

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
研究期間： 2008～2009
課題番号： 20790156
研究課題名 (和文) 次世代創薬基盤としてのオルガネラターゲティングシステムの開発
研究課題名 (英文) An organelle targeting system as a next generation technology for drug development
研究代表者
角田慎一 (TSUNODA SHINICHI)
独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部 創薬プロテオミクスプロジェクト
サブプロジェクトリーダー
研究者番号： 90357533

研究成果の概要 (和文)：

近年、細胞内オルガネラレベルでの疾患プロテオミクス研究が精力的に進められており、細胞内の特定領域において局在し、機能する蛋白質が次々と同定されつつある。そのため、これら細胞内蛋白質を標的とした安全かつ有効な治療法、すなわち、それら蛋白質自身を薬物として用いる、あるいは、それら蛋白質の機能を制御する蛋白質やペプチドを薬物として用いることが期待されている。本観点において、近年見出された TAT をはじめとする細胞内移行性を有するペプチド配列 (CPP) は、細胞内への蛋白質・ペプチド等の送達キャリアとして有望である。しかし TAT-薬物複合体は通常、エンドサイトーシス経路で取り込まれ、エンドソームにトラップされることから、標的部位へ効率よく到達できず、その効果が大きく制限されている。

そこで本研究では、細胞内機能性ペプチド・蛋白質のキャリアペプチドとして CPP を応用することに加え、エンドソームからの効率的エスケープ能、およびオルガネラターゲティング能を付加したインテリジェントな DDS、オルガネラターゲティング・システムの確立を試みた。これまでに細胞内導入効率と安全性に優れていた TAT を CPP として使い、エンドソームから細胞質内への移行のために HA-TAT を併用し、さらに細胞質から核への送達を達成するために核移行シグナル NLS を付与したオルガネラターゲティングシステムを構築した。モデル薬物として蛍光蛋白質、あるいは細胞内蛋白質の相互作用阻害ペプチドを用い、その動態と作用を検証した結果、細胞内オルガネラターゲティングが達成できていることを明らかにすることができた。本研究成果は、細胞内を標的とした新たな蛋白質・ペプチド療法の開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要 (英文)：

Through progress in proteomics research, enormous disease-related proteins have been identified in intracellular organelles. These intracellular proteins have become attractive targets for the development of an epoch-making therapeutic approach. In this context, intracellular delivery of macromolecular blockers using cell-permeable peptides is expected to be an attractive method. Although human immunodeficiency virus derived TAT peptides have been used as carriers of macromolecular cargo into the cell, TAT-conjugated cargos (TAT-cargo) enter the cell by endocytosis and thus most of them are entrapped within the endosome. Due to these characteristics, it is possible to be speculated that TAT-cargo alone cannot reach the targeted cellular compartment and the therapeutic effect is therefore extremely limited. To solve this problem, we devised a new cytosolic drug delivery method using TAT-conjugated endosome-disruptive HA2 peptide (TAT-HA2). First, to evaluate the utility of this strategy, we examined the intracellular behavior of TAT-conjugated fluorescent protein (TAT-VENUS) by confocal laser scanning microscopy. In HeLa cells treated with the mixture of TAT-VENUS and TAT-HA2, the fluorescence spread throughout the cytosol,

whereas in HeLa cells treated with TAT-VENUS alone, only punctuate fluorescence was observed. Subsequently, we also revealed that co-treatment with TAT-VENUS fused with the nuclear localization signal (TAT-VENUS-NLS) and TAT-HA2 enhanced both the endosome escape efficiency and accumulation of the cargo in the nucleus. Our techniques provide a unique methodology for the development of a novel therapeutic approach based on the intracellular targeting method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 医療系薬学

キーワード： 薬物動態・代謝学、ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

昨今の創薬研究は、「薬は低分子有機化合物である」という従来までの認識から、高次構造の中に豊富な情報を内蔵している生体高分子物質、とりわけペプチドや蛋白質を「疾病治療に有効な新たな医薬品シーズ」として捉えるようになってきた。また一方で、創薬を指向したポストゲノム研究は、疾患状態における蛋白質の時空間的・質的・量的な発現様式と疾患の発症・増悪・治癒との関連を網羅的に解析しようとする疾患プロテオミクスへと集約されつつある。中でも蛋白質の細胞内オルガネラレベルでの変動を、健常時と病態時において比較評価し、疾患関連蛋白質を探索しようとするオルガネラプロテオミクスが特に注目を集めており、これにより新たな創薬ターゲット蛋白質が数多く同定されてきている。以上のような創薬研究の新たな流れも相俟って、今後、細胞内の特定オルガネラに局在する蛋白質と疾患との関わりが明らかとされるにつれて、それらオルガネラ局在蛋白質（特定オルガネラで機能発現する蛋白質）自身の医薬品化、あるいは、それらの機能を制御しうるペプチド・蛋白質の開発が益々注目されると考えられる。しかし、ペプチドや蛋白質などの生体内高分子物質は、単に医薬品として適用・投与しても、これまでの膜透過性に優れた低分子有機化合物とは決定的に異なり、細胞膜を容易に透過することができないため、薬効発現の場である“細胞内、あるいは特定オルガネラ”へ

到達できず、疾病治療効果は全く期待できない。即ち、細胞内の特定オルガネラに導入されて初めて機能発現できる蛋白質、例えば、転写因子やシャペロン、イントラボディなどを医薬品として適用し、我が国独自の次世代治療戦略を構築しようとした場合、上述の問題を克服できる画期的創薬基盤技術が必須となってくる。

このような細胞内蛋白質をそのまま有効な医薬品シーズ（蛋白医薬）として、あるいは疾患の発症や悪化に関わる創薬ターゲットとなる細胞内蛋白質に対する制御ペプチド、抗体（イントラボディ）を有効な医薬品として開発するためには、ペプチド・蛋白質を安定に効率よく標的組織・細胞に送達させること、さらに、これらペプチド・蛋白質を効率よく細胞膜から細胞内へ移行させ、さらに標的オルガネラへデリバリーできることが必要不可欠となってくる。このうち前者に関しては、これまでの研究により、その方法論が確立されている。後者に関しては、細胞外から細胞内への移行活性を有するペプチド、CPP（cell penetrating peptide）を薬物キャリアとすることにより、蛋白質等の高分子物質を細胞内へ導入できることを、我々および他の研究グループなどから、最近報告された。しかし、代表的ないくつかのCPPの細胞内挙動を詳細に解析したところ、いずれのCPPも細胞内にマクロピノサイトーシス経路で取り込まれ、その後、大部分がエンドソームに留まることを見出した。以上の事実

は、CPP を薬物キャリアとして用い、疾病治療に有用な細胞内蛋白質などをデリバリーしても、標的オルガネラへ送達できないこと、即ち期待通りの薬効は得られないということ強く示している。実際に、CPP を用いた細胞内への薬物導入による治験が試みられたものの、十分な成果は得られていない。

従って、もしエンドソームから効率よく CPP をエスケープさせる方法論を確立することができれば、CPP は細胞質内へのペプチド・蛋白質薬物の送達キャリアとして極めて有望なものとなりうる。すなわち、エンドソーム膜の透過性を向上させる活性を有することが知られるインフルエンザウイルス由来の HA2 ペプチドを有効利用することができれば、細胞内エンドソームに取り込まれた CPP を、細胞質へエスケープさせることが可能になると考えられる。そのうえで、細胞内での物質輸送システムに使われているシグナルペプチド（核移行シグナル NLS、ミトコンドリア移行シグナル MTS 等）を利用できれば、細胞質内にエスケープさせた CPP 薬物複合体を核、ミトコンドリア等の標的組織に選択的に送達可能なオルガネラターゲティング・システムが初めて確立できるものと考えた。

2. 研究の目的

上述のように、近年、細胞内オルガネラレベルでの疾患プロテオミクス研究が精力的に進められており、細胞内の特定領域において局在し、機能する蛋白質が次々と同定されつつある。そのため、これら細胞内蛋白質を標的とした安全かつ有効な治療法、すなわち、それら蛋白質自身を薬物として用いる、あるいは、それら蛋白質の機能を制御する蛋白質やペプチドを薬物として用いることが期待されている。しかし、細胞内で機能する蛋白質・ペプチドを薬物として応用するには、細胞膜の透過障壁をクリアするドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発が不可欠である。さらに、細胞内での動態をも制御可能とする DDS 技術も求められてくる。そこで本研究では、細胞内移行性を有することが知られるペプチド配列（CPP）を細胞内機能性ペプチド・蛋白質のキャリアペプチドとして応用し、さらにインフルエンザ HA2 ペプチドによるエンドソームからの効率的エスケープ能、およびオルガネラ移行シグナルによるターゲティング能を付加したインテリジェントな DDS、オルガネラターゲティ

ング・システムの確立を試みた。

3. 研究の方法

蛍光色素標識された CPP (TAT, ANTP, REV および独自に創製した CPP) および、蛍光蛋白質 Venus に CPP を付加した融合蛋白質を作製し、その細胞内挙動を蛍光イメージングにて解析した。さらに、細胞に対する傷害性、種々の細胞に対する導入効率等についても比較検討し、それら解析から各 CPP の特性情報を集積した。一方で、インフルエンザ由来 HA2 ペプチドと CPP の融合ペプチドを合成し、CPP-Venus と同時に細胞に適用することで、エンドソームからのエスケープを促進させ、CPP-Venus を細胞質内に効率よく移行させうるシステムの確立を試みた。

また、細胞内導入効率と安全性に優れていた TAT を CPP として用い、エンドソームから細胞質内への移行のために HA2-TAT を併用し、さらに細胞質から核への送達を達成するために核移行シグナル NLS を付与したオルガネラターゲティングシステムを構築し、その有用性を検証した。

4. 研究成果

HA2 は、インフルエンザウイルスのエンベロープ蛋白質由来のペプチド断片であり、エンドソーム内における pH 低下に反応して、エンドソーム膜を破壊する活性を発揮することが知られている。従って、TAT 融合薬物と TAT を付加した HA2 ペプチド (HA2-TAT) を同時に細胞に添加することによって、薬物と HA2 の両者を同じエンドソーム内に共存させることができれば、薬物を細胞質内へと効率よく送達できるものと考えられる。そこで、本手法の細胞質内薬物送達法としての有用性を評価するために、HA2-TAT と TAT 融合蛍光蛋白質 (TAT-VENUS) を共処理した HeLa 細胞の蛍光画像を共焦点レーザー顕微鏡により撮像した (Figure 1)。その結果、TAT-VENUS 単独作用群では、VENUS 蛋白質がエンドソームに補足されていることを示すドット状の蛍光のみが認められたのに対して、TAT-VENUS と HA2-TAT を共処理した群では、VENUS 由来の蛍光が細胞質全体に拡散した像が観察された。以上の結果は、TAT 融合蛋白質と同じエンドソーム小胞内に侵入した HA2-TAT がエンドソーム破壊活性を発揮し、最終的に TAT 融合蛋白質の細胞質移行が促進されたことを示すものである。

続いて、代表的なオルガネラ移行シグナルである SV40 Large T 抗原由来の核移行シグナル (Nuclear Localization Signal: NLS) を付与した TAT-VENUS (TAT-VENUS-NLS) を用いて、本手法の細胞内ターゲティング技術としての応用を試みた。TAT-VENUS-NLS を単独、あるいは HA2-TAT と共に 3 時間共培養した HeLa 細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて撮像した (Figure 2)。TAT-VENUS-NLS を単独で作用させた群では、Figure 1 と同様に VENUS 由来の蛍光がドット状に認められた。それに対して、HA2-TAT と TAT-VENUS-NLS とを共処理した群においては、VENUS 由来の蛍光と核染色試薬である Hoechst 33342 由来の蛍光が完全に一致した像が観察された。以上の結果より、CPP、HA2、NLS の機能性ペプチドを組み合わせることによって、分子量数万の蛋白質をも核内に選択的に送達可能であることが示された。

続いて、本手法の薬物療法における有効性を検証するために、抗がんペプチド (PNC28) を用いて腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。PNC28 は核局在性のがん遺伝子産

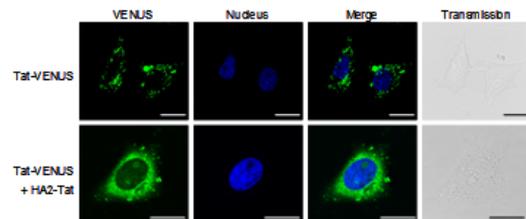


Figure 1. Intracellular distributions of Tat-VENUS. HeLa cells were treated with 10 μ M Tat-VENUS alone or in the presence of 5 μ M HA2-Tat, and cultured for 3 h. Fluorescence images were acquired by confocal laser scanning microscopy and the signals were digitally merged. The nucleus was counterstained with Hoechst 33342 (blue). Scale bars in each microphotograph indicate 20 μ m.

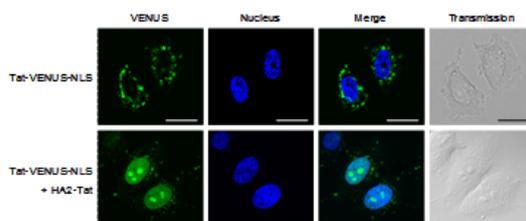


Figure 2. Intracellular distributions of Tat-VENUS-NLS. HeLa cells were treated with 10 μ M Tat-VENUS-NLS alone or in the presence of 5 μ M HA2-Tat, and cultured for 3 h. Fluorescence images were acquired by confocal laser scanning microscopy and the signals were digitally merged. The nucleus was counterstained with Hoechst 33342 (blue). Scale bars in each microphotograph indicate 20 μ m.

物 MDM2 に結合し、MDM2 の p53 分解活性を阻害することによって、がん細胞に細胞死を誘導できる抗がんペプチドである。従って、PNC28 を細胞内に効率よく導入した上で、さらに核内へと積極的に送達することが出来れば、より強力な殺腫瘍効果の誘導ができる。そこで PNC28 の核ターゲティングをモデルケースとして、CPP、HA2、NLS を組み合わせた細胞内ターゲティング技術の有効性を評価した (Figure 3)。各種 PNC28 を作用させた MDM2 高発現腫瘍細胞 (A549) の細胞生存率を WST-8 assay を用いて評価

したところ、PNC28-TAT 単独作用群と比較して、PNC28-TAT と HA2-TAT の共処理群では 70%、NLS 融合 PNC28-TAT (NLS-PNC28-TAT) 処理群においては 55% 程度にまで生存率が低下していた。それに対して、NLS-PNC28-TAT と HA2-TAT を併用することによってより強力な抗腫瘍効果が認められ、生存率が 35% にまで低下していた。これらの結果から、3 種類の機能性ペプチド (CPP、HA2、NLS) を組み合わせた細胞内ターゲティング技術が、抗がんペプチドの薬効を飛躍的に増強できる有効ながん治療戦略となり得ることが示された。本研究では、CPP、HA2、NLS を利用することによって、①エンドソームエスケープと②核ターゲティングという、2 段階の細胞内ターゲティング技術の開発に成功した。さら

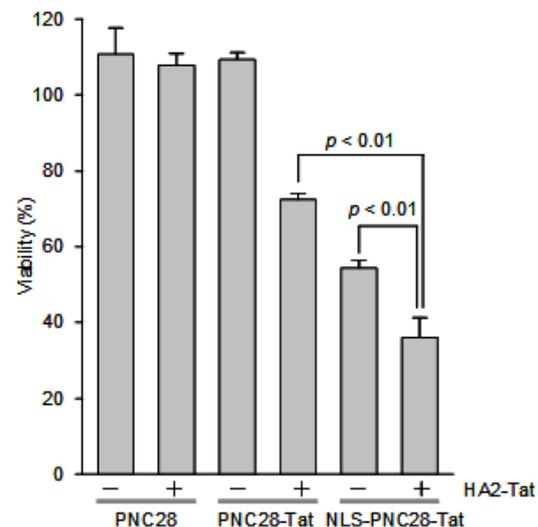


Figure 3. HA2-Tat enhances the cytotoxicity of NLS-PNC28-Tat. A549 cells were treated with 6 μ M PNC28, PNC28-Tat or NLS-PNC28-Tat in the presence of 5 μ M HA2-Tat. After 6 h, the cell viability was analyzed by WST-8 assay. Error bars indicate the mean \pm S.D. of triplicate assays.

に、本手法を適用することで核内蛋白質を標的とした抗がんペプチドの薬効を飛躍的に増強可能であることを示した。本オルガネラターゲティングシステムは、ミトコンドリアや小胞体、ペルオキシソーム等の様々なオルガネラ移行シグナルを利用することによって、核以外のオルガネラへも選択的に高分子を送達することが可能な方法論であることから、将来的には薬物の細胞内挙動を自在に制御可能な基盤技術になるものと期待される。

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 4 件)

1. Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y.,

- Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus. J. Mol. Biol., 380, 777-782, 2008. (査読有)
2. Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains. Biomaterials, 30: 3318-3323, 2009. (査読有)
3. 角田慎一, 癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲティング技術の研究., Pharma Vision News, 13, 32-37, 2009. (査読無)
4. 長野一也, 鍋師裕美, 角田慎一, ポストゲノム新時代の創薬基盤技術開発研究, 薬学雑誌, 130, 463-464, 2010. (査読無)

[学会発表] (計 1 件)

1. 角田慎一, 癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲティング技術の研究, 10 回創薬ビジョンシンポジウム, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田慎一 (TSUNODA SHINICHI)
独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部 創薬プロテオミクスプロジェクト
サブプロジェクトリーダー
研究者番号: 90357533

(3) 連携研究者

堤 康央 (TSUTSUMI YASUO)
大阪大学大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 50263306

鎌田 春彦 (KAMADA HARUHIKO)
独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部 創薬プロテオミクスプロジェクト・主任研究員
研究者番号: 00324509

吉川 友章 (YOSHIKAWA TOMOAKI)
大阪大学大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 60432449