

令和元年5月28日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08331

研究課題名(和文) 時空間制御機能を兼ね備えたAib含有ヘリックスペプチドの核酸医薬への応用

研究課題名(英文) Development of Aib-containing delivery tool of siRNA into cancer cells with ability of spatio-temporal control of siRNA actions

研究代表者

和田 俊一 (Wada, Shun-ichi)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30278593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬は、核酸分子をマテリアルとし、疾患関連分子の遺伝子発現や機能を抑制することで、病気の発症や進行を止める作用をもつ薬剤のことをさす。この核酸分子をがん細胞特異的に送達し、作用時間を制御できるペプチド性デバイスの創製を行った。細胞を用いた実験により、正常細胞に比べてがん細胞にこの薬剤が入りやすいことを示せたが、作用時間の制御には至らなかった。またペプチド性デバイスの構造の最適化を行い必要な化学構造を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性疾患に対して種々の医薬品が開発されてきている。その中の1つである核酸医薬は、臨床の場に提供されている医薬品は少ない。その薬剤の本体である核酸分子は生体内で不安定で分解されやすく、細胞膜透過性が悪いという欠点がある。この薬剤の欠点を補うためにペプチド性デバイスの創製を行い、核酸医薬とペプチド性デバイスの複合体ががん細胞に入りやすいこと及びこのペプチド性デバイスの必要な化学構造を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Recently, drugs based on RNA molecules, such as small interfering RNA (siRNA) and microRNA (miR), have been actively developed for the treatment of intractable diseases. siRNA regulates gene expression by inhibiting specific messenger RNA (mRNA) translation. The -aminoisobutyric acid (Aib)-containing peptidic delivery tools of these RNA molecules into cells, which have the abilities of cancer cell specificity and control of the duration of the actions, have been developed. Although the creation of the delivery tool enabling the control of the duration of the action have been tried unsuccessfully, we have shown an Aib-containing delivery tool the abilities of cancer cell specificity. Furthermore, in consequence of structure-activity relationship studies, we can show the suitable structure for delivery of RNA into cells.

研究分野：薬学

キーワード：核酸医薬 siRNA 膜透過性ペプチド 両親媒性ヘリックスペプチド -aminoisobutyric acid Aib RGD配列

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬 (アンチセンス, siRNA など) は, 核酸をマテリアルとし, 疾患関連分子の遺伝子発現や機能を抑制することで, 病気の発症や進行を止める作用をもつ薬剤のことをさす. 現在までに核酸医薬品として臨床に供されている化合物は著者の知るところ, Vitravene, Macugen と Kynamro の 3 種のみである. これら核酸医薬の開発の障壁となっている理由として, 核酸分子の生体内不安定性 (ヌクレアーゼによる分解) と細胞膜透過性の悪さが挙げられる. 2013 年に家族性高コレステロール血症治療薬として Kynamro が発売されたが, 細胞膜透過性が悪く, 高用量の投与が必要で高額な治療費や毒性発現の可能性が懸念されている. それ故, 生体内の特定部位に的確に送達可能な空間認識機能, 作用発現を時間的に制御できる機能を兼ね備えたデリバリーツールが開発できれば, 今後急増すると予測される核酸医薬の開発に大きく貢献することが期待できる.

2. 研究の目的

著者は, Aib (α -aminoisobutyric acid, U) とリシン (Lys, K) などを組み合わせた両親媒性ヘリックスペプチドに標的認識機能・ヌクレアーゼ耐性能・膜透過性を兼ね備えたペプチド性デバイスを創製し, 二本鎖オリゴヌクレオチド (siRNA) を用いる RNA 干渉法 (RNAi 法) への適用を検討することに取り組んできた. これらの機能を有するペプチドとして, Aib 含有ヘリックスペプチドに, がん細胞に過剰に発現しているインテグリンに特異的に結合する RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフを S-S 結合を介して結合させ, 標的認識能を付与させたペプチドを開発した. 本ペプチドが細胞表面を認識して, siRNA を細胞内に効率良く導入, RNAi 効果を発揮することを明らかにしてきた. また, ペプチド中の RGD の位置や数により, RNAi 効果の発現する時間を変えることができることを明らかにした. つまり, RGD をヘリックスペプチドの C-末端に結合させると RNAi 効果の発現に速効性が現れ (速効型, 表 1, **PI**), またヘリックスペプチド分子の中程の位置に RGD を 2 個付与するとその発現は前者より遅れてくる (遅延型, 表 1, **PII**) ということを明らかにしてきた (文献). そこで本研究では以下の (1) ~ (3) の目的で研究を遂行した.

表 1 cRGDfC-Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドのアミノ酸配列^a

Peptide	Sequence ^b
PI	acetyl-KLULKLULKULKAULKUGC(<i>cRGDfC</i>)-NH ₂
PII	acetyl-KC(<i>cRGDfC</i>)ULKLULKULKAC(<i>cRGDfC</i>)LKLUG-NH ₂

^a Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドと cRGDfC [cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys-)] の縮合は, ジスルフィド結合形成により行った. ^b U: α -aminoisobutyric acid (Aib).

(1) **PII** を有機化学的に改変し RNA 干渉能に対して速効性, 遅延性が期待できるか検討する.

遅延型ペプチドはヘリックスペプチドの疎水性面に S-S 結合を介して 2 個の RGD モチーフを結合させているため, 分子全体として両親媒性構造が崩れている. そのペプチドと siRNA の複合体がエンドサイトーシス機構で細胞内に移行した後, 細胞内還元環境下でペプチドと RGD をつなぐ S-S 結合が切断され, 元来の両親媒性ヘリックス構造が再構築し, その両親媒性ヘリックスペプチドの特長である膜障害作用を利用してエンドソーム膜を破壊し, エンドソーム脱出を図り, 細胞質への siRNA の放出, それに引き続いて RNAi 効果を発現すると考えている. しかし, ペプチドと RGD をつなぐ S-S 結合は, ヘリックス構造に近く立体障害により還元されにくい結果, **PII** においては RNAi 効果の遅延が生じていると考えている (図 1). そこでヘリックスペプチドと RGD とをつなぐ S-S 結合の立体障害の制御をアルキル鎖の挿入で行い, アルキル基の長さや RNAi 効果の相関性を検討し, RNAi 能に対して速効性, 遅延性が期待できるか検討する.

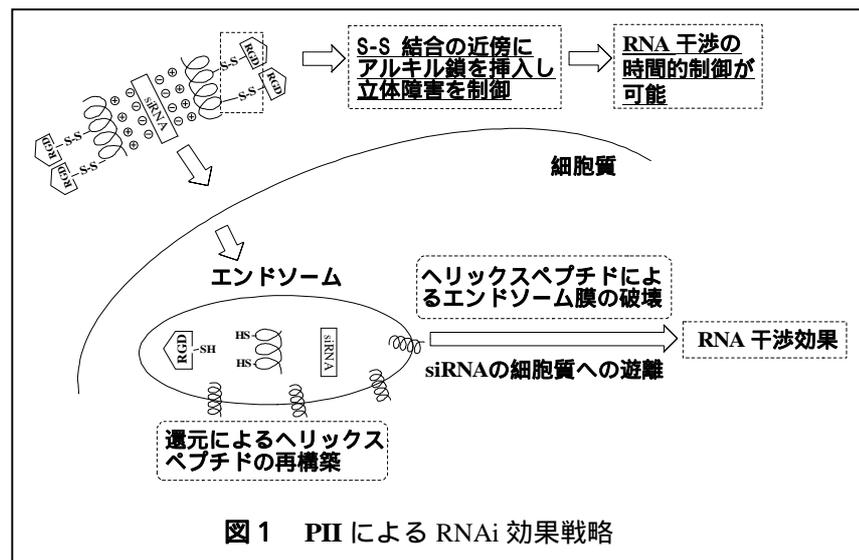


図 1 **PII** による RNAi 効果戦略

しかし, ペプチドと RGD をつなぐ S-S 結合は, ヘリックス構造に近く立体障害により還元されにくい結果, **PII** においては RNAi 効果の遅延が生じていると考えている (図 1). そこでヘリックスペプチドと RGD とをつなぐ S-S 結合の立体障害の制御をアルキル鎖の挿入で行い, アルキル基の長さや RNAi 効果の相関性を検討し, RNAi 能に対して速効性, 遅延性が期待できるか検討する.

(2) ペプチドと siRNA の混合物の製剤化が可能かどうかを検討する.

ペプチドと siRNA を静電的相互作用を利用してペプチド/siRNA 複合体を形成させ, その複合体を, RNAi 効果の実験に用いていた. しかしこの複合体形成はこれまで用事調製で行って

いた。臨床に展開するためにはより簡便にする必要があるため、より取り扱いを簡便にするためにペプチド/siRNA の複合体の製剤化を検討する。

(3) PI の構造活性相関研究及び siRNA のがん細胞選択的な取り込みを検討する。

ヘリックスペプチド分子の長さや塩基性残基である Lys の影響等を検討し、構造活性相関研究を検討する。また、PI による siRNA のがん細胞選択的な取り込みを検討する。

3. 研究の方法

(1) ペプチド合成

ペプチドの合成は、Fmoc-固相合成法により行った。通常のアミノ酸の縮合に関しては、縮合試薬として *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIPCI), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) を用い、Aib とその隣接したアミノ酸の縮合は、Fmoc-アミノ酸フルオリド、*N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) を用いた。RGD ペプチドとして環状の cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys-) (cRGDfC) を用い、cRGDfC のチオール基を 3-nitro-2-pyridylthio 化し活性化後、両親媒性ヘリックスペプチド中の Cys の側鎖とジスルフィド結合を形成させることにより RGD 配列を有したヘリックスペプチドの合成を行った。

(2) ペプチド/蛍光ラベル化 AlexaFluor488-siRNA 複合体の細胞内取り込み

ペプチドと AlexaFluor488-siRNA を静電的相互作用を利用して 37 °C, 30 min, インキュベーションすることで複合体を形成させ、その複合体を細胞に作用させた。細胞内に取り込まれた蛍光ラベル化 siRNA の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、細胞内に取り込まれた siRNA の定量的評価に関しては、細胞溶解液を作成し蛍光光度計を用いて定量した。

(3) ルシフェラーゼ安定発現 A549 (A549-Luc) 細胞に対する RNA 干渉効果の検討

ルシフェラーゼ遺伝子を標的としたペプチド/siRNA の複合体を A549-Luc に作用させ、インキュベーションした。その後、細胞を採取し、洗浄後、細胞溶解液を作製した。その細胞溶解液中のルシフェラーゼ酵素を発光分析により定量した。抗ルシフェラーゼ-siRNA は次の配列のものを用いた。sense strand: 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A dTdT-3'; antisense strand: 5'-UCG AAG UAC UCA GCG UAA G dTdT-3' (文献)。

4. 研究成果

(1) PII を有機化学的に改変及びその改変体の RNA 干渉効果

PII 改変体の設計と合成

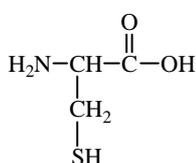
PII 中のヘリックスペプチド及び RGD 中に組み込んでいた Cys を Cys の側鎖の炭素が 1 個多いホモシステイン (X) に改変し、ヘリックスペプチドと RGD の間の立体障害を緩和させたペプチドを新たに 3 種類 (炭素数としては PII より 1~2 個多くした) 合成した (表 2)。ヘリックスペプチドと RGD との間の立体障害の大きさの順番は、PII > PIIa, PIIb > PIIc であると考えられる。

表 2 PII 改変体のアミノ酸配列とホモシステイン (X) の構造^a

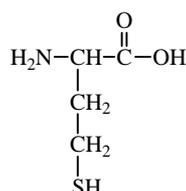
Peptide	Sequence ^b
PII	acetyl-KC(cRGDfC)ULKLULKULKAC(cRGDfC)LKLUG-NH ₂
PIIa	acetyl-KC(cRGDfX)ULKLULKULKAC(cRGDfX)LKLUG-NH ₂
PIIb	acetyl-KX(cRGDfC)ULKLULKULKAX(cRGDfC)LKLUG-NH ₂
PIIc	acetyl-KX(cRGDfX)ULKLULKULKAX(cRGDfX)LKLUG-NH ₂

^a Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドと cRGDfC [cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys-)]、cRGDfX [cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-homocystein-)]の縮合は、ジスルフィド結合形成により行った。

^b U: α-aminoisobutyric acid (Aib); X: homocysteine.



システイン (Cys, C)



ホモシステイン (X)

RNAi 効果

A549-Luc 細胞にペプチド/抗ルシフェラーゼ-siRNA 複合体 (1.0 μM/10 nM) を血清存在下で 24, 72 時間インキュベーションし、RNAi 効果及び siRNA の細胞内分布を観察し、インキュベーション時間の変化と活性の相関を検討した (図 2)。

炭素数を 1~2 個伸ばし、立体障害を軽減した PIIa - PIIc においても PII 同様、蛍光ラベル化 siRNA の細胞内デリバリー効果は認められたが、RNAi 効果については元のペプチド (PII) の効果よりも弱いことが分かった。また、インキュベーション時間を延長 (24 時間 → 72 時間) してもその効果は PII を上回ることはなかった。また共焦点レーザー顕微鏡を用いて、PIIa - PIIc による蛍光ラベル化 siRNA の細胞内分布を観測したところ、エンドソーム内に局在してい

ることが分かった。これらの結果から当初予想していたヘリックスペプチド RGD の細胞内還元によるエンドソーム膜の不安定化が、ヘリックスペプチドと RGD のリンカー部の炭素数を 1~2 個増加し、立体障害を軽減したペプチドを用いても起こっていない可能性があることが分かった。

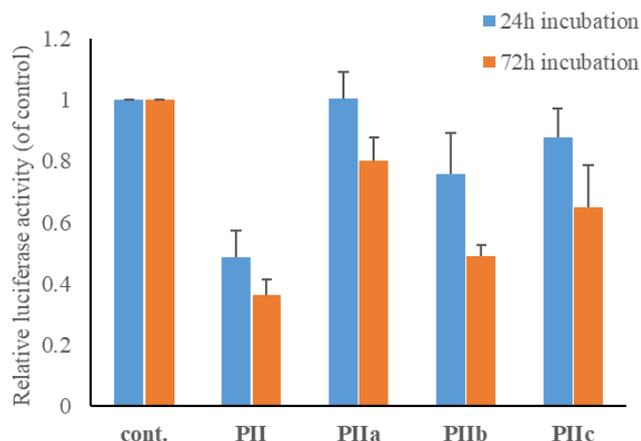


図2 PII 及びその改変体 PIIa - PIIc/siRNA 複合体の RNAi 効果

(2) ペプチドと siRNA の混合物の製剤化の検討

ペプチドと siRNA の混合物の製剤化の初期検討として、PI/siRNA 複合体形成 (モル比:50/1; 37℃, 30 min, DMEM 溶液) 後、凍結乾燥によりその複合体の粉末化、その後再溶解し、siRNA の分解の有無の確認及び RNAi 効果の確認を行った。

粉末後再溶解した混合溶液中の siRNA の純度をイオン交換カラム (Nacalai COSMOGEL IEX typeQ) を用いた HPLC で分析し検討したところ、siRNA は約 90% 安定に存在していることがわかった。また再溶解した PI/siRNA 複合体は、用事調製した複合体と比較すると、やや弱いながらも十分な RNAi 効果を示すことがわかった。

(3) PI の構造活性相関研究及び siRNA のがん細胞選択的な取り込みの検討

ヘリックスペプチドにおける RGD の位置:ヘリックスペプチド構造の C-末端に RGD を配置したペプチド (PI) が RNAi 活性が強かったことから、N-末端 (PIa) 或いは、N-, C-末端双方に RGD (PIb) を有したペプチドを合成し RNAi 活性を検討した。

Peptide	Sequence ^b	RNAi 活性を PI と比較
PI	acetyl-KLULKLULKULKAULKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	
PIa	acetyl-C(<i>cRGDfc</i>)KLULKLULKULKAULKLUG-NH ₂	ほぼ同等
PIb	acetyl-C(<i>cRGDfc</i>)KLULKLULKULKAULKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	やや低下

ヘリックスペプチドの残基数 (N-末端から 4, 8, 12 残基減らす) の影響を検討した。

Peptide	Sequence ^b	RNAi 活性を PI と比較
PI	acetyl-KLULKLULKULKAULKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	
PIc	acetyl-KLULKULKAULKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	活性消失
PId	acetyl-KULKAULKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	活性消失
PIe	acetyl-AULKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	活性消失

両親媒性ヘリックスペプチドにおける疎水性領域と塩基性領域 (リシン残基の数) の影響を検討した。

Peptide	Sequence	RNAi 活性を PI と比較
PI	acetyl-KLULKLULKULKAULKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	
PIII	acetyl-KKULKLUKKULKAULKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	活性消失
PIV	acetyl-KKULKLUKKULKKUKKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	活性消失
PV	acetyl-KKUKKKUKKULKKUKKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	活性消失
PVI	acetyl-KKUKKKUKKUKKKUKKLUGC(<i>cRGDfc</i>)-NH ₂	活性消失

~ の結果から、RGD の位置がヘリックスペプチドの末端にあること、ヘリックスペプチ

ドが 20 残基必要であること、ヘリックスペプチドにおける疎水性領域と塩基性領域(リシン残基の数)のバランス(塩基性領域を拡大すると活性が低下)が重要であることが分かった。

PI による siRNA のがん細胞選択的な取り込みの検討

がん細胞として A549 (ヒト肺がん細胞), U-87 MG (ヒト脳腫瘍細胞), WiDr (ヒト大腸がん細胞), 正常細胞として NIH3T3 (マウス線維芽細胞) を用いて, 血清存在下での PI/蛍光ラベル化-siRNA 複合体の細胞内取り込み実験を行った(PI/siRNA 複合体: 1.15 μ M/23.0 nM; 24 時間インキュベーション; 10% FBS DMEM 中)。市販品の siRNA のトランスフェクション試薬, lipofectamine RNAiMAX はすべての細胞に於いて複合体の取り込みが強く認められたが, PI/蛍光ラベル化-siRNA 複合体に於いては, 正常細胞の NIH3T3 細胞の細胞内取り込みに比べてがん細胞により取り込み能が高いことが分かった(図 3)。

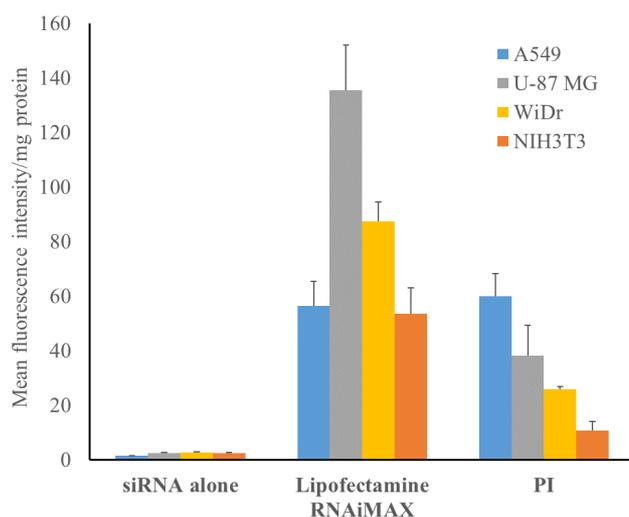


図 3 PI/蛍光ラベル化-siRNA 複合体のがん細胞 (A549, U-87 MG, WiDr 細胞), 正常細胞 (NIH3T3 細胞) における細胞内取り込み

(4) 結論

研究成果(1)の結果から, PII 中のヘリックスペプチドと RGD のリンカー部を PII より 2 炭素増炭し, ヘリックスペプチドと RGD の間の立体障害を緩和させた PIIc においても, 立体障害の大きい PII よりも RNAi 活性が向上せず, 速効性も認められなかった。共焦点レーザー顕微鏡の結果も含めて考察すると, 当初予想していたヘリックスペプチド RGD の細胞内還元が起こっていないことが考えられる。しかし現時点では詳細が分かっていないので, 更なる構造活性相関研究を行い, 時空間制御可能なデリバリーツールの実現に向け検討が必要である。

研究成果(2)の結果から, PI/siRNA 複合体の粉末化, 製剤化の可能性を示唆することができた。この製剤化が実現できれば臨床応用に向けて, 大きなインパクトを与えることができると考える。

研究成果(3)の構造活性相関研究から, siRNA のキャリアとしては PI のアミノ酸配列が現在のところ, ベストであると考えられ, PI はがん細胞選択的に siRNA を送達することができることがわかった。

<引用文献>

S. Wada, M. Iwata, Y. Ozaki, T. Ozaki, J. Hayashi, H. Urata, *Bioorg. Med. Chem.*, 24(18), 4478-4485 (2016).

S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl. *Nature* 411, 494-498 (2001).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 1 件)

Shun-ichi Wada, Kohei Taniguchi, Hiroaki Hamazaki, Azusa Yamada, Junsuke Hayashi, Kazuhisa Uchiyama, and Hidehito Urata, Influence of lysine residue in amphipathic helical peptides on targeted delivery of RNA into cancer cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, accepted. (2019), 査読有。

DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.05.044

Shun-ichi Wada, Anna Takesada, Yurie Nagamura, Eri Sogabe, Rieko Ohki, Junsuke Hayashi, and Hidehito Urata, Structure-activity relationship study of Aib-containing amphipathic helical

peptide-cyclic RGD conjugates as carriers for siRNA delivery, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27(24), 5378-5381 (2017). 査読有 .

DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.11.018

浦田秀仁, 和田俊一, 核酸医薬のデリバリーを指向した機能性核酸・ペプチド関連分子の創製, *化学工業*, 67, 48-60 (2016). 査読無 .

<http://www.kako-sha.co.jp/volkagaku.html>

Shun-ichi Wada, Masashi Iwata, Yuka Ozaki, Takashi Ozaki, Junsuke Hayashi, and Hidehito Urata, Design of Cyclic RGD-Conjugated Aib-Containing Amphipathic Helical Peptides for Targeted Delivery of Small Interfering RNA, *Bioorg. Med. Chem.*, 24(18), 4478-4485 (2016). 査読有 .

DOI: 10.1016/j.bmc.2016.07.040

[学会発表](計25件)

和田俊一, 谷口高平, 林淳祐, 内山和久, 浦田秀仁, ペプチド性キャリア MAP(Aib)-cRGD による microRNA-145 の細胞内導入, 日本薬学会第 139 年会 (2019).

S. Wada, K. Taniguchi, H. Hamazaki, A. Yamada, J. Hayashi, K. Uchiyama, H. Urata, Delivery of siRNA and microRNA into Cells by Aib-containing Amphipathic Helical Peptides, 10th International Peptide Symposium (2018).

和田俊一, 武貞安納, 曾我部絵里, 大木理恵子, 河北亜希, 林淳祐, 浦田秀仁, ペプチド性 siRNA キャリア MAP(Aib)-cRGD のヘリックス軸の長さ及び N-末端置換基の影響, 日本薬学会第 138 年会 (2018).

和田俊一, 武貞安納, 長村友里恵, 林淳祐, 浦田秀仁, 機能性 siRNA キャリアとしての MAP(Aib)-cRGD 複合体の構造活性相関研究, 日本薬学会第 137 年会 (2017).

和田俊一, 武貞安納, 曾我部絵里, 大木理恵子, 河北亜希, 林淳祐, 浦田秀仁, Structure-activity relationship study of MAP(Aib)-cRGD conjugates as carriers for siRNA delivery, 第 54 回日本ペプチドシンポジウム (2017).

和田俊一, 武貞安納, 長村友里恵, 林淳祐, 浦田秀仁, MAP(Aib)-cRGD conjugates as carriers for delivery of small interfering RNA, 第 53 回日本ペプチドシンポジウム (2016).

[図書](計1件)

和田俊一, 浦田秀仁 (共著), シーエムシー出版, 医療・診断をささえるペプチド科学 - 再生医療・DDS・診断への応用 -, 2017, p.239 - 247 .