

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23107004

研究課題名（和文）細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析

研究課題名（英文）Development of intracellularly-acting supermolecules for regulating cellular functions

研究代表者

由井 伸彦（Yui, Nobuhiko）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：70182665

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 74,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、分子科学に基づいたナノメディシンの実現を目指し、細胞内の生命反応を応答駆動力として細胞内反応を調節する超分子を設計した。基本分子骨格として、線状高分子であるポリエチレングリコール（PEG）に環状分子であるシクロデキストリン（CD）が貫通した骨格のポリロタキサン（PRX）を使用した。PRXは末端の切断による分解応答特性を示すため、分解応答型PRXを基盤材料として、ポリロタキサン分子骨格と生体分子との相互作用、核酸やタンパク質等の細胞内導入と生理活性の発現におけるPRX分子構造の影響、ならびに細胞内分解特性の効果について検討した。

研究成果の概要（英文）：For regulating cellular functions, we have studied supramolecular polyrotaxanes as novel biomaterials. One of the characteristics seen in polyrotaxanes is the mobility of cyclic compounds, and they can be freely rotational and sliding if any intermolecular forces with the linear chain and the neighboring cyclic compound are eliminated. In particular, polyrotaxanes consisting of -CD molecules and a poly(ethylene glycol) (PEG) chain are feasible in the structural components as biomaterials.

研究分野：バイオマテリアル科学

キーワード：ポリロタキサン シクロデキストリン siRNA 酵素 成長因子

1. 研究開始当初の背景

細胞代謝反応(細胞形質膜や膜直下の受容体群、リソソーム内酵素、ミトコンドリア電子伝達系酵素、骨格系タンパク質の再配列を制御する細胞質内酵素、核内での遺伝子転写や粗面小胞体でのタンパク質産生)などの、空間的に異なる極微細領域ごとに同時多発あるいは連携進行する分子反応をリアルタイムで追跡しつつ、細胞内反応を任意に調節することは、ナノメディシン分子科学を確立する上で必要不可欠である。本研究では、こうした目的設定のもと、細胞小器官内酵素反応や局所水素イオン濃度の変化を駆動力に構造変化を示す化合物を用いて、生体分子反応を解析、および反応を制御することで疾患治療が可能なナノメディシンを設計していく。

2. 研究の目的

本研究では、分子科学に基づいたナノメディシンの実現を目指し、細胞内の生命反応を応答駆動力とする超分子を設計し、細胞内反応を調節する。基本分子骨格として、線状高分子であるポリエチレングリコール(PEG)に環状分子であるシクロデキストリン(CD)が貫通し、両末端にストッパー分子を結合したポリロタキサン(PRX)骨格を使用する。ポリロタキサンは線状高分子の軸に沿ったCDの運動性や、末端の切断による分解応答特性を示す。すなわち、ポリロタキサンはCD貫通率に応じて運動性、主鎖の剛直性が変化する分子であることから、超分子骨格構造に応じて生体分子や細胞との特異的な相互作用を示すと考えられる。そこで、分解応答型PRXを基盤材料として細胞内反応の調節を目指して、ポリロタキサン分子骨格と生体分子との相互作用に関する検討を行なった。さらに、核酸やタンパク質等を利用した疾患治療のプラットフォームとしてPRXを応用する

ために、生体分子と細胞内導入と生理活性の発現におけるPRX分子構造の影響、ならびに細胞内分解特性の効果について検討した。

3. 研究の方法

(1) ポリロタキサン骨格構造が細胞取り込みに及ぼす影響

ポリロタキサンはCD部位の運動性により多価相互作用を亢進されることを見出しているが、一方でCDの貫通量に従いポリロタキサン分子の剛直性が変化する。このような特性を鑑みると、PRXは超分子骨格構造に応じて細胞との相互作用、細胞への取り込みにおいて特異的な作用を示すと考えられる。そこでCD貫通数5, 34, 63のPRXに対し、ジメチルアミノ(DMA)基と蛍光分子を修飾し細胞への取り込みを評価した。

(2) siRNA デリバリーにおけるポリロタキサン骨格構造の影響

生体分子としてsiRNAを選択し、ジメチルアミノエチル基修飾PRX(DMAE-PRX)との静電複合形成を評価した。軸高分子の分子量、CD貫通数、DMAE基修飾数の異なるDMAE-PRXを調製し、siRNAと混合し静電複合体の形成、ならびに安定性について評価した。また、HeLa細胞に対する細胞内取り込み量を蛍光標識siRNAにより評価するとともに、遺伝子発現抑制効果をルシフェラーゼアッセイにて評価した。

(3) 分解応答性ポリロタキサンを用いたタンパク質の細胞内導入と活性発現

生体分子をより複雑な構造であるタンパク質へと置き換えて、カチオン性PRXとの複合体形成、ならびに細胞内での活性発現について評価した。酵素として β -ガラクトシダーゼ(β -gal)を選択した。細胞内環境に反応したPRXの分解が細胞内での生体分子の活性発現に与える影響を明らかにするために、細胞内還元物質により切断される

ジスルフィド結合を軸高分子末端に導入した DMAE-SS-PRX を調製し、 β -gal との静電複合体評価と細胞内デリバリーを検討した。

(4) アニオン性ポリロタキサンを用いたタンパク質との複合体形成と活性発現

Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) は強力に骨の再生を促すことが知られており、再生医療において広く注目されている。しかし、BMP-2 は不安定なタンパク質であり、多量の BMP-2 投与が必要となる。しかし、多量投与による炎症、異常骨形成、癌化等の報告がある。BMP-2 の投与量、投与頻度低減のためのアプローチとして、BMP-2 の活性を亢進するヘパリン等の添加剤の利用が検討されている。ヘパリンの代替材料として PRX の利用を検討した。PRX の α -CD 部にヘパリンと同様の化学構造である硫酸基を導入した硫酸化 PRX を設計し、BMP-2 との静電複合体の形成、血液抗凝固作用、*in vitro* での骨分化、ならびにマウス頭蓋骨欠損モデルに対する骨再生能を評価した。ICR マウス (5 週齢) の頭蓋骨に 3.5 mm 径の骨欠損を作成し、コラーゲンスポンジに BMP-2 (10 ng/mice) を担持させ欠損部に埋入した。骨の形成は、一週間毎に X 線マイクロ CT 測定を行い骨形成の時間変化を評価した。

(5) 分解性ポリロタキサンを用いた代謝疾患治療

ニーマンピック病 C 型 (NPC 病) は、エンドソーム膜上のタンパク質 NPC1 の変異により、リソソーム内にコレステロールや脂質の異常蓄積が起こる疾患である。本研究では、PRX を用いた NPC 病治療を考案した。末端に細胞内分解性結合を有する PRX は、細胞内特異的に CD を放出することでコレステロール除去が可能になると考えられる。このような PRX による NPC 病治療のコンセプトを実証するための第一段階として、本研究では NPC 病患者由来細胞

に対する細胞内分解性 PRX のコレステロール除去作用について HP- β -CD と比較検討した。

4. 研究成果

(1) ポリロタキサン骨格構造が細胞取り込みに及ぼす影響

CD 貫通数 5, 34, 63 の DMA-PRX に対し、蛍光分子を修飾し細胞への取り込みを評価した。その結果、CD 貫通数の増加に伴い細胞への取り込み量が増加する傾向が認められた。特に、CD 貫通数 63、DMA 修飾数 58 の PRX (58N-63-CD-PRX) は、同等のアミノ基数のメタクリレートポリマーや DMA 修飾多糖 (プルラン) よりも飛躍的に高いものであった。また、4 $^{\circ}$ C で細胞と接触させた結果、58N-63-CD-PRX と接触した細胞のみ細胞膜に PRX が局在する様子が観察された。詳細なメカニズムに関しては現在解明中であるが、ポリロタキサン骨格の剛直性、あるいは動的な多価相互作用が細胞膜との相互作用を亢進し得ることが示唆された。

(2) siRNA デリバリーにおけるポリロタキサン骨格構造の影響

生体分子として siRNA を選択し、ジメチルアミノエチル基修飾 PRX (DMAE-PRX) との静電複合形成を評価した。結果、CD 貫通数が多く剛直な骨格の PRX ほど低混合比で複合体を形成することが明らかとなった。一方、PRX/siRNA 複合体に対してヘパリンを添加した際のポリアニオン交換反応に対する複合体の安定性を調べた結果、CD 貫通数 31 の PRX と比較して、CD 貫通数 52 の PRX は最大で 10 倍高い濃度のヘパリンを添加することではじめて複合体からの siRNA の放出が観察された。以上より、PRX の骨格構造 (CD 貫通数) が siRNA との静電複合体形成能と安定化に寄与していることが明らかとなった。また、細胞内へ

DMAE-PRX/siRNA 複合体の導入を行なった結果、既存の導入試薬である ExGen や Lipofectamine より有意に高い細胞内 siRNA 導入量を示し、特に CD 貫通数 52 の PRX においては約 30 倍高い取り込みを示した。このような PRX による細胞内 siRNA 導入における有意性は、PRX 上のアミノ基の修飾数や複合体のゼータ電位といった細胞との静電相互作用に関する因子よりも、交換反応に対する安定性との間に相関関係が見出された。以上より、siRNA の細胞内導入において超分子骨格が強く影響することが明らかとなった。

(3) 分解応答性ポリロタキサンを用いたタンパク質の細胞内導入と活性発現

DMAE-SS-PRX β -gal 複合体は、HeLa 細胞に対し市販のタンパク質導入試薬 (Xfect) より高い細胞内導入効率を示した。蛍光性基質である TokyoGreen- β -gal を用いて、細胞内酵素活性を蛍光イメージングにより評価した。その結果、DMAE-SS-PRX/ β -gal 複合体は強い蛍光を示し、細胞内で高い酵素活性を示す事が明らかとなった。これは細胞内での効果的リリースにより、酵素活性の発現に結実した結果であると考えられる。よって分解応答型ポリロタキサンによる生体分子の細胞内デリバリーは核酸に限定されることなく、複雑な構造のタンパク質の細胞内導入と細胞内での活性発現を誘導することにおいても有効であることが明らかとなった。

(4) アニオン性ポリロタキサンを用いたタンパク質との複合体形成と活性発現

硫酸化 PRX と BMP-2 は数百 nm の静電複合体を形成することを透過型電子顕微鏡観察より明らかとした。また、本複合体は MC3T3-E1 細胞に対し、BMP-2 単独と比較して骨分化誘導、石灰化の促進作用を示すことを確認した。BMP-2/硫酸化 PRX 複合体による骨分化促進作用が実際に in vivo

での骨再生に対しても有効化明らかとするため、マウス頭蓋骨欠損モデルにおける骨再生の評価を行った。BMP-2 移植群では移植三週後よりわずかな骨形成が確認された。BMP-2/硫酸化 PRX 移植群では、出血の問題もなく生存率も 100%であり、in vitro で得られた血液抗凝固作用は示さないことが in vivo でも確認された。BMP-2/硫酸化 PRX 移植群では移植二週後より欠損部位全面におよぶ顕著な骨再生が確認された。すなわち、硫酸化 PRX の添加により骨再生までの時間を短縮するとともに、骨形成の範囲も拡大することが明らかとなった。本結果より、硫酸化 PRX と BMP-2 の複合体は成長因子の活性を in vivo でも亢進し、効率的な骨再生を誘導することが示唆された。

(5) 分解性ポリロタキサンを用いた代謝疾患治療

細胞内分解性 PRX として末端にジスルフィド結合を有するプルロニック P123 と β -CD からなる PRX を調製し、PRX 上の β -CD 部位にヒドロキシエチル (HE) 基を導入することで水溶性かつ細胞内分解性を有する HE-SS-PRX を設計した (β -CD 貫通数 : 12.9、HE 基修飾数 : 52)。

NPC1 細胞におけるコレステロール蓄積改善効果を、細胞内コレステロール蓄積量の定量より評価した。コレステロール蓄積量に対する用量反応曲線より求めた HP- β -CD の半数効果濃度は 2.6 mM であったのに対し、HE-SS-PRX の半数効果濃度は HP- β -CD の約 1/100 である 0.024 mM であった。よって、細胞内特異的な PRX の分解と β -CD の放出がコレステロール蓄積改善に非常に有効であることから、NPC 病治療への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 21件)

M. Terauchi, T. Inada, A. Tonegawa, A. Tamura, S. Yamaguchi, K. Harada, N. Yui、

Supramolecular inclusion complexation of simvastatin with methylated α -cyclodextrins for promoting osteogenic differentiation, *Int. J. Biol. Macromol.*, 査読有、2016、in press、DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.114

田村篤志、由井伸彦、細胞内分解性ポリロタキサンによるニーマンピック病C型治療
化学工業、査読無、66、2015、925-932

田村篤志、人工材料(有機)、人工臓器、
査読無、44、2015、169-172、DOI: 10.11392/jsao.44.169

A. Tamura, G. Ikeda, K. Nishida, N. Yui. Cationic polyrotaxanes as a feasible framework for the intracellular delivery and sustainable activity of anionic enzymes: a comparison study with methacrylate-based polycations, *Macromol. Biosci.*, 査読有、15、2015、1134-1145、DOI: 10.1002/mabi.201500083

M. Terauchi, G. Ikeda, K. Nishida, A. Tamura, S. Yamaguchi, K. Harada, N. Yui. Supramolecular polyelectrolyte complexes of bone morphogenetic protein-2 with sulfonated polyrotaxanes to induce enhanced osteogenic differentiation, *Macromol. Biosci.*, 査読有、15、2015、953-964 DOI: 10.1002/mabi.201500032

S. Yamada, Y. Sanada, A. Tamura, N. Yui, K. Sakurai. Chain architecture and flexibility of α -cyclodextrin/PEG polyrotaxanes in dilute solutions, *Polym. J.*, 査読有、47、2015、464-467、DOI: 10.1038/pj.2015.18

K. Nishida, A. Tamura, N. Yui. Acid-labile polyrotaxane exerting endolysosomal pH-sensitive supramolecular dissociation for therapeutic applications, *Polym. Chem.*, 査読有、6、2015、4040-4047、DOI: 10.1039/C5PY00445D

A. Tamura, N. Yui. α -Cyclodextrin-threaded biocleavable polyrotaxanes ameliorate impaired autophagic flux in Niemann-Pick type C disease, *J. Biol. Chem.*, 査読有、290、2015、9442-9454、DOI: 10.1074/jbc.M115.636803

A. Tamura, I. Fukumoto, N. Yui, M. Matsumura, H. Miura. Increasing the repeating units of ethylene glycol-based dimethacrylates directed towards reduced oxidative stress and co-stimulatory factors expression in human monocytic cells, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 査読有、103、2015、1060-1066、DOI: 10.1002/jbm.a.35251

A. Tamura, N. Yui. Threaded macromolecules as a versatile framework for biomaterials, *Chem. Commun.*, 査読有、50、2014、13433-13446、DOI:

10.1039/C4CC03709J

A. Tamura, H. Tanaka, N. Yui. Supramolecular flower micelle formation of polyrotaxane-containing triblock copolymers prepared from macro-chain transfer agent bearing molecular hooks, *Polym. Chem.*, 査読有、5、2014、4511-420 DOI: 10.1039/C4PY00379A

A. Tamura, M. Tokunaga, Y. Iwasaki, N. Yui. Spontaneous assembly into pseudopolyrotaxane between cyclodextrins and biodegradable polyphosphoester ionomers, *Macromol. Chem. Phys.*, 査読有、215、2014、648-653、DOI: 10.1002/macp.201300774

N. Yokoyama, J.-H. Seo, A. Tamura, Y. Sasaki, N. Yui. Tailoring the supramolecular structure of aminated polyrotaxanes toward enhanced cellular internalization, *Macromol. Biosci.*, 査読有、14、2014、359-368、DOI: 10.1002/mabi.201300198

A. Tamura, N. Yui. Lysosomal-specific cholesterol reduction by biocleavable polyrotaxanes for ameliorating Niemann-Pick type C disease, *Sci. Rep.*, 査読有、4、2014、4356、DOI: 10.1038/srep04356

田村篤志、細胞内リリース効率改善による生理活性向上を企図した分解性超分子-生体高分子複合体の設計、バイオマテリアル-生体材料-、査読無、32、2014、33-34

I. Fukumoto, A. Tamura, M. Matsumura, H. Miura, N. Yui. Sensitization potential of dental resins: 2-hydroxyethyl methacrylate and its water-soluble oligomers have immunostimulatory effects, *PLoS One*, 査読有、8、2013、e82540、DOI: 10.1371/journal.pone.0082540

A. Tamura, G. Ikeda, J.-H. Seo, K. Tsuchiya, H. Yajima, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, N. Yui. Molecular logistics using cytocleavable polyrotaxanes for the reactivation of enzymes delivered in living cells, *Sci. Rep.*, 査読有、3、2013、2252、DOI: 10.1038/srep02252

A. Tamura, N. Yui. A supramolecular endosomal escape approach for enhancing gene silencing of siRNA using acid-degradable cationic polyrotaxanes, *J. Mater. Chem. B*, 査読有、1、2013、3535-3544、DOI: 10.1039/C3TB20514B

A. Tamura, N. Yui. Cellular internalization and gene silencing of siRNA polyplexes by cytocleavable cationic polyrotaxanes with tailored rigid backbones, *Biomaterials*, 査読有、34、2013、2480-2491、DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.006

Y. Yamada, T. Nomura, H. Harashima, A. Yamashita, N. Yui. Post-nuclear gene

delivery events for transgene expression by biocleavable polyrotaxanes、Biomaterials、査読有、33、2012、3952-3958、DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.049
②Y. Yamada, M. Hashida, T. Nomura, H. Harashima, Y. Yamasaki, K. Kataoka, A. Yamashita, R. Katoono, N. Yui、Different mechanisms for nanoparticle formation between pDNA and siRNA using polyrotaxane as the polycation、ChemPhysChem、査読有、13、2012、1161-1165、DOI: 10.1002/cphc.201100800

〔学会発表〕(計 6 2 件)

N. Yui、A. Tamura、Therapeutic approach to lysosomal storage disorders based on acid-labile polyrotaxanes. 3rd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, Tokyo, Japan, Nov. 2015.

N. Yui、Designing cytoleavable polyrotaxanes as a vehicle for molecular logistics of biomacromolecular delivery into target cells. The 6th Forum on New Materials, Italy, June, 2014

N. Yui、Supramolecular biomaterials exploit new paradigm of modulating cellular functions. 2014 Annual Meeting of the Korean Society for Biomaterials, Korea, Nov, 2014.

〔図書〕(計 3 件)

田村篤志、由井伸彦、細胞内分解性ポリロタキサンを用いた薬物送達と超分子医薬への応用、DDS キャリア作成プロトコル集、丸山一雄監修、シーエムシー出版、2015、80-88

由井伸彦、「ポリロタキサン」の超分子構造による薬物キャリア、未来医療を支える先端バイオマテリアル、石原一彦、秋吉一成、山岡哲二編、エヌティーエス、2012、391-394

N. Yui、Emerging biomedical functions through “mobile” polyrotaxanes、Supramolecular Polymer Chemistry、A. Harada eds., Wiley-VCH (Weinheim) 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 4 件)

名称：骨形成因子安定保持剤、骨形成因子活性化剤、骨形成因子の安定保持方法、骨形成因子の活性化方法、医薬組成物m複合体の使用、及び骨の再生方法

発明者：Masahiko Terauchi, Go Ikeda, Atsushi Tamura, Satoshi Yamaguchi, Kiyoshi Harada, Nobuhiko Yui

権利者：National University Corporation Tokyo Medical and Dental University

種類：特許

番号：PCT/JP2015/080945

出願年月日：2015年11月2日

国内外の別：国外

名称：骨形成因子安定保持剤、骨形成因子活性化剤、骨形成因子の安定保持方法、及び骨形成因子の活性化方法

発明者：寺内正彦、池田剛、田村篤志、山口聰、原田清、由井伸彦

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特許願 2014-224265

出願年月日：2014年11月4日

国内外の別：国内

名称：ポリロタキサン、及び医薬組成物

発明者：Atsushi Tamura, Nobuhiko Yui

権利者：National University Corporation Tokyo Medical and Dental University

種類：特許

番号：PCT/JP2014/071553

出願年月日：2014年8月18日

国内外の別：国外

名称：ポリロタキサン、及びライソゾーム病に対する医薬組成物

発明者：田村篤志、由井伸彦

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特許願 2013-172994

出願年月日：2013年8月23日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/org/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

由井 伸彦 (YUI, Nobuhiko)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：70182665

(2) 研究分担者

金野 智浩 (KONNO, Tomohiro)

東京大学・工学系研究科・准教授

研究者番号：80371706

徐 知勳 (SEO, Ji-Hun)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：20611544

田村 篤志 (TAMURA, Atsushi)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：80631150