

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790112

研究課題名(和文)

薬物送達ベクター-カクテルの多角的な膜分子認識と標的細胞への効率的導入

研究課題名(英文)

Intracellular delivery of therapeutic molecules using functional cell-penetrating peptides that target specific cells

研究代表者

中瀬 生彦 (NAKASE IKUHIKO)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：40432322

研究成果の概要(和文)：近年、細胞内へ高効率に移行する膜透過ペプチド(CPP)をキャリアとして用いることで、様々な分子の細胞内送達が行われている。本研究では、CPPの機能性を高めるために、さらに細胞標的可能なペプチド配列を組み込むことで、細胞選択的な薬物送達が可能であることを明らかにした。新たにロイシンジッパー配列を利用し、標的配列を発現させた細胞にキャリアペプチドを特異的に集積させることで、細胞膜の損傷がほとんど無い状態でキャリアペプチドがサイトゾルへ到達できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Cell-penetrating peptides (CPPs) have been used as carriers to efficiently deliver various types of molecules that are difficult to internalize into cells by themselves. In this research, to examine cell-specific delivery using functional CPPs bearing specific-molecule target sequences was conducted. Using leucine zipper peptides, we ascertained cell-specific internalization of CPP through target-sequence expressed cell membranes with less cytotoxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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：薬学・創薬化学

キーワード：膜透過ペプチド、薬物送達、細胞標的

1. 研究開始当初の背景

医薬品化学研究において、様々な生理活性を有する分子が生み出され、著しい創薬開発の進歩がみられている。例えば、構造活性相関から見出した新しい機能をもつタンパク質やペプチドの開発、遺伝子薬剤、ナノテクノロジーを駆使した創薬といった新しい“薬物治療への候補物質”が次々と見出されてい

る。しかし、低い細胞膜通過性が問題となり、そのものでは治療用薬物には成り得ないために、実際には生体に使用できない分子が多く存在する。

これまで研究代表者らは、細胞内への移行効率が高いヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来のアルギニンペプチド[HIV-1 Tat (48-60)]や、所属研究室で見出されたアルギニンのみ(8

～12 残基) からなるオリゴアルギニンペプチドといった塩基性ペプチドを細胞内導入キャリアとして用いることで、細胞内へ移行困難な分子を細胞内送達させ、分子の生理活性を上昇させる研究に取り組んできた。また、塩基性ペプチドの細胞内移行機序に関しても研究を進め、(1)マクロピノサイトーシスが塩基性ペプチドの効率的な細胞内移行に重要な経路であることや[Nakase *et al.* (2004)], (2)細胞表面において様々な糖鎖をもつプロテオグリカンと塩基性ペプチドとの強い相互作用がマクロピノサイトーシス誘導に大切な役割をしていることを既に報告している[Nakase *et al.* (2007), Nakase *et al.* (2009)]. これらの塩基性ペプチドを含めた細胞内へ高効率に移行するペプチドは、膜透過ペプチド (cell-penetrating peptide, CPP) といわれ、生体膜を通過することから、高いポテンシャルをもつ細胞内導入キャリアとして世界中から注目されている。

研究代表者らは CPP の機能向上を目指し、特異的に細胞標的可能な CPP の開発を展開している[平成 19~20 年度「糖鎖の多元的認識ベクターの開発と細胞選択的な薬物送達への展開」若手研究(B)]。これまでの研究成果として、癌細胞に高発現しているトランスフェリン受容体(TfR)を標的とするために、フェージディスプレイ法で見出された TfR 結合ペプチド配列を CPP に組み込んだ結果、TfR 依存的に細胞内へ移行し、しかも数分以内で細胞膜を通過することで、サイトゾルおよび核内へ効率的に移行できることを確認している。また、TfR 結合配列をもつ CPP にタンパク質性毒素 (サポリン) を結合させると、TfR 依存的な細胞毒性の誘発が可能であることも示している。

2. 研究の目的

上記の様に、CPP に細胞膜の標的分子を認識する配列を組み込むことで、特異的に薬物送達できるキャリアペプチドが創製できる可能性が示唆された。これまでの結果をさらに発展するために、細胞側に標的にできる分子を人工的に発現することができれば、その発現を制御することで、キャリアペプチドを用いた細胞内導入効率をコントロールできることが期待される。また、特異的な細胞へのターゲティングをより精密にコントロールするためには、標的細胞の膜にある特徴を多元的にとらえる必要がある。標的細胞に過剰発現している受容体が認められても、生体を構成している組織細胞全体を考慮すると、単一の受容体をターゲットするだけでは、特異性の高い細胞標的化は望めない。そこで本

研究課題では、(1)後述するロイシンジッパーを用いた CPP の細胞標的に関する検討及び、(2)標的細胞膜に提示された特異的な複数の膜タンパク質 (受容体、プロテオグリカン等) や(1)における標的発現分子に対して、それぞれの分子認識が異なる CPP の混合 (カクテル) 調製を行ない、カクテルによって標的細胞にのみ CPP を細胞表面に高濃度で堆積させ、最終的に細胞膜通過が生じる新しいシステムを開発する。本報告書では、(1)を中心に結果を述べる。

3. 研究の方法

細胞表面に塩基性ペプチドを集積させる方法として、ロイシンジッパーの Jun と Fos の結合配列を利用し、CPP と Jun ペプチドをハイブリッド化したキャリアペプチドを調製し、また遺伝子工学的に細胞膜表面に Fos 配列を提示させることで、Fos 提示細胞のみに選択的かつ効率的に細胞内導入できるか試みた。

①ペプチドの合成

本研究では、キャリアペプチドとして広く利用されているオクタアルギニン (R8) ペプチドを CPP として用いた。R8 ペプチドの C 末端側に Jun 配列を繋げた R8-Jun を Fmoc 式固相法により合成し、N 末端に FITC (fluorescein isothiocyanate) を導入した後 (FITC-R8-Jun)、脱保護および HPLC による精製を行った。得られたペプチドは、MALDI-TOFMS により同定した。

②細胞培養

細胞は、Chinese hamster ovary 由来の CHO-K1 細胞及び、プロテオグリカンの全ての糖鎖が欠失した変異株である CHO pgs-A745 (A745)細胞を 10% ウシ胎児血清を含む培地 (HamF12(+)) で培養した。

③Fos 配列発現プラスミドの作製

細胞膜表面に目的タンパク質を発現できる p-Display vector のマルチクローニングサイトに、ロイシンジッパーである Fos 配列の発現サイトをクローニングにより組み込み、細胞膜表面に Fos 配列を提示させるプラスミド(p-DisFos) を作製した。

④p-DisFos プラスミドのトランスフェクション

CHO-K1 細胞及び A745 細胞を 35-mm glass-bottomed dish を用いて 24 時間培養した後、p-DisFos プラスミドを細胞内に導入した。トランスフェクション方法として、p-DisFos プラスミドを無血清培地 Opti-MEM 中でカチオン性脂質である Lipofectamine 2000 と複合体を形成させ、HamF12 (+) 培地で希釈後に、

この培地で細胞を2日間培養した。

⑤ペプチドの細胞内導入

トランスフェクション2日後に、ペプチド含有培地でCHO細胞を37℃で10分間培養した後、ペプチドを含有していない培地で細胞洗浄を行い、レーザー共焦点顕微鏡により観察を行った。

⑥抗体による免疫染色

CHO細胞において、トランスフェクション2日後にペプチド含有培地で⑤と同様に細胞を培養後、p-DisFosの形質膜における発現を確認するために、抗myc抗体及び、2次抗体IgG mouse Alexa568を用いて細胞染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

①Jun ペプチド、R8-Jun ペプチドの Fos 提示細胞標的性の確認

Fos と Jun の細胞膜表面における結合性を確認するために、p-DisFos プラスミドにより細胞膜表面に Fos 配列を提示した細胞と、FITC ラベルした Jun ペプチド(FITC-Jun)の結合を、共焦点顕微鏡により確認した。その結果、Fos 発現細胞において FITC-Jun が細胞膜表面に効率的に結合していることが確認され、Fos を発現させていない細胞では、FITC-Jun が細胞膜表面に集積していないことが観察された。

また、R8 ペプチドをハイブリッド化した FITC-R8-Jun においても Fos 提示細胞におけるペプチド集積性を確認した。FITC-R8-Jun ペプチドを細胞に取り込ませた後、Fos 配列に融合した myc epitope に対する抗体を用いて細胞染色を行い、共焦点顕微鏡でそれぞれの蛍光シグナルを観察した。その結果、FITC-R8-Jun と抗 myc 抗体の蛍光シグナルは同じ細胞においてのみ観察されたことから、R8-Jun は Fos 発現細胞に特異的に細胞内移行することが明らかになり、配列中に R8 ペプチドが存在しても細胞表面における Fos 配列を認識できることが示された。

②FITC-R8-Jun の細胞内移行

FITC-R8-Jun の細胞内移行を、FITC-R8、および FITC-Jun と比較することで検討した。その結果、ペプチド濃度 2 μM において、FITC-R8-Jun は Fos 提示細胞の細胞膜を通過し、サイトゾルや核に効率的に移行している様子が観察された。一方、Fos 配列を発現させていない細胞では、FITC-R8-Jun は細胞内にほとんど移行しなかった。同じ実験条件において、FITC-Jun は Fos 提示細胞において形質膜に集積するものの、FITC-R8-Jun のように細胞内への移行はほとんど観察されなかった。この結果から、FITC-R8-Jun ペプチド

において、Jun 配列は形質膜に発現した Fos 配列の認識に、R8 配列は細胞膜通過に寄与することが明らかとなり、キャリアペプチドにおいて必要な機能的配列を付与することで、目的となる機能性キャリアペプチドの創製が可能となることがわかった。

また同様に、全てのプロテオグリカンの糖鎖が欠失した CHO 細胞の変異株である A745 細胞においても、FITC-R8-Jun の細胞内移行に関して検討した。R8 ペプチドは、細胞表面の糖鎖依存的に細胞内移行することが知られており、CHO-K1 細胞と比較して、A745 細胞において明らかに細胞内移行量が減少する。しかし、FITC-R8-Jun ペプチドにおいては、共焦点顕微鏡の観察において、Fos 配列を提示させた A745 細胞においてもペプチドが細胞内移行する様子を観察することができた。このことより、ロイシンジッパーを用いて CPP を効率的に標的細胞表面に集積させることで、プロテオグリカンの糖鎖欠失細胞においても、細胞内導入が可能であることが新たに示された。

③FITC-R8-Jun の細胞内移行における細胞膜損傷に関する検討

FITC-R8-Jun が細胞膜の損傷による細胞内流入ではないことを確認するために、細胞膜が損傷を受けないと染色されない propidium iodide (PI) を用いて検討した。その結果、FITC-R8-Jun の細胞内移行過程において、PI による細胞染色は確認されなかった。このことより、FITC-R8-Jun の細胞内膜通過において、ペプチドによる膜損傷がほとんど無いことが示された。

本研究で CPP とロイシンジッパー配列ペプチドの一種である Jun ペプチドをハイブリッド化することにより、Fos 発現細胞に対して、選択的かつ効率的に細胞内移行させることができた。このキャリアペプチドは、比較的短時間で標的となる細胞内へ移行し、しかも細胞膜の損傷をほとんど生じないことから、薬物等の細胞内送達ベクターとして幅広い応用が期待される。現在、先述したトランスフェリン受容体に結合するペプチドを CPP とハイブリッド化させたトランスフェリン受容体標的キャリアペプチドに加えて、癌細胞に特異的に発現する様々な受容体を標的可能なキャリアペプチドの開発及びカクテルキャリアの有効性に関して引き続き研究を進めている。

以上の結果は、細胞表面の標識を認識可能な膜透過機能を有する新しい送達ベクターの創製が可能であることを示し、さらなる機能性送達ベクターの開発に向けての重要な知見となり得ると強く考えられる。

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9件)

- ① I. Nakase, S. Kobayashi, S. Futaki. Endosome-disruptive peptides for improving cytosolic delivery of bioactive macromolecules. *Biopolymers* (2010) 94, 763-370. (査読有)
- ② R. Miyamoto, H. Akizawa, T. Nishikawa, T. Uehara, Y. Azuma, I. Nakase, S. Futaki, H. Hanaoka, Y. Iida, K. Endo, Y. Arano. Enhanced target-specific accumulation of radiolabeled antibodies by conjugating arginine-rich peptides as anchoring molecules. *Bioconjug. Chem.* (2010) 21, 2031-2037. (査読有)
- ③ H. Yukawa, H. Noguchi, I. Nakase, Y. Miyamoto, K. Oishi, N. Hamajima, S. Futaki, S. Hayashi. Transduction of cell-penetrating peptides into induced pluripotent stem cells. *Cell Transplant.* (2010) 19, 901-909. (査読有)
- ④ K. Shimane, E.N. Kodama, I. Nakase, S. Futaki, Y. Sakurai, Y. Sakagami, X. Li, T. Hattori, S.G. Sarafianos, M. Matsuoka. Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2010) 42, 1482-1488. (査読有)
- ⑤ H.H. Yu, I. Nakase, S. Pujals, H. Hirose, G. Tanaka, S. Katayama, M. Imanishi, S. Futaki. Expressed protein ligation for the preparation of fusion proteins with cell penetrating peptides for endotoxin removal and intracellular delivery. *Biochim. Biophys. Acta.* (2010) 1798, 2249-2257. (査読有)
- ⑥ C. Gao, I. Izquierdo-Barba, I. Nakase, S. Futaki, J. Ruan, K. Sakamoto, Y. Sakamoto, K. Kuroda, O. Terasaki, S. Che. Mesoporous Silica Based Delivery System for a Drug with a Peptide as a Cell-Penetrating Vector. *Microp. Mesop. Mater.* (2009) 122, 201-207. (査読有)
- ⑦ C.L. Watkins, P. Brennan, C. Fegan, K. Takayama, I. Nakase, S. Futaki, A.T. Jones. Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD. *J. Control. Release* (2009) 140, 237-244. (査読有)
- ⑧ S. Kobayashi, I. Nakase, N. Kawabata, H.H. Yu, S. Pujals, M. Imanishi, E. Giralt, S. Futaki. Cytosolic targeting of macromolecules using a pH-dependent fusogenic peptide in combination with cationic liposomes. *Bioconjug. Chem.* (2009) 20, 953-959. (査読有)
- ⑨ I. Nakase, H. Hirose, G. Tanaka, A. Tadokoro, S. Kobayashi, T. Takeuchi, S. Futaki. Cell-surface accumulation of flock house virus-derived peptide leads to efficient

internalization via macropinocytosis. *Mol. Ther.* (2009) 17, 1868-1876. (査読有)

〔学会発表〕(計31件)

- ①膜透過性 R12 ペプチドの効率的な細胞内移行を誘導する受容体の同定
田中弦、中瀬生彦、福田保則、畑中保丸、二木史朗
日本薬学会 第131年会 (2011年3月28-31日、静岡)
- ②アルギニンペプチドのマウス体内動態及び腫瘍指向性に関する検討
中瀬生彦、小西雄介、上田真史、佐治英郎、二木史朗
日本薬学会 第131年会 (2011年3月28-31日、静岡)
- ③細胞透過性オリゴペプチドによる A549 ヒト肺線がん細胞に体する細胞増殖抑制、細胞毒性、及びアポトーシスへの影響
黒田義弘、村田恵理、上田康陽、田崎絵美、小越菜保子、阿部峰大、宮本和英、中瀬生彦、二木史朗、通山由美、廣瀬宗孝
日本薬学会 第131年会 (2011年3月28-31日、静岡)
- ④アルギニンペプチドの細胞内拡散経路に関する検討
広瀬久昭、武内敏秀、中瀬生彦、二木史朗
日本薬学会 第131年会 (2011年3月28-31日、静岡)
- ⑤ステアリル化オクタアルギニンの塗布によるメラノーマ治療
岩根奈緒美、濱進、伊藤真寛、中瀬生彦、土谷博之、二木史朗、小暮健太郎
日本薬学会 第131年会 (2011年3月28-31日、静岡)
- ⑥架橋性リン脂質プローブを用いた EPA 含有リン脂質標的タンパク質の探索
佐藤翔、栗原達夫、中瀬生彦、東佑翼、二木史朗、渡辺文太、平竹潤、友廣岳則、畑中保則、川本純、江崎信芳
日本農芸化学会 2011年度大会 (2011年3月25-28日、京都)
- ⑦ Intracellular delivery of macromolecules using pH-dependent fusogenic peptide
I. Nakase, Sachiko Kobayashi, Shiroh Futaki
The 1st International Conference on MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis "Advanced Chemical Methodology for Creating Materials" (2011年1月24-25日、北海道大学)
- ⑧ Peptide-based approaches to deliver biomacromolecules into cells
I. Nakase, S. Futaki
第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 (2010年12月7-10日、神戸)
- ⑨ Mechanisms of Cellular Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides

I. Nakase

Global COE Symposium JAPAN-CANADA Joint Health Research Program “Biomembrane and Channels” (2010年12月10日、京都)

⑩ Direct penetration of arginine-rich peptides into cells accompanies dynamic alteration of membrane structures

H. Hirose, T. Takeuchi, I. Nakase, S. Futaki
5th International Peptide Symposium (2010年12月4-9日、京都)

⑪ Identification of a receptor responsible for cellular uptake of R12 peptide

G. Tanaka, Y. Fukuda, I. Nakase, Y. Hatanaka, S. Futaki

5th International Peptide Symposium (2010年12月4-9日、京都)

⑫ 膜透過性アルギニンペプチドの細胞内移行機序

中瀬生彦、二木史朗

第1回統合物質シンポジウム「統合物質創製化学の現状と展望」(2010年12月3-4日、京都大学化学研究所)

⑬ Internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides

I. Nakase, Shiroh Futaki

ハイベップ研究所 2010年紅葉ワークショップ (2010年12月3日、ハイベップ研究所京都本社)

⑭ アルギニンペプチドの生体膜透過

中瀬生彦、二木史朗

次世代スーパーコンピュータプロジェクト ナノ分野グランドチャレンジ研究開発 ナノ統合拠点 (2010年12月2-3日、福井市地域交流プラザ)

⑮ 膜透過性アルギニンペプチドの細胞内移行に寄与する受容体の同定

中瀬生彦、田中弦、福田保則、畑中保丸、二木史朗

第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2010年11月29-30日、富山国際会議場)

⑯ アルギニンペプチドを用いた細胞内デリバリー

二木史朗、中瀬生彦

平成22年度 生命融合科学教育部シンポジウム ケミカルバイオロジー-創薬、疾病、障害との接点と今後の展開- (2010年11月26日、富山 高志会館)

⑰ アルギニンペプチドを用いた細胞内デリバリー

中瀬生彦、二木史朗

第37回 岡山脳セミナー、第2回生体制御科学専攻系セミナー (2010年10月9日、岡山大学)

⑱ 膜透過性アルギニンペプチドの細胞内移行機序と薬物送達

中瀬生彦

第13回ペプチドフォーラム (2010年9月18

日、京都薬科大学)

⑲ Identification of a Potential Receptor That Stimulates Cellular Uptake of R12 Peptide

I. Nakase, G. Tanaka, Y. Fukuda, Y. Hatanaka, S. Futaki

31EPS CPP Satellite Meeting (2010年9月10-11日、Copenhagen)

⑳ Cytosolic delivery of macromolecules using pH-dependent fusogenic peptide

I. Nakase, S. Kobayashi, S. Futaki

3rd International Symposium Cellular Delivery of Therapeutic Macromolecules (2010年6月26-29日、Cardiff University)

㉑ アルギニンペプチドを用いた効率的な細胞内導入法の開発

中瀬生彦

岡山大学 若手異分野連携体セミナー (2010年6月18日、岡山大学)

㉒ 細胞内可視化のためのペプチドを用いた効率的なサイトゾル送達

中瀬生彦

遺伝子・デリバリー学会 10周年記念シンポジウム (2010年6月2-3日、北海道大学)

㉓ 膜透過ペプチドと対イオンを用いた効率的な細胞内導入法の開発～準安定状態を探る機能性分子への応用

中瀬生彦

過渡的複合体・キックオフ班会議 (2010年5月24-26日、山梨)

㉔ Dynamics of Membrane-associated molecules that accompany direct penetration of arginine-rich peptides into cells

H. Hirose, T. Takeuchi, I. Nakase, S. Futaki
27th Naito Conference (2010年6月29日-7月2日、札幌)

㉕ アルギニンペプチドによる CXCR4 を介したマクロピノサイトーシス誘導

田中弦、中瀬生彦、福田保則、畑中保丸、二木史朗

日本ケミカルバイオロジー学会 第5回年会 (2010年5月18-19日、神奈川)

㉖ Facilitated Internalization of Arginine-rich Peptides by the Addition of Penetration Accelerating Sequence (Pas)

K. Takayama, I. Nakase, S. Futaki

第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2009年11月30日~12月1日、大阪大学)

㉗ 膜透過ペプチドを用いた癌増殖抑制ペプチドの細胞内導入

二木史朗、中瀬生彦、高山健太郎

第28回メディシナルケミストリーシンポジウム (2009年11月25-27日、東京大学)

㉘ Promoted Cellular Uptake of Arginine-rich Peptides Bearing Penetration Accelerating Sequences (Pas)

K. Takayama, I. Nakase, H. Michiue, T.

Takeuchi, K. Tomizawa, H. Matsui, S. Futaki
3rd-Asia-Pacific International Peptide
Symposium (2009年11月8-11日、Jeju, Korea)

② Application of Expressed Protein Ligation
to the Preparation of Fusion Proteins with
Arginine-rich Cell Penetrating Peptides
H.H. Yu, I. Nakase, S. Pujals, M. Imanishi, S.
Futaki

第46回ペプチド討論会 (2009年11月4~6
日、福岡)

③ ペプチドを用いた細胞内デリバリー
中瀬生彦、二木史朗

近畿バイオインダストリー振興会議 フォ
ローアップ勉強会 (2009年9月11日、大阪
科学技術センター)

④ サイトゾルへの蛋白質の効率的移送
二木史朗、片山沙綾香、小林祥子、中瀬生彦
日本ケミカルバイオロジー学会 第4回
年会 (2009年5月18日~19日、神戸)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

①名称：腫瘍集積型抗癌剤

発明者：二木史朗、中瀬生彦、小西雄介、佐
治英郎、上田真史

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：特願 2010-285707

出願年月日：2010年12月22日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中瀬 生彦 (NAKASE IKUHIKO)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：40432322

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：