

平成30年6月5日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12899

研究課題名(和文) 血糖降下ホルモン血中濃度を遠隔操作する四元亜鉛核酸複合体による糖尿病治療革新

研究課題名(英文) Remote Control of Insulin Concentration in blood by Zinc pDNA Quaternary Complexes for New Diabetes Therapy

研究代表者

朝山 章一郎 (Asayama, Shoichiro)

首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号：90315755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Zn²⁺配位型エチル化ポリビニルイミダゾール(PVIm-Et)によるZn²⁺の血清存在下での肝細胞内送達を試みると、肝癌細胞株(HepG2)へのZn²⁺の取り込み量を向上させた。さらに、Zn²⁺配位型PVIm-Etは、最も効果的にZn²⁺によるpDNAの遺伝子発現上方制御が示されたため、Zn²⁺配位型PVIm-Et核酸複合体を、HepG2細胞に取り込ませると、培養上清中のインスリン残量の向上が認められた。従って、HepG2細胞によるインスリンの分解抑制に成功した。以上より、肝臓におけるインスリンの分解を抑制することによりその血中濃度を高める革新的な治療法を確立するための有望なデータを得た。

研究成果の概要(英文)：From a chemical structure perspective, ethylated PVIm (PVIm-Et) chelated the most Zn²⁺ ions compared to methylated PVIm (PVIm-Me) and butylated PVIm (PVIm-Bu). The resulting Zn²⁺-chelated PVIm-Et formed more stable complexes with plasmid DNA (pDNA) complex than non-chelated PVIm-Et. The Zn²⁺-chelated PVIm-Et delivered the highest amount of Zn²⁺ ions inside the cell, corresponding to the highest gene transfection, resulting in the remains of insulin in the conditioned medium. Therefore, the pDNA complex with Zn²⁺-chelated PVIm-Et has succeeded in the suppression of the insulin degradation by human hepatoma HepG2 cells. These results are expected to establish the new concept of the remote control of insulin concentration in blood for new diabetes therapy.

研究分野：生体材料学

キーワード：薬物送達システム 亜鉛イオン 核酸 糖尿病治療

1. 研究開始当初の背景

生体内において、唯一の血糖降下作用を示すホルモンであるインスリンは、膵臓から分泌される。近年、膵臓のβ細胞のインスリン顆粒膜上に局在する亜鉛トランスポーターをコードする遺伝子が、糖尿病の疾患感受性遺伝子の一つであると同定された。さらに、「亜鉛は膵臓から分泌されたインスリンの肝臓での分解を抑制する」という新たなメカニズムの存在が明らかとなった。

2. 研究の目的

申請者が、亜鉛と核酸である遺伝子を肝臓の実質細胞内へ共送達し、亜鉛による遺伝子発現の上方制御システムを構築してきたことを鑑み、「肝臓へ四元亜鉛核酸複合体を送達することにより、膵臓の分泌するインスリンの血中濃度を、肝臓への投薬により上昇させる」ことに挑戦する。すなわち、インスリンを補充しその血中濃度を高める常識的な治療法を覆し、肝臓におけるインスリンの分解を抑制することにより、その血中濃度を高める革新的な糖尿病治療法を提案する。

3. 研究の方法

(1) 亜鉛核酸複合体の構造最適化

①亜鉛配位型アルキル化ポリビニルイミダゾール (PVIIm-R-Zn) / プラスミド DNA (pDNA) 複合体の調製

各種アルキル鎖長を有するアルキル化ポリビニルイミダゾール (PVIIm-R) を合成し、酢酸亜鉛と混合後、透析により余剰の亜鉛イオン (Zn^{2+}) を取り除き、凍結乾燥により、亜鉛配位型アルキル化ポリビニルイミダゾール (PVIIm-R-Zn) を得た (図 1)。本研究では、PVIIm-R として、炭素数の異なるメチル (Me : $n = 0$)、エチル (Et : $n = 1$)、ブチル (Bu : $n = 3$) 化ポリビニルイミダゾールを合成した (PVIIm-Me, PVIIm-Et, PVIIm-Bu)。得られた PVIIm-R-Zn の粒子径およびゼータ電位を測定し、 Zn^{2+} 配位量は原子吸光分析により算出した。その後、PVIIm-R-Zn と pDNA を混合し、PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の形成は、アガロースゲル電気泳動後、粒子径およびゼータ電位を測定することにより確認した。

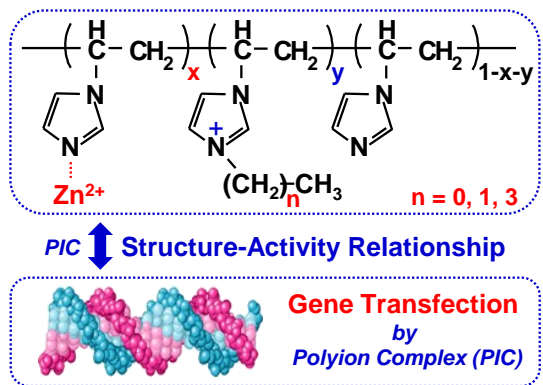


図 1 PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の調製

②PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の細胞毒性評価

得られた PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体をヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) へ添加し、アラマーブルー法により、細胞毒性を評価した。

(2) 亜鉛核酸複合体の肝細胞によるインスリンの分解抑制

①PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体によるヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) 内への Zn^{2+} および pDNA の取込量評価

PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体を HepG2 細胞へ添加し、細胞を溶解後、原子吸光分析により、細胞内 Zn^{2+} 量を定量した。また、pDNA の取込量は、ローダミンラベル化 pDNA を用いて、細胞溶解液の蛍光測定により算出した。

②PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体による HepG2 細胞に対する遺伝子発現評価

PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体を HepG2 細胞へ添加し、遺伝子発現をルシフェラーゼアッセイにより評価した。

③PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体による HepG2 細胞に対するインスリン分解抑制評価

PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体を HepG2 細胞へ添加し、培養上清中のインスリンの量を、インスリン抗体と用いたサンドイッチ型の ELISA により定量した。

4. 研究成果

(1) 亜鉛核酸複合体の構造最適化

①亜鉛配位型アルキル化ポリビニルイミダゾール (PVIIm-R-Zn) / プラスミド DNA (pDNA) 複合体の調製

各サンプルの粒子径およびゼータ電位測定の結果を表 1 に示す。PVIIm-Me および PVIIm-Et は、酢酸亜鉛と混合後、混合前は測定されなかった粒子径が、それぞれ約 53nm および約 75nm と確認された。また、ゼータ電位はそれぞれ約 +5.8mV および約 +6.2mV であった。一方、PVIIm-Bu を用いた場合は、粒子径およびゼータ電位は確認されなかった。粒子径の出現は、PVIIm-R のイミダゾール基に配位した Zn^{2+} による架橋度の違いによると考えられる。

表 1 PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の粒子径およびゼータ電位

	PVIIm-R-Zn		PVIIm-R-Zn/pDNA (+/- = 1)		PVIIm-R-Zn/pDNA (+/- = 2)	
	Particle Size / nm	ζ-Potential / mV	Particle Size / nm	ζ-Potential / mV	Particle Size / nm	ζ-Potential / mV
Me	53.2	+5.82	78.9	+4.86	156.4	+7.96
Et	74.7	+6.21	98.2	+5.01	164.2	+6.56
Bu	-	-	642.1	+8.94	667.7	+10.21

そこで、原子吸光分析により、PVIIm-R に配位した Zn^{2+} の量を定量すると、PVIIm-Me-Zn は 2.9mol%、PVIIm-Et-Zn は 3.7mol%、PVIIm-Bu-Zn は 1.8mol% であった。PVIIm-R のアルキル鎖長をブチル基まで長くすると、その立体障害な

どにより、 Zn^{2+} の配位量が低下し、架橋度が減少し、粒子径の測定が不可能になったと考えられる。

得られた PVIIm-R-Zn と pDNA を電荷比 (+/-) 1 および 2 で混合後、粒子径およびゼータ電位を測定すると、PVIIm-Me-Zn と PVIIm-Et-Zn はそれぞれ約 100nm および約 150nm の細胞取込に適した粒子径と正のゼータ電位が得られたのに対し、PVIIm-Bu-Zn の場合は約 650nm と大きな粒子径とより大きな正のゼータ電位が得られた。これらの結果は、Bu 基の疎水性による粒子の凝集を示唆している。

アガロースゲル電気泳動実験の結果を図 2 に示す。PVIIm-R (+/- = 2) および PVIIm-R-Zn (+/- = 1, 2) 共に、フリーな pDNA のバンドは認められなかったため、複合体の形成が確認された。この時、デキストラン硫酸 (DS) 存在下で実験を行うと、PVIIm-R/pDNA 複合体では、フリーな pDNA のバンドが現れたのに対し、PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体では、Bu (+/- = 1) の Bu 基は僅かに現れたが、フリーな pDNA のバンドは現れなかった。これらの結果から、PVIIm-Zn への Zn^{2+} の配位は、その pDNA 複合体の安定性も向上させると考えられる。

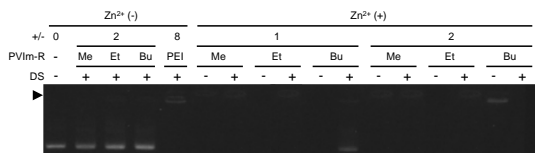


図 2 PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の調製

②PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の細胞毒性評価

PVIIm-R/pDNA 複合体および PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体を HepG2 へ添加した時の細胞生存率の結果を図 3 に示す。細胞生存率は、 Zn^{2+} の配位およびアルキル鎖長に依存せず、ほぼ 100% であった。従って、得られた PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体中の Zn^{2+} は、細胞毒性を示さない適度な含有量に制御し得たと考えられる。

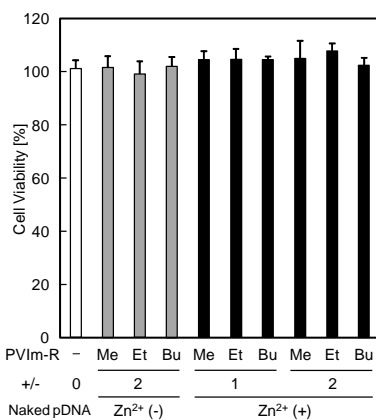


図 3 PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の HepG2 細胞生存率評価

(2) 亜鉛核酸複合体の肝細胞によるインス

リンの分解抑制

①PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体によるヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) 内への Zn^{2+} および pDNA の取込量評価

PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体を HepG2 へ添加した時の細胞内への Zn^{2+} の取込量の結果を図 4 に示す。電荷比 (+/-) が向上すると Zn^{2+} の取込量は向上した。特筆すべきは、 Zn^{2+} の取込量はアルキル鎖長に依存し、Et 基が最も多く、次いで Me 基であり、Bu 基はほとんど取込量が得られなかった。 Zn^{2+} の取込量の差は、PVIIm-R への Zn^{2+} の配位量に依存していた。すなわち、最も配位量の多い PVIIm-Et が細胞内へ最も多く Zn^{2+} を送達した。

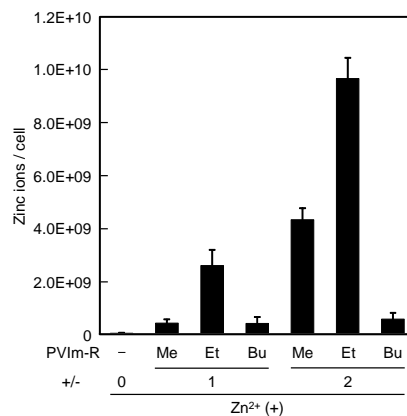


図 4 PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の HepG2 細胞内への Zn^{2+} の取込評価

一方、PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体を HepG2 へ添加した時の細胞内への pDNA の取込量の結果を図 5 に示す。pDNA の取込量は、 Zn^{2+} の配位の有無、および、アルキル鎖長にほとんど依存しなかった。

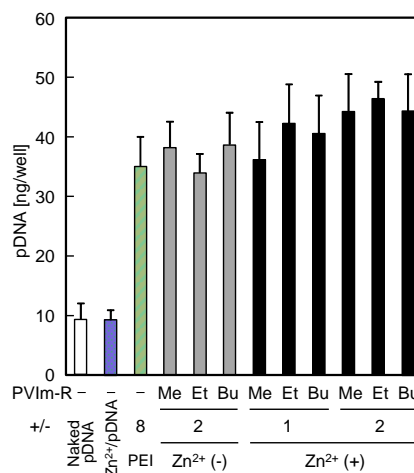


図 5 PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の HepG2 細胞内への pDNA の取込評価

②PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体による HepG2 細胞に対する遺伝子発現評価

PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体を HepG2 へ添加した

時の遺伝子発現評価の結果を図 6 に示す。電荷比 (+/-) 2 における PVIIm-R/pDNA 複合体の遺伝子発現量に対して、電荷比 1 においても、PVIIm-Me-Zn/pDNA 複合体、および、PVIIm-Et-Zn/pDNA 複合体の遺伝子発現量の方が高かった。これらの複合体は、電荷比 2 では、更に遺伝子発現が向上した。この時、PVIIm-Bu-Zn/pDNA 複合体は、遺伝子発現が得られなかった。

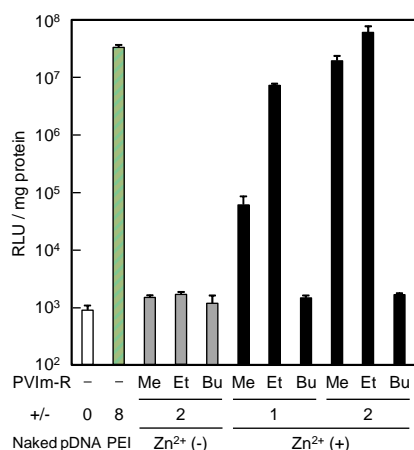


図 6 PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の HepG2 細胞内への pDNA の取込評価

一方、PVIIm-Et-Zn/pDNA 複合体の遺伝子発現量は、PVIIm-Me-Zn/pDNA 複合体の遺伝子発現量よりも高く、特に、電荷比 2 の PVIIm-Et-Zn/pDNA 複合体の遺伝子発現量は最も高く、ポジティブコントロールである電荷比 8 の分岐型ポリエチレンイミン (PEI) を上回った。

得られた遺伝子発現量は、細胞内に取り込まれた Zn²⁺ の量 (図 4) に依存しており、最も多く Zn²⁺ を取り込んだ細胞が、最も高い遺伝子発現を示した。すなわち、PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の遺伝子発現は、pDNA の取込量よりも Zn²⁺ の取込量に依存している。これらの結果より、PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の遺伝子発現は Zn²⁺ により情報制御されており、PVIIm-Et-Zn/pDNA 複合体が Zn²⁺ と pDNA の共送達に最適構造であることが明らかとなった。

③ PVIIm-R-Zn/pDA 複合体による HepG2 細胞に対するインスリン分解抑制評価

PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体を HepG2 へ添加した時の培養上清中のインスリンの残存量の結果を図 7 に示す。Zn²⁺ の配位していない PVIIm-R/pDNA 複合体のインスリン残存量が約 70% の実験条件下、特に、PVIIm-Et-Zn/pDNA 複合体を添加した系は、約 90% のインスリンが残存していた。つまり、PVIIm-Et-Zn/pDNA 複合体は、肝臓由来細胞によるインスリンの分解を抑制した。これらの結果は、PVIIm-Et-Zn/pDNA 複合体による肝臓への Zn²⁺ の送達が、肝臓でのインスリンの分解を抑制し、全身へ有効濃度のインスリンが循環することを示

唆している。

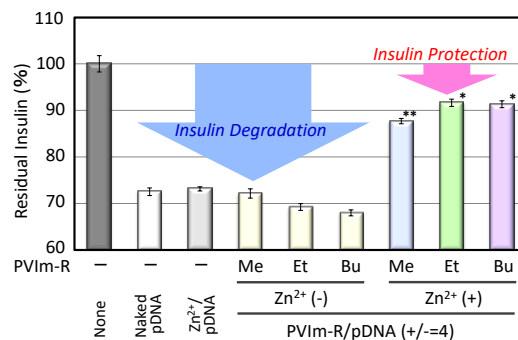


図 7 PVIIm-R-Zn/pDNA 複合体の HepG2 細胞によるインスリンの分解抑制評価

(3) 総括・展望

Zn²⁺ 配位型 PVIIm-Et と pDNA との複合体を、HepG2 細胞に取り込ませると、培養上清中のインスリン残量の向上が認められた。すなわち、HepG2 細胞によるインスリンの分解抑制に成功した。従って、インスリンを補充しその血中濃度を高める常識的な治療法を覆し、肝臓におけるインスリンの分解を抑制することにより、その血中濃度を高める革新的な糖尿病治療法を確立するための有望なデータを得た。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① S. Asayama, K. Nagashima, Y. Negishi, H. Kawakami, By-Product-Free Intact Modification of Insulin by Cholesterol End-Modified Poly(ethylene glycol) for In Vivo Protein Delivery, *Bioconjugate Chemistry*, 29, 67-73 (2018). (査読有)
DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00593
- ② S. Asayama, K. Nagashima, H. Kawakami, Facile Method of Protein PEGylation by a Mono-Ion Complex, *ACS Omega*, 2, 2382-2386 (2017). (査読有)
DOI: 10.1021/acsomega.7b00462
- ③ S. Asayama, M. Sakata, Y. H. Kawakami, Structure-Activity Relationship between Zn²⁺-Chelated Alkylated Poly(1-vinylimidazole) and Gene Transfection, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 173, 120-125 (2017). (査読有)
DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.05.007
- ④ M. Matsuhō, R. Kubota, S. Asayama, H. Kawakami, Lactoferrin-Modified Nanoparticles Loaded with Potent Antioxidant Mn-Porphyrins Exhibit Enhanced Antioxidative Activity in

Vitro Intranasal Brain Delivery Model,
Journal of Materials Chemistry B, 5,
1765-1771 (2017). (査読有)
DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.05.007

[学会発表] (計 16 件)

- ① 朝山章一郎, 長嶋果南, 根岸洋一, 川上浩良, インスリン/コレステロール末端修飾 PEG 複合体による血糖降下作用, 日本薬学会第 138 年会 (2018 年)
- ② 朝山章一郎, 長嶋果南, 根岸洋一, 川上浩良, コレステロール末端修飾 PEG によるインスリンの非共有結合 PEGylation, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 (2017 年)
- ③ Shoichiro Asayama, Atsushi Nohara, Sakura Taneichi, Yoichi Negishi, Hiroyoshi Kawakami, Biocompatible Highly Condensed Plasmid DNA for In Vivo Diffusive Delivery, The 25th Anniversary Congress of the European Society of Gene & Cell Therapy (2017 年)
- ④ 朝山章一郎, 長嶋果南, 川上浩良, プロテインモノイオンコンプレックスによるカタラーゼの PEGylation 効果, 第 66 回高分子討論会 (2017 年)
- ⑤ 朝山章一郎, 長嶋果南, 川上浩良, モノイオンコンプレックスによるタンパク質の非共有結合 PEGylation, 第 46 回医用高分子シンポジウム (2017 年)
- ⑥ Shoichiro Asayama, Atsushi Nohara, Sakura Taneichi, Yoichi Negishi, Hiroyoshi Kawakami, Design of Mono-Ion Complex for In Vivo Diffusive Plasmid DNA Delivery, 44th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2017 年)
- ⑦ 朝山章一郎, 長嶋果南, 根岸洋一, 川上浩良, インスリンの非共有結合 PEGylation: コレステロール末端修飾 PEG とインスリンの複合体形成, 第 33 回日本 DDS 学術集会 (2017 年)
- ⑧ 朝山章一郎, 永倉大賀, 坂田瑞希, 川上浩良, Zn²⁺/pDNA 共送達システムのインスリン肝クリアランス抑制機構解析, 第 66 回高分子学会年次大会 (2017 年)
- ⑨ 朝山章一郎, 種市さくら, 根岸洋一, 川上浩良, pDNA/PEG モノイオンコンプレックスの機能向上とオリゴイオンコンプレックスの形成, 第 66 回高分子学会年次大会 (2017 年)
- ⑩ 朝山章一郎, 種市さくら, 根岸洋一, 川上浩良, 持続的遺伝子発現型 pDNA/PEG モノイオンコンプレックスの分子設計, 遺伝子・デリバリー研究会第 17 回シンポジウム (2017 年)
- ⑪ 朝山章一郎, 坂田瑞希, 川上浩良, 糖尿病治療を目指した Zn²⁺/pDNA 共送達シス

テムのインスリン肝クリアランス抑制評価, 日本薬学会第 137 年会 (2017 年)

- ⑫ 朝山章一郎, 坂田瑞希, 川上浩良, Zn²⁺/pDNA 共送達システムのインスリン肝クリアランス抑制に基づく糖尿病治療への展開, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 (2016 年)
- ⑬ 永倉大賀, 朝山章一郎, 坂田瑞希, 川上浩良, Zn²⁺/pDNA 共送達システムによる細胞増殖促進, 第 66 回高分子討論会 (2016 年)
- ⑭ 朝山章一郎, 坂田瑞希, 川上浩良, Zn²⁺/pDNA 共送達システムによるインスリン肝クリアランス抑制と糖尿病治療への展開, 第 66 回高分子討論会 (2016 年)
- ⑮ 朝山章一郎, 坂田瑞希, 川上浩良, Zn²⁺/pDNA 共送達システムによる糖尿病治療へのアプローチ, 第 45 回医用高分子シンポジウム (2016 年)
- ⑯ 朝山章一郎, 坂田瑞希, 川上浩良, Zn²⁺/pDNA 共送達システムによる肝クリアランス抑制, 第 32 回日本 DDS 学術集会 (2016 年)

[図書] (計 1 件)

- ① 朝山章一郎 他, 講談社, 生体分子化学基礎から応用まで, 2017, 292 (269-287)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ①名称: 表面処理剤
発明者: 朝山章一郎 (代表)
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2018-010232
出願年月日: 2018 年 1 月 25 日
国内外の別: 国内
- ②名称: タンパク質吸着抑制表面処理剤
発明者: 朝山章一郎 (代表)
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2017-13942
出願年月日: 2017 年 1 月 30 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝山 章一郎 (ASAYAMA, Shoichiro)
首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授
研究者番号: 90315755