

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658281

研究課題名(和文)免疫応答回避性の糸状菌界面活性蛋白質の探索とその医療用ナノ粒子への応用

研究課題名(英文)Development of immune-response free nano-particles using fungal biosurfactant protein

研究代表者

阿部 敬悦(Abe, Keietsu)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50312624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ粒子は医療応用が期待されているが、免疫系での捕捉が課題である。近年、糸状菌の界面活性蛋白質が免疫応答回避(ステルス)能を有することが示された。本研究では、金属ナノ粒子を麹菌由来の精製界面活性蛋白質RoIAで被覆した新規ステルスナノ粒子の開発を行った。精製RoIAおよびRoIA被覆粒子は樹状細胞においてサイトカイン産生を誘起せず、RoIA被覆粒子はマクロファージによる貪食が低下していた。RoIA被覆粒子をマウスに静脈投与し、肝臓・脾臓への蓄積をMRIで観察したところ、RoIA被覆粒子は両臓器への取り込みが低下していた。以上、RoIA被覆粒子のステルス性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Although nano-particles have been developed for medical treatments, immune-responses including phagocytosis by macrophages are a major obstacle for medical use. Recently, a biosurfactant protein, hydrophobin originating from conidia of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* has been shown as an escaping factor from host immune-systems (stealth factor). In the present study, we developed novel stealth nano particles coated with the hydrophobin RoIA of the industrial fungus *Aspergillus oryzae*. Fe₃O₄ nano-particles were coated with purified RoIA. When RoIA-coated particles were incubated with dendritic cells, cytokine production from dendritic cells was not stimulated. RoIA-coated particles showed lower levels of phagocytosis by macrophages than non-coated particles. When RoIA-coated particles were administered to mice by intravenous injection, RoIA-coated particles indicated significantly lower levels of accumulation to the liver and spleen than non-coated particles by MRI-imaging.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：hydrophobin ナノ粒子 免疫応答 マクロファージ 貪食 イメージング 糸状菌 *Aspergillus*

1. 研究開始当初の背景

(1)医療用ナノ粒子と課題：医療用ナノ粒子は、蛍光イメージング、MRI、中性子捕捉療法、磁気温熱療法分野、薬物送達系(DDS)としての利用が期待されている。MRI やCT では固体ナノ粒子がイメージング試薬として利用できるが、静脈内に投与したナノ粒子の殆どが肝臓や脾臓などの細網内皮系(網内系)に捕捉され(マクロファージの貪食) 標的組織へ送達できないことが大きな課題となっている。網内系に捕捉されないナノ粒子を創成できれば、少投与量 で高性能な診断・治療用のプローブを達成できる。我々は、有機・無機ハイブリッド技術を用いた、多種の金属酸化ナノ粒子の精密合成に成功し、特にがん細胞送達選択性の高い精密サイズ制御(20nm)ナノ粒子を合成した(高見ら *Dalton Transactions*, 5442 [2008])。しかし、網内系での捕捉対策が課題となっていた。

(2)ステルス微生物素材の発見と生産：近年、ある種の病原真菌が動物全般に対し、1,3-β-D-グルカン(AG) (*PNAS* 104:1366, 2007)やヒドロフォピン(HP) (*Nature* 460:1117, 2009)を細胞表面に発現することで自身を免疫系から回避し(ステルス機能) 感染宿主での生存を図っていることが報告された。我々は以前より、これらの研究とは関連しない抗真菌剤開発(藤岡 *Euk. Cell* 16:1497[2007])やプラスチックの分解研究(高橋ら *Mol Microbiol* 57:1780, 2005)において、独立にこれらの新素材を発見して素材生産を行っていた(AG-阿部ら特許 4595074 号; HP-阿部ら特許 4273504 号)。

(3)免疫応答評価系：申請者らは(川上・福本)、ステルス素材の免疫応答評価系としてマウス樹状細胞・マクロファージを用いた評価系を有しており(宮里ら *Infect Immun* 77: 3056, 2009)、既に麹菌 HP 群のうち RoIA の予備評価を行って良好な結果を得ている(阿部ら特願 2011-176686)。

(4)ステルスナノ粒子構想：ナノ粒子を新規ステルス微生物素材で被覆することでナノ粒子をステルス化し、網内系に捕捉されことなく標的組織に送達するための技術開発が浮上した。

2. 研究の目的

医療用ナノ粒子では、ヒトや動物への投入時の免疫系による粒子の捕捉が大きな課題となっている。本研究では、生体中で安定な金属酸化ナノ粒子に、糸状菌由来の新規の免疫応答回避(ステルス)因子である界面活性蛋白質を被覆し、ステルス機能と水溶性を賦与した、新規のステルスナノ粒子を創成する。その新粒子のステルス機能を免疫細胞・動物アッセイ系で評価する。併せて、糸状菌由来の複数の界面活性蛋白質のステルス性を評価し、最適なステルス因子を選択する。

3. 研究の方法

(1)ステルス素材用新規界面活性蛋白質の探

索・発見・精製～糸状菌、例えば麹菌は固体表面に接着する際、細胞表面に様々な界面活性蛋白質を発現して機能を発揮すること明らかにしてきた(高橋ら *Mol Microbiol* 57:1780, 2005; 大滝ら *Appl. Environ Microbiol.* 72, 2407, 2006)。麹菌を種々の固体表面と接触培養を行うことで、固体表面に界面活性蛋白質を結合させて、それらを溶出後、蛋白質のN-末端ペプチドをペプチドシークエンサーおよび質量分析によって決定する。ペプチド配列を麹菌ゲノム情報と照合することで、新規界面活性蛋白質を同定する。同定された界面活性蛋白質は、麹菌組み換え体として生産・精製する。生産した界面活性蛋白質は、以下(2)で免疫応答評価を行った後に、(3)でナノ粒子の被覆を行う。

(2)界面活性蛋白質の樹状細胞を用いた免疫応答評価：免疫系細胞(樹状細胞・マクロファージ)は、その表面に微生物菌体成分を認識する受容体が存在し、細胞内シグナル伝達を経て転写因子 NF- κ B を介した、サイトカイン産生(IL-12, TNF- α , INF- γ)とコステイミュラトリー分子(CD40, CD80, CD86)の発現により、免疫応答、炎症反応が起きる。界面活性蛋白質被覆ナノ粒子は、この免疫応答・炎症反応を回避する必要がある。樹状細胞を用いた予備検討では 精製 RoIA 単体・精製 RoIA 被覆酸化鉄ナノ粒子は、樹状細胞でサイトカイン産生を誘起しない。本開発では精製ステルス素材の純度評価に樹状細胞応答系を用い、マクロファージによる捕捉(貪食)が起こるかも評価する。マウスモデルを用いた in vivo 評価では、網内系での捕捉回避能を評価する(図 1)。

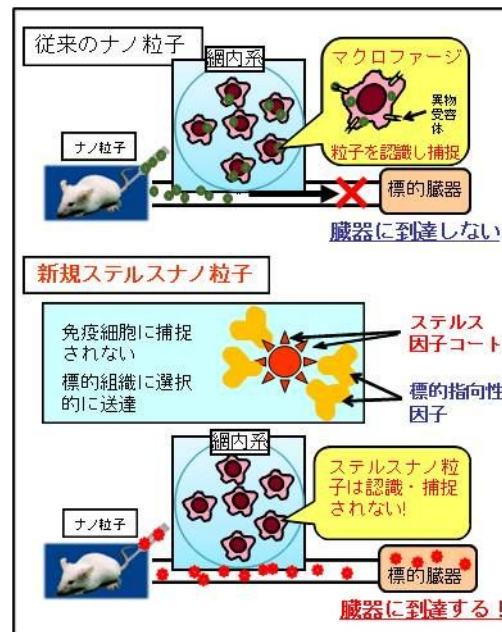


図 1. ナノ粒子の課題とステルス化

(3)界面活性蛋白質によるナノ粒子の被覆(高見・阿部)：これ迄に麹菌を宿主として RoIA 組換え体を生産し、各種クロマトグラフィーを用いて精製 RoIA 1mg/L 培養生産性を得ている(*Mol Microbiol* 57:1780, 2005)。予

備検討の結果、精製 RoIA で酸化鉄ナノ粒子を被覆することに成功している。同様の方法で、新たに見出された界面活性蛋白質についても、酸化鉄ナノ粒子の被覆を行う。

(4)界面活性蛋白質被覆ナノ粒子のマクロファージ貪食回避能の評価：本研究では精製ステルス素材の純度評価に樹状細胞応答系を用い、樹状細胞試験で免疫応答を回避した界面活性蛋白質で酸化鉄ナノ粒子を被覆する。その被覆粒子でマクロファージを刺激し、マクロファージによる捕捉(貪食)を回避し得るかも評価する。これまでの予備検討では、酸化鉄ナノ粒子を RoIA で被覆した場合、マクロファージの貪食回避が可能である(阿部ら特願 2011-176686)。

(5)界面活性蛋白質被覆ナノ粒子の in vivo 評価試験：界面活性蛋白質被覆酸化鉄ナノ粒子をマウスに静脈注射し、肝臓・脾臓の網内系のマクロファージに捕捉されるかを MRI-imaging で評価した。

4. 研究成果

(1)ステルス素材用新規界面活性蛋白質の探索・発現・精製～ 麹菌を種々の固体表面と接触培養を行うことで、固体表面に界面活性蛋白質を結合させて、それらを溶出後、分子量 1 万前後の蛋白質を MS 解析で同定した。主要な結合界面活性蛋白質は、既知の hydrophobin RoIA、疎水表面結合蛋白質 HsbA であり、さらに 2 種 A0090003000334 (0334) と A0090026000357 (0357) をセルロース結合性蛋白質として見出した。0334 および 0357 は、大腸菌と麹菌の種々の発現系による高発現を試みたが十分な高発現が得られず、粒子作製に必要な精製蛋白質量を確保することが出来なかった。

(2)界面活性蛋白質の樹状細胞を用いた免疫応答能評価～ 1)の結果、今後の粒子作製と各種試験に必要な蛋白質量を確保できる界面活性蛋白質は、hydrophobin RoIA だけであったので、RoIA を用いて以下、開発を進めた。RoIA については、以前の予備検討で蛋白質単

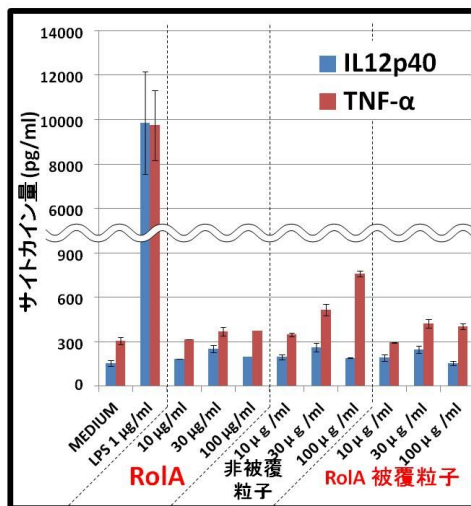


図 2. RoIA および RoIA 被覆粒子の樹状細胞刺激試験

独で C57BL/6 マウスより調製した骨髄樹状細胞 (BM-DC) をしないことが知られていたが、今回再確認をした結果刺激ないことが確認された(図 2)。

(3)界面活性蛋白質によるナノ粒子の被覆：以前から予備検討を進めていた金属ナノ粒子として、高温熱水反応により合成した酸化鉄(Fe₃O₄)ナノ粒子(平均粒径 200 nm)を用いた。2)の結果により RoIA 蛋白質が樹状細胞を刺激しないことが確認された。樹状細胞試験、4)のマクロファージ貪食回避試験を行うにあたり、RoIA 蛋白質と酸化鉄ナノ粒子に対する LPS の混入を除去する必要がある。そこで、RoIA はポリミキシン B 固定化カラムで、酸化鉄ナノ粒子は 1%デオキシコール酸洗浄することで LPS を低減する系を確立した(図 3)。これにより RoIA 被覆粒子による樹状細胞およびマクロファージ試験を安定して実施することが可能になった。

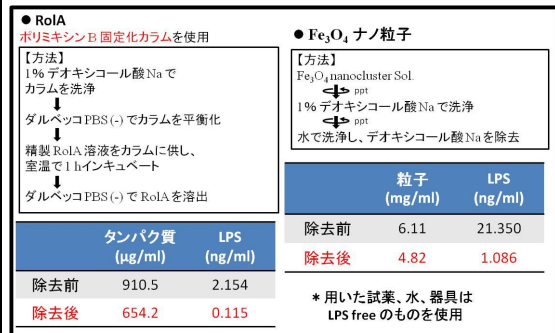


図 3. RoIA およびナノ粒子からの LPS 除去

酸化鉄ナノ粒子を完全被覆するために、表面積計算から 0.28mg の粒子を被覆するのに必要な RoIA 量は 3.26µg である。そこで精製 RoIA を粒子に添加して吸着させた後、洗浄区分も含めて、上清に残存する RoIA 量から吸着 RoIA 量を算出した。その結果、0.28mg の粒子には、5µg 以上の RoIA を添加することで飽和完全被覆が達成された(図 4)。

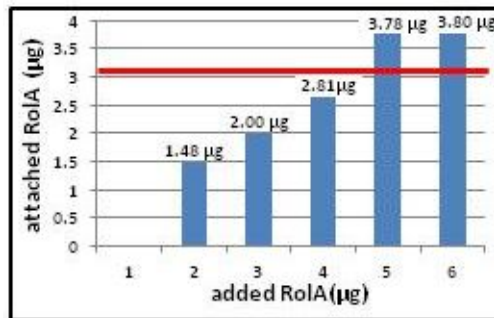


図 4. 酸化鉄粒子(0.28mg)の RoIA 完全被覆

LPS 除去後の RoIA と LPS を除去した酸化鉄ナノ粒子を被覆した。LPS-free RoIA 被覆粒子で樹状細胞刺激試験を行った結果、RoIA 非被覆粒子は粒子添加量に応じて、樹状細胞よりサイトカイン TNF- の産生が認められたが、RoIA 被覆粒子では、TNF- などのサイトカインが産生されなかった(図 2)。

(4)界面活性蛋白質被覆ナノ粒子のマクロファージ貪食回避能の評価：LPS-free RoIA 被

覆ナノ粒子が樹状細胞に認識されないことを確認したので、マクロファージの貪食試験を行った。以前の予備的検討では、RoIA 被覆粒子のマクロファージの貪食回避能が定性的に示されていたが、本研究ではマクロファージ貪食回避能を定量的に測定した。マクロファージ RAW264.7 細胞と酸化鉄ナノ粒子および RoIA 被覆ナノ粒子を培養し、細胞に貪食された粒子を濃塩酸可溶後、可溶化した鉄イオンを原子吸光法で定量して貪食の評価とした。大気圧顕微鏡においても、RoIA 被覆粒子の貪食回避が観察され、鉄の定量からも有意な RoIA 被覆粒子の貪食回避が観察された(図 5)。

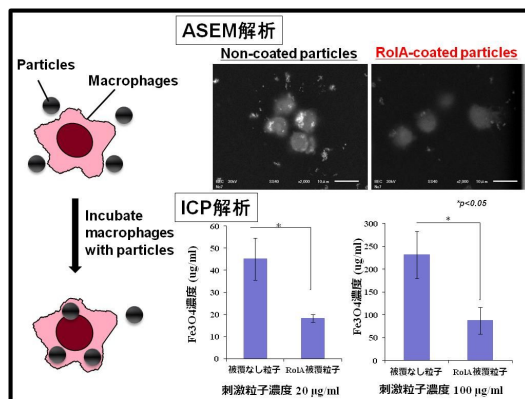


図 5. RoIA 被覆粒子のマクロファージ貪食回避能

(5)界面活性蛋白質被覆ナノ粒子の in vivo 評価試験: RoIA 被覆酸化鉄ナノ粒子では、非被覆酸化鉄ナノ粒子に比べ、静脈投与後の肝臓及び脾臓への取り込みが低下していた(図 6)。以上の結果を総合すると、RoIA 被覆酸化鉄ナノ粒子は、医療用ナノ粒子に必要なステルス能を有すると考えられた。

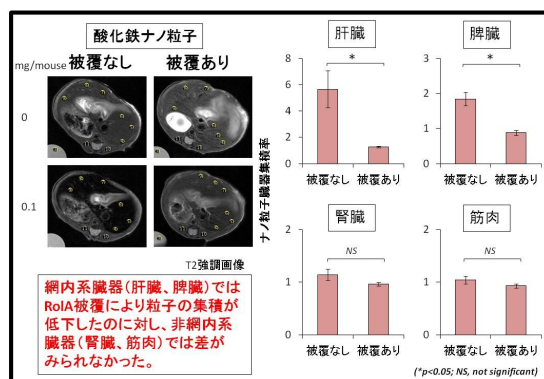


図 6. RoIA 被覆粒子のマウス投与後の MRI イメージングと各臓器の集積度定量値

作製した RoIA 被覆粒子のゼータ電位の測定結果から、RoIA 被覆粒子はマウス血中の pH 域において負の電位を有しており、血中において高い分散性を示すと考えられる。

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 4 件)

Takumi Tanaka, Hiroki Tanabe, Kenji

Uehara, Toru, Takahashi, Keietsu Abe, Involvement of hydrophobic amino acid residues in C7–C8 loop of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RoIA in hydrophobic interaction between RoIA and a polyester. 査読有 *Biosci. Biotech. Biochem.* 2014 DOI: 10.1080/09168451.2014.932684.

吉見 啓, 阿部敬悦, 麹菌ゲノム解明成果とその秘められた魅力, 今後の可能性, 査読無 月刊フードケミカル 1: 59-63 (2013)

高橋 徹, 阿部敬悦, 麹菌を用いた生分解性プラスチックリサイクルシステム (前編) 査読無 *プラスチック(日本プラスチック工業連盟誌)* 5:74-77 (2012)

高橋 徹, 阿部敬悦, 麹菌を用いた生分解性プラスチックリサイクルシステム (後編) 査読無 *プラスチック(日本プラスチック工業連盟誌)* 6:106-109 (2012)

(学会発表)(計 8 件)

田中拓未, 田邊弘毅, 高橋徹, 富樫貴成, 有田稔彦, 阿部敬悦, 麹菌が産生する hydrophobin RoIA と固体表面間の相互作用に関する研究, (査読有) 日本農芸化学会 2014 年度東京大会東 2014 年 3 月 26 日 ~ 30 日, 川崎

Takumi Tanaka, Hiroki Tanabe, Toru Takahashi, Toshihiko Arita, Fumihiko Hasegawa, Keietsu Abe, Interaction of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RoIA with solid surface. European Conference on Fungal Genetics 2014, 2014 年 3 月 23 日 ~ 27 日, Seville (Spain)

Takumi Tanaka, Hiroki Tanabe, Toru Takahashi, Toshihiko Arita, Fumihiko Hasegawa, Keietsu Abe, Interaction of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RoIA with solid surface. The 11th International Aspergillus Meeting, 2014 年 3 月 22 日 ~ 23 日, Seville (Spain)

佐藤大貴, 松村香菜, 高橋慎太郎, 高橋徹, 村垣公英, 石井恵子, 川上和義, 富樫貴成, 高見誠一, 阿尻雅文, 福本学, 阿部敬悦, 糸状菌由来の免疫回避機能性素材を用いた新規医療用ナノ粒子の開発, 第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス 2013 年 11 月 20 日 ~ 21 日, 筑波 (ポスター賞)

田中拓未, 田邊弘毅, 高橋徹, 富樫 貴成, 有田稔彦, 阿部敬悦, 麹菌が産生する hydrophobin RoIA と固体表面間の相互作用に関する研究, 第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス 2013 年 11 月 20 日 ~ 21 日, 筑波

佐藤大貴, 松村香菜, 高橋慎太郎, 高橋徹, 村垣公英, 石井恵子, 川上和義, 富樫貴成, 高見誠一, 阿尻雅文, 福本学, 阿部敬悦, 糸状菌由来の免疫回避機

能性素材を用いた新規医療用ナノ粒子の開発 ナノ粒子の性質について、日本農芸化学会 2013 年大会 2013 年 3 月 24 日～27 日、仙台（トピックス賞）

田邊弘毅、田中拓未、大類景子、上原健二、高橋徹、富樫貴成、有田稔彦、阿部敬悦、麹菌が産生する hydrophobin RolA と固体表面間の相互作用機構解析、査読有、第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2012 年 11 月 12 日～13 日、名古屋

Keietsu Abe and Toru Takahashi, Filamentous fungi are good at usage of hydrolyzing enzyme on solid-surfaces

Recruitment of polyesterase (cutinase) of *A. oryzae* by the biosurfactant protein hydrophobin RolA on plastics. Japan-Finland Joint symposium 2012, 2012 年 6 月 5 日、仙台

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 敬悦 (ABE, KEIETSU)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：50312624

(2) 研究分担者

高見 誠一 (TAKAMI, SEIICHI)
東北大学・多元物質科学研究所・准教授
研究者番号：40311550

福本 学 (FUKUMOTO, MANABU)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：60156809

(3) 連携研究者

川上 和義 (KAWAKAMI, KAZUYOSHI)
東北大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号：10253973