

## 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3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790048

研究課題名（和文） 細胞内微小環境を検知するバイオハイブリッド型蛍光プローブの開発

研究課題名（英文） Development of Bio-hybrid fluorescent probe for detection of cellular microenvironmentally change

研究代表者

西尾 忠 (NISHIO TADASHI)

慶應義塾大学・薬学部・助教

研究者番号：80401892

研究成果の概要（和文）：本研究は、環境刺激に鋭敏かつ可逆的に応答する機能性ポリマーを基盤とするバイオハイブリッド型蛍光プローブの開発と細胞内温度又は pH のイメージングを目的とした。温度応答性ポリマー、蛍光分子及びリガンド分子を組み合わせた蛍光プローブは、自身の下限臨界溶液温度（30°C）を境に低温域で発光、高温域で消光したほか、マクロファージ様細胞への効率的な取り込みが確認された。本研究により、標的細胞内の微小環境変化を検知する蛍光プローブ開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Our research focuses on the developing dual pH- and temperature-responsive fluorescent probe and applying to the cells for monitoring inside their micro-environment. To construct the novel fluorescent probes, we use the temperature-responsive polymer, which is one of the most representative “intelligent polymer” that exhibits hydrophilic-hydrophobic change in the vicinity of its lower critical solution temperature. In this study, we developed biohybrid fluorescent probe based on the intelligent polymer and investigated their fluorescence change and kinetic change in the cell

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：バイオハイブリッド蛍光プローブ、環境応答型蛍光ポリマー、細胞内環境変化、細胞蛍光イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

蛍光イメージングは現在、医学、生物学など多分野に渡り、生体分子の時空間的計測や生物機能解析のための必要不可欠なツールとなっている。中でも GFP を代表とする蛍光タンパク質を標的分子に発現させる

手法は最も汎用されているものの一つであり、吸収・蛍光特性のバリエーションを拡げた人工蛍光タンパク質の開発も精力的に行われている。また、低分子型蛍光プローブは従来、金属イオンや活性酸素のイメージングに使用されてきたが、最近ではタン

パク質の蛍光ラベリング剤としても利用されている。しかし前者はその分子サイズの問題から (GFP; ~27 kDa) 標的分子由来の性質、挙動を妨げるといった指摘がされており、後者に関しては、使用時におけるプローブ自身の細胞膜透過性の問題や細胞内における pH, 温度のような物理的, 化学的刺激を鋭敏に感知できるものが少数であるという問題があった。一方, 高分子化学分野においては, 外部刺激に応答して, その構造性質を大きく変化させる機能性ポリマーの開発応用が盛んであり, 再生医学や DDS 分野において実用化が進んでいる。これに付随してポリマーの精密合成法も進歩を遂げており, 任意の分子量サイズのグラフト, ブロックポリマーを得ることが可能となった。この反面, 本分野のイメージング技術への応用は殆どなされていない。このような背景から申請者は, 従来の蛍光イメージング法が不得手としてきた環境変化の捕捉を, 刺激応答性を有する機能性ポリマーで補完できれば, 今までに無い画期的な分析方法が構築できると考えた。

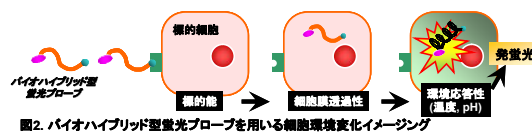
## 2. 研究の目的

生体は内部や外部の環境が変化しても, その状態を一定に保持するホメオスタシスを有しているが, 一旦これが破綻すると疾病や障害に繋がる。究極的にはミクロな細胞内環境 (シグナル伝達, 酵素反応, pH など) が異常をきたした結果, マクロな身体の病的な表現形として現れる。このため, 細胞内の環境変化やシグナル伝達物質の精密な動態解析が可能となれば, 病気の発症予測や進行度の検証, 薬物療法などを行った際の効果確認に非常に有用な情報が得られる。今回申請者は環境刺激に鋭敏かつ可逆的に応答する機能性ポリマーを基盤とするバイオハイブリッド型蛍光プローブの開発と細胞内環境変化のイメージングに関する基礎的研究を行った。具体的には, ①; pH, 温度に応答するポリマー, ②; ①で受けた刺激応答を光シグナルへと変換する蛍光分子, ③; 細胞内ターゲティングを指向した分子, 以上①~③を同一分子中に併せ有するバイオハイブリッドを合成した (図 1)。



次いでマクロファージ様細胞を用いて, 開発した分子の細胞膜透過能, 標的能を精査し, 細胞内環境変化の時空間的分析を試みた。本研究は刺激応答性蛍光ポリマーの理論的設計, 生体内での効率的発光システムの確立など物理化学, 分析化学の力を最

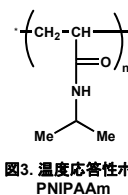
大限に発揮して, 今まで生体イメージング分野で実用化に至っていないバイオハイブリッド型蛍光プローブに関する基礎研究, 医療診断技術などへの貢献を目的としたものである (図 2)。



## 3. 研究の方法

開発したプローブは, ①;外部刺激 (環境変化) に応答する機能性ポリマー, ②;刺激応答を光シグナルへと変換する蛍光分子, ③;細胞内ターゲティングを指向した分子, 以上3つの部位を併せ有するものである。

① 機能性ポリマー; 本研究では計測する環境変化として, 温度及び pH を取り上げた。前者においては温度応答性ポリマーである PNIPAAm を用いた。PNIPAAm の相転移温度は 32°C であるが, 親水性又は疎水性基を導入することで転移温度を自在に制御可能である。このポリマーは相転移温度で膨潤-親水性, 凝集-疎水性といった性質構造変化を生ずる (図 3)。



②前述したポリマーの相転移前後の性質構造変化を認識する蛍光分子には, 親水的环境で発光, 疎水環境で消光する fluorescein, coumarin, 逆に疎水環境で発光する dansyl 誘導体を選択した (図 4)。

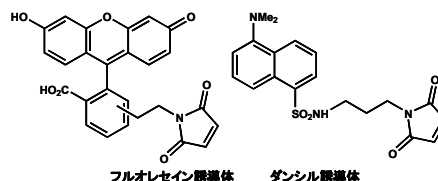


図4. 本研究で用いた蛍光分子

③リガンド分子には, 生体膜の構成成分で膜融合性を有するフォスファチジルエタノールアミン誘導体 (DOPE) を選択した (図 5)。

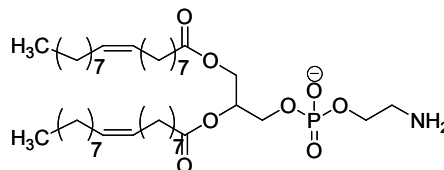


図5. DOPE

①~③を用いて合成したプローブの分子

量及び分子量分布は GPC で確認したほか、NMR, TOF-MS や IR などの分光機器を駆使して、蛍光及びリガンド分子の導入率を検証した。さらに溶液の温度 (又は pH) を変化させて透過率測定を行いプローブの刺激応答性の確認と、相転移温度 (又は pH) の算出を行った。また同様に外部条件を変化させて個々のプローブの蛍光強度を測定し、相転移条件付近で大きく変化する特性を有する蛍光ポリマーを選定した (図 6)。

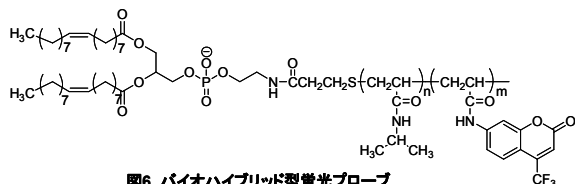


図6. バイオハイブリッド型蛍光プローブ

マクロファージ様細胞 (RAW 細胞) を用いて、蛍光プローブの細胞膜透過能を評価した。プローブを細胞に添加、インキュベートした後、時系列ごとに、その取り込み量を共焦点顕微鏡やフローサイトメーターで観察した。次にリガンド分子の導入効果を確認するため、DOPE 導入ポリマーと非導入ポリマーを用いてこれらの細胞透過性の違いを観察した。

#### 4. 研究成果

(平成 22 年度) 温度応答性ポリマーであるポリ-N-イソプロピルアクリルアミドは下限臨界溶液温度 (32°C) を境に低温域で親水性、高温域で疎水性を示す。これに親水性条件下で強い蛍光を発するフルオレセイン誘導体を 0.1 mol% 導入し、温度応答性蛍光ポリマーを合成した。このポリマーは期待通り、下限臨界溶液温度 (30.5°C) を境に低温域で強い蛍光を発し、高温域で急激な蛍光強度の減弱が確認された (図 7)。

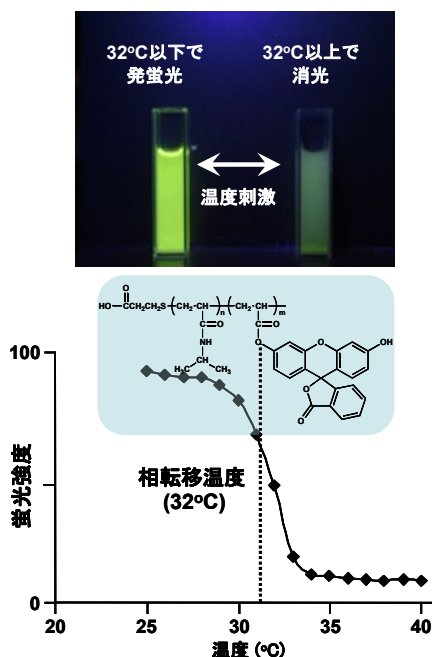


図7. 温度変化を感知する蛍光ポリマー

またフルオレセインは酸解離定数を 6.5 に有し、より塩基性条件下で強い蛍光を発することが知られているが、合成ポリマーはこの pH 応答性も有していた。これにより、温度、pH の両環境変化にตอบสนองする蛍光ポリマーを開発した。また、フルオレセインの代わりに、ダンシルクロリド誘導体を導入したポリマーは下限臨界溶液温度を境に、高温-強蛍光、低温-弱蛍光性を示した。次いでこの蛍光ポリマーを、膜融合脂質であるフォスファチジルエタノールアミン誘導体と連結し、バイオハイブリッド型蛍光プローブを作製した。このプローブは、元となる蛍光ポリマーの性質を維持していた。

(平成 23 年度) 本年度は前年度で開発した蛍光プローブのうち最も目的に即したものを選定し、細胞実験を行った。種々検討の結果、用いるプローブは次の 3 つの部分から構成されるものを選択した、1) 温度応答性ポリマー、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド、2) クマリン誘導体 (蛍光物質)、3) フォスファチジルエタノールアミン誘導体 (DOPE, 膜融合脂質)。このプローブは 32°C を境に低温域で親水性-発光、高温域で疎水性-消光を示す。マクロファージ様細胞 (RAW 細胞) を用いて、プローブの細胞取り込み効率を共焦点レーザー顕微鏡観察にて評価した。この結果、プローブは 6 時間で細胞に取り込まれることを確認した。次いでプローブと DOPE を有さない蛍光ポリマー間で比較を行ったところ、前者がより効率的に細胞内に取り込まれることが確認された。さらに培養温度の違いによる比較を行ったところ、高温時にプローブがより多く細胞内に取り込まれることが明らかとなった。これは、高温下でプローブが疎水性を示し、細胞膜との親和性が向上したためと推察された。本研究により、環境応答性ポリマーに蛍光物質及びリガンド分子を結合させることで、標的細胞内の微小環境変化を検知する蛍光プローブ開発の可能性が示唆された。

#### 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 3 件)

- ① Nishio T., Kanazashi R., Nojima A., Kanazawa H., Okano T., Effect of polymer containing a naphthyl-alanine derivative on the separation selectivity for aromatic compounds in temperature-responsive chromatography, *J. Chromatogr. A*, (査読有) 1228, 148–154 (2012).

- ② Nagata Y., Nishio T., Kanazawa H., Reaction monitoring of tocopherols with active nitrogen oxides by ultra high-speed liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (査読有) 55, 241–246 (2011).
- ③ Nishio T., Ayano E., Suzuki Y., Kanazawa H., Okano T., Separation of phosphorylated peptides utilizing dual pH- and temperature-responsive chromatography, *J. Chromatogr. A*, (査読有) 1218, 2079–2084 (2011).

西尾 忠 (NISHIO TADASHI)  
慶應義塾大学・薬学部・助教  
研究者番号：80401892

- (2) 研究分担者  
該当なし
- (3) 連携研究者  
該当なし

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① 西尾 忠, アミノ酸誘導体ポリマーの分子間相互作用を利用する温度応答性クロマトグラフィー, 第 22 回クロマトグラフィー科学会議, 2011.10.21 (宮城県, 仙台).
- ② 西尾 忠, 芳香族アミノ酸含有ポリマーによる p-p 相互作用を利用した温度応答性クロマトグラフィー, フィジカルファーマフォーラム (PPF2011), 2011.9.12 (神奈川県, 箱根).
- ③ Nishio T., Novel Aqueous Chromatographic System utilizing Temperature-Responsive Polymer Containing Aromatic Amino Acid, 36th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2011), 2011.06.21 (Budapest, Hungary).
- ④ 西尾 忠, 芳香族アミノ酸含有ポリマーを用いる温度応答性クロマトグラフィー, 第18回クロマトグラフィーシンポジウム, 2011.6.4 (福岡, 福岡県)
- ⑤ Nishio T., Temperature-Responsive Chromatography utilizing Amino-Acids Based Functional Copolymer, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, 2011.05.25 (Kyoto)
- ⑥ 西尾 忠, 芳香族アミノ酸を導入した機能性ポリマーによる温度応答性クロマトグラフィー, 日本薬学会第 131 年会, 2011.3.29 (静岡, 静岡)
- ⑦ 西尾 忠, 細胞内環境イメージングを指向したバイオハイブリッド型蛍光プローブ, 日本分析化学会第 59 年会, 2010.9.15 (宮城県, 仙台).
- ⑧ 西尾 忠, 環境応答型ポリマーを用いる細胞イメージング研究, 第 23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2010.7.22 (宮城県, 松島).
- ⑨ Nishio T., Novel Aqueous Chromatographic System for Quantification of Pharmaceutical Compounds using Temperature-Responsive Polymers as the Stationary Phase, 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2010), 2010.06.21 (Boston, USA).

- 6. 研究組織
- (1) 研究代表者