

アルギニンペプチドによる細胞膜損傷の評価と微粒子の細胞内移行の促進 加藤 徳剛

Investigation of plasma membrane damage induced by arginine peptides and improvement in the efficiency of intracellular uptake of nanoparticles by arginine.

Noritaka Kato

【1. 緒言】

他のポリカチオンと比べて、低毒性と言われているアルギニンペプチドは、薬物や微粒子を細胞内へ導く、膜透過性ペプチドの一種である。さらに、細胞外物質を、細胞外液ごと取り込むマクロピノサイトーシスを、細胞に誘導する性質も持っている。これらの性質から、アルギニンペプチドは、ドラッグデリバリーシステムにおいて、薬剤やドラッグキャリアなどの細胞内移行を促進させることができる。しかし、アルギニンペプチドが、細胞膜の構造に及ぼす影響、微粒子の細胞内移行に対するアルギニンペプチドの分子量依存性や、微粒子の粒径依存性など、詳細は不明である。そこで、他のポリカチオンと比べてアルギニンペプチドが低毒性である理由、およびアルギニンペプチドによる微粒子の細胞内移行の促進機構を解明することを、本研究の目的とした。1年目は、ポリアルギニンと他のポリカチオンが細胞膜に及ぼす影響の違いを明らかにすることを目的に研究を行った。評価法は、従来法および、我々が新規に開発した方法を併用した。従来法として、細胞から漏出する乳酸脱水素酵素 (LDH) を、呈色反応で検出して、細胞膜への孔形成の度合いを評価する方法 (LDH アッセイ) と、細胞内の代謝活性を呈色反応で検出して、細胞生存率を評価する方法 (WST アッセイ) を採用した。一方、開発した方法は、非線形光学現象である光第二高調波発生 (SHG) を利用した SHG アッセイである。細胞膜を構成している脂質分子の配向が乱れると、特殊な色素で染色した細胞膜の SHG 強度が低下することを利用した評価法である。SHG アッセイは、LDH アッセイよりも高感度に、細胞膜の構造変化を検出することが可能であるため、ポリカチオンが細胞膜へ及ぼす影響について、新たな知見が得られる。

【2. 実験方法】

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を用いた。SHG アッセイでは、18 mm×18 mm のカバーガラス上に、LDH と WST アッセイでは、96 穴マイクロプレートに培養した。細胞を播種後、血清含有イーグル最小必須培地 (EMEM) を用いて、インキュベータ内 (37°C, CO₂ 5%) で、SHG と LDH アッセイの場合は 20h、WST アッセイの場合は 48h、培養し

た。その後、高分子を溶かした血清不含 EMEM に交換し、インキュベータ内に 1h おいた。細胞当たり的高分子溶液の割合は、高感度な SHG アッセイでは 1.1×10^5 mL/cell、低感度な LDH と WST アッセイでは 1.4×10^5 mL/cell になるようにした。

その後、SHG アッセイでは、高分子含有培地を取り除き、両親媒性極性色素である RH237 を含有する平衡塩類溶液で、20min 間インキュベータ内で細胞膜を染色した。そして平衡塩類溶液で洗浄した後、レーザ走査型多光子励起顕微鏡で観察した。励起光源にはタイサファイアレーザ (パルス幅: 100fs, 励起波長: 850nm) を用いた。RH237 は蛍光発光するので、SHG 像と同時に 2 光子励起蛍光 (TPF) 像も撮像した。3 次元断層 SHG および TPF 像から、夫々の積分強度を求め、染色ムラを補償するため、SHG の積分強度を TPF の積分強度で規格化した I_{SHG}/I_{TPF} の値で、脂質分子の配向の乱れを評価した。

LDH アッセイの場合は、高分子に曝した後に、各種溶液を添加し、30min 間、室温で呈色反応を行い、プレートリーダーで比色分析した。WST アッセイの場合は、高分子に曝した後に、各種溶液を添加し、4h 間、インキュベータ内で呈色反応を行い、プレートリーダーで比色分析した。

細胞毒性の高い分岐型ポリエチレンイミン (PEI) を基準に、カチオン性のポリペプチドであるポリアルギニン塩酸塩 (PLA) とポリリシン塩酸塩 (PLL)、さらに、電氣的に中性で生体適合性が高いポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド (PHPMA) が、細胞膜へ及ぼす影響を比較した。

【3. 結果と考察】

[3-1. PEI と PLA の比較]

Fig. 1 に高分子濃度に対する I_{SHG}/I_{TPF} の値を示した。Fig. 1a は、高分子濃度を $\mu\text{g/mL}$ の単位で比較した場合で、細胞毒性試験なので従来よく用いられてきた単位である。PLA の方が、 I_{SHG}/I_{TPF} の値がやや大きく、脂質分子の配向を乱さないように見える。細胞膜は正味負の電荷を持っているため、ポリカチオンが細胞膜に静電吸着することが、細胞毒性を示す一因である。用いたポリカチオンは、モノマー 1 つ当たり正電荷を 1 つ持っているため、高分子濃度を正電荷の濃度、つまりモノマー換算濃度で、比較

した (Fig. 1b)。すると、両者で違いがほぼない。モノマー換算濃度で、再度詳細に比較した結果 (Fig. 2a)、両者に違いをないと結論した。一方、LDH アッセイを比較すると (Fig. 2b)、PEIの方が、よりLDHを漏出していることから、細胞膜に細孔を形成する能力は、PEIの方が高いことが明らかになった。

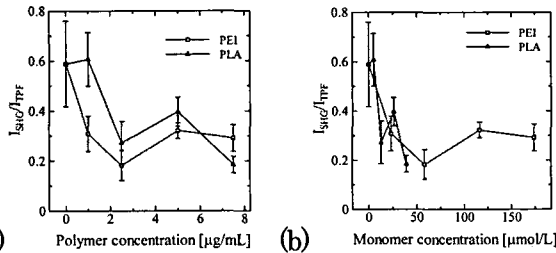


Fig. 1. PEI と PLA の SHG アッセイ, (a) 高分子濃度 ($\mu\text{g/mL}$), (b) モノマー換算濃度.

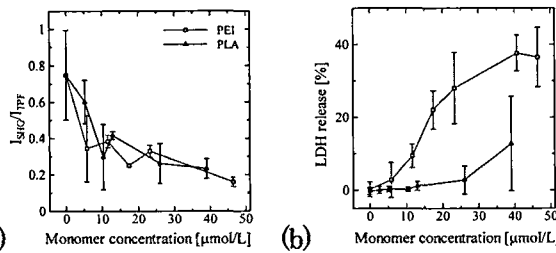


Fig. 2. (a) モノマー換算濃度における SHG アッセイ, (b) モノマー換算濃度における LDH アッセイ.

[3-2. PEI と PLL と PHPMA の比較]

SHG アッセイにおいて、PHPMA は、脂質分子の配向を乱さないこと、LDH と WST アッセイにおいても、細胞膜損傷を示さず、細胞生存率にも影響を与えなかったことが分かった (Fig. 3a, 4a, 5a)。電気的に中性な PHPMA は、静電相互作用はおろか、細胞膜との相互作用が殆ど無いことが分かった。

一方 PLL は、細胞膜に影響を与えることが分かった。高分子濃度を $\mu\text{g/mL}$ の単位で比較すると、PEI よりも影響が小さいように見える (Fig. 3a, 4a, 5a)。しかし、モノマー換算濃度で比較すると、PLL は PEI よりも、脂質分子の配向を乱さない (Fig. 3b) が、細胞膜に細孔を形成する能力は高く (Fig. 4b)、細胞生存率への影響は、両者で等しかった (Fig. 5b)。

[4. まとめ]

PEI を基準に、ポリカチオンが細胞膜に及ぼす影響を比較すると、SHG アッセイから、PEI=PLA > PLL の順で、細胞膜の脂質分子の配向を乱す能力が高いこと、LDH アッセイからは、PLL > PEI > PLA の順で、細胞膜への孔形成の能力が高いことが明らかになった。PLA は、ポリカチオンの中でも細胞毒性が低いとされてきたが、脂質分子の配向を乱す能力については、PEI とほぼ同じであることから、

PLL よりも細胞膜との相互作用が強いことが分かった。また、細胞膜への孔形成能力と、細胞膜の分子配向を乱す能力には、相関が無いことが分かった。

また、物質の細胞毒性は、従来 $\mu\text{g/mL}$ の単位で比較されてきたが、本研究より、ポリカチオンのモノマー換算濃度で比較することで、ポリカチオンが膜へ及ぼす影響を詳細に、議論できることが分かった。

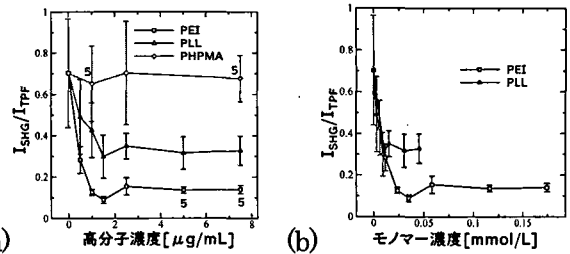


Fig. 3. PEI と PLL と PLA の SHG アッセイ, (a) 高分子濃度 ($\mu\text{g/mL}$), (b) モノマー換算濃度.

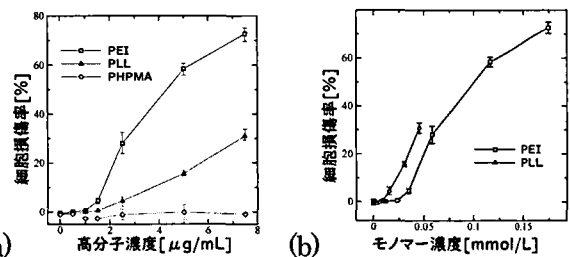


Fig. 4. PEI と PLL と PLA の LDH アッセイ, (a) 高分子濃度 ($\mu\text{g/mL}$), (b) モノマー換算濃度.

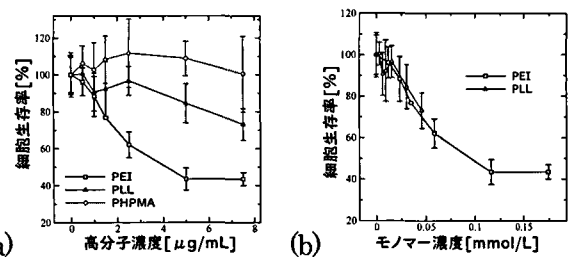


Fig. 5. PEI と PLL と PLA の WST アッセイ, (a) 高分子濃度 ($\mu\text{g/mL}$), (b) モノマー換算濃度.

[5. 成果報告]

- [1] 佐藤僚太, 田口海都, 宮本紗希, 加藤徳剛, HeLa 細胞に内在化されたマイクロ粒子の排出経路 (10a-S402-11), 応用物理学会, 2021年9月10日
- [2] 篠崎真実, 相山恵理子, 加藤徳剛, 多光子励起顕微鏡を用いたポリアルギニンによる細胞膜損傷の評価 (12p-S402-9), 応用物理学会, 2021年9月12日
- [3] 佐藤僚太, 田口海都, 宮本紗希, 加藤徳剛, HeLa 細胞における PEG 化粒子の内在化から排出までの経路 (32a-E105-7), 応用物理学会, 2022年3月23日
- [4] 篠崎真実, 相山恵理子, 加藤徳剛, カチオン性の官能基の種類と濃度でみたポリカチオンの細胞膜への影響 (23a-E104-7), 応用物理学会, 2022年3月23日