

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253004

研究課題名(和文) フリーズエッチ電顕法による薬剤・遺伝子導入用ナノ粒子の細胞内取込み機構の解明

研究課題名(英文) 'Deep-etch' electron microscopic analysis of the actual mechanism of entry of cell-penetrating nanoparticles used for drug and gene-delivery into living cells

研究代表者

Heuser John (Heuser, John)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：40571815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、膜透過性治療薬の細胞侵入メカニズムを電子顕微鏡で可視化解析することであり、これらの試薬が細胞にエンドサイトーシスされた後に、エンドソームの構造崩壊を伴って細胞に侵入するという仮説を検証することである。エンドソーム構造の崩壊過程を可視化することは、これらの薬剤がなぜ効くのかを深く理解するのに極めて重要であるばかりでなく、現在医学における将来の改善療法の開発に指針を与える上でも大切である。ポリカチオン性高分子による「プロトン・スポンジ」やエンドソーム崩壊ペプチドによる「エンドソーム・エスケープ」と呼ばれてきた仮説を電子顕微鏡法により慎重に検証した。

研究成果の概要(英文)：The basic purpose of this project was to visualize with the electron microscope (the EM) the mechanism of entry of the important cell-penetrating therapeutic agents available today, with the hypothesis that this entry is via endosome-rupture after cells have "endocytosed" the agents. We believed that visualizing endosome-rupture would be terribly important for understanding why these agents are effective, if they are, and for pointing the way for the development of future improved therapeutics in modern medicine. We felt that this was a vital medical goal, because it represents a 'bottleneck' between further industrial production of more modern therapeutics, and future clinical application of these new agents. These hypothesis so-called the "proton sponge" mechanism by polycationic polymers and the "endosome escape" by endosome-disrupting peptides were carefully tested by electron microscopy.

研究分野：細胞生物・生物物理学

キーワード：電子顕微鏡 ドラッグデリバリー エンドサイトーシス トランスフェクション

1. 研究開始当初の背景

生きた細胞の細胞膜を透過し細胞質内への移行を可能にする「人工合成ナノ粒子による薬剤・遺伝子の細胞内導入技術」は商業的にも非常に重要になっている。ナノ粒子の開発研究は、多種多様な細胞膜透過性ペプチド(CPP, Cell-Penetrating Peptide)によるカチオン化ナノ粒子の作製に集中している。先導的な研究により、ナノ粒子が細胞内に積極的に取込まれるのが示されている。細胞の真の内側(細胞質)まで到達し内包物を届けるには、細胞内に入られた後も細胞膜(実際にはエンドソーム膜)を透過する必要がある。しかし、細胞内に入られた後のナノ粒子については、ほとんど研究されていない。そこで、私たちは現在世界でほとんど実践不可能となった「ディープエッチ電子顕微鏡法(“Deep-etch electron microscopy”)”を用いて、CPPでオプソニン化されたナノ粒子がどのようにエンドソーム膜を透過するかを決定する構造解析法を提案したい。この最大の利点は、物理的かつ化学的な実験処置を施さずに、細胞を生きた状態のまま「急速凍結」して観察できることにある。そのため、CPPに突き破られるエンドソーム膜の表面像が高解像度で撮影され、実際に近い「ナノ粒子の細胞膜透過機構」に対する見解が得られると期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膜透過性治療薬の細胞侵入メカニズムを電子顕微鏡で可視化解析することであり、これらの試薬が細胞にエンドサイトーシスされた後に、エンドソームの構造崩壊を伴って細胞に侵入するという仮説を検証することである。

3. 研究の方法

私たちが独自に開発してきた「ディープエッチ電子顕微鏡法」を用いて、CPPで被覆された合成ナノ粒子がエンドソーム(or MVB)膜を透過するかどうか、更にどのように透過するかを生きた細胞の状態のまま解明する。ナノ粒子研究で世界を先導する研究室と共同研究を推進し、彼らが合成するナノ粒子を、極めて沢山のMVBを産生する培養動物細胞に投与する。ナノ粒子のエンドソーム膜透過過程(に伴う膜構造変化)が捉えられない場合には他のメカニズムの可能性を探る。

4. 研究成果

エンドソーム構造の崩壊過程を可視化することは、これらの薬剤がなぜ効くのかを深く理解するのに極めて重要であるばかりでなく、現在医学における将来の改善療法の開発に指

針を与える上でも大切である。この種の薬剤の効能を最大限に発揮させるには、細胞内への取り込みメカニズムを深く理解することが、唯一本質的に欠かすことが出来ないと私たちは議論してきた。細胞内への取り込み過程を直接観察できるのは電子顕微鏡法だけである。

初期研究期間の目的は、電子顕微鏡法でエンドサイトーシスを可視化解析する方法論を確立することであった。残念ながら、一連の仕事は結果として実行不能に近く困難であることが分かったが、従来の基本仮説について興味深い検証成果を得た。電子顕微鏡法で可視化でき、かつ細胞内取り込みに十分な性能をもつ薬剤を調達できなかった。共同研究者からの調剤試薬が細胞毒性を示したり、細胞侵入が不可能であった。金属ゼオライトからタンパク質脂質化合物対して、電子顕微鏡法的手法により多くの時間を費やされた。有効な治療法を見つけるというゴールを達成できないものの、私たちは、試薬投与時に予期されるエンドソームの構造変化に関して、電子顕微鏡法により正確に観察できるかという基本に立ち返ることにした。ポリカチオン性高分子による「プロトン・スポンジ」やエンドソーム崩壊ペプチドによる「エンドソーム・エスケープ」と呼ばれてきた仮説を慎重に検証した。電顕構造解析からすると、これらのメカニズムは全く不可能なものであった。最終的に、細胞透過性薬剤が細胞質に到達する作用機序に関する十分な情報は得られなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計18件)

- ① Kim H, Okamoto H, Felber AE, Polomska A, Morone N, Heuser JE, Leroux JC, Murakami T. Polymeric-coated pH-responsive high-density lipoproteins. *J Control Release*. 2016 Apr 28;228:132-40. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.03.005.
- ② Höfener S, Trumm M, Koke C, Heuser J, Ekström U, Skerencak-Frech A, Schimmelpfennig B, Panak PJ. Computing UV/vis spectra using a combined molecular dynamics and quantum chemistry approach: bis-triazin-pyridine (BTP) ligands studied in solution. *Phys Chem Chem Phys*. 2016 Mar 9;18(11):7728-36. doi: 10.1039/c5cp07540h.
- ③ Fukumitsu K, Hatsukano T, Yoshimura A, Heuser J, Fujishima K, Kengaku M. Mitochondrial fission protein Drp1 regulates mitochondrial transport and dendritic arborization in cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci*. 2016 Mar;71:56-65. doi:

- 10.1016/j.mcn.2015.12.006.
- ④ Honda M, Minami I, Tooi N, Morone N, Nishioka H, Uemura K, Kinoshita A, Heuser JE, Nakatsuji N, Aiba K. The modeling of Alzheimer's disease by the overexpression of mutant Presenilin 1 in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 15;469(3):587-92. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.025.
- ⑤ Lee JH, Heuser JE, Roth R, Goodenough U. Eisosome Ultrastructure and Evolution in Fungi, Microalgae, and Lichens. *Eukaryot Cell*. 2015 Oct;14(10):1017-42. doi: 10.1128/EC.00106-15.
- ⑥ Fukumitsu K, Fujishima K, Yoshimura A, Wu YK, Heuser J, Kengaku M. Synergistic action of dendritic mitochondria and creatine kinase maintains ATP homeostasis and actin dynamics in growing neuronal dendrites. *J Neurosci*. 2015 Apr 8;35(14):5707-23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4115-14.2015.
- ⑦ Ishikawa Y, Maeda M, Pasham M, Aguet F, Tacheva-Grigorova SK, Masuda T, Yi H, Lee SU, Xu J, Teruya-Feldstein J, Ericsson M, Mullally A, Heuser J, Kirchhausen T, Maeda T. Role of the clathrin adaptor PICALM in normal hematopoiesis and polycythemia vera pathophysiology. *Haematologica*. 2015 Apr;100(4):439-51. doi: 10.3324/haematol.2014.119537.
- ⑧ Muia J, Zhu J, Gupta G, Haberichter SL, Friedman KD, Feys HB, Deforche L, Vanhoorelbeke K, Westfield LA, Roth R, Tolia NH, Heuser JE, Sadler JE. Allosteric activation of ADAMTS13 by von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec 30;111(52):18584-9. doi: 10.1073/pnas.1413282112.
- ⑨ Heuser JE. Some personal and historical notes on the utility of "deep-etch" electron microscopy for making cell structure/function correlations. *Mol Biol Cell*. 2014 Nov 1;25(21):3273-6. doi: 10.1091/mbc.E14-05-1016.
- ⑩ Zhang Q, Filas BA, Roth R, Heuser J, Ma N, Sharma S, Panitch A, Beebe DC, Shui YB. Preservation of the structure of enzymatically-degraded bovine vitreous using synthetic proteoglycan mimics. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Oct 23;55(12):8153-62. doi: 10.1167/iovs.14-14366.
- ⑪ Hirai K, Reboul J, Morone N, Heuser JE, Furukawa S, Kitagawa S. Diffusion-coupled molecular assembly: structuring of coordination polymers across multiple length scales. *J Am Chem Soc*. 2014 Oct 22;136(42):14966-73. doi: 10.1021/ja507971r.
- ⑫ Metkar SS, Marchioretto M, Antonini V, Lunelli L, Wang B, Gilbert RJ, Anderluh G, Roth R, Pooga M, Pardo J, Heuser JE, Serra MD, Froelich CJ. Perforin oligomers form arcs in cellular membranes: a locus for intracellular delivery of granzymes. *Cell Death Differ*. 2015 Jan;22(1):74-85. doi: 10.1038/cdd.2014.110.
- ⑬ Murakami T, Nakatsuji H, Morone N, Heuser JE, Ishidate F, Hashida M, Imahori H. Mesoscopic metal nanoparticles doubly functionalized with natural and engineered lipidic dispersants for therapeutics. *ACS Nano*. 2014 Jul 22;8(7):7370-6. doi: 10.1021/nn5024818.
- ⑭ Otsuji TG, Bin J, Yoshimura A, Tomura M, Tateyama D, Minami I, Yoshikawa Y, Aiba K, Heuser JE, Nishino T, Hasegawa K, Nakatsuji N. A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem Cell Reports*. 2014 Apr 24;2(5):734-45. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.03.012. eCollection 2014 May 6. Erratum in: *Stem Cell Reports*. 2014 May 8;2(5):746.
- ⑮ Vitre B, Gudimchuk N, Borda R, Kim Y, Heuser JE, Cleveland DW, Grishchuk EL. Kinetochore-microtubule attachment throughout mitosis potentiated by the elongated stalk of the kinetochore kinesin CENP-E. *Mol Biol Cell*. 2014 Aug 1;25(15):2272-81. doi: 10.1091/mbc.E14-01-0698. Epub 2014 Jun 11.
- ⑯ Endo M, Yamamoto S, Emura T, Hidaka K, Morone N, Heuser JE, Sugiyama H. Helical DNA origami tubular structures with various sizes and arrangements. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014 Jul 14;53(29):7484-90. doi: 10.1002/anie.201402973.
- ⑰ Cashikar AG, Shim S, Roth R, Maldazys MR, Heuser JE, Hanson PI. Structure of cellular ESCRT-III spirals and their relationship to HIV budding. *Elife*. 2014 May 30;3. doi: 10.7554/eLife.02184.
- ⑱ Vassilopoulos S, Gentil C, Lainé J, Buclez PO, Franck A, Ferry A, Précigout G, Roth R, Heuser JE, Brodsky FM, Garcia L, Bonne G, Voit T, Piétri-Rouxel F, Bitoun M. Actin scaffolding by clathrin heavy chain is required for skeletal muscle sarcomere organization. *J Cell Biol*. 2014 May 12;205(3):377-93. doi: 10.1083/jcb.201309096.

[学会発表] (計5件)

- ① John Heuser. "Discovering the cause of adult-onset muscular dystrophy by electron microscopy of mouse genetic models". 第121回日本解剖学会総会・学術集会. 2016年03月28日～2016年03月30日. 福島、日本.
- ② Azumi Yoshimura, Silvia Pujals, Nobuhiro Morone, Tanya Tenkova and John Heuser. "Profound plasma membrane changes caused by acute cholesterol elevation". Biochemistry and Molecular Biology 2015. December 1-4, 2015. Kobe, Japan.
- ③ John Heuser. "A personal history of EM-visualization of the cytoskeleton", as the E.B. Wilson Medal lecture 2014. 2014 Annual meeting of American Society of Cell Biology. December 9, 2014. Philadelphia, USA.
- ④ John Heuser. "The future of electron microscopy: Challenges that remain". IIRS 10th anniversary conference. November 7, 2014. Tokyo, Japan.
- ⑤ John Heuser. "Future challenges and opportunities in biological electron microscopy". 2014 International symposium of the Next-Generation Microscopic Sciences, Japan Society of Microscopy. November 3, Awaji Island, Japan.

[図書] (計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ホイザー ジョン (Heuser, John)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授
研究者番号：40571815

(2) 研究分担者

諸根 信弘 (Morone, Nobuhiro)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・客員教授
研究者番号：50399680

(3) 研究分担者

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