

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860024

研究課題名(和文)デュアルイメージングが可能な脳組織造影カプセルの開発

研究課題名(英文)Development of brain tissue targeting dual-imaging capsule

研究代表者

濱野 展人 (Hamano, Nobuhito)

九州大学・先端医療イノベーションセンター・特任助教

研究者番号：80708397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳組織に対する造影剤としての機能も併せ持つ脳内移行型カプセルの開発を目的とした。脳内移行型カプセルは負電荷を有する20 nm前後のナノカプセルであること、アセチルコリンレセプターを特異的に認識し、従来型のカプセルと比較し、脳組織内に移行することが明らかとなった。しかしながら、どの経路で移行しているのかは明らかとならず、メカニズムについては今後の検討課題となることとなった。以上、当初のデュアルイメージングを実施するには到らなかったものの、脳内への移行が可能な新規ナノカプセルとして有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：To develop novel brain-targeting carrier, we prepared RVG peptide-modified protein cage, and evaluate the targeting ability of the cage. The cellular uptake and intracellular localization of HspG41C-RVG for Neuro2a cells was higher than those of HeLa cells. These result suggested that HspG41C-RVG could selectively target AchR. Moreover, in vivo analysis, HspG41C-RVG might be accumulated in the brain. In future, to examine targeting ability of brain tissue and mechanism of brain targeting, we will need to study histological analysis using brain section.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：ドラッグデリバリーシステム イメージング 脳へのデリバリー

1. 研究開始当初の背景

医療が発達した現代においても、脳の疾患は、脳腫瘍やアルツハイマー、パーキンソン病に代表される難治性疾患が数多く存在する。これら疾患の特徴として、絶対的な根治療法が存在しないこと、有用な薬物療法が確立されていないことなどが挙げられる。薬物療法を困難にしている最大の理由は、血液脳関門 (Blood-Brain-Barrier: BBB) の存在である。BBB が障壁となり、薬物が脳内に移行せず、他臓器のように治療することができない。加えて、脳組織を診断する際も、この BBB の影響により、造影剤が脳内に移行しないため、脳血管の造影は可能でも、より高度な脳組織の造影はできておらず、造影剤の開発や造影剤を送達することができるキャリアの開発が求められている。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では脳組織への造影剤としての機能も果たす脳内移行型カプセルの開発を試みる。脳内に到達させる新たなキャリアのプラットフォームとして、タンパク質ナノカプセルに着目した。これまでに我々は、従来の薬物キャリアとは一線を画する、ウイルスカプシドの構造を模倣した、タンパク質からなる 15 nm ほどのナノカプセルの開発に着目し、本ナノカプセルへの標的指向性の付与にも成功している [Murata et al., 2012, Int. J. Nanomedicine]。そこで、このタンパク質ナノカプセルに脳への標的指向性を付与する分子として、脳に移行する向神経性ウイルスである狂犬病ウイルスに由来する RVG ペプチド(アミノ酸配列: HDYTIWMPENPRPGTTPCDIFTNSRGKR ASNGN)に着目した。RVG ペプチドは、脳内や脳血管内皮細胞に多く発現しているアセチルコリン受容体 (AChR) を認識し、脳移行性を示す有望なペプチドとして報告されている [Kumar P., Wu H., McBride J. L., et al. Nature. 2007, 448, 39-43]。そこで、RVG ペプチドを組み込んだこの脳内移行型ナノカプセル作製し、ナノカプセルの内孔、並びに表面に造影剤を搭載することで、脳内を高感度かつ高解像度イメージングが可能なナノカプセルの開発を試みる。本ナノカプセルを開発することで、薬物の脳内デリバリーもできるカプセルの開発、ナノカプセル化した造影剤による脳疾患の早期発見など、臨床への応用に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

脳内移行型ナノカプセルの調製

これまでに用いてきたタンパク質ナノカプセル HspG41C の遺伝子をテンプレートとして、その C 末端に RVG ペプチドモチーフを組み込んだ。この組み替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 2xYT 培地に接種し、37 °C

振とう培養した。OD600 値が 0.5 に達した際に終濃度 1 mM の IPTG を加えて組み替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) を加えて十分居懸濁させた。これをプローブ型超音波照射装置でソニケーション (200W, 45 sec) した。4 °C で遠心分離 (20,000g, 20 min) した後、不溶性分画を除去した。

組み替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なった。塩濃度グラジェンド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 G4000SW 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 SDS-PAGE, MALDI-ToF 質量分析計によって確認した。更に得たタンパク質の粒径を動的光散乱法 (DLS) によって観察した。

RVG ナノカプセルの機能評価

(1) 細胞を用いた標的能の評価

AchR が多く発現しているとの報告がある神経芽細胞腫細胞である Neuro2a と、ネガティブコントロールとしてヒト子宮頸がん細胞である HeLa を用いた。AchR への標的能は、フローサイトメトリー、及び共焦点顕微鏡によるナノカプセルの細胞内への取り込みにより評価した。

フローサイトメトリー法

Neuro2a, HeLa をそれぞれ 2×10^5 , 1×10^5 cells/well になるよう 24 well プレートに播種後、翌日 Alexa Fluor 488 で標識したナノカプセルを細胞に添加 (Alexa Fluor488 終濃度: 4 μ M)、一時間インキュベートした。インキュベート後、細胞を PBS にて洗浄し細胞を回収した。回収した細胞を EC800 (Sony Biotechnology Inc.) により、フローサイトメトリーによる解析を行なった。

共焦点顕微鏡を用いた検討

Neuro2a, HeLa をそれぞれ 1×10^4 , 7.5×10^3 cells/well になるよう μ -slide chamber に播種後、翌日 Alexa Fluor 488 で標識したナノカプセルを細胞に添加 (Alexa Fluor488 終濃度: 1 μ M)、一時間インキュベートした。インキュベート後、細胞を PBS にて洗浄、ホルムアルデヒドで固定し、Pro Long Gold with DAPI を用いて封入した。オーバーナイト後、共焦点顕微鏡 (FV1000-D: Olympus) を用いてナノカプセルの細胞内への取り込みを観察した。

(2) In vivo における標的能の評価

ICR マウス (、4-5 週齢) のマウスに Alexa Fluor 750 で標識したナノカプセル (20 μ M 250 μ l) をマウス尾静脈から投与した。投与 4 時間後、IVIS Spectrum を用いて Alexa Fluor 750 を検出することにより、ナノカプセルの

体内動態を評価した。撮影後、マウスを灌流固定した。その後脳を回収し、1 mmのスライス片とし、*ex vivo* イメージングを試みた。

4. 研究成果

RVG ペプチド修飾ナノカプセルの発現と物性評価

発現したペプチド修飾タンパク質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、サイズ交換クロマトグラフィーによる二段階の精製法を行なった。SDS-PAGE, MALDI-ToF 質量分析の結果から、高純度のタンパク質を得ることができた。更に得ることができたタンパク質の粒径を DLS によって測定したところ、ペプチド未修飾のタンパク質がおよそ 15 nm であったのに対し、RVG ペプチド修飾タンパク質は 21.5 nm であった (Fig. 1)。また、本タンパク質の表面電荷を測定したところ、ペプチド未修飾のもので -15.56 ± 1.60 (mV; n=6) に対して、RVG ペプチド修飾タンパク質は -11.58 ± 1.58 (mV; n=6) となり、ペプチド修飾によって若干の電荷が上昇したことが示された。以上これら結果より、精製によって得ることができたタンパク質はナノカプセルとなり得ることが示された。

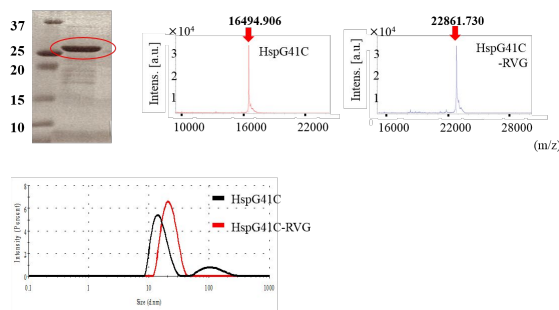


Figure 1. SDS-PAGE (A), MALDI-ToF-MS analysis (B), and size distribution (C) of Hsps. Size distribution of Hsps were determined by DLS. Measurements were undertaken at least twice, and the results showed almost identical size distributions.

RVG ペプチド修飾ナノカプセルの標的能の評価

タンパク質ナノカプセルの内孔を蛍光色素 Alexa Fluor 488 でラベル化したナノカプセルを用いて、RVG ペプチド修飾ナノカプセルの標的能について検討した。RVG ペプチドは AchR を認識することが報告されていることから、AchR が高発現している Neuro2a と発現が認められない HeLa を用いて比較検討を行なった。フローサイトメトリーにより、本ナノカプセルの細胞内取り込みを評価したところ、Neuro2a においてペプチド未修飾のナノカプセルと比較し、RVG ペプチド修飾ナノカプセルを添加した群において、蛍光強度の増強が確認された。一方で、HeLa に対しては、ペプチド未修飾群の非特異的な蛍光強度の増加が観察されたのに対して、RVG 修飾ナノカプセルでは非特異的な取り込みが抑制された (Fig. 2)。

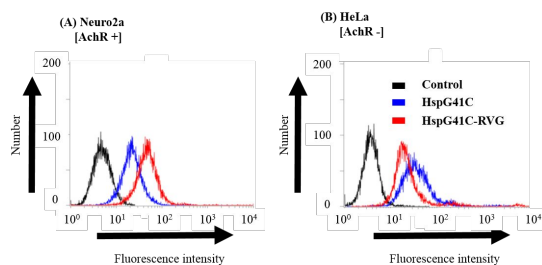


Figure 2. Cellular uptake of Hsps on cells, Neuro2a (A), HeLa (B). Cells were treated with non-modified protein cage (HspG41C), or RVG peptides-modified protein cage (HspG41C-RVG) for 1 hr at 37 °C. After incubation, cells were washed and fluorescence intensities were measured by flow cytometry.

更に共焦点顕微鏡により RVG ペプチド修飾ナノカプセルの細胞内局在についても検討した。RVG ペプチド修飾ナノカプセルは HeLa に対してはほとんど細胞内には移行せず、Neuro2a にのみ、顕著に細胞内に取り込まれることが明らかとなった (Fig. 3)。また、Neuro2a において、細胞内における蛍光がドット状であること、RVG ペプチド修飾ナノカプセルの表面電荷が負電荷であることから、本ナノカプセルの細胞内取り込みにはエンドサイトーシスが関与することが示唆された。また、本ナノカプセルの細胞毒性に関して検討したところ、従来型同様、顕著な細胞毒性を示すことはなく、*in vivo* においても適応可能であることが示唆された。

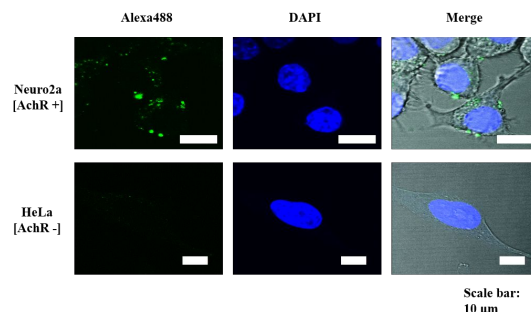


Figure 3. Confocal microscopy images of Neuro2a, HeLa. Cells were treated with Alexa488-labeled HspG41C-RVG for 1 hr at 37 °C. After incubation, cells were washed and fixed. Then, the cells were treated with DAPI (blue) for nuclei staining. Blue: fluorescence of DAPI. Green: Alexa488. Scale bars represented 10 μm.

In vivo における RVG ペプチド修飾ナノカプセルの脳への標的性の評価

細胞を用いた *in vitro* の実験系において本 RVG ペプチド修飾ナノカプセルは AchR 特異的であることが示された。そこで健常マウスに本ナノカプセルを投与することで、生体における脳への標的性について評価した。投与 4 時間後、マウスの脳周辺に対するナノカプセルの集積性を IVIS により観察した結果、RVG ペプチド修飾ナノカプセルは頭部に集積することが明らかとなった。また血流ではなく、実際に脳組織に集積しているかどうかを検討するため、灌流固定を施し、脳組織を取り出してイメージングを試みた。結果、*in vivo* イメージングの結果と同様、RVG ペプチド修飾ナノカプセルは顕著に脳組織に集積しており、また脳組織を 1 mm にスライスし同様の方法で観察を試みたところ、ペプチド修飾ナノカプセルは脳組織内部に移行して

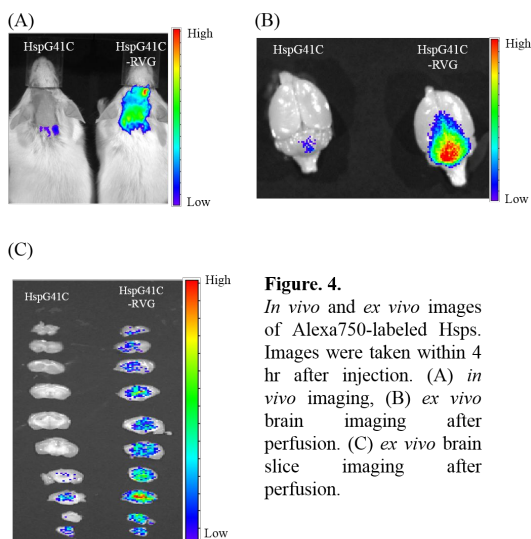


Figure 4.
In vivo and *ex vivo* images of Alexa750-labeled Hsps. Images were taken within 4 hr after injection. (A) *in vivo* imaging, (B) *ex vivo* brain imaging after perfusion. (C) *ex vivo* brain slice imaging after perfusion.

いることが明らかとなった (Fig. 4)。RVG ペプチドのレセプターである AchR は脳血管にも高発現していることが報告されていることから、本結果は血管を介してトランスサイトーシスなどの経路によって脳内に移行していることが考えられる。しかしながら、本ナノカプセルの脳への移行メカニズムに関して、はっきりとしたことは不明なままであり今後の課題として残ることとなった。

また、本ナノカプセルの安全性についても検討を行なった。血液を回収し、生化学的なパラメータにより評価を行なったところ、顕著な毒性を示すことはなく、生体への応用が可能であることが示唆されることとなった (Table. 1)。

Table. 1

Blood chemistry data after intravenous injection of Hsps

	ALP (IU/L)	ALT (IU/L)	BUN (mg/dl)	CRE (mg/dl)	CPK (U/L)
Control	325.4 ±23.3	17.6 ±3.36	26.8 ±3.91	< 0.2	198 ±114.9
HspG41C	205 ±38.9	17 ±5.95	23.8 ±1.08	< 0.2	217.4 ±97.6
HspG41C- RVG	207.2 ±38.3	14.6 ±4.97	29.0 ±2.79	0.2 ±0.07	301.4 ±123.1

n = 5
(Avg ± SD)

以上、本研究によって開発された脳内移行型ナノカプセルは、20 nm という従来型と同様ナノレベルを維持したナノ粒子でありながら、脳へ標的性を有する優れたナノキャリアとなり得ることが示唆された。今回開発されたナノカプセルは、脳への移行性を有するキャリアとして有用であることが期待され、MRI 造影剤やその他治療薬物を搭載可能なナノキャリア開発への応用に繋がるものと考えられる。

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)

[学会発表](計 5 件)

Nobuhito Hamano, Masaharu Murata, Takahito Kawano, Jing Shu Piao, Kenoki Ohuchida, Makoto Hashizume, Molecular

design and biological evaluation of brain-targeting protein cage, 41st Annual Meeting & Exposition of Controlled Release Society, 2014, July, Chicago

Nobuhito Hamano, Masaharu Murata, Takahito Kawano, Jing Shu Piao, Kenoki Ohuchida, Makoto Hashizume, Development and evaluation of brain targeting RVG peptide-modified protein nanocarrier, 42nd Annual Meeting & Exposition of Controlled Release Society, 2015, July, Edinburgh

濱野 展人, 村田 正治, 河野 喬仁, 朴 晶淑, 榎原 佐由子, 大内田 研宙, 橋爪 誠, 脳標的型タンパク質カプセルの開発, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014 年 5 月, 名古屋

濱野 展人, 村田 正治, 河野 喬仁, 朴 晶淑, 榎原 佐由子, 大内田 研宙, 橋爪 誠, 脳内デリバリーを可能とする AchR 標的化タンパク質ナノカプセルの開発, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 2014 年 7 月, 東京 (優秀発表者賞 受賞)

濱野 展人, 村田 正治, 河野 喬仁, 朴 晶淑, 榎原 佐由子, 大内田 研宙, 橋爪 誠, 脳を標的とした RVG ペプチド修飾タンパク質ナノキャリアの開発と機能評価, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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