

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871130

研究課題名(和文) 葉酸結合ペプチドアプタマーの創成による白血病細胞選択的な薬物送達システムの開発

研究課題名(英文) Development of leukemia cell-specific drug delivery system by the selection of folic acid-conjugating peptide aptamers

研究代表者

多田 誠一 (Tada, Seiichi)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：30598165

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)：葉酸レセプターの α 型には結合せず、 β 型にのみ特異的に結合するペプチド配列の選別法の検討を行った。より高い結合能が得られるよう、ランダムペプチド配列には葉酸分子を導入し、進化分子工学の手法で β 型レセプターへの標的選択性が得られる選別系を構築した。葉酸分子の導入に必要な葉酸化アミノ酸担持tRNAの合成と、ランダムペプチド配列中に導入されなかった葉酸分子の除去が可能なペプチド選別系を構築できたため、ごく近い将来に β 型レセプター結合性ペプチド配列が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In vitro selection method of peptide aptamers binding to only beta type of folate receptor, without alpha type, was investigated. A folic acid molecule was introduced the random peptide library sequence for better binding affinity of selected peptides. The specificity of the selected peptide against the folate receptor types was provided by evolutionary molecular engineering method. Folic acid-conjugating aminoacyl tRNA, which is necessary to incorporate folic acid molecule into the random peptide library, was successfully synthesized. The peptide selection methods were investigated for the removal of remained free folic acid molecules from translated products. Based on these investigation, folic acid-conjugating peptide aptamers binding to folate receptor beta is expected to be selected soon.

研究分野：生体材料工学、進化分子工学

キーワード：葉酸 葉酸レセプター ペプチドアプタマー in vitroセレクション リボソームディスプレイ cDN
Aディスプレイ 非天然アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病の治療においては、メトトレキサート等の薬剤を用いた治療法が定着しつつあるが、依然として強い副作用が生じる投与法を採用せざるを得ない場合があり、急性骨髄性白血病細胞 (Acute Myelogenous Leukemia cells, AML) に選択的に薬剤を導入できるデリバリーシステムの開発が求められている。

AML を含む多くの腫瘍細胞では、葉酸レセプターの発現が正常細胞よりも高いことが 1970 年代から知られており、葉酸レセプターを標的とした固形腫瘍への抗癌剤送達を目指し、葉酸分子を用いたドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が現在に至るまで各所で進められている。細胞表面の葉酸レセプターとしては、 β 型の 2 種類のサブタイプが存在が知られており、AML では β 型が特異的に発現している。葉酸レセプターは腫瘍細胞だけでなく腎臓の正常細胞でも発現が見られるが、正常細胞における葉酸レセプターの発現量は AML における発現量よりも遥かに少ないため、葉酸レセプター発現細胞に選択的に薬剤を送達する DDS の開発は急性骨髄性白血病の治療に非常に有効であると考えられる。しかし、葉酸レセプターを標的とした DDS の研究例は、日本国内と海外を併せても報告が数件ある程度である。そこで本研究代表者は、以前より開発していたタンパク質薬剤の細胞内導入キャリアに葉酸レセプターへの選択的導入能を付与し、急性骨髄性白血病の治療に有用な DDS の開発を目的とした本計画の実施に至った。

本研究の代表者は以前の検討により、炭酸アパタイトナノ粒子によるタンパク質薬剤の細胞内導入システムを開発している。この炭酸アパタイトナノ粒子はリン酸とカルシウム、炭酸イオンを主成分とする無機材料であり、高いタンパク質導入効率と非常に低い細胞毒性を兼ね備えた優れた細胞内導入単体であるが、その一方で幅広い細胞種に対するタンパク質導入効果を示すため、特定の組織や細胞に選択的に薬剤を導入する目的には適していないという難点があった。そこで代表者は、この炭酸アパタイトナノ粒子に特定の標的分子を特異的に認識して結合する分子を付与することで効果的な細胞種選択的タンパク質導入システムを構築することを考えた。

炭酸アパタイト表面には多様な種類のタンパク質やペプチドが吸着することが知られているため、粒子表面に結合させる標的細胞認識分子はタンパク質あるいはペプチドで構成されるものが望ましい。その点で、代表者が所属している研究室では *in vitro* 選別法を利用した標的分子認識ペプチド (ペプチドアプタマー) の開発に多数成功しており、特定の細胞表面に発現するタンパク質に選択的に結合するペプチドの開発に有用な知

見の蓄積があった。

これらの背景を元に、本研究の代表者は、葉酸レセプターに選択的に結合するペプチド配列を開発し、炭酸アパタイト粒子に付与して AML に選択的に薬剤を導入できる細胞内導入システムの開発を検討した (図 1)。

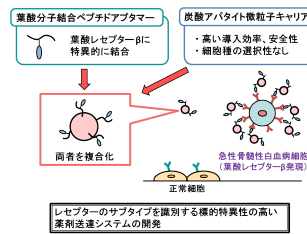


図 1 本研究の概要

2. 研究の目的

本研究では、葉酸レセプターに特異的に結合するペプチドアプタマーを開発し、これを炭酸アパタイトナノ粒子表面に固定化することで、急性骨髄性白血病細胞に選択的にタンパク質薬剤を導入できる細胞内導入キャリアを開発することを目的としている。前述の通り炭酸アパタイト粒子のタンパク質導入キャリアとしての開発はすでに検討が進んでいるため、本研究での主要目的は葉酸レセプター選択的なペプチドアプタマーの開発である。

今回のペプチドアプタマーの開発では、より標的分子に対し高い親和性を付与するために、葉酸レセプターのリガンドである葉酸分子を導入したペプチドアプタマーを選別するという手法を採った。葉酸分子は対応するレセプターに対し高い結合能を示すが、葉酸レセプターの β 型と α 型の両者に結合することが知られている。そこで、後述する *in vitro* 選別法によるペプチドアプタマーの選別の際に、ランダムペプチドライブラリー中に予め葉酸分子を導入し、その後に葉酸レセプターにのみ結合するペプチド配列を選別するという開発法を検討した。これにより、葉酸分子による強い結合能とペプチド部分による標的選択性を兼ね備えたペプチドアプタマーが得られるものと期待される (図 2)。本研究は、このようなりガンド分子導入型 *in vitro* 選別法によるペプチドアプタマー開発の有効性評価も目的としている。

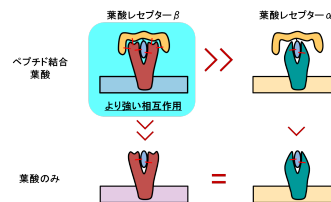


図 2 葉酸とペプチドの結合による相互作用の増強と標的選択性の付与

3. 研究の方法

主目的である葉酸分子含有葉酸レセプタ

ー 選択的結合ペプチドアプタマーの選別は、進化分子工学のアプローチに基づいた *in vitro* 選別法で実施することとした。この手法ではまず、ランダムペプチド領域を持つ鑄型 DNA から作製した mRNA を無細胞翻訳システムに投入し、得られたランダムペプチドライブラリーと対応する mRNA をそれぞれ後述するいずれかの手法で連結する。この複合体溶液に標的分子を固定化したビーズを添加して、標的分子に結合した複合体のみを回収することで、ランダムペプチド部分によるアフィニティー選別と、mRNA 部分の逆転写 PCR による選別されたペプチド配列の解読を両方達成する手法である。この方法で葉酸分子含有ペプチドアプタマーを選別するために、以下の項目について検討を行った。

(1) 葉酸結合アミノ酸を担持した tRNA の合成

本研究ではペプチドアプタマーの選別時に、予めランダムペプチド鎖に葉酸分子を導入しておく必要があったため、無細胞翻訳系でのペプチド翻訳時に葉酸結合アミノ酸を導入するための tRNA の合成を行った。ランダムペプチド鎖における葉酸導入箇所のコドンを終始コドンの一種である UAG とし、翻訳時に CUA のアンチコドンを持つ葉酸結合アミノフェニルアラニル tRNA を添加しておくことで、指定箇所に葉酸化アミノ酸が導入されたペプチドライブラリーを得ることができる。今回はこの葉酸結合アミノ酸担持 tRNA を有機合成と生物学的手法の共用によって作製した。

(2) mRNA-ランダムペプチド複合体の精製を可能にするペプチド選別法の検討

実際に葉酸結合ランダムペプチドライブラリーから葉酸レセプター に結合するペプチド配列を選別するにあたり、当初の予定ではリボソームディスプレイ法と呼ばれる方法でペプチド選別を実施する予定だった。リボソームディスプレイ法は翻訳配列の末尾に存在する終始コドンを欠損した mRNA を用いて翻訳を行うことで、翻訳収量に伴うリボソームの mRNA からの解離を抑制し、結果としてリボソームを介して mRNA と翻訳ペプチドの連結を実現させる手法である。この手法では他の手法と比較して容易に mRNA-ペプチド複合体が得られる反面、複合体の安定性が低く、精製が困難であるという難点がある。今回のペプチド選別系においては、無細胞翻訳系によるペプチド翻訳後に、反応に用いられずに残留する葉酸結合アミノ酸担持 tRNA あるいは tRNA から脱離した葉酸化アミノ酸が溶液中に相当量残留する可能性が検討の過程で浮上してきた。葉酸化分子が残留することで、標的分子である葉酸レセプター 分子によるペプチド選別を行う際に残留葉酸分子が葉酸レセプター に結合してしまい、目的としているペプチド配

列の選別に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで今回は、葉酸結合ペプチドアプタマーの選別により適した手法として、cDNA ディスプレイ法と 粒子ディスプレイ法の 2 種類の手法の検討を行った。cDNA ディスプレイ法は、mRNA とペプチドとの連結を、mRNA の 3' 末端に連結させたピューロマイシン結合 DNA リンカーによって達成する手法である。リボソームによる mRNA の翻訳が末端まで進むと、リンカー上に存在するピューロマイシンがリボソーム内に取り込まれ、ペプチドとの連結が行われるため、mRNA とペプチドとを共有結合によって連結することが可能になる。一方粒子ディスプレイは、ランダムペプチド配列を有する鑄型 DNA と、ランダムペプチド側に導入したタグ配列を認識する抗体とを磁気ビーズに固定化し、この磁気ビーズを無細胞翻訳液と共にリボソーム内に封入してから翻訳を行う。この操作により、鑄型 DNA と翻訳ペプチドとをビーズ上に共固定することが可能になる。いずれの手法でも核酸分子とペプチド鎖の結合は強固なので、葉酸化分子の残留物が生じても洗浄による除去が期待できる。

4. 研究成果

(1) 葉酸結合アミノ酸を担持した tRNA の合成

葉酸結合アミノ酸担持 tRNA の合成にあたっては、葉酸分子の各種溶媒に対する溶解性の低さと 葉酸分子が有する 2 箇所のカルボキシル基のうち γ 位側を選択的にアミノフェニルアラニンへ結合、という 2 点の課題への対策が必要だった。これらを解決する手法として、葉酸分子を 2 分割し、 β 位側のカルボキシル基二歩誤記を導入するというアプローチをとることで β 位活性化葉酸分子を合成し (図 3)、最終的に葉酸結合アミノ酸担持 tRNA を合成することができた。

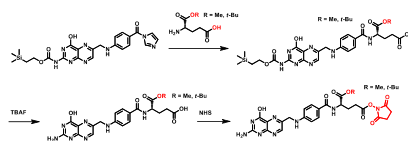


図 3 葉酸の β 位側カルボキシル基のスクシニイミジルエステル化スキーム

(2) mRNA-ランダムペプチド複合体の精製を可能にするペプチド選別法の検討

cDNA ディスプレイ法

cDNA ディスプレイ法の実施においては、mRNA と翻訳ペプチドの連結に必要な DNA リンカーが必要になる。今回の検討ではこの DNA リンカーの合成に成功し、T4 リガーゼによるこのリンカー分子と mRNA の連結を確認することができた。翻訳ペプチドと mRNA の連結についても SDS-PAGE による検討から確認できたため、本手法を用いた葉酸含有ペプチド選別系を構築することができ

た。

粒子ディスプレイ法

粒子ディスプレイ法では、鋳型 DNA と翻訳ペプチド捕捉用の抗体とをビーズ表面に固定化する必要がある。今回はストレプトアビジン担持磁気ビーズを用いてビオチン化鋳型 DNA、ビオチン化抗体を結合させ、翻訳されたモデルタンパク質 (FLAG タグ連結 GFP) のビーズ上固定に成功した。本手法でも非天然アミノ酸導入ペプチドの選別系を構築できたといえる。

上記成果により、葉酸分子導入ペプチドアプタマーのより効果的な選別が可能になったと考えられ、ごく近い将来に葉酸レセプターに選択的に結合するペプチドアプタマー配列の同定と、同ペプチドを用いた細胞種選択的薬剤導入システムの構築が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Seiichi Tada, Qingmin Zang, Wei Wang, Masuki Kawamoto, Mingzhe Liu, Michiru Iwashita, Takanori Uzawa, Daisuke Kiga, Masayuki Yamamura, Yoshihiro Ito, "In vitro selection of a photoresponsive peptide aptamer to glutathione-immobilized microbeads", *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 137-139 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.018

Seiichi Tada, Emel Timucin, Takashi Kitajima, Osman Ugur Sezerman, Yoshihiro Ito, "Direct in vitro selection of titanium-binding epidermal growth factor", *Biomaterials*, 35, 3497-3503 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.010

〔学会発表〕(計8件)

多田誠一他、非コードアミノ酸の導入による増殖因子の無機材料表面への固定化、第36回日本バイオマテリアル学会大会、2014年11月18日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

Seiichi Tada et al., "Direct selection of titanium-binding epidermal growth factor by evolutionary molecular engineering", *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia-Pacific (TERMIS-AP) Annual Conference 2014*, 2014 Sep 26, Daegu (Korea)

Seiichi Tada et al., "Direct selection of titanium-binding growth factor by ribosome display", *The 15th International Union of Materials Research Societies (IUMRS)-International Conference in Asia*, 2014 Aug 27, 福岡大学 (福岡県福岡市)

Seiichi Tada et al., "Creation of functional peptides using bioorthogonal evolution", 248th American Chemical Society National Meeting, 2014 Aug 10, San Francisco (USA)

多田誠一他、チタン表面結合性ペプチドを用いた増殖因子の固定化、第43回医用高分子シンポジウム、2014年7月28日、産業技術総合研究所臨海副都心センター(東京都江東区)

多田誠一他、チタン表面結合性上皮増殖因子のリボソームディスプレイ法を用いた選別、第35回日本バイオマテリアル学会大会、2013年11月26日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

多田誠一他、バイオ直交化学と進化分子工学による固定化型増殖因子の創製、第62回高分子討論会、2013年9月12日、金沢大学(石川県金沢市)

Seiichi Tada et al., "Ribosome display selection of epidermal growth factor binding to titanium surface", 第62回高分子学会年次大会、2013年5月31日、京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計1件)

Seiichi Tada, Takanori Uzawa, and Yoshihiro Ito, "Creation of functional peptides by evolutionary engineering with bioorthogonal incorporation of artificial components", in "Green Polymer Chemistry III: Biobased Materials and Biocatalysis", ed. by H. N. Cheng, R. A. Gross, and P. B. Smith, ACS Symposium Series, Am. Chem. Soc., in press (2015)

〔その他〕

伊藤ナノ医工学研究室ホームページ
<http://www.riken.jp/nano-med.eng.lab/home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

多田誠一 (TADA Seiichi)
独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・基礎科学特別研究員
研究者番号: 30598165