

「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 17 年度は以下の検討を行なった。(1) 実用化のための新基質開発、(2) 基質探索用ペプチドアレイの開発、(3) Src、IKK、Rho kinase にそれぞれ応答するキャリアの開発(4) 中空バイオナノ粒子へのキャリア／遺伝子複合体封入と細胞導入法の開発、(5) キャリア／遺伝子の基本設計法と複合体のシグナルによる発現制御メカニズムの検討。(1) に関しては、これまで存在しなかった PKC α 、 β 、 η 、Rho kinase にそれぞれ極めて特異的な基質を開発することに成功した。前 2 者は各種ガン、 η は脳腫瘍、Rho kinase は循環器疾患に重要なシグナルであり、基質そのものも非常に有用なものである。(2) に関しては、テイラーメイド医療に資するため、個人レベルに合わせた能力の基質をハイスループットに探索できるペプチドアレイシステムの開発に成功した。(3) に関しては、それぞれのシグナル応答ペプチドをグラフトしたキャリアを合成し、Src、Rho kinase の系では無細胞系、IKK 応答型に関しては、細胞レベルでの制御に成功した。(4) に関しては、中空バイオナノ粒子への複合体の封入法を確立し、細胞内に導入して標的シグナルに対する遺伝子制御に成功した。(5) に関しては、カチオン性基質以外のキナーゼに適用できるキャリア設計の一般化、複合体のシグナル応答メカニズムに関して詳細に検討し、遺伝子制御機序を明らかにして、キャリア設計指針に有用な情報を得た。これらの成果は、本概念の普遍化、in vivo への適用、実用化に大きく資するものである。

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) 新規基質の設計、開発

本概念(D-RECS:細胞内シグナル応答型薬物・遺伝子送達)を実用化するには、標的シグナルに高度に特異的な基質が必要である。ガンに対しては、PKC シグナルが有効であることが分かっていたが、PKC には 11種(ヒトでは 10 種)のサブタイプがあり、これらが組織と病態依存的に活性変化することが分かっている。特に PKC α と β は、ガンに深く関連するキナーゼであるが、極めて基

質特異性が似ており、これを見分ける基質は存在しなかった。今回、両者を完全に見分けることができ、他のサブタイプにも大きな特異性を有する基質の開発に成功した。 α と β はこれまで役割は同様と考えられてきたが、ガンのフェーズにより全く異なる挙動をとることが分かってきており、本基質は D-RECS に極めて有効であるばかりでなく、それ自体ががんの診断に用いることができると期待できる。また、最近グリオーマで特異的に亢進していることが分かった PKC η に関しても極めて特異的な基質の設計に成功した。一方、Rho kinase は循環器疾患の増悪に重要なキナーゼであるが、これに関しても基質選択性が PKA や PKC と非常に似通っており、これまで特異的な基質が存在しなかったが、非常に特異的な基質の開発に成功した。これらの基質に関しては特許申請中である。IKK 基質に関しても、応答性の優れた基質を見出している。

(2) 基質探索用ペプチドアレイの開発

テイラーメイド遺伝子治療のためには、個々の患者からの細胞を用いて、その患者にとって最も応答性のよい基質を探索する必要がある。そこで、種々の基質配列を持つペプチドライブラリーの設計と合成を開始し、それを用いたペプチドアレイによる基質スクリーニングシステムの開発に成功した。例えば、PKA に応答する可能性のあるペプチド数百種類を合成し、左のスキームでアレイ化して酵素との反応性を評価したところ、精製酵素での反応性と、細胞に PKA を強制発現してその溶解液を使用した際の評価結果はよい一致を示し、実際に細胞内で活性化している標的シグナルに応答する基質の探索に有効であるということが分かった。すなわち、これで、個々人に専用の治療用キャリアを用意できることになり、テイラーメイド型新規遺伝子治療システムの実現に大きな進展が見られた。

(3) Src、IKK、Rho kinase にそれぞれ応答するキャリアの開発

Src はチロシンキナーゼであり、種々のがん細胞で特異的に亢進している。チロシンキナーゼに応答するキャリアは知見がなく、さらにチロシンキナーゼ型基質はアニオン性のものが多く、全体としてカチオン荷電を有する基質を用いることが必須の今回の概念に適用するには新しい設計法が必要であった。種々検討の結果、アニオン性基質に適当なリンカーを介してカチオン性アミノ酸を導入して全体としてカチオン性にするすることで、このような標的キナーゼにも本概念が適用可能であることをみだし、実際に、無細胞形で Src に非常によく応答するキャリアの開発に成功した。IKK は、炎症などで活性化する临床上極めて重要な転写因子 NF- κ B を活性化するキナーゼで、今回開発に成功した IKK 基質を用いて、アクリルアミド型とイソプロピルアクリルアミド型のキャリアを設計、合成した。本キャリアにより遺伝子を細胞に導入した結果、細胞を TNF α で刺激して IKK-NF κ -B シグナルカスケードが活性化したときのみ導入遺伝子を発現させることに成功した。Rho kinase に対しても開発した基質を用いてキャリアを合成し、期待した応答性を得ている。これらの結果は、D-RECS を種々の疾患に適用するために、大きなステップであると考えており、本年度は、この系も動物を用いた臨床応用に適用を開始する予定である。

(4) 中空バイオナノ粒子への複合体の封入法の確立と細胞内導入

中空バイオナノ粒子に D-RECS システムを封入できれば、標的臓器にバイオナノ粒子で送

達した後、細胞内シグナルにより疾患細胞と正常細胞を見分けるという、in vivo での理想的なダブルターゲティングが可能となる。しかし、この粒子に開発したキャリアと遺伝子の複合体を封入する手法にかなりの検討が必要であった。種々の手法を検討した結果、脂質キャリアに PEG を導入し、高分子主鎖を疎水性にすることで、遺伝子との複合体のサイズを縮小し、リポソームを併用することで、非常に効率のよい封入法を開発することに成功した。この手法によりプロテインキナーゼ A に応答するシステムを用いて遺伝子を封入し、HepG2 細胞に導入したところ、フォルスコリン刺激により PKA シグナルが活性化したときのみ遺伝子の発現 (GFP) がみられ、初めて中空バイオナノ粒子を用いる本システムの送達法を確立することができた。これで、本粒子を用いる in vivo 適用法が確立できたので、本年度は PKC 応答システムを中心としたがん治療への応用を開始する。

(5) キャリア設計の一般化、複合体のシグナル応答メカニズム解明

以下の4つのことが明らかとなった。

- (i) 遺伝子との複合体の崩壊は、キャリア／遺伝子複合体内の基質の反応率によるものではなく、キャリアの正荷電が反応により相殺された時点で完結する。すなわち、複合体を迅速に応答させたい場合は、基質あたりの酵素反応における正荷電の減少を大きくすることが効果的である。
- (ii) これまでプロテインキナーゼ応答型システムの場合、リン酸アニオン荷電でのカチオン荷電相殺を遺伝子開放の引き金にする関係上、正荷電を多く含む Tat などの細胞透過型ペプチドは使えなかったが、基質とは別に Tat に正荷電を相殺するだけのアニオン性アミノ酸配列を連携したペプチドを導入しても、問題がないことが分かった。これにより、プロテインキナーゼ応答型キャリアの設計も非常に自由に行えるようになった。
- (iii) アニオン性基質しか利用できないターゲットでは、これまで D-RECS 概念の適用はできなかったが、基質内にカチオン配列を連結したり、高分子主鎖に別にカチオン配列を導入したりすることにより、アニオン型基質にも本概念が適用できることになった。これは、本概念での遺伝子制御が、あくまで高分子全体としての総荷電変化のみに応答することを示すものである。
- (iv) 標的シグナル酵素による遺伝子複合体崩壊を、蛍光による一分子観察で計測することに成功した。これにより、リアルタイムで複合体と酵素の反応を追跡できるほか、細胞内での挙動も追跡できるのではないかと期待している。これらのことが詳細に解明できれば、さらに有用なシステムを設計するための貴重な情報が得られるものと考えられる。

3. 研究実施体制

「片山」グループ(基質探索・PKC・Rho kinase 応答型開発)

①研究分担グループ長：片山 佳樹 (九州大学大学院工学研究院、教授)

②研究項目：

- ・基質ペプチドの開発
- ・ペプチドアレイの開発
- ・各種プロテインキナーゼ応答型キャリアの開発
- ・キャリア／遺伝子複合体の物性評価とシグナル制御メカニズム検討

「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：

- ・カプシド(中空バイオナノ粒子)への複合体の封入法の開発
- ・抗体を結合できる ZZ 粒子の開発

「下川」グループ

①研究分担グループ長：下川 宏明（東北大学大学院医学系研究科、教授）

②研究項目：

- ・ Rho kinase 評価系、循環器疾患評価系の開発

「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：

- ・ウイルスプロテアーゼ応答型システムの評価
- ・IKK 応答型システムの評価

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Takahito Kawano, Masato Yamagata, Hironobu Takahashi, Yasuro Niidome, Sunao Yamada, Yoshiki Katayama, Takuro Niidome, Stabilizing of plasmid DNA *in vivo* by PEG-modified cationic gold nanoparticles and the gene expression assisted with electrical pulses, *J. Control. Release* 111, 382-389 (2006)
- Aishan Han, Tatsuhiko Sonoda, Jeong-Hun Kang, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Development of a fluorescence peptide chip for the detection of caspase activity, *Comb. Chem. High T. Scr.* 9, 21-25, 2006.
- Yasunari Sakai, Vahid Khajoei, Yasuro Ogawa, Koichi Kusuhashi, Yoshiki Katayama, Toshiro Hara, A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma, *J. Biotechnol.* 121, 299-308, 2006
- Jun Oishi, Kenji Kawamura, Jeong-Hun Kang, Kota Kodama, Tatsuhiko Sonoda, Masaharu

- Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, An intracellular kinase signal-responsive gene carrier for disordered cell-specific gene therapy, *J. Control. Release* 110, 431-436, 2006
- Yada T, Shimokawa H, Kajiya F. Cardioprotective effect of hydroxyfasudil as a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microvessels. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 34:177-183,2006.
 - Tatsuhiko Sonoda, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Controlled gene delivery responding to cell signals using peptide-polymer conjugates, *Recent Res. Bioconjugate Chem.* 2, 145-158, 2005
 - Tatsuhiko Sonoda, Takashi Nogami, Jun Oishi, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, A Peptide Sequence Controls the Physical Properties of Nanoparticles Formed by Peptide-Polymer Conjugates That Respond to a Protein Kinase A Signal, *Bioconjugate Chem.* 16, 1542-1546, 2005
 - Kazuki Inamori, Motoki Kyo, Yoshiaki Nishiya, Yusuke Inoue, Tatsuhiko Sonoda, Eiji Kinoshita, Tohru Koike, Yoshiki Katayama, Detection and Quantification of On-Chip Phosphorylated Peptides by Surface Plasmon Resonance Imaging Techniques Using a Phosphate Capture Molecule, *Anal. Chem.*, 77, 3979-3985, 2005
 - Kenji Kawamura, Jun Oishi, Jeong Hun Kang, Kota Kodama, Tatsuhiko Sonoda, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Intracellular Signal-Responsive Gene Carrier for Cell-Specific Gene Expression, *Biomacromolecules*. 6, 908-913, 2005
 - Yu, D., Amano, C., Fukuda, T., Yamada, T., Kuroda, S., Tanizawa, K., Kondo, A., Ueda, M., Yamada, H., Tada, H., and Seno, M., The Specific Delivery of Proteins to Human Liver Cells by Engineered, Bio-Nanocapsules., *FEBS J.* 272 3651-3660, 2005.
 - Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, Tanaka H, Kishi T, Hayashidani S, Abe K, Takeshita A, Shimokawa H. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart*. 91:391-392,2005.
 - Ito K, Hirooka Y, Kimura Y, Shimokawa H, Takeshita A: Effects of hydroxyfasudil administered to the nucleus tractus solitarii on blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 3:269-277,2005.
 - Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajiya T, Shigeto F, Tanaka E, Shinozaki Y, Mori H, Kiyooka T, Katsura M, Ohkuma S, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. Beneficial effects of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. *J Am Coll Cardiol*. 45:599-607,2005.
 - Abe K, Morikawa K, Hizume T, Uwatoku T, Oi K, Seto M, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Shimokawa H. Prostacyclin does not inhibit Rho-kinase: An implication for the treatment of pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 45:120-124,2005.
 - Kishi T, Hirooka Y, Masumoto A, Ito K, Kimura Y, Inokuchi K, Tagawa T, Shimokawa H,

- Takeshita A, Sunagawa K. Rho-kinase inhibitor improves increased vascular resistance and impaired vasodilation of the forearm in patients with heart failure. *Circulation*. 111:2741-2747,2005.
- Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, Morris KG, Suzuki T, Shimokawa H, McMurtry IF, Oka M. Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Critical Care Med*. 171:494-499,2005.
 - Hedjazifar S, Jenndahl LE, Shimokawa H, Baeckström D. PKB mediates c-erbB2-induced epithelial α 1 integrin conformational inactivation through Rho-independent F-actin rearrangements. *Exp Cell Res*. 307:259-275,2005.
 - Rao PV, Deng P, Maddala R, Epstein DL, Li CY, Shimokawa H. Expression of dominant-negative Rho-binding domain of Rho-kinase in organ cultured human eye anterior segments increases aqueous humor outflow. *Mol Vision*. 11:288-297,2005.
 - Ito K, Hirooka Y, Hori N, Kimura Y, Sagara Y, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K. Inhibition of Rho-kinase in the nucleus tractus solitarius enhances glutamate sensitivity in rats. *Hypertension*. 46:360-365,2005.
 - Kozai T, Eto M, Matter C, Young Z, Shimokawa H, Luscher T. Stains prevent pulsatile stretch-induced proliferation of human saphenous vein smooth muscle cells via inhibition of Rho/Rho-kinase pathway. *Cardiovasc Res*. 68:475-482,2005.
 - Wakabayashi H., Nishishiro M, Arikawa S, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Kurihara T, Terakubo S, Shoji Y, Nakashima H, Motohashi N, sakagami H. Cytotoxic activity of azulenequinones against human oral tumor cell line. *Anticancer Res*. 25:305-312,2005
 - 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. Cytotoxicity and radical modulating activity of Moxa smoke. *In Vivo* 19:391-398,2005

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：3 件（CREST 研究期間累積件数：10 件）