

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成15年度採択研究代表者

片山 佳樹

(九州大学大学院工学研究院 教授)

「細胞対話型分子システムを用いる革新的遺伝子送達概念の創製」

1. 研究実施の概要

本研究の目的である疾患細胞に特異的に活性化している細胞内シグナルを利用した細胞特異的遺伝子送達法の開発のため、平成16年度は以下の検討を行なった。(1) PKAおよびカスパーゼ応答型キャリアーを用いた遺伝子制御メカニズムの検討、(2) PKC α 、HIVプロテアーゼ応答型キャリアーの開発、(3) 遺伝子・キャリアー複合体の細胞への導入に関する研究、(4) 循環器疾患、ウイルス感染のアッセイ系の開発。(1)に関しては、細胞内シグナルの選択性や遺伝子とキャリアーの複合体の崩壊と反応性、粒子の安定化に関して検討し、複合体の崩壊がどの程度のシグナルとの反応により引き起こされるかを明らかにし、また、実際に細胞内での遺伝子発現調節が、標的シグナルにより起こっていることを証明すると共に、安定な複合体を得ることに成功した。(2)に関しては、PKC α とHIVプロテアーゼに応答するキャリアーの開発にそれぞれ成功し、PKC α 応答型に関しては*in vivo*で働きうることを、HIVプロテアーゼ応答型に関しては、ウイルス感染細胞でのみ働きうることを証明した。(3)に関しては、中空バイオナノ粒子への複合体の封入法として各種検討し、脂質を用いる手法が有効であることを見出した。また、プラズマ法をより小さなディッシュで使用するための条件の最適化を検討した。(4)に関しては、循環器疾患の診断系として、新しいMRI造影剤の開発に成功し、血管傷害部位を検出することに成功した。ウイルス感染の診断法としては、一酸化窒素の発生を指標とし、センサーを用いた計測系の開発に成功した。

2. 研究実施内容

以下に各項目ごとに分けて実施内容を報告する。

(1) PKAおよびカスパーゼ応答型キャリアーを用いた遺伝子制御メカニズムの検討

まず、キャリアーと遺伝子の複合体安定化の検討では、PKA応答型キャリアーにおいて、高分子主鎖の疎水性を変えたものやPEGを側鎖に新たに導入したものを合成して、動的光散乱法によって複合体の平均粒径の時間変化を計測した。その結果、高分子主鎖の疎水性を上げると複合体の粒径は小さくなるが、塩溶液や緩衝溶液では、時間と共に複合体の会合が見られた。一方、PEGを導入すると非常に安定な複合体が

得られることが分かった。

ついで、PKA応答型キャリアーを用いて、各種薬物(Folskolin, TPA, PACAP, Rottlerin)で刺激した細胞(NIH 3T3)にルシフェラーゼ遺伝子を導入して、まず、HVJ-Eを用いて、PKAにより応答する転写因子であるCREBに対するプロモータを有するレポーター遺伝子を導入して、細胞内PKA活性を評価し、ついで、HVJ-Eにより、キャリアー・遺伝子複合体を導入して、発現量と細胞内PKA活性を比較したところ、そのプロフィールは完全に一致した。また、キャリアー中の基質ペプチドのリン酸化部位であるセリンを、アラニンに置換したネガティブコントロールキャリアーでは、全く遺伝子の発現は認められず、ここで観察される遺伝子発現の活性化は、間違いなく細胞内で活性化されたPKAによるものであることが立証できた。また、複合体において、どの程度のペプチドがリン酸化されると複合体が崩壊するのかを調べるため、リン酸化をATPの消費(発光で計測)、複合体の崩壊を動的散乱で見積もった。その結果、複合体は、20分で80%がリン酸化された時点で、ほとんど崩壊することが明らかとなった。

カスパーゼ応答型キャリアーを用いては、HVJ-Eによる細胞内への導入を試み、これまでのTatペプチドによる導入より効率がよいことを見出した。また、この場合もカスパーゼで切断されないネガティブコントロールキャリアーでは、全く細胞内での遺伝子発現が認められず、細胞内カスパーゼシグナルに応答していることが確かめられた。また、この遺伝子・キャリアー複合体を用いて、細胞核内でキャリアーがゲノムDNAに奪われる可能性を検討するため、無細胞発現系でホタルルシフェラーゼ遺伝子を複合体とし、これに大量のウミホタルルシフェラーゼ遺伝子を添加したが、ホタルルシフェラーゼの発現は全く認められず、この複合体は非常に安定であることが分かった。また、ペプチド自身は遺伝子発現に全く影響を及ぼさないことも分かった。

(2) PKC α 、HIVプロテアーゼ応答型キャリアーの開発

PKC α 応答型キャリアーに関しては、まず、基質の設計を行った。タンパクのリン酸化サイト周辺のアミノ酸配列を基本に、種々の配列を設計し、独自に開発したバイオチップを用いて探索を行い。さらに候補となった配列数種類を用い、マウスの各種臓器とガン組織の抽出液を用いて基質評価を行った。その結果、ガン組織のみでリン酸化される、特異性の高い基質を見出した。次いで、この基質を利用してキャリアー高分子を合成した。得られたキャリアーとルシフェラーゼ遺伝子の複合体を、マウスに移植したメラノーマにエレクトロポレーションにより導入したところ、発現が認められた。一方、リン酸化サイトであるセリンをアラニンに置換したコントロールキャリアーの場合は、全く発現が認められず、本概念がin vivoにも適用できることが初めて示された。

HIVプロテアーゼ応答型に関しては、通常基質ペプチド導入様式では、切断されにくかったため、新しいリンカーを開発して連結したところ、非常に応答性の良い

キャリアを開発できた。これを用い、HIV感染T細胞に遺伝子を導入したところ、発現が見られたが、正常T細胞では、発現は全く認められず、ウイルス感染細胞に特異的な遺伝子発現に成功した。

(3) 遺伝子・キャリア複合体の細胞への導入に関する研究

本年度では、中空バイオナノ粒子を1週間に数mg以上安定供給できる調製条件を確立した。その後、細胞内シグナル応答型遺伝子制御システムをこの粒子に封入する最適化条件を探索した。また、酵母で生産した中空バイオナノ粒子を熱処理することで安定に精製することができたので、蛍光物質を用いて粒子の中に封入する条件を次の方法で検討した。

- 1) 中空バイオナノ粒子の中には多くのs-s結合が含まれているので、還元剤(DDT)を処理することで粒子内の結合を緩くし、封入率を試みた。
- 2) 中空バイオナノ粒子に蛍光物質を封入する方法としてエレクトロポレーション法を用いて行った。その際、電圧、電流、パルス、反応液を変化させながら最適な条件を探った。
- 3) エレクトロポレーション以外の方法としてマイクロバブルを併用したソノポレーション法で封入する条件を調べた。
- 4) リポソームに蛍光物質を封入し、中空バイオナノ粒子と融合法で封入率を試した後、GFPプラスミドも検討した。

その結果、還元剤の処理により粒子のs-s結合力は弱くなったことは確認されたが、蛍光物質の封入率においては大きな差が認められなかった。また、エレクトロポレーション法では10~220V, 1~3A, 100~1000 μ Fの範囲で調べたところ、50V, 950 μ Fで高い封入率を示した。エレクトロポレーション法の反応液は塩濃度を調節したリン酸バッファーでより効果的であった。しかし、GFPの遺伝子を封入した場合、大きな発現上昇は見られなかった。また、電圧が高くなればなるほど粒子のサイズが大きくなり(直径1ミクロン程度)、肝臓の細胞に特異的に導入されることなく、細胞にランダムでつくることがあった。ソノポレーション法を用いた粒子への封入では蛍光物質が封入されていることが確認されたが、その効果が今までの方法より低く、遺伝子の導入にはうまくいかなかった。その後、リポソームとの融合法を考案し、蛍光物質と遺伝子ともに中空バイオナノ粒子に封入されたことが確認された。リポソームと粒子の比率を調節することでリポソームによる細胞への導入を抑え、粒子の性質により肝臓細胞への特異性を持つことができた。現在、リポソームと中空バイオナノ粒子の融合法が薬剤だけではなく遺伝子導入にも効果的であると考えられる。しかし、リポソームと粒子の融合でサイズが大きくなる傾向があるので、検討中である。また、リポソームの性質(電荷など)による粒子との最適な融合条件を検討している。

プラズマ法に関しては、これまで大きなディッシュでしか使用できなかったが、24mmシャーレに対応するためのプラズマヘッドを開発し、これを用いて遺伝子導入

のための、プラズマ照射時間、照射距離などの条件を最適化し、使用可能とした。

(4) 循環器疾患、ウイルス感染のアッセイ系の開発

循環器疾患への本システム適用のため、先ず効果の評価方法として、血管壁の情報を与える機能化造影剤の開発した。組織染色用に用いられているエバンスブルーが内皮剥離部位に選択的に集積する特性に着目し、従来のMRI用Gd造影剤にエバンスブルー構造を付加した機能化造影剤を設計・作製し、摘出血管および生体内で、その有用性を検討した。その結果、

(1) 新規の機能化造影剤は、摘出血管（ブタ大動脈）において、内皮剥離部位を鮮明に描出した。(2) 新規の機能化造影剤は、ラット頸動脈において、内皮剥離部位を鮮明に描出した。(3) 新規の機能化造影剤は、動脈硬化モデルマウスであるApoE欠損マウスの大動脈における経時的な動脈硬化プラークの形成を描出した。

ウイルス感染のアッセイ法としては、一酸化窒素計測系を考えた。細菌やウイルス感染に伴いNOが発生し、抗ウイルス効果並びに周辺組織への障害作用が報告されており、直接経時的にモニタリングすることができれば、NOの感染における診断また治療のためのバイオマーカーとも成り得る。しかし、NOの半減期は極めて短く、直接測定することは困難である。そこで、NOに選択的な多層被覆型微小電極を用い、細胞培養系におけるNOの測定系の確立を目指した。白金-イリジウム合金素子をNO選択性特殊膜で被覆した微小電極 (Model NO-502, 栄行科学) を用い、NOガスの検出を電気信号に変換し、検知した電気化学信号はPower-Lab (AD Instrument社) にて測定、解析した。酸性側でNOを発生するNOC-7を用いて検討したところ、無細胞系並びに細胞系でNOの発生を経時的にモニタリングできることが明らかとなった。また、濃度依存性にも優れ、定量化が可能であることを確認した。

3. 研究実施体制

片山グループ

- ① 研究分担グループ長：片山 佳樹（九州大学工学研究院、教授）
- ② 研究項目：PKAおよびカスパーゼ応答型キャリアーを用いた遺伝子制御メカニズムの検討
PKC α 、HIVプロテアーゼ応答型キャリアーの開発
新規造影剤の開発
プラズマ法の開発

谷澤グループ

- ① 研究分担グループ長：谷澤 克行（大阪大学産業科学研究所、教授）
- ② 研究項目：中空バイオナノ粒子の製造と遺伝子・キャリアー複合体封入法の開発

下川グループ

- ① 研究分担グループ長：下川 宏明（九州大学医学研究院、助教授）

② 研究項目：血管壁の情報を与える機能化造影剤の開発、評価
東海林グループ

① 研究分担グループ長：東海林 洋子（聖マリアンナ医科大学医学部、助教授）

② 研究項目：HIV感染細胞におけるHIVプロテアーゼ応答型キャリアーの有用性に関する研究
一酸化窒素のモニタリングシステムの構築、並びにウイルス感染におけるNOの役割に関する研究

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Intracellular Signal-Responsive Gene Carrier for Cell-Specific Gene Expression
K. Kawamura, J. Oishi, J-H. Kang, K. Kodama, T. Sonoda, M. Murata, T. Niidome, Y. Katayama, *Biomacromolecules* **6**, 908-913 (2005)
- In vivo MR Detection of Vascular Endothelial Injury Using A New Class of MRI Agent
T. Yamamoto, K. Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, F. Hyodo, M. Murata, N. Shigetani, K. Yoshimitsu, H. Shimokawa, H. Utsumi, Y. Katayama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 2787-2790 (2004)
First Functionalized MRI Contrast Agent Recognizing Vascular Lesions
- T. Yamamoto, K. Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, M. Murata, N. Shigetani, K. Yoshimitsu, H. Shimokawa, Y. Katayama, *Anal. Sci.* **20**, 5-7 (2004)
- Mass-Tag Technology for Monitoring of Protein Kinase Activity Using Mass Spectrometry
T. Sonoda, S. Shigaki, T. Nagashima, O. Okitsu, Y. Kita, M. Murata, Y. Katayama,
Bioorg. Med. Chem. Lett., **14**, 847-850 (2004)
- Novel Tissue and Cell Type-specific Gene Delivery System Using Surface Engineered Hepatitis B Virus Nanoprotein Particles.
Yamada, T., Kondo, A., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.
Current Drug Targets: Infectious Disorders **4**, No. 2, 163-167, (2004).
- Pinpoint Drug Delivery System Using Hollow Bio-Nanoparticles
Yamada, T., Seno, M., Kondo, A., Ueda, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.
高分子論文集 **61**, No. 12, 606-612 (2004).
- Nutraceuticals and delivery systems,
Shoji Y., Nakashima H., *J Drug Targeting*, **12(6)**, 385-391 (2004).

○ Cytotoxicity and radical modulating activity of Moxa smoke.

Sakagami H., Matsumoto H., Satoh K., Shioda S., Ali C. S., Hashimoto K., Kikuchi H., Nishikawa H., Terakubo S., Shoji Y. Nakashima H. Shimada J. *in vivo* **19**:3-9 (2005).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：8件（CREST研究期間累積件数：10件）