

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：20011~2012

課題番号：23650290

研究課題名（和文）トリプルセキュリティシステムによる超細胞特異的遺伝子送達システム

研究課題名（英文）Super cell-specific gene delivery system using triple securities

研究代表者

片山 佳樹 (KATAYAMA YOSHIKI)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：70284528

研究成果の概要（和文）：

遺伝子送達システムにおける標的疾患細胞に対する特異性を多重セキュリティシステムによって高めること目標とした。具体的にはポリエチレンイミン主鎖にシグナル応答性ペプチドを導入し、疎水相互基も導入したキャリアを開発し、大きく細胞標的シグナル応答性を向上させることに成功した。さらに、血中での安定性を高めるために、PEG鎖をがん組織周辺でのpH低下に応答して切除できるように組み込むことで、正常細胞条件に比して1300倍という極めて高い遺伝子発現の活性化を実現できた。

研究成果の概要（英文）：

In this research, we attempted to improve cell specificity of gene delivery system with multiple securities. Thus, cationic polyethyleneimine and hydrophobic chain were introduced into our previously developed intracellular signal-responsive gene carrier. The carrier improved cancer cell specificity dramatically. Then, PEG chains were also incorporated into the carrier with pH-labile manner to stabilize the polyplex with DNA in blood circulation. Obtained carrier realized 1300 times activation in cancer cell against normal cell condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

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：遺伝子送達、DDS、遺伝子治療、がん、プロテインキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、がんなどの有望な治療法であるが、正常臓器や正常細胞での副作用により、その実用が大きく阻まれており、しかも、現行の遺伝子送達システムはその問題を解決できていなかった。この問題は、遺伝子治療そのものにあるというよりも、がん細胞特異的に遺伝子送達ができないという部分に問題があった。一方、がんの特異性を持たせて遺伝子を送達する研究は、がん細胞への蓄積の

みに主眼が置かれており、その戦略のみではこれ以上の特異性を実現するのは困難な状況であった。そのため、細胞特異性を高度に確保できる新規な戦略の創製が望まれていた。

2. 研究の目的

上述の問題を解決するために、がん単純に遺伝子を蓄積させるだけではなく、従来のEPR効果を利用したがん部への蓄積に加え、

正常細胞では遺伝子を抑制し、がん細胞でのみ開放する3段階の遺伝子送達戦略を創製することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞内シグナル応答性の付与に対しては、標的キナーゼとして多くのがん細胞で特異的に亢進し、悪性度と強い相関が知られているプロテインキナーゼC α (PKC α)を標的シグナルとし、高分子主鎖にこの酵素に対する特異基質をグラフトしたタイプのキャリアーを設計した。すでに開発していたPKC α 基質配列の末端をアジド化し、アセチレン基を導入したポリエチレンイミンに側鎖としてクリック反応により導入した。さらに、遺伝子との複合体安定化のために、疎水結合を利用することを考え、基質ペプチドとポリエチレンイミン主鎖の間にアルキル鎖を介して分子も合成した。さらに、血中安定化のために、高分子主鎖にPEG鎖を直接種々のモル比で導入したキャリアー、pH感受性の芳香族イミン結合で導入したpH応答型キャリアーを合成した。いずれのキャリアーにおいても、プラスミド遺伝子との複合体を調製後、動的光散乱法により粒径とゼータ電位、血清存在下での安定性を評価した。また、細胞を用いて、細胞内PKC α に応答した遺伝子発現の活性化(シグナル応答性)を評価した。さらに、皮下に種々のがん細胞を移植した担ガンマウスを用いて、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を評価することで、がん細胞特異的な遺伝子発現の活性化を評価した。

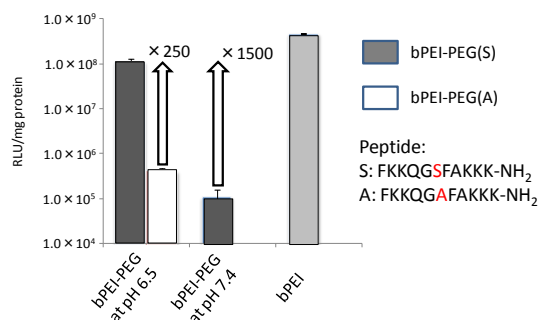
4. 研究成果

導入遺伝子活性化のための標的キナーゼシグナル応答型キャリアーに関しては、主鎖がポリアクリルアミド型のキャリアーをすでに開発していたが、そのシグナル応答性は10倍程度であった。そこでそのシグナル応答性の向上を目指した。これまで主鎖としても強いていた中性のポリアクリルアミド系高分子に対し、さらに遺伝子との相互作用を増強させ、しかも細胞内でポリプレックスのエンドソーム脱出能に優れたポリエチレンイミンを用い、これに基質ペプチドを導入する合成法を考案した。得られた高分子は、種々の荷電比でプラスミドと複合体を形成した場合、ポリアクリルアミド型に比してより強く遺伝子の発現を抑制した。各荷電比でのDNAの凝縮能をエチジウムブロミド追出し法により評価したところ、興味深いことにDNAとの相互作用は主として側鎖のペプチドの正荷電のみが寄与し、主鎖の正荷電は寄与しないことが分かった。さらに種々のがん細胞株でPKC α 応答型キャリアーと、側鎖の基質ペプチド配列のリン酸化部位であるセリン残基をアラニン残基に置換したPKC α 非

応答型キャリアーでの遺伝子発現量を比較し、両者の発現量比をシグナル応答性と定義した。その結果、シグナル応答性は、ポリアクリルアミド型では10倍程度であったのに対し、新型では、細胞内のPKC α 活性に依存して100~1000倍という大きな応答性を実現した。さらに発現量そのものも20倍に増加した。エンドソーム膜のプロトンポンプの阻害剤の投与でエチレンジアミン型では大きく発現量が低下したことから、この優れた性能はエチレンジアミン骨格が有する優れたエンドソーム脱出能に起因することも明らかとなった。

次に、複合体の安定化を図るため、基質とポリエチレンイミンの間に長鎖アルキル基を導入したキャリアーを合成した。これまでのキャリアーでは、複合体はキャリアー/遺伝子間の静電相互作用のみに基づいていたが、このキャリアーではキャリアー分子内、分子間での疎水相互作用がさらに複合体を安定化できると期待された。得られたキャリアーは実際に細胞への複合体取り込み能の向上を示し、アルキル鎖を導入しない場合に比べシグナル応答性も2倍になった。

ただし、複合体のゼータ電位は正であり、この戦略での複合体の安定化では血清タンパクとの相互作用は排除できない。そこで、血中での安定性向上を図り、キャリアーにさらに側鎖としてポリエチレングリコール(PEG)を導入した。複合体は血清中において、PEGの導入量依存的に安定性が向上し、凝集が抑制できた。ところが、遺伝子抑制能を評価したところ、こちらはPEG導入量に依存して低下してしまっただけでなく、これは、PEG鎖の大きなサイズ排除効果により、立体的に遺伝子DNAの凝縮が阻害されたためであると考えられた。すなわち、PEGにより複合体を安定化すると、標的キナーゼ活性の低い正常細胞でも遺伝子が働いてしまうという問題が生じた。そこで、血中ではPEGにより複合体を安定化させ、EPR効果によりがん部へ漏出した際に、がん部におけるpH低下(pH=6.8程度)でPEGが切除される新たなキャリアーを設計・合成した。その結果、正常細胞条件であ



Luciferase expression of pH-sensitive PEGylated carrier system (bPEI-PEG(S) and (A)) in HepG2 cell at different pH.

る pH=7.4 と、がんの条件である pH=6.8 で比較した場合、1,300 倍という大きな遺伝子発現の差を実現した。

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 16 件) すべて査読有

1. S. Kushio, A. Tsuchiya, Y. Nakamura, T. Nobori, C. W. Kim, G. Zhao, D. Funamoto, E. K. Lee, K. Lee, T. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, Cancer-specific gene carriers responding to cancer microenvironment: acidosis and hyper-activated protein kinases, *Biomed. Eng.*, in press
2. S. Shiosaki, T. Nobori, T. Mori, C. W. Kim, T. Yamamoto, T. Niidome, Y. Katayama, A protein kinase assay based on FRET between quantum dots and fluorescently labeled peptides, *Chem. Commun.*, in press
3. J-H. Kang, T. Mori, H. Kitazaki, T. Niidome, Y. Nakanishi, Y. Katayama, Serum protein kinase C-alpha as a diagnostic biomarker of cancers, *Cancer Biomarkers*, in press
4. M. Takeo, T. Mori, T. Niidome, S. Sawada, K. Akiyoshi, Y. Katayama, A polyion complex nanogel, *J. Colloid. Interf. Sci.*, in press
5. Y. Tahara, T. Kaneko, R. Toita, C. Yoshiyama, T. Kitaoka, T. Niidome, Y. Katayama, N. Kamiya, M. Goto, A novel double-coating carrier produced by solid-in-oil and solid-in-water nanodispersion technology for delivery of genes and proteins into cells, *J. Controlled Release*, in press
6. R. Toita, J-H. Kang, T. Tomiyama, C-W. Kim, S. Shiosaki, T. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, Gene carrier showing all-or-none response to cancer cell signaling, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 15410-15417 (2012)
7. R. Toita, T. Mori, Y. Naritomi, J-H Kang, S. Shiosaki, T. Niidome, Y. Katayama, Fluorometric detection of protein kinase Alpha activity based on phosphorylation-induced dissociation of a polyion complex, *Anal. Biochem.*, 424, 130-136 (2012)
8. A. Tsuchiya, Y. Naritomi, S. Kushio, J-H. Kang, M. Murata, M. Hashizume, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Improvement in the colloidal stability of protein kinase-responsive polyplexes by PEG modification, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 100, 1136-1141 (2012)
9. H. Tanaka, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Creating a unique environment for selecting reactive enzymes with DNA: "Sticky" binding of oligocation-grafted polymers to DNA, *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 1346-1353 (2012)

10. A. Tsuchiya, D. Asai, J-H. Kang, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Correlation between phosphorylation ratios by MALDI-TOF MS analysis and radioactivities by radioactive assay, *Anal. Biochem.*, 421(2):773-5 (2012)
11. R. Toita, M. Murata, S. Tabata, K. Abe, S. Narahara, J. Piao, J-H. Kang, M. Hashizume, Development of Human Hepatocellular Carcinoma Cell-Targeted Protein Cages, *Bioconjugate Chemistry*, 23, 1494-1501(2012)
12. H. Koga, R. Toita, T. Mori, T. Tomiyama, J-H. Kang, T. Niidome, Y. Katayama, Fluorescent nanoparticles consisting of lipopeptides and fluorescein-modified polyanions for monitoring of protein kinase activity, *Bioconjugate Chem.*, 22, 1526-1534 (2011)
13. J-H. Kang, D. Asai, A. Tsuchiya, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Peptide substrates for Rho-associated kinase 2 (Rho-kinase 2/ROCK2), *PLoS ONE*, 6, e22699 (2011)
14. T. Tomiyama, R. Toita, J-H. Kang, H. Koga, S. Shiosaki, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Effect of the introduction of chondroitin sulfate into polymer-peptide conjugate responding to intracellular signals, *Nanoscale Res. Lett.*, 6, 532 (2011)
15. S. Shiosaki, M. Kuramoto, R. Toita, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, A hydrophilic polymer grafted with a histone tail peptide represents an artificial gene regulator activated by a histone acetyltransferase, *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 4101-41405 (2011)
16. A. Tsuchiya, J-H. Kang, D. Asai, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Transgene regulation system responding to Rho associated coiled-coil kinase (ROCK) activation, *J. Controlled Release*, 155, 40-46 (2011)

[学会発表] (計 26 件)

1. 片山佳樹、日本学術振興会・分子ナノテクノロジー第 174 委員会 研究会. ペプチド/高分子材料を用いる疾患特異的医療システムの創製. (東京) 2012 年 12 月 14 日
2. 片山佳樹、第 35 回日本分子生物学会年会. 創薬及び診断のためのキヌーム解析用ペプチド・プロテインアレイ. (福岡市) 2012 年 12 月 11-13 日
3. 片山佳樹、福岡新テクノロジー創成シンポジウム. 創薬・診断・リスク評価のための細胞機能評価用バイオチップ. (福岡市) 2012 年 11 月 27 日
4. Yoshiki Katayama, The 1st International Symposium on Application of Biomolecular Devices for Sustainable Functional Materials. Novel Cell Signal-responsive Polyplexes for Improved Colloidal Stability and Cell

- Specificity in Gene Delivery. (仙台市) 2012年10月19日
5. T. Mori, K. Tobinaga, M. Matsuda, M. Takeo, T. Niidome, Y. Katayama, The 2nd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine. Co-endocytosis and Co-receptor: Controlling cell functions via modification of cell surface. (Taiwan) 2012年08月29-31日
 6. Y. Katayama, The 2nd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine. Intracellular signal-responding materials for new strategy of cell-specific gene delivery and in vivo imaging of disease functions (Taiwan) 2012年08月29-31日
 7. Y. Katayama, The 1st International Symposium on Polymer Ecomaterials. Intracellular signal-responding materials for new strategy of cell-specific gene delivery and in vivo imaging of disease functions. (Changchun) 2012年08月19-22日
 8. 新留琢郎、福島寛満、山下秀治、森健、片山佳樹、第28回日本DDS学会学術集会。金ナノロッドからの核酸のコントロールドリリリースシステム。(札幌市) 2012年7月4-5日
 9. 片山佳樹、第28回日本DDS学会学術集会。標的細胞内シグナルを検知し細胞を識別する遺伝子キャリアー。(札幌市) 2012年7月4-5日
 10. 金燦宇、森健、新留琢郎、片山佳樹、第28回日本DDS学会学術集会。Enhanced stability of cancer signal-responsive nanocarrier to improve the specificity of gene therapy。(札幌市) 2012年7月4-5日
 11. 土谷享、森健、新留琢郎、片山佳樹、第28回日本DDS学会学術集会。プロテインキナーゼ応答型ポリマーの分子修飾とポリマー/DNA複合体の安定性。(札幌市) 2012年7月4-5日
 12. 串尾聡之、土谷享、森健、新留琢郎、片山佳樹、第28回日本DDS学会学術集会。腫瘍の低pH及び細胞内シグナル異常に応答する二重ターゲティング遺伝子キャリアーの開発。(札幌市) 2012年7月4-5日
 13. 李恩卿、森健、新留琢郎、片山佳樹、第28回日本DDS学会学術集会。Disease signal-responsive siRNA: Silenced siRNA awakened by cellular protease。(札幌市) 2012年7月4-5日
 14. 吉浦萌笑、森健、片山佳樹、新留琢郎、第28回日本DDS学会学術集会。金ナノロッドのフォトサーマル効果によるHSP70の誘導。(札幌市) 2012年7月4-5日
 15. S. Shisaki, M. Kuramoto, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. Protease imaging system by using polyion-complex and its application to prostate cancer.(Quebec, Canada) 2012年07月15-19日
 16. 中村雄大、土谷享、森健、新留琢郎、片山佳樹、第49回化学関連支部合同九州大会。細胞内シグナルに応答する分岐状ポリエチレンイミンによる遺伝子デリバリー。(北九州市)。2012年06月30日
 17. 尚山堅士郎、渡部和人、千々岩信勝、森健、片山佳樹、新留琢郎、第49回化学関連支部合同九州大会。腫瘍特異的デリバリーを指向したナノキャリアーの設計。(北九州市)。2012年06月30日
 18. 大坪裕紀、森健、新留琢郎、片山佳樹、第49回化学関連支部合同九州大会。MALDI-TOF-MSを用いる迅速なプロテインキナーゼ活性測定法の開発。(北九州市)。2012年06月30日
 19. 大坪裕紀、森健、新留琢郎、片山佳樹、第72回分析化学討論会。新規ペプチドのアフィニティー精製および細胞内プロテインキナーゼ活性のMALDI-TOF-MSによるディファレンシャル計測。(鹿児島市) 2012年05月19-20日
 20. 片山佳樹、幹細胞治療研究フォーラム、細胞内シグナルを用いる新しい診断・治療・創薬のためのツール(東京)、2011年11月24日
 21. 片山佳樹、Sysmex プロテインカンファレンス、細胞内プロテインキナーゼプロファイリングのためのペプチドアレイ(神戸市)、2011年10月12日
 22. 片山佳樹、塩崎秀二郎、佐藤祐子、森健、新留琢郎、高分子討論会、高分子-ペプチド複合体により遺伝子の転写制御(岡山市)、2011年09月28日
 23. 片山佳樹、倉本政則、戸井田力、塩崎秀二郎、森健、新留琢郎、高分子討論会、ポリマー/ペプチドコンジュゲートを用いるがんイメージング剤(岡山市)、2011年09月28日
 24. 片山佳樹、日本分析化学会年会、生体分析への挑戦(名古屋市)、2011年09月14日
 25. Y. Katayama, 17th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Intracellular signal responsive gene regulation system for disease cell specific therapy and imaging (福岡市)、2011年07月15日
 26. Y. Katayama, R. Toita, J-H. Kang, T. Mori, T. Niidome, American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting, New gene regulation delivery system using peptide-pendant polyethyleneimine for

cancer cell-specific therapy and imaging (米国), 2011年05月19日

〔図書〕(計 4件)

1. Riki Toita, Yoshiki Katayama, Jeong-Hun Kang, Nanotechnological strategies for tumor-targeting delivery of drugs or genes, Nova Science Publishers, 2012年10月
2. 片山佳樹, 細胞内シグナル応答型遺伝子キャリア(ドラッグデリバリーシステムの新展開), シーエムシー出版2012年01月
3. 片山佳樹, アレイチップでのセンシング(バイオセンシング・バイオイメージングのニュートレンド) 化学同人2012年07月
4. Yoshiki Katayama, Technologies for the use of protein kinases into medical applications(Protein Kinases), 2011年5月

〔産業財産権〕

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3件)

名称: 金ナノロッドを含有するS/O製剤
発明者: 新留琢郎、新留康郎、神谷典徳、後藤雅宏、片山佳樹、ダークロンピスワン、野瀬圭介、栗原亮介
権利者: 九州大学
種類: 特許
番号: 特願2010-136286
出願年月日: 2012年6月15日
国内外の別: 国内

名称: アドレスラブルポジショナルスキニング法によるペプチド基質スクリーニング方法
発明者: 片山佳樹、秦彬斗、矢山由洋、森健、新留琢郎
権利者: 九州大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/070087
取得年月日: 2011年8月29日
国内外の別: 国外

名称: タンパク質キナーゼの新規基質ペプチド
発明者: 片山佳樹、秦彬斗、矢山由洋、韓曉明、下村隆、森健、新留琢郎
権利者: 九州大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/63699
取得年月日: 2011年6月
国内外の別: 国外

○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
<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~katayama/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
片山 佳樹 (KATAYAMA YOSHIKI)
九州大学工学研究院応用化学部門・教授

研究者番号: 70284528

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし