

令和元年6月6日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15063

研究課題名(和文)肝特異的自律会合型キャリア粒子の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of liver-specific delivery carrier made by self-aggregate

研究代表者

中村 伸吾 (NAKAMURA, Shingo)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター)講師

研究者番号：00505323

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)：我々は、原材料を単純に混合するだけの簡便な手法によって微粒子状の生体材料(LHPPs)が作り出せることを既に報告している。本研究では、このLHPPsに対する静電相互作用を基軸とした簡便な修飾基の導入方法を開発し、この修飾型LHPPsを用いて経静脈的にマウス生体肝細胞へタンパク質の導入を試み、これを達成した。本技術は、マウス生体肝細胞を対象とするタンパク質導入実験に役立つと考えられ、ゲノム編集実験や肝疾患治療研究などで効果を発揮すると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最大の特徴は、生体材料の作製方法として一般的である高度な合成技術等を用いずに、原材料の混合という極めて簡便な方法によってin vivoで機能するタンパク質デリバリーキャリアの作製を試みた点にある。そして、基剤としては汎用医薬品を利用している。本研究の成果は、in vivoでのタンパク質導入に関する基礎研究分野のみならず、医療分野等の応用研究での利用にも期待が持てる。

研究成果の概要(英文)： We have already reported that biomaterials based on low-molecular weight heparin (LHPPs) can be produced as extremely small particles, simply by mixing raw materials. In this study, we attempted to improve the LHPPs by a simple modification method using electrostatic interactions, and introduced intravenously the marker protein into mice hepatocytes. The results confirmed in vivo accumulation of the transferred protein in mice hepatocytes specifically. These materials are anticipated to be a useful tool for manipulating the function of mouse hepatocytes by using protein.

研究分野：生体材料学

キーワード：生体材料 タンパク質輸送システム 肝機能制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の機能改変に関わる技術としては、例えば遺伝子導入法が良く知られている。細胞内へ導入された遺伝子は、転写・翻訳後修飾等の過程を経ながらタンパク質を作りだし、当該細胞でその機能を発揮する。この時、導入されてから機能が発現するまでにはタイムラグが生じる。仮にタンパク質が細胞内へ直接導入されて、かつ、その機能が損なわれていなければ、タイムラグはずっと小さくなる。そして、投与量の増減等による効果が短時間で現れるので、細胞の機能改変や機能制御が簡便になると考えられる。In vitro における細胞内へのタンパク質導入技術としては、カチオン法などの方法が知られている。一方、in vivo においては、特に、血流を介した全身投与による標的臓器細胞等へのタンパク質の導入は難しいとされる。それは、タンパク質には臓器等に特異的な指向性が欠如しているためである。この問題を克服する為に、タンパク質デリバリーキャリアなどが使用される。例えば、肝臓特異的なアシアロ糖タンパク質受容体 (ASGP-R) へ結合する糖鎖で修飾したタンパク質デリバリーキャリアは、タンパク質の肝細胞指向性を高める。このようなタンパク質デリバリーキャリアの作製には、熟練した有機合成の技術とその知識が必要である。そもそも、タンパク質デリバリーキャリアの作製においても、多くの場合にはこのような専門性が求められる。これまで我々は、熟練した有機合成の技術とその知識を必要としない、生体材料を簡便に創成するための研究に取り組んできた。そして、例えば、原材料の単純な混合によって作り出されるナノ粒子型生体材料 LHPs (low-molecular weight heparin/ protamine particles) 等を報告している。これは、電荷の相反する高分子鎖の混合による静電相互作用によって単分散微粒子が作り出される系を利用した方法である。この LHPs は、in vitro での細胞増殖促進能力や in vivo でのタンパク質徐放能力などを有し、再生医療での応用に期待が持てた。そこで本研究では、この LHPs の高機能化を図るために、組織指向性などを司る修飾基の導入にも静電相互作用による系を活用できないか検討した。本方法で修飾基の導入が行えれば、「有機合成の技術を必要としない簡便な生体材料の創成」というこれまでの我々の研究コンセプトに基づく生体材料が作製できると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、生体材料 LHPs を活用してマウス生体肝細胞への機能性タンパク質の導入を行い、マウス生体肝細胞を機能制御することを目指した。具体的には、マウス生体肝細胞と親和性の高い LHPs 派生体 (修飾型 LHPs) の開発、修飾型 LHPs を用いた機能性タンパク質のマウス生体肝細胞への導入、そして、その効果に関する検討を行った。

3. 研究の方法

(1) LHPs 派生体 (修飾型 LHPs) の開発

生体材料 LHPs の調製方法は既に確立している。そこで、LHPs の細胞内へのタンパク質運搬効果を調べた。一定量のマーカータンパク質を系列希釈した LHPs と混合した後に株化細胞の培養系へ添加した。翌日、それぞれの細胞培養を停止して、添加したマーカータンパク質によるシグナルを顕微鏡観察によって確認した。また、マーカータンパク質の代わりに、細胞増殖を阻害するタンパク質を使用した同様の実験を行い、細胞数の計測 (Cell Counting Kit) を行ってその影響を評価した。次に、LHPs の修飾基を設計した。修飾基は、LHPs と相互作用できる電荷を有さねばならない。ゼーター電位測定装置によって LHPs の電荷を測定し、それと相互作用する様に設計することとした。加えて、細胞透過性を示すことが知られているペプチド配列も構成内容に含めることとした。高速攪拌しながら LHPs と当該修飾基を混合し、その後 30 分程度室温で静置した後に、再度ゼーター電位測定装置による経時的な電荷測定を行ってその安定性を評価した。

(2) In vivo タンパク質導入

修飾型 LHPs にマーカータンパク質を担持させ、これを経尾静脈的にマウスへ投与した。投与翌日、導入したマーカータンパク質のマウス生体における分布を確認するために、当該マウスの剖検・組織採材を行った。この時、マーカータンパク質/修飾型 LHPs の使用量を増減させてマーカーシグナルの出方に変動があるかどうか調べた。

(3) 治療効果の検討

他グループによる先行研究からは「飽和脂肪酸を不飽和脂肪酸に変換する酵素タンパク質をコードする *Lpcat3* (lysophosphatidylcholine acyltransferase 3) 遺伝子を糖尿病マウスの生体肝臓へウイルスベクターにより導入した結果、糖尿病が改善された」(4. 研究成果、参考文献) とされている。この系を利用して、LPCAT3 タンパク質を修飾型 LHPs に担持させて経尾静脈的に糖尿病マウスへ導入し、肝機能の改善効果がみられるかどうか調べた。

4. 研究成果

(1) LHPPs 派生体 (修飾型 LHPPs) の開発

生体材料 LHPPs を調製した (引用文献)。LHPPs と β -galactosidase (β -gal) との混合物を HepG2 細胞並びに NIH3T3 細胞の細胞培養系に添加し、翌日 (24 時間後) それぞれの細胞を 4% PFA で固定して X-gal 染色を行った。その結果、HepG2 細胞内において β -gal が沈着している様子を観察し (図 1)、さらに、細胞増殖を抑制するタンパク質 (RNase) を使用した同様の実験を行って添加後 24 時間における細胞数を計測したところ、HepG2 細胞の増殖抑制効果が確認できた。これらの結果は LHPPs の使用量と相関していた。したがって、LHPPs は細胞内へタンパク質を導入する効果を有していることがわかった。この現象は、HepG2 細胞で特に顕著に見られ NIH3T3 細胞ではほとんど観察されなかった。おそらくは、LHPPs の構成糖鎖が肝細胞の受容体に何らかの働きかけをしているのかもしれないと推測され、これは今後の検討課題である。

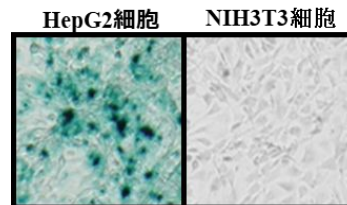


図 1 培養細胞の X-gal 染色の結果

LHPPs の表面電荷は正・負の電荷が混在しているため、ゼータ電位測定装置による測定結果は安定しない可能性があったが、測定値は安定的に負の数値を示した。そこで、修飾基には正の電荷を有するアミノ酸 (アルギニン) を採用した。また、細胞透過ペプチド (TAT 配列: GRKKRRQRRPPQ) も採用することとし、これらを外注によって合成した。そもそもポリアルギニン自身には、細胞膜透過効果のあることも知られており (引用文献) その意味においても本実験系にとっては有利な選択になるものと期待できた。加えて、アルギニンや TAT は顕著な細胞毒性は示さないとされている (引用文献)。これらのペプチド鎖を LHPPs と混合した後にゼータ電位値を再度測定したところ、負の数値は漸減したものの、やがて一定の値で落ち着いた。これにより修飾基の影響を受けた LHPPs (修飾型 LHPPs) が出来たものとし、HepG2 細胞並びに NIH3T3 細胞の細胞培養系を使用した上述と同様の β -gal 導入実験に供した。その結果、特に HepG2 細胞において強い沈着を認めたものの、今度は両方で β -gal の沈着が確認された。

(2) In vivo タンパク質導入

修飾型 LHPPs を使用して、 β -gal を ICR マウスに対して経尾静脈的に導入した。導入された β -gal の分布を確認するために、投与翌日 (17 時間後) に当該マウスを犠牲死させて肝臓 (実験群) 肺、心臓、腎臓を採材し、X-gal 染色を行った。その結果、肝臓における β -gal の沈着が観察できた。その他の 3 臓器では、腎臓で少量の沈着が観察された。従来の LHPPs (非修飾型) による実験結果と比較したとき、 β -gal の沈着量は明らかに増えていた。そして、導入されたマーカータンパク質は肝臓でその機能を発揮 (X-gal 染色における陽性反応) しており、導入タンパク質の機能は保持されていると考えられた。以上の結果、生体肝臓を対象とした経静脈的なタンパク質の導入で修飾型 LHPPs が効果を発揮することが示唆され、当初計画通りの系が開発できたものと考えられた。

(3) 治療効果の検討

先行研究 (参考文献) を参考にして、修飾型 LHPPs に LPCAT3 タンパク質を担持させ、糖尿病発症マウスへ経尾静脈的な投与を行った。その結果、無投与の対照群との間で有意な治療効果の差は認められなかった。導入タンパク質の機能は保持されている (上述結果 (2) より) とすれば、今後はその投与量を増やしていく必要があるものと考えられた。そのために、修飾型 LHPPs の機能性タンパク質の担持可能量を検討する必要がある。あるいは、導入方法を改善して導入量自体を増やす方策も考えられる。例えば、肝臓への遺伝子導入の代表的な手法であるハイドロダイナミクス法は、肝細胞におけるタンパク質などの取り込みへも効果を及ぼすものと期待でき、修飾型 LHPPs との併用で効果が得られるのではないかと考えられ、現在その検討を計画している。

< 引用文献 >

- Nakamura et al., *J Biomed Mater Res A*. **2009** Dec;91(3):814-23.
Futaki S et al., *J Biol Chem*. **2001**, 276, 5836-5840.
谷口ら *生化学* **2009**, 81(11), 992-995.
Rong et al., *Cell Metab*. **2013**, 18(5), 685-697.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- Nakamura S, Ishihara M, Watanabe S, Ando N, Ohtsuka M, Sato M. Intravenous Delivery of piggyBac Transposons as a Useful Tool for Liver-Specific Gene-Switching. *Int J Mol Sci*. **2018**, 19(11), E3452. doi:10.3390/ijms19113452.
Takabayashi Y, Kuwabara M, Sato Y, Ishihara M, Takikawa M, Nakamura S, Fukuda K, Hiruma S, Kiyosawa T. FGF-2-containing dalteparin/protamine nanoparticles

(FGF-2&D/P NPs) ameliorate UV-induced skin photoaging in hairless mice. *J Plast Surg Hand Surg.* **2018**, 52(6), 375-381. doi:10.1080/2000656X.2018.1523178.

Ishihara M, Kishimoto S, Nakamura S, Fukuda K, Sato Y, Hattori H. Biomaterials as cell carriers for augmentation of adipose tissue-derived stromal cell transplantation. *Biomed Mater Eng.* **2018**, 29(5), 567-585. doi:10.3233/BME-181009.

Sato M, Inada E, Nakamura S, Saitoh I. Intrapancreatic Parenchymal Cell Transplantation as a Possible Model for the Development of a Cell-based Therapy for Type I Diabetes Mellitus. *OBM Transplantation* **2018**, 2(3), 016. doi:10.21926/obm.transplant.1803016.

Kinoda J, Ishihara M, Nakamura S, Fujita M, Fukuda K, Sato Y, Yokoe H. Protective effect of FGF-2 and low-molecular-weight heparin/protamine nanoparticles on radiation-induced healing-impaired wound repair in rats. *J Radiat Res.* **2018**, 59(1), 27-34. doi:10.1093/jrr/rrx044.

Sato M, Saitoh I, Murakami T, Kubota N, Nakamura S, Watanabe S, Inada E. Intrapancreatic Parenchymal Injection of Cells as a Useful Tool for Allowing a Small Number of Proliferative Cells to Grow In Vivo. *Int J Mol Sci.* **2017**, 18(8), E1678. doi:10.3390/ijms18081678.

Takabayashi Y, Ishihara M, Kuwabara M, Takikawa M, Nakamura S, Hattori H, Kiyosawa T. Improved Survival of Full-Thickness Skin Graft With Low-Molecular Weight Heparin-Protamine Micro/Nanoparticles Including Platelet-Rich Plasma. *Ann Plast Surg.* **2017**, 78(5), 562-568. doi:10.1097/SAP.0000000000001051.

[学会発表](計4件)

中村伸吾, 渡部聡, 石原雅之, 安藤尚子, 大塚正人, 佐藤正宏. piggyBac系ベクターのハイドロダイナミクス遺伝子導入法はマウス肝臓での導入遺伝子の持続発現と肝細胞での gene switching を可能とする. 第41回日本分子生物学会年会. 2018年11月.

佐藤正宏, 齋藤一誠, 村上智哉, 窪田直子, 中村伸吾, 渡部聡, 稲田絵美. 少数個の増殖性細胞の体内増殖を可能とする新規マウス膵臓内細胞移植法. 第90回日本生化学会大会. 2017年12月.

佐藤正宏, 稲田絵美, 齋藤一誠, 三浦浩美, 大塚正人, 中村伸吾, 桜井敬之, 渡部聡. マウスすい臓内への piggyBac 系を介した直接生体内遺伝子導入は外来遺伝子の長期発現を可能とする. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月.

渡部聡, 中村伸吾, 桜井敬之, 大塚正人, 佐藤正宏. piggyBacベクターシステムと in vivo gene transfer を用いた新たな肝細胞株樹立の試み. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：石原 雅之

ローマ字氏名：(ISHIHARA, Masayuki)

所属研究機関名：防衛医科大学校

部局名：防衛医学研究センター 医療工学研究部門

職名：教授

研究者番号(8桁)：10508500

研究分担者氏名：佐藤 正宏

ローマ字氏名：(SATO, Masahiro)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：総合科学域総合研究学系

職名：教授

研究者番号(8桁)：30287099

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。