

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15499

研究課題名(和文) 肝星細胞を標的とする革新的ナノドラッグキャリアを用いた画期的肝硬変治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for liver cirrhosis with the innovative drug nanocarrier targeting hepatic stellate cells

研究代表者

富川 盛雅 (Tomikawa, Morimasa)

九州大学・大学病院・特別教員

研究者番号：60325454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：急性毒性が無く特定の臓器や組織に対する指向性も無いHSP16.5を利用し、肝星細胞を標的とする革新的ナノドラッグキャリアを開発することを目的とした。親水性ポリエチレングリコールリンカーを介して固定化されナノスケールの球状構造体となったHSP16.5が、肝星細胞に対して特異的に結合することを確認した。この星細胞標的化分子修飾型ナノカプセルは、肝硬変モデルマウスの肝臓内の星細胞に対して安定的に毒性無く高い集積性を示した。肝臓の組織化学的評価により、ナノカプセルが類洞を中心として肝臓全体に集積していることが確認できた。本研究が肝星細胞制御法の確立の端緒の一つと成り得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop an innovative drug nanocarriers targeting hepatic stellate cells using HSP 16.5 with no acute toxicity and no directivity to specific organs and tissues. HSP 16.5 immobilized via a hydrophilic polyethylene glycol linker was demonstrated to show nanoscale spherical structure specifically binds to hepatic stellate cells. The newly-developed drug nanocarrier in vivo in mice with liver cirrhosis showed high stable accumulation to the hepatic stellate cells with no toxicity. Histochemical evaluation of the liver showed that the drug nanocarrier accumulated in the whole liver especially in the sinusoidal area. This study may pave the way to develop the treatment for liver cirrhosis through the control of hepatic stellate cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝硬変 星細胞 繊維化 ナノキャリア

### 1. 研究開始当初の背景

わが国における肝硬変患者は約 30 万人、肝がん患者は約 5 万人に及び、これらの疾患による死亡を減らすことは国民の健康増進に大いに寄与すると考えられる。肝硬変の主病像である肝臓の線維化は最近まで不可逆であると考えられていたが、近年の研究から線維化が進行し小葉構造の改築が進んでいる場合でも肝線維化は可逆性であることが明らかになってきた。

肝線維化については肝星細胞が活性化し筋線維芽細胞へ変容することや、抗 TGF-抗体や Rho-kinase inhibitor が活性型肝星細胞を不活化し肝線維化が改善することが報告されており、肝星細胞が肝線維化の主要な役割を果たしていると考えられている。しかし、肝硬変患者においては、仮に肝星細胞を制御する薬剤が開発されても、従来通りの薬物投与方法では肝予備能の低下により十分な効果が期待できないばかりか、重篤な副作用が発生する懸念も大きい。

一方、これまでに特定の細胞を標的化するドラッグデリバリー (薬物送達) システムとして、水溶性高分子ヤリポソーム・ミセルなどを用いた様々なシステムが開発されてきたが、その細胞特異性・病変組織特異性については依然問題が残されている。近年、この問題を解決するための画期的ナノドラッグキャリア(次世代インテリジェント型ナノカプセル)を開発した (Bioconjug Chem 2012;23:1494-1501)。これはウイルスをモデルとしながらウイルスそのものではない従来のナノドラッグキャリアとは一線を画するものである。

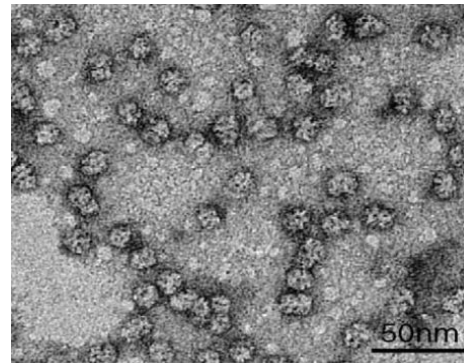
### 2. 研究の目的

ウイルスと非常によく似た構造体を形成する small heat shock protein(HSP16.5)をドラッグキャリアとして利用し、肝星細胞を標的とする革新的ナノドラッグキャリアを開発する。肝線維化の主要因子である -smooth muscle actin に対する siRNA やアポトーシス誘導性の siRNA などを内包薬物の第一候補とする。

### 3. 研究の方法

(1)肝星細胞特異的ナノカプセルの設計と in vitro 機能評価

HSP16.5 が自己組織化によって形成するナノ構造体は内孔 (径 7nm) を有する球状構造 (24 量体、外径 12nm) となる。ナノカプセルは大腸菌を使って大量発現させクロマトグラフィーによって精製する。さらに動的光散乱法 (DLC) と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察によって、組み換え HSP16.5 が期待どおりナノスケールの球状構造体を形成していることを確認した。



ナノカプセルの電子顕微鏡写真

認する。マウス予備実験において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なかった (Chem Commun 2013;49:7442-7444)。カプセルを構成するタンパク質の C 末端はカプセルの外表面に露出していることが X 線結晶構造解析の結果明らかとなっており、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 (Nature 1998;394:595-599)。

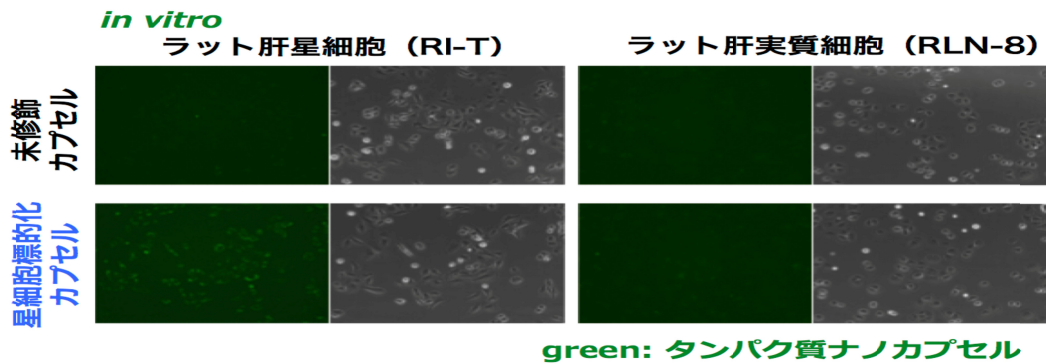
本研究では、標的とする肝星細胞の主要な機能であるビタミン A の取り込み・貯蔵機能に着目し、その標的分子であるレチノイン酸誘導体をナノカプセル表面に提示させる。疎水性の高いレチノイン酸誘導体をより効率的にカプセル表面に修飾させるため、親水性の高いポリエチレングリコール (PEG) リンカーを介して固定化することを試みた。

in vitro における肝星細胞特異性については、蛍光ラベル化したナノカプセルとヒト肝星細胞株 RI-T を用い、共焦点レーザー顕微鏡観察、フローサイトメーターを用いたナノカプセル細胞導入試験によって定量的に評価した。

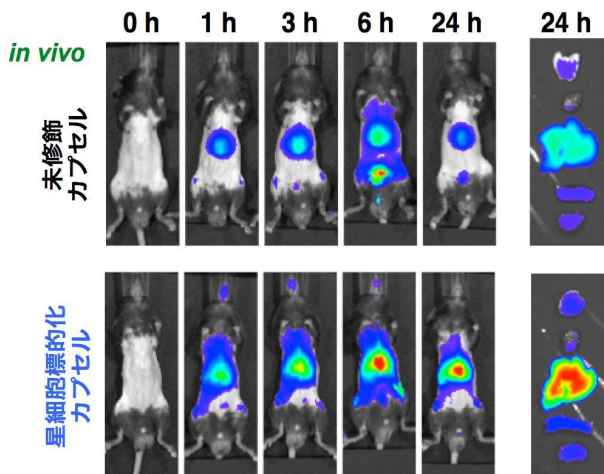
(2)薬物放出型ナノカプセルの設計・発現と肝星細胞での薬理評価 (in vivo)

蛍光ラベル化した肝星細胞特異的ナノカプセル (1~500  $\mu$ M) 100  $\mu$ l 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®) により観察する。また肝臓の組織標本に対して免疫染色を実施する。これらの組織化学的データを詳細に検討することにより肝特異的ナノカプセルの in vivo での集積性を評価した。

また標的部位局所での薬物放出を実現するために、新規概念に基づく薬物放出システムを開発した。詳細は避けるが、特定のアミノ酸配列を用いることで、カプセルからの薬物放出を促進するシステムを開発した。このナノカプセルはサイズ制御も可能であり、その内孔に -smooth muscle actin に対する siRNA やアポトーシス誘導性の siRNA などの薬剤を封入した。



### 星細胞標的化ナノカプセルの細胞特異性



### 星細胞標的化ナノカプセルの体内動態

カプセルに内包したこれらの薬剤が細胞内で薬理効果を発揮するかについては、肝硬変モデルとしてジメチルニトロソアミン投与マウスあるいは胆管結紮マウスによって評価する。

#### 4. 研究成果

星細胞標的化分子を効果的にカプセル表面に修飾させるため、親水性の高いポリエチレングリコール(PEG)リンカーを介して固定化することに成功した。

動的光散乱法(DLC)と透過型電子顕微鏡(TEM)観察によって、組み換え HSP16.5 が期待通りナノスケールの球状構造体を形成していることも確認した。得られた星細胞標的化分子修飾型ナノカプセルの特異性を *in vitro* で評価したところ、期待通り活性化した肝星細胞に対して特異的に結合することが確認できた。さらに肝硬変モデルマウスに血中投与したところ、類洞周辺の肝星細胞に対して高い集積性を示した。

血中安定性については、マウスから採取した血清中でカプセルの安定性を確認した結果、少なくとも 24 時間は球状構造を維持していることが確認できた。また規定量のナノカプセルをむすに投与していくつかの生化学パラメータを評価したところ、目立った毒性もないことが明らかとなった。この結果を受けて肝硬変モデルマウスに尾静脈から投

与し、*in vivo* 蛍光イメージャーでその動態を追跡した。この結果、星細胞特異的なナノカプセルは野生型と比較して有意に肝臓へ集積していることが確認できた。さらに、摘出した肝臓を組織化学的に評価したところ、類洞を中心としてナノカプセルが肝臓全体に集積していることが確認できた。

#### 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)

- 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
- 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).
- Go Kagiya, Ryohei Ogawa, Fuminori Hyodo, Kei Yamashita, Mizuki Nakamura, Ayumi Ishii, Yukihiko 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).
4. Kazuya Yokota, Takeyuki Saito, Kazu Kobayakawa, Kensuke Kubota, Masamitsu Hara, Masaharu Murata, Yasuyuki Ohkawa, Yukihide 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).
  5. 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).
  6. 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).
  7. 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).
  8. 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).
  9. 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).
  10. 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).
  11. 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
  12. 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).
  13. Tang W, Aakahoshi T, Piao J, Narahara S, Murata M, Kawano T, Hamano N, Ikeda T, Hashizume M, "Splenectomy enhances the therapeutic effect of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell infusion on cirrhosis rats", *Liver International*, 36, 1151-1159 (2015).
  14. 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).
- 〔学会発表〕(計9件)
1. 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
  2. 富川盛雅、橋爪 誠：腹腔鏡下下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
  3. 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
  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. 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
  6. 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
  7. 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
  8. 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テント留置により 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
  9. 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

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

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

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: 唾液検出用蛍光プローブ、唾液検出方法及び唾液検出用キット

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

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

富川 盛雅 (TOMIKAWA, Morimasa)

九州大学・大学病院・特任准教授

研究者番号: 60325454

(2) 研究分担者

村田 正治 (MURATA, Masaharu)

九州大学・レドックスナビ研究拠点・

准教授

研究者番号: 30304744

赤星 朋比古 (AKAHOSHI, Tomohiko)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号: 20336019

橋爪 誠 (HASHIZUME, Makoto)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 90198664