

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32624

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670082

研究課題名(和文)細胞膜を介した組織深部へのタンパク質輸送システムの開発

研究課題名(英文)The development of protein delivery system through the cell membrane

研究代表者

小泉 直也 (KOIZUMI, Naoya)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80433845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌組織は大きくなるにつれて、その癌組織の中心部分に薬が届きにくくなる。特に、比較的大きな分子量を持つタンパク質医薬品は、その大きさから癌組織の中心部分への到達率が低く、治療効果の妨げになっている。そこで、本研究は、癌組織の深部(中心部分)に効率よく治療用タンパク質を輸送する新しい技術の開発をおこなった。その結果、ウイルスタンパク質を利用し治療用タンパク質を癌組織深部に届けることに成功した。しかしながら、癌組織だけでなく正常な組織へも輸送してしまったことから、癌組織にのみ輸送可能な機能の付与が今後の課題として挙げられた。

研究成果の概要(英文)：As the cancer tissue is increased, medicine is less likely to reach the central portion of the cancer tissue. In particular, protein pharmaceuticals having a relatively large molecular weight, low arrival rate to the central portion of the cancerous tissue as its size, which decrease therapeutic effect. Therefore, the present study was conducted to develop a new technology to transport efficiently therapeutic protein in deep (center portion) of cancer tissue. As a result, a therapeutic protein using the viral proteins successfully be delivered to deep of cancer tissue. However, from the fact that you've been delivered also to normal tissue as well as cancer tissue, the grant of the only transport available functions in cancer tissue was cited as future challenges.

研究分野：薬物ターゲティング

キーワード：ターゲティング がん タンパク質医薬品

1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステム(DDS)とは、必要な薬物を必要な時間に必要な部位で作用させるためのシステム(工夫や技術)であり、薬物療法にとって非常に重要である。特にターゲティングシステム(必要な部位への送達)の開発研究は盛んに行われており、その成果は既存の医薬品においても応用され、多くの疾患治療に用いられている。これらターゲティング能の付加は、リポソームやミセルといった医薬品を搭載したキャリアーの特性や粒子サイズを利用するものや、細胞表面受容体と結合するリガンドをキャリアーに付与し、分子レベルでの標的指向性を持たせたシステムも開発されている。また、抗体医薬品を代表とする非常に特異性の高い分子標的薬は、すでに癌治療において必須の医薬品となっている。一方、これまでのターゲティング研究の多くは、生体内投与後に血管またはリンパ管を介して組織へ移行し、標的分子との親和性によりターゲット細胞への特異性および治療効果を発揮させるため、内皮細胞やその周辺細胞が標的であり、組織深部の細胞まで到達できないことが問題となっている。これら問題点を克服するため、組織透過性を亢進するペプチドなどを用いた検討が行われているが、基本的な戦略としては細胞間結合を緩め、組織内に水溶性分子の通り道を作ることにあり、安全性の問題や到達深度に限界がある。癌組織はその急速な形成過程から、血管やリンパ管が未発達であることが明らかとなっており、血液循環を介した組織深部への医薬品の到達が難しいことから、新たなデリバリー技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、血液循環(水相)を介した既存の概念とは全く異なる脂質相デリバリーシステムを用い、新規ターゲティング戦略を構築すべくその基盤研究を行うことを目的としている。申請者はこれまでに、DDS研究に利用可能なウイルスタンパク質のスクリーニングを行い、細胞膜を介した細胞間移動が可能なタンパク質を同定することに成功した。本タンパク質の安定発現細胞株を用いた検討においては、共存させた GFP 発現細胞への移行をフローサイトメトリー解析および共焦点レーザー顕微鏡像において確認した。また、本ウイルスタンパク質の機能解析についても検討を行っており、細胞間の膜移動に必要な領域を同定済みである。つまり、本タンパク質の機能部位を利用し、組織深部の標的細胞へ、脂質

連続層である細胞膜を移動経路とするターゲティングシステムの構築を行うことを目標としている。本ウイルスタンパク質を利用し、疾患治療に応用可能なターゲティングシステムを構築するには、検討・解決すべき多くのステップがあるが、高齢化社会において非常に重要な対象疾患である組織深部の癌や脳深部の神経細胞を標的とすることが可能な画期的システムの構築が期待できることから、まさに挑戦的萌芽研究であり、課題が達成された際の効果は非常に大きなものになると期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜移動タンパク質の細胞間移動機能評価

同定した細胞膜移動タンパク質について、培養細胞を用いた細胞間の移動能について基礎的な検討をおこなった。

まず、FLAG タグを挿入した細胞膜移動タンパク質を安定発現させた 293T 細胞、および GFP 発現 HepG2 細胞(ヒト肝癌細胞由来)または GFP 発現 MDCK 細胞(イヌ腎上皮細胞由来)を 6 well plate に各細胞 2×10^5 個細胞ずつ播種し、共培養をおこなった。翌日、2 mM EDTA/PBS 溶液にて、細胞を剥離し、FLAG タグに対する抗体および PI 標識した 2 次抗体を用いて、細胞表面の細胞膜移動タンパク質の存在をフローサイトメトリーにて検出した。

(2) 細胞膜移動タンパク質の分泌機能評価

同定した細胞膜移動タンパク質について、培養細胞を用いた細胞間の移動における細胞膜移動タンパク質の分泌機能の関与について検討をおこなった。

まず、FLAG タグを挿入した細胞膜移動タンパク質を安定発現させた 293T 細胞、および GFP 発現 HepG2 細胞を、それぞれトランスウェルのアピカル側およびベサル側に各細胞 2×10^5 個細胞ずつ播種し、培養した。翌日、2 mM EDTA/PBS 溶液にて、細胞を剥離し、FLAG タグに対する抗体および PE 標識した 2 次抗体を用いて、細胞表面の細胞膜移動タンパク質の存在をフローサイトメトリーにて検出した。

(3) 細胞膜移動タンパク質の細胞間移動機能の免疫染色による評価

同定した細胞膜移動タンパク質について、培養細胞を用いた細胞間の移動能について形態学的な評価を行うため免疫染色法を用いた検討をおこなった。

まず、FLAG タグを挿入した細胞膜移動タンパク質を安定発現させた 293T 細胞、および GFP 発現 HepG2 細胞を、それぞれ 6 well plate に各細胞 2×10^5 個細胞ずつ播種し、共培養をおこなった。翌日、4%パラフォルムアルデヒド溶液にて、細胞を固定化し、0.1% TRITON-X 溶液にて処理後、FLAG-tag に対する抗体および PE 標識した 2 次抗体を用いて、培養細胞における細胞膜移動タンパク質の存在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) 細胞膜移動タンパク質の細胞間移動機能評価

293T 細胞で発現させた細胞膜移動タンパク質は、共培養細胞である GFP 発現 HepG2 細胞の細胞膜にて検出されたが、MDCK 細胞においては、検出されなかった。よって、細胞膜移動タンパク質の移動能には、膜タンパク質、細胞膜組成、細胞種等の違いによる特異性の存在が示唆された。

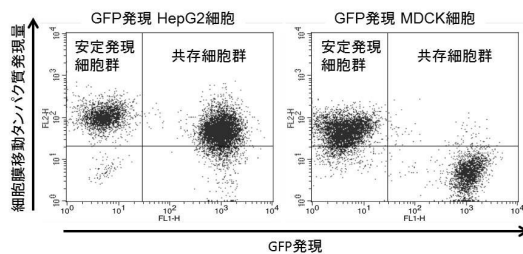


図 細胞膜移動タンパク質の移行能検討
同定タンパク質の安定発現細胞と GFP 発現細胞を共培養後のフローサイトメトリーによる細胞膜表面タンパク質の検出
→HepG2細胞には本タンパク質が移行したが、MDCK細胞には移行は認められなかった

(2) 細胞膜移動タンパク質の分泌機能評価

293T 細胞で発現させた細胞膜移動タンパク質は、共培養細胞である GFP 発現 HepG2 細胞の細胞膜表面に移行してフローサイトメトリーにて検出できることを (1) の検討にて明らかとした。そこで、細胞膜移動が分泌による経路により共存細胞の細胞膜に移動することが考えられることより、メディアムを共有するトランズウェルを用いた検討をおこなった。その結果、細胞膜移動タンパク質は、メディアムを介した分泌による移動はないことを明らかとした。このことより、隣接する細胞膜を直接介した移動であることが示唆された。

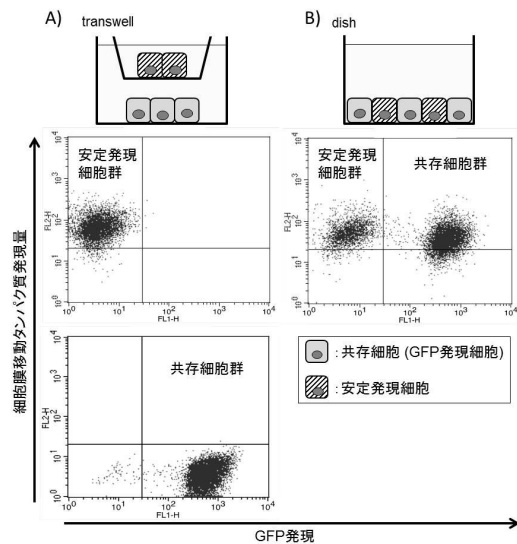


図 細胞膜移動タンパク質の分泌および移行能の検討
安定発現細胞と GFP 発現細胞を共培養後のフローサイトメトリーによる細胞膜表面タンパク質の検出
A) transwell条件 (各細胞をそれぞれ回収し測定) B) transwell未使用条件
→接触する条件でのみ、共培養した GFP 発現細胞の細胞膜に本タンパク質が分布した

(3) 細胞膜移動タンパク質の細胞間移動機能の免疫染色による評価

免疫染色法による評価においても、293T 細胞で発現させた細胞膜移動タンパク質は、共培養細胞である GFP 発現 HepG2 細胞の細胞膜にて検出された。また、GFP 発現 HepG2 細胞の細胞内にはほとんど検出されなかったことから、細胞膜にのみ局在することが強く示唆された。

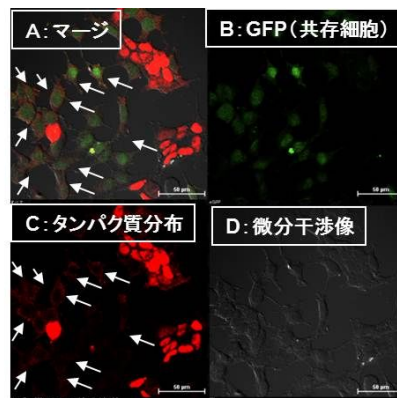


図.
同定タンパク質の安定発現細胞と GFP 発現細胞を共培養後の免疫染色によるタンパク質分布 A: マージ, B: GFP, C: 同定タンパク質, D: 微分干渉像
(共存培養した GFP 発現細胞の細胞膜にタンパク質が分布している (矢印))

研究成果から、新しい薬物デリバリーシステム構築のために必要なリード分子の同定とその輸送機構について基礎的な機能を明らかとした。これまでの薬物輸送システムとは異なり、細胞外の血液や体液(水相)を介した移動ではなく、細胞膜(脂質相)を介した移動が可能であることを示した。さらに、この細胞膜を介した輸送は、細胞種のちがいにより制限されることが示され、組織または細胞特異的な薬物輸送の可能性が示された。さらに、免疫染色法の結果より細胞内へはほとんど移行せず、細胞膜にタンパク質が存在することから、細胞膜タンパク質等を標的としたデリバリーシステムおよび治療戦略への応用が期待される。今後は、治療効果のあるタンパク質との融合体の作製および治療実験へと発展させることで細胞膜移動タンパク質のデリバリー担体としての有用性について検討可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

該当なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

小泉 直也 (KOIZUMI, Naoya)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80433845