

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560237

研究課題名(和文)細胞内 $\mu$ 攪拌子の創製と細胞応答の調節

研究課題名(英文)Preparation of micro-size in-cell magnetic stirrer for controlling cell behaviors

研究代表者

石原 一彦 (ISHIHARA, KAZUHIKO)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90193341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞親和性を有し、外部磁場に応答する細胞内磁気攪拌子の創製を行った。まず真球形の酸化鉄ナノ粒子内包型ポリスチレン(PSt)粒子を得た。得られた磁性コア粒子を含むPVAフィルムを作製し、PStおよびPVAのガラス転移温度以上で加熱・延伸することで、磁性コア粒子の形状に異方性を与えた。磁気ピンセットを用いた回転磁場の印加により、作製した異形磁性コア粒子は水中において回転運動を示した。すなわち、世界最小の磁気攪拌子の創製に成功した。粒子の回転速度は外部磁場の回転速度を5Hz、2Hzと変化させるとその回転に追従したことから、作製した異形磁性ナノ粒子は良好な磁気応答性を有することがわかった。

研究成果の概要(英文)：To achieve active control of cellular circumstances, we consider the control of chemical reactions in cells by using an intracellular magnetic stirring device is consisted of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-encapsulated anisotropic polymer nanoparticles covered with phospholipid polymers. This is a new intracellular device, which rotates in cells and enables the direct analysis of intracellular circumstances and control of cell functions. The Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-encapsulated polystyrene (PSt) spherical nanoparticles were prepared by the soap-free polymerization. The physical anisotropy was given to the nanoparticles by stretching the nanoparticles-embedded poly(vinyl alcohol) (PVA) film at 160 °C. After the physical stretch, the major axis was enlarged to about 330 nm and the minor axis was shortened to about 130 nm. The nanoparticle could rotate by alternative magnetic fields. That is world most small magnetic stirrer has been obtained.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：バイオマテリアル 磁性粒子 高分子合成 ナノ粒子 細胞・組織 生体親和性

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は、生命現象を司る化学反応を行なっている。これを微小化学プラントととらえると、常温(37℃)、常圧、水を媒体としている安全でクリーン条件のもと化学反応を行なっている。直径10-30 $\mu\text{m}$ で、これまでに関わっている分子については調べられてきているが、未だにその分子の濃度や反応効率に関する情報は得られていない。そこで、細胞での化学反応を加速することができれば、これに連動した細胞応答に対して効率的に摂動を与えることができるとの仮説をたてた。さらに細胞内化学反応の変動を観察することは、細胞内での特定の分子の運動や反応を理解するために重要な知見を与えると考えられる。

この仮説を証明するための手段として細胞内の力学的な攪拌を実施する。細胞内には多数の分子が高濃度で存在しており、とうてい人工系で作ることは困難とされている。したがって、細胞内環境を模して人工系での同様の研究をすることは全くできない。細胞内における化学反応を加速する方法として、触媒となるバイオ分子を送達することや生成物を細胞外に能動的に除去するなど、反応の平衡をずらすことが考えられる。本研究では細胞内環境に化学的な影響を与えることなく、細胞内反応を加速する可能性を追求する。そこで、細胞内に導入でき、細胞環境に全く影響せず、細胞内で回転することを可能とする細胞内 $\mu$ 攪拌子を創製する。

細胞を微小化学プラントとして機能させようとする研究はなされているが、細胞内での反応様式や反応条件を制御する方法論は確立されていない。本研究では界面科学やポリマー化学、さらにはバイオマテリアル科学の情報の集積が必要となるとともに、これによりiPS細胞やES細胞の製造に関わる細胞工学、また、組織再生医療に対する情報提供にもつながる。

## 2. 研究の目的

細胞内 $\mu$ 攪拌子に要求される特性として、(1)細胞内に導入できる特性、(2)細胞内に長時間留めおくことができる特性、(3)細胞内を攪拌できる構造的な特性、(4)直径10-30 $\mu\text{m}$ の範囲に回転磁場を与えるデバイス特性が求められる。これらの項目について研究を実施し、最終的に細胞内に導入した $\mu$ 攪拌子による細胞内化学反応の加速を達成し、細胞応答に与える効果を確認する。研究項目(1)、(2)は表面特性に関わるものであり、細胞とポリマー微粒子との反応を制御できるバイオマテリアル創製の基盤知見を応用し、親水-疎水性、細胞膜類似構造の構築、細胞膜と特異的に反応するペプチドの応用により達成できる。項目(3)については、長辺が500nm程度のラグビーボール形状とし、アスペクト比を5程度とする。項目(4)については、回転磁場を与えるデバイスを設計・創製する。これらを実施することで、目的を達成するとともに、細胞応答に与える効果から細胞内反応の理解につなげる。

## 3. 研究の方法

細胞をマイクロサイズの化学反応器ととらえることは、クリーンな環境における高効率化学反応の解明と、細胞をベースとする化学プラント創製に基礎知見を与える。さらに最近の細胞工学から組織再生医療の流れを考えると、細胞内化学反応の操作法の開拓は大きなカギとなると確信する。そこで、これまで達成されていない細胞の内部を攪拌することを実施する。これにより細胞内の化学反応が促進され、細胞応答に摂動が与えられると仮説した。

従来、細胞内に物質を導入することは、細胞内イメージングや遺伝子操作などに限定されていた。これらはすでに機能を有する物質を細胞内に導入する方法論に関して、多くの研究がなされてきた。一方において、細胞

内で分子反応の制御を能動的に行なうなど仕事をさせるデバイスは、これまでに研究例がなく、そのデバイス設計法についても全く知見がない状況である。本研究ではこれらの点に着目し、新たに磁性微粒子内包ポリマーナノ粒子の創製と細胞親和性と細胞膜透過誘導効果を持つポリマーブラシでの表面修飾法の開発により、細胞内 $\mu$ 攪拌子の創製の着想に至った。細胞内を攪拌することは、細胞内における様々なバイオ分子が関連する酵素反応、分子認識反応、分子の複製・修復など多くの化学反応を加速できる可能性を有する。

細胞内 $\mu$ 攪拌子に要求される特性として、前述の4項目があるが、まず、 $\mu$ 攪拌子のサイズを長辺 500nm-1,000nm、アスペクト比 5 程度のラグビーボール形状とし、磁性微粒子を導入したポリマー粒子の作製技術を開拓する。核となるナノ粒子を加熱加工するプロセスにより、内部に酸化鉄( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )微粒子を含むナノ粒子の創製と形状の制御を行なう。さらに表面開始原子移動ラジカル重合のより細胞親和性ポリマー (PMPC) と細胞膜透過誘起ポリマー (PAEMA) の各セグメントを有するブロック型ポリマー鎖で表面修飾し、細胞内 $\mu$ 攪拌子とする。回転磁場を与えるデバイスを新たに創製し、細胞内 $\mu$ 攪拌子に導入した後、最終的に攪拌の効果と細胞応答との関連を探る。

#### 4. 研究成果

##### (1) 異形磁性粒子の特性評価

ミニエマルジョン重合を用いて作製した真球形の磁性コア粒子(粒径: 130 nm)は、物理的延伸を行うことで長軸が約 210 nm に伸長し、短軸は約 100 nm に減少した。物理的延伸法により、球形粒子に形状の異方性を与えることができた。磁気ピンセットを用いた回転磁場の印加により、作製した異形磁性コア粒子は水中において回転運動を示した。粒

子の回転速度が外部磁場の回転速度とほぼ一致したことから、作製した異形磁性ナノ粒子は良好な磁気応答性を有することがわかった。

##### (2) 細胞適合性表面の評価

粒子表面へのポリマーブラシによる機能化は、赤外分光により追跡した。その結果より、各段階の反応が進行していることが示された。ブラシ構造を構築する前の磁性コア粒子の表面電位が約 -37 mV であったのに対し、原子移動ラジカル重合の開始剤官能基を末端に有する PMPC(PMPC-Br)磁性ナノ粒子は約 -1.0 mV の、次いで、AEMA を重合した PMPC-PAEMA 磁性ナノ粒子は約 +4.5 mV の表面電位であった。磁性コア粒子表面には作製時に使用した界面活性剤に由来するスルホン酸基が、PMPC-Br 磁性ナノ粒子表面には電気的に中性なリン脂質極性基が、PMPC-PAEMA 磁性ナノ粒子表面には AEMA ユニットに含まれるアミノ基がそれぞれ存在する。つまりこれらの結果から、作製した磁性ナノ粒子の表面電位が最表面に存在する化学種の電荷特性に強く影響されることがわかった。

磁性コア粒子および PMPC-Br 磁性ナノ粒子表面に対する BSA の吸着が  $0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下に著しく抑制された一方で、PAEMA 磁性ナノ粒子表面では  $0.35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、PMPC-PAEMA 磁性ナノ粒子表面では  $0.04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  程度と比較的高い吸着量を示した。磁性コア粒子表面は強い負電荷を有するため、生理条件下で負の正味電荷を有する BSA の吸着が抑制されたと考えられる。また、表面に存在する PMPC 鎖により、PMPC-Br 磁性ナノ粒子表面の BSA の吸着が抑制された。一方、正電荷を持つ PAEMA 磁性ナノ粒子および PMPC-PAEMA 磁性ナノ粒子表面で誘起される静電的相互作用により BSA の吸着が誘起されたと考えられる。しかしながら、PMPC-PAEMA 磁性ナノ粒子表面では BSA の理論単層吸着量 ( $0.26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) と比較すると十分吸着は抑制された。これは、PMPC

鎖の効果によると考えられる。

PMPC-PAEMA 磁性ナノ粒子と 37 で 2 時間接触させた HeLa 細胞はその内部から粒子由来の蛍光が観察されたが、PMPC-Br 粒子では観察されなかった。一方、PMPC-PAEMA 磁性ナノ粒子を 4 で接触させた場合、細胞内に蛍光は観察されなかった。つまり、細胞膜と相互作用しない PMPC 鎖でのみで覆われた PMPC-Br 磁性ナノ粒子は細胞内移行から回避された。一方、PMPC-PAMEA 磁性ナノ粒子の取り込み挙動が温度で変化したことから、最表面のカチオン性ユニットに由来するマクロピノサイトーシスで細胞内に移行したと考えられる。PMPC-PAEMA 磁性ナノ粒子は細胞取り込みの際に膜障害性を示さず、取り込み後の細胞増殖率にも影響を与えなかった。これらは粒子表面に存在する PMPC 鎖の高い細胞親和性に由来すると考えられる。つまり、PMPC-PAEMA 構造により細胞内移行性と細胞親和性を兼備する表面を実現することができた。

## 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 1 件)

Kensuke Yoshie, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, Cytocompatible magnetic nanoparticles with cell-internalizing properties for quantification of intracellular environment. *Trans Mat Res Soc Japan*, 査読あり, 41(1), 2016, 113-116.

DOI: doi.org/10.14723/tmrj.41.113

[学会発表](計 6 件)

1. 井上祐貴、吉江健介、石原一彦、リン脂質ポリマー被覆異形ナノ粒子による細胞親和性微小攪拌子の創製、第 37 回日本バ

イオマテリアル学会大会、2015 年 11 月 10 日、京都テルサ(京都府京都市)

2. 井上祐貴、吉江健介、石原一彦、細胞内微小攪拌子としての細胞親和型異形ポリマーナノ粒子、第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 27 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
3. K.Yoshie, Y.Inoue, K.Ishihara, Fabrication of nanometer-sized magnetic stirring device for use in the living cells to control cellular reactions, 日本 MRS 学会、2014 年 12 月 11 日、横浜市開港記念会館(神奈川県横浜市)
4. K.Yoshie, Y.Inoue, K.Ishihara, Fabrication of anisotropic magnetic polymer nanoparticles for intercellular stirring device, International Polymer Conference (IPC) 2014, 2014 年 12 月 5 日、EPOCAL Tsukuba, (茨城県つくば市)
5. 吉江健介、井上祐貴、石原一彦、MPC ポリマー被覆細胞内微小攪拌子の創製、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会、2014 年 11 月 17 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
6. 吉江健介、井上祐貴、石原一彦、細胞内攪拌を目的とした細胞適合性表面を有する異形磁性ナノ粒子、第 63 回日高分子学会高分子討論会、2014 年 9 月 25 日、長崎大学(長崎県長崎市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページなど

<http://www.mpc.t.u-tokyo.ac.jp>

## 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

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし