

# アデノウイルスカプシドタンパク質の機能解析および DDS 技術への応用に関する研究

薬剤学研究室 平井 孝昌

## 【緒言】

近年、低分子化合物と並び、タンパク質や遺伝子を応用した医薬品の開発が進められている。しかし、細胞内で効果を示す医薬品はいまだに低分子化合物に限られており、その理由の一つとして、タンパク質や遺伝子などの水溶性の高い高分子の細胞膜透過性が低いことが挙げられる。そのため、これらの高分子を細胞内で効果を示す医薬品として応用するには、細胞内への効率的な送達が可能となる Drug Delivery System (DDS) 技術が重要となる。そこで、本研究は DDS 技術に応用可能な新規機能性タンパク質の同定を目的とし、アデノウイルス (Ad) カプシドタンパク質の shaft タンパク質および knob タンパク質に着目し、その機能解析および DDS 技術への応用可能性について検討した。

## 【結果・考察】

### 1. shaft タンパク質の細胞膜透過性に関する検討

35 型 Ad の shaft タンパク質 (Ad35shaft) は、細胞膜透過性および遺伝子導入促進作用を有することから、目的物質の細胞内への送達に用いられる細胞膜透過性ペプチド (CPPs) として応用可能であると考え、活性領域およびその相互作用分子について検討した。活性領域の検討では、Ad35shaft を断片化したペプチド (Fig. 1) のうち、C 末端側の 44 アミノ酸 (Peptide B) および 26 アミノ酸 (Peptide C) が細胞への結合能および細胞膜透過性を有することを明らかとした。そこで、Peptide C の相互作用分子を同定するために、pull down assay を行った結果、複数のバンドが見られた。各バンドを回収し、nano-LC MS/MS により解析したところ、Heat shock protein (HSP) ファミリーの 70-kDa heat shock cognate protein (Hsc70)、70-kDa heat shock protein (Hsp70)、90-kDa heat shock protein  $\beta$  (Hsp90 $\beta$ ) が検出され、ELISA 法により各 HSP と Peptide C が直接結合することが明らかとなった。さらに、Hsc70 に対する short hairpin RNA (shRNA) により、細胞表面の Hsc70/Hsp70 発現量を減少させた K562 細胞 (Hsc70 ノックダウン細胞) を用いて、Peptide C の細胞への結合における HSP の関与を検討した。その結果、Peptide C の細胞膜結合量は shRNA 非発現細胞よりも Hsc70 ノックダウン細胞の方が低かった。これらのことから、Peptide C の細胞への結合に HSP が関与することが示唆された。また、分子量 4 万の FITC-dextran (FD40) をモデル高分子として用い、Peptide C の共存物質の細胞内取り込み促進能を評価した。その結果、FD40 単独に比べ Peptide C 存在下において細胞内 FD40 に起因する蛍光強度が高くなったことから、Peptide C により FD40 の細胞内取り込みが促進されることが示された。これらの結果より、Ad35shaft から同定した Peptide C は、HSP を認識する分子特異的な CPP として機能することが示唆された。

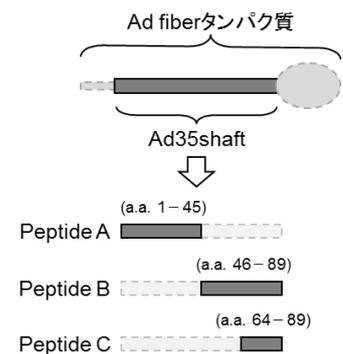


Fig. 1 Ad35shaftの断片化ペプチドの模式図

## 2. 細胞間移行能を有する knob タンパク質の DDS キャリアとしての有用性評価

5 型 Ad の knob タンパク質 (Ad5knob) は細胞内で生成すると、発現細胞だけではなく、他の細胞膜上にも存在し、細胞間を移行することを見出した。そこで、Ad5knob はタンパク質等を細胞から他の細胞へ送達する、新規 DDS キャリアとして応用可能であると考え、機能性タンパク質と融合した Ad5knob を用いて DDS キャリアとしての有用性評価を行った。機能性タンパク質のモデルには、細胞障害性を有するコレラ毒素の A サブユニット (NCTXA) を用い、Ad5knob と遺伝子工学的に融合した NCTXA-Ad5knob (Fig. 2A) について検討した。まず、*in vitro* における機能評価の結果、NCTXA-Ad5knob は、Ad5knob と同様に、発現細胞だけではなく、共培養した細胞膜上にも存在した。また、propidium iodide (PI) 染色にて細胞障害性を評価した結果、Ad5knob 発現細胞と比べて、NCTXA-Ad5knob 発現細胞の方が PI 陽性割合が高かった。これらのことから、NCTXA-Ad5knob は、細胞間移行能および細胞障害性を保持していることが示され、Ad5knob は機能性タンパク質との融合が可能であることが示唆された。次に、*in vivo* における機能評価として、Ad5knob の標的分子である human coxsackievirus and adenovirus receptor (hCAR) を発現させた B16 細胞を用いて作製した担がんマウスにおける抗腫瘍効果を検討した。Day 7 および 11 に各種発現プラスミドを腫瘍内に直接投与し、経時的に腫瘍の大きさを測定した結果、NCTXA-Ad5knob 発現プラスミド投与群は、Ad5knob や NCTXA 発現プラスミド投与群と比べて、腫瘍の増大が有意に抑制された (Fig. 2B)。これらの結果より、細胞間移行能を有する Ad5knob は、機能性タンパク質を周囲の細胞へ送達する DDS キャリアとして機能することが示唆された。

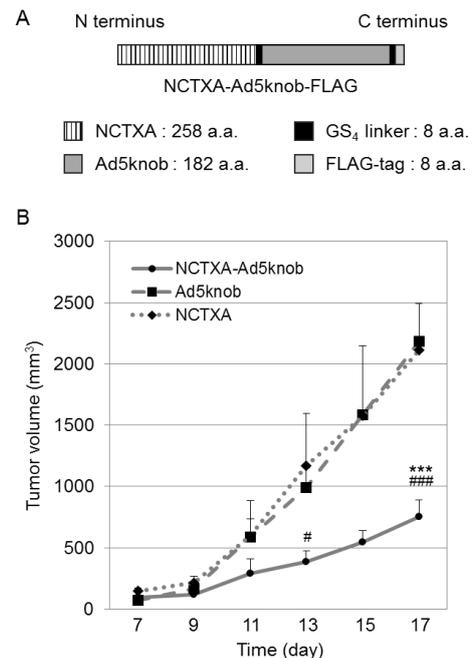


Fig. 2 NCTXA-Ad5knobの抗腫瘍効果  
A: NCTXA-Ad5knobの模式図  
B: hCAR発現B16細胞を用いて作製した担がんマウスにおけるNCTXA-Ad5knobの抗腫瘍効果  
(\*\*\* $p < 0.005$  vs. Ad5knob発現プラスミド投与群, # $p < 0.05$ , ### $p < 0.005$  vs. NCTXA発現プラスミド投与群)

### 【結論】

本研究において、高分子の細胞内取り込みを促進する Peptide C および融合した機能性タンパク質を発現細胞から他の細胞へ送達可能な Ad5knob を新たに同定した。本研究の成果は、既存の DDS 技術への適用にとどまらず、新規 DDS 技術の開発において有益な知見であり、タンパク質や遺伝子を用いた医薬品開発や新規治療法の確立に貢献できると考えている。

### 【本研究の誌上発表】

Hirai T., Yamagishi Y., Koizumi N., Nonaka M., Mochida R., Shida K., Nomura T., Fujii M., Sakurai F., Mizuguchi H., Watanabe Y., and Utoguchi N. Identification of adenovirus-derived cell-penetrating peptide. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 195–204 (2017)