

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19929

研究課題名(和文)インフラマソームのin vivoイメージングによる炎症性疾患の診断・治療システム

研究課題名(英文)In vivo imaging of inflammasome activation for clinical diagnosis

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はウイルスカプシドをモデルとする新しいナノドラッグキャリアを開発している。本プロジェクトでは、インフラマソームに特異的に反応し、その活性に応じてシグナルを変化させることができる機能化造影剤を設計・作製した。そのプラットフォームとしては、タンパク質ベースのバイオナノカプセル(small heat shock protein, HSP16.5)を用い、タンパク質工学や進化工学の概念を取り入れ、インフラマソームに対してより鋭敏かつ定量的に応答するナノカプセルを新たに分子設計した。得られた組み換え体は直径20nmの球状構造体であり、インフラマソームに対して濃度依存的に応答した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん組織に炎症細胞が浸潤していることは、病理学的に古くから知られており、慢性炎症と発がんは密接に関わっていると考えられてきた。特に近年は炎症反応により活性化するシグナル経路が発がんに関与していることが解明されつつあり、炎症応答を制御することでがん化やその進展を制御できる可能性も見えてきた。また炎症性疾患には本研究の目標であるNASHをはじめ、機序、診断法、そして治療法が開発途上にあるものも多く、炎症シグナルの中核を成すインフラマソームの解明が喫緊の課題となっている。本研究で開発したインフラマソーム応答型ナノカプセルはその造影剤として機能することができる。

研究成果の概要(英文)：We have developed novel nano-drug carrier modeled on the viral capsid. In this project, we designed and created a functionalized contrast agent that can react specifically with inflammasome and change the signal according to its activity. As its platform, we use protein-based bio-nanocapsules (small heat shock protein, HSP16.5) and incorporate the concepts of protein engineering and evolutionary engineering to respond to inflammasome more sensitively and quantitatively. Was newly designed. The obtained recombinant was a spherical structure with a diameter of 20 nm and responded to inflammasome in a concentration-dependent manner.

研究分野：医工学

キーワード：ナノ材料 DDS 分子イメージング 診断システム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

炎症反応は生体防御において極めて重要な反応であるが、過剰な炎症性応答は組織障害を惹起する。この炎症において重要な役割を担うのがインフラマソーム (inflammasome) と呼ばれるタンパク複合体である。このインフラマソームは刺激を認識する受容体 (Nod-like receptor や AIM2 等)、ASC というアダプター分子、そしてカスパーゼ 1 から構成されており、細菌やウィルスなどの病原体構成分子や代謝産物などの生体にとっての危険物質を認識すると多量体化して活性化する。この結果、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインが活性化型に変換され、体内に分泌されることになる。つまりインフラマソームは炎症応答の促進に直接関わっており、近年は感染症だけでなく生活習慣病を含めた様々な疾患との関係が次々と明らかになっている。その中にはアルツハイマー病や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)、あるいは心筋梗塞など早期診断が極めて難しい疾患も含まれている。炎症はこれらの疾患の極初期から起こっており、インフラマソームの形成を特異的に捉えることができれば、これらの疾患を極初期の段階で診断することが可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究ではこのインフラマソームに着目した新しい診断・治療システムを開発する。我々はインフラマソームに特異的に反応し、その活性に応じてシグナルを変化させることができる機能化造影剤を設計・作製する。すでに *in vitro* においてはこのカスパーゼ 1 の活性を可視化する手法が開発され、培養細胞において疾患発症のメカニズムの解明や薬剤の抗炎症機能の評価法として期待が持たれている。しかしながら、ヒトはもちろん動物個体においてこのインフラマソームをリアルタイムに可視化した例はほとんどない。これまでに報告された検出法はほとんどがペプチドベースであり、血中に投与しても数分で速やかに分解され、またペプチド自体に標的組織・細胞への指向性もないからである。

一方、本研究で開発する機能化造影剤のプラットフォームとしては、タンパク質ベースのバイオナノカプセル (small heat shock protein, HSP16.5) を用いる。予備実験において、ナノカプセルの血中安定性は極めて高く、少なくとも 1 週間は血中酵素に分解されることなく安定に存在した。さらにマウスに投与後、JSCC 標準化対応法によって各種の生化学パラメータを測定したところナノカプセルによる急性毒性も観察されなかった。本研究ではこのナノカプセルの体内での指向性と応答性を制御することで、*in vivo* でのインフラマソーム可視化を実現する。

## 3. 研究の方法

### ナノカプセルの作製と形態観察

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 (図 1)。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 PCR を駆使することで、インフラマソーム応答型ナノカプセルの分子設計を行った。この際、タンパク質工学や進化工学の概念を取り入れ、インフラマソームに対してより鋭敏かつ定量的に応答するナノカプセルを新たに分子設計した。

得られた組換え HSP16.5 遺伝子を大腸菌株 BL21 Codon Plus (DE3) へ形質転換した。この菌株を 100 mg/mL のアンピシリンを含む 2 $\times$ YT 培地に接種し、37 $^{\circ}$ C で振とう培養した。OD600 値が 0.5 に達した際に、終濃度 1mM の IPTG を加えて組み換えタンパクの発現を誘導し、そのまま 4 時間培養を続けた。

培養終了後、培地を遠心分離し、得られたペレットにリン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて

十分に懸濁させた。密閉型超音波照射装置を用いて氷温下でソニケーション(200 W, 45 s)し、終濃度がそれぞれ5 および 1 mg/mLのDNase I、RNase Aを加えた。4°Cで遠心分離(20 000g, 20 min)した後、不溶性分画を除去した。

組み換えタンパク質の精製は HiLoad 26/10 Q Sepharose HP™アニオン交換カラムでイオン交換クロマトグラフィーを行った。塩濃度グラジエントによってタンパク質を溶離し、分取した各フラクションを SDS-PAGE で分析した。目的のタンパク質を含むフラクションは、TSKgel G3000SW カラムを用いてゲル濾過精製した。得られたタンパク質は MALDI-TOF 質量分析計、動的光散乱法 (DLS) そして透過型電子顕微鏡 (TEM) によって物性評価した。

#### 4. 研究成果

##### 分子軌道計算による変異導入部位の選定

Kim らによってHSP16.5 タンパク質のT33 からE147 までのアミノ酸残基が24 量体を形成した状態の結晶構造が解析された (図1 A)。Chain A に着目し、PyMOLによって水素結合残基を調べると、Chain A は近隣のタンパク質Chain B、Chain C、およびChain Eと水素結合を形成する (図1 B-C)。今回はこれらのアミノ酸残基に変異導入した時の  $\Delta\Delta G_{\text{fold}}$  とサブユニット間の相互作用の変化を考慮しながら変異体の設計を試みた。

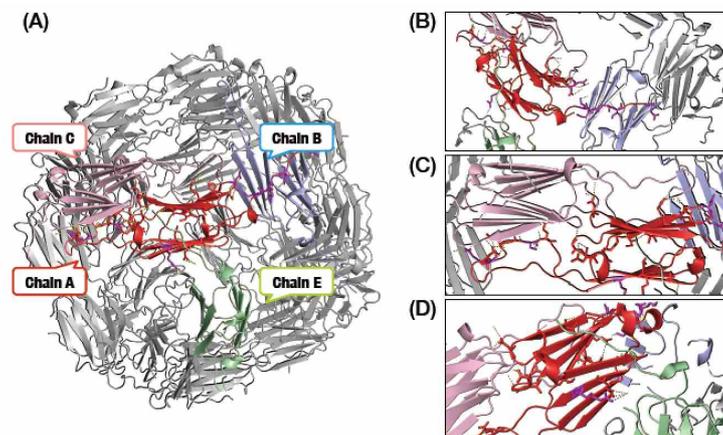


図1 (A) HSP16.5 がカプセルを形成したときの結晶構造. (B) Chain A と B, (C) Chain A と C, および (D) Chain A と E の形成する水素結合. いずれも赤がChain A, 青がChain B, ピンクがChain C, および緑がChain E であり, 黄色の点線が水素結合である。

HSP16.5 が8 量体を形成した結晶構造 (1SHS.pdb) をFoldX によって最適化したのち、近隣のタンパク質と水素結合を形成するChain A のアミノ酸残基を19 通りにアミノ酸置換したときの  $\Delta\Delta G_{\text{fold}}$  変化を計算した。この結果、位置によっては  $\Delta\Delta G_{\text{fold}}$  が大きく変化する位置も見つかり、これらは概ねASA の低いアミノ酸であった。これは、構造内部に埋もれたアミノ酸がアミノ酸置換によって露出することによって、周辺の構造安定性が大きく低下するものと考えられる。今回はどのアミノ酸変異によっても  $\Delta\Delta G_{\text{fold}}$  が  $\pm 2\text{kcal/mol}$  に収まる位置を中心に、変異を導入したときの相互作用変化計算を行った。この結果、ある条件下でいくつかのアミノ酸を置換することにより、Chain A および Chain B 間の相互作用に影響を与えることが明らかとなった。この結果を受けてナノカプセルの分子設計を実施した。

##### インフラマソーム応答型ナノカプセルの物性評価

組み換えタンパク質はアニオン交換クロマトグラフィーによって粗精製し、最終精製はゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) によって行った。得られたナノカプセルを SDS-PAGE で分析したところ、ほぼシングルバンドであり純度は  $>90\%$  と確認できた。さらにカプセルを動的光散乱法 (DLS) によって評価した結果、その粒径は20.7nmであり、野

生型HSP16.5の粒径11.5nmよりも大きいことが分かった。

### インフラマソームに対する応答性

次に、このカプセルがインフラマソームに対して応答し、構造崩壊するかを調べた。ナノサイズの構造変化をリアルタイムに観察することは困難であるが、Förster 共鳴エネルギー移動 (FRET) とよばれる現象を観察することで評価することが可能である。この技術は二つの波長の異なる蛍光分子を組み合わせ、一方が蛍光ドナー、もう一方がアクセプターとして機能させる。これら二つの蛍光はお互いの分子間距離に強く依存するため、その変化を観察することによって両分子の相対的な位置を推定することが可能となる。インフラマソーム応答型ナノカプセルに二つの蛍光分子 (Alexa488 と Alexa594) をラベルした時の蛍光を図 2 に示した。インフラマソーム未添加の場合、二つの蛍光分子間で FRET し、アクセプターとなる Alexa594 由来の蛍光が強くなっているのが確認された (図 2A)。これは、蛍光分子間の距離が極めて近接 (一般的には<10nm)、つまりナノ構造体を維持していることを示唆している。一方で、この溶液にインフラマソームを添加すると Alexa594 の蛍光が著しく減少するとともにドナーである Alexa488 の蛍光強度が上昇した (図 2B)。この現象は添加したインフラマソームの濃度依存的であり (図 2C)、ナノカプセルの構造がインフラマソームの添加によって大きく変化することを示唆している。実際、インフラマソーム添加後のサンプルを SDS-PAGE でも同様の結果が得られた。現在、このインフラマソーム応答型ナノカプセルは複数の疾患モデルで評価を継続しており、診断・治療の融合システムとして報告したい。

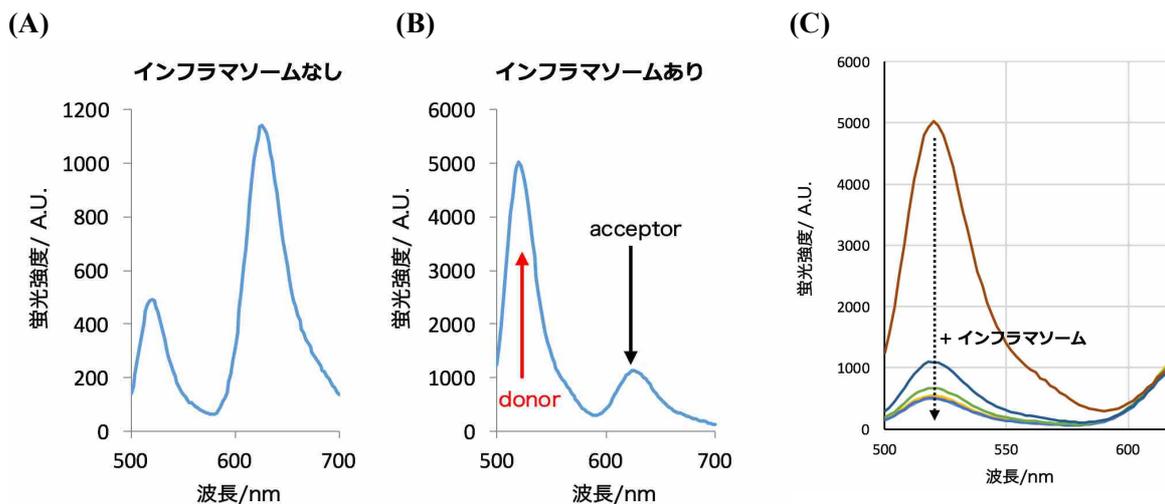


図2 インフラマソーム応答型ナノカプセルの蛍光強度変化. (A), インフラマソーム未添加; (B), インフラマソーム添加; (C), ドナー蛍光のインフラマソーム依存性

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Riki TOITA, Takahito KAWANO, Satoshi FUJITA, Masaharu MURATA, Jeong-Hun KANG	4. 巻 31
2. 論文標題 Increased hepatic inflammation in a normal-weight mouse after long-term high-fat diet feeding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 43-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1293/tox.2017-0038">https://doi.org/10.1293/tox.2017-0038</a>	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Naoya IMANISHI, Tetsuo YAMASAKI, and Kazuhiko TSUKAGOSHI, Masaharu MURATA	4. 巻 34
2. 論文標題 Phase Separation Multi-Phase Flow Using an Aqueous Two-Phase System of a Polyethylene Glycol/Dextran Mixed Solution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 953-958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.2116/analsci.18P105">https://doi.org/10.2116/analsci.18P105</a>	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Sato Hikari, Nakhaei Elnaz, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Kishimura Akihiro, Mori Takeshi, Katayama Yoshiki	4. 巻 34
2. 論文標題 Ligand-Mediated Coating of Liposomes with Human Serum Albumin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 2324 ~ 2331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.7b04024	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Toita Riki, Otani Kentaro, Kawano Takahito, Fujita Satoshi, Murata Masaharu, Kang Jeong-Hun	4. 巻 209
2. 論文標題 Protein kinase A (PKA) inhibition reduces human aortic smooth muscle cell calcification stimulated by inflammatory response and inorganic phosphate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 466 ~ 471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2018.08.051	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Iwamoto Chika, Ohuchida Kenoki, Okumura Miki, Usumoto Yosuke, Kishimoto Junji, Murata Masaharu, Ikeda Noriaki, Hashizume Makoto	4. 巻 32
2. 論文標題 Postmortem interval estimation using the animal model of postmortem gas volume changes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 66～70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2017.12.010	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kawano Takahito, Murata Masaharu, Kang Jeong-Hun, Piao Jing Shu, Narahara Sayoko, Hyodo Fuminori, Hamano Nobuhito, Guo Jie, Oguri Susumu, Ohuchida Kenoki, Hashizume Makoto	4. 巻 152
2. 論文標題 Ultrasensitive MRI detection of spontaneous pancreatic tumors with nanocage-based targeted contrast agent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 37～46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2017.10.029	査読の有無 有
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 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
研究分担者	梅野 太輔 (Umeno Daisuke) (00400812)	千葉大学・大学院工学研究院・准教授  (12501)	
研究分担者	赤星 朋比古 (Akahoshi Tomohiko) (20336019)	九州大学・医学研究院・准教授  (17102)	
研究分担者	橋爪 誠 (Hashizume Makoto) (90198664)	九州大学・先端医療イノベーションセンター・名誉教授  (17102)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	河野 喬仁  (Kawano Takahito)  (90526831)	九州大学・先端医療イノベーションセンター・特任助教    (17102)	