

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2011～2012

課題番号：23650288

研究課題名（和文） 人工ウイルス型ナノキャリアの開発と疾患に応答した薬物放出機能の構築

研究課題名（英文） Biological evaluation of protein nanocapsules containing doxorubicin

研究代表者

村田 正治 (MURATA MASA HARU)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号：30304744

研究成果の概要（和文）：

本研究ではウイルスをモデルとするのが新しいドラッグキャリアを開発している。我々が着目したのは、病原性の観点からウイルスそのものではなく、それと非常によく似た構造体を形成する small heat shock protein(Mj285)である。このタンパク質は分子量 16.5KDa のタンパク質 24 個が自己組織化することにより、内孔を有する球状構造体を形成している。厳格な立体構造と、隣接するタンパク質との強固な疎水性相互作用のために、このナノ構造体は非常に安定である。また構造体の内孔は疎水性のアミノ酸残基が配向しており、抗癌剤を含む多くの疎水性薬物を内包することが可能である。

そこで本研究では、このナノ構造体をドラッグキャリアとして利用し、その内孔に抗癌剤を固定化した新しい薬物送達システムを開発する。今回は上記のナノカプセルの細胞への軽質転換の機序と酸性オルガネラでの薬物放出挙動について報告する。

研究成果の概要（英文）：

This study describes the applications of a naturally occurring small heat shock protein (Hsp) that forms a cage-like structure to act as a drug carrier. Mutant Hsp cages (HspG41C) were expressed in Escherichia coli by substituting glycine 41 located inside the cage with a cysteine residue to allow conjugation with a fluorophore or a drug. The HspG41C cages were taken up by various cancer cell lines, mainly through clathrin-mediated endocytosis. The cages were detected in acidic organelles (endosomes/lysosomes) for at least 48 hours, but none were detected in the mitochondria or nuclei. To generate HspG41C cages carrying doxorubicin (DOX), an anticancer agent, the HspG41C cages and DOX were conjugated using acid-labile hydrazone linkers. The release of DOX from HspG41C cages was accelerated at pH 5.0, but was negligible at pH 7.2. The cytotoxic effects of HspG41C-DOX against Suit-2 and HepG2 cells were slightly weaker than those of free DOX, but the effects were almost identical in Huh-7 cells. Considering the relatively low release of DOX from HspG41C-DOX, HspG41C-DOX exhibited comparable activity towards HepG2 and Suit-2 cells and slightly stronger cytotoxicity towards Huh-7 cells than free DOX.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：ナノ材料、画像診断システム、DDS

1. 研究開始当初の背景

DDSにおける薬物キャリアとしてこれまでに様々な材料が試されてきた。理想的には薬剤を安定に封じ込める空間を有し、それを標的細胞まで輸送した後に、内包した薬物を有効濃度において放出する特性が望まれる。リポソームや高分子ミセルあるいはゲルなど、いくつかのキャリアにおいては薬剤の効果的な封じ込めと徐放に成功している。しかしながら一方で、*in vivo*における標的細胞特異性や局所での薬物放出能には依然課題が残されている。

従来の細胞ターゲティングは標的細胞表面に存在するマーカー分子を狙ったものである。この戦略は臓器選択性等の発現には効果的である反面、疾患細胞特異的な表面マーカー分子が容易に存在しないため、特に組織内に疾患細胞と正常細胞が混在する病巣においては、その特異性が期待通りには発揮されない。そこで本研究では異常細胞表面に発現する特異的なアンテナ分子を標的とする従来のターゲティングに加えて、さらに細胞シグナルの異常に基づく薬物放出システムを付加する。つまり細胞選択性を細胞内に薬物や遺伝子が入った後で、その活性の発揮を標的細胞シグナルで行うものであり、独自の薬物送達概念である。この二重の選択性によってDDSキャリアとしての特異性は格段に向上することが期待される。

また一方で、カプセルに内包した薬物を如何にして放出するか、についても十分な検討が必要である。タンパク質ナノカプセルは生体温度付近では極めてリジットな構造を有するため、内部に固定化した薬物をリリースするための何らかの工夫が必要である。特に副作用の低減を目指すためには、投与後、血中で漏れ出すことなく、標的細胞の中のみで放出される機序を構築する必要が有る。

2. 研究の目的

この新しい概念を実現するためのキャリアが、古細菌 Mj285 が構築するタンパク質ナノカプセルである。我々はこれまで高分子ミセルを基材とした DDS キャリアの開発を続けてきた。しかしながらより応答性の高いキャリア開発のためには、極めて洗練された感染機構をもつウイルスの様に、分子量分布のない、厳密に制御された立体構造を有する物質が望ましい。本研究で開発するタンパク質ナノ粒子はこの条件を十分に満たしており、これまでにな

い DDS キャリアと成り得る。興味深いことに、Mj285 ナノカプセルの形成は外相に露出した C 末端の数残基に依存しており、この領域を制御することによって粒子を崩壊させることができる。また一方で、その N 末端に配向する疎水性ヘリックスは、構造形成の重要な駆動力となっている。前年度までに、その C 末端に HBV の肝細胞への感染時に使われるタンパク質 PreS1 を遺伝子レベルで付与することで *in vitro* における肝臓特異性を大幅に向上させることに成功している。そこで本年度は、カプセル内孔の N 末端領域にポイントミューテーションを導入し、そこに抗癌剤をバイオコンジュゲートさせる方法を検討する。さらにその抗癌剤には酸性条件下で解裂するリンカーを導入することで、細胞内の酸性オルガネラでのみ抗癌剤をリリースする機構を構築する。このユニークな材料と新しいコンセプトに基づくターゲティングと薬物リリースにより、我々は薬物治療効果の向上と患者の QOL 改善を目指している。

3. 研究の方法

ナノカプセルの発現と精製

ナノカプセル HspG41C の遺伝子を定法にしたがって発現ベクター pET21a に挿入した。DNA シークエンシングで遺伝子配列を確認した後、組み換えベクター pET-HSPG41C を大腸菌株 BL21gold (DE3) へ形質転換した。この菌株を 100 mg/mL のアンピシリンを含む 2×YT 培地に接種し、37°C で振とう培養した。OD600 値が 0.5 に達した際に、終濃度 1mM の IPTG を加えて組み換えタンパクの発現を誘導し、そのまま 4 時間培養を続けた。

培養終了後、培地を遠心分離し、得られたペレットにリン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて十分に懸濁させた。これをプローブ型超音波照射装置でソニケーション (200 W, 45 s) し、終濃度がそれぞれ 5 および 1 mg/mL の DNase I、RNase A を加えた。4°C で遠心分離 (20 000g, 20 min) した後、不溶性分画を除去した。

組み換えタンパク質の精製は HiLoad 26/10 Q Sepharose HPTM アニオン交換カラムでイオン交換クロマトグラフィーを行った。塩濃度グラジエントによってタンパク質を溶離し、分取した各フラクションを SDS-PAGE で分析した。目的のタンパク質を含むフラクションは、TSKgel G3000SW カラムを用いてゲル濾過精製した。得られたタンパク質は MALDI-TOF 質量分析計によって確認した。

ドキソルビシン-マレイミド ヒドラゾン誘導体 (DOX-EMCH) の合成

ドキソルビシン塩酸塩 DOX (25 mg, 43 μmol) と EMCH (44 mg, 129 μmol) を 12ml のメタノールに溶解した。これにバスツールピペットを使って、二滴のトリフルオロ酢酸を加えた。遮光下において、そのまま室温で一昼夜攪拌した。エバポレーションによって反応溶液を 1ml に濃縮し、酢酸エチルから三回再結晶させた。結晶物を回収し、真空乾燥した。生成物は $^1\text{H-NMR}$ によって同定した。

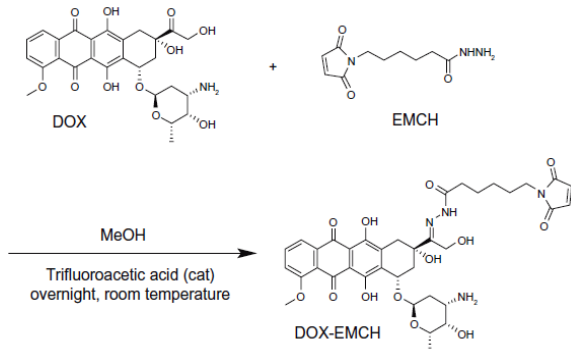


図1 DOX-EMCHの合成スキーム

DOX-EMCH のナノカプセルへの内包

HspG41C ナノカプセル (3.2mg) 各ナノカプセルをリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、これの DOX-EMCH (0.6mg) を加え室温で 2 時間攪拌した。さらに 4°C で 22 時間放置した後、未反応の DOX-EMCH を限外濾過によって精製した。DOX-EMCH 内包ナノカプセルの粒径を動的光散乱 (DLS) で分析したところ、内包の前後でそのサイズ (約 12nm) に大きな変化は観察されなかった。

4. 研究成果

ナノカプセルの細胞毒性と細胞への取込

細胞実験に先立って、ナノカプセルの細胞毒性を調べたところ、0~100 $\mu\text{g/ml}$ までの濃度領域においては細胞毒性が観察されなかった (図 2)。

また Alexa488 でラベル化したナノカプセルを各種細胞に投与したところ (1 μM)、24 時間をと長時間を要するものの、様々な細胞株に形質転換されることが示された (図 3) 恐らくナノカプセルはエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込みまれ田ものと推察される。一般的にエンドサイトーシスの経路は、クラスリン依存性、カベオラ依存性、マクロピノサイトーシス、そしてクラスリン-カベオラ非依存性の四つに分類される。ナノカプセルの取り込み機序を明らかにするために、各種のエンドサイトーシス阻害剤を用いた阻害実験を行った。実験には、CPZ (クラスリン依存型エンドサイトーシス阻害剤)、

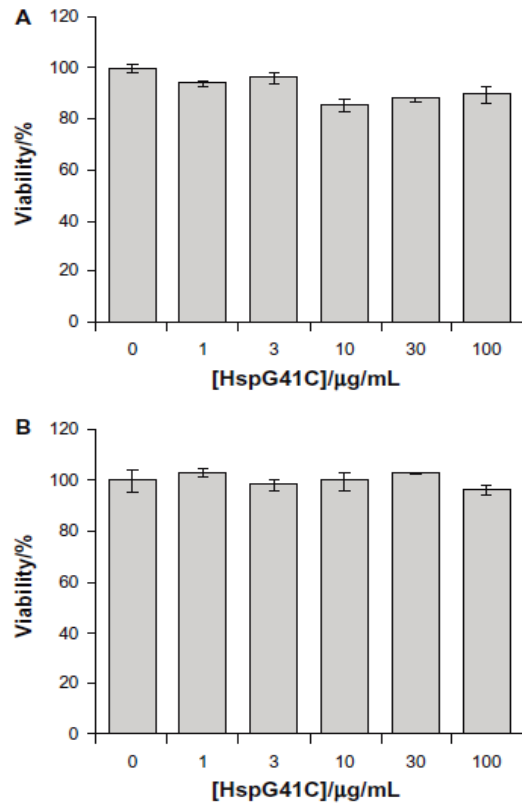


図2 ナノカプセルの細胞毒性

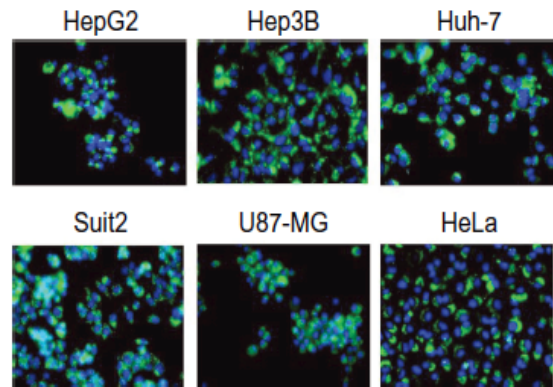


図3 各種細胞によるナノカプセルの取り込み

Amiloride (マクロピノサイトーシス阻害剤)、Filipin III (カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤) の三種の薬剤を使用した。この結果、ナノカプセルの投与前に細胞を Amiloride (500 μM)、あるいは Filipin III (15 μM) で処理することにより、その後のナノカプセルの取り込みはそれぞれ 8% および 19% 減少した。一方、CPZ (28 μM) の添加では、ナノカプセルの取り込みは 42% もの大幅な減少が観察され、さらに三種の阻害剤を同時に添加した際には 52% の阻害効果が示された。これらの結果は、ナノカプセルの細胞への形質転換がクラスリン依存型エンドサイトーシスによるものであることを示唆している。

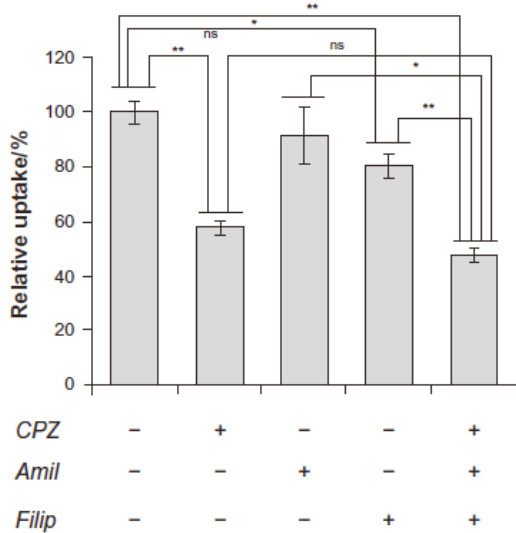


図4 ナノカプセルの取り込み阻害実験

細胞内におけるナノカプセルの局在

エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたナノカプセルの局在を共焦点顕微鏡によって観察した(図5)。この結果、Alexa488でラベル化したナノカプセル HspG41Cは、培地に投与して24時間後にエンドソームあるいはライソソームに集積しはじめることが分かった。さらに培養を継続し48時間後には、ほとんどのナノカプセルがエンドソームあるいはライソソームに局在した。またナノカプセルのごく一部はミトコンドリアにも観察された。恐らくエンドソームからの離脱にはミトコンドリアへの集積が必要であるためであろう。

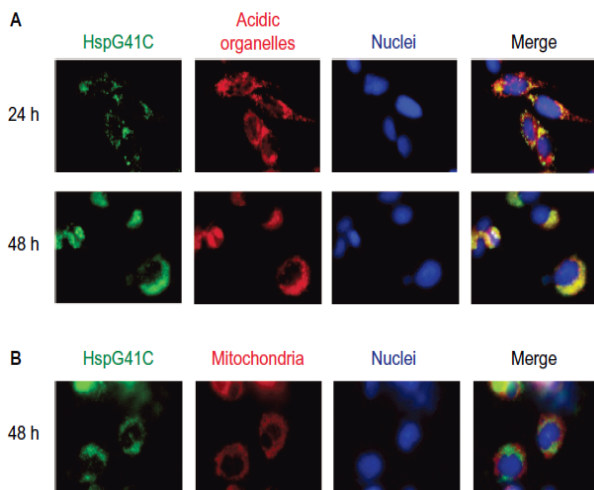


図5 細胞内でのナノカプセルの局在化

酸性オルガネラ(A)、ミトコンドリア(B)をそれぞれLysoTracker® RedあるいはMitoTracker® Redでそれぞれ染色。HspG41CはAlexa488でラベル化し、細胞核はHoechst33342で染色。所定の時間毎に蛍光顕微鏡により観察。

DOX-EMCH 内包ナノカプセルからの環境応答型薬剤放出

前述のプロトールにしたがって作成したDOX-EMCH内包ナノカプセルを0.2Mクエン酸緩衝液(pH5.0)あるいは0.2Mリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解し、終濃度を52μMとした。これらの溶液を37°Cで所定の時間放置し、カプセルから放出されたDOXを限外濾過(MWCO100,000)によって精製し、溶液中に含まれるDOXを紫外可視分光光度計により定量した。この結果、その放出挙動は溶液のpHに依存し、pH5.0においては約60%のDOXがナノカプセルから放出されることが分かった(図6)。一方、pH7.2ではその放出量は10%以下にとどまった。これはDOXとナノカプセルをコンジュゲートとしているヒドラゾン結合が酸性条件下で解裂したためであると推察される。ナノカプセルが細胞内で局在した酸性オルガネラもpH4~6とされており、DOX-EMCH内包ナノカプセルはこれらの細胞小器官に集積することによって、内包する抗癌剤DOXを放出することが期待される。今後は培養細胞を用いた実験を引き続き実施し、ナノカプセルを用いたドラッグデリバリーシステムの開発を行う予定である。

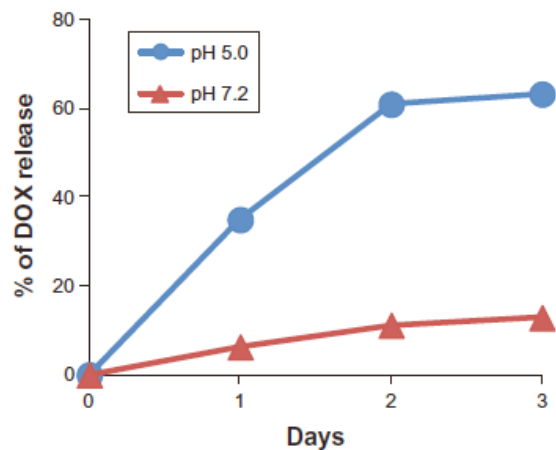


図6 DOX-EMCH内包ナノカプセルからのpH依存的なDOX放出

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- Riki Toita, Masaharu Murata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida and Makoto Hashizume, "Biological Evaluation of Protein Nanocapsules Containing Doxorubicin", *International*

- Journal of Nanomedicine*, **8**, 1989–1999 (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S40239>
2. Kensuke Kubota, Toshio Doi, Masaharu Murata, Kazu Kobayakawa, Katsumi Harimaya, Keiichiro Shiba, Makoto Hashizume, Yukihide Iwamoto, Seiji Okada, “Disturbance of ribcage development causes progressive thoracic scoliosis: The creation of a nonsurgical structural scoliosis model in mice”, *Journal of Bone and Joint Surgery*, in press.
HP: <http://jbjs.org>
 3. Hirotarō Kitazaki, Takeshi Mori, Jeong-Hun Kang, Takuro Niidome, Masaharu Murata, Makoto Hashizume, Yoshiki Katayama, “A colorimetric assay of protein kinase activity based on peptide-induced coagulation of gold nanorods”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **99**, 7–11 (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.08.028>
 4. Yuki Kawai, Masaharu Murata, Masahiko Hashimoto, Kazuhiko Tsukagoshi, “Tube Radial Distribution of Solvents Observed in an Aqueous Ionic Liquid Mixed Solution Delivered into a Capillary Tube”, *Analytical Sciences*, **28**, 1029-1031(2012).
DOI: <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.28.1029>
 5. Byunghyun Cho, Hee-Ho Lee, Jang-Kyoo Shin, Masaharu Murata, Kenoki Ohuchida and Makoto Hashizume, “DETECTION OF PANCREATIC CANCER CELLS (SUIT-2) USING AN FET-BASED BIOSENSOR WITH AN EXTENDED Au GATE”, *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, **24**(2), 131-137 (2012)
DOI: 10.4015/S1016237212500196
 6. Riki Toita, Masaharu Murata, Shigekazu Tabata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, and Makoto Hashizume, “Development of Human Hepatocellular Carcinoma Cell-Targeted Protein Cages”, *Bioconjugate Chemistry*, **23**, 1494–1501(2012)
DOI: 10.1021/bc300015f
 7. Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Kaori Umezaki, Riki Toita, Shigekazu Tabata, Jing Shu Piao, Kana Abe, Jeong-Hun Kang, Kenoki Oouchida, Lin Cui, Makoto Hashizume, “Liver cell specific targeting by the preS1 domain of hepatitis B virus surface antigen displayed on protein nanocages”, *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 4353–4362(2012)
DOI: 10.2147/IJN.S31365
 8. Akira Tsuchiya, Yuki Naritomi, Satoshi Kushio, Jeong-Hun Kang, Masaharu Murata, Makoto Hashizume, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, “Improvement in the colloidal stability of protein kinase-responsive polyplexes by PEG modification”, *Journal of Biomedical*

Materials Research A, **100A**,
1136-1141(2012)
DOI: 10.1002/jbm.a.34049

[学会発表] (計 5 件)

1. 村田正治、“先端医療におけるナノ診断とナノ治療”、第49回化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日、北九州国際会議場
2. 村田正治、楢原佐由子、朴晶淑、戸井田力、河野喬仁、崔林、大内田研宙、橋爪誠、“タンパク質ナノカプセルの機能化とドラッグデリバリーへの応用”、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月7日、北海道大学高等教育推進機構
3. 河野喬仁、村田正治、朴晶淑、楢原佐由子、大内田研宙、橋爪誠、“ガドリニウム錯体内包タンパク質ナノカプセルを用いたMRI造影剤の開発”、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月7日、北海道大学高等教育推進機構
4. 楢原佐由子、村田正治、朴晶淑、戸井田力、河野喬仁、崔林、大内田研宙、橋爪誠、“膵癌標的化タンパク質ナノカプセルの設計と機能評価”、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月7日、北海道大学高等教育推進機構
5. 村田正治、楢原佐由子、朴晶淑、河野喬仁、戸井田力、崔林、大内田研宙、橋爪誠、“プロテインナノケージの機能化とターゲティングデリバリー”、2012年11月26日、仙台国際センター

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：ナノカプセル、組成物、ポリヌクレオチド、組換えベクター及び形質転換体
発明者：村田正治、橋爪誠
権利者：九州大学
番号：特願 2013-065627
出願年月日：2013年3月27日
国内外の別：国内

発明の名称：共鳴信号増幅用プローブ及び内視鏡用高周波処置具
代表発明者 橋爪 誠
出願番号：特願 2012-021708
出願日：2012/2/3

○取得状況 (計 2 件)

発明の名称：診断システム
代表発明者 橋爪 誠
出願番号：特願 2010-227295
出願日：2010/10/7
公開日：2012/4/26
公開番号：特開 2012-080939

発明の名称：診断システム
代表発明者 橋爪 誠
出願番号：PCT/JP2011/070216
出願日：2011-09-06
公開日：2012-04-12
公開番号：W02012/046530

[その他]

- <http://www.cmeit.org>
- <http://camiku.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田正治 (MURATA MASAHARU)
九州大学先端融合医療レドックスナビ
研究拠点・准教授
研究者番号：30304744

(2) 連携研究者

橋爪 誠 (HASHIZUME MAKOTO)
九州大学大学院医学研究院・教授
研究者番号：90198664

河野 喬仁 (TAKAHITO KAWANO)
九州大学先端融合医療レドックスナビ
研究拠点・特任助教
研究者番号：90526831