

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03838

研究課題名(和文) 癌治療用microRNAを内包した細胞膜透過性を有する人工ウイルス殻の創製

研究課題名(英文) Creation of micro-RNA-encapsulated artificial viral capsids bearing cell-penetrating ability

研究代表者

松浦 和則 (MATSUURA, Kazunori)

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号：60283389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は、トマトブッシュスタントウイルス由来の  $\beta$ -Annulusペプチドの自己集合により、ペプチドナノカプセル(人工ウイルスキャプシド)を創製することに成功している。本研究では、核酸医薬を内包した細胞透過性を有する人工ウイルスキャプシドを創製した。細胞透過性ペプチドHis16をC末端側に有する  $\beta$ -Annulusペプチドを合成し、一本鎖核酸を内包することに成功した。His16修飾人工ウイルスキャプシドは、未修飾のキャプシドよりもHT1080細胞に導入されやすことが明らかとなった。加えて、ジスルフィド結合を介した人工ウイルスキャプシドへの一本鎖核酸の内包にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed peptide nanocapsules (artificial viral capsids) self-assembled from  $\beta$ -annulus peptide from tomato bushy stunt virus. In this research project, we developed nucleic acids-encapsulated artificial viral capsids bearing cell-penetrating peptides. We succeeded in synthesizing  $\beta$ -annulus peptide bearing cell-penetrating His16 peptide at C-terminal, and encapsulating ssDNA into the artificial viral capsids modified with His16. The His16-modified artificial viral capsids were internalized well into HT1080 cells, whereas unmodified capsids hardly internalized. In addition, we have developed encapsulation of ssDNA via disulfide bonds into artificial viral capsids.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：人工ウイルスキャプシド 細胞透過性ペプチド 自己集合 核酸医薬 細胞内導入

1. 研究開始当初の背景

(1) 天然のウイルスは、タンパク質からなる数十 nm サイズの殻 (キャプシド) の内部に核酸を内包した正十二面体対称性の構造を有する生体超分子であり、60 の倍数個のタンパク質サブユニットが規則的に自己集合することで形成される。このようなウイルスキャプシドを「ナノ材料」という観点から眺めてみると、一義的なサイズ・空間・会合数を有する大変魅力的な生体分子材料であることから、近年、天然のウイルスキャプシドをナノテクノロジーに応用する研究が盛んに行われてきており、この分野の開拓者の一人である T. Douglas らは、2006 年の Science 誌の総説において、“Viruses: Making Friends with Old Foes” (宿敵と友達になる) というタイトルで、ウイルスキャプシドを利用したナノテクノロジーの魅力について解説している。例えば、これまでに植物ウイルスキャプシドの内部空間を利用して、無機微粒子の合成・内包、合成高分子やタンパク質の内包、機能性分子による表面修飾などが報告されている (総説として、Francis et al., *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 774 など)。

(2) そのような背景のもと、研究代表者の松浦らは世界に先駆けて、合成ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドの創製に成功している (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9662, 科研費 NEWS, 2013 年 Vol.1 など)。これは、トマトブッシュスタントウイルス(TBSV) の正 12 面体骨格を形成する 24 残基  $\beta$ -Annulus ペプチドが自己集合して形成される 30-50 nm 程度の中空ナノカプセルである。これまでに、 $\zeta$  電位測定によるペプチド末端の配向性の解明、カチオン性を有するカプセル内部への DNA の内包 (*Polymer J.*, **2013**, *45*, 529)、蛍光性 ZnO ナノ粒子の内包 (*Nanomaterials*, **2014**, *4*, 778)、N 末端の Ni-NTA 修飾による His-tag タンパク質の内包、C 末端側修飾によるカプセル表面へのタンパク質(HSA) や金ナノ粒子の提示 (*Polymer J.*, **2015**, *47*, 146)などに成功している。我々の人工ウイルスキャプシドは、完全に合成ペプチドのみから構築されるので、合理的な分子設計を行うことにより、毒性・免疫原性の回避、細胞標的性、細胞膜透過性、刺激応答性などの遺伝子・薬物キャリアーに必要な機能を装備することが可能である。

(3) 一方、癌治療は現在、外科的手術や放射線・重粒子線療法が主であるが、癌の転移などによる再発や患者への負担が問題となっている。また、従来からの抗癌剤治療では、副作用も多く、根本的な治療とはならない。近年、micro-RNA などの核酸医薬を用いた癌治療が活発に研究されている。これまで、microRNA のような核酸医薬を細胞内にデリバリーするためには、天然ウイルスのキャプシドが用いられてきたが、このような技術は、

体内に導入すると過剰な免疫反応や毒性を引き起こす危険性を有しており、より安全な核酸デリバリー材料の開発が望まれている。近年、合成高分子による核酸デリバリーも検討されているが、天然のウイルスと比較して、細胞内導入効率・発現効率の低さが問題となっている。

(4) 細胞膜透過ペプチドは、タンパク質や核酸を細胞内へ導入するためのツールとして、現在幅広く使用されている。研究分担者の岩崎らは、ヒスチジンのみが 16 残基連続した His16 が、既知の細胞膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン(Arg8)よりも非常に高い細胞膜透過能を有するという新知見を世界に先駆けて見出している(特許第 6202707 号)。従来の細胞膜透過性ペプチドはポリカチオン性であるために核酸のデリバリー材料には不向きであるが、この His16 は中性 pH で無電荷であるため、核酸と非特異的な複合体を形成しない。

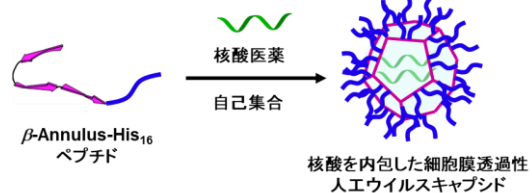


図 1. His16 修飾  $\beta$ -Annulus ペプチドの自己集合による核酸医薬を内包した細胞膜透過性人工ウイルスキャプシドの創製。

2. 研究の目的

本研究では、癌治療のための高効率・低毒性の microRNA キャリヤーとして、microRNA を内包した細胞膜透過性 His16 搭載人工ウイルス殻を開発し (図 1)、自己集合特性・細胞膜透過性・癌細胞治療効果の検討を目的とした。具体的には、①新規ペプチド  $\beta$ -Annulus-His16 の効率的合成法の確立、② His16 搭載人工ウイルス殻の構築と microRNA の効率的内包の確立、③ His16 搭載人工ウイルス殻の効率的な細胞内導入の確立、などを目標とした。

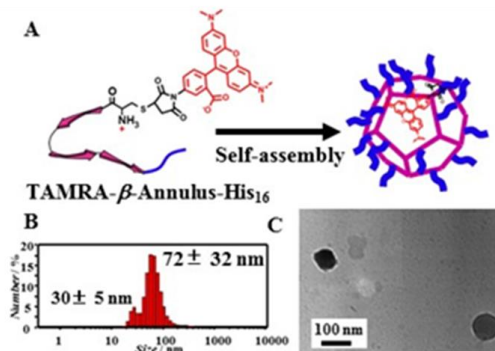


図 2. TAMRA ラベル His16- $\beta$ -Annulus ペプチドの自己集合による細胞膜透過性人工ウイルスキャプシドの形成 (A)、その DLS 粒径分布 (B)、および TEM 像 (C)。

### 3. 研究の方法

$\beta$ -Annulus ペプチド、His16- $\beta$ -Annulus ペプチドおよびその類縁ペプチドは、COMU を縮合剤とした Fmoc-固相法により合成した。場合に応じて、反応時間短縮のために、マイクロ波照射装置 (バイオタージ社製) を用いた。脱保護・脱樹脂後、逆相 HPLC (島津製作所製) により精製、MALDI-TOF-MS (ブルカードルトニクス製) により同定を行った。コイルドコイルを有する  $\beta$ -Annulus ペプチドは、C 末端が SBn 化された  $\beta$ -Annulus ペプチドと、N 末端に Cys を有するコイルドコイルペプチドを Native Chemical Ligation 法により連結することで合成した。

人工ウイルスキャプシドの粒径・形態は、動的光散乱(DLS、マルバーン社製)測定および透過型電子顕微鏡(TEM、日本電子製)観察により行った。TEM 観察の試料は、2% リンタングステン酸水溶液で染色して観察した。

人工ウイルスキャプシド内への核酸などの蛍光ラベルゲスト分子の内包は、凍結乾燥した  $\beta$ -Annulus ペプチド粉末に、所定のペプチド濃度になるように蛍光ラベルゲスト分子水溶液を加え、自己集合させることで行った。蛍光相関分光(FCS)装置 (浜松ホトニクス社製) により、蛍光ラベルゲスト分子のブラウン運動による自己相関関数を求め、理論式とのカーブフィッティングにより、内包後の拡散時間・内包率・複合体の粒径を算出した。

人工ウイルスキャプシドの HT1080 細胞内導入は、共焦点レーザー蛍光顕微鏡(CLSM、オリンパス社製)観察およびフローサイトメーター(FACS)測定により行った。

### 4. 研究成果

#### (1) His16 ペプチド提示人工ウイルスキャプシドの創製と細胞内導入

細胞透過性 His16 ペプチドを C 末端側に有する  $\beta$ -Annulus ペプチド (40 残基、配列: INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGSHHHHHHHHHHHHHHHHHH) を Fmoc-固相合成法により合成し、逆相 HPLC で精製、MALDI-TOF-MS で確認した。この His16- $\beta$ -annulus ペプチドは、水中で自己集合して 50-70 nm 程度の球状集合体を形成することが動的散乱(DLS)および透過型電子顕微鏡(TEM)観察からわかった。

また、C 末端に細胞透過性 His16 ペプチドを有し、N 末端に TAMRA 蛍光標識した  $\beta$ -Annulus ペプチドを合成し、その自己集合により His16 を提示した 70~100 nm 程度の人工ウイルスキャプシドを調製した (図 2)。これを HT1080 細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)観察およびフローサイトメーター(FACS)測定したところ、His16 提示人工ウイルスキャプシドは、未修飾の人工ウイルスキャプシドものよりも約 3.5 倍多く細胞内に取り込まれることがわかった (図 3)。

さらに、植物細胞であるタバコ培養細胞 (BY-2)への His16 提示人工ウイルスキャプシドの導入を検討したところ、CLSM により効率的な導入が確認された。His16 単独では植物細胞への導入は困難であるので、今後、His16 提示人工ウイルスキャプシドを用いた植物細胞への分子導入技術への応用が期待

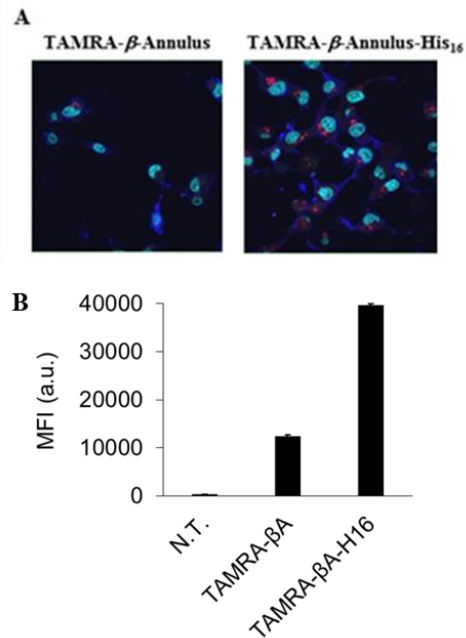


図 3. TAMRA ラベル人工ウイルスキャプシドの HT1080 細胞内導入に対する His16 ペプチド修飾の効果. (A) CLSM 観察 (赤蛍光: TAMRA, 水色蛍光: 細胞核), (B) FACS による取り込み量の比較.

できる。

#### (2) 蛍光相関分光法による人工ウイルスキャプシドへのゲスト分子の内包挙動解析

本研究では、核酸医薬を内包した人工ウイルスキャプシドの創製を検討する。人工ウイルスキャプシドへのゲスト分子の内包挙動を定量的に評価するために、蛍光相関分光(FCS)法により、様々な分子量の FITC 修飾デキストランの人工ウイルスキャプシドへの内包挙動を解析した。その結果、70 kDa 以下のデキストランでは殆ど内包されないが、それ以上の分子量では、分子量が大きくなるほど効果的に内包されるという分子量依存性を示すことを見出した。

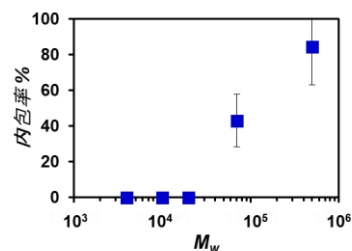


図 4. FITC ラベルデキストランの人工ウイルスキャプシドへの内包率の分子量依存性.

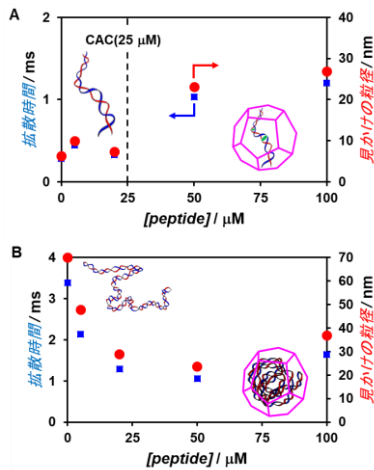


図5. 人工ウイルスキャプシドへのdsDNAの内包に伴うSYBR Greenの拡散時間および見かけの粒径のペプチド濃度依存性. (A) 200 bp DNA, (B) 2000 bp DNA.

また、二重鎖特異的蛍光色素であるSYBR Greenを用いて、200 bp および 2000 bp のサケ精子由来二本鎖DNAの人工ウイルスキャプシドへの内包のFCS解析を検討したところ、 $\beta$ -Annulus ペプチド濃度 50  $\mu$ M 以上で内包されることが明らかとなった(図5A)。2000 bp DNA の場合は、内包に伴う核酸の凝縮と思われる粒径の減少も観測された(図5B)。人工ウイルスキャプシドと複合化したDNAは、ヌクレアーゼDNase Iに耐性を有することから、DNAが内包されていることが確認された。

### (3) His16 ペプチド提示人工ウイルスキャプシドへの核酸の内包と細胞内導入

His16 を有する  $\beta$ -Annulus ペプチドを、TAMRA で蛍光ラベルした 23 nt 一本鎖DNA (核酸医薬の microRNA モデルとして) と複合化したところ、DLS および TEM から 100 nm 程度の球状複合体が観察された。また、FCS 法により、ペプチド濃度 100  $\mu$ M 以上で人工ウイルスキャプシドとの複合体を形成することがわかった。

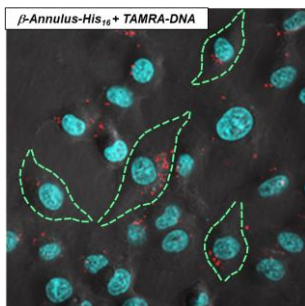


図6. TAMRA-DNA を内包した His16 修飾人工ウイルスキャプシドの HT1080 細胞内導入における CLSM 像. 赤蛍光: TAMRA, 水色蛍光: 細胞核

この複合体をヒト線維肉腫細胞(HT1080)細胞に導入し、CLSM 観察したところ、DNA 単体や His16 を有さない DNA-人工ウイルス

キャプシド複合体と比べて、取り込み効率が向上することが示唆された(図6)。また、細胞内に取り込まれた複合体の細胞内局在を解析したところ、複合体の大部分は細胞質には移行せずエンドソーム内に局在することが示唆された。

人工ウイルスキャプシドへの核酸の複合化効率を向上させるために、N 末端にカチオン性の Lys 残基を有する His16- $\beta$ -Annulus ペプチドを合成し、その自己集合挙動および核酸との複合化を検討したが、数百 nm 程度の大きな集合体しか形成しなかった。また、エンドソーム崩壊ペプチドである GALA ペプチドを C 末端に有する  $\beta$ -Annulus ペプチドを調製し、His16 ペプチドに加えて GALA ペプチドを表出した人工ウイルスキャプシドを作成し、細胞膜透過ならびにエンドソーム脱出を評価した。しかし、His16 と GALA ペプチドを表出した人工ウイルスキャプシドは、細胞膜透過は示したものの、エンドソーム脱出を示すまでは至らなかった。

### (4) ジスルフィド結合を介した人工ウイルスキャプシドへの核酸の内包

上記(3)において、静電相互作用により人工ウイルスキャプシドに一本鎖DNAを内包し、HT1080 細胞にある程度導入できることを明らかにしてきたが、複合体形成効率に問題があった。そこで、N 末端にジスルフィド結合を介して一本鎖DNA(23 nt)を連結した  $\beta$ -Annulus ペプチドを合成した(図7A)。コンジュゲートは、リン酸バッファー中で 40 nm 程度の球状の人工ウイルスキャプシドを形成することが DLS 測定、TEM 観察により明らかとなった(図7B, C)。また、この核酸内包キャプシドに還元剤 DTT を作用させると、キャプシド構造をある程度保持したまま一本鎖核酸を放出することが確認された。

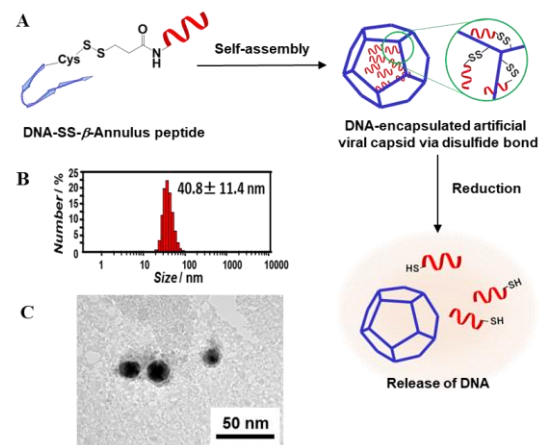


図7. (A) ジスルフィド結合でDNAを連結した人工ウイルスキャプシドの創製と還元によるDNA放出の模式図. (B) DLS 粒径分布, (C) TEM 像.

### (5) 突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製

天然に存在する突起を有するウイルスを

模倣して、ヘテロ二重鎖コイルドコイルの突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製を検討した。 $\beta$ -Annulus ペプチドの C 末端に Native Chemical Ligation によりコイルドコイル形成ペプチドを連結した。それに相補的なコイルドコイル形成ペプチドを 0.25 等量添加することで、突起を有する人工ウイルスキャプシドが TEM により確認できた (図 8)。一方、相補的なコイルドコイル形成ペプチドを 1 等量添加すると  $\beta$ -シート形成によるナノファイバーに形態変化することがわかった。今後、リガンドを有するコイルドコイルペプチドとの複合化により、細胞標的性を有する突起をもつ人工ウイルスキャプシドの創製が期待される。

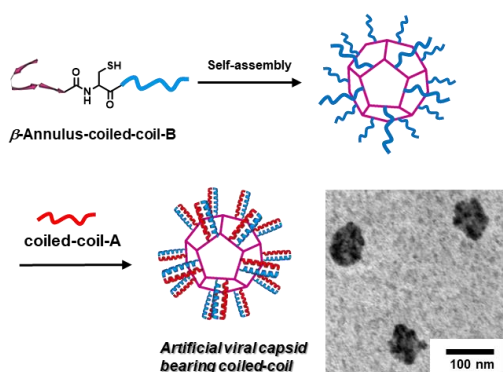


図 8. 表面にコイルドコイル突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製の模式図と TEM 像.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Kazunori Matsuura, Synthetic approaches to construct viral capsid-like spherical nanomaterials, *Chemical Communications*, 査読有, 54 巻, 2018, 印刷中.  
DOI: 10.1039/C8CC03844A
- ② Kazunori Matsuura, Construction of functional biomaterials by biomolecular self-assembly, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 査読有, 90 巻, 2017, 873–884.  
DOI: 10.1246/bcsj.20170133
- ③ Yukiko Kamiya, Yoshinobu Yamada, Takahiro Muro, Kazunori Matsuura, Hiroyuki Asanuma, DNA microcapsule for photo-triggered drug release system, *ChemMedChem*, 査読有, 12 巻, 2017, 2016–2021.  
DOI: 10.1002/cmdc.201700512
- ④ Seiya Fujita, Kazunori Matsuura, Self-assembled artificial viral capsid bearing coiled-coils at the surface, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 査読有, 15 巻, 2017, 5070–5077.  
DOI: 10.1039/C7OB00998D
- ⑤ Yoko Nakamura, Saki Yamada, Shoko Nishikawa, Kazunori Matsuura, DNA-modified artificial viral capsids self-assembled from DNA-conjugated  $\beta$ -annulus peptide, *Journal of Peptide Science*, 査読有, 23 巻, 2017, 636–643.  
DOI: 10.1002/psc.2967
- ⑥ Sayaka Kimura, Tsuyoshi Kawano, Takashi Iwasaki, Short polyhistidine peptides penetrate effectively into *Nicotiana tabacum* cultured cells and *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 81 巻, 2016, 112–118.  
DOI: 10.1080/09168451.2016.1234925
- ⑦ Kazunori Matsuura, Tomohiro Nakamura, Kenta Watanabe, Takanori, Noguchi, Kosuke Minamihata, Noriho Kamiya, Nobuo Kimizuka, self-assembly of Ni-NTA-modified  $\beta$ -annulus peptides into artificial viral capsids and encapsulation of His-tagged proteins, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 査読有, 14 巻, 2016, 7869–7874.  
DOI: 10.1039/C6OB01227B
- ⑧ Seiya Fujita, Kazunori Matsuura, Encapsulation of CdTe quantum dots in synthetic viral capsids, *Chemistry Letters*, 査読有, 45 巻, 2016, 922–924.  
DOI: 10.1246/cl.160396
- ⑨ Kazunori Matsuura, Yusaku Mizuguchi, Nobuo Kimizuka, Peptide nanospheres self-assembled from a modified  $\beta$ -annulus peptide of *Sesbania mosaic virus*, *Biopolymers: Peptide Science*, 106 巻, 2016, 470–475.  
DOI: 10.1002/bip.22774
- ⑩ 松浦和則, 人工ペプチドによる自己集合性材料—ウイルスキャプシドと光誘起ナノファイバー, *生物物理*, 査読有, 324 巻, 2016, 94–97.  
DOI: 10.2142/biophys.56.094
- ⑪ T. Iwasaki, Y. Tokuda, A. Kotake, H. Okada, S. Takeda, S. Kimura, M. Shinagawa, T. Kawano, Functional analysis of novel cell-penetrating peptide "polyhistidine" for application to drug delivery, *Peptide Science 2015*, 査読有, 2016, 211–214.
- ⑫ T. Iwasaki, Y. Tokuda, A. Kotake, H. Okada, S. Takeda, T. Kawano, Y. Nakayama, Functional Analysis of Novel Cell-Penetrating Peptide "Polyhistidine" for Application to Drug Delivery, *Journal of Controlled Release*, 査読有, 210 巻, 2015, 115–124.  
DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.05.268
- ⑬ 松浦和則, ウイルス由来ペプチドから自己集合したナノマテリアルの創製, *化学工業*, 査読無, 66 巻, 2015, 245–250.
- ⑭ K. Matsuura, G. Ueno, S. Fujita, Self-assembled artificial viral capsid decorated with gold nanoparticles, *Polymer Journal*, 査読有, 47 巻, 2015, 146–151.

[学会発表] (計 62 件)

- ① 佐藤祐希, 岩崎崇, 藤田聖矢, 稲葉央, 松浦和則, His16 修飾した人工ウイルスキャプシドの細胞内導入, 第 67 回高分子学会年次大会, 2018.
- ② Kazunori Matsuura, Syuya Fujiwara, Seiya Fujita, Fluorescence correlation spectroscopy analyses of encapsulation behavior of nanoparticles and polymers into synthetic viral capsid, IUMRS-ICAM 2017, 2017.
- ③ 中村陽子, 佐藤祐希, 稲葉央, 松浦和則, 人工ウイルスキャプシド内へのジスルフィド結合による核酸の内包, 2017 年日本化学会中国四国支部大会, 2017.
- ④ 佐藤祐希, 中村陽子, 藤田聖矢, 稲葉央, 松浦和則, ジスルフィド結合により DNA を内包した細胞透過性人工ウイルスキャプシドの構築, 第 66 回高分子討論会, 2017.
- ⑤ 岩崎崇, 徳田佳久, 小竹彩香, 笹原駿介, 河野強, 細胞膜透過ペプチド『ポリヒスチジン』の薬物輸送キャリアーとしての機能評価, 第 12 回ケミカルバイオロジー学会, 2017.
- ⑥ Kazunori Matsuura, Artificial viral capsids self-assembled from viral peptides, The 16th Akabori Conference, 2016.
- ⑦ Kazunori Matsuura, Seiya Fujita, Construction of artificial viral capsid bearing coiled-coil structures, The Fourth Asian Chemical Biology Conference, 2016.
- ⑧ Kazunori Matsuura, Tahahide Honjyo, Yuriko Shiomi, Takashi Iwasaki, Protein-modified artificial viral capsid self-assembled from protein-peptide conjugate, AsiaNano 2016, 2016.
- ⑨ Tatsuhiko Sakata, Takashi Iwasaki, Kazunori Matsuura, Creation of artificial viral capsid modified oligohistidine chain, PACIFICHEM 2015, 2015.
- ⑩ Kazunori Matsuura, Takahide Honjyo, Takashi Iwasaki, Dressed up artificial viral capsids self-assembled from  $\beta$ -annulus peptide, PACIFICHEM 2015, 2015.
- ⑪ 松浦和則, 本荘貴英, 塩見友梨子, 岩崎崇, 人工ウイルスキャプシド表面へのタンパク質の修飾, 第 64 回高分子討論会, 2015.

他 51 件

[図書] (計 4 件)

- ① 松浦和則 他 14 名, 丸善プラネット, ナノテクノロジーが拓く未来の医療, 2017, 254 (71-90).
- ② 岩崎崇 他 109 名, 技術情報協会, ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術, 2017, 557 (343-352).

③ 松浦和則 他 46 名, シーエムシー出版, DDS キャリア作成プロトコル集, 2015, 262 (139-148).

④ 松浦和則 他 48 名, フロンティア出版, 自己組織化マテリアルのフロンティア次世代を担う研究者による提案-未来を創るエキゾチック自己組織化戦略, 2015, 336 (1-8).

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 植物細胞に遺伝子を導入するための複合体

発明者: 岩崎崇、河野強、上中弘典、三浦千裕、渡辺倫子、山崎明歳

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-063568

出願年月日: 2017 年 03 月 29 日

国内外の別: 国内

名称: ポリヒスチジン修飾リポソーム

発明者: 岩崎崇、河野強、品川松美・小竹綾香

権利者: 国立大学法人鳥取大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-150709

出願年月日: 2015 年 07 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

① 松浦和則, 日本化学会 第 33 回 学術賞受賞 (2016 年 3 月 26 日)

② 岩崎崇, 日本海新聞 (2015 年 5 月 27 日) 読売新聞 (2015 年 6 月 16 日) 掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 和則 (MATSUURA, Kazunori)

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 60283389

(2) 研究分担者

岩崎 崇 (IWASAKI, Takashi)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号: 30585584

三浦 典正 (MIURA, Norimasa)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号: 30325005

(H29 年 9 月に資格喪失のため削除)