

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22249

研究課題名（和文）多機能性ナノ粒子プローブによる細胞表面分子ダイナミクス解析とガン細胞診断応用

研究課題名（英文）Analysis of biomolecular dynamics on the cell surface using multifunctional nanoparticle probes

研究代表者

三原 久和（Mihara, Hisakazu）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：30183966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：ガン細胞表面の生体分子と相互作用するリガンド群と分子ラベル化触媒を蛍光ナノ粒子上に集積した多機能性プローブを開発し、標的タンパク質やガン細胞表面の生体分子との相互作用の解析を実施した。酵素阻害剤や糖、細胞膜透過性ペプチド（CPP）を修飾した蛍光シリカナノ粒子を調製することに成功した。また、ラベル化反応により標的タンパク質に蛍光色素を標識して解析することができた。さらに、ガン細胞上の糖受容体を蛍光イメージングすることに成功した。また、ガン細胞選択的なCPP修飾ナノ粒子により、ガン細胞を選択的に識別することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、蛍光性シリカナノ粒子を種々のリガンドおよび分子ラベル化触媒で機能化することにより、細胞表面の生体分子のダイナミクスを解析する画期的な分子プローブを提供する研究である。ガン細胞に特有の生体分子を可視化、ラベル化による動態解析することが可能なプローブの開発は、ガン細胞の悪性度診断やガン疾患のメカニズム解明に貢献することが期待され、学術的に意義のある研究である。また、ガン細胞のフィンガープリント解析はテーラーメイド医療につながると期待され、社会的にも有意義な研究である。

研究成果の概要（英文）：We developed multifunctional fluorescent silica nanoparticles modified with ligands that bind to biomolecules on the surface of cancer cells. An enzyme inhibitor, a carbohydrate ligand (galactose) or cell-penetrating peptides (CPPs) were successfully modified on the surface of fluorescent nanoparticles. A galactose-binding receptor protein on the cancer cell surface was selectively visualized by galactose-modified fluorescent silica nanoparticles. In addition, fluorescent silica nanoparticles conjugated with cancer cell-selective CPPs could discern cancer cells and normal cells in the fluorescent imaging experiments.

研究分野：生命化学

キーワード：ペプチド リガンド 蛍光 ナノ粒子 ガン細胞 イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ガン化した細胞では、細胞表層の膜タンパク質や複合糖質などの生体分子の発現量や組成が正常細胞と比較して大きく異なることが明らかにされつつある。このことは、ガン細胞が表層の生体分子のダイナミクスを変化させることで、異常な増殖能や疾患部位からの浸潤、他の臓器への転移能を獲得していることを示唆している。細胞のガン化のメカニズムの解明や、ガン細胞の検出、さらにはガン細胞の悪性度の診断のためには、細胞表層の生体分子のダイナミクスを解析することが重要である。特定のタンパク質群を解析するフォーカスドプロテオミクスなど、各分野で挑戦的に研究されているが、画期的な方法論は未だ研究途上である。

2. 研究の目的

これまでに、タンパク質を解析するための分子ツールとして設計ペプチドライブラリを利用し、蛍光標識したライブラリの応答パターン(フィンガープリント)により標的タンパク質を解析する技術を開発してきた。本研究では、ガン細胞表層の生体分子と相互作用するリガンド群と分子ラベル化触媒を蛍光ナノ粒子上に集積した多機能性プローブを開発し、ガン細胞表層の生体分子のイメージングとダイナミクスを解析することを目的とした。

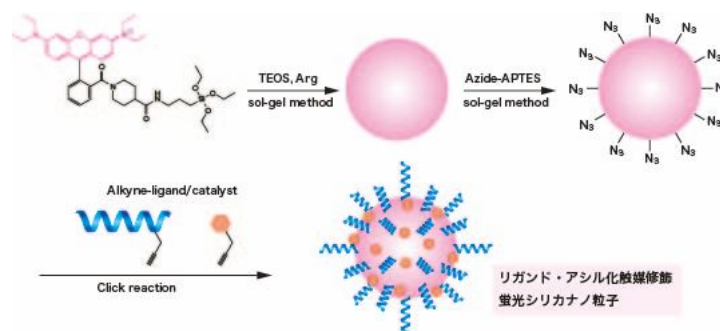
3. 研究の方法

(1) リガンドとアシル化触媒を修飾した蛍光シリカナノ粒子の調製

ナノ粒子の基材として生体内において安定で毒性を示さないシリカ(SiO_2)を利用した。赤色蛍光を示すローダミン B (RhoB) のシランカップリング誘導体を合成し、アルギニン(Arg)を触媒としたテトラエトキシシラン(TEOS)の加水分解と重縮合による汎用的な sol-gel 法で封入した蛍光シリカナノ粒子を調製した。さまざまなリガンドをナノ粒子上に修飾するため、アジド基を有するシランカップリング剤を合成し、ナノ粒子表面にアジド基を提示させた。

リガンドとして、ベンゼンスルホンアミド(炭酸脱水酵素の阻害剤)、ガラクトース、細胞膜透過性ペプチドを選択し、アルキン基を導入したこれらの誘導体を合成した。クリック反応により、アジド基を提示した蛍光シリカナノ粒子表面にリガンドを修飾した。

アシル化触媒として 4-dimethylaminopyridine (DMAP) を選択し、アルキン基を導入した誘導体を合成した。リガンドと同様に、クリック反応により DMAP を蛍光シリカナノ粒子表面に修飾した。



(2) タンパク質のラベル化解析

ベンゼンスルホンアミドと DMAP を修飾した蛍光シリカナノ粒子を用い、炭酸脱水酵素のラベル化解析を行った。ラベル化剤として蛍光色素フルオレセインのチオエステル誘導体を合成した。ラベル化したサンプルは電気泳動後にゲルイメージャーで解析した。



(3)細胞イメージング

ガラクトースを修飾した蛍光シリカナノ粒子を用い、ガン細胞表層の糖結合受容体の蛍光イメージングを行った。ガラクトース結合性のアシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)を発現していることが報告されている肝ガン組織由来細胞の HepG2 を用いた。比較として、ASGPR を発現していない乳ガン細胞 MCF7 を用いたイメージングも行った。

当研究室で見出したガン細胞選択的に膜透過能を示す細胞膜透過性ペプチドを修飾した蛍光シリカナノ粒子を用い、ガン細胞と非ガン細胞の蛍光イメージングを行った。ガン細胞として HeLa、非ガン細胞として HEK293 を用いた。

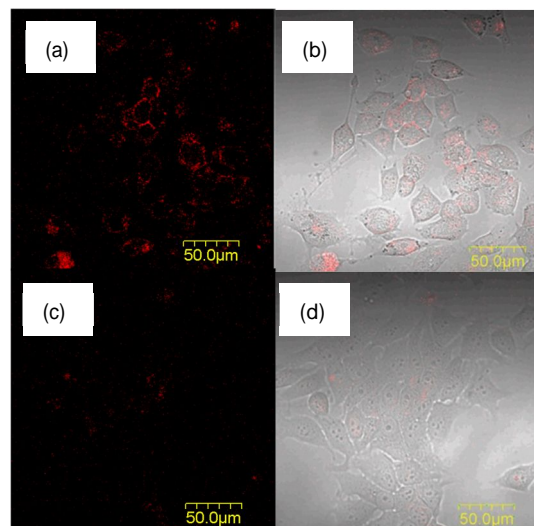
4. 研究成果

RhoB を封入したシリカナノ粒子を粒径(15 nm)を制御して調製することができた。また、調製した蛍光シリカナノ粒子上にアジド基を提示し、クリック反応により、ベンゼンスルホンアミド、ガラクトース、細胞膜透過性ペプチドを集積することができた。1粒子あたりの修飾数は、ベンゼンスルホンアミドが約300個、ガラクトースが約600個、細胞膜透過性ペプチドが約30個、と見積もることができた。これらの修飾数の違いは、リガンドの分子量に依存するものと考えられる。細胞膜透過性ペプチドの分子量は2000 Da 以上であり、分子量約200のガラクトース誘導体と比較すると10倍以上、分子量が大きい。そのため、粒径15 nmのナノ粒子上に密に提示できる分子数が少なくなったものと推察される。

ベンゼンスルホンアミドとDMAPのアルキン誘導体を用いて修飾した蛍光シリカナノ粒子を調製することができ、炭酸脱水酵素を選択的にラベル化することに成功した。ナノ粒子にリガンドを集積した多価効果により、低濃度の標的タンパク質でもラベル化できることが示唆された。

ガラクトースを修飾した蛍光シリカナノ粒子を用い、ガン細胞上の受容体を蛍光イメージングすることに成功した。ASGPRを発現している HepG2 表面でナノ粒子の蛍光が強く観察されたのに対し、ASGPRを発現していない MCF7 表面からは蛍光がほとんど観測されなかったことから、HepG2 上の ASGPR を選択的にイメージングできたと考えられる。

細胞膜透過性ペプチドを修飾した蛍光シリカナノ粒子を用い、ガン細胞を選択的に蛍光イメージングすることに成功した。低濃度の蛍光シリカナノ粒子を用いた場合でも、ガン細胞である HeLa 表面でナノ



ガラクトース修飾蛍光シリカナノ粒子を用いた HepG2 細胞(a,b)と MCF7 細胞(c,d)のイメージング

粒子の蛍光が強く観察されたのに対し、非ガン細胞である HEK293 からは蛍光がほとんど観測されなかった。ガン細胞選択的な細胞膜透過性ペプチドを蛍光シリカナノ粒子に集積することにより、多価効果が発揮され、低濃度でも選択的にガン細胞を可視化できたと考えられる。

以上の結果から、蛍光シリカナノ粒子に種々のリガンドおよびラベル化触媒を集積することにより、標

的タンパク質のラベル化解析や、特定の細胞上の生体分子を蛍光イメージング可能な、多機能性ナノ粒子プローブを創製することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mimi Tian, Takayuki Miki, Hiroshi Tsutsumi, Hisakazu Mihara
2. 発表標題 Cell-penetrating activity analysis of amphiphilic alpha-helix peptides from designed peptide library
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川脇 良太, 河原 大樹, 三木 卓幸, 三原 久和, 堤 浩
2. 発表標題 タンパク質のラベル化を指向したリガンド修飾シリカナノ粒子の創製
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
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
研究協力者	堤 浩 (Tsutsumi Hiroshi) (70398105)	東京工業大学・生命理工学院・准教授 (12608)	
研究協力者	三木 卓幸 (Miki Takayuki) (20823991)	東京工業大学・生命理工学院・助教 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------