

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288082

研究課題名(和文) 高分子ナノカプセルを用いた生体内における新規酵素利用基盤の構築

研究課題名(英文) Development of novel platform for enzyme utilization in the body based on polymeric nanocapsules

研究代表者

岸村 顕広 (Kishimura, Akihiro)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70422326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高分子中空カプセルPICsomeを利用して生体内での酵素利用のための技術基盤の構築を目指した。具体的には、(1) Biodetoxification、(2) 酵素補充、(3) ナノ光源デリバリー、のための新技術の確立を目指した。(1)では、ヒスタミン分解酵素を封入したPICsomeを開発し、花粉症治療などに価値の高いBiodetoxificationシステムを開発した。(2)では、より穏和な酵素封入法や酵素の安定性向上法を開発し、さらに細胞導入制御手法を開発した。(3)では、発光酵素を封入したPICsomeナノ光源を開発し、外部光源フリーの光応答システムの端緒とした。

研究成果の概要(英文)：In this research, a novel platform for enzyme application, which allows for expansion of its scope and durability of enzyme activity in in vivo conditions, was pioneered, particularly using polymeric hollow capsule PICsomes with a size of ~100 nm. In this project, the following three topics were mainly investigated: (1) Enzyme-based biodetoxification nanosystem, (2) Nano-delivery system for enzyme replacement therapy, (3) Nano-delivery system of light source in in vivo conditions. In the topic of (1), PICsome containing histamine degradation enzyme was developed, and successful performance was confirmed in in vivo experiments using model mice. In the topic of (2), milder methods for enzyme encapsulation was developed, and effective factor for cellular internalization of the PICsome system was revealed. In the topic (3), bioluminescent enzyme, Nano-Luc, was successfully encapsulated into PICsomes, and its activity was confirmed for future development of light-driven nanosystem.

研究分野：生体材料学、高分子化学、生体関連化学

キーワード：酵素 ナノリアクター ベシクル タンパク質デリバリー ナノ医薬品 Biodetoxification

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の進歩とともに、タンパク質を疾患治療に用いる検討がなされてきた。なかでも、多様な生体反応を司る酵素は、酵素補充療法や酵素-プロドラッグ療法などの観点から活用が期待されている。しかし、タンパク質のような生体由来分子を生体内で活用するには、免疫系から回避し、異物として認識され排除/分解されることを回避しなければならない。例えば、高尿酸血症の治療薬であるラスブリカーゼは、再投与の際のアナフィラキシーショックを懸念して再投与しないことが推奨されている。これに対し、タンパク質を直接投与するのではなく、遺伝子を送達し、タンパク質を発現させる遺伝子治療があるが、遺伝子は細胞内に適切に導入しなければ機能しない点、免疫応答惹起の可能性やゲノムへの組み込みの問題、あるいは倫理的な観点から容易く利用できるとは限らない。また、細胞内に導入せずとも酵素を利用したい場面は存在する。従って、酵素を直接生体内で利用するための技術基盤を開発する価値は依然として大きい。これまで、タンパク質の PEG 化技術が免疫系からの回避や長期血中循環などで一定の成果を上げてきたが、修飾時の酵素活性の維持、最終的な酵素の利用率や寿命の観点で、生体内における酵素の十分な活用が達成できているとはいえない。一方、単に送達するだけであれば、いわゆるナノキャリアを用いた送達システムを用いることが考えられる。典型的には、リポソームなどのベシクルや、ポリマー型カプセルなどに酵素を封入して用いることが考えられるが、活性を維持したままの封入は容易でない。また、その多くが疎水的な隔壁からなるカプセルであるため、自由に酵素の基質となる物質を内部に導入することは難しい。実際、物質のやりとりをカプセル内外で行うために、チャンネルタンパク質などをカプセルの隔壁に再構成させるなどのプロセスが必要となる。これらの手法は、基質選択性などを出す場合には有利であるが、汎用的な応用が難しく、また調製が容易でない。さらに、ナノゲルなども酵素キャリアに有効と考えられるが、ゲルの場合、充填物の漏れだしの問題が懸念され、長期利用に限界がある。これらの課題に対し、我々は、我々が独自に開発を進めてきた高分子中空カプセル”PICsome“を用いたシステムの活用が非常に有効であると考えた。つまり、PICsome は、水溶液中で

直接作製できるだけでなく、物質透過性を制御できる隔壁を持つベシクルであるため、酵素を内水相に封入しておき、外部からの基質の侵入、生成物への変換/放出をスムーズに行うことができる。また、この PICsome は生体適合性に優れたポリエチレングリコール(PEG)鎖に覆われているだけでなく、サブミクロンスケールで自在に粒径の制御が可能であるため、十分な血中循環能や腫瘍集積能を付与することができる(JACS 2010, ChemCommun 2011; J. Control. Rel. 2013)。本研究課題では、酵素封入 PICsome を新たな生体内酵素利用基盤と位置付け、細胞レベル、動物個体レベルでの利用法を確立するための研究を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究では、水中で簡便に酵素を封入できる高分子中空カプセル PICsome を利用することで、生体適合性に優れ、生体内で安定に活性を維持し、長期間にわたって酵素を利用するための技術基盤を築くことを目指した。具体的には、(1) Biodetoxification、(2) 酵素補充、(3) ナノ光源デリバリー、を実行するための酵素封入 PICsome を作製し、疾患治療などに応用できる酵素型ナノリアクターの開発を目指した。(1)では、即時型アレルギーのトリガになるヒスタミンを分解する酵素(ジアミノオキシダーゼ; DAO)を封入した PICsome を開発し、花粉症などへの外用薬として利用価値のあるものの開発を目指した。(2)では、特定の酵素を欠損した細胞への β -gal 補充をはじめとして、酵素封入 PICsome の細胞導入制御技術の開発を目指した。(3)では、酵素を封入した PICsome をナノ光源とし、光応答性 PICsome やその他光応答システムと複合させることにより、外部光源フリーの光制御システムの創製を目指した。

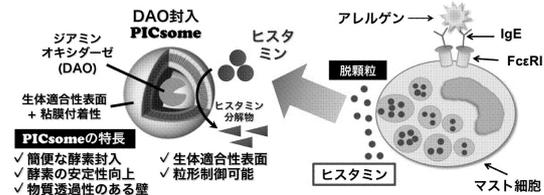
3. 研究の方法

2. に記載の3つの研究項目について、それぞれ以下のように進めた。

(1) Biodetoxification リアクター構築に向けて、生体内のアレルギー反応のメディエーターであるヒスタミンに注目し、これを分解・除去するためにジアミノオキシダーゼ (DAO; 分子量 ~170kDa; 等電点 5.2) を封入した (図)。DAO@PICsome の活性は、1,5-diaminopentane (別名: cadaverine)やヒスタミンを基質とし、酵素反応の生成物の一つである過酸化水素を、ペルオキシダーゼとその基質を用いた酵素反応と共役させることで

検出した。続いて、培養細胞として確立しているマスト細胞モデル RBL-2H3 を用いて脱顆粒したヒスタミンの除去能力の検定を行い、動物実験における投与量算出のための定量的評価を行った。

マウス耳介をマスト細胞の脱顆粒を誘導する試薬 (compound 48/80) で処理した後、DAO@PICsome の有無で局所の血管透過性の亢進に差が生じるか評価した。すなわち、



マウス耳介において血管内に投与した色素 (エバンスブルー) の血管漏出量を定量した。並行して、花粉症などで症状の緩和が望まれる目や鼻などの粘膜組織に注目し、粘膜に滞留して持続的に効果を示すためのPICsomeの機能化を進め、花粉症の外用薬としての応用を目指した。粘膜付着能の評価は、リポソームなどのナノ粒子について粘膜付着性や粘膜透過性を評価した過去の研究例を参考に、マウス、あるいは、ラットの腸管を用いて付着能を評価した。

(2) 細胞への酵素補充のためのリアクターとしては、四量体酵素である β -galactosidase (単量体分子量~540 kDa; 等電点 4.6) をモデル酵素として用いた。 β -galactosidase 封入体 (以下、 β -gal@PICsome) を作製した後、すみやかに活性測定を市販の基質を用いて行った。リソソーム病などの細胞に欠損した酵素の補充には、細胞内のリソソームに適切に酵素を送り込む必要があるため、培養細胞を用いての細胞取り込み機能の評価を行った。続いて、将来的な細胞質への酵素補充へと発展させるためにPICsomeの機能改良についても検討を進め、エンドソームからの脱出や取り込み経路の変更などを視野に入れたPICsomeベシクル壁内部へのリガンドの装着手法の検討を行った。また、酵素寿命や保存時の活性維持が重要であるため、PICsome内での酵素の安定性に関して作製手法・保存法の観点で検討を進めた。

(3) 生物発光型ナノ光源のための酵素として、発光強度に優れるウミシイタケルシフェラーゼ (分子量~36kDa)、及び、Nano Luc (分子量~19kDa) を利用し、PICsome 内包手法について検討を進めた。また、光開裂部を有する

PICsome の設計と開発も進め、光応答型のPICsomeの開発を進めた。

4. 研究成果

前出の3つの研究項目について、それぞれ以下のような成果を得た。

(1) Biodetoxification リアクター構築に向けて、DAOを封入したDAO封入PICsomeの調製に成功した。ヒスタミンなどを基質とし、残存ヒスタミンなどを定量することでDAOの活性の維持を確認した。さらにマスト細胞モデル培養細胞 RBL-2H3 を用いてDAO封入PICsomeのヒスタミン処理能力評価を行ったところ、脱顆粒後のペプチダーゼ共存条件であってもヒスタミンの処理が可能であることを見出した。また、DAOのみに比べてDAO@PICsomeがより持続的な処理能力を示すことを明らかとした。この成果は、高く評価され、Pacifichem2015において優秀ポスター賞を受賞した。また、マウス耳介で誘発させた炎症性応答を抑える効果を実証した。この成果は新規 biodetoxification ナノデバイスとして注目を集め、日本薬学会第137年会において講演ハイライトに選出された。さらに、花粉症などの症状緩和に用いるために、粘膜付着性に関する評価に着手し、特にマウス腸管をモデルに用いた closed loop 法が有効であることを見出した。

(2) 酵素補充用ナノリアクターとして、 β -galactosidase を PICsome に封入した β -gal@PICsome の作製を行った。特に、より封入酵素にダメージが残らない手法の開発を行い、ほとんど活性低下を招くことなく、 β -gal@PICsome を得ることができるようになった。

細胞内での活用のための実践的手法開発に向けて、PICsomeのPIC膜の化学修飾法の検討を進め、特に、PICsomeの細胞取り込み能と膜修飾の相関を明らかにした。 β -gal@PICsomeを用いた系についてさらに検討を進め、生体内での長期活用や長期保存に向けた安定性向上の検討を行った。その結果、デキストラン共封入条件では-20℃条件で一週間保存後でも活性が維持できた。また、単量体で活性を持つペルオキシダーゼ (HRP) についても顕著な活性維持効果が生体温度にて確認できたことから、PICsomeには酵素の実効濃度を高い状態で維持する働きに加え、酵素周囲の物理的外溢を軽減する保護効果があることも明らかとした。また、PIC膜へのペプチドリガンド修飾が可能であるこ

とを見出した。

(3) 生物発光型ナノ光源のための酵素として、発光強度や発光波長、あるいは酵素自体の分子量などの観点から、ウミシイタケルシフェラーゼと Nano-Luc に注目し、特に Nano-Luc については、低い封入効率ながらも PICsome に封入でき、ナノ光源として利用できることを明らかとした。同時に、これらの酵素の示す発光に反応して PICsome 機能が活性化するシステムの構築に向けて、クマリン誘導体による PICsome の化学修飾を行い、十分な量を導入可能であることを見出した。また、クマリン誘導体で修飾した PICsome を作製し、その光応答性について予備的な確認ができた。

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 12 件)

- ① Hengmin Tang, Yuki Sakamura, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, and *Akihiro Kishimura, Development of Enzyme Loaded Polyion Complex Vesicle (PICsome): Thermal Stability of Enzyme in PICsome compartment and Effect of Co-Encapsulation of Dextran on Enzyme Activity. *Macromol. Biosci.*, published online. DOI: 10.1002/mabi.201600542 査読有り
- ② 岸村 顕広、エマージングマテリアル・PICsome ~PEG と PEG のはざままで~ (An emerging material “PICsome”: A hot zone between “PEG” and “PEG”), *Drug Delivery System*, 2016, 31 (4), 308–319. 査読有り
- ③ Kenshiro Naoyama, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, and *Akihiro Kishimura, Fabrication of Dendrimer-based Polyion Complex Submicrometer-scaled Structures with Enhanced Stability under Physiological Conditions. *Macromol. Rapid Commun.*, **2016**, 37 (13), 1087–1093. DOI: 10.1002/marc.201600171 査読有り
- ④ Yasutaka Anraku, *Akihiro Kishimura, Mako Kamiya, Sayaka Tanaka, Takahiro Nomoto, Kazuko Toh, Yu Matsumoto, Shigeto Fukushima, Daiki Sueyoshi, Mitsunobu R. Kano, Yasuteru Urano, Nobuhiro Nishiyama and *Kazunori

Kataoka, Systemically Injectable Enzyme-loaded Polyion Complex Vesicles as *in vivo* Nanoreactors Functioning in Tumors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55 (2), 560–565. (DOI: 10.1002/anie.201508339) 査読有り

- ⑤ Sayan Chuanoi, Yasutaka Anraku, Mao Hori, *Akihiro Kishimura, *Kazunori Kataoka, Fabrication of polyion complex vesicles with enhanced salt and temperature resistance and their potential applications as enzymatic nanoreactors. *Biomacromolecules*, **2014**, 15 (7), 2389–2397. (DOI: 10.1021/bm500127g) 査読有り
- ⑥ *Horacio Cabral, Kanjiro Miyata, *Akihiro Kishimura, Nanodevices for studying nano-pathophysiology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, 74, 35–52. (DOI: 10.1016/j.addr.2014.06.003) 査読有り

[学会発表] (計 55 件)

- ① 唐 ヘンミン、森 健、片山 佳樹、田中 智之、○岸村 顕広、酵素封入型ナノリアクターによる生理活性物質の除去に基づく病態制御法開発: 生体内ヒスタミン分解・除去機能の評価、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日、仙台市(仙台国際センター)、口頭発表 (一般学術講演ハイライトに選出)
- ② Akihiro Kishimura, Development of Self-assembled Nano-structured Materials for Biomedical Applications, The 2nd Materials Research Society of Indonesia (MRS-Id) Meeting, Bandung, Indonesia, October 26, 2016. (Keynote lecture)
- ③ Akihiro Kishimura, Development of novel supramolecular hollow capsules “PICsomes” for biomedical applications. The 2nd International Conference on Nanomedicine (ChinaNanomedicine 2016), Wuhan, China, October 20, 2016. 招待講演
- ④ Akihiro Kishimura, Development of polyion complex nanostructures based on all-hydrophilic block copolymers. 22nd Ostwald-Colloquium of the German Colloid Society, Institute of Physical Chemistry, RWTH Aachen University, Aachen, Germany, September 2, 2016. 招待講演
- ⑤ Akihiro Kishimura, Engineering of enzyme

- nano-capsules for biomedical applications, International Conferences on Modern Materials and Technologies (CIMTEC) 2016: 11th International Conference Medical Applications of Novel Biomaterials and Nanotechnology, Perugia, Italy, June 7, 2016. 招待講演
- ⑥ 岸村 顕広、物質透過性ナノ膜を利用した生体高分子送達カプセルの設計と開発、第32回日本DDS学会学術集会・若手研究者企画ワークショップ、2016年6月30日、静岡コンベンションアーツセンター・グランシップ、静岡市。招待講演
- ⑦ ○Hengmin Tang, Yuki Sakamura, Satoshi Tanaka, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Akihiro Kishimura, Development of a novel enzymatic nano-reactors as biotransformation nanomedicine, THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES (Pacifichem 2015, #289), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, December 16, 2015, Poster. Student Poster Competition Award 受賞 (約3500件の応募者中54件が受賞)
- ⑧ 岸村 顕広、高分子透過膜からなるベシクルの創製と次世代DDSへの応用生体膜、第37回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2015年11月20日、熊本大学 大江キャンパス、熊本。招待講演
- ⑨ Akihiro Kishimura, Rational design of polyion complex nano-architectures for development of functional materials. 2015 Pusan-Gyeongnam/Kyushu-Seibu Joint Symposium on High Polymer (17th) and Fiber (15th), Dong-A University, Busan, Korea, November 13, 2015. 招待講演
- ⑩ 岸村 顕広、ポリイオンコンプレックスを基盤とする高分子ナノ構造材料の開発と応用、第151回東海高分子研究会講演会、2015年4月25日、名古屋工業大学、名古屋。招待講演
- ⑪ 岸村 顕広、物性制御可能なナノカプセルの開発と新しい生理学の可能性、第二回生体分子サイエンスセミナー、2014年9月2日、すずかけ台ホール、東京工業大学、東京。招待講演
- ⑫ 岸村 顕広、高分子中空ナノカプセルPICsomeを用いた新しいDDSのアプローチ、第30回日本DDS学会学術集会、2014年7月30日、慶応義塾大学(芝立キャンパス)、東京。招待講演
- ⑬ Akihiro Kishimura, Development of Polyion Complex Vesicles “PICsomes” with Semipermeable Properties As a Novel Platform for Nano-medicine, The 5th International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam, International University, Ho Chi Minh City, Vietnam, June 17, 2014. 招待講演
- ⑭ 岸村 顕広、ポリイオンコンプレックスを用いた水中での簡便なポリマーナノ構造形成と生体材料応用、第86回千葉地域活動高分子研究交流講演会、2014年6月10日、出光会館、市原市、千葉。招待講演
- ⑮ 岸村 顕広、ポリイオンコンプレックス型透過膜を有する中空カプセルPICsomeの開発とDDSへの応用、日本膜学会第36年会、2014年5月13日、早稲田大学(西早稲田キャンパス)、東京。招待講演
- [図書] (計2件)
1. 岸村顕広、静電相互作用を利用したポリアミノ酸由来高分子電解質のユニークな自己組織化とその生体材料応用(第1章第2節)、中西尚志・編集代表、松浦和則、矢貝史樹・編集幹事、角五 彰、岸村顕広、佐伯昭紀、竹岡敬和、内藤昌信、舟橋正浩・編集、自己組織化マテリアルのフロンティア、フロンティア出版:東京、pp.9-18。(2015年12月20日; 総ページ数336ページ) ISBN978-4-902410-26-6
2. 岸村顕広、高分子中空ナノカプセルPICsomeの作製法とその活用(第4章第4節)、丸山一雄・監修、DDSキャリア作製プロトコル集、株式会社シーエムシー出版:東京、pp.130-138。(2015年8月25日; 総ページ数262ページ) ISBN978-4-7813-1077-0
- [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
<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~katayama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸村 顕広 (KISHIMURA, Akihiro)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：70422326

(2) 研究分担者

該当せず。

(3) 連携研究者

該当せず。

(4) 研究協力者

唐 ヘンミン (TANG, Hengmin)
九州大学・大学院システム生命科学府・博士
後期課程
尚山 堅士郎 (NAOYAMA, Kenshiro)
九州大学・大学院システム生命科学府・博士
後期課程
山崎 北斗 (YAMASAKI, Hokuto)
九州大学・大学院システム生命科学府・博士
前期課程
寺内 幹雄 (TERAUCHI, Mikio)
九州大学・大学院システム生命科学府・博士
前期課程
小川 敦嗣 (OGAWA, Atsushi)
劉 一イ (LIU, Yiwei)
九州大学・大学院システム生命科学府・博士
前期課程