

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700396
 研究課題名（和文）
 心血管系組織の傷害部位を標的とした薬物・遺伝子輸送システムの開発
 研究課題名（英文）
 Development of drug and gene delivery system for injured sites of cardiovascular tissues
 研究代表者
 伊勢 裕彦（ISE HIROHIKO）
 東京工業大学・フロンティア研究センター・特任講師
 研究者番号：10324253

研究成果の概要（和文）：

申請者は、GlcNAc 含有糖鎖高分子を用いることで心筋細胞や血管平滑筋細胞が N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に対して高い相互作用を有することを見出した。このことから、これらの細胞が GlcNAc に対する細胞表面レクチンを発現していることが考えられた。そこで、この GlcNAc 糖鎖高分子を用いた心血管組織の傷害部位への薬物輸送システムの開発を試みた。GlcNAc 糖鎖高分子をコートしたリポソームを作製し、心筋細胞への相互作用を検討したところ、高い相互作用と取り込みが観察された。以上のことから GlcNAc コーティングリポソームを用いた心血管組織の傷害部位への薬物輸送システムの開発が期待された。

研究成果の概要（英文）：

Cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells (VSMCs) were found to interact with N-acetylglucosamine (GlcNAc) using glycopolymers containing GlcNAc. It was assumed that these cells have GlcNAc-binding lectin on the cell surfaces. We tried to develop drug and delivery systems for injured site of cardiovascular tissue. The uptake of GlcNAc-conjugated liposomes to cardiomyocytes was observed. These results suggested the development of drug and gene delivery system for injured sites of cardiovascular tissues using GlcNAc-conjugated liposomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：薬物輸送システム、N-アセチルグルコサミン、レクチン、糖鎖高分子

1. 研究開始当初の背景

現在、心筋梗塞における心筋傷害部位やその治療としての心血管インターベンション治療が引き起こす血管傷害部位において、特異的に薬物を作用させることのできる輸送システムの開発は報告がない。申請者の糖鎖を利用した心血管組織への薬物輸送システムの開発が実現できれば、低侵襲性に心筋梗塞部位の修復や血管傷害部位の内膜肥厚や血栓形成の抑制が可能になる新たな治療法の開発が期待できる。そこで、申請者は、心血管組織に発現する糖鎖結合分子であるレクチンに着目した。レクチンは、さまざまな糖鎖情報の細胞への伝達を行っており、このレクチンの解析は組織における炎症や感染、組織の再生のメカニズムの解明が期待される。また近年では、レクチンと糖鎖の生物学的な知見から人工的な機能糖鎖を合成し、これを利用した薬物輸送システムや感染防御創薬の開発が行われている。申請者は、心臓や血管傷害において糖鎖の情報伝達がどのように関与するのか、さらにこれらの知見を応用した新しい治療法の開発のために、レクチンの心筋組織や血管組織での発現を探索している。もしこのようなレクチンの存在が心血管組織であきらかになれば、炎症や再生現象に関する新しい生理機能を解明するきっかけとなり、また心血管組織への薬物輸送システム開発への応用も期待される。そして、近年申請者らは心筋細胞や血管平滑筋細胞にレクチン様の糖鎖結合分子の存在を見出した。

本申請研究課題においては、このレクチンを利用した血管傷害部位の平滑筋細胞や心筋梗塞部位の心筋細胞に特異的に輸送する薬物輸送システムの開発を目指す。特に薬物を輸送する媒体として糖鎖修飾リポソームを開発し研究を展開する。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに心筋細胞や血管平滑筋細胞が、GlcNAcを有する糖鎖高分子に対して高い相互作用を持つことを明らかにしている。本申請課題では、心筋細胞や血管平滑筋細胞に発現すると思われるGlcNAc結合レクチンを標的とする薬物や骨髄細胞などの輸送システムの開発を目指す。

3. 研究の方法

心筋細胞や血管平滑筋細胞を標的とするためにGlcNAc修飾リポソームを作製した。GlcNAc結合リポソームは、ジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC):コレステロール(Chol):ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン(DPPE)=80:20:1の組成でリポソームを超音波処理やエクストルダーターによって作製し、リポソーム表面のGlcNAcの結合は、GlcNAcをポリスチレン鎖に多数結合させたPV-GlcNAc(poly[N-p-vinylbenzyl-O-2-acetoamide-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2-acetoamide-2-deoxy-β-gluconamide])にアルキル鎖を導入して改変したものを用いて行う。この改変PV-GlcNAcは、糖とアルキル鎖からなる両親媒性の高分子であるために作製したリポソームに混ぜるだけでリポソーム表面に吸着して、GlcNAcをリポソーム表面に容易に結合させることができる。このようにして作製したリポソームは、およそ400~200 nmの大きさである。さらに骨髄細胞の心筋細胞への融合効率を高めるためのGlcNAc修飾骨髄細胞の作製は、アルキル鎖を導入したPV-GlcNAcを骨髄細胞表面にコーティングすることで行った。

4. 研究成果

平成20年度において、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を修飾したリポソームが、心筋細胞や血管平滑筋細胞に特異的に取り込まれることを見出し、通常は細胞に取り込まれない親水性の物質をこのリポソームによって細胞内に特異的に取り込ませることに成功した。この成果を利用して、骨髄細胞表面にGlcNAcを修飾することにより骨髄細胞を心筋細胞に対して高い相互作用を付加し、細胞輸送システムの開発を試みた。骨髄細胞を利用した再生医療において、移植した骨髄細胞が傷害された組織に生着しにくいことが問題となっている。そこで、本申請課題では骨髄細胞の細

胞表面をリポソームの表面を修飾する糖質高分子を用いてGlcNAc修飾を行った。その結果、心筋細胞に対してGlcNAc修飾した骨髄細胞は高い相互作用を示した。また心筋細胞に接着したGlcNAc修飾骨髄細胞は心筋細胞との細胞融合が観察された。このことから、骨髄細胞などさまざまな細胞のGlcNAc修飾が可能になり傷害心筋組織へ細胞をさせることが可能になった。核酸の輸送としてGlcNAc修飾リポソームを利用したところ、NF- κ Bデコイを血管平滑筋細胞へ取り込ませることができた。これにより炎症性のサイトカインであるIL-1 β の産生を抑制することが可能になった。これにより傷害部位に生じる炎症を効率的に抑制できることが期待できる。

平成21年度では、心血管系組織に発現するN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)結合タンパク質が、細胞骨格分子であるビメンチンとデスミンであることが見出された。これらのことから標的を心血管組織に限らずデスミンやビメンチンを発現する他の組織にも広げて検討を行った。デスミンを発現する細胞として肝臓組織に存在する星細胞を標的とした薬物輸送システムの開発を試みた。星細胞は、肝臓の細胞外マトリックスや増殖因子を産生する肝非実質細胞として知られているが、肝臓の障害によって活性化し繊維化を引き起こす細胞として知られている。そして、活性化した星細胞はデスミンを発現して筋線維芽細胞に変化することが知られている。そこで、この筋線維芽細胞を標的とすることは肝繊維化の治療において有効な手段である。当該年度ではこの星細胞に対してGlcNAc修飾リポソームが選択的に取り込まれるかを検討した。はじめにビメンチンを発現するHeLa細胞に対してGlcNAcとの相互作用があるか検討を行った。その結果、HeLa細胞はGlcNAc糖鎖高分子であるPV-GlcNAcに対して高い相互作用を有していることが明らかになり、さらにGlcNAc修飾リポソームもまたHeLa細胞に取り込まれることが見出された。また蛍光標識したオリゴヌクレオチドもGlcNAc修飾リポソームに封入することで、HeLa細胞に取り込ませることができるとも明らかになった。そこで、星細胞について検討を行ったところ、同様にGlcNAc修飾リポソームやPV-GlcNAcに対して高い相互作用が観察された。しかしながら、デスミンやビメンチンを発現しない肝実質細胞には相互作用が無く、星細胞選択的にGlcNAcが相互作用することが明らかになった。以上のことから、GlcNAc修飾リポソームを利用することでビメンチンやデスミンを発現する組織や細胞に薬物輸送システムを構築で

きるが見出された。

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 8 件)

- ① Ise H, Kobayashi S, Goto M, Sato T, Kawakubo M, Takahashi M, Ikeda U, Akaike T. Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces. *Glycobiology*, In press. 査読有
- ② Misawa R, Soeda J, Ise H, Takahashi M, Kubota K, Mita A, Nakata T, Miyagawa S. Potential feasibility of early bone marrow cell injection into the spleen for creating functional hepatocytes. *Transplantation*, 87, 1147-1154 (2009) 査読有
- ③ Kobayashi S, Ise H, Takahashi M, Goto M, Akaike T, Ikeda U. Surface coating of bone marrow cells with N-acetylglucosamine for bone marrow implantation therapy. *Biomaterials*, 30, 574-582 (2009) 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 伊勢裕彦、後藤光昭、佐藤孝雄、赤池敏宏、人工糖鎖高分子 PV-GlcNAc を用いた新規 GlcNAc 結合性レクチンの探索, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会、2009 年 11 月 16 日、京都
- ② 伊勢裕彦、後藤光昭、佐藤孝雄、赤池敏宏、Type III 型中間径フィラメントの GlcNAc 結合レクチン活性と細胞表面の発現, 第 82 回日本生化学大会、2009 年 10 月 24 日、神戸
- ③ Ise H, Goto M, Akaike T, Development of a drug delivery system using N-acetylglucosamine-conjugated liposomes, The 7th Asia 3 (China-Japan-Korea) Foresight Symposium on Gene Therapy and Biomaterials, 25 May 2009, Korea, Seoul

[図書] (計 1 件)

伊勢裕彦、医療・診断をめざす先端バイオテクノロジー 関根光雄/編 工学図書 98-110. 2009 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊勢 裕彦 (ISE HIROHIKO)
東京工業大学・フロンティア研究センター・
特任講師

研究者番号：10324253

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし