

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460158

研究課題名(和文) HSP47を標的とするペプチド性抗線維化薬の開発

研究課題名(英文) Development of a peptidic HSP47 inhibitor as an antifibrotic agent

研究代表者

小出 隆規 (Koide, Takaki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：70322253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体に局在するコラーゲン特異的分子シャペロンHSP47は、線維化疾患においてコラーゲンの過剰な産生に貢献している。研究代表者らは、HSP47を阻害するコラーゲン様3重らせんペプチドを細胞に取り込ませ、小胞体に蓄積させることができれば、線維化疾患の治療に役立つと考えた。本研究により、*in vitro*で当該ペプチドを細胞内に導入することには成功したが、逆行輸送をたどって小胞体に送達させることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：HSP47, an endoplasmic reticulum (ER)-resident collagen-specific molecular chaperone, contributes to the overproduction of collagen in fibrotic diseases. The aim of this study was to deliver an HSP47 inhibitor peptide to the ER via the retrograde vesicular transport system. The result demonstrated that the peptide was efficiently taken up by the cell *in vitro*. However, accumulation of the peptides to the ER lumen has not been achieved.

研究分野：ペプチド・タンパク質化学

キーワード：ペプチド コラーゲン 分子シャペロン

1. 研究開始当初の背景

(1)ペプチド医薬品の問題点

ペプチドやタンパク質など極性の大きい高分子は、脂質二重層からなる細胞膜を透過できないため、細胞内にほとんど移行しない。このため、このような中～高分子量薬物は、もっぱら細胞表面あるいは細胞外に存在する受容体や酵素を標的として開発されてきた。しかし、細胞内において分泌経路を形成する小器官(小胞体およびゴルジ体)は、膜に隔てられたいわゆる「内なる外」であるため、そこへ薬物を送達するためには、必ずしも膜を透過させる必要がない。この点に着目して、小胞体に局在するタンパク質を標的としたペプチド性薬物の開発を試みることにした。

(2) 標的タンパク質としての heat-shock protein 47 (HSP47)

本研究では、小胞体に局在するコラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 を創薬の標的とする。HSP47 はプロコラーゲンの正常な 3 重らせん構造形成に必須であり、HSP47 の機能を阻害することによりコラーゲンの産生は妨げられる。肝硬変に代表される線維化疾患においては、HSP47 は過剰なコラーゲン産生を促す悪玉シャペロンとして働く。新津らは HSP47 に対する siRNA の投与が実験動物の肝硬変を治療しうることを示した(引用文献)。

(3)HSP47 阻害ペプチドについて

研究代表者らはこれまでに、HSP47 によって認識されるコラーゲン 3 重らせん上のアミノ酸配列(X-Arg-Gly)を同定し、HSP47 とコラーゲンとの結合を *in vitro* で阻害する 3 重らせんペプチドを開発した(引用文献)。本研究では、これらを細胞に投与する薬物として使用することとした。

(4)ペプチドの細胞内への輸送および安定性に関する背景

中～高分子量薬物を培養細胞内に取り込ませるためには、アルギニンリッチな cell-penetrating peptide (CPP) とのコンジュゲート化がよく利用されている。研究代表者らは最近、コラーゲン様 3 重らせん構造を有するアルギニンリッチ CPP を開発した。この CPP は剛直な 3 重らせん構造を有しているため、タンパク質分解酵素による消化に強く抵抗する(血中での半減期 > 1 日)ことがわかっている(引用文献)。

細胞外から投与したペプチドの小胞体への輸送については、報告が少ないが、緑色蛍光タンパク質(GFP)に CPP である Tat ペプチドと小胞体滞留シグナルである Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) を付加した組換えタンパク質、Tat-GFP-KDEL が小胞体内腔に蓄積することが報告されている(引用文献)。また、細胞外から取り込まれたタンパク質が、

ゴルジ体を經由して小胞体に到達する逆行輸送のメカニズムについては、コレラ毒素やシガ毒素といった毒素タンパク質をもちいてよく研究されている。さらにアルギニンリッチ CPP 自体も、同じ逆行輸送ルートをたどりうることを示されている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞外から効率的に細胞内に取り込まれ、逆行輸送経路をたどって小胞体に移行、蓄積され、そこで、HSP47 とプロコラーゲンとの結合を競合的に阻害することによってコラーゲンの産生を抑制するような、コラーゲン様 3 重らせんペプチドを設計・合成し、培養細胞系をもちいてそのコンセプトを検証することを目的とした。また、このような活性を持つペプチドは、肝硬変をはじめとする線維化疾患治療薬のリード化合物としてのポテンシャルを有するものと期待できる。

3. 研究の方法

(1)ペプチドの合成

使用したすべてのペプチド鎖は一般的な 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) 型固相合成法を用いて手で構築した。トリフルオロ酢酸-スカベンジャー系による脱保護と樹脂からの切断を行った後、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)で精製し、凍結乾燥した。また、必要に応じて蛍光基であるフルオレセインあるいは TAMRA を付加した。得られたペプチドの純度は RP-HPLC で確認し、MALDI-TOF 質量分析により目的物であることを確認した。

(2)ペプチドの物性解析

コラーゲン様ペプチドはリン酸緩衝液に溶解し、1 晩以上 4℃ で放置したのち実験に使用した。ペプチドの 3 重らせん構造は、円偏光二色性(CD)スペクトル測定により確認した。また、3 重らせん構造の変性温度は、225 nm の CD シグナルの温度変化プロットにより求めた。

(3)培養細胞を用いた実験

ヒト子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞に蛍光標識したペプチドを添加し、一定時間後に洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡をもちいて生細胞内の蛍光を観察した。また、ペプチドの細胞内での局在を調べるために、Lyso tracker Red(リソゾーム)、Golgi tracker Red(ゴルジ体)および ER tracker Red(小胞体)との共染色を行った。

4. 研究成果

(1)アルギニンリッチコラーゲン様ペプチド単独での逆行輸送による小胞体への送達

(Pro-Hyp-Gly)₃-(Pro-Arg-Gly)₃-(Pro-Hyp-Gly)₃ のコラーゲン様配列を有するペプチドを合成した。また、既知の

cell-penetrating ペプチドとして(Arg)₉ およびそのエナンチオマーである(D-Arg)₉を合成した。さらに、これらペプチドのC末端に小胞体滞留シグナルである KDEL を付加したのも同様に調製した。使用したコラーゲン様ペプチドは、37 で3重らせん構造を取っていることを確認した。

HeLa 細胞への取り込み実験の結果から、これらのアルギニンリッチペプチドは、CPP として機能し、効率的に細胞内に取り込まれていることが示された。しかし、コラーゲン様ペプチドの蛍光のほとんどはエンドソームからリソゾームに移行し、長時間の培養後もゴルジ体あるいは小胞体との共局在は観察されなかった。このことから、ペプチドC末端への KDEL 小胞体残留シグナルの付加のみでは、小胞体への逆行輸送と小胞体への蓄積を効率的に達成することは困難であることがわかった。本研究の参考とした先行研究(引用文献)の結果が妥当であるかどうかは疑問である。

(2)補助剤を用いたペプチドの逆行輸送の検討

細胞内に取り込まれた上記ペプチドの逆行輸送を促進するために、Shiga-like toxin の B サブユニット(SLT-B)を利用することとした。遺伝子組換え SLT-B フラグメントとペプチドとを混合して HeLa 細胞に投与ところ、ペプチド単独の場合より効率的に細胞内に取り込まれた。しかしながら、取り込まれたペプチドはその C-末端に KDEL が付加されていた場合においても小胞体内腔への蓄積は観察されず、最終的にはリソゾームに蓄積することがわかった。

また、逆行輸送を促進するとされる nordihydroguaiaretic acid の同時投与によってもペプチドの細胞内局在パターンの顕著な変化は観察されなかった。

さらに、ペプチドの N-末端をヨードアセチル化したものを調製し、イミノチオランを用いて SLT-B フラグメントと共有結合的に複合体化した。ペプチド SLT-B 複合体を HeLa 細胞に振りかけたところ、細胞への取り込みは観察されたが、逆行輸送による小胞体への移行と蓄積は観察されなかった(図1)。これは、ペプチドの SLT-B への共有結合によって、SLT-B の活性構造である細胞膜上での 5 量体形成が妨げられたことによるものと推定された。

(3)順行輸送による小胞体へのペプチド送達の試み

トランスロコンを介した順行輸送により同様のペプチドを細胞質から小胞体内に送達することについても検討した。まず送達すべきペプチドを、ジスルフィド結合を介して CPP と結合させた。CPP としてはリソゾーム脱出能が高く細胞質への効率的な移行が期待される、L/D 体キメラのオリゴアルギニン

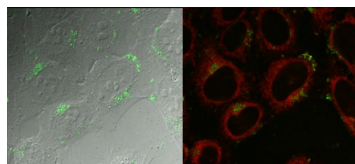


図1. SLT-IB-ペプチド複合体の細胞内移行と局在
ペプチド(30 μg/mL)添加培地でHeLa細胞を培養(24 h)。緑: SLT-IB-ペプチド複合体、赤: ER tracker

を選択した。また、それぞれのペプチド鎖には異なる蛍光基(フルオレセインおよび TAMRA)を付加した。このヘテロ 2 量体ペプチドは、細胞内で CPP が還元的に脱離することにより蛍光エネルギー移動(FRET)が解消し、フルオレセインの緑色蛍光を発するように設計した(図2)。

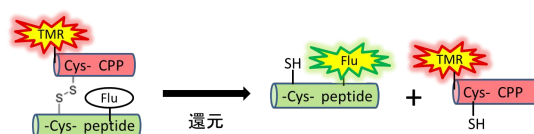


図2. 合成したペプチドの設計
細胞質内で還元されることにより緑の蛍光を発する

作製したペプチドを HeLa 細胞に投与し、蛍光観察により細胞内でのペプチドの動態を追跡した。このペプチドは効率的に細胞質に輸送され、フルオレセインの緑色蛍光が回復したことから細胞質においてジスルフィド結合が還元的切断を受け、目的のペプチドを遊離していることがわかった(図3)。さらに、トランスロコンへの挿入を期待して、ペプチドの N 末端に、18 アミノ酸残基からなる mammaglobin-A の分泌シグナル配列を付加したペプチドを合成し、同様に CPP ペプチドとジスルフィド結合によりヘテロ 2 量体化した。しかし、このペプチドはシグナル配列の高い疎水性により水系溶媒への溶解性が極めて悪くなり、凝集体として細胞に取り込まれたことを示す斑点状の蛍光顕微鏡像が得られたのみで、小胞体への有意な移行は観察されなかった。

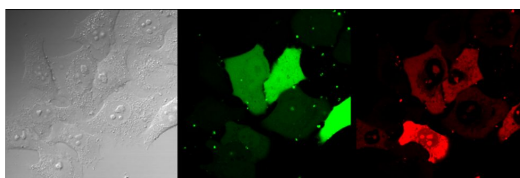


図3. ヘテロ2量体ペプチドの細胞への取り込みと細胞内局在
ペプチド(10 μM) 添加培地でHeLa細胞を培養(1 h)。微分干渉像(左)、フルオレセイン(中)、TAMRA(右)

<引用文献>

Sato et al., Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone, *Nat. Biotechnol.* 2008, 26(4), 431-442.

Koide et al., Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II, *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 11177-11185.

Yamazaki et al., Collagen-like cell-penetrating peptides, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 5497-5500.

Ma et al., A novel recombinant protein TAT-GFP-KDEL with dual-function of penetrating cell membrane and locating at endoplasm reticulum, *J. Drug Target.* 2009, 7(4), 329-333.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

Takaki Koide, Collagen Triple-helix as Scaffold for Peptide-based Biotools and Medicines, 7th Peptide Engineering Meeting, 2015年12月6日, Pune (India)

Takaki Koide, Collagen Triple Helix, A Unique Peptide Scaffold for Biotools and Biomaterials, IMS Asisn International Symposium "Supramolecular Dynamics at the Interface of Chemistry and Biology", 2015年6月13日, 分子化学研究所(愛知県・岡崎市)

小出隆規, コラーゲン3重らせんを模倣するペプチドのエンジニアリングと応用, 第20回ペプチドフォーラム, 2015年3月13日, 長浜バイオ大学(滋賀県・長浜市)

〔その他〕

<http://www.chem.waseda.ac.jp/koide/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 隆規 (KOIDE, Takaki)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号: 7 0 3 2 2 2 5 3

(2) 連携研究者

増田 亮 (MASUDA, Ryo)
早稲田大学・理工学術院・助教
研究者番号: 9 0 6 3 2 1 5 9