

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2007～2008

課題番号：19201024

研究課題名（和文） 高機能性ナノカプセルの創製と応用

研究課題名（英文） Development and application of functionalized nanocapsules

研究代表者

半田 宏 (HANDA HIROSHI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究代表者番号：80107432

研究成果の概要：

SV40 メジャーカプシドタンパク質である VP1 五量体の自己組織化によるナノカプセル形成技術を開発し、それを基盤として、カプセル内への多様な生理活性物質の内包技術およびカプセル表面の修飾・加工による細胞・組織指向性の改変技術を世界に先駆けて開発した。これにより、従来には無い革新的な DDS キャリヤの作製システムが構築できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	15,900,000	4,770,000	20,670,000
2008 年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
年度			
年度			
年度			
総計	30,300,000	9,090,000	39,390,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ウイルスカプシドタンパク質、VP1 五量体、自己組織化、VP2/VP3、高機能性ナノカプセル、ナノカプセル誘導因子

1. 研究開始当初の背景

ウイルスカプシドタンパク質の組換え体を作製して、それをを用いてナノ構造体の再構成は海外で盛んに研究が進んでいる。特に、近年、子宮頸がんに対するがんワクチンとして、HPV のカプシドタンパク質をベキュロウイルス系や酵母系で発現させた VLP が開発されている。しかし、カプシドタンパク質の再構成により形成されるナノカプセル内に生理活性物質を効率よく内包する技術は未だ開発されておらず、DDS としての機能を付与する技術は国の内外を問わず未だに開発さ

れていない。

我々は、SV40 メジャーカプシドタンパク質である VP1 を組換えバキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞内で多量に発現させると、核内にウイルス粒子様粒子 (virus-like particles; VLP) が形成される系を確立した。VLP を精製後、VLP を VP1 五量体にまで効率よく解離するために、EDTA と DTT を添加する条件を決定し、さらにゲルろ過で VP1 五量体を高度に精製した。解離した VP1 五量体はその自己組織化能によって、VLP 様のナ

ノカプセルおよびチューブ状構造体などの多彩な構造体に再構成する条件を詳細に検討した。その結果、非生理的な高塩濃度、高 pH、低 pH 等の条件下では、ノカプセルやチューブ状構造体が形成されることがわかったが、しかし、生理的条件下では、VP1 五量体はそのまま、カプセルやチューブなどの構造体が形成されることはなかった。

そこで、我々は高度に精製した SV40 カプシドタンパク質の自己組織化能を利用して、試験管内における生理的条件下で自己組織化を誘導し、それによりノカプセル形成を促進する因子を網羅的に探索し、いくつかの因子を同定することが出来た。それら因子の共通点を検討し、ノカプセル形成を誘導する基本原理の解明と、それら因子を利用することでノカプセル中に、タンパク質や DNA などの生理活性物質を内包する技術開発に挑戦した。

2. 研究の目的

試験管内における SV40 カプシドタンパク質の自己組織化のメカニズム解明という基礎研究の成果を基盤にして、自己組織化により形成されるノカプセルを新たな DDS 用のキャリアとして、実用化に向けた応用研究を行う。研究内容は、ノカプセル内への生理活性物質を内包する技術開発と、ノカプセル表面を加工・修飾し、細胞指向性を付与する技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

SV40 のメイジャーカプシドタンパク質である VP1 五量体を、まずバキュロウイルス発現系で多量に調製し、高度に精製した。次に、VP1 五量体の自己組織化によるノカプセルの形成を生理的条件下で誘導する因子を可能性のあるタンパク質や核酸の中から探索した。また、誘導する因子のメカニズムを解き明かすために、タンパク質のドメイン解析や dsDNA のサイズや形状の検討を行った。それら成果を基に、他の候補物質を探索・合成した。

ノカプセル形成後に、その中に誘導因子が内包されているか否かをいくつかの方法で検討し、次に、ノカプセルによる培養細胞への感染実験を行い、細胞内への導入効率を検討した。また、マウス個体を用いて、静脈注射によるがん組織への指向性を検討した。

細胞指向性を付与するために、VP1 のカプシド表面に位置するドメイン (BC、DE、HI ループ) 中のペプチドや一つのアミノ酸を置き換えた置換変異体や点変異体を作製し、それら変異体によるノカプセル形成能を検討した。

導入遺伝子の発現を制御する技術を開発

するために遺伝子発現の制御機構の解析や、導入薬剤の作用機構を解明するためにケミカルバイオロジーを行い、VP1 五量体に包含したフェライト粒子の応用展開に向けた開発研究を行った。

4. 研究成果

(1-1) SV40 の VP1 五量体の自己組織化能によるノカプセル形成を誘導する候補因子として、カプシドの裏打ちタンパク質であるマイナーカプシドタンパク質 VP2/VP3 の可能性を考え、大腸菌でのそれらの組換えタンパク質を作製して、ノカプセル形成の誘導活性を検討した。その結果、両者共にノカプセル形成誘導活性を有することがわかった。

次に、VP2 および VP3 の中で、ノカプセル形成を誘導する最小必要領域を決定した。その領域 (PD) と、蛍光タンパク質 (GFP) あるいはシトシンデアミナーゼ (CD) などの酵素との融合タンパク質を作製し、それら融合タンパク質を用いてもノカプセル形成誘導が起こることを見出し、ノカプセルの中に VP2/VP3 の共通部分である PD 領域を介して GFP 融合タンパク質を内包する技術を確立した。さらに、GFP 融合タンパク質を内包したノカプセルは宿主細胞へ感染し、細胞内で蛍光を発することが観察された。

また、PD 領域と熱耐性のシトシンデアミナーゼ酵素との CD 融合タンパク質もノカプセル形成誘導活性を有し、形成されたノカプセル内に CD 酵素活性が確認できた。また、そのノカプセルの感染によって CD 融合タンパク質を導入された宿主細胞では、培養液中にプロドラッグである 5-FU を添加すると、導入された CD の酵素活性によって 5-FU が 5-FC に変換されて、細胞が死に至ることが確認された。従って、ノカプセルがタンパク質をその活性を維持したままで細胞内へ導入できる有用な DDS キャリヤであることを証明することができた。

(1-2) 次に、ノカプセル形成の誘導因子として我々が考えたのは、2 本鎖 DNA (dsDNA) である。というのは、dsDNA は負の電化を有する。また、VP1 五量体の粒子の内側には正の電荷を持つ領域がある。そこで、静電的な相互作用でノカプセル形成が誘導される可能性があるかと推測し、ノカプセル形成能を検討した。その結果、dsDNA がノカプセル形成誘導能を持つことを発見した。しかも、dsDNA はノカプセル中に内包され、感染によって細胞内に導入され、それが核内に移行して、低頻度ではあるが dsDNA 上の遺伝子が発現することを見出した。その際、ノカプセルの中に完全に内包できる dsDNA は閉鎖環状 dsDNA であって

も直鎖状 dsDNA であっても、長さは 2,000 塩基対であることを DNA 分解酵素の感受性実験で明らかにした。ということは、2,000 塩基対長以上の場合は、余分な部分がナノカプセルの外側に出ていることを意味し、それ故、2,000 塩基対長という短い dsDNA しか内包することができないことがわかった。その逆に、短い dsDNA を調べてみると、200 塩基対長以下の dsDNA では、上手くナノカプセル形成が誘導されないこともわかり、ある程度の長さがナノカプセル形成に必要であることを明らかにした。これは自己組織化の誘導には、VP1 五量体が dsDNA と他の VP1 五量体と両方の相互作用が必要であることを示唆するものである。

近年、塩基性タンパク質と dsDNA を混合することで、dsDNA をコンパクションする技術を確認し、2,000 塩基対長という制約が解除でき、約 5,000 塩基対長の閉鎖環状 dsDNA を内包する技術開発に成功した。これにより、より多くの遺伝情報を内包することが出来るようになったので、遺伝子導入の応用展開への可能性がより高まった。

(1-3) 近年、粒径が 8nm~27nm の間の均一サイズのフェライト粒子を作製する技術を開発し、一個のフェライト粒子をナノカプセルの中に内包する技術開発に成功した。これが MRI 造影剤として使えることを示し、このナノカプセルの血中滞留性はかなり長く、数時間は血中に留まることがわかった。現在、非修飾・非加工のナノカプセルの投与と表面に機能性ペプチドを付与したナノカプセルをマウス個体に投与し、特異抗体の産生を経時的に検討することを始めており、その結果によって、さらなる表面改変を行う必要があるかを試みている。

また、ホール素子や MR 素子から成る磁気センサーの検出用プローブとして有用であることがわかった。しかし、磁力が少し低いので、磁力を高める技術開発も行っている。

現在、さらなる実用化を視野に入れて、実験動物を用いて細胞・組織指向性の MRI 造影剤や、高感度磁気センサーの検出用プローブの開発研究を推進している。

(2) ナノカプセル表面を遺伝子工学的的手法および化学的手法を用いて修飾・加工し、細胞指向性の獲得や、抗原性の低減を可能にする技術を開発している。まず、フェライト粒子を内包したナノカプセルの表面に、がん細胞を標的とする指向性ペプチドを化学的に付加して、それを二つの異なるがん細胞を植え付けた担がんマウスに尻尾から静脈注射すると、標的とするがん細胞に選択的に集積

している MRI 画像が得られた。その集積は数十時間後に、より多くなるので、血中滞留性が良く、がん細胞指向性が高いと思われる。これは未だ予備的な段階ではあるが、かなり期待できる結果が得られている。

(3) 導入した遺伝子の発現を的確に制御する技術を開発するために、遺伝子発現の制御機構の解析を行っており、特に、外界刺激に応答する遺伝子に共通に見られる伸長段階の制御に関わる転写制御因子による制御機構を解析している。

(4) 今後、薬剤を内包した DDS 開発を考えており、薬剤の作用機構を、その標的タンパク質の単離・同定から解き明かすケミカルバイオロジーを行っており、いくつかの低分子化合物に対する標的タンパク質を同定し、化合物の作用メカニズムを解明している。

(5) フェライト粒子を内包したナノカプセルを作製するために、磁力の強いフェライト粒子の作製とその表面コーティング技術開発を行うと共に、それを磁気センサーの検出プローブとして用いる高感度磁気センサーの開発を進めている。

本研究では、生理的条件下で VP1 五量体の自己組織化によるナノカプセル形成を誘導する因子を探索し、VP2/VP3、dsDNA、フェライト粒子などいくつかの因子を探索・同定することに成功した。また、カプセル表面を修飾・加工する技術を開発し、標的細胞・組織への選択的な指向性を持ち、カプセル内へ目的とする生理活性物質を内包する技術を開発し、革新的な DDS 用キャリアを作製する基盤技術を世界に先駆けて開発することに成功した。

以上の開発技術を組み合わせ、目的物質を目的量だけ内包し、標的細胞に対して選択的な指向性を有する高機能性ナノカプセルの構築システムの基盤を築き上げることができた。これからは実際の臨床医療への実用化・応用展開に向けた研究開発を図るつもりでいる。

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)

[雑誌論文] (計 24 件)

①Nakanishi, A., Chapellie, B., Maekawa, N., Hiramoto, M., Kuge, T., Takahashi, R-H. Handa, H. and Imai, T. SV40 vectors carrying minimal sequence of viral origin with exchangeable capsids. *Virology*, 379, 110-117, 2008. 査読有

②Takahashi, R-H., Kanesashi, S-N., Inoue, T., Enomoto, T., Kawano, M-A., Tsukamoto, H., Takeshita, F., Imai, T., Ochiya, T., Kataoka, K., Yamaguchi, Y. and Handa, H. Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. J. Biotechnol., 135, 385-392, 2008. 査読有

③Inoue, T., Kawano, M., Takahashi, R., Tsukamoto, H., Enomoto, T., Imai, T., Kataoka, K. and Handa, H. Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with minor capsid proteins VP2/3. J. Biotechnol., 134, 181-192, 2008. 査読有

④Tsukamoto, H., Kawano, M., Inoue, T., Enomoto, T., Takahashi, R., Yokoyama, N., Yamamoto, N., Imai, T., Kataoka, K., Yamaguchi, Y. and Handa, H. Evidence that SV40 VP1-DNA interactions contribute to the assembly of 40-nm spherical viral particles. Genes Cells, 12, 1267-1279, 2007. 査読有

[学会発表] (計 34 件)

①榎本輝也、川野雅章、塚本寛子、井上隆昌、高橋陵宇、半田宏「ウイルスの特性を利用した遺伝子導入用ナノカプセルの構築 (Development of Nano-capsule for Gene Delivery by utilizing the in vitro virus capsid assembly)」、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、2008. 12. 12、神戸ポートアイランド ワールド記念ホール

[図書] (計 3 件)

① Hiroshi Handa, Masaaki Kawano, R. Holland Cheng, World scientific, STRUCTURE-BASED STUDY OF VIRAL REPLICATION, 2008, p. 609-p. 630

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：改変されたウィルスカプシドタンパク質及びその使用

発明者：半田宏、中西章、金刺進之助、高橋陵宇

権利者：東京工業大学

種類：特願

番号：2007-503799

出願年月日：2008/11/19

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

半田 宏 (HANDA HIROSHI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：80107432

(2)研究分担者

落谷 孝広 (OCHIYA TAKAHIRO)

国立がんセンター・がん転移研究室・

独立室長

研究者番号：60192530

(3)連携研究者

阿部 正紀 (ABE MASANORI)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：70016624