

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700539

研究課題名(和文)次世代タンパク質用デリバリー素材：タンパク質を温和に保持し放出するナノマシン

研究課題名(英文)Protein carrier nanomachine

研究代表者

森 健 (Mori, Takeshi)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70335785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：3価のイオン性基をデキストランに種々の割合で修飾したカチオン性およびアニオン性の高分子を合成した。修飾率が5 mol%程度と低いときに、直径が30 nm程度のナノゲルを形成しうることが分かった。

これまでの分子設計のナノゲルでのタンパク質内包は難しいことが分かった。そこで、新しい分子設計を行った。細胞の表面にレセプターとなるポリマーを修飾し、これと相補的なリガンドタンパク質を細胞に取り込ませるという方法である。デキストラン主鎖にビオチンを修飾したものは、細胞表面に安定に修飾でき、ここにストレプトアビジンを加えると、すぐに細胞内へエンドサイトーシスによって取り込まれることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Here, we synthesized dextrans modified with trivalent cationic or anionic groups. Aqueous solutions of the cationic and anionic dextrans were then mixed resulting in the formation of polyion complex nanogels (PIC-NGs), which have physically crosslinked salt bridges formed between the cationic and anionic groups.

We have designed biotinylated polymers as synthetic receptors that have multiple alkyl groups for endocytotic delivery of target proteins. The polymers were stably attached to a cell surface via multivalent anchoring. The presented biotin was bound to streptavidin (SA) on the cell surface, and, via an endocytotic pathway, the cell rapidly internalized the biotinylated polymer/SA complex.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学

キーワード：タンパク質 ナノメディスン 細胞膜 エンドサイトーシス 免疫治療

1. 研究開始当初の背景

最近、効率のよいタンパク質のデリバリー法に対する期待がますます高まっている。タンパク質のデリバリー法は、従来の PEG 化製剤に代わり、現在、第三世代として Profection 試薬が各メーカーから市販されている。これらは細胞膜へ吸着しやすいカチオン性の脂質からなり、この脂質を目的のタンパク質と複合化させて用いる。したがって、適用できるタンパク質としては表面電荷がアニオンのもに限られるという問題がある。また、複合化に伴いタンパクが変性することや、エンドソーム脱出に難があるためリソソーム分解系からの回避が不十分といった問題があった。

2. 研究の目的

(1) 上記の現状を踏まえ、本研究ではタンパク質の種類を選ばない汎用性の高いデリバリー法を提案する(図1)。オリゴカチオンおよびオリゴアニオンを低い密度で親水性かつ中性のポリマーに担持したものは、両者を混合するとオリゴイオン間の静電相互作用により、直径 100 nm 以下のナノカプセルを自発的に形成する。これは親水性の主鎖ポリマーが分散安定性に寄与するためであり、通常の不溶化してしまうポリイオンコンプレックスとは異なる。我々は予備的知見として、ナノカプセルが生理塩濃度条件下において安定であることをすでに示した。一方で、タンパク質の表面にはカチオン性およびアニオン性のドメインがパッチ状に存在することから、ナノカプセル形成時にタンパク質を共存させれば、図1のようにタンパク質表面のイオン性ドメインとポリマーのオリゴイオンが静電相互作用することにより、安定かつ温和にタンパク質を内包したナノカプセルができると考えられる。また、親水性ポリマー主鎖によるステルス性に基づいた高い血中滞留性を有すると期待でき、さらに図3で後述するように、このカプセルはエンドソーム内での自発的な崩壊とエンドソーム膜の破壊能を持つため、内包したタンパク質は分解を受けることなく細胞質へ高効率で放出され、従来法に比べて格段に高い薬理活性を示すと期待される。

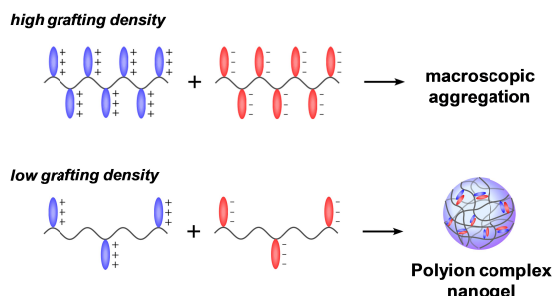


図 1

(2) 細胞表面への有機低分子やポリマーの修飾は、修飾する物質によって免疫原性やエ

ンドサイトーシスなどの細胞機能を能動的に制御できると期待され、研究が活発化している。その中で、最近、我々はアルキル修飾したデキストランが高効率かつ安定に細胞表面に修飾できることを見出した。これは有機低分子に比べ、多価効果によってより安定に膜と相互作用するためと考えられる。我々はこの技術を基盤として、人工レセプターを介したタンパク質の細胞内導入法(共エンドサイトーシス法)を開発した(図2)。核酸デリバリーと異なり、種々の性質を持つタンパク質を細胞内に導入する試薬の開発は容易ではない。本手法によれば、タンパク質の種類を選ばずに細胞内導入できると期待される。この方法は、がんの免疫治療など ex vivo で細胞にタンパク質を作用させる場合に、重要な技術になると期待される。

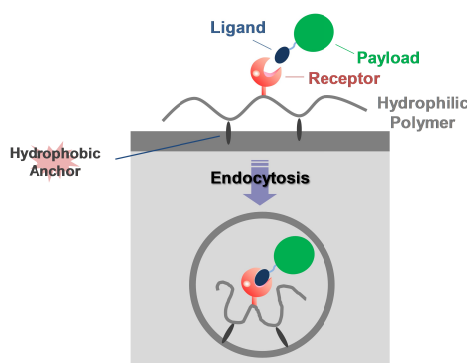


図 2

3. 研究の方法

(1) PIC-NG を構成する 2 種類のポリマー(カチオン性ポリマー、アニオン性ポリマー)は、デキストランの親水性主鎖に、カチオン性側鎖 N, N-bis(3-aminopropyl)ethylenediamine (トリアミン)、あるいはアニオン性側鎖 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid (トリカルボン酸) をグラフトすることで合成した。両ポリマーに対するオリゴイオン側鎖の導入率は $^1\text{H-NMR}$ および元素分析により決定した。PIC-NG の形成を動的光散乱法により評価した。

(2) 人工レセプター (1) を構成するポリマーの主鎖として水溶性で生体適合性を有するデキストランを用い (MW = 40 000)、エチレンジアミンを介して疎水性アンカーとして細胞膜結合能の高いパルミトイル、レセプターとしてビオチンを修飾し、さらに FITC 標識した。また、リガンドとして Cy3-ストレプトアビジン (Cy3-SA) を用いた。デキストランへの各官能基の導入率を、核磁気共鳴分光法 ($^1\text{H NMR}$) と UV-vis 分光光度計により算出した。

In vitro での評価には、ヒト T 細胞株である K562 細胞を用いた。これに 1 を添加して細胞膜に固定し、また 1 への Cy3-SA の結合を蛍光顕微鏡によって観察した。

4. 研究成果

(1) ¹H-NMR および元素分析により、各ポリマーへのオリゴイオン側鎖導入率を、カチオン性ポリマーが 25 mol%、アニオン性ポリマーが 22 mol%と決定した。カチオン/アニオン電荷比が1になるように両ポリマーを純水中で混合すると、コアセルベートを形成し、これを24時間振とうすることでPIC-NGが得られた(図3)。PIC-NGはPBS中では解離した。そこで、アミド結合を選択的に生成する架橋剤であるDMT-MMにより化学架橋を行ったところ、PBS中でも解離せず、粒子径が130 nmで粒度分布の小さい(0.098)PIC-NGが形成していることがわかった。一方、電荷比を変えてPIC-NGの形成を試みたところ、1から大きくずれると形成せず、1でもっとも光散乱強度の大きく、粒度分布の狭いことが分かった。

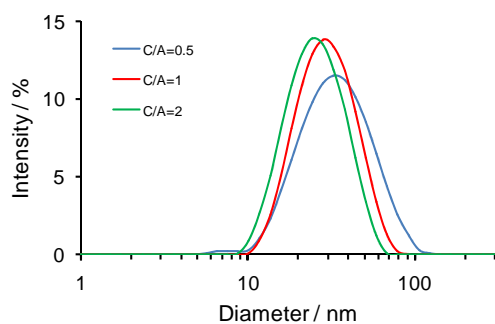


図3

(2) デキストランへの各側鎖の導入率は¹H-NMRにより、エチレンジアミンが5.7 mol%、パルミトイルが10 mol%、ビオチンが5 mol%、UV-visによりFITCが0.3 mol%と決定された。得られた1を細胞に添加したところ、細胞膜周辺でFITC由来の蛍光が観察された(Figure 2)。一方、同様の操作によりパルミトイルがグラフトされていないFITC修飾デキストランを細胞に添加したところ、細胞膜周辺で蛍光は観察されなかった。このことから、1の側鎖であるパルミトイルと細胞膜間の疎水性相互作用により1がアンカリングされたことが示された。ここに、Cy3-SAを添加したところ、細胞膜周辺にCy3-SAが濃縮されることが観察された(図4)。さらに、エンドサイトーシスの促進剤として血清を培地に加えたところ、Cy3-SAが細胞内に効率良く取り込まれることが示された(図5)。血清

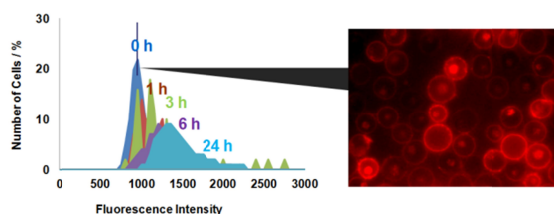


図4

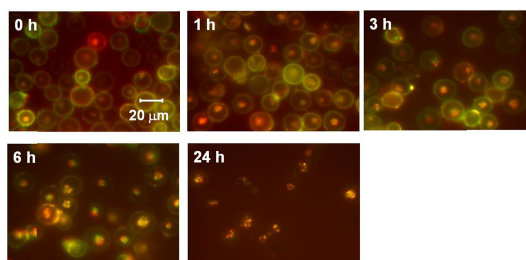


図5

無添加に比べ、血清を加えた場合には、3時間まで取り込みは加速し、それ以降は無血清時と同程度となった。

血清のどの成分が取り込みに効いているかを調べた。血清中にはトランスフェリンが高濃度で存在し、これはクラスリン依存のエンドサイトーシスを示すことが知られている。実際、トランスフェリン(ホロ体)を0.1 mg/mL加えたところ、アポ体(トランスフェリンレセプターに結合できない)に比べ、取り込みを加速していた。したがって、血清中のトランスフェリンは共エンドサイトーシスの促進物質であることが明らかとなった。

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2件)

1. M. Takeo, T. Mori, T. Niidome, S. Sawada, K. Akiyoshi, Y. Katayama, A polyion complex nanogel, *J. Colloid. Interf. Sci.* 390, 78-84 (2012).
2. K. Tobinaga, C. Li, M. Takeo, M. Matsuda, H. Nagai, T. Niidome, T. Yamamoto, A. Kishimura, T. Mori*, Yoshiki Katayama, Rapid and serum-insensitive endocytotic delivery of proteins using biotinylated polymers attached via multivalent hydrophobic anchors, *J. Controlled Release*, 177, 27-33 (2014).

〔学会発表〕(計5件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞膜上に修飾される人工レセプターとそれを用いた共エンドサイトーシス法
 発明者: 森 健、片山 佳樹、飛永 恭兵、竹尾 将史、松田 雅義

権利者:

種類:

番号:

出願年月日: 2012年5月11日

国内外の別： 国外

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~katayama/>

a/

6．研究組織

(1)研究代表者

森 健 (MORI, Takeshi)

九州大学工学研究院・准教授

研究者番号：70335785