

一取締役の両立を目指して――  
黒田俊一

産学官連携ジャーナル 1 (2005),  
No. 6, 25-28.

外来タンパク質を融合したバイオナノキャリアに関する研究

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型肝炎ウイルスの特性を生かしたヒト肝臓細胞に特異的な DDS ベクター「バイオナノキャリア」の性能の向上を目的として研究を進めている。B型肝炎ウイルスの表面抗原タンパク質を遺伝子組換えで発現させると、直径約 100 ナノメートルの中空粒子を形成する。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 (バイオナノキャリア) 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、このバイオナノキャリア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、表面抗原タンパク質遺伝子と外来タンパク質遺伝子的を融合させたバイオナノキャリアの作成を試みた。実験では表面抗原 L-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 (GFP) とホタル由来のルシフェラーゼ (Luc) を融合させることを試みた。これらのタンパク質は蛍光や発光により、その局在を知る事ができるレポータータンパク質として有用であるので、分子標的によるバイオイメ□ジングを視野に入れた形の癌の標的を考える事ができる。L-タンパク質の C 末端の長さを調整して融合タンパク質粒子の発現量を上げる工夫を行い、GFP 融合バイオナノキャリアを作成して *in vivo* で投与し、ヌードマウスに移植したヒト肝臓がん由来細胞の標的を検討した。尾静脈から注射した GFP 融合バイオナノキャリアは標的がん細胞に到達し、移植組織において緑色蛍光が効率よく検出されることを確認した。さらに GFP を Luc に置き換えて生体観察を可能にする系を構築中である。

A. 研究目的

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、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。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このLタンパク質を、原子間力顕微

鏡で観察すると、平均直径100-200 nmの粒子像が確認できる。興味深いことに拡大像では、B型肝炎ウイルスの電顕像に酷似している。すなわちLタンパク質はそれ自身が粒子形成能を有することが示唆された。さらに、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ため、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保持されている。

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のナノ粒子を「バイオナノキャリア」として応用する研究を行っている。しかし、このバイオナノキャリア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わかったのでシステイン残基を置換したL-タンパク質の発現を試みた。この結果、8個のシステインが置換可能で、タンパク質の安定化に寄与した。

さらに、このバイオナノキャリアにタンパク質を封入する場合には変性や失活を伴いやすいと予想されるため、L-タンパク質のC末端に外来タンパク質を遺伝子的に融合する形で封入する方法を考案した。この場合、GFPやルシフェラーゼを融合する事により、*in vivo*で投与した場合、その局在を知る事ができるレポーターとして有用であり、分子標的によるバイオイメージングを視野に入れた形の癌の標的は標的に到達する制がん剤の濃度をコントロールできる可能性があり、分子標的をさらに確実な技術にする。

## B. 研究方法

### 1. GFP 融合バイオナノキャリアの作製

緑色蛍光タンパク質 GFP の融合を行い、組換え発現で粒子を形成させた。この外来タンパク質部分が粒子内に封入または提示されることにより、100%の効率でタンパク質を保持するバイオナノキャリアの作製を試みた。L-GFP 融合タンパク質発現を最適化する為に L-タンパク質のカルボキシル末端の長さを最適化して

遺伝子発現の効率化を図った。発現は COS7 細胞により行った。

発現の量は、抗原量と GFP の蛍光強度により確認した。さらに、GFP 部分の粒子上でのトポロジーについてはプロテアーゼ K 処理と抗 GFP 抗体に対する反応性により評価した。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確認し、さらに、ヒト肝臓がん細胞株を移植したヌードマウスを用いて *in vivo* での到達能力を評価した。現在は酵母細胞で L-GFP 融合タンパク質の発現系を構築中である。

### 2. ルシフェラーゼ融合バイオナノキャリアの作製

GFP の融合を行ったのと同様に、組換え発現でホタル (*Photinus pyralis*) 由来ルシフェラーゼ (Luc) を融合して粒子を形成させた。L-Luc 融合タンパク質発現を最適化する為に L-タンパク質のカルボキシル末端の長さを GFP の場合と同様に最適化して遺伝子発現の効率化を図った。発現は COS7 細胞により行った。

発現の量は、抗原量と Luc の発光強度をルミノメーターで確認した。また、この融合タンパク質粒子を酵母細胞で発現させるためにベクターの構築を行っている。また、Luc を用いた生体のイメージングを行うためにプロテイン A の Z モチーフ 2 個を融合させて ZZ-Luc を調製して、イメージングの検討を先行している。

## C. 研究結果

### 1. GFP 融合バイオナノキャリア

Lタンパク質のC末端を45アミノ酸残基欠損させた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

を確認の後、L-GFP 融合タンパク質のトポロジーをプロテアーゼプロテクション法により調べて、GFP 内包型に加えて提示型が存在する事およびこれらが互いに独立して存在することがわかった。これを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 1)。

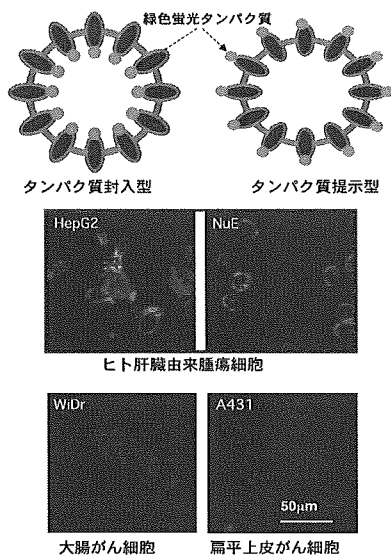


図 1 GFP 融合型バイオナノキャリア。GFP の部分は粒子内部に封入されているか表層へ提示されているかのどちらかになる。肝臓細胞表的能力の *in vitro* での評価をヒト肝臓がん由来細胞、HepG2, NuE; ヒト大腸がん由来細胞、WiDr; ヒト扁平上皮がん由来細胞、A431、で比較評価した。肝臓由来細胞でのみで蛍光が観察された。

バイオナノキャリアの原型と同様に、L-GFP 融合ナノキャリアはヒト肝臓由来の細胞にのみを認識して、細胞に集積し、細胞から緑色蛍光を検出する事が可能であった。さらに、これが *in vivo* でも機能することを確認するために、ヌードマウスへがん細胞を移植した担がん動物モデル (図 2) により、実験を行った。

尾静脈より L-GFP 融合ナノキャリア 400ng を投与した後、24 時間経過して移植組織を摘出して、腫瘍を摘出、パラホルムアルデヒドで固定後、包埋し切片

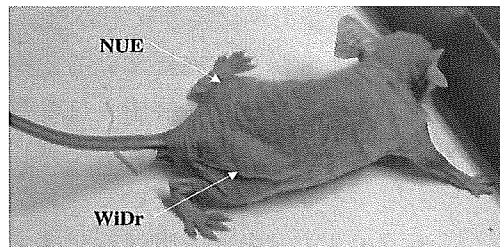


図 2 担がんヌードマウスの作成。ヌードマウスの背中に 2 種類のヒト由来がん細胞を移植して、L-GFP 融合ナノキャリアの *in vitro* における標的モデルとした。NuE, ヒト肝臓がん由来細胞; WiDr; ヒト大腸がん由来細胞。

を作成して、共焦点顕微鏡で観察すると、肝臓由来の細胞には緑色蛍光が観察されたが、対照の大腸がん由来の細胞には観察されなかった (図 3)。

同時に、宿主となったヌードマウスの各臓器に対して同様の手技により切片を作成して顕微鏡観察を行ったが、蛍光が

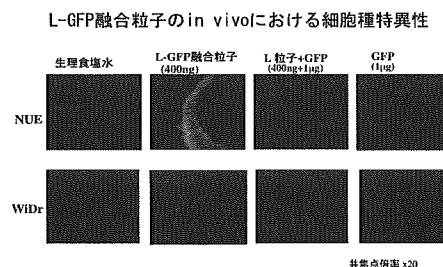


図 3 L-GFP 融合ナノキャリアによる移植腫瘍組織への標的。肝臓細胞由来の NuE の組織のみから緑色蛍光が検出され

検出されるものは無かった (図 4)。これらの結果から L-GFP 融合ナノキャリアは *in vivo* においても細胞・組織特異的に

#### L-GFP 融合粒子の *in vivo* 組織特異性

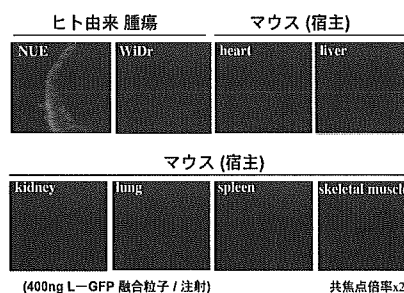


図 4 L-GFP 融合ナノキャリアによる移植腫瘍組織への標的。肝臓細胞由来の NuE の組織のみから緑色蛍光が検出されたが、宿主であるマウスの各臓器、心臓、肝臓、腎臓、肺、脾臓、骨格筋のいずれからも蛍光は検出されなかった。

分子標的を行える能力が卓抜していると評価した。

## 2. ルシフェラーゼ融合バイオナノキャリア

L-Luc 融合ナノキャリアも L-GFP と同様に L タンパク質の C 末端を欠損させて発現効率を検討した (図 5)。L-Luc 融合タ

### Lタンパク質 - ルシフェラーゼ融合のデザイン

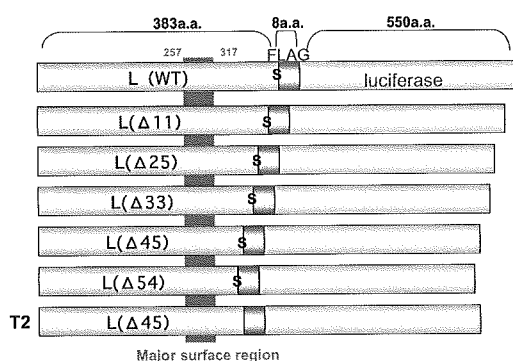


図 5 L タンパク質のカルボキシル末端へ Luc を融合するデザイン。C 末端からの欠損残基数を  $\Delta$  で示している。リンカーは S (連続するセリン 6 残基) と FLAG タグ。GFP を融合した場合のデザインは T2 タイプとして比較した。

ンパク質の COS7 細胞での発現を調べるため細胞を形質転換後 3 日経過して細胞から抽出してその中に含まれるルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、L タンパク質の C 末端は 11 アミノ酸残基欠損で発現が認められたが 54 アミノ酸残基まで欠損させることで、さらに発現効率を上げる事が可能であった。これ以上のアミノ酸の欠損は粒子を形成する場合に支障がある事を L-タンパク質単独ですでに調べている。また、GFP 融合粒子として最適であった 45 アミノ酸の欠損はルシフェラーゼでは発現効率不良であったが、GFP を融合した T2 タイプでは改善された (図 6)。

一方、ZZ-Luc タンパク質は大腸菌で発現させたところ、細胞抽出液の可溶性画

分に存在し、IgG カラムにより精製して、1 リッター培養当たり約 2 mg が得られた。この ZZ-Luc 12i g を BALB/c マウスの尾静脈から注射して、腹腔にルシフェリ

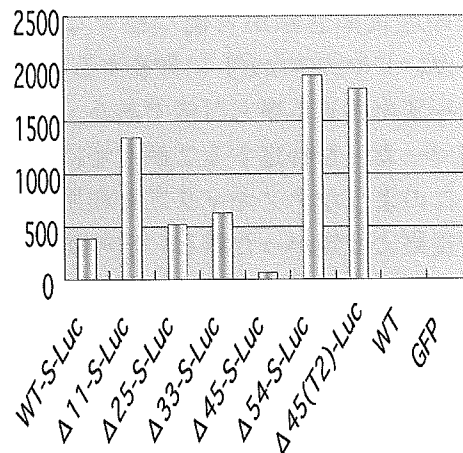


図 6 L-Luc 融合タンパク質の COS7 細胞での発現。細胞を形質転換後 3 日経過して細胞から抽出してその中に含まれるルシフェラーゼ活性を測定した。WT (Luc を融合していないバイオナノキャリア) と GFP はバックグラウンドのコントロール。

ンを注射すると、CCD カメラにより発光を検出する事ができた (図 7)。このことから、生体内イメージングが可能であることがわかった。



図 7 尾静脈注射により ZZ-Luc の生体内発光。大腸菌から遺伝子組換え発現させた ZZ-Luc を 12  $\mu$ g 投与後、ルシフェリン/ATP を腹腔に注射して、冷却 CCD カメラにより発光を観察した。マウスはイソフルランで麻酔した状態。

## D. 考察

能動的な分子標的技術として研究開発

が進んでいるバイオナノキャリアは B 型肝炎ウイルスの表面抗原を利用している事からヒト肝臓細胞を特異的に標的する事が可能である。また、肝臓細胞認識部位を細胞表面認識が可能な様々な分子（リガンドや抗体など）に置換する事で、標的を変化させる事も可能である。細胞表面マーカーを特定する事が可能になれば、このようなナノキャリアを利用する事で従来には無かった新しい形の能動的ドラッグデリバリーシステム（DDS）によりピンポイントで薬剤を送達できる段階へ一歩踏み込んだと言える。

バイオナノキャリアを使用する事で考えられる特長として、薬剤の副作用を抑えながら患部を標的して効率よく治療を行えることにある。しかし、薬剤や症状により投与量がコントロールできれば、副作用を効果的に回避しながら治療効果はさらに上げられ、治療期間の大幅な短縮が期待できる。このためには、投与したナノキャリアがどの程度効率的に到達しているかを無侵襲でモニターするのが最も現実的な手法である。そこで、考えられるのはバイオナノキャリアにレポーターとなる分子が付随している事である。磁性粒子を付加して MRI を利用する方法や蛍光物質を検出することも考えられるが、検出器が高価であったり、体毛などにより光が吸収されたり乱反射したりすることもあり、精度の高い検出には工夫が必要な場合も多い。これに対し発光を利用できれば励起光に使用するレーザーも不要で検出感度も良く定量性も得られるなどの利点がある。

必要な細胞や組織を *in vivo* で特異的に標的化する DDS 技術でこのような発光レポーターが利用できれば、到達した量の推定が可能となる。発光レポーターとして近年頻用されるのがルシフェラーゼで

あるが、この発光を *in vivo* でモニターするには冷却型 CCD カメラがあれば可能である。現状では *in vivo* カメラとしてもっとも安価であり、画像解析ソフトがあれば、定量性も得られるなどのメリットがある。

本研究では、まず GFP 融合型のバイオナノキャリアが、酵母細胞で産生されそれが粒子を形成して、*in vitro* でも *in vivo* でも細胞特異的な分子標的能力を維持している事を明らかにし、外来タンパク質を融合する事が有望な方法である事を示す事ができた。さらにルシフェラーゼを融合するバイオナノキャリアのデザインも完成し、これらの二つの融合粒子を酵母細胞で発現させて大量に取得し、*in vivo* でのイメージング技術を完成させる計画である。これに先立ち、大腸菌から遺伝子組み換えで調製した ZZ-Luc は、生体中で発光可能な分子である事が確認され、抗体を提示した場合に分子標的の効率を検証できる段階に入った。発光レポーターによる *in vivo* イメージングにより、DDS で投与される薬剤の送達量モニターリングシステムへの完成の準備が整いつつある。

## E. 結論

バイオナノキャリアをレポーター型としてデザインするために外来タンパク質遺伝子的に融合する方法が可能であることがわかった。しかし、融合型デザインは一律ではなく融合するタンパク質により L $\square$ タンパク質の C 末端の長さを調節する必要がある。今までの実験では、この融合型のバイオナノキャリアは *in vitro* および *in vivo* での分子標的が可能で、特にルシフェラーゼ利用の可能性が、*in vivo* イメージングの予備実験で明らかとなった。これらの実験はニアオキャリアにタ

ンパク質内包と提示の両方のタイプを作成可能である事を示す一方、レポータータンパク質と融合する事で薬剤送達効率の *in vivo* モニタリングを行える可能性が示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamada S, Terada K, Ueno Y, Sugiyama T, Seno M, Kojima I. Differentiation of adult hepatic stem-like cells into pancreatic endocrine cells. *Cell Transplant.* 14 (9): 647-653, 2005.
- 2) Tuoya, Hirayama K, Nagaoka T, Yu D, Fukuda T, Tada H, Yamada H, Seno M. Identification of cell surface marker candidates on SV-T2 cells using DNA microarray on DLC-coated glass. *Biochem Biophys Res Commun.* 334 (1): 263-268, 2005.
- 3) Ogata T, Dunbar AJ, Yamamoto Y, Tanaka Y, Seno M, Kojima I. Betacellulin-delta4, a novel differentiation factor for pancreatic beta-cells, ameliorates glucose intolerance in streptozotocin-treated rats. *Endocrinology.* 146 (11): 4673-4681, 2005.
- 4) Yu D, Amano C, Fukuda T, Yamada T, Kuroda S, Tanizawa K, Kondo A, Ueda M, Yamada H, Tada H, Seno M. The specific delivery of proteins to human liver cells by engineered bio-nanocapsules. *FEBS J.* 272 (14): 3651-3660, 2005.
- 5) Kitazoe M, Murata H, Futami J, Maeda T, Sakaguchi M, Miyazaki M, Kosaka M, Tada H, Seno M, Huh NH, Namba M, Nishikawa M, Maeda Y, Yamada H. Protein transduction assisted by polyethylenimine-cationized carrier proteins. *J Biochem (Tokyo).* 137 (6):

693-701, 2005.

- 6) 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. *Protein Eng Des Sel.* 18 (7): 321-327, 2005.5.
- 7) 近藤昭彦, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 上田政和「革新的なナノキャリア：中空バイオナノ粒子によるピンポイント DDS」*バイオインダストリー* 5月号, vol.22, no.5, pp.22-27, 2005.
- 8) 近藤昭彦, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 上田政和「中空バイオナノ粒子を用いたピンポイント DDS の開発」*Chemical Engineering,* vol.50, no.5, pp.351-356, 2005.5
- 9) Futami J, Kitazoe M, Maeda T, Nukui E, Sakaguchi M, Kosaka J, Miyazaki M, Kosaka M, H Tada, Seno M, Sasaki J, Hhuh N, Namba M, Yamada H. Intracellular delivery of proteins into mammalian living cells by polyethyleneimine-cationization. *J Biosci Bioeng.* 99 (2): 95-103, 2005.

### 2. 学会発表

- 1) 多田宏子, 妹尾昌治, 新しい DDS のためのバイオナノパーティクルテクノロジー、第一回医歯工学先端技術シンポジウム OKAYAMA、p.3-13. 2005.2.19
- 2) Toshiaki Ohno, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, David Salomon, Masaharu Seno, Biological Activity of the Extracellular Domain of Tomoregulin, 4th European-Japanese Bioorganic Conference & Chemical Biology COE Program Sponsored by Okayama University (Joint Symposium) Program, p.90, P14, 2005.3.18 Okayama

- 3) Tuoya, Koichi Hirayama, Tadahiro Nagaoka, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, and Masaharu Seno, Comparison of cell surface proteins expressed in BALB/c 3T3 and SV-T2 cells by novel DNA microarray. The 4th European-Japanese Bioorganic Conference & Chemical Biology COE Program Sponsored by Okayama University (Joint Symposium) Program, p.91, P15, 2005.3.18 Okayama
- 4) Toshihiro Hashizume, Tadahiro Nagaoka, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, Masaharu Seno, Design of Soluble ErbBs and Interacting with Their Ligands. 4th European-Japanese Bioorganic Conference & Chemical Biology COE Program Sponsored by Okayama University (Joint Symposium) Program, p.92, P16, 2005.3.19.
- 5) Dongwei Yu, Chie Amano, Takayuki Fukuda, Tadanori Yamada, Shun'ichi Kuroda, Katsuyuki Tanizawa, Akihiko Kondo, Masakazu Ueda, Hidenori Yamada, Hiroko Tada, Masaharu Seno, Specific Delivery of Protein to Human Liver Cells by Engineered Bio-Nanocapsule. The 4th European-Japanese Bioorganic Conference & Chemical Biology COE Program Sponsored by Okayama University, Okayama, Japan P93, P17, 52005.3.18.
- 6) Shinnosuke Yoshida, Hiroko Tada, Takayuki Fukuda, Mana Nagita, Shun'ichi Kuroda, Katsuyuki Tanizawa, Akihiko Kondo, Masakazu Ueda, Hidenori Yamada, Masaharu Seno, Effect of Cys-Residue Replacement from Envelope Protein of Bio-Nano Capsule (BNC) for Drug Delivery System. The 4th European-Japanese Bioorganic Conference & Chemical Biology COE Program Sponsored by Okayama University, Okayama, Japan P94, P18, 52005.3.18.
- 7) Tadahiro Nagaoka, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, Hiroshi Okamura and Masaharu Seno, Screening for Receptor Binding Motif of Betacellulin. 4th European-Japanese Bioorganic Conference (EJBC-4) & Chemical Biology COE Program Sponsored by Okayama University, program, p95, P-19, 2005.3.16, Setouchi (Okayama)
- 8) 井野 剛文, 田納 優, 宮田 幸平, 藤木 伸哉, 小坂 恵, 二見 淳一郎, 多田 宏子, 妹尾 昌治, 玉田 太郎, 黒木 良太, 山田 秀徳、分子間疎水相互作用の導入によるヒト RNase1 の結晶化と構造解析、第5回日本蛋白質科学会年会, プログラム・要旨集, p76, 2P-017, 2005.7.1
- 9) Dongwei Yu, Chie Amano, Takayuki Fukuda, Tadanori Yamada, Shun'ichi Kuroda, Katsuyuki Tanizawa, Akihiko Kondo, Masakazu Ueda, Hidenori Yamada, Hiroko Tada, Masaharu Seno, Development of a novel DDS vector the engineered Bio-nanocapsule for specific delivery of proteins to human liver cells. 産学連携を指向した九州バイオサイエンスシンポジウム・疾患プロテオミクス最前線, プログラム・講演要旨集, p93, P047, 2005.9.2
- 10) Hiroko Tada, Shinnosuke Yoshida, Takayuki Fukuda, Ichiro Yamada, Shunichi Kuroda, Katsuyuki Tanizawa, Akihiko Kondo, Masakazu Ueda, Hidenori Yamada Masaharu Seno, Effect of Cys-residue Replacement on Envelope Protein of Bio-Nano Capsule (BNC) for Drug Delivery System. The European Life Scientist Organization 2005 Meeting, Proceedings p.59, P109, 2005.9.4



- Dresden, Germany
- 11) Tuoya, Koichi Hirayama, Takayuki Fukuda, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, and Masaharu Seno, Characterization of tumor cells using DNA microarray designed for cell surface markers. The European Life Scientist Organization 2005 Meeting, Proceedings p.192, P415, 2005.9.6 Dresden, Germany
  - 12) Yasuyoshi Watanabe, Junichiro Futami, Midori Kitazoe, Hitoshi Murata, Shuichiro Kimura, Megumi Kosaka, Hiroko Tada, Masaharu Seno, and Hidenori Yamada, Quantitative analysis of intracellular delivery of cationized proteins.第78回日本生化学会大会発表抄録集 p793, 2P-313 (WS19-6), 2005.10.20
  - 13) 二見淳一郎、北添翠、村田等、渡邊泰宜、八木康行、多田宏子、妹尾昌治、甲斐敬、山田秀徳、蛋白質カチオン化による細胞内導入技術開発と機構解明. 日本生物工学会大会、プログラム・講演要旨集 P103、1C16-5, 2005.11.15.
  - 14) Yuya Nakagawa, Dongwei Yu, Takayuki Fukuda, Shun'ichi Kuroda, Katsuyuki Tanizawa, Akihiko Kondo, Masakazu Ueda, Hidenori Yamada, Hiroko Tada, Masaharu Seno. Engineered Bio-nanocapsule for specific delivery of proteins to human liver cells as a novel DDS vector. The 3rd Science and Research Symposium Hepatitis and Liver fibrosis from Basic Research to the Clinic, p.51, P-28, 2005.11.29, Nagoya.
  - 15) 平山幸一、拓亜、梅野裕達、妹尾昌治、マウス細胞表面マーカーアレイを用いた臓器別遺伝子発現の解析. 第28回日本分子生物学会年会、プログラム・講演要旨集 p746, 3P-1088, 2005.12.9
  - 16) 二見淳一郎、北添翠、村田等、渡邊泰宜、木村修一郎、八木康行、小坂恵、多田宏子、妹尾昌治、山田秀徳、蛋白質カチオン化法と HIV-TAT ペプチドを介した蛋白質細胞内導入の比較. 第28回日本分子生物学会年会、プログラム・講演要旨集, P773, 3P-1250, 2005.12.9.
  - 17) 永岡唯宏、多田宏子、山田秀徳、岡村浩、妹尾昌治、ヒトベータセルリンの受容体結合性分離のための変異体ライブラリー構築と解析. 第28回日本分子生物学会年会、プログラム・講演要旨集, p766, 3P-1211, 2005.12.9.
  - 18) 橋爪敏浩、永岡唯宏、多田宏子、山田秀徳、妹尾昌治、ファージディスプレイを用いた ErbB2 に特異的に結合するペプチドの同定. 第28回日本分子生物学会年会、プログラム・講演要旨集, p.766, 3P-1212, 2005.12.9.
  - 19) Hitoshi Murata, Junichiro Futami, Midori Futami, Megumi Kosaka, Hiroko Tada, Masaharu Seno and Hidenori Yamada, Artificial Control of Cell Proliferation Using an N-terminal Domain of Simian Virus 40 Large T Antigen by Means of PEI-cationization. The American Society for Cell Biology 45th Annual Meeting, Program P125, 1547-B28, 2005.12.13, San Francisco, USA.
  - 20) Tuoya, Koichi Hirayama, Yuh Sugii, Tadahiro Nagaoka, Takayuki Fukuda, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, Yasaburo Matsuura, Heizo Tokutaka, and Masaharu Seno. The application of cell surface marker DNA microarray in the search for molecular targets. The 16<sup>th</sup> International Conference on Genome Informatics, Program P56, 2005.12.19.
  - 21) Yasaburo Matsuura, Tuoya, Masaharu Seno, Heizo Tokutaka and Masaaki Ohkita. The Identification of a Cancer Cell Gene by

Using SOM. The 16<sup>th</sup> International  
Conference on Genome Informatics,  
Program P107, 2005.12.19.

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)  
主任研究報告

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。われわれ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。昨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。本年度の研究としては、HBs 抗原 L 粒子についてはアドリアマイシンを封入し、ヒト肝細胞癌などに対する殺細胞効果を、PMB30W については HBs 抗原結合ポリマーが緑色蛍光タンパク遺伝子 cDNA をヒト肝細胞癌にピンポイントにデリバリーして緑色蛍光タンパクを発現することを証明した。さらに、血管新生を阻害して抗腫瘍効果を示す物質を明らかにするためヒト RNase タンパクを挿入した繊維芽細胞増殖因子 (FGF) をヒト癌移植モデルに投与してその抗腫瘍効果を明らかにした。今後は、さらに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出来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、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の開発を試みた。われわれは、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、HBs抗原L粒子についてはアドリアマイシンを封入し、ヒト肝細胞癌に対する殺細胞効果を、PMB30WについてはHBs抗原結合ポリマーに緑色蛍光タンパク遺伝子cDNAを封入してヒト肝細胞癌にピンポイントにデリバリーして緑色蛍光タンパクを発現することを証明した。さらに、RNase挿入FGFによる遺伝子治療の可能性を探るため、本年度はタンパクによる血管新生阻害と抗腫瘍効果を検討した。

## B. 研究方法

1. アドリアマイシン封入L粒子によるヒト肝細胞癌に対する殺細胞効果：コートソ

ーム

2. HBs 抗原結合 GFP c DNA 封入 MPC ポリマーに関する研究: MPC ポリマーに HBs 抗原をエステル反応にて結合させた後, GFP c DNA を添加して HBs 抗原結合 GFP c DNA 封入 MPC ポリマーを作製する. ヒト肝細胞癌を移植したヌードマウスの腹腔内に上記のポリマーを注入し, 7日後に犠死せしめヒト肝細胞癌を含めた各種組織を蛍光顕微鏡にて観察した.

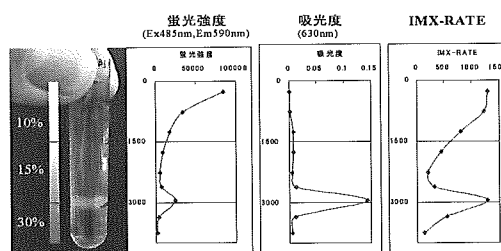
3. RNase 挿入 FGF タンパクに血管新生阻害および抗腫瘍効果:

- 1) *in vitro* における血管新生阻害: ヒトの血管内皮細胞由来の HUVEC を培養し, RNase 挿入 FGF タンパクを添加し, その殺細胞効果をヒト扁平上皮癌由来の A431 と MTT assay で比較検討した.
- 2) tube formation assay 法による血管新生阻害: type I collagen ゲル上で HUVEC を培養し, ゲルに RNase 挿入 FGF タンパクを添加し, tube formation を対照群と比較検討した.
- 3) *in vivo* における血管新生阻害: 小さなチャンバー内のがん細胞株である A431 を培養し, 培養液内に RNase 挿入 FGF を添加し, その後チャンバーをマウス背部皮下に置きその部位の血管新生を形態学的に測定し, 対照群と比較検討した.
- 4) がん細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果: A431 をヌードマウスに移植前日および移植後 5 日間 RNase 挿入 FGF タンパクを腹腔に投与して, 腫瘍径を測定し推定腫瘍重量を求め, 対照群と比較検討した.

### C. 研究結果

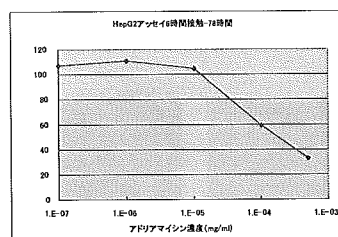
1. アドリアマイシン封入 L 粒子によるヒト肝細胞癌に対する殺細胞効果: コートソ

ームにアドリアマイシンを添加し, 混合してアドリアマイシン封入コートソームを超遠心にてコートソームやアドリアマイシンと分離して, さらに L 粒子を添加し反応させた後に, もう一度超遠心を行い, アドリアマイシン封入 L 粒子を作製・精製した.



次に, ヒト肝細胞癌株に *in vitro* で添加し, 細胞数を MTT assay で測定すると, 図のように濃度依存的な殺細胞効果が認められた.

HepG2へのアッセイ



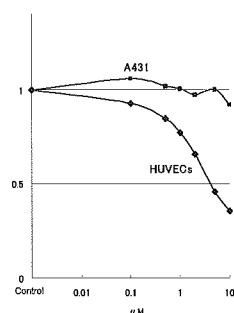
2. HBs 抗原結合 GFP c DNA 封入 MPC ポリマーに関する研究: cationic portion を導入した MPC ポリマーに緑色蛍光 cDNA を結合させてエステル基に HBs 抗原を反応させた HBs 抗原結合遺伝子封入 MPC ポリマーを作製して, *in vitro* および *in vivo* でヒト肝細胞癌に投与すると 7 日後にと殺して各種臓器の蛍光を蛍光顕微鏡で測定するとヒト肝細胞癌組織でのみ緑色蛍光物質の発現が認められた.

3. RNase 挿入 FGF タンパクに血管新生阻害および抗腫瘍効果:

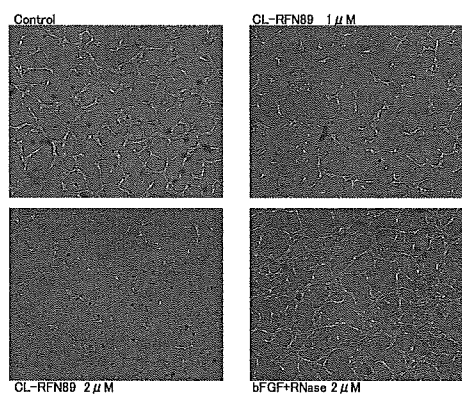
1) *in vitro* における血管新生阻害: HUVEC

および A431 に RNase 挿入 FGF タンパクを添加すると、HUVEC は濃度依存的な殺細胞効果が認められたが、A431 ではまったく殺細胞効果はみられなかった。

Cytotoxicity assay of CL-RFN89 to HUVECs and A431 cells

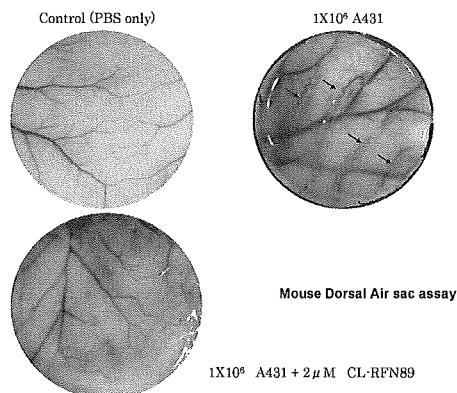


- 2) tube formation assay 法による血管新生阻害: FGF により HUVEC の tube formation は促進されたが、RNase 挿入 FGF は濃度依存的に HUVEC による tube formation を抑制した。

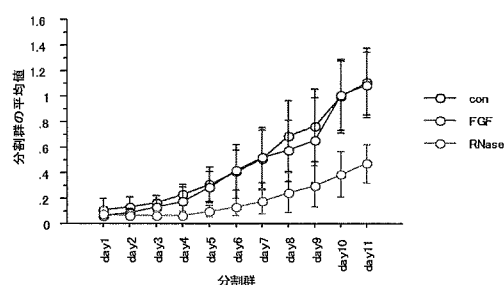


- 3) in vivo における血管新生阻害: 小さなチャンバー内でがん細胞株である A431 を培養し、培養液内に RNase 挿入 FGF を添加し、その後チャンバーをマウス背部皮下に置きその部位の血管新生を形態学的に測定し、対照群と比較すると、腫瘍細胞である A431 を培養しているチャンバーを皮下に植え込んだマウス背部では培養液のみの対照群より蛇行した血管新生が著明に認められたが、

A431 に加えて RNase 挿入 FGF を添加したチャンバーを植え込んだマウス背部では血管新生が抑制され、対照群と有意の差を認めなかった。



- 4) がん細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果: A431 をヌードマウス皮下に移植する前日は腹腔内に移植後 5 日間は RNase 挿入 FGF タンパク入れたアルゼミニポンプを背部皮下に埋め込んで持続的に投与したモデルで対照群と、腫瘍径を測定し推定腫瘍重量を求めると下記の図の如く、RNase 挿入 FGF を投与した群では A431 の増殖が抑制されていた。



#### D. 考察

リポソームであるコートソームを利用することによりアドリマイシンを L 粒子に封入することが可能であることやアドリマイシン封入 L 粒子には肝細胞癌株に対する殺細胞効果が認められることが判明した。まだ、in vitro の結果であるので in vivo での

成績や特異性など証明すべき事項は多いが、今後肝細胞癌に特異的な効果が強く副作用の少ない優れた抗癌剤が開発される可能性が生まれてきた。

また、昨年は可溶性 VEGF 受容体遺伝子による悪性腫瘍に対する遺伝子治療の可能性が示されたが、今年度は RNase 挿入 FGF による血管新生阻害や抗腫瘍効果が証明され可溶性 VEGF 受容体遺伝子以外にも RNase 挿入 FGF 遺伝子による遺伝子治療の可能性も生まれてきた。来年度にはこれらについてさらに明らかにしていきたいと考えている。

#### E. 結論

アドリアマイシン封入 L 粒子によりヒト肝細胞癌が *in vitro* で濃度依存的に殺細胞効果を示すことが明らかになった。RNase 挿入 FGF が *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* で血管新生を阻害するとともに癌組織を移植したヌードマウスモデルで血管新生を阻害することにより抗腫瘍効果を示すことが明らかとなったので、これらのタンパクや遺伝子のがん治療に応用できる可能性が生まれてきた。

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法へと発展させたいと考えている。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hoshimoto S., Ueda M., Jinno H., Kitajima M.: Mechanisms of growth inhibitory effect of RNase-EGF fused proteins against EGFR-overexpressing cells. *Anticancer Res.* In press.
- 2) Asaga S., Ueda M., Jinno H., Ikeda T., Kitajima M.: Identification of a new breast cancer related gene by restriction landmark genomic scanning. *Anticancer Res.* In press.
- 3) Nakamura T., Ozawa S., Kitagawa Y.,

Ueda M., Kubota T., Kitajima M.: Antiangiogenic agent SU6668 suppresses the tumor growth of xenografted A431 cells. *Oncology Rep.* 15:79-83. 2006

- 4) Akatsu T., Ueda M., Shimazu M., Wakabayashi G., Aiura K., Tanabe M., Kawachi S., Kameyama K., Kitajima M.: Primary undifferentiated spindle-cell carcinoma of the gallbladder presenting as a liver tumor. *J. Gastroenterol.* 40. 993-998. 2005.
- 5) Kawakubo H., Ozawa S., Ando N., Kitagawa Y., Mukai M., Ueda M., Kitajima M.: Alterations of p53, cyclin D1 and pRB expression in the carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Rep.* 14, 1453-1459, 2005.
- 6) Akatsu T., Ueda M., Shimazu M., Wakabayashi G., Aiura K., Tanabe M., Kawachi S., Kido H., Kitajima M.: Long-term survival of patients with gallbladder cancer detected during or after laproscopic cholecystectomy. *World J. Surg.* 29, 1106-1109 2005
- 7) Nakamura T., Ozawa S., Kitagawa Y., Shin C-H., Ueda M., Kitajima M.: Expression of basic fibroblast growth factor is associated with a good outcome in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncology Rep.* 14, 617-623, 2005.
- 8) Hoshimoto S., Aiura K., Suzuki M., Ueda M., Kitajima M., Kameyama K., Mukai M.: Resection of pancreatic metastases originating from papillary carcinoma of the thyroid A case report. *Pancreas* 31(1):8, 2005.
- 9) Akatsu T., Shimazu M., Kawachi S., Tanabe M., Aiura K., Wakabayashi G., Ueda M., Sakamoto M., Kitajima M.: Long-term survival of intrahepatic

- cholangiocarcinoma with hilar lymph node metastasis and portal vein involvement. *Hepato-Gastroenterology* 52,603-605.2005.
- 10) 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. *Protein Engineering, Design & Selection* 18(7) 321-327. 2005
  - 11) Yu D., Amano C., Fukuda T., Yamada T., Kuroda S., Tanizawa K., Kondo A., Ueda M., Yamada H., Tada H., Seno M.: The specific delivery of proteins to human liver cells by engineered bio-nanocapsules. *FEBS Journal* 272, 3651-3660. 2005.
  - 12) Imai E., Ueda M., Kanao K., Miyaki K., Kubota T., Kitajima M.: Surgical site infection surveillance after open gastrectomy and risk factors for surgical site infection. *J Infect Chemother* 11, 141-145.2005.
  - 13) Miyata R., Shimazu M., Kawachi S., Tanabe M., Aiura K., Wakabayashi G., Ueda M., Sakamoto M., Kitajima M.: Left tgrisegmentectomy and combined resection of the inferior vena cava, without reconstruction, for giant cystadenocarcinoma of the liver. *J Hepatobiliary pancreat Surg.*12, 272-276. 2005.
  - 14) Akatsu T., Yoshida M., Kubota T., Shimazu M., Ueda M., Otani Y., Wakabayashi G., Aiura K., Tanabe M., Furukawa T., Saikawa Y., Kawachi S, Akatsu Y., Kitajima M.: Gallstone disease after extended(d2) lymph node dissection for gastric cancer. *World J Surg.* 29(2), 182-186. 2005
  - 15) Akatsu T., Ueda M., Shimazu M., Kawachi S., Tanabe M., Aiura K., Wakabayashi G., Sakamoto M., Matsuo R., Kitajima M.: Spontaneous rupture of a mass-forming type peripheral cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 20(1), 162-163. 2005.
2. 学会発表
    - 1) Oyama T., Kitagawa Y., Ozawa S., Saikawa Y., Nagata H., Ishihara K., Ueda M., Kitajima M., Sentinel node-targeted trans-lymphatic chemotherapy using a phospholipids polymer-paclitaxel conjugate. April 16-20 2005 Anaheim 96th AACR
    - 2) Asago S., Ueda M., Jinno H., Kikuchi K., Itano O., Ikeda T., Kitajima M., Usefulness of restriction landmark genomic scanning (RLGS) in detecting genetic changes of breast cancer. April 16-20 2005 Anaheim 96th AACR
    - 3) Ueda M., Hayashida T., Aiura K., Tada H., Onizuka M., Seno M., Yamsada 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. April 16-20 2005 Anaheim 96<sup>th</sup> AACR
    - 4) Chiba N., Ueda M., Jinno H., Ozawa S., Watanabe J., Ishihara K., Kitajima M. Development of specific gene therapy by bio-compatible MPC polymer combined with hepatitis B surface antigen. April 16-20 2005 Anaheim 96<sup>th</sup> AACR
    - 5) Shimada T., Ueda M., Ikeda T., Jinno H., Watanabe J., Ishihara K., Kitajima M. Development of targeted therapy with paclitaxel incorporated in EGF-conjugated nanoparticle. April 16-20 2005 Anaheim 96<sup>th</sup> AACR
    - 6) Ito Y., Aiura K., Ueda M., Kitajima M.



Antitumor effect of Gemcitabine combined  
with interleukin-2 on liver metastases of  
murine pancreatic cancer. April 16-20 2005  
Anaheim 96<sup>th</sup> AACR

## 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放射線腫瘍学・画像応用治療学・教授

分担研究者 近藤科江 京都大学医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学・COE 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認することを目的として行うものである。昨年度、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。本年度は、構築した PTD 配列をもった融合たんぱく質の透過性の評価について検討した。PTD 配列を付加した中空バイオナノ粒子の構築が次の課題である。

### A. 研究目的

1999 年に、Dowdy らは、TAT 蛋白質の 11 アミノ酸を融合した $\beta$ -galactosidase タンパク質 (160kDa 以上の巨大なタンパク質) 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 $\beta$ -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(Science 誌)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 のリポ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。しかし、200 nm のリポゾ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関心が高まってきている。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いう仮説の基に、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事ができる DDS を開発しようとするものである。

## 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。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出てくる。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の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、PTD 3 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。

### 3. 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、PTD を融合させた GFP タンパク質を細胞培養液に添加し、30分後に細胞をトリプシン処理で回収して FACS 解析したところ、PTD1 配列よりも PTD3 配列と融合した GFP の方が細胞に多く取り込まれていることがわかった(図 1)。更に、同様の処理をした細胞の溶解液をウエスタンブロット法でタンパク質の解析を行ったところ、やはり PTD1 配列よりも

PTD3 配列を融合した GFP の方が多く細胞内に取り込まれているという結果を得た(図 2)。したがって、*in vitro* では、PTD3 配列の方が PTD1 よりも膜透過性が良いことが示された。

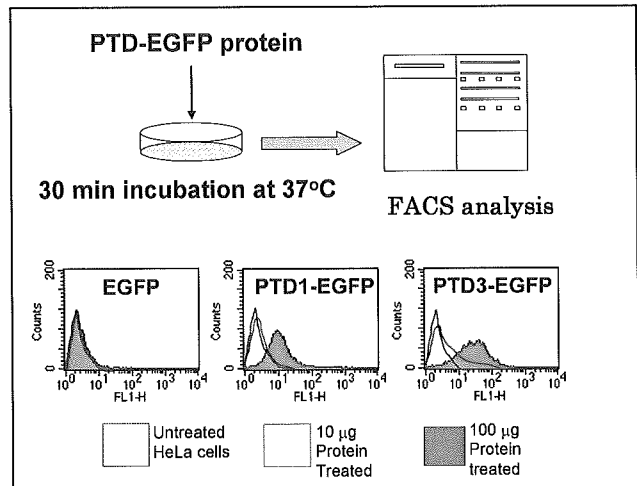


図 1 PTD-EGFP を用いた膜透過性の検討 (FACS 解析法)

次に、PTD1 と PTD3 に、ODD ドメインと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構築し、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。

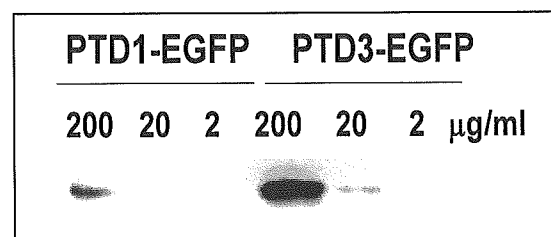


図 2 PTD-EGFP を用いた膜透過性の検討 (ウエスタンブロット法)

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%

O<sub>2</sub>)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。

#### 4. 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% O<sub>2</sub>)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3)。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。

