

平成21年7月28日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790042

研究課題名 (和文) 炎症性シグナルセンシングポリマーを用いた新規遺伝子治療戦略の創出

研究課題名 (英文) Development of inflammatory cell-specific gene regulation system for gene therapeutic strategy

研究代表者

浅井 大輔 (ASAI DAISUKE)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10423485

研究成果の概要 (和文)：NF- $\kappa$ B の活性化にはその上流の I $\kappa$ B キナーゼ (IKK) の活性化が必須であることに着目し、IKK 活性化シグナルを感知 (センシング) して DNA を放出する機能性高分子 (ポリマー) の創製し、本法を炎症性細胞に対する D-RECS 法と名付けて炎症性細胞特異的遺伝子発現手法として研究を展開した。慢性の炎症疾患である関節リウマチに対する新規遺伝子治療戦略を創出することを最終目的とし、既存の試作型ポリマーに改良・修飾を加えて新たな機能を賦与した種々の炎症性シグナルセンシングポリマーを調製した。外来遺伝子の強制発現による炎症細胞選択的な殺傷効果を試験管内および培養細胞内、そして関節炎モデルラットのそれぞれにおいて評価した。その結果、ポリマー/DNA 複合体の効率よい細胞内導入という点に改善の余地を残すものの、炎症刺激に応じた外来遺伝子 (治療用遺伝子) を強制発現できるシステムの開発に成功した。

研究成果の概要 (英文)：We proposed a novel strategy called D-RECS (drug or gene delivery system responding to cellular signals) to convert an intracellular signal to transgene expression. Here we apply this concept to inflammatory cells by using I $\kappa$ -B kinase as a signal molecule that triggers the gene expression. Candidate cationic substrates of I $\kappa$ -B kinase beta (IKK $\beta$ ) were synthesized and their reactivity was investigated. The results of gel shift assay showed that the polyplex was disintegrated and free DNA was released in the presence of IKK $\beta$ . The polyplex comprising CMV-GFP plasmid DNA and the polymer expressed the transgene in living cells exposed to a pro-inflammatory stimulus. Our concept of cell-specific gene expression was proved to work in inflammatory cells. This method may provide a unique strategy for gene therapy exclusively in inflammatory cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：IkappaB kinase、NF-kappaB、遺伝子キャリアー、ドラッグデリバリー、遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

TNF $\alpha$ や IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインやリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) といった微生物由来成分により細胞を刺激すると、NF- $\kappa$ B という重要なタンパク質が活性化される。30年以上に渡り不明であったこれらの刺激から NF- $\kappa$ B の活性化に至るまでのシグナル伝達機構の全貌が明らかにされては、や数年が経過した。LPS は重症感染症によって併発されることの多い敗血症の原因物質であることから感染症治療に対する新しいアプローチが、一方では NF- $\kappa$ B の活性化が癌細胞の増殖促進と抗アポトーシスに正に相関することから新規な作用機序の癌治療薬の開発が、NF- $\kappa$ B のシグナル伝達機構を時間的・空間的に制御することにより現在精力的に行われている。さらに、製剤化されその一部は承認された薬剤である関節リウマチ (RA) に対する分子標的治療薬は、従来の治療方針そのものを急速に変貌させようとしており、NF- $\kappa$ B のシグナル伝達機構の制御が画期的な治療薬に結びつくことを現実に示した。

上述のように抗 TNF $\alpha$ 抗体に代表される分子標的治療薬は RA 治療に画期的な効果をもたらしつつあるが、生物学的製剤であるが故に、長期投与した場合、細菌・真菌などによる感染症を併発する諸刃の剣であることや、高価な薬剤であるが故に治療に対する医療費が増加してきているという問題を抱えており完全な薬にはまだ遠い。RA の場合、病変が関節腔という閉鎖領域にあるため、全身への遺伝子療法の際に問題になるような副作用を比較的回避しやすく、RA に遺伝子治療を考慮すべき妥当性がある。したがって現在でも、関節炎の治療に遺伝子治療は将来の次世代医療の一つとして期待されている。

臨床的遺伝子治療を担ってきたアデノウイルスベクターは、非特異的炎症の惹起および発癌遺伝子の活性化による死亡事故が相次いで報告され、重大な影がおよんでいる。一方、リポソームなどの非ウイルスベクターは安全性・コストの面で優れた遺伝子ベクターであるが、導入遺伝子の細胞選択的発現制御技術がないためにその発展が妨げられている。この問題を解決するため、すでに多く

の方法が試みられている。既存の多くの手法は、標的細胞の表面に存在するマーカー分子を狙ったターゲティング概念に基づくものである。この手法は、臓器選択性を出す場合には良いが、疾患細胞特異的マーカー分子が容易に存在しないこと、正常細胞に積極的に遺伝子導入ができないようにする機構は存在しないため、標的細胞のみへの遺伝子の送達を達成することは必ずしも容易ではない。申請者らは疾患細胞で異常亢進している細胞内シグナルに応答して、疾患細胞でのみ導入した遺伝子の発現を活性化させる概念を提唱し、I $\kappa$ B キナーゼ (IKK)、プロテインキナーゼ C (PKC)、c-Src キナーゼ、プロテインキナーゼ A (PKA)、HIV プロテアーゼ、カスパーゼ 3 に応答してプラスミド DNA を放出する細胞内シグナルセンシングポリマーを開発し、試験管内において (一部は培養細胞においても)、遺伝子の発現制御に成功してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、最近その詳細が明らかになってきた NF- $\kappa$ B のシグナル伝達機構のうち、NF- $\kappa$ B の活性化に必須である IKK に着目し、RA に対する遺伝子治療の戦略に応用する。炎症細胞で活性化している IKK シグナルに応答して治療用遺伝子をコードするプラスミド DNA を放出する炎症性シグナルセンシングポリマーを用い、慢性の炎症疾患である RA に対する新規遺伝子治療戦略を創出することを目的とし、最終的に動物実験にまでもっていく。

## 3. 研究の方法

(1) IKK $\beta$ の基質ペプチドの合成および高分子材料の調製

申請者は既に試験管内実験・培養細胞実験・動物実験において皮膚癌細胞選択的な遺伝子発現を実現しうる、PKC応答型の遺伝子キャリアーの設計に成功している。そしてここで得られた分子設計に必要な情報を I $\kappa$ B キナーゼ $\beta$  (IKK $\beta$ ) に適用したところ、試験管内および培養細胞において、IKK $\beta$  に応答してプラスミド DNA を放出するポリマーを見出している。さらなる応答性の獲得を目指し、リン酸化部位周辺の種々のペプチドを合成して質量分析による *in vitro* キナーゼアッセイにより

リン酸化の有無・程度を調べ、基質配列の最適化を行った。N末端をメタクリロイル化したペプチドをFmoc固相合成法により合成し、アクリルアミドとラジカル重合させポリマーを調製した。この際、アクリルアミド主鎖とペプチド基質間に種々の長さのエチレングリコール鎖を導入して、ポリマー環境中で基質ペプチドへのフレキシビリティの賦与を狙った。また、DNAとの複合体の安定性を高める目的でポリエチレングリコール鎖を導入した高分子も並行して合成した。

#### (2) 高分子材料の試験管内での機能解析

調製したポリマーがプラスミドDNAと複合体を形成するか、そしてこのリン酸化によりポリマー/DNA複合体の崩壊が起こるかをゲルシフトアッセイにより調べた。次いで、IKKβがポリマー環境中に存在する基質をリン酸化するか、そのリン酸化の程度はポリマー単独とDNA複合体とではどの程度の差が認められるのかを、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPを用いた *in vitro* キナーゼアッセイにより、ポリマー分子に取り込まれた  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPを定量して評価した。

#### (3) 培養細胞での機能解析

申請者らは標的細胞へのターゲティングをB型肝炎ウイルスのカプシド由来のバイオナノカプセルが受け持ち、同一臓器内での疾患標的細胞と正常細胞の見分けをセンシングポリマーで行うというDual Security Systemの構築に成就している。このバイオナノカプセルは以前にJST-CRESTのグループメンバーとして共同研究をしてきた研究協力者：大阪大学の黒田俊一准教授（現・名古屋大学教授）より分与を受けてきた。今回、糖鎖リガンド標識バイオナノカプセルを用いて、炎症性細胞表面に発現するE-セレクトインのアクティブターゲティングが可能なバイオナノカプセルの併用について検討した。細胞導入手法としてマイクロインジェクション法およびソノポレーション法についても検討した。またRA患者滑膜細胞をSV40 T抗原により転換した株化細胞であるMH7A細胞を用い、調製したポリマーが炎症性刺激に応答してレポーター遺伝子を発現するかを調べた。また、自殺遺伝子の発現プラスミドを導入した後プロドラッグであるガンシクロビルを添加し、自殺遺伝子の導入処理をした細胞群が有意に殺傷さ

れるかどうかを精査した。

#### (4) RAモデルラットを用いた機能解析

関節炎誘発モデルマウスであるDBA/1Jを用いて慢性の炎症疾患の代表例である関節リウマチの治療に焦点をあてた。関節リウマチは関節の骨の脇の部分に付着している滑膜組織の炎症、すなわち滑膜細胞の炎症によるものである。この部位に調製した炎症性シグナルセンシングポリマーを用いて治療遺伝子を導入することができれば最も効果が期待される。関節腔に調製したポリマーを用いてレポーター遺伝子を導入した後、IKKβのリン酸化部位SerをAlaに置換した陰性コントロールポリマーと比較して有意にレポーター活性が認められるかをIn Vivo Imagerにより解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) IKKβの基質ペプチドの合成および高分子材料の調製

計17種のペプチドを設計・化学合成し、*in vitro* キナーゼアッセイによるペプチド基質配列の最適化を行った結果、①リン酸化部位C末端は34位Leuまででよく、一方、②N末端配列は基質認識に重要であり、特にN末端ERLLDDクラスターが必要であること、そして③DNA凝集のためのLysのN末端への挿入が可能であることがわかった。N末端メタクリロイル化ペプチドを化学合成し、アクリルアミドとラジカル重合させポリマーを得た（図1）。



図1. 高分子材料の合成スキーム

#### (2) 高分子材料の試験管内での機能解析

ゲルシフトアッセイにより調べたところ、調製した高分子は容易にプラスミドDNAと複合体（ポリプレックス）を形成すること、そしてポリプレックスはリコンビナント IKKβの添加により崩壊することが示唆された（図2）。

ポリプレックスの崩壊がポリマー中の基質のリン酸化に由来するものであるかを調べるために  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP を用いて調べたところ、確実に IKKβによりポリマーがリン酸化され

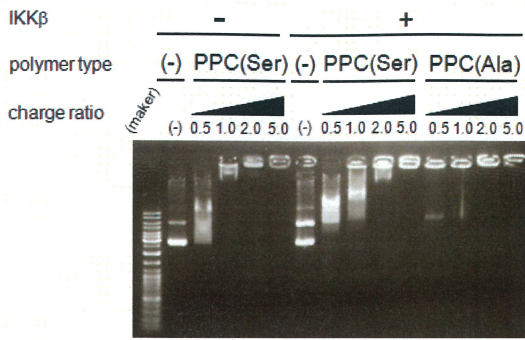


図2. IKKβによる高分子/DNA 複合体の崩壊

ていることがわかった。興味深いことに、このポリマーのリン酸化率はポリプレックスの場合と同程度であった。この結果は、ポリマーがプラスミド DNA と静電相互作用している状態およびポリマー単独の状態のどちらにおいても基質部位が IKKβにより同等にリン酸化を受けること、すなわち IKKβの基質へのアクセスし易さはポリマー単独・複合体のどちらにおいても変わらないというきわめて重要な発見となった (図3)。

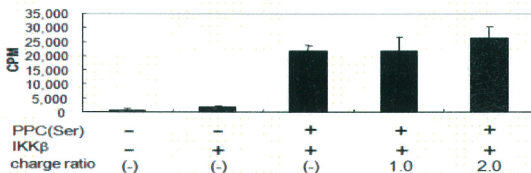


図3. IKKβによる高分子/DNA 複合体のリン酸化

### (3) 培養細胞での機能解析

研究協力者：黒田俊一教授より糖鎖リガンド標識バイオナノカプセルの分与を受け、A549 および Huvec 細胞を用いて IL-1β刺激により細胞表面に発現する E-セレクトインのアクティブターゲティングについて検討した。IL-1β刺激により E-セレクトインの発現が誘導されることを real-time RT PCR 法およびウエスタンブロット法により確認した。バイオナノカプセルでのレポーター遺伝子の送達および形質転換は認められたものの、調製したポリプレックスと組み合わせると形質転換は全く認められなかった。また、MH7A 細胞を用いて調製したポリマーが炎症性刺激に反応してレポーター遺伝子を発現するかを調べたが、発現は認められなかった。原因究明のためローダミン標識したバイオナノカプセルとフルオレセイン標識したプラスミドを用いて細胞への送達を調べたところ、バイオナノカプセル-プラスミド-高分子複合体の細胞表面への集積は認められた。これらの結果は、E-セレクトインのアクティブターゲ

ティングによって、複合体の細胞表面への送達・集積はできているものの、細胞内への移行過程が十分ではないことを示唆した。

一方、プラスミド DNA に治療用遺伝子として、IκB-αのドミナントネガティブ体として報告されている IκB-α supper repressor の発現プラスミド、自殺遺伝子として知られるヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ (HSVtk)、シトシンデアミナーゼの発現プラスミド (CD) を設計・構築した。PEG 鎖含有 IKKβ応答性高分子と HSVtk の発現プラスミドによるポリプレックスを調製して A549 細胞への形質転換後、プロドラッグであるガンシクロビルを添加して細胞殺傷能を MTT アッセイおよび細胞死プロテアーゼ活性測定法により評価した。その結果、自殺遺伝子による細胞殺傷効果は認められたものの、殺傷率は10%未満と低いものであった。ポリマーの細胞内での確かな機能を調べるために、ポリプレックスをマイクロインジェクション法により物理的に細胞内へ導入して調べたところ、種々の炎症性刺激に反応してレポーター遺伝子の発現が認められた (図4)。

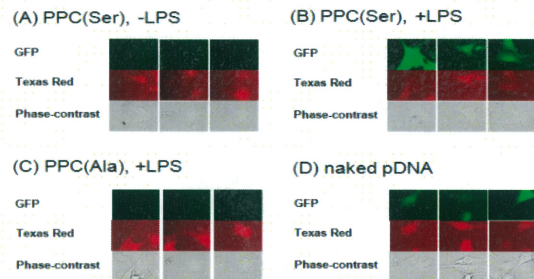


図4. LPS 刺激に応じたレポーター遺伝子発現

また、Real-time PCR で細胞内に導入された DNA 量を定量したところ、細胞内への遺伝子導入の有無は細胞腫によって異なることが判明した。これらの結果は、複合体は導入されかつ発現する細胞、細胞内に導入されるものの遺伝子発現しない細胞、導入すらされない細胞があることを示唆した。そこで、高分子材料の化学合成方法の改変および超音波 (ソノポレーション) による複合体導入に着手した。その結果、高分子主鎖への基質ペプチド導入率を上げること、およびソノポレーション法の併用により複合体の細胞内導入率・遺伝子発現効率が著しく改善されることを見出した。

以上の結果は、調製した高分子は細胞内に効率よく移行すれば機能するものの、細胞導入過程に改良の余地が残されていることを強く示唆し、この問題点の克服が次の課題である。

#### (4) RAモデルラットを用いた機能解析

関節炎誘発モデルマウス DBA/1J の関節腔に高分子/ルシフェラーゼ発現プラスミドのポリプレックスを投与して In Vivo Imager により関節腔に発現するルシフェラーゼ活性を測定した。有意なルシフェラーゼの発現が認められたものの Ala 置換体の陰性高分子のポリプレックスにおいてもルシフェラーゼ活性が発現した (図5)。この結果は、ポリプレックスは関節腔の環境においては、試験管内よりも安定性が求められることを間接的に示唆するものである。この安定性の向上にはポリマー/DNA 比をチューニングすることで克服可能である。また、ペプチド基質導入率の高い高分子材料が、より安定に DNA との複合体形成できることを既に見出している。これらペプチド含量の高い高分子を用いた *in vivo* での評価が今後の検討課題である。

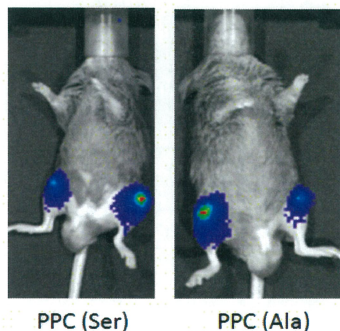


図5. 関節炎ラットにおけるレポーター遺伝子発現

#### 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)

1. Kang, J.H., Oishi, J., Kim, J.H., Ijuin, M., Toita, R., Jun, B., Asai, D., Mori, T., Niidome, T., Tanizawa, K., Kuroda, S., and Katayama, Y.; Hepatoma-targeted gene delivery using a tumor cell-specific gene regulation system combined with a human liver cell-specific bionanocapsule., *Nanomedicine*, in press (査読有)
2. Shoji-Moskowitz, Y., Asai, D., Kodama, K., Katayama, Y., and Nakashima, H.; Progress in current non-viral carriers for gene

delivery., *Frontiers in Medicinal Chemistry*, in press (依頼総説・査読無)

3. Asai, D., Kuramoto, M., Shoji, Y., Kang, J.H., Kodama, B.K., Kawamura, K., Mori, T., Miyoshi, H., Niidome, T., Nakashima, H., and Katayama, Y.; Specific transgene expression in HIV-infected cells using protease-cleavable transcription regulator., *J. Control. Release*, 141, 52-61 (2010) (査読有)
4. Kang, J.H.\*, Asai, D.\*, Toita, R., Kitazaki, H., and Katayama, Y.\* (\*: contributed equally); Plasma protein kinase C (PKC) $\alpha$  as a biomarker for the diagnosis of cancers., *Carcinogenesis*, 30, 1927-1931 (2009) (査読有)
5. Asai, D., Tsuchiya, A., Kang, J.H., Kawamura, K., Oishi, J., Mori, T., Niidome, T., Shoji, Y., Nakashima, H., and Katayama, Y.; Inflammatory cell-specific gene regulation system responding to Ik-B kinase beta activation., *J. Gene Med.*, 11, 624-632 (2009) (査読有)
6. Asai, D., Kang, J.H., Toita, R., Tsuchiya, A., Niidome, T., Nakashima, H., and Katayama, Y.; Regulation of transgene expression in tumor cells by exploiting endogenous intracellular signals., *Nanoscale Res. Lett.*, 4, 229-233 (2009) (査読有)
7. Kang, J.H., Toita, R., Tomiyama, T., Oishi, J., Asai, D., Mori, T., Niidome, T., and Katayama, Y.; Cellular signal-specific peptide substrate is essential for the gene delivery system responding to cellular signals., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 6082-6086 (2009) (査読有)
8. Kawamura, K., Kuramoto, M., Mori, T., Toita, R., Oishi, J., Sato, Y., Kang, J.H., Asai, D., Niidome, T., and Katayama, Y.; Molecular mechanism of caspase-3-induced gene expression of polyplexes formed from polycations grafted with cationic substrate peptides., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 20, 967-980 (2009) (査読有)
9. Kang, J.H., Asai, D., Kim, J.H., Mori, T., Toita, R., Tomiyama, T., Asami, Y., Oishi, J., Sato, Y., Niidome, T., Jun, B., Nakashima, H., and Katayama, Y.; Design of polymeric carriers for cancer-specific gene targeting: Utilization of abnormal protein kinase C $\alpha$  activation in cancer cells., *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 14906-14907 (2008) (査読有)
10. Asai, D., Tokunaga, T., Kondo, K., Kawaguchi, T., Takayanagi, S., Shinmyozu, T., Nakai, M., Yakabe, Y., and Shimohigashi, Y.; Direct measure of fluorescence intensity for efficient receptor-binding assay:

- Conjugates of ethinylcarboxyestradiol and 5( and 6)-carboxyfluorescein via  $\alpha,\omega$ -diaminoalkanes as a tracer for estrogen receptor., *J. Biochem.*, 143, 781-792 (2008) (査読有)
11. Kang, J.H.\* , Asai, D.\*, Yamada, S.\* , Toita, R., Oishi, J., Mori, T., Niidome, T., and Katayama, Y\*. (\*: contributed equally); A short peptide is a protein kinase C (PKC)  $\alpha$ -specific substrate., *Proteomics*, 8, 2006-2011 (2008) (査読有)
  12. Asai, D., Kodama, B.K., Shoji, Y., Nakashima, H., Kawamura, K., Oishi, J., Kuramoto, M., Niidome, T., and Katayama, Y.; Drug delivery system based on responses to an HIV infectious signal., *Med. Chem.*, 4, 386-391 (2008) (査読有)
  13. Asai, D., Nakashima, H.; Disordered cell-specific gene regulation system for suicide gene therapy., *Jpn. J. Chemother.*, 56, 538-542 (2008) (査読有)
  14. Kang, J.H., Kuramoto, M., Tsuchiya, A., Toita, R., Asai, D., Sato, T.Y., Mori, T., Niidome, T., and Katayama, Y.; Correlation between phosphorylation ratios by MALDI-TOF MS analysis and enzyme kinetics., *Eur. J. Mass Spectrom.*, 14, 261-265 (2008) (査読有)
- [学会発表] (計 26 件)  
(筆頭著者のみ記述)
1. Asai, D., Tsuchiya, A., Kang, J.H., Niidome, T., Nakashima, H., and Katayama, Y.; Inflammatory signal-sensing polymer responding to  $\text{I}\kappa\text{-B}$  kinase beta activation., 8<sup>th</sup> International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers (FBPS2009), Mishima (2009. 5. 20-23)
  2. Asai, D., Kuramoto, M., Kang, J.H., Niidome, T., Miyoshi, H., Nakashima, H., and Katayama, Y.; Specific transgene expression in virus-infected cells by a virus protease-cleavable transcription suppressor., BIT Life Sciences' 2<sup>nd</sup> Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2009), Seoul, South Korea (2009. 4. 2-4)
  3. 浅井大輔, 姜貞勲, 三好洋, 片山佳樹, 中島秀喜; 疾患細胞特異的な遺伝子発現制御法の開発-第2報, 第65回神奈川県感染症医学会学術集会、横浜 (2009. 3. 21)
  4. 浅井大輔, 三好洋, 中島秀喜; 抗ウイルス薬開発の新戦略-ウイルス感染細胞特異的な遺伝子発現制御法の創出, 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山 (2008. 10. 26-28)

5. Asai, D., Knag, J.H., Toita, R., Tomiyama, T., Mori, T., Niidome, T., Nakashima, H., and Katayama, Y.; Tumor intracellular signal-targeting by application of specific substrate peptide for protein kinase  $\alpha$ ., 17<sup>th</sup> Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, Sapporo (2008. 8. 26-29)
6. 浅井大輔, 倉本政則, 森健, 新留琢郎, 東海林洋子, 片山佳樹, 中島秀喜; HIV感染シグナルに応答する遺伝子発現制御材料の開発, 第24回日本DDS学会学術集会、東京 (2008. 6. 29-30)

(ほか、共著発表 20 件)

[図書] (計 1 件)

1. 浅井大輔; 疾患細胞選択的な遺伝子発現制御技術の創出と治療への応用 (細胞と対話する技術の創出-薬物を病変細胞でだけ働かせる新しい考え方), *国際科学技術財団研究助成研究内容解説*, 29-30 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Rho-キナーゼの新規基質ペプチド

発明者: 片山佳樹, 姜貞勲, 浅井大輔

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2009-211147

出願年月日: 平成 21 年 9 月

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 蛍光リガンド及び化学物質のアンドロゲン受容体への結合強度測定方法

発明者: 下東康幸, 中井誠, 浅井大輔,

矢可部芳州

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許 第 4180882 号

取得年月日: 平成 20 年 9 月

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ (研究業績等)

<http://www.marianna-u.ac.jp/microbiology/office/003347.html>

[http://www.japanprize.jp/subsidy\\_h20.html](http://www.japanprize.jp/subsidy_h20.html)

国際科学技術財団研究助成

[http://www.japanprize.jp/subsidy\\_h20.html](http://www.japanprize.jp/subsidy_h20.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 大輔 (ASAI DAISUKE)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10423485

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし