

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460161

研究課題名(和文) 標的認識機能を兼ね備えたAib含有ヘリックスペプチドの核酸医薬への応用

研究課題名(英文) Design of Cyclic RGD-Conjugated Aib-Containing Amphipathic Helical Peptides for Targeted Delivery of Small Interfering RNA

研究代表者

和田 俊一 (Shun-ichi, Wada)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30278593

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)： α -aminoisobutyric acid (Aib) 含有膜透過性ペプチドMAP(Aib)の2, 8, 14, 20 残基目の一部或いは複数個をCys残基に置換したペプチドと, RGD 配列を含んだペプチド [cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys-)] とをジスルフィド結合を介して結合させ, RGDペプチドの位置や数が異なった5種類のMAP(Aib)-RGDコンジュゲート体を合成した。MAP(Aib)の20残基目に1個のRGD配列を有したコンジュゲート体と2, 8残基目に合計2個のRGD配列を有したコンジュゲート体がsiRNAの有用なデリバリーツールであることがわかった。

研究成果の概要(英文)： To achieve the targeted delivery of siRNA, five conjugates of Aib-containing helical peptides with mono-, di-, and trivalent cRGDfC, which is known to bind to α v β 3 integrin, were synthesized. Among the five conjugates, the monovalent cRGDfC conjugating at position 20 of the amino acid sequence of the helical peptide through the formation of a disulfide bond (PI) and the divalent cRGDfC conjugating at positions 2 and 14 of the amino acid sequence of the helical peptide through the formation of disulfide bonds (PIII) significantly enhanced the delivery of fluorescence-labeled siRNA into A549 cells as the peptide/siRNA complex formed by electrostatic interaction. The cellular uptake of the PI/siRNA complex might involve specific interactions of the RGD group with the α v β 3 integrin receptor. The RNAi effect of the complex on luciferase expression in A549-Luc cells was examined. Luciferase expression was significantly decreased in the presence of the PI/siRNA and PIII/siRNA complexes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Aib 両親媒性ヘリックスペプチド 膜透過性ペプチド 核酸医薬 siRNA RNA干渉 インテグリンレセプター

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬(アンチセンス, siRNA, リボザイム, アプタマー, デコイ核酸など)は, 核酸をマテリアルとし, 疾患関連分子の遺伝子発現や機能を抑制することで, 病気の発症や進行を止める作用をもつ薬剤のことをさす. 近年の遺伝子科学の発展に伴い, 疾患関連遺伝子の同定が進み, 今後益々, 核酸医薬の重要性が増加することが予測される. 現在のところ核酸医薬として臨床に供されている化合物は申請者の知るところ, Vitravene と Macugen の 2 種のみである. これら核酸医薬の開発の障壁となっている理由として, 核酸分子の生体内不安定性(ヌクレアーゼによる分解)と膜透過性の悪さが挙げられる. これらの理由から上記の 2 種を含め臨床研究段階の核酸医薬の多くは局所適用に限られているのが現状である. これらの問題点を克服可能な分子機能を兼ね備えたデリバリーツールを開発できれば, 今後急増すると予測される核酸医薬品の開発に大きく貢献することが期待できる.

2. 研究の目的

著者はこれまでに, Aib (U: α -aminoisobutyric acid) とリシン (Lys) を組み合わせたプロテアーゼ耐性を有する両親媒性ヘリックスペプチド, MAP(Aib) が, 効率良くオリゴヌクレオチドを細胞内に導入することを明らかにしてきた(文献,). しかし, 本ペプチドはオリゴヌクレオチドを細胞内に導入する際に, 標的認識能がないという欠点が揚げられてきた. そこで本研究では, MAP(Aib) をベースとした両親媒性ヘリックスペプチドに標的認識機能を付与し, 且つ高いヌクレアーゼ耐性能・膜透過性を兼ね備えたペプチド性デバイスを創製し, 一本鎖オリゴヌクレオチドを用いるアンチセンス法や二本鎖オリゴヌクレオチドを用いる RNA 干渉法への適用を検討することを目的とする. 具体的には以下の点を検討し, 明らかにする.

(1) 標的認識機能・ヌクレアーゼ耐性能・膜透過性を兼ね備えた Aib 含有ヘリックスペプチドの設計・合成: Aib と Lys を組み合わせて両親媒性ヘリックスペプチドをデザインし, ヘリックス軸に対して Aib を中心とした疎水性面と Lys を中心とした親水性面を形成させ, 膜透過性を有したヘリックスペプチドを合成する. 疎水性面側に Cys を配置し, ジスルフィド結合を介してがん細胞に過剰に発現しているインテグリンレセプターに特異的に結合する RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフ(文献)を結合させ, 標的認識機能を付与させる. ジスルフィド結合を介して RGD モチーフをペプチドに結合させると, 両親媒性構造が崩れるが, 細胞内に移行した後, 細胞内の還元的環境下でジスルフィド結合が切断され, 元来のヘリックス構造が再構築されると予想される. この分子変換は, 細

胞取り込み機構がエンドサイトーシスの際, 再構築された両親媒性ヘリックス構造によるエンドソーム膜の破壊によるエンドソーム脱出機能として期待できる.

(2) Aib 含有ヘリックスペプチド/siRNA 複合体形成: デザインしたペプチドの Lys 側鎖の正電荷と siRNA のリン酸基の負電荷の静電的相互作用を利用し, ペプチド/siRNA 複合体を形成させる. この複合体形成により, siRNA はペプチドに覆われるため, ヌクレアーゼに対して抵抗性を示すことが期待できる.

(3) 複合体の標的認識機能, RNA 干渉効果の検討: RGD モチーフを付与することによるペプチド/siRNA 複合体の標的認識能, RNA 干渉能を検討する. Fig. 1 に今回の研究の概略をまとめた.

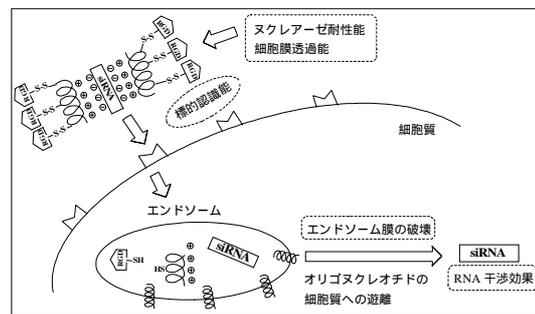


Fig. 1. Aib 含有ヘリックスペプチドによる siRNA の細胞内輸送戦略.

3. 研究の方法

(1) ペプチド合成

ペプチドの合成は, Fmoc-固相合成法により行った. 通常のアミノ酸の縮合に関しては, 縮合試薬として *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIPCI), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) を用い, Aib とその隣接したアミノ酸の縮合は, Fmoc-アミノ酸フルオリド, *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) を用いた. RGD ペプチドとして環状の cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys-) (cRGDfC) を用い, cRGDfC のチオール基を 3-nitro-2-pyridylthio 活化後, 両親媒性ヘリックスペプチド中の Cys の側鎖とジスルフィド結合を形成させることにより RGD 配列を有したヘリックスペプチド (PI - PV, Table 1) の合成を行った. PI-acetamide は, 対応するヘリックスペプチドに 2-iodoacetamide を反応させることにより合成した.

(2) ペプチド/蛍光ラベル化 AlexaFluor488-siRNA 複合体の細胞内取り込み

ペプチドと AlexaFluor488-siRNA を静電的相互作用を利用して 37 °C, 30 min, インキュベーションすることで複合体を形成させ, その複合体をヒト肺がん細胞である A549 細胞に 37 °C, 8h 作用させた. 細胞内に取り込ま

れた蛍光ラベル化 siRNA の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、細胞内に取り込まれた siRNA の定量的評価に関しては、細胞溶解液を作成し蛍光光度計を用いて定量した。

(3) ルシフェラーゼ安定発現 A549 (A549-Luc) 細胞に対する RNA 干渉効果の検討

ルシフェラーゼ遺伝子を標的としたペプチド/siRNA の複合体を A549-Luc に作用させ、無血清培地で 8 時間 37 °C でインキュベーション後、血清の入った培地を加え、24 時間培養した。その後、細胞を採取し、洗浄後、細胞溶解液を作製した。その細胞溶解液中のルシフェラーゼ酵素を蛍光分析により定量した。抗ルシフェラーゼ-siRNA は次の配列のものを用いた。sense strand: 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A dTdT-3'; antisense strand: 5'-UCG AAG UAC UCA GCG UAA G dTdT-3' (文献 [10])。

4. 研究成果

(1) cRGDfC-Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドの設計と合成

両親媒性ヘリックスペプチドである MAP(Aib) のアミノ酸配列をベースとし、C-末端に Cys を配置した **PI**、14 番目に Cys を配置した **PII**、2, 14 番目に Cys を 2 個配置した **PIII**、8, 14 番目に Cys を 2 個配置した **PVI**、2, 8, 14 番目に Cys を 3 個配置した **PV** を合成した。RGD 配列として $\alpha_v\beta_3$ インテグリンリセプターに親和性を有する cRGDfC を用い、ヘリックスペプチドとジスルフィド結合を介して cRGDfC と縮合させた (Table 1)。これらの類縁体の合成は、siRNA の細胞内取り込み能、RNA 干渉効果や $\alpha_v\beta_3$ インテグリンリセプター認識能の影響を検討するために行った。また、**PI-acetamide** は、RGD 配列を持たないペプチドとして、対照実験を行う目的で合成した。

Table 1. cRGDfC-Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドのアミノ酸配列。^a

ペプチド	アミノ酸配列 ^a
PI	acetyl-KLULKLULKULKAULKLUKUGC ²⁰ (cRGDfC)-NH ₂
PI-acetamide^b	acetyl-KLULKLULKULKAULKLUKUGC ²⁰ (CH ₂ CONH ₂)-NH ₂
PII	acetyl-KLULKLULKULKAC ¹⁴ (cRGDfC)LKLUK-NH ₂
PIII	acetyl-KC ² (cRGDfC)ULKLUKULKULKAC ¹⁴ (cRGDfC)LKLUK-NH ₂
PVI	acetyl-KLULKLUKUGC ⁸ (cRGDfC)KULKAC ¹⁴ (cRGDfC)LKLUK-NH ₂
PV	acetyl-KC ² (cRGDfC)ULKLUKUGC ⁸ (cRGDfC)KULKAC ¹⁴ (cRGDfC)LKLUK-NH ₂

^aU: α -aminoisobutyric acid (Aib);

cRGDfC: cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys-).

Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドと cRGDfC の縮合は、ジスルフィド結合形成により行った。

^b**PI-acetamide** のチオール基を acetamide 基で保護した。

またこれらペプチドは、CD スペクトルの結果から α -ヘリックス構造を取っていることがわかり、**PI** を除いて **PII** - **PV** 中の RGD 配列は、両親媒性ヘリックス構造の疎水側に

配置していることがわかった。故に、siRNA と複合体を形成するとき、ペプチドの親水性側を内側に siRNA を取り囲み、疎水性側にある RGD 配列が外側に向くと予測される。

(2) ペプチド/蛍光ラベル化 AlexaFluor488-siRNA 複合体の細胞内取り込み

ペプチド/AlexaFluor488-siRNA 複合体 (2.5 μ M/25 nM) を 37 °C, 8 h, A549 細胞に作用させた結果を Fig. 2 に示す。ヘリックスペプチドの C-末端に RGD 配列を有する **PI**、2, 14 番目に RGD 配列を 2 個有する **PIII** が最も細胞内取り込み量が多く、次に **PII**, **PV** で、**PVI** に関しては全く取り込みが認められなかった。一方、RGD 配列を持たない **PI-acetamide** については、**PI** や **PIII** よりも弱いですが、**PII** あるいは **PV** より強い取り込み能が認められた。

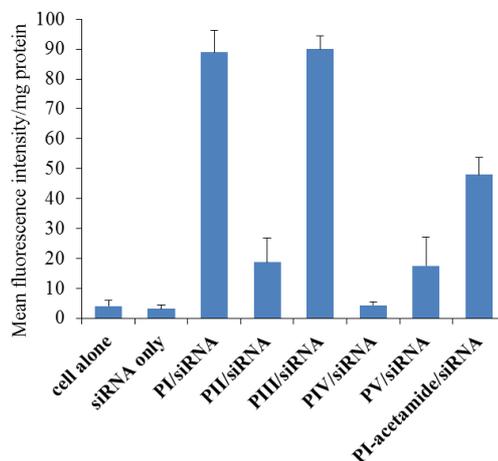


Fig. 2. ペプチド/蛍光ラベル化 siRNA の A549 細胞内取り込み。

ペプチド/AlexaFluor488-siRNA 複合体 (2.5 μ M/25 nM) を 37 °C, 8 h, 細胞に作用させた。

次に最も取り込み能の強い **PI**/siRNA, **PIII**/siRNA 複合体の細胞内での分布を、上記の実験と同条件を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。**PI**/siRNA, **PIII**/siRNA 複合体双方に細胞内に強い蛍光像が認められ、上記の実験結果を支持した。その細胞内分布を詳しく観察していくと、**PI**/siRNA 複合体は細胞内一面及び斑点状に蛍光像が認められ、一方 **PIII**/siRNA 複合体は斑点状の蛍光像のみが認められた (Fig. 3)。一般的にこの斑点状の蛍光像はペプチド/siRNA がエンドソーム内に局在していることを意味することから、**PI**/siRNA, **PIII**/siRNA 複合体はエンドサイトーシス機構で細胞内に移行したことが示唆された。さらに、酸性のオルガネラで蛍光を発する LysoTracker Red DND-99 (赤色の蛍光) で、**PI**/siRNA あるいは **PIII**/siRNA 複合体 (緑色の蛍光) を作用させた細胞を処理すると、斑点状の蛍光像のみが色の変化 (黄色) が認められ、複合体がエンドソーム内に局在して

いることが示された (Fig. 3) .

さらに, **PI**/siRNA 及び **PIII**/siRNA 複合体の細胞内取り込みを, エンドサイトーシス機構を阻害する低温 (4 °C) で行うと, **PI**/siRNA 及び **PIII**/siRNA 複合体はそれぞれ 15% , 90% の取り込み阻害が起こった . **PIII**/siRNA 複合体の取り込み阻害は強く起こったが, **PI**/siRNA の取り込み阻害はそれほど強くなかった . これらの結果から, **PIII**/siRNA 複合体の細胞内取り込み機構は主にエンドサイトーシス機構が考えられるが, **PI**/siRNA 複合体の取り込み機構は, 共焦点レーザー顕微鏡で細胞に一樣に蛍光像が認められること, 及び低温実験の結果から, 一部エンドサイトーシス機構を持つが, 非エンドサイトーシス機構も含まれると考えられる . この事実は, いくつかの膜透過性ペプチドの非エンドサイトーシスの膜透過機構 (inverted micelle, carpet model, pore formation) でも見られる (文献 [10]) .

また, ペプチドの RGD 配列が $\alpha_v\beta_3$ インテグリンリセプターを認識し, 細胞内に移行しているか否かを判断するため, $\alpha_v\beta_3$ インテグリンリセプターに対して選択的且つ高い親和性を有する cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) (cRGDFV) 共存下で **PI**/siRNA 及び **PIII**/siRNA 複合体の細胞内取り込み実験を行った (文献 [10]) . 5.0 μ M の cRGDFV 存在下, **PI**/siRNA 複合体 (0.5 μ M/25 nM) を細胞に作用させると, **PI**/siRNA 複合体のみで行った実験に比べると, 約 20% の取り込み阻害が認められた . 一方, **PIII**/siRNA 複合体 (2.5 μ M/25 nM) についても同様に実験を行ったが, 明瞭な結果は得られず, また, cRGDFV 濃度を 5.0 μ M 以上に上げると細胞毒性を示すことからこれ以上の実験は行えなかった . 以上の結果から, **PI**/siRNA 複合体は一部 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンリセプターを認識し, それに伴うエンドサイトーシス機構で細胞内に移行していることがわかった .

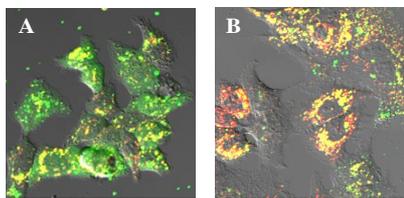


Fig. 3. **PI**/siRNA 及び **PIII**/siRNA 複合体の細胞内での分布

A549 細胞をペプチド/AlexaFluor488-siRNA 複合体 (2.5 μ M/25 nM, 緑色) で 37 °C, 8 h (A: **PI**) 或いは 41 h (B: **PIII**) インキュベーション後, さらに LysoTracker Red DND-99 (10 nM, 赤色) で 37 °C, 1 h インキュベーションした .

(3) ルシフェラーゼ安定発現 A549 (A549-Luc) 細胞に対する RNA 干渉効果の検討

A549-Luc 細胞にペプチド/抗ルシフェラーゼ-siRNA 複合体 (1.0 μ M/10 nM) を作用させた RNA 干渉効果を Fig. 4 に示した . 蛍光 siRNA の取り込み能に優れた, **PI**/siRNA 複合体のみにルシフェラーゼの発現抑制が認められ, その抑制効果は既存のトランスフェクション試薬である lipofectamine 2000 より強いことがわかった . また RGD 配列を持たない **PI-acetamide** に全く抑制効果が認められなかったことから, ヘリックスペプチドに RGD を付与することの重要性が示唆された . また, 蛍光 siRNA の取り込み能が強かった **PIII**/siRNA 複合体に関しては, 1.0 μ M/10 nM 濃度でインキュベーション後, 24 h 培養では効果が表れなかったが, 培養時間を 48 h に延長すると 15% のルシフェラーゼ発現抑制が認められた . これは, 先で述べたように **PIII**/siRNA 複合体の細胞内取り込みメカニズムがエンドサイトーシスであることとの関連性が考えられ, エンドソームにトラップされた複合体が細胞質に放出されるのに時間を要するものと思われる .

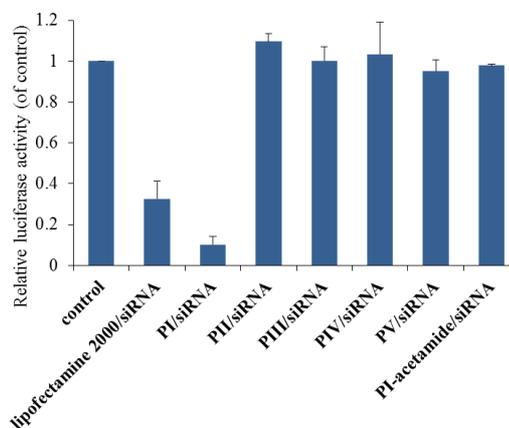


Fig. 4. ペプチド/siRNA 複合体の RNA 干渉効果

A549-Luc 細胞にペプチド/抗ルシフェラーゼ-siRNA 複合体 (1.0 μ M/10 nM) を含んだ無血清培地で 37 °C, 8 h インキュベーション後, 血清を含んだ培地を加え 24 h 培養した . 化合物を含まない細胞のルシフェラーゼの発現量を 1.0 (control) とし, 各複合体のルシフェラーゼ発現量をその相対値で示した .

(4) 結論

両親媒性ヘリックスペプチド MAP(Aib) のアミノ酸配列をベースとして, そのペプチドに環状 RGD 配列を C-末端に付与した **PI**, そのペプチドの 2, 14 番目に環状 RGD 配列を有する **PIII** が siRNA の優れたデリバリーツールであることがわかった . また, MAP(Aib) がオリゴヌクレオチドと静電的複合体を形成することにより, オリゴヌクレオチドの酵素耐性を示すことから, 創製したこれらペプチドは, 核酸医薬の欠点を補ったペプチド性デバイスとなる可能性を示せた . また **PI** に関しては $\alpha_v\beta_3$ インテグリンリセプター

ーを認識していることから、がん細胞へのターゲティングの可能性を示唆した。

以上より、今回合成したペプチドが核酸医薬の発展に寄与する可能性を明らかにした。

<引用文献>

S. Wada, H. Tsuda, T. Okada, H. Urata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 5688-5691 (2011).

S. Wada, Y. Hashimoto, Y. Kawai, K. Miyata, H. Tsuda, O. Nakagawa, U. Urata, *Bioorg. Med. Chem.* 21, 7669-7673 (2013).

F. Danhier, A. Le Breton, V. Preat, *Mol. Pharmaceutics* 9, 2961-2973 (2012).

C. L. Waite, S. M. Sparks, K. E. Uhrich, C. M. Roth, *BMC Biotech.* 9, 38-47 (2009).

S. Reissmann, *J. Pept. Sci.* 20, 760-784 (2014).

J. L. Zaro, W. I. Shen, *Front. Chem. Sci. Eng.*, 9, 407-427 (2015).

S. Bloch, B. Xu, Y. Ye, K. Liang, G. V. Nikiforovich, S. Achilefu, *Mol. Pharm.*, 3, 539-549 (2006).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

S. Wada, M. Iwata, J. Hayashi, H. Urata, Design of Multivalent Cyclic RGD-Conjugated MAP(Aib) for Targeted Delivery of Small Interfering RNA, *Peptide Science*, 52, 255-256 (2015). 査読有り。

S. Wada, Y. Ozaki, T. Ozaki, M. Iwata, J. Hayashi, H. Urata, Cyclic RGD-MAP(Aib) Conjugate for Delivery of Small Interfering RNA, *Peptide Science*, 51, 157-158 (2014). 査読有り。

S. Wada, Y. Hashimoto, Y. Kawai, K. Miyata, H. Tsuda, O. Nakagawa, H. Urata, Effect of Ala Replacement with Aib in Amphipathic Cell-Penetrating Peptide on Oligonucleotide Delivery into Cells, *Bioorg. Med. Chem.*, 21(24), 7669-7673 (2013). DOI: 10.1016/j.bmc.2013.10.029. 査読有り。

[学会発表](計12件)

和田俊一, 岩田征士, 林淳祐, 浦田秀人, Design of Multivalent Cyclic RGD-Conjugated MAP(Aib) for Targeted Delivery of Small Interfering RNA, 第52回日本ペプチドシンポジウム, 2015年11月16日~11月18日, 平塚市 中央公民館(神奈川県・平塚市)。

和田俊一, 岩田征士, 尾崎友香, 尾崎嵩, 林淳祐, 浦田秀人, 細胞認識能を兼ね備えた Cyclic RGD-MAP(Aib)コンジュゲート体の合成と siRNA のデリバリーの可能性, 日本薬学会第135年会, 2015年3月25日~3月28日, 神戸学院大学, 兵庫医療大学, 神戸産博ホール, デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県・神戸市)。

和田俊一, 尾崎友香, 尾崎嵩, 岩田征士, 林淳祐, 浦田秀人, Cyclic RGD-MAP(Aib) conjugates for delivery of small interfering RNA, 第51回日本ペプチドシンポジウム, 2014年10月22日~10月24日, 徳島大学大塚講堂(徳島県・徳島市)。

尾崎嵩, 橋本佑樹, 中川治, 和田俊一, 浦田秀人, 細胞認識能機能を兼ね備えた膜透過性 Aib 含有ヘリックスペプチドの合成と核酸医薬への応用, 第63回日本薬学会近畿支部大会, 2013年10月12日, 同志社女子大学(京都府・京田辺市)。

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 俊一 (WADA Shun-ichi)
大阪薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 30278593