

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12656

研究課題名(和文) Lab-on-a-chipによる細胞内デリバリーキャリアナノ粒子の創製

研究課題名(英文) Creation of carrier nanoparticles for intracellular delivery by Lab-on-a-Chip

研究代表者

武岡 真司 (Takeoka, Shinji)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20222094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Lab-on-a-chipデバイスを用いて、A．カチオン性アミノ酸型脂質の合成、B．キャリアナノ粒子の調製、C．ナノ粒子による薬物の細胞内デリバリー評価までのプロセスを行う。Aではフロー合成法によりカチオン性脂質ライブラリーを構築した。Bのリボソーム調製マイクロ流体デバイスのうちHerringbone構造では目詰まりが頻発し、洗浄工程が煩雑であった。スタティックミキサー構造では流路が単純構造で分解洗浄できる。薬物内包条件を重回帰分析し各々の特徴を整理した。Cでは、カチオン性リボソームと細胞の相互作用をカルシウム応答パターンから取得し、エンドサイトーシスや膜融合では異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フロー合成法の確立により、短期間にケミカルライブラリーを構築できることを実践を通じて明らかにした。パッチ式によるスケールのミスマッチはフローにより解消され、溶媒や試薬の量も大幅に低減でき環境負荷を大幅に軽減できた。新規マイクロ流体デバイスを用いてリボソームを目詰まりなく調製する方法を提案できたことは、リボソームや脂質ナノ粒子の製造において意義がある。カルシウム応答性からリボソームの細胞内動態を解析する方法は、ラベルフリーにてリボソームと細胞の相互作用を短時間でスクリーニングできる方法として有望である。本方法はLab-on-a-chipを用いたフローシステムに対する適合性も高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：Nanoparticles such as liposomes with excellent systemic and intracellular delivery are important in the development of drug delivery systems (DDS). In this project, using a lab-on-a-chip device, we synthesized amino acid-type lipids (A), prepared liposomes (B), and evaluated intercellular delivery systems using the liposomes (C). (A) We conducted construction of a cationic lipid library using the flow reactor synthesis and the characterization of the cationic lipid liposomes. (B) In the microfluidic device with a Herringbone structure, clogging frequently occurs in the flow paths. The microfluidic device with a static mixer can be easily cleaned. Parameters related to drug encapsulation performance were compared in detail by multiple regression analysis. (C) Cationic liposomes were added to macrophage-like cells, and the intracellular calcium response pattern was monitored by real-time fluorescence imaging. The response changed significantly for endocytosis and membrane fusion.

研究分野：ナノバイオマテリアル、ナノメディシン

キーワード：リボソーム アミノ酸型脂質 カチオン性脂質 薬物運搬システム フロー合成法 マイクロ流体デバイス 細胞内デリバリー カルシウム応答性

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

優れた体内ならびに細胞内動態を示すリポソームなどのキャリアナノ粒子は、薬物運搬システム(DDS)の開発、特に、核酸医薬品やゲノム編集における遺伝子治療用キャリアの開発において重要であり、そのために多くの研究に様々なリソースと資金がかけられてきた。例えば、新規なリポソームの開発における基本的な操作はほとんどがバッチ式で成されており、スケールのミスマッチによる無駄や効率の悪さが大きな障壁となる。新しい脂質の有機合成であればドラフトやエバポレーター、凍結乾燥機、クロマト分離システムなどの設備や備品を揃え、大量の有機溶媒や危険な試薬を扱うためのスキルと細心の注意を必要とし、廃液や試薬の廃棄にも大学が人件費と処理費をかけて定められたルールに従わなければならない。数十 mg レベルで合成物が得られたとしても、同定や基本的な細胞評価は数 ng あれば行える。リポソームなどのナノ粒子を調製する際も、エクストルーダー、ろ過、超遠心分離など、数 mL スケールのバッチ式で行う器具や装置で調製しても、キャラクタリゼーションや細胞実験は数滴レベルで十分である。この様にスケールギャップは研究の遂行に大きな障害になっている。他方、製薬企業では、大掛かりな分注ロボットを用いてケミカルライブラリーや遺伝子のハイスループットスクリーニングがなされているが、設備投資に見合う成果が得られているのであろうか。ましてや大学の研究室では到底利用できるものではない。そのためにリソースのオープン化による産官学連携が必要となろう。他方、リソグラフィ技術とマイクロ流体工学を基本とする Lab-on-a-chip デバイスが成熟期に入り、デバイス自体の開発からデバイスを利用した応用研究の段階に入ってきた。モールドの製作には費用がかかるものの、それ以降のチップの加工はどの大学にもある工作室で行え、チップ自体は使い捨てにできるほど安価で、シリンジポンプなどを揃えればどの研究室でも実施できる。すなわち、研究者が基盤研究(C)程度の予算規模で独立した状態で、分子細胞生物学的な学術研究に Lab-on-a-chip デバイスで調製したナノ粒子を導入できる段階に入ってきたと思われる。Lab-on-a-chip デバイスに多変量解析を組み合わせれば、少量・短時間・多種類のサンプルを効率的に評価しながらリポソームの調製条件を少量、そして短時間で最適化することができる。また、フロー合成法も流路を用いて反応液を混合することで希釈されずに反応を高効率に進めることができる Lab-on-a-chip デバイスの一つである。報告者の対象としている脂質は、極性頭部、スパーサー、アシル鎖がアミド結合とエステル結合で結合されているため、縮合反応をフロー合成法にて条件を変えながら連続的に行う脂質合成も Lab-on-a-chip の考え方で行うことができる。

2. 研究の目的

当初の本計画では、Lab-on-a-chip デバイスを用いて、A. アミノ酸型脂質の合成、B. キャリアナノ粒子の調製、C. キャリアナノ粒子による薬物の細胞内デリバリー評価 までのプロセスを連結させて、脂質や薬物の種類に応じたキャリアナノ粒子の最適化を多変量解析から行う。A のマイクロフロー反応デバイスにて脂質各部を連結させて得られるライブラリーに対して、B のマイクロ流体デバイスを用いて薬物内包リポソームや核酸複合脂質ナノ粒子を構築し、C のマイクロ流体デバイスを用いてナノ粒子と細胞を混合し薬物や核酸の細胞内デリバリーを共焦点顕微鏡の画像解析から評価する。各プロセスの多変量解析から説明変数を明らかにし、最適化を高効率に行うことであった。しかしながら、COVID-19 蔓延により 2020 年度から 2021 年度にかけて研究のアクティビティが大幅に低下した。そのために B に関しては、A でカチオン性脂質が合成を進めている間、リポソームの研究でよく用いられる脂質組成を用いてマイクロ流体デバイスを用いたリポソームの調製条件を多変量解析にて評価した。C についても核酸複合脂質ナ

ノ粒子の代わりに、Aで合成したカチオン性脂質リボソームの細胞内デリバリーをカルシウム応答の画像解析から評価する目的に変更した。

3. 研究の方法

A. マイクロフロー合成法によるアミノ酸型脂質ライブラリーの構築

アミノ酸型脂質を頭部、スペーサー部、尾部に分けて既存のバッチ式合成法により量合成を行う。具体的には、頭部として二つのアミノ基を Boc で保護したリシン ((Boc)-Lys(Boc)-OH) を、スペーサー部としてカルボニル基を Bz 基で保護した短鎖アミン ($H_2N-C_n-OBzl, n=3, 5, 7$) を、尾部として、アミノ基を Boc 基で保護したグルタミン酸 (Boc-Glu(OH)-OH) の二つのカルボニル基に二つの長鎖アルコールをエステル結合した (Glu2C_m, $m=14, 16, 18$) を量合成した。フロー合成法に用いられる T 字ミキサーを用いて、頭部アセトニトリル溶液をトリフオスゲンと混合してから、さらに T 字ミキサーを用いてスペーサー部アセトニトリル溶液と混合させた。これを塩化アンモニウム水溶液に受けてトリフオスゲンを失活させた。分液による抽出と洗浄、カラム精製により頭部 + スペーサー部を得た。頭部 + スペーサー部 Bz 基の脱保護反応は、T 字ミキサーを用いて水素と混合した後 Pd/C カラムにフローさせて行った。これをアセトニトリルに溶解させて、T 字ミキサーを用いてトリフオスゲンと混合させてから尾部アセトニトリル溶液と反応させて、先の反応と同様に精製を行った。最後に Boc 基の脱保護は TFA にて行った。

B. マイクロ流体デバイスを用いるリボソームの調製

代表的なアミノ酸型脂質として Lys-C3-Glu2C16 を選定し、GFP をエンコードする pDNA と静電的相互作用と疎水性相互作用によって複合させた脂質ナノ粒子(LNP)を既存のマイクロ流体デバイス(staggered herringbone micromixer (SHM), Darwin Microfluidics 社製)を用いて調製を試みた。より一般化したリン脂質組成 (DPPC, cholesterol, DHSG, PEG-DSPE, 5:5:1:0.066) を用いてマイクロ流体デバイス自体(modified K-series SM, Noritake 社製)を評価した。混合脂質に 0.2 mol% の DiD を混合させ、濃度が 15-90 mg/mL になるようにエタノールに脂質を溶解させた。内包評価にはカルセインを選び PBS に溶解させた。脂質エタノール溶液とカルセイン水溶液を 2 種類のマイクロ流体デバイスと 2 台のシリンジポンプを用いて混合(水/エタノールの混合比: FRR3,4,5、全流束: TFR1500, 2000, 2500 μ L/min)した。未内包カルセインとエタノールは Vivaspin®6, 100,000 MWCO, (Sartorius 社製)を用いて遠心ろ過して除去した。粒子径、分布(PDI)、ゼータ電位は Zetasizer Nano (Malvern Panalytical 社製)を用いて測定した。脂質回収率(LRR)、カプセル化効率(EE)、担持率(Loading)は、SynergyH1 fluorescent plate reader (BioTek 社製)による DiD 蛍光定量値から LRR を計算し、カルセインの定量値から EE を計算、そして Loading を求めた。また、リボソームのラメラリティは、TNS にてリボソーム分散液のリボソーム総表面積を求める方法を用いて、超音波照射法で調製した一枚膜リボソーム分散液における脂質濃度と TNS の蛍光強度と、サンプルリボソーム分散液のそれとの比較から計算した。

C. マイクロ流体デバイスを用いる核酸複合脂質ナノ粒子の細胞内デリバリーの評価

核酸複合脂質ナノ粒子の研究を行う前に、核酸を複合させない状態のカチオン性脂質リボソームによる細胞内デリバリーのコントロール実験を行った。その結果、思いがけない発見があり、カチオン性脂質リボソームの細胞内デリバリーを画像処理したカルシウム応答性から評価する計画に変更した。その方法を以下に示す。

K3C14 および K3C16 を HEPES 緩衝液(2mL、20mM、pH7.4)中で室温にて水和した後超音波処理(発振周波数 38kHz、室温、1時間)により粒子径を制御した。THP-1 細胞は、RPMI 培地にて培養し(2.0 \times 10⁵個/mL、1mL)を、PMA にて 18 時間刺激した後更に 1 日間インキュベート

した。DPBS で 3 回洗浄した後、HBS で希釈した Fura 2-AM を添加したディッシュを倒立型蛍光顕微鏡 (IX71、オリンパス社製) に設置した。2 つの波長 (340 nm と 380 nm) の励起光を 3 秒ごとに交互に Fura 2-AM を励起した。ビームスプリッターとエミッションフィルターを通した光を冷却 CCD カメラで撮影した。HBS 希釈リポソーム分散液を培地に添加し画像を撮影した。細胞を取り囲むように ROI を設定し 2 波長における蛍光画像のレシオ比 F340/F380 を算出した。

4 . 研究成果

A . マイクロフロー合成法によるアミノ酸型脂質ライブラリーの構築

2020 年度はフローマイクロリアクターを用いてアミノ酸型脂質の合成を行った。Fmoc-C3-wang resin を詰め込んだカラムを流路に接続し、Fmoc の脱保護、Z-Lys(Z)-OH 縮合、脱樹脂させて Z-Lys(Z)-C3-COOH を 2.5 時間で 97.6 % の収率で得た。次にマイクロ流路内の最初の T 字ミキサー内で Z-K3COOH とトリフォスゲンを混合し、0.5 秒の滞留を経て次の T 字ミキサー内で Glu2C14 溶液と混合し 4.3 秒の間にアミド縮合を完結させた。15 通りの反応条件を検討した結果、3 分間の送液稼働にて 82mg の Z-Lys(Z)-C3-Glu2C14 が 32% の収率で得られたものの、Z 基の脱保護に失敗した。そこで合成経路を大幅に変更した。具体的には、方法に記載した通り Boc-Lys(Boc)-OH を T 字ミキサー内でトリフォスゲンと混合し 0.5 秒の滞留を経て H₂N-C3-OBzl を混合し 4.3 秒の滞留で Boc-Lys(Boc)-C3-OBzl を 65% の収率で得た。バッチ式の接触還元によって Bzl 基の脱保護した Boc-K3-COOH を得、同様にフロー合成法にてこれをトリフォスゲンと混合後 Glu2C14 を混合し 4.3 秒の滞留で Boc-Lys(Boc)-C3-Glu2C14 を 21% の収率で得た。バッチ式の TFA による脱保護で 83% の収率で K3Glu2C14 (K3C14) を得た。脱保護と分液操作やクロマトを用いた精製などの工程はバッチ式の方が簡便で確実であるためにそのまま利用することにしたものの、フロー合成法の適用により全合成行程をたった 1 日で完了させることができたことは大幅な成果である。

2021 年度は、合成担当者が変わり COVID-19 のために引き継ぎがほとんどできなかった。再現性のチェックから本合成法の検討を行い、構造の異なるアミノ酸型脂質においても若干の条件調整によって同様に短時間で高収率が得られることを確認した。そして、アミノ酸型脂質の極性頭部、スペーサー、疎水性尾部のライブラリーにおいてスペーサー部の合成を行い、ライブラリーを充実させた。2022 年度は、本研究にて確立したフローマイクロリアクターを用いる合成法によりカチオン性脂質ライブラリーを構築し、得られたカチオン性脂質リポソームとして物性を整理した。

B . マイクロ流体デバイスを用いるリポソームの調製

マイクロ流体デバイスを用いたリポソームや核酸脂質複合ナノ粒子の調製法に関しては、混合脂質エタノール溶液と蛍光タンパク質あるいは pDNA の水溶液 を混合させることで行った。100 から 150 nm のサイズのナノ粒子を連続的に調製できることを確認した。また、エタノールや未内包の分子を連続的に除去するミニチュア型中空糸モジュールを開発した。

他方、マイクロ流体デバイス (SHM) を用いたリポソームに関しては目詰まりの問題に直面した。カチオン性アミノ酸型脂質 Lys-C3-Glu2C16 を pDNA と静電的相互作用と疎水性相互作用によって複合させた脂質ナノ粒子 (LNP) を既存の SHM を用いて調製を試みた。都度洗浄することで再現性良い結果が得られたものの、それではバッチ式と変わらなくなることからマイクロ流体デバイス自体の構造と素材 (ガラスからステンレスへの変更) について検討を開始した。2021 年度では、2020 年度に開発したエタノールや未内包の分子を連続的に除去するミニチュア型中

空糸モジュールを用いてリポソームの調製から精製工程までを重回帰分析を行い、説明変数を特定するとともに最適化を図った。その結果、収率向上のための流路の前処理方法を見出した。2022年度では、超小型のスタティックミキサーを開発している企業の協力を得て、マイクロ流路デバイス内にスタティックミキサーを挿入した新しいマイクロ流体デバイス（SM）を評価した。SMは分解して洗浄ができ、透明なのでフロー状態を目視で観察できるなどSHMと比較して優れた特徴があった。また、ミニチュア型中空糸モジュールの作製は手作りであるため、手間がかかる上中空糸モジュールも目詰まりが起り、時間とともにフロー条件が変化することが分かった。ゲルろ過カラムもエタノールや未内包分子を完全に分離すると大幅に希釈されてしまう課題があった。そのため既存の遠心ろ過分離を原理とする Vivaspin®6 を用いることとした。2022年度では、方法で記載した様に二つのマイクロ流体デバイス SHM と SM を用いて同条件で同組成の混合脂質から調製し、多変量解析を行って比較した。マイクロ流体デバイスにおいて、粒子径、PDI、LRR、EE、Recovery を目的変数とし、その因果関係を独立に示す説明変数を明らかにした。詳しい結果に関しては論文審査中なので現段階では報告できない。いずれの装置においても、エタノール中の脂質濃度が高くなるにつれて粒子径が大きくなり、SMで調製したリポソームはSHMよりも粒子径は大きいことが明らかとなった。しかし、PDIはSMの方が有意に小さく粒子径の制御に優れることが分かった。また、EEはSMの方がSHMよりも低く、脂質濃度の増加に伴い差が開いていったが、ラメラリティの増加から説明できることが分かった。

C. カルシウム応答性によるカチオン性脂質リポソームと細胞との相互作用の評価

2021年度は、カチオン性脂質リポソームがマクロファージ様細胞のインフラマソームを誘導し、IL-1 β を放出させる機構を調べたところ、カルシウムシグナルが関わっていることに気が付き、Fura2-AMによってレシオ型蛍光画像を解析する作業を開始した。リポソームを添加後細胞内へのカルシウム流入によって Fura2-AM の発光が見られるために短時間で評価するのに適していた。しかしながら、同一視野でも細胞ごとに応答パターンが異なることも気になり、全細胞についてカルシウム応答を記録することとした。細胞ごとの応答パターンを機械学習にて解析したところ特徴的なパターンに分類できることを見出した。そこでリポソームの構成脂質の細胞内動態とカルシウム応答パターンをリンクさせる作業を開始した。2022年度にて、通常の脂質リポソームと同様にエンドサイトーシスで取り込まれるカチオン性アミノ酸型脂質 K3C14 リポソーム分散液の添加では、添加してしばらく経ってから小さいピークが複数認められた。他方、当研究グループが見出した膜融合能の高い K3C16（K3C14よりも尾部のアルキル鎖の炭素数が2つ多い）リポソーム分散液の添加では、添加直後に大きなピークが認められた。そこで、視野中のすべての細胞においてあるルールを設けてピークを検出し、ピークの強度とタイミングをプロットしたところ、ほとんどの細胞に共通して膜融合能の高い脂質では特徴的に添加早期に大きなピークが見られることが明らかとなった。これは膜融合能が知られている他の脂質リポソーム分散液においても認められたことからカルシウム応答挙動の観察からカチオン性リポソームと細胞との相互作用を解析できることを示唆している。従来は、リポソームの脂質二分子膜を蛍光プローブで標識し、蛍光標識脂質と細胞膜の共局在を顕微鏡で観察していた。しかし、蛍光標識自体が脂質の動態に影響を与えることが懸念されており、更に蛍光ラベル化操作も煩雑であった。したがって、本法はラベルフリーにてリポソームと細胞の相互作用を短時間でスクリーニングできる方法として有望である。そして本方法は、本研究課題のテーマである、Lab-on-a-chip を用いたフローシステムに対する適合性も高いと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morihiro Hotta, Kengo Hayase, Aya Kitanaka, Tianshu Li, Shinji Takeoka	4. 巻 34
2. 論文標題 Development of the observation of membrane fusion with label-free liposomes by calcium imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2023.101483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 植原俊太郎、武岡真司
2. 発表標題 重回帰分析によるマイクロ流体デバイスを用いた薬物内包リポソーム調製条件の検討
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aya Kitanaka, Tianshu Li, Shinji Takeoka
2. 発表標題 Evaluation of Cationic Liposomes on Inducing Calcium Mobilization in THP-1 Cells
3. 学会等名 第8回アジアバイオマテリアル学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tianshu Li, Shinji Takeoka
2. 発表標題 Preliminary study on the in vitro pre-activation of T cells by arginine-based cationic liposomes
3. 学会等名 第8回アジアバイオマテリアル学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀田 盛弘、早瀬 賢吾、武岡 真司
2. 発表標題 カルシウムイメージングによるリボソームと細胞との相互作用観察
3. 学会等名 日本血液代替物学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早瀬 賢吾、堀田 盛弘、Tianshu Li、武岡 真司
2. 発表標題 ルカルシウムイメージングによるカチオン性リボソームと細胞の相互作用の観察
3. 学会等名 日本化学会第103春季大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Takeoka Lab http://www.takeoka.biomed.sci.waseda.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

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
---------	---------