

熊谷研究助成表彰報告書

(令和3年度 助成分)

令和5年7月14日

公益財団法人 熊谷科学技術振興財団 御中

代表研究者・所属機関名

上村真生・東京理科大学

所属学部学科・所属部課室・役職

先進工学部機能デザイン工学科・准教授

氏名 上村 真生

貴財団より助成を受けました件につき下記の通り(中間・最終)報告致します。

1. 研究テーマ及び期間
研究テーマ: 高分子修飾磁性ナノ粒子による細胞内オルガネラのナノ力学刺激技術の創出
期間: 2022年3月～2023年4月
2. 共同研究者名
氏名 所属機関・職名
該当なし
3. 成果の概要
細胞内に存在するさまざまなオルガネラは、それぞれが生命活動に必要な機能を担っている。また近年では、細胞内でタンパク質やRNAなどが相分離により形成する液滴が「膜のないオルガネラ」として重要な存在であることも高い注目を集めている。さらに、細胞にはたらく「力」に関わる「メカノバイオロジー」の研究が進み、これらの小器官は外から作用する力に応答して機能が活性化または低下することが明らかとなっている。またこれらの小器官は、細胞のがん化や、ミトコンドリア病やゴルジ体病などの有効な治療法が無い難病の原因にも関わっていることがわかってきている。そこで本研究では、非侵襲・遠隔的に小器官を「ナノ力学刺激」する技術を開発することを目的とした。具体的には、細胞内のゴルジ体に特異的に結合する磁性ナノ粒子を作製し、磁場印加による力学刺激を与えた際に、細胞がどのような挙動を示すかを観察した。
本研究ではまず、磁性ナノ粒子の合成に取り組んだ。FeCl ₂ ・4H ₂ OとFeCl ₃ ・6H ₂ Oを超純水中で混合し、アンモニア水とNaOHを添加、混合することで、Fe ₃ O ₄ ナノ粒子を合成した。得られたFe ₃ O ₄ ナノ粒子は、マグネットと遠心機を用いた精製によって、任意の粒径のものを回収した。得られたFe ₃ O ₄ ナノ粒子の粒子径を動的光散乱(DLS)で評価したところ、およそ粒径50 nmの粒子が得られたことがわかった。

つぎに、この磁性ナノ粒子をゴルジ体に集積させるためのリガンド分子として、L-Cysteineをナノ粒子表面に導入した。この際、蛍光観察を行うために蛍光色素(FITC)を同時に導入した。Fe₃O₄磁性ナノ粒子とドーパミンを混合し、遠心フィルター精製することでドーパミン修飾ナノ粒子を作製した(DOPA-NPs)。

つづいて、L-CysteineとFITCを、DOPA-NPsの表面にアミド結合を介して導入した(L-Cys-FITC NPs)。L-CysteineとFITCの導入は、それぞれ定量試薬と蛍光スペクトル測定より確認した。L-Cys-FITC NPsの粒径をDLSで測定した結果、約75 nmであった。この結果より、表面修飾によって、複数のFe₃O₄ナノ粒子が凝集した状態で表面修飾された構造を有していることが示唆された。つぎに、L-Cys-FITC-NPsの細胞毒性を、WST法により評価した。ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞を96wellマイクロプレートに培養し、L-Cys-FITC-NPsを添加して24時間培養した後、PBSで洗浄し、WST法による毒性評価を行った。この結果、作製した粒子はほとんど細胞毒性を示さなかった。このため、L-Cys-FITC-NPsは、長時間の観察にも使用できることが明らかとなった。

その後、作製したL-Cys-FITC-NPsの細胞内のゴルジ体への集積特性を評価した。HeLa細胞にL-Cys-FITC-NPsを添加し、24時間培養した後、ゴルジ体染色試薬(BODIPY TR Ceramide)を添加し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。この結果、ゴルジ体の部位に特異的にL-Cys-FITC-NPsが局在している様子が観察された。リガンド分子であるL-cysteineを導入していないナノ粒子ではこのような挙動は観察されなかったため、L-cysteineを導入することによって、ゴルジ体に特異的に集積可能なナノ粒子が得られたと考えられる。

最後に、L-Cys-FITC-NPsをゴルジ体に集積させた細胞に、ネオジム磁石を用いて磁場を印加し、細胞の移動距離を計測した。この結果、磁場を印加しなかった場合と比べて、磁場を印加した際には細胞の移動距離が大きく減少する様子が観察された。これは、ゴルジ体に対して力学的な刺激が加わることによって、細胞骨格にも影響を与えられた結果であると考えられる。

以上の結果から、細胞内のオルガネラを局所的に刺激・操作するナノ粒子を得ることに成功した。今後、このナノ粒子を用いて、細胞のさまざまな活動の操作を行うことで、新たな医療技術の開拓を進める予定である。

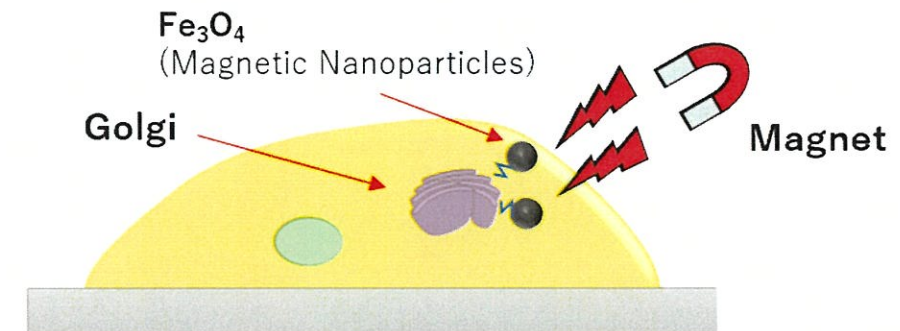


図. 本研究の概要

4. 研究成果の発表状況(予定を含む)

【論文発表】

原著論文の発表準備中。

【学会発表】

中島 慶人, 上村 真生

“磁性ナノ粒子による細胞メカノセンサーの遠隔操作”

第32回日本MRS年次大会, 横浜・産業貿易センタービル, 2022. 12/5-7.

上村 真生

“高分子複合化ナノ粒子による細胞の温感・触覚受容体の遠隔操作”

第71回高分子討論会, 北海道大学, 2022. 9/5-7.