

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02497

研究課題名(和文) バイオ高分子医薬品の新たな細胞内導入戦略

研究課題名(英文) New strategy for intracellular delivery of biomacropharmaceuticals

研究代表者

二木 史朗 (Futaki, Shiroh)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：50199402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,300,000円

研究成果の概要(和文)： バイオ医薬品は、一般に細胞膜透過性を有しないため、効率的な細胞内送達法の開発は、新しい医薬品・医療の開発という観点から大きな波及効果を与える。本研究では、細胞膜への傷害性が非常に高い、クモ毒由来のカチオン性の両親媒性ヘリックスペプチドM-lycotoxinの疎水面のロイシンを酸性アミノ酸であるグルタミン酸に置換したL17Eペプチドを創出した。L17Eは、細胞膜には顕著な傷害性を示さない反面、エンドソーム膜を効果的に不安定化する特性を有しており、通常はエンドソーム内に保持される抗体などのタンパク質を効果的にサイトゾルに放出できることが分かった。

研究成果の概要(英文)： One of the major obstacles in intracellular targeting using antibodies is their limited release from endosomes into the cytosol. We have developed an approach to deliver biomacromolecules into cells by using endosomolytic peptides derived from the cationic and membrane-lytic spider venom peptide M-lycotoxin. The delivery peptides were developed by introducing a glutamic acid into the hydrophobic face (L17E) to M-lycotoxin, enabling a marked cytosolic liberation of proteins including antibodies from endosomes. The predominant membrane-perturbation mechanism of this peptide is assumed to be the preferential disruption of negatively charged membranes (endosomal membranes) over neutral membranes (plasma membranes), and the endosomolytic peptide promotes the uptake by inducing macropinocytosis.

研究分野：生体機能化学

キーワード：細胞内送達 抗体 エンドサイトーシス マクロピノサイトーシス クモ毒 膜傷害性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

近年、抗体をはじめとしたバイオ高分子医薬品が新たな分子標的医薬として確固たる地位を築きつつある。抗 HER2 抗体や抗 TNF 抗体をはじめ、世界の売り上げ上位の医薬品の中でかなりの数が抗体医薬となっていることから明らかなように、抗体医薬品はその効果と将来性が期待されている。しかし、現時点で市販されている抗体医薬は、全て細胞膜上の受容体や細胞外の病態関連因子を標的とするものであり、細胞内因子を標的としたものはない。これは、抗体を細胞内に効率的に導入する手法が確立されていないことに起因するものである。細胞内には、例えば、チューブリンなどの細胞骨格関連タンパク質や、キナーゼ関連分子など、抗がん剤としての多くの標的がある。抗体を細胞内に効率的に導入することが可能であれば、抗体医薬の適用範囲は一層拡大し、様々な疾患の治療に貢献すると期待される。

一方、近年、細胞膜透過性を有するペプチド (cell-penetrating peptides, CPP) を用いて、細胞内に薬物を送達する手法が開発されてきた。申請者は、オクタアルギニン (R8) などのアルギニンに富む塩基性ペプチド (アルギニンペプチド) が効率的に細胞内に移行すること (JBC 2001) や、その細胞内への移行には、直接的な膜透過経路と共に「マクロピノサイトーシス」という特殊なエンドサイトーシスも関与すること (Mol. Ther. 2004) などを世界に先駆けて報告してきた。また、この遺伝子送達における有用性 (Acc. Chem. Res. 2012) や、がん標的における可能性 (J. Control. Release 2012) あるいは in cell NMR (Nature 2009) を含めたケミカルバイオロジー分野への応用展開に関して報告してきている。このように、アルギニンペプチドは非常に有望な送達技術である。しかし、医薬品としての抗体の細胞内導入には、送達効率、特にエンドソームからサイトゾルへの抗体の移送効率の格段の向上が必要である。抗体は、細胞の生理的な飲食経路 (エンドサイトーシス) を介して細胞内に取り込まれる。薬効発現には、十分量の抗体が、取り込み小胞 (エンドソーム) から細胞質 (サイトゾル) へ放出され、標的分子と結合することが必要である。アルギニンペプチドは膜傷害性の低さをその特長としており、抗体 (15-16 kDa) などの大型分子のエンドソーム膜透過を可能とする効果的な膜構造攪乱が達成できない。このため、申請者は抗体等の大型分子の細胞内導入には、この限界を克服・補完できる新しい方法論の樹立が必要と考えるに至った。抗体のみならず、エンドソーム内包薬物のサイトゾルへの効果的な放出は、遺伝子や核酸医薬等を含めた他のバイオ高分子医薬品の細胞内送達の最重要課題の一つであり、社会的要求も非常に高い。

2. 研究の目的

抗体医薬品の細胞内標的化を念頭に、本研究では、培養細胞レベルで抗体の細胞内 (サイトゾル) への送達を達成する新手法の開発を目的とした。このために、以下に関して検討を行うこととした。

(i) 高い膜傷害性あるいは細胞傷害性を有する種々の毒素由来ペプチドや抗菌ペプチドに着目し、細胞外では膜傷害性を抑制し、エンドソーム内ではその構造を誘起させる効果的な on-off の構造制御法の開発を行う。
(ii) 細胞内タンパク質に対する抗体 (蛍光標識体) を生細胞に導入し、細胞内器官の染色を通して抗体の細胞内移行効率と細胞内標的能を確認する (共焦点顕微鏡による評価)。
(iii) シグナル伝達に関連する細胞内タンパク質に対する抗体の導入により細胞機能が調節できること確認する (生理活性による評価)。

3. 研究の方法

ペプチド合成は Fmoc 固相法により行った。ペプチドの膜傷害性は WST-1 アッセイによる細胞傷害性による判断した。ペプチドのエンドソーム不安定化能は細胞内導入物質 (10 kDa デキストラン、IgG) の共焦点顕微鏡観察により行った。また各種細胞生物学的アッセイにより、生理作用を検討した。ペプチドの脂質選択的傷害性に関しては、リポソームを用いた溶出試験により判定した。

4. 研究成果

溶血性を示すペプチドをデータベースから抽出し、下記の 9 種のペプチドを化学合成した。

M-lycotoxin :
IWLTKFLGKHAHLAKQQLSKL-amide
Chrysopsin :
FIGLLISAGKAIHDLIRRRH-amide
Cryptonin :
GLLNGLLALRLGKRALKKI IKRLCR-amide
Osmin :
GFLSALKKYLPIVLKLV-amide
Grammistin :
FIGGIISFFKRLF-amide
Brevinin :
FLPVLAGIAAKVVPALFCKITKKC-amide
Melectin :
GFLSILKKVLPKVMAMHK-amide
Mastoparan :
INWKALLDAAKKVL-amide
Bombinin :
GIGALSAKGALKGLAKGLAEHFAN-amide

これらの細胞毒性を検討し、細胞膜への傷害性が最も高い候補ペプチドとして、クモ毒由来のカチオン性の両親媒性ヘリックスペ

プチド M-lycotoxin を選出した。細胞表面では膜傷害性を発揮せず、エンドソーム膜を選択的に不安定化することを狙い、このペプチドの疎水面アミノ酸を酸性アミノ酸であるグルタミン酸に置換した以下のペプチド 9 種を合成した。

L6E :
IWLTAEKFLGKHAAKHLAKQQLSKL-amide
L9E :
IWLTALKFEGKHAAKHLAKQQLSKL-amide
A13E :
IWLTALKFLGKHEAKHLAKQQLSKL-amide
L17E :
IWLTALKFLGKHAAKHEAKQQLSKL-amide
Q21E :
IWLTALKFLGKHAAKHLAKQELSKL-amide
L6E/G10E :
IWLTAEKFLGKHAAKHLAKQQLSKL-amide
L9E/A13E :
IWLTALKFEGKHEAKHLAKQQLSKL-amide
A13E/L17E :
IWLTALKFLGKHEAKHEAKQQLSKL-amide
L17E/Q21E :
IWLTALKFLGKHAAKHEAKQELSKL-amide

このうち 17 番目のロイシンをグルタミン酸に置換した L17E は、細胞膜には顕著な傷害性を示さない反面、エンドソーム膜を効果的に不安定化する特性を有していることが 10 kDa デキストランをモデル高分子として用いた予備実験により明らかとなった。L17E 40 μ M 存在下、HeLa 細胞と 10 kDa デキストランを 1 時間インキュベーションすることにより、約 50% の細胞で、10 kDa デキストランの著明なサイトゾルへの移行が共焦点顕微鏡により観察された。

さらに、下記の 4 種のペプチドを合成し、10 kDa デキストランのサイトゾルへの移行の評価により、L17E の標的が細胞膜であること、17 位のロイシンの酸性アミノ酸への置換が重要であること、L17E (23-25) に対応する配列が活性発現に重要であること等を示した。

D-L17E :
iwltalkflgkhaakheakqqlskl-amide
L17D :
IWLTALKFLGKHAAKHDAKQQLSKL-amide
L17E (23-25) :
IWLTALKFLGKHAAKHEAKQQL-amide
L17E (20-25) :
IWLTALKFLGKHAAKHEAK-amide
(配列中の小文字は D アミノ酸を示す)

L17E との同時投与により、Cre リコンビナーゼ、サポリン、抗体 (IgG) などのタンパク質が効果的にサイトゾルに移送できることが分かった。また、エクソソーム内包物を効果的に細胞内に送達できることも分かった。

細胞外から導入した抗体によって、細胞内タンパク質の標的化やシグナル伝達の抑制が可能であることも示された。

L17E のサイトゾルへの送達促進効果を検討したところ、マクロピノサイトーシスと呼ばれる刺激依存型液相エンドサイトーシスが関与していることが明らかとなった。つまり、このペプチドと細胞表面との相互作用によって、エンドソームからサイトゾルへのバイオ高分子医薬品の放出の前段階となる、エンドサイトーシスによる細胞内へのバイオ高分子医薬品の取込能が向上することが分かった。さらに、リポソーム漏出アッセイにより、L17E には当初予期していたような顕著な pH 依存的な膜傷害性はみられないことが分かった。一方、興味あることに、このペプチドは中性脂質からなる膜 (細胞膜モデル) に較べて酸性脂質を含む膜 (エンドソーム膜モデル) に、より強い傷害性を示すことが明らかとなった。

「エンドサイトーシスの活性化による細胞への取込量の亢進」と「エンドソーム構成脂質選択的な膜不安定化」という従来にないユニークな機序によって、効率的な抗体の細胞内移行を達成していることが明らかとなった。これらの成果は、下記の論文として発表を行った。成果はプレスリリースされ、新分や web ニュース等でも取り上げられた。また、L17E は株式会社ペプチド研究所から市販されるに至った。実験を担当した連携研究者と大学院生が、学会等で下記の賞を受賞した。

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 3 件)

1. Nakase Ikuhiko, Noguchi Kosuke, Aoki Ayako, Takatani-Nakase Tomoka, Fujii Ikuo, Futaki Shiroh. Arginine-rich cell-penetrating peptide-modified extracellular vesicles for active macropinocytosis induction and efficient intracellular delivery. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1991. doi: 10.1038/s41598-017-02014-6.
2. Akishiba Misao, Takeuchi Toshihide, Kawaguchi Yoshimasa, Sakamoto Kentarou, Yu Hao-Hsin, Nakase Ikuhiko, Takatani-Nakase Tomoka, Madani Fatemeh, Gräslund Astrid, Futaki Shiroh. Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 751-761. doi:10.1038/nchem.2779.
3. Nakase Ikuhiko, Noguchi Kosuke, Fujii Ikuo, Futaki Shiroh, Vectorization of

biomacromolecules into cells using extracellular vesicles with enhanced internalization induced by macropinocytosis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34937. doi: 10.1038/srep34937.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 二木史朗, ペプチドを用いた細胞内デリバリー, 第 393 回 CBI 学会講演会「中分子創薬の実現にむけて」(招待講演), 2018 年
2. Futaki Shiroh, Cytosolic delivery of biomacromolecules, 2018 International Symposium on Chemical Biology (招待講演)(国際学会), 2018 年
3. 二木史朗, 細胞内デリバリーペプチドの膜との相互作用, 17-1 バイオ・高分子研究会 (招待講演), 2017 年
4. Futaki Shiroh, Peptide-mediated Delivery of Biomacromolecules into Cells, 12th Australian Peptide Conference 2017(招待講演)(国際学会), 2017 年
5. Futaki Shiroh, Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide, The Second A3 Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub (招待講演)(国際学会), 2017 年
6. 二木史朗, 見る・知る・作る: ペプチドと細胞膜との相互作用, 第 9 回東京大学化学生命工学専攻 ChemBio ハイブリッドレクチャー (招待講演), 2016 年
7. Futaki Shiroh, Facilitated membrane translocation of arginine-rich peptides in the presence of curvature inducing peptides, 14th Chinese International Peptide Symposium & 5th Asia-pacific International Peptide Symposium (CPS-14 & APIPS-5) (招待講演)(国際学会), 2016 年
8. Futaki Shiroh, Peptide mediated delivery of bioactive proteins into cells, 8th Asia TIDES (招待講演)(国際学会), 2016 年
9. Futaki Shiroh, Converting a cytotoxic, hemolytic peptide to an intracellular delivery tool of bioactive proteins, NEA and ASIAHORCs Joint Symposium on Chemical Biology (招待講演)(国際学会), 2015 年
10. Futaki Shiroh, A novel lysosomolytic peptide designed from spider venom, 7th Peptide Engineering Meeting(招待講演)(国際学会), 2015 年
11. Futaki Shiroh, Peptide mediated delivery of bioactive proteins into cells, 7th International Peptide Symposium(招待講演)(国際学会), 2015 年
12. Futaki Shiroh, Exploiting hemolytic amphiphilic peptides as a design template for cytosolic antibody, Pacificchem 2015(招待講演)(国際学会), 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 細胞質送達ペプチド

発明者: 二木史朗、坂本健太郎、秋柴美沙穂

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 2017-055508

出願年月日: 2017 年 3 月 22 日

国内外の別: 国内

名称: 細胞質送達ペプチド

発明者: 二木史朗、*秋柴美沙穂、川口祥正、

武内敏秀

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/077395

出願年月日: 2015 年 9 月 28 日

国内外の別: 外国

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html>

メディア報道一覧 (プレスリリース・取材などの結果、各年度に報道されたもの)

1) 京都新聞掲載, 二木史朗 細胞内へ抗体効率取込 2017.5.23

2) 日本経済新聞電子版掲載 二木史朗 京大、クモ毒を改良し細胞内への抗体輸送手段を開発 2017.5.23

3). 日経バイオテク ON LINE 掲載 二木史朗 京大、抗体の細胞内輸送手段を開発

2017.5.26

4) Chemical and Engineering News で紹介 二木史朗 Two new ways to get proteins into cells 2017.7.24

5) Nature Chemistry 誌 News & Views で紹介 二木史朗 Just passing through 2017. 7. 25

L17E の市販化
株式会社ペプチド研究所
(L17E Cytosolic Delivery Peptide, Code: 3409-v)

受賞

1) Poster Prize, 秋柴美沙穂, 「Modification of natural hemolytic peptide achieving intracellular delivery of antibodies」, 2016.7.7, The 14th Chinese International Peptide Symposium & the 5th Asia-pacific International Peptide Symposium

2) Poster Prize, 河野健一, 「Facilitated cell penetration of dipicolylamine-modified R8 by metal complex formation」, 2016.7.7, The 14th Chinese International Peptide Symposium & the 5th Asia-pacific International Peptide Symposium

3) 優秀ポスター賞, 秋柴美沙穂, 「高分子の細胞内送達を実現するエンドソーム不安定化ペプチドの開発」, 2017.9.8, 第 11 回 バイオ関連化学シンポジウム

4) 若手口頭発表最優秀賞, 坂本健太郎, 「Histidines in L17E endosome-destabilizing peptide」, 2017.11.21, 第 54 回ペプチド討論会

5) 日本ペプチド学会ポスター賞, Jan Vincent V. Arafiles, 「Novel macropinocytosis-inducing cell penetrating peptides」, 2017.11.21, 第 54 回ペプチド討論会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二木 史朗 (FUTAKI Shirōh)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号: 50149502

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

武内 敏秀 (TAKEUCHI Toshihide)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号: 70600120

河野 健一 (KAWANO Kenichi)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号: 70732874