

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14880

研究課題名（和文）生体応用を志向した細胞膜高透過性ヘリカルペプチドの開発

研究課題名（英文）Development of cell penetrating peptides based on helical promoter for biomedical application

研究代表者

三澤 隆史（Misawa, Takashi）

国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・室長

研究者番号：40709820

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）：本研究課題では、生体応用を志向した新規細胞膜高透過性ペプチドの開発を目的として、ペプチドの二次構造に着目した構造展開およびpost-modificationによる側鎖修飾を行った。その結果、高い細胞貫通性かつ細胞内での安定性を向上させたペプチドの開発に成功した。また、本ペプチドは多様な核酸分子やタンパク質などを効率的に細胞内に導入可能であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出した細胞膜高透過性ペプチドは、生体内でも安定に存在が可能であり、効率的に細胞内にカーゴ分子を導入であることから、新たなDDS技術に繋がると考えている。また、多様な修飾が可能であるため、その他の標的組織やオルガネラを標的とした高次機能化が可能になる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：In this project, we developed novel peptides with high permeability to cell membranes for biological applications by focusing on the secondary structure of the peptides and post-modification of the side chains. As a result, we succeeded in developing peptides with high cell-penetrating permeability and improved intracellular stability. In addition, the peptides were found to be capable of efficiently introducing various nucleic acid molecules and proteins into the cells.

研究分野：創薬化学

キーワード：ペプチド a,a-ジ置換アミノ酸 ヘリカルペプチド postmodification

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

従来の小分子を基盤にした創薬では治療困難な疾患に対し、siRNA などを利用した遺伝子治療が注目を集めている。しかし、核酸などの生体高分子は細胞膜を透過することができず、その治療効果を十分に発揮することはできない。オリゴアルギニン(Rn)に代表される膜透過性ペプチド(CPPs)は生体高分子などの親水性分子を細胞内に導入するキャリア分子として注目を集めている。当研究室ではこれまでに、 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸(dAAs: disubstituted amino acids)をペプチド配列中に導入することで、ペプチドのヘリカル構造が安定化し、細胞膜透過性の向上および生体内分解酵素に対する耐性を獲得することを見出している。そこで、近年膜透過性ペプチド(Cell-penetrating peptides: CPPs)が注目を集めている。CPPs は細胞膜を透過するだけでなく、タンパク質や核酸などのカーゴ分子を細胞内に輸送することができる。これまでに代表的な CPPs としてオリゴアルギニン(Rn)や HIV-1 tat などが知られ、これらの配列中にはカチオン性アミノ酸であるアルギニンが多く含まれていることが明らかになっている。さらには、アルギニンのグアニジノ基と細胞表面に存在する酸性基との相互作用が膜透過能に重要であることが報告されている(Futaki et al. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 2437., Wender et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9506)。上述の通り、CPPs の配列内アミノ酸側鎖の重要性が報告される一方で、ペプチドの二次構造と膜透過能の相関性に関しては未だ不明な点が残されている。また、CPPs の生体応用を志向した場合、生体内酵素による分解など安定性に乏しいこと、特定の標的細胞のみに薬剤を届けることができない(細胞選択性)などの問題点が挙げられる。

## 2. 研究の目的

当研究室では、ペプチドの二次構造制御に関する研究を行っており、その中で、 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸(dAAs:  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acids)を用いることで短鎖ペプチドのヘリカル構造を安定化できることを見出している。また、代表的な dAAs である Aib (2-aminobutyric acid) とロイシン(Leu)の繰り返し配列からなるペプチド(Leu-Leu-Aib)<sub>n</sub> (**1**) が安定なヘリカル構造を示すこと、その L-, D-アミノ酸の含有率によってヘリカル構造を高度に制御できることを報告した(*Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 4, 840.)。申請者らはこれらの知見を活かし、ヘリカル構造を制御した CPPs の創製を目的として、代表的な CPPs であるノナアルギニン FAM- $\beta$ Ala-(L-Arg)<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub> (R9; FAM = 5,6-Fluorescein)に Aib を導入した FAM- $\beta$ Ala-(L-Arg-L-Arg-Aib)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (FAM-1) 及び FAM- $\beta$ Ala-(L-Arg-D-Arg-Aib)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (FAM-2) をデザイン・合成しその膜透過能を評価した。その結果、ヘリカル構造を形成する FAM-1 はランダム構造を形成する FAM-2 と比較してより高い膜透過能を示した(*Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 2403.)。これらの結果はヘリカル構造が膜透過能に有利に機能することを示している。しかし、Arg を Aib で置換したことにより Arg 数(9→6 残基)・分布が減少・変化したことにより、ノナアルギニン(R9)と比較するとその膜透過能は大きく減弱していた。これらの結果は、膜透過能の向上には、アルギニンの数や分布に変化を与えることなく、オリゴアルギニン配列のヘリカル構造を誘起することが求められる。

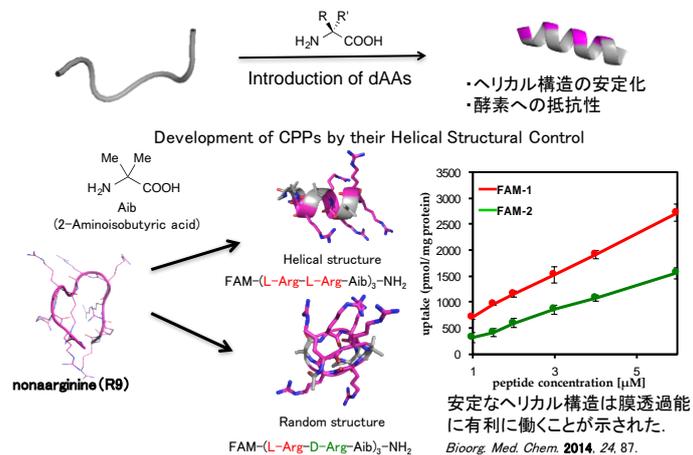


Figure 1. 二次構造制御と膜透過性の相関

## 3. 研究の方法

オリゴアルギニンに対し、ヘリカルプロモータ配列を連結したペプチドをデザイン・合成し、その二次構造および膜透過能を評価した。ヘリカルテンプレートとしては、ロイシン型ペプチド **1** やアジド基の導入を検討した。各ペプチドはマイクロウェーブを利用した Fmoc 固相法を用いて伸長し、細胞膜透過性を評価するために N 末にフルオレセインを導入した。まず、合成したペプチドがヘリカル構造を形成し、膜透過能が向上するかを検討する必要があるため、CD スペクトルを用いて二次構造を評価し、ヘリカルプロモータ配列の最適化を行った。構造制御出来ない場合などは計算機科学によるアミノ酸配列の最適

化を行い、ペプチドの再合成・構造解析により、安定なヘリックス性を示すヘリカルプロモータペプチドの合成および導入を目指した。細胞膜透過活性評価では接着・浮遊細胞に対しペプチドを処理し、共焦点顕微鏡による観察やフローサイトメトリーを用いて細胞内導入量を定量的に評価する。次に、合成ペプチドにヘリカル構造の安定化・酵素耐性獲得による細胞内への生体高分子輸送能を評価する。ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA をペプチドと共添加し、ルシフェラーゼアッセイを行うことで DNA の導入効果を、乳がん細胞で過剰発現しているエストロゲン受容体 ER や転写因子である Notch に対する siRNA をペプチドと共添加しウェスタンブロット法により標的タンパク質の発現量を検出することで siRNA の導入効果を検討する

#### 4. 研究成果

まず、合成したペプチドについて CD スペクトルを用いて二次構造を評価した。その結果、不安定な二次構造を形成する細胞膜透過性ペプチドであるノナルギニン(R9)に対し、ヘリカルプロモータ H-(LeuLeu-Aib)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (1) を連結させたペプチド **Block3**:{FAM-βAla-(Leu-LeuAib)<sub>3</sub>-(Gly)<sub>3</sub>-(Arg)<sub>9</sub>} は 208 および 222 nm に負の吸収極大を示し、安定なヘリカル構造を形成していることを明らかにした(Figure 2)。また、フローサイトメトリーを用いた細胞内取り込み量を評価したところ、R9 よりも高い細胞膜透過性を示すことを明らかにした。次に、得られたペプチド **Block3** を用いて、siRNA の細胞内導入実験を行った。顕微鏡観察の結果から、**Block3** は細胞内に効率的に細胞内に導入可能であることが示唆された。また、siRNA の遺伝子配列依存的に標的タンパク質の発現量が減少することが明らかになり、**Block3** は siRNA のデリバリーツールとして機能する事を示した。**Block3** は siRNA と複合体を形成し、エンドサイトーシスを介して細胞内に導入され、その後エンドソームから脱出する事で siRNA の効果を発揮させる事を明らかにした (Figure 3.)。また、**Block3** は、KRAS 依存的に細胞増殖を起こす NCIH358 細胞に対し、変異型 KRAS に対する siRNA を細胞内に輸送し、変異型 KRAS の細胞内発現量を顕著に抑制すること、変異型 KRAS の発現量に応じて細胞増殖も抑制することを見出し、**Block3** の医薬化学応用への可能性についても実証した (Figure 4)。(*Chem. Commun.* 2019, 55, 7792.) 本研究で得られた細胞膜高透過性ペプチドは多様なカーゴ分子を細胞内に導入可能な新規 DDS 技術の創出に繋がる。また、非天然アミノ酸の導入はペプチドの生体内安定性を向上させることが知られ、生体への応用の可能性も示唆される。

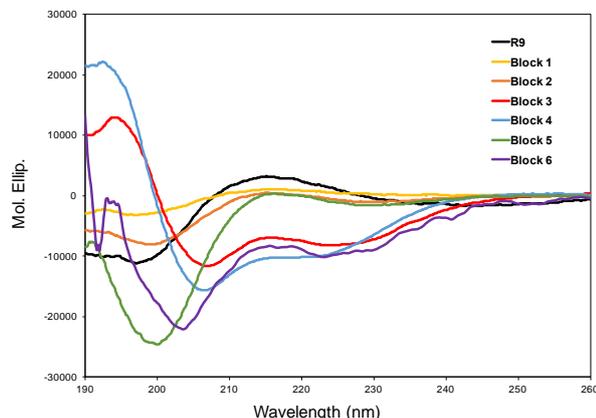


Figure 2. CD スペクトルによる二次構造解析

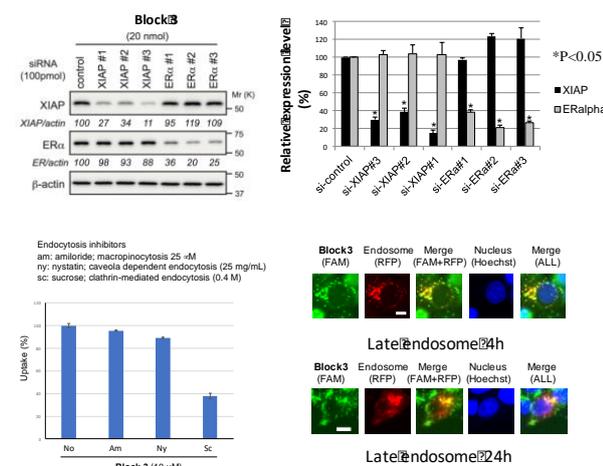


Figure 3 Block3 による siRNA 導入とメカニズム解析

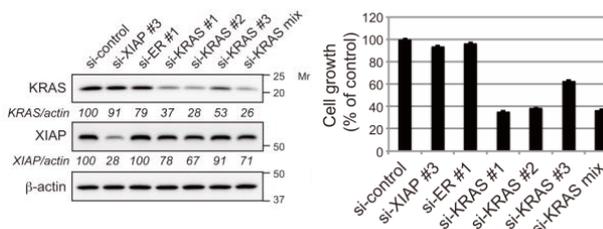


Figure 4. 変異型 KRAS に対する siRNA 導入

また、非天然アミノ酸の導入はペプチドの生体内安定性を向上させることが知られ、生体への応用の可能性も示唆される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashi Misawa, Nobumichi Ohoka, Makoto Oba, Hiroko Yamashita, Masakazu Tanaka, mikihiko Naito, Yosuke Demizu	4. 巻 55
2. 論文標題 Development of 2-aminoisobutyric acid (Aib)-rich cell-penetrating foldamers for efficient siRNA delivery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communication	6. 最初と最後の頁 7792-7795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9CC02203A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroyuki Kobayashi, Takashi Misawa, Makoto Oba, Naoya Hirata, Yasunari Kanda, Masakazu Tanaka, Kenji Matsuno, Yosuke Demizu	4. 巻 66
2. 論文標題 Structural Development of Cell-Penetrating Peptides Containing Cationic Proline Derivatives	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 575-580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c18-00079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Genichiro Tsuji, Takashi Misawa, Mitsunobu Doi, and Yosuke Demizu	4. 巻 3
2. 論文標題 The extent of helical induction caused by introducing $\alpha$ -aminoisobutyric acid into an oligovaline sequence	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 6395-6399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.8b01030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 三澤隆史、大岡伸通、大庭誠、田中正一、内藤幹彦、出水庸介
2. 発表標題 多様な機能を付与できる細胞膜高透過性ペプチドの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第15回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三澤隆史、大岡伸通、大庭誠、田中正一、内藤幹彦、出水庸介
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF CELL-PENETRATING FOLDAMERS FOR DELIVERY OF BIOMACROMOLECULES
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三澤隆史、大岡伸通、大庭誠、田中正一、内藤幹彦、出水庸介
2. 発表標題 核酸医薬を細胞内に導入するオリゴペプチドの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三澤隆史、大岡伸通、大庭誠、田中正一、内藤幹彦、出水庸介
2. 発表標題 二次構造制御を基盤とした膜透過性ペプチドの開発と核酸デリバリーへの応用
3. 学会等名 第34回日本DDS学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Misawa, Nobumichi Ohoka, Makoto Oba, Masakazu Tanaka, Mikihiko Naito, Yosuke Demizu
2. 発表標題 Development of helix-stabilized amphipathic cell-penetrating peptides for siRNA delivery
3. 学会等名 第35回ヨーロッパペプチドシンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Misawa, Nobumichi Ohoka, Makoto Oba, Masakazu Tanaka, Mikihiro Naito, Yosuke Demizu
2. 発表標題 Development of Cell-Penetrating Peptide Foldamers for siRNA Delivery
3. 学会等名 第10回ペプチドシンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三澤隆史、大岡伸通、大庭誠、田中正一、内藤幹彦、出水庸介
2. 発表標題 細胞膜高透過性ペプチドフォルダマーの開発と核酸デリバリーへの応用
3. 学会等名 第36回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関