

「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 18 年度は以下の検討を行なった。(1) プロテインキナーゼ C α 応答型システムによるガン特異的遺伝子制御法の開発、(2) Src 応答型システムの開発と、それを用いた遺伝子制御メカニズム解明、(3) I- κ -kinase 応答型システムの開発、(4) ウイルスプロテアーゼ応答型システムの開発、(5) *in vivo* 投与のための中空バイオナノ粒子の検討、(6) *in vivo* 投与のためのプラズマ型導入装置開発、(7) *in vivo* 投与のための MEND の応用の検討、(8) 基質探索のためのペプチドアレイの検討。(1)に関しては、細胞での検討および、担ガンマウスを用いた検討で、非常に高い特異性でガンのみで遺伝子を発現させることに成功した。(2)でも、Src 応答型システムの開発に成功し、細胞での遺伝子制御に成功、さらに、1 分子観察によりリン酸化に伴う複合体の崩壊挙動、複合体の荷電変化、複合体上での転写を観察することに成功した。(3)では、目的のキャリアーの合成に成功し、やはり細胞内での良好な遺伝子制御を実現した。(4)に関しては、各プロテアーゼに応答する基質の設計と遺伝子制御剤の合成に成功した。(5)では、バイオナノ粒子内に複合体を封入して、ガンへの局注では遺伝子を制御できることを明らかにした。(6)では、ペンシル型のプラズマ導入装置の試作品を開発した。(7)では、MEND に複合体を封入して、細胞レベルで遺伝子制御が可能であることを明らかにした。(8)では、1200 種のペプチドライブラリを用いてきしつをスクリーニングできることを実証した。これらの成果は、本システムの制御メカニズムに迫りつつ、*in vivo* への適用にめどをつけ、実用化に大きく踏み出すものとして非常に価値のある成果である。

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)プロテインキナーゼ C α (PKC α) 応答型システムによるガン特異的遺伝子制御法の開発

前年度に開発した、ガンで特異的に亢進することが知られているプロテインキナーゼ α に特異的

な基質を評価し、実際に他のサブタイプに対する特異性を定量的に解析した後、これを利用した高分子型遺伝子制御剤を合成した。これを細胞内にマイクロインジェクションで導入したところ、きわめて良好な PKC α 特異的な遺伝子の発現制御が可能であった。そこで、次に B16 メラノーマを移植した担ガンマウスを作成し、これにルシフェラーゼ遺伝子と本遺伝子制御剤の複合体を局注したところ、正常皮下組織への皮下投与ではまったく発現が認められなかったのに対し、腫瘍内投与では、顕著な発現が認められた。また、リン酸化部位をアラニンに変換した negative control では、遺伝子の発現は認められなかった。これは、細胞内シグナルを用いて in vivo でガン特異的な遺伝子制御を実現した初めての成果であり、既存の方法に比べその特異性はきわめて良好であった。

(2) Src 応答型システムの開発と、それを用いた遺伝子制御メカニズム解明

Src に対する基質は、カチオン性ではないため、これにリジンを追加した基質を新たに開発し、これを組み込んだ遺伝子制御剤を開発した。これを GFP 遺伝子との複合体にして、細胞内にマイクロインジェクションにより導入すると、Src が更新したガン細胞で顕著な発現が見られ、一方、リン酸化部位であるチロシンをフェニルアラニンに変えた Negative Control ポリマーでは遺伝子の発現は認められず、本制御剤が実際に細胞内で Src に応答した遺伝子発現制御を行っていることを実証できた。次に、この遺伝子との複合体を DAPI 染色して、蛍光顕微鏡下で 1 分子観察したところ、Src の添加により、複合体が急下に崩壊する様子が観察できた。また、顕微鏡視野下で電気泳動を行うことで、初め正に帯電していた複合体が、リン酸化の進行に伴い、電荷が中和され、その後遺伝子を放出していく様子を実証できた。さらに、複合体上で実際に遺伝子が転写されている様子を確認することにも成功した。これらの結果は、本制御剤による遺伝子転写の制御がリン酸化の進行に伴う物性変化による事、また、複合体からの完全な遺伝子放出がなくても、複合体がゆるむことで、変化する事を示している。

(3) I- κ -kinase 応答型システムの開発

前年度に調製した I- κ -kinase 応答型高分子の詳細な機能評価を実施した。まず、陰性コントロール高分子として基質リン酸化部位の Ser を Ala へ置換したアナログを合成した。次いで、ペプチド基質のみならず、アクリルアミド高分子が I- κ -kinase によりリン酸化を受けているかを評価するために、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いたキナーゼアッセイ系を構築して調べた。その結果、Ser 体高分子にのみ I- κ -kinase による有意なリン酸化が確認された。このアッセイ系は Src キナーゼ応答型高分子の被リン酸化能評価も可能であることが判明し、キナーゼ基質含有高分子の被リン酸化能評価に広く適用でき、有用である。次に、高分子-pDNA 複合体を複数種の培養細胞へマイクロインジェクション法により導入し、炎症性サイトカインで細胞を刺激して、高分子の遺伝子発現制御能を調べたところ、RAW264.7、NIH3T3、HeLa 細胞において炎症性サイトカイン刺激依存的な遺伝子発現が認められた。この現象は陰性コントロール高分子では見られなかった。これより、試験管内および培養細胞レベルにおける炎症性サイトカイン刺激に応じた遺伝子発現制御システムが確実なものとなった。

一方、上述の試作型高分子を用いて得られた結果をフィードバックして高分子に改良を加え、新たに複数種の機能性高分子を設計・合成した。

(4) ウイルスプロテアーゼ応答型システムの開発

HIV-1、HTLV-1、HCV の3種のウイルスプロテアーゼを標的として、これらに応答する機能性高分子の設計・合成、機能評価を行った。HIV-1、HTLV-1 プロテアーゼ応答型については、ヒト T リンパ球由来培養細胞 MT-4 細胞および Mo1t-4 細胞への効率の良い導入を達成すべく、膜透過性ペプチド修飾法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法を検討したが、いずれをもっても期待した導入率を得るに至らなかった。上述の試作型高分子を用いて得られた結果をフィードバックして、高分子の物性（ゼータ電位および高分子-pDNA 複合体の粒子半径）およびペプチド基質配列の面から改良を加え、新たに複数種の機能性高分子を設計・合成した。一方 HCV プロテアーゼ応答型については、複数種の基質ペプチドの設計・合成を行い、リコンビナント HCV プロテアーゼを用いて合成基質の評価を実施した。その結果、1種の優れたペプチド基質を見出した。

感染細胞におけるウイルスプロテアーゼ応答型機能性高分子の評価のため、接着細胞への感染実験が可能であるコクサッキーウイルス (CV) プロテアーゼを標的としたシステムの構築を開始した。CV プロテアーゼをクローニングして活性型リコンビナント CV プロテアーゼを調製した。複数種の基質ペプチドの設計・合成を行い、前述のリコンビナント CV プロテアーゼを用いて評価したところ、数種の優れたペプチド基質を見出した。

(5) in vivo 投与のための中空バイオナノ粒子の検討

中空バイオナノ粒子に細胞内シグナル応答型遺伝子を入れるために、カチオン性のリポソームと中空バイオナノ粒子の融合法を検討し、簡便・効率的な中空バイオナノ粒子への遺伝子封入法としてリポソームとの融合方法を新しく開発することに成功した。次に、細胞内シグナル応答型遺伝子を封入した中空バイオナノ粒子を培養細胞に導入して、その遺伝子発現を GFP 蛍光及びルシフェラーゼ活性により測定したところ、PKA, および PKC 応答型システムにおいて、良好な標的シグナル依存性の遺伝子発現制御能を認めた。また、担癌マウスモデルを用いて中空バイオナノ粒子に PKC 応答型の遺伝子(ルシフェラーゼ)複合体を封入して局注したところ、ヒト肝がん細胞に特異的な発現を認めた。さらに、肝がん以外の組織への遺伝子デリバリーのために、抗体結合が可能な Z Z 粒子を用いて野生型中空バイオナノ粒子と同様な実験を行い、再標的化を行った。

(6) in vivo 投与のためのプラズマ型導入装置開発

in vivo での導入法に資するため、ペンシル型のプラズマ発生装置を試作することに成功した。また、同時に、ハイスループットアッセイに用いる事のできるプレート用のプラズマ型導入装置の施策も検討した。

(7) in vivo 投与のための MEND の応用の検討

北大原島研究室で開発されている MEND に本遺伝子・制御剤複合体を封入する事を試みた。その結果、封入に成功し、細胞レベルでは、PKC 応答型において、PKC が亢進した細胞での遺伝子の発現が認められ、細胞を PKC 阻害剤で前処理したり、リン酸化部位をアラニンに変えた Negative Control では、遺伝子の発現は認められなかった。

(8) 基質探索のためのペプチドアレイの検討

我々が開発したペプチドアレイによる基質探索能を実証するために、ペプチドライブラリを用いて種々のキナーゼの基質探索を行った。質量分析での検証を併用する事により、多くの新規基質を見出す事に成功した。

3. 研究実施体制

(1)「片山」グループ (PKC, PKA, Src, I- κ -kinase 応答型システム、in vivo 適用検討、基質探索)

①研究者名

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
- ・ 各種プロテインキナーゼ応答型遺伝子制御剤の開発
- ・ キャリヤ/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
- ・ in vivo 適用法の検討

(2)「谷澤」グループ (中空バイオナノ粒子の利用検討)

①研究者名

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遺伝子制御システムを中空バイオナノ粒子に封入する最適化条件検討
- ・ 動物モデルを用いて遺伝子治療に適した投与条件を検討

(3)「下川」グループ (Rho kinase の病態関与の検討)

①研究者名

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 の一連の循環器疾患における関与の検証

(4)「東海林」グループ (ウイルスプロテアーゼ, I- κ -kinase 応答型システム、基質評価、細胞内導入法検討)

①研究者名

東海林 洋子 (聖マリアンナ医科大学医学部 准教授)

②研究項目

- ・ 各種ウイルスプロテアーゼ応答型システムの開発
- ・ I- κ -kinase 応答型システムの評価

- ・各種基室能評価
- ・細胞内マイクロインジェクションによる評価

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Jun Oishi, Yoji Asami, Takeshi Mori, Jeong-Hun Kang, Miharuru Tanabe, Takuro Niidome, Yoshiaki Katayama, Measurement of homogeneous kinase activity for cell lysates based on the aggregation of gold nanoparticles, *ChemBioChem*, 8, 1-5, (2007)
- Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Jun Oishi, Kenji Kawamura, Riki Toita, Yuhua Jiang, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiaki Katayama, Role of plasma as activator and cofactor in phosphorylation by protein kinase C, *Cell Biochem. Funct.* in press
- Jeong-Hun Kang, Aishan Han, Shuhei Shigaki, Jun Oishi, Kenji Kawamura, Riki Toita, Xiao Ming Han, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiaki Katayama, Mass-tag technology responding to intracellular signals as a novel assay system for the diagnosis of tumor, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 18, 106-112 (2007)
- Jeong-Hun Kang, Yuhua Jiang, Riki Toita, Jun Oishi, Kenji Kawamura, Aishan Han, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Masami Ishida, Kenji Tatematsu, Katsuyuki Tanizawa, Yoshiaki Katayama, Phosphorylation of Rho-associated kinase (Rho-kinase/ROCK/ROK) substrates by protein kinases A and C, *Biochimie*, 89, 39-47 (2007)
- Iwasaki, Y., Ueda, M., Yamada, T., Kondo, A., Seno, M., Tanizawa, K., Kuroda, S., Sakamoto, M., and Kitajima, M., Gene Therapy of Liver Tumors with Human Liver-Specific Nanoparticles, *Cancer Gene Ther.* 14, 74-81 (2007).
- Nagaoka, T., Fukuda, T., Yoshida, S., Yu, D., Kuroda, S., Tanizawa, K., Kondo, A., Ueda, M., Yamada, H., Tada, H., and Seno, M., Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modification, *J Control Release* 118, 348-356 (2007).
- Kita T, Hata Y, Kano K, Miura M, Nakao S, Noda Y, Shimokawa H, Ishibashi T. Transforming growth factor-β2 and connective tissue growth factor in proliferative vitreoretinal diseases. Possible involvement of hyalocytes and therapeutic potential of Rho kinase inhibitor. *Diabetes*. 56:231-238 (2007).
- Jiang BH, Tawara S, Abe K, Takaki A, Fukumoto Y, Shimokawa H. Acute vasodilator effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 49:85-89, (2007).
- Fukumoto Y, Mohri M, Inokuchi K, Ito A, Hirakawa Y, Masumoto A, Hirooka Y, Takeshita A, Shimokawa H. Anti-ischemic effects of fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina. *J Cardiovasc Pharmacol.* (in press).

- Yomura Y, Shoji Y, Asai D, Murakami E, Ueno S, Nakashima H.: Direct, real-time, simultaneous monitoring of intravitreal nitric oxide and oxygen in endotoxin-induced uveitis in rabbits., *Life Sci.*, **80**, 1449-1457 (2007)
- Kang JH, Asai D, Oishi J, Kawamura K, Toita R, Jiang Y, Mori T, Niidome T, Katayama Y.: Role of plasma as activator and cofactor in phosphorylation catalyzed by protein kinase C., *Cell Biochem Funct.*, in press
- Kenji Kawamura, Jun Oishi, Shigeki Sakakihara, Takuto Niidome, Yoshiki Katayama, Intracellular signal-responsive artificial gene regulation. *J. Drug Target.* **14**, 456-464 (2006)
- Jun Oishi, Moeko Ijuin, Tatsuhiko Sonoda, Jeong-Hun Kang, Kenji Kawamura, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, A protein kinase signal-responsive gene carrier modified RGD peptide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 5740-5743 (2006)
- Kota Kodama, Yoshiki Katayama, Yoko Shoji, Hideki Nakashima. The features and shortcomings for gene delivery of current non-viral carriers, *Curr. Med. Chem.*, **13**, 2155-2161 (2006)
- Jeong-Hun Kang, Riki Toita, Yuhua Jiang, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Simultaneous analysis of phosphorylated peptides by MALDI-TOF-MS, *Chromatographia*, **63**, 595-598 (2006)
- Jun Oishi, Kenji Kawamura, Jeong-Hun Kang, Kota Kodama, Tatsuhiko Sonoda, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, An intracellular kinase signal-responsible gene carrier for disordered cell-specific gene therapy, *J. Control. Release* **110**, 431-436 (2006)
- Yasunari Sakai, Vahid Khajoe, Yasuro Ogawa, Koichi Kusuhara, Yoshiki Katayama, Toshiro Hara, A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma, *J. Biotechnol.* **121**, 299-308 (2006)
- Shishido, T., Muraoka, M., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., Kuroda, S., Fukuda, H., and Kondo. A., Secretory production system of bionanocapsules using a stably transfected insect cell line, *Appl. Microbial. Biotechnol.* **73**, 505-511 (2006)
- Peridsky Y, Heilman D, Haorah J, Zelivyanskaya M, Persidsky R, Weber GA, Shimokawa H, Kaibuchi K, Ikezu T. Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across blood-brain barrier in HIV encephalitis (HIVE). *Blood.* **107**:4770-4780 (2006)..
- Furuyama T, Komori K, Shimokawa H, Matsumoto Y, Uwatoku T, Hirano K, Yoshihiko Maehara Y. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses intimal thickening in autologous vein graft in rabbits. *J Vasc Surg.* **43**:1249-1256 (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. *Clin Hemorheol Microcirc.* **34**:177-183 (2006).
- Chapados R, Abe K, Elliot J, Ihida-Stunbery K, McKean D, Gates AT, Kern M, Merklinger S,

- Elliot J, Plant A, Shimokawa H, Jones PL. ROCK controls matrix remodeling in pulmonary hypertension. *Circ Res.* 99:837-844 (2006).
- Sun X, Minohara M, Kikuchi H, Ishizu T, Tanaka M, Piao H, Osoegawa M, Ohyagi Y, Shimokawa H, Kira J. The selective Rho-kinase inhibitor Fasudil is protective and therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 180:126-134 (2006).
 - Hizume T, Morikawa K, Takaki A, Abe K, Sunagawa K, Amano M, Kaibuchi K, Kubo C, Shimokawa H. Sustained elevation of serum cortisol level causes sensitization of coronary vasoconstricting responses in pigs in vivo. - A possible link between stress and coronary vasospasm -. *Circ Res.* 99:767-775 (2006).
 - Abe K, Tawara S, Oi K, Hizume T, Uwatoku T, Fukumoto Y, Kaibuchi K, Shimokawa H. Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 48:280-285 (2006).
 - Miura M, Hata Y, Hiratyama K, Kita T, Noda Y, Fujisawa K, Shimokawa H, Ishibashi T. Critical role of the Rho-kinase pathway in TGF- β 2-dependent collagen gel contraction by retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 82:849-859 (2006).

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:12 件(CREST 研究期間累積件数:22 件)