分子修飾による細胞内サンプルリターン材料の開発

研究課題名（英文）Development of intracellular sample return materials by precise modification of position-controlled molecules to nanoparticles

研究代表者

佐々木 隆浩（SASAKI, Takahiro）

北海道医療大学・薬学部・助教

研究者番号：20714489

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新提案の細胞内分析法である「細胞内サンプルリターン法」のための多機能性ナノ材料の開発を行った。細胞内サンプルリターンに必要な種々の機能をナノ粒子へ付与するため、それぞれの機能を担う分子材料の合成およびそれらを位置選択的に修飾する技術の開発を行った。また、修飾法開発の過程でナノ粒子と機能性分子をつなぐ一次修飾剤が特定の条件において不安定化することを発見した。この発見は今後の研究において重要であったため予定の研究計画を変更してこの現象の解明に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内サンプルリターン法は、細胞へ負荷を与えずありのままの細胞を詳細に調べるための新たな方法である。これが実現されれば、ひとつの細胞を扱い、個々の違い（個性）や変化する様子を多面的に調査することが可能となる。また、今回用いた一次修飾剤は、ナノ材料のバイオ応用研究で用いられている主要な材料のひとつであるが、この不安定化現象はこれまでに知られていない。この現象は関連研究の根幹に関わる重要な発見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, a multi-functional nanomaterial for a new proposed intracellular analysis method, Intracellular sample return method, was attempted to develop. To provide nanoparticles with the various functions required for Intracellular sample return, we developed molecular materials and their position-controlled modification techniques to nanoparticles. In addition, in the process of developing the modification method, we discovered that the primary modifier linking the nanoparticles to the functional molecules can be destabilized under certain conditions, and we have elucidated the phenomenon in preference to the execution of other research programs.

研究分野：ナノバイオ 分析化学（材料化学）

キーワード：細胞内サンプルリターン 多機能性ナノ粒子 精密位置制御分子修飾 ナノバイオマテリアル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来、細胞を対象とする種々の研究は集団の細胞を扱い、その平均的挙動を評価している。一方、近年注目されている単一細胞解析研究は、ひとつの細胞を扱い、同じ細胞種でも少しずつ異なる個々の挙動(細胞の個性)を評価することが特徴である。このことは、単一から集団まで、広範かつ詳細に細胞活動を理解するうえで重要とされている。

従来とは異なるアプローチをとる単一細胞解析分野であるが、その実験法の多くは従来と変わらない。すなわち、細胞に対してひとつの条件で処理を行い、ひとつの結果を得る、「一細胞一条件一解析」の実験系である(図1)。しかしながら、この系では興味深い機能を示す細胞を発見したとしても、評価できるのはたった一つの側面のみである。これに対して、同一の細胞に複数回(あるいは複数種)の処理と解析を行う「一細胞複数条件複数解析」の実験系が実現できれば、同一の細胞を多面的に評価することが可能となる。この実験系によれば従来法では困難な、細胞分裂直後の過渡状態、外部刺激および内部刺激に対する細胞システムの応答、恒常性による刺激応答状態からの回復、細胞死への移行過程など、様々な挙動評価や細胞の一生に関する情報を同一の細胞から取得・追跡できる可能性がある。

「一細胞一条件一解析」から「一細胞複数条件複数解析」へと移行する鍵は、「解析」アプローチの変革にある。従来の解析法は、細胞の破壊処理や過剰量の試薬の添加を伴うことが多い。これでは同一の細胞に対して更なる検討を行うことは困難である。

したがって、一細胞複数条件複数解析の実験系の実現には、細胞へ負荷を与えず繰り返しの処理を可能にする新たな解析法が必要となる。本研究ではこの新たな解析法を実現する実験法として、低負荷で細胞へ出入りし、細胞内で狙った物質を採取し、回収することのできるナノ材料による「細胞内サンプルリターン法」を着想した(図2)。

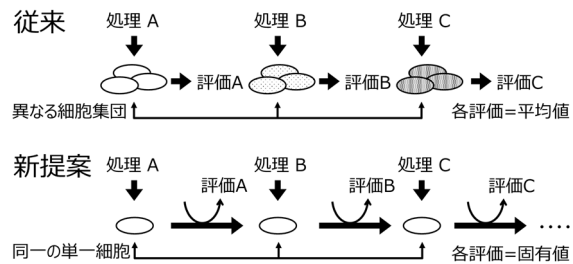


図1 従来法および新提案の細胞実験系の比較

2. 研究の目的

本研究では、「細胞内サンプルリターン法」を実現するために、細胞内ストレス性、細胞内取込誘起、標的物質認識能、標的物質捕捉能、細胞外排出誘起、分離回収性といった複数機能を有する多機能性ナノ材料の開発を目的とした。

3. 研究の方法

細胞内サンプルリターン法のためのナノ材料には、6つの機能(細胞内ストレス性、細胞内取込誘起、標的認識、標的捕捉、細胞外排出誘起、分離回収性)が必要と考えた。これらの機能は、主にナノ粒子表面に各機能性分子を修飾することにより付与する。具体的には、細胞内ストレス性はポリエチレングリコール(PEG)鎖によって、細胞内取込誘起は細胞膜透過性ペプチドによって、標的認識および標的捕捉は後述の分子材料によって、分離回収性はナノ材料のコアに用いる酸化鉄磁性ナノ粒子(MNP)の磁性によって達成する。細胞外排出に関しては、未だ不明な点が多いことから、本研究では前述の5つの機能のMNPへの付与に注力することとした。さらに、複数の機能が効果的に発現するよう、各機能性分子の修飾位置を精密に制御する必要もある。したがって、本研究では、(1)材料合成、(2)ナノ粒子への分子修飾、(3)材料の機能評価の3テーマに分けて、研究を進めた。なお本研究の標的物質として、肝細胞における主要な薬物代謝酵素のひとつであるCYP3A4を選択した。

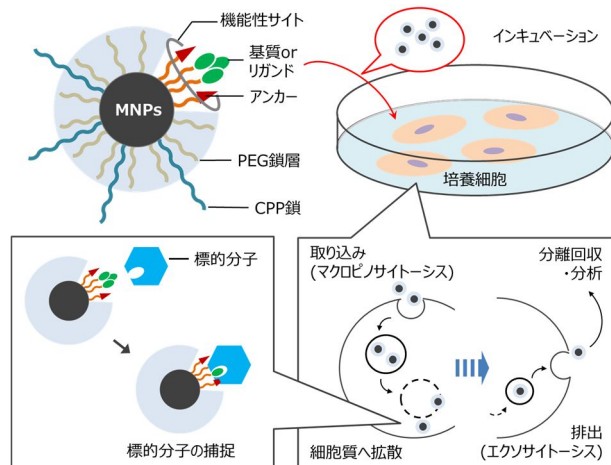


図2 細胞内サンプルリターン法およびナノ材料の概要

細胞内取込誘起は細胞膜透過性ペプチドによって、標的認識および標的捕捉は後述の分子材料によって、分離回収性はナノ材料のコアに用いる酸化鉄磁性ナノ粒子(MNP)の磁性によって達成する。細胞外排出に関しては、未だ不明な点が多いことから、本研究では前述の5つの機能のMNPへの付与に注力することとした。さらに、複数の機能が効果的に発現するよう、各機能性分子の修飾位置を精密に制御する必要もある。したがって、本研究では、(1)材料合成、(2)ナノ粒子への分子修飾、(3)材料の機能評価の3テーマに分けて、研究を進めた。なお本研究の標的物質として、肝細胞における主要な薬物代謝酵素のひとつであるCYP3A4を選択した。

3-1. 材料合成

MNP(ナノ材料の担体で磁気分離回収可能) 標的認識分子材料(CYP3A4との相互作用部位、スペーサー部位、MNP結合部位により構成) 標的捕捉分子材料(CYP3A4中リシン残基との反応部位、スペーサー部位、MNP結合部位により構成) 精密位置制御分子修飾補助材料(MNPへのチオール(SH)基転写用分子修飾SiO₂マイクロビーズ)の4種の材料をそれぞれ合成した。

3-2. 精密位置制御分子修飾

本研究で提案する精密位置制御分子修飾法は、はじめにMNP表面の一点にのみSH基を修飾(ワンスポット修飾)し、これを起点としてMNP表面へ種々の分子修飾を2次元方向に展開す

る方法である。従来の多機能性分子修飾法は、ナノ材料表面から垂直方向へ展開するビルドアップ法式でありアプローチが異なる。ワンスポット修飾によるMNP表面へのSH基修飾は、修飾補助材料表面に付与したSH基転写用分子を介して行った。さらに、後続の分子修飾についても計画した。

3-3. 機能評価

合成した分子材料およびそれらを実装したMNPの機能評価を計画した。標的物質認識分子の機能は、この分子とCYP3A4との相互作用の大きさを評価することにより確認することとし、これには酵素と化合物の相互作用の指標とされる50%阻害濃度(IC₅₀)を用いた。標的物質捕捉分子の機能は、各種溶液条件におけるこの分子とアミン化合物との反応性を評価した。さらに、これら分子材料を実装したMNPの機能性評価を行うことも計画した。

3-4. 一次修飾ナノ粒子の修飾剤安定性の評価

ナノ粒子の凝集抑制および溶媒への分散性を付与するために分子修飾を施したナノ粒子を一次修飾ナノ粒子とよび、この修飾分子を一次修飾剤とよび、本研究における一次修飾ナノ粒子は、MNPに一次修飾剤としてクエン酸を修飾したMNP@CAである。また、一次修飾剤がもつ官能基は、分子材料を化学修飾する際の下地の役割も担う。この一次修飾剤の安定性評価は当初の研究計画で予定していないものであったが、本研究を進める過程でその重要性を見出し、計画した検討事項より優先して行うこととした。一次修飾剤の定量的安定性評価法は、SH基ワンスポット修飾の過程で得られる修飾補助剤表面へ固定したMNP@CAを用い、種々の溶液へ浸漬処理した後、MNP残存率を測定することで行った。残存率はMNP由来Feの測定により評価した。

4. 研究成果

4-1. 材料合成

MNP合成においては、粒子径10-20nmの範囲で粒径の揃った単分散なMNPの合成を目標とし、既報の熱分解合成法(J. Park et al., *Nat. Chem.*, 2004)を基に合成装置および反応条件を最適化した。その結果、粒子径16nm(±9%)あるいは20nm(±9%)の単分散なMNPの合成に成功した。このMNPは表面保護剤としてオレイン酸が配位した疎水性ナノ粒子として得られる(MNP@OA)。MNP@OA表面には分子修飾に適した官能基が存在しないため、一次修飾剤としてクエン酸による配位子交換を行い表面に豊富なカルボキシ(COOH)基を有するMNP@CAを得た。

標的認識分子の機能としては、酵素-低分子間の基質特異的な相互作用を利用し、標的物質であるCYP3A4を認識することを目的とする。標的認識分子材料の構造は、CYP3A4に対して基質特異性を有するケトコナゾール部位、ヘキサエチレングリコールを用いたスペーサー部位、ピリジリジルスルフィド構造によるMNP結合部位からなる構造とした。ケトコナゾールへのスペーサー修飾において、CYP3A4の分子認識を阻害しない修飾位置の選定が重要となる。ケトコナゾールとCYP3A4との相互作用は、ケトコナゾールのピラゾール環がCYP3A4の活性中心であるヘム鉄へ配位することで生じるため、ピラゾール環の反対側に存在するピペラジン環をスペーサー結合位置に選び合成を行い、目的の化合物を得た(図3b)。

標的捕捉分子の機能としては、標的認識分子との相互作用によりMNP近傍に長時間存在する標的物質を不可逆な共有結合の形成によって確実にMNP表面に捕捉・保持することを目的とする。標的となるCYP3A4と標的物質捕捉分子との反応はアシル基転移反応を利用する。この反応は生体分子への蛍光標識手法としてその有用性が報告されている(例えばS. Fujishima et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2012)。標的物質捕捉分子の構造は、アシル基転移反応部位、スペーサー部位、MNP結合部位からなる構造としてこれを合成し、目的の化合物を得た(図3c)。

ワンスポット修飾補助材料は、Stöber法(W. Stöber et al., *J. Colloid. Interface Sci.*, 1968)によりSiO₂マイクロビーズ(粒子径:約2μm)を合成した後、アミノ(NH₂)基含有シランカップリング剤を用いてNH₂基修飾を行った(SiO₂@NH₂)。このSiO₂@NH₂表面の一定割合のNH₂基に対しアミド結合にてSH基転写用分子を修飾した(図3d)。

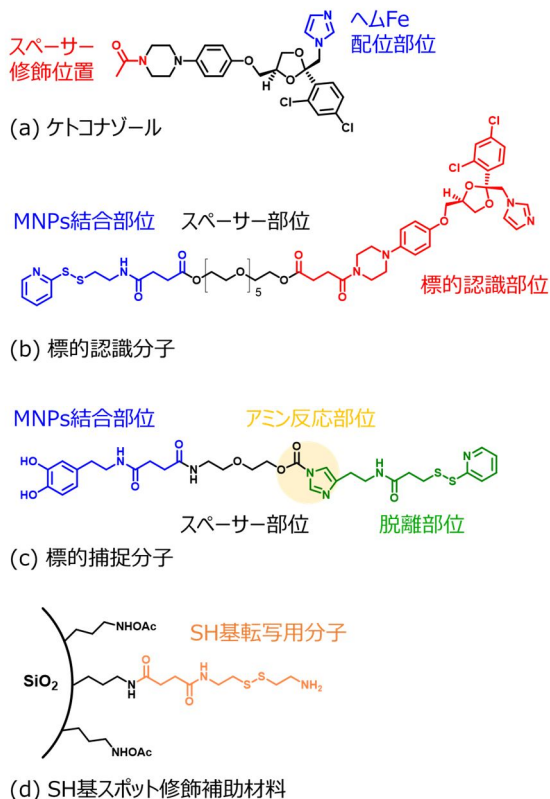


図3 機能性分子材料およびワンスポット修飾補助材料

4 - 2 . 精密位置制御分子修飾

MNP への SH 基ワンスポット修飾は、合成した修飾補助材料を用いて行った。修飾原理としては、修飾補助材料表面の SH 基転写用分子末端の NH_2 基と MNP@CA の COOH 基とをアミド縮合反応を介して結合し (図 4a)、続いて SH 基転写用分子内ジスルフィド (-SS-) 結合を還元することで MNP 表面の一点に SH 基を転写する ($\text{MNP@CA}(\text{SH})$)。SH 基ワンスポット修飾の確認として、 $\text{MNP@CA}(\text{SH})$ の SH 基の再酸化による形態変化を試

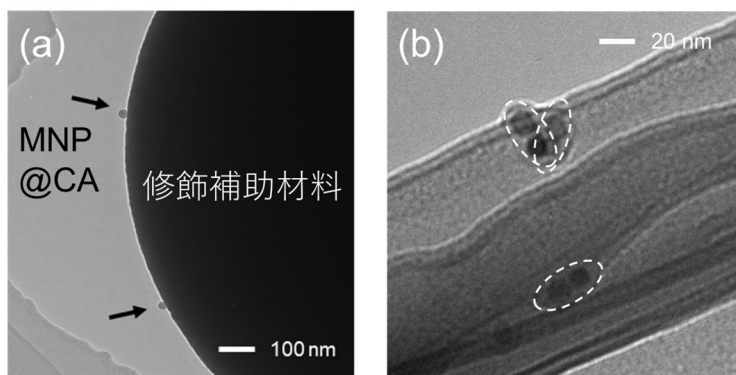


図 4 修飾補助材料へ固定した MNP の TEM 像 (a) および MNP-SS-MNP の TEM 像 (b)

みた。これは、SH 基の酸化による -SS- 結合形成を利用して MNP 同士が連結されることを期待した。一点にのみ SH 基が修飾されていれば、2 つの MNP からなる連結体が得られる。実際に酸化した $\text{MNP@CA}(\text{SH})$ の形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察したところ、MNP 二粒子連結体 (MNP-SS-MNP) が確認され、SH 基ワンスポット修飾が達成されたものと考えられる (図 4b)。

4 - 3 . 機能評価

標的認識分子について、スパーサー修飾後に CYP3A4 との相互作用能力が保持されているかを検証するため、この化合物と CYP3A4 との IC_{50} 値を求め、スパーサー未修飾のケトコナゾールの IC_{50} 値と比較した。得られた IC_{50} 値は、それぞれ 1.3×10^{-1} および $4.9 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ であった。スパーサー修飾前後で同等の値を示したことから、この分子材料は標的認識能を保持しておりスパーサー修飾は CYP3A4 との相互作用を阻害しない適切な位置であることが示唆された。

標的捕捉分子について、 NH_2 基を有する化合物としてタウリンを用いたアシル基転移反応の反応性を評価した。標的捕捉分子とタウリンは、アシル基転移反応後、新たな生成物を生成するため、高速液体クロマトグラフ - 紫外可視吸収検出法 (HPLC-UV_{vis}) にて、反応挙動を追跡した。この結果、細胞内環境に近い緩衝液中 (pH 7.4) においてタウリンとほとんど反応しないことが明らかとなった。この条件におけるタウリン中 NH_2 基の化学状態は、その pK_b より分子型：イオン型 = 1 : 9 であり、標的捕捉分子と反応し得る分子型 NH_2 基の存在比率が小さいことが反応性に影響を及ぼしたものと考えられる。このことから、細胞内に存在する NH_2 基を有する多くの分子種との非特異的な反応は起こりにくく、標的認識分子に認識されて標的捕捉分子近傍に長く存在する標的物質とのみ特異的に反応することが期待される。一方、標的捕捉分子と NH_2 基との基本的な反応性の確認は、 NH_2 基が分子型で存在し得るメタノール中にて行った。その結果、45 min 程度ですべての標的捕捉分子が NH_2 基と反応することが確認された。

研究計画では、これら分子材料を $\text{MNP@CA}(\text{SH})$ へ位置選択的に修飾し、標的認識能と標的捕捉能の連携を評価する予定であったが、 MNP@CA の一次修飾剤 (CA) の安定性に関する問題が生じたため、こちらの検討を優先することとした。

4 - 4 . 一次修飾ナノ粒子の修飾剤安定性の評価

一次修飾ナノ粒子の修飾剤、すなわち MNP@CA 表面に配位修飾されたクエン酸分子は、以後に修飾される機能性分子を MNP 表面に保持する重要な役割を担っており、機能化された MNP の性能はこのクエン酸分子が脱離しない前提に基づいている。しかしながら、この安定性に関する報告はなされておらず、特定の条件において不安定化する事実は知られていなかった。この一次修飾剤の不安定化は、上述の理由からナノ粒子のバイオ応用研究に重大な影響を及ぼす可能性がある。したがって当初の研究計画を変更し、このクエン酸の安定性評価に関する検討を優先して行うこととした。さらに SH 基ワンスポット修飾のプロセスで得られる修飾補助材料へ固定した MNP (図 4a) は、修飾剤安定性の評価に適していることを見出した。 MNP@CA は一次修飾剤であるクエン酸を介して修飾補助材料表面に固定されており、このクエン酸が何らかの作用により MNP 表面から脱離すれば、それは修飾補助材料表面からの MNP の脱離を意味する。したがって、修飾補助材料表面の MNP の残存率を評価すれば修飾剤の安定性の定量的な評価が可能となると考えた。残存率は、酸処理にて生じた MNP 由来 Fe を比色分析により測定し、算出した。実際に、種々の溶液中に一定時間浸漬した後、修飾補助材料に残存している MNP 量を測定したところ、30 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中 37°C、24 h 浸漬の条件において著しく不安

定化し、その MNP 残存率はおよそ 25%であった。一方、他の緩衝剤（HEPES や Tris）に対しては概ね安定であったことから、不安定化の主因は pH や温度ではなく緩衝液成分のリン酸であり、リン酸と金属との親和性に由来する配位子交換に起因すると考えられる。この不安定化条件は細胞内環境に近い条件であり、細胞を対象としたバイオ応用を目的とする材料にとって非常に重要な知見である。また、この評価法は修飾補助剤に固定できるすべての一次修飾剤に適用でき、溶媒としても水系のみならず有機溶媒も扱うことができる。実際に、複数の有機溶媒中においても安定性評価を行い、特定の有機溶媒で不安定化することが明らかとなった。このことは、ナノ粒子へ分子修飾を行う際の反応条件を最適化するうえで重要な知見となる。さらに、一次修飾剤はその構造に由来する化学的性質により溶液に対する親和性がそれぞれ異なるが、本評価法はその影響を受けることのない優れた方法と考えられる。

本研究のまとめとして、細胞内サンプルリターンのための多機能性ナノ粒子の開発を試みた。種々の機能を担う材料合成は達成し、精密位置制御分子修飾法も概ね確立できた。一方、分子材料を実装した MNP の機能については、想定外の一次修飾剤の不安定化現象の検討を優先したため評価を行うことはできなかった。しかしながら、今回見出した一次修飾剤の安定性はほとんど認識されていない重要な現象であり、ナノ粒子のバイオ応用研究の発展に不可欠な重要な研究テーマであると考えられる。したがって、今後さらに一次修飾剤の安定性に関する研究を継続するとともに、細胞内サンプルリターン材料の開発も並行して進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木隆浩, 濱田卓弥, 佐藤浩輔, 村井毅
2. 発表標題 バイオ応用のための配位型分子修飾磁性ナノ粒子の安定性評価
3. 学会等名 日本化学会第100春期年会(2020)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----