

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05744

研究課題名（和文）膜透過ペプチドの受容体をエントランスとしたターゲティングデリバリー

研究課題名（英文）Targeted delivery with receptor of cell penetrating peptide as entrance

研究代表者

奥田 明子（田所明子）（Okuda, Akiko）

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：60454584

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らが開発したサイトゾル移行型膜透過ペプチドPas2r12は、抗体などの高分子をサイトゾルへと導入することができる。このPas2r12を生体へ応用できれば、組織細胞内を標的とした新たな分子標的薬の開発に繋がると期待した。本研究では、作製したCaveolin-1過剰発現株のうち有意にPas2r12によるカーゴタンパク質のサイトゾル導入率が低下する株を見出した。また、Pas2r12およびPa2r12とEGFPの複合体によって、ERKがリン酸化されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性リンパ腫を始めとする癌の治療において、分子標的薬の貢献は非常に大きい。特に、受容体特異的な抗体を用いて、細胞内へと抗がん剤を導入することで効果的で副作用の少ない薬剤が期待できる。本研究はまだ基礎段階ではあるが、細胞内へと高分子を導入できるツールとして意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The Pas2r12 can introduce macromolecules such as antibodies into the cytosol. We expected that this Pas2r12 would lead to the development of new molecular-targeted drugs targeting tissue cells. In this study, We found that the cytosolic transduction of cargo protein by Pas2r12 was significantly reduced one of the caveolin-1 overexpressing strains. We also found that ERK was phosphorylated by Pas2r12 and the complex of Pa2r12 and EGFP.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：膜透過ペプチド Caveolin-1 ERK EGFP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体組織へのタンパク質導入技術は、細胞生物学的基礎研究から創薬・臨床研究に至るまで幅広い分野で必要とされている。しかし、現状では培養細胞レベルでさえ導入方法は確立されているとは言えない。研究代表者らが開発したサイトゾル移行型膜透過ペプチド Pas2r12 は、抗体などの高分子をサイトゾルへと導入することができる[1,2]。この Pas2r12 を生体へ応用できれば、組織細胞内を標的とした新たな分子標的薬の開発に繋がると期待した。さらに、Pas2r12 は特異的受容体の存在が予測された。そこで、この受容体をエントランスとしたターゲティングができるのではないかと考え、本課題の申請に至った。

2. 研究の目的

生細胞内タンパク質導入法として、細胞膜透過性ペプチドを用いる方法がある。しかし、ほとんどがエンドサイトーシスで取り込まれ、導入物質の多くはエンドソーム内に留まるので生理活性を示すことができなかった。研究代表者は、基盤研究 C (H29-H31) においてサイトゾル移行型膜透過ペプチド (Pas2r12) を開発し、カベオラエンドサイトーシスという特殊な経路を介して、緑色蛍光タンパク質や抗体をサイトゾルへと移行させることに成功した[1]。カベオラエンドサイトーシスには、細胞表面にリガンド特異的な受容体が存在することが知られている[3]。本研究では、①カベオラの主要構成タンパク質の一つである Caveolin-1 と Pas2r12 によるカーゴデリバリーとの関係、②Pas2r12 が細胞に対してどのようなシグナルとして認識されているか、以上2点について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Caveolin-1 過剰発現株は、HEK293 (ヒト胎児腎臓由来細胞) を親株として制限酵素によって線状化した Human Caveolin-1/CAV1 Gene ORF cDNA clone expression plasmid (pCMV3-untagged, Sino Biological, China) をランダムインテグレーションすることで作製した。

Caveolin-1 の発現量、Caveolin-1 のリン酸化、ERK のリン酸化量は、Western blot により確認した。免疫染色細胞および Pas2r12 による EGFP のサイトゾル導入細胞は、共焦点レーザー顕微鏡 FluoView FV1200 (Olympus, Tokyo, Japan) により確認を行なった。蛍光標識されたアルブミンと EGFP の細胞内導入量は、NovoCyte Flow Cytometer (Agilent Technologies, CA, USA) を用いて解析を行なった。

4. 研究成果

(1) Caveolin-1過剰発現株についての解析

まず、作製した3株 (Cav38、Cav44、Cav53) に対して、Caveolin-1 (22 kDa) が過剰発現していることを確認したところ、親株である HEK293 に比べて、Cav38、Cav44、Cav53 は約 3.1 倍、4.1 倍、3.4 倍の Caveolin-1 量であることが分かった。これら3株について免疫組織化学染色を行ったところ、Cav38、Cav44、Cav53 において Caveolin-1 が細胞膜辺縁や細胞基質内に散在している様子が観察された。Caveolin-1 の細胞における分布は、細胞表面のカベオラが知られている。よって、細胞膜辺縁にみられるシグナルはカベオラに局在している Caveolin-1 に由来するものである可能性が考えられた。

カベオラ依存性エンドサイトーシスのマーカーとしてアルブミンが知られている。Caveolin-1 過剰発現株でアルブミンの細胞内導入量は顕著に低下するという報告があることから、3株に

おける牛血清アルブミンの細胞内導入量を比較した。BSAは、細胞表面カベオラ構造内にあるgp60に結合し、これによってカベオラ依存性エンドサイトーシスが引き起こされることから、カベオラ依存性エンドサイトーシスのマーカーとして使用される。HEK293に対してCav38、44、53におけるBSAの細胞内導入量は、おおよそ1/2であることが分かった。以上の結果から、Cav38、44、53は、Caveolin-1が過剰発現しており、一様にカベオラ依存性エンドサイトーシスマーカーの導入量が低下することが示された。

(2) Caveolin-1過剰発現株におけるPas2r12によるEGFPのサイトゾル導入率への影響

Pas2r12によるEGFPの細胞内導入量について解析を行った。HEK293に対してCav38、44、53におけるEGFPの細胞内導入量は、顕著に増加していることが分かった。Pas2r12によりサイトゾルへEGFPが導入された細胞の割合を、共焦点レーザー顕微鏡解析により確認した。EGFPのサイトゾル導入細胞の割合は、HEK293では30%であった。一方、Cav38は34%、Cav53は43%でありHEK293におけるEGFPのサイトゾル導入率と差がなかったが、Cav44は12%と顕著に低下した。以上の結果から、Cav44では細胞内へEGFPは導入されたが、サイトゾル導入がほとんど行われなことが分かった。Cav44において、HEK293株との違いがCaveolin-1を過剰発現しているだけではなく、サイトゾルへ導入に必要な遺伝子の発現がランダムインテグレートによりCaveolin-1が挿入されることで起こっているのではないかと考えられた。

(3) CPPによるERKシグナルの活性化

Pas2r12 または Pas2r12 と EGFP の複合体を HEK293 細胞に加え、ERK のリン酸化について調べた。Pas2r12、r12、Pas2、Pas2r12 と EGFP の複合体、EGFP を加えた細胞において、何も加えていないコントロールと比べてPas2r12 および Pas2r12 と EGFP の複合体 ERK のリン酸化が顕著に増加した (図 A)。

次に、Caveolin-1 過剰発現株における Caveolin-1 のリン酸化と Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) 1/2 の活性化について調べた。Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 経路は、増殖、分化、アポトーシスおよびストレス応答を含む多種多様な細胞プロセスを調節する重要なシグナル伝達経路である[4,5]。MAPK 経路には下流タンパク質を活性化及びリン酸化する3つの主要なキナーゼ、MAPK キナーゼキナーゼ (Rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf) など)、MAPK キナーゼ (Mitogen-activated Extracellular signal-regulated Kinase (MEK) 1/2 など)、MAPK (Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) 1/2 など)が含まれる[6]。HEK293 と同様に、Cav38、Cav44、Cav53 では Pas2r12 と EGFP の複合体によって ERK のリン酸化が確認された (図 B)。以上の結果から、Pas2r12 と EGFP の複合体は HEK293 および Cav38、Cav44、Cav53 において細胞外シグナルとして認識されていることが示唆された。

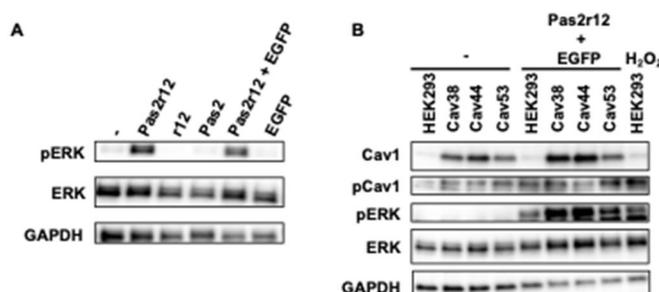


図 A: 膜透過ペプチドおよびPas2r12とEGFP複合体によるERKのリン酸化、
B Caveolin-1過剰発現株におけるPas2r12とEGFP複合体によるCaveolin-1およびERKのリン酸化

< 引用文献 >

- [1] A. Okuda, S. Tahara, H. Hirose, T. Takeuchi, I. Nakase, A. Ono, M. Takehashi, S. Tanaka, S. Futaki, Oligoarginine-Bearing Tandem Repeat Penetration-Accelerating Sequence Delivers Protein to Cytosol via Caveolae-Mediated Endocytosis, *Biomacromolecules*. 20 (2019) 1849–1859. doi:10.1021/ACS.BIOMAC.8B01299.
- [2] A. Okuda, S. Futaki, Protein Delivery to Cytosol by Cell-Penetrating Peptide Bearing Tandem Repeat Penetration-Accelerating Sequence, *Methods Mol. Biol.* 2383 (2022) 265–273. doi:10.1007/978-1-0716-1752-6_18.
- [3] C. Tiruppathi, W. Song, M. Bergenfeldt, P. Sass, A.B. Malik, Gp60 Activation Mediates Albumin Transcytosis in Endothelial Cells by Tyrosine Kinase-dependent Pathway, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 25968–25975. doi:10.1074/JBC.272.41.25968.
- [4] A. Carriere, H. Ray, J. Blenis, P.P. Roux, The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade, *Front. Biosci.* 13 (2008) 4258–4275. doi:10.2741/3003.
- [5] Y. Guo, W. Pan, S. Liu, Z. Shen, Y. Xu, L. Hu, ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis, *Exp. Ther. Med.* 19 (2020). doi:10.3892/ETM.2020.8454.
- [6] U. Degirmenci, M. Wang, J. Hu, Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy, *Cells*. 9 (2020). doi:10.3390/CELLS9010198.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Okuda Akiko, Futaki Shiroh	4. 巻 2383
2. 論文標題 Protein Delivery to Cytosol by Cell-Penetrating Peptide Bearing Tandem Repeat Penetration-Accelerating Sequence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 265 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1752-6_18	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 奥田明子、及川晟	4. 巻 43
2. 論文標題 改良型膜透過ペプチドによるサイトゾルへのタンパク質導入に牛胎児血清が与える影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物試料分析	6. 最初と最後の頁 314-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 須貝景斗、奥田明子
2. 発表標題 改良型膜透過ペプチドによるタンパク質導入におけるCaveolin-1過剰発現の影響
3. 学会等名 本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田明子
2. 発表標題 ドラッグデリバリーと膜透過ペプチドについて
3. 学会等名 生物試料分析化学甲信越支部新潟分科会第18回研修会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------