

200400181A

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術開発 研究事業

「ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による
局所DDSの開発のための基盤研究」に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

国立国際医療センター 石坂幸人

平成17(2005)年 3月

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術開発 研究事業

「ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による
局所DDSの開発のための基盤研究」に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

国立国際医療センター 石坂幸人

平成17（2005）年 3月

目 次

I. 総合研究報告		
「ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による 局所DDSの開発のための基盤研究」に関する研究	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 「ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による 局所DDSの開発のための基盤研究」に関する研究		
石坂幸人	-----	4
2. 「磁性体ナノ粒子のペプチド付加、最適化」に関する研究		
長谷川正勝		
3. 「感温性高分子を用いたインテリジェント型リポゾームの構築」に関する研究		
河野健司		
4. 「磁性体粒子を用いた遺伝子導入効率の改善」に関する研究		
山下克美		
5. 「ヒト血液細胞に対するエンドゾームを介さない 高効率の分子導入法の技術開発」に関する研究		
湯尾 明		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	17

ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による
局所 DDS の開発のための基盤研究

主任研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部

研究要旨 本研究では、標的ペプチドを結合させた磁性体ナノミセルを用いて MRI による標的細胞の検出を行う一方、局所に磁場を照射することでの加温誘導を試みる。そして、感温性ミセルに同様のペプチドを付加し、ミセル中に包埋された薬剤を局所で放出させるための技術開発を目指している。本プロジェクトでは磁性体ナノ粒子へのペプチドの結合システムの確立、感温性ミセルの開発、磁場照射による磁性体からの加温誘導法の確立 の3つの条件をクリアすることが必須である。今年度は、以上の要件の内、2つの条件設定が可能になった。即ち、標的ペプチドを磁性体ナノ粒子に結合させ、これが標的分子に結合すること、そして MRI により、標的細胞を画像化することが可能になる一方、40 度を境に疎水性—親水性が変換する性質を有する高分子化合物を用いた感温性リポソームの開発研究が進展した。このミセルを用いることで、高温で初めて薬剤等の放出を可能にするシステムが可能になる。次年度には磁性体から誘導される誘導加温効果の条件を把握し、これを用いて感温性ミセルからの薬剤放出の可能性を明らかにする予定である。

分担研究者

長谷川正勝	名糖産業名古屋研究所	所長
河野健司	大阪府立大学工学部	教授
島 清彦	がん研究会	
	化学療法部門	部長
山下克美	金沢大学薬学部	助教授
湯尾 明	国立国際医療センター	
	血液疾患研究部	部長

A. 研究目的

本研究では、

- 標的ペプチド結合型磁性体を用いた標的細胞の MRI による画像化、
- 高周波照射による磁性体からの加温誘導、
- 同じく標的ペプチドを結合させた感温性ミセルを融解させることによる局所 DDS

を目指している。この試みを達成させるためにはいくつかの要件を満たすことが必要である。即ち、磁性体ナノ粒子に自在に標的ペプチドを結合させるシステム確立、また磁場を照射することにより、加温誘導される磁性体の調整。40 度以上で融解する性質を有するミセルの作成である。また将来的には、感温性を示す磁性体ナノ粒子の開発も視野に入れることも必要である。本年度は、ペプチド付加型磁性体ナノ粒子を用いて標的細胞を MRI により画像化することを試

みる一方、分担研究者である河野博士により、42-45 度で融解する感温性ミセルの開発を行った。

B. 研究方法

a. 標的ペプチドの磁性体ナノ粒子への結合
パイロット実験として、研究代表者が同定した標的ペプチド（RBP-1）を用いた基礎実験を行った。RBP-1 はレセプター型チロシンキナーゼの一つである RET に結合するペプチドである。RET は解析した全ての神経芽細胞腫細胞株で発現を認める分子で、正常組織ではシュワン細胞や造血幹細胞に発現している。RBP-1 は8個のアミノ酸からなるペプチドで、C 末端にグリシルーグリシン—システインを付与した形で合成し。システインの SH 基を介して種々の分子に結合させることが可能である。一方、磁性体ナノ粒子は名糖産業名古屋研究所が開発したもので、40-80 nm の大きさである。鉄分子の周囲にデキストランをコートしたものがプロトタイプで肝臓癌の MRI 診断のための造影増強剤（リゾビスト）としてすでに臨床に使用されている。さらに名糖産業の磁性体ナノミセルは高周波（磁場）の下に設置すると磁場強度及び時間依存的に温度上昇を示す特性があり、本プロジェクトの中心的な役割を果たす材料である。

プロトタイプの磁性体ナノ粒子にカルボキシル基を付与したカルボキシメチルデキストランマグネタイト（以下 CMDM）を今回用いた。結合の方法は、まず CMDM にマレイミド基を挿入し、ペプチドの SH 基と反応後させた。その後透析により、フリーのペプチドを除去した。

b. 磁性体結合型ペプチドを用いた標的化
磁性体ナノミセルに結合させた標的ペプチドが標的分子に対する結合性を検定した。まず、RBP-1 の標的分子である RET 遺伝子を HeLa 細胞に発現させ、高発現細胞を樹立した。その膜画分を調整して、ピアコアセンサーチップに結合させ、磁性体結合型ペプチドの結合性を解析した。

c. RET 発現細胞の MRI による検出
培養系に磁性体付加型ペプチドを作用させ、リンスした後に、細胞をプレートから剥離し、アクリルアミドを用いてガラス管内に包埋させた。これを NMR により画像化を試みた。

d. 感温性リポソームの作成
脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子である 2 エトキシエトキシエチルビニルエーテル-オクタデシルビニルエーテルブロック共重合体と卵黄ホスファチジルコリンおよびコレステロールに pH5 に調製した緩衝液を加え、エクストルーダー（孔径 100nm）を用いてリポソームを、作製した。このリポソーム分散液にアドリアマイシンを加え、インキュベートすることで ADR 内封共重合体修飾リポソームを調製した。リポソームからの ADR の放出は、種々の温度において ADR の蛍光強度を測定することで評価した。

C. 研究結果

a. 磁性体結合型ペプチドの標的細胞への結合
磁性体 1 分子に対して 10 個前後のペプチドが付加された化合物を用いて RET に対する結合性を検定したところ、結合性が確認された。高いモル比で RBP-1 を結合させた磁性体ナノミセルの結合性は必ずしも強くなかった。

b. RET 発現細胞の MRI による検出
In vitro でペプチド結合型磁性体ナノミセルを RET 発現細胞に作用させ、その後調整した細胞について MRI 解析を行ったところ、RET 依存的に MRI による陽性シグナルが得られた。

c. 感温性リポソームの性状
リポソームに複合化した共重合体はリポソーム膜上で、39.6℃において親水性から疎水性に変

化することが、熱分析によってわかった。pH 勾配法によって感温性リポソームへのアドリアマイシンの封入を行ったところ、効率よくアドリアマイシンがリポソーム内部に封入できることがわかった。

このようにして調製したアドリアマイシン内包感温性高分子修飾リポソームからのアドリアマイシンの放出の温度依存性について調べた。39℃以下においては、アドリアマイシンの放出は、ほとんど起こらなかったが、40℃以上においては、温度の上昇とともに急激にアドリアマイシンの放出が起こることがわかった。

リポソームの温度感受性に及ぼす共重合体の分子量の影響を調べるために、分子量 6700、9300、および 16700 の共重合体で修飾したリポソームからのカルセインの放出を調べた。その結果、分子量の大きな共重合体で修飾したリポソームほどより著しい内包物質の放出が誘導された。

さらに、血中滞留性が高いリポソームであるポリエチレングリコール（PEG）脂質含有リポソームに共重合体を導入することによって温度感受性の付与を試みた。共重合体修飾リポソームに種々の含有率で分子量 5000 の PEG 脂質を含有させたところ、PEG 脂質含率 2%までは、共重合体の転移温度付近において鋭敏にアドリアマイシンを放出することがわかった。しかし、さらに PEG 脂質の含率を高めた場合、アドリアマイシンの放出が起こる温度が高温側にシフトした。PEG 鎖の存在によって、共重合体とリポソーム膜との相互作用が抑制されたためと考えられる。

D. 考察

ペプチド結合型磁性体ナノミセルを用いた標的細胞の画像化が可能であることが示唆された。In vivo の実験としてヌードマウスの皮下に RET 陽性腫瘍細胞を移植し、尾静脈から磁性体ナノミセルを打ち込むことによる標的細胞の画像化を現在試みている。また次年度では、さらにいくつかのペプチドを用いて標的細胞の画像化を試みる予定である。

河野教授が開発した感温性リポソームを用いることで、局所 DDS の実現性が具体化されつつある。外部からの物理的刺激により、局所の温度を上昇させることで、DDS が可能になると期待される。どのような物理的刺激を使用するかについては現在のところ選択肢として2つが考えられる。一つは超音波を多方向から与え、交差点で温度上昇を誘導させるためのシステムすでに開発されている。今回の本プロジェクトは、新規加温誘導システムの開発も視野に入れており、磁場を用いたシステム開発を試みる。局所に集

積した磁性体ナノミセルに磁場による加温誘導を行うことの可能性を明らかにする。

次年度では、この重要案件を明らかにすることが研究の一つの中心になる。ヌードマウス皮下に移植された標的細胞に集積する磁性体ナノミセルの分子数は究めて少ないことが予測される。一個の感温性ナノミセルを誘導加温により融解するために必要な磁性体ナノミセルの量と照射する磁場の強度を検定することが肝要である。現在の加温誘導効果の判定は、ある一定の量の磁性体溶液を磁場にさらし、溶液の温度を測定することで行っている。しかし、溶液全体の温度上昇を誘導するためには、多量の磁性体が必要である。今回の目的は感温性ナノ粒子を融解するため必要な局所（ナノレベル）での誘導加温トランスファーであることから、特別なアッセイシステムを組むことが必要である。すなわち、磁性体ナノ粒子と感温性リポソームを一定の量比で混合した溶液を作成し、これをマイクロインジェクション法で細胞内に投与した後、磁場を照射する。その後、感温性ミセルから放出される色素の有無を以って加温効果を検定することを予定している。また、磁性体を含む感温性ナノミセルの作成や感温性を示す磁性体ナノ粒子の開発も重要と思われる。次年度では分担研究者とともに、以上の点について解析する予定である。

E. 結論

ペプチド付加型磁性体ナノミセルを用いて標的細胞を画像化することが可能になった。次年度では標的細胞選択的に加温誘導するためのシステムの構築を行う。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Taguchi T., Shimura M., Osawa Y., Suzuki Y., Mizoguchi I., Niino K., Takaku F., and Ishizaka Y. Nuclear trafficking of macromolecules by an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 18-26, 2004.
2. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, 3011-3020, 2004.
3. Shimura, M., et al. Element array after CDDP treatment by scanning x-ray fluorescence microscopy. Submitted.

4. Shimura M. et al. Premature sister chromatid separation by Vpr-induced disruption of heterochromatin protein 1. Submitted.

5. Kono, K. et al. Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery, *Bioconjugate Chem.*, 16, 208-214 2005.

6. Haba, Y. et al. Synthesis of biocompatible dendrimers with a peripheral network formed by linking of polymerizable groups, *Polymer*, 46, 1813-1820 2005.

7. Haba, Y. et al. Rendering poly(amidoamine) or poly(propyleneimine) dendrimers temperature sensitive, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 12760-12761 2004.

8. Yoshino, K. et al. Temperature-sensitization of liposomes by use of N-isopropylacrylamide copolymers with varying transition endotherms, *Bioconjugate Chem.* 15, 1102-1109 2004.

9. Kono, K., Takagishi, T. Temperature-sensitive liposomes, *Methods in Enzymology*, 387, 73-82 2004.

2. 学会発表

1. Shimura M, Ishizaka Y. Aberrant sister chromatid separation by HIV-1 VPR coupled with disruption of HP1a and kinetochore components. 第 20 回 Oncogene Meeting, Frederick, Maryland, USA, 6 月, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 国際出願番号: PCT/JP97/03009

発明人: 丸野重雄、長谷川正勝、花市正敬、長江英夫、村瀬勝俊、山田永人

発明の名称: 「多糖誘導体—磁性金属酸化物複合体」

出願人: 名糖産業株式会社、丸野重雄

出願日: 1997/08/28

2) 日本国特許番号: 第 2726520 号

発明者: 丸野重雄、長谷川正勝

発明の名称: 「有機磁性複合体」

出願人: 名糖産業株式会社、丸野重雄

出願日: 1989/10/20

ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による 局所 DDS の開発のための基盤研究

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部

研究要旨 本研究では、標的ペプチドを結合させた磁性体ナノミセルを用いて MRI による標的細胞の検出を試みる一方、局所に磁場を照射することで加温誘導を行うことを試みる。そして、感温性ミセルに同様のペプチドを付加し、ミセル中に包埋させた薬剤を局所で放出させるための技術開発を目指している。今年度は標的ペプチドを磁性体ナノ粒子に結合させ、これが標的分子に結合すること、さらに MRI により、標的細胞を画像化することに成功した。

A. 研究目的

レセプター型チロシンキナーゼの一つである RET に結合するペプチドを用いて細胞標的に向けたパイロット実験を行う。RET は解析した全ての神経芽細胞腫細胞株で発現を認める分子で、正常組織ではシュワン細胞や造血幹細胞に発現している。これまでに RET の細胞外ドメインをリコンビナント蛋白質として発現させ、これに結合する 8 個のアミノ酸からなるペプチド（以下 RBP-1; RET binding peptide）同定した。本プロジェクトでは、この RBP-1 をパイロット実験として用いている。すなわち、RBP-1 を磁性体に結合させる一方、感温性ナノミセルに結合し、MRI で標的細胞を検出しながら、磁場を照射することで誘導される加温効果を用いて感温性ナノ粒子から局所で薬剤を放出させることを目標としている。

今年度は、ペプチド付加された磁性体ナノミセルの標的細胞に対する結合と MRI による画像化を試みた。

B. 研究方法

a. 標的ペプチドの磁性体ナノ粒子への結合

磁性体ナノミセルに結合させた標的ペプチドが標的分子に対する結合性を保持している事が肝要である。RBP-1 の標的分子である RET 遺伝子を HeLa 細胞に発現させ、高発現細胞を樹立する。その膜画分を調整して、ピアコアセンサーチップに結合させ、磁性体結合型ペプチドの結合性を解析した。

b. 磁性体結合型ペプチドの標的細胞への結合
HeLa 細胞に RET を過剰に発現させた細胞株を樹立し、これにビオチン化ペプチドを作用させた後、結合性の有無を蛍光標識したストレプトアビジンで解析した。

c. RET 発現細胞の MRI による検出

培養系に磁性体付加型ペプチドを作用させ、リンスした後に、細胞を調整し、アクリルアミドを用いてガラス管内に包埋させた。これを NMR により画像化を試みた。

C. 研究結果

a. 磁性体結合型ペプチドの標的細胞への結合

磁性体 1 分子に対して 10 個前後のペプチドが付加された化合物を用いて RET に対する結合性を検定したところ、結合性が確認された。高いモル比で RBP-1 を結合させた磁性体ナノミセルの結合性は必ずしも強くなかった。

b. RET 発現細胞の MRI による検出

In vitro でペプチド結合型磁性体ナノミセルを RET 発現細胞に作用させ、その後調整した細胞を MRI 解析を行ったところ、RET 依存的に MRI によるシグナルが得られた。

D. 考察

ペプチド結合型磁性体ナノミセルを用いた標的細胞の画像化が可能であることが示唆された。In vivo の実験としてヌードマウスの皮下に RET 陽性腫瘍細胞を移植し、尾静脈から磁性体ナノミセルを打ち込むことによる標的細胞の画像化を現在試みている。次年度では、さらにいくつかのペプチドを用いて標的細胞の画像化を試みる予定である。

次に、磁性体ナノミセルに磁場を照射することによる加温誘導の可能性を明らかにすることが肝要である。ヌードマウス皮下に移植された標的細胞に集積する磁性体ナノミセルの分子数は究めて少ないことが予測される。一個の感温性ナノミセルを誘導加温により融

解するために必要な磁性体ナノミセルの量と照射する磁場の強度を検定することが肝要である。また、磁性体を含む感温性ナノミセルの開発も重要である。次年度では分担研究者とともに、以上の点について解析する予定である。

E. 結論

ペプチド付加型磁性体ナノミセルを用いて標的細胞を画像化することが可能になった。次年度では標的細胞選択的に加温誘導するためのシステムの構築を行う。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Taguchi T., Shimura M., Osawa Y., Suzuki Y., Mizoguchi I., Niino K., Takaku F., and Ishizaka Y. Nuclear trafficking of macromolecules by an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 18-26, 2004.
2. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, 3011-3020, 2004.
3. Shimura M. et al. Premature sister chromatid separation by Vpr-induced disruption of heterochromatin protein 1. Submitted.

2. 学会発表

1. Shimura M, Ishizaka Y. Aberrant sister chromatid separation by HIV-1 VPR coupled with disruption of HP1a and kinetochore components. 第 20 回 Oncogene Meeting, Frederick, Maryland, USA, 6月, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

磁性体ナノ粒子へのペプチド付加、最適化に関する研究

分担研究者 長谷川正勝 名糖産業株式会社 名古屋研究所長

研究要旨：分担研究者らが開発した磁性体ナノ粒子に、申請者が同定した RET 特異的結合ペプチド「RBP-1」を導入した「RBP-1 - 磁性体ナノ粒子複合体」を作成した。当初作成した複合体は、目的とする RET 発現細胞への結合が確認されたものの、細胞内で不安定であったため、架橋部分のみを改良して安定化を図った同複合体の改良品を作成した。改良品は *in vitro* の試験では、以前の複合体と同様に標的とする RET 発現細胞に結合することが確認された。

A. 研究目的

本研究は、微小癌に対する MRI の診断と非侵襲的な局所 DDS の構築を目指すものである。申請者が同定した細胞標的機能を有するペプチドを、分担研究者らが開発した磁性体ナノ粒子（MRI による検出が可能、高周波にて発熱する）に導入することにより、標的細胞特異的な MRI 造影剤の開発および局所温熱療法への応用を目的とする。

B. 研究方法

磁性体ナノ粒子表面に、ペプチド類が結合できるように設計した架橋分子を導入し、これを介すことで RBP-1 ペプチド（卵巣ガンなどに発現する RET に結合）を導入する。この方法にて合成される「RBP-1 - 磁性体ナノ粒子複合体」は、既に先行研究において、RET 発現細胞への結合が確認されていたが、細胞内での安定性に問題があった。そこで、物性（導入 RBP-1 量 *etc*）は変化させず、架橋部分の構造のみを再設計して安定化を図っ

た同複合体を合成することとした。合成した試作品の RET 結合試験は、国立国際医療センター研究所にて行った。

（倫理面への配慮）

該当せず。

C. 研究結果

本研究の当該年度の研究結果、架橋部分のみを変更し安定化を図った、改良型「RBP-1 - 磁性体ナノ粒子複合体」の試作品を合成することができた。国立国際医療センター研究所において本複合体の *in vitro* での RET 発現細胞への結合試験が実施された結果、RET 発現細胞への結合が確認された。

D. 考察

本研究の結果から、MRI 造影可能、且つ高周波により加温できる「磁性体ナノ粒子」に、RET 認識ペプチド「RBP-1」を導入することで、本複合体を標的の RET 発現細胞に結合できうることを示された (*in vitro*)。特に当該年度において

は、本複合体の改良検討が可能になり、改良試作品が作成できたことから、他にもこのような特異的結合可能なペプチドの種類を変更することで、対象癌種を拡大することができるものと考察される。更に、誘導加温の最適条件を検討することにより、温熱療法として有用性が期待される。

E. 結論

本研究の結果により、*in vitro* の段階であるが、細胞標的ペプチドを導入した磁性体ナノ粒子複合体が、標的とする細胞に集積できることが示唆された。特に当該年度においては、本複合体の物性が徐々に明らかとなり、改良検討およびその試作品作成へと進展した。このことから、将来、本複合体を標的癌特異的 MRI 造影剤として実用化できる可能性があり、また、磁性体ナノ粒子本体の磁氣的性質を増大できれば、標的微小癌の温熱療法も十分可能性があるものと結論した。これにより、今後、同複合体を *in vivo* で検討することが次に行うべき研究課題であると結論した。

F. 健康危険情報

分担研究者らが開発した磁性体ナノ粒子は、既に MRI 造影剤として製品化され、高い生体安全性が示されている。しかし、本研究ではペプチドを導入するために、その表面が一部改良されていることから、同様な生体安全性は保証し得ない。今後、*In vivo* での実験へ進むにつれ、十分な注意を施し検討を行っていかねばならない。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 国際出願番号：PCT/JP97/03009

発明人：丸野重雄、長谷川正勝、花市正敬、長江英夫、村瀬勝俊、山田永人
発明の名称：「多糖誘導体—磁性金属酸化物複合体」

出願人：名糖産業株式会社、丸野重雄

出願日：1997/08/28

2) 日本国特許番号：第 2726520 号

発明者：丸野重雄、長谷川正勝

発明の名称：「有機磁性複合体」

出願人：名糖産業株式会社、丸野重雄

出願日：1989/10/20

以上

研究課題：ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による局所DDSの開発のための基礎研究（感温性高分子を用いたインテリジェント型リポソームの構築）

分担研究者：所属施設 大阪府立大学
氏名 河野健司

A. 研究目的

体外からの温度刺激によって、体内における薬物送達の制御が可能なインテリジェント型ナノキャリアとして、温度感受性高分子とリン脂質からなる複合型リポソームの構築を行う。ここでは、末端に脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子を合成し、この高分子を組み込んだリポソームの内包物質放出挙動について検討した。

B. 研究方法

脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子である2エトキシエチルビニルエーテル-オクタデシルビニルエーテルブロック共重合体と卵黄ホスファチジルコリンおよびコレステロールに pH5 に調製した緩衝液を加え、エクストルーダー（孔径 100nm）を用いてリポソームを、作製した。このリポソーム分散液にアドリアマイシンを加え、インキュベートすることで ADR 内封共重合体修飾リポソームを調製した。リポソームからの ADR の放出は、種々の温度において ADR の蛍光強度を測定することで評価した。

C. 研究成果及び考察

リポソームに複合化した共重合体はリポソーム膜上で、39.6℃において親水性から疎水性に変化することが、熱分析によってわかった。pH 勾配法によって感温性リポソームへのアドリアマイシンの封入を行ったところ、効率よくアドリアマイシンがリポソーム内部に封入できることがわかった。

このようにして調製したアドリアマイシン内包感温性高分子修飾リポソームからのアドリアマイシンの放出の温度依存性について調べた。39℃以下においては、アドリアマイシンの放出は、ほとんど起こらなかったが、40℃以上においては、温度の上昇とともに急激にアドリアマイシンの放出が起こることがわかった。これは、40℃付近においてリポソーム膜上に固定化された共重合体が親水性から疎水性に変化し、リポソーム膜と相互作用することによって膜構造を乱し、内包したアドリアマイシンの透過を促進したことによるものと考えられる。

リポソームの温度感受性に及ぼす共重合体の分子量の影響を調べるために、分子量 6700、9300、および 16700 の共重合体で修飾したリポソームからのカルセインの放出を調べた。その結果、

分子量の大きな共重合体で修飾したリポソームほどより著しい内包物質の放出を引き起こすことがわかった。

さらに、血中滞留性が高いリポソームであるポリエチレングリコール（PEG）脂質含有リポソームに共重合体を導入することによって温度感受性の付与を試みた。共重合体修飾リポソームに種々の含有率で分子量 5000 の PEG 脂質を含有させたところ、PEG 脂質含有率 2%までは、共重合体の転移温度付近において鋭敏にアドリアマイシンを放出することがわかった。しかし、さらに、PEG 脂質の含有率を高めた場合、アドリアマイシンの放出が起こる温度が高温側にシフトした。PEG 鎖の存在によって、共重合体とリポソーム膜との相互作用が抑制されたためと考えられる。

D. 結論

本研究において、感温性を有する2エトキシエチルビニルエーテル-オクタデシルビニルエーテルブロック共重合体を用いて、新しい温度感受性リポソームを作製した。このリポソームは、40~45℃以上に加温すると急激に内部のアドリアマイシンを放出した。また、この共重合体を複合化することによって、血中滞留性に優れた PEG 修飾リポソームに温度感受性を付与できることもわかった。今後、このリポソームを用いて、局所加温による体内標的部位への抗がん剤の集積化及び、磁性粒子の組込みによる高周波応答能の付与について検討する予定である。

E. 研究発表

1. K. Kono et al. Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery, **Bioconjugate Chem.**, 16, 208-214 (2005).
2. Y. Haba et al. Synthesis of biocompatible dendrimers with a peripheral network formed by linking of polymerizable groups, **Polymer**, 46, 1813-1820 (2005).
3. Y. Haba et al. Rendering poly(amidoamine) or poly(propyleneimine) dendrimers temperature sensitive, **J. Am. Chem. Soc.** 126, 12760-12761 (2004)
4. K. Yoshino et al. Temperature-sensitization of liposomes by use of N-isopropylacrylamide copolymers with varying transition endotherms, **Bioconjugate Chem.** 15, 1102-1109 (2004).

5. K. Kono, T. Takagishi, Temperature-sensitive liposomes, **Methods in Enzymology**, 387, 73-82 (2004).

ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による 局所 DDS の開発のための基盤研究

分担研究者 山下 克美 金沢大学大学院自然科学研究科 助教授

研究要旨 細胞への遺伝子導入の効率を上昇させるための基礎実験を行った。市販の陽イオン性リポソームを用い、細胞へピューロマイシン耐性遺伝子を導入し、5日間ピューロマイシンを加えた培地で培養し生存細胞数、すなわち遺伝子導入細胞数を染色により測定した。その結果、OZbioscience 社より販売されている、磁性体付加型リポソーム試薬を用いることで、遺伝子導入効率が飛躍的に上昇することが判明した。本プロジェクトで用いられる磁性体付加型試薬を遺伝子導入に応用できれば、遺伝子治療の際に効率的な DDS が期待される。

A. 研究目的

局所への薬物送達には薬物治療のみならず、将来的には遺伝子治療への応用も期待できる。すなわち、ミセル中に閉じ込めた遺伝子を患部に効果的に送達できれば、例えば、癌部でのみ発現上昇している遺伝子を抑制遺伝子等で特異的に標的化することも可能である。

本研究では、siRNA の癌治療への応用を目指して、細胞へ siRNA を発現するプラスミドを導入するための効率のよい方法を検討し、今後の遺伝子導入実験の効率化のための基礎資料を収集することを目的とした。さらに、siRNA を誘導的に発現可能なシステムの構築を検討した。

B. 研究方法

タンパク質合成阻害性抗生物質のピューロマイシン耐性を有するプラスミドを、市販の遺伝子導入試薬を用いて、HeLa 細胞へ導入後、ピューロマイシンで導入細胞を 5 日間選択し、細胞の生存率を細胞染色により測定した。用いた導入試薬は、LipofectAmine 2000, LipofectAmine Plus (両試薬とも Invitrogen 社), Transfectin (Bio-Rad 社), Polyfect (GIAGEN 社), PolyMag II (OZbioscience 社), さらに、先の 4 試薬を OZbioscience 社の CombiMag 試薬と混和し、磁性をもたせた遺伝子導入試薬とし、遺伝子導入に用いた。

試薬に添付のマニュアルにしたがってプラスミド DNA と試薬を混和し、HeLa 細胞へ導入し、24 時間後に細胞をトリプシンではがし、2 倍に希釈し 4 日間ピューロマイシン存在下にて培養し、5 日目に細胞を固定染色し、導入効率を評価した。ピューロマイシンを含む培地は毎日交換し、死細胞を除去した。

(倫理面への配慮)

患者由来の生体組織を研究に使用しているわけではないので、特段の配慮はない。

C. 研究結果

a. 導入試薬単独使用での効率

各試薬の間で、推奨試薬使用量と DNA 量比（およびその結果として、一回の導入に使用する DNA 量）に違いがあるが、それは無視して一回の transfection で生じるピューロマイシン耐性細胞数を、細胞染色という半定量的な方法にて判定した。その結果、Transfectin と Polyfect を使用した場合は、耐性細胞の出現がまったくなく、残り 3 試薬において、PolyMag II > LipofectAmine 2000 > LipofectAmine Plus の順で耐性細胞の出現が観察された。これらの結果から、磁性を利用した遺伝子導入試薬である PolyMag II が優れていると評価した。

b. 通常の導入試薬に対する磁性体試薬、CombiMag 試薬の効果

LipofectAmine 2000, LipofectAmine Plus, Transfectin, Polyfect に対し、CombiMag 試薬の相加的な効果を期待し、それぞれの試薬と DNA の混液に CombiMag 試薬を混和し、細胞へプラスミドを導入した。耐性細胞出現頻度の評価は上述の通りである。その結果、実験 a において耐性細胞の出現が見られなかった、Transfectin と Polyfect では CombiMag 試薬の効果はまったく観察されなかった。一方、LipofectAmine 2000 と LipofectAmine Plus では、明らかな効果が見られ、耐性出現細胞数の増加が観察された。さらに、LipofectAmine 2000 と CombiMag 試薬を使用した場合には、PolyMag II 試薬単独よりも高い導入効率が観察され、磁性体試薬の有効性が確認された。

c. siRNA 誘導発現プラスミドについて

siRNA を誘導発現するために、ベクターの構築を行っている。従来の方法との大きな改良点は、マイクロ RNA のシステムを利用した siRNA 発現ユニットを使用していることと、RNA

polymerase III のプロモーターではなく、より発現制御の容易な、RNA polymerase II のプロモーターを利用することである。現在、モデル遺伝子で新システムの有効性を検討中である。

D. 考察

今年度の研究から、磁性体遺伝子導入試薬を用いることで、細胞への遺伝子導入効率が大幅に上昇することが明らかになった。これを遺伝子治療という臨床の場へ応用するには数多くの問題があるが、磁性体を付加した遺伝子導入試薬を局所へ有効に遺伝子を送達できれば 高い頻度で細胞へ導入できることが期待される。

E. 結論

siRNA 発現プラスミドを高頻度で細胞へ導入するための基礎実験として、磁性体遺伝子導入試薬の有効性について検討し、それが極めて有効であることを確認した。現在、siRNA を誘導的に発現するプラスミドを構築中であり、それが完成すれば、がん治療に有効な遺伝子をノックダウンするための検定システムが完成する。今後は、これらの研究と平行して、有効に局所へプラスミドを送達するペプチドの検索を行う予定である。

F. 健康情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (著者・題目・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入)

① S. Uchida, M. Ohtsubo, M. Shimura, M. Hirata, H. Nakagama, T. Matsunaga, M. Yoshida, Y. Ishizaka, and K. Yamashita: Nuclear export signal in CDC25B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316, 226-232 (2004)

② S. Uchida, A. Kuma, M. Ohtsubo, M. Shimura, M. Hirata, H. Nakagama, T. Matsunaga, Y. Ishizaka, and K. Yamashita: Binding of 14-3-3 β but not 14-3-3 σ controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, 117, 3001-3020 (2004)

③ S. Tsukamoto, K Yamashita, K. Tane, R. Kizu, T. Ohta, S. Matsunaga, N. Fusetani, H. Kawahara, and H. Yokosawa: Girolline, an antitumor compound isolated from a sponge, induces G2/M cell cycle arrest accumulation of polyubiquitinated p53. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 699-701 (2004)

2. 学会発表

① S. Uchida, A. Kubo and K. Yamashita: Contribution of 14-3-3 binding in Cdc25B subcellular localization. The 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop (奈良 2004. 4)

② S. Uchida, A. Kubo, R. Kizu and K. Yamashita: Regulation of subcellular localization of CDC25B. Cancer Research UK Beatson International Conference" (Glasgow, UK 2004. 6)

③ 内田早苗, 久保暁嗣, 松永司, 木津良一, 石坂幸人, 山下克美: 14-3-3 による CDC25B の細胞内局在制御. 第 77 回日本生化学会大会 (横浜 2004 10)

④ 大橋紗耶香, 金居正幸, 花井修次, 山下克美, 田沼靖一, 浦野健, 古川鋼一, 三輪正直: ポリ ADP 理ボース分解酵素の細胞内局在と細胞周期への関与. 第 77 回日本生化学会大会 (横浜 2004 10)

⑤ 久保暁嗣, 内田早苗, 杉村勇人, 久保原禪, 松永司, 山下克美: GSK-3 β の Cdc25A タンパク質量制御への関与. 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸 2004 12)

⑥ 内田早苗, 久保暁嗣, 木津良一, 松永司, 中釜斉, 石坂幸人, 山下克美: CDC25B における 14-3-3 との結合に必要な部位の解析 (神戸 2004 12)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他

ヒト血液細胞に対するエンドゾームを介さない高効率の分子導入法の技術開発

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨 ヒト血液細胞への遺伝子や蛋白などの分子導入が困難で、このことが効果的な薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の開発の大きな妨げとなっている。本研究においては、ヒト血液細胞株を用いて、遺伝子 (オリゴヌクレオチド、プラスミド) の導入効率改善を試みた。検討した遺伝子導入手法は、エトキシレーテッドポリエチレンイミン (EPEI) 法、HVJエンベロープベクター、ヌクレオフェクターの3つの方法で、いずれも従来の手法よりはるかに良好な結果を生み出したが、その中でも特にヌクレオフェクターが最も効率が優れ、プラスミドDNAの導入実験に貢献した。一方、HVJエンベロープベクターは、蛋白の導入にも有効で、しかも、エンドゾームではなく細胞質への直接の導入が可能であった。

A. 研究目的

ヒト血液細胞への分子導入は極めて困難であることは良く知られている。この状況は、正常血球であっても白血病細胞であってもほぼ同様であり、また、導入分子がプラスミドサイズの遺伝子であっても、低分子量のオリゴヌクレオチドであっても、同様である。このような状況は、様々の疾患に対する新しい分子標的療法を行う際の、効果的な薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の開発の大きな妨げとなっている。

今回の研究では、このような状況を打破するためにヒト血液細胞 (株) への効率の良い遺伝子導入法の開発を試みた。

B. 研究方法

細胞はヒト白血病細胞株 (U937、HL-60、OCI-AML1a、F36P) を用いた。

プラスミドの導入効率を検討するために、GFP蛋白をコードする発現プラスミドを用いた。また、FITCラベルのオリゴヌクレオチドやアレクサ標識IgGも用いた。

試みた遺伝子導入促進法は、エトキシレーテッドポリエチレンイミン (EPEI) を用いた手法、HVJエンベロープベクターを用いた手法、ヌクレオフェクターを用いたエレクトロポレーション法、であった。

C. 研究結果

アンチセンスオリゴのヒト血液細胞内導入に関しては、主にU937細胞を用いて、EPEIを用いた系により行った。オリゴヌクレオチドの場合でもプラスミドDNAの場合

でも、安定した導入、発現が確認された。

HVJエンベロープベクターを用いた場合は、細胞の凝集が起こりやすくなる傾向があったが、遺伝子の導入、発現はオリゴヌクレオチドでもプラスミドDNAでも良好であった。さらに、アレクサ標識IgGを用いた実験によって、HVJエンベロープベクターは蛋白の導入にも応用できることが確認された。

ヌクレオフェクターを用いたエレクトロポレーション法は、今回用いた全ての白血病細胞株において極めて良好な (30-60%) 導入、発現効率を示した (GFP発現プラスミドによる)。

D. 考察

HVJエンベロープベクターを用いた手法、ヌクレオフェクターによるエレクトロポレーション法によって、ヒト血液細胞株への良好な分子導入が可能であった。これらの手法はいずれも、エンドゾーム形成によって遺伝子の細胞質への移行が阻まれるという欠点無く、他の手法に比べても極めて有用と考えられた。

E. 結論

HVJエンベロープベクターを用いた手法、ヌクレオフェクターによるエレクトロポレーション法によって、ヒト血液細胞株に対して、オリゴヌクレオチド、プラスミドDNA、蛋白を効率よく導入することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Nakatsu M, Doshi M, Saeki K, Yuo A: Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells. Int J Hematol 81: 32-38, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

な し

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体 の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taguchi T., Shimura M., Osawa Y., Suzuki Y., Mizoguchi I., Niino K., Takaku F., and Ishizaka Y.	Nuclear Trafficking of Macromolecules by an Oligopeptide Derived from Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type-1.	<i>Biochem.</i> <i>Biophys.</i> <i>Res. Commun</i>	320	18-26	2004
Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K.	Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14- 3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B.	<i>J. Cell Sci.</i>	117	3011-3020	2004

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Kono, H. Akiyama, T. Takahashi, T. Takagishi, A. Harada	Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery	Bioconjugate Chemistry	16	1813-1820	2005
Y. Haba, A. Harada, T. Takagishi, K. Kono	Rendering poly(amidoamine) or poly(propylenimine) dendrimers temperature sensitive	J. American Chemical Society	126	12760-12761	2004
K. Yoshino, A. Kadowaki, T. Takagishi, K. Kono	Temperature-sensitization of liposomes by use of N-isopropylacrylamide copolymers with varying transition endotherms	Bioconjugate Chemistry	15	1102-1109	2004

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sanae Uchida, 他 8 名	Nuclear Export Signal in CDC25B	Biochem. Biophys. Res. Commun.	316 巻 1 号	226-232 ページ	2004
Sachiko Tsukamoto, 他 8 名	Girolline, an Antitumor Compound Isolated from a Sponge, Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Accumulation of Polyubiquitinated p53	Biol. Pharm. Bull.	27 巻 5 号	699-701	2004
Sanae Uchida, 他 8 名	Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s Controls the Cytoplasmic Localization of CDC25B: Binding Site Preferences of 14-3-3 Subtypes and the Subcellular Localization of CDC25B	J. Cell Sci.	117 巻 14 号	3011-3020	2004



Nuclear trafficking of macromolecules by an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1

Takashi Taguchi,^a Mari Shimura,^a Yoshiaki Osawa,^a Yasunori Suzuki,^a Izuru Mizoguchi,^a Koitsu Niino,^b Fumimaro Takaku,^c and Yukihito Ishizaka^{a,*}

^a Department of Intractable Diseases, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan

^b Niino Clinic, 1-64 Sakuragi-cho, Yonezawa, Yamagata 992-0027, Japan

^c Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498, Japan

Received 12 March 2004

Available online 8 June 2004

Abstract

Vpr, an accessory gene product of HIV-1, is incorporated into cells when added to the culture medium. Via such function Vpr has been shown to transduce a protein into cells that is expressed as a chimeric protein with Vpr. The domain required for protein transduction, however, remained to be clarified. Here we identified a sequence encompassing 52–78 amino acids of Vpr (C45D18) that enables nuclear trafficking of proteins. When chemically synthesized C45D18 was added to the culture medium of human cord blood mononuclear (CBMN) cells, most cells became positive for the incorporated C45D18. Furthermore, recombinant proteins conjugated with the C45D18 were efficiently transduced and transported to regions corresponding to the nucleus. Incorporation of C45D18-conjugated protein was observed within a few hours after addition of the protein, independent of cellular growth. Although it is well known that Tat-derived peptide has a transducing activity, C45D18 was more active than Tat peptide for trafficking proteins into cells. Taking together with results from FACS analysis revealing that more than 90% of CBMN cells were positive for X-gal staining after treatment of C45D18-conjugated β -galactosidase, we propose that C45D18 translocates bioactive macromolecules directly into the nucleus.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: HIV-1; Vpr; Nuclear trafficking; Protein transduction domain; Resting cells

Vpr, one of six auxiliary genes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV) [1,2] encodes a virion-associated protein [3–5], and has been proposed as a factor crucial for HIV-1 infection in resting macrophages [6]. Several lines of evidence indicate that Vpr is involved in translocation of preintegration complex from cytoplasm to nucleus [6,7]. Vpr is a small protein composed of 96 amino acids (aa), but has several functional domains of three α -helix regions (17–29, 36–47, and 53–78, respectively), a leucine-rich region from 60 to 80 aa, and C-terminal arginine-rich region [7]. It has been noted that Vpr has two separable parts responsible for nuclear translocation [8]. On the other hand, we previously re-

ported that Vpr induces genomic instability by causing chromosome breaks and aneuploidy [9,10]. Our experiments also revealed that the C-terminal region of Vpr is important for cell-cycle arrest, and Vpr mutant lacking C-terminal 18 aa was negative for inducing cell-cycle abnormality at the G2/M phase.

As a particularly interesting property, Vpr functions like a transacting factor, and latently infected cells restart viral production, when Vpr is extracellularly added to cells [11,12]. In addition to such an activity, Vpr can enter cells when it is added to culture medium [7,13]. Consistently, a synthetic full-length peptide of Vpr or C-half of Vpr was used for efficient transduction of plasmid DNA [14]. On the other hand, Sherman et al. [15] recently reported that Vpr could transport exogenous proteins into cells. A fusion protein of Vpr with β -galactosidase (β -gal) was also shown to enter cells.

* Corresponding author. Fax: +81-3-5272-7527.

E-mail address: zakay@ri.imej.go.jp (Y. Ishizaka).