

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26289310

研究課題名(和文)高機能化タンパク質ナノスフィアによるがん細胞ターゲティング

研究課題名(英文)Targeting of cancer cells by protein nanospheres with high functions

研究代表者

小畠 英理 (Kobatake, Eiry)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：00225484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：疎水性温度応答性ポリペプチドとポリアスパラギン酸の融合タンパク質が、加温により直径30 nm程度の均一なナノスフィアを形成することが明らかとなった。このナノスフィアは、分子設計により表面に任意の機能タンパク質を提示することが可能であり、内部は疎水性コアを形成するため、疎水性化合物を容易に内包することができる。これを利用してがん細胞への特異的送達を行うため、表面に分子認識機能を有する分子を提示し、内部には抗がん剤を包含したタンパク質ナノスフィアを構築した。これらタンパク質ナノスフィアは、がん細胞を特異的に認識することができ、がん細胞に到達後は内部の薬剤を放出し殺傷できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, protein nanospheres were constructed for drug delivery system (DDS). Component proteins were consisting of hydrophobic thermo-responsive protein and poly-aspartic acids. This protein could be assembled and formed nanospheres by mild heating. Molecular recognizing functional proteins could be displayed on the surface of nanospheres. On the other hand, hydrophobic anti-cancer drugs could be incorporated into the inside of nanospheres. These modified nanospheres could recognized cancer cells specifically, and kill cells by releasing anti-cancer drugs.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質 ナノ粒子 DDS 抗がん 生体機能材料

1. 研究開始当初の背景

医療の高度化に伴い、薬物の体内分布を時空間的に制御して副作用を最低限に抑制し、高精度なピンポイント治療を目指す DDS への関心がますます高まっている。DDS においてターゲティング能を賦与するためには、標的指向性を有するキャリアに薬剤を保持させ、目的部位に選択的に到達させる手法がとられる。これまで DDS のキャリアとして研究されているのは、リポソーム、合成ポリマー、磁性粒子など多岐にわたっているものの、生体分子のみを用いたキャリア構築はほとんど報告がない。生体分子、特にタンパク質の利用により、タンパク質分子のみが達成し得る極めて高度な機能を賦与したナノキャリアが構築でき、より高度な治療・診断が期待される。

エラスチン由来のペプチドの繰り返し配列(ELP)は、転移温度以上でコアセルベーションという現象により可逆的に凝集することが知られている(J. Am. Chem. Soc., 113, 4346, 1991)。しかし、形成される凝集塊は形状、サイズの制御が困難であり、マイクロメートルスケールの不定形な塊となる。代表者らはこれまでの研究により、温度応答特性を示す ELP の一つである (GVGVP)_n の末端にポリアスパラギン酸鎖(Dm)を連結したタンパク質を転移温度以上に加熱すると、(GVGVP)_n 部位の可逆的凝集および Dm 部位の静電的な反発により凝集体のサイズがある程度制御された構造体を作製できることを明らかにしてきた(Biomaterials, 30, 3450, 2009)。しかし、がん細胞をターゲットとする DDS キャリアとして資するには EPR (Enhanced Permeation and Retention) 効果発現のために、粒径を 100 nm 以下にすることが望ましい。さらにターゲットとするがん組織の状況に応じて粒径を精密に制御できれば、例えば 30 nm 程度の粒径が必要とされる繊維質な膵臓がんへの DDS も可能となる。また従来の粒子では通常 35 付近に設定される転移温度以下で粒子が崩壊してしまうため、調製が難しいことや、生理的条件下での粒子形状が不安定等の欠点があった。

2. 研究の目的

本研究は、粒径がナノメートルスケールで精密に制御され、かつ高度に機能化された安定なタンパク質ナノスフィアを構築し、その生体内利用に向けての基礎的評価を行うとともに、がん細胞へのターゲティングにより効果的ながんの治療・診断を行うことを目的として行行った。

本研究では、基本骨格となる繰り返し単位配列を変化させることにより、加熱・冷却後も粒子形状を安定に保持できるナノスフィアを構築した。そして、その粒子表面にはがん細胞特異的に結合する標的指向性分子を提示し、粒子内部には薬剤を内包したナノキャリアを作製し、がん細胞の殺傷を試みた。

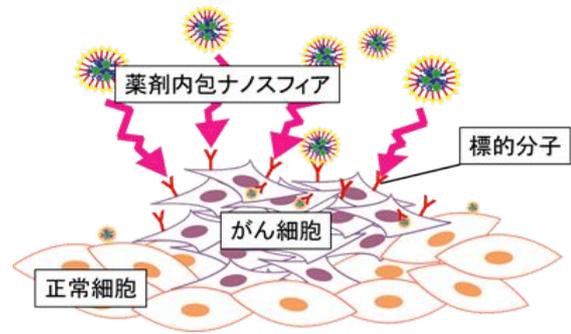


図1 本研究の概念図

3. 研究の方法

(1) タンパク質の設計および発現・精製

ナノスフィアの基本構造となるタンパク質は、(AVGVP)_n とポリアスパラギン酸(Dm)を遺伝子工学的に連結して作製した。このベクターを大腸菌に導入して組換え大腸菌を作製し、タンパク質の発現・精製を行った。

(2) 動的光散乱による粒子径測定

設計の狙い通りに、作製したタンパク質がサイズ制御された粒子を形成するかどうかを動的光散乱(DLS)により測定した。この際、(AVGVP)_n による温度特性を評価するため、それぞれのタンパク質について温度を変化させて粒子径を測定した。

(3) 電子顕微鏡による粒子の形態観察

ナノ粒子形成前後での形状、およびナノ粒子の安定性を確認するため、低温(25℃)および高温(50℃)移行後、さらに低温(25℃)に戻したときの形態を、透過型電子顕微鏡(TEM)により観察した。

(4) 蛍光物質による粒子内部の状態変化観察

周囲の環境から極性溶媒が減少する、あるいは蛍光物質の動きが制限されると蛍光を発する環境応答型の蛍光物質を使用して、温度による(AVGVP)_nDm 内部の変化を観察した。まずタンパク質中に存在する Lys 残基を化学結合により蛍光分子で標識し、温度を変化させて蛍光強度を測定した。これにより(AVGVP)_n 部位が疎水性コアを有する粒子を形成するかどうかを評価することができる。

(5) タンパク質内部への疎水性分子取り込みの基礎的評価

DDS への応用の可能性を探るため、疎水性低分子化合物がタンパク質内部に取り込まれるかどうかを、疎水性蛍光プローブを用いて評価した。

(6) 分子認識タンパク質導入による多機能化ナノスフィアの構築

薬剤を特定のがん細胞にデリバリーするためには、DDS キャリアに分子認識能を賦与することが重要である。そこで腫瘍細胞に過剰発現する EGF (epidermal growth factor) レセプターをターゲットとするために、EGF と(AVGVP)_n との融合タンパク質を新たに構築し、これを用いて粒子を作製することにより、表面に腫瘍細胞ターゲティング能を提示

したナノスフィアを作製した。この際、粒子内部の疎水性コアに疎水性プロープ 1, 8-ANS を担持し、蛍光顕微鏡観察により腫瘍細胞へのターゲティング能を評価した。

(7) 薬剤内包ナノスフィアによる殺細胞効果の評価

疎水性抗がん剤であるパクリタキセル (PTX) を用いて、これを EGF 表面提示ナノスフィア内部に内包した。これを腫瘍細胞に添加し、顕微鏡観察による細胞形態変化、および細胞数計測により、殺細胞効果を評価した。また最終年度では、より汎用性の高いシステムを目指し、iRGD ペプチドを提示したナノ粒子を構築し、その評価を行った

4. 研究成果

本研究は、生体適合性、生分解性、生体吸収性等に優れるタンパク質のみを構成成分として、粒径がナノメートルスケールで精密に制御され、かつ安定な構造を有する高機能化タンパク質ナノスフィアを設計・構築し、これをキャリアとして用いてがん細胞をターゲティングするドラッグデリバリーシステム (DDS) を開発することを目的として行った。

本研究により、エラスチンの疎水性ドメインをモチーフとした温度応答性ポリペプチド (AVGVPP)_n とポリアスパラギン酸 (Dm) の融合タンパク質 (AD) が、加温により直径 30 nm 程度の均一なナノスフィアを形成することが明らかとなった。

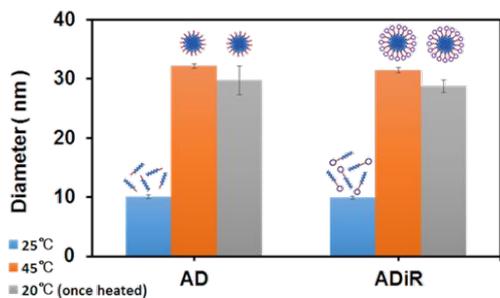


図2 温度変化によるナノ粒子形成
ADiR: AD に iRGD ペプチドを導入

このナノスフィアは、分子設計により表面に任意の機能タンパク質を提示することが可能であり、一方内部は疎水性コアを形成するため、疎水性化合物を容易に内包することができる。これを利用してがん細胞への特異的送達を行うため、表面に EGF、抗体結合タンパク質、DNA アプタマー、iRGD ペプチド等様々な分子認識機能を有する分子を提示し、内部には抗がん剤を包含したタンパク質ナノスフィアを構築した。これらタンパク質ナノスフィアは、がん細胞を特異的に認識することができ、がん細胞に到達後は内部の薬剤を放出し殺傷できることが明らかとなった。

最終年度で構築した iRGD ペプチドは、細胞接着配列 RGD と組織透過性配列 CendR を組み合わせた環状ペプチドである。iRGD ペプチ

ドを表面提示、抗がん剤 PTX を内包したタンパク質ナノスフィアを、RGD のターゲットであるインテグリンを過剰発現しているがん細胞に添加した。その結果、細胞死が顕著に促進され、構築したナノスフィアががん細胞に対する優れた標的能と細胞内輸送能を有し、DDS キャリアとして高い性能を有することが明らかとなった。

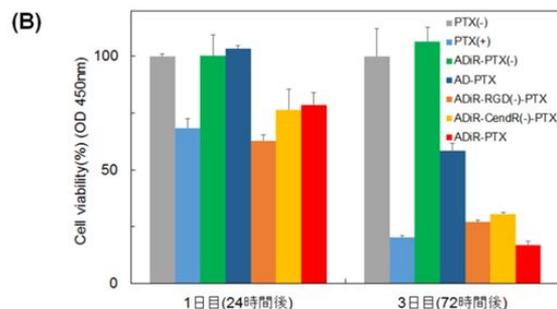
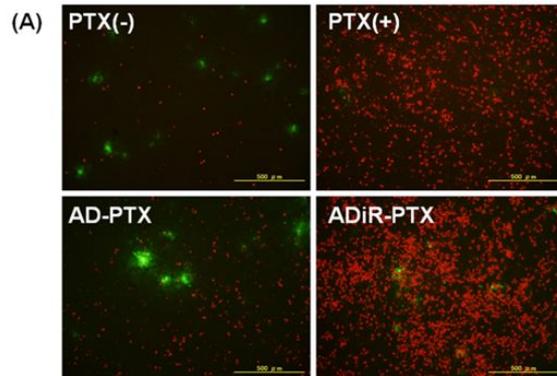


図3 PTX 内包ナノ粒子による細胞死誘導

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. Yasunori Mizuguchi, Yasumasa Mashimo, Msayasu Mie, Eiry Kobatake, Design of bFGF-tethred assembling extracellular matrix proteins via coiled-coil triple helix formation, *Biomed. Mater.* (2017) doi: 10.1088/1748-605X/aa7616
2. Ken-ichiro Kamei, Yasumasa Mashimo, Momoko Yoshioka, Yumie Tokunaga, Christopher Fockenber, Shiho Terada, Yoshie Koyama, Minako Nakajima, Teiko Shibata-Seki, Li Liu, Toshihiro Akaike, Eiry Kobatake, Siew-eng How, Motonari, Uesugi, Yong Chen, Microfluidic-nanofiber hybrid array for screening of cellular microenvironments, *Small* (2017) doi: 10.1002/smll.201603104
3. Kenji Usui, Masayasu Mie, Takashi Andou, Hisakazu Mihara, Eiry Kobatake, Fluorescent and luminescent fusion

- proteins for analyses of amyloid beta peptide aggregation, *J. Peptide Sci.* (2017) **23** (7-8), 659-665. doi: 10.1002/psc.3003.
4. Yusuke Ikeda, Yasumasa Mashimo, Masayasu Mie, Eiry Kobatake, Design of luciferase-displaying protein nanoparticles for use as highly sensitive immunoassay detection probes, *Analyst* (2016) **141**(24), 6557-6563. doi: 10.1039/c6an01253a
 5. Masayasu Mie, Tatsuya Naoki, Eiry Kobatake, Development of a split SNAP-CLIP double labeling system for tracking proteins following dissociation from protein-protein complexes in living cells, *Anal. Chem.* (2016) **88**(16), 8166-8171. doi: [10.1021/acs.analchem.6b01906](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01906)
 6. SokeLee Siew, Mami Kaneko, Masayasu Mie and Eiry Kobatake, Construction of a tissue-specific transcription factor-tethered extracellular matrix protein via coiled-coil helix formation, *J. Mater. Chem. B* (2016) **4**, 2512-2518, doi: 10.1039/C5TB01579K
 7. Chawapun Suttinont, Yasumasa Mashimo, Masayasu Mie, Eiry Kobatake, Delivery of bFGF for tissue engineering by tethering to the ECM, *BiolMed. Res. Int.* (2015) Article ID 208089
 8. Yasmine Assal, Yoshinori Mizuguchi, Masayasu Mie, Eiry Kobatake, Growth factor tethering to protein nanoparticles via coiled-coil formation for targeted delivery. *Bioconjugate Chem.* (2015) **26** (8), 1672-1677, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00266
 9. Zha Li, Tomoshi Kameda, Takashi Isoshima, Eiry Kobatake, Takeshi Tanaka, Yoshihiro Ito, Masuki Kawamoto, Solubilization of single-walled carbon nanotubes using a peptide aptamer in water below the critical micelle concentration. *Langmuir* (2015) **31**(11), 3482-3488, doi: 10.1021/la504777b
 10. Rie Matsumoto, Rieko Hara, Takashi Andou, Masayasu Mie, Eiry Kobatake, Targeting of EGF-displayed protein nanoparticles with anticancer drugs. *J. Biomed. Mater. Res B Appl. Biomater.* (2014) **102** (8), 1792-1798
 11. Kenji Usui, Takuya Kikuchi, Kunio Kikuchi, Masayasu Mie, Eiry Kobatake, Hisakazu Mihara, Cellular differentiation assessments by measuring the degree of cellular internalization and membrane adsorption using designed peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2014) **24**, 4129-4131
 12. Farhima Akter, Masayasu Mie, Eiry Kobatake, DNA-based immunoassays for sensitive detection of protein. *Sensors and Actuators B* (2014) **202**, 1248-1256
- 〔学会発表〕(計 9 件)
1. GUO Wei; MASHIMO, Yasumasa; MIE Masayasu; KOBATAKE, Eiry, Construction of DNA Aptamer Displayed Nanoparticles, 日本化学会第 98 春季年会 2018 年 3 月 20 日~23 日、日本大学理工学部 船橋キャンパス
 2. 池田裕介, 眞下泰正, 三重正和, 小島英理, がん細胞を標的とした高機能化タンパク質ナノ粒子の開発, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 2017 2017 年 11 月 20 日, 21 日, タワーホール船橋
 3. 島村萌里, 眞下泰正, 三重正和, 小島英理, 転写因子タンパク質導入による細胞機能制御, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 2017 2017 年 11 月 20 日, 21 日, タワーホール船橋
 4. 池田裕介, 眞下泰正, 三重正和, 小島英理, タンパク質ナノ粒子を利用した高感度バイオセンシングシステムの開発, つくば医工連携フォーラム 2017 2017 年 1 月 20 日, 物質・材料研究機構
 5. 水口佳紀, 眞下泰正, 三重正和, 小島英理, 三次元生体組織構築を目指した多機能タンパク質ハイドロゲルの設計, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 2016 年 11 月 21 日, 22 日, 福岡国際会議場
 6. Y. Ikeda, Y. Mashimo, M. Mie, E. Kobatake, Development of protein nanoparticles for sensitive biosensing, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), December 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii
 7. C. Suttinont, Y. Mashimo, M. Mie, E. Kobatake, Construction of bFGF-tethered ECM for tissue engineering, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), December 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii
 8. Eiry Kobatake, Construction of DNA-Protein Hybrid for Sensitive Biosensing, ICSS Meeting 2014 (International Conference on Small Science), December 8-11, 2014, Eaton Hotel, Kowloon, Hong Kong
 9. 池田裕介, 三重正和, 小島英理, 高感度バイオセンシングを指向したルシフェラーゼ融合タンパク質ナノ粒子の構築, 第

8 回バイオ関連化学シンポジウム 2014、
2014 年 9 月 11 日 13 日、岡山大学 津
島キャンパス

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小島 英理 (KOBATAKE, Eiry)
東京工業大学・生命理工学院・教授
研究者番号：00225484