

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12544

研究課題名(和文) ユビキチン-プロテアソーム系を利用したタンパク質ナノキャリアの分解制御と薬物放出

研究課題名(英文) Biodegradable nano-cages for controlled drug release

研究代表者

村田 正治 (Murata, Masaharu)

九州大学・先端医療イノベーションセンター・特任教授

研究者番号：30304744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではウイルス構造体を模したタンパク質ナノカプセルを構築し、これを細胞内シグナルによって崩壊させるシステムの創製を目指した。そのために利用したのが細胞内に普遍的に存在するタンパク質分解システムである。我々はナノカプセルの表面にある種の分子を最適配向させることによって、このナノカプセルを分解させることに成功した。この時、カプセルの内孔に小分子量の薬剤を封入しておくことで、分解と協奏的に薬物が放出されることも確認した。この原理を用いることで、特定の薬剤を特定の細胞へ送り込むことも可能になる。

研究成果の概要(英文)：We describe the development of neuropilin 1-binding peptide (iRGD) - nanocages that specifically target human pancreatic cancer cells in which an iRGD is joined to the surface of naturally occurring heat shock protein (HSP) cages. Using a genetic engineering approach, the iRGD domain was joined to the C-terminal region of the HSP cage using flexible linker moieties. The characteristics of the interdomain linkages between the nanocage and the iRGD domain play an important role in the specificity and affinity of the iRGD - nanocages for their target cells. Furthermore, a moderately hydrophobic anticancer drug, OSU03012, was successfully incorporated into the L30-iRGD nanocage by heating the mixture. The OSU03012-loaded L30-iRGD - nanocage induced cell death of pancreatic cancer cells by activating the caspase cascade more effectively than the same concentrations of free OSU03012. The iRGD - nanocages show great potential as a novel nanocarrier for pancreatic cancer-targeted drug delivery.

研究分野：薬物送達システム

キーワード：ナノ材料 DDS がん

1. 研究開始当初の背景

これまでに水溶性高分子やリポソーム・ミセルなどを用いた様々な薬物送達システムが開発されてきたが、その細胞あるいは病変組織特異性については依然問題が残されている。本研究では、これら従来のドラッグキャリアとは一線を画する新しい概念に基づく薬物送達システムの構築を目的とした。

この新しいドラッグキャリアのモデルとするのがウイルスである。ウイルスは非常にシンプルな構造でありながら極めて効果的な感染機構を有する。硬い外殻に守られたウイルスの遺伝子は、レセプターを介した宿主細胞への侵入、脱殻を経て細胞内に放出される。この感染機序の重要な鍵となっているのが、タンパク質の高次構造体であるカプシドである。本研究ではこの高次構造体を模したタンパク質ナノカプセルを構築し、これを細胞内シグナルによって崩壊させるシステムの創製を目指した。

2. 研究の目的

申請者らが着目したのは、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 (HSP16.5) 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 (内径 7nm) を有する球状構造体 (外径 15nm) を形成している。9 個のシート構造によ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り、60 においても安定にその構造を維持することができる。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、ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染機序など、分子標的化能を付与した新しい薬物送達システムを開発した。

3. 研究の方法

i) 膵がん標的型ナノカプセルの設計と機能評価

本研究では HSP16.5 が自己組織化によって形成するナノ構造体に着目し、その機能化を目的とする。この構造体は内孔 (径 7nm) を有する球状構造 (24 量体、外径 12nm) を構築することが知られている。我々の予

備実験において、マウスに投与したこのナノカプセルは急性毒性を示さず、特定の臓器や組織に対する指向性も確認されなかった。また X 線結晶構造解析の結果、このタンパク質の C 末端はカプセルの外表面に露出していることが明らかとなっており、遺伝子組み換えによりこの領域に標的細胞に対するアンテナ分子を組み込むことが可能である。

そこで本研究では、多くの膵がんにおいて高発現していることが明らかとなっている VEGF に対するコレセプターの一種、Neuropilin-1 に対するアンテナ分子である iRGD ペプチドをナノカプセル表面に提示することを試みた。この膵がん特異的ナノカプセルは大腸菌を使って大量発現し、クロマトグラフィーによって精製した。動的光散乱法 (DLC) と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察、あるいは質量分析法等によって詳細に物性評価する。これらの技術的なノウハウは既に蓄積している。

ii) 膵がん標的型ナノカプセルの体内動態評価

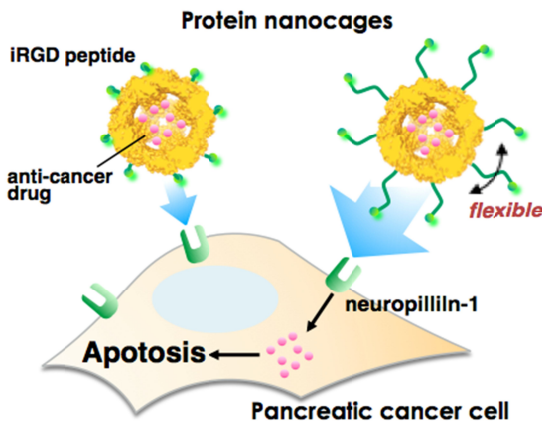
膵がん細胞特異性の評価については、K-ras、p53 そして Cre に遺伝子変異を加えたマウス膵がんモデル (KPC マウス) およびその原発巣から樹立した膵がん細胞を用いて定量的に評価する。カプセル表面に提示した iRGD ペプチドは、ペプチド単体と違って立体障害等の影響により十分な親和性を発揮できない可能性がある。この場合は、HSP16.5 と iRGD ペプチドの間に、Gly-Gly-Ser のようなフレキシブルなリンカーを遺伝子レベルで組み込むことを検討し、その長さについては演繹的に評価した。さらに、蛍光ラベル化した iRGD ナノカプセル (1~100 μM) 100 μl をマウスに尾静脈から投与し、その指向性と代謝を *in vivo* 蛍光イメージャー (IVIS®) により観察した。さらに組織化学的データを詳細に検討することによって、膵がん特異的ナノカプセルの集積性を評価した。

4. 研究成果

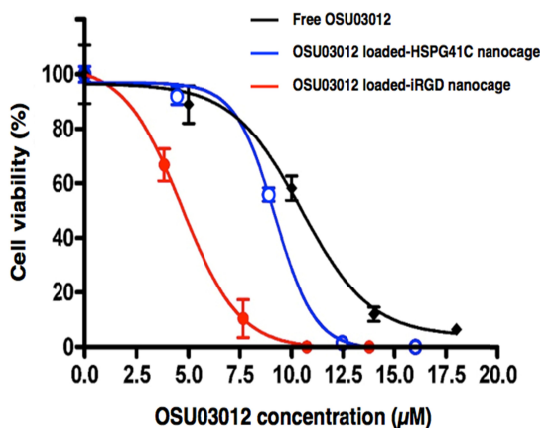
膵がんは血流が少ないため投与した抗がん剤の患部へ到達率が低く、DDS 技術がもっとも必要とされるがんである。さらに近年の研究から膵がんへの DDS キャリアとしては 30nm 以下の粒径を持つ粒子であることが有効であることが明らかになっているが、タンパク質ナノカプセルは本来 12nm であるため深部への十分な浸透性が期待できる。さらに本研究では膵がんを高発現していることが明らかとなっている

Neuropilin-1 を分子標的とする膵がん特異的ナノカプセルを開発した。そのアンテナ分子として iRGD ペプチド (CRGDKGQDC) をコードする遺伝子を、ナノカプセル外表面に配向する C 末端に様々な長さのアミノ酸リンカーを組み込んだ。この膵がん特異的ナノカプセルは Neuropilin-1 高発現株(膵がん)に高い親和性を示し、配列依存のかつリンカー長が長いほど取り込まれやすくなる傾向を示した。そこで様々な癌細胞に細胞死を誘導することが知られている薬剤 OSU03012 とカプセルを共存させ、55 で 30 分間加熱振とうしたところ、カプセル1つあたりに 40~50 分子の OSU03012 が内包されていることが明らかとなった。この OSU03012 を内包した膵がん特異的ナノカプセルは、Neuropilin-1 高発現株をより効果的にアポトーシス誘導することが示された。

(A)



(B)



膵がん特異的ナノカプセルの設計と DDS A ; 膵がん特異性の概念図、B ; 内包した抗がん剤による細胞死の誘導

次に、今後の臨床応用に際してもっとも重要となるナノカプセル自体の安全性を評価した。健常なマウスを用い、血中に投与したナノカプセル (G41C ナノカプセル) による生体毒性を定量的に評価した。この結果、測定した全ての生化学パラメータはコントロールとほぼ同レベルであり、体外から投与されたナノカプセルが腎、肝などの代謝系臓器だけでなく、心臓や筋肉組織に対しても有意の毒性を示さないことを示した。

ナノカプセル投与による生体毒性評価

24 hr

	CRE (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	LDH (IU/L)	CK (IU/L)
Control	0.105 ±0.01	93.5 ±17.3	45 ±24.8	663 ±189.8	338 ±73.6
Buffer	0.105 ±0.01	88.5 ±17	54.5 ±38.3	756.5 ±90.1	345.5 ±72.5
G41C	0.085 ±0.02	90 ±18	29.5 ±8.3	511.5 ±86.2	274 ±87.3

48 hr

	CRE (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	LDH (IU/L)	CK (IU/L)
Control	0.11 ±0.01	67.5 ±5.2	24.5 ±6.4	659.5 ±73.3	311 ±174.5
Buffer	0.12 ±0.01	62.5 ±6.1	22 ±5.5	638 ±154.5	454.5 ±207.8
G41C	0.1 ±0.01	71 ±13.8	23 ±9.6	480 ±98.4	246 ±76.6

さらに、KPC マウスを使って、膵がん特異的ナノカプセルのがん部への集積化を評価した。所定量の膵がん特異的ナノカプセルを尾静脈から投与し、IVIS を使って経時的にその体内動態を追跡した。この結果、膵がん特異的ナノカプセルはコンとロート比較して高いがん部への集積を確認することができた。なお、この実験および結果の詳細については知財の関係上公表を差し控えたい。

ナノカプセルをドラッグデリバリーシステムの薬物キャリアとして使用するためには、その指向性を制御することが不可欠である。本研究ではナノカプセルの粒径制御やカプセル表面に何らかのアンテナ分子を組み込むことでカプセルの指向性を制御した。このために、外表面に配向している C 末端に標的組織やがん細胞において高発現しているレセプターに特異的なペプチド分子をコードする遺伝子を組み込んだ。この

結果、in vitro および in vivo において膵がんへの標的化に成功した。引き続き、実用化を目指して研究を継続する予定である。

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 14件)

1. Masaharu Murata, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Ryo Ugawa, Makoto Hashizume, "Expression and characterization of myristoylated preS1-conjugated nanocages for targeted cell delivery", *Protein Expression and Purification*, 110, 52-56(2015).
2. Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida, Takashi Murakami, Makoto Hashizume, "Design and function of engineered protein nanocages as a drug delivery system for targeting pancreatic cancer cells via neuropilin-1", *Molecular Pharmaceutics*, 12, 1422-1430(2015).
3. Takahito Kawano, Masaharu Murata, Jing Shun Piao, Sayoko Narahara, Nobuhito Hamano, Jeong-Hun Kang, Makoto Hashizume, "Systemic Delivery of Protein Nanocages Bearing CTT Peptides for Enhanced Imaging of MMP-2 Expression in Metastatic Tumor Models", *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 148-158(2015). * Corresponding author
4. Tang W, Aakahoshi T, Piao J, Narahara S, Murata M, Kawano T, Hamano N, Ikeda T, Hashizume M, "Basic FGF-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cell infusion ameliorate liver cirrhosis via paracrine HGF", *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20, 1065-1074(2015).
5. Tang W, Aakahoshi T, Piao J, Narahara S, Murata M, Kawano T, Hamano N, Ikeda T, Hashizume M, "Splnectomy enhances the therapeutic effect of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell infusion on cirrhosis rats", *Liver International*, 36, 1151-1159 (2015).
6. Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Riki Toita, Takahito Kawano, and Masaharu Murata, "Monitoring of phosphorylated peptides by radioactive assay and matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry", *Amino Acids*, 47, 2377-2383(2015).
7. Nobuhito Hamano, Masaharu Murata, Takahito Kawano, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Ryosuke Nakata, Tomohiko Akahoshi, Tetsuo Ikeda, and Makoto Hashizume, "Förster Resonance Energy Transfer-Based Self-Assembled Nanoprobe for Rapid and Sensitive Detection of Postoperative Pancreatic Fistula", *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 5144-5123(2016).
8. Go Kagiya, Ryohei Ogawa, Fuminori Hyodo, Kei Yamashita, Mizuki Nakamura, Ayumi Ishii, Yukihiro Sejimo, Shintaro Tominaga, Masaharu Murata, Yoshikazu Tanaka & Masanori Hatashita "Development of a real-time imaging system for hypoxic cell apoptosis", *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 5, 16009-16017(2016).
9. Kazuya Yokota, Takeyuki Saito, Kazu Kobayakawa, Kensuke Kubota, Masamitsu Hara, Masaharu Murata, Yasuyuki Ohkawa, Yukihiro Iwamoto, "The feasibility of in vivo imaging of infiltrating blood cells for predicting the functional prognosis after spinal cord injury", *Scientific Reports*, 6, 25673 (2016).
10. Ryuichi Kumashiro, Kozo Konishi, Tohru Chiba, Tomohiko Akahoshi, Shotaro Nakamura, Masaharu Murata, Morimasa Tomikawa, Takayuki Matsumoto, Yoshihiko Maehara and Makoto Hashizume, "Integrated Endoscopic System Based on Optical Imaging and Hyperspectral Data Analysis for Colorectal Cancer Detection", *Anticancer Research*, 36, 3925-3932 (2016).
11. Riki Toita, Takahito Kawano, Masaharu Murata, Jeong-Hun Kang, "Anti-obesity and anti-inflammatory effects of macrophage-targeted interleukin-10-conjugated liposomes in obese mice", *Biomaterials*, 110, 81-88 (2016).
12. Takahito Kawano, Masaharu Murata, Fuminori Hyodo, Hinako Eto, Nuttavut Kosem, Ryosuke Nakata, Nobuhito Hamano, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Tomohiko Akahoshi and Makoto Hashizume, "Noninvasive mapping of the redox status of dimethylnitrosamine induced hepatic fibrosis using in vivo dynamic nuclear polarization magnetic resonance imaging", *Scientific Reports*, 6, 32604 (2016).

13. Daisuke Asai, Masaharu Murata, Riki Toita, Takahito Kawano, Hideki Nakashima, and Jeong-Hun Kang, "Role of amino acid residues surrounding the phosphorylation site in peptide substrates of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)", *Amino Acids*, 48, 2875-2880 (2016).
14. Sho Endo, Kohei Nakata, Kenoki Ohuchida, Shin Takesue, Hiromichi Nakayama, Toshiya Abe, Kazuhiro Koikawa, Takashi Okumura, Masafumi Sada, Kohei Horioka, Biao Zheng, Yusuke Mizuuchi, Chika Iwamoto, Masaharu Murata, Taiki Moriyama, Yoshihiro Miyasaka, Takao Ohtsuka, Kazuhiro Mizumoto, Yoshinao Oda, Makoto Hashizume, Masafumi Nakamura, "Autophagy Is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice", *Gastroenterology*, in press

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Uemura M, Yamashita M, Tomikawa M, Souzaki R, Ieiri S, Matsuoka N, Akahoshi T, Hashizume M: New objective skill assessment system for the laparoscopic intestinal anastomosis model and evaluation of validity. The 11th Anniversary Asian Congerence on Computer Aided Surgery (ACCAS), July 11, 2015, Singapor
2. 富川盛雅、遠藤和也、森田和豊、本間健一、江口大彦、杉町圭史、是永大輔、竹中賢治: 胃全摘術後食道空腸吻合部の機能的通過障害に対するストント留置により quality of life が改善した 1 例. 第 76 回日本臨床外科学会総会、2015 年 11 月 27 日、福岡
3. 富川盛雅、植村宗則、杉町圭史、森田和豊、遠藤和也、本間健一、江口大彦、是永大輔、池田哲夫、赤星朋比古、橋爪誠 : 日米間で異なる内視鏡外科トレーニングの現状と今後の展望 -アンケート調査に基づく検討. 第 116 回日本外科学会学術総会、2016 年 4 月 16 日、大阪
4. 富川盛雅、植村宗則、長尾吉泰、中田亮輔、小幡 聡、神保教広、杉町圭史、宗崎良太、赤星朋比古、橋爪 誠 : 内視鏡外科の技術練度の数理学的定量的記述と外科教育への応用. 第 71 回日本消化器外科学会総会、2016 年 7 月 14 日、徳島
5. 富川盛雅、植村宗則、橋爪 誠 : 内視鏡外科の技術練度の数理学的定量的記述と外科教育への応用. 第 25 回日本コンピュータ外科学会大会. 2016 年 11 月 27 日、東京

6. 富川盛雅、橋爪 誠 : 腹腔鏡下血行遮断術にて止血が得られた出血性直腸静脈瘤の一例. 第 29 回日本内視鏡外科学会総会. 2016 年 12 月 8 日、横浜
7. 長尾吉泰、池田哲夫、赤星朋比古、植村宗則、中田亮輔、小幡 聡、宗崎良太、大内田研宙、富川盛雅、橋爪 誠 : 九州大学内視鏡外科手術トレーニングセンターにおける内視鏡外科技術伝承の現状とその問題. 第 117 回日本外科学会定期学術集会. 2017 年 4 月 29 日、神奈川
8. Masaharu Murata, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Makoto Hashizume: Liver cell specific targeting by myristoylated preS1-conjugated nanocages for drug deliver, Pacificchem2015, 2015 年 12 月 15 日、ハワイ・ホノルル
9. M. Murata, S. Narahara, J.-S. Piao, T. Kawano, N. Hamano, R. Nakata, M. Hashizume: Engineered protein nanocages for drug delivery in pancreatic cancer Engineered protein nanocages for drug delivery in pancreatic cancer, 17th Tetrahedron Symposium, 2016 年 6 月 28 日、バルセロナ

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称: 膵液検出用蛍光プローブ、膵液検出方法及び膵液検出用キット

出願人: 九州大学

発明者: 村田正治、橋爪 誠、濱野展人、池田哲夫、赤星朋比古

出願番号: 特願 2015-202419

出願日: 2015/10/13

国内外の別: 国内

名称: フリーラジカルの消費速度情報の取得方法および NASH の判定方法

出願人: 九州大学

発明者: 村田正治、兵藤文紀、橋爪 誠、中田亮輔、赤星朋比古、

出願番号: 特願 2016-117335

出願日: 2016/6/13

国内外の別: 国内

名称: リポソーム組成物及び炎症性疾患用治療剤

出願人: 国立循環器病研究センター、九州大学

発明者: 姜 貞勲、村田正治

出願番号: 特願 2016-252224

出願日：2016/12/27

国内外の別：国内

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cmeit.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田正治 (MURATA MASAHARU)

九州大学先端医療イノベーションセンター・特任教授

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

富川盛雅 (TOMIKAWA MORIMASA)

九州大学病院 先端医工学診療部・准教授

研究者番号：60325454

河野 喬仁 (TAKAHITO KAWANO)

九州大学先端医療イノベーションセンター・助教

研究者番号：90526831