

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：34506
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2017～2020
課題番号：17H04744
研究課題名(和文)細胞核ナノトランスポーターの開発および細胞核ドラッグデリバリーシステムへの応用

研究課題名(英文)Development of cell nuclear nanotransporters for fabrication of nuclear-targeting drug delivery system

研究代表者
長濱 宏治(NAGAHAMA, KOJI)
甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授

研究者番号：00551847
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：インポーチンの核膜孔通過機構に倣って、ヘパリン・デキストランなどの親水性高分子の側鎖に疎水性アミノ酸誘導体を化学導入した両親媒性高分子を合理設計し、これら分子の自己組織化によりゲル状ナノ粒子(ナノゲル)を作製した。インポーチン模倣ナノゲルは自発的に細胞に取り込まれた後、エンドソームを脱出し、インポーチンと同じ機構により自発的に核内に移行することを実証した。また、ナノゲルはタンパク質や抗がん剤など様々な機能性分子を核内に輸送し、これらの分子を核内で機能させることにも成功した。ナノゲルは細胞・生体適合性を示すことより、世界初の細胞核ドラッグデリバリーシステム用キャリアとしての応用展開が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インポーチンの核膜孔通過機構に倣ったナノキャリア設計は全く新しいアイデアである。従来の核内物質輸送技術では、薬物やキャリアを核移行シグナルで修飾し、インポーチンにより核内に輸送させる手法が用いられてきたが、この手法は細胞質内の多くのタンパク質との競合反応になるため、核内輸送効率が低かった。それに対して、本研究により確立した核内物質輸送技術はインポーチン非依存的に核内移行するため、従来の核内輸送技術の問題点を完全に解決するものである。したがって、本研究の成果は医薬として生体レベルでの応用が期待され、革新的なナノ医療基盤としてライフイノベーションの推進に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Here, we show a rational design of novel artificial nuclear nanotransporters (NucPorters), inspired by importin, naturally occurring nuclear transporters. The NucPorter is generated by simple molecular design: self-assembly of amphiphilic polymers which a few numbers of hydrophobic amino acid-derivatives with phenyl groups are conjugated to negatively charged hydrophilic heparin. The NucPorter can mimic essential structural and chemical features of importin machinery to pass through the NPCs. Importantly, the NucPorter demonstrates remarkable rapid and high efficient nuclear transport in cultured cells, tissue/organ, and living mice. Moreover, the NucPorter successfully imports both enzymes and synthetic anticancer drugs into the nucleus with keeping their bioactivity. Thus, the NucPorter provides a promising new route to generate innovative nuclear-targeting medicines, diagnostics, cell imaging and engineering techniques, and drug delivery systems.

研究分野：生命高分子科学

キーワード：細胞核 インポーチン 高分子ナノゲル ドラッグデリバリーシステム ナノバイオテクノロジー バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

細胞核内は遺伝子発現や複製・転写が行われる重要な反応場である。不要物質の核内侵入を防ぐため、細胞質と核間の物流は核膜孔のバリア機能により高度に制御されている。したがって、DNA や転写因子などの核内物質を標的とするドラッグデリバリーでは、核膜孔を通過して核内に薬物を輸送するキャリアが極めて重要となる。これまでに、細胞外から細胞質への薬物輸送は盛んに研究されており、多くの輸送キャリアが開発されているが、核膜孔の構造は複雑で、バリア機能は厳密であるため、核膜孔を自在に通過するキャリアの設計は難しく、いまだ有用なキャリアが存在しないことから、細胞核内への物質輸送技術は確立されていない。

細胞内にはインポーチンという核輸送タンパク質が存在し、核膜孔を通過できないタンパク質を細胞質から核内に輸送する能力をもつ。2014年には、インポーチンの核膜孔通過機構が報告された。以上の背景のもと、私たちは“インポーチンの核膜孔通過機構に倣う”という独自の新しいアイデアにより、インポーチンの核膜孔通過に必要な不可欠な2つの機能ドメイン(核膜孔内部のポリペプチド鎖に多く含まれるフェニルアラニン-グリシン連続配列と動的に結合・解離する複数の疎水ドメイン、核膜孔内部のポリペプチド鎖に多く含まれるリジン残基と結合するアニオン性ドメイン)を搭載した高分子ナノ組織体ライブラリを合成し、ライブラリの中でも、親水性高分子 Heparin に疎水性フェニルアラニン誘導体を共有結合した両親媒性高分子が形成するナノ組織体を、エレクトロポレーションによりヒト細胞の細胞質に導入すると、大部分が核膜孔を通過して核内に移行・集積することを見出した。

2. 研究の目的

本研究課題では、インポーチン模倣高分子ナノ組織体を基盤材料として用い、細胞外から核内に機能性物質を高効率で輸送し、遺伝子発現や細胞機能を制御する核内物質輸送技術を確認することを目的として設定した。さらに、この輸送技術を活かして細胞核ドラッグデリバリーシステム(DDS)を開発することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、以下の各項目を遂行することで目的の達成を試みた。

- (1) ナノ組織体の核内動態(核膜孔通過速度・核内滞留時間)制御のための分子設計の最適化
 - ・ナノ組織体の核内動態に関する構造-機能相関の解明
 - ・ナノ組織体の核内動態制御を目指した分子設計の最適化
- (2) ナノ組織体を自発的に細胞内に取り込ませ、核移行させる
 - ・ナノ組織体への細胞取り込み促進モジュール、エンドソーム脱出モジュールの付加
- (3) ナノ組織体への機能性物質担持手法の最適化および担持物質の放出特性を制御する
 - ・ナノ組織体に機能性核酸・転写因子・DNA 標的抗がん剤を担持する手法の最適化
 - ・担持した機能性物質の核内放出制御のための放出メカニズム理解と放出制御手法の確立
- (4) ナノ組織体を用いた核内物質輸送により、遺伝子発現および細胞機能を制御する
 - ・機能性核酸・転写因子・抗がん剤の核内輸送による遺伝子発現・細胞機能制御手法の確立
- (5) ナノ組織体を用いて、細胞核 DDS を開発する
 - ・ナノ組織体の体内動態を制御する手法の確立
 - ・ナノ組織体を用いた機能性物質の *in vivo* 細胞核デリバリーおよび生体レベルで遺伝子発現および細胞機能を制御する手法の確立

4. 研究成果

- (1) ナノ組織体の核内動態(核膜孔通過速度・核内滞留時間)制御のための分子設計の最適化

ヘパリンに化学修飾する疎水性アミノ酸誘導体として、フェニルアラニンエチルエステル(PheEE)、フェニルアラニンベンジルエステル(PheBz)、ロイシンエチルエステル(LeuEE)を用い、エレクトロポレーションにより細胞内動態を調べた結果、ヘパリン-PheEE 修飾体(HepPheEE)が最も速やかに核移行し、また核内滞留時間も長いことが示された(図1)。さらに、ヘパリン1分子あたりのPheEE修飾数は10以上であれば、核移行性や滞留性は同程度であった。以上より、HepPheEEを最適な高分子として選択し、以降の実験を進めた。HepPheEEは動物組織においても核移行性を示し、生体に適用可能であることを見出した [1]。

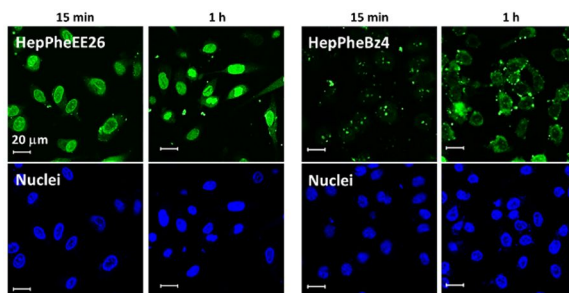


図1. 各種インポーチン模倣ナノ組織体の核内動態。

- (2) ナノ組織体を自発的に細胞内に取り込ませ、核移行させる

上記(1)では、ナノ組織体の核内動態に着目したため、エレクトロポレーションによりナノ組織体を直接細胞質に導入した。一方、細胞核 DDS 技術を開発するためには、ナノ組織体を自発的に細胞内に取り込ませ、核移行させることも重要となる。そこで、HepPheEE の自発的に取り込み後の核内移行性を調べた結果、高い負電荷にもとづき細胞取り込み効率が低いことが判明した。そこで、主鎖を中性のデキストランに変更し、デキストラン - PheEE 修飾体 (DexPheEE) を合成した結果、そのナノ組織体は高い細胞取り込みを示した。また、DexPheEE ナノ組織体をエレクトロポレーションにより直接細胞質に導入したところ、速やかに核に移行し滞留したことから、主鎖の変更は核移行性には影響しないことを確認した。一方、自発的に取り込ませた場合にはエンドソームから脱出できないことが分かった。そこで、プロトンスポンジ効果を期待して、デキストラン - ヒスチジンエチルエステル (HisEE) 修飾体 (DexHisEE) を合成し、DexPheEE / DexHisEE 複合ナノ組織体を作製した。複合ナノ組織体は HisEE 部位の弱酸性領域での pH 緩衝能によりエンドソーム内でプロトンスポンジを示し、エンドソームから脱出して細胞質に移行した。また、DexHisEE は複合ナノ組織体から離脱し、DexPheEE 単独ナノ組織体となって核に移行することを見出した。つまり、自発的に細胞内に取り込ませ、核移行させるナノ組織体を作製することに成功した。

(3) ナノ組織体への機能性物質担持手法の最適化および担持物質の放出特性を制御する

先行していた HepPheEE ナノ組織体を用いて、様々な機能性物質の担持を評価した。ナノ組織体を形成する前の高分子水溶液に機能性物質を溶かし、高分子が自己組織化してナノ組織体を形成する際に、担持が可能であった。担持可能な物質として、疎水性低分子化合物 (蛍光色素、DNA を標的とする抗がん剤) および多種多様なタンパク質を同定した。また、機能性物質を担持した状態で核内移行性を示した (図 2)。ナノ組織体により核内に輸送した低分子化合物は、核内において数日間で徐々に放出された。サイズの大きいタンパク質の場合、より長い時間をかけて放出された。つまり、担持物質のサイズに依存して放出速度が変わることを見出した。

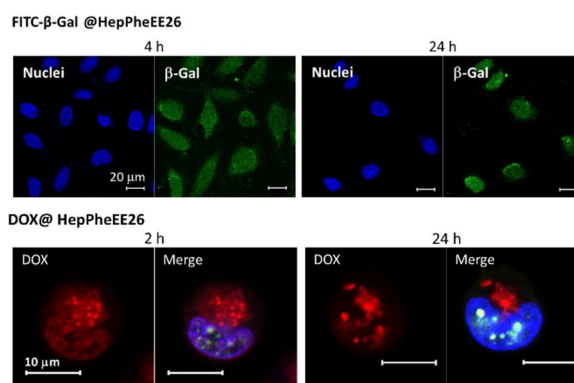


図 2. β-ガラクトシダーゼ (上)、ドキソルビシン (下) 担持 HepPheEE ナノ組織体の核内動態。

(4) ナノ組織体を用いた核内物質輸送により、遺伝子発現および細胞機能を制御する

担癌マウスに抗がん剤ドキソルビシンを担持した HepPheEE ナノ組織体を与え、抗がん活性を評価した。ナノ組織体はがん組織中のがん細胞の核内にドキソルビシンを運び、ドキソルビシンを核内に効果的にとどめ、集中的に標的 DNA に作用させることで、通常ドキソルビシン単独投与と比べて、著しく高い抗がん活性を示した (図 3)。また、ナノ組織体で核内にヌクレアーゼを輸送し、核内で DNA を切断することが可能であることも見出した。以上のように、ナノ組織体を用いた機能性物質輸送により、細胞機能を制御できることを示した。

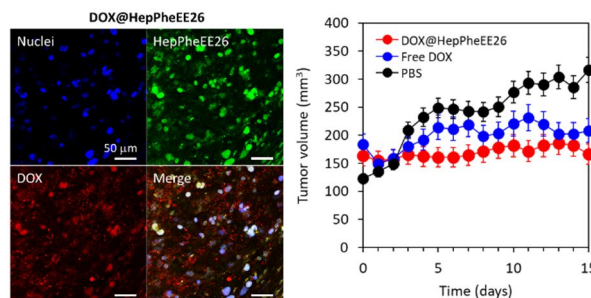


図 3. ドキソルビシン担持 HepPheEE ナノ組織体の *in vivo* 抗がん活性。

(5) ナノ組織体を用いて、細胞核 DDS を開発する

HepPheEE ナノ組織体および DexPheEE / DexHisEE 複合ナノ組織体の体内動態をマウスで調べ、比較的長い血中滞留性、低い肝臓および脾臓への移行性・蓄積性を確認した。また、DexPheEE の PheEE 修飾数、デキストラン分子量、DexPheEE と DexHisEE の複合組成などが体内動態を左右する要因のひとつであることを見出し、体内動態制御のためのナノゲル設計指針を得た。以上より、HepPheEE ナノ組織体および DexPheEE / DexHisEE 複合ナノ組織体は細胞核 DDS 技術を開発する上で、有用なナノキャリアであることを実証した。

参考文献

[1] Koji Nagahama, Yoshinori Sano, Mitsuo Inui, Seika Aoyama, Tokitaka Katayama, Kimika Ono, Bioinspired Cell Nuclear Nanotransporters Generated by Self-Assembly of Amphiphilic Polysaccharide-Amino Acid Derivatives Conjugates, *Advanced Biosystems* 2020, 4, 1900189.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koji Nagahama, Yoshinori Sano, Mitsuo Inui, Seika Aoyama, Tokitaka Katayama, Kimika Ono	4. 巻 4
2. 論文標題 Bioinspired cell nuclear nanotransporters generated by self assembly of amphiphilic polysaccharide amino acid derivatives conjugates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Biosystems	6. 最初と最後の頁 1900189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adbi.201900189	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 乾 充男・秋山 雄大・長濱 宏治
2. 発表標題 人工インポーチン/エクスポートンの開発と細胞質 - 核間の動態制御
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Nagahama
2. 発表標題 Bioinspired Cell Nuclear Nanotransporters Generated by Self-Assembly of Amphiphilic Polysaccharide-Amino Acid Derivatives Conjugates
3. 学会等名 13th International Symposium on Nanomedicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長濱宏治、秋山雄大、中西健太
2. 発表標題 自発的な核内輸送性を有するナノゲルの開発と核内物質輸送特性の解析
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Nagahama, Y. Kimura, S. Aoyama, and A. Takemoto
2. 発表標題 Living Functional Hydrogels Generated by Bioorthogonal Cross-Linking Reactions of Azide-Modified Cells with Alkyne-Modified Polymers
3. 学会等名 12th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長濱宏治、真田ゆか
2. 発表標題 糖鎖修飾による細胞表面ゲル化手法の開発および表面ゲル化が細胞応答に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第28回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田真鈴、佐野由倫、前川紗恵子、長濱宏治
2. 発表標題 細胞核ナノトランスポーターを用いた機能性タンパク質デリバリーによる細胞反応制御
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱田優汰、長濱宏治
2. 発表標題 核移行能とエンドソーム脱出能を兼ね備えたpH応答性離脱式ナノゲル
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長濱宏治、佐野由倫、乾充男
2. 発表標題 インポーチンに倣った細胞核移行性ナノキャリアの設計
3. 学会等名 第50回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱田優汰、乾充男、佐野由倫、長濱宏治
2. 発表標題 インポーチンの機能を模倣した細胞核ターゲティングナノキャリアの開発
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

甲南大学フロンティアサイエンス学部ホームページ http://www.konan-first.jp/database/search.php?essay 甲南大学フロンティアサイエンス学部ホームページ http://www.konan-first.jp/database/search.php 甲南大学フロンティアサイエンス学部ホームページ http://www.konan-first.jp/database/search.php 甲南大学フロンティアサイエンス学部長濱研究室ホームページ https://www.konan-u.ac.jp/hp/nagahama

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------