

バイオ分子の細胞内機能の定量的解析を実現する 高輝度リン脂質ポリマー被覆量子ドットナノ粒子の創製

Creation of QDs embedded polymeric nanoparticles with phospholipid polymer with high luminance that enable quantitative analysis of the function of biomolecules in a cell

東大院工 ○林加織・井上祐貴・石原一彦

e-mail : hayashi@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

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



1. 緒言

バイオイメージングや遺伝子治療など、細胞内の特定部位への物質送達を実現するには、標的の細胞内小器官へ高効率に物質を送達するキャリアーが求められる。このようなキャリアーの創製には、キャリアーの化学構造や周辺環境が細胞内分子動態に与える効果を明らかにし、これらをその設計に反映させることが必要である。蛍光プローブを用いた生細胞のリアルタイムイメージングは、細胞内分子動態を定量的に解析する有効な手法の一つである。しかし、従来の蛍光プローブは輝度が小さく、細胞と非特異的に相互作用するため、シグナル/ノイズ比が低下し、細胞内分子動態の定量的解析は困難となる。

2. 目的

バイオ分子の細胞内機能の定量的解析を可能とする高輝度な蛍光イメージングプローブの創製

要求特性

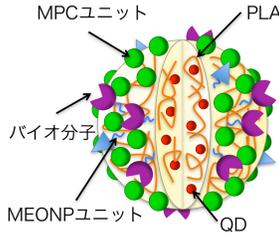
- 高S/N比
 - 優れた蛍光特性を利用してナノ粒子を個々に可視化 → 量子ドット(QD)
 - 非特異反応を阻止することでバイオ分子の特性のみ反映 → リン脂質ポリマー

コア : poly(L-lactic acid) (PLA)
 シェル : poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-*co*-*n*-butyl methacrylate (BMA)-*co*-*p*-nitrophenyloxycarbonyl oligo (ethylene glycol) methacrylate (MEONP)) (PMBN)

- QDの光学特性および蛍光安定性を維持する
- 細胞による非特異的な取り込みを抑制する
- 固定化したバイオ分子の特性を反映し、細胞内へ特異的に取り込まれる
Goto, Y. *et al. Biomacromolecules*, 9:3252-3257, 2008

⇒

- PMBN/PLA/QDナノ粒子をベースとした高輝度ナノ粒子の作製
- 細胞取り込みおよび細胞内輸送機能の定量的な評価



3. 実験

○ PMBN/PLA/QDナノ粒子の作製

生体親和性 (MPCユニット), 疎水性 (BMAユニット), バイオ分子固定化能 (MEONPユニット)

溶媒蒸発法

QD X mg/mL
 PLA/CH₂Cl₂ 0.10 mg/mL
 0.50 mL

超音波照射 10 W Y min

溶媒蒸発

超遠心分離 50,000 rpm 2 h 4°C 1.0 mL

水中へ再分散

作製条件の制御

X { 0.5, 1.0, 2.0 } Y { 5, 10, 20 }

様々な仕込みQD量および超音波照射時間にてポリマーナノ粒子を作製し、それぞれが輝度に与える影響を評価した。輝度 ∝ 内包QD数 × 蛍光量子収率

- 透過型電子顕微鏡(TEM)による内包QDの観察 → Image Jによる1粒子断面あたりのQD面積の測定
- 動的散乱法による粒径の測定
- 相対法による蛍光量子収率の算出

○ リン脂質ポリマーナノ粒子の表面修飾

➢ バイオ分子の固定化

粒子表面にR8とNLSを種々の仕込み比で固定化し、粒子表面の化学構造を変化させた。

oligopeptide

- 細胞膜透過性ペプチド(R8) : RRRRRRRR
- 核移行シグナルペプチド(NLS) : PKKKRKVEDPYC

NLS/R8 (In feed (mole fraction)) = 0/1.0, 0.25/0.75, 0.50/0.50, 0.75/0.25, 1.0/0

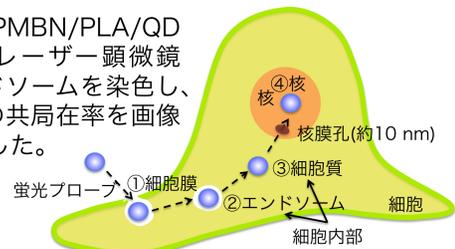
➢ カチオン性ポリマーによる細胞取り込みの増強

Poly(ethylene imine)(PEI)(branch, Mw : 1.0 × 10⁴)と粒子を混合し、粒子の周辺環境を変化させた。

○ バイオ分子の細胞内動態評価

24時間前培養し、終濃度5.0 μg/mLでoligopeptide-PMBN/PLA/QDナノ粒子を加え、2時間後PBSでリンスし、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)により観察した。その際、PKH67によりエンドソームを染色し、oligopeptide-PMBN/PLA/QDナノ粒子とエンドソームの共局在率を画像解析により評価することで、その細胞質移行性を定量化した。

- 細胞 : ヒト子宮頸癌(HeLa)細胞
- 培地 : DMEM (FBS 10% PC/SM 1%)
- 播種密度 : 1.0 × 10⁴ cells/cm²
- 培養条件 : 37°C, CO₂ 5%



4. 結果

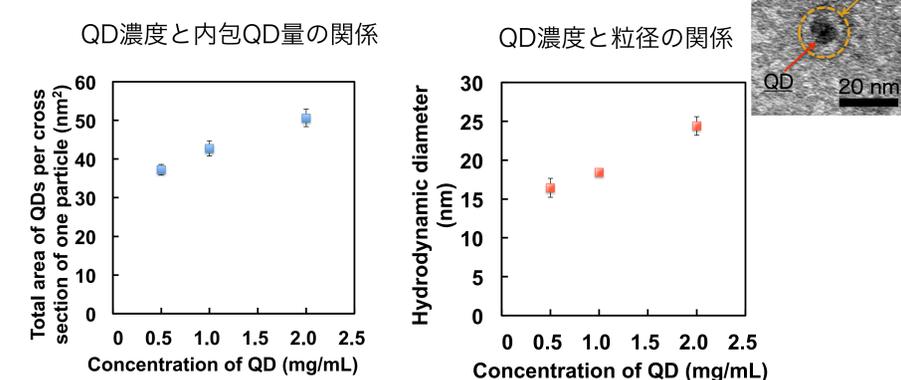
○ PMBNの合成結果

Abb.	In feed (mole fraction)			In copolymer (mole fraction)*			Yield (%)	Mn (x10 ⁴)**
	MPC	BMA	MEONP	MPC	BMA	MEONP		
PMBN451	0.40	0.50	0.10	0.42	0.55	0.03	56	1.3

*Determined by ¹H-NMR (C₂D₅OD)

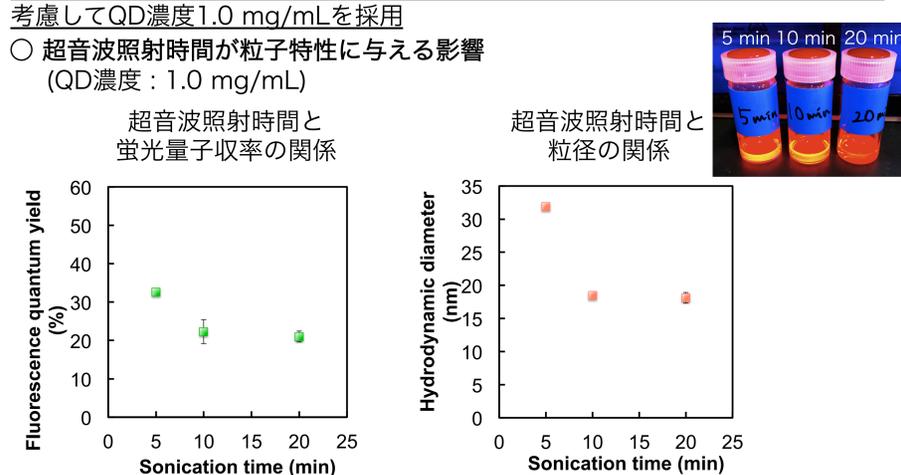
**Determined by GPC with PEG standards in CH₃OH : H₂O = 0.70 : 0.30 mixture containing 10 mmol/L LiBr, flow 0.5 mL/min

○ QD濃度が粒子特性に与える影響



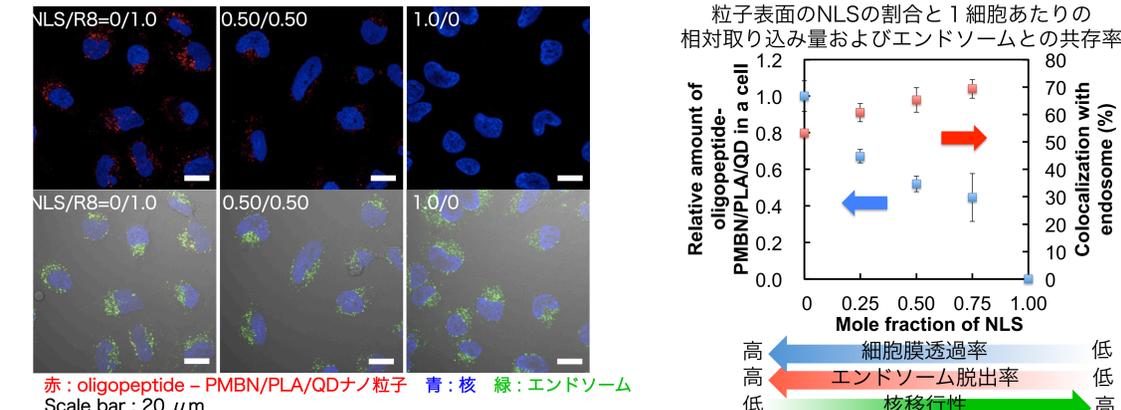
QD濃度の増大により粒子の高輝度化を達成したが、バイオ分子動態への影響を考慮してQD濃度1.0 mg/mLを採用

○ 超音波照射時間が粒子特性に与える影響



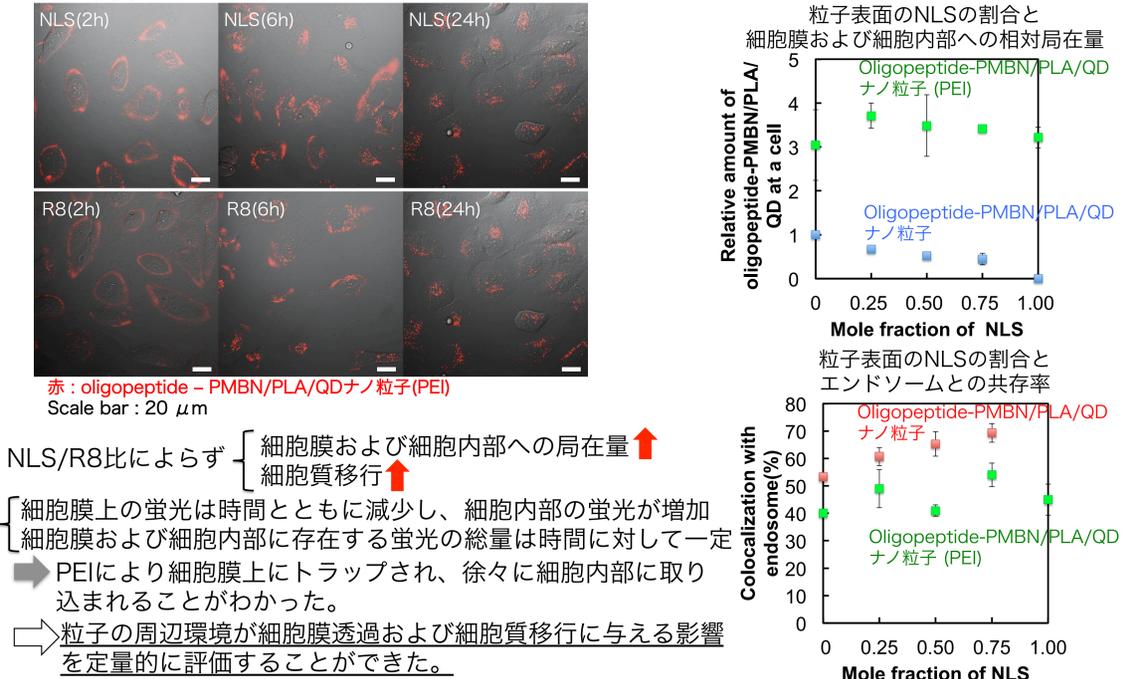
超音波照射時間の短縮により粒子の高輝度化を達成したが、バイオ分子動態への影響を考慮して超音波照射時間10 minを採用

○ バイオ分子の細胞取り込みおよび細胞質移行の定量的評価



NLSの割合 ↑ { 細胞膜透過 ↓ 細胞質移行 ↓ } ⇨ NLS/R8比が細胞膜透過および細胞質移行に与える影響を定量的に評価することができた。

○ 粒子表面のカチオン性ポリマーが細胞取り込みに与える影響の評価



5. 結論

高輝度ポリマーナノ粒子により以下の2点が明らかとなった

- 核に至るまでにバリアとなる細胞膜透過および細胞質移行はR8により突破可能である。
- さらに、粒子表面のバイオ分子によらずPEIにより細胞膜透過および細胞質移行は促進される。

PMBN/PLA/QDナノ粒子は評価すべきバイオ分子の特性を反映し、その細胞内機能を定量的に解析可能な蛍光イメージングプローブである。

本研究は科研費新学術領域研究「ナノメディシン分子科学」により行われた。