

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：72801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14413

研究課題名(和文) ウイルスの伝播指向性を利用した中枢神経系への薬物輸送技術の新戦略

研究課題名(英文) Improvement of drug delivery system (DDS) targeting the central nerve system

研究代表者

水谷 壮利 (MIZUTANI, Taketoshi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・博士研究員

研究者番号：00376617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、ラット初代培養細胞からなるBBB in vitro 再構成系モデルを用いた解析によりPVの外殻からBBB透過能を有する2種類のペプチド配列の同定に成功した。当該ペプチドはそれぞれの配列のみで血管内皮細胞に特異的な細胞透過性を示すだけでなく、GFPなどと融合した組み替え蛋白質をも効率的に輸送、透過できる性質を兼ねそらえている。このペプチドはマウス脳血管内皮細胞株(MBEC4、bEnd.3)、ヒト臍帯血由来血管内皮細胞(HUVEC)に効率良く細胞内移行を示す。当該ペプチドはPVのBBB透過能を担う責任領域の可能性が高く、中枢神経系への薬物輸送担体に資する潜在性があるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Poliovirus (PV) is believed to have an ability to invade central nerve system (CNS) overcoming the blood brain barrier (BBB) from blood stream. If we can use this potential ability to overcome the wall of BBB, it could be beneficial for the drug delivery method to CNS.

In this study, I have identified two peptides from PV capsids, which are potentially responsible for PV invasion of the CNS. These peptides are selectively delivered into the human vascular endothelial cells within 24 hours when they are supplied into the supernatant medium as the GST-Venus fusion proteins. Furthermore, by using in vitro BBB model system with rat brain vascular endothelial cells, I found that these peptides can penetrate well into the brain side. These results indicate that these peptides will be possible drug carriers for CNS.

研究分野：ウイルス学

キーワード：血液脳関門 Blood brain barrier poliovirus

1. 研究開始当初の背景

ウイルス種によって惹起される疾患の違いは、ウイルスの感染、増殖、体内伝播に影響を与える宿主側の分子群がウイルス種ごとに異なるためである。一方で、このウイルス種の違いによる特異性がウイルスの指向性(トロピズム)を規定する重要な要因となっている。

ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類されるポリオウイルス(PV)は、中枢神経系に指向性を示す一本鎖RNAウイルスであり、小児マヒ(ポリオ;急性灰白髄炎)の病因ウイルスである。ヒトに経口感染後、消化管、局所リンパ小組織、血流を介し、血液脳関門(BBB)を透過して中枢神経系に侵入し、神経細胞で増殖することで病原性を示す。PVの体内伝播において、感染(ウイルス複製)はヒトPVレセプター(PVR)の存非で決まるが、PV粒子の血液から脳への移行はPVRの有無に関係なく効率よく行われることがPV感受性モデルマウスを用いた我々の研究で既に証明している。

特にPVのBBB透過は小児マヒを引き起こすその病原性発症の観点からも重要なイベントである。その学究的側面もさることながら中枢組織への薬剤送達技術の開発は学術および医学的発展においてその具現化の波及効果は限りなく大きい。この分野における新たな変革、転換には血液脳関門(BBB)透過の基本原理の理解が不可欠であるが、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々のグループはPVが消化管から侵入後、血液中からBBBを越えて脳実質部分に伝播するモデルを提唱し、その分子機構の解明を進めてきたが、その詳細は解明しきれていない。(Nomoto A. et al. *Virology* 1997, Mizutani T. et al. *J.B.C.* 2016)。そこで本研究ではPVの外殻からBBB透過を

規定する責任領域の同定を試みた。当該ペプチドの特性の理解は、病原体の中核への伝播機構の理解にとどまらず、中枢神経系への薬物輸送の新たなキャリアー(機能性ペプチド)としての活用につながる事が期待された。

3. 研究の方法

(1)PV外殻タンパク質を40アミノ酸前後のペプチドレベルにまで裁断化し、それぞれのペプチドとGST-FLAG融合タンパク質を大腸菌にて作製し、血管内皮細胞等を用いてその細胞内透過能の性質についてFLAG抗体を用いた免疫染色像を指標に解析した。

(2)ヒト臍帯血由来血管内皮細胞(HUVEC)に阻害剤を添加し、当該ペプチドの細胞透過経路(トランスサイトosis)の検討を行った。本実験にはそれぞれのペプチドとGST-Venus融合タンパク質を大腸菌にて作製し、フローサイトメーターにてその細胞透過性を検証した。血管内皮細胞等を用いてその細胞内透過能の性質についてまたペプチドの細胞透過能を規定する最低必須配列をPCR法にて欠失変異体を作製し、HUVECに対する透過性を指標に解析を行った。

(3)ラット *in vitro* BBBモデルキット(ファーマコル社)を用いて組み換え蛋白質を大腸菌にて作製し、添加後の脳側へのタンパク透過性を時間経過に従って検討した。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞透過性を有するPV側外殻責任領域の探索

ポリオウイルス粒子はVP1~4で作られる蛋白質の殻をかぶっている。VP1~3は外側に配位する、一方でVP4は粒子の内側に配位している。そこでVP1~3タンパク質を

40 アミノ酸前後に裁断し、GST タグ、FLAG タグにつなげたコンストラクトを作製した。構築したコンストラクトを元に組み換え蛋白質を大腸菌にて作製し、1 μM の濃度でマウス血管内皮細胞 (MBEC4) の培地に添加し、24 時間後に細胞を PBS で洗い、細胞内に侵入した組み換え蛋白質を FLAG 抗体を用いた免疫染色で検出した (図 1)。その結果、MBEC4 の細胞内に侵入性を示す 2 種類のペプチドを見出した。当該ペプチドを便宜的に Cell Penetrating Peptide (CPP)-N4, N6 と命名した。

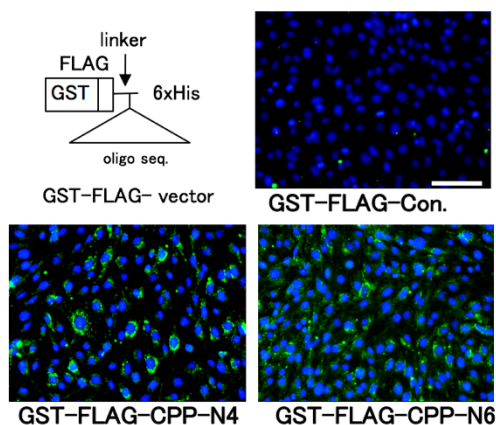


図 1: GST-FLAG vector の免疫染色実験結果

(2) エンドサイトーシス阻害剤を用いた CPP-N4 と CPP-N6 の血管内皮細胞への細胞透過機構の解析

次に、CPP-N4 と CPP-N6 に着目し、このペプチドの細胞内への透過経路について、エンドサイトーシスの経路を検討した。

CPP-N4 および N6 を連結した GST-VENUS vector を構築し、組み換え蛋白質を大腸菌にて作製し、精製タンパク質を得た。次に 1 μM の濃度で MBEC4 細胞株の培地に添加した。これと同時にエンドサイトーシスの経路のそれぞれを阻害する阻害剤、3 種 (クラスリン標的阻害剤; CPZ、ダイナミン標的阻害剤; Dynasore、マクロピノサイトーシス; EIPA) を表記の濃度で添加した (阻害剤の標的模式図は図 3 を参照)。

細胞を 24 時間培養後に PBS で洗い、細胞内に侵入した組み換え蛋白質を VENUS の蛍光を元にフローサイトメーターにて検出した。CPP-N4 ペプチド融合 GST-VENUS 蛋白質 (青色) は、ダイナミン依存的な透過効率の減少を示した。一方、CPP-N6 ペプチド融合 GST-VENUS 蛋白質 (橙色) はどの阻害剤にも感受性を示した (図 2)。

■ GST-Ve-CPP-N4 ■ GST-Ve-CPP-N6

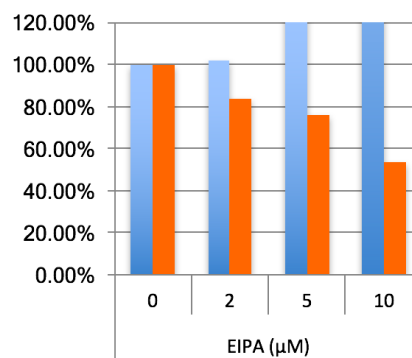
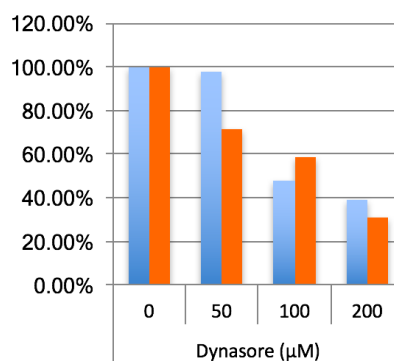
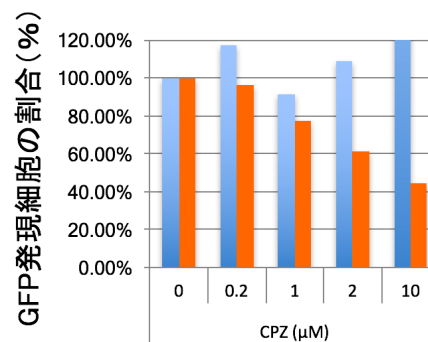


図 2: 阻害剤添加による透過阻害実験結果

非添加細胞の蛍光染色細胞%を 100 とした時の割合で表示。GST-VENUS-CPP-N4 蛋白質は青色、 GST-VENUS-CPP-N6 蛋白質は橙色で表記した。

以上の結果から CPP-N4 はダイナミン依存的なエンドサイトーシスであり、②カベオリン、③脂質ラフトを介した細胞侵入を示した。CPP-N6 は①～④のすべてのエンドサイトーシス全般の経路を利用している可能性が示された。

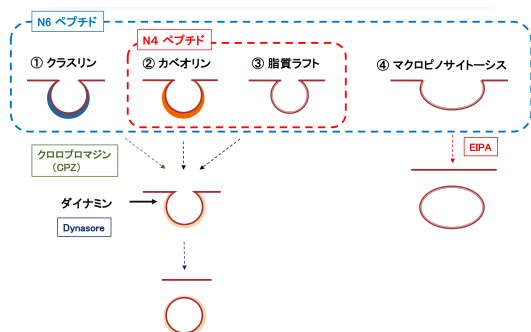


図 3 : エンドサイトーシスの一般的経路と阻害剤の標的と CPP-N4, N6 の透過経路模式図。エンドサイトーシスは主に①～④の経路があり、クロプロマジン (CPZ) はクラスリン依存的な細胞内割入を阻害する。EIPA は同様にマクロピノサイトーシス依存的な細胞内割入を阻害する。ダイナミンは①～③で割入したエンドソームを細胞膜から切り離す酵素であり、その阻害剤が Dynasore。

(3) CPP-N4, N6 ペプチドの血液脳関門 (BBB) 透過能の検討

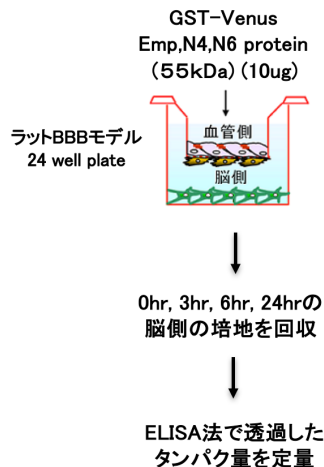
当該ペプチドが血液脳関門 (Blood Brain Barrier : BBB) 透過性があるのか否かを検討した。先に作製した CPP-N4 および N6 を連結した GST-VENUS を市販のラット in vitro BBB モデルキット (ファーマコル社) に用いて実験を行った (図 4、実験プロトコール)。組み換え蛋白質を大腸菌にて作製し、1 well あたり 10 μ g を添加し、表記の時間ごとに血管側のラット血管内皮細胞への細胞透過性、および脳側のタンパク透過率を検討した。

血管側のラット血管内皮細胞への透過率はフローサイトメーターで計測し、脳側への移行タンパク質量は C 末端側につながれて

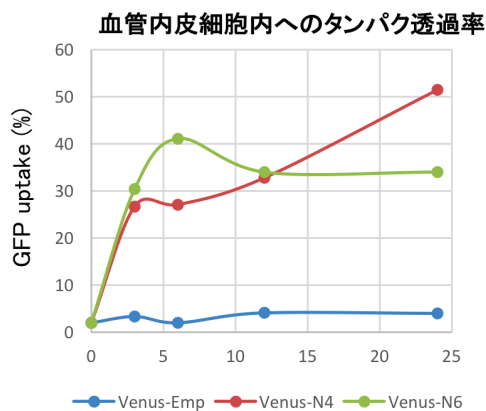
いる His 蛋白質を ELISA 法にて検出した。当該組み換え蛋白質は 3 時間後には血管内皮細胞への透過が観察され、脳側への細胞透過も観察された。特に CPP-N4 が BBB 透過においてより強い性質を示した。(図 4)。

(A)

実験プロトコール



(B)



(C)

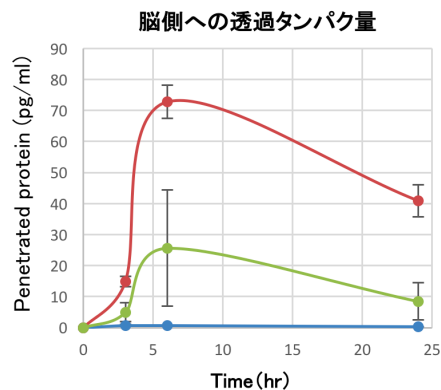


図 4 : 当該ペプチドの血液脳関門 (Blood

Brain Barrier : BBB) 透過性の検討。

CPP-N4 および N6 を連結した GST-VENUS を市販のラット *in vitro* BBB モデルキット (ファーマコル社) を用いてプロトコール図の通り実験を行った(A)。培地に添加して3、6、12、24 時間後に細胞、及び脳側の培地を回収し、透過タンパク質量をそれぞれフローサイトメトリー及び ELISA 法により定量した(B, C)。

本研究のまとめ

本研究成果により、PV の外殻から BBB 透過を規定する 2 種類のペプチド候補配列 (CPP-N4, N6) の同定に成功した。これまでの解析により、当該ペプチドはそれぞれの配列単独で GST-Venus などのタンパク質を血管内皮細胞に効率よく透過させる特性を有していることが明らかとなった。さらにラット BBB *in vitro* モデルを用いた実験により脳側への細胞透過性を確認した。当該ペプチドは、中枢神経系への薬物輸送の新たなキャリアー (機能性ペプチド) としての活用につながることを期待されるが、今後は動物個体モデルによる実証実験が重要となる。

本研究成果の意義

当該分野の国内、国外の他の研究成果では、HIV の TAT タンパク質などに中枢神経系への移行能が報告されているが、組織選択性が低いとされている。PV の血液脳関門透過を支持するペプチド配列の知見はウイルスの伝播指向性の理解による病態発症のメカニズム解明の一端に留まらない。すなわち中枢神経系へのより厳密な薬物輸送の方法論の展開と新たなイノベーションが期待され、意義深いものである。

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 1 件)

Mizutani T, Ishizaka A, Nihei C. Transferrin Receptor 1 Facilitates Poliovirus Permeation of Mouse Brain Capillary Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 291(6):2829-36. 2016, 査読あり. DOI: 10.1074/jbc.M115.690941

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称:「血液脳関門を透過する薬物輸送体、ペプチド及びその用途」

発明者: 水谷壮利、石坂彩

権利者: 公益財団法人微生物化学研究会

種類: 特許

番号: 特願 2017-063319

出願日: 2017 年 3 月 28 日

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.bikaken.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 壮利 (MIZUTANI Taketoshi)

公益財団法人 微生物化学研究会・微生物

化学研究所・博士研究員

研究者番号: 00376617