

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650263

研究課題名(和文) 遺伝子治療のための高比重リポ蛋白質の構造機能改変

研究課題名(英文) Manipulation of high-density lipoprotein structure and function for development of gene delivery carrier

研究代表者

村上 達也 (Murakami, Tatsuya)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授

研究者番号：90410737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、治療用遺伝子を体内の望みの部位に運ぶナノ材料を生体成分から開発することを目指している。申請者は生体内に存在する直径10nmの高比重リポタンパク質(HDL)に着目した。HDLは試験管の中でapoA-I蛋白質とリン脂質から作製できる。しかしHDLを血管内投与すると、肝臓細胞など正常細胞の持つHDL受容体に認識される。従って望みの部位(例えば癌組織など)にHDLを集積させるために、このHDL受容体に認識されにくくする必要がある。遺伝子組換え技術を用いて、様々なapoA-I部分断片を有するHDLを作製し、HDL受容体への親和性を評価したところ、親和性が低下したHDLを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Our purpose in this study is to develop nanomaterials capable of delivering therapeutic gene to desired sites, such as cancer tissues, by utilizing natural nanomaterials in our body. High-density lipoprotein (HDL) is a natural nanomaterial that delivers lipids from peripheral tissues to the liver in our body. Due to its physiological functions, HDL have a propensity to accumulate in liver via HDL receptor recognition of apoA-I moiety in HDL. In order to weaken this recognition in the liver and then to redirect HDL to desired sites, we designed 9 apoA-I deletion mutants and succeeded in preparation of 8 HDL mutants. Among them, a few HDL mutants were found to show decreased affinity to the HDL receptor.

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：遺伝子キャリア ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

遺伝子キャリアを含めほとんどのドラッグキャリアは、生体適合化のため、ポリエチレングリコール(PEG)で表面修飾する必要がある。しかし PEG は遺伝子の細胞内導入を阻害するだけでなく、近年抗原性を示すことも明らかとなった。これに対して申請者は、我々の血中に存在する高比重リポタンパク質(HDL)に着目した。HDL は試験管内でリン脂質と脂質結合タンパク質 apoA-I から作製でき、生体適合化のための PEG 修飾が不要である。

天然の HDL の大きさは約 10 nm であるが、申請者は HDL のサイズを薬物内包によって 100 nm 以上にまで制御することに成功している。一般に 5-100 nm ナノ粒子は癌・炎症組織に集積することが知られているため、サイズコントロールされた HDL も癌・炎症組織集積性を示す可能性がある。

HDL は末梢組織から肝臓へ余剰コレステロールを輸送する。この肝臓輸送には Scavenger Receptor class B type I (SR-BI) と呼ばれる HDL 受容体が関与している。SR-BI による HDL 認識は apoA-I を介して行われることから、肝臓以外への集積性を HDL に付与するためには、SR-BI 認識を軽減させることが必要である。apoA-I は 243 アミノ酸からなり、10-20 アミノ酸程度から構成される α -helix がベルト状につながった構造を有するとされている。そこで申請者は、この α -helix 単位で欠損させた様々な apoA-I 欠損変異体を作製し、得られる HDL の SR-BI 親和性を軽減させることを考えた。

2. 研究の目的

様々な apoA-I 断片を含む HDL 変異体ライブラリーを作製し、その中から SR-BI 低親和性の HDL を見いだす。さらにその HDL の遺伝子キャリアとしての機能を評価する。

3. 研究の方法

apoA-I 断片は遺伝子組換えにより得た。HDL の作製は、apoA-I 断片とリン脂質ミセルを混合して静置し、その後透析することにより行った。SR-BI 親和性評価は、SR-BI 安定発現細胞を用いて行った。具体的には、野生型 HDL (全長 apoA-I を含む。以後 HDL(wt) と表記) を蛍光ラベルし、この蛍光ラベル HDL(wt) の上記細胞への結合活性が、各 HDL 変異体共存下でどの程度減少するかを、fluorescence-activated cell sorter (FACS) で調べた。蛍光ラベルしていない HDL(wt) を共存させたときの減少度と比較することで、各 HDL 変異体の SR-BI 親和性を評価した。

4. 研究成果

設計した apoA-I 欠損変異体を図 1 に示す。SR-BI 高親和性領域が N, C 両末端に存在するとの報告も考慮し、9 種の欠損変異体遺伝子設計・作製した。このうち、8 種類の蛋白

質が大腸菌で発現が確認された。

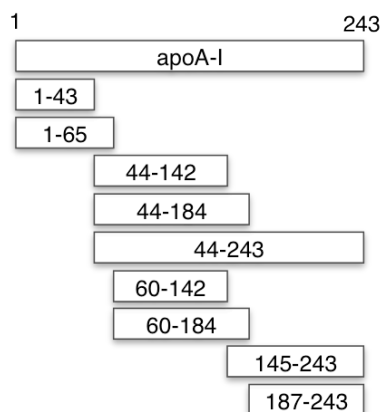


図 1. 本研究で作製した apoA-I 欠損変異体の一次構造 N 末端 43 アミノ酸からなる変異体以外、全ての変異体は大腸菌発現で取得可能であった。

各 apoA-I 欠損変異体から得られた HDL 変異体の大きさを表 1 に示す。各 HDL 変異体は、欠損により残ったアミノ酸残基番号を利用して表記されている。例えば、N 末端 59 アミノ酸と C 末端 101 アミノ酸を欠損させた HDL は、HDL(60-142) となる。HDL(wt) は phospholipid/protein molar ratio = 100 で作製すると天然型同様約 10 nm の粒子径を示す。これに対して同 molar ratio で HDL 変異体を作製した場合、その粒子径は野生型に比べて大きくなった。これはおそらく apoA-I 欠損変異体では phospholipid/protein weight ratio が増大して phospholipid 過剰下で粒子形成がなされたためと、欠損によって得られる HDL が不安定化したための両方が考えられる。そこで

表 1. 各種 HDL 変異体の平均粒子径 d

Name	d (nm)	
	Weight ratio*	Molar ratio*
HDL(wt)	11	11
HDL(1-65)	40	46
HDL(44-142)	36	31
HDL(44-184)	31	37
HDL(44-243)	18	15
HDL(60-142)	14	20
HDL(60-184)	10	13
HDL(145-243)	35	53
HDL(187-243)	23	31

* Weight ratio と Molar ratio は HDL 作製時の lipid/protein 混合比(=100)を表す。

HDL(wt)と同じ protein/phospholipid weight ratio で各 HDL 変異体を作製すると、ほぼすべての場合で粒子径は減少し、野生型の粒子径に近づくものも存在した。

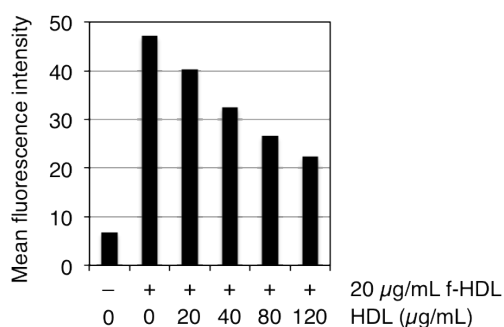


図 2. FACS による CHO-SR-BI への f-HDL 結合活性とその SR-BI 依存性の評価 f-HDL の細胞への非特異的結合を抑制するため、2 mg/mL BSA を共存させた。

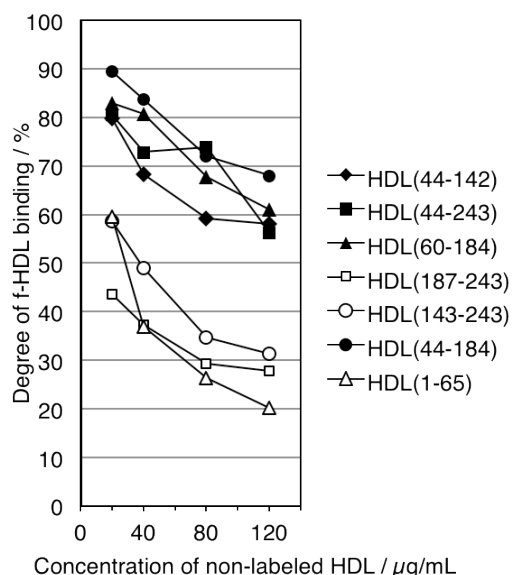


図 3. FACS による各種 HDL の CHO-SR-BI への結合活性評価 2 mg/mL BSA 存在下、各種 HDL による f-HDL (20 µg/mL) の結合活性阻害の程度を表す。この値が高いほど、その HDL 変異体の SR-BI 結合活性は低いことを示唆する。

SR-BI 安定発現細胞(CHO-SR-BI)は、東京大学大学院薬学研究科の新井洋由教授よりご提供頂いた。CHO-SR-BI を用いて SR-BI 親和性を FACS で高感度に評価するためには、HDL(wt)をその SR-BI 親和性にできる限り影響を与えない範囲で、より多くの蛍光物質でラベルする必要がある。具体的には、結合に応じて蛍光強度が大きく上昇し、かつラベルしていない HDL(wt)共存下ではその蛍光強度が大きく低下する(=結合が SR-BI 依存的事)ことが望ましい。反応条件を種々検討した結果、2 mg/mL ウシ血清アルブミン(BSA)

(HDL の CHO-SR-BI への SR-BI 非依存的な結合を抑制するために添加) 存在下、CHO-SR-BI への結合によって蛍光強度が~7 倍上昇し、6 倍量のラベル化していない HDL(wt)共存下で~60%蛍光強度が低下する蛍光ラベル HDL(wt) (f-HDL(wt))を作製することに成功した(図 2)。

この f-HDL(wt) (20 µg/mL)と各 HDL 変異体を共存させ、CHO-SR-BI への f-HDL(wt)結合阻害度を比較した(図 3)。この結果、検討した 7 種の HDL 変異体のうち、HDL(wt)よりも SR-BI 結合活性が低下したものは、HDL(44-142), HDL(44-243), HDL(60-184), HDL(44-184)であり、逆に SR-BI 結合活性が増強したものは、HDL(187-243), HDL(143-243), HDL(1-65)となった。N, C 両末端を欠損させると SR-BI 結合活性は低下し、その低下度は C 末端を欠損させた場合に大きくなり、これらは前述した過去の知見と矛盾しない。

現在、最も SR-BI 結合活性の低下した HDL(44-184)を基にさらに変異体作製を進め、欠損の最適化を行っている。さらに HDL(44-184)のサイズや HDL 作製に用いるリン脂質の種類を種々変えることで SR-BI 結合活性に与える影響についても研究を進める予定である。

以上まとめると、近年抗原性が明らかとなった合成高分子 PEG を必要としない遺伝子キャリアとして、我々の血中に存在するナノ粒子 HDL に注目し、新しい生体適合性遺伝子キャリアの開発を目指した。体内の望みの部位、例えば癌組織、に HDL を集積させるため、HDL 受容体 SR-BI に認識されにくい HDL 変異体を作製するため、様々な apoA-I 断片を含む HDL 変異体を作製した。SR-BI 発現細胞を用いる結合活性評価系を構築し、各 HDL 変異体を評価した結果、元の HDL よりも顕著に結合活性の低下した変異体 HDL(44-184)を見いだした。

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 10 件)

1. Murakami, T., Nakatsuji, H., Inada, M., Matoba, Y., Umeyama, T., Tsujimoto, M., Isoda, S., Hashida, M., Imahori, H., Photodynamic and photothermal effects of semiconducting and metallic-enriched single-walled carbon nanotubes, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134, 17862-17865. 査読有
DOI: 10.1021/ja3079972
2. Murakami, T., Phospholipid nanodisc engineering for drug delivery systems, *Biotechnology Journal*, 2012, 7, 762-767. 査読有
DOI: 10.1002/biot.201100508
3. Kasai, H., Murakami, T., Ikuta, Y., Koseki, Y., Baba,

- K., Oikawa, H., Nakanishi, H., Okada, M., Shoji, M., Ueda, M., Imahori, H., Hashida, M., Cration of pure nanodrugs and their anticancer properties, *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51, 10315-10318. 査読有
DOI: 10.1002/anie.201204596
- Numata, T., Murakami, T., Kawashima, F., Morone, N., Heuser, J. E., Takano, Y., Ohkubo, K., Fukuzumi, S., Mori, Y., Imahori, H., Utilization of photoinduced charge-separated state of donor-acceptor-linked molecules for regulation of cell membrane potential and ion transport, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134, 6092-6095. 査読有
DOI: 10.1021/ja3007275
 - Kohara, K.; Yamamoto, S.; Seinberg, L.; Murakami, T.; Tsujimoto, M.; Ogawa, T.; Kurata, H.; Kageyama, H.; Takano, M., arboxylated SiO₂-coated a-Fe nanoparticles: towards a versatile platform for biomedical applications, *Chemical Communications*, 2013, 49, 2563-2565. 査読有
DOI: 10.1039/c3cc39055a.
 - Maeda, Y.; Higo, J.; Amagai, Y.; Matsui, J.; Ohkubo, K.; Yoshigoe, Y.; Hashimoto, M.; Eguchi, K.; Yamada, M.; Hasegawa, T.; Sato, Y.; Zhou, J.; Lu, J.; Miyashita, T.; Fukuzumi, S.; Murakami, T.; Tohji, K.; Nagase, S.; Akasaka, S., Helicity-selective photoreaction of single-walled carbon nanotubes with organosulfur compounds in the presence of oxygen, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135, 6356-6362. 査読有
DOI: 10.1021/ja402199n.
 - Ikuta, Y.; Koseki, Y.; Murakami, T.; Ueda, M.; Oikawa, H.; Kawai, H., Fabrication of pure nanodrugs of posophyllofoxin dimer and their anticancer activity, *Chemistry Letters*, 2013, 42, 900-901. 査読有
DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.130224>.
 - Mathew, S.; Murakami, T.; Nakatsuji, H.; Okamoto, H.; Morone, N.; Heuser, J. E.; Hashida, M.; Imahori, H., Exclusive photothermal heat generation by a bis(naphthalocyanine) complex and inclusion into modified high-density lipoprotein nanocarriers for therapeutic applications, *ACS Nano*, 2013, 7, 8908-8916. 査読有
DOI: 10.1021/nn403384k.
 - Nakamura, M.; Tahara, Y.; Murakami, T.; Iijima, S.; Yudasaka, M., Gastrointestinal actions of orally-administered single-walled carbon nanohorns, *Carbon*, 2014, 69, 409-416. 査読有
DOI: 10.1088/0957-4484/22/46/465102.
 - Hashida, Y.; Tanaka, H.; Zhou, S.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Murakami, T.; Umeyama, T.; Imahori, H.; Hashida, M., Photothermal ablation of tumor cells using a single-walled carbon nanotube–peptide composite, *Journal of Controlled Release*, 2014, 173, 59-66.
- [学会発表] (計 14 件)
- 稲田真実、村上達也、中辻博貴、梅山有和、今堀博、近赤外光照射時に高い光線力学効果を発現する単層カーボンナノチューブの探索と応用、日本化学会第 93 春季年会(2013)、2013 年 03 月 22 日-2013 年 03 月 25 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス
 - 中辻博貴、村上達也、諸根信弘、John E. Heuser、橋田充、今堀博、細胞膜透過性高比重リポタンパク質による金ナノロッドの生体適合化と細胞内送達、日本化学会第 93 春季年会(2013)、2013 年 03 月 22 日-2013 年 03 月 25 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス
 - Murakami, T., Light-harvesting carbon nanomaterials for cell biology and therapy, RSC-iCeMS International Symposium(招待講演), 2013 年 03 月 17 日-2013 年 03 月 18 日, Kyoto University, Kyoto
 - Murakami, T., Biochemical Engineering of Mesoscale Lipid-Protein Composite Biomaterials for Drug Delivery System, CLS-iCeMS Joint Symposium(招待講演), 2012 年 04 月 20 日-2012 年 04 月 22 日, Tsinghua University, Beijing
 - 村上達也、生体由来ナノディスクの機能改変と生物医学応用、第 7 回ナノ・バイオメディカル学会大会(招待講演)、2013 年 01 月 24 日-2013 年 01 月 24 日、京都テルサ
 - 稲田真実、村上達也、中辻博貴、的羽良典、梅山有和、橋田充、今堀博、近赤外光照射時に活性酸素種を高効率生成する単層カーボンナノチューブの探索:光線力学的療法への応用を目指して、日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012、2012 年 11 月 26 日-2012 年 11 月 27 日、仙台国際センター
 - 中辻博貴、村上達也、諸根信弘、John E. Heuser、橋田充、今堀博、ディスク状高比重リポタンパク質と金ナノロッドの融合:新しい有機無機複合体材料の作製と機能評価、日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012、2012 年 11 月 26 日-2012 年 11 月 27 日、仙台国際センター
 - Murakami, T., Enhancement of Photodynamic Effect by Single Chirality Separation of Semiconducting Single-walled Carbon Nanotubes: Application to Photodynamic Therapy, CBI 学会 2013 年大会, 2013 年 10 月 28 日-2013 年 10 月 31 日, タワーホール船堀
 - 中辻博貴・小山 祥平・木村 佑・高野 勇太・沼田 朋大・森 泰生・今堀 博・村上 達也、細胞接着性金ナノロッドの作製と細胞膜蛋白質の光制御への応用、日本化学会第 94 回春季年会、2014 年 03 月 27 日-2014 年 03 月 30 日、名古屋大学
 - Hyungjin Kim、岡本陽己、土田邦博、村上達也、カチオン性ペプチド融合高比重リポタンパク質の開発、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、2013 年 11 月 25 日-2013 年 11 月 26 日、タワーホール船堀
 - 村上達也、Simon Mathew、中辻博貴、岡本陽己、橋田充、今堀博、サンドイッチ型ナフトロシアニウム錯体内包り蛋白質の光照射による熱選択的産生と殺細胞活性、2013 年 11 月 25 日-2013 年 11 月 26 日、タワーホール船堀
 - 村上達也、中辻博貴、稲田真実、的羽良典、橋田充、今堀博、カーボンナノチューブの光線力学効果と殺細胞活性、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、2013 年 07 月 04 日-2013 年 07 月 05 日、京都テルサ
 - 村上達也、光応答性ナノ材料による細胞工学と難病治療、第 10 回光科学若手研究会(招待講演)、2013 年 05 月 11 日-2013 年 05 月 11 日、京都大学宇治キャンパス

ス

14. 村上達也、ナノテクノロジーを用いた難病治療法の開発に向けて、福井プロジェクト・グループ主催 岡山大学・岡山理科大学・津山工専 Try アングル・インターネット講演会(招待講演)、2013年04月05日-2013年04月05日、津山工専

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.murakami.icems.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 達也 (MURAKAMI, Tatsuya)

研究者番号：90410737

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：