

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850082

研究課題名(和文)新しい細胞膜透過ペプチド『ポリヒスチジン』の分子機構の解明

研究課題名(英文)Cellular uptake of novel cell-penetrating peptide "polyhistidine peptide (H16)"

研究代表者

岩崎 崇 (IWASAKI, Takashi)

鳥取大学・農学部・助教

研究者番号：30585584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新しい細胞膜透過ペプチド『ポリヒスチジン(H16)』の分子機構の解明を試みた。その結果、ポリヒスチジン(H16)は血清の影響を受けず、主にマクロピノサイトーシスによって細胞膜を透過することが分かった。細胞内ではポリヒスチジン(H16)の大部分はゴルジ体およびリソソームに局在し、一部は細胞質まで移行することが確認された。ポリヒスチジン(H16)を融合したタンパク質も同様の細胞内局在を示した。さらに、担癌マウス体内において、ポリヒスチジン(H16)は腫瘍組織に集積し、安定した滞留性を示した。本研究結果から、ポリヒスチジン(H16)は有力なDDS素材であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Cell-penetrating peptides (CPPs) are arginine/lysine-rich sequences, and they are effectively internalized into cells. On the other hand, in the present study, we found that polyhistidine peptide (H16: HHHHHHHHHHHHHH-NH₂) was efficiently internalized into the HT1080 human fibrosarcoma cells. Cellular uptake of the H16 peptide was mainly due to micropinocytosis. Although most of the H16 peptide localized in the lysosome and Golgi apparatus, a proportion of the H16 peptide escaped from the macropinosome to the cytoplasm. In a protein transduction study, green fluorescence protein fused to the H16 peptide (GFP-H16) was also internalized into cells. Furthermore, in vivo study showed that the H16 peptide accumulated immediately in tumor tissue and showed long residence-time in the tumor (HT1080 human fibrosarcoma)-bearing mice. The findings suggest that the H16 peptide is novel CPP and represents a promising drug delivery carrier candidate in medical and biotechnological fields.

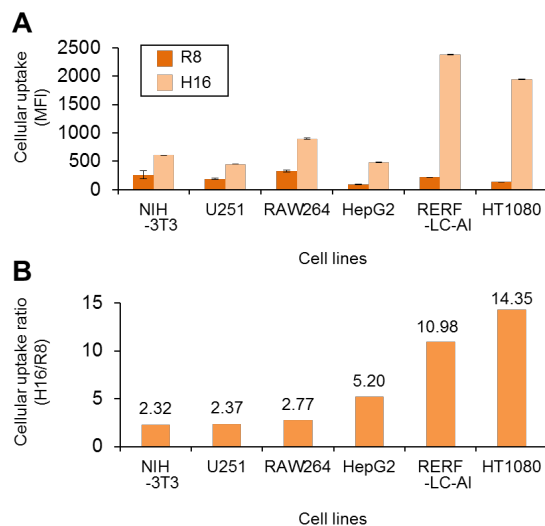
研究分野：ペプチド化学、細胞生物学

キーワード：ペプチド 細胞膜透過ペプチド ヒスチジン ゴルジ体 リソソーム 腫瘍 薬物輸送システム DDS

1. 研究開始当初の背景

細胞膜透過ペプチドは、タンパク質や核酸を細胞内へ導入するためのツールとして、現在幅広く使用されている。細胞膜透過ペプチドの共通の特徴として、塩基性アミノ酸のアルギニン(R)を豊富に含むことが知られており、その代表例としては、HIV-1(ヒト免疫不全ウイルス)のTATペプチド(YGRKKRRQRRR)や、TATペプチドをモチーフにして人工設計されたオクタアルギニン(R8: RRRRRRRR-NH₂)が挙げられる。

しかしながら、我々はこれまでの独自の研究から、『ヒスチジン(H)のみが16アミノ酸残基連続したポリヒスチジン(H16: HHHHHHHHHHHHHH-NH₂)が、オクタアルギニン(R8)よりも高い細胞膜透過能を有する』という新知見を世界に先駆けて見出した(図1)。このようなヒスチジンのみから構成されるペプチドが高い細胞膜透過を示すという現象は全く知られておらず、ポリヒスチジン(H16)は大変興味深い現象を我々に突き付けた。



NIH-3T3 : mouse fibroblast cells
U251 : human glioma cells
RAW264 : mouse macrophage cells
HepG2 : human hepatoma cells
RERF : human squamous lung cancer cells
HT1080 : human fibrosarcoma cells

図1. ポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過

2. 研究の目的

本研究では、新たに発見された細胞膜透過ペプチド: ポリヒスチジン(H16)の分子機構の解析を行い、細胞膜透過メカニズムを解明するとともに、薬物輸送技術(Drug delivery system: DDS)応用のための基盤を構築することを目的とする。具体的には以下の四つの事項を達成することを目的とする。

1 ポリヒスチジン(H16)が細胞膜を透過する際に、どのような経路によって細胞内へ取り込まれているかを特定することで、細胞膜透過メカニズムを明らかにする。

2 細胞内へ取り込まれたポリヒスチジン(H16)の細胞内挙動(局在)を解明するとともに、どのような細胞小器官または細胞内空間を指向したDDSへ応用できるかを明らかにする。

3 ポリヒスチジン(H16)の分子輸送能を評価するために、ポリヒスチジン(H16)に生理活性ペプチドまたはタンパク質を融合し、細胞内輸送を解析する。

4 ポリヒスチジン(H16)をマウス体内に投与した際の、生体内における組織集積性および滞留性を明らかにすることで、生体内におけるDDSキャリアーとしての応用性を評価する。

3. 研究の方法

1 細胞培養

本研究ではHT1080(ヒト線維肉腫由来細胞株: RCB1956)を供試細胞として用いた。培地はMEM培地(Glucose 1.0 g/L, with L-Glutamine 584 mg/L, with Sodium Pyruvate 110 mg/L)に10% fetal bovine serum (FBS) (v/v)、streptomycin 100 µg/mL、penicillin 100 units/mL、amphotericin B 250 ng/mLを加えたものを用いて、37 °C、5.0% CO₂条件にて培養した。

2 ポリヒスチジン(H16)の細胞内取り込み経路の解析

HT1080細胞株を6ウェルマルチプレートに5.0 × 10⁵ cells/mL/wellとなるように、また35 mmマルチウェルガラスボトムディッシュ(松浪硝子工業株式会社)に2.0 × 10⁴ cells/100 µL/wellとなるように播種した後、5.0% CO₂、37 °C、24時間前培養した。その後、赤色蛍光色TAMRA (Tetramethyl rhodamine)で標識したポリヒスチジン(以降TAMRA-H16と記載する)を終濃度10 µMになるように加え、様々なpH条件、血清条件、温度条件のもと、3時間インキュベーションを行った。

一方で、エンドサイトーシス経路の解析実験においては、Chlorpromazine (クラスリン依存型エンドサイトーシス阻害剤)、Nystatin (ラフト・カベオラ依存型エンドサイトーシス阻害剤)、Amiloride (マクロピノサイトーシス阻害剤)、を各エンドサイトーシス経路の阻害剤として使用した。HT1080細胞株を各阻害剤で前処理し

(Chlorpromazine : 30 分、Nystatin : 1 時間、Amiloride : 2 時間)、細胞を PBS で洗浄した。次いで、TAMRA-H16 を終濃度 10 μ M になるように加え、3 時間インキュベーションを行った後に、再度細胞を PBS で洗浄した。

TAMRA-H16 の細胞膜透過は、共焦点レーザー顕微鏡 FV10i-LIV (OLYMPUS) ならびにフローサイトメーター MoFlo (Beckmancoulter) にて評価した。

3 ポリヒスチジン(H16)の細胞内局在の解析

HT1080 細胞株を 35 mm マルチウェルガラスボトムディッシュに 2.0×10^4 cells/100 μ L/well となるように播種した後、5.0% CO₂、37 $^{\circ}$ C、24 時間前培養した。その後、ミトコンドリア染色試薬 MitoTracker Green (100 nM \cdot 3 時間前処理)、ゴルジ体染色試薬 BODIPY FL-ceramide (5 μ M \cdot 30 分前処理)、リソソーム染色試薬 LysoTracker Green (5 μ M \cdot 30 分前処理)、小胞体染色試薬 ERTracker Blue-White (100 nM \cdot 3 時間前処理)、核染色試薬 Hoechst33342 (1 μ g/mL \cdot 1 時間前処理) によって、各細胞小器官を蛍光染色した。次いで、TAMRA-H16 を終濃度 10 μ M になるように加えた。3 時間インキュベーションした後、細胞を PBS で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、TAMRA-H16 と各細胞小器官マーカーの共局在を解析した。

4 ポリヒスチジン(H16)融合生理活性ペプチドの活性解析

ポリヒスチジン(H16)を用いた生理活性ペプチドの細胞内輸送能を評価するために、ポリヒスチジン(H16)と生理活性ペプチドである Pro-apoptotic domain (PAD ペプチド : KLA₂LAKLAKLAKLAK-NH₂) の融合ペプチドを合成した。PAD ペプチドはミトコンドリア膜を傷害するペプチドとして知られており、単独では細胞膜透過を示さないが、人為的に細胞質へ導入することで細胞毒性を示すことが知られている。そこで、ポリヒスチジン(H16)融合 PAD ペプチド (PAD-H16 : KLA₂LAKLAKLAKLAKGHHHHHHHHHHHHH-NH₂) を合成し、細胞毒性を指標とすることで、ポリヒスチジン(H16)の生理活性ペプチドの細胞内輸送能を評価した。

細胞毒性の評価は、WST 法により行った。HT1080 細胞株を 96 ウェルマルチプレートに 1.0×10^4 cells/100 μ L/well となるように播種した後、5.0% CO₂、37 $^{\circ}$ C、24 時間前培養した。次いで、H16、PAD、および PAD-H16 を終濃度 0 ~ 100 μ M になるように添加し、24 時間インキュベーションした。その後、細胞生存率を Cell counting kit-8 (同仁化学) を使用して定量した。

5 ポリヒスチジン(H16)融合タンパク質の細胞膜透過の解析

ポリヒスチジン(H16)を用いたタンパク質の細胞内輸送能を評価するためにポリヒスチジン(H16)と緑色蛍光タンパク質 GFP を融合した組み換えタンパク質を調製した。

HT1080 細胞株を 35 mm マルチウェルガラスボトムディッシュに 2.0×10^4 cells/100 μ L/well となるように播種した後、5.0% CO₂、37 $^{\circ}$ C、24 時間前培養した。次いで、GFP または GFP-H16 を終濃度 5 μ M になるように添加し、3 時間インキュベーションした。また同時に、Hoechst33342 を終濃度 1 μ g/mL になるように添加し、核を蛍光染色した。その後、細胞を PBS で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、組み換えタンパク質の細胞膜透過を解析した。

6 ポリヒスチジン(H16)の担癌マウス生体内における挙動解析

4 週齢の BALB/cAJcl-nu/nu マウス(日本クレア)に HT1080 細胞株(4.0×10^7 cells/匹)を移植し、担癌マウスを作製した。腫瘍サイズが 250 mm³ に到達した時点で、Dylight750 標識した R8 ペプチドまたは H16 ペプチドを 5 nmol/匹となるように尾静脈注射した。その後、Dylight750-R8 ならびに Dylight750-H16 の経時的な生体内分布を IVIS Lumina XR (パーキンエルマー)にて解析した。

また、Dylight750-R8 ならびに Dylight750-H16 を投与してから 24 時間後のマウスを解剖し、各器官におけるペプチドの集積率を定量した。

本動物実験は、アスピオファーマ株式会社の倫理委員会の承認のもと、関連法令等に従い、実施した。

4 . 研究成果

1 ポリヒスチジン(H16)の細胞内取り込み経路の解析

ポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過に対して、pH 条件(pH7.4 または pH6.0)が与える影響を解析したところ、ポリヒスチジン(H16)は両 pH 条件下において同等の細胞膜透過を示すことが分かった(図 2 A)。ポリヒスチジン(H16)は pH7.4 では電荷を帯びず、pH6.0 で正電荷を帯びる。しかし、pH7.4 と pH6.0 の両条件下において細胞膜透過効率に差異が見られなかったことから、ポリヒスチジン(H16)は電荷に非依存的な細胞膜透過メカニズムを有していることが明らかになった。

次に、血清(10% FBS)の存在・非存在下においてポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過を解析したところ、血清の有無は細胞膜透過に影響を与えないことが確認された(図 2 B)。

アルギニンを豊富に含む既知の細胞膜透過ペプチドは、血清の存在下において細胞膜透過が顕著に抑制されることが知られているが、ポリヒスチジン(H16)ではそのような現象が見られなかったことから、ポリヒスチジン(H16)は既知の細胞膜透過ペプチドとは異なる細胞膜透過メカニズムを有している可能性が示唆された。

一方で、温度条件がポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過に与える影響を調べたところ、低温条件(4℃)においてポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過は顕著に抑制されることが確認された(図2C)。低温条件(4℃)は細胞内のエネルギー産生が阻害される条件であることから、ポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過はエネルギー依存的であることが示唆された。

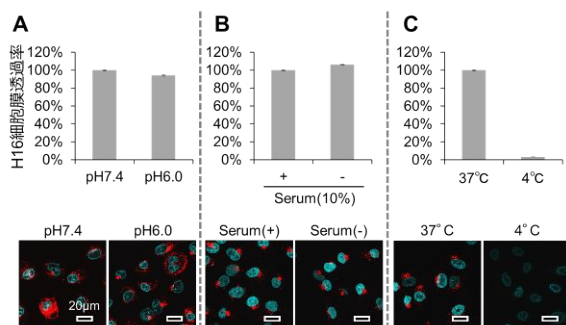


図2. 種々の条件がポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過に与える影響

以上のことから、ポリヒスチジン(H16)はエネルギー依存的な細胞膜透過経路、すなわちエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていることが示唆された。そこで、代表的な3つのエンドサイトーシス経路(クラスリン依存型エンドサイトーシス、ラフト・カベオラ依存型エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス)について検証した。各エンドサイトーシス阻害剤で細胞を前処理した後に、TAMRA-H16を添加したところ、マクロピノサイトーシス阻害剤である Amiloride で前処理した細胞において、TAMRA-H16の細胞膜透過が濃度依存的に阻害されることが確認された(図3)。このことから、ポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過経路は、主にマクロピノサイトーシスに起因していることが示唆された。

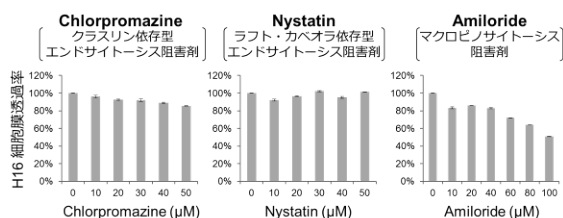
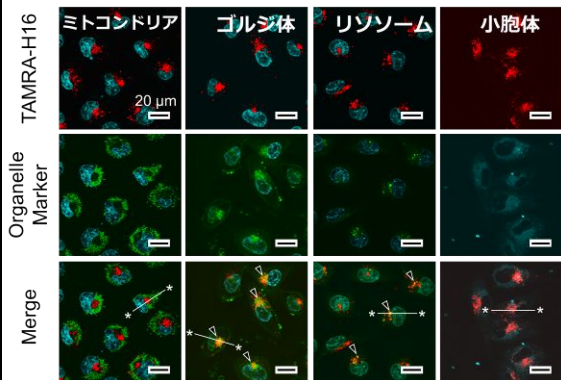


図3. 各エンドサイトーシス阻害剤がポリヒスチジン(H16)の細胞膜透過に与える影響

2 ポリヒスチジン(H16)の細胞内局在の解析

ポリヒスチジン(H16)の細胞内局在を調べるために、細胞小器官を各マーカーで蛍光染色し、TAMRA-H16との共局在を解析した。その結果、TAMRA-H16の赤色蛍光と、ゴルジ体およびリソソームを標識した緑色蛍光の共局在が確認された。この結果から、ポリヒスチジン(H16)は細胞膜を透過した後に、細胞内においてゴルジ体ならびにリソソームに局在することが明らかになった。



矢印は赤色蛍光と緑色蛍光の共局在を示す *部分の蛍光分布を定量解析した(下図参照)

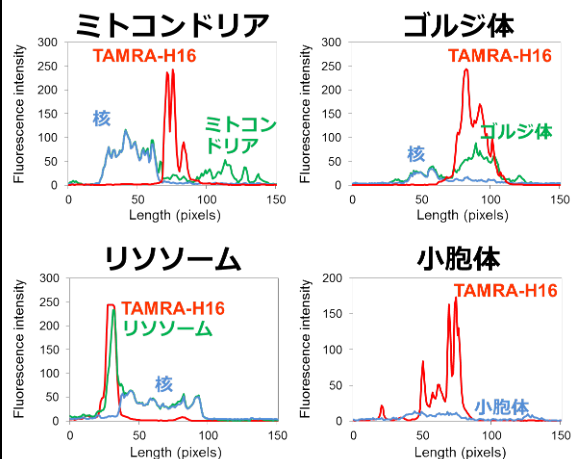


図4. ポリヒスチジン(H16)の細胞内局在

3 ポリヒスチジン(H16)融合生理活性ペプチドの活性解析

ポリヒスチジン(H16)の細胞内局在を解析した結果、ポリヒスチジン(H16)の大部分は細胞内でゴルジ体とリソソームに局在していることが分かった。そこで、ポリヒスチジン(H16)が細胞質にどの程度移行しているかを調べるために、ポリヒスチジン(H16)を融合した生理活性ペプチド:PAD-H16を用いて、細胞毒性を指標とすることで細胞質移行を解析した。その結果、H16またはPAD単独で処理した細胞では、100 μMという高濃度においても細胞毒性は認められなかった一方で、

PAD-H16 で処理した細胞では、濃度依存的な細胞毒性が認められた。

以上の結果から、細胞内においてポリヒスチジン(H16)の大部分はゴルジ体とリソソームに局在する一方で、一部のポリヒスチジン(H16)は細胞質へ移行していることが示唆された。

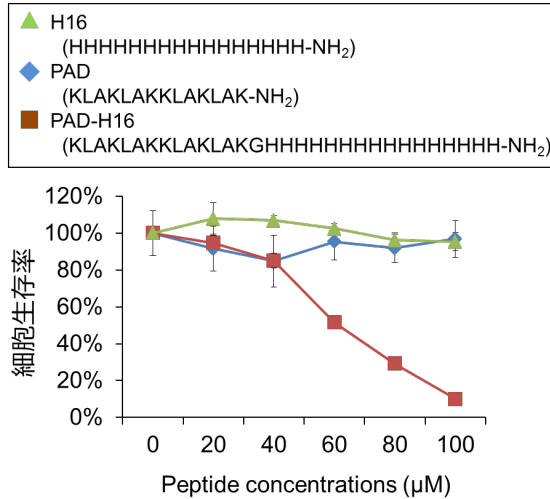
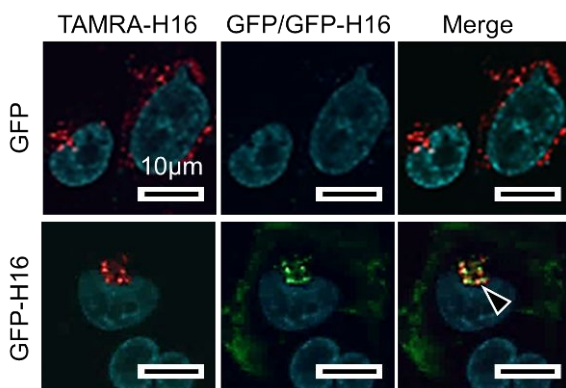


図5 . PAD-H16 の生理活性

4 ポリヒスチジン(H16)融合タンパク質の細胞膜透過の解析

ポリヒスチジン(H16)のタンパク質輸送能を調べるために、GFP-H16 の細胞膜透過を解析した。その結果、GFP のみを処理した細胞内においては緑色蛍光が観察されなかったのに対して、GFP-H16 で処理した細胞内部には緑色蛍光が認められた。また、TAMRA-H16 と GFP-H16 を共投与したところ、細胞内において共局在を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、ポリヒスチジン(H16)はタンパク質を細胞内へ輸送できることが明らかになった。また、ポリヒスチジン(H16)融合タンパク質は、細胞内においてゴルジ体・リソソームに局在することが確認された。



矢印は赤色蛍光と緑色蛍光の共局在を示す

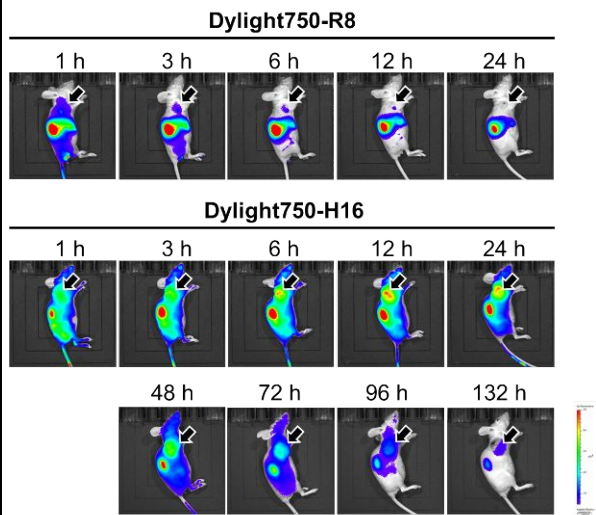
図6 . GFP-H16 の細胞膜透過と細胞内局在

5 ポリヒスチジン(H16)の担癌マウス生体内における挙動解析

HT1080 細胞株を移植した担癌マウスに、Dylight750 標識した R8 ペプチドと H16 ペプチドを尾静脈注射し、生体内の分布を解析した。

その結果、Dylight750-R8 は注射直後から速やかに腎臓に集積し、腎排出が確認されたのに対して、Dylight750-H16 は注射直後に腎臓と腫瘍組織に集積することが確認された。さらに、Dylight750-H16 は注射後も安定的に生体内に滞留し、注射後 132 時間まで腫瘍組織に集積が確認された。

以上の結果から、ポリヒスチジン(H16)は生体内において腫瘍組織に対する集積性を示すだけでなく、安定した滞留性も有していることが明らかになった。



矢印は腫瘍組織を示す

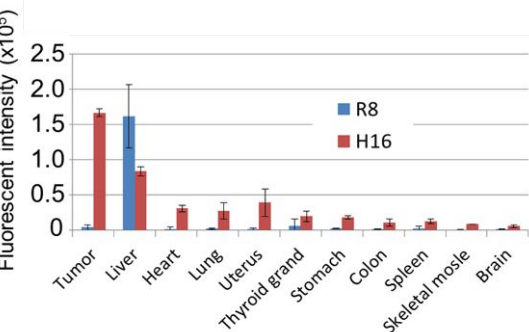


図7 . ポリヒスチジン(H16)の生体内挙動

6 総括

本研究より、ポリヒスチジン(H16)は電荷および血清の影響を受けず、主にマクロピノサイトーシスによって細胞膜を透過することが明らかになった。また、細胞内では大部分のポリヒスチジン(H16)はゴルジ体およびリソソームに局在し、一部のポリヒスチジン(H16)は細胞質に移行することが確認された。ポリヒスチジン(H16)を融合したタンパク

質も同様の細胞内局在を示したことから、ポリヒスチジン(H16)はゴルジ体やリソソームを標的とした DDS に応用可能である可能性が示唆された。

さらに、担癌マウス体内において、ポリヒスチジン(H16)は腫瘍組織に集積し、安定した滞留性を示すことが確認された。この安定した滞留性は、ポリヒスチジン(H16)が血清の影響を受けないことに関連していると考えられる。

以上の研究成果から、ポリヒスチジン(H16)は有力な DDS 素材であることが明らかになった。今後は、さらなる応用研究の展開が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

T. Iwasaki, Y. Tokuda, A. Kotake , H. Okada, S. Takeda, T. Kawano, Y. Nakayama, Cellular uptake and *in vivo* distribution of polyhistidine peptides, *J. Control. Release*, **210**, 115-124. (2015) 査読有
doi:10.1016/j.jconrel.2015.05.268

〔学会発表〕(計 4 件)

小竹 彩香、徳田 佳久、河野 強、岩崎 崇、細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジン(H16)の細胞内挙動の解析 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 26-29 日 (岡山市・岡山大学)

岩崎 崇、新しい細胞膜透過ペプチド・ポリヒスチジンの発見と応用研究 中四国動物生理シンポジウム 2014 年 11 月 15 日 (広島県三原市)

徳田 佳久、小竹 彩香、河野 強、岩崎 崇、新規細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジン」の分子機構の解析 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 27-30 日 (神奈川県川崎市・明治大学)

岩崎 崇、徳田 佳久、小竹 彩香、河野 強、新規細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジン」の発見 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 27-30 日 (神奈川県川崎市・明治大学)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩崎 崇 (IWASAKI, Takashi)
鳥取大学・農学部・助教
研究者番号：30585584