

学位論文題名

Studies of functionalized virus-like particles and stimuli-responsive drug release

(機能性ウイルス様微粒子と刺激に応答した薬剤放出に関する研究)

学位論文内容の要旨

近年、薬物・遺伝子治療のための効果的な薬剤送達システムの構築が注目されている。薬剤キャリアに必要な性質は、標的性や高効率な細胞への導入、そして薬剤の保持と目的箇所での放出である。特に、薬剤キャリアからの「制御された放出」が可能になれば、放出が早過ぎることによる副作用や、遅すぎることによる薬剤効果の減少を防ぐことができる。これまでにリポソームや高分子ミセル・ハイドロゲルなどの材料を用いて、体内や細胞内の様々な刺激に応答した放出機能を持ったキャリアが多く開発されている。しかし、これらの合成キャリアは標的性を持たないため、細胞表層特異的なリガンドなどを提示させる必要があった。そこで単独で高い標的性を持つキャリアとして、ウイルスのタンパク質のみから形成されるウイルスカプセルに着目した。ウイルスカプセルは、高い標的性と細胞導入率を兼ね備えた理想的な薬剤運搬キャリアである。例えば JC ウイルス由来のカプセルは、ウイルスゲノムを持たないため病原性や感染力は無いが、野生型ウイルスと同様のレセプター介在型エンドサイトーシスによって効果的に哺乳類細胞内へ導入される。しかしながら、これまでに「制御された放出」というコンセプトを持ったウイルスカプセルは開発されていない。ウイルスカプセルは細胞への取り込みにウイルスの生活環と同様のメカニズムを使用するため、エンドソームや細胞質などの輸送中の特定段階で薬剤を放出することができなかった。ウイルスカプセルをより実用的なキャリアとするために、内包した薬剤を任意の場所で選択的に放出させるメカニズムの構築が求められている。そこで本研究では、目的分子を取り込んで pH 変化に応答して放出する機能をウイルスカプセルに付加し、薬剤キャリアとしての可能性を広げることが目的とした (Fig.1)。

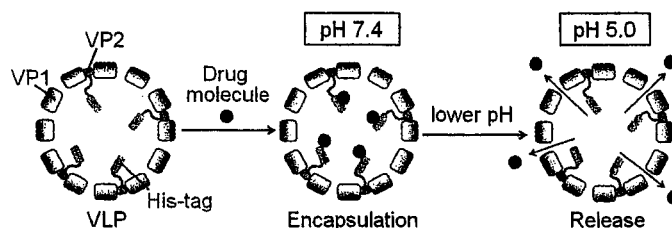


Fig. 1 Schematic illustration of the encapsulation and pH-responsive drug release from the virus capsule.

第2章では、大腸菌発現系を用いて機能性ウイルスカプセルの作製を試みた。ウイルスカプセルを構成するタンパク質には様々なペプチドやタンパク質を融合させて発現することができる。そこで、ウイルスカプセルを形成する主要コートタンパク質 VP1 に加え、そこに結合可能なサポートタンパク質 VP2 をアンカーとして用いて、ウイルスカプ

セル内部への機能性タンパク修飾を行った。緑色蛍光タンパク質(GFP)やペプチドタグを VP2 の N 末端に融合し大腸菌内で VP1 とともに共発現を行った。その後菌体を破碎し、菌内で自己集合したウイルスカプセルを密度勾配遠心によって精製した。原子間力顕微鏡(AFM)や走査型透過電子顕微鏡(STEM)を用いた構造観察および抗体アッセイから、精製したウイルスカプセルに目的タンパクが内包されていることを確認した。更に蛍光相関分光法(FCS)を用いて GFP 内包ウイルスカプセルの蛍光・構造特性評価を行った。1 粒子当たりの蛍光強度の比較から、GFP 内包ウイルスカプセルは単量体の GFP の約 9.6 倍の蛍光強度を示しており、ウイルスカプセル中に 9~10 個の GFP 分子が内包可能なことを明らかにした。ここで示したウイルスカプセルの機能化方法は、酵素や抗体といったタンパク質薬剤の内包にも使用できるものと思われる。

第 3 章では、ヘキサヒスチジン(His-tag)を内部に提示したウイルスカプセルを使用して、低分子薬剤の内包と pH に応答した放出について検討した。His-tag を使用することにより、特異的かつ可逆的な分子の結合が可能となる。薬剤モデル分子として、His-tag 結合性の nitrilotriacetic acid (NTA)部分と蛍光性の sulforhodamine (SR)部分を兼ね備えた NTA-SR を合成した。蛍光相互相関分光(FCCS) 解析により、合成した NTA-SR は Co^{2+} 存在下で His-tag を内部に提示したウイルスカプセルに内包可能だということがわかった。さらに、この溶液の pH を 7.4 から 5.0 へ変化させたところ、ウイルスカプセルに内包されていた NTA-SR は約 20 分かけて放出された。ヒスチジン残基の pKa は約 6.5 であるため、それよりも pH が低い条件ではプロトン化されて his-tag の結合力が低下する。その結果、pH の低下に応じて分子の放出が起こったものと考えられる。続いて、NTA-SR を内包したウイルスカプセルを NIH3T3 細胞へ添加し、細胞への取り込みと細胞内分布について共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、ウイルスカプセルへ内包することにより、NTA-SR の細胞内への取り込み効率が向上することがわかった。さらに、細胞内において GFP を提示したウイルスカプセルの緑色蛍光と NTA-SR の赤色蛍光では異なる局在を示した。ここから、NTA-SR を内包したウイルスカプセルはエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれ、その後エンドソーム内の酸性条件下(pH = 5.0-6.5)で放出されたものと推察した。

第 4 章では、より高効率な細胞内導入のために、ウイルスカプセルの基板への固定化を行った。ウイルスカプセルをポリスチレン基板へ固定化し、その上で細胞を培養したところ、ポリスチレン基板上へ固定化したウイルスカプセルは溶液中で拡散するものよりも細胞に取り込まれやすいことがわかった。また、ウイルスカプセルをシアル酸提示基板上に固定化すると細胞内への導入量がさらに増加した。これは、ウイルスカプセルとシアル酸間の相互作用により、基板へのウイルスカプセルの固定化量が増大したことに起因していると考えられる。本手法をセルマイクロアレイの構築に応用することで、薬剤の細胞内複合解析や高速スクリーニングへの貢献が期待される。

第 5 章では異なる材料から薬剤送達システムへの応用を目指して、DNA を使ったハイドロゲルを作製した。生体適合性を持った高分子電解質である DNA と、アジド基を側鎖に持つポリビニルアルコール(PVA)の光架橋ハイドロゲルフィルムを作製し、浸漬する水溶液の塩濃度を変えることで、体積の膨張・収縮を制御することに成功した。生体内では塩濃度勾配に依存した物質輸送が数多く存在するため、ここで提案した材料を使って複合化マイクロゲルを作製すれば、塩濃度に応じて薬剤を放出するキャリアーと成りうる。

以上より、pH や塩濃度に応答した放出が可能な薬剤キャリアーを構築し、細胞への高

効率な導入方法を明らかにした。本研究で得た知見は、今後の薬剤送達システムの発展につながると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 居 城 邦 治

副 査 教 授 石 森 浩 一 郎

副 査 教 授 村 越 敬

副 査 教 授 鈴 木 孝 紀

副 査 准教授 新 倉 謙 一

学 位 論 文 題 名

Studies of functionalized virus-like particles and stimuli-responsive drug release

(機能性ウイルス様微粒子と刺激に応答した薬剤放出に関する研究)

近年、薬物・遺伝子治療のための効果的な薬剤送達システムの構築が注目されている。薬剤キャリアーに必要な性質は、標的性や高効率な細胞への導入、そして薬剤の保持と目的箇所での放出である。特に、薬剤キャリアーからの「制御された放出」が可能になれば、放出が早過ぎることによる副作用や、遅すぎるることによる薬剤効果の減少を防ぐことができる。これまでにリポソームや高分子ミセル・ハイドロゲルなどの材料を用いて、体内や細胞内の様々な刺激に応答した放出機能を持ったキャリアーが多く開発されている。しかし、これらの合成キャリアーは標的性を持たないため、細胞表層特異的なリガンドなどを提示させる必要があった。

本論文は、単独で高い標的性を持ちながら体内や細胞内の様々な刺激に応答した薬剤放出が可能なキャリアーの構築と、固体基板を使った細胞への高効率な導入方法に関して報告している。ウイルスのタンパク質のみから形成されるウイルスカプセルの高い標的性と細胞導入率に着目し、薬剤キャリアーとして使用するために、カプセル内部に機能性タンパク質を内包する手法を見出した。ウイルスカプセルに6つのヒスチジンからなる his-tag を導入することで、特異的かつ可逆的な薬剤分子の結合と、pH 低下にともなった放出が可能となることを明らかにした。また、薬剤モデル分子を担持させて細胞へ作用させると、細胞に取り込まれた後に細胞内において分子を放出することを示した。さらに、ウイルスカプセルを培養基板上に固定化し、その上で細胞を培養することでより高効率な導入が可能だということを見出した。

これらの結果は、副作用を抑えた効果的な治療のために重要な薬剤送達システムや、薬剤高速スクリーニングを可能とするセルマイクロアレイにおけるウイルスカプセルの薬剤キャリアーとしての有用性を他に先駆けて見出したことを意味している。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格のあるものと認める。