

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656500

研究課題名(和文)細胞検査用高機能バイオチップの創製

研究課題名(英文)Construction of a cell-analyzing biochip

研究代表者

三原 久和 (Mihara, Hisakazu)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：30183966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ガン細胞等の分化や状態の迅速・精密解析を目標として、細胞と種々の異なる相互作用をす
るペプチドリガンド群を搭載した細胞検査バイオチップを創製するための挑戦的萌芽研究を行った。細胞の表面と相互
作用し、種々の異なる細胞挿入活性を有するペプチドライブラリを作成した。機能性ペプチド群の細胞相互作用の違い
を細胞フィンガープリントとして解析する細胞検査用ペプチドチップ開発のための萌芽的研究成果を得た。本挑戦的萌
芽研究では、細胞ごとに異なる作用を示す種々のペプチドリガンドを開発し細胞フィンガープリント解析に成功した。
さらに細胞相互作用や細胞挿入のメカニズムも研究した。

研究成果の概要(英文)：To approach the goal of high-throughput analysis of cancer cells, the study on dev
elopment of biochips using peptide ligands with various cell interaction abilities was performed. A pepti
de library showing various cell-penetration activities was successfully constructed. The different activi
ties were converted to the color-bar codes regarded as cell finger print patterns. The mechanism of pepti
de cell-penetration was also examined.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオチップ ペプチド 細胞

1. 研究開始当初の背景

DNA チップ、タンパク質チップや細胞チップなど種々のタイプのバイオチップ（マイクロアレイ）の開発研究が競争的に行われている。網羅的解析の研究用 DNA チップは種々開発され、実用されているが、タンパク質チップや細胞チップにおいては未だ基盤レベルの研究のみであり、臨床現場や食品検査など現場で実際に利用できるバイオチップには至っていない。化学的に安定で、利用価値の高いバイオチップの開発研究が重要視されている。

代表者は、約8年間ペプチドを捕捉分子群に用いたチップ（ペプチドチップ）の開発基礎研究に勢力を注入してきた。ペプチドチップは、抗体などのタンパク質チップや種々の細胞を配置させた細胞チップと大きく異なり、化学的に非常に安定でより安価に作成できる利点を有している。

一方、ガン細胞や ES 細胞、iPS 細胞の分化や状態を迅速・正確に検査する技術が望まれている。申請者は、ペプチドチップ開発の過程で細胞と相互作用し、細胞挿入活性を有する α ヘリックスペプチド群を見出してきている。これらのペプチドは、そのアミノ酸配列の種類により、同じ細胞でも異なる細胞挿入活性を示し、また同じペプチドでも細胞の種類によって大きく異なる細胞挿入活性を示す。つまり 20~30 種の少数のペプチド群を配置したアレイを作成することにより、その細胞に対する活性の違いをデータ集約（細胞フィンガープリント解析）することで、種々の細胞の種類や状態を識別できる細胞検査用チップとすることができる。本研究では、このような細胞検査バイオチップを作成するために、細胞と異なる相互作用をするペプチドリガンドを種々作成し、その相互作用のメカニズムの違いを明らかにし、次世代型の細胞検査デバイス開発につながる挑戦的研究を実施する。

2. 研究の目的

臨床医の経験的判断で行っているガンの悪性度や種類などを手術現場で迅速・精度よく解析する手法や ES 細胞、iPS 細胞の分化や状態を正確に把握する技術への要求度が高まっている。我々は、膜タンパク質や多糖などの細胞の表面と相互作用し、細胞挿入活性を有するペプチドライブラリを作成している。本研究の独創的な点は、それらの機能性ペプチド群の細胞相互作用の違いを細胞フィンガープリントとして解析する細胞検査用ペプチドチップである。本挑戦的萌芽研究で行う細胞検査ペプチドチップ創製では、細胞ごとに異なる作用を示す種々のペプチドリガンドが開発でき、その細胞相互作用や細胞挿入のメカニズムを研究することによ

り、目標のバイオチップ創製に近づく成果を獲得できる。

3. 研究の方法

(1) 細胞挿入活性を有するペプチドリガンドのデザインと合成

Tat などの天然ウイルス由来ペプチドや人工のオリゴアルギニンペプチドなど多くの細胞挿入活性ペプチド (CPP) が知られているが、本研究では、系統的アミノ酸置換が行えるよう設計した両親媒性の α ヘリックスペプチド群を種々100 種程度デザインし、合成する。

(2) ペプチドリガンドの細胞挿入活性

設計合成したペプチドリガンドの細胞挿入活性を、ペプチドに導入する蛍光基 TAMRA により評価する。ペプチドのアミノ酸配列の違いにより、どのように細胞挿入活性に違いが出るかを詳細に検討し、細胞検査に適合したペプチド群を選定する。

(3) 細胞挿入活性ペプチドの相互作用メカニズム評価

ペプチドの細胞挿入活性に関する細胞相互作用メカニズムの解析は、ペプチド群を細胞検査チップ応用するための重要な知見となる。温度条件やペプチド濃度、相互作用時間、阻害剤など種々の条件を変えた分析を行い、ペプチドによる細胞相互作用メカニズムの違いの解析を実施する。

(4) 低濃度で高活性を示すペプチドナノ粒子の検討

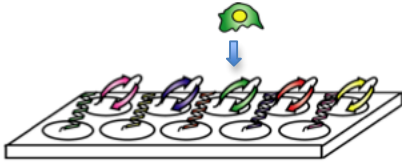
Tat やオリゴ Arg など現在のレベルでは μ M の濃度を必要とする CPP が多く知られているが、ナノ粒子に固定化・集積化することにより、nM オーダーの少量で CPP 活性を示すペプチド群に性能発展させる。この高機能化が成功すれば、より好感度の細胞相互作用ペプチドリガンドが獲得できる。

(5) 細胞検査用ペプチドチップ創製

設計した α ヘリックスペプチドの細胞挿入活性のペプチド配列による挿入活性の違いをパターン解析し、細胞ごとの細胞フィンガープリント (CFP) とする。同じペプチドでも細胞が異なることにより細胞挿入活性が異なることで、様々なカラーバーコードパターン CFP を作成できる。これらペプチド群を固定化ではなく基板上に配置・スポットする手法を開発する。またナノ粒子による高機能化ペプチドの配置化も検討する。また分化状態の異なる細胞に対しても活性の違いにより細胞分化を識別できるようペプチド群を検討する。ガン細胞の分化や状態の迅速・精密解析に結び付ける検討も行う。

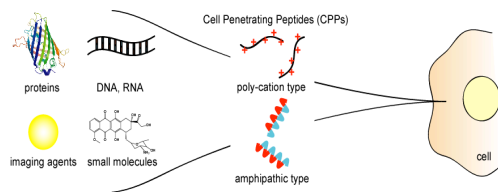
4. 研究成果

細胞の種類により大きく異なる細胞挿入活性を有するペプチドをさらに種々デザインし、より多様な活性をもつペプチドリガンド群を創出した。また、これらペプチド群の細胞相互作用メカニズムを調べることは、より良いペプチドデザインや細胞検査バイオチップ应用到不可欠であり、ペプチドと細胞表面受容体との相互作用を解析する研究を開始した。



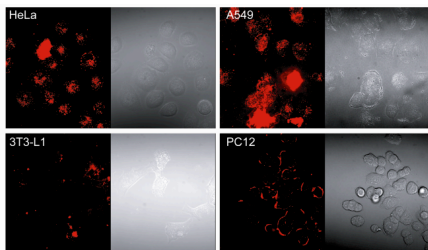
(1) 細胞挿入活性を有するペプチドリガンドのデザインと合成

Tat などの天然ウイルス由来ペプチドや人工のオリゴアルギニンペプチドなど多くの細胞挿入活性ペプチドが知られている。本研究では、系統的アミノ酸置換が行えるよう設計した種々の両親媒性の α ヘリックスペプチド群約 200 種をデザインし、合成した。



(2) ペプチドリガンドの細胞挿入活性

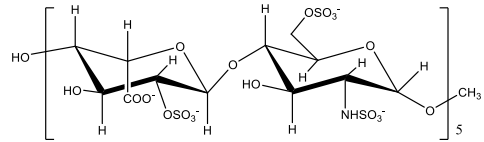
設計合成したペプチドリガンドの細胞挿入活性を、ペプチドに導入する蛍光基や金ナノ粒子により評価した。ペプチドのアミノ酸配列や細胞の違いにより、どのように細胞挿入活性に違いが出るかを詳細に検討し、細胞検査に適したペプチド群を選定した。とくに配列中央に Ala あるいは Phe をもつペプチドでは細胞への挿入活性や細胞腫への特異性が大きく異なることを見出した。



(3) 細胞挿入活性ペプチドの相互作用メカニズム評価

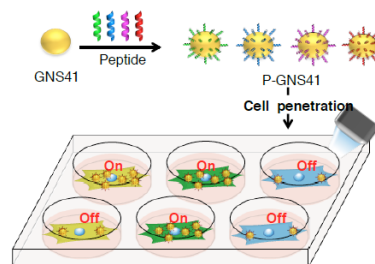
ペプチドの細胞挿入活性に関する細胞相互作用メカニズムの解析は、ペプチド群を細胞検査チップ应用到するための重要な知見となる。ペプチド濃度、相互作用時間など種々

の条件を変えたペプチドの細胞挿入活性分析を行った。阻害剤を用いたペプチドの細胞挿入活性分析を行い、ペプチドが主としてマクロピノサイトーシスにより細胞導入されることが分かった。また、細胞表面の相互作用標的候補となる硫酸化多糖類とペプチドとの相互作用を評価する研究により、ペプチド構造の違いによる細胞との相互作用の差異を明らかにするモデル研究に成功した。



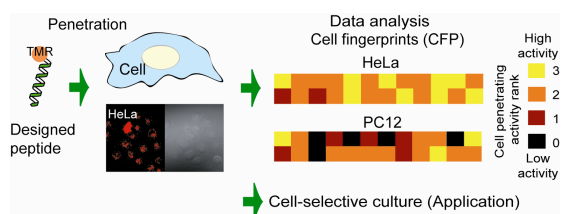
(4) 低濃度で細胞挿入活性を示すペプチド金ナノ粒子の開発

Tat やオリゴ Arg など現在のレベルでは μ M の濃度を必要とする細胞挿入ペプチドが多く知られているが、金ナノ粒子に固定化・集積化することにより、nM オーダーの少量で細胞挿入活性を示すペプチド群に性能発展させた。より高感度の細胞相互作用ペプチドリガンドが獲得できた。



(5) 細胞検査用ペプチドチップ創製

設計した α ヘリックスペプチドのペプチド配列による細胞挿入活性の違いをパターン解析し、細胞ごとに特徴的な細胞フィンガープリントの作成に成功した。同じペプチドでも細胞の種類により細胞挿入活性が異なることで、様々な細胞フィンガープリントのカラーバーコードパターンを作成できる。また分化状態の異なる細胞に対しても活性の違いにより細胞分化を識別できる分析も実施した。将来、癌細胞を検査できるペプチドバイオチップを開発するための萌芽的研究成果として期待される。



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. K. Usui, T. Kikuchi, M. Mie, E. Kobatake, H. Mihara, Systematic Screening of the Cellular Uptake of Designed α -Helix Peptides *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 2560-2567 (2013) 査読有
2. T. Kakiyama, K. Usui, K. Tomizaki, M. Mie, E. Kobatake, H. Mihara, A Peptide Release System using a Photo-cleavable Linker in a Cell Array Format for Cell-toxicity Analysis *Polymer J.*, **45**, 535-539 (2013) 査読有
3. K. Usui, T. Kikuchi, K. Tomizaki, T. Kakiyama, H. Mihara, A Novel Array Format for Monitoring Cellular Uptake Using a Photo-Cleavable Linker for Peptide Release *Chem. Commun.*, **49**, 6394-6396 (2013) 査読有
4. H.J. Park, H. Tsutsumi, H. Mihara Cell Penetration and Cell-selective Drug Delivery Using α -Helix Peptides Conjugated with Gold Nanoparticles *Biomaterials*, **34**, 4872-4879 (2013) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Hisakazu Mihara, Kenji Usui, Hiroshi Tsutsumi, Kiyoshi Nokihara, Designed Peptide Libraries for Cell Analyzing Microarrays, 6th International Peptide Symposium, 2013 年 6 月 22 日～2013 年 6 月 27 日, Hawaii (招待講演)
2. Park Hyejin, 堤 浩, 三原久和, α ヘリックスペプチド結合金ナノ粒子を用いた細胞導入と細胞選択的ドラッグデリバリー, 第 49 回ペプチド討論会, 2012 年 11 月 07 日～2012 年 11 月 09 日, 鹿児島
3. 西村仁孝, Hyejin Park, 堤 浩, 三原久和, 細胞透過性ペプチド結合金ナノ粒子の細胞との相互作用評価, 第 61 回高分子討論会, 2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日, 名古屋

[図書] (計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三原久和 (MIHARA, Hisakazu)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：30183966

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし