

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18689

研究課題名(和文)新しい細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジンを利用した効率的な分子輸送技術の開発

研究課題名(英文)Functional analysis of novel cell-penetrating peptide "Polyhistidine" for application to molecular delivery

研究代表者

岩崎 崇 (Iwasaki, Takashi)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：30585584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新しい細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジンを利用したリポソーム薬物輸送、経口薬物輸送、植物細胞への分子輸送、の開発基盤研究を遂行した。その結果、長鎖ポリヒスチジン(H16)をリポソームに修飾することで、高い細胞膜透過能を有するリポソームの作出に成功した。また、長鎖ポリヒスチジン(H16)は、人工的に形成した腸管上皮細胞層を通過することも確認された。一方で、短鎖ポリヒスチジン(H6～H10)は植物細胞に対して高い細胞膜透過を示すことが明らかになった。本研究成果より、ポリヒスチジンは鎖長を変えることで様々な分野の薬物・分子輸送キャリアーとして応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we found polyhistidine peptides (PHPs), as the novel cell-penetrating peptide. Here, we report various potential capacities of PHPs for the application to 1) liposomal DDS (drug delivery system), 2) oral DDS and 3) molecular delivery into plant cells. Firstly, H16 peptide-modified liposome (H16-Lipo) was efficiently internalized into HT1080 human fibrosarcoma cells and localized to Golgi apparatus and lysosome. This result implies the H16-Lipo has potential to be used for "Golgi apparatus and lysosome-targeting DDS". Secondly, H16 peptide moved across epithelial monolayer constructed of CaCo-2 human colon carcinoma. This indicates H16 peptide has capacity for application to oral DDS carrier via intestinal epithelia. Finally, in contrast to the result of human cell lines, short PHPs (H6-H10) showed effective internalization into plant cells. This indicates short PHPs (H6-H10) have potential to be used for molecular delivery into plant cells.

研究分野：ペプチド化学、細胞生物学

キーワード：細胞膜透過ペプチド ヒスチジン 薬物輸送 リポソーム 腸管上皮 植物細胞

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜透過ペプチドは、有効な薬物輸送キャリアーとして現在注目を集めている。我々は、これまでの研究から、新しい細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジンを発見した。ポリヒスチジンは、ヒスチジンのみが連続したシンプルなペプチドであるが、動物細胞に対して高い細胞膜透過能を有するユニークなペプチドである (Iwasaki T. et al. *J. Control. Release*, **210**, 2015)。そこで本研究では、ポリヒスチジンを様々な分野に応用するべく、ポリヒスチジンを利用した分子輸送技術の基盤構築を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究では、ポリヒスチジンを利用することで、高効率かつユニークな分子輸送技術の開発に挑戦した。具体的には、以下の三つの分子輸送技術の基盤構築を試みた。

#### (1) ポリヒスチジンのリポソーム輸送

動物細胞に対して高い膜透過性を示すポリヒスチジン (H16) を利用して、ポリヒスチジン (H16) 修飾リポソームを構築し、細胞内への効率的な分子輸送技術の基盤を確立する。

#### (2) ポリヒスチジンの腸管上皮細胞層透過

動物細胞に対して高い膜透過性を示すポリヒスチジン (H16) の腸管上皮細胞層透過能を調べることで、ポリヒスチジン (H16) を利用した経口薬物輸送技術の基盤を確立する。

#### (3) ポリヒスチジンの植物細胞膜透過

様々な鎖長のポリヒスチジンの植物細胞に対する細胞壁・細胞膜透過を調べることで、ポリヒスチジンを利用した植物細胞内への分子輸送技術の基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試細胞

本研究では、動物細胞として HT1080 (ヒト線維肉腫由来細胞: RCB1956)、RERF-LC-AI (ヒト肺扁平上皮癌由来細胞: RCB0444)、U251 (ヒト神経膠腫由来細胞: RCB0461)、CaCo-2 (ヒト大腸癌細胞: RCB0988)、Jurkat (ヒト T 細胞性白血病由来細胞: RCB0806)、RAJI (ヒトバーキットリンパ腫由来細胞: RCB1647)、KG-1 (ヒト急性骨髄性白血病: RCB1166)、THP-1 (ヒト急性単球性白血病: RCB1189) を供試細胞として用いた。HT1080、RERF-LC-AI、CaCo-2 の培養には MEM 培地、U251 の培養には D-MEM 培地、Jurkat、RAJI、KG-1、THP-1 の培養には RPMI1640 培地を使用した。各培地は、ウシ胎児血清 (FBS) を 10% 含有する状態で使用した。CaCo-2 のみ、FBS を 20% 含有するよう添加した。全動物細胞は、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> 条件にて培養した。

一方で、植物細胞として BY-2 (タバコ培養細胞: rpc00001) を供試細胞として用いた。

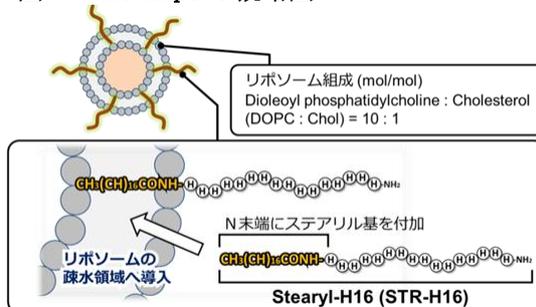
BY-2 細胞の培養には LS (Linsmaier and Skoog) 培地を用いて、200 rpm、27°C の条件にて振とう培養した。

#### (2) ポリヒスチジン (H16) 修飾リポソームの調製

リポソーム構成リン脂質である Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) と Cholesterol をクロロホルムに溶解させ、それぞれ 500 nmol と 50 nmol を試験管内で混合した。その後、デシケーターで減圧乾燥し、さらに凍結乾燥機で乾燥させることで、リン脂質のフィルムを形成させた。次に、試験管に 10 mM Fluorescein (pH7.4 に調節した PBS に溶解) を 500 μL 添加し、水和させた。ボルテックス懸濁後、超音波処理を 1 min 行い、室温暗所で 30 min 静置した。その後、凍結融解を 5 回繰り返し、Avanti Polar Lipids 社のリポソーム調製器 (Mini-Extruder) を使用し、100 nm フィルターに 19 回通過させることで、リポソーム溶液を調製した。調製したリポソーム溶液 50 μL を illustra MicroSpin™ S-300 HR Columns (GE Healthcare Life Sciences) に供し、遠心分離 (735 x g、1 min) によってゲル濾過精製を行った。

精製したリポソーム溶液に対して、任意濃度の STR-H16 (N 末端をステアリル化した H16) を添加し、室温・暗所で 1 h インキュベーションすることで、ポリヒスチジン (H16) 修飾リポソーム (H16-Lipo) を調製した (図 1)。

図 1. H16-Lipo の概略図



#### (3) ポリヒスチジン (H16) 修飾リポソームの細胞膜透過の評価

培養細胞を  $5.0 \times 10^5$  cells/mL/well となるように 6 ウェルマルチプレートに播種し、5.0% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で前培養した。24 h 後、新しい培地に交換し、H16-Lipo 溶液を終濃度 100 μM (DOPC 換算) となるように各ウェルに添加した。5.0% CO<sub>2</sub>、37°C で 3 h インキュベーションした後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.05% トリプシン溶液 (0.53 mM EDTA 含有) 処理により細胞を剥離した。遠心分離 (500 x g、5 min) により細胞を回収し、500 μL の FACS 緩衝液 (2% FBS 含有 PBS) によく懸濁した。細胞懸濁液を、フローサイトメーター BD FACSCanto II に供し、細胞内蛍光強度

を測定することで、H16-Lipo の細胞膜透過能を評価した。この際、ペプチド未修飾のリポソームを、ネガティブコントロールとして用いた。

#### (4) ポリヒスチジン (H16) 修飾リポソームの細胞内局在の評価

培養細胞を  $2 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ L/well となるように 35 mm glass bottom dish (松浪硝子工業株式会社) に播種し、5.0% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で前培養した。24 h 後、新しい培地に交換し、H16-Lipo 溶液を終濃度 100  $\mu$ M (DOPC 換算) となるように細胞に添加した。同時に、Tetramethylrhodamine (TAMRA) で標識した TAMRA-H16 を、終濃度 10  $\mu$ M となるように細胞に添加 (共投与) した。5.0% CO<sub>2</sub>、37°C で 3 h インキュベーションした後、細胞を PBS で 2 回洗浄した。顕微鏡観察の前に、Hoechst33342 (同仁化学) により、細胞の核を蛍光染色した。

H16-Lipo、TAMRA-H16 および Hoechst33342 で処理した細胞を、共焦点レーザー顕微鏡 FV10i-LIV/FV10i-DOC (OLYMPUS) により観察した。細胞内における H16-Lipo、TAMRA-H16 および核 (Hoechst33342 染色) の位置関係を解析した。

#### (5) 腸管上皮細胞層透過の評価

CaCo-2 を MEM 培地に懸濁し、96-Well Cell Culture Devices (MILLIPORE) の Cell culture plate (上層) の各ウェルに  $9.0 \times 10^3$  cells/100  $\mu$ L/well となるように播種した。また、Receiver plate (下層) の各ウェルには MEM 培地を 250  $\mu$ L 添加した。3 日おきに新鮮な MEM 培地に交換し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベートした。21 日間培養を継続することにより、腸管上皮細胞層を人工的に形成した。

腸管上皮細胞層が形成された後、Cell culture plate (上層) のウェルを HBSS 100  $\mu$ L で 3 回洗浄し、蛍光標識したポリヒスチジン (H16) と、代表的な細胞膜透過ペプチド (R8) を、終濃度 10  $\mu$ M になるように添加した。また、Receiver plate (下層) のウェルには HBSS を 250  $\mu$ L 添加した。そして、Cell culture plate (上層) と Receiver plate (下層) を合わせ、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベートした。

経過時間 (1 h、2 h、3 h、6 h、12 h) ごとに Receiver plate (下層) の HBSS を回収し、蛍光強度を測定することで、腸管上皮細胞層を透過したペプチド量を定量した (図 2)。

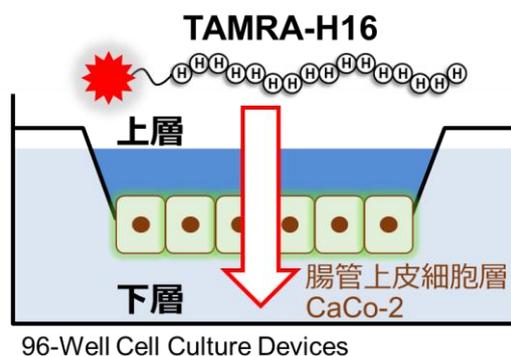
#### (6) 植物細胞に対する膜透過の評価

タバコ BY-2 細胞 ( $2.0 \times 10^4$  cells/mL) に、様々な鎖長のポリヒスチジン (H8~H20) を終濃度 1  $\mu$ M となるように添加し、27°C で 12 h 振とう培養 (200 rpm) した。その後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、Digestion medium (Cellulase 300 mg, Macerozym 20 mg,

Pectolyase 10 mg, CaCl<sub>2</sub> 117 mg, MES 530 mg, Sucrose 15.4 g, up to 10 mL) を加え、27°C で 3 h 振とう培養 (60 rpm) することで、プロトプラスト化 (細胞壁除去) した。その後、W5 buffer (NaCl 4.49 g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 9.1 g, KCl 186 mg, MES 533 mg, up to 100 mL) で 3 回洗浄を行い、遠心分離 (100 x g, 3 min) により、プロトプラストを沈殿として回収した。

タバコ BY-2 細胞は、プロトプラスト化の前後で、共焦点レーザー顕微鏡 FV10i-LIV/FV10i-DOC (OLYMPUS) を用いて、蛍光写真の撮影を行った。また、細胞内に取り込まれたポリヒスチジンを定量するために、プロトプラスト化した細胞の蛍光写真に関して、細胞内の蛍光ピクセル数を測定した。

図 2. 腸管上皮細胞層透過の評価の概略図



## 4. 研究成果

### (1) ポリヒスチジンのリポソーム輸送

最初に、H16-Lipo の最適な調製方法を決めるために、リポソームに対する STR-H16 の表面修飾率の検討を行った。その結果、リポソーム表面に導入する STR-H16 の量に比例して、H16-Lipo の細胞膜透過量が増加することが確認された。さらに、表面修飾率 20% 以上において、H16-Lipo は効率的な細胞膜透過 (未修飾 Lipo の 12.8 倍以上) を示し、以降の細胞膜透過量はほぼ一定であったことから、リポソームに対する STR-H16 の最適表面修飾率を『20%』に決定した (図 3)。以降の解析では、STR-H16 表面修飾率 20% の H16-Lipo を使用した。

次に、H16-Lipo の細胞選択性について調べた結果、H16-Lipo は付着系細胞株に対して高い細胞膜透過を示し、特にヒト線維肉腫細胞株 HT1080 に対して最も高い細胞膜透過を示した (図 4)。よって、以降の解析においては HT1080 細胞を使用した。

さらに、H16-Lipo 細胞内局在を解析するために、H16-Lipo と TAMRA-H16 を細胞に共投与した結果、H16-Lipo と TAMRA-H16 は細胞内において共局在することが明らかになった。これまでの研究から、TAMRA-H16 はゴルジ体およびリソソームに局在することが分かっている (Iwasaki T. et al. *J. Control. Release*, **210**, 2015)。このことから、H16-Lipo も同様に細胞内においてゴルジ体およびリソソーム

ムに局在することが明らかとなった(図5)。

以上の結果から、ポリヒスチジン(H16)はリポソームを細胞内に導入する能力も有していることが確認された。またH16-Lipoは、ゴルジ体・リソソームといった細胞小器官を標的とした薬物輸送に応用可能であると考えられる。

図3. リポソームに対するH16の最適修飾率の検討

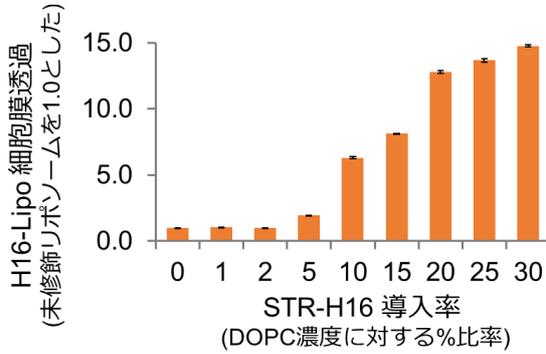


図4. H16-Lipoの細胞選択性

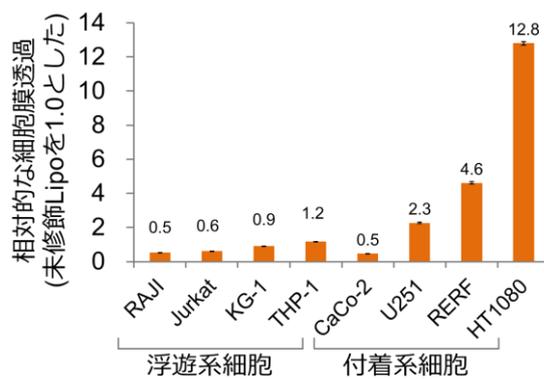
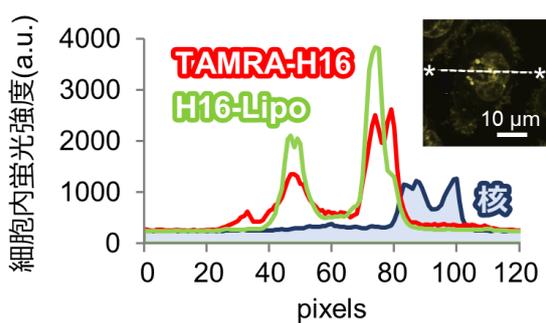


図5. H16-Lipoの細胞内局在



(2) ポリヒスチジンの腸管上皮細胞層透過

ポリヒスチジン(H16)の経口DDSへの応用性を評価するため、人工的に形成した腸管上皮(CaCo-2細胞)を用いた上皮細胞層透過試験を行った。人工的に形成させた上皮細胞層の上層側から蛍光標識したポリヒスチジン(TAMRA-H16)を添加し、下層側へ移行した蛍光量を測定することで、ポリヒスチジン(H16)の上皮細胞層透過能を測定した。既に上皮細胞層を透過することが分かっている

既知の細胞膜透過ペプチド(R8)と比較したところ、ポリヒスチジン(H16)は明確な上皮細胞層透過を示すことが分かった(図6)。さらに興味深いことに、ポリヒスチジン(H16)の上皮細胞層透過は、迅速である(初速度が大きい)という特徴を有していることが明らかになった(図7)。

以上の結果から、ポリヒスチジン(H16)は上皮細胞層を透過(通過)する能力を有していることが確認された。すなわち、ポリヒスチジン(H16)は腸管上皮を介した経口薬物輸送キャリアーとして有力な素材であることが示唆された。

図6. H16の腸管上皮細胞層の透過効率

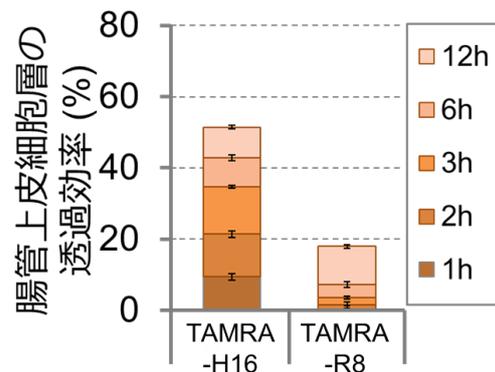
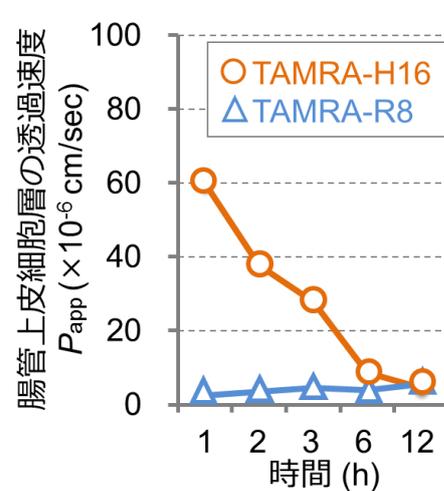


図7. H16の腸管上皮細胞層の透過速度



(3) ポリヒスチジンの植物細胞に対する細胞膜透過

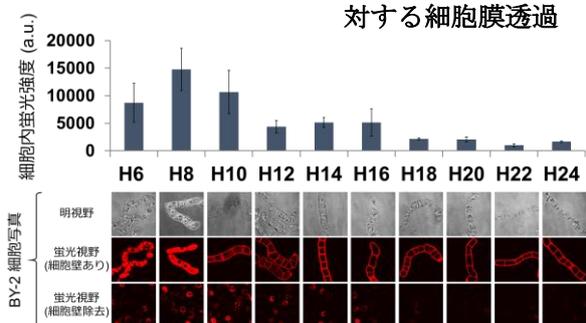
これまでに、動物細胞に対しては、長鎖(ヒスチジン16残基以上)のポリヒスチジンが高い細胞膜透過を示すことが分かっていたが、植物細胞に対しては全く未知であった。そこで、様々な鎖長のポリヒスチジンを合成し、植物細胞(タバコBY-2細胞)に対する細胞膜透過を評価した。

その結果、非常に面白いことに、植物細胞に対しては、短鎖(ヒスチジン6~10残基)のポリヒスチジンが高い細胞膜透過を示すことが確認された(図8)。一方で、ヒスチジン12残基以上のポリヒスチジンは細胞膜透過

を示さないことが確認された。特に、植物細胞においては、10 残基以上のポリヒスチジンが細胞壁にトラップされることが確認された。

以上の結果から、動物細胞に対しては長鎖(ヒスチジン 16 残基以上)のポリヒスチジンが高い細胞膜透過を示したのに対して、細胞壁を有する植物細胞に対しては短鎖(ヒスチジン 6~10 残基)のポリヒスチジンが高い細胞膜透過を示すことが確認された。細胞壁の有無により、明確に正反対の結果が得られたことは、大変興味深いことである。このような結果が得られた理由は未だ明らかになっていないが、短鎖(ヒスチジン 6~10 残基)ポリヒスチジンが、植物細胞に対して有効な細胞膜透過ペプチドであることが確認されたことから、植物細胞に対する分子輸送キャリアーとしての応用が期待できる。

図 8. ポリヒスチジンの植物細胞に対する細胞膜透過



#### (4) 総括

本研究を通じて、我々はポリヒスチジンが様々な用途に応用可能であることを見出した。

長鎖ポリヒスチジンであるポリヒスチジン(H16)は、リポソームを細胞内のゴルジ体・リソソームへと輸送する能力を有していることが明らかになった。この結果から、ポリヒスチジン(H16)を修飾したリポソームは、ゴルジ体・リソソームといった細胞小器官を標的とした薬物輸送技術に応用できると言える。

また、ポリヒスチジン(H16)は人工的に構築した腸管上皮細胞層を透過(通過)することも明らかになった。興味深いことに、ポリヒスチジン(H16)の透過速度は既知の細胞膜透過ペプチドよりも迅速であることが確認された。このことから、ポリヒスチジン(H16)は、腸管上皮を介して迅速に体内吸収される薬物輸送技術に応用できると考えている。具体的には、食後すぐに吸収が必要とされるインスリンのような難吸収性の化合物に対して、優れた経口薬物輸送キャリアーになり得ると期待している。

一方で、植物細胞といった細胞壁を有する細胞に対しては、短鎖ポリヒスチジン(H6~H10)が高い細胞膜透過を示すことが明らかとなった。従来の細胞膜透過ペプチドは、植

物細胞の細胞壁に電荷的にトラップされてしまうため、植物細胞に対しては有効でないと考えられている。この点において、短鎖ポリヒスチジン(H6~H10)は細胞壁を通過して、植物細胞内まで移行できることから、植物細胞に対して有効な分子輸送キャリアーになり得ると言える。

以上の知見より、動物細胞に対しては長鎖ポリヒスチジン、植物細胞に対しては短鎖ポリヒスチジンといったように、標的細胞に応じてヒスチジン鎖長を使い分けることで、効率のかつ選択的な分子輸送技術につなげることが可能である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① S. Kimura, T. Kawano, T. Iwasaki. Short polyhistidine peptides penetrate effectively into *Nicotiana tabacum*-cultured cells and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 112-118 (2017) 査読有  
DOI: 10.1080/09168451.2016.1234925
- ② T. Matsukawa, Y. Matsunaga, T. Iwasaki, K. Nagata, M. Tanokura, T. Kawano. Comparison of physiological functions between antagonistic Insulin-like peptides, INS-23 and INS-18 in *Caenorhabditis elegans*. *Peptide Science* 2016, 45-46 (2017) 査読有
- ③ T. Hayashi, M. Shinagawa, T. Kawano, T. Iwasaki. Cellular uptake and lysosomal targeting property of Poly-histidine peptide-modified liposome. *Peptide Science* 2016, 151-152 (2017) 査読有
- ④ Y. Kunitatsu, M. Saga, T. Iwasaki, T. Kawano. NLP-3, a C-terminal peptide amide of *Caenorhabditis elegans* regulates its larval diapause by modulating secretion of a TGF- $\beta$ -like peptide, DAF-7. *Peptide Science* 2016, 213-214 (2017) 査読有
- ⑤ Y. Matsunaga, Y. Honda, S. Honda, T. Iwasaki, H. Qadota, G.M. Benian, T. Kawano. Diapause is associated with a change in the polarity of secretion of insulin-like peptides. *Nat. Commun.*, **7**, 10573 (2016) 査読有  
DOI: 10.1038/ncomms10573
- ⑥ Y. Matsunaga, Y. Honda, S. Honda, T. Iwasaki, H. Qadota, G.M. Benian, T.

Kawano. *C. elegans* insulin-like peptides, INS-35 and INS-7, change their secretion polarity in larval diapause. *Peptide Science* 2015, 79-82. (2016) 査読有

- ⑦ T. Iwasaki, Y. Tokuda, A. Kotake, H. Okada, S. Takeda, S. Kimura, M. Shinagawa, T. Kawano. Functional analysis of novel cell-penetrating peptide "Polyhistidine" for application to drug delivery. *Peptide Science* 2015, 211-214. (2016) 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① S. Kimura, T. Kawano, T. Iwasaki. Short polyhistidine peptides penetrate effectively into *Nicotiana tabacum*-cultured cells and *Saccharomyces cerevisiae* cells. AFELiSA 2016, 2016年11月9日、(大田市・韓国)
- ② T. Hayashi, M. Shinagawa, T. Kawano, T. Iwasaki. Cellular uptake and lysosomal targeting property of Poly-histidine peptide-modified liposome. 第53回ペプチド討論会、2016年10月26日、(京都テルサ・京都市)
- ③ S. Kimura, T. Kawano, T. Iwasaki. Short Poly-histidine peptides Penetrate effectively into *Nicotiana tabacum* cultured cells and *Saccharomyces cerevisiae* cells. 第53回ペプチド討論会、2016年10月26日、(京都テルサ・京都市)
- ④ 井上 千穂、河野 強、岩崎 崇、ヒスチジンリッチタンパク質/ペプチドの細胞膜透過機能に関する研究、平成28年度日本農芸化学会、2016年3月28日、(札幌コンベンションセンター・札幌市)
- ⑤ T. Iwasaki, Y. Tokuda, A. Kotake, H. Okada, S. Takeda, S. Kimura, M. Shinagawa, T. Kawano. Functional analysis of novel cell-penetrating peptide "Polyhistidine" for application to drug delivery. 第52回ペプチド討論会、2015年11月16日、(平塚中央公民館・平塚市)
- ⑥ 岩崎 崇、新しい細胞膜透過ペプチド『ポリヒスチジン』、日本農芸化学会 中四国支部 第19回若手シンポジウム、2015年5月15日、(岡山大学・岡山市)

[図書] (計 1 件)

岩崎 崇、石橋 純、昆虫由来抗菌ペプチドの

応用、pp.226-238、長岡 功 (監)、抗菌ペプチドの機能解明と技術利用、CMC 出版、2017

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 植物細胞に遺伝子を導入するための複合体

発明者: 岩崎 崇、河野 強、上中 弘典、三浦 千裕、渡辺 倫子、山崎 明歳

権利者: 鳥取大学

種類: 特許

番号: 2017-063568 号

出願年月日: 2017年3月29日

国内外の別: 国内

名称: ポリヒスチジン修飾リポソーム

発明者: 岩崎 崇、品川 松美、小竹 彩香、河野 強

権利者: 鳥取大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-150709 号

出願年月日: 2015年7月30日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 崇 (IWASAKI, Takashi)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号: 30585584

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )