

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 11日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700491

研究課題名（和文）感染バリア組織におけるナノマテリアルの動態と
それに対する免疫応答の可視化

研究課題名（英文）Visualization of nanomaterials and immune responses to them in infection barrier-tissue

研究代表者

藤井 文彦 (FUJII FUMIHIKO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：40374657

研究成果の概要（和文）：

組織中でのナノマテリアルの動態とそれに対する免疫応答を可視化するために、主に以下の2つの方法を確立した。①ナノマテリアルの組織中での動態は、3次元の運動に加えて回転運動も伴う。そこで、回転運動を可視化するための偏光特性をもった半導体ナノ結晶を合成し、実際に回転運動を観察できることを示した。②ある条件下で半導体ナノ結晶がアポトーシスを誘導することを確認し、免疫細胞の1種であるマクロファージによってそれが貪食されることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

To visualize the dynamics of nanomaterials and immune responses in tissue, we have developed two techniques described below. 1. In addition to three dimensional motion of nanomaterials, their rotational motion is also crucial to reveal their dynamics in tissue. Thus, we synthesized polarized-semiconductor nanocrystals and demonstrated rotational single particle tracking of the nanomaterial. 2. Semiconductor nanocrystals induced apoptosis in a specific condition. Furthermore, we confirmed that macrophages phagocyte the apoptotic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノマテリアル、免疫応答、バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノカプセルやナノ粒子などを用いた化粧品やその他の製品が多数存在し、日常的にナノメートルサイズの物質（ナノマテリアル）に接する機会が増えている。加えて、医療現場などの特殊な環境下でも、ドラッグデリバリーなどへのナノマテリアルの応用がいっそう進んでいる。しかしながら、生体

内でのナノマテリアルの動態と生体への影響に関しては系統的に調べられていない。そのため、毒性のあるものに関してはリスクを最小限に抑え、治療薬に関してはそれらを有効に作用させる事が現時点では難しい。

生体内では、核酸やタンパク質といったナノサイズの分子が集合分散して様々な機能を発揮しており、それらと同程度のサイズで

あるナノマテリアルは、生体分子に対してバルクの物質とは異なる相互作用を引き起こすと考えられる。例えば、ナノ粒子をドラッグデリバリーに応用するために調べられた最近の報告によれば、ナノマテリアルの癌細胞への取り込み効率は、粒径が約 50nm の時に最大になることが示され、必ずしもサイズが小さければ取り込み効率が向上するというわけではなかった (W. Jiang, et al., 2008, Naure)。また、樹状細胞やマクロファージなどの免疫系の貪食細胞においても、サイズ依存的にナノレベルの物質を細胞内に取り込むことが報告されている (A. Rodriguez, et al., 2005, Naure Cell Biology)。このようにナノマテリアルの生体への影響を評価する際には、構成している元素や分子の化学的な性質のみならず、サイズや形状といった物理的な性質も考慮して評価しなければならない。

2. 研究の目的

本研究では、表面電荷と表面分子の組成を変化させたナノ粒子以外に、粒径と形状を厳密に制御したナノ粒子を作製し、生体内での動態を調べることを目的とした。

申請者はこれまでに、半導体量子ドット (Qdot) を用いて表面電荷を変化させたナノ粒子を作製し、マウス骨髄由来の樹状細胞への取り込まれ方の違いを、フローサイトメトリーを用いて細胞レベルで評価してきた (未発表データ)。しかしながら、生体内でのナノマテリアルの動態とそれに対する免疫応答を明らかにするためには、その現象を生きた生体内で非侵襲的に観察しなければならない。なぜならば、ナノマテリアルの凝集・分散性などの物理的な性質は置かれた環境に応じて変化し、異物に対する免疫応答は生きた生体内では時空間的に厳密にコントロールされているからである。

強力な非侵襲計測法の 1 つである MRI を用いた場合、約 $100 \cdot \mu\text{m}$ の空間分解能を得るためには、数十分の時間が必要である。顕微鏡をベースにした蛍光イメージング法は、数十 ms の時間分解能で、約 200nm の空間分解能がある。幸いにも本研究でターゲットとしている組織は、表面から深さが 0.1~0.3mm 程度であり、光計測に適した観察部位といえる。本研究では、光学顕微鏡を用いて、ナノ粒子の動態とそれに対する免疫応答を、高い時空間分解能で可視化することを目的とした。

以上の目的をもとに、以下の項目を達成した。

(1) 粒子径をコントロールしたシリカ被覆ナノ粒子 (Silica coated nanoparticle: Si-NP) の合成。

(2) 生体深部での追跡を可能とする超高輝度ナノ粒子 (Ultrabright nanoparticle: UB-NP) の合成。

(3) 回転情報を得るための量子ロッド (Quantum rod: QR) の合成と回転計測。

(4) ナノ粒子による細胞への影響とマクロファージによる応答の確認。

3. 研究の方法

(1) 粒子径をコントロールしたシリカ被覆ナノ粒子 (Si-NP) の合成は以下の方法で行った。シランカップリング剤 (tetraethoxysilane: TEOS) を用いて、以下の手順で量子ドット (Quantum dot: QD) を被覆した。Cyclohexane に界面活性剤の Igepal CO-520 と、QD、TEOS、 NH_4OH の順に加え、一晚攪拌した。溶液にエタノールを加えた後、遠心操作によって沈殿物を回収した。この操作を 3 回繰り返して、得られた沈殿物を最後は水に溶解し、遮光した状態で室温で保存した。粒子径は QD と TEOS の反応比を変えることで変化させた。

(2) 生体深部での追跡を可能とする超高輝度ナノ粒子 (UB-NP) の合成は以下の方法で行った。高分子化合物 (poly(maleic anhydride-octadecene): PMAO) を用いて、以下の手順で QD あるいは QR を縮合した。THF に QD あるいは QR を溶解し、PMAO、dimethylformamide、2,2'-(ethylenedioxy) bis(ethylamine) (EBE) で室温で 1 時間攪拌した。Tris 溶液で透析することによって、PMAO の未反応部位を終端した。得られた溶液を 30 分間超音波処理した後水で透析し、遮光した状態で室温で保存した。

(3) 回転情報を得るための量子ロッド (QR) の合成と回転計測は以下の方法で行った。

① 量子ロッド (Quantum rod: QR) の合成と水溶化、および抗体の付加は以下の方法で行った。QR はコア (CdSe) とシェル (CdS) から成る半導体のナノ結晶である。コアの合成は、tri-*n*-octylphosphine oxide (TOPO)、octadecylphosphonic acid (ODPA)、cadmium oxide (CdO) および Tri-*n*-octylphosphine (TOP) の混合溶液を、窒素ガス雰囲気下で 370°C まで加熱し、TOP に溶解した Se を加えて行った。得られた CdSe のナノ結晶と、TOPO、ODPA、hexylphosphonic acid (HPA)、CdO が入った溶液の温度を 350°C に保ち、TOP に溶解した S を加えてコアの周りにシェル構造を成

長させた。この溶液の温度を100°Cまで下げ、一晩アニーリングし、翌日、温度を60°Cまで下げてメタノールを加えて遠心し、沈殿物を回収した。この操作を3回繰り返し、得られた沈殿物を最後はCyclohexaneに溶解し、遮光した状態で室温で保存した。

QRの水溶化は、神隆教授(理研・QBiC)の指導のもと以下の方法で行った。還元型グルタチオン(Glutathione: GSH)を用いて、以下の手順でQRを被覆した。QR溶液からクロロホルムを除いた後、QRをテトラヒドロフラン(Tetrahydrofuran: THF)に溶解した。GSH水溶液をQR溶液に加えて混合した後、70°Cまで温度を上昇させた。混合溶液が2層に分離することを確認した後、遠心操作を行ってGSH-QRを回収した。得られたペレットに蒸留水を加えた後、カリウムブトキシド(Potassium *t*-butoxide: KOBu_t)を加えることによって半透明のGSH-QR溶液を得た。

② QRの物性評価と回転計測は以下の方法で行った。QR溶液の蛍光スペクトルと量子収率は、それぞれ蛍光光度計(FP-6200, Jasco)と絶対量子収率測定装置(C10027, Hamamatsu photonics)を用いて測定した。QRの形状は、カーボン支持膜がコートされた銅製グリッド上にQR溶液を載せて乾燥させた後、transmission electron microscope(H-800, Hitachi)を用いて観察した。GSH-QRの水と半径とGSH-QRへの抗体の付加の評価は、それぞれZetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)とcompact FCS装置(C9413-01MOD, Hamamatsu Photonics K. K., Japan)を用いて行った。

以下の回転運動観察用の顕微鏡は、渡邊朋信博士(理研・QBiC)に構築していただいた。回転運動および3次元運動を同時に観察するための顕微鏡は、IX-71(Olympus)、対物レンズ(Olympus 60X PlanApo, 1.45 NA, oil)、リレー光学系(GA01, G-angstrom, Japan)、CCDカメラ(EM-CCD, Ixon DV887, Andor Technology plc., UK)、レーザー(J050BS-18-11-11, Showa optronics Co., Japan)を用いて構築した。回転運動を解析するために、観察対象からの蛍光を偏光ビームスプリッターを用いて分離し、3次元運動を解析するために、分離した信号を凸型および凹型のレンズペアに通し、信号をCCDカメラに導いた。

(4) ナノ粒子の細胞への影響と、その細胞へのマクロファージによる応答の確認は、梅本英司博士(阪大・医学部)に指導あるいは遂行していただいた。胸腺由来の細胞と腹腔由来のマクロファージは、6-10週例のC57BL/6

マウスから採取した。胸腺由来の細胞を所定の濃度のGSH-QDで培養し、アポトーシスの誘導はFITC-Annexin V、7-AAD、DNA fragmentation assay、TUNEL assayで確認した。細胞におけるGSH-QDの局在は透過型電子顕微鏡で行い、同時に同定をエネルギー分散型X線分析(EDX: energy dispersive X-ray spectroscopy)で行った。加えて、アポトーシスを誘導した胸腺由来の細胞をマクロファージと共培養することにより、取り込みを確認した。

4. 研究成果

(1) 粒子径をコントロールしたシリカ被覆ナノ粒子(Si-NP)の合成。

癌細胞への取り込み効率は、ナノマテリアルの粒子径に強く依存していることが報告されており、樹状細胞やマクロファージなどの免疫系の貪食細胞においても、サイズ依存的にナノレベルの物質を細胞内に取り込むことが報告されている。生体組織においてもサイズに依存した取り込み効率の違い、さらには取り込み経路の違いが予想される。そこで、サイズを厳密にコントロールしたナノマテリアルを作製し、その特性を評価した。

サイズをコントロールするために、QDをシランカップリング剤(TEOS)で被覆した。得られたシリカ被覆ナノ粒子(Si-NP)は、シクロヘキサンやクロロホルムには分散しないが、水、ブタノールおよびメタノールには良く分散した。被覆材としてTEOSを使用しているため、表面には水酸基があることが予想される。

得られたSi-NPをTEMで観察すると、支持膜上でも良く分散しており直径は約50nmであった(図1)。中心に見られる黒点がCdSe/CdZnSからなるQDであり、その周りをシランカップリング剤(TEOS)が数十ナノメートルの厚さで覆っていることが分かる。

QDとTEOSの反応比を変えることによって、粒子径を10nmステップで制御することもできた。95%以上のSi-NPがQDを1つだけ内包していることが分かったため、このSi-NPを用いて組織内に取り込まれたSi-NPの数を、蛍光強度から定量化することができる。

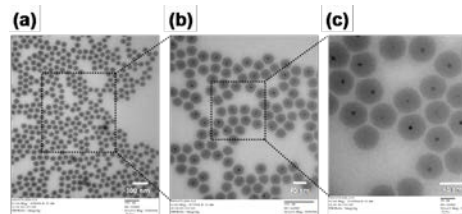


図1. Si-NPのTEM像。

(2) 生体深部での追跡を可能とする超高輝

度ナノ粒子(UB-NP)の合成。

近年、生体を透過しやすい近赤外領域の光を使った生体計測が盛んに行われている。中でも、超短パルスの近赤外レーザーを励起光源に用いた2光子顕微鏡は、様々な分野で利用されている。ただし、生体中での光子の平均自由行路が約0.1mmであるため、生体深部(mm以上の深さ)を高い分解能で(約200nm)で観察することは難しい。そこで、より深部までナノ粒子を追跡できるよう、粒子内に数百個のQDあるいはQRを封入した超高輝度ナノ粒子を開発した。

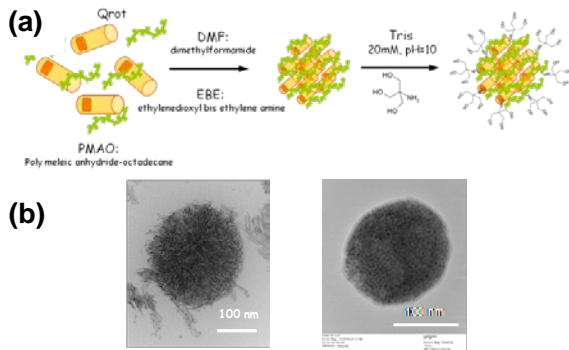


図2. (a) 高分子化合物を用いたUB-NPの合成法。

(b) QRあるいはQDからなるUB-NPのTEM像。

QRあるいはQDを高分子化合物(PMAO)とクロスリンカー(EBE)を用いることによって縮合し、粒子径が約200nmのナノ粒子を得た(図2a)。1つの粒子内には、数百~数千個のQRあるいはQD(図2b)が内包されていることが予想される。

QDから調製したUB-NPとGSHで被覆したQDの1粒子の輝度を、1分子計測技術を使って測定した(図8)。GSH-QDはQD特有の明滅現象が観察されるとともに、単位時間当たりの光子数は4000~8000であった。一方UB-NPの計測では、励起光強度と検出器の感度をそれぞれ13.5%と1%に下げた条件下で、光子数は120000~160000だった。その結果、得られたUB-NPは単体のQDよりも約1500倍の輝度をもつことが分かった。

(3) 回転情報を得るための量子ロッド(QR)の合成と回転計測。

①QR, GSH-QR, mAb-QRの特性評価。

QRは、QDと同じく半導体元素からなるナノサイズの結晶である。QDと同様に高輝度で光退色に耐性があり、サイズを変化させることによって発光波長をnmステップで変えることができる。したがって長時間このナノ結晶を生体中で追跡することが可能であり、多色の光イメージングにも適している。QDに似た特性に加えて、QRは細長い形状をしているた

め偏光特性をもっており、QRで標識した生体分子の回転情報、つまり方向を知ることができる。このナノマテリアルを使って、組織中でのナノマテリアルの動態を、3次元でトレースするだけでなく、回転情報を交えた詳細な情報を得ることができる。そこで、QRを作製し、その特性を調べた。

QRはコア(CdSe)とシェル(CdS)から成る構造をしており、コアの周りにシェルを一定方向に伸長させることによって得られる。得られたQRを透過型電子顕微鏡(TEM)で観察したところ、幅は平均4nm、長さは50nmであり、縦横比(Aspect ratio:AR)は13だった(図3)。ARが5以上のときは偏光度は0.6以上となることから²⁾、得られたQRの99%以上が0.6以上の偏光度をもつことが示唆された。

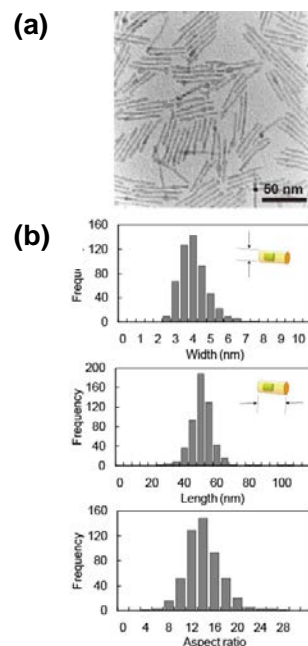


図3. (a) QRのTEM像。(b) サイズと縦横比。

得られた疎水性QRを水溶化するために、トリペプチド鎖の1種である還元型グルタチオン(GSH)を用いてQRを被覆した。疎水性QRとGSH溶液を混合して熱を加え、脱プロトン化剤であるKOBu_tを加えることで簡便に水溶化QRを得ることが出来た。GSHは、生体中にも存在する低分子化合物であり毒性が低い。加えて、アミノ基とカルボキシル基の官能基をもつため、抗体等の生体分子をQR表面に簡便に付加することができる。

疎水性QRとGSH-QRの蛍光スペクトルを比較したところ大差は無く、両者の量子収率はそれぞれ49および48%だった。半導体ナノ結晶は、水溶化の過程で表面に欠陥が生じることによって、量子収率が著しく低下することが知られている。したがって、ここで示したGSHを用いた被覆法は、簡便さに加えてQRの

特性を損なわない水溶化法といえる。広く用いられているポリマー被覆QR (Poly-QR) とサイズを比較した場合、半分程度の水和半径であった。従来の被覆法よりも小さな水溶化QRを調製可能ということで、生体分子の標識にもより適した被覆法といえる。先に述べたGSHの利点として、GSH-QR表面に簡便に抗体を付加できることも確認した。

以上の特性をもったGSH-QRを標識剤として用いて、膜受容体CD36の運動を観察した。CD36は、マクロファージの膜上に存在するスカベンジャーレセプターの1種であり、様々なリガンドとの結合によって細胞質中に移行することが知られている。ここでは、CD36の3次元運動および回転運動を1分子の精度で観察することによって、合成したQRの有用性を実証した。

QRをCD36に特異的に結合させるために、クロスリンカー試薬を用いてGSH-QRの表面に抗CD36抗体を付加した(mAb-QR)。マクロファージの培養液にmAb-QRを加えることによって、マウス腹腔由来のマクロファージが染色された。この現象は、非標識の抗CD36抗体を事前に過剰に加えることによって阻害されたことから、目的どおり大部分のmAb-QRがCD36に結合していることが確認できた。

② 回転と3次元運動を同時観察するための顕微鏡の構築。

CD36の回転運動および3次元運動を観察するために、2つの特徴をもった光学系を組んだ。まず、回転運動を解析するために、QRからの偏光を偏光ビームスプリッターを用いて分離した。加えて、3次元運動を解析するために、偏光ビームスプリッターを通した後の信号をシリンド状のレンズペアを通過させた。

この光学系を用いて、QRの偏光を測定した。p偏光とs偏光に違いがあり、実際にQRが偏光特性をもつことが確認された。検出角度を20度ステップで変化させると蛍光強度が徐々に変化し、pとs偏光の蛍光強度は対称性をもって変化した。したがって、pとs偏光の強度比からQRの角度を見積もることが可能である。ちなみに、ここで測定したQRの偏光度は0.8を超えており、多数のQRの偏光度を平均すると約0.6となっていた。

また、QRと対物レンズの距離を変化させたときの蛍光像の楕円率を測定した。対物レンズをQRから遠距離側へ移動させることによって、縦長だった蛍光像が横長へと変化した。したがって、蛍光像の縦横比からQRのZ位置を見積もることが可能である。この顕微鏡では、偏光度の影響を受けずに見積もれるZ位置は約1 μ mであった。

③ CD36の回転および3次元運動の同時観察。

上述したmAb-QRおよび顕微鏡を用いて、マクロファージ膜上のCD36の運動を1分子精度で観察した。その1例を図4に示した。このCD36は、緩慢な角度変化を伴いながら、3次元位置を大きく変化させながら移動した。この運動は、エンドソーム内に取り込まれたCD36が、エンドソームの動きに合わせて回転運動を伴い、細胞質に移動する様子を示しているのかもしれない。別のCD36は、激しく角度を変化させていたが、Z位置の変化はほとんど観察されなかった。このCD36は、細胞表面の膜上で自由に回転運動をしているが、細胞質への移動を伴っていないことを示しているのかもしれない。

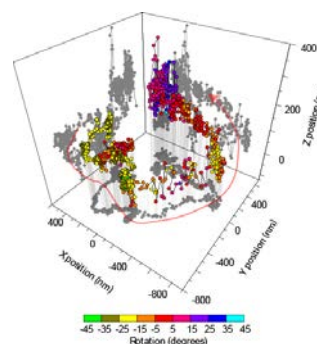


図4. マクロファージの膜受容体CD36の3次元および回転運動の1分子観察。

シンボルカラーは、受容体の相対角度を示す。

生体分子の回転運動を観察するために、従来は有機系色素が使用されてきた。それらの色素類は、蛍光強度が低く、光退色性を有するなどの不十分な点がある。特に、皮膚などの生体深部で蛍光を観察する場合は、2光子顕微鏡を用いなければならないが、励起光強度が高いため、その弱点が顕著に現れる。ここで示した半導体ナノ結晶は、それらの点を克服できる蛍光体である。加えて、半導体ナノ結晶は構成する元素を換えることによって、近赤外領域に蛍光ピークをもつ量子収率の高い蛍光体を調製することも可能である。近赤外領域の光は、ヘモグロビンおよび水による吸収、その他の分子による散乱が少ないため、生体に対する透過能が高い。これを利用することによって、皮膚などの生体深部での観察が容易となる。

また、回転運動を観察には、金ナノロッドも使用されてきた。従来の生体イメージングでは、多種類の分子を多色の色素で標識し、相対的な位置関係や相互作用の解析が行われてきた。回転運動の観察でも、今後は多種類の分子を観察する必要性が増えてくると

推測する。しかしながら、金ナノロッドの測定では光散乱を検出するために、多色イメージングには不向きである。一方、QRの吸収は短波長領域の広範囲におよんでおり、蛍光スペクトルの半値幅は約30nmと狭い。したがって、多種類のQRを1種類の光源で励起し、得られた多色の蛍光を光学フィルターで分離することにより、容易に多色イメージングが可能である。

以上の特性によって、多種類のナノマテリアルの動態を生体深部で観察する場合、ここで報告したQRと観察法が有効である。生体組織中でのナノ粒子の動態はこれまでも報告されてきたが、我々はナノマテリアルの回転情報を得る技術を新たに確立した。以上の成果に関しては、現在論文を執筆中である。

(4) ナノ粒子による細胞への影響と免疫応答の確認。

胸腺由来の細胞を、半導体ナノ結晶の1種であるグルタチオン被覆した量子ドット(GSH-QD)とともに培養することによって、血清不在の条件下でアポトーシスが誘導されることが確認できた。アポトーシス誘導の確認は、FITC-Annexin V、7-AAD、DNA fragmentation assay、TUNEL assayを用いて行った。この条件下でのGSH-QDの粒子径を光散乱法を用いて計測すると、約100nmの凝集体になっていることが確認できた。

透過型電子顕微鏡を用いて観察した結果、細胞におけるGSH-QDは凝集した状態で細胞膜に局在していることが確認できた(図5)。それが確かにGSH-QDであることをエネルギー分散型X線分析(EDX: energy dispersive X-ray spectroscopy)を用いて同定した。

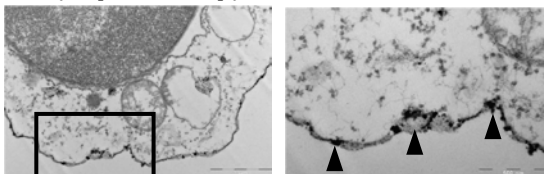


図5. GSH-QDで処理した胸腺由来の細胞のTEM像。

右図は左図の囲みを拡大したもの。

矢尻がGSH-QDを示している。

アポトーシスを誘導した胸腺由来の細胞は、マクロファージと共培養することによって貪食されることを確認した。貪食を阻害する抗Tim4抗体を用いることによって、顕著に抑制された。QDを用いることによって、アポトーシスを誘導すると同時に、アポトーシス細胞を標識できる。QDは従来の有機系色素に比べて輝度が高く光退色性が低いいため、体内でアポトーシス細胞がいつどこで捕捉され、どこに運搬されるかを追跡するために極

めて有効であると考えられる。以上の成果に関しては、現在論文を執筆中である。

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1件)

- ① (査読あり) M. Ohmachi, Y. Komori, A. Iwane, F. Fujii, T. Jin, T. Yanagia, Simple fluorescence microscopy for simultaneous observation of single molecule's 3D orientation and movement and its application to quantum rod-tagged myosin V, Proc Natl Acad Sci U S A. (2012) 109(14), 5294-5298

[学会発表] (計3件)

- ① F. Fujii, T. M. Watanabe, E. Umemoto, S. Fukui, M. Miyasaka, T. Yanagida, T. Jin, Simultaneous 3D and rotational tracking of membrane receptors using polarized nanocrystals, 17th International Biophysics Congress & 12th National Biophysics Congress, 2011/11/01, 中国国家会議センター (中国)
- ② M. Sugawa, F. Fujii, T. Jin, T. Masaike, T. Nishizaka, Development of circular orientation fluorescence emitter imaging (COFEI) with the advanced TIRF microscopy, The 49th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan, 2011/09/16, 兵庫県立大学姫路書社キャンパス (兵庫県)
- ③ M. Ohmachi, Y. Komori, Iwane, F. Fujii, T. Jin, T. Yanagia, Simultaneous observation of myosin V three-dimensional orientation and linear steps, The 49th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan, 2011/09/16, 兵庫県立大学姫路書社キャンパス (兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 文彦 (FUJII FUMIHIKO)

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任助教

研究者番号: 40374657

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: