

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		多層ナノキャリアへの核移行シグナル分子の導入による高効率遺伝子デリバリー			
研究テーマ (欧文) AZ		Introduction of nuclear localization signal to the multi-layered nanocarrier for efficient gene delivery			
研究氏 代表名 者	カタカナ CC	姓)ワカバヤシ	名)リエ	研究期間 B	2014 ~ 2015 年
	漢字 CB	若林	里衣	報告年度 YR	2015 年
	ローマ字 CZ	Wakabayashi	Rie	研究機関名	九州大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		九州大学大学院工学研究院応用化学部門・助教			
概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。)					
<p>近年、がんを初めとする難治性疾患に関連する遺伝子が明らかになってきており、このような疾患の治療法として、遺伝子治療が注目を集めるようになってきている。遺伝子を標的の組織・細胞に送達させるためのキャリアは、主にウイルス型と非ウイルス型に分類することが出来るが、安全性が高い非ウイルス型のキャリアの遺伝子導入効率の向上が強く望まれている。本研究では、遺伝子を生体安全性の高い界面活性剤で多重に包んだ多層ナノキャリアに、機能性ペプチドを導入することで、細胞導入効率と遺伝子発現効率の向上を目指した。</p> <p>エマルション形成と凍結乾燥を二度繰り返すことで、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) あるいは EGFP 発現遺伝子を界面活性剤で二重に包んだ多層ナノキャリアを調製した。機能性ペプチドとして、最外層にカチオン性ペプチド、内層に膜融合ペプチド、最内層に核移行シグナル (NLS) ペプチドの導入を試みた。キャリアへのペプチドの導入は、カチオン性ペプチドと膜融合ペプチドには長鎖アルキル基を、NLS ペプチドには、遺伝子結合性ペプチド配列を導入することにより行った。</p> <p>まず、タンパク質 EGFP を用いた CHO 細胞への導入試験の結果、カチオン性ペプチドと膜融合ペプチドの導入により、細胞質内へのタンパク質導入効率が向上することが確認された。この結果から、カチオン性ペプチドの導入により細胞膜への親和性が向上し、膜融合ペプチドの導入により細胞質内へのタンパク質の放出が促されることが示差された。遺伝子の発現効率を向上させるためには、細胞質から更に核へと遺伝子を移行させる必要がある。そこで、NLS として知られる SV40 ウイルス由来、あるいは cMyc 遺伝子由来のペプチドと、遺伝子結合性の塩基性ペプチドを繋げた機能性ペプチドを設計し、遺伝子との結合性および遺伝子導入効率を評価した。その結果、cMyc 遺伝子由来のものと比較して、SV40 ウイルス由来ペプチドを導入した機能性ペプチドにおいて、遺伝子導入効率が向上することが確認された。</p>					
キーワード FA	エマルション	遺伝子デリバリー	ペプチド		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Recent development in molecular biology has revealed disease-related genes for cancer and other refractory diseases and thus gene therapy has attracted attention. There are two types of carriers that can deliver therapeutic genes to targeted organs and cells, which are viral and non-viral carriers. Despite the high transduction efficiency of viral carriers, issues arise such as their natural tropism and immune responses. Non-viral carriers are attractive alternatives in that they are safe and designable, though their lower transduction ability remains a challenge. In this study, we developed a multi-layered gene nanocarrier introduced with functional peptides for higher gene delivery and transduction efficiency.

Two cycles of emulsification and freeze-drying using two different kinds of surfactants produced a double-coated nanocarrier that encapsulated the enhanced green fluorescent protein (EGFP) or EGFP-coded vector. As functional peptides, we introduced a cationic peptide, membrane fusogenic peptide, and nuclear localization signal (NLS) peptide to the outermost, inside, and innermost layers, respectively. To introduce these peptides to the double-coated nanocarrier, the cationic and membrane fusogenic peptides were conjugated with long alkyl chains, and the NLS peptide was fused with a gene-binding peptide.

The in vitro delivery of EGFP into CHO cells revealed that the introduction of cationic and membrane fusogenic peptides increased the delivery efficiency of the protein into cytoplasm. This result suggested that the outermost cationic peptide increased the affinity of the carrier with cell membranes and the inner membrane fusogenic peptide could promote the release of the protein into cytoplasm. For a higher transduction efficiency, genes should be delivered from cytoplasm to nucleus: therefore, we designed new peptides with SV40 virus-derived and cMyc-derived NLS peptides fused with a gene-binding peptide. The transduction efficiency was higher with SV40 virus-derived peptide than with cMyc-derived one.