

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18066

研究課題名（和文）高分子-細胞膜間の運動性が低下した水和水量を指標とする癌細胞標的化技術の確立

研究課題名（英文）Tumor targeting technology based on the interfacial water between polymer and plasma membrane

研究代表者

西田 慶（Nishida, Kei）

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：30895272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、タンパク質間相互作用が生じ得るタンパク質の表面には運動性の低下した水分子が多量に水和していることに着目し、高分子材料および細胞膜間の水和水量を指標とした細胞標的化技術の確立を目的とした。1. 高分子材料および細胞膜の水和水の評価、2. 水分子に着目した癌細胞と高分子材料間の相互作用力を評価した。水和水量の異なる高分子からなるコアセルベート微粒子を作製し、複数の細胞種に対して添加した結果、コアセルベート液滴は水和水量に依存して、細胞に対する集積性が変化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題では、細胞の標的化を実現する新たなアプローチを確立することを目的とし、合成高分子ならびに細胞膜上の運動性が低下した水和水量に着目した研究を推進した。従来、細胞レベルでは標的とする細胞群に高発現が認められる抗原に対するリガンドの使用、組織レベルでは癌組織間隙の拡張に伴う透過性の向上を利用した方法が広く研究されている。本研究では、細胞膜上に発現する特定の抗原ではなく、細胞膜を構成する分子組成に起因した水和水の差を指標として細胞選択性を実現した。癌治療に対する材料設計において、細胞標的化を達成するための新規パラメータとして貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The surfaces of proteins, where protein-protein interactions can occur, are hydrated with large amounts of water molecules with reduced mobility. In this study, we aimed to establish a cell targeting technique using the amount of hydration water between polymeric materials and cell membranes as an indicator: 1. evaluation of hydration water in polymeric materials and cell membranes, and 2. evaluation of interaction force between cancer cells and polymeric materials focusing on water molecules. Coacervate microparticles composed of polymers with different amounts of hydration water were prepared and added to multiple cell types, and it was found that the coacervate droplets varied in their accumulation to cells depending on the amount of hydration water.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：細胞膜 水和 糖鎖 癌細胞標的化

1. 研究開始当初の背景

特定の細胞を選択的に標的化する技術は、疾患の診断や治療の発展に必要不可欠である。悪性腫瘍などに対しては抗体-薬物結合体の成功に見られるように、疾患細胞の細胞膜表面に高発現している特定の抗原に着目し、それに対する抗体により標的細胞を選択的に認識・殺傷することを可能としている。抗体は抗原に対する優れた特異性と 10^{-7} M/sec という高い結合定数から、その有用性が認められている。しかしながら、抗体の合成は煩雑かつ高価であるとともに標的に応じて最適な設計が求められる。また近年、細胞の抗原発現量には不均一性があることが報告されており、悪性腫瘍に対する抗体を用いた癌免疫療法の奏功率は 20-30% に留まるといった課題がある (Nat. Comm., 10, 657 (2019))。癌の化学療法などの疾患治療の発展には抗体-抗原反応に代わる、新たな細胞標的化を達成する材料開発が急務である。

生体のタンパク質は、タンパク質-タンパク質間の相互作用を介して複合体を形成することで機能発現を制御している。タンパク質間の相互作用は、タンパク質同士の立体構造に基づいた、静電的相互作用や疎水性相互作用を駆動力としていると考えられているが詳細は議論が続いている。近年、タンパク質間相互作用を起こし得るタンパク質の表面には、バルク水と比較して 1,000 倍遅い運動性を示す水分子が水和していることが報告された (Sci. Rep., 7, 8744 (2017))。さらに、運動性が低下した水和水はタンパク質間接触が生じる初期段階で、水素結合網を形成することで自由エネルギーを安定化し、タンパク質間相互作用の形成を促進することが示唆されている (Nat. Comm. 2, 261 (2011), PNAS, 116, 4244 (2019)) (図 1a)。そこで申請者は、タンパク質間相互作用で見られる水和水の運動性による相互作用力を、材料-細胞膜表面間の相互作用に適応できないか考えた。

細胞の中と外界を隔てる細胞膜は、リン脂質を主成分としてスフィンゴ脂質やコレステロール、糖脂質、膜タンパク質からなる脂質二重膜として形成されている。細胞膜の構成成分は細胞種によって大きく異なり、細胞膜の物理化学的な性質に影響を与えている。例えば、脂質鎖に含まれる飽和-不飽和炭化水素鎖の含有量比やコレステロールの含有量は細胞膜の流動性に関与しており、膜タンパク質の機能発現だけでなく、細胞膜上の水和水の運動性に影響することが報告されている (Prog. Lipid Res., 29, 167 (1990), BBA Biomembranes, 1798, 1436 (2010))。そこで申請者は、細胞種の細胞膜組成によって細胞膜表面の運動性が低下した水和水量も異なると期待し、材料側の運動性が低下した水和水量を適切に調節することができれば、新たな細胞標的化方法を確立できると予想した (図 1b)。

申請者の所属する研究室では、抗血栓性の被覆材料として汎用されている疎水性高分子であるポリ(2-メトキシエチルアクリレート) (PMEA) およびその類似体の精密合成によって、材料表面の水和水を量および運動性の観点で系統的に変化させることを可能としている (Bull. Chem. Soc. Jpn., 92, 2043 (2019))。PMEA 類似体と水の界面に水和した水分子は、運動性の観点で不凍水、中間水および自由水に分類できることを提唱している。その中でも不凍水や中間水は、材料と強く相互作用しているためにバルク水と比較して運動性が 1,000 倍以上低下している (Polymer, 50, 6091 (2009))。さらに申請者は、PMEA 類似体の不凍水や中間水量を調整することで細胞の接着力を制御できることを見出すとともに、特定の PMEA 類似体は正常細胞と比較して癌細胞に対して 15 倍以上高い集積性を示すことを明らかにした。一方、優れた医用高分子である PEG や PMPC は PMEA 類似体と比較して水和水量が非常に多く、細胞との相互作用力が顕著に低下する。本結果は、細胞膜と合成高分子の相互作用力は合成高分子の不凍水・中間水量によって制御可能であることを示唆している。

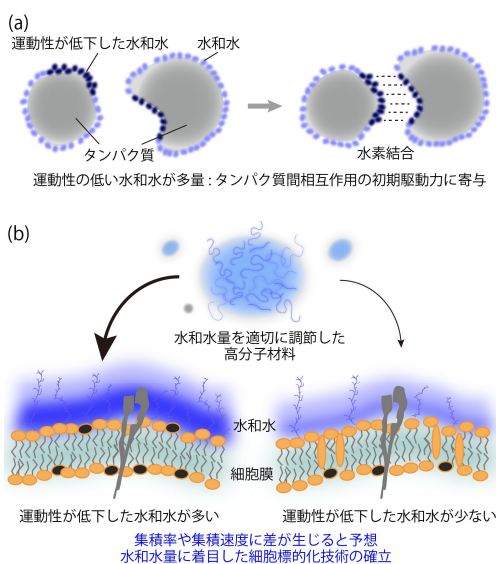


図 1 (a) タンパク質間相互作用における水和水
(b) 本申請内容に対する概念図

2. 研究の目的

本申請課題では、細胞の標的化を実現する新たなアプローチを確立することを最大の目的とし、合成高分子ならびに細胞膜上の運動性が低下した水和水量に着目した研究を推進する。具体的には、PMEA 類似体などの合成高分子および細胞膜間の運動性が低下した水和水量に着目した、新たな細胞標的化方法の確立を実施する。従来、細胞レベルでは標的とする細胞群に高発現が認められる抗原に対するリガンドの使用 (アクティブターゲティング)、組織レベルでは enhanced permeation and retention (EPR) 効果に代表される組織間隙の拡張に伴う透過性の向上を

利用した方法(パッシブターゲティング)が広く研究されている。本申請で提案する方法は、細胞膜上に発現する特定の抗原ではなく、細胞膜を構成する分子組成に起因した水和水の差を指標として、細胞選択性を実現しようとするものである。

3. 研究の方法

本申請では、高分子材料側に対する運動性の低下した水和水量(不凍水・中間水)を制御するために、所属研究室の知見を踏襲し種々のPMEA類似体を合成した。一方、PMEA誘導体は薬物送達等で用いられる既存の医用高分子と比較して水への溶解性が乏しい。そこで申請者はこれまでに、PMEA誘導体を水中で液-液相分離させることで、血清などの夾雑環境下においても安定に存在する微小液滴を形成させることに成功しているため、本微小液滴を高分子微粒子として利用した(図2a)。様々なPMEA誘導体の微小液滴および種々の細胞における水和水量を示差走査熱量分析、脂質蛍光プローブ、周波数変調原子間力顕微鏡(FM-AFM)を用いて定量的に解析した。また、高分子-細胞間の相互作用力を、AFMを用いて定量的に評価した。特に本申請では細胞の標的化を、癌細胞と正常細胞に焦点を当て研究を実施することにする。具体的には、水和水量を制御した高分子微粒子を作製し、種々の細胞に対する微粒子の集積性を定量的に評価した。また、集積メカニズム解明を目的に、細胞膜構成成分の最外殻に位置している糖鎖に着目し、微粒子の集積性に対する影響を評価した。

4. 研究成果

4-1. 高分子材料および細胞膜の水和水の評価

本研究の基盤材料として、結合水量が異なる複数のpoly(2-methoxyethyl acrylate)(PMEA)類似体を合成した。PMEA類似体を適切に、水中で水和水させることで、コアセルベート様の微粒子を形成することを見出した。脂質表面の水和水状態を評価するためのプローブとして知られるLaurdanを各微粒子に挿入し、液滴の水和水状態を評価した。その結果、液滴の結合水量は、熱量分析から求めた高分子の結合水量を反映していることが明らかとなった。同様に、特定のヒト癌細胞とヒト正常繊維芽細胞にlaurdanを挿入することで、細胞膜上の水和水状態を検討したところ、ヒト正常繊維芽細胞NHDFと比較して、ヒト子宮頸癌Hela細胞において水和水量が少ないことが示唆された。

4-2. 水分子に着目した癌細胞と高分子材料間の相互作用

各コアセルベート微粒子を各細胞に添加した結果、細胞膜の水和水量が少ない癌細胞に対して、水和水量が多いコアセルベート微粒子が顕著に集積し得ることを見出した。具体的には、水和水量が多いPMEAやpoly((2-(2-ethoxy)ethoxy)ethyl acrylate)(PEE2A)といった高分子からなるコアセルベートは、Hela、ヒト肺癌A549、ヒト卵巣癌SKOV-3、ヒト線維肉腫HT-1080細胞に対して顕著な集積性を示した一方で、NHDFや大動脈平滑筋AoSMC細胞には集積性を示さなかった。水和水量が少ないpoly(n-butyl acrylate)(PBA)やpoly(2-ethoxyethyl acrylate)(PEEA)ではどの細胞種に対しても、集積が認められなかった。この結果より、高分子の水和水量に依存して癌細胞に対する微粒子の集積性を発揮しうることが示唆された。

図2(a)PMEA類縁体の微小液滴形成,(b)微小液滴に対するヒアルロン酸の吸着,(c)CD44ノックダウンHeLa細胞に対する微小液滴の非集積性

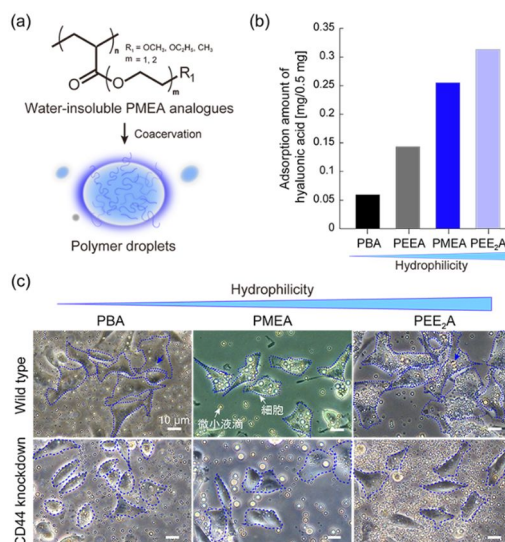


図2(a)PMEA類縁体の微小液滴形成,(b)微小液滴に対するヒアルロン酸の吸着,(c)CD44ノックダウンHeLa細胞に対する微小液滴の非集積性

4-3. 癌細胞と高分子材料間の相互作用メカニズム

細胞膜表面の水和水は最表面の糖鎖によって制御されていると考え、細胞膜表面の糖鎖分子を酵素により消化し、癌細胞膜-PMEA 誘導体の相互作用を原子間力顕微鏡により評価した。その結果、ヒアルロン酸由来のグリコシル結合を分解するヒアルロニダーゼ処理した際には癌細胞膜-高分子間の相互作用力が減少し、シアル酸由来のグリコシル結合を分解するノイラミニダーゼ処理した際には相互作用力が顕著に増加した。このような相互作用力の変動は、PMEA 誘導体の親水性や水和水量と比例関係が認められた。さらに、水晶振動子マイクロバランス法 (QCM) を用いて PMEA 誘導体と糖鎖分子間の相互作用を評価した。コアセルベート微粒子を QCM 基板上に展開し、ヒアルロン酸またはシアル酸を構成する三糖、四糖を作用させた。その結果、癌細胞に対して集積性を示さない高分子では、どちらの構成糖分子の吸着が認められないものの、癌細胞に対して集積性を示す高分子では、ヒアルロン酸の構成糖分子の吸着が認められた。PMEA 誘導体からなるコアセルベート微粒子に対するヒアルロン酸の吸着量を評価した結果、ヒアルロン酸の吸着量は、PMEA 誘導体の親水性および癌細胞集積性と正の相関が認められた (図 2b)。ヒアルロン酸は細胞膜受容体である CD44 のリガンドとして知られている。そこで、PMEA 類縁体からなるコアセルベート微粒子の細胞集積性を CD44 の発現の観点で評価した。その結果、癌細胞の CD44 をノックダウンすることで微小液滴は非集積性を示した (図 2c)。PMEA 類縁体は、血清・血漿タンパク質の吸着・変性を抑制する特性を有している。そのため PMEA 類縁体からなる微小液滴は、培地中に含有する、あるいは癌細胞が産生したヒアルロン酸が優先的に吸着することで、CD44 陽性癌細胞に集積性を示したものと考察される。以上より、PMEA 類縁体からなるコアセルベート微粒子は、抗体といったリガンドに非依存的な癌細胞検出を達成し得る材料として期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Nishimura Shin-nosuke, Nishida Kei, Shiimoto Shohei, Tanaka Masaru	4. 巻 3
2. 論文標題 Surfactant-Free Suspension Polymerization of Hydrophilic Monomers with an Oil-in-Water System for the Preparation of Microparticles Toward the Selective Isolation of Tumor Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials Advances	6. 最初と最後の頁 5043-5054
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2MA00129B	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 -
1. 著者名 Nishida Kei, Anada Takahisa, Tanaka Masaru	4. 巻 186
2. 論文標題 Roles of interfacial water states on advanced biomedical material design	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Drug Delivery Reviews	6. 最初と最後の頁 114310 ~ 114310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.addr.2022.114310	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 Nishida Kei, Baba Koki, Murakami Daiki, Tanaka Masaru	4. 巻 10
2. 論文標題 Nanoscope analyses of cell-adhesive protein adsorption on poly(2-methoxyethyl acrylate) surfaces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 2953-2963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2BM00093H	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 Nishimura Shin-nosuke, Nishida Kei, Ueda Tomoya, Shiimoto Shohei, Tanaka Masaru	4. 巻 13
2. 論文標題 Biocompatible poly(N-(-acryloyloxy-n-alkyl)-2-pyrrolidone)s with widely-tunable lower critical solution temperatures (LCSTs): a promising alternative to poly(N-isopropylacrylamide)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymer Chemistry	6. 最初と最後の頁 2519 ~ 2530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d2py00154c	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 Nishida Kei, Nishimura Shin-nosuke, Tanaka Masaru	4. 巻 23
2. 論文標題 Selective Accumulation to Tumor Cells with Coacervate Droplets Formed from a Water-Insoluble Acrylate Polymer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 1569 ~ 1580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.1c01343	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 Nishida Kei, Sekida Shogo, Anada Takahisa, Tanaka Masaru	4. 巻 8
2. 論文標題 Modulation of Biological Responses of Tumor Cells Adhered to Poly(2-methoxyethyl acrylate) with Increasing Cell Viability under Serum-Free Conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 672 ~ 681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.1c01469	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 Nishimura Shin-nosuke, Nishida Kei, Tanaka Masaru	4. 巻 58
2. 論文標題 A -hairpin peptide with pH-controlled affinity for tumor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 505 ~ 508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CC06218B	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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shin-nosuke Nishimura, Kei Nishida, Tomoya Ueda, Masaru Tanaka
2. 発表標題 Smart Vinyl Polymers Inspired from Poly(vinyl-2-pyrrolidone): A Promising Alternative to Conventional Biocompatible Synthetic Polymers
3. 学会等名 MRM2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kei Nishida, Masaru Tanaka
2. 発表標題 Specific cell recognition based on a dense phase enriched in water-insoluble polymer
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会/第8回アジアバイオマテリアル学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原 道治, 上原 広貴, 西田 慶, 穴田 貴久, 田中 賢
2. 発表標題 含水高分子コーティングが細胞接着及び三次元組織化に与える影響
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会/第8回アジアバイオマテリアル学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 慎之介, 西田 慶, 上田 智也, 田中 賢
2. 発表標題 側鎖にピロリドン環を有するビニルポリマー薄膜上における間葉系細胞の接着および分化挙動
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会/第8回アジアバイオマテリアル学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原 道治, 上原 広貴, 西田 慶, 穴田 貴久, 田中 賢
2. 発表標題 PMEA誘導体を用いた細胞-高分子基板間相互作用の制御による細胞の三次元組織化
3. 学会等名 化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村慎之介, 西田慶, 田中 賢
2. 発表標題 ピロリドン環を側鎖に有するスマートビニルポリマーの設計: 水中での温度応答特性と細胞親和性
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田慶, 穴田貴久, 田中 賢
2. 発表標題 非水溶性高分子が形成するバイオ界面: 癌細胞選択性の発現
3. 学会等名 第50回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村慎之介, 西田慶, 中尾俊介, 上原広貴, 穴田貴久, 田中賢
2. 発表標題 微小な pH 変化に応答して細胞認識性が向上するペプチドリガンドの開発
3. 学会等名 第37回DDS学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田慶, 田中 賢
2. 発表標題 アクリレート骨格を有する高分子液滴による細胞選択な集積性の発現
3. 学会等名 第37回DDS学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村慎之介, 西田慶, 中尾俊介, 上原広貴, 穴田貴久, 田中賢
2. 発表標題 ポリ(2-メトキシエチルアクリレート)からなるマイクロ粒子の調製と細胞親和性
3. 学会等名 第70回高分子年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kei Nishida, Takahisa Anada, Shingo Kobayashi, Masaru Tanaka
2. 発表標題 Bio-interface composed of water-insoluble polymers tailoring cell adhesion strength based on a water content
3. 学会等名 第70回高分子年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原道治, 上原広貴, 西田慶, 穴田貴久, 田中賢
2. 発表標題 細胞 - 高分子基板間相互作用制御による三次元細胞組織化
3. 学会等名 第70回高分子年次大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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