

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23750264

研究課題名（和文） 乳癌細胞をターゲットとした複数の機能性ペプチドから成る遺伝子ベクターの開発

研究課題名（英文） Gene carriers containing functional peptides for breast cancer treatment

研究代表者

沼田 圭司 (NUMATA KEIJI)

独立行政法人理化学研究所・酵素研究チーム・チームリーダー

研究者番号：40584529

研究成果の概要（和文）：

複数の機能性ペプチドから構成される融合ペプチドを合成し、遺伝子キャリアとして用いることで、特定の細胞に遺伝子導入することに成功した。ガン細胞に特異的な相互作用を示す Tumor Homing Peptide を用いることで、ガン細胞特異的に遺伝子を導入することに成功した。さらに、遺伝子と融合ペプチドが形成する複合体の表面に存在する Tumor Homing Peptide の比率を向上させることで、遺伝子導入効率を向上させることにも成功した。

研究成果の概要（英文）：

Nano-scale complexes of fusion peptides to contain tumor homing peptides with plasmid DNA (pDNA) are designed as less-cytotoxic and highly target-specific gene carriers. The fusion peptide containing Lyp1 showed significant differences from fusion peptide containing F3 in cytotoxicity to MCF10A cells, and the fusion peptide containing F3 is therefore considered to be the most useful candidate for target delivery into tumorigenic cells. The target specificity of the pDNA complexes to tumorigenic cells was also found to be regulated by specific adsorption process on the cell surface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・高分子・繊維材料

キーワード：ペプチド、シルク、遺伝子デリバリー、

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、既存の治療方法では難病と考えられている疾病に対し、画期的な治療法となる可能性を有した重要な科学技術の一つである。最も古くから研究されているウイルス由来の遺伝子ベクターを用いて、これまでに 1000 以上の臨床実験が行われてきたが、米国 Food and Drug Administration の認可は未だに得られていない[Edelstein et al. *J. Gene. Med.* 2007]。これは、免疫反応等の安

全上の問題に起因する。近年では、合成高分子をベースとした高い遺伝子導入効率および低い細胞毒性を有する遺伝子ベクターが開発されている[Osada et al. *J. R. Soc. Interface*, 2009]。しかしながら、ターゲットとした細胞や組織にのみ遺伝子を送達し発現させることは難しく、遺伝子ベクターのサイズや表面電荷、解離 pH 等で送達部位を限定する手法が多く用いられている。申請者は高い生体適合性が手術用縫合糸等

の生体材料として証明されているシルクタンパク質を用いて [Kim et al. *Nat. Mater.* 2010, Santin et al. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999]、ペプチドベースの遺伝子ベクターを 2008 年から開発しており、これまでにシルクとポリリジンのジブロック共重合体に、RGD ペプチド、Cell Penetrating Peptide (CPP)、および Tumor-Homing Peptide (THP) である F3 ペプチドを第三成分として導入したトリブロック共重合体を生合成し、遺伝子ベクターとしての機能を解析して来た [Numata et al. *Biomaterials* 2009, Numata et al. *J. Controlled Release*, 2010, Numata et al. *Biomacromolecules* 2010]。しかしながら、このシルクベースベクターは実用化に向けて選択性および遺伝子導入効率を更に向上させる必要があった。

2. 研究の目的

遺伝子治療は難病の治療を含め、将来的に必須の科学技術の一つであり、この技術の実現には疾病に応じた遺伝子ベクターが求められる。これまでに多くの遺伝子ベクターが研究され、高い遺伝子導入効率を示す多くのベクターが開発されて来た。しかしながら、特定の細胞や組織に遺伝子を発現させ、他の目的としない組織に対しては、細胞毒性を示さない遺伝子ベクターは未だ開発途上である。本申請課題では、乳癌細胞をターゲットとし、乳癌細胞にのみ選択的にかつ高効率で遺伝子を導入することを目指し、4 つの機能性ペプチドから構成されるテトラブロック共重合体を生合成し、新規遺伝子ベクターとしての有用性を明らかにすることを目的とする。

本研究では合成高分子の遺伝子ベクターには付加が難しいと考えられる癌細胞に特異的に吸着するペプチド (Tumor-Homing Peptide, THP) を遺伝子ベクターに付与することで、癌細胞へのターゲットデリバリー機能を強化する。また、pDNA と複合体を形成するために、ポリカチオン性の配列としてリジン、アルギニン、およびヒスチジンから成る配列、そして遺伝子導入効率を向上させる CPP を導入する。このように、テトラブロック構造を有するペプチドベース新規遺伝子ベクターを、大腸菌を用いたペプチド合成法により開発することを目指す。

本申請課題で合成したベクターを用いた場合、作業仮説とする反応機構としては、THP が癌細胞に選択的に吸着した後に、CPP が細胞膜を不安定化させ、シルクに保護された遺伝子とポリカチオンの複合体が細胞内にエンドサイトーシス経路で導入される。そして、ペプチドベクターが細胞内で酵素分解された後に、核に取り込まれた遺伝子が発現する機構を想定している。なお、シルクベースの

遺伝子ベクターにより pDNA が核まで送達される様子は申請者の過去の報告において確認されている [Numata et al. *J. Controlled Release*, 2010]。

次に、異なる機能を有する各セグメント (シルク、ポリカチオン、CPP、および THP) に期待する効果および明らかにする点を示す。遺伝子ベクターとしてこれまで利用して来たシルクタンパク質は、*Nephila clavipes* クモ由来の MaSp1 の 6 量体 (約 22kDa) であり、内包した pDNA を分解酵素から保護できることが明らかとなっている [Numata et al. *Biomacromolecules* 2010]。しかしながら、pDNA とイオン複合体を形成した際に、シルクの高い分子量により 100 nm 以下の複合体を調製することが困難であった。本研究では、更なる遺伝子導入効率の向上を目指し、ウィルスのサイズと同程度である粒径 80 nm の複合体を調製するため、シルクセグメントを 10kDa 程度まで低分子量化させることで、粒径の小さいポリイオン複合体を調製可能か明らかにする。これまでのシルクベースの遺伝子ベクターにおいて、ポリカチオン配列は 15 から 45 量体のポリリジンを用いてきたが [Numata et al. *Biomaterials* 2009]、アルギニンやヒスチジンを用いることで、遺伝子導入効率が飛躍的に向上することが複数のグループから報告されている [Chen et al. *Gene Ther.* 2000, Pichon et al. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001, Asayama et al. *Mol. Pharm.* 2008]。そこで、本申請課題では、ポリリジンおよびポリヒスチジンから成る交互共重合体を用いることで、遺伝子導入効率の向上を目指した。CPP は細胞膜を不安定化もしくは貫通する性質を有するペプチドであり、これまでに多くの CPP が報告されている [Holm et al. *Nat. Protoc.* 2006]。申請者の過去の研究では ppTG1 を用いたが、本申請課題では、最も幅広く研究されている Tat ペプチドの二量体 Tat2 も試した。癌細胞へのターゲットデリバリーを可能にする THP としては、乳癌細胞等の細胞表面に存在する Nucleolin に特異的に吸着もしくは追跡することが報告されている F3 ペプチドを用いる [Porkka et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, Christian et al. *J. Cell Biol.* 2003]。さらに、Lyp1 という異なる THP を候補に加えて実験を行った。本申請課題では、THP ペプチドをリガンドとして用いることで、癌細胞に特異的に遺伝子を送達し発現させる選択性を如何に向上できるか明らかにする。また、細胞膜を貫通するために必要である CPP を THP の隣に位置付けることで、THP により細胞表面に吸着した遺伝子ベクターが、効率良く細胞膜を貫通し、遺伝子を取り込まれる機構を目指す。

3. 研究の方法

シルク、ポリカチオン、CPP (Tat ペプチド)、および THP (F3 ペプチド) から成るテトラブロック共重合体をコードしたプラスミドをクローニングし、目的とするペプチドベースのテトラブロック共重合体を大腸菌により生合成する。得られたポリマーと pDNA を様々な比率で混ぜ合わせることでポリイオンコンプレックスを調製し、そのサイズ、表面電荷、形状、耐酵素分解性、細胞毒性を解析する。これらの結果を基に、80nm 程度の単一の粒径分布を有する試料を用いて、*in-vitro* 遺伝子導入実験を行う。F3 ペプチドが特異的に吸着すると報告のある MDA-MB-231 乳癌細胞および対照実験として MCF-10A 乳腺上皮細胞を用い、遺伝子導入効率および癌細胞への選択性を評価する。優れた結果を示したポリイオンコンプレックス試料は、各細胞を導入したマウスを用いて、*in-vivo* 遺伝子導入の効率および選択性を評価すると同時に、siRNA への応用を試みる。

4. 研究成果

ガン細胞に特異的に相互作用することが知られている二種類の THP を用いて、ガン細胞への特異的な遺伝子導入効率を調べた。具体的には、シルク-poly(L-lysine)-THP トリブロック構造を有する融合ペプチドを合成し、プラスミド DNA と混ぜ合わせることで直径約 143nm、表面電荷+13.8 mV 程度のコンプレックスを得ることができた。このコンプレックスはほぼ細胞毒性を示さず、また遺伝子導入効率は低いものの、特異的に癌細胞にのみ遺伝子導入することに *in-vitro* および *in-vivo* の系で成功した。

ガン細胞特異的な遺伝子導入効率の更なる向上を目指して、融合ペプチドとプラスミド DNA の複合体表面における THP の存在比率を上げることを試みた。シルク部分の分子量を 6 分の 1 に、ポリリジンの部分を 3 分の 1 に低下させ、相対的に THP の比率を高めた。その結果、*In-vitro* における遺伝子導入効を更に向上させることに成功した。この複合体が細胞に取り込まれる過程を走査型電子顕微鏡で観察した結果、ガン細胞へは複合体が吸着し、比較的短時間で取り込まれるのに対し、健常細胞へは吸着せず、取り込まれる複合体の数が圧倒的に少ないことが明らかとなった。

以上の結果から、ポリリジン配列によりプラスミド DNA とイオンコンプレックスを形成し、THP の存在比および融合ペプチドの配列を工夫することにより劇的に遺伝子導入効率を向上させられること、および癌細胞への特異的な導入が可能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 4 件)

- ① Sachiko Kaihara Nitta, Keiji Numata*. Biopolymer-based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, Special Issue "Bioactive Nanoparticles 2012", Volume 14, Issue 1, pp1629-1654, **2013**. (査読有り)
- ② Manoj Lakshmanan, Yutaka Kodama, Takeshi Yoshizumi, Kumar Sudesh, Keiji Numata*. Rapid and Efficient Gene Delivery into Plant Cells Using Designed Peptide Carriers. *Biomacromolecules*, Volume 14, Issue 1, pp10-16, **2013**. (査読有り)
- ③ Keiji Numata, Aneta J Mieszawska, Laura A. Kvenvold, David L Kaplan*. Silk-Based Nano-Complexes with Tumor Homing Peptides for Tumor-Specific Gene Delivery. *Macromolecular Bioscience* Volume 12, Issue 1, pp75-82, **2012**. (査読有り)
- ④ Keiji Numata, Michaela R Reagan, Robert H Goldstein, Michael Rosenblatt, David L Kaplan*. Spider Silk-Based Gene Carriers for Tumor Cell-Specific Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, Volume 22, Issue 8, pp1605-1610, **2011**. (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Keiji Numata, Yutaka Kodama, Takeshi Yoshizumi, Rapid and efficient gene delivery into plant cells using fusion peptide carrier, *International Polymer Conference*, Kobe, Japan, December 14th, 2012.
- ② Keiji Numata. Chemo-enzymatic synthesis of peptide polymers and their application for gene delivery. *American Chemical Society, Symposium on "Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biobased Materials"*, USA, August 21st, 2012.
- ③ Keiji Numata. Virus-inspired gene delivery systems into plant cells via functional polypeptides. *Gordon Research Conference on Bioinspired Materials*, USA, June 27th, 2012.
- ④ Keiji Numata. Gene delivery systems mediated polypeptides into animal and

plant cells. *Gordon Research Conference on Peptides, Chemistry & Biology of*, USA, February 22nd, 2012.

- ⑤ 沼田圭司、酵素触媒を用いた新規バイオポリマー合成、植物科学シンポジウム植物最先端研究への期待、品川、コクヨホール、2012年12月3日。
- ⑥ 沼田圭司、バイオポリエステルおよびバイオポリアミドの生合成とその応用、エコマテリアル研究会、東京、2012年7月6日。
- ⑦ 沼田圭司、ペプチドポリマーによるソフトマテリアルデザイン、第二回新規材料創成を目指した合成生物学、横浜、2012年1月27日。

〔図書〕(計1件)

- ① Jo-Ann Chuah, David Kaplan, Keiji Numata*. Engineering peptide-based carriers for drug and gene delivery. *Engineering in Translational Medicine*. Springer, London. 2014 (受理済み) .

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

理化学研究所 酵素研究チーム

http://www.riken.jp/bmep/teams/enzyme_research/index.html

ニュース等

- ① Global medical discovery. <http://globalmedicaldiscovery.com> (2013/03/08)

Rapid and efficient gene delivery into plant cells using designed Peptide carriers.

<http://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/rapid-and-efficient-gene-delivery-into-plant-cells-using-designed-peptide-carriers/>

- ② Genetically engineered spider silk improve gene therapy, *Kurzweililai News* (Aug. 11, 2011) (<http://www.kurzweililai.net/genetically-engineered-spider-silk-improve-gene-therapy>).
- ③ Genetically Engineered Spider Silk for Gene Therapy, *ScienceDaily* (Aug. 11, 2011) – Genetically engineered spider silk could help overcome a major barrier to the use of gene therapy in everyday medicine, according to a new

study that reported development and successful initial laboratory tests of such a material. It appears in ACS' journal *Bioconjugate Chemistry*. <http://www.sciencedaily.com/releases/2011/08/110810101559.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼田 圭司 (NUMATA KEIJI)

独立行政法人理化学研究所・酵素研究チーム・チームリーダー

研究者番号：40584529

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し