

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800045

研究課題名（和文） 人工ウイルスによるレドックス病変部位への薬物送達とその治療

研究課題名（英文） Drug delivery to redox-disease site using an artificial virus

研究代表者

戸井田 力

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40611554

研究成果の概要（和文）：

従来の薬物キャリアーは、病変細胞選択性に課題が残されていた。本研究では、天然に存在する球状タンパク質 Hsp16.5 に着目し、化学的あるいは遺伝子工学的な手法により、肝臓ガン・肝硬変選択性を賦与することに成功した。また、モデル薬物としてドキソルビシン(DOX)を修飾した修飾 Hsp を肝臓ガン細胞および正常肝臓細胞へ作用させたところ、肝臓ガン細胞への毒性はフリーの DOX と同等であったが、正常肝臓細胞への毒性は劇的に減少した。

研究成果の概要（英文）：

Traditional drug carriers do not have sufficient selectivity to disease cells. In this research, a naturally occurring protein cage, Hsp16.5, was fabricated to selectively deliver cargos into hepatoma cells through chemical and genetic methods. Resulting fabricated Hsp16.5 cages were selectively taken up by hepatoma cells, but not by normal hepatocyte. When conjugate with doxorubicin (DOX) and hepatoma-targetable Hsp were added to hepatoma and normal hepatocyte, cytotoxicity of this conjugates to hepatoma was comparable with that of free DOX, whereas this conjugates drastically reduced cytotoxicity to normal hepatocyte.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：ナノバイオ、医療・福祉、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

近年、疾患の原因が分子レベルで明らかとなり、異常分子をターゲットにした革新的な

治療薬が次々と開発されている。これらの治療薬を最大限に利用するには、治療薬を疾患細胞に対して効率的かつ選択的に送達でき

る薬物送達システムが必要不可欠である。しかしながら、現行の薬物キャリアーは疾患細胞への選択性が乏しく、臨床応用は難しい。したがって、疾患細胞への確にしかも効率よく薬物を送達できるシステムが実現できれば、従来の薬物療法の飛躍的な改善により、患者さんのQOLを劇的に改善できると期待される。

2. 研究の目的

新規な薬物キャリアーのモデルとして、ウイルスは極めてよいお手本である。ウイルスはシンプルな構造ながら、自身のキャプシド構造を巧みに利用し、標的細胞への侵入、自身の遺伝子の放出を効率よく放出し、感染する。しかし、ウイルスそのものは病原性の観点からの薬物キャリアーとしては望ましくない。そこで、天然に存在するHsp16.5に着目した。Hsp16.5は24個のモノマーが自己会合することで、内孔10 nm・外径15 nmの球状のナノカプセルを形成する(図1)。また、ナノカプセルのC末端側は外部に露出しており、この領域に疾患細胞に対するパイロ分子を修飾することが可能である。さらに、ナノカプセル内部は疎水性のアミノ酸が多数存在しているため、疎水性の薬物を封入することが可能である。

しかし、Hsp16.5自身を実験動物に投与しても、特定組織への選択性を全く示さなかった。そこで、本研究では、肝臓疾患(肝硬変および肝臓ガン)をターゲットとし、Hsp16.5の化学的・遺伝子工学的な修飾を通じて、疾患細胞への標的性を賦与することを目的とした。

3. 研究の方法

Hsp16.5を化学修飾あるいは遺伝子工学的に修飾することで、修飾Hspが疾患細胞に選択的に取り込まれるか評価した。また、ドキシソルビシンをモデル薬物として選択し、毒性を評価した。

(1) 肝星細胞への標的化

肝星細胞は肝硬変の原因細胞である。肝星細胞はビタミンAを積極的に取り込むこと、また肝星細胞を殺すことで、肝硬変を治癒できることがすでに報告されている。そこで、HspナノカプセルにビタミンAを修飾することで、肝星細胞内への積極的な取込みが期待された。Hspナノカプセルにポリエチレングリコール(分子量2,000)を介してビタミンAを修飾した(Hsp-PEG-VA)。蛍光ラベル化したHsp-PEG-VAをRI-Tラット肝星細胞およびRLN-8ラット正常肝臓細胞に加え、蛍光顕微鏡により、取込みを比較した。

(2) 肝臓ガン細胞への標的化

肝臓ガン細胞に特異的に結合するSP94ペプチド(SFSIIHTPIPL)を化学的あるいは遺伝子工学的に修飾し、肝臓ガンターゲット能を評価した。SP94ペプチドの肝臓ガン細胞および正常肝臓細胞への解離定数はそれぞれ0.1 nMおよび10 μMであることが報告されている(*Mol. Cancer Therapeut.*, 7, 579, 2008)。

① SP94ペプチドの化学修飾

N末端およびC末端にペプチドリンカーを介してシステインを修飾した。ここでは、Ac-CGGSGSFSIIHTPIPL-NH₂をSP94-N、Ac-SFSIIHTPIPLGGC-NH₂をSP94-Cと呼ぶ。はじめに、Hsp16.5を両末端にサクシンイミジル基およびマレイミド基を有する二価性ポリエチレングリコール(SM-PEG)(重合度12および24)アミド結合を介して修飾し、次いでSP94-NあるいはSP94-Cを作用させることで、Hsp16.5にSP94ペプチドを修飾した(Hsp-PEG-SP94)。SM-PEGの長さ、ペプチドの修飾量、ペプチド修飾末端の異なる計6種を作製した。この修飾Hspナノカプセル蛍光分子を修飾し、肝臓ガン細胞(Huh-7、HepG2)および正常肝臓細胞(RLN-8)への取込み量を蛍光顕微鏡および蛍光強度から評価した。

② SP94ペプチドの遺伝子工学的な修飾

HspナノカプセルのC末端側に遺伝子組換えにより、SP94ペプチドを修飾した。SP94ペプチドはペプチドリンカー(Gly, Ser)を3、5、11残基と変化させた(図1)。以下、それぞれHsp-SP94(L3)、Hsp-SP94(L5)、Hsp-SP94(L11)と呼ぶ。Hsp-SP94(L5)およびHsp-SP94(L11)を蛍光修飾し、肝臓ガン細胞およびそれ以外の細胞に加え、取り込みを蛍光顕微鏡により評価した。

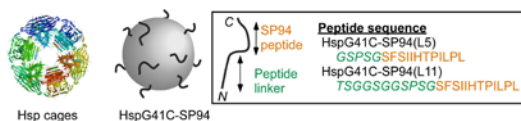


図1. SP94ペプチド修飾Hspナノカプセル

また、エンドソーム内pHで加水分解されるヒドラジンリンカーを介してマレイミド基が修飾されたドキシソルビシン誘導体(DOX-Ma1)を作製した。DOX-Ma1をHsp-SP94(L11)内孔に存在するシステイン残基にマイケル付加により修飾し(Hsp-SP94(L11)-DOX)、Huh-7細胞およびRLN-8細胞に対する毒性を評価した。コントロールとして、フリーのDOXおよび天然HspにDOX-Ma1を修飾したHsp-DOXを用いた。Hsp-SP94(L11)に近赤外蛍光分子を修飾し、

Huh-7 細胞を移植したマウスに尾静脈投与し、体内動態を評価した。

4. 研究成果

(1) 肝星細胞への標的化

蛍光標識した Hsp-PEG-VA をラット肝星細胞およびラット正常肝臓細胞に加えたところ、ラット肝星細胞から蛍光が見られたのに対して、ラット正常肝臓細胞からは蛍光が検出されなかった。今後、全身投与による肝星細胞へのデリバリーを考えた場合、血中滞留性を考慮する必要がある。また、今回比較的分子量の小さな PEG を使用したが、PEG の分子量を大きくすることで、ビタミン A の自由度が増し、標的性・効率が劇的に向上する可能性がある。したがって、今後、PEG の分子量の検討が重要であると考えられる。

(2) 肝臓ガン細胞への標的化

① SP94 ペプチドの化学修飾

PEG リンカーを介して SP94 ペプチドが修飾された Hsp ナノカプセル (Hsp-PEG-SP94)、PEG リンカーの長さ、ペプチド修飾密度、ペプチド修飾末端の違いによらず、いずれも肝臓ガン細胞に選択的に取り込まれた。しかしながら、ペプチド修飾密度が向上するにつれ劇的に肝臓ガン細胞への取込み量が向上した。これは、ペプチド修飾密度が大きくなることで、Hsp-PEG-SP94 がより効率的に細胞表面レセプターに結合できることを示している (多価効果)。興味深いことに、SP94-N を修飾した Hsp-PEG-SP94 は SP94-C を修飾したものより、肝臓ガン細胞への取込み量が最大で 10 倍大きかった。ペプチドによる標的細胞へのデリバリー法は多数報告されているが、ペプチドの修飾末端に関してはほとんど議論されてこなかった。本成果は、ペプチドによる標的化を試みている研究者に極めて重要であると考えている。本成果に関しては、米国化学会の Bioconjugate Chemistry 誌に掲載されている。

② SP94 ペプチドの遺伝子工学的な修飾

ペプチドリリンカーの最も短い Hsp-SP94 (L3) は大腸菌から発現されるものの、球状構造が形成できないことが分かった。これは、SP94 ペプチドがナノカプセルの自己組織化を妨げていることを意味しており、比較的大きなペプチドの修飾には長いリンカーが必要であることを示している。

次に、蛍光修飾した Hsp-SP94 (L5) および Hsp-SP94 (L11) を、肝臓ガン細胞およびそれ以外の細胞に加えたところ、肝臓ガン細胞からのみ蛍光が確認された (図 2)。また、SP94 ペプチド共存下で同様の実験を行ったところ、蛍光強度が 7 割程度減少した。この結果は、肝臓ガン細胞表面で発現しているレセプ

ターを介して Hsp-SP94 (L11) が取込まれていることを示している。また、Hsp-SP94 (L11) の方が強い蛍光を示した。これは、よりリンカー長の長い Hsp-SP94 (L11) の方が SP94 ペプチドの自由度が高く容易に細胞表面レセプターに結合できるためと推測した。

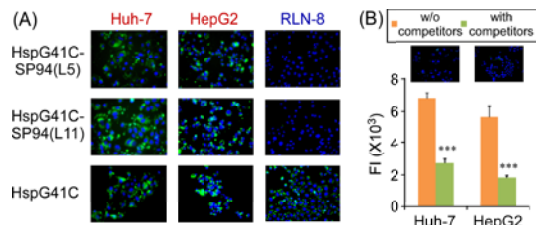


図 2. Hsp-SP94 の細胞への取込み

(A) 蛍光顕微鏡での観察。緑はナノカプセル、青は細胞核を示す。(B) 過剰量の SP94 ペプチド共存下での Hsp-SP94 (L11) の取込み。

Hsp-SP94 (L11) が肝臓ガンをターゲットとした薬物デリバリーへ応用できるか検討するために、酸性環境下で DOX がリリースされるコンジュゲート体 Hsp-SP94 (L11)-DOX を作製した。Hsp-SP94 (L11)-DOX を Huh-7 肝臓ガン細胞へ加えたところ、細胞毒性 (IC₅₀ 値) は同等であったのに対して、RLN-8 正常肝臓細胞に加えた場合は、フリーの DOX に対して 15 倍、天然型 Hsp-DOX の 5 倍程度低かった。今回作製した Hsp-SP94 (L11) は肝臓ガン細胞に高い選択性により正常肝臓細胞に対する副作用を劇的に減少することが可能であった。(本成果の一部は International Journal of Nanomedicine 誌に掲載されており、一部は査読中である。)

最後に、Huh-7 担ガンマウスに近赤外蛍光修飾 Hsp-SP94 (L11) を尾静脈投与し、体内動態を評価したところ、わずかに Huh-7 組織への蓄積がみられた。リンカー長を主とする分子構造の最適化が今後の課題である。

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 1 1 件)

1. Riki Toita, Masaharu Murata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida, Makoto Hashizume, Biological evaluation of protein nanocapsules containing doxorubicin, International Journal of Nanomedicine, 査読有, 8 (2013) 1989-1999, <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S4023>

2. Shujiro Shiosaki, Takanobu Nobori, Takeshi Mori, Riki Toita, Yuta Nakamura, Chan Woo Kim, Tatsuhiko Yamamoto, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, A protein kinase assay based on FRET between quantum dots and fluorescently-labeled peptides, *Chemical Communications*, 査読有, 49 (2013) 5592-5594, 10.1039/C3CC41680A
 3. Jeong-Hun Kang, Riki Toita, Chan Woo Kim, Yoshiki Katayama, Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design, *Biotechnology Advanced*, 査読有, 30 (2012) 1662-1672, 10.1016/j.biotechadv.2012.07.004
 4. Riki Toita, Jeong-Hun Kang, Tetsuro Tomiyama, Chan Woo Kim, Shujiro Shiosaki, Takuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Gene Carrier showing all-or-none type response to cancer cell signaling, *Journal of American Chemical Society*, 査読有, 134 (2012) 15410-15417, dx.doi.org/10.1021/ja305437n
 5. Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Kaori Umezaki, Riki Toita, Shigekazu Tabata, Jing Shu Piao, Kana Abe, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida, Lin Cui, Makoto Hashizume, Liver cell specific targeting by the preS1 domain of hepatitis B virus surface antigen displayed in protein nanocages, *International Journal of Nanomedicine*, 査読有, 7 (2012) 4353-4362, http://dx.doi.org/10.2147/INJ.S31365
 6. Yoshiro Tahara, Takeshi Kaneko, Riki Toita, Chiharu Yoshiyama, Takuya Kitaoka, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Noriho Kamiya, Masahiro Goto, A novel double-coating carrier produced by solid-in-oil and solid-in-water nanodispersion technology for delivery of genes and proteins into cells, *Journal of Controlled Release*, 査読有, 161 (2012) 713-721, 10.1016/j.jconrel.2012.05.001
 7. Riki Toita, Masaharu Murata, Shigekazu Tabata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Makoto Hashizume, Development of human hepatocellular carcinoma cell-targeted protein cages, *Bioconjugate Chemistry*, 査読有, 23 (2012) 1494-1501, dx.doi.org/10.1021/bc300015f
 8. Riki Toita, Takeshi Mori, Yuki Naritomi, Jeong-Hun Kang, Shujiro Shiosaki, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Fluorometric detection of protein kinase C α activity based on phosphorylation-induced dissociation of a polyion complex, *Analytical Chemistry*, 査読有, 84 (2012) 130-136, 10.1016/j.ab.2012.01.036
 9. Shujiro Shiosaki, Masanori Kuramoto, Riki Toita, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, A hydrophilic polymer grafted with a histone tail peptide as an artificial gene regulator, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有, 19 (2011) 4101-4105, 10.1016/j.bmc.2011.05.011
 10. Haruka Koga, Riki Toita, Takeshi Mori, Tetsuro Tomiyama, Jeong-Hun Kang, Takuro Niidome, Fluorescent nanoparticles consisting of lipopeptides and fluorescein-modified polyanions for monitoring protein kinase activity, *Bioconjugate Chemistry*, 査読有, 22 (2011) 1526-1534, dx.doi.org/10.1021/bc200066w
 11. Tetsuro Tomiyama, Riki Toita, Jeong-Hun Kang, Haruka Koga, Shujiro Shiosaki, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Effect of introduction of chondroitin sulfate into polymer-peptide conjugate responding to intracellular signals, *Nanoscale Research Letters*, 査読有, 6 (2011) 532-538, 10.1186/1556-276X-6-532
- [図書] (計2件)
1. Riki Toita, Yoshiki Katayama, Jeong-Hun Kang, Nova Publisher, *Advances in nanotechnology* (2011), 22 ページ (pp317-338)
 2. Jeong-Hun Kang, Riki Toita, Masaharu

Murata, Studium Press, Application of
Nanomedicine (2012), 26 ページ
(pp353-378)

〔その他〕
ホームページ等

レドックスナビ研究拠点
<http://redoxnavi.kyushu-u.ac.jp/>

歯学研究院生体材料学講座
<http://rikou5.dent.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸井田 力 (TOITA RIKI)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：40611554