

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700487

研究課題名(和文) 生分解性高分子ナノゲルによる革新的細胞核内タンパク質デリバリー技術の創成

研究課題名(英文) Development of nuclear protein delivery systems using biodegradable polymeric nanogels

研究代表者

長濱 宏治 (Nagahama, Koji)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授

研究者番号：00551847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：私達が設計・開発した疎水性アミノ酸結合ヘパリンは、水中で自己会合してナノサイズの組織体を形成し、その内部にタンパク質を担持することが可能であった。タンパク質を担持したナノ組織体をエレクトロポレーションにより細胞質に導入すると、ナノ組織体は速やかに核膜孔複合体と相互作用し、その後は細胞核に移行し集積した。このナノ組織体は細胞適合性を有しており、機能性タンパク質やタンパク質医薬の核内輸送用ナノキャリアとして有用である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated the design and development of polymeric nanostructures having protein-encapsulation ability via self-assembly of hydrophobic amino acid derivatives-modified heparins. These nanostructures were found to exhibit nuclear permeation property through the interactions with nuclear pore complexes when the nanostructures were internalized into the cytoplasm of HeLa cells by electroporation. After that the nanostructures accumulated in the nucleus with high efficacy. HeLa cells treated with the nanostructures showed a similar doubling time with that of non-treated cells. These results indicate that the nanostructures could be useful as nuclear delivery carriers for functional proteins and protein drugs.

研究分野：生命高分子科学

キーワード：細胞核 タンパク質デリバリー ナノ組織体 生分解性高分子 バイオマテリアル ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

細胞内は核と細胞質に区画化されており、核内は遺伝情報の保持・複製や発現など、細胞の運命を決定・制御する重要な反応を行う場である。そのため、転写因子、ヒストン関連タンパク質、エピジェネティクス関連タンパク質、DNA 転写・複製関連タンパク質など核内で作用するタンパク質は、細胞質で合成されたのち適切なタイミングで核内に輸送される。核内への物質輸送は物質通過選択性を有する核膜孔（巨大なタンパク質複合体でバスケット様の構造を形成する）を介して行われる。低分子化合物は拡散によって核膜孔を通過するが、タンパク質などの高分子化合物は独自では核膜孔を通過できないため、核輸送タンパク質であるインポーチンによって核内に運ばれる。

核内に輸送されるタンパク質はそのアミノ酸配列中に核局在シグナル配列（NLS）をもっており、インポーチンは細胞質で核内輸送タンパク質の NLS を認識することで複合体を形成する。近年、核膜孔の内径部を構成する非構造的なタンパク質群にフェニルアラニン-グリシンの連続配列（FG リピート）が多く含まれていることが明らかにされ、インポーチン-タンパク質複合体は、インポーチンと FG リピートとの相互作用を通じて核内孔を通過すると考えられている。FG リピートはポリペプチド鎖間で - スタッキングや疎水性相互作用を駆動力とする会合によりネットワーク構造を形成し、分子ふるい効果により高分子化合物の自由な核膜孔通過を阻害する。インポーチンは三次構造を形成するとその表面に疎水ポケットが複数現れ、これらの疎水性ポケットを使って FG リピートとの可逆的な結合と解離を繰り返しながらネットワーク構造をほどこき、核膜孔を通過すると考えられている。

近年では、遺伝子工学的もしくは化学的にタンパク質を NLS ペプチドで修飾する手法が開発され、インポーチンに NLS 修飾タンパク質を運ばせる技術が報告されている。しかしながら、このような技術では、核内に輸送できる物質が制限され、またタンパク質の場合、NLS 修飾による機能低下が懸念される。さらに、インポーチンの発現量は一定量ではなく、細胞状態によって増減するとの報告例もある。したがって、インポーチンに依存する NLS 修飾に代わる新しい核内物質輸送技術の開発が必要とされている。

このような背景のもと、私達はインポーチンの核膜孔通過メカニズムに倣い、FG リピートと多点で相互作用するナノキャリアを作製すれば、インポーチンに依存しない新規な核内物質輸送技術がくれるのではないかと考えた。そこで本研究課題において私達は、FG リピートと相互作用可能と考えられるフェニルアラニンやロイシンなど疎水性アミノ酸の誘導体を親水性高分子の側鎖に結合した両親媒性高分子を合成し、疎水性側鎖間

での会合を駆動力として自己組織化するナノ組織体の作製を試みた。このナノ組織体は、疎水性側鎖により形成される会合ドメインがインポーチンの疎水ポケットのような役割を果たすことで、ナノ組織体が核膜孔通過能を発現すると期待した。本報告書では、自己組織化ナノ組織体の作製、それらの物性、核膜孔通過能、ナノ組織体へのタンパク質担持能、核内へのタンパク質輸送特性について評価した結果を概説する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、私達が独自に考案したインポーチン模倣高分子ナノ組織体の核膜孔通過能について調べ、その知見にもとづき細胞核内にタンパク質を輸送可能なナノキャリアを作製することである。上記の研究目的を達成するため、本研究期間内に(1) 疎水性アミノ酸誘導体結合多糖の合成、(2) 疎水性アミノ酸誘導体結合多糖の自己組織化によるナノ組織体構築、ナノ組織体の物理化学的諸特性解析、(3) ナノ組織体の細胞特性・細胞内動態解析、(4) ナノ組織体のタンパク質保持特性の解析、(5) ナノ組織体の細胞核内タンパク質輸送能の解析、という研究項目を遂行する。

3. 研究の方法

(1) 疎水性アミノ酸誘導体結合多糖の合成
多糖として、高い生体適合性および生分解性を有するヘパリン（Hep）を選択した。疎水性アミノ酸誘導体として、- スタッキング相互作用が可能なフェニル基を有するフェニルアラニンエチルエステル（PheEE）、フェニルアラニンベンジルエステル（PheBz）、そしてスタッキング相互作用ができないロイシンエチルエステル（LeuEE）を選択した。水とメタノールの混合溶媒中、DMT-MM を縮合剤として用いた Hep のカルボキシル基とアミノ酸誘導体のアミノ基とのカップリング反応により、疎水性アミノ酸誘導体結合ヘパリンを得た。Hep と疎水性アミノ酸誘導体のモル比を変えることにより、疎水性アミノ酸導入本数が異なる高分子化合物を複数合成した。得られた高分子化合物の¹H-NMR スペクトル解析より、Hep 一分子あたりの疎水性アミノ酸誘導体の結合本数を算出した。

(2) 疎水性アミノ酸誘導体結合多糖の自己組織化によるナノ組織体構築

疎水性アミノ酸導入 Hep をリン酸緩衝液（PBS）に溶解し、超音波照射することで自己組織化させ、ナノ組織体を形成させた。ナノ組織体水溶液の動的光散乱測定により、ナノ組織体のサイズと分布を解析した。ピレンを蛍光プローブとして用いたナノ組織体水溶液の蛍光スペクトル解析より、ナノ組織体の臨界面会合形成濃度（CAC）を算出し、またナノ組織体内の疎水場の量を見積もった。

(3) ナノ組織体の細胞特性・細胞内動態解析
がん細胞株である HeLa 細胞を用いて、ナノ組織体の核膜孔通過能を調べた。ガラムボトムシャーレに播種した HeLa 細胞に疎水性アミノ酸誘導体結合ナノ組織体を加え、エレクトロポレーションによりナノ組織体を HeLa 細胞の細胞質内に導入した。その後、細胞核を Hoechst33342 により染色し、経時的な共焦点顕微鏡観察によりナノ組織体の細胞内動態を解析した。ナノ組織体をエレクトロポレーションにより細胞内に導入した後、細胞増殖曲線を作製し、非導入の細胞と比較することにより、ナノ組織体が細胞増殖に及ぼす影響を評価した。

(4) ナノ組織体のタンパク質担持特性
モデルタンパク質として、酸性タンパク質であるウシ血清アルブミン (BSA), 塩基性タンパク質であるリゾチームを選択し、それぞれの蛍光ラベル体を作製した。疎水性アミノ酸誘導体結合 Hep の固体に各種タンパク質水溶液を加え、やさしく攪拌することにより、ナノ組織体へのタンパク質内包を行った。内包操作後、ナノ組織体水溶液の動的散乱測定および電気泳動を行い、ナノ組織体のタンパク質担持特性を評価した。また、タンパク質担持ナノ組織体のゼータ電位測定により、ナノ組織体の表面電荷特性について調べた。

(5) ナノ組織体の細胞核内タンパク質輸送能の解析
研究方法(3)で述べた手法によりタンパク質担持ナノ組織体を作製し、研究方法(4)で述べた同様の操作により細胞内動態を解析し、ナノ組織体の細胞核へのタンパク質輸送能について解析した。

4. 研究成果

(1)疎水性アミノ酸誘導体結合多糖の合成
合成した疎水性アミノ酸誘導体結合 Hep の構造を図 1 に示す。疎水性アミノ酸結合本数 (DS) は合成段階における疎水性アミノ酸誘導体の仕込み量によってある程度調節可能であった。合成した疎水性アミノ酸誘導体結合 Hep の特性を表 1 にまとめた。

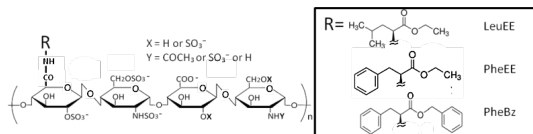


図 1 疎水性アミノ酸誘導体結合 Hep の構造

表 1 合成した疎水性アミノ酸誘導体結合 Hep の特性

Polymer	M _w	DS	D _n (nm)	CAC (mg/mL)
Heparin	19,000	—	8	—
HepPheEE26	24,190	26	89	0.20
HepPheEE7	20,350	7	122	0.70
HepPheBz16	23,070	16	116	0.08
HepPheBz4	20,020	4	102	0.80
HepLeuEE10	20,590	10	125	0.11

(2) 疎水性アミノ酸誘導体結合多糖の自己組織化によるナノ組織体構築

疎水性アミノ酸誘導体結合 Hep を PBS で溶解して自己組織化させた後、動的散乱によりサイズ (D_n) を測定したところ、Hep のみでは 8 nm に散乱ピークが現れるのに対し、疎水性アミノ酸誘導体結合 Hep の場合、いずれも約 90~125 nm にピークが得られたことから、自発的なナノ組織体の形成が示された (表 1)。ピレンを疎水性蛍光プローブとして用いたナノ組織体水溶液の蛍光スペクトル解析より、すべての疎水性アミノ酸誘導体結合 Hep は臨界会合体形成濃度 (CAC) を示し (表 1), 疎水性物質であるピレンを担持可能な疎水性空間を持つことが分かった。また、疎水性側鎖の導入数の増大により CAC が低下したことから、疎水性アミノ酸間ではたらく疎水性相互作用がナノゲル形成の駆動力であると示唆される。以上より、疎水性アミノ酸誘導体結合 Hep は水中で自発的に疎水性アミノ酸側鎖同士が会合し、その会合ドメインが物理架橋点となることでナノ組織体を形成すると考えられる。

(3) ナノ組織体の細胞特性・細胞内動態解析
蛍光ラベル化ナノ組織体をエレクトロポレーションにより HeLa 細胞の細胞質に導入し、経時的な細胞内局在観察を行った。HepPheEE26 ナノ組織体は細胞質に導入して 15 分後には細胞核周辺に集積しはじめ、1 時間後には核の蛍光とナノ組織体の蛍光が共局在したことから、HepPheEE26 ナノ組織体は核膜孔通過能を有することが分かった (図 2)。一方、芳香族官能基を持たない HepLeuEE10 ナノ組織体は核周辺へ集積しなかったことから、核膜孔通過には - スタッキング相互作用が必要だと考えられる。芳香族官能基の数を増やした HepPheBz16 ナノ組織体は細胞核周辺に集積するものの、核内には移行しなかった。一方、HepPheBz4 ナノ組織体は核膜孔を通過して核内に移行した。このことから、過度に強い - スタッキング相互作用は核膜孔通過能を妨げる要因になると考えられる。以上、Hep に結合させる疎水性側鎖の種類および結合本数を調整することにより、核膜孔を自由通行可能なナノ組織体を作製することに成功した。

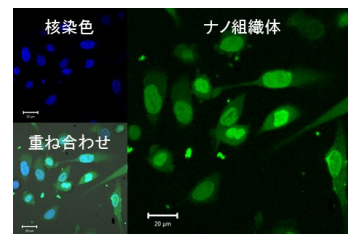


図 2 HepPheEE26 ナノ組織体の細胞内動態

HepPheEE26 ナノ組織体をエレクトロポレーションにより導入した HeLa 細胞の増殖曲線はエレクトロポレーションのみ行った

HeLa 細胞の増殖曲線とほぼ同程度であったことから, HepPheEE26 ナノゲルの核内移行特性は細胞増殖に悪影響を及ぼさないと考えられる。

(4) ナノ組織体のタンパク質担持特性
核内移行性を有する HepPheEE26 ナノ組織体のタンパク質担持特性を調べるため, 蛍光ラベル化した BSA およびリゾチーム溶液で HepPheEE26 を溶解した後, 動的光散乱測定を行ったところ, リゾチーム単独の散乱ピークは完全に消失し, HepPheEE26 ナノ組織体単独よりもわずかに大きいサイズ分布をもつ単峰性の散乱ピークが見られた。また, アガロース電気泳動によりリゾチーム単独, ナノ組織体単独, そして複合物のそれぞれ泳動したところ, 単独では異なる位置にバンドが現れるが, 複合体ではバンドの位置が一致した。以上より, タンパク質はナノ組織体に担持された状態であると示唆される。BSA でも同様な結果が得られた。以上より, HepPheEE26 ナノ組織体は電荷を問わず多種多様な性質をもつタンパク質を担持可能と考えられる。

(5) ナノ組織体の細胞核内タンパク質輸送能の解析
BSA およびリゾチームを担持した HepPheEE26 ナノ組織体をエレクトロポレーションにより HeLa 細胞の細胞質に導入すると, 1 時間後にはタンパク質が細胞核周辺に集まりはじめ, その後 12 時間後には核内に移行した。タンパク質単独ではこのような核内集積は見られないことから, この核内集積は HepPheEE26 ナノ組織体によるデリバリー効果である。以上より, ナノ組織体は細胞核内タンパク質輸送能をもつと結論づけられる。

(6) まとめと展望
本研究で私たちは, 疎水性アミノ酸誘導体結合ナノ組織体を設計・開発し, それらはタンパク質担持特性を有し, さらに細胞に毒性を示すことなく核膜孔を通過することにより, 担持タンパク質を核内に輸送する能力を有することを明らかにした。つまり, このナノ組織体は“人工インポーチン”であり, 核へタンパク質を輸送するナノキャリアとして応用可能である。これまでに, インポーチンの機能を有する人工ナノ組織体の開発例はなく, 本研究が世界で初めての報告となる。本ナノ組織体は, 細胞・実験室レベルでの利用にとどまらず, 組織・個体レベルでの応用, つまり核内タンパク質治療の臨床応用に向けて先導的役割を果たしていくと期待されるため, 本研究は極めて大きな学術的意義及び社会的意義をもつものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

K. Nagahama, Y. Sano, T. Kumano,

Anticancer drug-based multifunctional nanogels through self-assembly of dextran-curcumin conjugates toward cancer theranostics, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 査読有, 印刷中, 2015
DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.04.062
K. Nagahama, D. Kawano, N. Oyama, A. Takemoto, T. Kumano, J. Kawakami, Self-assembling polymer micelle/clay nanodisk/doxorubicin hybrid injectable gels for safe and efficient focal treatment of cancer, *Biomacromolecules*, 査読有, 16, 2015, 880-889
DOI: 10.1021/bm5017805
Y. Ohya, H. Suzuki, K. Nagahama, A. Takahashi, T. Ouchi, A. Kuzuya, Design of biodegradable injectable polymers exhibiting temperature-responsive sol-gel transition, *Advances in Science and Technology*, 査読有, 86, 2013, 9-16
<http://www.scientific.net/AST.86>

〔学会発表〕(計11件)

佐野由倫, 中西健太, 長濱宏治, 高分子ナノゲルを用いた人工インポーチンの創製, 第 61 回高分子研究発表会(神戸), 2015 年 7 月 17 日, 兵庫県民会館(兵庫県・神戸市)

中西健太, 佐野由倫, 長濱宏治, 核膜孔通過能を有する自己組織化ナノゲルの細胞内動態解析, 第 61 回高分子研究発表会(神戸), 2015 年 7 月 17 日, 兵庫県民会館(兵庫県・神戸市)

佐野由倫, 中西健太, 長濱宏治, 核膜孔通過能を有する自己組織化ナノゲルの合成と分子輸送能評価, 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 28 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

佐野由倫, 中西健太, 長濱宏治, 疎水性アミノ酸誘導体を会合ドメインとする自己組織化ナノゲルの合成とアミノ酸応答挙動, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 18 日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

熊野尊之, 内海智也, 長濱宏治, クルクミンナノ組織体の細胞内取り込み・動態とがん細胞死誘導活性解析, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 18 日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

佐野由倫, 中西健太, 長濱宏治, 疎水性アミノ酸誘導体を動的架橋点とするヘパリンナノゲルの合成と物性解析, 第 63 回高分子討論会, 2014 年 9 月 25 日, 長崎大学文教キャンパス(長崎県・長崎市)

熊野尊之，長濱宏治，生分解性クルクミンナノ組織体の構築とガン細胞死誘導効果の評価，第 63 回高分子学会年次大会，2014 年 5 月 30 日，名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

熊野尊之，長濱宏治，がん細胞にアポトーシスを誘導する血管投与型クルクミンナノ組織体の構築，第 35 回日本バイオマテリアル学会大会，2013 年 11 月 26 日，タワーホール船堀（東京都・江戸川区）

佐野由倫，長濱宏治，クルクミンのナノバイオマテリアル化：生分解性クルクミンナノゲルの合成および物性評価，第 35 回日本バイオマテリアル学会大会，2013 年 11 月 26 日，タワーホール船堀（東京都・江戸川区）

佐野由倫，長濱宏治，セラノスティクスへの応用を目指したクルクミンナノゲルの開発に関する研究，第 4 回生命機能研究会，2013 年 9 月 21 日，同志社びわこリトリートセンター（滋賀県・大津市）

佐野由倫，長濱宏治，生分解性クルクミンナノゲルの合成およびナノバイオマテリアルとしての特性評価，第 62 回高分子討論会，2013 年 9 月 12 日，金沢大学角間キャンパス（石川県・金沢市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.konan-first.jp/>

<http://www.pi.konan-u.ac.jp/nagahama/>

6．研究組織

(1)研究代表者

長濱 宏治（NAGAHAMA, Koji）

甲南大学・フロンティアサイエンス学部生命化学科・准教授

研究者番号：00551847