

平成22年 6月 2日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19200038
 研究課題名（和文） 細胞認識性キメラタンパク被覆型アパタイトナノキャリアを用いた
 幹細胞遺伝子発現制御
 研究課題名（英文） Regulation of Stem Cells Gene Expression using Apatite nanocarriers
 coated with Cell-reconizable chimeric Protein.
 研究代表者 赤池敏宏（AKAIKE TOSHIHIRO）
 東京工業大学・フロンティア研究センター・教授
 研究者番号：30101207

研究成果の概要（和文）：炭酸アパタイトはリン酸カルシウム的一种であり、従来のリン酸カルシウム法よりも生成する粒子サイズが微小になり、かつ細胞内の酸性環境により迅速に溶解するようになるため遺伝子導入効率を向上させることができる。本研究では炭酸アパタイトナノ粒子を用いて DNA や mRNA, タンパク質などの様々な生体高分子を極めて効率的に細胞内へ導入できる世界に類例のない手法を開発した。それに基づき、炭酸アパタイトナノ粒子キャリアー設計を、基礎研究から医療応用まで様々な応用の可能性を追求、提起した。

研究成果の概要（英文）：Targeted genes and relatives DNA RNA protein and drug involved delivery has received much attention throughout the world. In this study, we show for the first time pH-sensitive delivery of gene and relatives based on biocompatible inorganic nanoparticles of carbonate apatite being highly stable at the typical physiological pH and quickly degradable at the typical pH of endosomal compartment. This nano sized (100-300 nm) apatite-gene conjugates demonstrated huge uptake of drug to various cells as determined by Florescence microscopy and flow cytometry. The application of carbonate apatite nanocarriers systems to stem-cells(ES, EC Cells) are successfully done with aid of cell-recogonizable nano-biomaterials such as chimeric antibodies as well as sugar-carrying polymers design.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	17,700,000	5,310,000	23,010,000
2008年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2009年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
年度			
年度			
総計	37,500,000	11,250,000	48,750,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：薬物伝達システム 再生医療、炭酸アパタイト、ナノキャリアー、細胞認識性バイオマテリアル、ES細胞、

1. 研究開始当初の背景

動物細胞へ特定の遺伝子をデリバリーする手法は、遺伝子治療やDNAワクチンなど、ヒトの疾患を治療・制御する新技術の開発において非常に重要である。ウイルスを用いた系ではDNAの導入効率は高いが、ウイルス感染や白血病の発生など、副作用や安全性の面で重大な問題がある。これらの理由から、非ウイルス性の人工材料系遺伝子デリバリーシステムは臨床での必要性が増加している。しかし、非ウイルス性の遺伝子デリバリーキャリアはここ30年研究され続けているにもかかわらず、遺伝子導入効率がウイルス性のものと比較すると非常に低い。我々は世界で初めて、高いpH感受性を有する炭酸アパタイトのナノ粒子に細胞を認識する分子を付与したキャリアを開発し、これを用いて動物細胞にDNAやsiRNA、タンパク質や低分子量薬物を導入することに成功した。

このナノ粒子はDNAに対し高い親和性を示す一方、エンドソーム内における酸性条件下では迅速に溶解し、「プロトンスポンジ効果」によって細胞質中へのDNAの放出を促進させるという特徴を有している。細胞質中に移動したDNAはその後、核孔を通過する、もしくは細胞分裂時に核内へ混入されるなどして細胞質から核へと移行するが、この一連の過程によって導入されたDNAの最終的な発現量は既存の手法の平均5-100倍に達することを確認した。またウイルスの構造を参考にして、細胞認識性を有するタンパク質と、非常に親水性の高いタンパク質の2種類のタンパク質をともにDNA/ナノ粒子表面に結合させることにより、ナノ粒子への細胞特異性の付与と、更なる細胞導入効率の向上をめざした。さらに、フィブロネクチン、コラーゲンなどの細胞外マトリックス(ECM)タンパク質をナノ粒子にコーティングさせることにより、インテグリンを介したエンドサイトーシスによる遺伝子導入の

促進効果を見出した。この新しい手法はイオン結晶というリン酸無機物質の特徴と、細胞認識機能をデザインしやすいという合成高分子やタンパク質のような有機分子の特徴とをシナジー的に組み合わせるものであり、新しい医療用デリバリーシステムを切り開く画期的なものであると本研究を位置づけた。

2. 研究の目的

本研究において我々は生分解性の炭酸アパタイトからなる多機能性ナノ粒子開発のスタート台に立ち、これを遺伝子、タンパク質、siRNA、mRNA および薬物の幹細胞内デリバリーに応用し、新たな再生治療法の確立を目指した。我々は細胞内のエンドソームにおいては、その低pH環境に応答し、DNAもしくはRNAを素早く放出する可能性を見出しており、そのメカニズムの詳細解明を急ぐと共にこれらの薬効発現の効率化を図り、さらに高性能化をめざした。生分解性がなく治療効果の低かった従来のデリバリー方法(ポリマー等)と比較して、これらの特徴を有する炭酸アパタイト粒子は細胞改変法や治療法として圧倒的に優れたものとなる可能性を持っている。

本研究ではこの炭酸アパタイト粒子の細胞認識性を高めるためタンパク質と本粒子のハイブリッド化条件の最適化をはかる一方、既にE-カドヘリンやN-カドヘリンの頭部あるいはEGF分子等と抗体Fcフラグメントとを組み合わせるキメラタンパクの設計を展開した。いずれもコーティング安定性とすぐれた細胞認識性を併せ持つ融合タンパク質となった。これらを前述の炭酸アパタイトナノ粒子へのコーティング材料として応用し、必要に応じてはダブルあるいはトリプルコーティングを施すことによりES細胞や各種幹細胞への選択的なDNA/RNA導入用キャリアとして応用する事をめざした。本研究ではま

ず<a>炭酸アパタイトナノ粒子の構造制御
b>細胞特異的な認識性を有する各種のキメラタンパク質の設計とそのナノ粒子への被覆過程の制御を行った上で次の段階として
c>各種細胞の相互作用（導入）とその細胞内運命の解析・機能解析を行った上で最終段階として ES 細胞を筆頭とする各種幹細胞への遺伝子導入とその増殖分化の制御を目指した。

3. 研究の方法

(1)炭酸アパタイトナノ粒子の効率的な作成方法の確立

①ナノ粒子サイズのコントロールと効率化
より効率的なデリバリーと機能発現のために、現在のアパタイト作成方法をベースとしつつ添加するカルシウム、リン酸、炭酸の濃度、添加量を検討して、使用する遺伝子の導入に最適なナノサイズの形成法を確立した。炭酸アパタイトナノ粒子の作成は、時間、濃度、攪拌などのノウハウが非常に詳細にわたるため、希ガス下での実施を工夫した。A)リン酸溶液、b)カルシウム溶液、c)マグネシウム溶液、d)炭酸溶液、e)バッファー溶液、そしてf)遺伝子溶液の混合順や混合時間など、機能の完璧化をめざして詳細に検討した。

②遺伝子発現メカニズムの詳細解明
導入遺伝子の機能発現メカニズムの詳細を検討するために、遺伝子に蛍光ラベル等の修飾を施し、細胞内運命の詳細を共焦点レーザー蛍光顕微鏡等の測定を行った。

(2)細胞をの特異的遺伝子発現効率向上のための炭酸アパタイトナノ粒子の最適化

①各種細胞への遺伝子導入効率の検討
②各種キメラ型タンパク質の分子設計と細胞特異的な認識素子としてのナノ粒子へのコーティング

本研究では各種細胞、最終的にはES細胞を対象とする。キメラタンパク質によってこれら細胞の特異的認識と機能発現性を高めたナノ粒子キャリアーによる細胞内遺伝子送達法を確立する。機能細胞、特に、ES細胞など各種幹細胞へ自在に遺伝子送達を行うためのキ

メラタンパク質—炭酸アパタイトハイブリッドナノ粒子を設計した。細胞特異的タンパク質と炭酸アパタイトナノ粒子のコンポジット作成を実施した。また炭酸アパタイトナノ粒子表面に遺伝子をコンプレックス化させた後さらに、当研究室で開発したPVLA（ガラクトース側鎖のポリスチレン誘導体などの改良の糖鎖含有高分子にてコーティングあるいはコンプレックス形成を実施し、細胞・組織特異的なシステムとして構築した。

(3)ES細胞、F9細胞、P19細胞など各種の幹細胞をin vitro（生体外）で選択的認識するキメラタンパク質や糖鎖ポリマーの設計およびそれで被覆した炭酸アパタイトナノ粒子の細胞内導入と遺伝子発現とその制御法（m, si-RNA, タンパク質など）を詳細に検討した。

4. 研究成果

(1)炭酸アパタイトを用いた遺伝子導入法の開発

生物学やバイオマテリアルの分野では、アパタイトとはリン酸カルシウム的一种である水酸アパタイト（ハイドロキシアパタイト）を指す。水酸アパタイトは特に歯の成分として有名で、歯のエナメル質の約95%、骨の約65%は、水酸アパタイトで構成されている。そのため生体適合性の高い生体材料としても知られており、生理活性分子の輸送キャリアとしての研究も行われるようになってきた。一般的な遺伝子導入法であるリン酸カルシウム法も水酸アパタイトによる導入法だと考えられている。生体内に存在しているアパタイトには炭酸イオンやマグネシウムイオンなどの様々な微量成分が置換されており、歯や骨といった部位ごとの硬組織の性質の違いを生み出している。炭酸イオンを含有した水酸アパタイトは炭酸アパタイトとも呼ばれている。

炭酸アパタイトはリン酸イオンの一部が炭酸イオンに置換されており、結晶性が著しく低下していることが知られている。また結晶成長速度が低下し、析出する粒子のサイズが減少することも知られている。本研究ではこ

の炭酸アパタイトが、生体適合性の高い材料である点と、生成する粒子のサイズが減少する点に注目して、リン酸カルシウム法に代わる、新しい遺伝子導入キャリアとしての利用法を検討し、それを開発することに成功した。本手法では、炭酸イオンをアパタイトに含有させることにより、粒子のサイズをナノサイズに抑えることができた点と酸性条件下における溶解性を高めることができた点の2点が遺伝子導入効率の向上につながったと考察された。炭酸アパタイトは水酸アパタイトよりも酸性溶液中における溶解度が高いため、炭酸アパタイトとDNAとの複合体が細胞にエンドサイトーシスで取り込まれた後に、エンドソーム内の低 pH 条件に応答して溶解し、アパタイトに結合させたDNAを細胞質中に放出することができると考察している。炭酸アパタイト粒子は酸性条件下で迅速に溶解するため、エンドソームの低 pH 条件下ですぐに導入したい物質を放出することができる。そのため導入物質が過酷な低 pH 条件にさらされる時間がわずかで済む。このことは細胞内への導入物質がエンドソームやリソソームの内部で破壊されることがなく、活性を維持したまま導入できることが判明した。

DNA-炭酸アパタイト複合体を HeLa 細胞や NIH3T3 細胞に添加し、血清存在下で4時間培養後、複合体懸濁液を除去して、さらに24時間培養したところ、従来のリン酸カルシウム共沈法やリポフェクトアミンを用いた場合よりも非常に高い遺伝子発現が確認された。MTT assayにより複合体の細胞毒性を確認したが、他の方法との差は見られなかった。以上のことから、炭酸アパタイトによる遺伝子導入法は、安全性が高く、しかも既存のトランスフェクション試薬を上回る遺伝子導入効率を示す方法であることが確認された。

(2) 細胞認識性タンパク質を修飾した炭酸アパタイトによる選択的遺伝子導入

炭酸アパタイトを用いた場合でも胚性幹細胞 (ES 細胞) などの特殊な細胞への遺伝子導入はできず、エレクトロポレーション法や

ウイルスによる方法に頼っていた。ES 細胞や浮遊培養の細胞は一般的に市販のトランスフェクション試薬による導入が難しいことが知られており、遺伝子導入効率を向上させることが求められる。また、遺伝子治療に用いる際には、特定の細胞や組織特異的に遺伝子やタンパク質をデリバリーできることが望ましい。そこで本研究では、細胞認識タンパク質を修飾した炭酸アパタイトの使用を試みた。細胞認識タンパク質として、細胞外マトリクス (ECM) タンパク質であるフィブロネクチンを使用した。さらに、当研究室で開発された細胞間結合に寄与している E-cadherin と抗体である IgG の Fc 領域を融合したタンパク質である E-cad-Fc で炭酸アパタイト複合体を修飾することにより、遺伝子導入効率を向上させることができるか検討した。遺伝子導入には、炭酸アパタイト複合体のみでは遺伝子導入が困難だったマウス胚性癌細胞である F9 細胞とマウス ES 細胞の一種である EB3 細胞を用い遺伝子導入効率が向上するか否かを検討した。その結果、F9 細胞と EB3 細胞の両方で未修飾の複合体を添加した場合よりも高い遺伝子発現が確認された。

(3) 炭酸アパタイトによる mRNA、タンパク質の細胞内導入

mRNA を導入することのメリットとして、DNA から mRNA までの転写過程を経る必要がなく、mRNA の導入後すみやかにタンパク質を作り出すことが可能である点が挙げられる。そのため、mRNA 導入から生理的な効果が得られるまでのタイムラグが起こりにくく、導入後に目的とした作用が起こりやすい。しかし、通常 mRNA 自体分解が起こりやすく、長時間保持しておくことが困難であることや、さらに mRNA 自体の細胞内への高効率な導入ツールが確立されていなかったためにあまり利用されることは少なかった。本研究では、炭酸アパタイトとリポソームを形成する脂質である DOTAP との複合体を作製し、そこに mRNA を結合させることで、効果的な mRNA の細胞内への導入を可能とした。炭酸アパタイト

-DOTAP 複合体を用いた mRNA 導入では、複合体が細胞内のエンドソームに取り込まれた後に、速やかに分解する。これにより、mRNA が細胞質中に速やかに放出され、エンドソーム内の酸性条件下でのダメージが起こりにくく、比較的多くの mRNA を細胞質中に導入することが可能になったと考えられる。

通常の DOTAP やリポフェクトアミン 2000 と比較して、炭酸アパタイト-DOTAP 複合体を使用した場合、mRNA の導入効率は 10 倍以上向上することが確認された。さらに mRNA をリポフェクトアミン 2000 で導入する際、血清存在下では導入効率の低下が見られたが、本手法を用いると導入効率の低下は見られなくなった。このことは、mRNA の導入中も細胞を血清存在下という好ましい条件下で培養できることを示している。血清非存在下の不安定性がなく細胞を安定条件下で培養することが可能である。

以上のことから炭酸アパタイトは mRNA の細胞内導入に有効であることが示された。

最近ではタンパク質を医薬品として利用することは珍しくなりつつあるが、現在出回っているタンパク質医薬品は細胞の外から働きかけるものであり、細胞内で効果を発揮するものは開発されていない。これはタンパク質が細胞膜を透過できないことに原因があるため、タンパク質を細胞内に導入する技術が利用できれば、細胞内の数多くのタンパク質を医薬品として利用できる可能性が出てくる。

しかし、タンパク質の活性を保ったまま細胞内へ導入するには困難が生じる。まず、遺伝子を導入する際と同様の手法で炭酸アパタイト-タンパク質複合体を調製し、細胞内へ導入できるかどうか確認した。FITC で蛍光標識したウシ血清アルブミン (BSA) と炭酸アパタイトとで複合体を形成させ、HeLa 細胞、NIH3T3 細胞に複合体を添加し、4 時間後に細胞表面に残留した複合体を除去してから蛍光顕微鏡で観察した。FITC-BSA のみでは、細胞内に蛍光が観察されないが、FITC-BSA-炭酸アパタイト複合体を添加した場合は、

細胞内の蛍光が観察された。

さらに活性を維持することが難しい酵素についても導入を検討した。 β ガラクトシダーゼを炭酸アパタイトとの複合体作製によって、細胞内へ導入させた後に X-gal を用いて酵素活性染色を行うと、細胞全体が青色に染まり、酵素活性を維持したまま導入できることが確認された。

これらの結果から、炭酸アパタイトを使用すると、タンパク質も細胞内に導入できることが確認された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 44 件)

1. Tada S, Chowdhury EH, Cho CS, Akaike T. pH-sensitive carbonate apatite as an intracellular protein transporter. *Biomaterials*, 31, 1453-1459, (2010)、査読有
2. Hossain S, Tada S, Akaike T, Chowdhury EH. Influences of electrolytes and glucose on formulation of carbonate apatite nanocrystals for efficient gene delivery to mammalian cells. *Anal. Biochem.* 397, 156-161, (2010)、査読有
3. K. Kutsuzawa, S. Tada, S. Hossain, K. Fukuda, K. Maruyama, Y. Akiyama, T. Akaike, E.H. Chowdhury, Disrupting actin filaments promotes efficient transfection of a leukemia cell line using cell adhesive protein-embedded carbonate apatite particles *Anal. Biochem.* 388, 164-166, (2009)、査読有
4. F. T. Zohra, E. H. Chowdhury, & T. Akaike High performance mRNA transfection through carbonate apatite-cationic liposome conjugates. *Biomaterials*, 30, 4006-4013, (2009)、査読有
5. T. Hiratsuka, M. Goto, Y. Kondo, C-S. Cho, T. Akaike; Copolymers for Hepatocyte-Specific Targeting Carrying Galactose and Hydrophobic Alkyl Groups. *Macromol. Biosci.*, 8, 231-238, (2008)、査読有
6. Nagaoka M, Hagiwara Y, Takemura K, Murakami Y, Li J, Duncan SA, Akaike T.; Design of the artificial acellular feeder layer for the efficient propagation of mouse ES cells. *J Biol Chem.* 283, 26468-26476, (2008)、査読有

7. Kutsuzawa K, Maruyama K, Akiyama Y, Akaike T, Chowdhury EH; Efficient transfection of mouse embryonic stem cells with cell-adhesive protein-embedded inorganic nanocarrier. *Anal Biochem.* 372(1), 122-4, (2008) 、査読有
8. Kutsuzawa K, Akaike T, Chowdhury EH.; The influence of the cell-adhesive proteins E-cadherin and fibronectin embedded in carbonate-apatite DNA carrier on transgene delivery and expression in a mouse embryonic stem cell line. *Biomaterials.* 29(3), 370-6. (2008) 、査読有
9. E.H.Chowdhury, T.Akaike; pH-Sensitive Inorganic Nano-Particles and Their Precise Cell Targetibility: An Efficient Gene Delivery and Expression System. *Current Chemical Biology*, 1,201-213 (2007) 、査読有
10. F.T.Zohra, E.H.Chowdhury, S.Tada, T.Hoshihara, T.Akaike; Effective delivery with enhanced translation activity synergistically accelerates mRNA-based transfection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358, 373-378,(2007) 、査読有
11. Chowdhury EH, Akaike T.; High performance DNA nano-carriers of carbonate apatite: multiple factors in regulation of particle synthesis and transfection efficiency. *Int J Nanomedicine.*2(1):101-6. (2007) 査読有
12. 多田誠一、E. H. Chowdhury、沓沢好一、赤池敏宏「生体適合性ナノキャリアの設計とDNA・RNA・蛋白質の高効率細胞内デリバリー」再生医療、6、64-71、(2007) 、査読有
13. 赤池敏宏、長岡正人、E. H. Chowdhury、原田伊知郎「細胞接着分子の利用による細胞制御—細胞生物学／遺伝子工学／材料工学／物理学間の学際的融合による細胞認識材料設計とその再生医療への応用」材料の科学と工学、44 (1) 、6-12、(2007)、査読有

[学会発表] (計 25 件)

1. T. Akaike Design of Cell-recognition Biomaterials for Regenerative medicine and Cell-Targeting Medicine. 2009 International Symposium on Crystal Engineering & Drug Delivery System, 2009/9/6, Tianjin, China

[図書] (計 7 件)

1. 多田誠一・E. H. Chowdhury・沓沢好一・赤池敏宏「第 4 章セラミックス 2. 炭酸アパタイト 生理活性分子の導入キャリアとしての炭酸アパタイトナノ粒子」遺伝子医学 MOOK 別冊 絵で見てわかるナノ DDS マテリアルから見た治療・診断・予後・予防、ヘルスケア技術の最先端 221-228 (2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：細胞培養用基材

発明者：佐竹真、福井三由紀、兼子博章、赤池敏宏、賀喜白乙、

権利者：帝人株式会社、東京工業大学

種類：特許

番号：2008-233322

出願年月日：2008. 9. 11

国内外の別：国内

名称：組織撮影用 MRI 造影剤

発明者：赤池敏宏、篠田さやか、後藤光昭

権利者：東京工業大学・セラジックス

種類：特許

番号：2009-055656

出願年月日：2009. 3. 9

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.akaike-lab.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤池 敏宏 (AKAIKE TOSHIHIRO)

東京工業大学・フロンティア研究センター・教授

研究者番号：30101207

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし