

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300176

研究課題名（和文） 細胞機能解析バイオデバイスとしての生体親和型ポリマーナノ粒子の創製

研究課題名（英文） Preparation of biocompatible polymer nanoparticles as cell-function analysis biodevices

研究代表者

石原 一彦（ISHIHARA KAZUHIKO）

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：90193341

研究成果の概要（和文）：新しい細胞機能解析バイオデバイスとしてのポリマーナノ粒子を創製した。すなわち、ポリマーナノ粒子表面を細胞膜類似構造のリン脂質ポリマーで被覆し、さらに内部に分光学的方法で安定に識別できる量子ドットを導入した。この表面に特異的に生理活性バイオ分子を結合することで、その分子の細胞機能に与える効果のみ明確に測定・判別した。リン脂質ポリマーの効果で、細胞内に全く取り込まれないことを世界で初めて実証した。また、細胞内へのナノ粒子の取り込みには、表面に結合するポリペプチドの化学構造、組成、密度などが重要な役割を果たすことを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Polymeric nanoparticles for new cell-function analytical biodevices were prepared. The polymeric nanoparticles covered with phospholipid polymer, which functioned as artificial cell membrane, and quantum dots were embedded in the polymer nanoparticles. Moreover, special functional biomolecules, oligopeptide, were introduced on the surface to understand their functions to the cell responses. Effects of phospholipid polymer were clearly demonstrated that the nanoparticles did not internalize to the cells without biomolecules on the surface. On the other hand, when the some specific oligopeptide were immobilized on the surface, the nanoparticles turned to cell-penetrative. That is, it could be concluded that the chemical structure, sequence, and density of the oligopeptide strongly influence cell internalization of the nanoparticle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：

キーワード：ナノ粒子・細胞機能・生体親和性・リン脂質ポリマー・量子ドット・磁性粒子・細胞膜透過ペプチド

1. 研究開始当初の背景

新しい細胞機能解析バイオデバイスとしてのポリマーナノ粒子の創製を実現する。すなわち、ポリマーナノ粒子に細胞に全く認識されないリン脂質ポリマー表面を作製し、さらに内部に簡便な分光学的方法で識別可能なプローブ(量子ドット: QD)と回収を容易にする磁性粒子を導入する。この表面に特異的に生理活性バイオ分子を結合することで、その分子の細胞機能に与える効果のみ明確に測定・判別できるポリマーナノ粒子を創製する。これを細胞分析、分離、観察に応用することで細胞機能変化を指標として、バイオ分子の機能を解析することを目的としている。これによりマテリアルと細胞間で生じる重篤な炎症反応や生体組織の治癒過程について、バイオ分子の役割を明確にしながら解明することを目指す。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 安定で粒径制御できる MPC ポリマーの設計と合成、MPC ポリマー被覆ナノ粒子の創製と粒子特性の解析およびナノ粒子表面の解析を中心とした生体親和型ポリマーナノ粒子の創製、(2) ナノ粒子内部への機能性無機結晶(量子ドット、磁性粒子)とナノ粒子表面へのバイオ分子の固定化条件の最適化、固定化したバイオ分子の活性と選択性の解析からなるバイオアフィニティーナノ粒子の創製、(3) ナノ粒子と接触した場合の細胞応答・組織反応の追跡、バイオ分子特性と細胞機能との相関に着目した細胞応答解析に基づくバイオ分子機能評価から構成される。

3. 研究の方法

細胞に全く認識されない生体親和型ポリマーナノ粒子を調製するにあたり、基盤となるリン脂質ポリマー(MPC ポリマー)の分子設計と合成を行う。ここでは、MPC と共重合するモノマーの一つとして両親媒性を付与する観点から疎水性モノマーを選択し、さらに表面にバイオ分子を穏和な条件で固定化できる官能基を導入する。このポリマーを表面処理剤と分散安定剤として応用し、水中で溶媒蒸発法により疎水性ポリマーを核としたポリマーナノ粒子を調製する。表面解析を行い、ポリマー構造とナノ粒子の特性との関連を明らかにする。次いで内部に量子ドットや磁性粒子を導入し、識別性と回収性を併せ持つ機能化を実施する。特定のバイオ分子を選択し、ナノ粒子表面に化学結合させて、バイオアフィニティーを有するナノ粒子を作製する(図1)。この際に、アフィニティー能力を結合・解離定数を求めることにより定量的に評価する。これを利用して、細胞系との

反応過程を検討するとともに、細胞内取り込みや細胞内移動などの観察をフローサイトメーターや共焦点レーザー顕微鏡により行う。最終的に、ナノ粒子表面に結合したバイオ分子の役割について細胞機能変化との関連を明らかにし、炎症反応と治癒過程を分子化学的に解明する。また、新しいバイオ分子探索、生体親和型マテリアル設計概念の提示、細胞分離手法に関連する基盤確立の方法論を提案する。

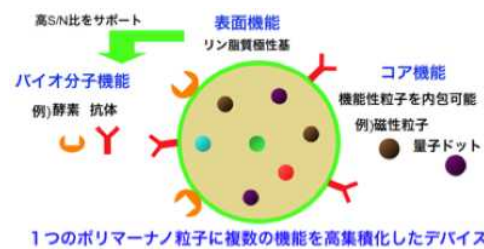


図 1. 細胞膜類似表面を有するポリマーナノ粒子の概念

(1) 生体親和型ポリマーナノ粒子の創製

研究期間のはじめに、48 時間以上細胞系と接触した場合においても、細胞に取り込まれないナノ粒子の構造を規定し、さらにその粒径、表面電荷、表面の官能基密度などをパラメーターとした調製条件を確立する。特に粒径に関しては、10-250nm の範囲を設定する。

(2) バイオアフィニティーナノ粒子の創製

ナノ粒子表面に結合するバイオ分子(タンパク質)の種類を選定し、その固定化条件を決定する。その際に、バイオ分子と選択的に結合する標的分子との結合、解離定数の算出を行いパラメーターとする。ナノ粒子の内部に蛍光標識する量子ドット、回収・分離を容易にする磁性粒子を導入する方法を確立する。これらの無機結晶は水媒体に対して分散性が悪いために、その表面が完全にポリマーマトリックス及びMPCポリマーで覆われる条件を決定する。

(3) 細胞応答解析に基づくバイオ分子機能評価

上記で作製したポリマーナノ粒子を利用して、貪食細胞系や接着細胞系を利用して、取り込み、細胞内移動、活性化、組織化など細胞反応に与えるバイオ分子の影響を明確にする。これからタンパク質を構成するポリペプチド構造に着目して、活性サイトを推定する。

4. 研究成果

(1) 細胞膜模倣表面を持つポリマーナノ粒子の調製

MPC ポリマーを利用して粒子を作製すると、

非特異的な細胞応答を阻止できる。そこで、水溶性で両親媒性の MPC ポリマーを設計し、これを乳化剤、表面処理剤としてポリマー粒子を作成した。粒子の直径は、MPC ポリマー溶液の濃度により制御できる。表面には親水性の MPC ユニットが存在し、水媒体に対する分散安定性も良好で、室温下においても数ヶ月間は沈殿することはない。さらに、活性エステルである *p*-ニトロフェニルエステル基を有する MPC ポリマー (PMBN) は、表面に酵素、抗体などのタンパク質や DNA などの特異的な分子認識機能を有するバイオ分子を、活性を低下させない温和な条件で反応、固定化できる。このポリマーを水に溶解し、ここに核となるポリ乳酸 (PLA) やポリスチレン (PSt) を水に混和しない低沸点有機溶媒 (塩化メチレンなど) に溶解した溶液を混合し、超音波照射により分散乳化する。この分散液を減圧下にて加温することで有機溶媒を揮散させると、ポリマー粒子の分散液が生成する。MPC ポリマーナノ粒子 (PMBN/PLA-NP) は高い水分散安定性、血清タンパク質の非特異的吸着抑制能、表面に固定化された抗体の活性保持機能を持ち、これらの特性を最大限に生かすことで標的タンパク質を高選択性かつ高 S/N 比で回収できることがわかった。したがって、PMBN/PLA-NP はバイオアフィニティーナノ粒子として優れた適性を備えている。

また、PMBN/PLA-NP 表面に固定化した抗体の活性が典型的な疎水性表面を有する PSt ナノ粒子上に固定した抗体の活性に比べると、結合定数から見積もった抗原/抗体複合体の安定性がオーダーにして 2 桁高く、この値は生体内における抗原/抗体複合体の形成定数を同程度であることが明らかとなった。このような現象がナノ粒子上で起こることはこれまでに報告されておらず、これは MPC ポリマーの効果であると考えられる。一方、従来の PSt ナノ粒子を利用した免疫分析では、抗体の活性低下により分析精度が低下している可能性を示唆している。MPC ポリマーを利用して作成された人工細胞膜表面では、媒体中のタンパク質の非特異的吸着を抑制し、かつ表面に固定化したタンパク質が活性を損なうことなく本来の機能を発現し得ることがわかる。すなわち、高感度バイオ分析を行う上で最適なプラットフォームを提供でき、バイオ工学や臨床検査・診断など様々な用途において高い潜在性を持つ。

(2) 蛍光イメージング機能を搭載したポリマーナノ粒子の創製と構造解析

MPC ポリマーナノ粒子である PMBN/PLA-NP は表面に最適なバイオ分子を結合させることで、バイオアフィニティーを発現できることが明らかとなった、さらなる機能化を試み、ポリマー粒子の内部に磁性ナノ粒子や量子

ドット (QD) を導入することで、新たなナノバイオデバイスの構築が可能と考えた。

半導体のナノ結晶である QD はその魅力的な蛍光特性から、バイオイメージングツールとして期待されている、しかしながら、QD (ここでは疎水性のリガンドであるトリオクチルホスフィン (TOPO) で表面を修飾された ZnS CdSe-core QD を指すものとする) はそのままでは有機溶媒にしか分散できないため、バイオ環境で使用するためには表面処理が必要である。チオール基と ZnS が結合を形成することを利用して TOPO と交換する手法が考案された。しかし、この方法では QD の安定性維持に問題があり、QD が崩壊して蛍光強度が著しく減少したり、強い細胞毒性を示したりする。続いて、両親媒性分子によるカプセル化が考案された。カプセル物質として PEO 鎖を有するブロックポリマーが最も有望視されている。実際に市販されているものはこのタイプの QD である。しかし、修飾用 PEO の合成に手間がかかることや、PEO であるためサイズが大きくなる (30 nm)、バイオ分子固定化のため官能基を導入すると著しく毒性が発現するといった問題がある。

そこで、PMBN 及び PLA を用いて、QD 内包ポリマーナノ粒子を調製した (PMBN/PLA/QD)。動的分散 (DLS) 測定より得られた PMBN/PLA/QD の流体力学的サイズは約 20 nm であり、その粒径分布は十分小さい。また AFM 観察結果より PMBN/PLA/QD は球状の 20 nm ナノ粒子であることがわかり、そのサイズは DLS 測定の結果とほぼ一致している。さらに TEM 観察からナノ粒子一つあたりに 6-8 個の QD が内包されていることが明らかとなった。PMBN/PLA/QD 表面は PC 基で覆われ、水およびリン酸緩衝液 (PBS) 中で優れた分散性を示した。PMBN/PLA/QD の吸収及び蛍光スペクトルはトルエン中に分散している未処理の QD のそれとほぼ同じである。また、1 年間以上 4 °C で保存した PMBN/PLA/QD の分散性及び蛍光強度はほぼ変化しない。さらにバイオ分野で用いられる pH 域では蛍光強度が減少することなく非常に安定である。QD の特徴の一つである、蛍光寿命においても有機色素であるフルオレセイン (FITC) と比較すると、FITC では経時的に蛍光強度が減衰するが、PMBN/PLA/QD では 6 時間以上も初期値の 95% 以上の蛍光強度が観察され、極めて安定であることがわかった。

(3) ナノ粒子表面に結合させたバイオ分子の効果の解明

細胞に対するバイオ分子の機能解明を妨げている最大の原因の一つに、分析用のプローブ (蛍光タンパク質や蛍光ナノ粒子) の非選択的な細胞取り込みが挙げられる。バイオ分子の正確な情報はしばしば非選択的な細

胞取り込みによって発生したアーティファクトにより曖昧となる。したがって、非選択的な細胞取り込みに対して耐性を持ち、非侵襲的なイメージング技術により継続的に追跡可能な生体親和型プローブが望まれる。in vitro にて PMBN/PLA/QD の細胞取り込みを検討した。PMBN/PLA/QD 表面の活性エステル基が培地中の血清タンパク質と結合することを防ぐために、予め表面の活性エステル基にグリシン (G) を反応させた (G-PMBN/PLA/QD)。ポリマー粒子を HeLa 細胞の培地中に添加し、その取り込みを観察した。対照とした直径 50nm の蛍光標識 PSt ナノ粒子を HeLa 細胞と 24 時間インキュベートした結果、HeLa 細胞内に粒子の取り込みが観察された (図 2 下: 非特異的な細胞認識)。一方、G-PMBN/PLA/QD では細胞内に全く取り込まれていない (図 2 上: 細胞による非認識)。PMBN/PLA/QD が非特異的な細胞取り込みを完全に回避することは、世界で初めて観察された驚くべきものである。このように細胞取り込みの完全回避はリン脂質分子による修飾例を除いて報告されていない。また、PMBN/PLA/QD はマクロファージ前駆細胞である J774.1 細胞の細胞取り込みも回避しており、すなわちファゴサイトシスも起こさないことを意味している。

PMBN/PLA/QD のバイオイメージングプローブとしての特性を調べるため、バイオ分子のモデルとして合成膜透過ペプチドとして知られるオクタアルギニン (R8) を固定し、その膜透過機能を検討した。HIV ウィルス (HIV-1) が持つ Tat タンパク質の 48-60 配列のペプチドが細胞膜透過性を有している。これらのペプチドは膜透過ペプチドと呼ばれ、難細胞膜透過性の細胞外由来タンパク質の細胞内輸送に役立つと期待されている。近

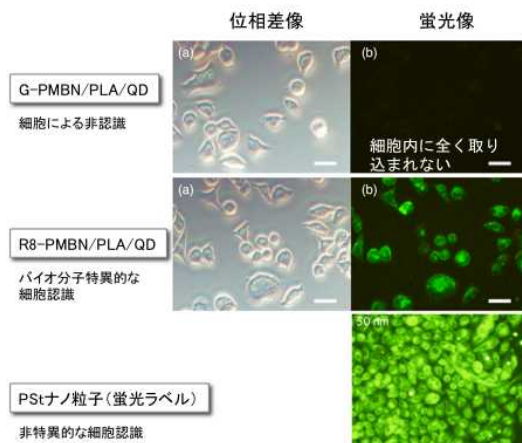


図 2. 種々のポリマーナノ粒子の細胞内取り込みの観察結果
年、Tat-(48-60) (GRKKRRRRPPQ) 中に多くのアルギニンが含まれることに着目し、人工

的に合成された R8 の細胞膜透過性が発見された。R8 はマクロピノサイトシス機構により細胞内に取り込まれることが明らかとなっている。

PMBN/PLA/QD に R8 を反応させた粒子 (R8-PMBN/PLA/QD) とインキュベートした HeLa 細胞を蛍光観察した結果、R8-PMBN/PLA/QD は HeLa 細胞内に遍在していた (図 2 中: バイオ分子特異的な細胞認識)。この結果より、G-PMBN/PLA/QD では全く細胞に取り込まれないにもかかわらず、R8 のような膜透過ペプチドを固定するとその機能を発現した。これより PMBN/PLA/QD はバイオ分子の機能のみを正しく評価できるプローブとしての機能を有していることが示された。

(4) 細胞への取り込みの速度論的考察

細胞取り込みを速度論的に定量解析できることはイメージングプローブとしても欠かせない能力のひとつである。G-PMBN/PLA/QD はインキュベーション時間経過によらず全く細胞に取り込まれない。一方、R8 に誘起された細胞取り込みは PMBN/PLA/QD は添加後 15 分間以内に始まっており、その後緩やかになり、1 時間で飽和に達することがわかった。この事からも PMBN/PLA/QD が生体分子機能を動的に評価できるといえる。共焦点レーザー顕微鏡によりナノ粒子の細胞内動態解析した結果、添加して 5 分間以内に細胞膜表面に接着し、15 分間から 30 分間以内にエンドソーム内に取り込まれ、エンドソーム内に取り込まれる R8-PMBN/PLA/QD の量が 1 時間から 3 時間で増加し、最終的に 5 時間で R8-PMBN/PLA/QD が全てエンドソーム内に取り込まれる様子が観察された。さらに、共焦点顕微鏡により励起光を照射し続けて、R8-PMBN/PLA/QD が細胞に取り込まれる様子を同一視野内の細胞で調べた。PMBN/PLA/QD は蛍光強度が減少

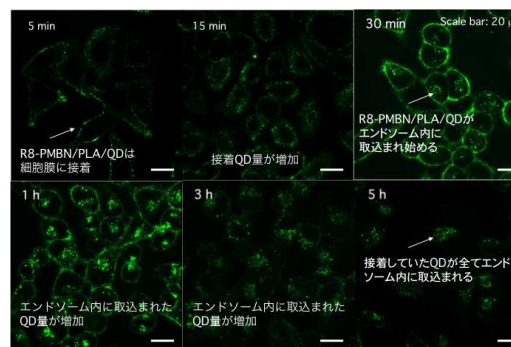


図 3. 細胞内取り込み挙動の時間依存性 (連続観察)

することなく、R8 によりエンドソーム内

に取り込まれる様子を継続的に観察することが可能であった。低温での細胞への取り込みの検討や阻害剤を添加した際の取り込みの検討から、R8-PMBN/PLA/QD の取り込みは clathrin 依存エンドサイトシスではなく、マクロピノサイトシスであることが明らかとなった。

PMBN/PLA/QD 表面に結合させるオリゴペプチドが細胞取り込みに与える効果を調べると、カチオン性のアミノ酸残基が効果的であり、一方、その他のオリゴペプチドを結合しても PMBN/PLA/QD が細胞内に取り込まれないことがわかった。また、R8 の 2 つのアミノ酸シーケンスを G に変更すると、細胞の取り込みが起きなくなる。すなわち、細胞が分子 2 個分の分子ユニットを正確に認識するという事を明確にした。これらのポリマーナノ粒子は、細胞内に取り込まれても細胞内の遺伝子に全く影響せず、炎症反応性のサイトカインの発現は認められなかった。このことは、表面に存在するリン脂質極性基による効果と考えられる。

(5) 結論

本研究では、人工細胞膜で被覆したポリマーナノ粒子が、細胞に取り込まれないことを示した。これによりナノ粒子表面に結合したバイオ分子が細胞に与える効果を明確に示すことが可能となった。また、安定な蛍光特性を有する半導体ナノ粒子を、このポリマーナノ粒子に導入できることを明らかにした。これにより細胞内でのナノ粒子の挙動を 30 時間以上にわたり連続観察できることを明らかにした。これらの研究成果は、細胞の状態を正確にイメージングできる新しいツールを提供することを示しており、医薬品や化粧品安全性試験、細胞や組織を対象とする研究法として大きな貢献をする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

① K. Ishihara, Y. Goto, R. Matsuno:

Biomimetic polymer nanoparticles embedding quantum dots, MRS Proceedings 1357, mrs11-1357-1106-07 (2011)

doi:10.1557/opl.2011.1505

② K. Masuda, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara: Quantum dots covered with pH responsive and biocompatible phospholipid polymer for trafficking in endocytosis process, Trans Mater Res Soc 36, 265-268 (2011)

<http://mrs-j.org/home/ja/backnumber>

③ R. Matsuno, K. Ishihara: Integrated functional nanocolloids covered with artificial cell membranes for biomedical applications, Nano Today 6, 61-74

(2011) doi:10.1016/j.nantod.2010.12.009

④ K. Ishihara, Y. Goto, R. Matsuno, Y. Inoue, T. Konno: Novel polymer biomaterials and interfaces inspired from cell membrane functions, Biochim Biophys Acta-General 1810, 268-275 (2011)

doi:10.1016/j.bbagen.2010.04.008

⑤ K. Masuda, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara: Novel Cytocompatible intracellular pH-imaging fluorescence probe composed of quantum dot and phospholipid polymer, Trans Mater Res Soc 35, 147-150 (2010)

<http://mrs-j.org/home/ja/backnumber>

⑥ T. Goda, Y. Goto, K. Ishihara: Cell-penetrating macromolecules: Direct penetration of amphipatic phospholipid polymers across plasma membrane of living cells, Biomaterials 31, 2380-2387 (2010)

doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.095

⑦ R. Matsuno, K. Ishihara: Molecular-integrated phospholipid polymer nanoparticles with highly biofunctionality, Macromol. Symp. 279, 125-131 (2009) doi:

10.1002/masy.200950519

⑧ Y. Goto, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara: High-sensitive analysis of oligopeptide-induced cell penetration using phospholipid polymer nanoparticles containing quantum dots, Trans. Mater. Res. Soc. 34, 189-192 (2009)

<http://mrs-j.org/home/ja/backnumber>

〔学会発表〕(計 12 件)

① K. Ishihara, Y. Goto, R. Matsuno, Y. Inoue, T. Konno, M. Takai, "Inhibition of inflammatory on phospholipid polymer-coated nanoparticles", Society for Biomaterials Annual Meeting. (20110413). Orland (USA)

② K. Masuda, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara: "Quantum dots covered with biocompatible phospholipid polymer for imaging of the bionolecule trafficking" 日本MRS学会学術大会. (20101221). 横浜

③ 福田義人, 金野智浩, 坂田利弥, 石原一彦: "高効率・高精度で細胞機能評価が可能なリン脂質ポリマー被覆磁気ビーズの創製" 日本バイオマテリアル学会. (20111129). 広島

④ 増田紘一, 松野亮介, 金野智浩, 高井まどか, 石原一彦: "細胞内環境応答型分子イメージングを特徴とするリン脂質ポリマー被覆量子ドットの創製" 日本バイオマテリアル学会. (20101129). 広島

⑤ K. Ishihara: "Polymer nanoparticles with bioinspired surface as cell analyzing device" 5th SBE International Conference on Bioengineering and Nanotechnology 2010 (ICBN2010). (20100802). Singapore (Singapore)

⑥ K. Ishihara: "Quantum dots embedding polymer nanoparticles covered with artificial cell membrane by molecular integration process" Processing and Fabrication of Advanced

Materials(PFAM-18). (20091214). 仙台

⑦ 石原一彦: "細胞膜模倣ポリマー材料のナノバイオ機能" 日本膜学会シンポジウム. (20100514). 東京

⑧ K. Ishihara: "Bioinspired phospholipid polymer surfaces for nanobiodevices" Swiss/Japan NanoBio Symposium. (20090911). Lausanne (Swiss)

⑨ 石原一彦: "バイオイメージングツールとしての生体親和型ナノ粒子" 第11回マイクロ化学研究会セミナー. (20090818). 東京

⑩ K. Ishihara, Y. Goto, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai: "Novel Stable Fluorescence nanoparticles covered with biocompatible phospholipid polymers and specific biomolecules" Controlled Release Society Annual Meeting. (20090718). Copenhagen (Denmark)

⑪ K. Ishihara: "Bioinspired phospholipid polymer surfaces for nanobiodevices" Frontier of Biomedical Polymer Science 2009. (20090522). 三島

⑫ K. Ishihara, Y. Goto, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai: "Novel stable fluorescence nanoparticles covered with biocompatible phospholipid polymers" Society for Biomaterials Annual Meeting. (20090421). San Antonio (USA)

[その他]

ホームページ等

<http://www.mpc.t.u-tokyo.ac.jp/ishihara/theme/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 一彦 (ISHIHARA KAZUHIKO)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：90193341