

## O2-1

病態細胞イメージングへの適用を目指した  
 バイオハイブリッド型蛍光プローブの開発  
 Development of bio-hybrid fluorescence probe

for pathological cell imaging

○ 嶋村美来<sup>1</sup>, 小林浩規<sup>1</sup>, 西尾 忠<sup>1</sup>, 金澤秀子<sup>1</sup>, 岡野光夫<sup>2</sup>

1. 慶應義塾大学薬学部, 2. 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

○Mirai SHIMAMURA<sup>1</sup>, Hiroki KOBAYASHI<sup>1</sup>, Tadashi NISHIO<sup>1</sup>, Hideko KANAZAWA<sup>1</sup> and Teruo OKANO<sup>2</sup>

1. Faculty of Pharmacy, Keio University

2. Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University

**Abstract:** Recently, bio-imaging and its related techniques have been actively investigating in life science field. In this research, we developed "bio-hybrid fluorescent probe" based on temperature-responsive polymer, which is called as poly-*N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm). PNIPAAm has phase transition temperature at 32°C and shows reversible hydrophilic (<32°C)-hydrophobic (>32°C) change in the aqueous solution. First, we synthesized fluorescent polymer by introduction fluorescent molecule, such as fluorescein, coumarin, rhodamine or dansyl derivative into PNIPAAm. Fluorescent polymer showed environment (temperature or pH)-dependent fluorescence intensity change. Next, we prepared bio-hybrid fluorescent probe by conjugation fluorescent polymer and biomolecules (lipid or protein). Cellular uptake of this probe was controlled by incubation temperature.

Key words: Bio-hybrid fluorescent probe, Poly-*N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm)

### 1. はじめに

近年、生体中の病変部位の確定を目的とする生体イメージング研究が精力的に行われている。このうち蛍光プローブを用いた手法では、細胞中で対象分子の時空間的挙動が高感度に観察可能であり、病変細胞を検出することが期待できる。我々は、機能的な蛍光高分子を基盤として、温度や pH 変化を感知し、その蛍光強度が変化するバイオハイブリッド型蛍光プローブの研究を行っている。正常とは異なる病態細胞内の pH, 温度を感知し、選択的に発光させることで疾患の早期発見に繋がることが期待される。

### 2. 目的

Poly-*N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm) は外部温度刺激に応答し、下限臨界溶解温度 (LCST; 32°C) を境に低温で親水性、高温で疎水性変化を起こし、構造を可逆的かつ鋭敏に変化させる性質を有する (Fig. 1)。我々はこの高分子に pH 応答性などを有する蛍光団を導入して、外部からの pH や温度刺激により蛍光強度が大きく変化する新規蛍光プローブの開発と、これを用いた細胞蛍光イメージング法への応用を目指した。この目的達成のため、今回 4 種類のそれぞれ性質の異なる蛍光性高分子を開発した。さらに細胞膜透過性を高めるために膜融合性脂質を結合させたバイオハイブリッド型蛍光プローブを作製し、細胞イメージングへの適用を検討した (Fig. 2)。

### 3. 実験

#### 3-1. 蛍光性高分子

温度応答性ポリマー、PNIPAAm はモノマーである *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) をラジカル重合して得られる。

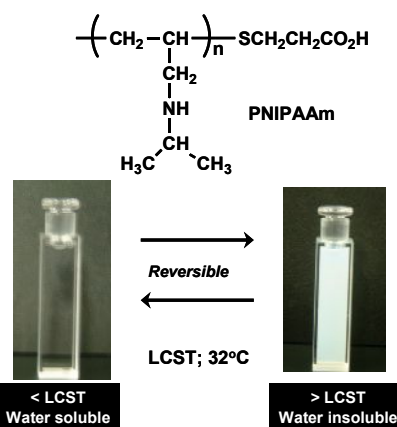


Fig. 1. Temperature-responsive polymer; PNIPAAm.

我々は、NIPAAm と重合性官能基を有する 4 種の蛍光試薬, fluorescein *o*-acrylate (FL), 7-(4-trifluoromethyl)coumarin acrylamide (CO), methacryloxyethyl thiocarbonyl rhodamine B (RH) 又は dansyl aminoethylacrylamide (DA) を用い、NIPAAm と共重合させて P(NIPAAm-*co*-FL) (1), P(NIPAAm-*co*-CO) (2), P(NIPAAm-*co*-RH) (3), P(NIPAAm-*co*-DA) (4) をそれぞれ合成した。これらの水溶液における温度及び pH 変化に伴う蛍光強度の測定を行い、環境応答性を評価した (Fig. 3)。

#### 3-2. バイオハイブリッド型蛍光プローブ

蛍光性高分子の末端カルボキシ基を活性エステル化後、膜融合性脂質の phosphatidyl ethanolamine, dioleoyl (DOPE) を脱水縮合させ、バイオハイブリッド型蛍光プローブを作

製した。更に RAW264.7 細胞を用いて細胞実験を行った。共焦点レーザー顕微鏡で観察し、細胞膜透過性を評価した。評価内容として、DOPE の有無によるプローブの細胞透過性の比較及び細胞培養温度の違いによるプローブの取り込み効率の検討を行った (Fig. 4)。

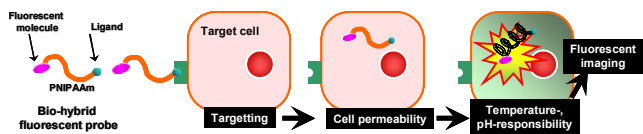


Fig. 2. Concept of bio-hybrid fluorescent probe and cellular imaging.

#### 4. 結果

合成した蛍光性高分子 (1)~(4) はいずれも温度応答性を有し、LCST を 30°C 付近に有していた。このうち、(1)~(3) は低温側 (<LCST)—発蛍光、高温側 (>LCST)—消光という性質を有し、(4) はこれらと逆の性質を有していた。さらに(1) は FL 由来の pH 応答性も有していた [低 pH (<pH 6.5)-弱発光、高 pH (pH>6.5)-強発光]。これらの結果から、温度、PH の両環境に応答する蛍光性高分子の開発に成功した。元来、FL、CO 及び RH は極性溶媒中で強く蛍光を発し、DA はこれとは逆に低極性溶媒中で発光する性質を有することを考慮すると、これらの高分子の蛍光特性は、共重合させた蛍光団の性質と、温度制御により親水-疎水変化する高分子の性質の組合せに由来すると考えられた。

次いで、蛍光性高分子 (2) と DOPE からなるバイオハイブリッド型蛍光プローブを作製し、その物理化学的性質を評価したが、本プローブは、蛍光性高分子 (2) の性質を維持していることを確認した (LCST を境に、低温側—発蛍光、高温側—消光)。これを用いた細胞実験では、プローブ添加後 5 h で細胞内にプローブ由来の蛍光が確認され、細胞膜透過性が確認された。また、DOPE の有無による細胞取り込み効率を比較した。この結果、DOPE を有するプローブは、それを有さない蛍光性高分子より、細胞取り込みが促進されることを確認した。さらに、培養温度の違いによる、プローブの細胞取り込み効率を比較した。LCST より高温に設定して培養した場合、低温で培養したものと比べて、細胞取り込みが亢進していることが確認された。この結果は、高温培養時、プローブ中のポリマーは疎水性を示すため、細胞膜との親和性が高くなったためと考えられる。

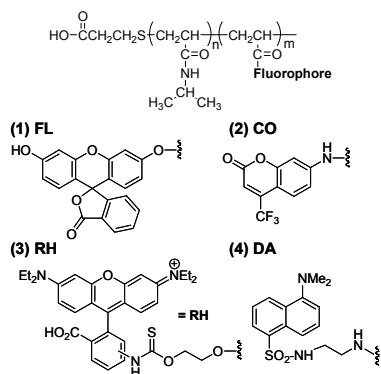


Fig. 3. Temperature- and pH-responsive fluorescent polymers.

#### 5. 今後の展望

今回、蛍光性高分子の末端に膜透過性脂質 (DOPE) を修飾することにより、細胞膜透過性が亢進することが確認された。今後、DOPE を各種疾患細胞が発現するレセプター特異的なリガンドに変更することで、標的細胞選択的な細胞イメージングを目指したいと考えている。また、細胞培養温度を変えることで、LCST を境に蛍光プローブの細胞取り込みが制御可能であることが確認された。開発した蛍光プローブは、細胞導入の際、従来からのマイクロインジェクション法等を用いることなく、温度制御のみで導入できることが特長の一つである。今後、この利点を活かし、蛍光性高分子に抗体等を結合させ、PNIPAAm による温度制御能と抗体によるターゲティング能を併せ持つ蛍光プローブの作製も行っていく予定である。

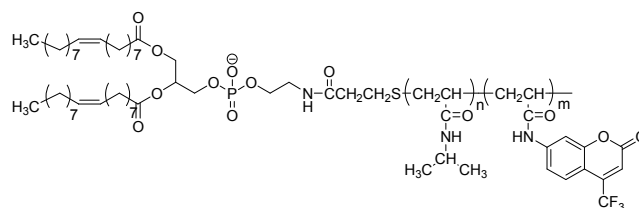


Fig. 4. Structure of bio-hybrid fluorescent probe.

#### 6. 参考文献

- H. Kobayashi, M. Nishikawa, C. Sakamoto, T. Nishio, H. Kanazawa, T. Okano, *Anal. Sci.*, **25** 1043-1047 (2009).