

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 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22655050

研究課題名（和文） 細胞膜の流動性に着目した癌細胞特異的なナノ微粒子の創製

研究課題名（英文） Fabrication of cancer cell-specific nanoparticles utilizing the fluidity of cell membranes

研究代表者

新倉 謙一 (NIIKURA KENICHI)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号：40360896

研究成果の概要（和文）：

癌細胞の診断を目的として、流動性の高い細胞膜へ選択的に取り込まれるナノ粒子の作製を行った。ナノ粒子表面にフレキシブルな親疎水のブロック型の分子を提示させると、水から有機溶媒に移動する両親媒性のナノ粒子が作製できた。このナノ粒子は細胞膜を直接透過することで細胞内に入ることを明らかにできた。このためこれらナノ粒子の細胞導入量は細胞膜の流動性に敏感と考えられ、新しい癌細胞の検出につながる粒子表面分子の設計指針が得られた。

研究成果の概要（英文）：

For the purpose of the diagnosis of cancer cells, we synthesized nanoparticles that can be selectively uptaken into cell membrane with high fluidity. We can demonstrate that the conformational change of surface ligands on gold nanoparticles can promote the aqueous/organic phase transfer of nanoparticles. The nanoparticles were internalized into cells by penetrating a cell membrane directly. This design of surface ligands based on hydrophilic-hydrophobic block type molecules will lead to the creation of a new type of nanoparticle enabling the detection of cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体機能材料

キーワード：癌細胞・細胞膜・ナノ粒子合成

1. 研究開始当初の背景

癌の検出プローブの代表的なものとして、¹⁸F-FDG(Fluoro Deoxy Glucose) がある。これは癌細胞のグルコースの取り込み亢進を利用したものであり、癌イメージング法で用いられる PET (Positron Emission Tomography)

にて検出される。しかし、一つの手法では精度の改善に限界があり、複数の検出原理を同時に用いて同時に測定することで、より正確な癌の早期診断が可能となると期待される。

2. 研究の目的

代表的な癌の検出法としては、癌特異的な抗原(癌マーカー)の抗体検出法がある。抗体は特定の癌細胞の診断には強力だが、診断という意味では、多くの癌の検出に広く有効な手法の開発こそ重要である。本研究では癌細胞のもつ物理化学的な側面、特に細胞膜の流動性の増加に基づいた癌細胞の検出を目的とする。癌細胞は正常細胞と比較して細胞の粘弾性が減少し、細胞膜の流動性がある。そこで細胞膜の流動性の高い細胞に特異的に取り込まれるナノ微粒子を創製し、癌細胞の検出を目指す。

3. 研究の方法

癌細胞への取り込みを向上させるには、まずいかに細胞膜の透過性を粒子に持たせるのが重要な因子になる。これまで様々なナノ粒子の表面分子が報告されてきたが、親水性の粒子に疎水性の性質を持たせることが膜透過の鍵となると考えた。これは細胞膜が疎水性であること、また細胞内においても、核膜に存在する核膜孔の内部が疎水的な空間であり、これら生体バリアーを突破する上で疎水性相互作用が重要と考えられているからである。一方で、粒子表面の疎水性を上げるとは粒子の水中での分散性を低下させてしまうことにつながる。そこで水溶性のナノ粒子に疎水性を付与しても水中で高い分散性を保持ことは、ナノ粒子による癌検出で重要となる。まず細胞膜透過性を持たせることを目的として、水中で高い分散性を持つ両親媒性のナノ粒子の作製を行った。この粒子の最表面は疎水性の分子で覆われ、その内側にフレキシブルな構造(ポリエチレングリコール: PEG 部位)を持たせた。クロロホルムなどの非極性溶媒中では疎水部を最表層に、水中では PEG 部位を最表層にすることでどのような溶媒にも分散できると考えた。すなわち折れ曲がることで両親媒性を粒子に付加できる。さらに疎水性部位が細胞膜への透過(疎水部が細胞膜に侵入していく)にも有効であると予想されるため細胞内への導入効率も高いと考えた。

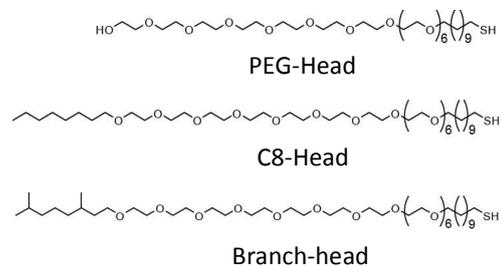
4. 研究成果

(1) 折れ曲がり表面分子の合成とそれらを提示した金ナノ粒子の NMR キャラクターゼーション

本研究で新たに合成した化合物をスキーム 1 に示した。市販されているクエン酸修飾の金微粒子に添加することで表面交換し、金微粒子上に提示した。交換終了後に遠心精製を 2 回行い、未反応物を除いた。精製した金ナ

ノ粒子を重メタノールや重クロホルムに溶解し、NMR を測定することで PEG 部位のフレキシブルな運動に関して議論した。

C8-Head 分子を提示した金ナノ粒子の $^1\text{H-NMR}$ の解析の結果、クロホルム中では、PEG 部位及び内部アルキルのピーク強度が低くなり、末端のメチル基のプロトンピークが強く観察された。またメタノール中では、逆に PEG 部位が強く観測され、末端メチルのシグナルはほとんど観測されなかった。これらの結果は、疎水性の溶媒であるクロホルム中では末端のメチル基が粒子の表面に露出し、親水性のメタノール中ではメチル基が隠れ、PEG 部位が露出していることを示唆している。したがって、我々の作製した疎水化 PEG は親水性/疎水性の環境に応じて粒子の表面で折れ曲がるようなコンホメーション変化して、様々な溶媒に溶解していることがわかった。



スキーム 1: 本研究で新たに合成したナノ粒子表面分子: “折れ曲がり分子”

(2) 折れ曲がり分子を提示した金ナノ粒子の水-有機相の移動

次にこれら表面分子を提示したナノ粒子が、折れ曲がりによって水-有機相の移動をするかどうかを確かめた。水に分散させた C8-Head 金ナノ粒子と PEG-Head 金ナノ粒子の溶液にクロロホルムを添加し、有機相への移動を調べた(図 1)。その結果、C8-Head 金ナノ粒子は水からクロロホルム相へ 2-4 時間で移動したが PEG-Head 金ナノ粒子は界面を透過できなかった。これは粒子表面の自由エネルギーがクロロホルムと水の間にあるためだが、本研究で開発した粒子は分子構造を変化することで表面自由エネルギーが可変なため、水からクロロホルム相に移動できたと考えられる。



図 1. 水に分散させた C8-Head および PEG-Head 金ナノ粒子(直径 20 nm)のクロロホルム相への移動

(3) 折れ曲がり分子を提示した CdTe 量子ドットの細胞膜透過実験

水から有機相への移動が確認できたため、次に実際に細胞膜の透過を調べた。細胞は HeLa 細胞を用いて 37 および 4 °C での折れ曲がり分子提示量子ドットの取り込みを共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーで調べた。量子ドットは蛍光を発するため細胞内への取り込みを蛍光によって定量化できる。PEG-Head 量子ドットは温度によらず細胞内への取り込みがほとんど観察されなかった。一方 C8-Head および Branch-Head の量子ドットは細胞内に取り込まれた (図 2)。特に 37°C で C8-Head は Branch-Head の約 2.5 倍取り込まれることが明らかになった。興味深いことに 4°C では C8-Head および Branch-Head 量子ドットを取り込み量はほぼ同じであった。4°C ではエンドサイトーシスが停止するため、Branch-Head 量子ドットは膜透過で細胞内に侵入しやすいことを意味する。このため Branch-Head を有するナノ粒子の細胞導入量は細胞膜の流動性に敏感と考えられ、新しい癌細胞の検出につながる粒子の設計指針になり得る。今後は癌細胞への特異性を明確にするために in vivo の研究に展開する予定である。

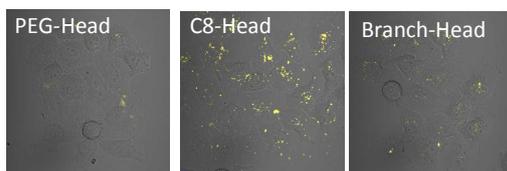


図 2 . PEG-Head, C8-Head および Branch-Head 量子ドットを HeLa 細胞の培地へ添加後の共焦点顕微鏡像(37°C)。量子ドットは黄色で示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① K. Niikura, N. Iyo, T. Higuchi, T. Nishio, H. Jinnai, N. Fujitani, K. Ijio, Gold Nanoparticles Coated with Semi-Fluorinated Oligoethyleneglycol Produce sub-100 nm Nanoparticle Vesicles without Templates, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 7632, 2012 査読有
- ② K. Nagakawa, K. Niikura, T. Suzuki, Y. Matsuo, M. Igarashi, H. Sawa, K. Ijio, Virus Capsid Coating of Gold Nanoparticles via Cysteine-Au Interactions and their Effective

Cellular Uptakes, *Chem. Lett.*, 41(1), 113-115, 2012 査読有

- ③ S. Sekiguchi, K. Niikura, Y. Matsuo, Shige H. Yoshimura, K. Ijio, Nuclear Transport facilitated by the Interaction Between Nuclear Pores and Carbohydrates, *RSC Advances*, 2, 1656-1662, 2012 査読有
- ④ S. Sekiguchi, K. Niikura, Y. Matsuo, and K. Ijio, Hydrophilic Gold Nanoparticles Adaptable for Hydrophobic Solvents, *Langmuir*, 28(13), 5503-5507, 2012 査読有
- ⑤ H. Akita, T. Masuda, T. Nishio, K. Niikura, K. Ijio, and H. Harashima, Improving in Vivo Hepatic Transfection Activity by Controlling Intracellular Trafficking: The Function of GALA and Maltotriose, *Mol. Pharmaceutics*, 8(4), 1436-1442, 2011 査読有
- ⑥ K. Niikura, K. Nambara, T. Okajima, R. Kamitani, S. Aoki, Y. Matsuo, and K. Ijio, Artificial Polymeric Receptors on the Cell Surface Promote the Efficient Cellular Uptake of Quantum Dots, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9, 5787-5792, 2011 査読有
- ⑦ S. Sekiguchi, K. Niikura, N. Iyo, Y. Matsuo, A. Eguchi, T. Nakabayashi, N. Ohta and K. Ijio, pH-Dependent Network Formation of Quantum Dots and Fluorescent Quenching by Au Nanoparticle Embedding, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(11), 4169-4173, 2011 査読有
- ⑧ K. Niikura, K. Nambara, T. Okajima, Y. Matsuo, K. Ijio, Influence of Hydrophobic Structures on the Plasma Membrane Permeability of Lipid-like Molecules, *Langmuir*, 26(12), 9170-9175, 2010 査読有
- ⑨ T. Nishio, K. Niikura, Y. Matsuo and K. Ijio, Self-lubricating Nanoparticles: Self-Organization into 3D-Superlattices during a Fast Drying Process, *Chem. Commun.*, 46, 8977-8979, 2010 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ① N. Iyo, SERS Active Hollow Assembly of Gold Nanoparticles in Solutions, 12th RIES-Hokudai International Symposium" 観 ", 2011.11.21, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo(北海道札幌市)
- ② 新倉謙一、フッ素系チオールで保護され

- たナノ粒子の自己組織化、第 60 回高分子
討論会、2011.9.28、岡山大学
- ③ 新倉謙一、フッ素界面の導入による金ナ
ノ粒子配列構造の高速製作、第 63 回コロ
イドおよび界面化学討論会、2011.9.9、
京都大学
- ④ S. Sekiguchi, The Nuclear Import of
Nanoparticles by Displaying Glycoside
Cluster on the Surface, Glyco 21,
2011.8.26, University of Vienna
(Australia)
- ⑤ 伊與直希、有機フッ素化合物提示金ナノ
粒子の自己組織化による三次元球形構造
体の作製、2011 年度北海道高分子若手研
究会、2011.8.26、洞爺サンパレス(北海
道)
- ⑥ 松永達也、様々な形状の金ナノ粒子ワク
チンの作製とワクチン活性の形状依存性、
2011 年度北海道高分子若手研究会、
2011.8.26、洞爺サンパレス(北海道)
- ⑦ 新倉謙一、細胞膜修飾高分子を用いたガ
ン細胞特異的な微粒子導入、日本化学会
第 91 春季年会、2011.3.26、神奈川大学
- ⑧ K. Nambara, Effect of hydrophobic
structures of prodrugs on cellular
membrane permeability,
Pacifichem2010, 2010.12.17, Hawaii
- ⑨ 新倉謙一、細胞内刺激に応答して分子放
出可能なウイルスカプセルの作製、第 7
回バイオオプティクス研究会・理研シン
ポジウム「蛍光相関分光と情報伝達 (7)」
合同シンポジウム、2010.12.3、東京農工
大学
- ⑩ K. Niikura, Carbohydrate Modification
of Nanoparticles Allows the Rapid
Passage through the Nuclear Pore
Barrier, AsiaNANO2010, 2010.11.2,
National Museum of Emerging Science
and Innovation
- ⑪ K. Nambara, Efficient Delivery of
Nanoparticles into Cancer Cells
Facilitated by Cellular
Membrane-Retaining Cationic
Polymers with Artificial Ligands,
AsiaNANO2010, 2010.11.2, National
Museum of Emerging Science and
Innovation
- ⑫ 南原克行、物質の細胞膜透過における疎
水部構造の影響、第 59 回高分子討論会、
2010.9.16、北海道大学
- ⑬ 南原克行、細胞表層修飾可能な高分子を
用いたガン細胞への高効率な物質導入、
第 59 回高分子討論会、2010.9.16、北海
道大学
- ⑭ S. Sekiguchi, Mechanism for nuclear
import of maltooligosaccharide-coated
nanoparticles, ICS2010, 2010.8.2,

Makuhari Messe International
Convention Comple

- ⑮ K. Nambara, Design of Hydrophobic
Structures of Prodrugs to Enhance
Cellular Membrane Permeability,
LB13, 2010.7.20, Quebec City (Canada)
- ⑯ 新倉謙一、糖鎖修飾により促進されるナ
ノ粒子の核移行とメカニズム解明、第 59
回高分子学会年次大会、2010.5.27、パシ
フィコ横浜
- ⑰ 新倉謙一、ウイルスの金属被覆とウイル
スセンシングへの応用、TKG グループ研
究助成金 受賞記念講演会、2010.4.27、
田中貴金属工業(株)本社(東京)

〔図書〕(計 2 件)

- ① 新倉謙一、社団法人高分子学会、高分子、
2011 年 6 月号(Vol.60 No.8)、2011、
531-536
- ② 新倉謙一、財団法人金原一郎記念医学医
療振興財団、生体の科学、2011 年 10 月
号(増大号)(Vol.62 No.5)、2011、
496-497

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：自己組織化可能な粒子、金属コアの表
面修飾剤、粒子集積体、粒子集積体の製造方
法、光増強素子及び光化学反応を利用する装
置

発明者：新倉謙一

権利者：北海道大学

種類：特許

番号：特願 2011-036468

出願年月日：23 年 2 月 22 日

国内外の別：国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新倉 謙一 (NIIKURA KENICHI)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号：40360896

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし