

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20201

研究課題名(和文)ペプチド/ビニルポリマー・ハイブリッド戦略によるスマートDDSキャリアーの開発

研究課題名(英文)Design and Synthesis of Smart DDS Carrier from Peptide/Vinyl Polymer Hybrid Strategy

研究代表者

西村 慎之介(Nishimura, Shin-nosuke)

九州大学・先端物質化学研究所・特別研究員(PD)

研究者番号：60851475

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)：抗がん剤を用いる化学療法は、がん治療においてしばしば用いられる。しかしながら、抗がん剤は正常細胞をも侵襲するため、高い副作用がしばしば問題となっている。本課題は、がん細胞選択的な取り込みを示すスマートドラッグデリバリーシステム(DDS)キャリアーの実現を目指し、リガンドおよびキャリアー材料の開発を行った。がん組織周辺のpH調整不全を利用し、がん細胞のみに特異的に取り込まれることがペプチドリガンドの開発に成功し、細胞取り込みメカニズムを明らかにした。また、液液相分離を引き起こす生体親和性の高いポリマー材料の開発に成功し、新しい薬物輸送担体としての可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、弱酸性雰囲気急速な構造転移を起こすペプチドが、その高次構造変化に基づいてがん細胞選択的な取り込みを達成した点にある。これは30残基程度の短いペプチドが、高次構造を適切に設計することで天然のタンパク質様の機能を発現できることを示唆している。このようなペプチドはがん細胞にのみ薬剤を輸送できるリガンド分子として高いポテンシャルを秘めており、社会が求めるがん細胞選択的DDSキャリアーの開発に大きく貢献する点で意義深い。

研究成果の概要(英文)：Chemotherapy is considered one of the most effective methods to systemically attack cancerous tissues in the whole body, even if the tumor is hidden and hardly visible. However, anticancer drugs can also destroy normal cells and cause serious side effects, which result in significant deterioration of the quality of life for patients with cancer. It is known that the tumor microenvironment has a major characteristic such as an acidic extracellular pH of ~6.5 compared with normal tissues (pH ~7.4). In this study, a novel pH-sensitive peptide containing an RGD epitope was successfully developed and clarified the mechanism of internalization into cancer cells. This peptide was efficiently taken up by cancer cells compared with normal cells. In addition, a novel biocompatible polymer materials which occur liquid-liquid phase separation (LLPS) were also successfully developed. The polymer materials can be applied to drug delivery system carrier.

研究分野：高分子化学

キーワード：ペプチドリガンド ドラッグデリバリーシステム(DDS) 高分子バイオマテリアル がん細胞選択性細胞取り込み pH応答性 液液相分離 生体親和性

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 1960年代にドラッグデリバリーシステム (DDS) の概念が提唱されて以来、現在までに多くの研究がなされてきた。DDSにはナノテクノロジーが応用されており、古典的なDDSでは数10から200ナノメートル程度のリポソームや高分子ミセルがキャリアーとして用いられている。これらはがん組織周辺の血管内皮(新生血管内皮)細胞間の隙間が正常細胞よりも大きく開口していることを利用しており、がん細胞組織へ特異的に集積する原理は enhanced permeability and retention (EPR) 効果によって説明される。このような手法は受動的ターゲティングと呼ばれ、標的組織における薬物濃度を相対的に高める技術である。近年では、標的指向性分子(リガンド分子)を用いて積極的に標的部位へ薬物を送達させる能動的ターゲティング型のDDSキャリアーが注目されている。受動的キャリアーと比較して、効率的な標的組織への移行と標的細胞への取り込みが期待でき、更に細胞小器官のターゲティングも可能となる。一方、リガンドを用いるため正常細胞と相互作用を起こしてしまうデメリットもある。これらが既存のDDSキャリアーにおける根本的課題であり、本申請課題で提案するがん細胞選択的取り込みが達成可能なスマートリガンドの開発とDDSキャリアーとしての応用が必要である。

(2) 能動的ターゲティングのリガンド分子としては抗体やペプチド、核酸などが用いられる。中でも、ペプチドは一次構造(アミノ酸配列)を巧みに設計することで比較的鎖長の短いペプチドであっても、pHなどの外部環境に応答した $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シートなどの二次構造の形成を精密に制御することができる。また、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列のように細胞親和性などの生理機能もデザインできるため大変魅力的である。環状型のRGDペプチド(cRGD)は増殖性の新生血管内皮細胞に対して選択的に結合し、増殖を抑制することからがんのターゲティングにおいて広く用いられている。しかしながら、cRGDペプチドはその高い細胞親和性から正常細胞とも容易に相互作用する。より良いリガンド分子として、がん細胞周辺のみで高い細胞親和性を示すスマートペプチドの開発が望まれる。

(3) ペプチドをリガンドに有するDDSキャリアーとしては高分子ミセル型が多く、その親水部にはポリエチレングリコール(PEG)が用いられることがほとんどである。これはPEGが被修飾体の血中滞留性を向上させ、免疫原性を減少させるためである。しかしながら、一部のヒトは抗PEG抗体を保有していることが古くより報告されている。近年では、添加物としてPEGが濫用された結果、24%程度ものヒトが抗PEG抗体保有していることがわかってきており、PEGを用いないDDSキャリアーの開発も重要な課題である。

### 2. 研究の目的

本課題は、がん細胞選択的取り込みを達成できる新規スマートペプチドの開発ならびにペプチド-ポリマー・ハイブリッドからなるPEGフリーのDDSキャリアーの創成を目的とした。①ネイティブのRGDモチーフはフィブロネクチンのループ構造上に存在しており、歪んだ形をしているためcRGDは直鎖型RGDペプチドと比較して高いがん細胞親和性を示すこと、②がん細胞組織周辺のpHは正常細胞組織周辺(pH 7.4)と比較して僅かに酸性(pH 6.5)であること、に着目して設計した微少なpH変化を認識してRGDモチーフが直鎖型(ランダムコイル構造)からループ型( $\beta$ -ヘアピン構造)へ可逆的に変化するスマートペプチドの合成を目指した。すなわち、がん細胞周辺において親和性が自発的に向上する分子設計である。また、ペプチドにハイブリッド化することを念頭に、PEGに置き換わる生体親和性ポリマーの開発も同時に目指した。

### 3. 研究の方法

(1)がん細胞組織周辺のpH 6.5でランダムコイル構造から $\beta$ -ヘアピン構造に転位するペプチドをFmoc固相合成法により合成した。

(2)ペプチドの高次構造は円偏光二色性(CD)スペクトル測定、核オーバーハウザー効果(NOE)スペクトル測定(NOESY)および蛍光スペクトル測定により検討した。

(3)中性条件および酸性条件におけるペプチドのがん細胞への取り込み挙動をヒト線維肉腫細胞(HT-1080)およびヒト乳腺がん細胞(MDA-MB-231)を用いて検討した。また、正常細胞への取り込み挙動は正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を用いて同様の条件で検討した。

(4)ピロリドン環を側鎖に有するポリアクリレートを新規に設計合成し、水に対する親和性を示差走査熱量(DSC)測定ならびに濁度測定により検討した。

(5)生体親和性評価はヒト全血を用いた溶血試験ならびにマウスマクロファージ様細胞(RAW264.7)を用いた細胞毒性試験により行った。

#### 4. 研究成果

図 1 に示すペプチド (SSRFWEFESS-<sup>D</sup>P-RGD-P-SSRFWEFESS, βh-RGD) の合成を Fmoc 固相合成法により行った。得られたペプチドの構造はマトリックス支援レーザー脱離イオン化スペクトル (MALDI-TOF MS) 測定により評価した。なお、コントロール実験に用いた SSRFWEFESS-<sup>D</sup>P-RGE-P-SSRFWEFESS (βh-RGE) も同様に合成した。目的物の分子量に見合う単一のピークが得られ、高速液体クロマトグラフィーにより算出した純度は 90% 以上であった。これらのことから、目的ペプチドの合成に成功し、純度よく単離できたといえる。

βh-RGD の希薄条件下 (37 °C) における二次構造の pH 依存性について CD スペクトル測定から評価した (図 2A)。ペプチド濃度は 40 μM とし、pH 範囲は 4.0 から 9.0 とした。中性-塩基性領域 (pH 7.0-9.0) では、208 nm 付近に負の極大吸収が観測され、ランダムコイル構造を形成していることが分かる。弱酸性下の pH 6.7 から 208 および 227 nm の吸収に変化が見られ、pH 5.8 においては β-シート構造形成に基づく 208 nm の正の極大吸収と 227 nm の負の極大吸収が観測された。図 2B は各 pH における 208 nm のモル楕円率 ( $[\theta]_{208}$ ) をプロットしたものである。pH 7.0 付近から二次構造に変化が見られ、pH 6.0 でランダムコイル構造から β-シート構造への転移が完了している。以上より、βh-RGD は pH 変化に対して鋭敏に応答し、弱酸性下では β-シート構造を形成することが分かった。

先にも述べたように、FN の RGD エピトープ様のループ構造を再現するためには、βh-RGD が β-シート構造だけでなく β-ヘアピン構造を形成している必要がある。βh-RGD の高次構造をより詳細に検討するため、モデルペプチドとして N 末端と C 末端をそれぞれビマンとトリプトファンでラベル化した Bimane/Trp-βh-RGD を合成した。このペプチドを重水に溶解させ、重塩酸と重水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 6.0 と 7.4 に調整した。図 3 は各 pH におけるペプチド水溶液の NOESY 測定の結果である。中性条件ではトリプトファンとビマン間の NOE は観測されなかった (図 3A)。一方、弱酸性条件下ではトリプトファン側鎖 (7.4 および 7.7 ppm) とビマンのメチル基およびメチレン基 (1.8, 2.5 および 3.5 ppm) 間で NOE シグナルが観測された (図 3B)。より詳細に検討するため、トリプトファン誘起クエンチング法を用いた蛍光スペクトル測定を行った (図 4)。ビマンの蛍光発光はトリプトファンが近接している場合に消光されることが知られている。pH を 8.0 から 6.0 まで変化させると蛍光強度が減少した。これらの結果から、本研究で設計したペプチドは、弱酸性下でランダムコイル構造から β-シート構造へと転移し、分子内で折りたたまれることで β-ヘアピン構造を形成していることが示唆された。

次に、βh-RGD の細胞内取り込み挙動に対する pH の影響を検討した。本実験では、可視化するためにフルオレセインでラベル化したペプチド (FITC-βh-RGD) を用いた。コントロールには、細胞親和性を示さないと考えられる FITC-βh-RGE を用いた。HT-1080 細胞を pH 6.2 または 7.4 で馴化させ、そこに各ペプチドを加えて培養した。図 5A に培養後の HT-1080 細胞の共焦点レーザー顕微鏡画像を示した。FITC-βh-RGD で処理した細胞では、いずれの pH においてもペプチドに由来する緑色蛍光が観測された。一方、FITC-βh-RGE で処理した細胞では緑色蛍光が観測されなかった。このことから、RGD エピトープの存在が細胞内取り込みに重要であることが分かる。FITC-βh-RGD の内在化挙動を検討するため、リソソームを赤色に染色した。興味深いことに、中性条件ではペプチドがリソソーム内に存在する一方で、酸性条件では細胞質全体に広がっている。Miller らは、βh-ヘアピン構造を持つペプチドは細胞透過性を示し、エンドソームまたは細

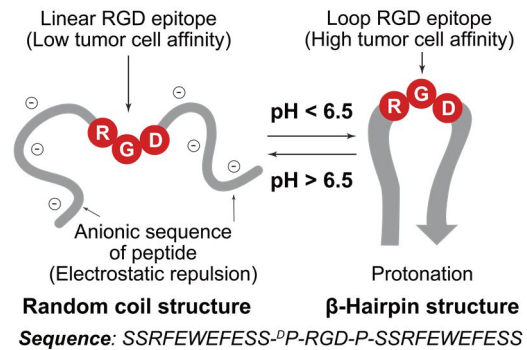


図 1. 本課題で開発した β-ヘアピン構造を形成する RGD ペプチドの設計概念。

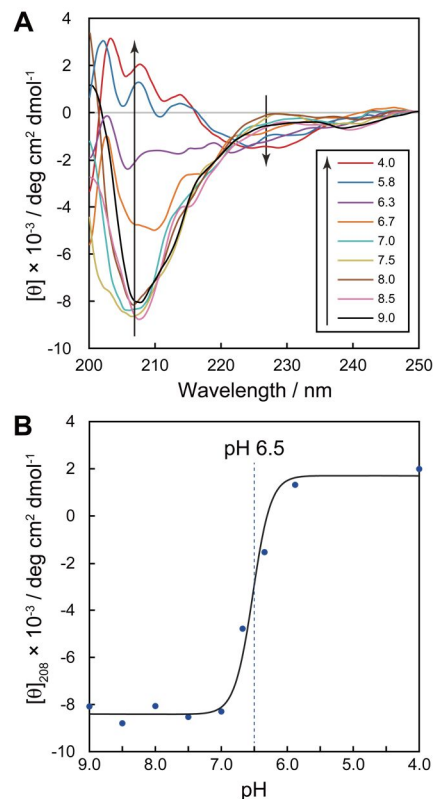


図 2. (A) 希薄条件下における βh-RGD の CD スペクトルと (B) pH に対する  $[\theta]_{208}$  の変化。

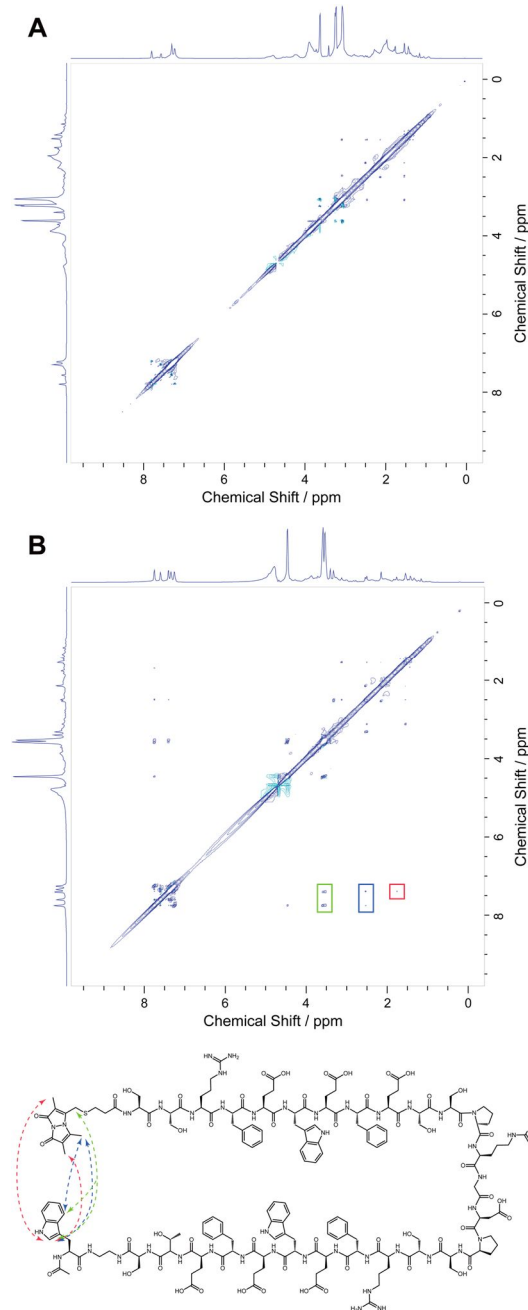


図 3. Bimane/Trp-βh-RGD の NOESY スペクトル. (A) pH 7.4, (B) pH 6.0.

胞膜を透過して内在化することを報告している (S. E. Miller *et al.*, *Pept. Sci.*, **2019**, 122, e24125.)。このことから、ペプチドは RGD の存在によって細胞内に取り込まれ、β-ヘアピン構造の形成に基づいて細胞質全体に内在化したことが明らかとなった。取り込み量をフローサイトメトリーをにより定量化した (図 5B)。弱酸性下における βh-RGD の取り込み量は中性条件下比較して 6 倍程度であった。これは弱酸性下において β-ヘアピン構造を形成し、RGD エピトープが歪むことでがん細胞に対する親和性が向上し、取り込み量が増加したものと考えられる。なお、他種のがん細胞である MDA-MB-231 でも同様の傾向が見られた。

がん細胞は正常細胞に比べ、RGD レセプターである Integrin β1 が過剰発現していることが知られている。そこで、細胞取り込みのメカニズムを明らかにするため、RGD レセプターである Integrin

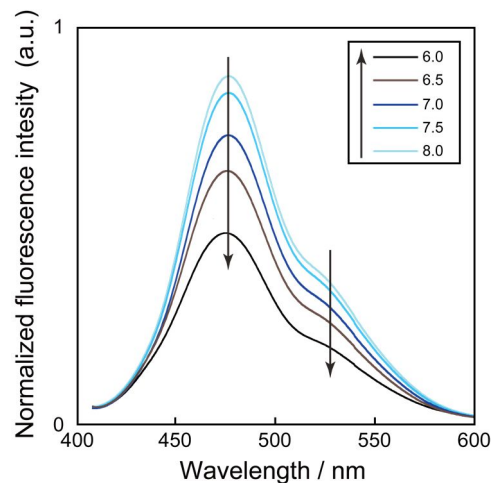


図 4. 各 pH における Bimane/Trp-βh-RGD の蛍光スペクトル。

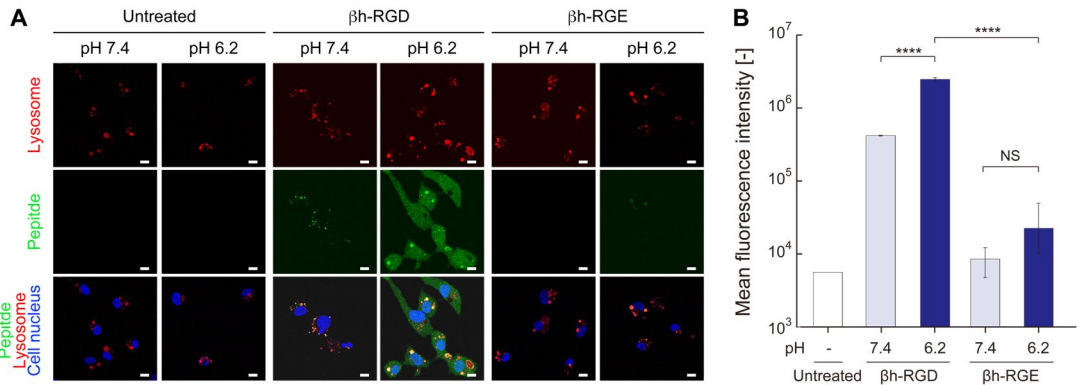


図 5. (A) 共焦点レーザー顕微鏡観察による細胞内取り込み挙動の検討と (B) フローサイトメトリーによる取り込み量の定量結果。

$\beta$ 1 の発現を阻害した HT-1080 (siRNA-treated HT-1080) と未処理の HT-1080 (WT-HT-1080)を用いてペプチドの取り込み挙動を比較した (図 6)。中性条件下ではいずれの細胞でも大きな差は見られなかった。一方で、弱酸性下では siRNA-treated HT-1080 において取り込み量が有意に減少した。このことから、 $\beta$ h-RGD の取り込みには Integrin  $\beta$ 1 の存在が重要であると考えられる。このことを証明するために、正常細胞である NHDF と未処理の HT-1080 に対するペプチドの取り込み実験を行った。pH によらず NHDF にはほとんど取り込まれず、pH 6.2 において有意に差があることが分かった。

以上の結果より、本研究で設計した  $\beta$ h-RGD は弱酸性条件下において Integrin  $\beta$ 1 との親和性が上

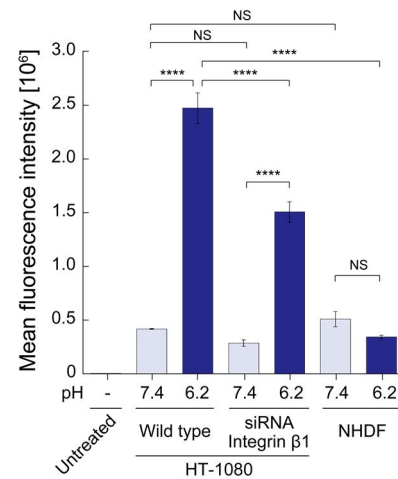


図 6. HT-1080 (Integrin  $\beta$ 1 の発現を阻害の有りおよび無し) と NHDF へのペプチドの取り込み。

昇し、がん細胞にのみ多量に取り込まれることが明らかとなった。 $\beta$ h-RGD はがん細胞ターゲティングリガンドとして高いポテンシャルを有しており、DDS キャリアーへの応用が期待される。

本課題では PEG に置き換わる新たな生体親和性合成高分子 (PNARP, R = Me, Et, Pr, Bu, Pn Hx) およびその共重合体の設計と合成も行った。このポリマーは側鎖にピロリドン環を有しており、生体親和性が高いことが予測される。まず、血液に対する適合性を検討するため、ヒト全血を用いた溶血試験を行った (図 7A)。ネガティブコントロールとして Tween 20、ポジティブコントロールとして Triton X100 を用いた。すべての PNARP は赤血球の溶血を誘起せず、高い血液適合性を有することがわかる。次に、RAW264.7 に対する細胞毒性試験を行った (図 7B)。高濃度条件 ([PNARP] = 10 mg mL<sup>-1</sup>) においてもほとんどの細胞が生存しており、細胞毒性はほとんどないことが明らかとなった。これらの結果から、PNARP は高い生体親和性を有し、PEG の代替として有望である

以上、本研究では能動的ターゲティングのリガンド分子として有望なペプチドの開発、および PEG の代替となる新規高分子の合成に成功した。本成果は医用材料の設計指針となるものであり、医療の発展に資する。

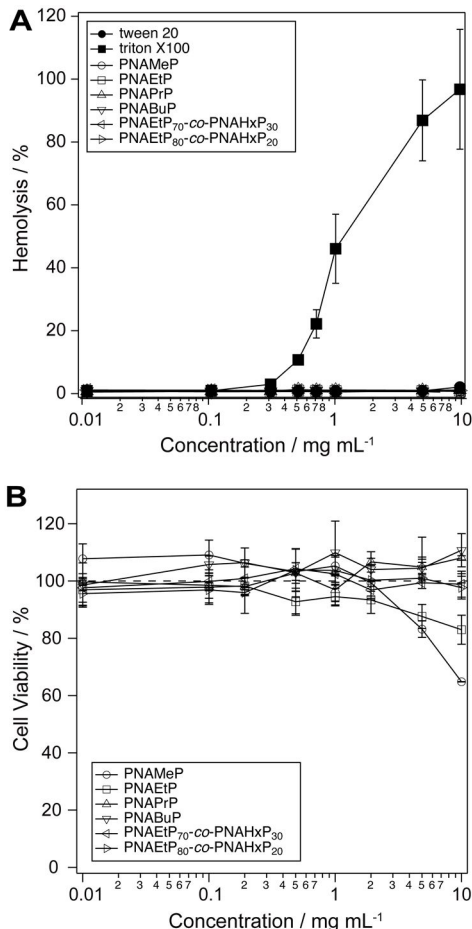


図 7. PNARP の生体親和性評価. (A) 溶血試験. (B) 細胞毒性試験。

## 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 1件）

1. 著者名 Nishimura Shin-nosuke, Nishida Kei, Tanaka Masaru	4. 巻 58
2. 論文標題 A -hairpin peptide with pH-controlled affinity for tumor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 505 ~ 508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CC06218B	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 Nishimura Shin-nosuke, Nishida Kei, Ueda Tomoya, Shiimoto Shohei, Tanaka Masaru	4. 巻 13
2. 論文標題 Biocompatible poly(N-( -acryloyloxy-n-alkyl)-2-pyrrolidone)s with widely-tunable lower critical solution temperatures (LCSTs): a promising alternative to poly(N-isopropylacrylamide)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymer Chemistry	6. 最初と最後の頁 2519 ~ 2530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2PY00154C	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 Nishimura Shin-nosuke, Nishida Kei, Shiimoto Shohei, Tanaka Masaru	4. 巻 -
2. 論文標題 Surfactant-free suspension polymerization of hydrophilic monomers with an oil-in-water system for the preparation of microparticles toward the selective isolation of tumor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ma00129b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村 慎之介, 西田 慶, 田中 賢
2. 発表標題 微小なpH変化に应答して細胞認識性が向上するペプチドリガンドの開発
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Nishimura, K. Nishida, M. Tanaka
2. 発表標題 pH-Responsive -Hairpin Peptide to Regulate Cell Affinity for New Class DDS Carrier
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Nishimura, K. Nishida, M. Tanaka
2. 発表標題 Design and Synthesis of pH-Responsive -Hairpin Formable RGD Peptide and Its Selective Adhesion of Cancer Cells Based on High-order Structural Change
3. 学会等名 日本化学会第100回春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村 慎之介, 西田 慶, 上田 智也, 田中 賢
2. 発表標題 側鎖にピロリドン環を有するビニルポリマー薄膜上における間葉系細胞の接着および分化挙動
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 慎之介
2. 発表標題 生物に優しいテラーメイド型温度応答性ポリマーの開発: 応答温度の自在設計と生体親和性の付与
3. 学会等名 TL0京都 第5回大学発シーズ マッチングセミナー マテリアルサイエンス特集 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 高分子組成物	発明者 西村 慎之介, 上田 智也, 西田 慶, 田中 賢	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-127929	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------