

「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

遺伝子治療は、有望な次世代医療であるが、現行では導入遺伝子を標的細胞でのみ発現させることができないため、その適用が極めて限定されている。本研究では、疾患細胞特異的に活性化する細胞内シグナルに応答して遺伝子を活性化できる新しいナノ分子システムを構築し、これを臨床応用可能な手法として確立することを目的としている。そのために、本分子システムに、肝炎ウイルスエンベロップ由来の中空バイオナノカプセルおよびプラズマ型遺伝子導入装置を併用する。これまでに、細胞内のプロテインキナーゼとしてプロテインキナーゼA (PKA)、プロテアーゼとしてCaspase-3に応答するシステムの構築に成功し、細胞内での標的シグナルによる遺伝子発現制御に成功した。Caspase-3においては、細胞膜透過型のTatペプチドを用いることで遺伝子とキャリアーからなるナノ粒子を細胞に導入することに成功した。一方、PKA応答型では、Tat併用も検討したが、遺伝子との複合体のみでは細胞への導入効率が悪かった。そこで、中空バイオナノカプセル利用の前段階の検討として、センダイウイルスエンベロップにPKA応答型キャリアー／遺伝子複合体を封入して細胞へ導入することを試み、成功した。また、遺伝子／キャリアー複合体ナノ粒子の安定化と粒径の減少を狙って、キャリアー主鎖高分子の疎水性を向上したタイプも合成し、良い結果を得た。中空ナノカプセルでは、遺伝子／キャリアー複合体の封入の検討とともに、安定に大量合成するシステムを開発した。また、臨床応用に供するため、冠状動脈における内皮肥厚モデルとウイルス疾患適用のためのウイルス感染のアッセイ系を確立した。また、ウイルス感染細胞での導入遺伝子の局在を検討した。

2. 研究実施内容

2-1. プロテアーゼ応答型遺伝子制御システム

プロテアーゼとして細胞死の実行シグナルであるCaspase-3に応答するキャリアーを開発した。本キャリアーは、中性の高分子主鎖にオリゴカチオンであるペプチドをグラフトしたもので、カチオン性ペプチドと高分子の連結部分にCaspase-3で特異的に切断される配列を導入している。高分子主鎖として、親水性のポリアクリルアミド、疎水性を向上させたポリイソプロピルアクリルアミド(PNIPAAm)、側鎖ペプチドとしてカチオン部分をオ

リゴリジン、Tatペプチド、核移行シグナル配列、オリゴアルギニンをそれぞれ組み合わせた様々なキャリアーを合成し、細胞への遺伝子導入効率、および細胞内でのCaspase-3シグナル応答性を検討した。その結果、カチオン部位として膜透過性のないオリゴリジンや核移行配列を有するものは、高分子主鎖が疎水性の高い場合のみ細胞に導入され、Tatペプチドを用いた場合では、高分子主鎖の如何にかかわらず遺伝子を細胞へ導入することが可能であった。いずれの場合でも、細胞に導入された遺伝子複合体は、細胞をスタウロスポリン刺激してCaspase-3を活性化した場合のみ、遺伝子が発現した。一方、Caspase-3基質配列DEVと荷電は同じで切断能のないEVEEを用いた場合では、Caspase-3活性化による遺伝子の発現は見られず、確かにCaspase-3に応答して遺伝子発現を制御していることが分かった。

2-2. プロテインキナーゼ応答型遺伝子制御システム

プロテインキナーゼ応答型キャリアーとしては、まず、主鎖にポリアクリルアミドを有し、カチオン性のPKA選択的基質をグラフとしたキャリアーについて検討した。このタイプのキャリアーは、遺伝子とナノ粒子を形成し、無細胞系では極めて良好なPKA応答型の遺伝子発現制御能を有していたが、細胞への導入効率が極めて悪かった。しかし、本システムは、キナーゼによる基質のリン酸化に伴うアニオン荷電の増加により遺伝子との複合体を崩壊させるものであり、Tatのようなカチオン荷電の多いペプチドを用いると、リン酸基導入に伴う効果が減弱してしまう。そこで、細胞内でTatが切除されるように、基質配列にジスルフィド結合でTatペプチドを連結したキャリアーを合成した。しかし、このキャリアーでは遺伝子の細胞内での発現制御がほとんど見られなかった。そこで、センダイウイルスエンベロップに本システムを封入することを試みた。その結果、細胞への導入に成功し、フォルスコリン刺激により細胞内のPKAを活性化した場合のみ、遺伝子の発現が見られた。本成果は、中空バイオナノカプセルの使用の可能性を示唆するものである。ただ、現状では遺伝子との複合体のサイズが200nmと大きいため、中空バイオナノカプセルへの封入効率が悪い事が分かり、複合体のサイズ減少と安定化を狙って、キャリアーと遺伝子との荷電比を変化させて、複合体の粒径を調べた。その結果、荷電比が増加すると、粒径は変化せず、粒径分布が狭く、均一な粒子となることが分かった。そこで、次に、高分子鎖の疎水性を増大させるため、PNIPAAmにしたキャリアーを合成した。このキャリアーは、主鎖の相転移温度以上(37℃)で、遺伝子との複合体ナノ粒子の粒径が半分減少し、さらにその場合に非常に優れた遺伝子発現制御能を示した。今後、このシステムを中空バイオナノカプセルにて移用する予定である。

2-3. 中空バイオナノカプセル

中空バイオナノカプセルを安定供給できるために、発現・精製条件を検討し、サイズ制御も含めて調製法の確立を目指した。中空バイオナノカプセル法は、本遺伝子送達概念をin vivoに適用するための不可欠の方法であり、その安定供給条件を最初に確立しておくことが必要である。中空バイオナノ粒子法の精製が超遠心分離に依存しているために、1週間1種類1mgが上限であったが、クロマトグラフィー法を導入することで、1週間

2-3種類各20mgの生産が可能になった。また、PKAキャリアーを用いて調製した遺伝子複合体の封入する検討も開始したが、上述のように遺伝子との複合体のサイズが中空バイオナノカプセルのサイズと等しいため封入効率が悪いことが分かった。今後、サイズを減少できるタイプのキャリアーを用いて検討する。

2-4. 循環器系疾患への適用

本システムを循環器系疾患に適用するために、冠状動脈における攣縮や、内皮傷害に基づく内皮肥厚へのアプローチを考えている。今年度は、これらの実験モデル確立のため、ナノ粒子を用いた内皮肥厚抑制実験系を検討した。すなわち、病変選択機能を有するナノカプセルに薬物（遺伝子）を内包させ、副作用の少ないナノ治療系を検討した。具体的には、抗増殖薬であるドキソルビシンを内包し血管透過性亢進部位に集積する特徴を有するナノカプセルであるNK911の血管病変形成抑制効果を、ラット頸動脈のバルーン傷害モデルにおいて検討した。その結果、同モデルにおいて、バルーン傷害後にNK911を静注するだけで、バルーン傷害部位（内皮剥離部位）にドキソルビシンが選択的に送達され、4週間後の血管病変の形成が有意に抑制された。また、NK911の全身投与に伴う副作用は認めなかった。この結果から、ナノカプセルを用いたナノ治療が循環器領域で実際に臨床応用できる可能性が、初めて示された。

2-5. ウイルス疾患への適用

ウイルス疾患へ本システムを適用するためには、ウイルス感染をアッセイする手法の確立が不可欠であり、今年度は、それを確立した。これまでに、単純ヘルペスウイルス1型のimmediate earlyのpre-mRNA4/5に対するアンチセンスDNAを種々作成し、ウイルス感染細胞の細胞変成（CPE）に及ぼす影響を観察することで*in vitro*の抗ヘルペス効果を報告してきた。他にも抗ヘルペス効果を検討するためにプラーク法やウイルスDNAの半定量化を試みてきた。しかしながら、これらの方法は多検体処理には不向きで、手技者の主観が入るなど正確さの面で問題がある。そこで、多検体処理を行うためにMTT法による抗ヘルペス効果の判定とさらに簡便なアッセイ系の検討を行った。その結果、良好なアッセイ系を確立することができた。

また、ポリアニオンであるアンチセンスDNAは細胞膜透過性が著しく悪いにも関わらず、ある程度の抗ウイルス効果が認められている。そこで、ウイルス感染細胞とウイルス非感染細胞におけるアンチセンスDNAの細胞内分布を比較した。ウイルス非感染細胞では、細胞質の細胞小器官と思われる部分にしか存在しなかった。一方、ウイルス感染細胞ではアンチセンスDNAが高率にしかも核へ分布しているのが認められた。さらに、細胞のどの小器官に存在しているかを細胞の微細構造と共に明らかにするために、アンチセンスDNAの透過型電子顕微鏡による観察を行っている。今後は、ウイルス感染細胞におけるアンチセンスDNAのみならず他の薬物動態についてさらに詳細な検討を加えて行く。

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：細胞内シグナル応答型遺伝子キャリアーの開発と細胞での評価

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：細胞内シグナル応答型システムのin vivo適用のための中空バイオナノ粒子法の開発

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：細胞内シグナル応答型システムの循環器系疾患への適用

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微生物学講座、講師）
- ② 研究項目：細胞内シグナル応答型システムのウイルス性疾患への適用

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

- Masaharu Murata, Tomo Yamasaki, Mizuo Maeda, Yoshiki Katayama,
An artificial regulation system for DNA-transcription: learning from prokaryotic organism, *Chemistry Letters*, **33**(1), pp.4-5, 2004
- Masaharu Murata and Yoshiki Katayama,
Mass-tag technology for monitoring of protein kinase activity using mass spectrometry, Tatsuhiko Sonoda, Shuhei Shigaki, Takeyuki Nagashima, Osamu Okitsu, Yasuhiro Kita, *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters* 14, pp.847-850, 2004
- Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, M. Murata, N. Shigetani, K. Yoshimitsu, H. Shimokawa, Y. Katayama,
First Functionalized MRI Contrast Agent Recognizing Vascular Lesions, T. Yamamoto, K. Anal. Sci. 20, 5-7 (2004)
- T. Yamada, Y. Iwasaki, H. Tada, H. Iwabuki, M. K. L. Chuah, T. VandenDriessche, H. Fukuda, A. Kondo, M. Ueda, M. Seno, K. Tanizawa, and S. Kuroda,
“Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes”,

Nature Biotechnol., Vol. 21, pp. 885-890 (2003).

- Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, Matsumoto Y, Hattori T, Oi K, Matsuda T, Kataoka K, Takeshita A.

Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats. *Circ Res.* 92:e62-e69, 2003.

- Shoji Y, Nakashima H.

Current status of delivery systems to improve target efficacy of oligonucleotides.

Current Pharmaceutical Design 2004, 10, 785-796.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：2件）