

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14940

研究課題名(和文)非天然アミノ酸を利用した新規細胞膜表面修飾法の開発とDDSへの応用

研究課題名(英文)Cell surface modification using non-natural amino acid and its application to drug delivery system

研究代表者

橋田 充 (Hashida, Mitsuru)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：20135594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、細胞膜表面にPEG脂質を介してタンパク質リガンドを導入し、標的細胞との接着を向上させる方法の開発である。リガンドのモデルとしてmCherryに対する低分子抗体VHHを用いた。VHHと抗原の結合に影響を与える可能性が低い箇所に非天然アミノ酸によりアジド基を導入し、PEG脂質をVHHの特定の箇所と結合させた。まず、DBCO-PEG-DSPEを細胞の表面に修飾し、Az-VHHを添加することで細胞膜にVHHを導入できた。細胞膜に導入されたVHHは抗原特異的な結合能を保持しており、VHH修飾細胞は抗原をコーティングされたディッシュに対し抗原特異的に接着が向上した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to enhance the cell-cell adhesion by introducing the protein ligand via PEG-lipid to cells. Variable domain of heavy chain of heavy chain antibody (VHH) against mCherry was used as a model protein ligand. Azide group was introduced into VHH at the selected position as the connection of PEG-lipid through azide group does not disturb antigen binding. VHHs were modified on the cell surface by adding Az-VHH after cells were coated with DBCO-PEG-DSPE. VHH modified on the cell surface could specifically bind with antigen. Adhesion to antigen-coated plate was enhanced by VHH-modification to cells.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：細胞膜修飾 非天然アミノ酸 VHH 細胞接着 細胞製剤

## 1. 研究開始当初の背景

細胞を使った再生医療においては、自己増殖能と多分化能を有する幹細胞が用いられ、ES 細胞や iPS 細胞、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells; MSCs) が強力な候補である。治療の観点から見ると、間葉系幹細胞は、骨髄や脂肪組織から分離・精製して細胞を得ることができ、自家移植だけでなく、同種異系移植で他人由来の細胞を移植しても免疫拒絶を受けにくいことが報告されているため、倫理的な問題もなく、幹細胞を使った細胞の製剤化が最も進んでいる。2012 年 5 月に世界初の間葉系幹細胞製剤 Prochymal<sup>®</sup> (一般名 remestemcel-L) がカナダで販売承認を受け、日本でも 2015 年 9 月 18 日に、JCR ファーマ株式会社が、Osiris 社より技術導入を受けて、急性 GvHD に対する治療薬「テムセル<sup>®</sup>HS 注」として製造販売承認を取得した。

申請者は、これまで医薬品の治療効果を最大限に引き出すために、薬物を治療の標的部位へ送達し、必要な時間、必要な量を作用させる Drug Delivery System の開発に携わってきた。特に、標的組織に選択的に薬物をデリバリーすることを目的に、リガンドを修飾することで標的指向性を付与したりポソームをはじめとした数多くのキャリアを開発してきた。その中で、細胞を投与・移植して治療を行う細胞治療においても、投与・移植された細胞がどこで、いつ、どの様に機能を発揮するかが、治療効果を決定する重要な要素であり、それを制御する方法の開発が必要であると考えた。治療標的となる細胞と細胞製剤の選択的な接着を向上するには、細胞製剤の細胞膜上に標的となる細胞に特異的に認識されるリガンドを発現または修飾する方法が有効である。それを実現する方法には、遺伝子導入、細胞膜タンパク質の化学修飾も有り得るが、本研究では、短時間で簡単にリガンドを導入できる方法として PEG 脂質を介して細胞膜にリガンドを導入する方法を選択した。

## 2. 研究の目的

本研究では、PEG 脂質を介して細胞膜表面にリガンドを導入し、標的となる細胞との接着を向上させる方法を開発する。リガンドにはペプチドまたは VHH を用いた。VHH を PEG 脂質と結合させる場合は、VHH と抗原の結合に影響を与える可能性が低い箇所に非天然アミノ酸によりアジド基を導入することで、PEG 脂質が VHH の特定の箇所に結

合するように設計した。

## 3. 研究の方法

### (1) DBCO-PEG-DSPE の合成

鎖長の異なる Fmoc-PEG-COOH と DSPE をクロロホルム中で反応させ、piperidine で脱保護し、クロロホルムまたは水中で透析し、DSPE-PEG-NH<sub>2</sub> を得た。DSPE-PEG-NH<sub>2</sub> と DBCO-NHS をアセトン中で混合し、カイザーテストにより未反応の NH<sub>2</sub> がなくなるまで反応させた。反応液を水に滴下し、上清を回収することで未反応の DBCO-NHS を除去した。各段階で得られた反応物は MALDI による分子量測定によって確認した。PEG 鎖長の分子量が 2000 の場合は日本油脂より購入した NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE を DBCO-NHS と THF 中で脱水縮合し、カイザーテストで未反応のアミノ基が無いことを確認した後、水中で未反応の DBCO-NHS を析出させ、得られた上清を精製水に対して再生セルロース製メンブレンで透析し、DBCO-PEG 脂質を得た。

### (2) DSPE-EG<sub>2</sub>-ペプチドの合成

NovaSyn Fmoc-Gly-TGT resin に Fmoc-N-amido-PEG<sub>2</sub>-acid および HOBt、DIPCI を加えて反応させ溶媒を除去、洗浄した後、20% ピペリジン DMF を加えて Fmoc を除去した。同様の方法で Fmoc 保護アミノ酸の反応と保護基の除去を繰り返した後、脱離液 (酢酸 : 2,2,2-Trifluoroethanol : Dichloromethane = 1:1:3) で切り出し、HPLC で精製して Boc 保護ペプチド EG<sub>2</sub> を得た。Boc 保護ペプチド EG<sub>2</sub>、DSPE、DIPCI をモル比 2:1:8 でクロロホルムに溶解し 50°C で一晩振盪し EG<sub>2</sub> 末端の COOH 基と DSPE 末端の NH<sub>2</sub> 基を反応させた。TFA で脱保護し、スペクトラポア MWCO1000 を用いて、メタノールで 1 日、水で 2 日透析し精製した。

### (3) Az-mKO2 または Az-VHH の発現および精製

mKO2 の Phe22 をアンバーコドンに置き換えた。また、VHH 及び GST の配列と両者の間に TEV プロテアーゼ認識配列を挿入し、さらに VHH とプロテアーゼ認識配列の間にアンバーコドンを導入した。これらの各発現ベクターと、アンバーコドンに対応する tRNA 及びこの tRNA に AzPhe を導入するアミノアシル tRNA 合成酵素を同時に発現するプラスミドベクター pCDF/pAzAz を同時に大腸菌 (BL21(DE3)) の形質転換を行い、OD600 = 0.6 になるまで培養後、IPTG を最終濃度 1 mM に

なるように加えさらに8時間培養した。菌体を回収し破碎後、遠心分離により可溶性画分を回収し、グルタチオンアガロースレジンを用いて精製した。mKO2は、His-tag精製により得た。Az-VHHは、GST-tagにより精製した後、Az-VHH-GSTをTEVプロテアーゼと24時間反応させ、再度レジンを用いて精製して得た。

#### (4) His tag 融合 mCherry または GST-tag 融合 mCherry の発現および精製

mCherry の配列を pColdII ベクターに組み込み、N 末端に His Tag を導入した大腸菌発現用ベクターを構築した。このベクターを用いて大腸菌の形質転換を行い、上と同様に IPTG を添加後さらに 48 時間培養した。菌体回収後可溶性画分を Ni アガロースレジンにより精製した。上記のベクターの His tag と mCherry の間に GST 配列を挿入した発現ベクターを作製した。このベクターを用いて大腸菌の形質転換を行い上と同様に IPTG を添加後さらに 48 時間培養した。菌体回収後可溶性画分を Ni アガロースレジンにより精製した。

#### (5) VHH の細胞表面修飾

株化ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を DBCO-PEG-DSPE 及び シクロデキストリン (CD) を含む 10%FBS 含有培地中で 30 分間転倒混和した後、DBCO-PEG-DSPE を含まない 10%FBS 含有培地中で 30 分間転倒混和した。さらに Az-VHH を含むスクロース含有 HEPES 緩衝液中で 1 時間転倒混和した。未修飾の DBCO-PEG-DSPE を除いた後、細胞表面上の DBCO の反応性の確認を目的に、アジド基を有するローダミングリン含有培地中で細胞を 1 時間転倒混和し、PBS で洗浄後フローサイトメーターにより蛍光強度を測定した。上記と同様の方法で hMSC に DBCO-PEG-DSPE を修飾した後、Az-VHH を含むスクロース含有 HEPES 緩衝液中で 1 時間転倒混和し、Az-VHH を DBCO-PEG-DSPE と結合させた。

#### (6) 抗原への細胞の接着評価

グルタチオンがコートされたプラスチックプレートに GST-mCherry 溶液を添加し一晩インキュベートすることにより GST-mCherry を固相化した。VHH を修飾した hMSC を GST-mCherry を固相化したプレートに添加し、30 分間培養後 PBS で洗浄し蛍光強度測定を行った。

## 4. 研究成果

まず PEG 鎖の鎖長の異なる PEG-DSPE を合成し、それらを表面に修飾した間葉系幹細胞 (MSC) とディッシュ上に播種された血管内皮細胞との接着を評価した。エチレングリコールの繰り返し数が 2-6 回程度では、細胞接着にほとんど影響がなかったが、PEG 鎖長が長い程、また修飾される分子数が多いほど、接着が阻害された。そこで ICAM1 と結合することが知られる LFA-1 の結合配列を有するペプチドをリガンドとして短鎖 PEG 脂質に結合させた peptide-PEG-DSPE を合成した。これを用いてペプチドを修飾した MSC を一定の流速で血管内皮細胞の上に流したところ、未修飾の MSC と比較して移動速度が遅くなった (Fig. 1)。本結果より、細胞に PEG 脂質を介してリガンドを修飾することで、標的細胞との接着を向上させることができる可能性が示された。

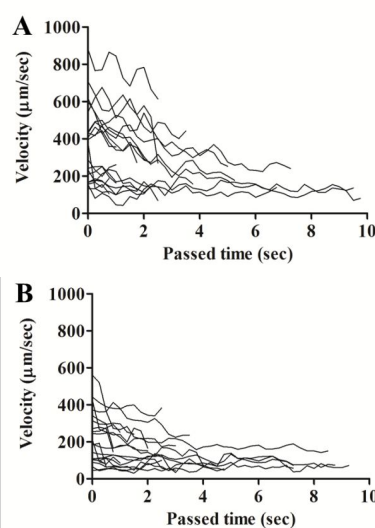
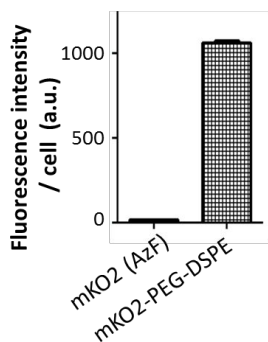


Fig. 1. Time profile of velocity of moving hMSCs on hLSME.

Moving velocity of unmodified hMSCs (A), modified hMSCs with 0.05 mM ITDGEA-EG2-DSPE, 5 mM  $\alpha$ CD and 5% DMSO (B) on hLSME monolayers on chamber (N=20).

より強固な結合を得るためには、ペプチドより多点で結合することが期待できるタンパク質、例えば抗体などをリガンドにすることが有効であると考えられる。ペプチドやタンパク質を PEG 脂質と結合させる時に、標的のタンパク質との結合を阻害しないように PEG 脂質と結合させる必要がある。ペプチドの場合は、アミノ酸の数が少ないためチオール基とマレイミドの結合などを利用して、PEG 脂質と結合する箇所を限定した設計が可能である。しかしながら、タンパク質はアミノ酸の数が多く、アミノ酸の官能基を利用して特定の箇所で PEG 脂質と結合させるこ

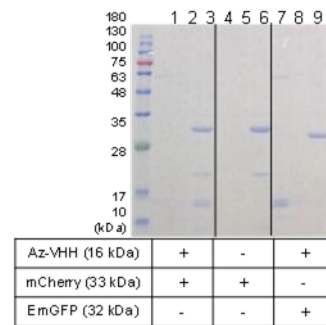
とは困難である。そこで、遺伝子工学的に非天然アミノ酸を導入する技術を利用して、アジド基を有するアミノ酸、アジドフェニアラニン (Az-F) をタンパク質の特定の箇所に挿入し、アジド基とアルキンのクリック反応により PEG 脂質とタンパク質を結合させることにした。タンパク質のモデルとして蛍光タンパク質 mKO2 に Az-F を導入し、質量分析法でアジド基が標的箇所に導入されていることを確認した。次に、PBS 中で DBCO-PEG-DSPE とクリック反応で結合させ mKO2-PEG-DSPE を得て、PEG 脂質を結合させても mKO2 の蛍光スペクトルに変化がないことを確認した。これを含む培地で細胞を培養し、蛍光顕微鏡で観察すると細胞膜表面に蛍光シグナルが観察され、その蛍光強度を FACS で測定すると mKO2 のみを添加した細胞に比べて mKO2-PEG-DSPE を添加した細胞の蛍光強度が有意に高かった (Fig. 2)。以上の結果より、遺伝子工学的にタンパク質を導入した Az を介してタンパク質を PEG 脂質と結合させる方法を確認し、さらにその結合体を用いて細胞の膜表面にタンパク質を修飾できることを確認した。



**Fig. 2. Surface modification of hMSCs with mKO2-PEG-DSPE**

Cells were incubated in DMEM containing 10% FBS, 2.5 mM  $\alpha$ -cyclodextrin and 3  $\mu$ M mKO2-PEG-DSPE or mKO2 (AzF) at 37°C under non-adherent condition for 2 h. After cells were washed by DMEM containing 10% FBS and PBS, fluorescence intensity was measured. Each result represents the mean  $\pm$  S.D.

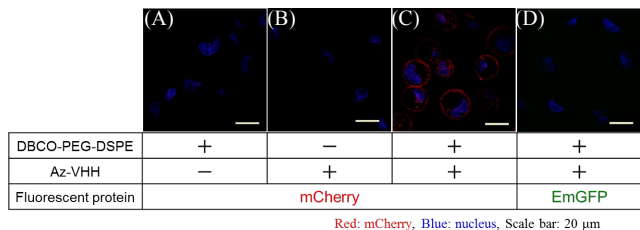
次に、mCherry に対する VHH をリガンドとして選択し、Az-F を導入して VHH (Az-VHH) を作製した。Az-VHH と FITC-phosphine を混合して電気泳動したところ、Az-VHH の分子量に相当する位置に蛍光のバンドが確認されたことから VHH への Az の導入が確認できた。さらに、mCherry または Em-GFP を結合させた resin に、Az-VHH を添加、溶出したところ、Az-VHH は mCherry に結合するが Em-GFP に結合しないことを確認した (Fig. 3)。



**Fig. 3. Evaluation of antigen binding ability of Az-VHH**

mCherry or EmGFP was bound to Ni agarose resin. After incubating mCherry-resin with (lane 1 - 3) or without (lane 4 - 6) Az-VHH, or incubating EmGFP-resin with Az-VHH (lane 7 - 9), mixture was eluted by 500 mM imidazole from resin. Flow through fraction (lane 1, 4, 7), wash fraction (lane 2, 5, 8) or eluted fraction (lane 3, 6, 9) of each mixture was analyzed by SDS gel electrophoresis.

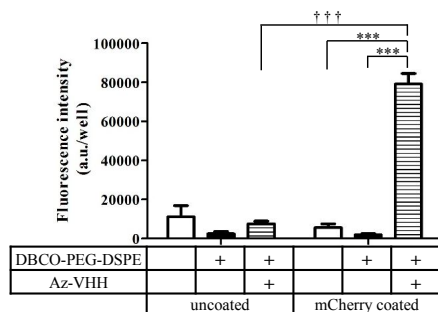
PBS 中で DBCO-PEG-DSPE と反応させ VHH-PEG-DSPE を得て、Hela 細胞に添加して培養した後、mCherry を添加したが、細胞膜に蛍光のシグナルがほとんど観察されなかった。そこで、Hela 細胞に DBCO-PEG-DSPE を添加した後、Az-VHH を添加し、さらに mCherry を添加すると細胞膜に蛍光のシグナルが観察できた。(Fig. 4B,C)。一方、GFP を添加しても GFP の蛍光シグナルは全く検出できなかった (Fig. 4D)。本結果より PEG 脂質を介して VHH を細胞膜表面に修飾できること、さらに修飾された VHH は抗原との特異的結合能を維持していることが確認できた。



**Fig. 4. Cell surface modification with Az-VHH**

After hMSCs were treated with either DBCO-PEG-DSPE (A) or Az-VHH (B), or both (C), cells were incubated in DMEM containing 30  $\mu$ M of mCherry for 30 min at 37°C. As a control, VHH-modified cells were incubated in DMEM containing EmGFP (D). After wash with PBS, cells were stained with Hoechst 33342 for 15 min at 37°C and fixed by 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, followed by observation by confocal microscopy. Blue, nucleus; red, mCherry; scale bars, 20  $\mu$ m.

mCherry を固定化したプレートを用意し、VHH 修飾された細胞または未修飾の細胞を添加したところ、接着した細胞数は VHH 修飾された細胞の方が約 8 倍高かった。さらに、VHH 修飾した細胞に mCherry をプレートメントするとその接着する細胞数が有意に減少した (Fig. 5)。



**Fig. 5. Adhesion of VHH-modified hMSCs to mCherry coated plates**

Microplates were immobilized with GST-mCherry (mCherry coated) or none (uncoated). hMSCs were treated with neither DBCO-PEG-DSPE nor Az-VHH (white bars), only DBCO-PEG-DSPE (black bars) or both (horizontal stripes bars). After nucleus were stained with Hoechst 33342, cells were incubated on each plate. After unbound cells were washed with PBS, nuclear fluorescence intensity was measured by plate reader. Each result represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Statistics: one-way ANOVA followed by Tukey's test, \*\*\*:  $p < 0.001$ , †††:  $p < 0.001$ ,  $n = 3$ .

以上、PEG 脂質を介して VHH を細胞膜表面に修飾することで VHH の抗原との接着を向上させることができた。本研究の結果は、PEG 脂質を介して低分子抗体を細胞膜への導入できることを示し、さらに低分子抗体による抗原認識による標的細胞との接着の向上させる可能性を示唆するものであり、細胞製剤の DDS 開発に繋がることが期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

樋口ゆり子、小田敬昌、山下富義、橋田 充、ペプチド PEG 脂質を用いて表面修飾された間葉系幹細胞と血管内皮細胞との接着における鎖長の影響、第 31 回日本 DDS 学会学術集会、2015 年 7 月 3 日、京王プラザホテル ( 東京都 )

杉田かおり、樋口ゆり子、山下富義、橋田 充、非天然アミノ酸を介して結合させたタンパク質-PEG 脂質誘導体による細胞膜表面修飾、第 9 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2015 年 11 月 7 - 8 日、千葉大学薬学研究院 亥鼻キャンパス ( 千葉県 )

樋口ゆり子、杉田かおり、山下富義、橋田 充、mKO2 の特定の位置で結合した mKO2-PEG-DSPE 結合体の合成と細胞膜表面修飾への応用、日本薬剤学会第 31 年会、2016 年 5 月 21 日、長良川国際会議場 岐阜都ホテル ( 岐阜県 )

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

橋田 充 ( HASHIDA MITSURU )  
 京都大学・薬学研究科・教授  
 研究者番号 : 2 0 1 3 5 5 9 4

### (2) 研究分担者

樋口 ゆり子 ( HIGUCHI YURIKO )  
 京都大学・薬学研究科・講師  
 研究者番号 : 4 0 4 0 2 7 9 7