



片山 佳樹

九州大学工学研究院応用化学部門

プロフィール：昭和62年九州大学大学院工学研究科博士課程修了、同年(株)同仁化学研究所入社、昭和63年同主任研究院、平成元年～平成3年イギリス王立医学研究所客員研究員、平成5年(株)同仁化学研究所チーフ、平成7年九州大学工学研究院助教授、専門：生体関連化学、分析化学、趣味：読書、イラスト、ドライブ

細胞情報と化学情報を相互変換する分子の創製と機能

要旨

薬物、特に遺伝子の送達においては、標的細胞選択性を発揮する事は本質的な問題であるが、現在、必ずしも満足できる状況には無いといえる。そのため、遺伝子治療などでは、現在臨床に適用できるのは、細胞選択性がなくてもよいケースに限られている。一方で、細胞は、内部に細胞内情報伝達系と呼ばれる複雑な反応系を有しており、これら細胞内シグナルのバランスの上に正常な生命活動が営まれている。ガンをはじめ、多くの疾患では、特定の細胞シグナルが持続的に活性化していることが知られており、これを利用すれば、正常細胞と異常細胞の見分けが可能であると考えられるが、これまで細胞シグナルに着目した考え方は存在しなかった。本研究では、疾患に関連するこれらの細胞内シグナルにตอบสนองして薬理活性を開放する薬物カプセルや導入遺伝子の発現を活性化する遺伝子導入剤など、新しい概念で細胞選択性を発揮する分子システムを開発し、現在の薬物送達手法の問題点を解決しようとするものである。

プロテインキナーゼシグナル応答型薬物カプセル

プロテインキナーゼ(タンパク質リン酸化)シグナルは、細胞内シグナルの中でも最も重要なシグナルである。タンパク質においては、リン酸化反応は、水和の増大、アニオン荷電の出現、水素結合サイトの出現という3つの因子によりタンパク質の構造変化を引き起こし、その活性を変化させる。このことを利用すれば、人工の高分子においてもリン酸化反応による大きな物性の変化を生じさせる事ができるはずである。

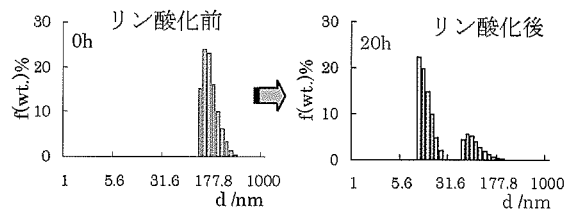


図1 プロテインキナーゼAシグナルによる粒径変化

標的プロテインキナーゼシグナルにตอบสนองして崩壊する薬物カプセルの設計

においては、感熱性高分子を基本とした高分子ミセルをデザインした。まず、その前段階として、N-インプロピルアクリルアミドと片末端をメタクリロイル化したプロテインキナーゼA(以下PKAと略す)に対する選択的基質ペプチドを共重合した高分子を合成した。この高分子は、相転移温度以上で水に不溶となり沈殿するが、この温度は、リン酸化により上昇する事を見出した。すなわち、温度を適当に取れば、リン酸化前には水に不溶で、リン酸化後には水溶性にする事が可能である事が分かった。これは、リン酸基の導入による高分子鎖の水和の増大による事が考えられる。そこで、この高分子にさらにポリエチレングリコールユニットをグラフトした高分子を合成したところ、これが水中でナノ粒子を形成し、それが標的とするキナーゼシグナルで崩壊して内包物を放出する事が分かった(図1)。また、導入する基質ペプチドの配列を検討した結果、応答の方向や程度は、ペプチド基質の総荷電のリン酸化に伴う変化が重要である事を見出した。得られた知見を利用し、最終的に生理条件で理想的な応答をする粒子の開発に成功した(図2)。

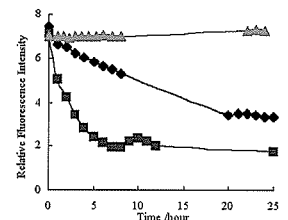


図2 ナノ粒子からのダンシルアニリンの放出
0.3mg/mL NIPAM-PEPEP5, 0.2mM ATP, 20μM N-dansyl aniline and 10mM MgCl₂ in PBS(°). λex : 340nm. Measurement Temperature : 34.0°C

プロテインキナーゼシグナル応答型遺伝子転写制御

タンパク質リン酸化シグナルを遺伝子導入、発現制御系へ応用する試みとして、PKAにตอบสนองして遺伝子の転写を活性化する分子を開発した。これは、ポリアクリルアミド等の水溶性高分子にカチオン性のPKA選択的基質ペプチドをグラフトしたものである。まず、本高分子がDNAと静電的相互作用により強固な複合体を形成し、これがPKAシグナルにより崩壊する事をゲル電気泳動で確認した。また、cell freeの発現系での実験におけるルシフェラーゼ発現系で、本高分子がDNAと複合体を形成した場合、遺伝子の発現をほとんど完全に抑制できる事、さらに、PKAシグナルにより、発現を完全に回復できる事、また、他のセリンスレオニンキナーゼであるPKCでは全く回復せず、標的シグナルに選択的であった(図3)。この機能は、リン酸化に伴う高分子鎖へのアニオン荷電の導入により、複合体の安定性が低下する事に起因すると考えられる。また、mRNAの定量結果から、この制御が実際に転写レベルで起こっている事を確認した。細胞毒性も、使用濃度では全く問題はなかった。

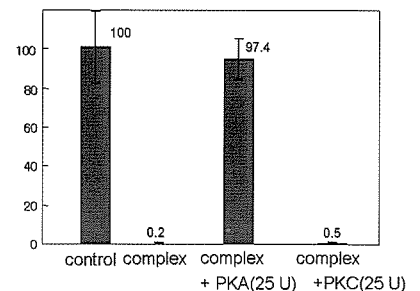


図3 PKAシグナル選択的遺伝子発現制御

プロテアーゼシグナル応答型遺伝子転写制御

プロテアーゼシグナルもキナーゼシグナルと並び重要な細胞内シグナルである。本研究では、種々の疾病に関連するアポトーシス実行シグナルであるカスパーゼ3に反応するシステムを開発した。前項と基本的に同じ発想で、カチオン性のペプチドとしてオリゴリジン、あるいは細胞膜透過型のTatペプチドを用い、これと高分子鎖をつなぐ部分にカスパーゼ3で選択的に切断される配列を導入した。すなわち、カスパーゼ3によりカチオン部分が高分子から切除される事で高分子-遺伝子複合体を崩壊させるシステムである。ゲル電気泳動と原子間力顕微鏡での観察において、実際にカスパーゼ3シグナルが複合体を崩壊させる事を確認した。Cell freeの発現実験では、キナーゼシグナル応答型の場合と同様、高分子との複合体は完全に遺伝子の発現を抑制し、カスパーゼ3シグナル添加時のみ遺伝子発現を元のレベルまで回復させる事に成功した。制御は、転写レベルで起こっており、細胞毒性にも問題はなかった。また、この複合体は、蛍光標識DNAを用いて細胞内に導入できる事が確認されたため、実際に細胞内で発現制御ができるかどうか確認した。正常細胞では、導入した遺伝子は全く発現しなかったが、スタウロスポリンで刺激して細胞にアポトーシス刺激した場合、カスパーゼ3の活性化に伴い、導入遺伝子からGFPが発現する事が確認できた(図4)。これは、細胞内シグナルにより遺伝子導入に細胞選択性を発揮した初めての例である。

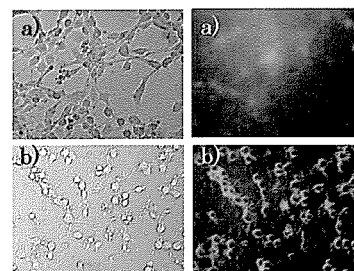


図4 カスパーゼシグナル応答型遺伝子導入剤を用いて GFP 遺伝子を導入した例。
a)正常細胞。b)アポトーシス細胞

まとめ

以上のようにさきがけ研究において、これまで例のなかった細胞内シグナルに反応する材料を用いた全く新しい薬物/遺伝子送達概念(D-RECS: Drug Delivery Responding to Cellular Signal)を創製することに成功した。

研究成果

論文

1. Yoshiki Katayama, Kenji Fujii, Etsuko Ito, Shigeki Sakakihara, Tatsuhiko Sonoda, Masaharu Murata, Mizuo Maeda, Intracellular signal-responsive artificial gene regulation for novel gene delivery, *Biomacromolecules* 3(5), 905-909 (2002).
2. Yoshiki Katayama, Tatsuhiko Sonoda, Mizuo Maeda, A Polymer Micelle responding to the Protein Kinase A Signal, *Macromolecules*, 34(24), 8569-8573 (2001).
3. Shigeki Sakakihara, Kenji Fujii, Yoshiki Katayama, Mizuo Maeda, A novel regulation system of gene expression responding to protease signal., *Nucleic Acid Res., Suppl.* 1, 149-150 (2001).
4. Tatsuhiko Sonoda, Yoshiki Katayama, Mizuo Maeda, A New Polymer Reagent for Monitoring of Protein Kinase A Activity, *Anal. Sci.*, 17, i277-i279 (2001).
5. Yuya Ohuchi, Yoshiki Katayama, Mizuo Maeda, Fluorescent-Based Sensing of Protein Kinase A Activity Using The Dual Fluorescent-Labeled Peptide, *Anal. Sci.*, 17, i1465-i1467 (2001).

解説

1. 片山佳樹、導入した遺伝子が患部細胞内だけで機能する新しい遺伝子治療法、*遺伝子医学*、19(Vol.6No1)、(2002,2)。