

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560224

研究課題名(和文) Sonochemical internalization法の確立

研究課題名(英文) Development of the sonochemical internalization method

研究代表者

大槻 高史(Ohtsuki, Takashi)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：80321735

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)：本研究では、Sonochemical internalization法という「細胞質内への物質導入を超音波で誘導する方法」を提案し、開発に取り組んだ。近年、Cell-penetrating peptide (CPP)を付加した蛋白質等の細胞内導入が盛んに行われているが、エンドサイトーシスで細胞内に入るもののエンドソーム内に集積してしまい、機能が現れないことも多い。そのようなCPP融合蛋白質をエンドソームから出すための起爆剤として「超音波に応答して活性酸素種を出す音増感剤」の利用を検討した。僅かではあるが、複合体分子を超音波依存的にエンドソームを脱出させ細胞質へと運ぶことに成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a method for cytosolic delivery of proteins and peptides using sonosensitizers and ultrasonic waves. This method is named as sonochemical internalization. Recently, many researchers have used cell-penetrating peptides (CPP) for cytosolic delivery of proteins or peptides. However, in many cases, the CPP-fused molecules are entrapped in endosomes. In this study, we attempted to use sonosensitizers and ultrasonic waves for the endosomal escape of the CPP-fused molecule. We confirmed the ultrasound-dependent endosomal escape slightly but certainly.

研究分野：生体関連化学

キーワード：超音波 CPP RNA 音増感剤 SCI

## 1. 研究開始当初の背景

筆者らは、光をあてた細胞のみで細胞質内に RNA を導入する方法を開発した。この方法において要となるのは光応答性 RNA キャリアであり、これは RNA キャリア蛋白質に光増感剤を共有結合させた分子である (Bioconjug. Chem, 2008)。このキャリアで細胞内に運び込んだ RNA はエンドソームという小胞に滞留して全く機能しないが、光を当てるとエンドソームが崩壊し、トラップされていた RNA は細胞質に拡がる (このとき起こるエンドソーム崩壊は、光照射時に光増感剤から生成する活性酸素種 [ROS] の量と相関している)。つまり、光応答性キャリアを用いると、光による RNA の細胞質内導入が起こることが分かった (J. Control. Release, 2009)。同様に、光増感剤と組み合わせることで「細胞内に侵入しエンドソーム内局在する蛋白質」の細胞質内導入の光誘導も可能である。

一方、近年、超音波照射により ROS を生じる物質が報告されてきている。その中には、酸化チタンのような無機物質 (J. Control. Release 2011, 149, 190) もあるが、有機色素類も含まれている (Ultrasonics 2012, 52, 490)。これらは音増感剤 (sonosensitizer) と呼ばれている。

上記の、光で RNA や蛋白質の細胞質内導入を誘導する方法は、in vivo に応用する場合に、光の到達深度に問題があり生体組織の深部への適用が難しい。そこで、音増感剤を利用して、超音波で細胞質内分子導入を誘導する方法の提案に思い至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、光と光増感剤とエンドソーム局在性分子の組み合わせを用いたのと同様に、超音波と音増感剤とエンドソーム局在性分子の組み合わせでエンドソーム破壊 (そして生体分子の細胞質内導入) を起こす方法について検討する。すなわち、エンドソーム局在性分子と音増感剤を細胞に投与した後、エンドソームに集積してきた頃に超音波の力でエンドソーム破壊を引き起こし、生体分子の細胞質内導入を行う方法を SCI 法として提唱し 確立することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 音増感剤の探索

超音波照射時に ROS 生成を介してエンドソーム破壊を引き起こすような音増感剤を探した。まず、市販の有機色素の中から、超音波照射時に ROS 生成するものを探し、また、細胞投与時にエンドソーム局在するものを探した。

### (2) 蛋白質に付加可能な音増感剤の合成

既知の音増感剤に対して、蛋白質に結合可能な官能基 (マレイミド基) をもつものの合成を行った。

(3) エンドソーム局在性音増感剤とエンドソーム局在性蛋白質を用いた SCI 法の試行  
細胞内に侵入してエンドソームに局在する機能分子として、Cell-penetrating peptide (CPP) 融合型 RNA キャリア蛋白質および CPP 融合型アポトーシス誘導蛋白質を用いた。このエンドソーム局在性機能分子とエンドソーム局在性音増感剤とを培養細胞に投与し、その後、超音波照射することでエンドソーム局在性機能分子がエンドソームを脱出して細胞質へと拡散するかどうかを調べた。

### (4) 超音波応答性蛋白質分子の作製

細胞内侵入性かつエンドソーム局在性の蛋白質に、音増感剤を付加したものを作製した。このとき、上述の CPP 融合型 RNA キャリア蛋白質および CPP 融合型アポトーシス誘導蛋白質を用いた。これらの蛋白質の SH 基に対してマレイミド基をもつ音増感剤を付加させ、ゲル濾過により精製した。

### (5) エンドソーム局在性・超音波応答性機能分子による SCI 法の検討

(4) で作った超音波応答性蛋白質分子を培養細胞に加え、この分子がエンドソームに蓄積することを蛍光顕微鏡で確認した。ここで超音波を照射し、超音波照射時に機能分子が細胞質内へと拡散するかどうかを調べた。その後、導入した分子による細胞内機能発現を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 音増感剤の探索

市販の有機色素の中で、RoseBengal やポルフィリン等から、超音波照射時に ROS 生成することが確認された。これらは細胞投与時にエンドソームに局在とまではいかないが、ある程度移行した。これらは音増感剤としては既知のものである。効率良く ROS 生成する新規の音増感剤は見つからなかった。

### (2) 蛋白質に付加可能な音増感剤の合成

音増感剤の RoseBengal やポルフィリンに対して、蛋白質に結合可能な官能基 (マレイミド基) をもつものの有機合成に成功した。

### (3) エンドソーム局在性音増感剤とエンドソーム局在性蛋白質を用いた SCI 法の試行

エンドソーム局在性蛋白質とエンドソーム局在性音増感剤とを培養細胞に投与し、その後、超音波照射したが、エンドソームの脱出は見られなかった。これはエンドソーム局在性蛋白質と音増感剤とを別々に用いたせ

いであると考え、(4)の、蛋白質 音増感剤  
コンジュゲートの作製に進んだ。

(4) 超音波応答性蛋白質分子の作製  
細胞内侵入性かつエンドソーム局在性の蛋白質 (CPP 融合型 RNA キャリア蛋白質、および CPP 融合型アポトーシス誘導蛋白質) に、音増感剤の付加を試みた。ポルフィリンの付加については、この化合物が疎水性が高いため水溶液中での反応を進めることが困難であったが、RoseBengal を付加したものを作製には成功した。

(5) エンドソーム局在性・超音波応答性機能分子による SCI 法の検討

(4) で作製した超音波応答性蛋白質分子を培養細胞に投与した後、超音波照射を行った。照射強度と照射時間を変えて検討を行った。強い照射条件において、僅かではあるが、CPP 融合型 RNA キャリア蛋白質と RNA の複合体分子を超音波依存的にエンドソームを脱出させ細胞質へと運ぶことに成功した。

以上により SCI 法という新手法が使える可能性が見えてきた。今後、さらに音増感剤の種類の検討や導入条件の検討により SCI 法による導入効率を高めたい。

## 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 2 件)

Hakata, Y., Tsuchiya, S., Michiue, H., Ohtsuki, T., Matsui, H., Miyazawa M. and Kitamatsu, M., Intracellular delivery of a peptide cargo by a cell-penetrating peptide via leucine-zippers does not affect the function of cargo, Chemical Communications, 51, 413-416 (2015) DOI: 10.1039/c4cc07459a

Akahoshi, A., Doi, Y., Sisido, M., Watanabe, K., Ohtsuki, T., Photo-dependent protein biosynthesis using a caged aminoacyl-tRNA. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 24, 5369-5372 (2014)

〔学会発表〕(計 7 件)

原田敦史、山本聡、弓場英司、河野健司、超音波力学療法のための酸化チタンナノ粒子内包高分子ミセル、分子デリバリー研究会：物理と薬学のコラボレーション、慶應義塾大学矢上キャンパス(神奈川県)、2014.12.5

三木 駿也、澄田 憲祐、渡邊 和則、平川 和貴、岡崎 茂俊、大槻 高史、「PCI 法におけるエンドソーム脱出機構の解明」第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014.11.27

大槻 高史、藤原 隼人、畑地 祐里、北松 瑞生、渡邊 和則 「光化学的に細胞質内に侵入するペプチド分子の設計」光化学討論会、札幌、2014.10.11-13

三木 駿也、澄田 憲祐、渡邊 和則、平川 和貴・岡崎 茂俊、大槻 高史 「光による CPP 融合物質のエンドソーム脱出の機構解明」光化学討論会、札幌、2014.10.11-13

Atsushi Harada, Eiji Nakata, and Takashi Ohtsuki, In vitro performance of ultrasound-dependent drug delivery system, The 5th International Symposium of Advanced Energy Science, Kyoto, 2014.9.30-10.1

山本聡、弓場英司、原田敦史、河野健司、酸化チタンナノ粒子内包ポリイオンコンプレックスミセルの超音波照射による殺細胞効果発現メカニズム評価、第 63 回高分子討論会、長崎大学文教キャンパス(長崎県)、2014.9.24-26

三木 駿也、澄田 憲祐、渡邊 和則、平川 和貴、岡崎 茂俊、大槻 高史、光増感による CPP 融合物質のエンドソーム脱出の分子メカニズムの解明、第 36 回 日本分子生物学会年会、神戸、2013.12.3

Atsushi Harada, Eiji Nakata and Takashi Ohtsuki, Development of drug delivery system using ROS generation by ultrasound irradiation. The 4th International Symposium of Advanced Energy Science, 2013.9.30-10.1, Kyoto

〔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  
<http://www.biotech.okayama-u.ac.jp/labs/ohtsuki/index.htm>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

大槻 高史 (OHTSUKI TAKASHI)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号：80321735

(2)研究分担者

原田 敦史 (HARADA ATSUSHI)  
大阪府立大学・大学院工学系研究科・准教授  
研究者番号：50302774

(3)連携研究者

中田 栄司 (NAKATA EIJI)  
京都大学・エネルギー理工学研究所・講師  
研究者番号：70467827