

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18977

研究課題名（和文）ハイドロゲルをコアとした新奇ジャイアントリポソームの形成と形態制御

研究課題名（英文）Formation and structural control of hydrogel-cored giant liposome

研究代表者

佐伯 大輔（Saeki, Daisuke）

信州大学・学術研究院工学系・助教

研究者番号：70633832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：脂質二分子膜からなる小胞体であるジャイアントリポソーム(GL)は安定性の低さや調製方法の難しさが更なる発展の制約となっている。本研究では、高い安定性を有するハイドロゲルをコアとしたGLの形成手法の確立を行った。

安定なGLを高効率に形成する手法として、ハイドロゲル粒子を脂質分子を溶解した油相に分散させ、水相へ再分散させ、ゲル粒子を脂質二分子膜で被覆しGL化する油水界面通過法を確立した。また、GLの形態制御を行うため、GLのコアとして用いる非球形ハイドロゲル粒子を形成するためのマイクロ流路を開発した。

以上、本研究により、GLの形態をハイドロゲルで制御するための重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジャイアントリポソーム(GL)は生体膜モデルや人工細胞など幅広い研究領域で注目されているが、その安定性の低さや調製方法の難しさが更なる発展の制約となっている。本研究では、高効率かつ簡便にGLを形成するための新たな手法を確立した。また、ゲルをGLのコアに用いることで、安定性の問題を解決した。本研究で得られた知見により、従来のGLの抱える問題点が解決され、GLの更なる応用につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Giant liposomes (GLs) are hollow particles composed of a lipid bilayer and their application is restricted by their low stability and preparation difficulty. In this study, we established the preparation technique of hydrogel-cored GLs with high stability.

First, an oil-water interface transfer method to efficiently prepare GLs was developed. Lipid-coated hydrogel particles were transferred to water phase through oil-water interface, and hydrogel-cored GLs formed. Then, a microfluidic device to form non-spherical hydrogel particles was developed for controlling the GL morphology.

The important findings were obtained by this research to control the GL morphology using hydrogels.

研究分野：生体分子工学

キーワード：リポソーム ハイドロゲル 形態制御 マイクロ流路

1. 研究開始当初の背景

脂質二分子膜からなる生体膜は、膜タンパク質などにより分子結合能や選択的透過性などの優れた分子認識能を発現している(図1)。これらの優れた機能を人工的に再現するため、脂質二分子膜からなる小胞体であるリポソームが古くから用いられてきた。近年、マイクロメートルオーダーのサイズを有する巨大リポソーム(GL; giant liposome)が、静置水和法やエレクトロフォーメーション法、マイクロ流路法などを用いて比較的容易に形成できるようになった。GLは、サイズ、構造が細胞に近いことから、生体膜モデルや人工細胞、マイクロバイオリクターのような基礎研究から応用まで、幅広い研究領域で注目されている。一方で、自立膜ゆえの安定性の低さや形態制御の難しさが、調製、研究、あるいは応用における制約となっている。生体膜においては、細胞骨格がこれらの機能を実現しており、脂質二分子膜単独では限界がある。

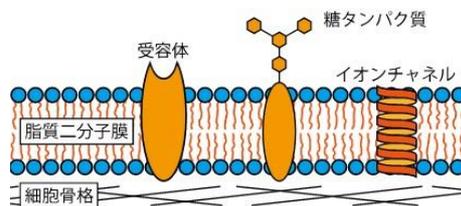


図1. 生体膜の構造

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、ハイドロゲルをコアとした、新奇な構造を有するGLの均一かつ高効率な形成手法の確立を目的とした。生体膜における細胞骨格を、柔軟性と形状安定性を兼ね備えたハイドロゲルを内水相に用いることにより代替・模倣し、従来法では実現不可能な高い物理的安定性を有するGLの調製を試みた。(1) ハイドロゲルをコアとしたGLの形成方法、(2) コアとして用いるためのハイドロゲル粒子の形成方法の2つの項目に分けて進め、形態が制御されたGLの形成について検討した。

3. 研究の方法

(1) ハイドロゲル粒子をコアとしたGLの形成方法の確立

GLの形成方法として、油水界面を利用した界面通過法を検討した(図2)。水相と脂質を溶解した油相を接触させて静置すると、油水界面に脂質の単分子膜が形成される。この界面にハイドロゲル粒子を通過させると、脂質単分子膜が粒子表面に移しとられ、GLが形成できると考えた。

ハイドロゲル粒子には、粒子基材の影響をみるため、市販の球状のメタクリレートポリマー粒子もしくはアガロース粒子を用いた。また、表面電荷の影響をみるため、カチオン性もしくはアニオン性のゲル粒子を用いた。分散水相を除去したゲル粒子を中性脂質 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)、アニオン性脂質 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*rac*-(1-glycerol) sodium salt (POPG)、またはカチオン性脂質 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt) (DOTAP) を溶解した chloroform と *n*-hexane の混合溶媒に分散させ、脂質を吸着させた。その後、遠心機を用いて水相へ再分散させ、脂質二分子膜を形成させた。脂質二分子膜の形成を確認するため、蛍光標識脂質を油相に添加した。また、GLへの物質内包化挙動を調べるため、あらかじめ水溶性蛍光物質 FITC-dextran を溶解した水相にゲル粒子を浸漬し、ゲル粒子分散液を調製し、同様にGL形成を行った。得られたGLは、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、および共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

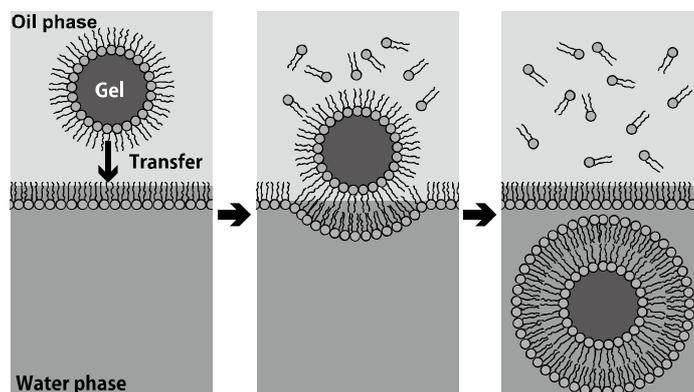


図2. 界面通過法を利用したハイドロゲルをコアとしたGL形成

(2) コアとして用いるためのハイドロゲル粒子の形成方法の確立

本研究では、ゲル粒子の形態を制御することにより、GLの形態制御を実現する。そこで、本研究では、形態が制御されたゲル粒子を形成するため、マイクロメートルサイズの構造が精密に制御された材料を形成できる、マイクロ流体デバイスを用いた。ハイドロゲルの材料には、カル

シウム塩により容易に架橋し、ハイドロゲルが形成される、アルギン酸を用いた。アルギン酸をマイクロ流体デバイス中でゲル化させ、ハイドロゲル粒子を形成する方法について検討した。一般的には、アルギン酸のゲルを得る場合、水相中でアルギン酸とカルシウム塩を接触させるが、ゲル化速度が大きく、形態制御が困難である。本研究では、アルギン酸を含む水相とカルシウム塩を含む油相を接触させてゲル化する方法を検討した。油水界面を形成させることで、流路内における内水相の形状が維持され、ハイドロゲルの形状が制御できると考えた。

マイクロ流体デバイスは、ソフトリソグラフィ法を用いて、ポリジメチルシロキサン (PDMS) を加工して作製した。アルギン酸ナトリウムを含む水相とカルシウム塩を含む油相を、シリンジポンプを用いて送液し、十字型流路構造を用いて接触させた。その後、デバイスから回収し、塩化カルシウム水溶液中に保存した。デバイス内におけるゲルの形成は、位相差顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) ハイドロゲル粒子をコアとした GL の形成方法の確立

初めに、粒子基材の影響について検討した。メタクリレート系ポリマー粒子を用いて油相への分散を試みたところ、油相がゲル粒子に吸収されてしまった。疎水性が高いためであると考えられる。一方で、アガロース粒子を用いた場合は、油相の吸収は見られず、油相に分散させることができた。ゲル粒子を油相に分散させて脂質分子を吸着させるためには、親水的なゲル粒子を用いる必要があることが分かった。

次に、アガロース粒子を用いて、ゲル粒子及び脂質分子の電荷が GL 形成に及ぼす影響を評価した。ゲル粒子と脂質分子の電荷が同一符号の場合、ゲル粒子からは脂質由来の蛍光は検出されず、電荷が異なる符号の場合、蛍光が検出された (図 3)。ゲル粒子が脂質分子で被覆されており、脂質分子の被覆には、ゲル粒子表面と脂質分子間の静電相互作用が必要であることが示唆された。

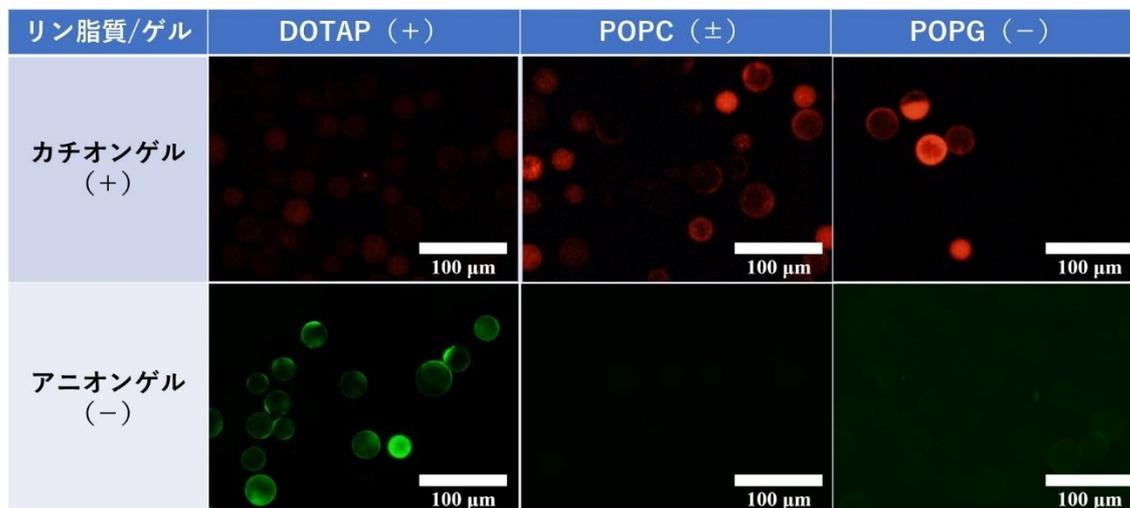


図 3 . 脂質分子とゲル粒子の電荷が GL 形成に及ぼす影響

物質内包化挙動を評価するため、内水相に FITC-dextran を保持させ、GL 形成を行ったところ、ゲル粒子の内部から FITC-dextran 由来の蛍光が観察された (図 4 左)。脂質二分子膜が形成され、内水相が閉鎖的に維持されたと考えられる。さらに、脂質分子の吸着箇所を観察するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、ゲル粒子表面から強い蛍光が検出された (図 4 右)。脂質分子はゲル粒子表面に吸着し、脂質二分子膜を形成していることが示唆された。

以上の結果より、本手法を用いることで、ハイドロゲル粒子をコアとした GL が形成できることが分かった。ハイドロゲル粒子を鋳型として GL が形成されるため、安定性の問題だけでなく、形成効率や均一性の解決にもつながると期待される。

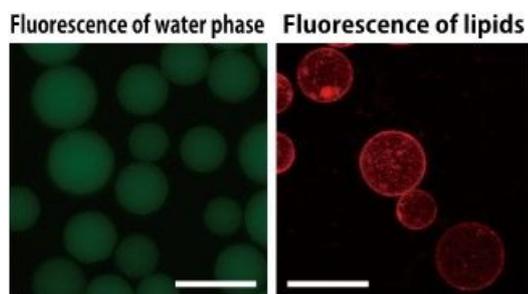


図 4 . 得られた GL の蛍光観察画像 (左) FITC-dextran を保持させて形成させた GL の蛍光顕微鏡観察画像、(右) 脂質分子の蛍光の共焦点レーザー顕微鏡観察画像

(2) コアとして用いるためのハイドロゲル粒子の形成方法の確立

初めに、アルギン酸ナトリウムを含む水相とカルシウム塩を含む油相を十字型流路構造により接触させ、油相により水相を切断することにより液滴化し、同時にカルシウムイオンによりアルギン酸を架橋し、ハイドロゲルを形成させるコンセプトで、単独の十字型流路構造からなるデバイスを開発した(図5)。作製したデバイスを用いてゲル粒子の形成を試みたところ、油相の流量を上げる、すなわちせん断力を大きくしても、液滴化は見られず、合流後すぐにゲル化し、ファイバーが形成された。アルギン酸ナトリウムやカルシウム塩の濃度を下げた場合、デバイス内ではゲル化せず、デバイスから回収したものは液滴形状を保っておらず、形態を制御するのは困難であった。一方で、本デバイスを用いた場合、アルギン酸カルシウムのゲルファイバーをきわめて安定に形成できることが分かった(図6)。従来の水相中でゲル化する手法の場合、ゲル化速度を遅くするための流路の導入や、ゲル化より速く各相を流入させるなど、精密な流体制御が必要であったが、本デバイスでは、幅広い流量範囲でファイバーが形成され、ファイバー径の制御も容易であった(図7)。また、ファイバー内部への機能性分子の担持や、半分ずつ組成の異なる非対称ファイバーの形成も行うことができた。粒子化は困難であったが、ファイバーの形成手法として非常に有用な手法であると考えられる。

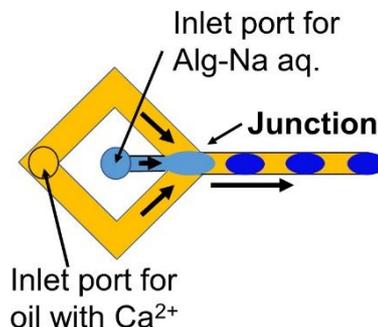


図5 .単独の十字型流路構造からなるデバイス

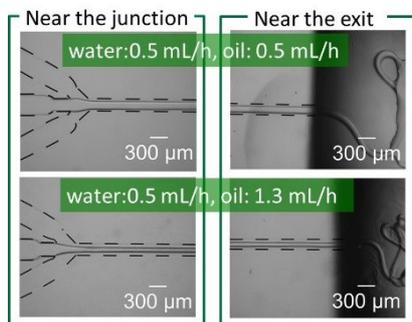


図6 .ファイバー形成の顕微鏡観察画像

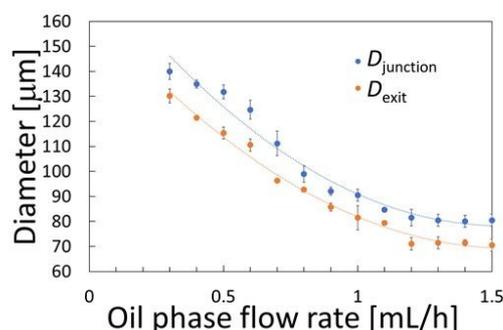


図7 .流量条件によるファイバー径の制御

次に、液滴化とゲル化を独立して行う二つの十字型流路構造からなるデバイスを開発した(図8)。一つ目の十字型流路構造で、アルギン酸ナトリウムを含む水相とカルシウム塩を含まない油相を接触させ、せん断により液滴化し油中水滴 (water-in-oil droplets; W/O 液滴) を形成させ、二つ目の十字型流路構造で、W/O 液滴とカルシウム塩を含む油相を接触させ、W/O 液滴をゲル化するというコンセプトである。作製したデバイスでハイドロゲル粒子の形成を試みたところ、一つ目の十字型流路構造で形成された W/O 液滴を、形態を保ったままゲル化し、ハイドロゲル粒子を得ることができた(図9)。従来の水相中でゲル化する手法では精密な流量制御が必要であったが、本デバイスは前述のファイバー系と同様に流量条件により容易に粒子の形態を制御することができた。また、従来手法では困難な、非球形のハイドロゲル粒子を得ることができ、2 か月以上安定に保持できることもわかった。さらに、アルギン酸のカルボン酸へ機能性分子を共有結合的に導入することで、粒子を機能化することもできた。得られたゲル粒子はアニオン性のカルボキシ基を多く含有する高分子からなっており、(1)の手法と組み合わせることで、非球形の GL を形成できると考えられる。

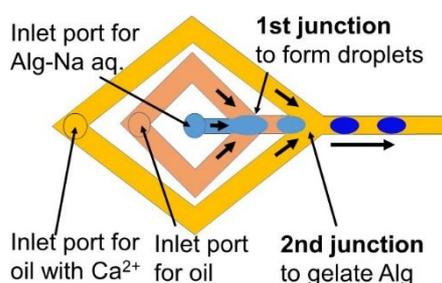


図8 .液滴化とゲル化を独立して行うための二つの十字型流路構造からなるデバイス



図9 .得られた非球形ハイドロゲル粒子の顕微鏡観察画像

(3) まとめ

本研究により、高い安定性を有するハイドロゲルをコアとした GL を形成する手法、および非球形のハイドロゲル粒子を形成する手法を確立でき、GL の形態をハイドロゲルで制御するための重要な知見が得られた。本研究の手法を用いることで、高い安定性を有し、様々な形態の GL を形成することができると考えられ、GL の更なる応用につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 佐伯大輔	4. 巻 46 (4)
2. 論文標題 高分子固体表面への支持脂質二分子膜形成と応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹田穂波, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 マイクロ流路を用いたアルギン酸ハイドロゲルファイバーの作製
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会(東京大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間一行, 池島真太郎, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 ハイドロゲルを内水相とした油水界面を利用したジャイアントベシクルの調製
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会(東京大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田穂波, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 油水界面を利用したアルギン酸ゲルマイクロファイバーの形成における流量条件の影響
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間一行, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 油水界面通過法を用いたハイドロゲル支持ベシクルにおける物質内包化の検討
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐伯大輔
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた天然高分子ハイドロゲルファイバーの形成
3. 学会等名 ファーマラボEXPOアカデミックフォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成瀬惇喜, 竹田穂波, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 マイクロ流路を用いたアルギン酸ハイドロゲル粒子の作製
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯大輔
2. 発表標題 高分子固体表面への支持脂質二分子膜形成と応用
3. 学会等名 日本膜学会第43年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯大輔
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた天然高分子ハイドロゲル材料の精密加工
3. 学会等名 JST新技術説明会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹田穂波, 佐伯大輔, 奥村幸久
2. 発表標題 マイクロ流路内の油水界面を利用した二成分アルギン酸ゲルファイバーの形成
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Honami Takeda, Daisuke Saeki, Yukihiisa Okumura
2. 発表標題 Preparation of calcium alginate hydrogel fiber using water/oil interface in microfluidic devices
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 ハイドロゲルファイバー製造装置およびハイドロゲルファイバー製造方法	発明者 佐伯大輔、竹田穂波、奥村幸久	権利者 国立大学法人信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-022329	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ハイドロゲル成形体の製造装置、ハイドロゲル成形体の製造システム、およびハイドロゲル成形体の製造方法	発明者 佐伯大輔、竹田穂波、成瀬惇喜、奥村幸久	権利者 国立大学法人信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-020815	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 リボソームおよびその製造方法	発明者 佐伯大輔、本間一行、池島真太郎、奥村幸久	権利者 国立大学法人信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-129677	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem004/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	奥村 幸久 (Okumura Yukihiisa) (40243042)	信州大学・学術研究院工学系・教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------