

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25560225

研究課題名(和文)疾患シグナル応答型タンパク質ナノカプセルによる薬物送達システム

研究課題名(英文)Pancreatic cancer specific targeting by protein nanocages

研究代表者

村田 正治 (Murata, Masaharu)

九州大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：30304744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではウイルスをモデルとするのが新しいドラッグキャリアを開発している。我々が着目したのは、病原性の観点からウイルスそのものではなく、それと非常によく似た構造体を形成するsmall heat shock proteinである。しかしこのナノカプセル自体には特定の組織や細胞に対する特異性はない。そこで本年度は肺癌等多くの癌細胞で高発現していることが知られているNeuropilin-1を分子標的化したナノカプセルを標的化するために、カプセル表面にiRGDペプチドモチーフを遺伝子レベルで導入した。今回はこのiRGDナノカプセルのキャラクタリゼーションを行うとともに細胞特異性について検討した。

研究成果の概要(英文)：Protein nanocages are self-organized complexes of oligomers whose three-dimensional architecture can be determined in detail. These structures possess nanoscale inner cavities into which a variety of molecules, including therapeutic or diagnostic agents, can be encapsulated. These properties yield these particles suitable for a new class of drug delivery carrier, or as a bioimaging reagent that might respond to biochemical signals in many different cellular processes. We report here the design, synthesis, and biological characterization of a Pancreatic cancer nanocage carrying small heat-shock protein. These nanoscale protein cages, with a targeting peptide on their surfaces, were prepared by genetic engineering techniques. iRGD-carrying nanocages showed lower cytotoxicity and significantly higher specificity for human pancreatic cancer cell lines than other cell lines in vitro.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体医工学・生体材料学

キーワード：ナノ材料 DDS 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

DDSにおける薬物キャリアとしてこれまでに様々な材料が試されてきた。理想的には薬剤を安定に封じ込める空間を有し、それを標的細胞まで輸送した後に、内包した薬物を有効濃度において放出する特性が望まれる。リポソームや高分子ミセルあるいはゲルなど、いくつかのキャリアにおいては薬剤の効果的な封じ込めと徐放に成功している。しかしながら一方で、*in vivo*における標的細胞特異性や局所での薬物放出能には依然課題が残されている。これまでのDDSキャリアの課題を克服するためには、配列とそれに裏打ちされた構造が明確な新しいタンパク質ベースのナノキャリアが必要である。

2. 研究の目的

タンパク質ベースのキャリアとして着目したのが、古細菌Mj285が構築するタンパク質ナノカプセルである。我々はこれまで高分子ミセルを基材としたDDSキャリアの開発を続けてきた。しかしながらより応答性の高いキャリア開発のためには、極めて洗練された感染機構をもつウイルスの様に、分子量分布のない、厳密に制御された立体構造を有する物質が望ましい。本研究で開発するタンパク質ナノ粒子はこの条件を十分に満たしており、これまでにないDDSキャリアと成り得る。

興味深いことに、Mj285ナノカプセルの形成は外相に露出したC末端の数残基に依存しており、この領域を制御することによって粒子を崩壊させることができる。また一方で、そのN末端に配向する疎水性ヘリックスは、構造形成の重要な駆動力となっている。本年度はそのC末端領域に親水性リンカーを介してiRGDペプチド(GCRGDKGPDC)を導入した。このiRGDナノカプセルの物性を十分に評価した後、リンカー長と分子標的能の関係などを詳細に検討した。

3. 研究の方法

iRGD ナノカプセルの分子設計と発現

ナノカプセルHspG41Cの遺伝子をテンプレートとして、そのC末端に3~30残基のフレキシブルリンカー(-(GGG)_n-)を介してiRGDモチーフを組み込んだ(図1)。これらの組み換えナノカプセルを含むベクターを大腸菌株BL21CodonPlus(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×YT培地に接種し、37°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。これをプローブ型超音波照射装置でソニケーション(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質量分析計によって確認した。

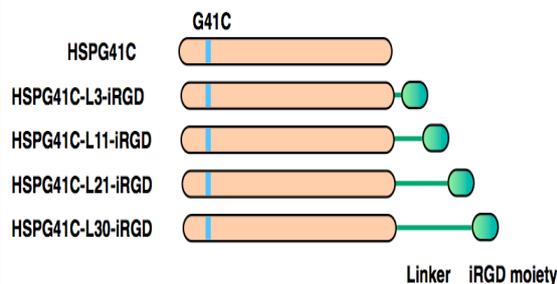


図1 種々のリンカーを有するiRGDナノカプセルのドメイン構造

iRGD ナノカプセルの機能評価

ヒト膵癌由来細胞株であるAsPC-1/CMV-LucとMIA-Paca2細胞を6wellのm-Slidesに 1×10^4 cells/wellとなるよう播種した。これを10vol% FBS、抗生物質(100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン, 0.25 µg/mL アムホテリシン-B)を添加したDMEM培地(DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM)を用い、37°C、5%CO₂雰囲気設定したCO₂インキュベーター内に培養した。一昼夜培養した後、培地交換し、終濃度1µM(蛍光色素基準)のAlexa488ラベル化iRGDナノカプセルを添加し、そのまま6時間培養を続けた。ナノカプセルの細胞への取り込みは蛍光顕微鏡BZ-9000(Keyence)を用いて評価した。

4. 研究成果

iRGD ナノカプセルの発現と物性評価

発現した4種類のiRGD ナノカプセルはすべて可溶性分画として良好な発現を示した。すべてのナノカプセルを上記のイオン交換クロマトグラフィーによって粗精製した後、サイズ排除クロマトグラフィー法によって最終精製した。この結果、すべてのナノカプセルを高純度で得ることができた(図3)

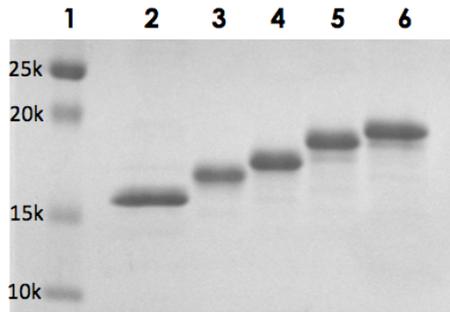


図3 iRGD ナノカプセルの SDS-PAGE

lane1, MW marker; lane2, HSP16.5-G41C; lane3, HSP16.5-L3-iRGD; lane4, HSP16.5-L11-iRGD; lane5, HSP16.5-L21-iRGD; lane6, HSP16.5-L30-iRGD

得られたナノカプセルの粒径を動的光散乱法(DLS)によって測定したところ、コントロールとなる G41C ナノカプセルが 12.0nm であったのに対して、L3-iRGD ナノカプセルは 12.6nm、L11-iRGD ナノカプセルは 12.9nm、L21-iRGD ナノカプセルは 13.6nm そして L30-iRGD ナノカプセルは 14.2 nm であった。これらの結果から、C 末端に付加したリンカー長に応じて粒径が増大したものと考えられる。

iRGD ナノカプセルの膵癌に対する特異性

細胞実験に先立って、AsPC-1 細胞に対する L30-iRGD ナノカプセルの細胞毒性を調べたところ、0~50 ug/ml までの濃度領域においては細胞毒性が観察されなかった。そこで次に、カプセル内孔を蛍光色素 Alexa488 で修飾した iRGD ナノカプセルの細胞特異性を観察した。この結果、二種類のヒト膵癌由来細胞株のうち MIA-Paca2 よりも AsPC-1 に対してより多く取り込まれていることが分かった(図4)。リンカーの影響を調べるために、各 iRGD ナノカプセルの細胞あたりの蛍光量を定量したところ、より長いリンカーを有する iRGD ナノカプセルが AsPC-1 に対してより多く取り込まれた(図5)。対照的に、MIA-Paca2

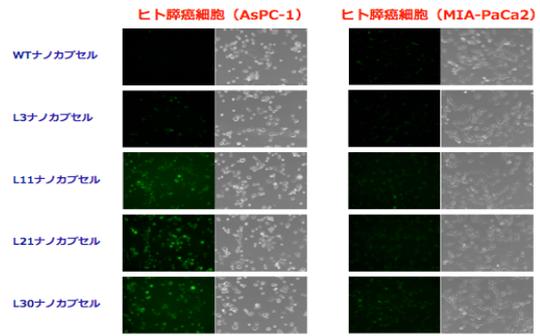


図4 iRGD ナノカプセルの膵癌細胞への取り込み

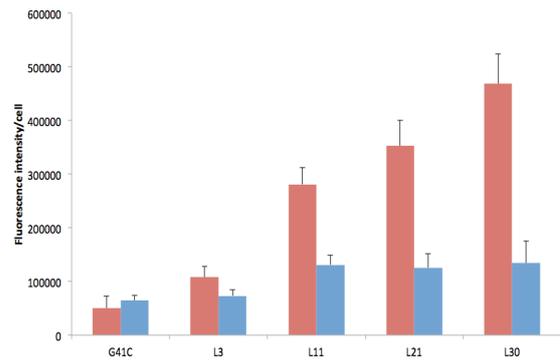


図5 iRGD ナノカプセルの形質転換におけるリンカー長の影響

に対してはリンカー長の影響は観察されなかった。

次に、AsPC-1 細胞に対する iRGD ナノカプセルの親和性に、カプセル表面に呈示した iRGD モチーフが関係しているかを調べるため合成ペプチドによる阻害実験を実施した。使用したペプチドは iRGD ナノカプセルに組み込んだ同じ配列を有する合成 iRGD ペプチド (GCRGDKGPDC) と一残基変異させた合成 iRGE ペプチド (GCRG**E**KGPDC) の二つである。先に述べた AsPC-1 による iRGD ナノカプセルの取り込みと同じ実験条件下において、上記の合成ペプチドを共存させた際の細胞あたりの蛍光量をプロットした結果を図7に示した。この結果、AsPC-1 による iRGD ナノカプセルの取り込み量は、合成 iRGD ペプチドの添加により濃度依存的に減少した(図6)。これとは対照的に、配列の異なる合成 iRGE ペプチドの影響は全く受けなかった。

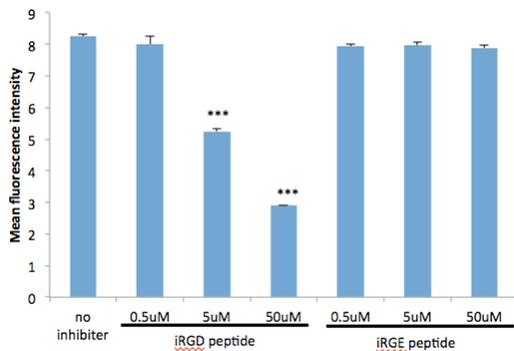


図6 合成ペプチドによる阻害実験

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 9 件)

1. Riki Toita, Masaharu Murata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida and Makoto Hashizume, “Biological Evaluation of Protein Nanocapsules Containing Doxorubicin”, *International Journal of Nanomedicine*, **8**, 1989–1999(2013)
2. Kensuke Kubota, Toshio Doi, Masaharu Murata, Kazu Kobayakawa, Yoshihiro Matsumoto, Katsumi Harimaya, Keiichiro Shiba, Makoto Hashizume, Yukihide Iwamoto, Seiji Okada, “Disturbance of Rib Cage Development Causes Progressive Thoracic Scoliosis. The Creation of a Nonsurgical Structural Scoliosis Model in Mice”, *Journal of Bone and Joint Surgery*, **95**, e130(1-7) (2013)
3. Riki Toita, Masaharu Murata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang and Makoto Hashizume, “A nanocarrier based on a genetically engineered protein cage to deliver doxorubicin to human hepatocellular carcinoma cells”, *Chemical Communications*, **49**, 7442-7444(2013).
4. Kei Nishiyama, Masaharu Murata, Masahiko Hashimoto, and Kazuhiko Tsukagoshi, “Specific Distribution Behavior of a Ternary Mixture of Solvents Fed into Bent and Wound Microchannels in Microchips”, *Analytical Sciences*, **29**, 1003-1008(2013).
5. Jeong-Hun Kang, Riki Toita, Daisuke Asa, Tetsuji Yamaoka, Masaharu Murata, “Reduction of inorganic phosphate-induced human smooth muscle cells calcification

by inhibition of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase”, *Heart and Vessels*, in press.

6. Jeong-Hun Kang, Riki Toita, Daisuke Asai, Tetsuji Yamaoka, and Masaharu Murata, “Liver cell-specific peptides derived from the PreS1 domain of human hepatitis B virus”, *Journal of Virological Methods*, **201**, 20-23(2014).
7. Megumu Mori, Toru Chiba, Akira Nakamizo, Ryuichi Kumashiro, Masaharu Murata, Tomohiko Akahoshi, Morimasa Tomikawa, Yuichirou Kikkawa, Koji Yoshimoto, Masahiro Mizoguchi, Tomio Sasaki, Makoto Hashizume, “Intraoperative visualization of cerebral oxygenation using hyperspectral image data: a two-dimensional mapping method”, *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery*, in press.
8. Daisuke Asai, Riki Toita, Masaharu Murata, Yoshiki Katayama, Hideki Nakashima, and Jeong-Hun Kang, “Peptide substrates for G protein-coupled receptor kinase 2”, *FEBS Letters*, in press.
9. Yoshinori Fujimura, Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Daiki Setoyama, Miho Irie, Daisuke Miura, Hiroyuki Wariishi, Masaharu Murata, Kazuhiro Mizumoto, Makoto Hashizume, Masao Tanaka, “Mass Spectrometry-Based Metabolic Profiling of Gemcitabine-Sensitive and Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells”, *Pancreas*, **43**, 311-318(2014).

[学会発表] (計 11 件)

1. M.Murata, S.Narahara, J-S.Piao, T.Kawano, R.Toita, M.Hashizume, “Liver-targeted drug delivery using genetically engineered nanocages”, 14th Tetrahedron Symposium, 2013年6月15日、Hilton Vienna
2. 村田 正治、檜原 佐由子、朴 晶淑、河野 喬仁、濱野 展人、大内田 研宙、橋爪 誠、“タンパク質ナノキャリアの機能化による構造制御と薬物放出”、第29回日本DDS学会学術集会、2013年7月5日、京都テルサ
3. 河野 喬仁、村田 正治、朴 晶淑、檜原 佐由子、濱野 展人、大内田 研宙、橋爪 誠、“タンパク質ナノカプセルを用いた高感度MRIプローブの開発”、第29回日本DDS学会学術集会、2013年7月5日、京都テルサ

4. 檜原 佐由子、村田 正治、朴 晶淑、河野 喬仁、濱野 展人、大内田 研宙、橋爪 誠、“膵癌標的化タンパク質ナノカプセルの分子設計と機能評価”、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、2013 年 7 月 5 日、京都テルサ
5. 朴 晶淑、村田 正治、檜原 佐由子、河野 喬仁、濱野 展人、大内田 研宙、橋爪 誠、“肝特異的ナノカプセルの機能と機序の解明”、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、2013 年 7 月 4 日、京都テルサ
6. M.Murata, S.Narahara, R.Toita, J-S.Piao, M.Hashizume、“Liver cell specific targeting by PreS1 Peptide-carrying nanocages”、40st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society、2013 年 7 月 15 日、Hawaii Convention Center
7. 村田正治、“ナノカプセルによる疾患の標的化と DDS・分子イメージングへの応用”、九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス(小児外科)、2013 年 8 月 30 日、九州大学病院
8. 村田正治、“プロテインナノカプセルをプラットフォームとする分子イメージング試薬の開発”、日本分析化学会第 62 年会、2013 年 9 月 11 日、近畿大学東大阪キャンパス
9. 河野 喬仁、村田 正治、朴 晶淑、檜原 佐由子、濱野 展人、大内田 研宙、橋爪 誠、“タンパク質ナノ構造体を用いた膵癌標的型 MRI プロブの開発”、バイオマテリアル学会九州講演会 2013、2013 年 9 月 20 日、熊本大学 くすの木会館(黒髪北キャンパス)
10. 濱野 展人、村田 正治、河野 喬仁、檜原 佐由子、朴 晶淑、大内田 研宙、橋爪 誠、“脳標的型タンパク質ナノカプセルの開発と機能評価”、バイオマテリアル学会九州講演会 2013、2013 年 9 月 20 日、熊本大学 くすの木会館(黒髪北キャンパス)
11. 濱野 展人、村田 正治、河野 喬仁、檜原 佐由子、朴 晶淑、大内田 研宙、橋爪 誠、“脳標的型タンパク質カプセルの分子設計と標的機能評価”、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 30 日、熊本市総合体育館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)
 名称：ナノカプセル、組成物、ポリヌクレオチド、組換えベクター及び形質転換体
 発明者：村田 正治、橋爪 誠
 権利者：九州大学
 番号：PCT/JP2014/057776
 出願年月日：2014 年 3 月 20 日
 国内外の別：海外

発明の名称：診断システム
 代表発明者 千葉 亨、橋爪 誠、松本主之、小西 晃造、富川 盛雅、村田 正治、赤星 朋比古
 出願番号：P2011-072216
 出願日：2013/9/27
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)
 発明の名称：診断システム
 発明者 千葉 亨、橋爪 誠、松本主之、小西 晃造、富川 盛雅、村田 正治、赤星 朋比古
 出願番号：2013-048646
 出願日：2011/8/30
 公開日：2013/3/14
 公開番号：特開 2012-080939

[その他]

ホームページ等
<http://www.cmeit.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田正治 (MURATA MASAHARU)
 九州大学先端融合医療レドックスナビ
 研究拠点・准教授
 研究者番号：30304744

(2) 連携研究者

橋爪 誠 (HASHIZUME MAKOTO)
 九州大学大学院医学研究院・教授
 研究者番号：90198664

河野 喬仁 (TAKAHITO KAWANO)
 九州大学先端融合医療レドックスナビ
 研究拠点・特任助教
 研究者番号：90526831

濱野展人 (NOBUHITO HAMANO)
 九州大学先端医療イノベーションセンター
 研究拠点・特任助教
 研究者番号：80708397