

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650255

研究課題名(和文) コラーゲン誘導体を用いた全身転移ガン細胞標的核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Development of nucleic acid medicines targeted to generally metastasized cancer cells using collagen derivatives

研究代表者

小田 和司 (Oda, Kazushi)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・助教

研究者番号：30293400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円、(間接経費) 330,000円

研究成果の概要(和文)：正に帯電するよう酸処理したりさらに化学修飾したコラーゲンを調製したサンプルを用いてヒト由来培養細胞の形質転換効率の変化を調べた。各種コラーゲン試料単独では十分な形質転換効率の上昇は得られず、添加物質を少しずつ変えながら実験を繰り返し、最適条件を探った。およそ10%程度形質転換効率が増したが、実用化に十分とは言えなかった。経口投与を想定して平均10数アミノ酸のペプチドにした試料を調整したが、それでも形質転換効率が大きく上昇することはなかった。

研究成果の概要(英文)：Cationated collagen by acid treatment or by chemical modification is analyzed in transformation efficiency using cultured cells. Several derivatives of collagen alone did not show raise of transformation efficiency. Several additives are tested and optimal condition are elucidated. Around 10% raise in efficiency of transformation. Although 10 to 20 amino acid peptides for oral dose are tested for transformation, no samples showed outstanding raise in transformation efficiency.

研究分野：生物物理学、分子生物学

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：ナノバイオロジー ナノメディスン ガン細胞標的核酸試薬

### 1. 研究開始当初の背景

元来+にチャージしているアテロコラーゲンをを用いた形質転換効率の向上現象は既に一部論文にまとめられ報告されていた。また、GFP に人工的に+チャージを導入したタンパク質を用いると効率よく改変 GFP が細胞に取り込まれることが報告されていた。このように+にチャージしていることが鍵になると予想され、細胞内にタンパク質が取り込まれる現象は+チャージによるエンドサイトシス説が有力視されているが、アテロコラーゲンの場合も同様な機構によるのかははっきりしていなかった。

また、毒性を無視した研究用試薬としてはリポフェクトアミンやその改良試薬が非常に高い形質転換効率を示し、市販されているが、臨床医療として適用可能な毒性の低い高効率形質転換薬剤は未開発であった。

さらに、臨床応用するにあたり、経口投与や注射など患者の身体に軽い負担の薬剤の開発が望まれていた。

そこで、元々体内に存在するコラーゲンやその誘導体を調べれば臨床医療として適用可能な毒性の低い高効率形質転換薬剤の開発が期待できた。

### 2. 研究の目的

アテロコラーゲンは、コラーゲン分子の中の種特異的な両端部をタンパク質分解酵素で切除したタンパク性高分子で、当初、細胞接着因子として新田ゼラチン社により製品化された。+チャージを持っていて抗原性が低いという特徴があり、これは臨床応用可能な医用素材で、遺伝子治療に向け応用可能である点は大いに注目すべきである。

そこで、コラーゲン由来の誘導体を改良・最適化することで導入効率を上げることは十分可能と期待できる。また、アテロコラーゲンの注目すべき効果として siRNA の導入効率の向上にも効果があることがわかっている。

siRNA はガン治療に効果があることが示され、現在最も注目されている核酸医薬の一つである。しかし、まだ効率の良い導入方法が確立されておらず、また、全身の標的臓器に効率良く導入する方法がないことが最も大きな障害になっている。

有効な治療手段のない全身に転移してしまったガン細胞をひとつ残らずロックアウトするドラッグデリバリーシステムの基盤整備が本研究の意義である。そのためにまず導入効率を最適化したコラーゲン由来の誘導体を同定する。本研究は、本学の塚原俊文教授と連携・協力しながら行った。われわれは、アテロコラーゲンを開発し製品化に成功した新田ゼラチン社と秘密保持契約を結んで共同研究を開始しており、精製段階の異なるさまざまなコラーゲンや化学修飾したコラーゲン由来の試料提供を受け、これらの中から遺伝子導入に最適な試料を探索した。すでに知られているアテロコラーゲンよりも形質転換効率のよいコラーゲン誘導体を見つけている。さらに、使用するコラーゲン誘導体はいったん加熱してゲル化した試料でも形質転換効率向上活性を保持している事実をつかんだ。このことは加熱滅菌しても形質転換活性が失われないことを意味しており、ドラッグデリバリーシステムで臨床応用する際に有利になる可能性があった。ナノパーティクルと呼ばれる直径がナノメートルサイズの固体はガン細胞に特異的に取り込まれることが既に知られているが、コラーゲン誘導体に siRNA を混合し、いったん加熱してゲル化した試料をナノパーティクルに加工すればガン細胞に特異的に siRNA を取り込ませることが可能になると期待できた。本研究の目的は全身に転移したガン細胞を標的とする核酸医薬ドラッグデリバリーシステムの基盤技術開発である。

### 3. 研究の方法

新田ゼラチン社から 10 数種の試料が提供

され、それらについて解析した。

アテロコラーゲンをを用いた核酸導入現象は導入する核酸試料やアテロコラーゲン試料の種類に関わらず、核酸試料の導入原理は同じであると推定される。そこでまず各種精製コラーゲン誘導体を用いて最も形質転換効率が良い細胞種の選択を行った。GFP 遺伝子を入れたプラスミドを選択マーカーとして NIH3T3 細胞、HEK293 細胞、神経に分化可能な P19 細胞、初代培養細胞を用いて各種精製コラーゲン誘導体を添加した状態で形質転換効率を調べたところ、HEK293 細胞が最も効率がよいことがわかった。また、既に提供された試料を解析したところ、アテロコラーゲンよりも導入効率が有意に高い試料が見出された。当面は HEK293 細胞を用いて最適なコラーゲン誘導体の探索をおこない、再び形質転換効率の低い細胞について形質転換効率の向上がみられるか調査した。

また、提供されたコラーゲン試料については試料をいったん加熱し、ゲル化しても十分な形質転換効率の向上があることが確認された。

新田ゼラチン社から提供されるコラーゲン試料は、さまざまな誘導体があり、それぞれについて精製度も異なった試料がある。また、それらについて化学修飾をほどこすことも可能である。そこでこれらの中でもっとも導入効率の良いコラーゲン試料を、HEK293 細胞を用いて検索した。もしここで精製度が高くない試料で高い形質転換効率を得られたものがあれば、その試料を分離精製し同定する。また、精製されたコラーゲン試料については限定分解してカラムクロマトグラフィーで分画し、各成分について導入効率を調べた。また一方、荷電が変化するように官能基を導入して核酸導入効率を調べた。

また、経口投与を想定して平均 10 数アミノ酸のペプチドにした試料を調整してこれについても調べた。もし、これで実用化できる

場合、コラーゲン試料を経口投与し、核酸試薬を注射すれば、血流中の物質を取り込みやすいガン細胞に集中して薬剤を取り込ませることが期待された。

#### 4 . 研究成果

新田ゼラチン社の協力を得て、正に荷電が変化するように酸処理したりさらにカチオン化修飾したコラーゲンを調製した試料を用いて HEK 細胞の形質転換効率の変化を調べた。各種コラーゲン試料単独では十分な形質転換効率の上昇は得られず、添加物質を少しずつ変えながら実験を繰り返し、最適条件を探った。およそ 10%程度形質転換効率が上昇したが、結局、画像解析装置を用いて自動的に形質転換効率を測定可能なレベルにまで形質転換による発光効率を上昇させることに成功しなかった。

また、新田ゼラチン社の協力を得てコラーゲン試料を限定分解し、平均 10 数アミノ酸のペプチドにした試料を調整してもらい、試験した。これは経口投与を想定した試料調整であったが、それでも形質転換効率が大きく上昇することはなかった。

当初の計画が期待に沿って形質転換効率を上昇させれば実用化も可能であったが、期待したほど形質転換効率を上げることができず、新規性のある発見に乏しい成果しかえられなかったため、不本意ながら成果の発表は見送らざるを得なかった。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小田 和司 (ODA KAZUSHI)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアル

サイエンス研究科・助教

研究者番号：30293400

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

塚原俊文 (TSUKAHARA TOSHI FUMI)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアル

サイエンス研究科・教授

研究者番号： 60207339