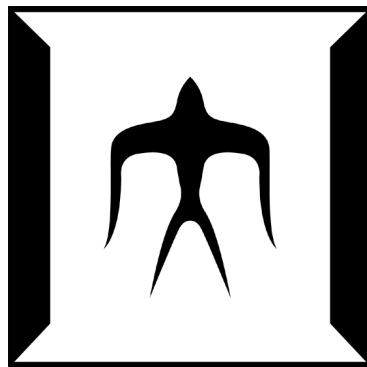


論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	高機能化タンパク質ナノ粒子の開発とその応用
Title(English)	
著者(和文)	池田裕介
Author(English)	Yusuke Ikeda
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10815号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小畠 英理,山口 雄輝,白木 伸明,小倉 俊一郎,三重 正和
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10815号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 29 年度 学位論文

高機能化タンパク質ナノ粒子  
の構築とその応用



東京工業大学大学院

生命理工学研究科

生命情報専攻

池田 裕介

担当教員 小島 英理 教授

## 目次

<b>第1章 序論</b> .....	<b>5</b>
1.1 緒言 .....	6
1.2 医療分野に向けたナノ粒子の開発 .....	7
1.3 タンパク質粒子材料としてのエラスチン .....	9
1.3.1 天然エラスチンとトロポエラスチン .....	9
1.3.2 ELP の LCST 挙動 .....	10
1.4 ELP により構成されるナノ粒子 .....	13
1.4.1 Tt の分散による両親媒性ミセル形成 .....	13
1.4.2 ELP ジブロックコポリマー .....	13
1.4.3 ELP ハイブリッドポリマー .....	15
1.5 ELP ナノ粒子のバイオセンシングへの応用 .....	16
1.5.1 ELISA による腫瘍マーカーの検出 .....	16
1.5.2 ナノ粒子をベースとした高感度化 .....	17
1.5.3 ELP ナノ粒子による ELISA の高感度化 .....	19
1.5.4 Nano Luciferase による発光能付加 .....	20
1.5.5 Biotin Acceptor Peptide による抗体結合能付加 .....	21
1.6 ELP ナノ粒子の DDS への応用 .....	22
1.6.1 DDS とナノキャリア .....	22
1.6.2 様々な材料をベースとしたナノキャリアによる DDS .....	23
1.6.3 ELP ナノ粒子をキャリアとした DDS .....	25
1.6.4 キャリアの細胞標的化 .....	26
1.6.5 キャリアの細胞内輸送化 .....	27
1.7 本研究の目的と意義 .....	28
<b>第2章 ルシフェラーゼ融合タンパク質ナノ粒子の作製とその特性評価</b> .....	<b>37</b>
2.1 緒言 .....	38
2.2 実験方法 .....	39
2.2.1 試薬 .....	39
2.2.2 プラスミドの構築 .....	39
2.2.3 融合タンパク質の発現、精製および定量 .....	40
2.2.4 Nluc 融合ナノ粒子のビオチン提示評価 .....	42
2.2.5 ADNB ナノ粒子の熱安定性評価 .....	42
2.2.6 濁度測定による相転移評価 .....	42
2.2.7 動的光散乱法(DLS)による粒子径測定 .....	43
2.2.8 ADNB ナノ粒子の凍結融解安定性評価 .....	43

2.2.9	ADNB ナノ粒子の保存安定性評価 .....	43
2.2.10	ADNB ナノ粒子のストレプトアビジン検出能評価.....	44
2.2.11	ADNB ナノ粒子を用いたビオチン化抗体検出能評価 .....	44
2.2.12	ADNB ナノ粒子を利用した腫瘍マーカー検出能評価 .....	45
2.3	実験結果及び考察 .....	46
2.3.1	融合タンパク質の発現、精製および定量 .....	46
2.3.2	ELP 融合 Nluc のビオチン提示評価.....	47
2.3.3	ADNB ナノ粒子の熱安定性評価 .....	47
2.3.4	温度変化による粒子形成評価.....	48
2.3.5	ADNB ナノ粒子の凍結融解安定性評価 .....	49
2.3.6	ADNB ナノ粒子の保存安定性評価 .....	50
2.3.7	ADNB ナノ粒子のストレプトアビジン検出能評価.....	51
2.3.8	ADNB ナノ粒子のビオチン化抗体検出能評価 .....	52
2.3.9	ADNB ナノ粒子の腫瘍マーカー検出能評価.....	53
2.4	結言 .....	55
<b>第3章</b>	<b>iRGD 融合タンパク質ナノ粒子の作製とその特性評価 .....</b>	<b>71</b>
3.1	緒言 .....	72
3.2	実験方法.....	73
3.2.1	試薬.....	73
3.2.2	細胞株.....	73
3.2.3	プラスミド構築.....	73
3.2.4	融合タンパク質の発現、精製および定量 .....	74
3.2.5	ELP 融合 iRGD の環状形成評価.....	75
3.2.6	ELP 融合 iRGD の RGD 活性評価.....	76
3.2.7	濁度測定による相転移評価 .....	76
3.2.8	動的光散乱法(DLS)による粒子径測定 .....	77
3.2.9	蛍光測定によるナノ粒子の薬剤内包能評価.....	77
3.2.10	ナノ粒子への薬物モデルの内包法の最適化.....	77
3.2.11	ADiR ナノ粒子の細胞内導入能評価.....	78
3.3	実験結果及び考察 .....	79
3.3.1	融合タンパク質の発現、精製および定量 .....	79
3.3.2	ELP 融合 iRGD の環状形成評価.....	79
3.3.3	ELP 融合 iRGD の RGD 活性評価.....	81
3.3.4	温度変化による粒子形成評価.....	82
3.3.5	薬物内包能評価.....	83
3.3.6	ナノ粒子への薬物モデルの内包法の最適化.....	83

3.3.7	iRGD 融合タンパク質ナノ粒子の細胞導入能評価 .....	84
3.4	結言 .....	87
<b>第 4 章</b>	<b>臨床応用に向けた iRGD 融合ナノ粒子の抗腫瘍効果と血中動態の評価.....</b>	<b>99</b>
4.1	緒言 .....	100
4.2	実験方法 .....	101
4.2.1	試薬.....	101
4.2.2	細胞株および動物.....	101
4.2.3	血清中でのナノ粒子の機能発現評価.....	101
4.2.4	抗がん剤内包粒子の細胞死誘導評価.....	102
4.2.5	ナノ粒子への近赤外蛍光色素の内包法の最適化.....	103
4.2.6	マウス血中における薬剤内包ナノ粒子の滞留性評価 .....	103
4.2.7	担癌マウスへ静脈投与したナノ粒子の腫瘍内蓄積評価.....	104
4.3	実験結果及び考察 .....	105
4.3.1	血清中でのナノ粒子の機能発現評価.....	105
4.3.2	抗がん剤内包粒子の細胞死誘導評価.....	105
4.3.3	ナノ粒子への近赤外蛍光色素の内包法の最適化 .....	108
4.3.4	マウス血中における薬剤内包ナノ粒子の滞留性評価 .....	109
4.2.5	担癌マウスへ静脈投与したナノ粒子の腫瘍内蓄積評価 .....	110
4.4	結言 .....	112
<b>第 5 章</b>	<b>結論.....</b>	<b>122</b>
<b>References.....</b>	<b>.....</b>	<b>126</b>
<b>謝辞.....</b>	<b>.....</b>	<b>140</b>

# 第 1 章

## 序論

## 1.1 緒言

微粒子材料は、バイオテクノロジーにおいて様々な利用が成されている。中でも100 nm以下のナノ粒子は各種センシングシステムやドラッグデリバリーシステム(DDS)など幅広い領域での利用が期待されている。ナノ粒子の特徴として、粒径をナノサイズにすることで、単位体積当たりの表面積が著しく増大する点が挙げられる。シグナル分子を複数提示したナノ粒子をプローブとしてバイオセンシングへ応用する場合、標的物質に対するシグナルの出力が増強されるため、高感度なセンシングシステムの構築が可能である。一方で、ナノ粒子に薬剤を内包しDDSへ応用した場合、通常の薬剤では到達できない患部に薬剤を送達できるため、ナノ粒子への期待が高まっている。特にその優れた自己組織化能や生体適合性からタンパク質は、ナノ粒子の有用な材料として注目されている。

ナノ粒子の設計にタンパク質を用いることで、生体適合性や低抗原性、生分解性を備えることができる。また遺伝子工学的手法により分子を作製可能であるため、リポソームや高分子といったナノ粒子に比べ、単分散な粒子が作製できるといった利点がある。また他のペプチドもしくはタンパク質のドメインやモチーフを組み入れることで機能付加が可能となり、簡便に目的に沿った融合タンパク質を構築できる。

細胞外マトリックスの一種であるエラスチンタンパク質のモデルペプチド(**Elastin-like polypeptide: ELP**)は、高い生体適合性や生体内における安定性、薬剤内包能を有することから DDS キャリアへの応用が期待されている。さらに **ELP** は、相転移温度(**Tt**)と呼ばれる一定温度を超えると構造を変化させ、巨大な凝集塊を形成する温度応答性を有する。しかし加熱により生じる凝集塊が 1  $\mu\text{m}$  を超え、かつ無秩序なため、DDS キャリアとして利用するためにはそのサイズや配向性を制御する必要がある。この凝集体のサイズを制御するために、当研究室では、先行研究として **ELP** の疎水性ドメインをモチーフとした温度応答性ペプチド(**GVGVP**)<sub>n</sub> と負電荷を有するアミノ酸であるアスパラギン酸(**Dm**)ポリペプチド

の融合タンパク質を作製した。Dm の静電反発力を利用することで粒子サイズを 100 nm 以下に制御し、GVGVP の方向性を制御することに成功した。さらに、(GVGVP)<sub>n</sub> の代わりにより高い構造安定性を有する(AVGVP)<sub>n</sub> に、Dm を付加したタンパク質を作製した。これにより、凝集体のサイズ、および分子配向の制御能に加え、温度変化に対して高い安定性を有するナノ粒子を構築することに成功した。しかしながら、この粒子を医療分野へ応用するためには、目的に応じた機能を付加する必要がある。そこで本研究では、(AVGVP)<sub>n</sub> Dm に機能性タンパク質を融合することで、バイオセンシングの検出プローブや、DDS キャリアとしての実現を目指す。

以降本章では、最初に医療分野におけるナノ粒子の重要性について述べる。次にタンパク質粒子材料として注目を集めているエラスチンについて概説し、ELP を用いたナノ粒子設計の優位性とこれまでの研究例を挙げる。またこの粒子を担体としたバイオセンシングシステムやドラッグデリバリーシステムへの応用について述べる。最後に、本研究の目的と意義を明らかにする。

## 1.2 医療分野に向けたナノ粒子の開発

原子・分子を目的に応じた形状もしくは構造へと組み立てるボトムアップ法、もしくは固体の物質を微細加工するトップダウン法によって得られるナノメートルスケールの大きさを有する微粒子である「ナノ粒子」は近年、様々な分野で高機能化材料のカギとなる先端材料として注目を浴びている[1-2]。粒子サイズが ナノスケールとなることによって、通常のマイクロスケールの構造体とは異なる種々の性質（構造的、形態的、熱的、光学的、電磁氣的、力学的物性）を示し、このような特性が種々の目的に応じた機能化に利用される。こうしたナノ粒子の開発と利用に関する近年の発展は、医療分野にまで進展している[3]。歴史的には医療とナノ粒子の関わりは古く、すでに 1970 年代の論文には「ナノ粒子」という

用語が登場し、これを利用したドラッグデリバリーシステム (DDS)に関する報告がなされている[4-5]。こうしたナノ粒子の応用には、大きく分けて二つの方向性が考えられる。まずひとつは、粒子自体の微細な形状とその特性をそのまま利用しようとするアプローチである[6]。例えば、金ナノ粒子や量子ドットによるナノメディシンはその代表例である。このアプローチは、個々の粒子が量子効果に基づく光学的特性を発揮することで、イムノアッセイや蛍光イメージング、がんに対する抗腫瘍効果を期待するものであり、生体サンプルへ投与されたナノ粒子は血中で分散した状態でその機能を発揮する[7]。もうひとつの流れは、ナノ粒子を機能性素子として適当なアセンブリング技術によってユニットへ組み込み、ミクロあるいはマクロなスケールをもつ複合的な構造体を構築しようとするアプローチである[8]。こうしたナノ構造の制御は、例えば散剤や錠剤などに対して従来にない機能を付与する有力なツールとなる可能性を秘めている。このようなナノ粒子の幅広い応用性は、目的に応じたテーラーメイドな高機能化材料を創生することができるため、医療分野において注目を集めている。

ナノメディシンに求められる機能や特性は多種多様であるため、その要求に応じて材料の選定がなされている。例として、金、PLGA、リポソーム、デンドリマー、カーボンナノチューブなど様々な材料が挙げられる[8-12]。これら材料は、ナノメートルスケール(~200 nm)であるが、サイズや構造が不均一なものの混合物であるといえる。たとえば水溶性高分子のナノ粒子は通常、分子量の分散が大きいことが知られている。またその他のナノ材料においても、ラジカル重合などの化学反応を用いて形成されていることから、その構造やサイズが全く均一であるということはありません。このような構造サイズの不均一性は、ナノメディシンの精度を高めるうえでの障害となる可能性がある。

そこで新たに注目されているのが、生体高分子であるタンパク質を用いたナノ粒子である。遺伝子工学的に作製するタンパク質は合成高分子と比べ分子量の分布がほとんどなく、それぞれの一次構造もほぼ一義的に決まっている。高次構造を形成すると、それに応じて新

しい機能を発現できる点が合成高分子にはない大きな特徴である。これらの特徴から、タンパク質を用いることで高機能なナノ粒子の構築が期待できる。そこで次節では、ナノ粒子の材料として注目を集めているエラスチンについて説明し、それを用いた研究を紹介する。

## 1.3 タンパク質粒子材料としてのエラスチン

### 1.3.1 天然エラスチンとトロポエラスチン

エラスチンは、様々な組織に見られる主要な細胞外マトリックスであり、伸縮性や反跳性などの機能を付与する弾性繊維の主要な構造要素である。一生を通じて継続的な代謝回転が行われなため、耐久性に非常に優れており、例えばヒトの胸部動脈の場合、エラスチンは機械的な損傷を受けずに数十億回の拡張と収縮サイクルに耐えることが出来る。トロポエラスチンは、化学結合によって架橋することでエラスチンネットワークを形成する約 800 残基のアミノ酸からなる分子量約 72kDa の前駆体分子であり、水に不溶であり耐久性が高く、半減期は 70 年である[13]。トロポエラスチンの構造は、疎水性ドメインと親水性ドメインが交互に続く特徴を持っており、各ドメインは一般的に異なるエキソンによりコードされている[14-15]。疎水性ドメインはグリシン(Gly)、バリン(Val)、アラニン(Ala)、プロリン(Pro) 残基の繰り返し配列によって構成されており、(例: Gly-Val-Gly-Val-Pro、Gly-Val-Pro-Gly-Val、Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro)、親水性領域は主としてリジン(Lys) 残基が点在した Ala 繰り返し配列(例: Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala)によって構成されている[13]。トロポエラスチン分子は、相転移温度(Tt)よりも低い水溶液中では可溶性を示す一方で、温度が Tt を超えると急激な相転移を起こし、ポリペプチドの脱溶媒和および凝集を引き起こす。このコアセルベーションプロセスにおいて、繊維状構造の形成が観察され、トロポエラスチン分子のアラインメントがエラスチンネットワークの集合において重要な因子であるということが明らかとなった[16-17]。Keeley らは、ヒトエラスチン

をベースとして、組換えにより発現したポリペプチドが、実際に整列し、原線維を形成する能力を有することを示した[18]。これにより、疎水性ドメインの相互作用は、分子間で架橋する Lys 残基を含む親水性ドメインの位置がベースとなっていることを提唱した[13] (Fig. 1.1)。

Tt を介した加熱時のトロポエラスチンのコアセルベーションは、タンパク質の分子内および分子間の熱力学的なエントロピーの増加によって引き起こされている。Tt より高温の状態でのこのコアセルベーションにおける熱力学的選択は、水和した水分子のエントロピーが大きく関わっている。Tt より低い温度では、バルク水よりも低いエントロピーの水分子層によって非極性側鎖が水和している。温度が上昇すると、非極性側鎖が分子内および分子間での接触を起こし、結合水分子が遊離し、そのエントロピーの増加がタンパク質のエントロピーの減少を補う[19-20]。このプロセスは、温度を上げるとトロポエラスチンの溶解度が低下し、Tt 以下に冷却しても可逆的であるため、高分子工学において、下限臨界溶液温度 (LCST) 挙動と呼ばれている。次節では、トロポエラスチン中に見出された合成ポリペプチドの LCST 挙動について解説していく。

### 1.3.2 ELP の LCST 挙動

Urry らは、トロポエラスチンおよびその配列中に見出される繰り返し配列(ELP)について広範囲に研究し、合成ポリペプチド Val-Pro-Gly-Val-Gly (VPGVG) 繰り返し配列が、トロポエラスチンと同様の挙動でコアセルベートすることを見出した[16,21]。この VPGVG 繰り返し配列は、トロポエラスチンのコアセルベーションにおける単純モデルとなり、Tt 以上の加熱によって Fig. 1.2 に示した構造変化を引き起こす。具体的には、ポリペプチドが、Tt 以下でのランダムコイル構造から、Tt 以上での  $\beta$  スパイラルへとコンフォメーションが変化し、同時に水和水分子を放出する[20,22-23]。 $\beta$  スパイラル構造は、VPGVG 繰り返し配列により形成される II 型の  $\beta$  ターンにより構成される。Pro および Gly 残基は、 $\beta$  タ

ーンのコンプォメーションの維持に重要であるが、残りの Val 残基は、天然アミノ酸もしくは一部の非天然アミノ酸に置換することができる[20,24-25]。このような繰り返し配列の立体構造は  $\beta$  スパイラルをとっているといわれているが、歪んだ  $\beta$  スパイラルの立体構造を取っていることも報告されている[25]。しかし、ELPs が Tt 以下において既に  $\beta$  スパイラル構造をとることも報告されており、前述のランダムコイルから構造化した  $\beta$  スパイラルへの立体構造の変化以外のメカニズムによって LCST 挙動を引き起こしている可能性も残っている[26]。このように ELP の LCST 挙動のメカニズムは全て解明されているわけではない[27]。

Urry らは、ELP と呼ばれるエラスチンの GVGVP 繰り返し配列に基づいて LCST 挙動の異なる様々なポリペプチドを開発した[28]。そのモデルは Gly-Xaa-Gly-Val-Pro (GXGVP) の 5 つのアミノ酸ユニットから成るポリペプチドであり、2 番目の残基は L-プロリンを除く任意の天然アミノ酸で構成される。通常、ELP- [X<sub>i</sub>Y<sub>j</sub>Z<sub>k</sub>-n] という表記で記述され、括弧内の大文字は、ペンタペプチド繰り返し中の Xaa ゲスト残基のアミノ酸 1 文字表記、下付き文字は、そのゲスト残基の割合を示し、n はペンタペプチドの繰り返し数を表す。まずゲスト残基を変化させることにより、ELP の LCST 挙動を調整できることが分かっている。例えばこの残基の疎水性を増加させると、Tt が減少する。ゲスト残基の置換は、Tt への影響が大きいため、ELP の LCST 挙動を改変するのに広く使用される方法である。しかし、GXGVP のゲスト残基以外の残基を変更することで、ELP の性質を大きく変えることも可能である。例えば、GXGVP の 3 番目のグリシンをアラニン残基へと置換し、ゲスト残基をバリンとした (GVAVP) <sub>n</sub> や、4 番目のバリンをアラニンへ置換した (GVGAP) <sub>n</sub> などは、可逆的な弾性を全く示さなくなる[19,29]。一方で、4 番目のバリンをイソロイシンに置換すると、LCST 挙動の可逆的な弾性は保ち続ける[30]。

ELP に劇的な変化をもたらす置換として、GXGVP の 1 番目のグリシンをアラニン残基に変え、ゲスト残基をバリンとした置換した (AVGVP) <sub>n</sub> ポリマーがある[31]。このポリマ

一は  $T_t$  以上の加熱による凝集時にヒステリシスを示し、エラストマーよりも可塑性となるため、再度  $T_t$  以下に戻してもモノマーへと解離しない(Fig.1.4[A])[32]。構造変化を維持し続けるという、不可逆的な LCST 挙動を示すこの (AVGVP)  $n$  は安定な微粒子材料の設計において非常に有用であるといえる。

また、アミノ酸の組成だけでなく、ELP の全鎖長も  $T_t$  に大きな影響を及ぼす[33]。この効果は分子量が低い ELP において最も高く、ELP の鎖長を調整することで任意の温度領域において LCST を示すよう設計することもできる[34]。このようにゲスト残基の選択やポリペプチドの全長を考慮した ELP の設計をすることで、 $T_t$  を自在に操ることができる。また ELP の LCST を変化できる重要な要素として、ELP 溶液の塩濃度がある[35-36]。Cho らは Hofmeister シリーズにおける広範囲なカオトロピックおよびコスモトロピックなアニオンについて、塩濃度の増加とともに ELP の  $T_t$  が減少することを示した[37-38]。さらに、ELP の濃度を変えることで、ELP の設計が完了した後に  $T_t$  を変更することも可能である[39]。しかし、濃度に対して  $T_t$  が対数依存的であり変化量が制限されているため、 $T_t$  に対する ELP の濃度の影響は一般的にはかなり小さく、 $T_t$  はほとんど ELP 配列のデザインに依存しているといえる。

このような検討により設計された ELP の作製はこれまで長時間にわたる有機合成により行われてきたが、組換え DNA 技術の台頭により、従来よりも正確に規定された配列および分子量を有するポリペプチドが作製できるようになった。遺伝子工学により ELP を産生する一般的な方法として、ライゲーションによって作製した ELP 配列をコードするプラスミドによって形質転換された大腸菌を使用する方法があり[39]、このほかにも様々な技術が利用されている[33,40-41]。これら技術による優れた配列制御により、特異的な温度特性と自己組織化能を持つ ELP の設計が可能となった。さらに、組み換え技術により ELP ブロックコポリマーのような複雑なポリペプチドが容易に作製できるようになった[42-43]。次節ではそれらによって形成されるナノ粒子について詳しく説明していく。

## 1.4 ELP により構成されるナノ粒子

### 1.4.1 Tt の分散による両親媒性ミセル形成

ELP ポリペプチドは、温度の上昇によって刺激応答してナノ粒子を形成することが示されている。この現象は、ELP の設計を変えることで粒子サイズや Tt を調整することもできる。ナノサイズに制御された温度応答性粒子を作製するため、2 種類以上の ELP ブロックを融合したジブロックコポリマーが開発されている[44]。このジブロックコポリマーは 1 つの ELP をベースにして、性質の異なる ELP 配列もしくは生体分子鎖から構成される。Fig. 1.3 に、Tt を経て相転移する際の ELP のジブロックコポリマーの自己集合の一般的原理を示す。2 つの ELP ブロックは、異なる極性のゲスト残基を用いることによって、異なる Tt を有するように設計される。疎水性ブロックの Tt が親水性ブロックの Tt よりも低いので、疎水性ブロックが凝縮した状態において親水性ブロックがランダムコイルコンフォメーションをとる範囲の温度が存在する。この温度範囲内で、両親媒性が誘発され、ELP ブロックコポリマーは自己集合して、サイズの分散が低い粒子になりミセル状の形態をとる。親水性ブロックの Tt を超える加熱を行うと、全構造の凝集が引き起こるが、これは、形態とサイズの制御が全くできないため、一般的に望ましくない。そのため、生理学的温度においてミセル構造を維持するような Tt をもつブロックコポリマーを作製することが重要である。次章ではこの ELP ブロックコポリマーの設計について述べる。

### 1.4.2 ELP ジブロックコポリマー

温度応答性の自己集合によってナノ粒子を形成する ELP ジブロックコポリマーを初めて示した例として、Conticello らの研究が挙げられる[45]。彼らは疎水性ドメイン [VPGEG(IPGAG)<sub>4</sub>]<sub>14</sub> および親水性ドメイン [VPGFG(IPGVG)<sub>4</sub>]<sub>16</sub> の ELP 配列を融合したジブロックコポリマーを開発した。それぞれのゲスト残基は一定の温度において極性に差

が出るように設計しているため  $T_t$  に差を生み出している。 $T_t$  より低い温度では、このジブロックコポリマーは、主にユニマーポリペプチド鎖として存在していたが、 $T_t$  以上では、疎水性ブロックの脱水によりナノ粒子の形成をもたらす、平均直径  $87 \pm 15 \text{ nm}$  の単分散な粒子が観察された。

さらに、ELP の組成を正確に制御することにより、自己集合能を制御することができる。Chilkoti らは、球状のナノ粒子へと自己組織化できる、2 つの異なる ELP ブロックに基づいたブロックコポリマーを開発した。ELP ゲスト残基を変化させることにより、親水性ブロック  $\text{ELP-[VPGVG(VPGGG)}_7(\text{VPGAG})_8\text{]}_n$  および疎水性ブロックの  $\text{ELP-[VPGVG]}_m$  を融合したブロックコポリマーを作製した[43,46]。低温側の  $T_t$  以上に加熱すると、疎水性ブロックが凝集し、高温側の  $T_t$  までの  $8 \sim 10^\circ\text{C}$  の範囲で安定な単分散の球状ナノ粒子が形成される。さらに 2 つのブロックの長さを調整することで、ジブロックコポリマーがナノ粒子を形成する臨界ミセル温度(CMT)を最大限に拡大させることが可能になった。また、ELP ブロックコポリマー中にシステイン残基を導入し、ジスルフィド結合によって分子内架橋することでナノ粒子を安定化させる試みや[47-48]、ELP ブロックコポリマーの N 末端にリジン残基を組み込み、自己集合後のアミン反応性試薬による架橋により、低温側の  $T_t$  以下の温度まで下げても分解しない安定なナノ粒子を形成させる試みがなされている [49-50]。医療分野においては、サンプルの温度変化や、血漿タンパク質やリポペプチド等の両親媒性物質と接触する可能性があるため、ELP ベースのナノ粒子の安定性を向上することは特に重要とされている。

### 1.4.3 ELP ハイブリッドポリマー

前節では、複数の ELP ブロックからなるコポリマーによるナノ粒子の設計を説明した。しかし、ELP 同士の融合ではなく、他の生体高分子や低分子を融合し、その性質によって LCST 挙動を制御する試みもなされている[35,51]。Smits らは、ポリエチレングリコール (PEG) を ELP に融合した ELP-PEG ハイブリッドポリマーを作製した[52]。ELP は疎水性、PEG は親水性であるため、塩濃度の上昇によって ELP の転移が起こり、自己集合によってミセル状のナノ粒子が形成された。またシルク様ポリペプチドと ELP を融合したシルクエラスチン様ポリマー (SELP) も開発されており、ELP に低温での凝集性を持たせることで、自己集合化よりナノ粒子のみならずハイドロゲル、ナノファイバーなどの様々な規則的構造を取ることが明らかとなっている[53-57]。そのほかにも、疎水性低分子薬物[58]、一本鎖 DNA[59]、短鎖ペプチド[60]、ウイルスコートタンパク質[61-63]、などの融合によってナノ粒子を形成するハイブリッドポリマーの作製が試みられている。当研究室では Fujita らが、(GVGVP) $n$  に負電荷を有するポリアスパラギン酸を融合したハイブリッドポリマーを作製し、静電的な反発力と親水性を利用することで生理条件下(37°C, pH 7.4)付近における 100 nm 以下の粒子形成、および ELP の配向性を制御することに成功した[64]。また Hara らは (GVGVP) $n$  と比較して高い構造安定性を有する(AVGVP) $n$  にポリアスパラギン酸を付加することで、凝集体のサイズ、および分子配向の制御能に加え、温度変化に強く、より安定性が高いナノ粒子を構築することに成功している(Fig. 1.4(B))。さらにこのハイブリッドポリマーに標的リガンドを融合させることで、ELP ナノ粒子を特定の領域に標的化することにも成功している[65,66]。

以上のように ELP によって構成されるナノ粒子は、生物医学への応用において理想的な材料となりうる。特に ELP ベースで構築する大きな利点は、生分解性および生体適合性に優れていることである。実際、エラスターゼやコラゲナーゼによる対する ELP の分解が報告されている[67]。また生体適合性の高さは、Urry らによって報告されており、ELP が

非毒性で非突然変異誘発性、また非免疫原性であることを示している[68]。このように ELP で構成されたナノ粒子はナノメディシンとして高い素質を有することを示唆している。次節以降では、ELP ナノ粒子の医療分野への展開として、バイオセンシングシステムとドラッグデリバリーシステム(DDS) への応用に焦点を当てて解説する。

## 1.5 ELP ナノ粒子のバイオセンシングへの応用

### 1.5.1 ELISA による腫瘍マーカーの検出

バイオセンシングシステムの中でも Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) は、抗原に対する特異抗体を反応させ、さらなる抗原・抗体反応、あるいは化学反応を組み合わせて特異抗体と標識物質の免疫複合体を形成し、最終的に標識酵素の発色反応や、発光反応によって抗原の存在を可視化・定量化する分析手法である。この方法は、検出のターゲットである抗原を精製せずにその存在量を定量できるため、ライフサイエンス分野やバイオ研究分野において広く普及している[69]。特に医療検査においては、その手軽さと汎用性の高さから ELISA が取り入れられ、患者の体内の異変を血液や尿などの体液中で検知することで、幅広く貢献している。

検出対象となる物質はアレルギー源、病原体、各種ホルモン等さまざま存在するが、中でも腫瘍マーカーの検出は、現代病ともいえるがんの早期発見につながることから、いち早く ELISA の検出対象として研究が進められてきた。腫瘍マーカーの ELISA 検出として最もよく知られ、研究例も多いのが、前立腺特異抗原 (PSA) である。1979 年 Wang らが精漿から PSA の精製に初めて成功し[70]、1980 年に Kuriyama らによって HRP 標識した抗 PSA 抗体を用いて血清中の PSA が ELISA で定量化された[71]。1994 年に前立腺がんの症状を示さなくとも PSA 濃度が高い個人では、前立腺がんのリスクが高まるという研究結果を受

け、PSA は前立腺がんのスクリーニング用マーカーとして FDA に認可された。そのほかにも、大腸がん、胃がん患者の血中に多く見られる癌胎児性抗原(CEA)、肝臓がん患者の血中に多く見られる  $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)の検出法として、ELISA が取り入れられている [72]。

しかし現行では、癌患者でもその血中濃度はごく微量であるため、疾病が進行する前に早期発見するための検出感度は不十分な場合も多く、これまで以上に高感度なセンシングシステムの開発が急務とされている。そこで近年では、ナノ粒子を用いて、ELISAの感度を向上させる手法が研究されており、ナノ粒子の表面に酵素等のシグナル標識物質を複数提示させて利用することで、腫瘍マーカーの検出感度を向上させる技術が開発されている。次章ではシグナル物質を整列提示したナノ粒子からなる検出プローブによるELISAの高感度化について解説する。

### 1.5.2 ナノ粒子をベースとした高感度化

前節で述べたように、抗原(標的物質)とそれに対する抗体を取得さえすれば、ELISA は様々な物質の検出系として応用することができる。しかしながら、医療検査において ELISA が有用なものであるためには、さらに高感度でなければならない。バイオマーカーが超低濃度の時点、つまり疾患を早期かつ兆候が見える前のステージで検知し適切な診断を施せば、死亡率低下もしくは生存率向上につながる。そのためには、シグナル増幅の役割を持つ酵素を改良する必要がある。そこで近年ではナノ材料を利用して酵素を増幅させた研究が盛んに行われており、その代表的なナノ材料として金ナノ粒子が挙げられる。

金ナノ粒子とは、1  $\mu\text{m}$  以下の金微粒子が流体中に分散しているコロイドのことである。特に、金により構成されたナノ粒子 (AuNP)は、大きさや形状、表面の化学的特性、あるいは凝集状態を変化させることで、粒子の光学的・電子的特性を調整することが可能であるため、有機太陽電池、センサープローブ、治療薬、生物医学用ドラッグデリバリー、触媒を

はじめとするさまざまな分野で利用されている [73-78]。また金ナノ粒子は、特有の物理化学特性を有しているため、金ナノ粒子上に DNA や、抗体、その他さまざまな生体分子を提示させることができる [79-81]。この特性を利用して、金ナノ粒子に酵素を提示し、1 標的物質あたりに複数の酵素を提示した高感度な ELISA 用検出プローブの作製が行われている。Ambrosi らは金ナノ粒子表面に HRP 標識抗体を複数提示させたナノ複合体を作製し、乳がんのバイオマーカーである CA15-3 に対して複数の HRP を結合させることで ELISA による検出の高感度化に成功した (Fig.1.5) [82]。また、Zyou らは金ナノ粒子表面に複数の HRP と二次抗体を提示したプローブを作製することで、pg/ml オーダーで検出できる従来よりも高感度な Pb(II) の検出システムを構築した [83]。また Jia らは、金ナノ粒子表面に複数の HRP と検出抗体を提示し、抗原を介して捕捉抗体が提示された磁性マイクロ粒子と結合することで標的物質を pg/ml オーダーで特異的に検出する Nano-ELISA を開発した [84]。金ナノ粒子を用いる利点として、粒子自体が安定で、低コストであることが挙げられる。しかし、金ナノ粒子は粒径の制御が難しい上に凝集しやすく、酵素の提示数の違いで ELISA の定量性に影響を与えやすいこと、酵素を複数提示させるための表面積が十分でないことが問題点として挙げられる。

また、ナノカーบอนを材料として ELISA を高感度化させる試みも数多くある。ナノカーบอนは、ナノメートルの大きさの構造をもつカーボン (炭素) からなり、人工的に作製された物質である。ナノカーบอนは重量当たりの表面積が広く、抗体や酵素といった生体分子との結合が容易なため、生化学分析のアプリケーションとしての利用が可能である [85-88]。そのため、このナノカーボンに酵素を提示し、1 標的物質あたりに複数の酵素を提示した高感度な ELISA 用検出プローブの作製が行われている。

カーボンナノチューブ (CNT) は円筒状で、直径が 1 nm、長さが 1  $\mu$ m 程度の微小で細長い形状をしたナノカーボンである。円筒面はグラファイトの一原子層であるグラフェンを丸めた形であり、炭素原子は六方格子をとっている。Zhang らは、多層の CNT の表面上に

多数の HRP と二次抗体を共有結合により提示し、血管拡張性失調症変異タンパク質を 0.2 fg/ml の検出限界で高感度に検出できる ELISA を開発した[89]。Chunglok とも単層のカーボンナノチューブに HRP と HRP 標識抗ネズミチフス菌抗体を提示させた複合体を作製し、サルモネラ菌の高感度アッセイを可能にした [90]。

ナノカーボンを用いる利点として、単位重量当たりの表面積が大きく、酵素を多数提示しやすいことが挙げられる。しかし欠点として、これらナノカーボンの作製は研究途上であるため、均一なサイズで作製することが難しいこと、大量生産ができないことなどが挙げられる。

### 1.5.3 ELP ナノ粒子による ELISA の高感度化

前節では金ナノ粒子、ナノカーボンを利用した ELISA の高感度化の取り組みについて述べた。いずれの場合も、1 つの分子に多数の酵素を提示することが高感度化につながっている。一方で、これらの分子は、粒径等のサイズ制御が困難であるといわれている。そこで本研究では、ELP を基盤としたタンパク質ナノ粒子に着目した。ELP で構成されたナノ粒子は均一なサイズを持っているため、ELISA における酵素担体として非常に高い素質を有することが示唆される。また優れた自己集合性と高い生体適合性を有することから、生体医工学およびナノテクノロジーの分野において大きな潜在性を秘めたナノ素材といえる。そこで本研究では、このタンパク質ナノ粒子をベースとして表層に機能付加を行うことで、ELISA における検出プローブとしての応用を考えた。具体的には発光能を有する酵素として Nano Luciferase、およびビオチン化配列である Biotin Acceptor Peptide を、ナノ粒子を形成するハイブリッドポリマーに融合し、発光能とアビジンを介した抗体結合能の付加を行った。次項と次々項では、それぞれの機能付加の役割について、詳しく解説する。

#### 1.5.4 Nano Luciferase による発光能付加

生命科学研究で用いられる多くの定量方法の中でも、生物発光に基づく分析法はその特性である高い感度と使い易さにより広く汎用されている。生物発光とは、生物体による光エネルギーの放出形態のことで、バクテリア、菌類、原生動物、魚類、昆虫そのほか広く観察されている。ルシフェラーゼを触媒として、ルシフェリンが酸化発光するホタル、ウミホタル、ホタルイカなどの例がよく知られている。この生物発光を標識酵素としたイムノアッセイはいくつか報告されている。De Lucka らはホタルルシフェラーゼを標識酵素とする methotrexate、dinitrophenol (DNP)、trinitrotoluene (TNT) の発光イムノアッセイを開発した[91-92]。

生物発光を用いたイムノアッセイの特徴としては、① 高感度であり、微量分析の検出が可能であること ② 定量性の範囲の幅が広く、数オーダーにわたっていること ③ 光源が不要であるため迷光がないこと ④ 反応が迅速で秒単位の短時間で分析できること などがあげられる。一方で欠点としては、ルシフェラーゼを用いる場合には、酵素が不安定であることがあげられる。

Nano Luciferase (Nluc) は、2012 年にプロメガ社によって開発された、他のルシフェラーゼと比較して最も比活性の高いトゲオキヒオドシエビ (*Oplophorus gracilirostris*) 由来のルシフェラーゼである。このルシフェラーゼは基質として Frimazine と酸素分子を利用することにより、アデノシン三リン酸 (ATP) の非存在下で、長寿命なグロータイプの生物発光が生じる。さらに Nluc は、低分子量 (171 アミノ酸、19kDa)、高い物理的安定性、翻訳語修飾が必要ないことなど、様々な利点を有している[93]。

本研究では、シグナル発光の役割を果たす酵素として、Nluc を利用した。優れた比活性を有する Nluc を融合タンパク質に導入することで、検出プローブの高感度化が期待できる。また発光寿命が長く、安定性が高いため、生物発光を利用したイムノアッセイにおける欠点であった「酵素の不安定さ」を改善できると期待できる。さらには、分子量が低いため、ナ

ノ構造体の作製時やアッセイ系において立体障害を最小限に抑えることが可能であると考えられる。

### 1.5.5 Biotin Acceptor Peptide による抗体結合能付加

イムノアッセイ等における物質の標識方法の 1 つとして、アビジン又はストレプトアビジンと、ビオチン間の結合を利用する方法がある。これらの結合は解離定数が極めて小さいため、検出感度の向上や定量的なアッセイを行なうために有用である。例えば、検体中に存在する抗原を検出するイムノアッセイの場合、抗原に結合したビオチン化抗体を、酵素標識したアビジンまたはストレプトアビジンと反応させ、残存した標識の活性を測定することが行われている。また、抗体等のビオチン化のために、被ビオチン化物質のアミノ基、カルボキシル基、チオール基などを利用してビオチンを固定化するビオチン化試薬が市販されている。しかし、化学試薬はタンパク質の活性部位にも非特異に結合してしまうため、タンパク質の機能を阻害してしまうという問題点があった。そのため、タンパク質の機能を阻害することのない、特異的な標識技術の開発が望まれていた。

細胞内に存在するビオチンリガーゼによって認識されるタンパク質ドメインは、生物種を越えて広く保存されており、このタンパク質ドメインを融合した種々のタンパク質が生体内でビオチン化されることが報告されている [94]。しかし、このビオチン化されるドメインは、最も小さいものでも 75 アミノ酸残基を必要とする大きなポリペプチドである。より小さな部位特異的ビオチン化タグを開発するために、種々のビオチン酵素のビオチン周辺配列を模倣し、15~27 残基のランダムなアミノ酸配列を持つペプチドライブラリーを構築し、大腸菌内でビオチン化するペプチド配列が探索された。Biotin Acceptor Peptide (BAP) と名づけられた短いペプチドは、大腸菌のビオチンリガーゼにより効率的にビオチン化されることが見出された [95]。

本研究では、ビオチン標識された抗体との結合を目的として、BAP 配列を融合タンパク

質に導入した。ビオチン化された融合タンパク質は、アビジンを介することで、ビオチン標識抗体ーアビジンー融合タンパク質の複合体を形成することができ、間接的に抗体結合能を付加することが可能であると期待される。

## 1.6 ELP ナノ粒子の DDS への応用

### 1.6.1 DDS とナノキャリア

薬物の体内動態を考慮した製剤設計により医薬品を開発する場合、薬物を効率的に疾患部位に送り届けることが最終的な目標であり、その考え方の原点には、ドラッグデリバリーシステム(DDS) の概念が存在する。DDS は、従来の治療薬よりも治癒効果を向上させる方法や、副作用を軽減する方法を考える分野であり、実際には、薬物送達を①場所、②時間、③量 を制御して行うための技術を開発することが目標である。DDS は、標的部位に到達してから元の化合物に戻り、薬効を発揮させるプロドラッグや、PEG や糖鎖を修飾し、粘膜透過性の促進、排泄、分布、代謝を変化させるハイブリッド薬物など、薬物そのものを化学修飾する戦略がある。しかし新たな戦略としてナノ材料に薬物を封入あるいは吸着して体内動態を制御する「ナノキャリアによる DDS」が注目を集めている[96]。一般的な低分子化合物薬は、単独で体内に静脈投与すると、血中を循環した後、腎臓を経由して迅速に排泄される。よって標的部位に到達できる薬物はごくわずかであり、体内分布は非特異的なものになってしまう。これに対し、ナノキャリア(10~200 nm) に封入した薬物を血中に投与すると、糸球体の濾過サイズが 5 nm であるため腎臓からの排泄を防ぐことができ、血中滞留性が改善される。また Klivanov らは、キャリア表面を親水性の PEG で修飾することで、肝臓、脾臓に分布している単核食細胞系(MPS)からの捕捉を防ぎ、血中滞留性が劇的に向上することを提唱した[97]。さらに Maeda、Matsumura らによって、血中の粒子径 200 nm 以下のキャリアが、がん新性血管の漏出性と未発達なリンパ管によって、がん周囲に蓄積す

る EPR(Enhanced Permeability and Retention) 効果を示すことを明らかにした[98-99]。このような血中滞留性向上や EPR 効果などの生体に備わった機能を受け身に利用する標的化をパッシブターゲティングと呼ぶ。実際に *in vivo* で薬物キャリアを用いた研究は Kataoka らにより行われ、抗がん剤アドリアマイシンを内包したがんターゲティングキャリアを開発し、安定な血液循環と固形がんに対する高い抗がん活性を示した[100]。これ以降、抗がん剤をキャリアに内包し、EPR 効果によってがん細胞に蓄積させる試みが広く行われるようになった。そこで次節では、様々なナノ粒子を薬物内包キャリアとして利用した DDS 研究について紹介する。

### 1.6.2 様々な材料をベースとしたナノキャリアによる DDS

これまで、臨床応用を目指し様々なナノサイズのキャリアの開発が行われてきた。がん治療を目的として既に医薬品に応用されているもの、もしくはこれからの応用が期待されているキャリア材料について解説する。

まず DDS キャリアとして最も広く研究されてきたナノ粒子として、リポソームが挙げられる。リポソームはリン脂質二重膜から構成される小胞であり、生体適合性と抗原性の面で大きく優れている。当初は細網内皮系(RES)の MPS に取り込まれやすいという生物学的な問題が大きな障壁となっていたが[101]、Young らが、表面を PEG で修飾したステルス性リポソームを開発し、免疫活性化タンパク質の非特異的な吸着を抑えることで血中滞留性とそれに伴う EPR 効果を高めた[102]。これに伴い、抗がん剤を封入した PEG-リポソームキャリアの治療効果の検討が進められ、既にドキソルビシンを封入したリポソーム製剤(DOXIL®)として上市されている。また McNeeley らは、PEG-リポソーム間にシステイン切断配列を挿入した機能性粒子を開発し、がん細胞到達後のシステインの投与により、立体障害となる PEG 修飾を本体から脱離させることで、薬物送達能の向上を報告した[103]。しかしながらリポソームは均一サイズでの調製が難しく、継時的に不安定である場合が多い

ため、DDS の精度をさらに高めていくことは困難である場合が多い。

生体適合性かつ生分解性に優れている PLGA(乳酸-グリコール共重合体)ナノ粒子も DDS キャリアの候補として注目されている。作製法を最適化することで薬剤の内包効率や徐放性を制御可能であり、その機能性の高さから DDS 研究での応用展開が図られている [104]。Fonseca らは、抗がん剤 Paclitaxel を内包した 200 nm 以下の PLGA ナノ粒子を作製し、抗がん剤単独投与よりも高いがん細胞内取り込み率であることを報告した [105]。また、Sanna らは、糖類のキトサンを修飾したカチオン性 PLGA ナノ粒子を開発し、アニオン性の細胞表面への親和性と吸着性を高めることで、薬剤を細胞内へ効率よく取り込ませることに成功した [106]。数々の研究成果が功を奏し、既にリュープロレリン酢酸塩を含有した PLGA ナノ粒子の医薬品であるリュープリンが前立腺がんの治療薬として市販されている。しかしながら、PLGA は熱や水分の影響を受けやすく、特有の高付着性・高凝集性を示すため、粒子サイズが増大し、RES に取り込まれやすくなり、薬効が低下するといった欠点がある。

金ナノ粒子も DDS キャリアの候補の 1 つである。金ナノ粒子はリポソーム (100 nm) や PLGA (50 nm~200 nm) では作ることでできない 20nm 以下の範囲でナノ粒子を作製することができ、サイズ調整と粒子表面への化学物質の修飾が容易であること、イメージングへの応用が可能であることから、新しい DDS ナノキャリアとして期待されている [107-108]。Zhang らは、桿状の金ナノ粒子表面にシリカをコーティングした抗がん剤ドキソルビシン内包型金ナノロッドを開発した。シリカコーティングにより粒子の薬剤内包量と生体適合性を向上させ、さらに抗がん剤の DDS と同時にがん細胞に蓄積した金ナノ粒子の近赤外光を吸収する性質を利用して生体内イメージングすることで、がんの診断と治療を同時に行えるセラノスティクス技術を確立した [109]。また Deng らは、生分解性のブロックコポリマーと金ナノ粒子を複合した、ドキソルビシン内包型キャリアを開発した。金ナノ粒子が強力な近赤外光照射により局在表面プラズモン共鳴を起こし発熱することで熱に比較的弱い

がん細胞を殺傷するため、抗がん剤療法と温熱療法を同時に行える優れた特性を示した [110]。このように金ナノ粒子を利用することでマルチな特性をキャリアに付与できるため、臨床試験が盛んにおこなわれているが、生分解性を持たず、生体に存在しない無機物であるため、安全性の確保が必要であり、キャリアとしての実用化には至っていない。

これら材料の、サイズの不均一性や、体内での安定性、生分解性、生体毒性といった種々の欠点は、体内における薬物動態の精度を高めていく上では大きな障害となりうる。また、ボトムアップでキャリアに機能付加する場合、化学修飾に頼らざるを得ないため、構造が複雑化するほどコストの高騰が避けられず、医薬品としての実現化が遠のいてしまう。そこで新たに、生体高分子を用いた DDS キャリアが注目されている。生体高分子は、生体を構成する高分子の総称であり、単分散でそれぞれの一次構造もほぼ一義的に決まっている。また高次構造を形成すると、それに応じて新しい機能を発現できることが他の材料にはない大きな特徴である。よって、生体高分子を利用することで高機能な DDS キャリアの構築が可能であると考えられる。そこで次項では、生体高分子の中でも ELP をキャリアとした DDS 研究を紹介する。

### 1.6.3 ELP ナノ粒子をキャリアとした DDS

タンパク質を用いたキャリア設計は、生体適合性や低抗原性、生分解性などの条件を備えたキャリア構築が期待できる。またタンパク質は分子設計が DNA の配列で規定されるため、リポソームや金ナノ粒子といった DDS キャリアに比べ、単分散のものが作製できるという利点がある。さらに、他のタンパク質のドメインやモチーフを組み入れることで機能付加が可能となり、簡便に目的に沿った融合タンパク質を構築できる。これらの利点より、タンパク質をベースとした DDS キャリアが期待されている。タンパク質の中でも特に ELP は優れた自己集合性と生体適合性から、DDS の分野において大きな潜在性を秘めた分子素材といえる [111]。事実 Chilkoti [112-113]、Urry [28, 68]、Rodriguez [114-115] らの研究が

ループなどを中心に、DDS キャリアや細胞足場材料などへの応用が報告されている。MacKey らは、ELP の疎水基の部分に、Cys 残基を複数導入した両親媒性ポリマーを作製し、マレイミド修飾した疎水性抗がん剤を大量封入できるナノ粒子を作製し、マウスモデルにおける高い抗腫瘍効果を示した[58, 116-117]。また Soon らは、2 種類の両親媒性ポリマーを混合し、複数の相転移温度を持つナノ粒子を作製し、2 段階の構造変化により薬剤の内包に加え放出が行えることを示した[118]。これらのタンパク質キャリアは、EPR 効果を考慮した 100 nm 以下の粒子径制御がなされており、がん治療を目的とした DDS キャリアとして実現が期待されている。しかし、Cabral により 100 nm 以下の粒子は血管を透過して腫瘍組織には移行するものの、がん環境の性質によっては間質に留まり、がん細胞まで到達できないことが報告された[119]。よってがん治療へ応用するには、EPR 効果などのパッシブターゲティングだけでなく、キャリア自体の機能付加により能動的に標的指向性を高めるアクティブターゲティングを行う必要がある。次項ではキャリアのアクティブターゲティングに焦点を当てる。

#### 1.6.4 キャリアの細胞標的化

疾患に対する治療において最も理想とされ薬物治療法は、薬物を適切な部位のみに送達することであり、中でも直接疾患部位への選択的結合性を利用して能動的に送達できる標的化戦略をアクティブターゲティングと呼ぶ。キャリアに標的能を持たせることは、表面に抗体やペプチド等の機能性分子を付加することにより可能となる。抗体を利用した例としては、Swaminathan がいくつかの種類のがん幹細胞で過剰発現している糖タンパク質である CD133 を標的として[120]、抗 CD133 抗体を修飾した抗がん剤内包 PLGA ナノ粒子を作製し、肺がんモデルマウスにおいて腫瘍の肥大化を抑制した[121]。ペプチドを利用した例では Chilkoti らが、がん細胞に過剰発現している  $\alpha 5 \beta 3$  インテグリンに特異的に結合する細胞接着配列である RGD 配列を ELP ポリマーの疎水性末端に融合し、がん細胞標的能

を持った抗がん剤内包ミセルを構築することに成功した[122]。さらに ELP ポリマーに癌細胞の血管細胞に過剰発現している CD13 受容体のリガンドである NGR トリペプチドを融合させることで、癌の血管組織への標的も試みている[123]。また、Yang らはがん細胞と同様にリンパ管腫瘍に特異的に結合する LyP-1 の環状ペプチド[124]を表面修飾した抗がん剤内封リポソームを開発し、マウスの肺腺がんのリンパ管腫瘍の転移を抑制した[125]。一般的にターゲティングツールとして用いられるペプチドは抗原性が低く、短鎖で立体障害等の影響を与えないため、標的化キャリアに適したリガンドであるといえる[126]。

### 1.6.5 キャリアの細胞内輸送化

前述のように、標的細胞への到達性を向上させることに付随し、さらに細胞内への送達性を向上させることもターゲティングにおいて重要なファクターとなる[127]。HIV-1 ウイルス由来の TAT (Trans-Activator of Transcription Protein) が細胞膜を通過し、細胞質内へ移行することが報告されて以来、同様の作用を有するペプチドがいくつか見つかかり、膜透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide : CPP) と総称されるようになった[128-129]。その後 CPP を DDS キャリアに導入し、薬剤を細胞内にまで送達し薬効を高める研究が進められている。Tiwari らは水疱性口内炎ウイルス G タンパク質(VSV-G)由来のペプチド VG-21 を金ナノ粒子表面に修飾し、細胞表面のレセプターに結合後のエンドサイトーシスを誘導することで細胞透過性を付与することに成功した[130]。Ryu らはアルギニンを豊富に含む Bac ペプチドと細胞周期阻害ペプチド p21 を ELP キャリアに融合し、優れた細胞透過性と膵臓がんマウスにおける抗腫瘍効果を示した。[131-132]ほかにもハチ毒主要成分のメリチン由来ペプチド[133]、HIV 由来の Rev ペプチド[134]、サケ白子由来のプロタミンペプチド等[135]が、DDS キャリアの細胞透過性付加に利用されている。これらのペプチドと前節で紹介した標的能を併せ持ったアクティブターゲティングキャリアが理想的であるが、非特異的な細胞内侵入を防ぐため、細胞標的化までは細胞内輸送機能はマスキングされ、標的

の細胞に到達してから細胞内輸送能が発揮されるのが望ましい[136]。

そこで最近では、腫瘍細胞周囲の血管へ到達後に、受容体 NRP1 を介した腫瘍血管透過を行うシステムが報告されている。NRP1 は通常、血管内皮細胞の膜上に存在し、VEGF165 や Sema3A などのリガンドと複数の塩基性アミノ酸を介して結合すると、細胞間の間隙が広がり、血管透過性が向上することが知られている[137]。このメカニズムを利用して DDS を実現するために、塩基性アミノ酸を含む配列を持つ **Internalizing RGD (iRGD)** と呼ばれる環状ペプチドが開発されている (Fig. 1.6(A))。iRGD は前項で述べた RGD モチーフと、NRP1 を介した組織浸透の要素を持つ C 末端の **RXXK 配列 (CendR モチーフ)** を組み合わせた配列であり、RGD 配列によって腫瘍血管内皮細胞に結合後、iRGD が酵素的に切断されて開裂し、CendR 配列が露出することで腫瘍血管内皮細胞を透過する輸送システムが作動する (Fig. 1.6(B)) [138]。この環状ペプチドの段階的なターゲティングは、腫瘍への薬剤の蓄積効率を最大限に高めることができる。実際 Sugahara らによって iRGD を担がんマウスに投与することで NRP1 に結合して血管漏出性が亢進し、薬剤のデリバリー効率が向上することが示された[139]。

## 1.7 本研究の目的と意義

以上、本章では微粒子工学におけるナノ粒子は様々な分野で高機能化材料のカギとなる先端材料として注目を浴びており、医療分野への応用まで進展していることを述べてきた。その中でもタンパク質である ELP から成るナノ粒子は単分散で機能付加が容易であり、さらに生分解性および生体適合性に優れているため、ナノメディシンとしての応用に相応しい材料であることを示した。バイオセンシングの分野においては、腫瘍マーカーを早期の段階で発見するために ELISA の高感度化が求められており、特にナノサイズ of 材料を担体としてシグナル増幅の役割を果たす酵素を複数提示する手法は、大幅な検出感度の向上が期

待できる。また、DDS の分野においても、薬剤をより安全かつ効果的に利用するために、DDS キャリアとして高い素質を有している ELP ナノ粒子が注目を浴びており、さらに生体高分子を用いて DDS キャリアにがん細胞への標的能と細胞内移行能を付加することで、より効果的な DDS が可能である。

当研究室ではエラスチンの疎水性ドメインをモチーフにした温度応答性ペプチド (AVGVP)<sub>n</sub> とポリアスパラギン酸 (以下、Dm) のハイブリッドポリマーがナノ粒子を形成することを見出している。通常、エラスチン様ポリペプチド(ELP)は、温度に応答して可逆的に構造を変化させ、高い温度で巨大な凝集体を形成する。しかしながら、Dm を導入した ELP は、加熱時に Dm の反発力によりミセル状の粒子を形成し、粒子のサイズを 30 nm 程度に制御することが可能である。またこのミセルは、機能性タンパク質を表層に融合することで様々な性質を付与できることが示されている。上記の特性を利用して、(AVGVP)<sub>n</sub> Dm で構成されたタンパク質に機能性分子を付加し、医療分野への応用を目指した高機能化タンパク質ナノ粒子を設計することを本研究の目的とし、現在まで不可能であった、進行がんに対する早期発見の実現や画期的な治療法を開発していくことを本研究の意義とする。

本論文では、第二章において腫瘍マーカーの高感度バイオセンシングへの応用を目的として、(AVGVP)<sub>42</sub> D<sub>44</sub> に、発光酵素である Nano luciferase (以下 Nluc) と、ビオチンが付加される認識配列 Biotin Acceptor Peptide (以下 BAP) を遺伝子工学的に融合させることで、ナノ粒子に発光能と、アビジンを介した抗体結合能を付加した。このナノ粒子を ELISA 法の検出プローブとして利用し、1 つの粒子に提示された複数の酵素によるシグナル増幅によって、高感度に標的物質を検出できるか否かを検証した。

次いで第 3 章においては、DDS への応用を目的として、(AVGVP)<sub>42</sub> D<sub>44</sub> に、細胞接着配列 RGD と組織透過性配列 CendR を組み合わせた環状ペプチド internalizing RGD(以下 iRGD) を遺伝子工学的に融合させ、ナノ粒子にがん細胞接着能と、細胞内輸送能を付加した。このナノ粒子を、がん細胞を標的とするキャリアとして利用し、内包物が iRGD の機能を

利用してがん細胞へ特異的に送達されるか検証した。

次いで第 4 章においては、実際に第 3 章で構築したナノキャリアに抗がん剤を内包し、効率的にがん細胞の細胞死を誘導できるか否かを検証した。また、*in vivo*における体内動態を調べるために、キャリアを **nude** マウスへ静脈注射し、血中滞留性を検証した。

最後に、第 5 章において本研究で得られた結果を総括するとともに今後の展望について述べ、結論とする。

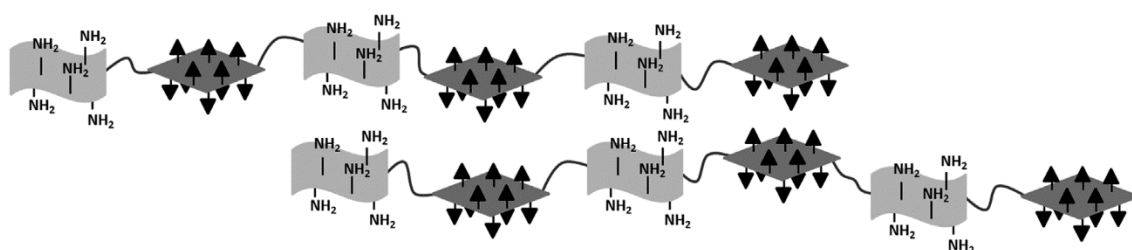


Figure 1.1

トロポエラスチン中の疎水性ドメインの相互作用と、それにより起こる分子間架橋による構造アラインメント。疎水性ドメインは、疎水性側鎖(三角形)が突出したひし形構造、親水性の架橋ドメインはリジン残基が突出した波型で示している。疎水性側鎖間の相互作用によりリジン残基を有する親水性ドメインが近接して架橋を引き起こす。リジン残基はリシルオキシダーゼによって酸化的に脱アミノ化され、トロポエラスチン 2 分子のリジン残基間でデスモシンもしくはイソデスモシン架橋を形成する [18]。

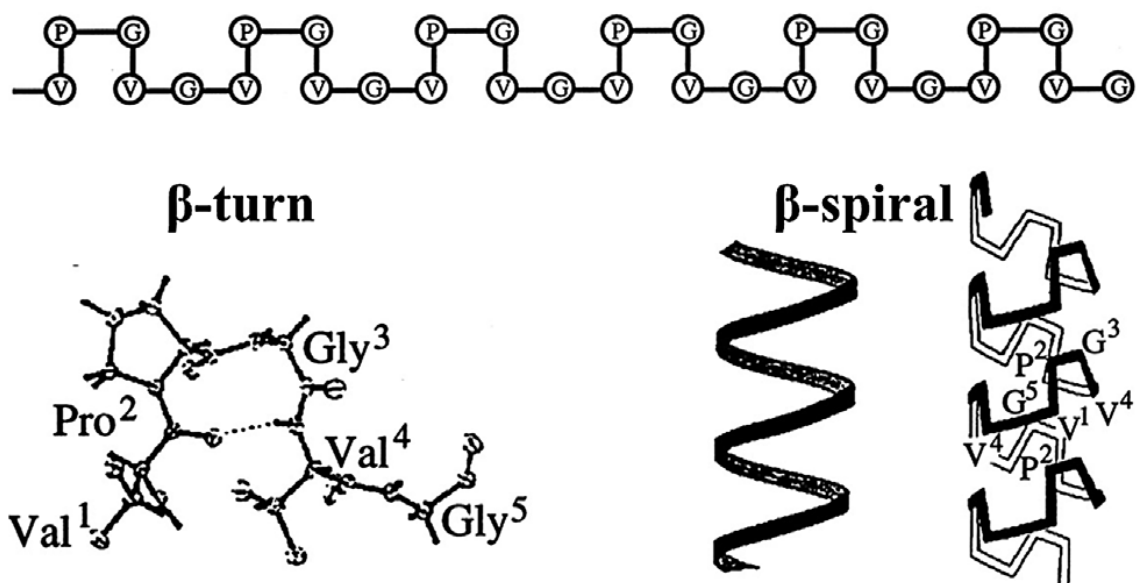


Figure 1.2

Tt 以上の温度においてポリ(GVGVP) がとる  $\beta$  スパイラル構造。

ポリ(GVGVP)は、ペプタペプチドの 1 番目および 4 番目のバリン間の分子内水素結合によって、安定な  $\beta$  ターン構造を繰り返している。通常、ランダムコイル構造をとるが Tt 以上の加温によって構造が変化し、ターンの構造を維持しつつ螺旋状の  $\beta$  スパイラル構造をとる [20]。

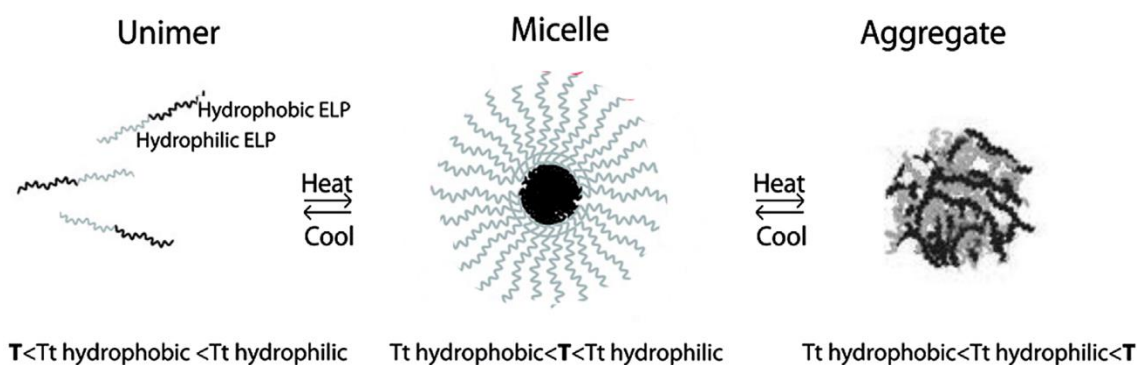


Figure 1.3

ELP をベースとしたナノ粒子形成の一般的な原理。疎水性ブロックと親水性ブロックを有する ELP ブロックコポリマーは、疎水性ブロックの  $T_t$  よりも高い温度で加熱するとミセルに自己集合する。さらに、親水性ブロックの  $T_t$  以上に加熱すると、ナノ粒子の構造は破壊され、マイクロスケールの無秩序な凝集を引き起こす [44]。

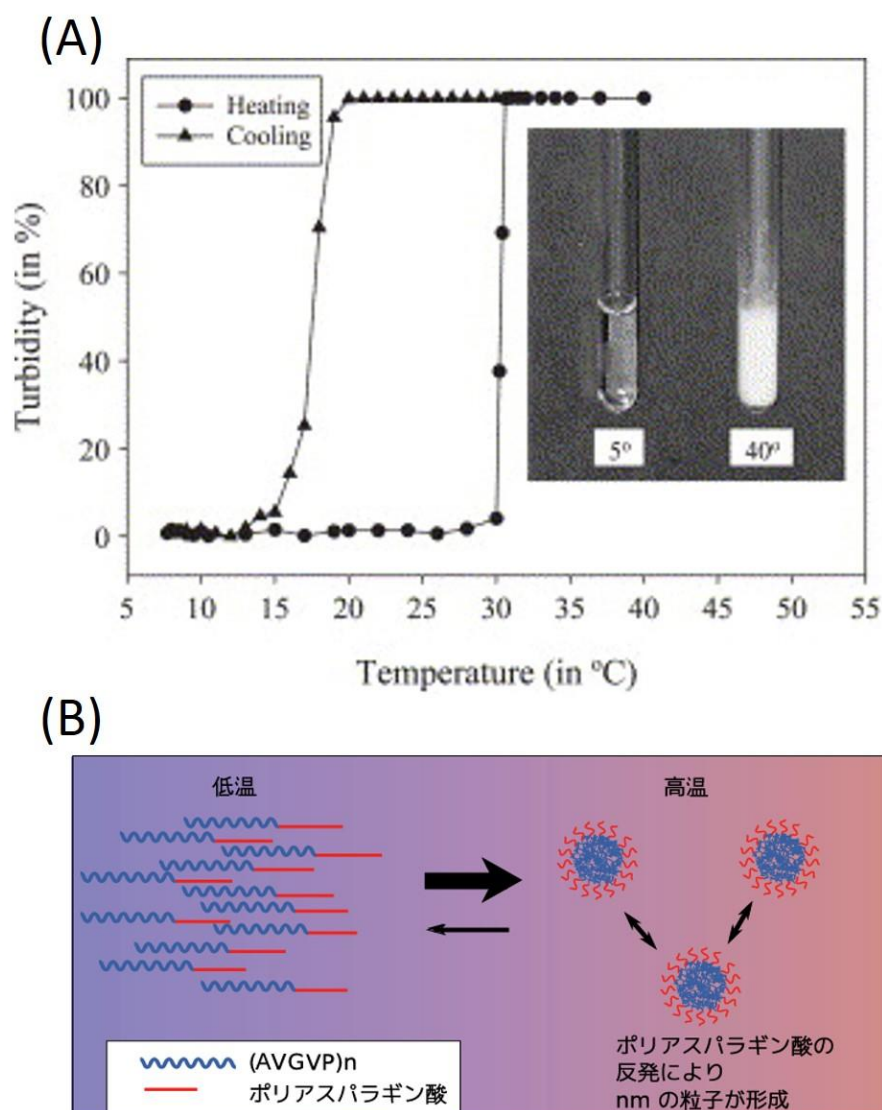


Figure 1.4

(A) (AVGVP) $n$  の濁度の温度変化。30°C付近で相転移温度を超え、凝集を形成する。一度凝集を形成すると相転移温度より大幅に冷却しない限り、凝集は解消されない [111]

(B) ポリアスパラギン酸を用いた(AVGVP) $n$  の粒子径制御の概念図。(AVGVP) $n$  を用いることでより構造安定性の高い粒子が構築可能 [64]。

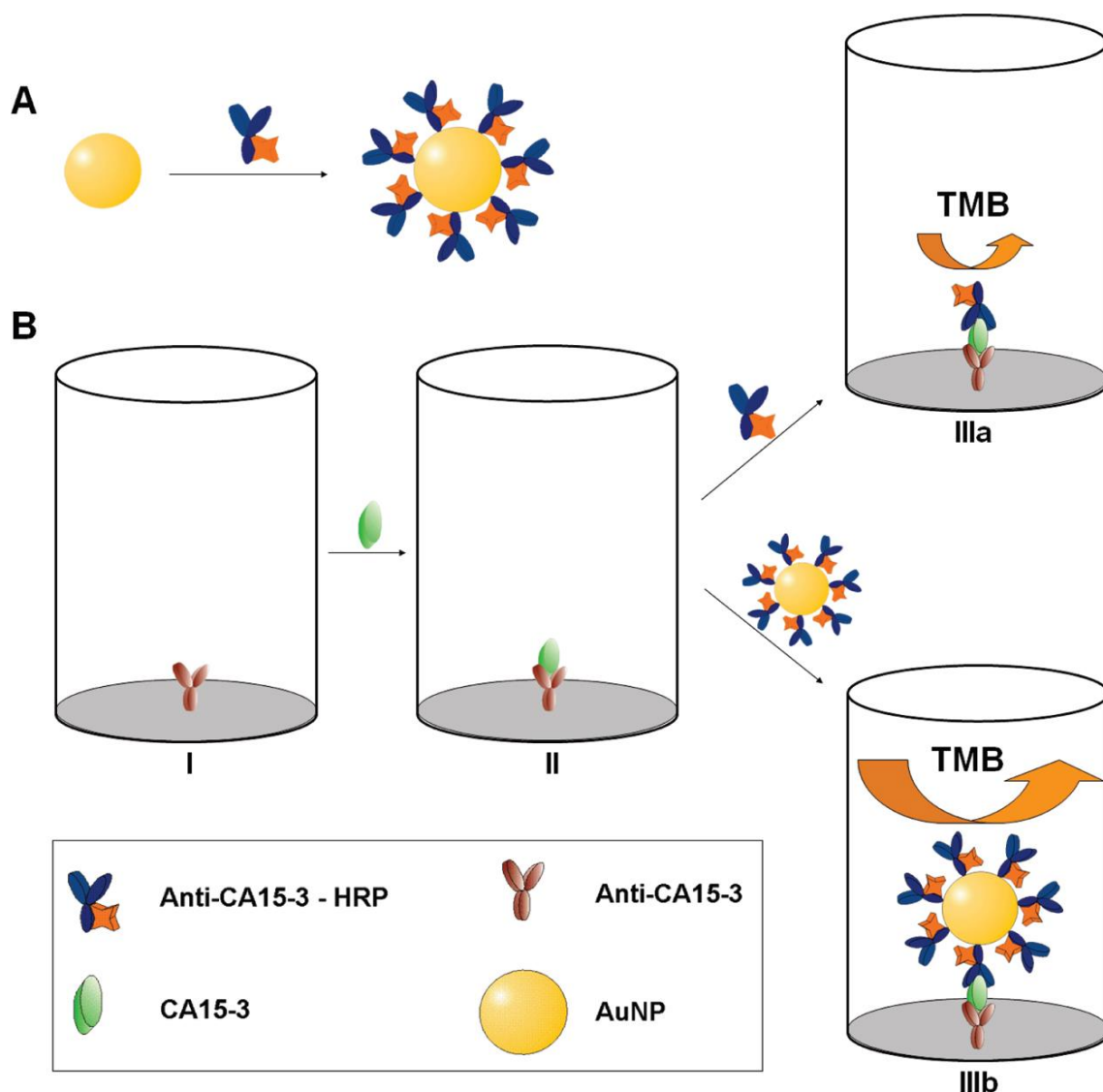


Figure.1.5

金ナノ粒子表面への酵素複数提示による ELISA の高感度化の一般的な原理

(A) 金ナノ粒子表面へ静電的相互作用、疎水性相互作用、金とチオールとの配位結合等により、HRP 標識抗体を修飾することで、多酵素複合体を形成させる。

(B) 固相に吸着した抗体に捕捉された腫瘍マーカーCA15-3 に対して多酵素複合体を添加すると、マーカー1分子につき複数の HRP が対応する。このため、単独の酵素と比較して、低いバックグラウンドを維持しつつ酵素による検出シグナルを増幅することができ、ELISA の高感度化が実現できる [82]。

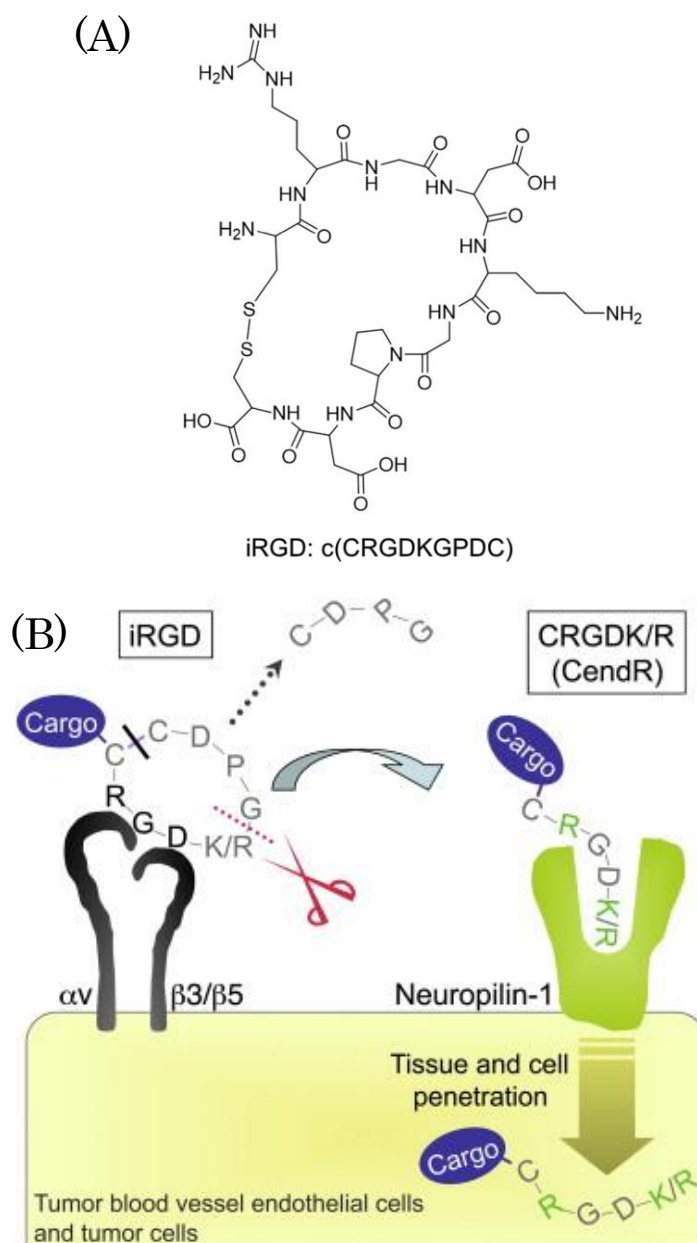


Figure 1.6

(A) 環状 iRGD ペプチドの化学構造。両末端のシステインのチオール基同士のジスルフィド結合により、環状構造をとる [140]。

(B) iRGD ペプチドによるカーゴデリバリーの模式図。RGD によって腫瘍血管に集積し、酵素的にペプチドが切断され CendR が露出する。それにより腫瘍内部への浸透が促進し、付随した薬剤の高効率なデリバリーが実現する [139]。

## 第2章

ルシフェラーゼ融合タンパク質  
ナノ粒子の作製とその特性評価

## 2.1 緒言

当研究室で作製した ELP の疎水性ドメイン(AVGVP)<sub>n</sub> とポリアスパラギン酸(Dm)の融合タンパク質は、加熱によりミセル状の粒子を形成する。このナノ粒子は、高い構造安定性、サイズ及び分子方向の制御能を有しており、バイオセンシングの高感度化としての利用が期待できる。この粒子をバイオセンシングに応用するためには、酵素によるシグナル増幅機能および、分子認識機能の付与が有効である。本章では、発光酵素であるトゲオキヒオドシエビ由来のルシフェラーゼ Nano luciferase (Nluc)と大腸菌内の修飾酵素によりビオチンが付加される認識配列 Biotin Acceptor peptide (BAP) をナノ粒子に付加することで、バイオセンシングの高感度化を試みる (Fig. 2.1)。

はじめに、作製した粒子化タンパク質 (AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Chis (AD)に Nluc と BAP を連結した融合タンパク質 (AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Nluc-BAP-Chis (ADNB)の発現ベクターを遺伝子工学的に構築し、大腸菌 BLR 株に発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。次に精製した ADNB のアビジン結合能を、ウエスタンブロットティングによって評価し、粒子形成に際して活性低下が懸念される、Nluc の熱安定性を発光活性測定により評価した。次に ADNB が温度に応答して構造変化することを濁度測定により評価した。また ADNB 粒子の粒子径を動的光散乱法(DLS)により評価した。また、ADNB の凍結融解安定性、保存安定性を発光活性測定により評価した。

続いてルシフェラーゼ融合タンパク質ナノ粒子をバイオセンシングに利用可能であるか検証した。融合タンパク質 ADNB は粒子形成時に、粒子を構成するタンパク質の数と同等の酵素が存在している。このナノ粒子の ELISA 法への応用法としては、固相担体に吸着させた捕捉抗体に標的分子を特異的に結合させ、その上に標的分子の抗体 (1 次抗体)ービオチン標識 2 次抗体ーstreptavidin-ADNB ナノ粒子の複合体を結合させ、発光測定する系である (Fig.2.1)。この時、1つの標的分子に対して ADNB ナノ粒子を介し、複数の

ルシフェラーゼを結合させることができ、微量の標的分子に対しても高いルシフェラーゼ発光を示すため、高感度に標的物質を検出できると考えられる。

最初に固相担体に任意濃度のストレプトアビジンを固定化し、ADNB 粒子を固定化後に基質を添加することで、ADNB 粒子のストレプトアビジン検出能を評価した。続いて、固相担体に任意濃度のビオチン標識抗体を固定化し、ストレプトアビジンを介して ADNB 粒子を結合させ、ADNB 粒子の抗体検出能を評価した。最後に標的物質として肝臓がんマーカーである  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) を用いて腫瘍マーカーに対する ADNB 粒子を用いた ELISA の検出能を評価した。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試薬

プラスミド作製時に用いた制限酵素及びその他の酵素類はタカラバイオ株式会社より購入し、合成オリゴフラグメント(*Nco*I - *Eco*R I - *Nde*I - *Spe*I)はグライナー・ジャパン社より購入した。組み換えタンパク質発現のために使用したプラスミドは Stratagene 社、または Novagen 社より購入した。大腸菌 JM109 株、BLR (DE3)株はそれぞれタカラバイオ(株)、Novagen®社より購入した。Nluc ルシフェラーゼベクター (pNL1.1 [Nluc] Vector) およびその基質 (Nano-Glo™ Luciferase Assay Reagent) は、Promega 社より購入した。Human serum (from human male AB plasma)は Sigma-Aldrich 社より購入した。その他の試薬等は特筆しない限り特級のものを使用した。

### 2.2.2 プラスミドの構築

pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Nluc-BAP-Chis 作製までのプラスミドの構築スキームを Fig. 2.2 に示す。プラスミドの設計には、すでに当研究室で作製されたプラスミド pET28b-

(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Oligo-Chis、pET28b-Oligo-BAP-Chis と、Nluc ベクター (pNL1.1) を用いた。pNL1.1 の Nluc をコードしている箇所の N 末端側に *EcoR* I, *Nco* I, *Sal* I、C 末端側に *Xho* I, *EcoR* I の制限酵素配列が付加されるよう primer (5'-ggggaattcgccatgggcgtcgac ATGGTCTTCACACTCGAAGATTTC -3', 5'-tcagaattcctcgagCGCCAGAATGCGTTCGC ACAGCCG -3') を用いて PCR 反応によって増幅し、*EcoR* I -*Nco* I - *Sal* I - Nluc -*Xho* I - *EcoR* I のフラグメントを得た。得られた PCR 産物を *Sma* I で切断したクローニング用ベクター pUC18 に挿入することで pUC18-Nluc を作製し、シーケンスを確認した。また、合成オリゴフラグメント *Nco* I - *EcoR* I - *Nde* I - *Spe* I を *Nco* I と *Spe* I で処理して Eluc を除去した pET28b-Eluc-BAP-Chis に挿入することで、pET28b-Oligo-BAP-Chis を得た。次に、pUC18-Nluc-Chis を *Nco* I と *EcoR* I にて切断し、得られた Nluc フラグメントを、*Nco* I と *EcoR* I で同様に処理した pET28b-Oligo-BAP-Chis に挿入することで、pET28b-Nluc-BAP-Chis (NB) を作製した。最後に、pET28b-Nluc-BAP-Chis を *Nco* I と *Sal* I にて切断して得られた Nluc-BAP フラグメントを *Nco* I と *Xho* I にて処理した pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Chis に挿入することで、pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Nluc-BAP-Chis (ADNB) を得た。

### 2.2.3 融合タンパク質の発現、精製および定量

大腸菌内においてタンパク質を発現させるために、作製したプラスミド pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Nluc-BAP-Chis で形質転換した大腸菌 BLR (DE3) 株を、Kanamycin 20 µg / ml, Tetracycline 20 µg/mL を含む LB 培地にて 37°C で振とう培養を行った。その後、O.D.<sub>660</sub>=0.6 に達した時点で終濃度 1 mM の Isopropyl thiogalactoside (IPTG) と、50 µM の Biotin を加え、25°C、Overnight で培養を行い、タンパク質を発現させた。ビオチンを培地に添加したのは、大腸菌由来のビオチンが ADNB 発現時に BAP 配列に提示され、ビオチンが不足し、大腸菌生育に悪影響を与えないようにするためである。回収した大腸菌の

ペレットを  $2.5 \times 10^3$  unit/ $\mu$ l の Benzonase® Nuclease (Novagen) と、1 mg/ml となるように lysozyme を加えた PBS で懸濁し、超音波処理により破碎した。そして破碎された大腸菌ライセートに 1 mM となるように Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を加え、17,000 g にて 15 分間の遠心を行い、上清を分取することにより可溶画分ライセートを得た。

可溶画分中に含まれる目的タンパク質は、コバルトイオンを配位した TALON® Metal Affinity Resin (Clontech) とヒスチジンタグとの配位結合を利用して精製を行った。レジンを充填したポリブレップエンブティカラム(BioRad)を PBS で平衡化し、そこに可溶画分を添加した。4°Cにおいて1時間ローテーションを行い、目的のタンパク質をレジんに吸着させた。フロースルーを除去し、非特異的に吸着したタンパク質を除去するために、レジンの3倍量の Wash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Buffer、0.3 M NaCl、pH 8.0)で5回洗浄を行った。さらにレジンの3倍量の 10 mM Imidazole を含む Wash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Buffer、0.3 M NaCl、pH 8.0)で3回洗浄を行った。その後、100 mM Imidazole を含む Elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Buffer、0.3 M NaCl、pH 8.0) をレジンと等量加え、4°Cで15分間インキュベートしたのち、グラビティーフローで目的タンパク質を溶出した。同様の手順でさらに3回、計4回溶出を行った。

精製したタンパク質は Slide-A-lyzer (Pierce)を用い、100倍以上の PBS で4°Cにおいて1時間以上の透析を3回行った。精製したタンパク質は、12%ポリアクリルアミドを用いた SDS-PAGE に展開したあと、CBB 染色液(ナカライテスク)に浸して染色し、目的タンパク質が得られたことを確認した。タンパク質濃度は BCA protein assay kit (Pierce)により決定した。精製したタンパク質は-80°Cで保存した。

#### 2.2.4 ELP 融合 Nluc のビオチン提示評価

精製した ADNB に対して Streptavidin Alkaline phosphatase (Promega)を用いて Western blotting を行うことで、ELP 融合 Nluc の BAP 部分へのビオチン提示を確認した。ELP 融合 Nluc を、12%ポリアクリルアミドを用いた SDS-PAGE に展開したあと、ポリアクリルアミドゲルを blotting buffer (メタノール: MQ : 10×blotting buffer = 6 : 30 : 4) 中で 15 分間浸したろ紙とメンブレンに挟み、90 分間トランスファーした。その後メンブレンを取り出し、Blocking One (ナカライテスク社) 4 ml に 30 分間漬け、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼを 10 µl 加え、10 分間振盪した。PBS-T (0.1%含有 Tween20 PBS) で洗浄を 3 回行い、基質である Fast red-TR salt (sigma)を 1 ml 加え、5 分間静置させることで酵素反応させた。

#### 2.2.5 ADNB ナノ粒子の熱安定性評価

ADNB は、精製・透析後 1 時間のサンプルを用意した。1 nM に希釈した ADNB を 0.5 ml マイクロチューブに添加し、iCycler (Biorad)のグラジエント機能を用いて 25~80°C の温度で 20 分間加熱した。その後室温で 20°Cまで冷却し、白色の 96-well polystyrene plate (Corning®社, product#3922) に移した。Nano-Glo® Luciferase Assay Reagent を 30 µl 加え、マイクロプレートルミノメーター(Lmax)で積算時間 1 秒にて発光値を算出した。

#### 2.2.6 濁度測定による相転移評価

濁度は DU7500 分光光度計(Beckman)を用い、マルチセル温度コントローラで任意の温度で測定した。温度に対する濁度の変化は、温度変化速度を 1°C/min とし、350 nm の透過光により測定を行った。温度は 20°Cから測定を開始し、50°Cまで達した後、再度 20°Cまで冷却した。相転移温度は濁度変化の中間点での温度と定義した。

### 2.2.7 動的光散乱法(DLS)による粒子径測定

試薬及びバッファーはすべて 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターにて、ダストを除去した。データは Nano-ZS (Malvern)を用いて、633 nm のレーザー光の 90°の方向の散乱を 10 秒間以上、複数回測定し、収集することで 1 セットとした。これを 5 セット行った。セルは Malvern 社の“Size & Zeta ”キャピラリーセル(DTS1060)もしくはポリスチレン製セル(DTS0012)を使用した。セルの温度を変化させた場合、10 分間平衡化した。粒子径分布の散乱強度表示から体積表示への換算は Nano-ZS 付属のソフトウェアを用いた。

### 2.2.8 ADNB ナノ粒子の凍結融解安定性評価

ADNB は 45°C で 20 分間加熱しナノ粒子を形成させた。ADNB ナノ粒子を白色の 96-well polystyrene plate (Corning®社, product#3922) に 50 fmol 分注した。Nano -Glo® Luciferase Assay Reagent を 30  $\mu\text{l}$  加え、マイクロプレートルミノメーター(Lmax)で積算時間 1 秒にて発光値を算出し、この時の発光値を、活性 100%とした。次にサンプルを 80°C で 45 分間凍結し、その後室温に静置して 15 分間で融解した。サンプルを 50 fmol 採取し Nano-Glo® Luciferase Assay Reagent を 30 $\mu\text{l}$  加え、マイクロプレートルミノメーター(Lmax)で積算時間 1 秒にて発光値を算出し、同様の操作を凍結融解 1 回目の測定結果とした。これを凍結融解 6 回目の測定結果を得るまで繰り返した。

### 2.2.9 ADNB ナノ粒子の保存安定性評価

ADNB を 4°C、25°C に保存し、Nluc 活性の経時変化を調べた。ADNB は精製、透析後 1 時間のものを用意し、PBS で 5  $\mu\text{M}$  に調整した。ADNB は 45°C、20 分間加熱しナノ粒子を形成させた。白色の 96-well polystyrene plate (Corning®社, product#3922) に、採取した 50 fmol のサンプルを添加し、Nano-Glo® Luciferase Assay Reagent を 30 $\mu\text{l}$  加え、ルミノメーターで積算時間 1 秒にて発光測定を行った。この時、経過時間 0 秒における発光

値を 100%の活性とした。ADNB サンプルを 4°C、25°C 中で静置し、0、24、48、96、192、240、312、384、456、528、600、672、768 時間ごとにサンプルを採取し、白色の 96-well polystyrene plate に 50 fmol 添加し、Nano-Glo® Luciferase Assay Reagent を 30 µl 加え、ルミノメーターで積算時間 1 秒にて発光測定を行った。

### 2.2.10 ADNB ナノ粒子のストレプトアビジン検出能評価

200 nM の ADNB を 45°C で 20 分間加熱し、ナノ粒子形成後、10000 rpm で 3 分間遠心し、上清を採取することでナノ粒子を調製した。96-well polystyrene plate (Corning®社, product#3922) に PBS で任意の濃度に調整した Streptavidin 50 µl を加えて、37°C で 1 時間インキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄した後、Blocking One 200 µl を加えて 37°C で 30 分間ブロッキングした。PBS-T で 3 回洗浄した後、200 nM の融合タンパク質(AVGVP)<sub>42</sub>-Chis を 250 µl 加えて 25°C で 1 時間ブロッキングを行った。PBS-T で 3 回洗浄した後、200 nM の ADNB 50 µl を加え、4°C で 1 時間インキュベートすることで、Streptavidin へ ADNB を結合させた。PBS-T で 3 回洗浄した後、Nano-Glo® Luciferase Assay Reagent を 30 µl 加え、マイクロプレートルミノメーター(Lmax)で積算時間 1 秒にて発光値を算出した。

### 2.2.11 ADNB ナノ粒子を用いたビオチン化抗体検出能評価

200 nM の ADNB を 45°C で 20 分間加熱し、ナノ粒子形成後、10,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を採取することでナノ粒子を調製した。96-well polystyrene plate (Corning®社, product#3922) に PBS で任意の濃度に調整した biotinylated Anti-Rabbit IgG 50 µl を加えて、37°C で 1 時間振盪させながらインキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄した後、200 nM の AVGVP を 200 µl を加えて 37°C で 1 時間振盪させながらブロッキングした。PBS-T で 3 回洗浄した後、200 nM の ADNB 50 µl を加え、4°C で 1 時間浸透させながらインキュベートし、Streptavidin を介して ADNB を結合させた。PBS-T で 3 回洗浄した後、Nano-

Glo® Luciferase Assay Reagent を 30  $\mu$ l 加え、マイクロプレートルミノメーター (Lmax) で積算時間 1 秒にて発光値を算出した。

### 2.2.12 ADNB ナノ粒子を利用した腫瘍マーカー検出能評価

400 nM の ADNB を 45°C で 20 分間加熱し、ナノ粒子形成後、10000 rpm で 3 分間遠心し、上清を採取することでナノ粒子を調製した。96-well polystyrene plate (Corning®社, product#3922) に Anti-AFP, Human, Mouse-Mono (EXBIO 社) 1 $\mu$ g/ml を 100  $\mu$ l 加えて、37°C で 1 時間振盪させながらインキュベートした。PBS-T 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した後、Blocking One を 250  $\mu$ l 加え、37°C で 1 時間振盪させながらブロッキングを行った。PBS-T 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した後、5% BSA もしくはヒト血清(sigma 社)で任意の濃度に希釈した  $\alpha$ -Fetoprotein (Fitzgerald 社) を 100  $\mu$ l 加えて 37°C で over night で振盪させながらインキュベートした。PBS-T 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した後、Anti-AFP, Human, Rabbit-Poly (Monosan 社) 1  $\mu$ g/ml を 100  $\mu$ l 加えて、37°C で 1 時間振盪させながらインキュベートした。PBS-T 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した後、Anti-IgG (H+L), Rabbit, Goat-Poly, Biotin (Vector 社) 1  $\mu$ g/ml を 100 $\mu$ l 加えて、37°C で 1 時間振盪させながらインキュベートした。PBS-T 250 $\mu$ l で 3 回洗浄した後、Streptavidin 1  $\mu$ g/ml を 100  $\mu$ l 加えて、37°C で 1 時間振盪させながらインキュベートした。PBS-T 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した後、200 nM の AVGVP を 250  $\mu$ l 加え、25°C で 1 時間振盪させながらブロッキングを行った。PBS-T 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した後、400nM の ADNB 50  $\mu$ l を加え、25°C で 1 時間振盪させながらインキュベートし、Streptavidin を介して ADNB を結合させた。PBS-T 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した後、Nano-Glo® Luciferase Assay Reagent を 30  $\mu$ l 加え、マイクロプレートルミノメーター(Lmax)で積算時間 1 秒にて発光値を算出した。検出限界(DL) は得られた結果から標準偏差およびグラフの傾きを算出し、次頁の IUPAC の定義に従って求めた。

$$DL = 3.3 s/a$$

s : blank 試料の測定値の標準偏差

a : 検出限界付近の検量線の勾配

## 2.3 実験結果及び考察

### 2.3.1 融合タンパク質の発現、精製および定量

本研究で用いたプラスミドは、全て T7 プロモーター下流に構造遺伝子を有し、pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Chis は N 末端側から、温度に応答して凝集体を形成する配列 (AVGVP) の 42 回繰り返り、凝集体のサイズを制御するためのアスパラギン酸 (D<sub>44</sub>)、精製用 tag である His tag が付加されるように設計されている。pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Nluc-BAP-Chis は、シグナル発光能を付加するために、ポリアスパラギン酸の末端に Nluc を融合した。また、ビオチンをナノ粒子表面に提示しアビジンとの結合能を付加するために、Nluc の末端にさらに BAP を融合した (Fig. 2.3 (A))。C 末端に Nluc と BAP を融合することで、ナノ粒子表面に Nluc とビオチンが提示され、粒子を構成する融合タンパク質の数だけ発光能を持ち、アビジンに対する結合能を持つナノ粒子が形成されると期待した。これら pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Chis を用いて発現させたタンパク質は AD、pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Nluc-BAP-Chis を用いて発現させたタンパク質は ADNB と名付けた。

本章で作製したプラスミドで形質転換した大腸菌 BLR (DE3)株を用いてタンパク質を発現誘導したところ、いずれも可溶性のタンパク質として発現した。発現したタンパク質はすべて、可溶画分から TALON® Metal Affinity Resin を用いて単離精製を行った。精製後、透析を行い 10% glycerol を含む PBS 中に溶解した。得られたタンパク質を SDS-PAGE により確認したところ、いずれのタンパク質においてもエクストラバンドが多少現れたが、純度の高いバンドとして確認できた (Fig. 2.3 (B))。得られたバンドがアミノ酸配列から予測

される分子量 (AD: 26.7 kDa, ADNB: 50.6 kDa)より若干大きいのは ELP の特性に起因するものと考えられる [141]。

### 2.3.2 ELP 融合 Nluc のビオチン提示評価

ADNB の BAP 配列へのビオチン提示は、アルカリホスファターゼ標識アビジンを用いて Western blotting により確認した (Fig. 2.4 (A))。ADNB は大腸菌系を用いた発現の際に、大腸菌内のビオチンリガーゼ (BirA)により BAP 配列のリジン残基がビオチン化される。AD を SDS-PAGE 展開したレーンをネガティブコントロールとし、ADNB を SDS-PAGE 展開したレーンと比較した。その結果ネガティブコントロールである AD のレーンでは、アルカリホスファターゼによる呈色反応が全く見られなかった。それに対し、ADNB のレーンでは ADNB の分子量 50.6kDa 付近に赤色の呈色反応が見られた。これは、ADNB の BAP 配列がビオチン化され、アルカリホスファターゼ標識アビジンと特異的に結合していることに起因する。以上のことから、作製した融合タンパク質 ADNB は、BAP 配列にビオチンが提示されていることが明らかとなった。

### 2.3.3 ADNB ナノ粒子の熱安定性評価

融合タンパク質 ADNB は相転移温度以上の加熱により、表面に Nluc が提示されたナノ粒子を形成することが予測される。しかしながら、粒子形成過程の加熱による Nluc の活性低下により ELISA への適用時に検出感度の低下が懸念される。この加熱による活性低下を検証するために、融合タンパク質 ADNB を対して 25~80℃まで 5℃刻みで 20 分間加熱を行い、その後 4℃にて基質を添加し、加熱していない ADNB の発光値を 100%の活性としてとして活性を比較した (Fig. 2.4(B))。その結果、25℃と 30℃で加熱した ADNB は活性低下の傾向が見られたため Nluc の活性が加熱により低下したといえる。しかし 35℃で加熱した ADNB は、活性が減少せず、90%以上を維持していた。その後も ADNB は 40℃か

ら 60°Cにかけて活性 90%を保持し、60°Cを境に活性が急激に減少していった。ADNB が 35~60°Cの間で高い活性を保持していた理由としては、ADNB の相転移が 34.5°Cで開始されるので、35°C以降のサンプルは AVGVP とアスパラギン酸の繰り返し配列により安定な粒子を形成し、そのコアであるエラスチン部分が保護基として作用していると考えられる。60°C以降で活性が急激に減少したのは、Nluc の T<sub>m</sub> 値が 60°Cであるので [93]、加熱により Nluc が変性したことに起因する。この結果から ADNB は、60°Cの環境下まで高い活性を保持できることが示された。

#### 2.3.4 温度変化による粒子形成評価

精製した ADNB が温度に応答して集合状態を取るか否かを検討するために、連続的に温度を変化させながら濁度を測定した。タンパク質溶液は AD が 600 µg/ml、ADNB が 1600 µg/ml になるように調製した。その結果を Fig. 2.5 (A) に示す。昇温過程においては、ADNB も AD と同様に特定の温度を境に濁度が上昇していることが明らかになった。よって ADNB は温度応答性を有するといえる。相転移温度は AD が 34.5°Cであったのに対し、ADNB は 37.5°Cであった。降温過程では、AD は 30°Cまでは濁度がほとんど下がっていなかったが、それ以降、濁度が緩やかに減少する結果となった。当研究室の Matsumoto らが行った AD を用いた濁度測定でも同様の現象が見られているため、降温過程で粒子が崩壊している可能性が考えられる [65]。一方で ADNB は 20°Cまで降温しても濁度がほとんど下がっておらず、温度変化に伴う構造変化が不可逆的であることが示された。Rincon らは、(AVGVP) の繰り返し配列が相転移温度を境にマイクロスケールの凝集体を形成し、その凝集体は 15°Cまで冷却した後も崩壊せず安定に存在することを報告している [142]。この特徴は AD、ADNB の挙動と一致しており、ADNB は(AVGVP)<sub>n</sub> の構造安定性を保持していることが示された。

次に ADNB が実際にサイズ制御された粒子を形成するか否かを、動的光散乱法 (DLS)を

用いて測定した。PBS 中に 400 µg/ml となるようにタンパク質溶液を調整し、20℃、45℃、20℃の順で温度を変化させながら粒子径の測定を行った。その結果が Fig. 2.5(B)である。Fig. 2.5(B) より、AD と ADNB は温度に応答して粒子径のピークが移動した。まず始めの20℃ではどちらも 10~15 nm 前後の粒子径を示した。次に 45℃に加熱すると AD と同様に粒子径ピークがシフトし、AD の 30 nm 前後の粒子径より大きい 40 nm 前後のサイズを示した。つまり ADNB は(AVGVP)<sub>n</sub> の性質通り温度に応答して凝集し、粒子化していること、またアスパラギン酸の静電反発力を利用することで凝集の際限ない成長を抑制していることが明らかになった。ADNB が AD に比べ粒子径が大きいのは、Nluc と BAP が融合していることに起因すると考えられる。最後に再度冷却して 20℃にしたところ、ADNB は AD と同様に粒子が崩壊することなくサイズが維持していた。これらの結果から ADNB は当初の設計通り、加熱により粒子を形成し、一度粒子を形成すると冷却後も解離せず、粒子径を保ったままであることが示された。その結果は Fig. 2.5 (A)の濁度測定の結果とも一致する。

### 2.3.5 ADNB ナノ粒子の凍結融解安定性評価

タンパク質の保存法として一般的である凍結保存において、融合タンパク質 ADNB の Nluc 活性が維持できるかを調べるために、-80℃の凍結融解を最大 6 回まで繰り返し、Nluc の活性を調べた。Nluc-BAP(NB)をコントロールとし、粒子形成前のモノマー状態の ADNB、粒子形成後の ADNB の Nluc 活性と比較した。凍結融解前のタンパク質を凍結融解 0 回とし、その発光値を 100%の活性とした。その結果を Fig.2.6 に示す。

凍結融解 1 回目の時点で、コントロールである NB は活性が 10%以下に減少していた。Nluc は-80℃による凍結に弱いことが示された。それに対して、モノマー状態の ADNB は活性が 60%程度保持されていた。さらに粒子形成後の ADNB は、凍結融解してもほぼ活性が維持されていることが分かった。2 回目以降の凍結融解では、どのタンパク質も活性低下

が見られたが、粒子形成後の ADNB では、6 回目の凍結融解においても 20%程度の活性を保持していた。これらの結果から、融合タンパク質 ADNB から成るナノ粒子は、凍結融解に対して高い安定性を保持していることが示された。

### 2.3.6 ADNB ナノ粒子の保存安定性評価

ADNB ナノ粒子を長期間一定の温度に静置し、Nluc の活性をどれだけ維持できるか調べた。Nluc -BAP (NB)をコントロールとし、粒子形成前のモノマー状態の ADNB、粒子形成後の ADNB の Nluc 活性と比較した。精製後 4°Cで 1 時間静置したタンパク質を時間 0 h とし、その発光値を 100%の活性とした。0 h の時点での NB の発光値は、 $402.0 \times 10^4$  RLU/sec、粒子形成前 ADNB は  $2049.0 \times 10^4$  RLU/sec、粒子形成後 ADNB は  $2078.2 \times 10^4$  RLU/sec であった。始めに 4°Cで静置した場合の Nluc 活性推移の結果を Fig. 2.7 (A)に示す。

24 時間静置の時点で、コントロールである NB は活性が 30%以下に減少しており、その後は 312 時間まで 30%前後を推移し、それ以降は減少傾向を示した。768 時間後には活性が 10%以下まで低下した。それに対し、ナノ粒子を形成した ADNB は、24 時間後に 60%近くにまで減少したが、その後は 600 時間まで活性は 60%に保持されていた。その後は活性が減少し始め、768 時間の時点で活性は 48%だった。最も活性が保たれていたのはナノ粒子形成前のモノマー状態の ADNB であり、他の 2 サンプルが大きく活性低下していた 24 時間静置のサンプルでも 95%の活性を保持していた。その後も大きな活性低下はなく 90%前後の活性を維持し、768 時間の時点においても活性は 90%だった。

次に、25°Cで静置した場合の Nluc 活性推移の結果を Fig. 2.7 (B)に示す。NB は 24 時間静置の時点で活性が 30%以下にまで低下し、その後は 312 時間まで 30%前後まで活性を保持していたが、それ以降活性が緩やかに低下し、768 時間後の時点で活性は 12%であった。それに対し、ナノ粒子を形成した ADNB は、経過時間に比例して活性が低下しており、312

時間経過後、活性が50%を切り、768時間後の時点で活性は18%であった。25°Cで静置した場合も、やはりナノ粒子形成前のモノマー状態のADNBが最も活性を保持しており、384時間経過まで活性が80%以上を保っており、その後は緩やかに低下していったが、768時間後の時点でも活性は52%であった。ルシフェラーゼの中でも安定なウミホタルルシフェラーゼの室温での半減期60時間と比較してもかなり安定であることが分かる [143]。エラスチン構造を有していないNBは活性の低下が大きかったため、エラスチン構造がルシフェラーゼの安定性に関与していると考えられる。また、ナノ粒子形成状態よりも、粒子形成前のモノマー状態のADNBの方がエラスチンとの接触面積大きいため、モノマー状態のADNBの方が、活性保持率が高かったと考えられる。

これらの結果から、融合タンパク質ADNBは優れた長期保存安定性を有しておりバイオセンシングにおける検出プローブとして有用であることが示された。

### 2.3.7 ADNB ナノ粒子のストレプトアビジン検出能評価

ADNB ナノ粒子の表層に提示されているビオチンのアビジン結合能を利用して、ストレプトアビジン検出を行った (Fig. 2.8)。コントロールとして、2.2.3 で作製した融合タンパク質ADNBのADの部分を除いたNluc-BAP (NB) を用いた。その結果が Fig. 2.9 である。NB を検出プローブとしたサンプルでは、ストレプトアビジンの濃度が  $1 \sim 10^4$  pg/ml において、発光値は低く抑えられており、ストレプトアビジンの濃度依存的な発光値の上昇は見られなかった。 $10^5$  pg/ml において発光値の上昇が見られ、 $10^6$  pg/ml において発光値が飽和状態となり、その発光値は、 $4.11 \times 10^6$  RLU/sec 程度であった。それに対して、ADNB ナノ粒子を検出プローブとしたサンプルでは、ストレプトアビジンの濃度が  $1 \sim 10^3$  pg/ml において発光値は低く抑えられており、ストレプトアビジンの濃度依存的な発光値の上昇は見られなかった。 $10^4$  pg/ml において、発光値のわずかな上昇が確認され、 $10^7$  pg/ml において発光値が飽和状態となり、その発光値は  $1.97 \times 10^7$  RLU/sec 程度であった。両者を比

較すると、ADNB ナノ粒子を検出プローブとしたサンプルの方が、ストレプトアビジンの検出限界が低かった。これはADNBがナノ粒子を形成する事によって、アビジン1分子あたりにより多くのルシフェラーゼが結合するため、より低濃度のストレプトアビジンを検出できることに起因している。さらに、結合飽和時の発光値が、NBの場合と比べて5倍程度高かったため、より定量的に検出できたといえる。これは、NBの比活性がADNBと比較して低いことに起因すると考えられる。以上の結果から、ADNB ナノ粒子は、アビジン結合能を利用して、高感度で定量的な検出に利用可能であることが示唆された。

### 2.3.8 ADNB ナノ粒子のビオチン化抗体検出能評価

2.3.7より、ADNB ナノ粒子の検出能のポテンシャルの高さが明らかとなった。そこで、次のステップとして、任意の濃度に希釈したビオチン化抗体を固相に吸着し、ストレプトアビジン-ADNB ナノ粒子の複合体を固定化することによって、ビオチン化抗体が検出可能であるかを確認した (Fig. 2.10)。また粒子を形成させないモノマー状態のADNBもコントロールとして同様の実験を行い、ADNB ナノ粒子に優位性があるかを調べた。その結果が Fig. 2.11 である。モノマー状態のADNBを検出プローブとしたサンプルでは、ビオチン化抗体の濃度が  $1 \sim 10^3$  pg/ml において発光値は低く抑えられており、ビオチン化抗体の濃度依存的な発光値の上昇は見られなかった。 $10^4$  pg/ml において発光値の上昇が見られ、その後は  $10^6$  pg/ml まで急激に発光値が上昇し、飽和状態となった。よって、モノマー状態のADNBのビオチン化抗体検出限界は  $10^3 \sim 10^4$  pg/ml の範囲内にあるといえる。これに対し、ADNB ナノ粒子を検出プローブとしたサンプルでは、ビオチン化抗体の濃度  $1 \sim 10^2$  pg/ml まではモノマー状態のADNBと同様に、発光値の上昇は観測されなかったが、 $10^3$  pg/ml において発光値の上昇が確認できた。その後は  $10^5$  pg/ml まで急激に発光値が上昇し、飽和状態となった。よってADNB ナノ粒子のビオチン化抗体検出限界は  $10^2 \sim 10^3$  pg/ml の範囲内にあるといえる。モノマー状態のADNBと比較すると、10倍程度検出限界

が向上していることが明らかとなった。これは、ADNB がナノ粒子を形成する事によって、ビオチン化抗体 1 分子あたりに複数のルシフェラーゼが結合するため、より低濃度のビオチン化抗体を検出できることに起因している。以上の結果から、ADNB ナノ粒子を検出プローブとした場合、モノマー状態と比較して、10 倍程度高感度に標的物質を検出できることが示唆された。

### 2.3.9 ADNB ナノ粒子の腫瘍マーカー検出能評価

これまでの結果より、融合タンパク質 ADNB により構築されたナノ粒子が、標的物質に対する高感度な検出能を持つことが示唆された。このナノ粒子は、医療・臨床検査の対象となっている腫瘍マーカー等の高感度な検出が実現できるものと期待できる。そこで、ADNB ナノ粒子を用いて、胎児の肝細胞や卵黄嚢で産生される糖タンパク質である  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) をターゲットとした ELISA を行い、その感度を検討した。AFP は健常者ではほとんど産生されないが、肝細胞癌、肝芽腫などの腫瘍細胞では産生されるため、肝臓がんにおける腫瘍マーカーとして広く知られている。

本実験では、固相に吸着させた抗 AFP 抗体に、PBS で任意の濃度に調製した AFP を固定化し、一次抗体、ビオチン化二次抗体、ストレプトアビジン、ADNB ナノ粒子の順に添加することで複合体を形成させ、Nluc の発光によってその感度を調べた (Fig. 2.12)。その結果を Fig. 2.13(A)に示す。AFP の代わりにヒト血清アルブミン (HSA) を添加したコントロールサンプルにおいては、HSA の濃度を高くしても、発光値はほとんど変化しなかった。一方、AFP を添加したサンプルのうち、モノマーの ADNB で検出したサンプルにおいては、AFP が  $1\sim 10^2$  pg/ml の濃度までは、コントロールに近い発光値を示し、 $10^3$  pg/ml において、コントロールとの有意な差が現れた。その後は、AFP 濃度に依存して緩やかに発光値が上昇している。よって、モノマー状態の ADNB の AFP 検出限界は  $10^2$  pg/ml  $\sim$   $10^3$  pg/ml 程度であると推測した。それに対し、ADNB ナノ粒子で検出したサンプルにおいて

は、AFPが1~10 pg/mlの濃度までは、コントロールに近い発光値を示し、 $10^2$  pg/mlの時点でコントロールとの有意な差が現れている。よって、ADNB ナノ粒子のAFP 検出限界は10 pg/ml~ $10^2$  pg/ml程度であると推測される。また低濃度領域での検出挙動と検量線作成によって算出される検出限界(LOD)を調べるため、500 pg/ml以下の濃度のAFPにおけるNlucの発光値についてより細かい間隔でプロットした。その結果をFig. 2.13(B)に示す。ADNB ナノ粒子で検出したサンプルにおいては、低濃度領域においても濃度依存的に発光値が上昇しており、モノマー状態のADNBと比較すると、各濃度におけるNluc発光値によって作成した検量線の傾きが大きい結果となった。また、blank試料の測定値の標準偏差と検量線の傾きに基づいてLODを算出すると、ADNBナノ粒子による検出では25.9 pg/ml、モノマーのADNBによる検出では $2.48 \times 10^2$  pg/mlとなり、ADNBナノ粒子による検出はモノマー状態と比較して、10倍程度高感度であることが明らかとなり、2.3.8での実験結果と一致している。この結果から、ADNBナノ粒子は腫瘍マーカーを標的として、シグナル増幅によって高感度に検出できることが明らかとなった。

最後に、このADNBナノ粒子を検出プローブとした高感度ELISAによって、ヒト血清中のAFPを検出できるか否かを実証した。生体中に進行した癌が存在する場合、腫瘍マーカーは、血液もしくは尿に遊離しているため、生物学的試料中においても腫瘍マーカーを正確に検出できることが極めて重要である。ヒト血清中で任意の濃度にAFPを希釈してプレート上に固定化し、抗体を介して結合したADNBナノ粒子のNlucの発光によってその感度を調べた。その結果をFig. 2.14に示す。ADNBナノ粒子で検出したサンプルはAFPの濃度依存的にNlucの発光シグナルが増加していることが分かった。この結果から、ADNBナノ粒子を検出プローブとしたELISAが血清中の試料の検出に適用可能であることが明らかとなった。既に確立されたELISAを高感度化する場合においては、実験プロトコルを大きく変更する必要はなく、HRP等の酵素の代わりにこのプローブを導入するだけでシグナル増幅が可能である。このため、本研究において開発された高感度化プローブは汎用性が高

く、他の腫瘍マーカーを対象とした ELISA へと容易に展開することが期待できる。

## 2.4 結言

本章では、ELP の疎水性ドメイン(AVGVP)<sub>n</sub> とポリアスパラギン酸(D<sub>m</sub>)の融合タンパク質で構築されたタンパク質ナノ粒子をバイオセンシングへと応用するために、シグナル増幅の役割を担う発光能とアビジンを介した抗体結合能を付加させ、ELISA における高感度な検出プローブを作製することを目的とした。そのために(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Chis の D<sub>44</sub> 末端に Nluc と BAP を融合した(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Nluc-BAP-Chis を作製し、その構造や物性、熱や凍結融解に対する耐性を評価した。また ADNB ナノ粒子を用いて、ELISA における腫瘍マーカーの検出系を構築し、高感度に標的物質を検出できるか否かを検証した。

まず、遺伝子工学的手法によって融合タンパク質 ADNB を作製し、ウエスタンブロッティングによって、融合タンパク質の BAP 配列にビオチンが提示されたことを確認した。また熱安定性評価を行い、60°Cの加熱においても Nluc の活性を 90%以上保持していることが確認され、ナノ粒子形成における加熱がルシフェラーゼ活性に影響を与えないことを明らかにした。次に、DLS による粒子径の計測により、AD、ADNB ともに 35°C程度の加温において粒子を形成すること、並びにその粒子は 20°Cに冷却後も大半が解離されず粒子径を保っていることを示した。また、ADNB の粒子径は 40 nm 前後であることを明らかにした。次にバイオセンシングにおける検出プローブ材料として重要項目である凍結融解安定性、長期保存安定性について評価した。凍結融解に関しては、ADNB ナノ粒子は 1 回の凍結融解においてもルシフェラーゼ活性を 95%以上保持していることを確認した。このことから、(AVGVP)<sub>n</sub> が凍結融解の緩衝材として働き、凍結融解安定性を向上させていることが分かった。また長期間一定温度で ADNB を静置し、時間経過における Nluc の活性を追ったところ、粒子形成前のモノマーの ADNB は、室温で長期間保存してもルシフェラーゼの活性低下が低減されていることを確認した。

続いてストレプトアビジンを標的物質とした ADNB ナノ粒子の検出能評価を行い、ADNB ナノ粒子はストレプトアビジン結合能を利用して、高感度で定量的にストレプトアビジンを検出可能であることが示唆された。続いてビオチン化抗体を標的物質として、ADNB ナノ粒子の検出能評価を行った。ADNB ナノ粒子のビオチン化抗体検出限界は $10^2 \sim 10^3$  pg/ml 程度であり、従来の標的1分子に1酵素を提示する検出法と比較して、10倍程度高感度に検出できることが示された。最後に、腫瘍マーカーである  $\alpha$ -Fetoprotein を標的とした ELISA 系を構築し、ADNB ナノ粒子の検出能を評価した。ADNB ナノ粒子の AFP 検出限界は 25.9 pg/ml 程度であり、従来の標的1分子に1酵素を提示する検出法と比較して、10倍程度高感度に検出できることが明らかとなった。さらに生体サンプルを模倣したヒト血清中の AFP に関しても検出可能であり、生体試料中のマーカー検出に適用可能であることが明らかとなった。

以上の結果から融合タンパク質 ADNB より構成されたタンパク質ナノ粒子は、ELISA における様々な標的物質1分子に対して複数のルシフェラーゼが結合することにより、1分子あたりのシグナルが増幅された高感度な ELISA を確立し、優れた腫瘍マーカーの検出能を有することが明らかとなった。

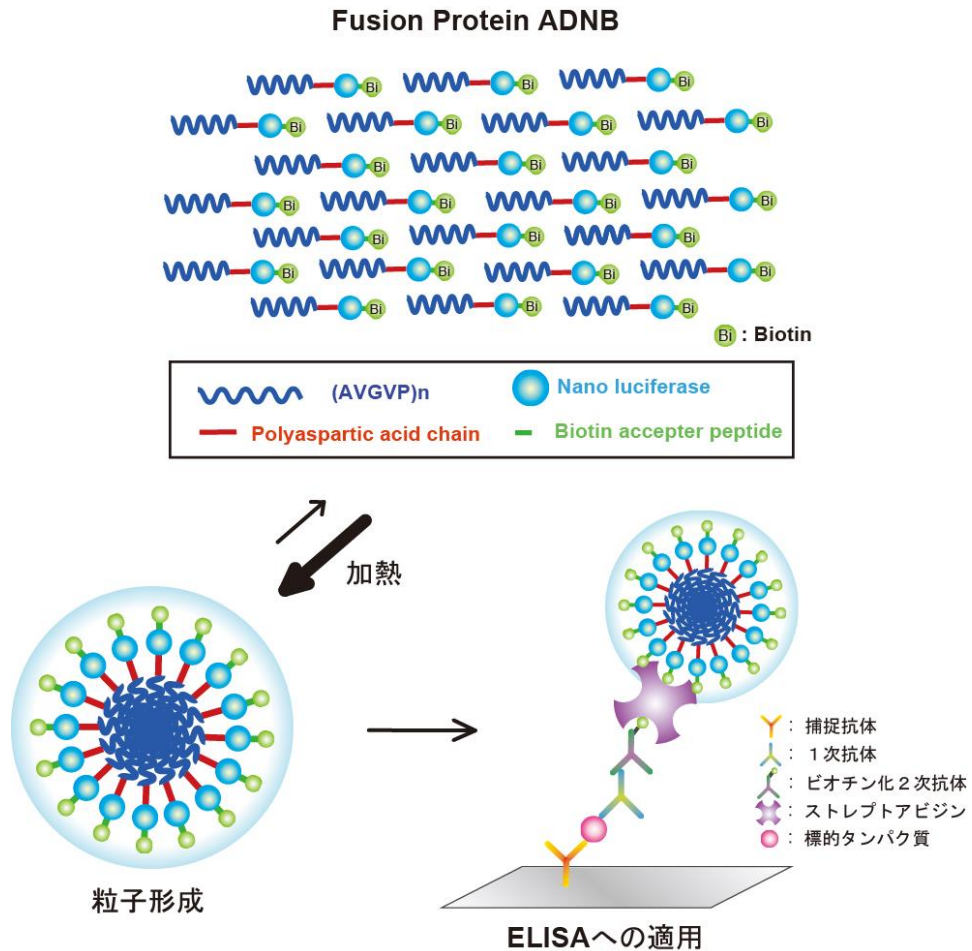


Figure 2.1 作製した融合タンパク質の粒子形成と ELISA における検出プローブとしての応用の概念図

ナノ粒子は、表層にルシフェラーゼとビオチンが多価に結合しているため、ストレプトアビジンを介して標的タンパク質を認識したビオチン化抗体に結合可能となる。複数提示したルシフェラーゼの発光により、高感度な標的タンパク質の検出が実現できる。

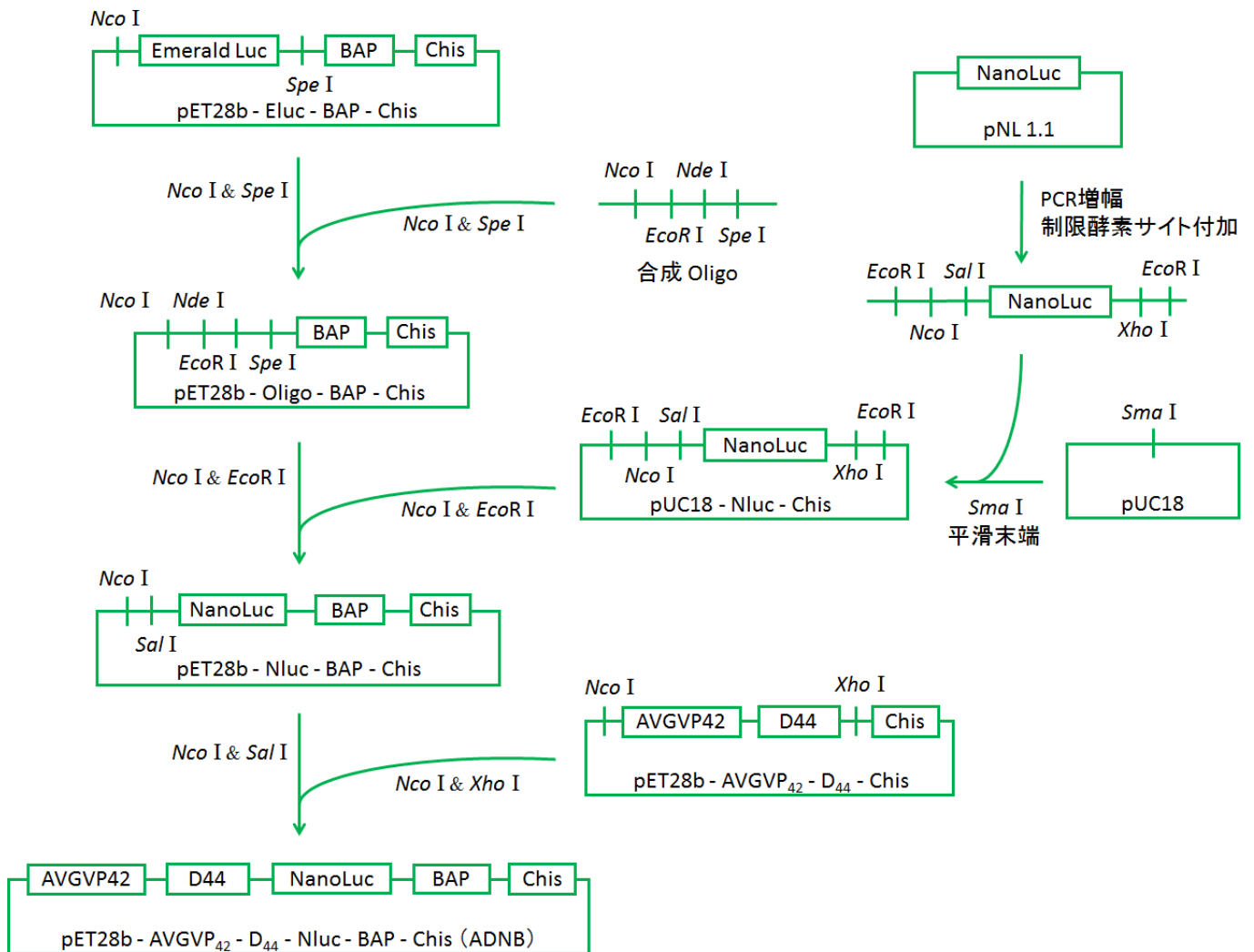


Figure 2.2 pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Nluc-BAP-Chis のプラスミド構築スキーム

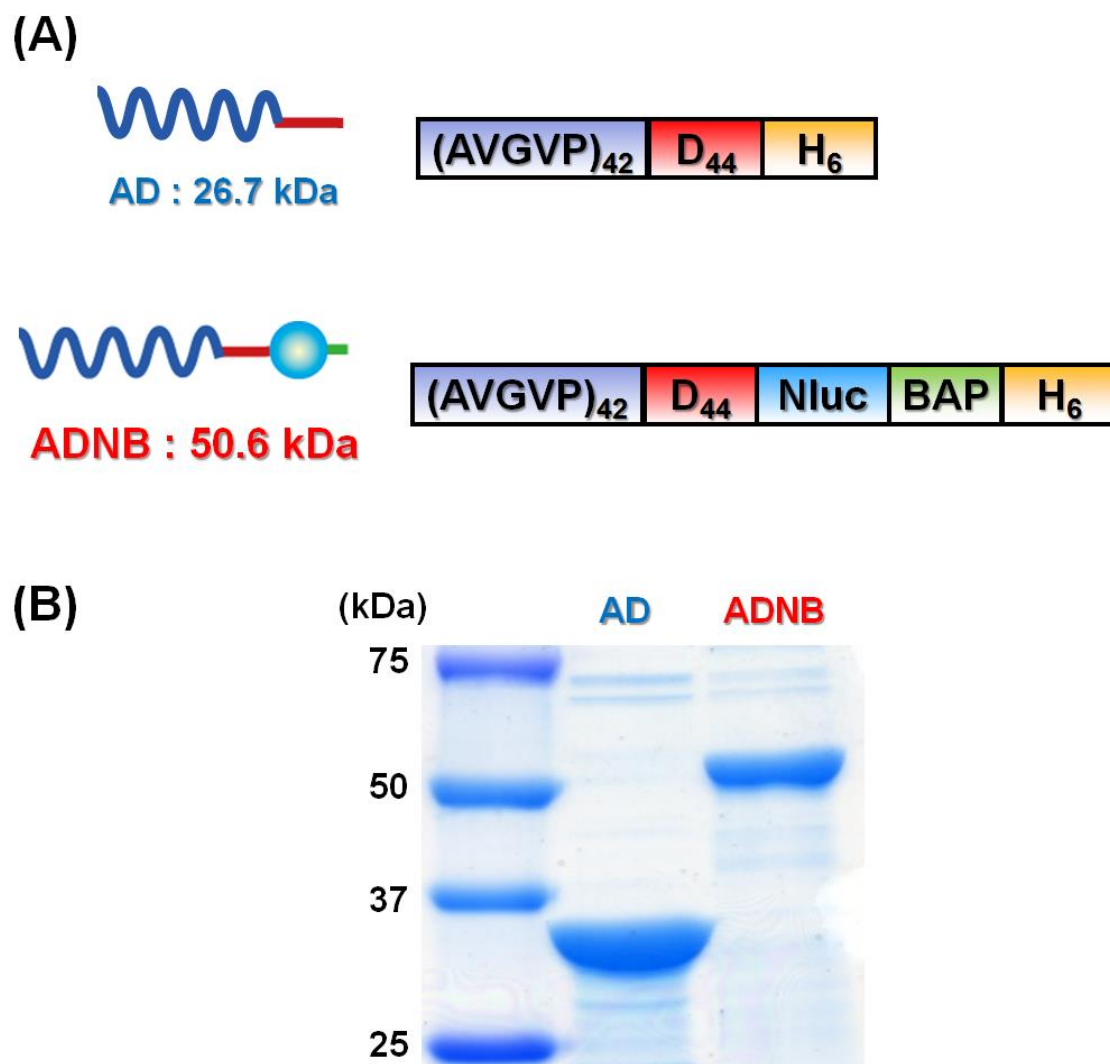


Figure 2.3

(A) 構築したタンパク質

(B) AD, ADN の精製後サンプルの SDS-PAGE

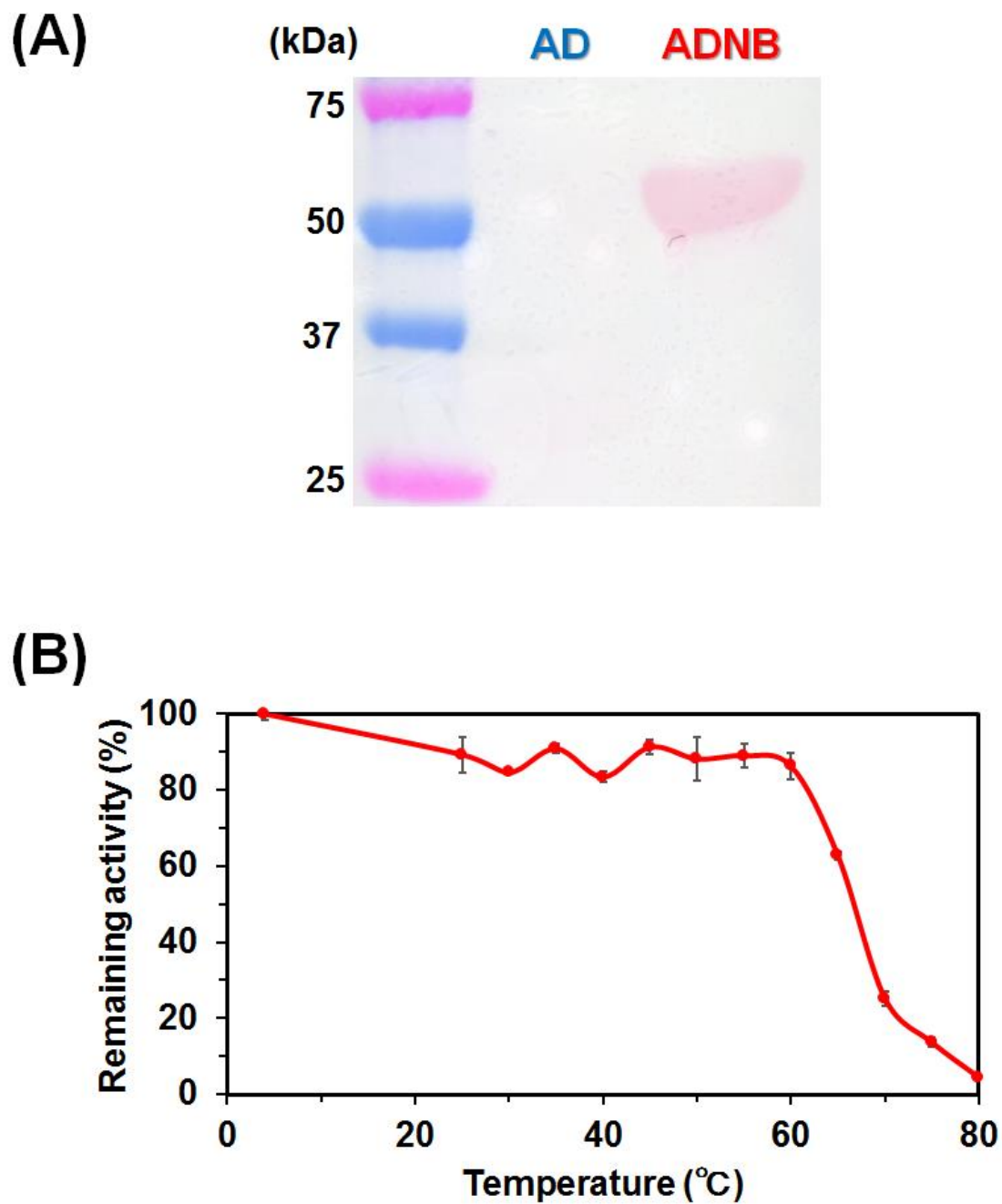


Figure 2.4

(A) AD, ADNB の Western blotting (ADNB: 50.6 kDa)

(B) 各温度での加温後における ADNB の Nluc 活性測定

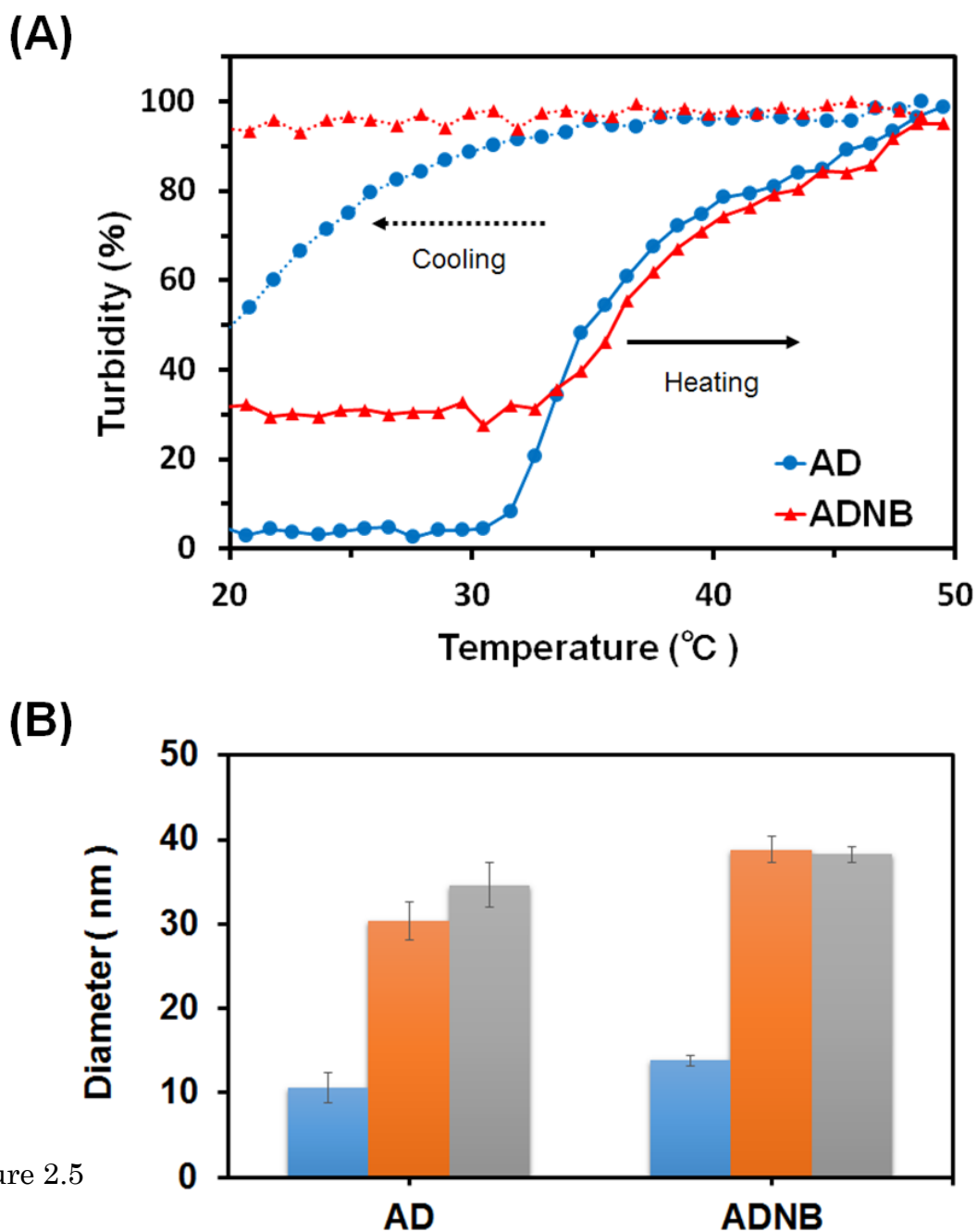


Figure 2.5

温度変化による粒子形成評価

(A) AD (●) と ADNB(▲)の温度に対する濁度変化

(B) 各温度における粒子径。青は 20°C、赤は 45°C、灰色は再冷却後の 20°C における粒子の直径を示す。

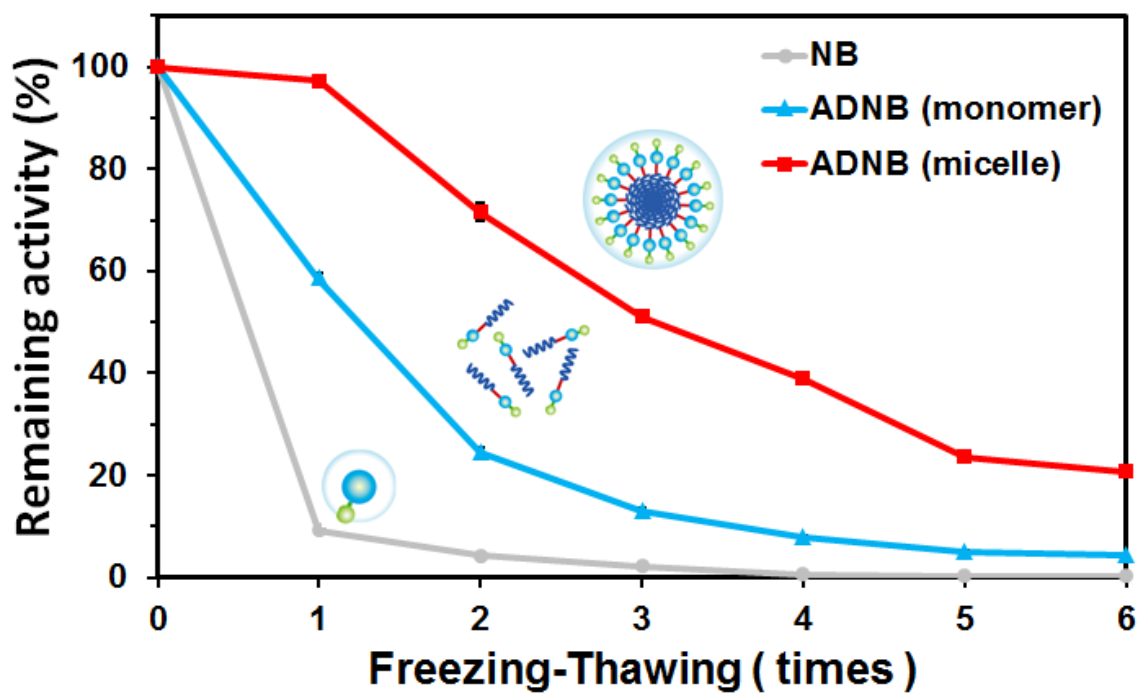


Figure 2.6

凍結融解された融合タンパク質の Nluc 活性測定

●は NB、▲は粒子形成前の ADNB、■は粒子形成 ADNB

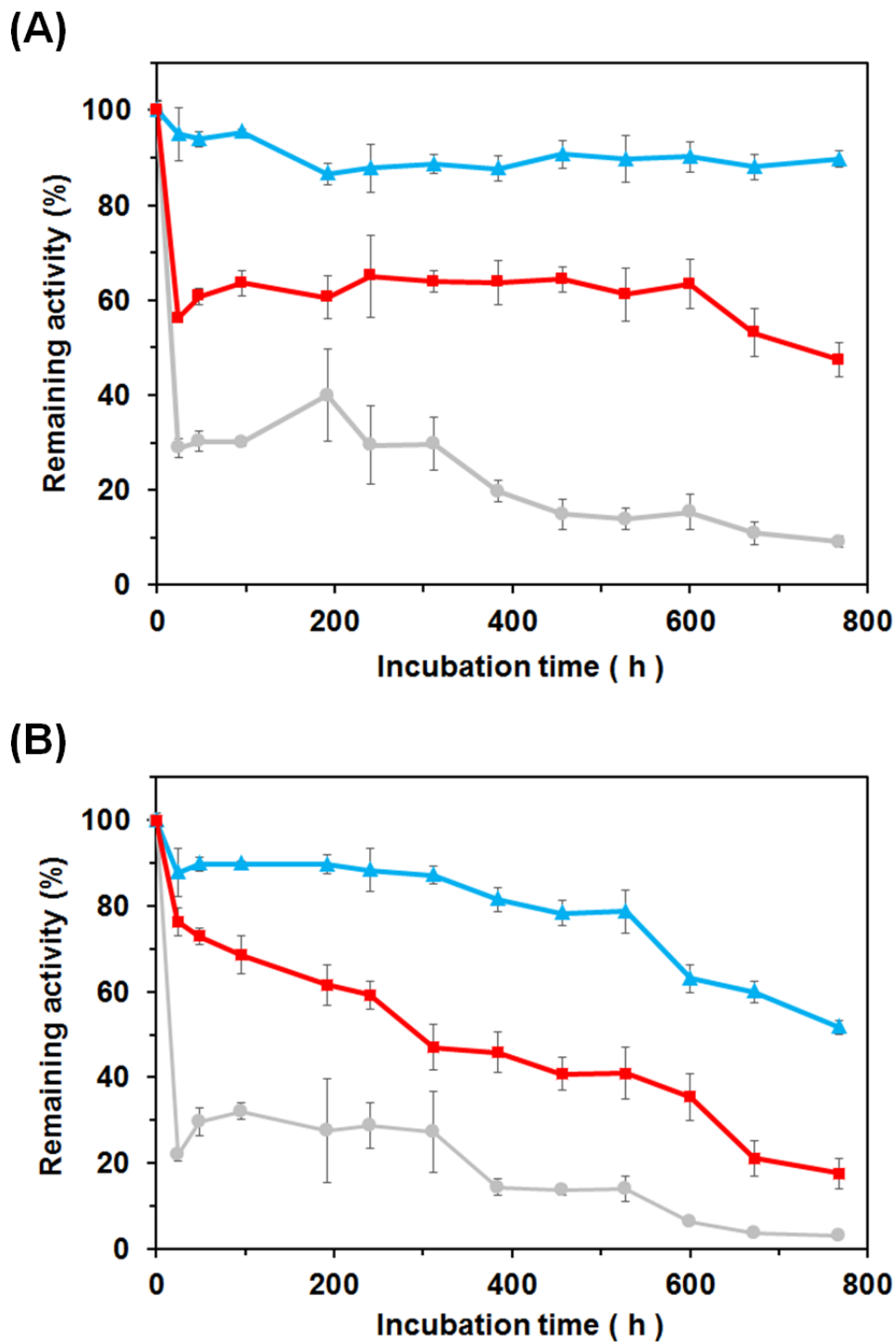


Figure 2.7

(A) 4°C (B) 25°C環境下で保存した融合タンパク質の Nluc 活性

●は NB、▲は粒子形成前の ADNB、■は粒子形成 ADNB

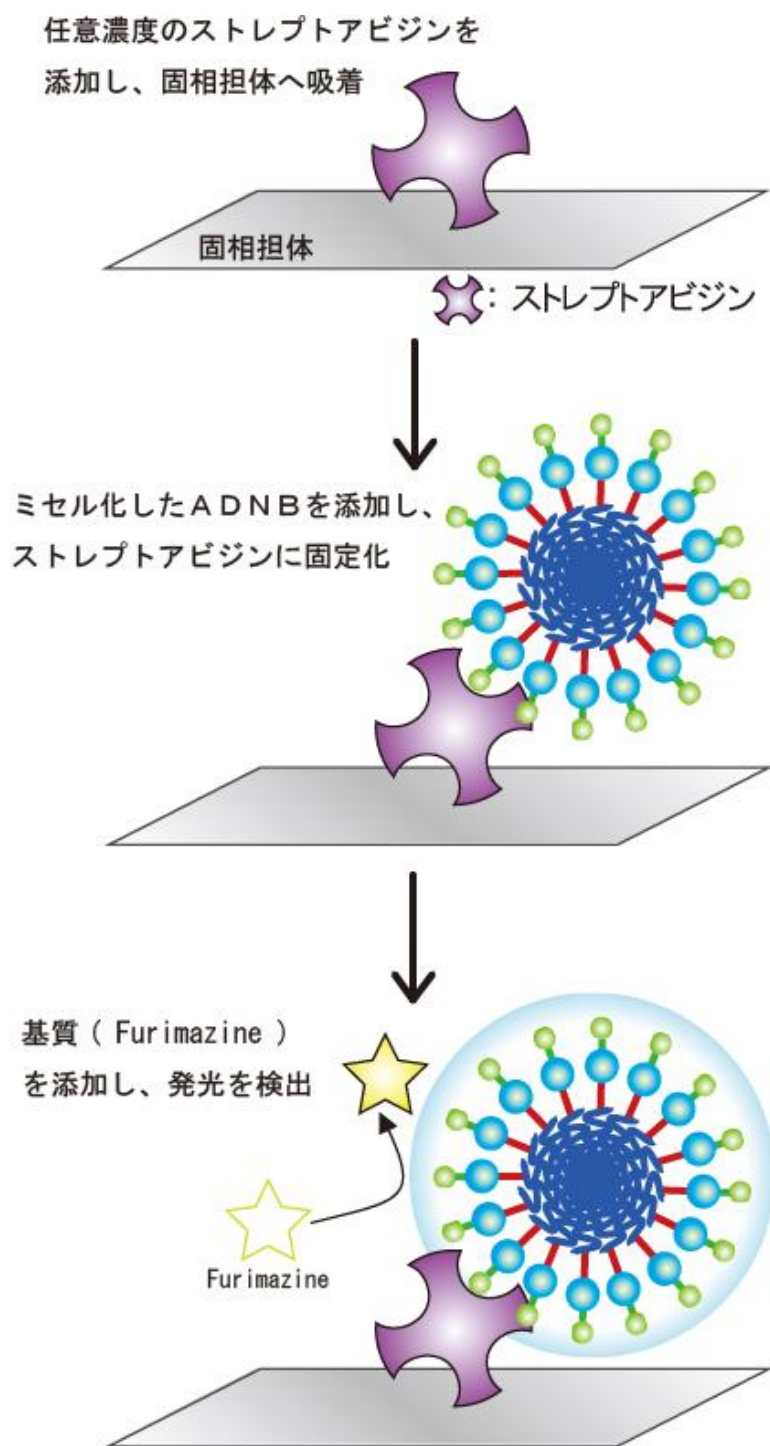


Figure 2.8

ナノ粒子を検出プローブしたストレプトアビジン検出の概念図

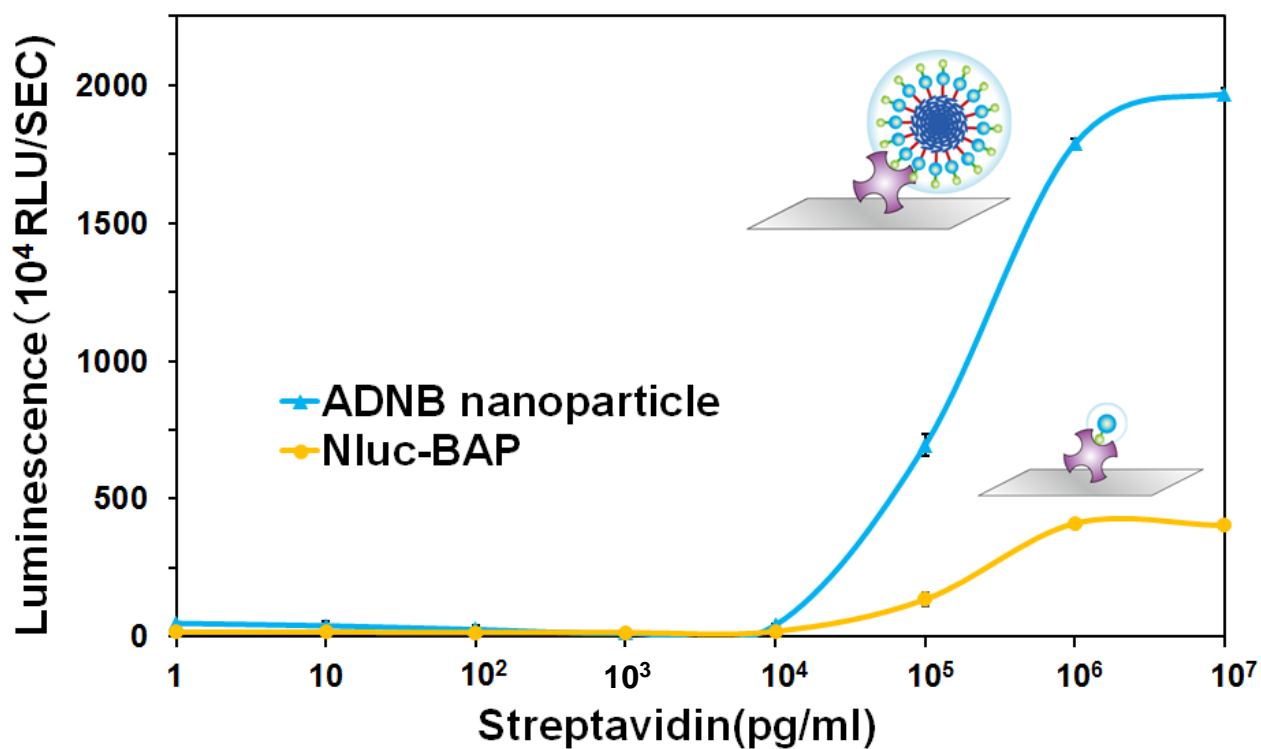


Figure 2.9

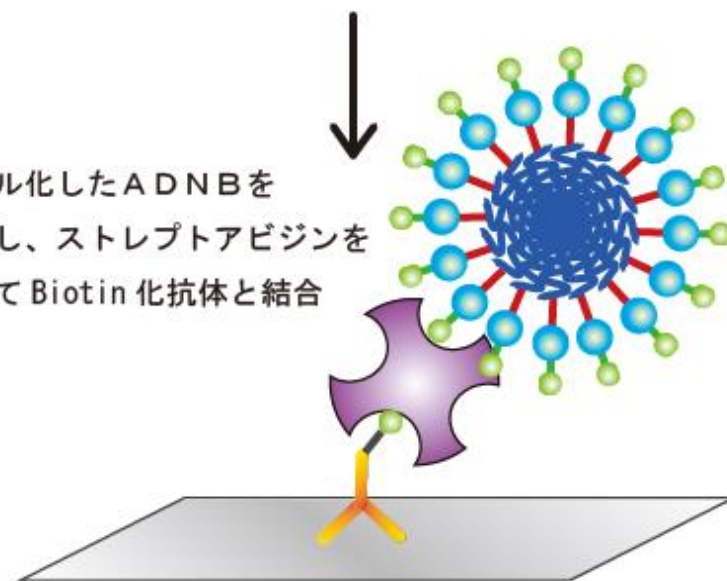
各濃度のストレプトアビジンにおける Nluc 発光値のグラフ

●は NB を、▲は ADNB ナノ粒子を検出プローブとして用いた測定結果

任意濃度の Biotin 化抗体を添加し、  
固相担体へ吸着



ミセル化した ADN B を  
添加し、ストレプトアビジン  
を介して Biotin 化抗体と結合



基質 (Furimazine) を  
添加し、発光を検出

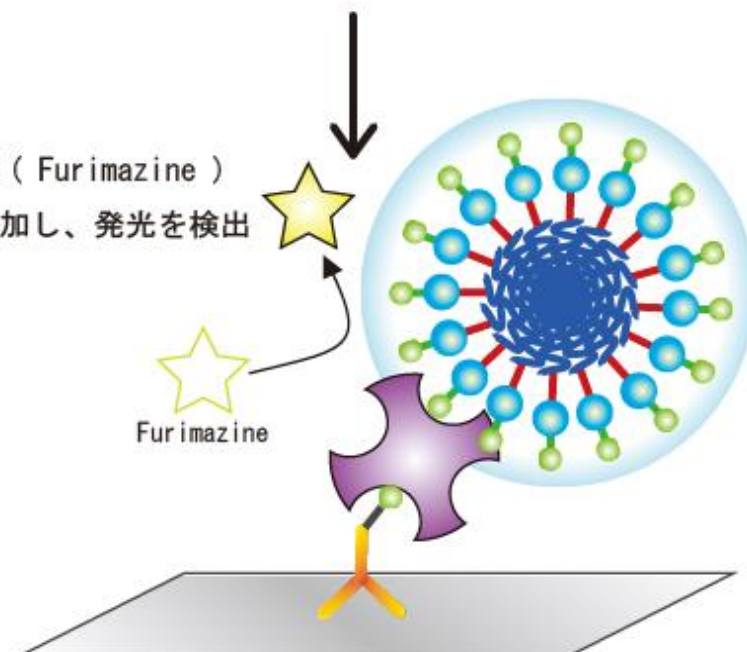


Figure 2.10

ナノ粒子を検出プローブとしたビオチン化抗体検出の概念図

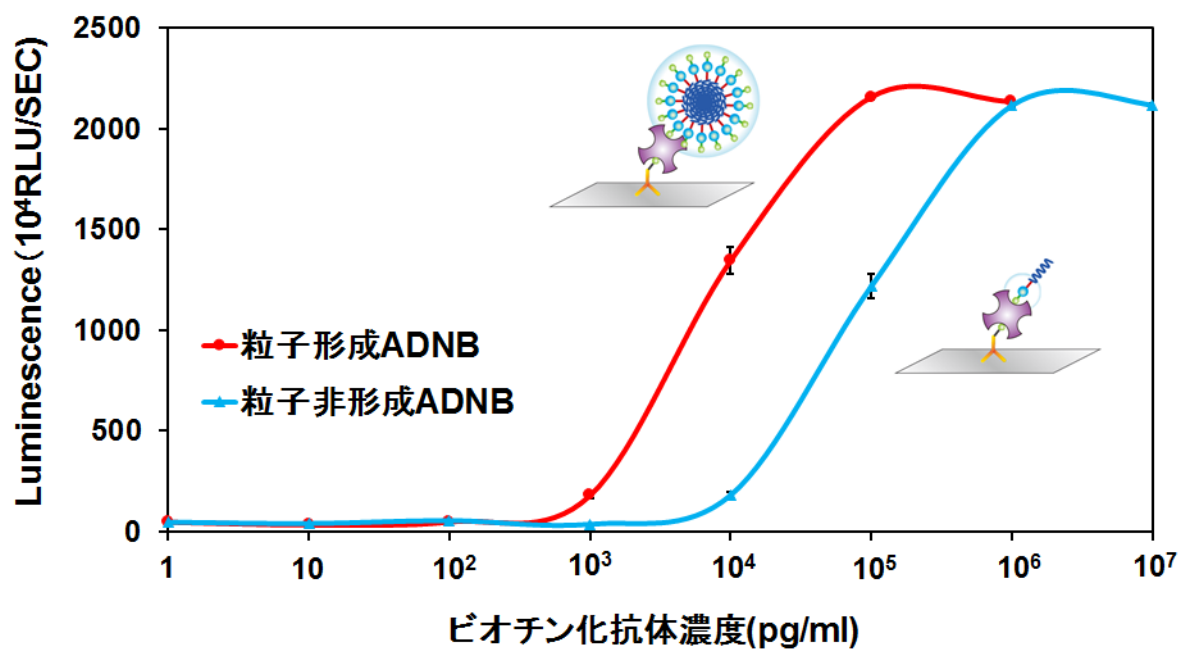


Figure 2.11

各濃度のバイオチン化抗体における Nluc 発光値のグラフ

●は ADNB ナノ粒子を、▲は ADNB のモノマーを検出プローブとして用いた  
測定結果

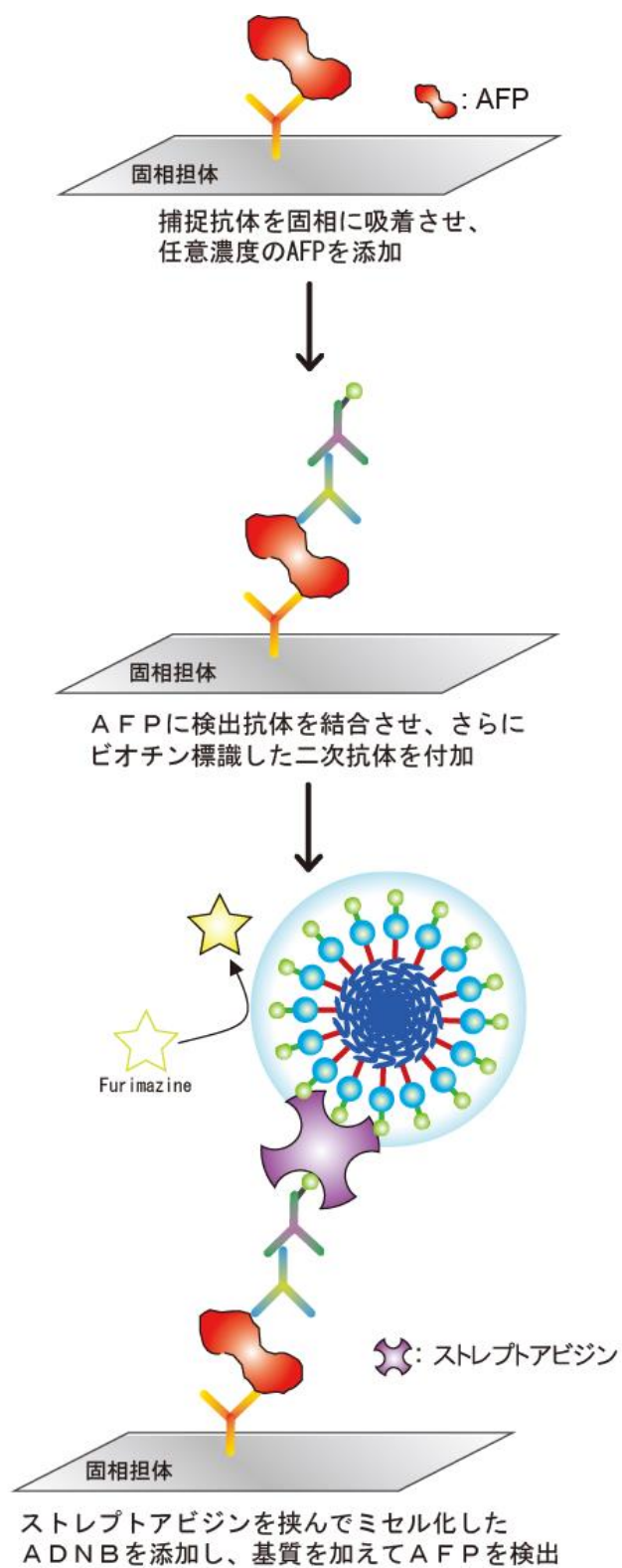


Figure 2.12

ナノ粒子を検出プローブとした ELISA による AFP 検出の概念図

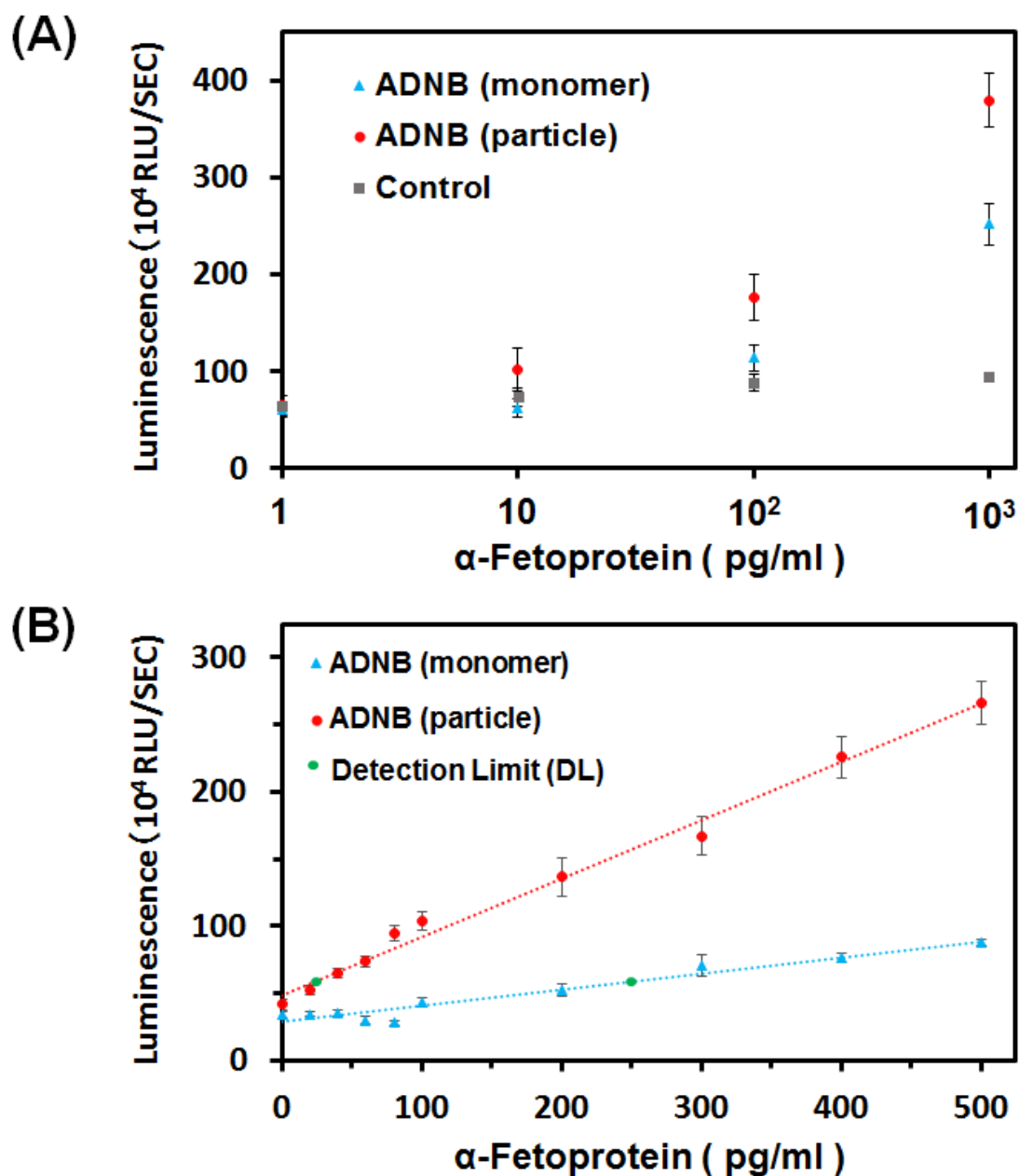


Figure 2.13

ELISA での各濃度の AFP における Nluc 発光値のグラフ

(A) AFP 1-10<sup>3</sup> pg/ml (B) AFP 1-5 × 10<sup>2</sup> pg/ml のエリア

- は AFP の代わりに HSA を添加したコントロール ● は ADNB ナノ粒子を、
- ▲ は ADNB のモノマーを検出プローブとして用いた測定結果
- は  $\alpha$ -Fetoprotein の検出限界の濃度を示す。

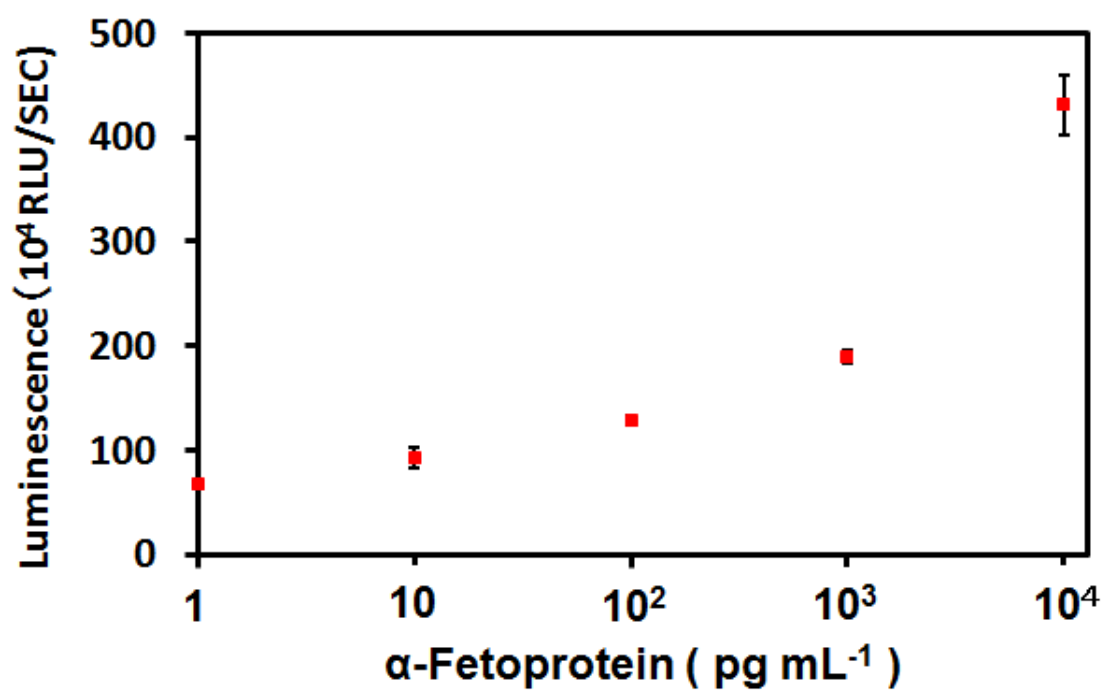


Figure 2.14

ADNB ナノ粒子を利用した ELISA でのヒト血清中の各濃度の AFP における Nluc 発光値のグラフ

## 第 3 章

# iRGD 融合タンパク質ナノ粒子の 作製とその特性評価

### 3.1 緒言

当研究室で作製した ELP の疎水性ドメイン(AVGVP)<sub>n</sub> とポリアスパラギン酸(Dm)の融合タンパク質は、加熱によりミセル状の粒子を形成する。このナノ粒子は、高い構造安定性、サイズ及び分子方向の制御能、薬剤内包能を有し、DDS キャリアとして高い素質を有する。この粒子を DDS キャリアとして応用するためには、特定の細胞への細胞標的能と細胞内輸送能を付加する必要がある。本章では、がん細胞で過剰発現している  $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンに対する細胞接着活性配列である RGD モチーフと、NRP1 を介した細胞内移行能を示す CendR モチーフの両方のドメインを持つ iRGD 配列をナノ粒子に付加することで、がん細胞への標的化と、がん細胞への内在化を試みる(Fig. 3.1)。

はじめに、作製した粒子化タンパク質(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Chis (AD) に iRGD を連結した融合タンパク質(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-iRGD-Chis (ADiR) の発現ベクターを遺伝子工学的に構築し、大腸菌 BLR (DE3)株に発現させた。次に精製した ADiR が温度に応答して構造変化することを濁度測定により評価した。また、ADiR の RGD 活性を細胞接着能測定により評価した。ADiR 粒子の粒子径、薬剤内包能を、動的光散乱法(DLS)、蛍光測定法により評価した。最後にがん細胞への細胞内移行能は、薬剤蛍光モデルである Coumarin-6 (C-6)の蛍光観察より評価した。以上より、作製したタンパク質が温度に応答してナノ粒子を形成し、表面に提示された iRGD によりがん細胞に特異的に結合し、細胞内部へ取り込まれることを示す。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬

プラスミド作製時に用いた制限酵素及びその他の酵素類はタカラバイオ株式会社より購入した。組み換えタンパク質発現のために使用したプラスミドは Stratagene 社、または Novagen 社より購入した。大腸菌 JM109 株、BLR(DE3) 株はそれぞれタカラバイオ(株)、Novagen®社より購入した。8-Anilino-1-naphthalene sulfonic acid (1.8-ANS) は和光純薬工業株式会社より購入した。Coumarin-6 (C-6) は関東化成工業株式会社より購入した。細胞培養培地 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) と penicillin/streptomycin は Sigma-Aldrich 社より購入した。Fetal bovine serum (FBS) は BioWest 社より購入した。その他の試薬等は特筆しない限り特級のものを使用した。

### 3.2.2 細胞株

ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞 (A549)、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) は Riken Bioresource Center より購入した。A549 細胞および HEK293 細胞は、10% FBS および 1% Penicillin/Streptomycin を添加した DMEM 中で、37°C で 5% CO<sub>2</sub> を含む加湿条件下で培養した。

### 3.2.3 プラスミド構築

プラスミドの設計には、すでに当研究室で作製されたプラスミド pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Oligo-Chis を用いた。*EcoR* I-*Spe* I-GGGS2-iRGD-*Hind* III-*Xho* I のアミノ酸配列がコードされた合成オリゴ(5'-aattcACTAGTGGCGGTGGATCTGGCGGTGGATCTTGCCGTGGAGATAAAGGACCGGATTGCAAGCTTc-3'、5'-tcgagAAGCTTGCAATCCGGTCCTTATCTCCACGGCAAGATCCACCGCCAGATCCACCGCCACTAGTg-3')をアニーリング

し、*EcoR* I と *Xho* I で処理した pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Oligo-Chis に挿入することで、pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-iRGD-Chis を作製した。得られた pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-iRGD-Chis のシーケンスを確認した。

### 3.2.4 融合タンパク質の発現、精製および定量

大腸菌内においてタンパク質を発現させるために、作製したプラスミド pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-iRGD-Chis で形質転換した大腸菌 BLR (DE3)株を、Kanamycin 20 µg/ml, Tetracycline 20 µg/mLを含むLB培地にて37°Cで振とう培養を行った。その後、O.D.<sub>660</sub>=0.6に達した時点で終濃度 1 mM の IPTG を加え、25°C、Overnight で培養を行い、タンパク質を発現させた。回収した大腸菌のペレットを 2.5×10<sup>-3</sup> unit/µl の Benzonase® Nuclease (Novagen)と、1 mg/ml となるように lysozyme を加えた PBS で懸濁し、超音波処理により破碎した。そして破碎された大腸菌ライセートを 17,000 g にて 15 分間の遠心を行い、上清を分取することにより可溶画分ライセートを得た。

可溶画分中に含まれる目的タンパク質は、ニッケルイオンを配位した His-Select Nickel Affinity Gel (Sigma)とヒスチジンタグとの配位結合を利用して精製を行った。レジンを充填したポリプレップエンブティカラム(BioRad)を PBS で平衡化し、そこに可溶画分を添加した。4°Cにおいて1時間ローテーションを行い、目的のタンパク質をレジんに吸着させた。フロースルーを除去し、非特異的に吸着したタンパク質を除去するために、レジンの3倍量の Wash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Buffer、0.3 M NaCl、pH 8.0)で2回洗浄を行った。さらにレジンの3倍量の 20 mM Imidazole を含む Wash buffer (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Buffer、0.3 M NaCl、pH 8.0)で5回洗浄を行った。その後、100 mM Imidazole を含む Elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Buffer、0.3 M NaCl、pH 8.0) をレジンと等量加え、4°Cで15分間インキュベートしたのち、目的タンパク質を溶出した。同様の手順でさらに3回、計4回溶出を行った。

精製したタンパク質は Slide-A-lyzer (Pierce)を用い、100 倍以上の PBS で 4°Cにおいて 1 時間以上の透析を 3 回行った。精製したタンパク質は、12%ポリアクリルアミドを用いた SDS-PAGE に展開したあと、CBB 染色液(ナカライテスク)に浸して染色し、目的タンパク質が得られたことを確認した。タンパク質濃度は BCA protein assay kit (Pierce)により決定した。精製したタンパク質は-80°Cで保存した。

### 3.2.5 ELP 融合 iRGD の環状形成評価

精製したタンパク質の iRGD 配列が安定な環状構造をとっているか否かを、還元時と非還元時のタンパク質の SDS-PAGE 展開と、マレイミド基付加による蛍光測定によって評価した。SDS-PAGE による環状化の確認では、還元処理の有無で ADiR の構造を比較するため、大腸菌内で形成されたジスルフィド結合を解消するために 2-メルカプトエタノール(2-Me)を加えたサンプルと、加えていないサンプルを用意し、12%ポリアクリルアミドを用いた SDS-PAGE に展開したあと、CBB 染色液(ナカライテスク)に浸して染色した。また、マレイミド基の蛍光標識による環状形成評価では、300  $\mu\text{g/ml}$  に調製した AD (26.8 kDa, SH 基数 0)、ADiR (27.4 kDa, SH 基数 2) タンパク質の PBS 溶液 100  $\mu\text{l}$  を 1.5 ml マイクロチューブに入れ、100 mM の DTT (Dithiothreitol) 溶液 10  $\mu\text{l}$  を加え、よく混合した。コントロールとして、DTT を加えないサンプルも用意し、酸化型グループとした。37°Cで 30 分間インキュベートした後、溶液全量を MWCO 10K フィルトレーションチューブに移し、10000 rpm で 15 分間遠心した。PBS 500  $\mu\text{l}$  をフィルトレーションチューブに加えて混合し、10000 rpm で 15 分間遠心し、濾液を除去した。これを 3 回繰り返すことで未反応の DTT を除去した。最後の遠心後、PBS 100  $\mu\text{l}$  をフィルトレーションチューブに加え、よく混合した。1.5 ml マイクロチューブに移し、20 mM Oregon green-Mal 溶液を 1.5 $\mu\text{l}$  加え、37°Cで 30 分間インキュベートした。その後、溶液全量を MWCO 10K フィルトレーションチューブに移し、10000 rpm で 15 分間遠心した。PBS 500  $\mu\text{l}$  を加えて混合し、10000 rpm

で 15 分間遠心し、濾液を除去した。これを 3 回繰り返すことで未反応の DTT マレイミドを除去した。PBS 100 $\mu$ l をフィルトレーションチューブに加えてよく混合し、1.5 ml マイクロチューブに移した。サンプルを 25  $\mu$ g/ml となるよう PBS で希釈し、FP-6500 spectrofluorometer で波長 494 nm の励起光を照射し、500 nm~600 nm における蛍光スペクトルを測定した。光増倍管の印加電圧は 290 V で行った。

### 3.2.6 ELP 融合 iRGD の RGD 活性評価

ELP に融合した iRGD のがん細胞への結合能を評価するために、ADiR 融合タンパク質の細胞接着能評価を行った。浮遊細胞培養用 96 well plate (BD Bioscience) に任意の濃度の AD、ADiR 融合タンパク質を 100  $\mu$ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートすることでタンパク質を固相表面にコーティングした。PBS で 1 回洗浄後、1%BSA を 200  $\mu$ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートすることでタンパク質のブロッキングを行った。PBS で 3 回洗浄した後、DMEM (1% Penicillin/Streptomycin 含有) 中で培養した A549 を  $4.0 \times 10^4$  cells/well の密度で添加し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、CCK-8 Cell Counting Kit (DOJINDO, Japan) を用いて細胞数測定を行った。

### 3.2.7 濁度測定による相転移評価

濁度は DU7500 分光光度計(Beckman)を用い、マルチセル温度コントローラで任意の温度で測定した。温度に対する濁度の変化は、温度変化速度を 1 $^{\circ}$ C/min とし、350 nm の透過光により測定を行った。温度は 20 $^{\circ}$ C から測定を開始し、50 $^{\circ}$ C まで達した後、再度 20 $^{\circ}$ C まで冷却した。相転移温度は最高濁度と最低濁度の中間点(Turbidity:50%)における温度と定義した。

### 3.2.8 動的光散乱法(DLS)による粒子径測定

試薬及びバッファーはすべて0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターにて、ダストを除去した。データは Nano-ZS (Malvern)を用いて、633 nm のレーザー光の 90°の方向の散乱を 10 秒間以上、複数回測定し、収集することで 1 セットとした。これを 5 セット行った。セルは “Size & Zeta” キャピラリーセル(DTS1060)もしくはポリスチレン製セル(DTS0012)(ともに Malvern)を使用した。セルの温度を変化させた場合、10 分間平衡化した。粒子径分布の散乱強度表示から体積表示への換算は Nano-ZS 付属のソフトウェアを用いた。

### 3.2.9 蛍光測定によるナノ粒子の薬剤内包能評価

ADiR 粒子内部への薬剤内包能評価は、疎水性部位へ結合する 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS)の蛍光測定により検討した。融合タンパク質 ADiR が 500  $\mu\text{g/ml}$ 、1,8-ANS が 100  $\mu\text{M}$  となるように PBS で調製し、25°C で 10 分間インキュベートした。その後、波長 370 nm の励起光を照射し、蛍光スペクトルを測定した。測定には FP-6500 spectrofluorometer (Jasco) を用いた。次に、42°C で 10 分間インキュベートし、同様に測定を行った。光増倍管の印加電圧は 290 V で行った。

### 3.2.10 ナノ粒子への薬物モデルの内包法の最適化

ADiR ナノ粒子への薬物モデルの内包法の最適化は、疎水性蛍光色素である coumarin-6 (C-6) を用いて行った。融合タンパク質 ADiR が 5  $\mu\text{M}$ 、C-6 が 50  $\mu\text{M}$  となるように PBS で調製し、混合液を作製した。超音波処理を行った後 42°C で 15 分間インキュベートし、色素を取り込んだナノ粒子を形成させた。タンパク質溶液を Slide-A-lyzer (Pierce)を用いて、100 倍以上の PBS で 37°C において overnight の透析を 1 回~3 回行い、未内包の C-6 を除去した。最後にフィルター滅菌(0.22  $\mu\text{m}$ )を行うことで C-6 内包 ADiR 粒子を調製し、蛍光

スペクトルを測定した。測定には FP-6500 spectrofluorometer (Jasco) を用いた。光増倍管の印加電圧は 290 V で行った。また濃度を振った単独の C-6 (超音波処理済み)の蛍光強度により検量線を作製し、ADiR ナノ粒子中の C-6 のモル濃度を推定した。

### 3.2.11 ADiR ナノ粒子の細胞内導入能評価

ADiR 粒子のがん細胞への取り込みは、疎水性蛍光色素である coumarin-6 (C-6)を内包して行った。コントロールとして、iRGD 配列を持たないナノ粒子 AD、iRGD 配列を有しているが RGD 配列を欠損させ、CendR 配列のみを有する ADiR-RGD(-)、iRGD 配列を有しているが CendR 配列を欠損させ、RGD 配列のみを有する ADiR-CendR(-)を用いた。ADiR-RGD(-)の iRGD ドメインは CRG<sup>2</sup>E<sup>2</sup>KGPDC、ADiR-CendR(-)の iRGD ドメインは CRGD<sup>2</sup>E<sup>2</sup>GPDC の配列を有しており、遺伝子工学的手法により作製し、ADiR と同様の発現精製法によって融合タンパク質を得た。

タンパク質溶液(5 μM)と C-6 (50 μM)を混合し、超音波処理を行った後 42°Cで 15 分間インキュベートし色素を取り込んだナノ粒子を形成させた。タンパク質溶液を Slide-A-lyzer (Pierce)を用いて、100 倍以上の PBS で 37°Cにおいてオーバーナイトの透析を 3 回行い、未内包の C-6 を除去し、タンパク質濃度を BCA protein assay kit (Pierce)により決定することで C-6 内包 ADiR 粒子を調製した。

DMEM (1% Penicillin/Streptomycin、10% FBS 含有)中で培養した A549 もしくは HEK293 細胞を、細胞培養用 35 mm dish plates (BD Bioscience)に 1.0×10<sup>4</sup> cells /well の密度で播種し、37°Cで一晩培養した。その後無血清培地に培地交換してさらに一晩培養した、調製した C-6 内包ナノ粒子をタンパク濃度が 6 nM となるように添加した。任意の時間経過後に、PBS で 1 回洗浄後、共焦点顕微鏡もしくは蛍光顕微鏡を用いて観察した。

### 3.3 実験結果及び考察

#### 3.3.1 タンパク質の発現、精製および定量

本研究で用いたプラスミドは、全て T7 プロモーター下流に構造遺伝子を有し、pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Chis は N 末端側から温度に应答して凝集体を形成する配列(AVGVP)の 42 回繰り返り、凝集体のサイズを制御するためのアスパラギン酸(D<sub>44</sub>)、精製用 tag である His tag が付加されるように設計されている。pET28b-(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-iRGD-Chis は、がん細胞への標的能と細胞内移行能を付加するためにポリアスパラギン酸の末端に iRGD を融合した(Fig. 3.2(A))。C 末端に iRGD を融合することで、ナノ粒子表面に iRGD が提示され、 $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンを過剰発現しているがん細胞に対する標的能と、NRP-1 を介した細胞内移行能が付加されることを期待した。これら pET28b-(AVGVP)<sub>44</sub>-D<sub>42</sub>-Chis を用いて発現させたタンパク質を AD、pET28b-(AVGVP)<sub>44</sub>-D<sub>42</sub>-iRGD-Chis を用いて発現させたタンパク質を ADiR 名付けた。

本章で作製したプラスミドで形質転換した BLR(DE3)株を用いてタンパク質を発現誘導したところ、いずれも可溶性のタンパク質として発現した。発現したタンパク質はすべて、可溶画分から His-Select Nickel Affinity Gel を用いて単離精製を行った。精製後、透析を行い PBS 中に溶解した目的タンパク質を最終生成物とし、いずれのタンパク質においてもほぼ単一のバンドとして確認できた (Fig. 3.2(B))。得られたバンドがアミノ酸配列から予測される分子量 (AD:26.7 k, ADiR: 27.4 k)より大きいのは ELP の特性に起因するものと考えられる[141]。

#### 3.3.2 ELP 融合 iRGD の環状形成評価

通常、分子内に偶数個のチオール基が存在する場合、分子内ジスルフィド結合が優先的に形成するとされている。ADiR ナノ粒子の iRGD 部位が 2 つのシステイン(Cys)のチオール

基同士のジスルフィド結合によって環状構造を形成しているか否かを確認するため、タンパク質還元時と非還元時における SDS-PAGE と蛍光測定によって評価した。iRGD 配列のシステイン残基の状態として、分子間のシステイン残基同士のジスルフィド結合、分子内のシステイン残基同士のジスルフィド結合(環状形成)、非結合状態の3つの可能性がある。まず SDS-PAGE により、分子間のシステイン残基同士のジスルフィド結合による多量体形成が引き起っていないことを確認した。還元時と非還元時における SDS-PAGE 展開の結果が Fig. 3.3(A)である。図のように還元処理の有無で、タンパク質のバンドのシフトはなく、分子間ジスルフィド結合による凝集は見られなかった。このことから、ADiR のチオール基同士での分子間結合による二量体以上の形成は起こっていないと考えられる。よって、分子間結合の可能性は消され、分子内結合によって iRGD が環状構造を取っている、もしくはフリーの状態の2択に絞られた。

さらに分子内ジスルフィド結合による環状形成を明らかにするため、蛍光試薬である Oregon Green® 488 Maleimide を標識して蛍光測定をおこなった。Oregon Green-Mal は、マレイミド基がチオール基 (-SH) の求核攻撃を受けて結合を形成するため、SH 基を有した化合物に Oregon Green を標識することができる。そこでこの性質を利用して、iRGD 部位の環状形成を評価した。ADiR の iRGD 部位が環状構造を形成している(酸化型)と仮定すれば、2つのシステインのチオール基はジスルフィド基となり、Oregon Green-Mal が標識されず、蛍光を発さないと考えられる。コントロールとして、iRGD 部位を欠いた AD、還元剤(ジスルフィド結合を切断し、チオール基へ戻す)である DTT を加えた ADiR に対しても同様の実験を行った(Fig. 3.3(B))。その結果、還元型 ADiR のサンプルは、Oregon Green の蛍光スペクトル 520nm 付近において強い蛍光が見られた。それに対して酸化型 ADiR は 520nm 付近において、コントロールである AD と同様の結果となった。この結果は、ADiR は分子内のジスルフィド結合によって、フリーなチオール基を有していないため、Oregon green-Mal が結合できなかつた一方で、DTT によって強制的にジスルフィド結合を開裂す

ることで、Oregon green-Mal が結合し、蛍光を発したことを示唆している。コントロールと酸化型 ADiR で見られるわずかな蛍光が観測されたのは、フィルター濾過の際に融合タンパク質に結合していないフリーな Oregon green-Mal が完全に除去できていなかったためだと考えられる。よって今回作製した ADiR は、狙い通り iRGD ドメインにおいて、分子間チオール基のジスルフィド結合によって環状構造を形成していることが明らかとなった。

### 3.3.3 ELP 融合 iRGD の RGD 活性評価

ADiR のインテグリン結合能を A549 の細胞接着測定を行うことで評価した。ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞である A549 は、細胞表面に  $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンを過剰発現していることが明らかにされている[144]。固相化した ADiR が、がん細胞の  $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンに結合することで、A549 がプレートに接着し、その接着細胞数は固相化した ADiR の濃度に依存することが予想される。

各濃度のタンパク質溶液でコーティングした細胞培養プレートに、無血清培地で培養した A549 を添加して 2 時間インキュベートし、洗浄後の細胞数を測定した(Fig. 3.4(A))。AD を添加したサンプルでは細胞が全く接着しておらず、AD の濃度に依存した細胞接着数の増加も見られなかった。それに対し ADiR を添加したウェルでは、ADiR の濃度に依存して細胞数が増加していることが示された。よって、ADiR はがん細胞に対する接着能を有することが示唆された。続いて、この接着が iRGD に由来する RGD 配列と  $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンの特異的な相互作用であることを市販の RGD ペプチドを利用して検証した。A549 の添加前に任意の濃度の RGD ペプチドによって細胞表面の  $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンをブロッキングすることで、細胞の接着阻害が起きるか否かを調べた(Fig. 3.4(B))。その結果、RGD ペプチドの濃度依存的に細胞の接着阻害が起り、細胞数が減少していることが確認された。これは、細胞表面の  $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンの機能阻害により、細胞が固相化した ADiR に結合できなく

なったためだと考えられる。以上の結果から、ADiR は自身の RGD 配列による、 $\alpha$ V $\beta$ 3 イнтеグリンへの結合能を有していることが明らかとなった。

### 3.3.4 温度変化による粒子形成評価

精製した ADiR が温度に応答して集合状態を取るか否かを検討するために、連続的に温度を変化させながら濁度を測定した。タンパク質溶液はそれぞれ 500  $\mu$ g/ml になるように調整した。その結果が Fig. 3.5(A)である。昇温過程においては、ADiR も AD と同様に特定の温度を境に濁度が上昇していることが明らかになった。よって ADiR は温度応答性を有するといえる。相転移温度はそれぞれ AD が 34.6 $^{\circ}$ C、ADiR が 38.2 $^{\circ}$ Cであり、どちらも生体温度付近であった。一方、降温過程では ADiR と AD はともに濁度がほとんど下がっておらず、温度変化に伴う構造変化が不可逆的であることが示された。これにより ADiR は (AVGVP) $_n$  の構造安定性を保持していることが示された。

次に ADiR が実際にサイズ制御された粒子を形成するか否かを、動的光散乱法(DLS)を用いて測定した。PBS 中に 500  $\mu$ g/ml となるようにタンパク質溶液を調整し、20 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ Cの順で温度を変化させながら粒子径の測定を行った。その結果が Fig. 3.5(B)である。Fig. 3.5(B) より、AD と ADiR は温度に応答して粒子径のピークが移動した。まず始めの 20 $^{\circ}$ Cではどちらも 10~15 nm 前後の粒子径を示した。次に 37 $^{\circ}$ Cに加熱すると 30 nm 前後にピークがシフトした。つまり ADiR は (AVGVP) $_n$  の性質通り温度に応答して凝集し、粒子化していること、またアスパラギン酸の静電反発力を利用することで凝集の際限ない成長を抑制していることが明らかになった。最後に再度冷却して 20 $^{\circ}$ Cにしたところ、粒子径は 37 $^{\circ}$ Cのときのものとほぼ一致した。37 $^{\circ}$ Cにおける ADiR の粒子径は AD とほぼ同じことから、アスパラギン酸による粒子径制御において iRGD の存在はほとんど影響しないことが示された。これらの結果から ADiR で構成された粒子は当初の設計通り、加熱により粒子を形成し、一度粒子を形成すると冷却後も解離せず、粒子径を保ったままであることが示さ

れた。その結果は Fig. 3.5(A)の濁度測定の結果とも一致する。

### 3.3.5 薬剤内包能評価

3.3.4 の結果から、ADiR は(AVGVP)<sub>n</sub> の性質よりある一定の温度以上で凝集し、アスパラギン酸の静電反発力を利用することでサイズ制御された粒子を形成することが明らかになった。この結果は、ADiR 粒子が疎水性のコアを保持したミセル状の粒子であることを示唆している。そこで本項では、ナノ粒子に 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS) を取り込ませ、ナノ粒子が周囲の疎水性分子を内包可能かどうか検討した。

1,8-ANS は疎水性ポケットや脂質の疎水性部位へ蓄積し、蛍光を発する。ELP にも結合し、加熱による集合に伴い蛍光を発することが知られている[145]。そこで、この性質を利用して各温度における蛍光強度を測定し、薬剤内包能を評価した。その結果が Fig. 3.6 である。1,8-ANS を含む PBS 中で AD と ADiR を粒子化させたところ、著しい蛍光の増大が観察され、さらに ADiR 粒子は AD 粒子の約 2 倍の蛍光強度を示した。これは加熱により (AVGVP)<sub>n</sub> が疎水性コアを形成した結果と考えられる。一方、BSA は温度に関わらず蛍光値がほぼ一定であり、PBS はほとんど蛍光を発していない。このことから、蛍光強度の増加は粒子化によるものであると考えられ、AD と ADiR は粒子化の際、ポリアスパラギン酸部位が外側を向き負電荷の層を、(AVGVP)<sub>n</sub> 部位が内側を向き疎水性環境を形成していることが示唆された。また疎水性化合物とともに加熱することで粒子化の際それらを取り込み、粒子内に内包可能であることが示された。また ADiR は、iRGD の付加により AD 粒子の約 2 倍の薬剤内包能を有することが明らかとなった。

### 3.3.6 ナノ粒子への薬物モデルの内包法の最適化

3.3.5 の結果から ADiR ナノ粒子は疎水性化合物とともに加熱することで粒子化の際それらを取り込み、粒子内に内包可能であることが示されたが、内包されないまま溶液中に残っ

た化合物も存在する。DDS キャリアとして薬物を内包する際は、そのようなフリーな薬物が適切な DDS を経ずに副作用を引き起こすリスクがあるため、透析等によって除去する必要がある。そこで疎水性の蛍光薬物モデルである蛍光色素 Coumarin-6 (MW : 350.4,  $\lambda_{\max}$  : 444nm,  $\lambda_{\text{em}}$  : 503 nm) をナノ粒子へ内包し、フリーな色素を除去できる透析時間を検証した。まず、濃度既知の Coumarin-6 (C-6) を用意し、蛍光測定により検量線を作製した (Fig.3.7(A))。その結果、C-6 の濃度依存的に蛍光強度が増加し、ナノ粒子中の C-6 の定量に必要な検量線を得ることができた。続いて、混合サンプルの加熱により調製した蛍光内包ナノ粒子に対して任意の回数の透析を行い、粒子に内包された C-6 の濃度の推定と、未反応の C-6 の除去された量を Fig.3.7(A) の検量線をもとに測定した (Fig.3.7(B))。その結果、フリーな C-6 のみを透析したサンプルの測定値がナノ粒子溶液中に残存した未反応の C-6 の量であると推定すると、オーバーナイトの透析の回数を重ねるごとにフリーな C-6 が除去され、3 回行うことでほとんど除去されていることが確認された。また、その時点でのナノ粒子中の C-6 の濃度は 15 $\mu\text{M}$ 、タンパク質濃度は 2.9 $\mu\text{M}$  であった。この結果から、最適な内包法は未反応な C-6 を完全に除去できるオーバーナイトの透析 3 回であり、その内包量はナノ粒子自身のモル濃度のおよそ 5 倍のモル濃度であることが示唆された。

### 3.3.7 iRGD 融合タンパク質ナノ粒子の細胞導入能評価

これまでの結果より、ADiR は AD と同様に温度に応答して疎水性のコアを有する粒子を形成し、同時に薬剤をコア内部に封入できることが示された。ADiR 粒子はポリアスパラギン酸部位が外側を向き、表面に iRGD が提示されているため  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  インテグリンへの過剰発現細胞に対する細胞標的能を有すると考えられる。またインテグリンへの結合後は、プロテアーゼ (Matriptase や Furin) による塩基性配列切断を受け、末端に RXXK 配列 (CendR) が露出し、がん細胞において過剰発現している NRP-1 に結合することで速やかに細胞内に移行すると考えられる。そのため ADiR 粒子は  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  インテグリンと結合後、細胞内に取り

込まれ、内包物を放出すると考えられる。これを確かめるために、ADiR 粒子内に疎水性薬物モデルである C-6 を内包させ、 $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンを過剰発現する A549 細胞に添加し細胞の挙動を観察した。まず、培養した A549 細胞に対して蛍光色素 C-6 を内包した ADiR ナノ粒子を添加し、時間経過ごとの蛍光の分布を共焦点顕微鏡により観察した(Fig. 3.8)。その結果、15 分後では C-6 の蛍光は見られず ADiR ナノ粒子はほとんどが細胞外に分布していると考えられる。しかし 30 分が経過すると、蛍光が見え始め、一部のナノ粒子が iRGD ペプチドの機能により細胞内部へ移行し始めているのが確認できる。60 分後には蛍光が強く見られ、多くのナノ粒子が内部移行しているのが分かる。これ以降インキュベーション時間を延長しても、蛍光強度の増大は見られなかった。この結果より、ADiR ナノ粒子はおおよそ 1 時間でがん細胞への結合し、細胞内部に移行することが示唆された。

この結果をもとに、蛍光内包ナノ粒子添加後のインキュベーション時間を 1 時間とし、コントロールとの蛍光の比較によって ADiR ナノ粒子に付加されたがん細胞内部移行能を確かめた(Fig. 3.9)。その結果、ADiR 粒子を添加した細胞において細胞内で C-6 の蛍光が確認された。一方でコントロールである AD 粒子を添加した細胞では C-6 の蛍光が観察できず、AD 粒子が細胞に取り込まれていないことが明らかになった。これは今回作製したタンパク質粒子が表面にマイナスの電荷を帯びており細胞表面への非特異吸着とそれに続くエンドサイトーシスによる細胞内への取り込みがほとんどなかったためだと考えられる。また、ADiR の RGD 配列を欠損した ADiR-RGD(-)ナノ粒子、CendR 配列を欠損した ADiR-CendR(-)ナノ粒子を添加した細胞では、蛍光は見られるものの ADiR ナノ粒子ほどの蛍光強度ではなかった。ADiR-RGD(-)は NRP-1 経路を介して、ADiR-CendR(-)はインテグリンを介したエンドサイトーシスにより細胞内にある程度移行するものの、ADiR ナノ粒子はこれら 2 つの機能の相乗効果により、効率的に薬剤をがん細胞内部へ送達できることが示唆された。

また、体内における抗がん剤の非がん細胞への非特異的な送達は、想定外の副作用を引き

起こす可能性があるため、避けることが望ましい。非がん細胞へ薬物送達されないことを確かめるために、細胞表面における  $\alpha V\beta 3$  インテグリンと NRP1 の発現量が少ないヒト胎児腎細胞(HEK293)を用いて同様の実験を行った(Fig. 3.10)。その結果、ADiR ナノ粒子を添加した細胞は AD ナノ粒子や C-6 を直接添加した細胞と同様に、内部移行に起因する蛍光が全く観察されなかった。これは、ADiR ナノ粒子の iRGD 配列が  $\alpha V\beta 3$  インテグリンと NRP1 を過剰発現しているがん細胞を選択的に標的していることを示唆している。

以上の結果から、ADiR ナノ粒子は iRGD 配列の 2 つの機能の相乗効果により、非がん細胞には影響を与えずに効率的に薬剤をがん細胞内部へ送達できることが示された。

### 3.4 結言

本章では、ELP ナノ粒子の DDS キャリアへの応用を目的として、ELP の疎水性ドメイン(AVGVP)<sub>n</sub> とポリアスパラギン酸(Dm)の融合タンパク質で構築されたタンパク質ナノ粒子に、機能性ペプチドを用いてがん細胞への標的能と細胞内移行能を付加することを目的とした。そのために(AVGVP)<sub>42</sub>D<sub>44</sub>Chis の D<sub>44</sub> 末端に iRGD を融合した(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-iRGD-Chis を作製し、その構造や物性、細胞標的能、細胞内移行能を評価した。

まず、温度を連続的に変化させながら濁度を測定し、アスパラギン酸の付加により濁度の上昇を抑えられていることを明らかにした。つまりポリアスパラギン酸の存在が、凝集の際限ない成長を抑制していることが示唆された。次に、DLS による粒子径の計測により、AD、ADiR とともに生体内温度 37°Cにおいて粒子を形成すること、並びにその粒子は 20°Cに冷却後も大半が解離されず粒子径を保っていることを示した。また、その粒子径は 30 nm 前後であることを明らかにした。この結果から、アスパラギン酸による粒子径制御において融合した iRGD はほとんど影響せず、ADiR は AD と同様に加熱によりサイズ制御された粒子を形成することが明らかになった。次に DDS キャリアとして重要項目である薬剤内包能、および細胞標的能について、ADiR 粒子の特性を評価した。ADiR が形成するナノ粒子は疎水性蛍光物質 1,8-ANS を粒子内部に取り込み、蛍光値を著しく増加させた。このことから(AVGVP)<sub>n</sub> が凝集することで、疎水性のコアを保持したミセル状の粒子を形成することが明らかになった。最後に ADiR で構築されたナノ粒子が、がん細胞への細胞内移行能を保持しているかを評価した。ADiR に蛍光薬物モデルを内包させ、細胞に添加したところ、インテグリンへの結合と NRP1 による細胞内移行によりナノ粒子ごと細胞内へ取り込まれることが明らかになった。また非がん細胞に対しては、非特異的な細胞内移行を行わないことが明らかとなった。

以上の結果から、構築したタンパク質ナノ粒子 ADiR は、 $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリン過剰発現細

胞に対する標的能と NRP-1 を介した細胞内移行能を有し、DDS キャリアとして高い素質を有することが明らかとなった。

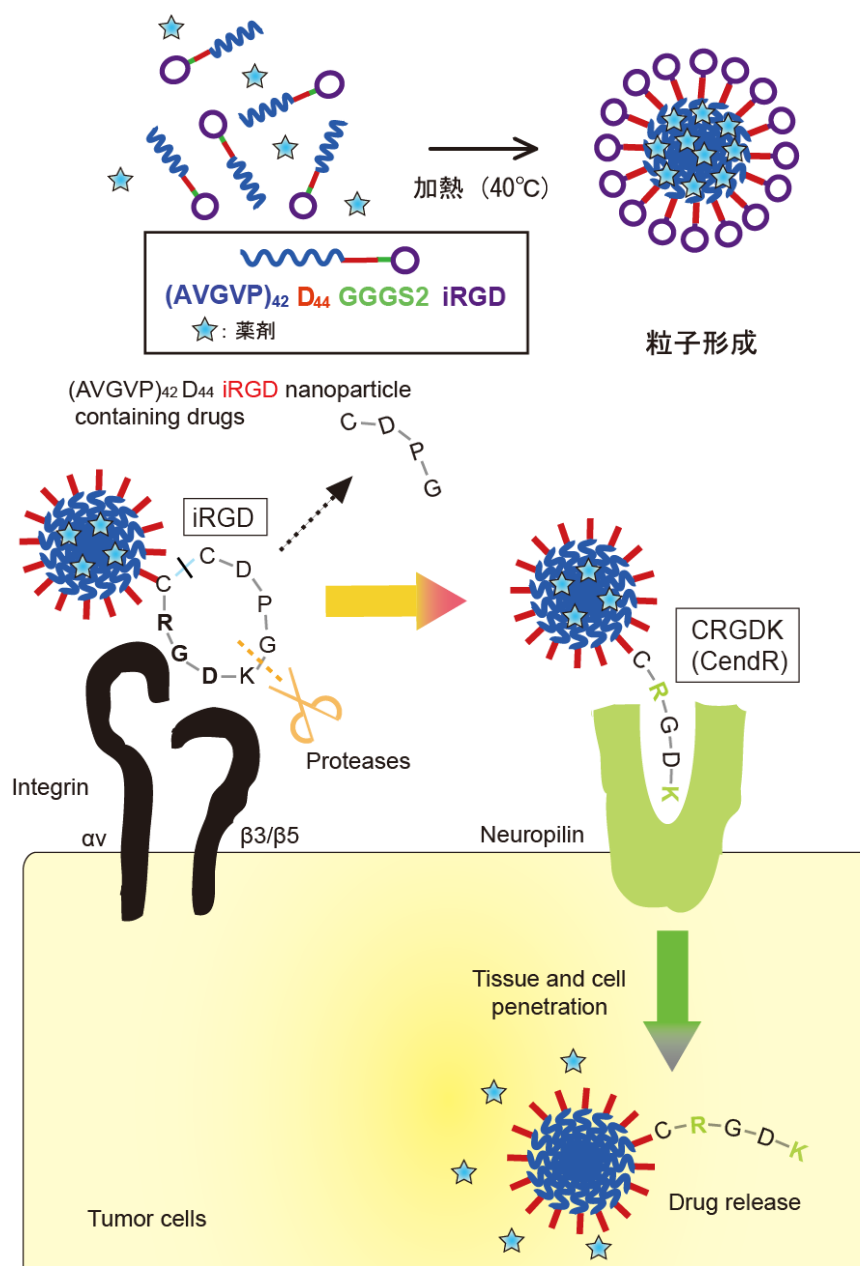


Figure. 3.1

作製した融合タンパク質による薬物内包と、がん細胞への標的と細胞内導入の概念図。疎水性薬剤との混合溶液の加熱により、ADiR は疎水性コアに薬剤を封入したナノミセルを形成する。表層に提示された iRGD モチーフの機能により、薬剤をがん細胞表面に特異的に送達し、細胞内部へと移行させることができる

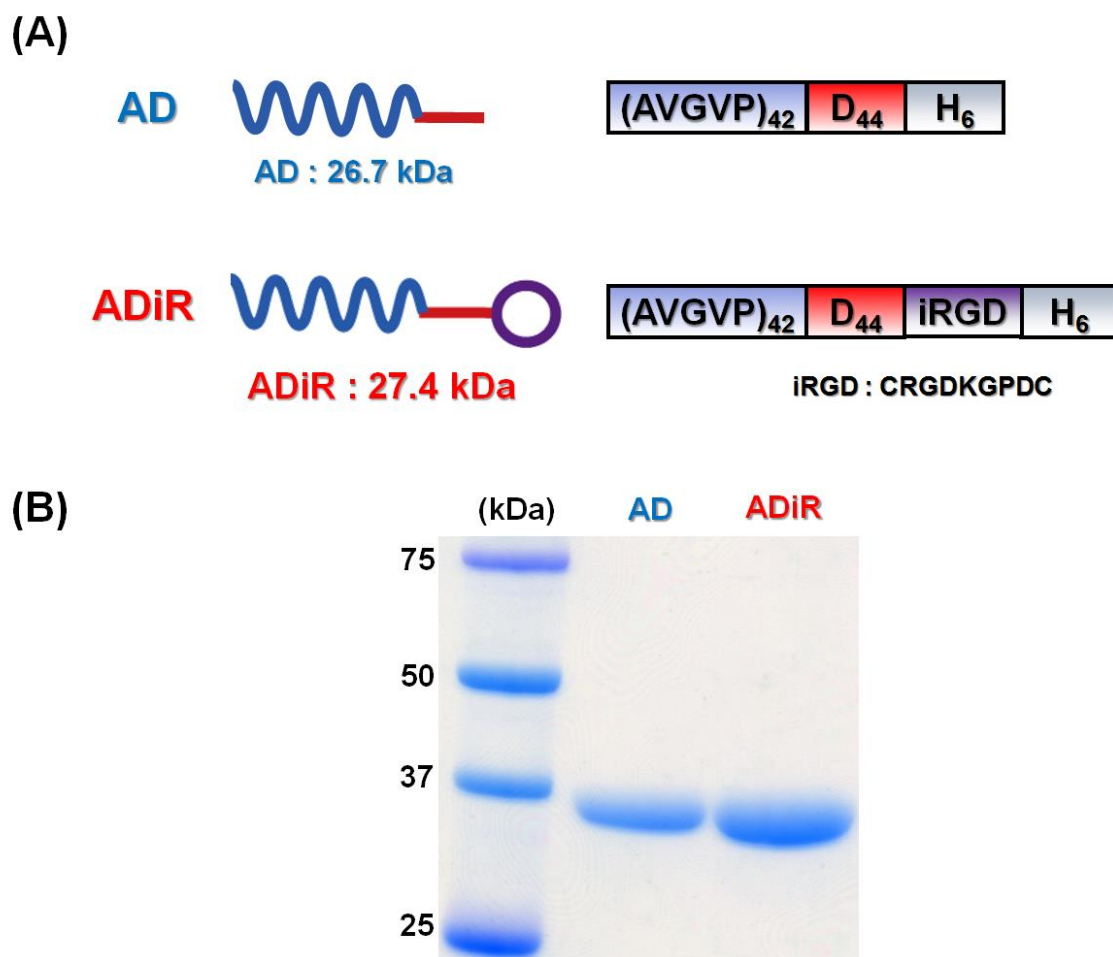


Figure. 3.2

(A)構築したタンパク質

(B)AD, ADiR の精製後サンプルの SDS-PAGE (AD:26.7 kDa, ADiR: 27.4 kDa)

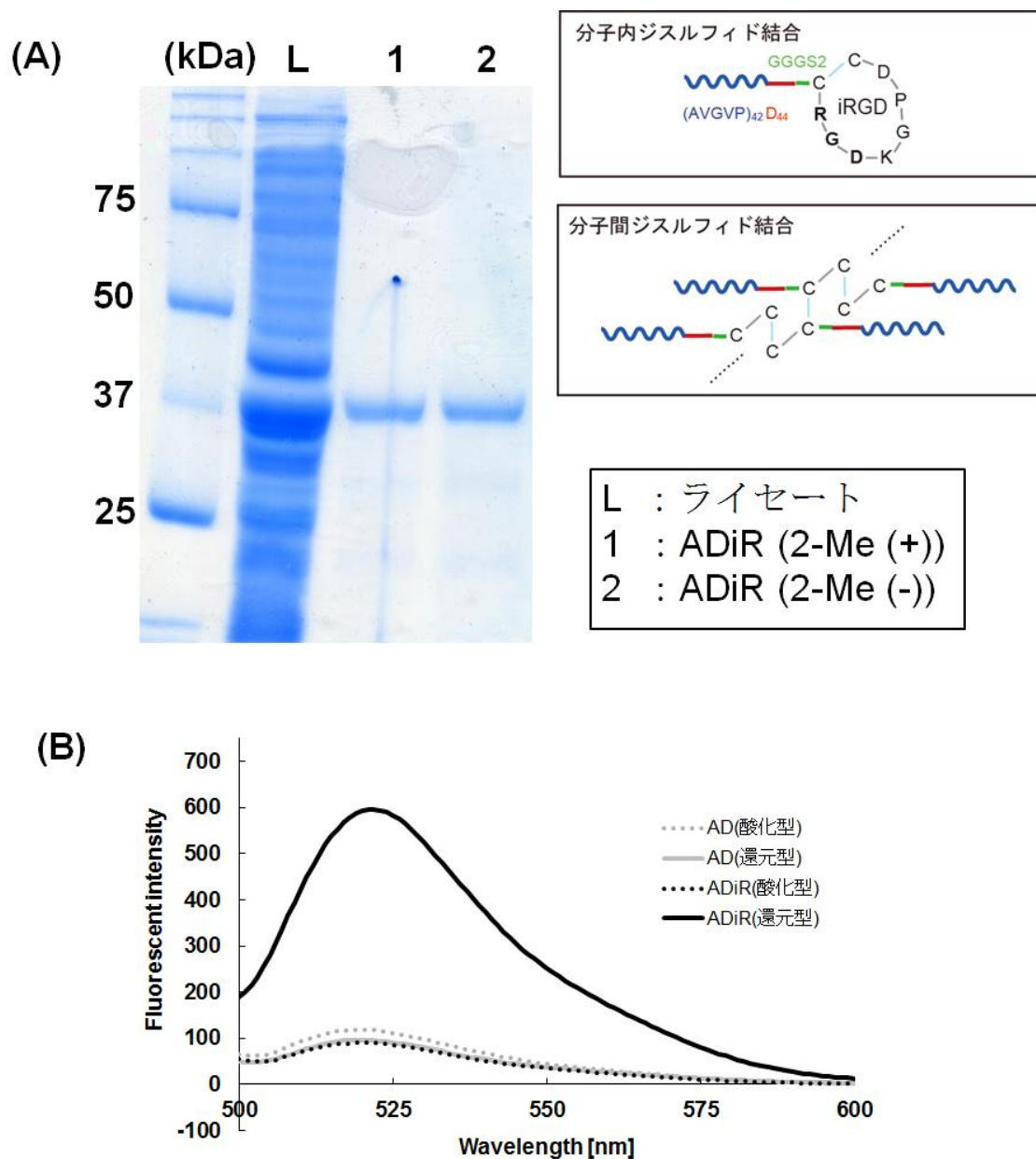


Figure. 3.3

(A) 還元状態の違いによる SDS-PAGE での分子量変化

(B) 蛍光標識マレイミドの修飾評価。実線は還元状態、点線は酸化状態における

融合タンパク質の蛍光強度を示す

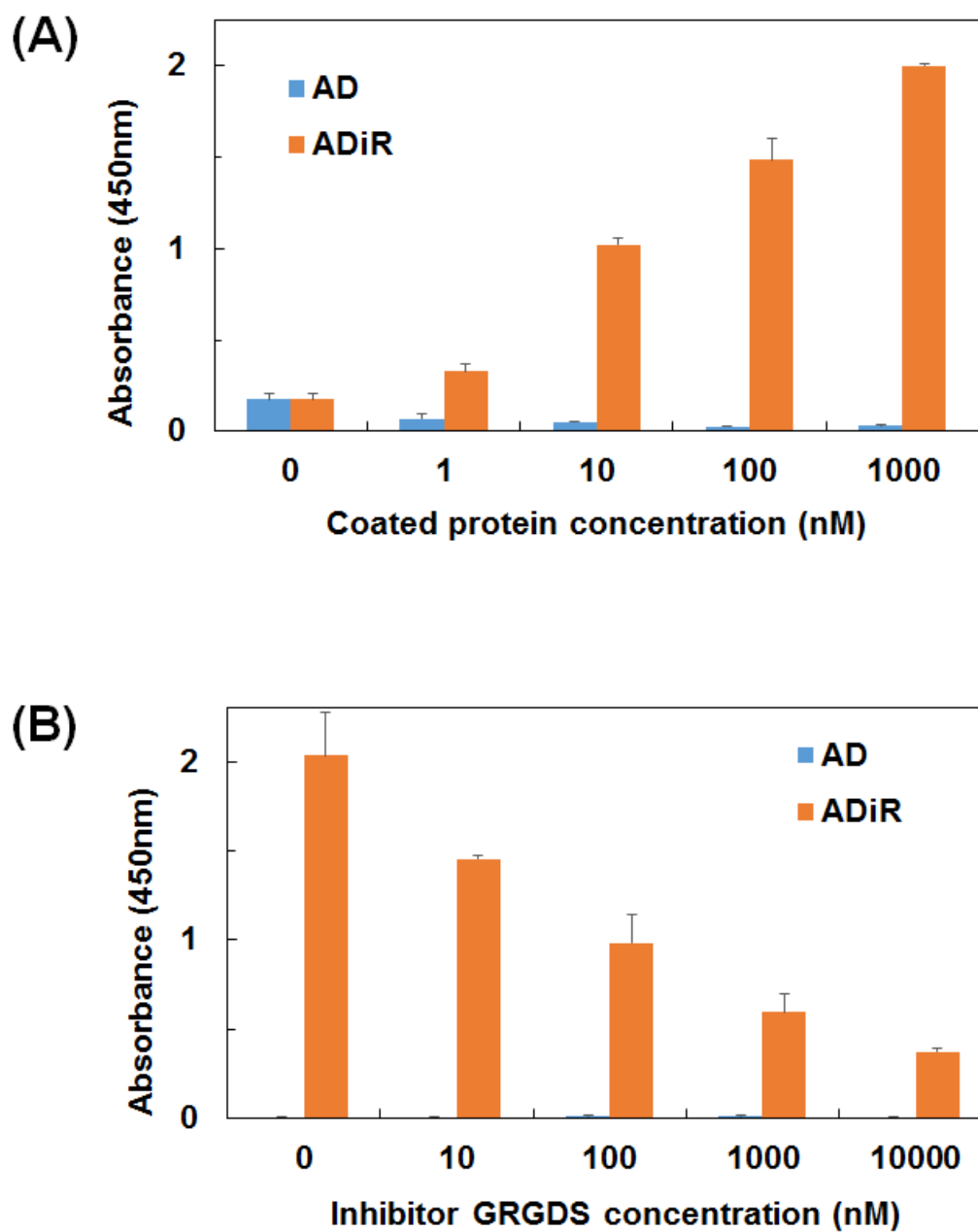


Figure. 3.4

(A) ELP 融合 iRGD によるインテグリン接着能評価

(B) RGD ペプチドインヒビターを利用したインテグリン接着阻害評価

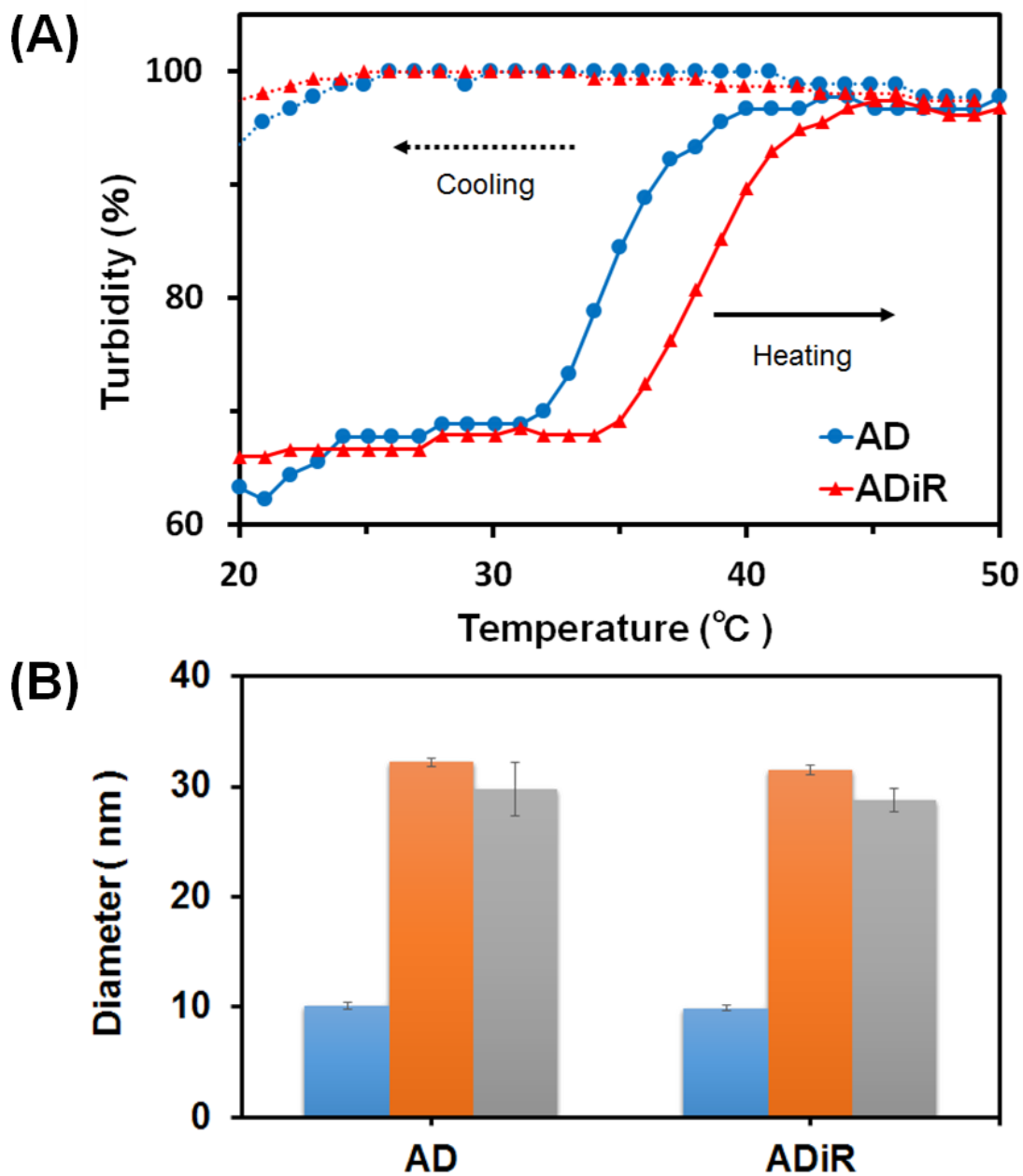


Figure. 3.5

温度変化による粒子形成評価

(A) AD (●) と ADiR(▲)の温度に対する濁度変化

(B) DLS による各温度における粒子径測定。青は 20°C、赤は 37°C、

灰色は再冷却後の 20°Cを示す

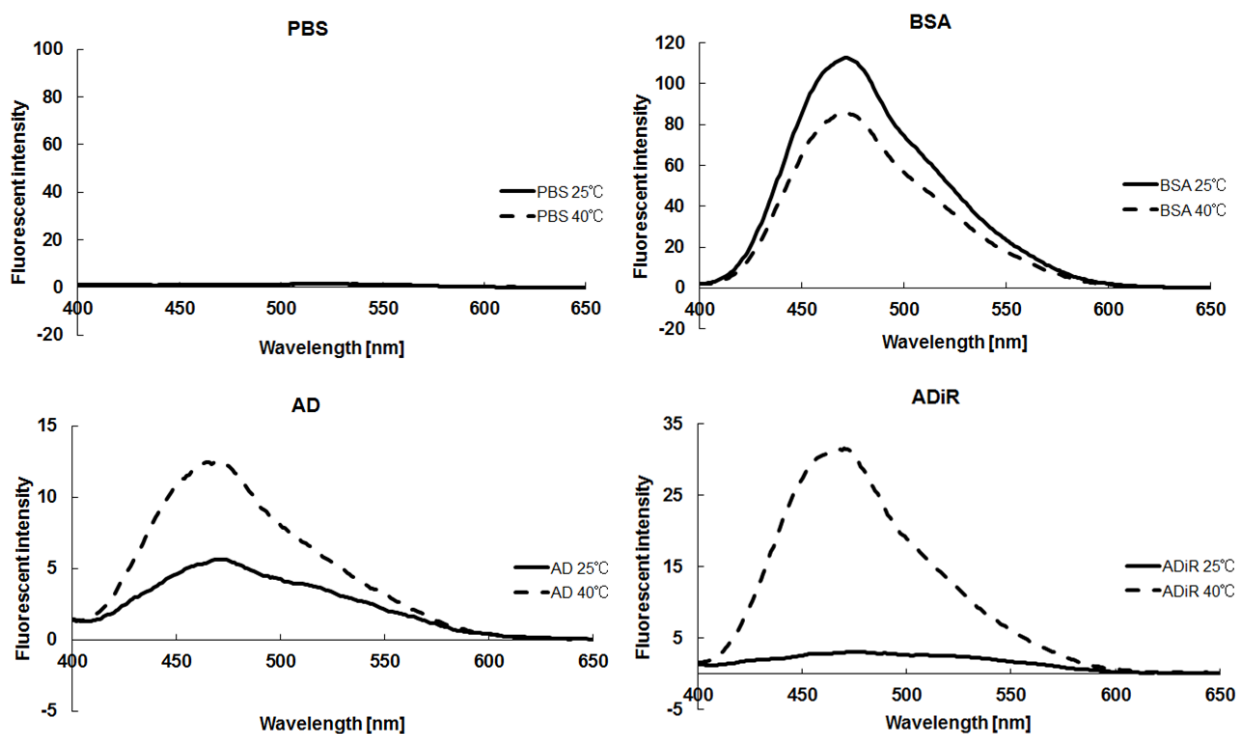


Figure. 3.6

25°Cおよび37°Cにおける 1,8-ANS の蛍光スペクトル変化

実線が 25°C、点線が 37°Cにおける測定結果を示す

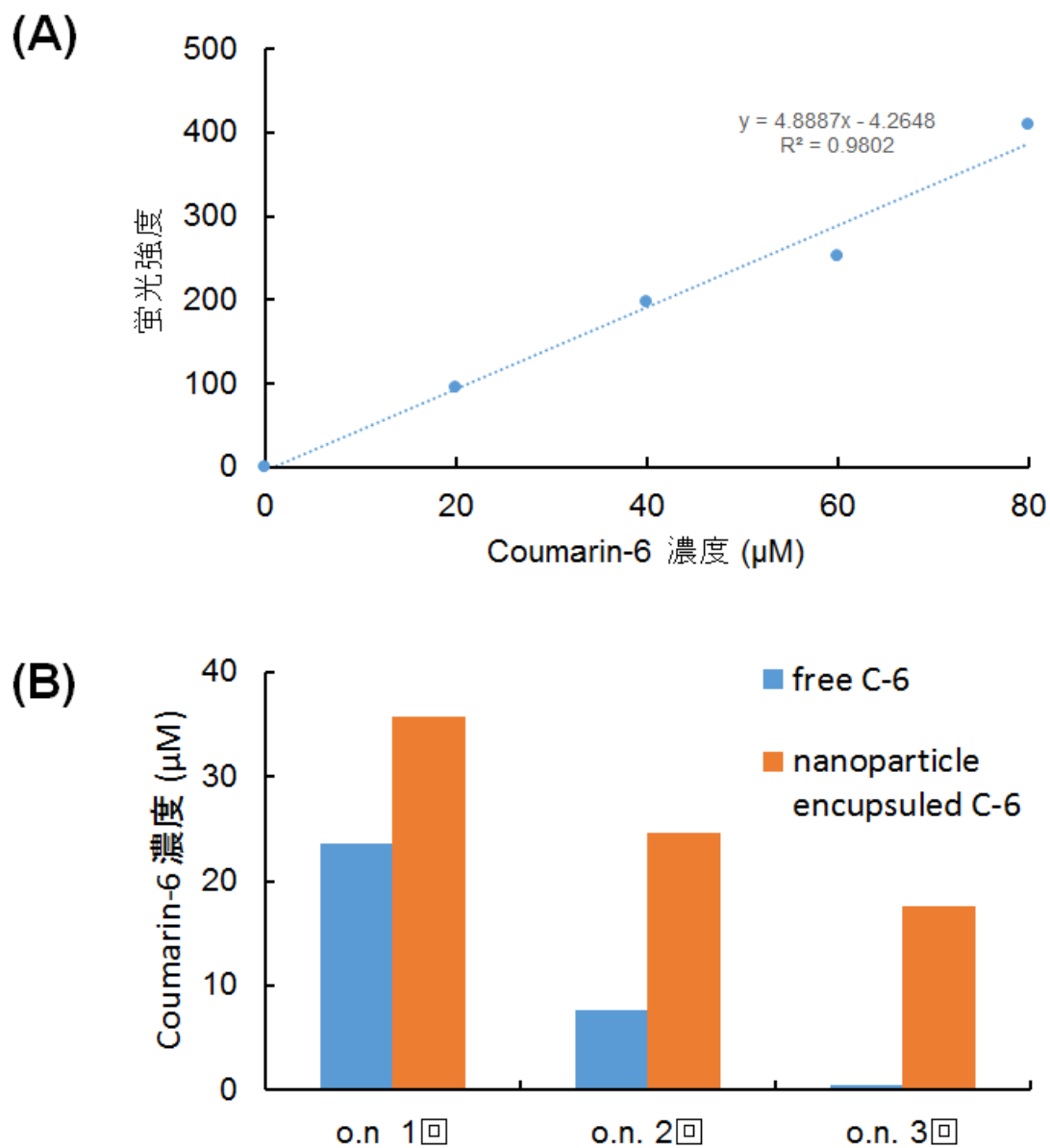


Figure. 3.7

(A) 疎水性薬物モデル C-6 の蛍光強度による検量線作成

(B) 検量線に基づいた、ナノ粒子の C-6 内包量推定評価

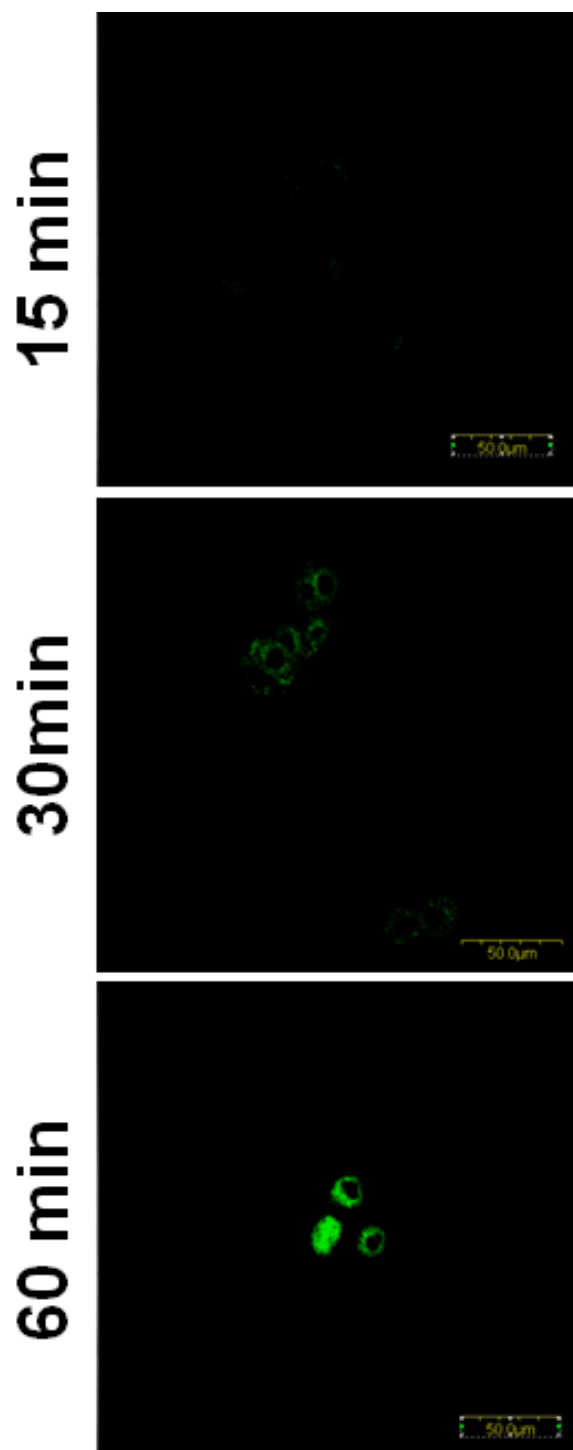


Figure 3.8

タイムスケール変化による ADiR ナノ粒子のがん細胞内への移行追跡評価

(スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ )

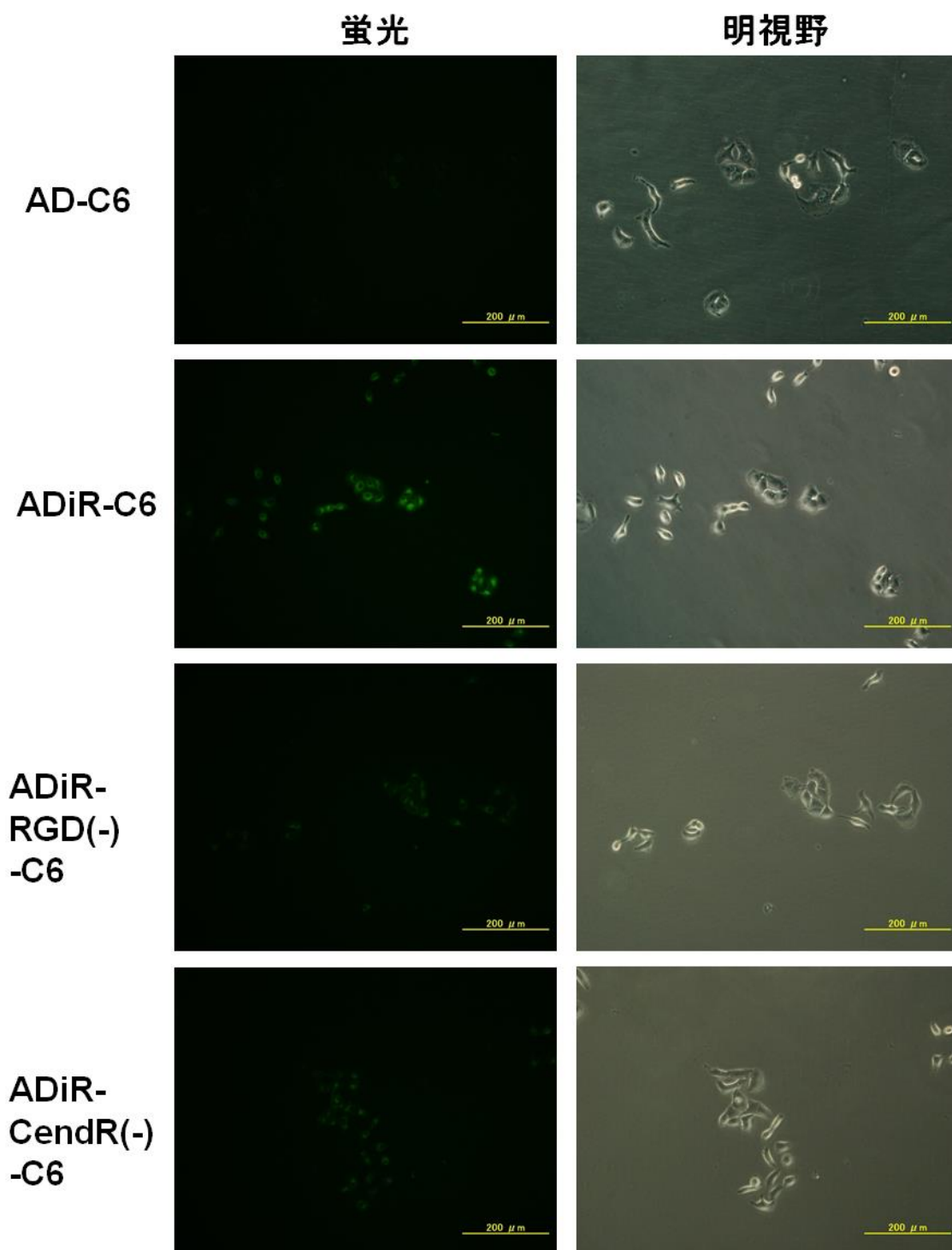


Figure 3.9

A549 細胞（がん細胞）における蛍光内包ナノ粒子の細胞内移行能評価

（スケールバー：200  $\mu\text{m}$ ）

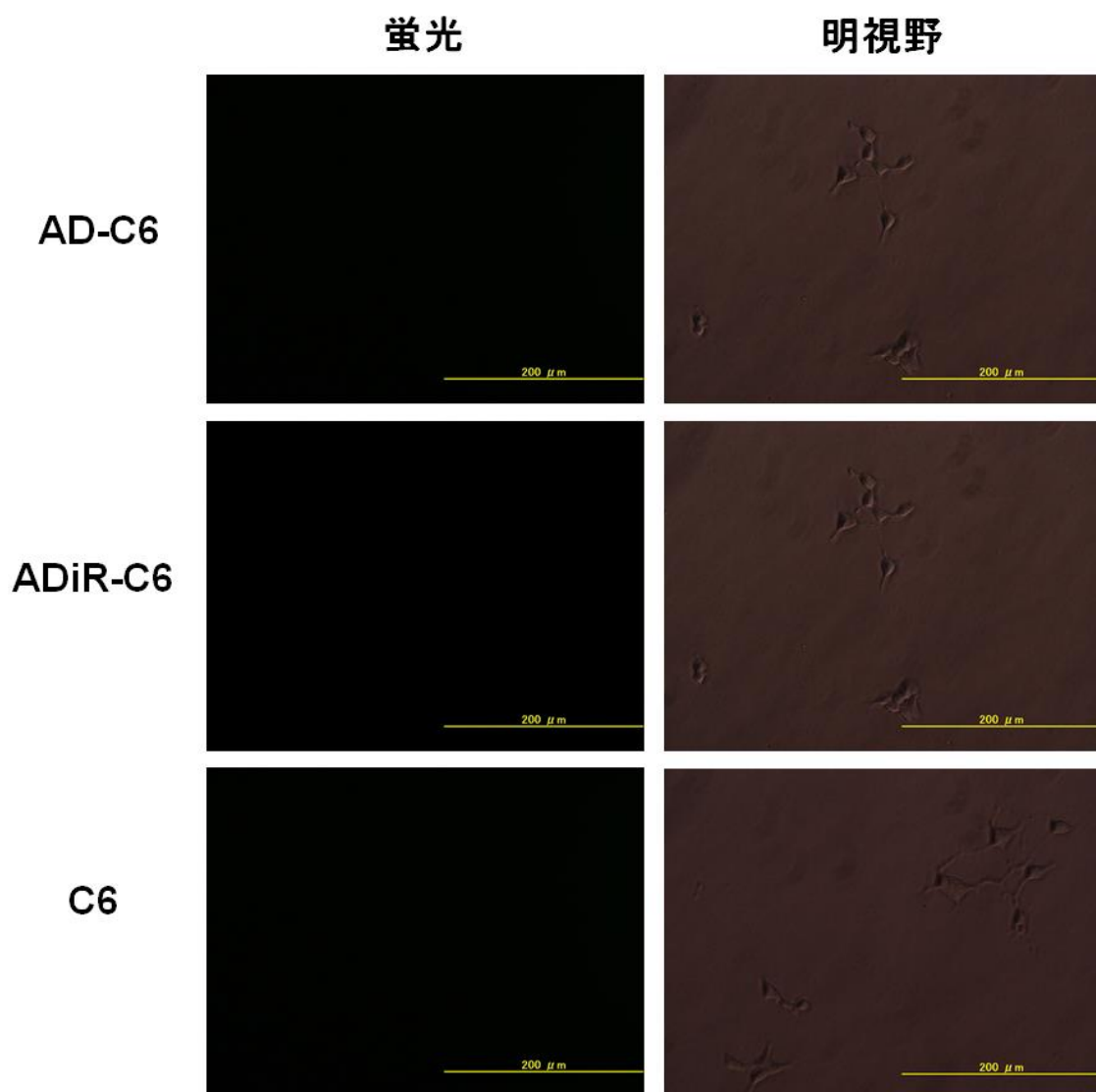


Figure 3.10

HEK293 細胞（非がん細胞）における蛍光内包ナノ粒子の細胞内移行能評価

（スケールバー：200  $\mu\text{m}$ ）

## 第 4 章

臨床応用に向けた  
iRGD 融合ナノ粒子の  
抗腫瘍効果と血中動態の評価

## 4.1 緒言

第 3 章では(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-Chis に iRGD 配列を融合することで、がん細胞標的能と細胞内移行能を有するタンパク質ナノ粒子を構築することに成功した。作製した(AVGVP)<sub>42</sub>-D<sub>44</sub>-iRGD-Chis は、自らが持つ RGD 配列を介して  $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンを過剰発現するがん細胞に特異的に結合することを示した。また温度に応答して 30 nm 程度のナノ粒子を形成し、同時に疎水性薬剤を疎水性コアに内包可能であることを示した。そして薬剤内包ナノ粒子はがん細胞の  $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンへの結合後、NRP-1 を介した細胞内移行能によって疎水性分子を内包したまま細胞内へ取り込まれることが明らかになった。

本章では第 3 章で作製した iRGD 融合タンパク質ナノ粒子を、DDS キャリアとして臨床において利用可能であるか調べた。抗がん剤治療への臨床応用を想定した場合、抗がん剤内包 ADiR ナノ粒子は静脈注射によって、がん患者に投与される。ナノサイズに制御された粒子は、正常な血管内皮細胞は透過せず、マクロファージ等免疫細胞による捕食も回避し、やがて腫瘍血管付近に到達する。その後 iRGD によりがん血管内皮細胞の表面に結合し、細胞内移行により、がん細胞の内部、そして深部にまで移行する。その際の薬剤放出により優れた抗腫瘍効果を示すことが期待できる(Fig.4.1)。このような生体内での応用を想定し、第 4 章においては血清中でのナノ粒子の機能発現、抗がん剤を内包したナノ粒子による細胞死誘導、マウス体内におけるナノ粒子の動態を評価した。

はじめに、血清中における細胞内移行能を、C-6 を内包したナノ粒子を用いて評価した。続いて、がん細胞への抗腫瘍効果を、抗がん剤内包ナノ粒子を添加した細胞の染色及び生細胞数の定量により評価した。また、マウス血中における滞留性を、近赤外光蛍光内包ナノ粒子の *in vivo* イメージングにより評価した。最後に生体内における腫瘍への集積性を担癌マウスへの静脈内投与により評価した。以上より、作製した高機能化タンパク質ナノ粒子が、がん細胞を標的とした DDS キャリアとして、臨床へと応用可能であることを示す。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 試薬

細胞培養培地 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) と penicillin/streptomycin は Sigma-Aldrich 社より購入した。Fetal bovine serum (FBS) は BioWest 社より購入した。Coumarin-6 (C-6) は関東化成工業株式会社より購入した。Paclitaxel は Adipogen Life Sciences 社より購入した。DY-635 は Dyomics GmbH 社より購入した。その他の試薬等は特筆しない限り特級のものを使用した。

### 4.2.2 細胞株および動物

ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞 (A549)、ヒト胎児腎細胞 (HEK293)、ヒトアストロサイトーマ細胞株 (U87MG) は Riken Bioresource Center より購入したものを使用した。A549 細胞、HEK293 細胞、U87MG 細胞は、10% FBS および 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した DMEM 中で、37°C で 5% CO<sub>2</sub> を含む加湿条件下で培養した。BALB / c nude マウス (雌、4 週齢) は日本チャールス・リバー株式会社より購入された個体を使用した。マウスは 12 時間ごとに明転と暗転を繰り返す、25°C に制御された部屋に保管し、餌と水は自由に与えた。すべての動物実験は、東京工業大学動物実験委員会の承認を得て、東京工業大学が定める実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従って実施した。

### 4.2.3 血清中でのナノ粒子の機能発現評価

血清中における ADiR 粒子のがん細胞内への移行能評価は、疎水性蛍光色素である Coumarin-6 (C-6) を内包して行った。タンパク質溶液 (5 μM) と C-6 (50 μM) を混合し、超音波処理を行った後 42°C で 15 分間インキュベートし色素を取り込んだナノ粒子を形成させた。タンパク質溶液を Slide-A-lyzer (Pierce) を用いて、100 倍以上の PBS で 37°C におい

てオーバーナイトの透析を 3 回行い、未内包の C-6 を除去し、タンパク質濃度を BCA protein assay kit (Pierce) により決定することで C-6 内包 ADiR 粒子を調製した。

DMEM (1% Penicillin/Streptomycin、10% FBS 含有) 中で培養した A549 細胞を、細胞培養用 35 mm dish plates (BD Bioscience) に  $1.0 \times 10^4$  cells /well の密度で播種し、37°C で一晩培養した。その後 DMEM (1% Penicillin/Streptomycin、10% FBS 含有) で培地交換してさらに一晩培養した、調製した C-6 内包ナノ粒子をタンパク質濃度が 6 nM、もしくは 60 nM となるように DMEM (50% FBS 含有) で希釈し、100  $\mu$ l 添加した。1 時間経過後に、PBS で 1 回洗浄後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### 4.2.4 抗がん剤内包粒子の細胞死誘導評価

抗がん剤を内包した ADiR 粒子による抗腫瘍効果は、疎水性抗がん剤である paclitaxel (PTX) を内包して評価した。コントロールとして、iRGD 配列を持たないナノ粒子 AD、iRGD 配列を有しているが RGD 配列を欠損させ、CendR 配列のみを有する ADiR-RGD(-)、iRGD 配列を有しているが CendR 配列を欠損させ、RGD 配列のみを有する ADiR-CendR(-) を用いた。

タンパク質溶液 (3  $\mu$ M) と Paclitaxel (30  $\mu$ M) を混合し、超音波処理を行った後 42°C で 15 分間インキュベートし色素を取り込んだナノ粒子を形成させた。タンパク質溶液を Slide-A-lyzer (Pierce) を用いて、100 倍以上の PBS で 37°C においてオーバーナイトの透析を 3 回行い、未内包の PTX を除去し、タンパク質濃度を BCA protein assay kit (Pierce) により決定することで PTX 内包 ADiR 粒子を調製した。

DMEM (1% Penicillin/Streptomycin、10% FBS 含有) 中で培養した A549 もしくは HEK293 細胞を、細胞培養用 35 mm dish plates (BD Bioscience) に  $1.0 \times 10^4$  cells /well の密度で播種し、37°C で一晩培養した。その後無血清培地に培地交換してさらに一晩培養した後、調製した PTX 内包ナノ粒子を任意の濃度で添加した。培養 1 日目と 3 日目において

CCK-8 溶液を含んだ培地に交換し 1 時間インキュベーター内で呈色反応を行った。その後マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度により生細胞数を測定した。生細胞数の定量においては、PBS のみを加えたサンプルの吸光度を 100%として各サンプルの生存率を算出した。Calcein-AM と propidium iodide(PI)による細胞染色では、細胞の播種数のみ  $5.0 \times 10^4$  cells /well に変更し、3 日後に細胞染色することによって生死判定を行った。

#### 4.2.5 ナノ粒子への近赤外蛍光色素の内包法の最適化

ADiR ナノ粒子への近赤外蛍光色素の内包法の最適化は、疎水性近赤外蛍光色素である DY-635 を用いて行った。融合タンパク質 ADiR が 3  $\mu$ M、DY-635 が 30  $\mu$ M となるように PBS で調製し、混合液を作製した。超音波処理を行った後 42°C で 15 分間インキュベートし、色素を取り込んだナノ粒子を形成させた。タンパク質溶液を Slide-A-lyzer (Pierce) を用いて、100 倍以上の PBS で 37°C において 2 時間の透析を 1 回～4 回行い、未内包の C-6 を除去した。最後にフィルター滅菌(0.22  $\mu$ m)を行うことで DY-635 内包 ADiR 粒子を調製し、蛍光強度を測定した(蛍光波長 : 671 nm, 励起波長 : 647 nm)。測定には FP-6500 spectrofluorometer (Jasco) を用いた。光増倍管の印加電圧は 310 V、レスポンスは 0.5 秒で行った。また濃度を振った単独の DY-635 (超音波処理済み)の蛍光強度により検量線を作製し、ADiR ナノ粒子中の DY-635 のモル濃度を推定した。

#### 4.2.6 マウス血中における蛍光内包ナノ粒子の滞留性評価

蛍光標識ナノ粒子のマウス血中における滞留性は、IVIS Imaging System (Xenogen, Alameda, CA) によって評価した。IVIS の CCD カメラを -90°C に冷却し、高感度で撮影可能な状態にした。生後約 6 カ月の BALB/c nude マウスに、過剰量の酸素を混合した麻酔薬イソフルランを吸入させ、行動を静止した。その後の 5  $\mu$ M の DY-635 標識ナノ粒子 100  $\mu$ l をマウスの尾部から静脈注射した。また、PBS のみを静脈注射したサンプルをコントロー

ルとした。麻酔状態から覚醒した時点でのタイムポイントを 0 min とし、15 min、30 min、60 min において、再度イソフルランで麻酔した後、マウスの血中に滞留している DY-635 標識したナノ粒子の蛍光を IVIS (励起波長 : 640, 蛍光波長 : 670nm に設定) によって蛍光イメージングした。イメージングは、マウスの背中側(Fig. 4.7)と、腹側(Fig. 4.8)の二方向から撮影した。また、サンプル注射前のマウスも同様に IVIS で蛍光イメージングした。

#### 4.2.7 担癌マウスへ静脈投与したナノ粒子の腫瘍内蓄積評価

担癌マウスにおける蛍光標識ナノ粒子の腫瘍部位への蓄積は、IVIS Imaging System (Xenogen, Alameda, CA) によって定性的に評価した。U87MG がん細胞は、10%FBS および 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した DMEM 中で、37°Cで 5%CO<sub>2</sub> を含む加湿条件下で培養し、80%コンフルエントに達した時点で細胞を採取した。マウスに麻酔薬イソフルランを吸入させ行動を静止し、 $5.0 \times 10^6$  cells/50 uL の U87MG 細胞を皮下注射した。腫瘍形成は、移植した部位の腫瘍の成長を観察することによって評価し、腫瘍サイズ(V)は、 $V(\text{mm}^3) = a(\text{mm}) \times b^2(\text{mm}) / 2$  (a: 腫瘍の長軸の長さ、b: 短軸の長さ) の式に従って、ノギスを用いて測定した。移植後 7 週間~9 週間後に腫瘍サイズが 200 mm<sup>3</sup> に達した時点で実験を開始した。マウスに麻酔薬イソフルランを吸入させ、行動を静止した。その後、10 μM の DY-635 標識ナノ粒子 200 μl をマウスの尾部から静脈注射した。また、PBS のみを静脈注射したサンプルをコントロールとした。ナノ粒子の投与後 6 時間後に、マウスを犠牲にした。腹部から胸部にかけて切開し、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、腫瘍を切除して取り出した。それぞれの臓器を PBS で洗浄し、蛍光の蓄積を IVIS でイメージングした。

## 4.3 実験結果及び考察

### 4.3.1 血清中でのナノ粒子の機能発現評価

血清中における ADiR ナノ粒子のがん細胞内移行能を、蛍光色素 C-6 を内包し血清中での蛍光を観察することで評価した。3.2.11 の実験においては、ナノ粒子添加時に無血清培地を利用していたが、*in vivo* における評価を行うにあたり、血中に投与する必要があるため、血清存在下でも安定してがん細胞ターゲティングが行えるか否かが重要である。血清中では一般的に DDS キャリアに対し、血清タンパク質が非特異的に吸着する傾向にあり、キャリアの崩壊や、ターゲティングの妨害をもたらす恐れがある。ナノ粒子の添加を 50 %血清培地中で行うことで血中環境を模倣し、粒子の血清中でのがん細胞に対する挙動を調べることで、*in vivo* に適用可能であるか確認した (Fig.4.2)。その結果、6 nM の ADiR ナノ粒子を添加した細胞では、わずかに細胞内において蛍光が観測できたが、前章の無血清での条件下 Fig. 3.9 と比較すると蛍光強度は低い結果となった。これは、血清タンパク質が iRGD 配列に非特異的に吸着し、一部のナノ粒子において機能が阻害されたことが原因であると考えられる。しかし、濃度を 10 倍高い 60 nM に設定すると、顕著な細胞内部での蛍光が観察された。対照的に、AD ナノ粒子を添加した細胞では、60 nM においても ADiR ナノ粒子ほどの強い蛍光は見られなかった。よって、iRGD モチーフが機能して、細胞内移行が促されていることが示された。以上の結果から、ADiR ナノ粒子は血清中において、一部の機能阻害もみられるが iRGD の機能を発揮し、薬剤を内包したままがん細胞内部へと移行できることが明らかとなった。

### 4.3.2 抗がん剤内包粒子による細胞死誘導評価

抗がん剤を内包した ADiR 粒子の薬剤効果を確認するために、CCK-8 による生細胞数定量と死細胞染色により、A549 の生存割合を評価した。

まず、細胞死に適切な抗がん剤の濃度を最適化するために、PTX の濃度が 0、250、500、750、1000 nM となるように AD、もしくは ADiR ナノ粒子を A549 へ添加し、3 日後に生細胞数を定量した(Fig.4.3(A))。また、ポジティブコントロールとして PTX のみ添加した細胞も用意した。その結果、PTX 内包 ADiR ナノ粒子を添加した細胞は PTX の濃度に依存して生細胞数が減少し、1000 nM の PTX においてポジティブコントロールと同程度の細胞死誘導効果を示した。よって、以降の実験における PTX の濃度を 1  $\mu$ M に設定した。また 1000 nM の PTX を内包したサンプルについて顕微鏡による形態観察を行った(Fig.4.3(B))。その結果、PTX 内包 ADiR ナノ粒子を添加したサンプルは、ポジティブコントロールと同様に A549 独自の形態を失った細胞が多く見られ、顕著な細胞死誘導が示された。

さらに死細胞のみを染色することで細胞死の判断を明確に行うため、PTX の濃度が 1  $\mu$ M となるようにナノ粒子を添加し (粒子濃度 200 nM)、3 日後に生細胞と死細胞を同時染色することで、抗がん剤による細胞死誘導効果を比較した (Fig.4.4(A))。ネガティブコントロールとして PBS のみを添加した細胞、ポジティブコントロールとして 1  $\mu$ M の PTX を溶解した PBS を添加した細胞も用意した。その結果、ネガティブコントロールでは、死細胞に起因する赤色の蛍光がほとんど見られなかったのに対し、PTX 内包 ADiR ナノ粒子を添加した細胞は、ポジティブコントロールと同等もしくはそれ以上の赤色蛍光が観察され、抗がん剤による細胞死誘導を確認することができた。PTX 内包 AD ナノ粒子を添加した細胞においても若干の細胞死が見られたが、内包した PTX の若干の漏出によるものだと考えられる。

さらに ADiR ナノ粒子が標的能と細胞内移行能の相乗効果により、細胞死誘導を促していることを確認するために、コントロールとして、ADiR の RGD 配列を欠損させた ADiR-RGD(-)、CendR 配列を欠損させた ADiR-CendR(-)ナノ粒子を用いて、PTX 添加後の生細胞数を定量し、抗がん剤による細胞死誘導を比較した(Fig.4.4(B))。3 日後の定量結果を見ると、PTX を内包した ADiR-RGD(-)と ADiR-CendR(-)ナノ粒子は、細胞死誘導に起因

する細胞数の減少が見られた。これは、ADiR-RGD(-)については NRP-1 を介した細胞内移行、ADiR-CendR(-)については、インテグリンへの結合とそれに続くエンドサイトーシスによる細胞内取り込みにより細胞内に抗がん剤が移行したと考えられる。しかしながら、RGD, CendR の両配列を欠損していない ADiR が最も顕著に細胞死誘導を招いていることから、RGD モチーフと CendR モチーフの両機能により、DDS に機能が増幅されていることが分かる。さらに、PTX を内包していない ADiR においては、3 日後においても細胞死誘導が全く見られず、ADiR の細胞内侵入による毒性は皆無であることも明らかとなった。また、3 日後の PTX 内包 AD ナノ粒子を添加した細胞において 50%程度の細胞死が確認された。これは、粒子に内包した PTX が若干漏出しており、このフリーな PTX が細胞死誘導を引き起こしたと考えられる。

最後に非がん細胞についても PTX を用い、同様に実験を行った。1  $\mu$ M の PTX を内包した 200 nM の AD、ADiR ナノ粒子の溶液を HEK293 細胞に添加した。同様にしてネガティブコントロールとして PBS のみを添加した細胞、ポジティブコントロールとして 1  $\mu$ M の PTX を溶解した PBS を添加した細胞も用意した。3 日後の細胞の形態を顕微鏡で観察した結果を Fig.4.5(A)に示す。PTX 内包 ADiR ナノ粒子を添加した細胞では、細胞死に起因する形態変化は見られず、PTX 無添加の細胞状態とほとんど変化がなかった。また、1 日目と 3 日目の生細胞数を CCK-8 によって測定した結果が Fig.4.5(B)である。PTX のみを添加したサンプルにおいては、3 日目に 20%程度の生細胞の減少が見られ、抗がん剤による細胞死が誘導されていると示唆される。それに対し、PTX 内包 ADiR を添加したサンプルでは、そのような細胞死は見られず、PTX 無添加のサンプルと同程度の細胞数を維持していた。これは、今回作製したタンパク質粒子の表面が負電荷であり、負に帯電した細胞表面への PTX を内包した ADiR の非特異吸着と細胞内への取り込みが抑制されたためだと考えられる。また PTX 内包 AD ナノ粒子を添加したサンプルでは、若干の生細胞数減少が観測された。これは、AD に内包された PTX が時間の経過とともに若干漏出し、細胞に作用したも

のであると考えられる。

以上の結果から、ADiR ナノ粒子はがん細胞表面のインテグリンを介して特異的に細胞内に取り込まれ、内包した抗がん剤を細胞内で放出することで A549 の細胞死を誘導することが明らかになった。

### 4.3.3 ナノ粒子への近赤外蛍光色素の内包法の最適化

マウスの体内におけるナノ粒子の分布をイメージングするために、近赤外蛍光色素の内包法を検討した。生体内の光の吸収スペクトルは、光の透過を妨げる主要な生体物質ヘモグロビン、オキシヘモグロビン、デオキシヘモグロビン、さらには水による光吸収があるが、近赤外光の波長域（600–900 nm）では、これらの物質は大きな吸収を持たない。よって生体内での蛍光イメージングには、近赤外領域の光を利用することで、生体組織への透過性を高め、生体試料自らが生ずる自家蛍光を最小限にとどめることができる。そこで、ADiR ナノ粒子をマウス血中での滞留性を蛍光イメージングによって観察するにあたり、近赤外領域に励起スペクトルをもつ疎水性蛍光色素 DY-635 を ADiR ナノ粒子に内包し、*in vivo* イメージングで利用できるか否かを確認した。DY-635 内包ナノ粒子は粒子形成後、3.2.10 に記した蛍光色素 C-6 を内包した手順と同様に透析法で行い調製した。まず、未内包の DY-635 を除去するプロセスを確立させるため、2 時間～8 時間のスケールで透析を行い、サンプルの蛍光強度を測定した(Fig.4.6(A))。DY-635 内包ナノ粒子と同時に、DY-635 のみのサンプルを同濃度で透析を行い、ナノ粒子に内包されなかった色素の残存量を推定した。その結果、透析 2、4、6、8 時間後における ADiR ナノ粒子に内包されなかった DY-635 の割合は、74、55、24、12%となり、時間依存的に減少していることが明らかとなった。8 時間透析によってある程度の未内包 DY-635 は除去できているので、この条件を最適な透析時間として設定した。

続いて、調整後の DY-635 内包 ADiR ナノ粒子のタンパク質モル濃度と、蛍光強度により

推定される DY-635 のモル濃度を同時に測定し、その比を算出した。その結果を Fig.4.6(B) に示す。10~50  $\mu\text{M}$  の DY-635 は濃度依存的に蛍光が上昇し、検量線が作成可能であった。検量線を基に調製した 2.71  $\mu\text{M}$  の AD、2.90  $\mu\text{M}$  の ADiR ナノ粒子に内包された DY-635 内包モル濃度を求めると、それぞれ 13.4、14.1  $\mu\text{M}$  となり、ナノ粒子とのモル濃度比はおおよそ 5 倍であった。この比は 3.2.10 の C-6 の内包時と類似しており、ナノ粒子は自身のモル濃度の 5 倍の蛍光色素を内包することが示唆された。これら結果から、DY-635 は十分な濃度で ADiR ナノ粒子へ内包可能であり、近赤外光の励起により *in vivo* イメージングへ適用可能であることが示唆された。

#### 4.3.4 マウス血中における蛍光内包ナノ粒子の滞留性評価

DDS 研究においては、*in vivo* での評価が必要不可欠となっているため、マウスモデルを用いて ADiR ナノ粒子の血中滞留性評価を行った。動物実験は全て、同大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所の西山伸宏教授の指導のもと行った。最初に、投与したナノ粒子がマウス血中で長時間滞留し続けるか否かを IVIS (*In Vivo* Imaging System)によってモニタリングした。生体には、外来異物に対する排出機構があり、抗がん剤を内包した DDS キャリアは、血液循環中に肝臓や脾臓を中心とする細網内皮系組織(RES)の貪食細胞に捕捉される傾向にある[146]。しかし ADiR ナノ粒子は、全体がタンパク質で構成され、凝集性を持たず高い分散性を示すため、異物と認識されずに RES に取り込まれにくくなり、血中に長時間循環滞留する特性を有していると考えられる。このようなステルス性を有していることを調べるため、蛍光標識した ADiR ナノ粒子を免疫不全のヌードマウスである BALB/c nude の尾部に静脈注射で投与し、時間経過における蛍光の分布を、インビボイメージングシステム(IVIS)を用いて調べた。マウスの背面より撮影した結果を Fig.4.7 に示す。Pre injection の時点で PBS のサンプルで蛍光を強く発している部位(背面右部)が脾臓であり、ある程度の自家蛍光を有していることが知られている。投与 15 分後では血中の AD と

ADiR ナノ粒子が全身を循環しており、全体的に蛍光を発しているという結果が見られた。また、脾臓への蓄積は若干見られるものの、顕著ではなかった。ステルス性のないナノキャリアでは、投与 5 分後の時点ですぐに脾臓にトラップされて蓄積し、強い蛍光が見られるため、AD 及び ADiR は血中滞留性を有していることが示唆された。30 分後でも同様の結果が見られ、1 時間経過すると、ある程度脾臓に蓄積し、赤色で示される強い蛍光が見られた。同様に、腹側から撮影した結果を Fig.4.8 に示す。15 分後の時点で PBS のサンプルで蛍光を発している大きなエリア(腹部左側)が腸管であり、与えられた飼料の自家蛍光によるものである。その上の部位に肝臓が位置している (15 分後の ADiR ナノ粒子において最も強く発している部位)。30 分後の時点で、AD、ADiR ナノ粒子ともに肝臓の部位で強い蛍光が出ている。しかしながら、これもステルス性欠如したナノキャリアと比較すると蛍光は小さく、コントロールの PBS と比較しても全身に蛍光が分布していることから、滞留性を有していることが示唆された。60 分後になると、肝臓への蓄積がかなり強まっているが、この傾向はナノキャリア特有であり、一方で全身に分布している状態は続いているため、ある程度の滞留性を有していると考えられる。

以上の結果から、今回作製した ADiR ナノ粒子は生体内において血中に滞留する性質を有しており、*in vivo*へ適用可能であることが明らかとなった。

#### 4.3.5 担癌マウスへ静脈投与したナノ粒子の腫瘍内蓄積評価

*In vivo*で ADiR ナノ粒子が薬剤を腫瘍組織に特異的に送達することを確認するために、U87MG 担癌ヌードマウスモデルを利用した。U87MG 腫瘍は、高度な血管形成性の脈管構造を有し、 $\alpha$ V $\beta$ 3 インテグリンを過剰発現している。よって、U87MG 腫瘍を移植したマウスにおいては、iRGD 配列を有する ADiR ナノ粒子は血中において他の臓器よりも優先的に腫瘍へ蓄積することが予測される。

蛍光標識した AD、ADiR ナノ粒子を、U87MG 腫瘍を皮下移植した BALB/c nude の尾

部に静脈注射で投与し、6時間後における各臓器と腫瘍への蛍光の分布を、インビボイメージングシステム(IVIS)を用いて調べた。取り出した臓器と腫瘍を蛍光イメージングした結果を Fig.4.9 に示す。コントロールの PBS を投与したマウスでは、肝臓においてマウスの餌の自家蛍光に起因する蛍光が観測されたが、その他の臓器において蛍光は見られなかった。AD ナノ粒子を投与したマウスでは、肝臓と腎臓に蛍光の蓄積が強く見られているが、腫瘍にも若干蓄積していることが分かった。これは、ナノサイズに制御された粒子の EPR 効果により、蓄積したものと考えられる。それに対して ADiR ナノ粒子を投与したマウスでは、腫瘍において AD ナノ粒子よりも強い蛍光が観測された。これは、iRGD 付加によるナノ粒子のアクティブターゲティングによって蓄積が増強されたものであり、標的能と細胞内移行能の付与により、ナノ粒子に DDS における優位性をもたらしたと考えられる。しかしながら、腎臓と肝臓への蓄積は極めて顕著であり、大部分の蛍光分子が腫瘍へ到達していないことが分かる。これは長期的な血液循環において、粒子を内包した蛍光分子の漏出による腎臓への蓄積や、ナノ粒子同士の凝集により形成した巨大分子が、肝臓の細網内皮系に貪食され蓄積したものであると考えられる。よって、今回作製したナノ粒子は、さらなる高機能化によって構造をより強固に改変し、生体の血中内での安定性を獲得することが必要である。

## 4.4 結言

本章では第3章で構築した iRGD 融合タンパク質ナノ粒子が、がん細胞を標的とした抗がん剤内包 DDS キャリアとして臨床において利用可能であるか検証することを目的とした。そのために、iRGD 融合ナノ粒子を用いて、血清中での機能発現、抗がん剤内包による細胞死誘導、血液循環における滞留性を評価した。

まず、血清中における ADiR ナノ粒子のがん細胞内移行能を評価し、ADiR ナノ粒子は血清中において、iRGD の機能を発揮し、薬剤を内包したままがん細胞内部へと移行することを示した。次に、抗がん剤薬剤内包粒子による細胞死誘導評価を行い、ADiR ナノ粒子は iRGD 配列のがん細胞標的能と細胞内移行能の両機能の相乗効果により、内包した抗がん剤を細胞内で放出することで、顕著に細胞死を誘導することを示した。また、非がん細胞に対しては、抗がん剤の非特異的な送達を防ぎ、細胞毒性を及ぼさないことを示した。

最後にマウス血中における薬剤内包ナノ粒子の滞留性評価を行い、ADiR で構築されたナノ粒子が、免疫細胞の捕食による排泄を回避し、長時間血中に滞留する特性を有しているか否かを評価した。最適化した方法により作製した近赤外蛍光色素内包 ADiR ナノ粒子をマウスに静脈注射し、蛍光イメージングしたところ、1 時間後においても、蛍光が全身に分布していたため、血中に長時間滞留する性質を有していることが示された。また、担癌マウスにおいて ADiR で構築されたナノ粒子が、特異的に腫瘍へ集積するか否かを各臓器と腫瘍の蛍光イメージングにより確認した。その結果、ADiR ナノ粒子は、iRGD によって腫瘍への蓄積が増強されていることが示唆された。しかし、肝臓や腎臓への蓄積も顕著であり、今後さらなる高機能化が必要とされる。

以上の結果から、作製した iRGD 融合タンパク質ナノ粒子は、がん細胞を標的とした DDS キャリアとして、生体内においても応用可能であることが明らかとなった。

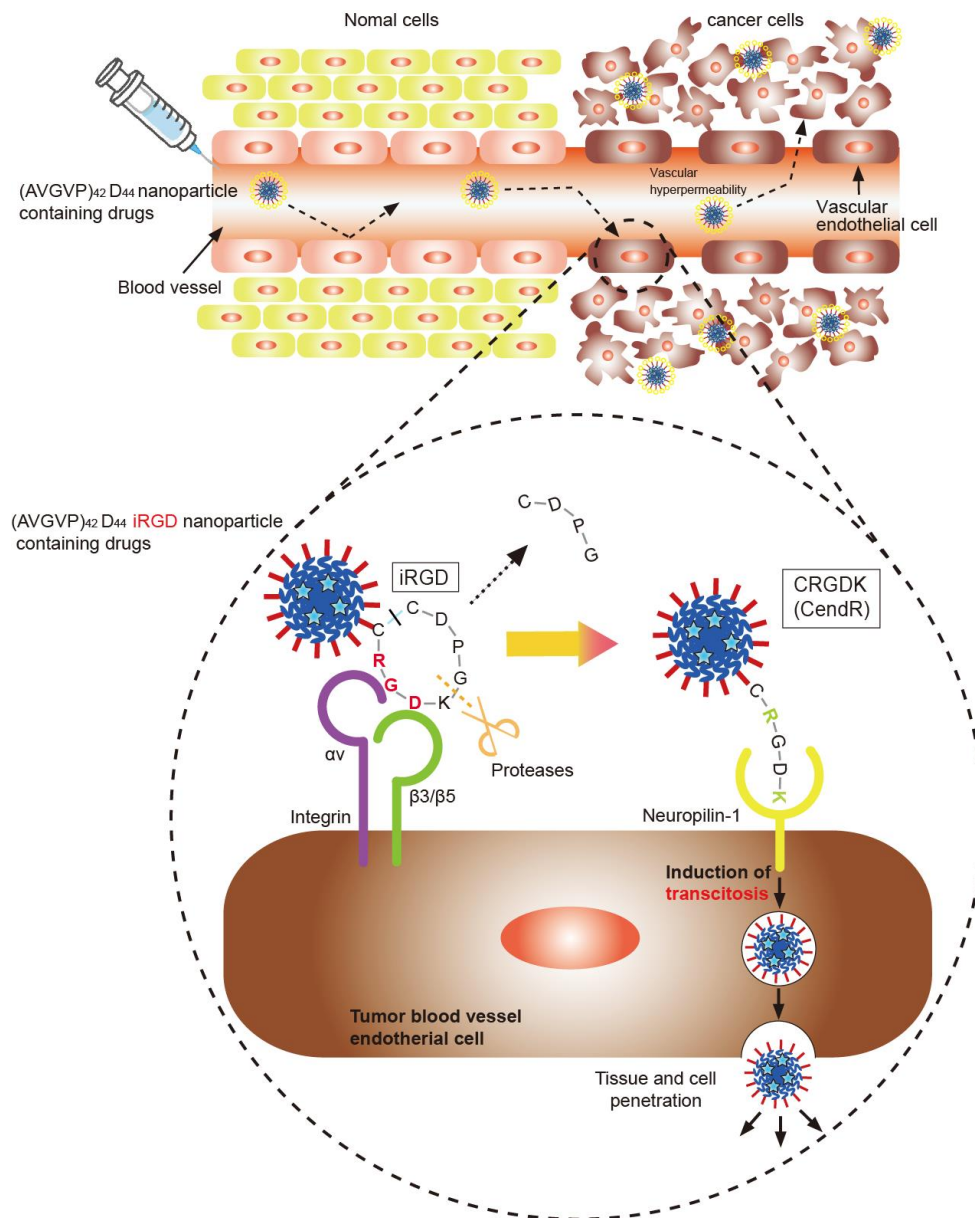


Figure 4.1 悪性腫瘍を有する生体内における抗がん剤内包ナノ粒子の動態

静脈注射によって投与された抗がん剤内包粒子は、正常細胞付近の血管は通過し、腫瘍組織付近に到達する。その後 iRGD はがん化した血管内皮細胞の  $\alpha V\beta 3$  インテグリンに結合し、NRP-1 を介した細胞内移行により、がん細胞の深部まで移行する。その際の薬剤放出により優れた抗腫瘍効果を示す。

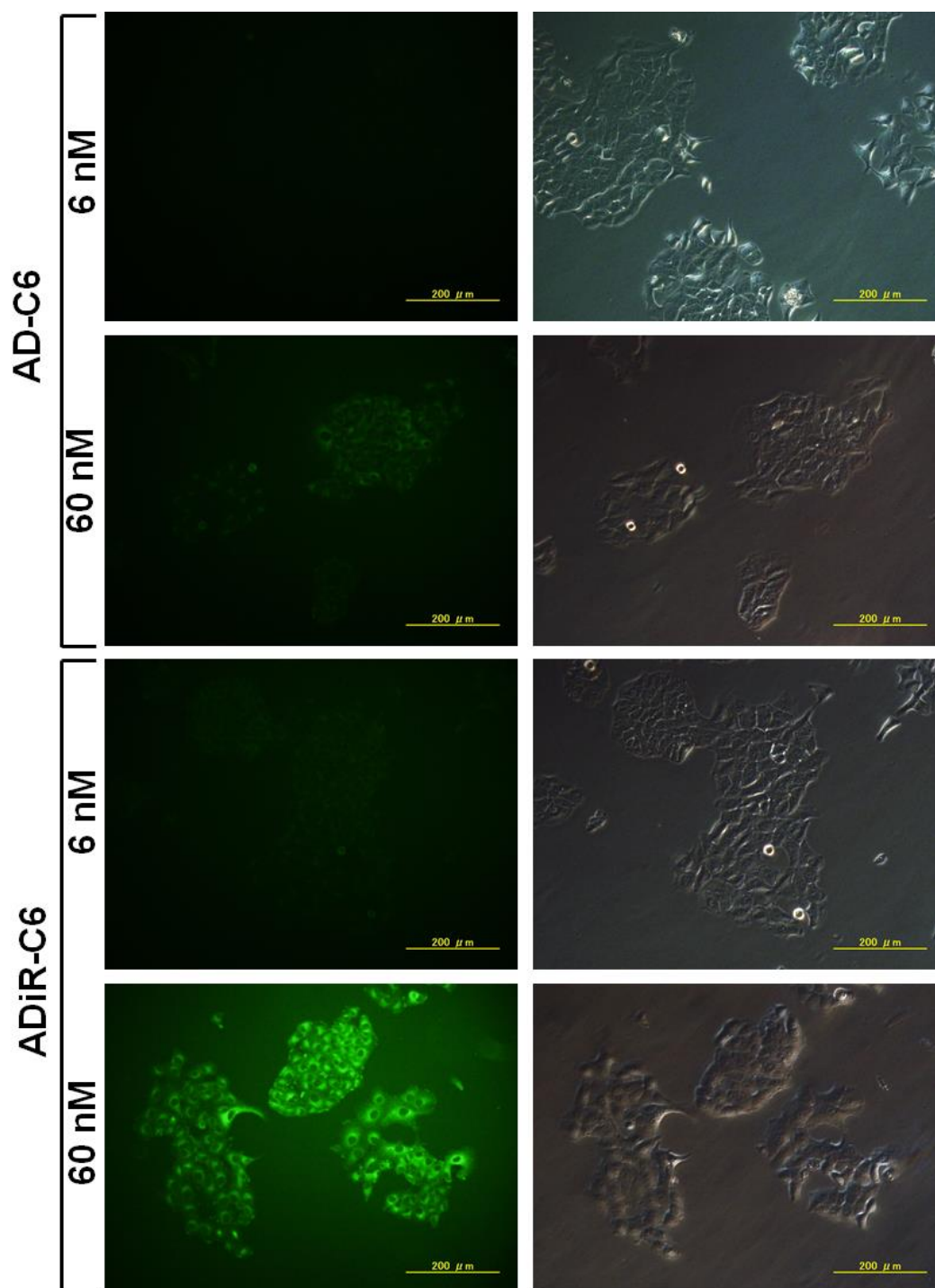


Figure 4.2

血清中における蛍光内包ナノ粒子のがん細胞内移行能評価

(スケールバー: 200 μm)

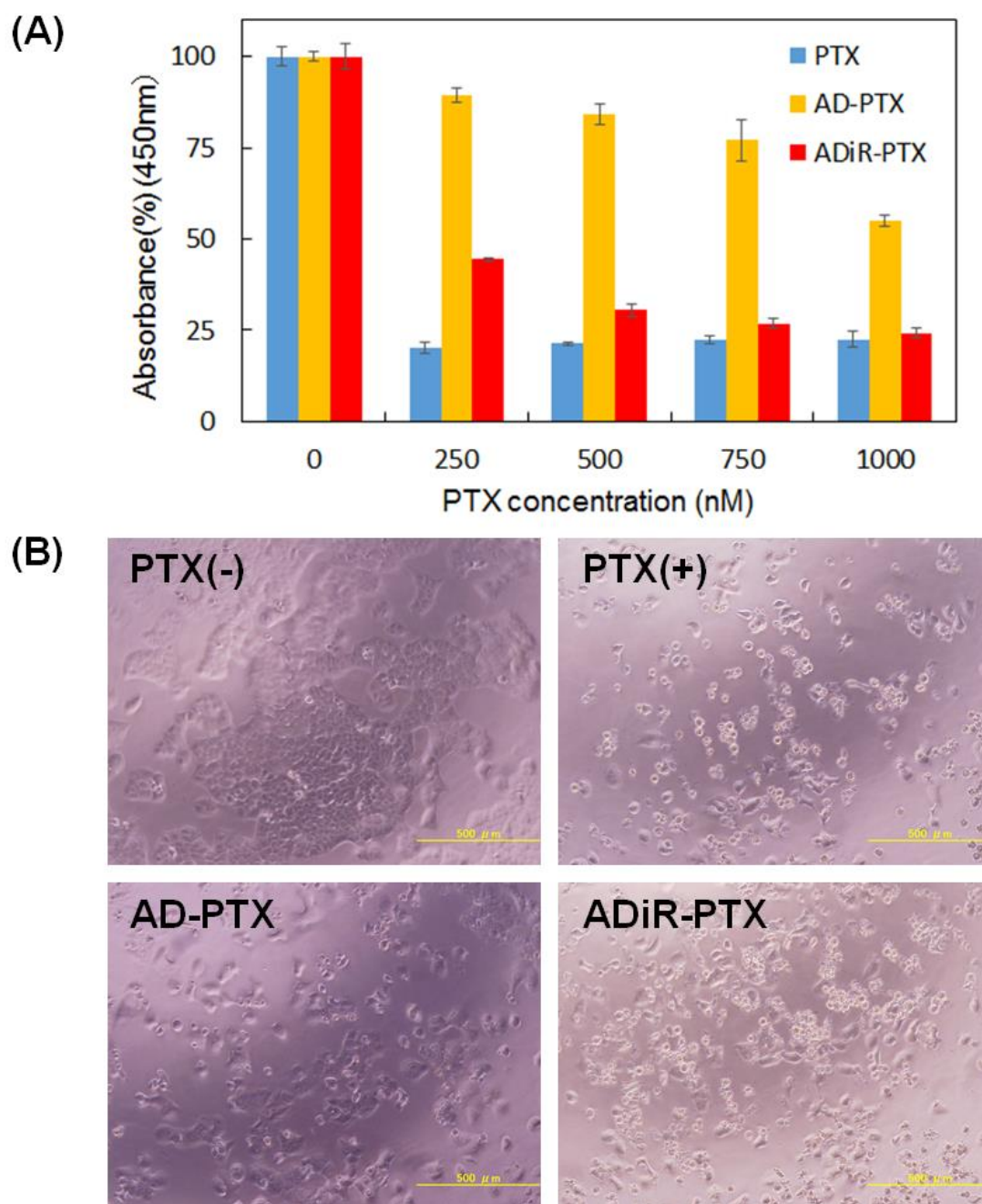


Figure 4.3 抗がん剤内包粒子による細胞死誘導評価

(A) 抗がん剤内包粒子による細胞死誘導の 3 日目における生細胞数定量評価

PTX 無添加時の吸光度を 100%として各サンプルの細胞数比を算出した。

(B) 1  $\mu$ M 抗がん剤内包粒子による細胞死誘導の 3 日目における細胞形態観察

(スケールバー: 500  $\mu$ m)

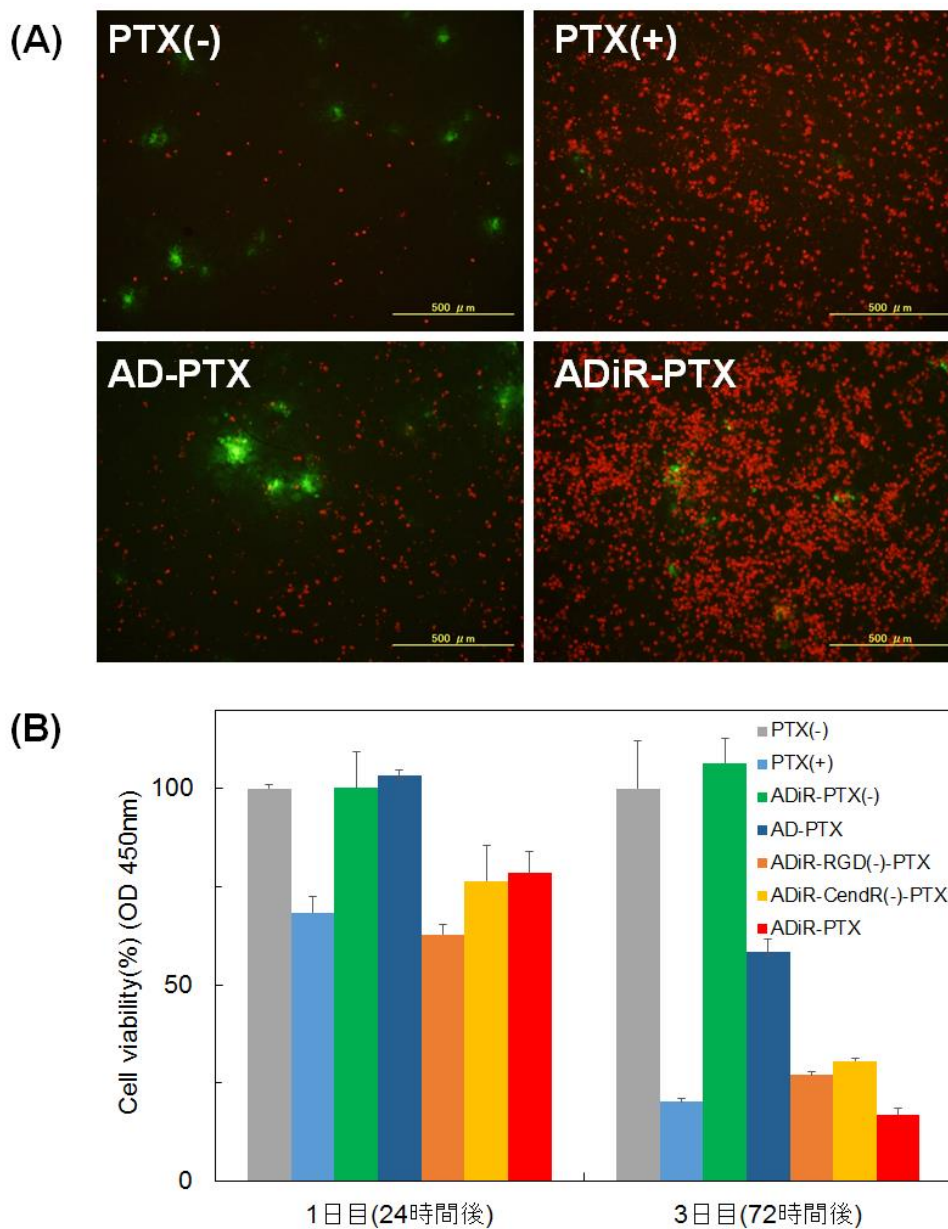


Figure 4.4 抗がん剤内包粒子による細胞死誘導評価

(A) 細胞死誘導 3 日目における細胞染色 (スケールバー: 500  $\mu\text{m}$ )

緑は Calcein-AM による生細胞染色、赤は PI による死細胞染色

(B) 細胞死誘導による生細胞数変化の機能欠損粒子との比較

PTX 無添加時の吸光度を 100%として各サンプルの細胞数比を算出した。

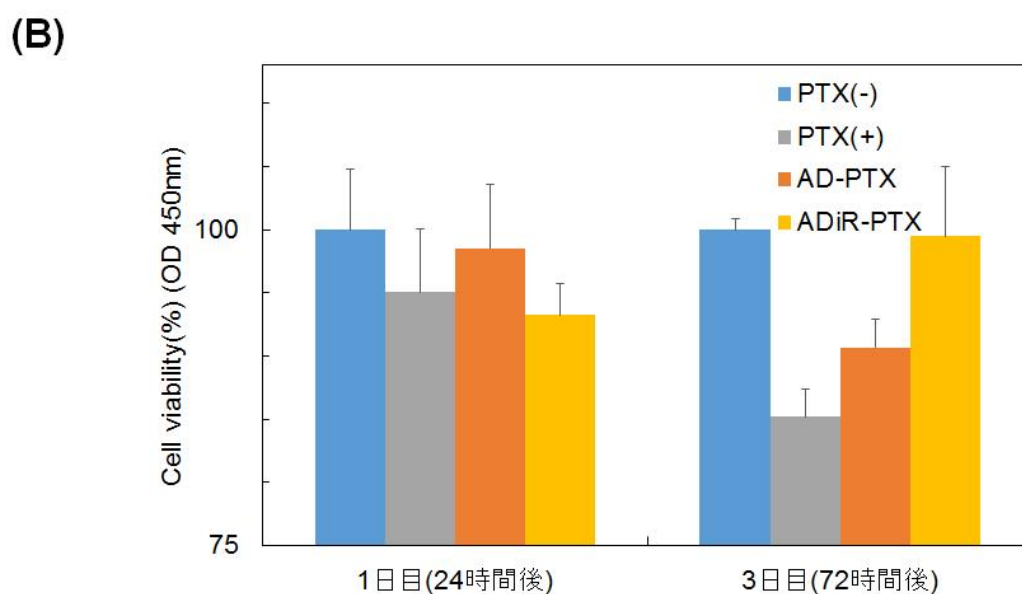
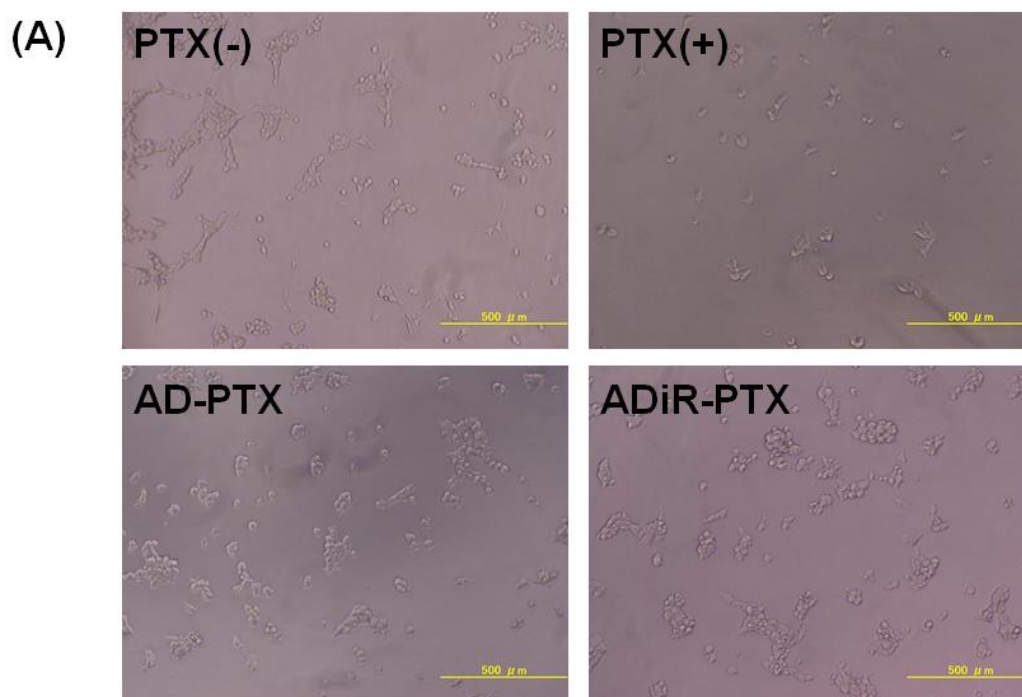
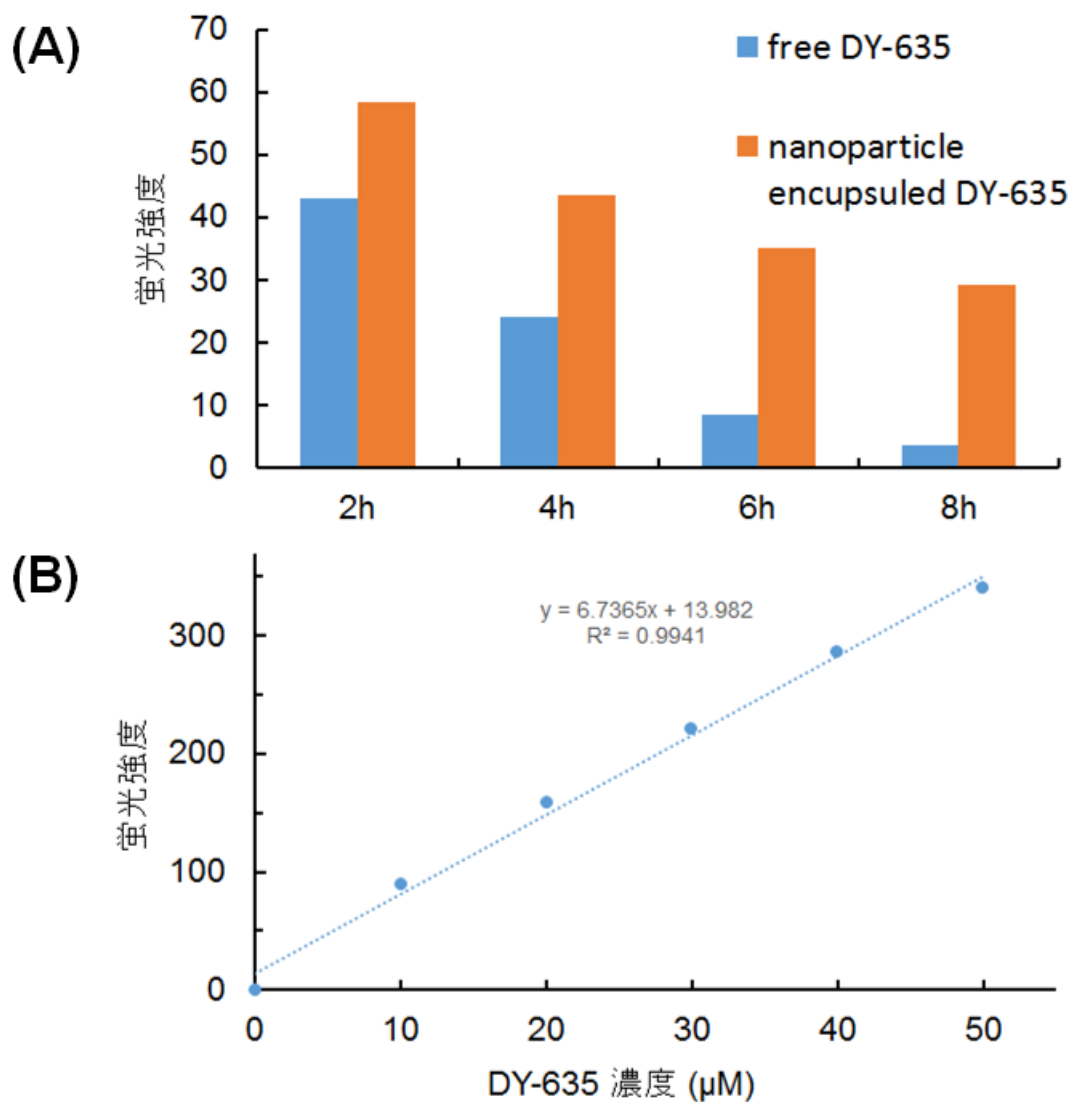


Figure 4.5 非がん細胞 HEK293 への毒性評価

(A) 細胞死誘導の 3 日目における細胞形態観察 (スケールバー: 500  $\mu\text{m}$ )

(B) 細胞死誘導後の生細胞数定量評価

PTX 無添加時の吸光度を 100%として各サンプルの細胞数比を算出した。



試料	蛍光強度	DY-635 濃度値(μM)	DY/ナノ粒子 モル濃度比
AD	95.49	13.42	4.95
ADiR	99.98	14.05	4.83

Figure 4.6 ナノ粒子への近赤外蛍光色素内包評価

(A) 透析時間変化における未内包の DY-635 蛍光色素の除去率の評価

(B) DY-635 の検量線作成とナノ粒子中の DY-635 のモル濃度の推定

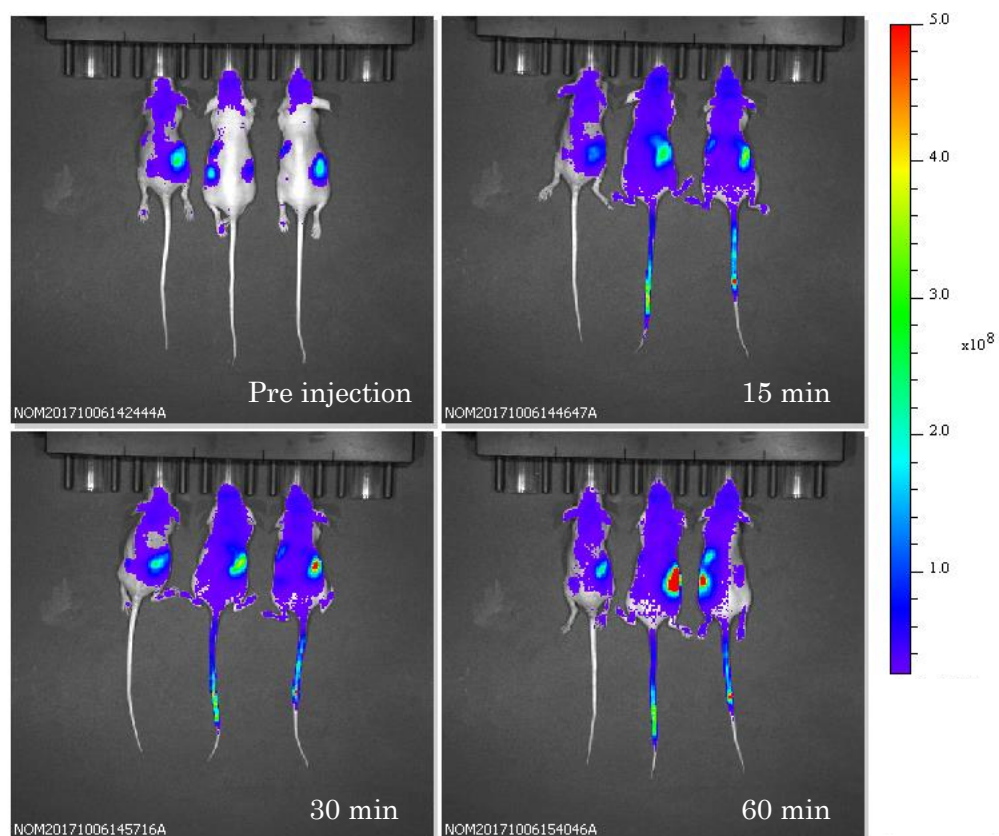


Figure. 4.7 マウス内部のナノ粒子の蛍光イメージング (背中側)

左から PBS、AD、ADiR を投与した個体

色付きのスケールバーは、蛍光強度 ( p/s/cm<sup>2</sup>/sr )を示す

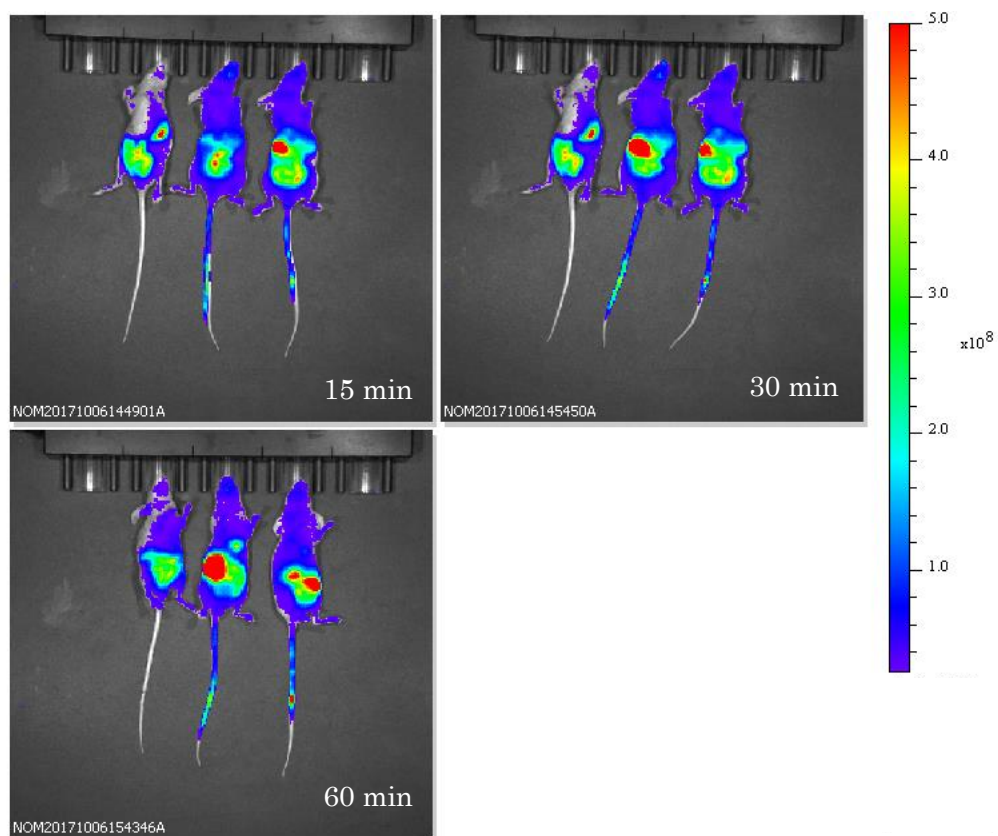


Figure. 4.8 マウス内部のナノ粒子の蛍光イメージング (腹側)

左から PBS、AD、ADiR を投与した個体

色付きのスケールバーは、蛍光強度 ( p/s/cm<sup>2</sup>/sr )を示す

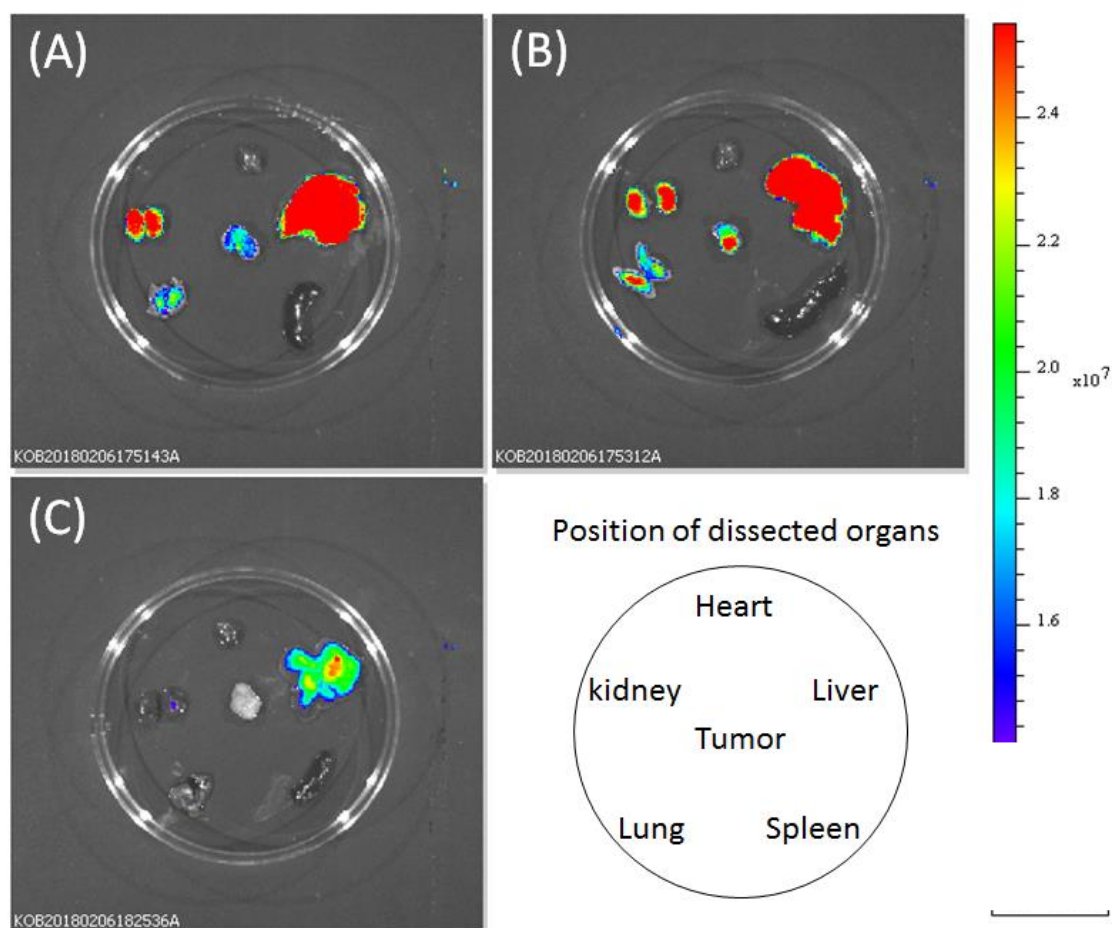


Figure. 4.9 担癌マウスの各臓器における蛍光内包ナノ粒子の蓄積

(A)はAD ナノ粒子、(B)はADiR ナノ粒子、(C)はPBS を投与した個体の臓器

色付きのスケールバーは、蛍光強度 ( p/s/cm<sup>2</sup>/sr )を示す

## 第 5 章

### 結論

本研究では、バイオセンシングや DDS への応用を目的として、ELP によって構成されるナノ粒子の機能付加を試みた。当研究室では、高い生体適合性や生体内における安定性を有する ELP の疎水性ドメイン(AVGVP)<sub>42</sub> とポリアスパラギン酸(D<sub>44</sub>)の融合タンパク質(AD)を作製し、高い構造安定性、サイズ及び分子方向の制御能、薬剤内包能を有するミセル状のナノ粒子を構築することに成功した。また機能性タンパク質を表層に融合することで、ナノ粒子に様々な性質を付与できることが示された。そこで本研究では (AVGVP)<sub>42</sub> D<sub>44</sub> で構成されたタンパク質に機能性分子を付加し、医療分野への応用を目指した高機能化タンパク質ナノ粒子を設計した。

第 2 章では、腫瘍マーカーを標的としたバイオセンシングへと応用するために、AD ナノ粒子に酵素によるシグナル増幅能と分子認識能の付与を行い、ELISA における高感度な検出プローブを開発することを目的とした。そのために D<sub>44</sub> 末端に、ルシフェラーゼの Nluc とビオチン修飾配列 BAP を融合した ADNB を作製し、機能評価を行った。融合タンパク質 ADNB は加熱により 40 nm 程の単分散な粒子を形成し、熱や凍結融解、長期保存によるルシフェラーゼ活性低下が抑えられ、検出プローブとして安定な性質を示した。また、AFP を標的とした腫瘍マーカーの ELISA 検出系を構築し、ADNB ナノ粒子の検出能を評価したところ、ADNB ナノ粒子の AFP 検出限界は 25.9 pg/ml 程度であり、従来 of 標的 1 分子に 1 酵素を提示する検出法と比較して、10 倍程度高感度に検出できることが明らかとなった。さらにヒト血清中の AFP に関しても検出可能であり、生体試料中のマーカー検出に適用可能であることが明らかとなった。以上の結果から、融合タンパク質 ADNB より構成されたタンパク質ナノ粒子は、標的物質 1 分子に対して複数のルシフェラーゼが結合することにより、1 分子あたりのシグナルが増幅された高感度なバイオセンシングが可能であり、腫瘍マーカーに対する優れた検出能を有することが明らかとなった。

バイオセンシング研究における今後の展望として、ルシフェラーゼ融合ナノ粒子に抗体結合タンパク質を融合し、抗体結合能を付加することで、さらに検出プローブとしての汎用性を高めていくことが必要であると考えている。今後臨床検査への応用に向けてさらなる検討を重ね、本法を用いて各種生体内微量物質の高感度検出系を開発し、新たな知見が得られることを期待したい。

第 3 章では、腫瘍組織を標的とした DDS へと応用するために、AD ナノ粒子にがん細胞への標的能と細胞内移行能を付加し、がんへの標的指向性の高い DDS キャリアを構築することを目的とした。そのために D<sub>44</sub> 末端に、RGD と CendR モチーフを有する環状ペプチド iRGD を融合した ADiR を作製し、機能評価を行った。融合タンパク質 ADN<sub>B</sub> は加熱により 30 nm 程の単分散な粒子を形成し、自らの持つ RGD 配列によって  $\alpha_v\beta_3$  インテグリン過剰発現細胞へと特異的に結合することを明らかにした。また、DDS キャリアとして重要項目である薬剤内包能、および細胞標的能について、ADiR 粒子の特性を評価した。ADiR が形成するナノ粒子は疎水性物質を粒子の疎水性コアに内包することが明らかとなり、ADiR に蛍光薬物モデルを内包させ、細胞に添加したところ、 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンへの結合と NRP1 による細胞内移行によりナノ粒子ごと細胞内へ取り込まれ、高効率に細胞内へのドラッグデリバリーが行えることが明らかとなった。また非がん細胞に対しては、非特異的な細胞内移行を行わないことを示した。これにより ADiR により構築されたタンパク質ナノ粒子は、 $\alpha_v\beta_3$  を過剰に発現するがん細胞に対する標的能と細胞内輸送能を有し、DDS キャリアとして高い素質を有することが明らかになった。

第 4 章では、第 3 章で作製した iRGD 融合タンパク質ナノ粒子が、がん細胞を標的とした抗がん剤内包 DDS キャリアとして臨床において利用可能であるか検証することを目的とした。そのために、iRGD 融合ナノ粒子を用いて、血清中での機能発現、抗がん剤内包による細胞死誘導、血液循環における滞留性、腫瘍組織への集積を評価した。ADiR ナノ粒子は

血清中においても、iRGDの機能が維持され、薬剤を内包したままがん細胞内部へと移行することを示した。また抗がん剤内包粒子による細胞死誘導評価を行い薬剤の効果が增强されるか検証したところ、ADiR ナノ粒子は、内包した抗がん剤を細胞内で放出することで、顕著に細胞死を誘導することを示した。また、非がん細胞に対しては、細胞毒性を及ぼさないことを示した。そして、マウス血中における薬剤内包ナノ粒子の滞留性評価においては、1時間後においても、ADiR 全身に分布しており、免疫細胞の捕食による排泄を回避し、血中に長時間滞留する性質を有していることが示された。また、 $\alpha v \beta 3$  を過剰に発現するがん細胞を移植した担癌マウスにおいて ADiR ナノ粒子を投与したところ、iRGD 配列付加により腫瘍への蓄積が增强されていることが示唆された。以上の結果から、作製した iRGD 融合タンパク質ナノ粒子は、がん細胞を標的とした DDS キャリアとして、生体内においても応用可能であることが明らかとなった。

DDS 研究における展望とし、抗がん剤内包ナノ粒子による治療効果を検証し、*in vivo* においても機能付加の有意性を示していく予定である。またさらなる応用として、pH や光応答性の機能性分子を付加することで、刺激応答による構造変化により薬剤放出を制御することが可能となり DDS の精度をさらに向上できると考えている。今後の ELP ナノ粒子の機能向上に向けた試行錯誤が、DDS キャリアによる薬物治療の可能性をさらに現実的なものとするであろう。

以上、ELP ナノ粒子表面への機能性分子の付加により、バイオセンシング分野においてはシグナル増幅能の向上による高感度化、DDS 分野においては分子標的能による薬効の增强といった重要な特性を示した。実際の臨床応用までには検討すべき点が多々あるが、本研究がタンパク質ナノ粒子を用いたバイオセンシングプローブや DDS キャリア実現の一助になれば幸いである。

## References

- [1] O. Salata, “Applications of nanoparticles in biology and medicine.” *J Nano biotechnology*, 2004, **2**, 3.
- [2] L. Mazzola, “Commercializing nanotechnology.” *Nature Biotechnology*, 2003, **21**, 1137.
- [3] R. Paull, J. Wolfe, P. Hebert and Sinkula M, “Investing in nanotechnology.” *Nature Biotechnology*, 2003, **21**, 1134.
- [4] J.J. Marty, R.C. Oppenheim and P. Speiser, “Nanoparticles : a new colloidal drug delivery system.” *Pharm. Acta Helv*, 1978, **53**, 17.
- [5] J. Kreuter, “Nanoparticles and nanocapsules : new dosage forms in the nanometer size range.” *Pharm. Acta Helv*, 1978, **53**, 33.
- [6] M. Shimomura and T. Sawadaishi, “Bottom-up strategy of materials fabrication : a new trend in nanotechnology of soft materials.” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*, 2001, **6**, 11.
- [7] R. Wilson, “The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection.” *Chem. Soc. Rev*, 2008, **37**, 2028.
- [8] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. L. Breton and V. Préat, “PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications.” *J Control Release*, 2012, **161**, 505.
- [9] L. A. Dykman and N.G. Khlebtsov, “Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects.” *Acta Naturae*, 2011, **3**, 34.
- [10] A. Puri, K. Loomis, B. Smith, J. H. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman and R. Blumenthal, “Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic.” *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2009, **26**, 523.
- [11] E. Bekyarova, Y. Ni, E. B. Malarkey, V. Montana, J. L. McWilliams, R. C. Haddon and Vladimir Parpura, “Applications of Carbon Nanotubes in Biotechnology and Biomedicine.” *J Biomed Nanotechnol*, 2005, **1**, 3.
- [12] E. Abbasi, S. F. Aval, A. Akbarzadeh, M. Milani, H. T. Nasrabadi, S. W. Joo, Y. Hanifehpour, K. Nejati-Koshki and R. Pashaei-Asl, “Dendrimers: synthesis, applications, and properties.” *Nanoscale Res Lett*, 2014, **9**, 247.

- [13] W. F. Daamen, J. H. Veerkamp, J. C. van Hest and T. H. van Kuppevelt, "Elastin as a biomaterial for tissue engineering." *Biomaterials*, 2007, **28**, 4378.
- [14] W. R. Gray, L. B. Sandberg and J. A. Foster, "Molecular model for elastin structure and function." *Nature*, 1973, **246**, 461.
- [15] Z. Indik, H. Yeh, N. Ornsteingoldstein, P. Sheppard, N. Anderson, J. C. Rosenbloom, L. Peltonen and J. Rosenbloom, "Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84**, 5680.
- [16] D. W. Urry, M. M. Long, B. A. Cox, T. Ohnishi, L. W. Mitchell and M. Jacobs, "The synthetic polypentapeptide of elastin coacervates and forms filamentous aggregates." *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.*, 1974, **371**, 597.
- [17] G. M. Bressan, I. Pasquali-Ronchetti, C. Fornieri, F. Mattioli, I. Castellani and D. Volpin, "Relevance of aggregation properties of tropoelastin to the assembly and structure of elastic fibers." *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, 1986, **94**, 209.
- [18] F. W. Keeley, C. M. Bellingham and K. Woodhouse, "Elastin as a self-organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin." *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2002, **357**, 185.
- [19] B. Vrhovski, S. Jensen and A. S. Weiss, "Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin." *Eur. J. Biochem.*, 1997, **250**, 92.
- [20] D. W. Urry, "Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers." *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 11007.
- [21] C. H. Luan, R. D. Harris, K. U. Prasad and D. W. Urry, "Differential scanning calorimetry studies of the inverse temperature transition of the polypentapeptide of elastin and its analogues." *Biopolymers*, 1990, **29**, 1699.
- [22] B. Li and V. Daggett, "The molecular basis of the temperature- and pH-induced conformational transitions in elastin-based peptides." *Biopolymers*, 2003, **68**, 121.
- [23] D. W. Urry, "Protein elasticity based on conformations of sequential polypeptides: The biological elastic fiber" *J. Protein Chem.*, 1984, **3**, 403.

- [24] I. L. Wu, M. A. Patterson, H. E. Carpenter Desai, R. A. Mehl, G. Giorgi and V. P. Conticello, "Multiple site-selective insertions of noncanonical amino acids into sequence-repetitive polypeptides." *ChemBiochem*, 2013, **14**, 968.
- [25] X. L. Yao and M. Hong, "Structure Distribution in an Elastin-Mimetic Peptide (VPGVG)<sub>3</sub> Investigated by Solid-State NMR." *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 4199.
- [26] M. Hong, D. Isailovic, R. A. McMillan and V. P. Conticello, "Structure of an elastin-mimetic polypeptide by solid-state NMR chemical shift analysis." *Biopolymers*, 2003, **70**, 158.
- [27] N. K. Li, F. G. Quiroz, C. K. Hall, A. Chilkoti and Y. G. Yingling, "Molecular Description of the LCST Behavior of an Elastin-Like Polypeptide." *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 3522.
- [28] D. W. Urry, C. H. Luan, T. M. Parker, D. C. Gowda, K. U. Prasad, M. C. Reid, and A. Safavy, "Temperature of Polypeptide Inverse Temperature Transition Depends on Mean Residue Hydrophobicity." *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 4346.
- [29] D. W. Urry, T. L. Trapane, M. M. Long and K. U. Prasad, "Test of the librational entropy mechanism of elasticity of the polypentapeptide of elastin. Effect of introducing a methyl group at residue 5." *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1983, **79**, 853.
- [30] D. W. Urry, T. Hugel, M. Seitz, H. E. Gaub, L. Sheiba, J. Dea, J. Xu and T. Parker, "Elastin: a representative ideal protein elastomer." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2002, **357**, 169.
- [31] E. R. Wright and V. P. Conticello, "Self-assembly of block copolymers derived from elastin-mimetic polypeptide sequences." *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, **54**, 1057.
- [32] J. Reguera, J. M. Lagaron, M. Alonso, V. Rebotto, B. Calvo and J. C. Rodriguez-Cabello, "Thermal Behavior and Kinetic Analysis of the Chain Unfolding and Refolding and of the Concomitant Nonpolar Solvation and Desolvation of Two Elastin-like Polymers." *Macromolecules*, 2003, **36**, 8470.
- [33] A. Chilkoti, M. R. Dreher and D. E. Meyer, "Design of thermally responsive, recombinant polypeptide carriers for targeted drug delivery." *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, **54**, 1093.

- [34] A. Girotti, J. Reguera, F. J. Arias, M. Alonso, A. M. Testera and J. C. Rodriguez-Cabello, "Influence of the Molecular Weight on the Inverse Temperature Transition of a Model Genetically Engineered Elastin-like pH-Responsive Polymer." *Macromolecules*, 2004, **37**, 3396.
- [35] D. E. Meyer and A. Chilkoti, "Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides." *Nat. Biotechnol.*, 1999, **17**, 1112.
- [36] J. Reguera, D. W. Urry, T. M. Parker, D. T. McPherson and J. C. Rodriguez-Cabello, "Effect of NaCl on the Exothermic and Endothermic Components of the Inverse Temperature Transition of a Model Elastin-like Polymer." *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 354.
- [37] Y. Cho, Y. Zhang, T. Christensen, L. B. Sagle, A. Chilkoti and P. S. Cremer, "Effects of Hofmeister Anions on the Phase Transition Temperature of Elastin-like Polypeptides." *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 13765.
- [38] K. B. Rembert, J. Paterova, J. Heyda, C. Hilty, P. Jungwirth and P. S. Cremer, "Molecular Mechanisms of Ion-Specific Effects on Proteins." *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 10039.
- [39] D. E. Meyer and A. Chilkoti, "Genetically Encoded Synthesis of Protein-Based Polymers with Precisely Specified Molecular Weight and Sequence by Recursive Directional Ligation: Examples from the Elastin-like Polypeptide System." *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 357.
- [40] M. B. van Eldijk, C. L. McGann, K. L. Kiick and J. C. van Hest, "Elastomeric polypeptides." *Top. Curr. Chem.*, 2012, **310**, 71.
- [41] M. Amiram, F. G. Quiroz, D. J. Callahan and A. Chilkoti, "A highly parallel method for synthesizing DNA repeats enables the discovery of 'smart' protein polymers." *Nat. Mater.*, 2011, **10**, 141.
- [42] A. Ribeiro, F. J. Arias, J. Reguera, M. Alonso and J. C. Rodriguez Cabello, "Imaging barriers to diffusion by pair correlation functions." *Biophys. J.*, 2009, **97**, 312.
- [43] D. E. Meyer and A. Chilkoti, "Quantification of the Effects of Chain Length and Concentration on the Thermal Behavior of Elastin-like Polypeptides." *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 846.

- [44] W. Hassouneh, K. Fischer, S. R. MacEwan, R. Branscheid, C. L. Fu, R. Liu, M. Schmidt and A. Chilkoti, “Unexpected Multivalent Display of Proteins by Temperature Triggered Self-Assembly of Elastin-like Polypeptide Block Copolymers.” *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 1598.
- [45] T. A. T. Lee, A. Cooper, R. P. Apkarian and V. P. Conticello, “Thermo-Reversible Self-Assembly of Nanoparticles Derived from Elastin-Mimetic Polypeptides.” *Adv. Mater.* 2000, **12**, 1105.
- [46] M. R. Dreher, A. J. Simnick, K. Fischer, R. J. Smith, A. Patel, M. Schmidt and A. Chilkoti, “Temperature Triggered Self-Assembly of Polypeptides into Multivalent Spherical Micelles.” *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 687.
- [47] W. Kim, J. Thevenot, E. Ibarboure, S. Lecommandoux and E. L. Chaikof, “Self-assembly of thermally responsive amphiphilic diblock copolypeptides into spherical micellar nanoparticles.” *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 4257.
- [48] W. Kim, J. Xiao and E. L. Chaikof, “Recombinant Amphiphilic Protein Micelles for Drug Delivery.” *Langmuir*, 2011, **27**, 14329.
- [49] F. C. M. Smits, W. W. A. Castelijns and J. C. M. van Hest, “Crosslinked ELP-based nanoparticles, using the strain promoted azide-alkyne cycloaddition.” *Eur. Polym. J.*, 2012, **62**, 382.
- [50] S. Schoffelen, M. B. van Eldijk, B. Rooijackers, R. Raijmakers, A. J. R. Heck and J. C. M. van Hest, “Metal-free and pH-controlled introduction of azides in proteins.” *Chem. Sci.*, 2011, **2**, 701.
- [51] S. R. MacEwan and A. Chilkoti, “Controlled Apoptosis by a Thermally Toggled Nanoscale Amplifier of Cellular Uptake” *Nano Lett.*, 2014, **14**, 2058.
- [52] F. C. M. Smits, M. B. van Eldijk, N. Vermue, M. F. Debets, S. Schoffelen and J. C. M. van Hest, “Synthesis and Self-Assembly of Well-Defined Elastin-Like Polypeptide–Poly(ethylene glycol) Conjugates.” *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 2751.
- [53] J. A. Gustafson and H. Ghandehari, “Silk-elastinlike protein polymers for matrix-mediated cancer gene therapy.” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**, 1509.

- [54] Z. Megeed, J. Cappello and H. Ghandehari, “Genetically engineered silk-elastinlike protein polymers for controlled drug delivery.” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, **54**, 1075.
- [55] X.-X. Xia, M. Wang, Y. Lin, Q. Xu and D. L. Kaplan, “Hydrophobic Drug-Triggered Self-Assembly of Nanoparticles from Silk-Elastin-Like Protein Polymers for Drug Delivery.” *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 908.
- [56] X.-X. Xia, Q. Xu, X. Hu, G. Qin and D. L. Kaplan, “Tunable Self-Assembly of Genetically Engineered Silk–Elastin-like Protein Polymers.” *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 3844.
- [57] M. D. Golinska, T. T. H. Pham, M. W. T. Werten, F. A. de Wolf, M. A. Cohen Stuart and J. van der Gucht, “Fibril Formation by pH and Temperature Responsive Silk-Elastin Block Copolymers.” *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 48.
- [58] J. A. MacKay, M. Chen, J. R. McDaniel, W. Liu, A. J. Simnick and A. Chilkoti, “Self-assembling chimeric polypeptide–doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumours after a single injection.” *Nat. Mater.*, 2009, **8**, 993.
- [59] S. Fluegel, J. Buehler, K. Fischer, J. R. McDaniel, A. Chilkoti and M. Schmidt, “Self-Assembly of Monodisperse Oligonucleotide–Elastin Block Copolymers into Stars and Compound Micelles.” *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 5503.
- [60] M. K. Pastuszka, X. Wang, L. L. Lock, S. M. Janib, H. Cui, L. D. DeLeve and J. A. MacKay, “An amphipathic alpha-helical peptide from apolipoprotein A1 stabilizes protein polymer vesicles.” *J. Control. Release*, 2014, **191**, 15.
- [61] M. B. van Eldijk, J. C.-Y. Wang, I. J. Minten, C. Li, A. Zlotnick, R. J. M. Nolte, J. J. L. M. Cornelissen and J. C. M. van Hest, “Designing Two Self-Assembly Mechanisms into One Viral Capsid Protein.” *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 18506.
- [62] J. A. Speir, S. Munshi, G. J. Wang, T. S. Baker and J. E. Johnson, “Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy.” *Structure*, 1995, **3**, 63.
- [63] L. Lavelle, M. Gingery, M. Phillips, W. M. Gelbart, C. M. Knobler, R. D. Cadena-Nava, J. R. Vega-Acosta, L. A. PinedoTorres and J. Ruiz-Garcia, “Phase diagram of self-assembled viral capsid protein polymorphs.” *J Phys Chem B*, 2009, **113**, 3813.

- [64] Y. Fujita, M. Mie and E. Kobatake, "Construction of nanoscale protein particle using temperature-sensitive elastin-like peptide and polyaspartic acid chain." *Biomaterials*, 2009, **30**, 3450.
- [65] R. Matsumoto, R. Hara, T. Andou, M. Mie and E. Kobatake, "Targeting of EGF-displayed protein nanoparticles with anticancer drugs." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014, **102**, 1792.
- [66] Y. Assal, Y. Mizuguchi, M. Mie and E. Kobatake, "Growth factor tethering to protein nanoparticles via coiled-coil formation for targeted drug delivery." *Bioconjug. Chem.*, 2015, **26**, 1672.
- [67] M. Shah, P. Y. Hsueh, G. Sun, H. Y. Chang, S. M. Janib and J. A. MacKay, "Biodegradation of elastin-like polypeptide nanoparticles." *Protein Sci.*, 2012, **21**, 743.
- [68] D. W. Urry, T. M. Parker, M. C. Reid and D. C. Gowda, "Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its  $\gamma$ -Irradiation Cross-Linked Matrix: Summary of Generic Biological Test Results." *J. Bioactive Compatible Polym.*, 1991, **6**, 263.
- [69] Editorial, "ELISA: a replacement for radioimmunoassay?" *Lancet*, 1976, **2**, 406.
- [70] M. C. Wang, L. A. Valenzuela, G. P. Murphy, and T. M. Chu, "Purification of a human prostate specific antigen." *Invest. Urol*, 1979, **76**, 159.
- [71] M. Kuriyama, M. C. Wang, L. D. Papsidero, C. S. Killian, T. Shimano, L. Valenzuela, T. Nishiura, G. P. Murphy and T. M. Chu, "Quantitation of prostate specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay." *Cancer Research*, 1980, **40**, 4658.
- [72] M. P. Pavlou, E. P. Diamandis, and I. M. Blasutig, "The Long Journey of Cancer Biomarkers from the Bench to the Clinic." *Clin Chem*, 2013, **59**, 147.
- [73] T. Stuchinskaya, M. Moreno, M. J. Cook, D. R. Edwards and D. A. Russell, "Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates." *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, **10**, 822.
- [74] S. D. Brown, P. Nativo, J. A. Smith, D. Stirling, P. R. Edwards P R, Venugopal B, D. J. Flint, J. A. Plumb, D. Graham and N. J. Wheate, "Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin." *Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 4678.

- [75] M. E. Ali, U. Hashim, S. Mustafa, Y. B. Che Man and Kh. N. Islam, "Gold Nanoparticle Sensor for the Visual Detection of Pork Adulteration in Meatball Formulation. *Journal of Nanomaterials*, 2012, **2012**, 103607.
- [76] S. D. Perrault and W. C. Chan, "In vivo assembly of nanoparticle components to improve targeted cancer imaging." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2010, **107**, 11194.
- [77] G. Peng, U. Tisch, O. Adams, M. Hakim, N. Shehada, Y. Y. Broza, S. Bilan, R. Abdah-Bortnyak, A. Kuten and H. Haick, "Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles." *Nature Nanotech*, 2009, **4**, 669.
- [78] D. T. Thompson, "Using gold nanoparticles for catalysis." *Nano Today*, 2007, **2**, 40.
- [79] L. A. Dykman, V. A. Bogatyrev, B. N. Khlebtsov and N. G. Khlebtsov, "A protein assay based on colloidal gold conjugates with trypsin." *Anal. Biochem.* 2005, **341**, 16.
- [80] G. Harrison, P. Haffey and E. E. Golub, "A nanogram-level colloidal gold single reagent quantitative protein assay. *Anal. Biochem.*, 2008, **380**, 1.
- [81] M. L. Sánchez-Martínez, M. P. Aguilar-Caballos and A. Gómez-Hens, "Homogeneous immunoassay for soy protein determination in food samples using gold nanoparticles as labels and light scattering detection." *Anal. Chim. Acta*, 2009, **636**, 58.
- [82] A. Ambrosi, F. Airò, and A. Merkoçi, "Enhanced Gold Nanoparticle Based ELISA for a Breast Cancer Biomarker." *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 1151.
- [83] Y. Zhou, X. L. Tian, Y. S. Li, F. G. Pan, Y. Y. Zhang, J. H. Zhang, L. Yang, X. R. Wang, H. L. Ren, S. Y. Lu, Z. H. Li, Q. J. Chen, Z. S. Liu and J. Q. Liu, "An enhanced ELISA based on modified colloidal gold nanoparticles for the detection of Pb(II)." *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 3700.
- [84] C. P. Jia, X. Q. Zhong, B. Hua, M. Y. Liu, F. X. Jing, X. H. Lou, S. H. Yao, J. Q. Xiang, G. H. Jin and J. L. Zhao, "Nano-ELISA for highly sensitive protein detection. " *Biosens Bioelectron.*, 2009, **24**, 2836.
- [85] M. Yang, Y. Kostov and A. Rasooly, "Carbon nanotubes based optical immunodetection of Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) in food." *Food Microbiology*, 2008, **127**, 78.
- [86] M. A. Aziz, S. Park, S. Jon and H. Yang, "Amperometric immunosensing using anindium tin oxide electrode modified with multi-walled carbon nanotube and poly copolymer." *Chemical communications*, 2007, **25**, 2610.

- [87] J. Okuno, K. Maehashi, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto and E. Tamiya, "Label-free immunosensor for prostate-specific antigen based on single-walled carbon nanotube array-modified microelectrodes." *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 2377.
- [88] N. V. Panini, G.A. Messina, E. Salinas, H. Fernandez and J. Raba, "Integrated microfluidic systems with an immunosensor modified with carbon nanotubes for detection of prostate specific antigen (PSA) in human serum samples." *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **23**, 1145.
- [89] Q. Zhang, B. Zhao, J. Yan, S. Song, R. Min and C. Fan, "Nanotube-Based Colorimetric Probe for Ultrasensitive Detection of Ataxia Telangiectasia Mutated Protein." *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 9191.
- [90] W. Chunglok, D. K. Wuragil and S. Oaew, "Immunoassay based on carbon nanotubes-enhanced ELISA for Salmonella enterica serovar Typhimurium." *Biosens Bioelectron*, 2011, **26**, 3584.
- [91] J. Wannlund, A. Jamshid, L. Levin and M. Deluca, "A bioluminescent immunoassay for methotrexate at the subpicomole level." *Biochem Biophys Res Commun.*, 1980, **96**, 440.
- [92] F. L. Mitchel, "Luminescent Assays: Perspectives in Endocrinology and Clinical Chemistry." *J Clin Pathol*, 1982, **35**, 1298.
- [93] M. P. Hall, J. Unch, B. F. Binkowski, M. P. Valley, B. L. Butler, M. G. Wood, P. Otto, K. Zimmerman, G. Vidugiris, T. Machleidt, M. B. Robers, H. A. Benink, C. T. Eggers, M. R. Slater, P. L. Meisenheimer, D. H. Klaubert, F. Fan, L. P. Encell and K. V. Wood, "Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate." *ACS Chem. Biol.*, 2013, **7**, 1848.
- [94] J. E. Cronan, "Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins." *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 10327.
- [95] P. J. Schatz, "Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in Escherichia coli." *Biotechnology*, 1993, **11**, 1138.
- [96] S. Bamrungsap, Z. Zhao, T. Chen, L. Wang, C. Li, T. Fu and W. Tan, "Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system." *Nanomedicine (Lond)*, 2012, **7**, 1253.

- [97] AL. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin and L. Huang, "Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes." *FEBS Lett*, 1990, **268**, 235.
- [98] Y. Matsumura and H. Maeda, "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs." *Cancer Res*, 1986, **46**, 6387.
- [99] H. Maeda, "Status quo ante, and future of Polymer drugs." *Drug Delivery System*, 2001, **16**, 136.
- [100] M. Yokoyama, G. S. Kwon, T. Okano, Y. Sakurai, T. Seto and K. Kataoka, "Preparation of micelle-forming polymer-drug conjugates." *Bioconjugate chem*, 1992, **3**, 295.
- [101] H. M. Patel, "Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis." *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1992, **9**, 39.
- [102] T. M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann and A. Yau-Young, "Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo." *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1066**, 29.
- [103] K. M. McNeeley, E. Karathanasis, A. V. Annapragada and R. V. Bellamkonda, "Masking and triggered unmasking of targeting ligands on nanocarriers to improve drug delivery to brain tumors." *Biomaterials*, 2009, **30**, 3986.
- [104] A. Kumari, S. K. Yadav and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems." *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, **75**, 1.
- [105] C. Fonseca, S. Simões and R. C. Gasparan, "Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity." *J. Control. Release*, 2002, **83**, 273.
- [106] V. sana, N. Pala and M. Sechi, "Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer." *Int. J. Nanomedicine*, 2012, **7**, 5501.
- [117] W. Chen, S. Zhang, Y. Yu, H. Zhang and Q. He, "Structural-Engineering Rationales of Gold Nanoparticles for Cancer Theranostics." *Adv Mater*, 2016, **28**, 8567.
- [108] P. D. Pietro, G. Strano, L. Zuccarello and C. Satriano, "Gold and Silver Nanoparticles for Applications in Theranostics." *Top Med Chem.*, 2016, **16**, 3069.

- [109] Z. Zhang, L. Wang, J. Wang, X. Jiang, X. Li, Z. Hu, Y. Ji, X. Wu and C. Z. Chen, “Mesoporous silica-coated gold nanorods as a light-mediated multifunctional theranostic platform for cancer treatment.” *Adv Mater.*, 2012, **24**, 1418.
- [110] H. Deng, F. Dai, G. Ma and X. Zhang, “Theranostic Gold Nanomicelles made from Biocompatible Comb-like Polymers for Thermochemotherapy and Multifunctional Imaging with Rapid Clearance.” *Adv Mater.*, 2015, **27**, 3645.
- [111] R. Herrero-Vanrell, A. C. Rincón, M. Alonso, V. Rebotto, I. T. Molina-Martinez and J. C. Rodríguez-Cabello, “Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release.” *J. Controlled Release*, 2006, **102**, 113.
- [112] I. Weitzhandler, M. Dzuricky, I. Hoffmann, F. Garcia Quiroz, M. Gradzielski and A. Chilkoti, “Micellar Self-Assembly of Recombinant Resilin-/Elastin-Like Block Copolypeptides.” *Biomacromolecules*, 2017, **18**, 2419.
- [113] A. Weinberger, V. Walter, S.R. MacEwan, T. Schmatko, P. Muller, A. P. Schroder, A. Chilkoti and C. M. Marques, “Cargo self-assembly rescues affinity of cell-penetrating peptides to lipid membranes.” *Sci Rep*, 2017, **7**, 43963.
- [114] M. H. Misbah, L. Quintanilla. M. Alonso and J. C. Rodríguez-Cabello, “Evolution of amphiphilic elastin-like co-recombinamer morphologies from micelles to a lyotropic hydrogel.” *Polymer*, 2015, **81**, 37.
- [115] J. C. Rodríguez-Cabello, F. J. Arias, M. A. Rodrigo and A. Girott, “Elastin-like polypeptides in drug delivery.” *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **97**, 85.
- [116] J. R. McDaniel, J. Bhattacharyya, K. B. Vargo, W. Hassouneh, D. A. Hammer and A. Chilkoti, “Self-assembly of thermally responsive nanoparticles of a genetically encoded peptide polymer by drug conjugation.” *Angew Chem*, 2013, **52**, 1683.
- [117] E. M. Mastria, M. Chen, J. R. McDaniel, X. Li, J. Hyun, M. W. Dewhirst and A. Chilkoti, “Doxorubicin-conjugated polypeptide nanoparticles inhibit metastasis in two murine models of carcinoma.” *J Control Release*, 2015, **208**, 52.
- [118] A. S. Soon, M. H. Smith, E. S. Herman, L. A. Lyon and T. H. Barker, “Development of self-assembling mixed protein micelles with temperature-modulated avidities.” *Adv Healthc Mater.*, 2013, **2**, 1045.

- [119] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama and K. Kataoka, "Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size." *Nat. Nanotechnol.*, 2011, **6**, 815.
- [120] J. U. Schmohl and D. A. Vallera, "CD133, Selectively Targeting the Root of Cancer." *Toxins*, 2016, **8**, 165.
- [121] S. K. Swaminathan, E. Roger, U. Toti, L. Niu, J. R. Ohlfest, J. Panyam, "CD133-targeted paclitaxel delivery inhibits local tumor recurrence in a mouse model of breast cancer." *J. Control Release*, 2013, **171**, 280.
- [122] A. J. Simnick, C. A. Valencia, R. Liu, A. Chilkoti, "Morphing low-affinity ligands into high-avidity nanoparticles by thermally triggered self-assembly of a genetically encoded polymer." *ACS Nano*, 2010, **4**, 2217.
- [123] P. Laakkonen, K. Porkka, J. A. Hoffman and E. Ruoslahti, "A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels." *Nat. Med.*, 2002, **8**, 751.
- [124] A. J. Simnick, M. Amiram, W. Liu, G. Hanna, M. W. Dewhirst, C. D. Kontos and A. Chilkoti, "In vivo tumor targeting by a NGR-decorated micelle of a recombinant diblock copolypeptide." *J Control Release*, 2011, **155**, 144.
- [125] Z. Yan, F. Wang, Z. Wen, C. Zhan, L. Feng, Y. Liu, X. Wei, C. Xie and W. Lu, "LyP-1-conjugated PEGylated liposomes: a carrier system for targeted therapy of lymphatic metastatic tumor." *J. Control Release*, 2012, **157**, 118.
- [126] S. Q. Geng, A. T. Alexandrou, J. J. Li, "Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis." *Cancer Lett*, 2014, **349**, 1.
- [127] K. F. Pirollo and E. H. Chang, Trends "Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake?" *Biotechnol*, 2008, **26**, 552.
- [128] J. M. Gump and S. F. Dowdy, "TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects." *Mol Med*, 2007, **13**, 443.
- [129] I. Massodi, E. Thomas and D. Raucher, "Application of thermally responsive elastin-like polypeptide fused to a lactoferrin-derived peptide for treatment of pancreatic cancer." *Molecules*, 2009, **14**, 1999.

- [130] P. M. Tiwari, E. Eroglu, S. S. Bawage, K. Vig, M. E. Miller, S. Pillai, V. A. Dennis and S. R. Singh, “Enhanced intracellular translocation and biodistribution of gold nanoparticles functionalized with a cell-penetrating peptide (VG-21) from vesicular stomatitis virus.” *Biomaterials*, 2014, **35**, 9484.
- [131] J. S. Ryu and D. Raucher, “Anti-tumor efficacy of a therapeutic peptide based on thermo-responsive elastin-like polypeptide in combination with gemcitabine.” *Cancer Lett*, 2014, 348, 177.
- [132] L. R. Walker, J. S. Ryu, E. Perkins, L. R. McNally and D. Raucher, “Fusion of cell-penetrating peptides to thermally responsive biopolymer improves tumor accumulation of p21 peptide in a mouse model of pancreatic cancer.” *Drug Des Devel Ther*, 2014, **8**, 1649.
- [133] K. K. Hou, H. Pan, L. Ratner, P. H. Schlesinger and S. A. Wickline, “Mechanisms of nanoparticle-mediated siRNA transfection by melittin-derived peptides.” *ACS Nano*, 2013, **7**, 8605.
- [134] N. T. Tran, T. H. Wang, C. Y. Lin, Y. C. Tsai, C. H. Lai, Y. Tai and B. Y. Yung, “Direct synthesis of Rev peptide-conjugated gold nanoparticles and their application in cancer therapeutics.” *Bioconjugate Chem*, 2011, **22**, 1394.
- [135] Q. Guo, H. Wang, Y. Zhao, H. Wang, F. Zeng, H. Hua, Q. Xu and Y. Huang, “Cell-penetrating albumin conjugates for enhanced doxorubicin delivery.” *Polym Chem*, 2013, **4**, 4584.
- [136] X. Liu, J. Jiang, Y. Ji, J. Lu, R. Chana and H. Meng, “Targeted drug delivery using iRGD peptide for solid cancer treatment.” *Mol Syst Des Eng*, 2017, **2**, 370.
- [137] L. Roth, C. Prahst, T. Ruckdeschel, S. Savant, S. Weström, A. Fantin, M. Riedel, M. Héroult, C. Ruhrberg and H. G. Augustin. “Neuropilin-1 mediates vascular permeability independently of vascular endothelial growth factor receptor-2 activation.” *Sci Signal*, 2016, **9**, 42.
- [138] K. N. Sugahara, T. Teesalu, P. P. Karmali, V. R. Kotamraju, L. Agemy, O. M. Girard, D. Hanahan, R. F. Mattrey and E. T. Ruoslahti, “Tissue-Penetrating Delivery of Compounds and Nanoparticles into Tumors.” *Cancer Cell*, 2009, **16**, 510.

- [139] K. N. Sugahara, T. Teesalu, P. P. Karmali, V. R. Kotamraju, L. Agemy, D. R. Greenwald and E. Ruoslahti, "Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs." *Science*, 2010, **328**, 1031.
- [140] X. Liu, J. Jiang, Y. Ji, J. Lu, R. Chana and H. Meng, "Targeted drug delivery using iRGD peptide for solid cancer treatment." *Mol. Syst. Des. Eng.*, 2017, **2**, 370.
- [141] D. T. McPherson, J. Xu and D. W. Urry, "Product purification by reversible phase transition following *Escherichia coli* expression of genes encoding up to 251 repeats of the elastomeric pentapeptide GVGVP." *Protein Expr. Purif.* 1996, **7**, 51.
- [142] A. C. Rincon, I. T. Molina-Martinez, B. de Las Heras, M. Alonso, C. Bailez, J. C. Rodriguez-Cabello, and R. Herrero-Vanrell, "Biocompatibility of elastin-like polymer poly(VPAVG) microparticles: in vitro and in vivo studies." *Journal of Biomedical Materials Research*, 2006, **78**, 343.
- [143] Y. Nakajima, K. Kobayashi, K. Yamagishi, T. Enomoto and Y. Ohmiya, "cDNA cloning and characterization of a secreted luciferase from the luminous Japanese ostracod, *Cypridina noctiluca*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2004, **68**, 565.
- [144] X. Zhang, Z. Xiong, Y. Wu, W. Cai, J. R. Tseng, S. S. Gambhir, and X. Chen, "Quantitative PET Imaging of Tumor Integrin  $\alpha\beta_3$  Expression with  $^{18}\text{F}$ -FRGD2." *Nucl Med.*, 2006, **47**, 113.
- [145] B. De Campos Vidal, "The use of the fluorescent probe 8-anilino-naphthalene sulfate (ANS) for collagen and elastin histochemistry." *J. Histochem. Cytochem.*, 1978, **26**, 196.
- [146] H. Hatakeyama, H. Akita and H. Harashima, "A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma." *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, **63**, 152.

## 謝辞

本論文は、筆者が東京工業大学生命理工学研究科生命情報専攻博士課程の学生として、小島・三重研究室に在籍した、3年間の研究をまとめたものです。

本研究を行うにあたり、終始懇切なる御指導と御助言を賜りました恩師、小島 英理先生（東京工業大学 教授）に甚大なる謝意を表します。私が曲がりなりにも3年間で博士論文をまとめることができたのは、先生が研究者としてのやりがいと面白さを常に私に示してくださり、私のゆっくりとした成長に辛抱強く付き合ってくださいましたからに他なりません。心より深く御礼申し上げます。また、日々の研究において多大なる御指導、御助言を下された 三重 正和 先生（東京工業大学 准教授）に深く御礼申し上げます。どんな時でも明晰かつ厳密に、そして丁寧で温かい御指導をいただきました。先生の御指導により、本研究にいつそう深く取り組むことができました。心より御礼申し上げます。また、研究の進捗や、本論文をまとめるにあたり適宜ご指導いただきました 眞下 泰正 先生（東京工業大学 助教）に御礼申し上げます。博士課程の3年間、研究室の先生方からは常に代わらぬ温かい御指導を賜りました。ここに改めて深く感謝の意を申し上げます。

本実験を遂行するにあたり。2・3章の粒子径測定において動的光散乱計 Nano-ZS の使用を許可して下さった 三原 久和 先生（東京工業大学 教授）に心より感謝いたします。また、Nano-ZS の使用法を深く御指導いただきました、堤 浩 先生（東京工業大学 准教授）に心より感謝いたします。

4章の動物実験において、貴重な御指導と御助言を頂き、実験施設の使用を許可して下さった 西山 伸宏 先生（東京工業大学 教授）に心より感謝いたします。また、*in vivo* 実験で親身な御指導、御鞭撻を頂きました、野本 貴大 先生（東京工業大学 助教）に心より感謝いたします。

研究者として多くの御助言をくださった小島・三重研究室の先輩方、同期および後輩の皆さんに感謝致します。

最後になりましたが、博士課程に進学する機会を与えてくださり、今日まで私を温かく見守り続けてくれた両親と祖母に深く感謝いたします。27年もの長い歳月において経済的負担をさせてしまいましたが、これから少しずつ時間をかけて恩返しをさせてください。

本研究の成果が皆様のご期待に沿うものかどうか甚だ疑問ではありますが、ここに重ねて厚く謝意を表し、謝辞といたします。

2018年 2月 27日

池田 裕介