

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年9月11日現在

機関番号：14401
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2010～2011
課題番号：22650111
研究課題名（和文） ペルオキシソームのインポート機構を利用した高効率蛋白質デリバリーシステムの開発
研究課題名（英文） Development of a novel protein delivery system using peroxisomes
研究代表者
谷澤 克行（TANIZAWA KATSUYUKI）
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：20133134

研究成果の概要（和文）：本研究では、半中空化したペルオキシソームに細胞内で目的タンパク質を高効率に濃縮した後、細胞からペルオキシソームを高純度に分離精製する手法を確立した。また、精製ペルオキシソーム表面に特異抗体を提示させることで、標的細胞特異的に内包タンパク質をデリバリーできることを明らかにした。さらに、Fabry病の治療用タンパク質内包ペルオキシソームを用い、治療標的部位であるリソソームへの同タンパク質のデリバリーに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a novel protein delivery system using peroxisome and the peroxisomal protein import system as a protein delivery carrier and a protein concentrator, respectively. First, we established an affinity purification method for highly purified peroxisomes in which the target protein had been efficiently imported intracellularly. Next, we developed an efficient method to display specific antibodies onto the surface of the purified peroxisomes and utilized it to an antibody-dependent and functional delivery of the target protein encapsulated in the peroxisomes. Finally, we successfully demonstrated that α -galactosidase A, a therapeutic protein agent for Fabry disease, could be efficiently delivered into the target lysosomes by using this novel protein delivery system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	0	2,200,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,000,000	240,000	3,240,000

研究代表者の専門分野：生化学、構造生物学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：タンパク質送達システム、細胞生物学、ペルオキシソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

次世代の高分子医薬品として注目されているタンパク質製剤は、タンパク質本来の生理活性に基づく優れた薬効が期待できるも

の、細胞内部への送達が困難なため薬効発現が限られている。さらに、そのままの形状では生体内でプロテアーゼ等による分解を受け易く、医薬品化が困難となる場合が多い。このプロテアーゼによる分解を防ぐため、近

年 Drug Delivery System (DDS) の技術を用い、タンパク質をリポソームやポリマーなどのキャリア担体で包み、安定化させて治療部位へ送達する技術が国内外で検討されている。しかしながら、封入できるタンパク質が限定されることや、有機溶剤の混入が避けられないこと、さらにタンパク質の封入効率が低く（重量比で数%）、デリバリー効率が不十分であることが大きな問題となっている。

(2) 着想に至った経緯

申請者らはこれまでに、独自に開発したヒトB型肝炎ウイルスの外披タンパク質から成る中空ナノ粒子「バイオナノカプセル (BNC)」を用い、世界初のヒト肝臓特異的 DDS を開発した (Yamada et al., 2003)。さらに近年、リポソームと BNC の融合法による高効率デリバリー法を考案し (Jung et al., 2006)、タンパク質製剤のリポソームへの封入法の開発を進めている。このような中、申請者はリポソームと同様の脂質二重膜構造を有する細胞内小器官 (オルガネラ) の一つであるペルオキシソーム (PS) のタンパク質インポート機構に着目し、細胞内に発現させた治療用タンパク質を人工的に中空化した PS へ特異的にインポートさせることによって高純度に濃縮後、細胞から分離精製することによって、高濃度タンパク質内包カプセルとして利用できると着想した。さらに、PS 膜上のタンパク質の遺伝子を組み換えることによって、高度な標的細胞特異性、細胞侵入能、膜融合能を付与することが可能であり、これまで不可能であった細胞内分子を標的とする全く新しい作用機序を持つタンパク質製剤の創製に繋がると着想し、研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、これまで不可能であった高濃度のタンパク質製剤を標的細胞内部への送達を可能にするため、全く異なる2つの技術、すなわち細胞生物学のタンパク質インポート技術と DDS のデリバリー技術を融合させることにより、革新的なタンパク質デリバリーシステムの創製を目的としている。

(2) 本研究で申請者は、本技術によるタンパク質デリバリー法の特許出願に必要なデータを取得することを目標としている。具体的には、①PS の中空化技術の確立、②治療用タンパク質の特異的インポート技術の開発、③PS への内包率の算出、④培養細胞を用いた機能評価、を行ない、本手法による高効率タンパク質デリバリー手法の基盤技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) PS の高純度精製法

ヒト腎臓由来 HEK293 細胞をショ糖等張緩衝液中でホモジナイズし、除核画分より重ミトコンドリア画分を除去して得られた軽ミトコンドリア画分+マイクロソーム画分を、ビオチン化抗 peroxisome membrane protein 70 (PMP70) 抗体とインキュベートし、単鎖アビジン標識磁気ビーズによって特異的に捕捉した。ビーズを洗浄後、100 mM ビオチンで PS を溶出した。限外濾過により PS 画分のバッファー交換を行い、遊離ビオチンを完全に除去した。

PS 画分と除核画分を用いて、各オルガネラのマーカー酵素 (catalase: peroxisome, NADPH cytochrome c reductase: microsome, succinate dehydrogenase: mitochondria, β -galactosidase: lysosome, acid phosphatase: cytosol) の酵素活性を常法に従って測定し、タンパク質濃度より比活性を算出し、PS 画分の純度を算出した。

(2) shRNA を用いた PEX5 遺伝子サイレンシングによる PS の中空化法

PEX5 特異的な shRNA 発現レンチウイルスベクターを標的配列が異なる3種類構築した (si-5A~5C)。HEK293 細胞を用い、構築したウイルスベクターによる PEX5 のノックダウン効果を、蛍光免疫染色法、ウエスタンブロット法、定量的 RT-PCR 法により検証した。

次に、PEX5 特異的 shRNA 安定発現細胞より樹立した HEK293-PEX5KO 細胞にモデル PTS2 タンパク質 (PTS2-luciferase) を一過性に過剰発現し、上記方法で PS を分離精製後、PS 画分における luciferase 活性を測定し、比活性を算出した。さらに、抗 luciferase 抗体で蛍光免疫染色を行い、PTS2-luciferase の細胞内局在を形態学的に解析した。

(3) shRNA を用いた PEX7 遺伝子サイレンシングによる PS の中空化法

PEX7 特異的な shRNA 発現レンチウイルスベクターを標的配列が異なる3種類構築した (si-7A~7C)。HEK293 細胞を用い、構築したウイルスベクターによる PEX7 のノックダウン効果を上記と同様な方法により検証した。

次に、PEX7 特異的 shRNA 安定発現株より樹立した HEK293-PEX7KO 細胞にモデル PTS1 タンパク質 (luciferase-SKL) を一過性に過剰発現し、上記方法で PS を分離精製後、PS 画分における luciferase 活性を測定し、比活性を算出した。さらに、luciferase の標準精製標品を用いた比活性測定より PS 画分に於ける luciferase-SKL のタンパク質量を算出した。また、抗 luciferase 抗体で蛍光免疫染色を行い、luciferase-SKL の細胞内局在を形態学的に解析した。

(4) 精製 PS の物性評価

精製 PS の粒子径と ζ 電位を動的光散乱法により測定した。また、luciferase-SKL が PS 膜内に内包されていることを検証するため、プロテアーゼプロテクションアッセイを行った。10 μg の精製 PS を氷上で 30 分間 0.1% トリプシンとインキュベートした後、過剰のトリプシンインヒビターを添加し反応を停止した。抗 luciferase 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、luciferase-SKL の分解の有無を評価した。コントロールとして、1% Triton X-100 の有無の条件で同様に精製 PS を処理した。

(5) 精製 PS への特異抗体の付加と抗体特異的標的化法

精製 PS 表面にビオチン標識抗 PMP70 抗体が結合していることを利用し、アビジンを介して特異抗体を付加することを検討した。特異抗体のモデルとして抗ヒト HB-EGF 抗体を用い、ビオチン標識抗 HB-EGF 抗体と NeutrAvidin を 2 : 1 のモル比で混合し、抗 HB-EGF 抗体-アビジン複合体を作成した。次に、この複合体を精製 PS とインキュベートした後、反応溶液をビオチンセファロースビーズとインキュベートし、未反応の抗 HB-EGF 抗体-NeutrAvidin 複合体を沈降除去することで、抗 HB-EGF 抗体提示 PS を作成した。細胞への標的化実験には、蛍光標識 NeutrAvidin を用い、同様に複合体を作成した。

カバーガラスに播種したヒト HB-EGF 発現 Vero 細胞と抗 HB-EGF 抗体提示蛍光標識 PS を氷上でインキュベートし、HB-EGF 特異的 PS の細胞への結合能を評価した。

(6) 分割ルシフェラーゼ内包 PS によるタンパク質デリバリー

2 分割型 luciferase (N-Luc, C-Luc) の C 末側 C-Luc の C 末端に PTS1 シグナルを付加した C-Luc-SKL タンパク質を HEK293-PEX7KO 細胞に一過性に過剰発現させ、上記方法で PS を分離精製した。PS 表面に上記方法で抗 HB-EGF 抗体を付加し、C-Luc-SKL 内包抗 HB-EGF 提示 PS を作成した。この PS と N-Luc およびヒト HB-EGF を安定発現した Vero 細胞とを 5% CO₂, 37 °C で様々な時間インキュベートした後、培地に D-luciferin を直接添加し、ルミノメーターにより luciferase 活性を測定した。

(7) α-galactosidase 内包 PS によるリソソームへのタンパク質デリバリー

α-galactosidase を HEK293-PEX7KO 細胞に一過性に過剰発現させた後、上記方法で PS を分離精製した。PS 表面に蛍光標識 NeutrAvidin を介して抗 HB-EGF 抗体を付加し、α-galactosidase 内包蛍光標識抗 HB-EGF

提示 PS を調製した。PS 中の α-galactosidase 活性は、ONP α-galactopyranoside を基質として 410 nm の吸光測定で酵素活性を測定した。

次に、この PS と HB-EGF 発現 Vero 細胞とを 5% CO₂, 37 °C で様々な時間インキュベートした後固定し、リソソームマーカー Lamp2 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。次に、内在性の α-galactosidase を siRNA によってノックダウンした HB-EGF 発現 Vero 細胞と様々な時間インキュベートした後細胞を回収し、可溶化上清の α-galactosidase 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) PS の高純度精製法の開発

ビオチン標識抗 PMP70 抗体と、ビオチンにより溶出可能な単鎖アビジンを利用して精製した PS 画分を用い、各オルガネラのマーカー酵素の酵素活性を測定した結果、本精製法で得られた PS 画分は catalase の比活性で 92% 以上の極めて高濃度の PS が濃縮されていることが明らかとなった。さらに、この PS 画分に含まれる他のオルガネラのマーカー酵素比活性は何れも 6% 以下であり、極めて高純度の PS が精製可能であることが明らかとなった (表 1)。

表 1 精製 PS 画分の純度測定

fraction	Enzyme content (% of PNS)				
	Catalase	SDH	NADH-cyt c reductase	Acid phosphatase	Luciferase-SKL
H Mito	5.8 ± 3.3	55.3 ± 9.3	8.1 ± 1.3	28.5 ± 1.3	1.1 ± 0.9
IP(PS)	93.2 ± 3.9	4.1 ± 1.3	2.1 ± 0.7	3.7 ± 2.1	94.66 ± 9.2
Sup	1.2 ± 0.1	37.7 ± 4.9	88.3 ± 6.3	67.7 ± 4.9	6.1 ± 0.3

(2) shRNA を用いた PEX5 遺伝子サイレンシングによる PS の中空化技術の開発

PEX5 特異的 shRNA 発現レンチウイルスを HEK293 細胞へ感染させた結果、si-5A~5C のそれぞれ単独では十分なノックダウン効果が得られなかったが、3 種のウイルスを同時に感染させることで、PEX5 が検出限界以下に低下することが明らかとなった。この細胞を株化し、HEK293-PEX5KO 細胞を樹立した。

この細胞の内在性 PTS1 タンパク質の細胞内局在を、蛍光免疫染色によって検討したところ、PS へインポートされていないことが明らかとなった (図 1)。

次に、この細胞に PTS2-luciferase を過剰発現させ、PS 画分における luciferase の比活性を測定した結果、PTS2-luciferase 由来の活性は極めて低いことが明らかとなった。また、この細胞を抗 luciferase 抗体で蛍光免疫染色したところ、PTS2-luciferase は PS へ殆どインポートされておらず、PEX5 のノックダウンによって、PTS2 経路のインポートが何らか

の障害を受けたものと考えられた。

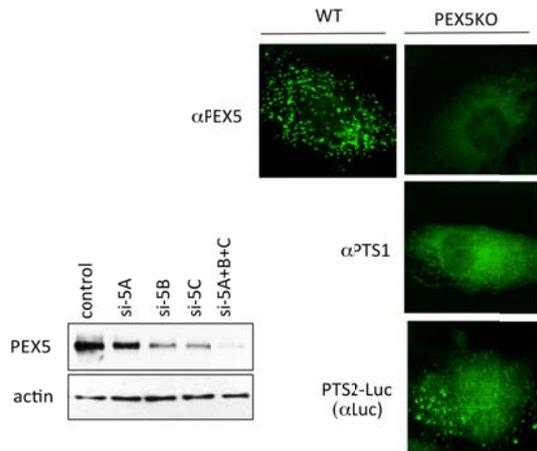


図1 PEX5KO細胞の性状解析

以上のことから、PEX5のノックダウンによるPTS1経路の遮断と、全PTS2タンパク質(4種)のノックダウン及びPTS2経路による目的タンパク質のインポートという当初予定の計画が困難と判断した。そのため、次にPEX7のノックダウンによるPTS2経路の遮断と、PTS1経路による目的タンパク質のインポートを検討した。

(3) shRNAを用いたPEX7遺伝子サイレンシングによるPSの中空化技術の開発

PEX7特異的shRNA発現レンチウイルスをHEK293細胞へ感染させた結果、si-7A~7Cのそれぞれ単独で十分なノックダウン効果が得られ、PEX7タンパク質およびmRNAが検出限界以下に減少することが明らかとなった。この細胞を株化し、HEK293-PEX7KO細胞を樹立した。

この細胞の内在性PTS2タンパク質の細胞内局在を検討したところ、PSへインポートされていないことが明らかとなった(図2)。

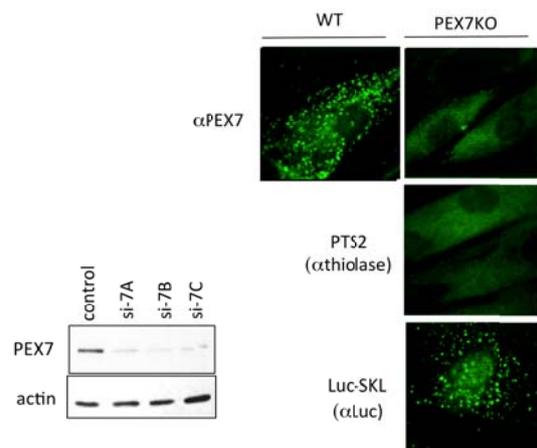


図2 PEX7KO細胞の性状解析

次に、この細胞にluciferase-SKLを一過性に過剰発現させ、PS画分におけるluciferase

の比活性を測定した結果、PS画分におけるluciferase活性は比活性でPNS画分の90%以上と極めて高く、高純度にluciferase-SKLタンパク質が濃縮されていることが明らかとなった。また、luciferase標準精製標品を用いた酵素活性測定から、精製PSにおけるluciferase-SKLタンパク質の含有率は $62 \pm 4.9\%$ と算出された。

(4) 精製PSの物性評価

精製PSの粒子径と ζ 電位を動的光散乱法により測定した。その結果、粒子径と ζ 電位の平均値は、それぞれ約 $1.5 \mu\text{m}$ と $-0.5 \pm 0.13 \text{ mV}$ であることが明らかとなった(図3)。

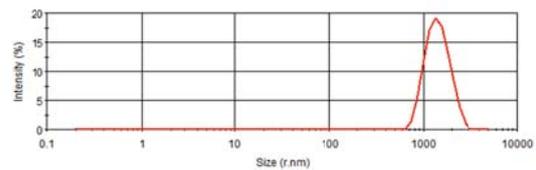


図3 精製PSの粒子径

次に、luciferase-SKL内包PSを用いて、プロテアーゼプロテクションアッセイを行った。その結果、1% Triton X-100非存在下では、luciferase-SKLはトリプシンによる消化を受けないことが明らかとなった。一方、1% Triton X-100存在下では、30分の処理でluciferase-SKLが完全に消化された。以上の結果から、luciferase-SKLはPSの膜内に内包されていることが実証された(図4)。



図4 プロテアーゼプロテクションアッセイ

(5) 精製PSへの特異抗体の付加と抗体特異的標的化技術の開発

精製PSにNeutrAvidinを介して抗HB-EGF抗体を付加し、抗HB-EGF抗体提示PSを作成した。抗HB-EGF抗体提示PSの粒子径と ζ 電位を動的光散乱法により測定した結果、抗体付加前の精製PSと比較し、粒子径は殆ど変化なく単一ピークであること、 ζ 電位は $-0.7 \pm 0.43 \text{ mV}$ と若干負になることが明らかとなった(図5)。

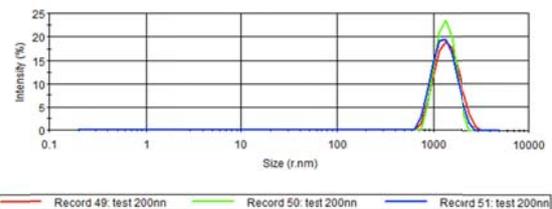


図5 抗体修飾PSの粒子径

次に、抗 HB-EGF 抗体提示 PS の抗体特異性を評価するため、luciferase-SKL 内包 PS に抗 HB-EGF 抗体を付加し、HB-EGF 発現 Vero 細胞と氷上でインキュベートした。蛍光免疫染色の結果、内包する luciferase-SKL は、HB-EGF の発現依存的に細胞表面に集積し、HB-EGF 抗体依存的にデリバリーされていることが明らかとなった (図 6)。

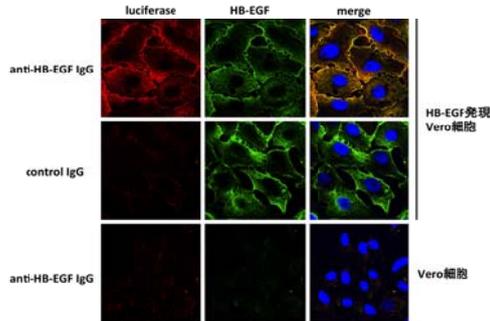


図 6 抗体提示 PS による luciferase のデリバリー

(6) 分割ルシフェラーゼ内包 PS によるタンパク質デリバリー

分割型 luciferase (C-Luc) の C 末端に PTS1 シグナルを付加した C-Luc-SKL タンパク質を内包する PS を精製後、抗 HB-EGF 抗体を付加し、C-Luc-SKL 内包抗 HB-EGF 提示 PS を作成した。この精製 PS を、分割型 luciferase (N-Luc) および HB-EGF 発現 Vero 細胞と 5% CO₂, 37 °C で様々な時間インキュベートした後 luciferase 活性を測定した。その結果、16 時間以上のインキュベーションによって、有意なルシフェラーゼ活性が確認された。また、luciferase 活性はその後 36 時間まで上昇し、48 時間以降も活性を維持することが明らかとなった (図 7)。

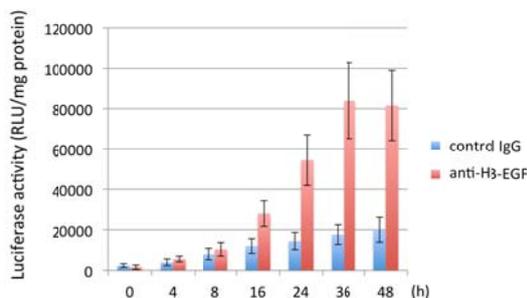


図 7 分割ルシフェラーゼアッセイ

次に、同様に C-Luc-SKL 内包 PS を、N-Luc および HB-EGF 発現 Vero 細胞と様々な時間インキュベートした後に細胞を 4% PFA で固定し、C-Luc-SKL 断片を認識する抗 luciferase 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、添加 8 時間後から C-Luc-SKL の多くは細

胞内へ取り込まれ、エンドソームマーカである EEA1 と共局在することが明らかとなった。また 16 時間後からは、リソソームマーカである LAMP2 と共局在し、ごく一部が細胞質に局在することが判明した (図 8)。

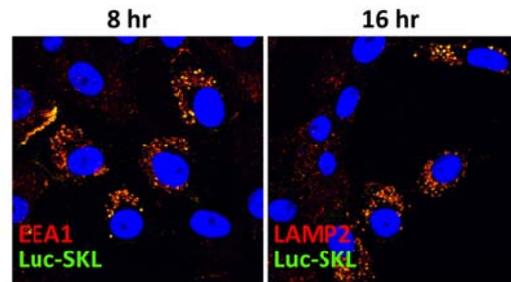


図 8 Luciferase-SKL の細胞内局在

以上の結果から、PS によって送達された C-Luc-SKL タンパク質は、一部細胞質へ移行し N-Luc と複合体を形成することで luciferase 活性を示すが、多くはエンドソームやリソソーム内に留まっていると考えられた。

今後、PS に内包したタンパク質を効率よく標的細胞の細胞質へデリバリーするため、PS 表面へ pH 依存性の膜透過ペプチド HA2(E5L) 等を付加することを検討する予定である。

(7) ヒト α -galactosidase A 内包 PS によるリソソームへのタンパク質デリバリー

Fabry 病は、 α -galactosidase A の活性低下又は遺伝的欠損によって globotriaosylceramide (GL-3) が全身の臓器・組織に進行性に異常蓄積し、心臓を初めとする多臓器障害を引き起こす。治療法としては、 α -galactosidase の静脈内投与による酵素補充療法が行われているが、送達効率が低く極めて大量の酵素が必要となることが問題となっている。このことから、PS によって α -galactosidase A をリソソーム内へ高効率に送達できれば、Fabry 病の画期的な治療法となると期待される。

N 末端に influenza hemagglutinin (HA) タグ、C 末端に PS 標的 SKL シグナルを付加した HA- α -galactosidase A-SKL を内包する PS を精製し、 α -galactosidase 活性を測定した。その結果、PS 画分における α -galactosidase の比活性は PNS の 80%以上と極めて高く、高純度に α -galactosidase A が濃縮されていることが明らかとなった。また、 α -galactosidase A 標準精製標品を用いた酵素活性測定から、PS 画分における α -galactosidase A のタンパク質含有量は約 $52 \pm 8.3\%$ と算出された。

次に、この精製 PS の表面に抗 HB-EGF 抗体を付加し、 α -galactosidase 内包抗 HB-EGF 抗体提示 PS を作成した。これを HB-EGF 発現 Vero 細胞の培地へ添加し、5% CO₂, 37 °C で様々な時間インキュベートした後固定し、リソソームマーカ LAMP2 および HA に対

する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った結果、添加後18時間以降よりHA- α -galactosidase A-SKLがLAMP2と共局在し、リソソームへ集積化することが明らかとなった(図9)。またこの共局在は、添加72時間後も持続した。さらに、細胞内の α -galactosidase活性を、HA- α -galactosidase A-SKL内包PSの添加8, 16, 24, 48, 72時間後に測定した。その結果、添加後8時間から α -galactosidase活性が有意に上昇し、24時間後に最大となった後、72時間まで高い活性が持続することが明らかとなった(図9)。

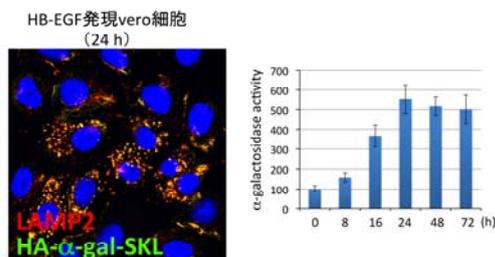


図9 PSによる α -galactosidaseのリソソームへのデリバリー

今後は、本方法によるFabry病への治療効果を明らかにするため、患者由来繊維芽細胞を用い、 α -galactosidase Aの欠損によって細胞内に蓄積した内在性スフィンゴ糖脂質が、本研究で開発したPSによる α -galactosidase Aのリソソームへのデリバリーにより減少するか否かについて検討する予定である。

本研究により、PSのタンパク質インポート機構を利用したタンパク質デリバリーシステムの技術基盤を確立することに成功した。インポート効率の問題から、PSの完全中空化は困難であったが、①目的タンパク質を重量比で約60%内包するPSを高純度(約90%)に精製する技術を確立するとともに、②特異的抗体をPS表面へ付加し、抗体依存的なPSの集積化と内包するタンパク質デリバリー技術を確立した。またこれらの技術を用いることにより、Fabry病の治療タンパク質である α -galactosidase Aを治療標的部位であるリソソームへ高効率にデリバリーすることに成功しており、本研究によって開発したタンパク質デリバリー技術が新たな治療法となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① M. Yamada, A. Oeda, J. Jung, M. Iijima, N. Yoshimoto, T. Niimi, S.-Y. Jeong, E.K. Choi,

K. Tanizawa, and S. Kuroda, Hepatitis B Virus Envelope L Protein-Derived Bio-Nanocapsules: Mechanisms of Cellular Attachment and Entry into Human Hepatic Cells, *Journal of Controlled Release*, 査読有, 160, 322-329 (2012).

DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.11.004

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷澤 克行 (TANIZAWA KATSUYUKI)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号: 20133134

(2) 研究分担者

松崎 高志 (MATSUZAKI TAKASHI)

大阪大学・医学研究科・特任研究員

研究者番号: 90456939