

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590649

研究課題名(和文)新規ペプチドベクターを用いたファブリー病マウスの遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文)Developping of the genetherapy for Fabry's disease mouse using the newly designed peptide vector

研究代表者

岩本 武夫 (Iwamoto, Takeo)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90568891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子を混ぜた分枝両親媒性ペプチド・カプセル(BAPC)は、細胞毒性を示さず発現したが、その導入効率はマウスの遺伝子治療に使えるほど高くなかった。そこでDNAとペプチド網を形成する分枝両親媒性陽イオン・ペプチドの生物物理学的特性とトランスフェクション効率について検討を行った。二重鎖プラスミドDNAを加えた場合、BAPCを形成されず、2つの会合タイプが観察された。ペプチド/DNA電荷比の低い場合プラスミドはナノサイズの圧縮構造を取り、ヒーラー細胞で非常に高い感作効率を示した。DNAプラスミドを高効率に運び細胞毒性も少ない既存の物に代わる新しいプラスミドDNA/ペプチド複合体の調製法を見つけた。

研究成果の概要(英文)：We designed a new class of branched amphiphilic peptide capsules(BAPC) that self-assemble into extremely stable nanospheres. BAPC mixed with gene were delivered to cells without cytotoxicity. But transfections were not enough high to apply gene therapy for mice. We investigated the biophysical properties and transfection efficiency for BAPC form peptiplexes with DNA. We found that, in the presence of double stranded plasmid DNA, BAPC are unable to form. Instead depending of the peptide/DNA ratios, the peptides either coat the plasmid surface forming nanofibers (high peptide to DNA ratio) or condense the plasmid into nanometer-sized compacted structures (low peptide to DNA ratios). Different gene delivery efficiencies are observed for the two types of assemblies. The compacted structures display much higher transfection in HeLa cells. This level of transfection is greater than that observed for a lipid-based reagent when the total number of viable transfected cells is taken into account.

研究分野：生化学、生物物理、有機合成化学

キーワード：合成ペプチド 新規ベクター ファブリー病 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

ファブリー病はライソゾーム酵素の一つである β -Galactosidase A が欠損し糖脂質セラミドトリヘキソシド (GL3) が心臓、腎臓、血管内皮細胞などに蓄積し心肥大、腎不全、脳血管障害などの疾患を呈する。現在の治療法として、酵素補充療法により治療効果が期待されているが、2週間毎の投与が必要で患者にかかる精神的経済的負担は大きい。そこで遺伝子治療法の開発が急務である¹⁾。しかし染色体にインテグレーションされ長期発現が期待できるレンチウイルス、レトロウイルスの臨床応用では、重症複合型免疫不全で腫瘍遺伝子を刺激しT細胞性白血病を引き起こした。またインテグレーションしないアデノウイルスベクターなどでは繰り返し行う必然性から、免疫や炎症反応の惹起などの副作用が発生し、より副作用の少ない遺伝子治療の開発が望まれている。そこでカチオン性脂質や高分子で構成される非ウイルス型遺伝子キャリアー(ベクター)が検討され安全性、製剤製、生産コストに優れ今後の発展が見込まれている。しかし現状では遺伝子導入効率が低く、また遺伝子導入に伴い細胞毒性が惹起されるなどの課題が残されている。ブロックポリマーとして、ポリスチレン-b-ポリアクリルアミドシステム、ポリスチレン-b-ポリイソシアン、ポリエチレンオキシド-ポリエチレン、ポリブタジエン-b-ポリ-L-グルタミン酸、グリシン系ペプチド(G4D2、G6D2、G8D2、G10D2)、両親媒性ジペプチド(ポリサルコシン-ポリ-L-グルタミン酸)などが報告された。ブロックポリマーの利点は、カセット式にベシクル表面に容易に機能を付加することができる点である。また UCLA の Deming のグループは K100L20、K60L20、E20L60、R20L60 などコポリマーを形成するポリペプチドベシクルを開発した²⁾。彼らはコポリマーペプチドがミセル、ベシクル、ベシクル中にベシクルを含む多岐な構造を形成し混在し、また形成されるベシクルの大きさと構造はペプチドの疎水性と全体の連鎖長を変えることで調整可能であることを報告した。しかしこれらを利用した応用研究はまだ報告されていない。

申請者はイオンチャネルの構造と機能について長年研究を行ってきた。特に膜貫通部位とチャネルのポアを形成するペプチドの特性について研究してきた。その中でカルシウムイオンチャネル³⁾のポア領域部分の両親媒性ペプチドを化学合成しイオンチャネル機能があることを見出した。またペプチド同士が水溶液中で会合し、セメントのように硬く固まる性質を発見した。さらにシーケンスのどの部分にその機能があるか明らかにし、環境に優しいバイオ接着剤の開発に成功した⁴⁾。KKKFLIVIKKK のペプチドがナノフィブリル構造を取り、フィブリルの絡み合いによって接着能力が発揮された。この能力を引き出すには pH の高い環境が必要なため、

生体内では利用出来ない。そこで中性領域で自己会合体を安定に形成するペプチドのデザインを検討した。そこでリン脂質に似た構造の分枝両親媒性ペプチドで連鎖長の違う2種類のペプチドを混合すると自発的に安定なナノベシクルを形成することを見出した。このナノベシクルは、逆平行 β -シートパッキング構造を取ってペプチド二分子膜を作り、図1に示すような直径200 nmの中空球を形成した。このベクターは3~6 M Urea、2% SDS、Trypsin などの水溶液中でも安定であった。従来ベクターとして使用されるリポソームの臨界ミセル濃度(mMオーダー)に比べ、1000倍も低濃度で安定したベクターが形成できるため、このベシクルの付加価値を高めるために、遺伝子治療用ベクターとしての応用研究を開始した。

2. 研究の目的
デザインした分枝両親媒性ペプチドは臨界会合濃度 $10 \mu\text{M}$ でナノベシクル(ブロックポリマー)を形成した。このベシクルの付加価値を高めるため、遺伝子治療用ベクターとしての利用を検討している。すでに培養細胞で遺伝子導入率29%を確認している。実際にこのベクターでファブリー病マウスの遺伝子治療を行うためには、次の3点を改良または検討する必要がある。

- (1)治療用遺伝子導入率の向上
 - (2)ベクター表面の多価陽イオンによる細胞毒性
 - (3)ベクター投与後惹起される可能な免疫系副作用の影響。
- これらの問題点を改良または明らかにし、新規ベクターで従来法よりも安全性の高いマウスを用いた遺伝子治療の開発を試みることである。

3. 研究の方法
- (1)ベクター材料の分枝両親媒性ペプチドの合成

ベクター材料の分枝両親媒性ペプチド Bis-h9; (FLIVIGSII)2-KKKKK, Bis-h5; (FLIVI)2-KKKKK, Bis-h9-Tat; (FLIVIGSII)2-KKKRRQRRRG は固相ペプチド合成法²⁾で合成した。固相ペプチド合成法では9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) Chemistry を採用し、Fmoc 保護アミノ酸と HOBt/HBTU 活性エステル法を用いて合成した。固相合成の樹脂には、CLEAR アミド樹脂を使い、合成途中の分枝点では、Fmoc-Lys(Fmoc)-OH 試薬を使い分枝構造ペ

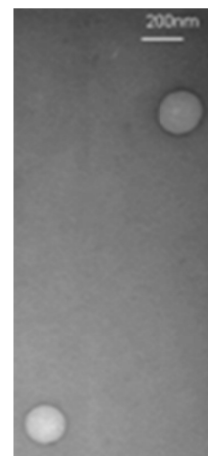


図1 Bis-h9 と Bis-h5 の等量混合で形成されたナノベシクルの TEM イメージ

チドを合成した。合成終了後、TFAにより各々のアミノ酸側鎖の保護基を除去しペプチドも樹脂から切り離し粗ペプチドを得た。粗ペプチドは HPLC で精製し、副生成物が十分に除かれたか質量分析器 (MS) で確認し、純度検定を行った。ベクター材料としては 95% 以上のものを使用した。

(2) ハイブリット型治療用遺伝子 (GALC+eGFP) cDNA の調製
ヒト病欠損酵素 ガラクトシダーゼ (GALC) とマーカー遺伝子 enhanced green fluorescent protein (eGFP) を組込んだプラスミドを大腸菌 (DH5) にストックしたのから起こし、大量培養した後、Qiagen kit にて精製した。

(3) 遺伝子導入率測定並びに酵素活性測定
 1×10^5 個の 293A 細胞株にペプチドベクターを加え 20 時間培養を行いその後培養液を交換し培養を継続し、翌日細胞を回収し発現した GFP の蛍光強度をフローサイトメトリー (FACS) で測定し遺伝子導入率を評価した。その後トリプシン処理で細胞を回収し、酵素活性を 4-MU 蛍光ラベルした基質を用いて発現したタンパクの酵素活性を測定した。

4. 研究成果

図 2 に示すように培養細胞 293A にペプチドベクターで遺伝子を導入し発現した eGFP を示している。強い細胞毒性は示さず細胞内の酵素活性も確認できたが、期待するほど遺伝子導入効率は向上しなかった。そこで次に遺伝子導入のメカニズムについて検討を行った。当初よりプラスミド DNA はペプチドの Lys 残基の陽イオンアミンと DNA の構成要素である陰イオンのリン酸基との間で静電的な相互作用しペプチドカプセルの中にトラップされていると仮定していた。そこで最適化した条件で 4.7 kb の eGFP 二重鎖プラスミド DNA (ds pDNA) を混ぜてペプチドカプセルの形態学観察を大気圧電子顕微鏡で調べた結果、期待した数十 nm のペプチドカプセルを見つけることはできなかった。そこで直径 20nm のカプセルを形成する時に必要なペプチド分子の理論数をコンピューターモデリング手法で 1600~2000

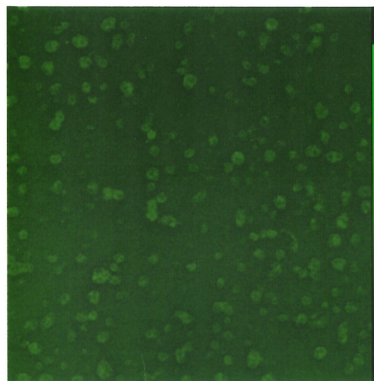


図 2 共焦点蛍光顕微鏡による eGFP 発現 293A 細胞画像

と推定した。一つのカプセルに一つの ds pDNA が含まれれば最も高率の良い遺伝子発現が期待できる。このモデルのペプチド由来の陽イ

オン (P) と DNA 由来の陰イオン (N) の電荷比 (P:N) を計算すると 65.5 であった。実際に電荷比が 65.5, 20.8, 10.4, 5.2, 2.6, 1.3, 0.65 になるようにペプチドと ds pDNA を調整し透過型電子顕微鏡で観察した。その結果 ds pDNA のみのときと比べ電荷比 10.4 に調整したサンプルでは明らかに密集した nano 構造を示した。電荷比 65.5 の場合は nanofiber 状に広がり電荷比を調節することで異なる構造の複合体が生まれることを見出した。実際の溶液中での電荷比 10.6 の密集した nano 構造を原子間力顕微鏡で調べた結果、高さ 70~85nm 横 200~250nm であった。しかしこの系ではペプチドカプセルの存在は見つけることができなかった。このことはペプチドに ds pDNA を加えると複合体を形成するがカプセル構造は形成しないことが判った。本当に複合体が形成されているかを確認するため、0.8% アガロースゲル電気泳動を用いて各々の試料バンドの移動度を測定した結果、電荷比 2.6 と 10.4 のバンドは複合体形成により負電荷が減ったため上方にバンドシフトし 20.8 においては電気泳動されずまた DNA 検出蛍光試薬の臭化エチジウムは複合体形成により ds pDNA に侵入できず検出されなかった。またペプチドが線形 DNA 配列の表面を覆ったためデオキシリボヌクレアーゼ-1 を作用させても DNA の分解は起こらなかった。電荷比 10.4 のサンプルとトランスフェクション用に市販されているリポフェクチンをリファレンスにしてヒラー細胞に 6 h インキュベーションしトランスフェクション効率を FAC で測定した結果、リポフェクチンと比較して明らかに高い効率 30% を示した。更にリポフェクチンでは強い細胞障害を示したが無毒であった。更に効率に影響を及ぼす CaCl₂ 添加濃度や培養液の構成について最適化を行った。その後、蛍光ラベル化ペプチド複合体を用いて温度をコントロールしながら細胞への取り込みを調べた結果、取り込みはエンドサイトーシスのような温度依存的なプロセスで起こることが分かった。最高トランスフェクション率を示した電荷比 10.4 の nanostructure 表面のゼータ電位を測定した結果 +5mV であった。この値は陰極の細胞膜表面でのインタラクションを促進するには適正な値で細胞損害を与えないような高値ではなかった。このように細胞にやさしく高効率なトランスフェクションが行われることが構造解析知見を得ることによって可能に成った。これらの知見を基により高効率なペプチドのデザインも可能である。最近急成長している siRNA 治療学は siRNA の細胞内移入による遺伝子発現抑制によって行われる。DNA に比べ低分子の siRNA とペプチドを高電荷比で調整し、分解されやすい siRNA をペプチドで保護して細胞まで運ぶ安価 siRNA の細胞内移入による遺伝子発現抑制なキャリアーとして使用可能かどうかを検討する予定である。

<引用文献>

Kyosen, S., Iizuka, S., Kobayasi, H., Kimura, T., Fukuda, T., Shen, J., Shimada, Y., Ida, H., Eto, Y., Ohashi, T. (2010) Neonatal gene transfer using lentiviral vector for murine Pompe disease: long term expression and glycogen reduction. *Gene Therapy* 17, 521-530.

Holowka, E. P., Pochan, D. J., Deming, T. J. (2005) Charged Polypeptide Vesicles with Controllable Diameter *Journal of the American Chemical Society* 127 (35), 12423-12428.

Grove, A. Tomich, J. M., Iwamoto, T. Montal, M. (1993) Design of a functional calcium channel protein: Inferences about an ion channel forming motif derived from the primary structure of voltage-gated calcium channels. *Protein Sci.* 2, 1918-1930.
Shen, X., Moore, R., Mo, X., Frazier, S.J., Iwamoto, T., Tomich, J.M., Susan Sun, X.S. (2006) Novel pH Dependent Adhesive Peptides. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 837-844.

5. 主な発表論文等

Avila LA, Aps L, Sukthankar P, Ploscaru N, Gudlur S, Simo L, Szoszkiewicz R, Park Y, Lee S, Iwamoto T, Ferreira L, Tomich J. et al. (2015) "Branched amphiphilic cationic oligopeptides from peptiplexes with DNA: A study of their biophysical properties and transfection.", *Mol. Pharmaceutics*, 査読有 12 (3), pp 706-715 DOI:10.1021/mp500524s

Sukthankar P, Avila LA, Whitaker S.K, Iwamoto T, Morgenstern A, Apostolidis C, Liu K, Hanzlik R, Dadachova E, Tomich J. (2014) "Branched amphiphilic peptide capsules: Cellular uptake and retention of encapsulated solutes.", *Biochim Biophys Acta*. 査読有 1838(9), 2296-2305 DOI:10.1016/j.bbame.2014.02.005

Sukthankar P, Gudlur S, Avila L. A, Whitaker S.K, Katz B. B., Hiromasa Y, Gao J, Thapa P, Moore D, Iwamoto T, Chen J, Tomich J. (2013) "Branched oligopeptides form nanocapsules with lipid vesicle characteristics.", *Langmuir*. 査読有 29(47), 14648-54 DOI:10.1021/la403492n

Gudlur S, Sukthankar P, Gao J, Avila LA, Hiromasa Y, Chen J, Iwamoto T, Tomich J. (2012) Peptide nanovesicles formed by the self-assembly of branched amphiphilic peptides. *PLoS One.*;7(9):e45374. DOI:10.1371/journal.pone.0045374

(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)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩本 武夫 (Iwamoto, Takeo)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90568891

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

小林 博司 (Kobayashi, Hiroshi)
Tomich, John M