

Delivery System Using Hollow
Bio-Nanoparticles. 高分子論文集 61
(2004), No. 12, 606-612.

- 3) 黒田俊一、妹尾昌治、近藤昭彦、上田政和、谷澤克行 中空バイオナノ粒子が拓く新しい医療技術 月刊「化学工業」55 (2004), No. 12, 40-46.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 出願 2004-104702 中空ナノ粒子を用いたセンシングツールおよびそれを用いたセンシング方法

出願者：東レ株式会社

発明者：谷澤克行、黒田俊一、
鄭基晩、秋山英雄、正均

- 2) 出願予定 超低抗原性中空バイオナノ粒子

出願人：大阪大学、(株)ビークル (未定)

発明者：黒田俊一、谷澤克行、
山田忠範 (未定)

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

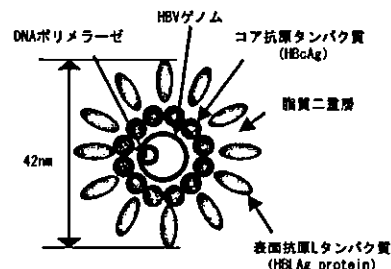
バイオナノ粒子の安定化とタンパク質封入

分担研究者 妹尾 昌治 岡山大学大学院自然科学研究科・助教授

B型肝炎ウイルスワクチンを目的としてとしてウイルス表面抗原タンパク質を組換え発現により調製すると、直径約100ナノメートルの中空粒子を形成することからこれを、ヒト肝臓細胞に特異的に物質を送達するドラッグデリバリー用ナノカプセル（バイオナノ粒子）として用いることが可能であることを示してきた。本研究は、このバイオナノ粒子をさらに発展的に実用化に近づける方法を開発することを目的としている。本年度は、バイオナノ粒子の性質の安定化およびタンパク質を封入する技術を検討した。その結果、表面抗原タンパク質に存在するシステイン残基同士がランダムなジスルフィド結合を形成することによるポリマー形成とタンパク質変性の影響によりバイオナノ粒子の安定性が低いことが判明した。さらに、このシステイン残基数を減少させることによりバイオナノ粒子の安定性が増すことがわかった。種々の組み合わせを検討した結果、このシステイン残基を15個中8個まで置換可能であることが判明したので、この8個を置換したバイオナノ粒子 m8 を作成し、ヒト肝臓細胞への遺伝子および蛍光薬剤の送達能力を野生型と比較したところ、改善が観察された。さらに、バイオナノ粒子にタンパク質を封入する方法として表面抗原タンパク質と遺伝子的に融合させた融合タンパク質の作成を試みた。実験では表面抗原タンパク質のカルボキシル末端側にクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（EGFP）を融合させることを試みた。その結果、C末端の長さを調整して発現量を上げるための最適化が必要であることがわかった。さらに、融合させたEGFPは粒子の外側に提示されるものと粒子内部に包摂されるものがあることがわかったが、これらはひとつの粒子で混在するものではなく、どちらかの形で一つの粒子を形成することが示唆された。

A. 研究目的

タンパク質の性質として中空粒子を形成するものは一般的な概念ではない。本研究で用いるB型肝炎ウイルスの表面抗原が形成するナノサイズの粒子はその特徴を備える数少ないタンパク質の一つである。このB型肝炎ウイルスの表面タンパク質はLタンパク質と呼ばれる（図1）。すでにこのウイルスのワクチンを開発する目的で多くの研究グループがこの表面抗原遺伝子の組み換え発現に取り組んできた。このタンパク質の組み換え発現は容易ではなかったが、種々の工夫の成果により現在では酵母により生産されたものが、ワクチンとして広く利用されるようになった。ウイルスのL遺伝子を酵母細胞で発現させると、Lタンパク質が細胞内



```

msllilvic flplaaigkv rochggnskx fproggtnls vphlgltpfd holdpaigan 60
secretion signal      Prs1
shhdhdhfnr hhdqprang vgaagfsgf vphggllgh spoaogiltt vpaapffast 120
NRSGROPTP ISPELRDSEP QAMQNSITTF HQALLQPRVR GLITPAGGSS SGTVMVPTT 180
Prs2
ASPIGQEPAP NMENTTSGFL GPLLVLAGF FLLTRILTIP QSLQSWTSL NPLGAPTCP 240
GQNSQPTSN HSPTSCFFIC PCYRNHCLR FIFLFIALL CLIFLLVLLD YQGNLPVCP 300
LPGISTTSTG PCKTCTIPAQ GTSMFPECC TKPSDGRCTC IPFIPSWAPA RELMEWASVR 360
FSMLSLLVFP VQMFVGLSPT VGLSVIMDDM YMGPSLYNIL SPFLPLPFP FCLRVYI 417
    
```

図1. B型肝炎ウイルスの模式図と表面抗原Lタンパク質のアミノ酸配列。

に顕著に蓄積する。興味深いことに最大に拡大した像では、B型肝炎ウイルスの電顕像に酷似した像が観察される。この酵

母細胞を破碎して、超遠心分離を繰り返すとLタンパク質が培養10当たり約10 mg得られる。さらにこのLタンパク質を、原子間力顕微鏡で観察すると、と平均直径100-200 nmの粒子像が確認できる。溶液中での粒子径をレーザー散乱などで測定すると50-500 nmである。興味深いことに、この粒子構造は熱処理に対して比較的安定であり、B型肝炎ウイルスが熱処理に対して耐性であることと相関しているように見える。この粒子はLタンパク質1種類で構成され、脂質成分や糖質は20%以下である。粒子の内部は酵母の細胞質由来のオルガネラや核酸を含まないことが確認されている。すなわち、このタンパク質はそれ自身が粒子径性能を有すると言っても過言ではなく、他に類を見ない。これらの特徴に加えて、このLタンパク質にはB型肝炎ウイルス同様にヒト肝臓細胞を特異的に認識する能力が残っていることである。Lタンパク質のアミノ末端に位置するPreS1領域は、このヒト肝臓細胞の表面構造に非常に特異的な親和性を持っている。この卓抜した能力によりウイルスは肝臓以外の臓器や細胞には感染しない。

そこで、私たちは生体内において効率良く特定の分子を標的する技術へこの中空ナノ粒子を応用する研究を始めた。このような標的技術の開発はドラッグデリバリーシステム(DDS)や遺伝子治療分野において近年活発化している。静脈注射や経口投与によりピンポイントで特定の細胞や組織に薬剤や遺伝子を送達できれば、多くの薬品が効能に伴う副作用から解放され、患者のQOLの向上や、開発が中断された新型薬剤が復活する可能性が考えられるからである。

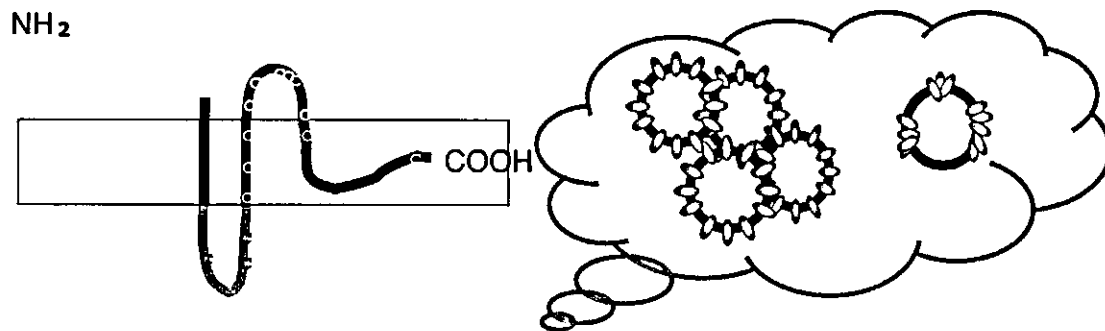
まず、精製されたLタンパク質から成る中空ナノ粒子を、標的へ導入したい遺伝子と混合してエレクトロポレーションを行うと遺伝子を封入した粒子が得られる。クラゲの緑色蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子をこの粒子に封入してヒト肝臓癌由来細胞株HepG2の培養液に加えて、4日間培養を続けた後蛍光を観察すると細胞中に蛍光が観察された。この蛍光は、市販の遺伝子導入試薬を用いた場合と比較

してもより強く、また、ヒト肝臓由来以外の細胞ではこのような結果が得られないことからこの中空ナノ粒子の遺伝子導入効率は非常に高いと考えられた。

さらに、粒子とGFP遺伝子の混合液をエレクトロポレーションした後、今度はヒト肝臓癌由来細胞を移植した担癌ヌードラットに注射して、癌組織に粒子が到達するのを蛍光により判定した。粒子の投与はその到達能力を調べるために尾静脈から行った。投与後2週間で、腫瘍を切除して組織内の蛍光を観察すると、蛍光が検出された。さらに、別のヒト肝臓癌由来細胞株を移植した腫瘍でもほぼ同様の結果が得られると共に、対照として移植された大腸癌由来組織には蛍光が認められないばかりか、使用した動物の正常な組織にも蛍光は観察されなかった。特に、宿主ラットの肝臓組織に到達しないことは、Lタンパク質ナノ粒子がヒトの肝臓細胞を非常に特異的に識別していることを示しており、B型肝炎ウイルスの性質を保持していることを示唆している。さらに、注目すべき点は移植腫瘍が肝臓細胞由来であっても本来肝臓が存在するべき位置とは異なる部位に存在する点である。通常肝臓組織の標的は門脈等への注入により行われるがこれは血管系の特性を利用したものにすぎず、肝臓細胞を能動的に標的したものでは無い。これに対してナノ粒子の結果は、遠位から特定の細胞を標的できるということを示しており、この点で非常に優れていると考えられる。すなわち、これは転移した癌細胞を標的することも可能であることを示唆している。

しかし、このバイオナノ粒子はジチオスレイトールのような還元剤に対しても不安定であることから必須のジスルフィド結合が存在すると考えられる。さらに、この粒子を構成するLタンパク質は保存中にジスルフィド結合の架橋によりポリマー形成を起こし、同時に感染効率を低下させることが経験的にわかってきた。

また、バイオナノ粒子内に物質を封入する際に用いるエレクトロポレーション法も、発熱や電氣的酸化還元を条件を制御できないことからタンパク質を封入す



```

*
mrsllilvlc flplaalgKV RQG 60
120
180
*
MENTSGFLG PLLVLQAGFF LLTRILTIPQ SLDSWFTSLN FLGGAPTCFG QNSQSFTSMH 240
* * * * *
SPTSCRPICP GYRWMCLRRF IIFLFILLIC LIFLLVLLDY QGMLPVCPLL PGTSTTSTGP 300
* * *** * *
CKTCTIPAQG TSMFPSCCCT KPSDGNCTCI PIPSSWAFAR FLWENASVRF SWLSLLVFPV 360
*
QWFVGLSPTV WLSVIWMMNY WGPSLYNILS PFLPLLPIFF CLWVYI 406

```

図2 Lタンパク質の模式図とランダムなジスルフィド結合の架橋による粒子構造変性のモデル。Lタンパク質の1次構造中にはシステイン残基(*印)が15個存在するがジスルフィド結合に必要な残基は特定されていない。PreS2領域のC末端側はS領域で、この部分は2つの膜貫通ドメインとC末端側の疎水性領域(黒字部分)が資質2重層に埋もれていると考えられている。

る場合には変性や失活を伴いやすいと予想されるため、異なる方法で封入することが必要と考えられた。

これらの二つの問題に取り組むために、システイン残基の置換とタンパク質融合による粒子の発現を試みた。

B. 研究方法

1. システイン残基置換によるバイオナノ粒子の安定化

バイオナノ粒子を構成するLタンパク質の1次構造は、まずアミノ末端にニワトリリゾチーム由来の分泌シグナルを付加して、酵母細胞中での分泌発現を可能としている。そのシグナルにLタンパク質のPreS1, PreS2領域とS領域が続く(図2)。システイン残基は分泌シグナルを除きS領域にのみ合計14

残基存在する。

これらのうち、疎水性領域に存在するものはアラニン残基、親水性領域に存在するものはセリン残基に置換して、そのミュータントをサル腎臓由来COS7細胞において一過発現させ、その培養上清に分泌されるバイオナノ粒子アナログの性状をウェスタンブロッティングおよび抗原性により解析した。さらに、複数の置換の組み合わせの可能性を調べ、ランダムなジスルフィド結合が起こらないようシステイン残基を最小限の数になるようなバイオナノ粒子を作製した。また、このミュータント粒子と野生型粒子を用いて、トリプシンに対する感受性や、緑色蛍光タンパク質遺伝子や蛍光物質カルセインの肝臓細胞への送達能力を比較して、安定性を評価した。

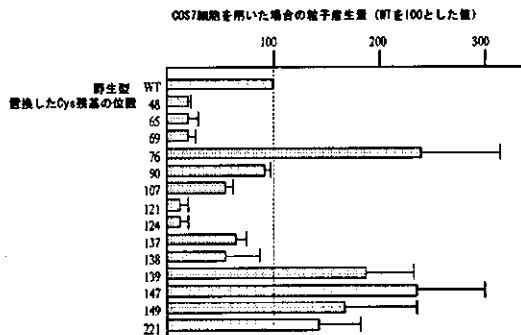


図3 Lタンパク質中のシステイン残基置換を行ったミュータントをCos7細胞で発現させ、培地中に分泌される抗原量の測定結果。アミノ酸の番号はS領域での位置を表す。

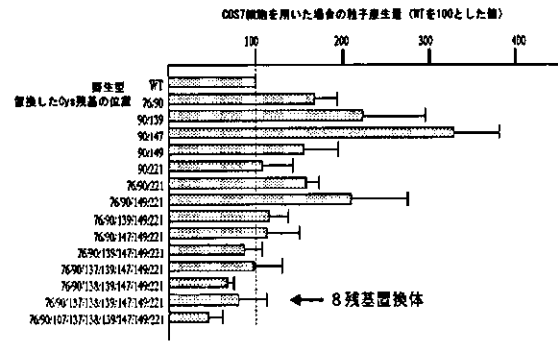


図4 Lタンパク質中のシステイン残基置換を複数組み合わせたミュータントをCos7細胞で発現させ、培地中に分泌される抗原量の測定結果。

2. バイオナノ粒子へのタンパク質封入方法

Lタンパク質のカルボキシル末端側は特に重要な機能を持たないと考えられるので、この末端に外来タンパク質を遺伝子的に融合してLタンパクとの融合を行い、組換え発現で粒子を形成させた場合に、この外来タンパク質部分が粒子内に封入されることにより、エレクトロポレーションのような条件に依らず100%の効率でタンパク質を封入したバイオナノ粒子の作成を試みた。実際には、カルボキシル末端が膜貫通領域として存在するには長さが長過ぎるので、これを最適化して緑色蛍光タンパク質EGFPの発現の結果を調べた。発現はCOS7細胞により行った。

発現の量は、抗原量とEGFPの蛍光強度により解析した。さらに、プロテアーゼK処理と抗体の抗EGFP抗体に対する反応性によりEGFP部分が内封されているかどうかを解析した。また、この融合タンパク質粒子を培養細胞の培地中に添加することにより、ヒト肝臓細胞の標的能力を評価した。

C. 研究結果

1. システイン残基置換によるバイオナノ粒子の安定化

このジスルフィド結合に関与するシ

ステイン残基は遺伝子に変異を入れアミノ酸をアラニンやセリンに置換する事で特定すると14個存在するシステイン残基の内、8個までが置換しても組換え発現が野生型の80%以上となることから、置換が可能であることが

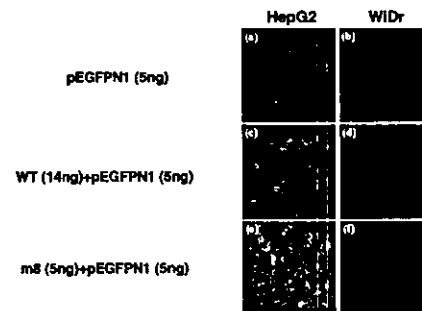


図5 EGFP遺伝子発現ベクターpEGFPN1を封入したバイオナノ粒子を用いた細胞への遺伝子の導入実験。

明らかになった(図3)。さらに、これらの置換を組み合わせても、8個のシステインは置換可能であった(図4)。そこで、8個のシステイン置換体m8と野生型の性質と比較した。

まず、緑色蛍光タンパク質の遺伝子の発現系プラスミドをエレクトロポレーションで粒子へ封入した後、ヒト肝臓がん由来細胞株HepG2とヒト大腸が

ん由来細胞株 WiDr の培地中に添加して 3 日後に蛍光顕微鏡により観察した (図 5)。野生型粒子では 14 ng を用いて観察される蛍光は m8 粒子 5 ng を用いて観察される蛍光より弱く、m8 粒子で導入効率が改善されていることが示唆された。

遺伝子の代わりに蛍光物質カルセイン (分子量 660) をエレクトロポレーションにより封入して、培養細胞の培地中に添加して 9 時間後に、細胞を蛍光顕微鏡で観察した (図 6)。この場合も遺伝子の場合と同様に m8 を用いる場合では野生型を用いた場合に比べ

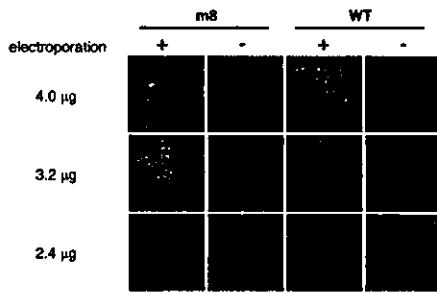


図 6 バイオナノ粒子の野生型と m8 にカルセインを封入して、HepG2 細胞へ導入した時の共焦点蛍光顕微鏡による観察像。

て効率よくカルセインを細胞へ導入することが可能であった。

バイオナノ粒子の安定性をトリプシン消化により評価した (図 7)。その結果、野生型粒子は m8 粒子よりも薄い濃度のトリプシンで分解が観察され、m8

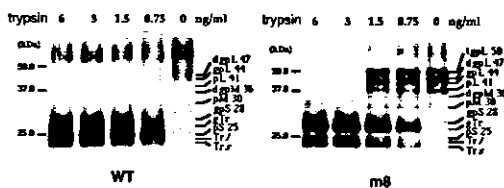


図 7 野生型と m8 バイオナノ粒子を異なる濃度のトリプシンにより処理して、SDS 電気泳動した後抗 HBsAg 抗体によりウェスタンブロッティングを行った。

の方が構造的に安定化していることが示唆された。

2. バイオナノ粒子へのタンパク質封入方法

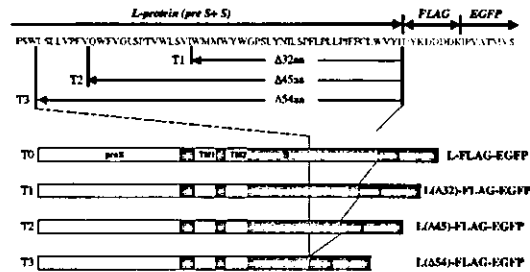


図 8 Lタンパク質のカルボキシル末端へEGFPを融合するデザイン。Lタンパク質をカルボキシル末端側から欠損させてEGFPを融合した。

バイオナノ粒子へタンパク質を封入するための方法論として遺伝子的融合を行った (図 8)。これらのデザイン T0～T3 を発現系に組み込んで、Cos7 細胞で発現させ、その発現量を抗原性による定量と蛍光の強度による評価の二つの異なる方法で評価した (図 9)。この結果から、Lタンパク質のカルボキシル末端に外来タンパク質を融合させるた

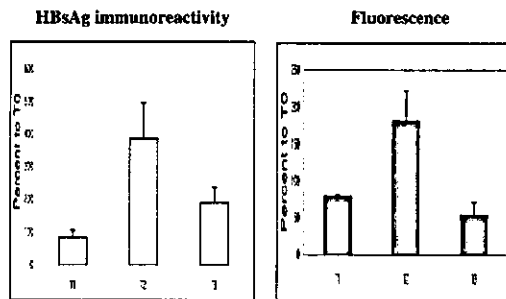


図 9 Lタンパク質とEGFPの融合タンパク質のCos7細胞での発現レベルの比較。カルボキシル末端の欠損をさせずにEGFPを融合したT0の発現レベルを100%としてT1,T2,T3のそれぞれの発現レベルを抗原性と蛍光強度により評価した。

めには、最適な長さがあることがわかった。

これにより T2 型の融合タンパク質が最も高い発現量を示したため、この T2 型融合タンパク質が粒子を形成していることを、シヨ糖密度勾配超遠心法により評価したところ、細胞の培地中に分泌されたものも細胞中に存在するものもともに等しい粒子密度を持って

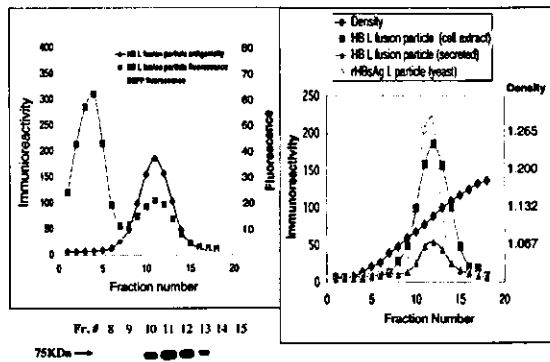


図 10 シヨ糖密度勾配超遠心による粒子密度の比較。T2 融合タンパク質を Cos7 細胞の培地と細胞中の両方から別々に採取して、形成される粒子の密度を評価した。左側で培地中から得られる粒子画分 10-12 はさらに右側での細胞中から抽出されたものとの比較を行っている。

いることが示唆された (図 10)。

さらに、融合粒子の肝臓細胞への標的能力

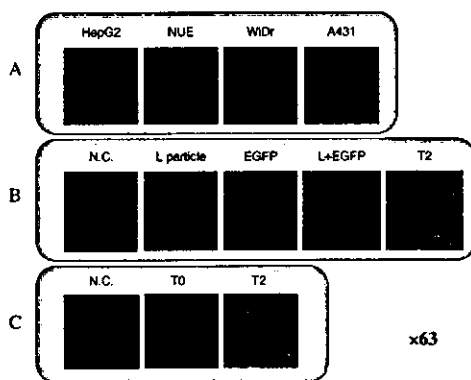


図 11 融合型粒子の肝臓細胞標的能力の評価。(A) 種々の細胞への導入実験。ヒト肝臓がん由来細胞、HepG2, NuE; ヒト大腸がん由来細胞、WiDr; ヒト上皮がん由来細胞、A431、(B) HepG2 細胞への感染性の評価。(C) 細胞から抽出した粒子の比較。

を *in vitro* で評価した (図 11)。この結果から、細胞中のものも培地中に分泌されたものも共にヒト甘草細胞を標的とする能力が備わっていることが示唆された。

T1 および T2 型粒子に対してプロテアーゼ K による消化を試みた。EGFP はプロテアーゼ K に対して耐性であり、粒子内でのトポロジーにより消化されるパターンが異なることがわかったが、これは EGFP 部分のアミノ末端が L タ

ンパク質のトポロジーに依存しているためと考えられた (図 12)。EGFP に

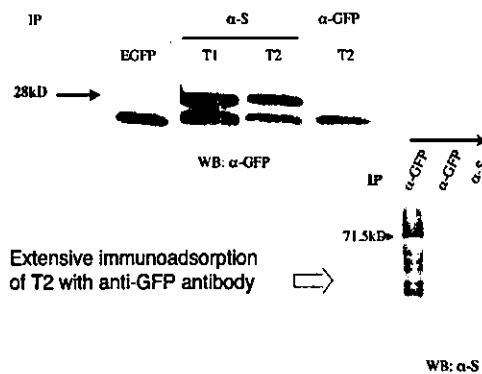


図 12 EGFP 融合 T2 粒子のプロテアーゼ K 処理と抗 EGFP 抗体による吸収の実験。

対する抗体により数回に渡って、粒子の画分を吸収し最後に HBsAg の抗体でウェスタンブロッティングを行うと、抗 EGFP 抗体では吸収できない画分が存在することがわかった。これは EGFP が粒子の中に内封されているか粒子表面に提示されているかの違いに相当し、しかもこの二つのトポロジーは一つの粒子の中では互いに混在していないことが示唆された (図 13)。

D. 考察

DDS は従来、21 世紀の最先端医療技術として期待されて「放出制御」「標的化」「膜透過促進」の 3 つに大別してその技術開発が行われてきたが、これらの技術は必ずしも同じ速度で進んできた

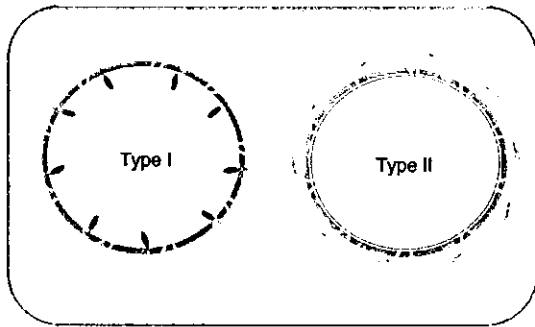


図13 EGFP融合型バイオナノ粒子のトポロジー。EGFPの部分は粒子内部に封入されているTypeIか粒子表層へ提示されているTypeIIのどちらかになる。

とは言えない。標的化を行うためには細胞や組織のマーカーを特定する情報も必要であるため、具体的な標的化技術は他の2つの技術にくらべて遅れているのが現状である。ハーセプチンのような抗体を用いた実用的成功例が出始めたのはごく最近になってからのことである。一方、遺伝子治療は、欠損したり機能しなくなった特定の遺伝子を別の正常な遺伝子に置き換えたり補充する技術だが、*in vivo* でこれを行うためにはDDS技術に依存することになる。現在はウィルスベクターやリポソームを直接患部へ注入する方法がとられているが、特定の細胞・組織内に効率よく遺伝子を導入することは未だに難しい。そのため、再生医療の技術としても考えられてきた*ex vivo*の手法が遺伝子治療に利用され、現在は*in vivo*と*ex vivo*の両方が同時に行われている。これらの方法に無い、しかも重要と考えられるのはやはり、必要な細胞や組織を*in vivo*で特異的に標的化するDDS技術である。したがって、ウィルスの感染効率と組織特異性に着目して、生理活性物質を細胞・組織内にピンポイントで効率よく導入するために、生体認識分子を提示するウィルス由来の中空タンパク質ナノ粒子を大量に生産し、それを非ウィルスベクター（運搬

体)として細胞へ導入する方法は、大きな可能性を秘めている。本研究ではバイオナノ粒子の安定性をシステイン残基置換により、ランダムなジスルフィド結合の形成を阻止することにより向上させることができた。また、抗体による免疫沈降のデータに基づきEGFP融合型粒子は一つの粒子内で一定のトポロジーで存在することが明らかになった。これにより融合型粒子の方法論はタンパク質内封だけにとどまらず、新たな標的部位をデザインすることも可能となった。

E. 結論

バイオナノ粒子を構成するB型肝炎ウイルス表面抗原Lタンパク質に存在する14個のシステイン残基を置換して種々のミュータントを作成した結果、残基数を6個まで減少させることができたことがわかった。これにより、Lタンパク質が分子間および分子内によるランダムなジスルフィド架橋を生じて変性し粒子の安定性を損なう可能性を最小限にとどめて、野生型よりも効率よく遺伝子や化合物を送達する能力をもつm8粒子を得ることができた。一方、バイオナノ粒子へタンパク質封入する方法として考案した遺伝子融合による緑色蛍光タンパク質融合型粒子は、Lタンパク質のカルボキシル末端の長さを最適化して発現させる必要があることがわかった。さらに、発現した融合型粒子は緑色蛍光タンパク質を、内封するものと外側へ提示するものに分かれることが判明した。これにより目的に応じたデザインが工夫できることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Futami, J, Kitazoe, M, Maeda, T, Nukui, E, Sakaguchi, M, Kosaka, J, Miyazaki, M, Kosaka, M, Tada, H., Seno, M, Sasaki, J, Hhuh, N, Namba, M, Yamada, H. Intracellular delivery of

- proteins into mammalian living cells by polyethyleneimine -cationization. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 99(2):95-103.
- 2) 山田忠範、妹尾昌治、近藤昭彦、上田政和、谷澤克行、黒田俊一「中空バイオナの粒子を用いたピンポイントドラッグデリバリーシステム」高分子論文集、*Japanese Journal of Polymer Science and Technology* Vol.61, No.12, 606-612, 2004
 - 3) Strizzi L, Bianco C, Normanno N, Seno M, Wechselberger C, Wallace-Jones B, Khan NI, Hirota M, Sun Y, Sanicola M, Salomon DS. Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. *J Cell Physiol.* 2004 Nov; 201(2): 266-276
 - 4) Ogata, T, Park KY, Seno, M, Kojima, I. Reversal of streptozotocin-induced hyperglycemia by transplantation of pseudoislets consisting of beta cells derived from ductal cells. *Endocr J.* 2004 Jun; 51(3):381-386.
 - 5) Tada, H, Onizuka, M, Muraki, K, Masuzawa, W, Futami, J, Kosaka, M, Seno, M, Yamada, H. Insertional -fusion of basic fibroblast growth factor endowed ribonuclease 1 with enhanced cytotoxicity by steric blockade of inhibitor interaction. *FEBS Lett.* 2004 Jun 18; 568(1-3):39-43.
 - 6) Yamada, T, Ueda, M, Seno, M, Kondo, A, Tanizawa, K, Kuroda, S., Novel tissue and cell type-specific gene/drug delivery system using surface engineered hepatitis B virus nano-particles. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2004 Jun; 4(2):163-167.
 - 7) Li L, Yi Z, Seno, M, Kojima, I. Activin A and betacellulin: effect on regeneration of pancreatic beta-cells in neonatal streptozotocin-treated rats. *Diabetes.* 2004 Mar; 53(3):608-615.
2. 学会発表
- 1) 木村修一郎、二見淳一郎、北添翠、村田等、小坂恵、多田宏子、妹尾昌治、山田秀徳「大腸菌性インクルージョンボディからのニワトリアビジン4量体の酸化的リフォールディング」第77回日本生化学会大会、発表妙録集 p.773, 2P-152(W42-3) 2004.10.14
 - 2) 釣井隼、二見淳一郎、北添翠、村田等、小坂恵、多田宏子、妹尾昌治、山田秀徳「T7 RNA polymerase の細胞ない導入による外部制御可能な一過性遺伝子発現」第77回日本生化学会大会、発表妙録集, p.987, 3P-654(W22-3) 2004.10.15
 - 3) Tuoya, Koichi Hirayama, Tadahiro Nagaoka, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, Masaharu Seno, Characterization of cell surface marker proteins in SV-T2 cells, The American Society for Cell Biology 44th Annual Meeting 2004.12.8, USA(Wash DC)
 - 4) Toshihiro Hashizume, Tadahiro Nagaoka, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, Masaharu Seno, Molecular design of soluble ErbBs with IgG-hinge region, The American Society for Cell Biology 44th Annual

- Meeting, Late Abstract, L375, 2004.12.8, USA(Wash DC)
- 5) Dongwei Yu, Chie Amano, Takayuki Fukuda, Tadanori Yamada, Shun'ichi Kuroda, Katsuyuki Tanizawa, Akihiko Kondo, Masakazu Ueda, Hidenori Yamada, Hiroko Tada, Masaharu Seno, Imaging of human liver cells by specific delivery of Bio-nanocapsule fused to EGF, 第27回日本分子生物学会年会, プログラム・講演要旨集, p.260, 3PB-139, 2004.12.10
 - 6) 二見淳一郎, 中西秀高, 鉄矢陽子, 渡辺泰宜, 木村修一郎, 村田等, 北添翠, 小阪恵, 多田宏子, 妹尾昌治, 甲斐敬, 山田秀徳「タンパク質生細胞内導入法による living cell imaging におけるバックグラウンド低減化技術」第27回日本分子生物学会年会, プログラム・講演要旨集, p.209, 3PA-436, 2004.12.10
 - 7) 村田等, 阪口政清, 二見淳一郎, 北添翠, 小坂恵, 多田宏子, 妹尾昌治, 許南浩, 山田秀徳 (医・細胞生物) 「カチオン化 SV40T 抗原 N 末端ドメインによる細胞増殖の人工制御」第27回日本分子生物学会年会, プログラム・講演要旨集, p.239, 3PA-437, 2004.12.10
 - 8) 拓亜, 平山幸一, 永岡唯宏, 多田宏子, 山田秀徳, 妹尾昌治「細胞表面マーカー・マイクロアレイを用いる BALB/c 3T3 細胞とその SV40 形質転換細胞 SV-T2 の比較」第27回日本分子生物学会年会, プログラム・講演要旨集, p.239, 3PA-439, 2004.12.10
 - 9) 永岡唯宏, 多田宏子, 山田秀徳, 岡村浩, 妹尾昌治「Diamond-like Carbon コーティングスライドグラスを用いたヒトベータセルリン変異体アレイによる受容体結合性の解析」第27回日本分子生物学会年会, プログラム・講演要旨集, p.896, 3PA-440, 2004.12.10
 - 10) 橋爪敏浩, 永岡唯弘, 多田宏子, 山田秀徳, 妹尾昌治「免疫グロブリンのヒンジ領域を用いた可溶性 ErbB のデザイン」第27回日本分子生物学会年会, プログラム・講演要旨集, p.896, 3PA-441, 2004.12.10
 - 11) 大野利晃, 多田宏子, 山田秀徳, David Salomon, 妹尾昌治「Tomoregulin の細胞外領域がもつ生物活性の解析」第27回日本分子生物学会年会, プログラム・講演要旨集, p.896, 3PA-442, 2004.12.10
 - 12) 吉田慎之介, 多田宏子, 福田隆之, 名木田真奈, 黒田俊一, 谷澤克行, 近藤昭彦, 上田政和, 山田秀徳, 妹尾昌治「DDS 用バイオナノカプセル (BNC) を構成する蛋白質への Cys 残基欠損の効果」第27回日本分子生物学会年会, プログラム・講演要旨集, p.896, 3PA-440, 2004.12.10
 - 13) 二見淳一郎, 中西秀高, 鉄矢陽子, 渡辺泰宜, 木村修一郎, 村田等, 北添翠, 小阪恵, 多田宏子, 妹尾昌治, 甲斐敬, 山田秀徳「タンパク質生細胞内導入法による living cell imaging におけるバックグラウンド低減化技術」第27回日本分子生物学会年会, プログラム・講演要旨集, p.209, 3PA-436, 2004.12.10

肝細胞がん治療への応用

分担研究者 上田 政和 慶應義塾大学医学部・講師

協力研究者 城戸 啓 慶應義塾大学医学部・助手

協力研究者 宮田 量平 慶應義塾大学医学部・助手

本研究は、ヒト肝細胞にのみピンポイントに薬物、遺伝子、タンパク、siRNAなどをデリバリー可能なバイオナノ粒子を用いてヒト肝細胞癌に対する治療を確立しようという意図を持った研究である。我々はバイオナノ粒子としてひとつはヒト肝臓に対してきわめて特異的かつ強力な感染性を有するB型肝炎ウイルス(HBV)の外皮たんぱく質であるL粒子を、またもうひとつの手段としては優れた生体および血液適合性を有する水溶性共重合体ポリマーであるPMB30Wを用いた。PMB30Wは親水基と疎水基の両方を有しており水溶性でかつ疎水性物質を安定的に内包させることや遺伝子を結合させることなどができる。さらに、p-ニトロフェノールカルボニルオキシエチルメタクリレートを加えたpoly(MPC-co-BMA-co-NPMA)はエステル結合によりHBs抗原や増殖因子などを結合させ、特定の組織や細胞に特異性や指向性を持たせることが可能となる。本年度の研究としては、HBs抗原L粒子についてはL粒子に封入する予定の可溶性VEGF遺伝子が細胞内で発現可能か否かを明らかにし、PMB30Wについてはパクリタクセル封入体の特性を明らかにするとともにHBs抗原結合ポリマーが可溶性VEGF遺伝子をヒト肝細胞癌にピンポイントにデリバリーしてVEGFタンパクを発現することを証明した。今後は、本研究を発展させて肝細胞癌に対する特異性の高い遺伝子治療法や化学療法を開発させていきたいと考えている。

A. 研究目的

ヒト肝細胞癌は日本の国民病とも言うべき疾患であり、日本を始めとした東南アジアに多い。この肝細胞癌は主として肝炎を母体として発生するものであり、再発・再燃が高率であることや肝機能障害を伴っていることなどが特徴であるからできるだけ

生体に侵襲の少ない治療法が望ましい。そのためには、どうしてもヒト肝細胞癌に対する特異性の高くしかも生体にとって安全性も高い治療法の開発が必要である。そこで、われわれはヒト肝細胞癌に対してピンポイントに遺伝子・薬物・タンパク・siRNAなどをデリバリーするバイオナノキャリア

一の開発を試みた。われわれ2種類のバイオナノキャリアの開発を試みた。ひとつは、ヒト肝臓に対して極めて特異的かつ強力な感染性を有するB型肝炎ウイルスの外皮タンパク質であるHBs抗原L粒子である。本粒子を酵母で産生させると、直径100nm前後の中空粒子を形成する(L粒子)。このL粒子はヒト肝細胞に高い標的化能力を持ち、生体内でピンポイントに遺伝子や薬物送達出来るナノキャリアーとして利用可能である。実際、L粒子内にヒト第IX因子cDNAを封入してヒト肝細胞癌を移植したマウスに尾静脈から静注しその後尾静脈から採血して血中ヒト第IX因子を測定すると30日以上にわたって治療域である2%を超える高値を示していた。さらに、肝細胞特異的なレセプターを他の特異性を持つレセプターに変換すれば、任意の細胞へのピンポイント送達も可能である。このL粒子は、ウイルスゲノムをまったく含まない、安全性と特異性に高くしかも細胞や組織への高い遺伝子導入効率を持ち、遺伝子、タンパク質、化合物、RNA等種々の物質を細胞へ送達する優れたシステムである。そこで、本粒子を改良して分子標的療法のキャリアーとなるバイオナノ中空粒子を確立するとともに肝細胞癌の治療薬を開発することを目的とした。他の方法として、われわれはMPCポリマーを用いた。MPCポリマーは人工腎臓や人工心臓などにバイオマテリアルとして広く臨床応用され、その安全性は認められている。このMPCポリマーは側鎖にリン脂質極性基を有し、優れた血液適合性を有する2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)とn-ブチルメタクリレート(MBA)との水溶性共重合体

(PMB30W)であり、水溶性でかつ疎水性物質を安定に内包することが出来る。もともと抗癌剤には難溶性のものが多く、本物質により徐放性で易水溶性となりしかも、このミセル体は大きさが平均50nmで腫瘍組織集積性も高くなりしかもセンチネルノードに集積するスズコロイドと同じ大きさであり抗癌剤を経リンパ流的に到達させることも可能になり、新たな投与方法が生まれることも予想される。また、p-ニトロフェニルカルボニルオキシエチルメタクリレート(NPMA)を加えたpoly(MPC-co-BMA-co-NPMA)(PMBN)はエステル結合により増殖因子や抗体などを結合させ、特定の組織や細胞に特異性や指向性を持たせることが可能となる。本年度の研究としては、HBs抗原L粒子についてはL粒子に封入する予定の可溶性VEGF遺伝子が細胞内で発現可能か否かを明らかにし、PMB30Wについてはパクリタクセル封入体の特性を明らかにするとともにHBs抗原結合ポリマーが可溶性VEGF遺伝子をヒト肝細胞癌にピンポイントにデリバリーしてVEGFタンパクを発現することを証明した。今後は、本研究を発展させて肝細胞癌に対する特異性の高い遺伝子治療法や化学療法を開発させていきたいと考えている。

B. 研究方法

1. 可溶性VEGF受容体遺伝子による遺伝子治療に関する研究：可溶性VEGF受容体遺伝子であるFlt-1発現plasmidをHVJ vectorに封入し、ヒト肝癌細胞株NuEにin vitroおよびin vivoで投与した。In vitroについては培養上清中の可溶性VEGF受容体濃度をELISA法で測定した。In vivoについて

は、NuE をヌードマウス皮下に移植したのち、Flt1-HVJ Envelope vector を尾静脈より静注した。対照群には同量の HVJ Envelope vector のみを静注した。経時的に推定腫瘍重量と体重を測定した。Vector を投与後 14 日目にヌードマウスを犠死せしめ肝臓、脾臓、腎臓、腫瘍を摘出して重量を測定した。

2. パクリタクセル封入 MPC ポリマーに関する研究：細胞膜構造に類似した特殊なポリマーに難水溶性抗癌剤であるパクリタクセル (PTX) を内包し、ラット盲腸粘膜下層に局所注入した群 (SM 群) 及び尾静脈から静注した群 (IV 群) の 2 群間で SN を含む盲腸間膜 LN における PTX 濃度を経時的に比較した (n=3~5)。またラット盲腸間膜 SN 転移モデル (ラット腹水浮遊肝細胞癌 AH130 を盲腸粘膜下層に注入して作成) に対し PTX 内包ポリマーを腫瘍直下粘膜下層に投与し、1 週間後の SN を含む流域 LN 重量を比較し抗腫瘍効果を検討した (SM 群、IV 群、非投与 Control 群 n=6)

3. HBs 抗原結合可溶性 VEGF 受容体 cDNA 封入ポリマーに関する研究：生体適合性を有した 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) と、遺伝子に結合可能な Cation unit である N,N-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) と、蛋白質の NH₂ 基とエステル結合し特異性を持たせることを可能にさせる p-nitrophenyl-carboxyloxyethyl methacrylate (NPMA) とが polymer 結合した化合物 (PMDN) を Vector の骨格として用いた。さらに PMDN に組織特異性を持たせる目的で HBs 抗原または EGF を、抗腫瘍効果を発現させるために生体内で血管新生抑制作用を有する sFlt-1 cDNA

をそれぞれ結合させたもの (PMDN complex; sFlt-1/PMDN with HBs または sFlt-1/PMDN with EGF) を作製した。2. 上記 PMDN complex を用いて、腫瘍細胞 HepG2, WiDr それぞれに transfection させ ELISA 法にて sFlt-1 発現量を比較検討した。3. 腫瘍細胞 HepG2 の皮下担癌マウスモデルを作製し、それらに上記 PMDN complex を腹腔内投与し腫瘍径を経時的に測定し抗腫瘍効果を検討した。

C. 研究結果

可溶性 VEGF 受容体遺伝子による遺伝子治療に関する研究：Flt-1 plasmid を封入した HVJ Envelope vector を NuE に in vitro で添加するとその培養上清中に可溶性 VEGF 受容体が検出されたが、HVJ Envelope vector のみを添加された対照群では可溶性 VEGF 受容体は検出されなかった。NuE をヌードマウス皮下に移植させたモデルでは、対照群では腫瘍重量は経時的に増加し 14 日後には 7 倍以上になったが、Flt1 遺伝子を封入した HVJ Envelope vector を投与した群では 14 日後に腫瘍重量が 2 倍になったのみで対照群に比して有意に抑制されていた。体重や各種臓器重量は投与群と対照群との間に有意の差を認めなかった。

パクリタクセル封入 MPC ポリマーに関する研究：SM 群の SN 内 PTX 濃度は投与 6 時間後において IV 群の約 9 倍と有意に高値を示した (p<0.05)。さらに SM 群では投与 24 時間後においても SN 内 PTX 濃度は保持され、その濃度はヒト癌細胞株 A431 における IC₅₀ を上回っていた。抗腫瘍効果の検討では SM 群では IV 群、Control 群より有意に SN およびその他の流域 LN 重量が低値を示

した($p < 0.05$)。

HBs 抗原結合可溶性 VEGF 受容体 cDNA 封入ポリマーに関する研究：ELISA 法による sFlt-1 発現量は、HepG2 に sFlt-1/PMDN with HBs を transfection させた群において、他の群に比較して有意に多く認められた。

さらに HepG2 皮下担癌マウスに sFlt-1/PMDN with HBs を腹腔内投与した群において、他の群と比較して有意な腫瘍縮小効果を認めた。

D. 考察：個体で腫瘍が増大していくためには腫瘍に酸素や栄養素が供給されることが必要不可欠でありそのためには血管新生無くしては腫瘍の増殖もみられない。多くの腫瘍細胞において血管新生因子である VEGF や FGF などが産生されていること周知の事実である。ところで、腫瘍における血管新生因子のうちで代表的なものは VEGF であるが、VEGF は可溶性 VEGF 受容体と結合すると complex を作って、その生物活性を失う。そこで、可溶性 VEGF 受容体 cDNA を HVJ や水溶性共重合体ポリマーを用いて腫瘍細胞や個体に投与すると可溶性 VEGF を産生させる事が可能でしかも生体内の VEGF を中和することにより血管新生を阻害する効果を有していることが判明してきた。HVJ を用いた研究では特異性を持たせることはできず可溶性 VEGF 受容体は主として肝細胞で産生されていたが、HBs 抗原を結合させたポリマーでは、ヒト肝細胞癌でのみ可溶性 VEGF 受容体 cDNA は発現し、細胞特異性を示すことが可能となった。

この水溶性共重合体ポリマーは本研究で示したように遺伝子ばかりではなく、親水

性基と疎水性基の両方を有しておりパクリタクセルをはじめとした抗がん剤などで疎水性の高い物質でも容易に封入可能で、有用な drug delivery system ともなりえるものと考えている。

E. 結論：可溶性 VEGF 受容体 cDNA を HVJ や水溶性共重合体ポリマーを用いて個体や細胞で可溶性 VEGF 受容体を発現させることにより、個体で血管新生を阻害することにより抗腫瘍効果を発揮させることが可能であることが判明した。さらに、水溶性共重合体ポリマーに HBs 抗原を結合させるとヒト肝細胞癌特異的に遺伝子を運搬しかつ発現させることが可能であることが証明された。今後は、さらに研究を進展させて肝細胞癌に対する新たな遺伝子治療へと発展させたいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashida T., Ueda M., Aiura K., Tada H., Onizuka M., Seno M., Yamada H., Kitajima M. Anti-angiogenic effect of an insertional fusion protein of human basic fibroblast growth factor and ribonuclease-1 by three-dimensional tube formation assay and mouse dorsal air sac assay. Protein Eng. In press
- 2) Akatsu, T., Ueda, M., Shimazu, M., Wakabayashi, G., Aiura, K., Tanabe, M., Kawachi, S., Tanimoto, A., Shinmoto, H., Sakamoto, M., Kitajima, M.: Kupffer cell

- function of hepatocellular adenoma: Pulse sequence effects in superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging. *J of Gastroenterology and Hepatology*. 2004
- 3) Suzuki, K., Aiura, k., Ueda, M., Kitajima, M.: The influence of platelets on the promotion of invasion by tumor cells and inhibition by antiplatelet agents. *Pancreas* 29(2), 132-140. 2004.
 - 4) Takeuchi, H., Ozawa, S., Shin, C.H., Ando, N., Kitagawa, Y., Ueda, M., Kitajima, M.: Loss of p16 expression is associated with vascular endothelial growth factor expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int. J. Cancer* 109, 483-490. 2004.
 - 5) Kitagou, M., Ueda, M., Aiur, K., Kitajima, M.: Comparison of K-ras point mutation distributions in intraductal papillary-mucinous tumors and ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Int. J. Cancer* 110, 177-182, 2004
 - 6) Suzuki, K., Aiura K., Ueda M., Kitajima M.: Platelets counts closely correlated with the disease-free survival interval of pancreatic cancer patients. *Hepato-Gastroenterology*. 51, 847-853, 2004.
 - 7) Takigawa Y., Akiyama Y., Maruyama K., Sugiyama K., Uchida E., Kosuge T., Ueda M., Kitajima M., Yamaguchi K.: Antitumor effect induced by dendritic cell(DC)-based immunotherapy against peritoneal dissemination of the hamster pancreatic cancer. *Cancer Letters* 215: 179-186. 2004.
 - 8) Ohashi Y., Ueda M., Kawase T., Kawakami Y., Toda M. Identification of an epigenetically silenced gene4, RFX, in human glioma cells using restriction landmark genomic scanning. *Oncogene*, 23: 7772-7779. 2004.
 - 9) Yagi H., Ueda M., Kawachi S., Tanabe M., Aiura K., Wakabayashi G., Shimazu M., Sakamoto M., Kitajima M. Squamous cell carcinoma of the liver originating from non-parasitic cysts after a 15 year follow-up. *Eur J. Gastroenterol Hepatol* 16: 1051-1056. 2004.
2. 学会発表
- 1) 田辺稔, 若林剛, 上田政和, 島津元秀, 河地茂行, 瀧川穰, 阿部雄太, 城戸啓, 八木洋, 赤津知孝, 宮田量平, 高原武志, 清水裕智, 北島政樹. 肝悪性腫瘍に対する凍結融解壊死治療. 104回日本外科学会 4月7~9日 2004年
 - 2) 相浦浩一, 上田政和, 島津元秀, 若林剛, 田辺稔, 河地茂行, 林田哲, 伊藤康博, 千葉斉一, 高橋伸, 北島政樹. 16番リンパ節転移陽性膵癌症例に対する手術適応の検討. 104回日本外科学会 4月7~9日 2004年
 - 3) 杉浦功一, 小澤壯治, 北川雄光, 矢野和仁, 上田政和, 北島政樹. 食道癌における血管新生促進因子およびレセプター発現とその腫瘍臨床的異議. 第90回日本消化器病学会 4月21~23日 2004年
 - 4) 上田政和, 松浦芳文, 北島政樹, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 近藤昭彦. ヒト肝組織移植モデルの確立とHBs抗原L粒子によるヒト肝細胞に対する分

子標的治療法の開発. 第 90 回日本消化器病学会 4 月 21～23 日 2004 年

- 5) 上田政和, 林田哲, 北島政樹, 多田宏子, 妹尾昌治. 増殖因子・受容体を分子標的

とした外科領域における新しい治療薬の開発. 第 41 回日本外科代謝栄養学会 7 月 8～9 日 2004 年

脳内デリバリー可能な中空バイオナノ粒子の創製
-膜透過ペプチド (PTD) を用いたL粒子の修飾-

分担研究者 平岡真寛 京都大学医学研究科腫瘍放射線科学・教授

分担研究者 近藤科江 京都大学医学研究科腫瘍放射線科学・COE特任助教授

本研究は、膜透過性を有する 10 個程度のポリペプチド (PTD) を用いて、脳内にデリバリー可能な中空バイオナノ粒子を構築するための基礎的技術を確立することを目的として行うものである。本年度は、脳内にデリバリー可能な PTD の設計・構築・デリバリー能の検証を行い、中空バイオナノ粒子に付加すべき PTD の候補を決定するための研究を行った。その結果、新規に構築した PTD 配列が脳への移行効率がよいことがわかった。この配列を中空バイオナノ粒子に導入することにより、膜透過性をもった中空バイオナノ粒子が構築できるとかんがえられ、脳への移行が可能な中空バイオナノ粒子の構築の可能性が示された。

A. 研究目的

1988年にGreenとFrankelの2つのグループが、同時にエイズウイルス (HTLVIII) の構成タンパク質であるTATは細胞膜を通過することを発表した。その後1994年に、FawellらがTAT蛋白質の36アミノ酸を融合したタンパク質が膜を通過して細胞内に入ることを示した。1999年に、Dowdyらは、TAT蛋白質の11アミノ酸を融合した巨大な β -galactosidaseタンパク質 (160kDa以上) をマウスの腹腔に注射することで、脳を含めた全身の組織細胞に β -galactosidaseタンパク質を活性を保ったままデリバリー出来ることを報告し、TAT融合タンパク質は、*in vivo* デリバリー手法の一つとして一躍脚光を浴び始めた。

このTATタンパク質の11アミノ酸は、

塩基性のアミノ酸が多く含まれていることから、塩基性アミノ酸を連ねた poly-Lys, Poly-Arg の融合タンパク質も研究が進み、これら膜透過性を有する短い polypeptide を PTD (protein transduction domain) と総称し、様々な研究に利用されている。

これまでの研究で PTD は、化合物、antisense RNA、DNA といった核酸、ファージ、短いペプチド、大きなタンパク質や 40 nm の鉄ビーズに至るまで融合させた物を細胞内に輸送することが報告されている (図1)。最近では、200 nm のリボゾームも細胞膜を通過して細胞内に導入することが出来たという報告があり、かなり大きなものまで輸送できること考えられているが、その細胞膜通過の機構は未だ解明されていない (図1に膜透過機構のモデルを示す。)

しかし、200 nm のリポソームも輸送できるということで、*in vivo*でのドラッグデリバリーシステム (DDS) に利用できるのではないかと興味が高まってきた。

本研究は、中空バイオナノ粒子に PTD を導入することで、中空バイオナノ粒子に *in vivo* デリバリー能を付加することで、脳にまで中空バイオナノ粒子を輸送すること

が出来るのではないかとこの仮説の基に、PTD を中空バイオナノ粒子に導入し、そのデリバリー能を検証することを目的とし、最終的に脳内に治療薬をデリバリーすることができる DDS を開発しようとするものである。

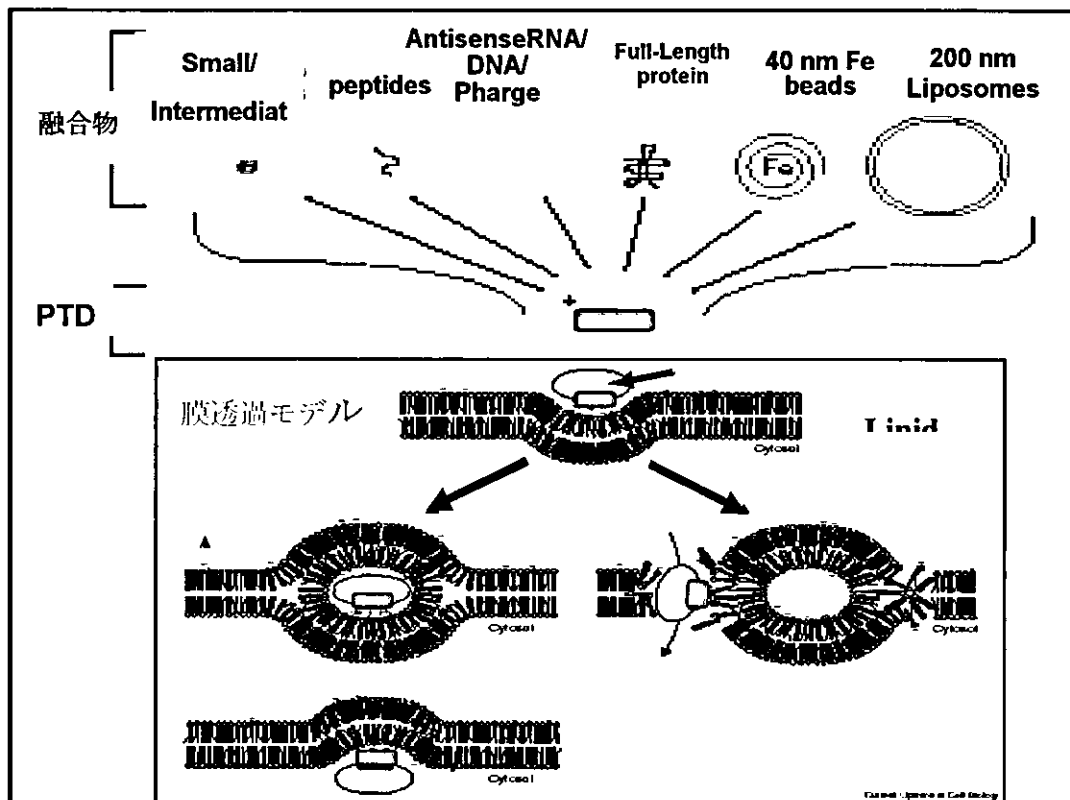


図1 PTDにより細胞内に輸送される融合物

B. 研究方法

1. PTD の設計とモデルタンパク質の構築

PTD は基本的には塩基性のタンパク質を配置することで膜透過性を付与するペプチドを作成することが可能である。これまでもかなりの数の既存のタンパク質や人工ペプチド PTD 配列が報告されている (表

1)。しかしながら、塩基性の配列を融合することでタンパク質全体の極性が著しく偏り、融合タンパク質として合成する際に不都合が生じ、作成が困難になる場合がある。したがって、配列を工夫し、融合タンパク質全体を確実に合成する必要がある。また、融合したタンパク質により、膜透過性の効率が異なってくるため、いくつかの

PTD を設計しモデルタンパク質により膜透過性を検証を行う必要が出てくる。
 そこで、いくつかの PTD 配列を設計し、
 Myc タグをつけて細胞への導入効率をけん
 しょうしたところ、PTD3 と命名した配列が
 細胞内への導入効率が良いことがわかった。
 この PTD 配列はトリプトファンをリジン、

アルギニンと組み合わせた物で、これまで
 報告されている物とは異なるが、融合タン
 パク質の安定性の面でもかなり有用である
 ことがわかった。

表 1 PTD

Polymer	Sequence	Uptake efficiency*	# of Arg
HIV-1 Tat ₅₁₋₅₇	KRRQRR	low	4
HIV-1 Tat ₄₉₋₅₅	RKKRRQR	low	4
HIV-1 Tat ₄₉₋₅₆	RKKRRQRR	low	5
Arg ₄	RRRR	low	4
Arg ₅	RRRRR	medium	5
d-Arg ₅	rrrrr	medium	5
Arg ₁₆	RRRRRRRRRRRRRRRR	medium	16
Yeast PRP ₆₁₂₉₋₁₄₄	TRRNKRNRRIQEQLNRK	medium	5
φ21 N ₁₂₋₂₉	TAKTRYKARRAELIAERR	medium	5
λ N ₁₋₂₂	MDAQTRRRERRAEKQAQWKAAN	medium	5
FHV coat ₃₅₋₄₉	RRRRNRTRRNRRRVR	medium	11
Arg ₆	RRRRRR	medium	6
d-Arg ₆	rrrrrr	medium	6
BMV Gag ₇₋₂₅	KMTRAQRRAAARRNRWTAR	high	7
IITLV-II ReX ₄₋₁₆	TRRQTRRRARRNR	high	8
HIV-1 Rev ₃₄₋₅₀	TRQARRNRRRRWRERQR	high	9
HIV-1 tat ₄₈₋₆₀	GRKKRRQRRRPPQ	high	6
HIV-1 tat ₅₇₋₄₉	RRRQRRKKR	high	6
d-HIV-1 tat ₄₉₋₅₇	rkkrrqrrr	high	6
Arg ₇	RRRRRRR	high	7
d-Arg ₇	rrrrrrr	high	7
N-Arg ₇	RRRRRRR	high	7
Arg ₈	RRRRRRRR	high	8
d-Arg ₈	rrrrrrr	high	8
Arg ₉	RRRRRRRRR	high	9
d-Arg ₉	rrrrrrr	high	9
Carbamate 9	Guanidine-9 oligocarbamate	high	9 (guanidine) ..

*Uptake efficiency is a qualitative illustration of relative activities among CPPs from published studies.

2. 培養細胞を用いた PTD 融合タンパク質
 の細胞内輸送の検証

上記の様にいくつかの PTD 配列を持った融
 合タンパク質が細胞内で有効に機能するか

否かを検証する目的で、低酸素によるアポトーシスを抑える機能をもつタンパク質と融合させた融合タンパク質を培養細胞の培地に添加して、低酸素条件下で細胞死をどれくらい抑制できるかという検証を FACS 解析法を用いて行った。すなわち、様々な濃度の PTD 融合タンパク質を細胞の培養液に添加後、通常培養(20%O₂)と低酸素状態(1%)で培養し、低酸素培養で引き起こさ

れるアポトーシスがどの程度抑えられるかを調べた。その結果、融合しているタンパク質は同じであるにもかかわらず、PTD1 はほとんど低酸素によるアポトーシスを抑えなかったが、PTD3 は極めて低濃度で有効に低酸素によるアポトーシスを抑制することが分かった(図2)。このことから、中空バイオナノ粒子に導入する PTD には PTD3 を用いることが有効であると考えられた。

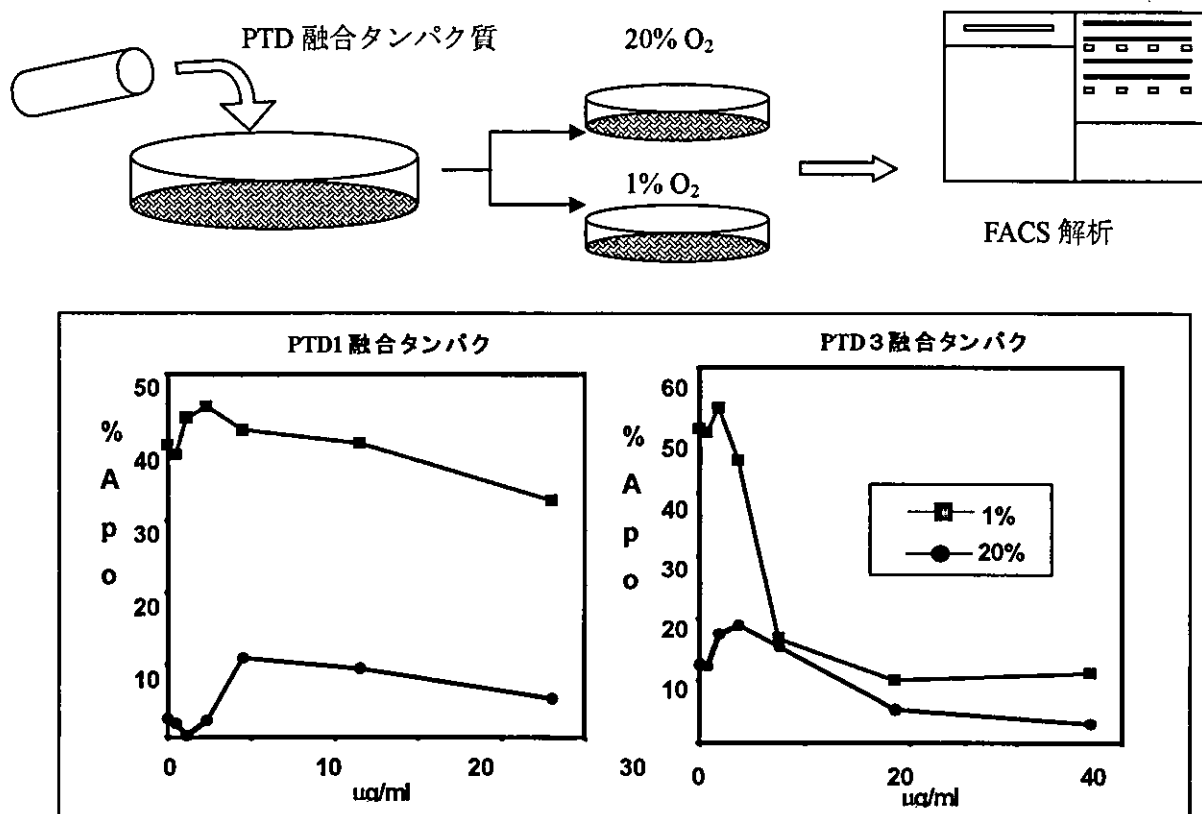


図2 PTD 融合タンパク質のアポトーシス抑制能の比較

3. 動物実験での脳内輸送の検討

PTD3 融合タンパク質 (Myc タグ付加) をマウスに腹腔内投与して脳までの輸送状態を調べた。具体的には 50mg/Kg の PTD3-Myc タンパク質を腹腔内に投与して投与後 12 時間までに脳を灌流固定し myc

タグに対する抗体を用いて免疫染色を行い、組織での PTD3 融合タンパク質の脳内分布を調べた。血管床末梢辺縁部 (A, B)、皮質 (C, D)、CAI (E, F) のいずれにおいても PTD3 融合タンパク質を投与したネズミでは融合タンパク質 (濃茶色) が確認