

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06263

研究課題名（和文）人工ペプチドによる生体制御システムの開発

研究課題名（英文）Development of biological regulation system with artificial peptide

研究代表者

松下 正之（MATSUSHITA, MASAYUKI）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：30273965

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：私たちは、細胞内に侵入するペプチドにタンパク質などの高分子を結合させることにより、目的の物質を直接細胞内に導入し、生体機能を制御する方法の開発を行ってきた。ウイルスを用いる方法と違い、タンパク質を直接細胞内に導入するためDNA損傷による癌化などの副作用がなく、幹細胞制御技術や医療への応用が急速に広まっている。しかしながら、世界中で開発されている細胞内侵入ペプチドは全ての細胞種に侵入するため、本研究で目的の細胞にのみ選択的に侵入可能なペプチドを研究した。これまで開発してきた目的の臓器や細胞にのみ輸送可能なペプチドによる疾患モデルでの治療効果の検討や新たに血液脳関門透過ペプチドの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康社会の実現に向け、疾患の早期診断や副作用のない治療を推進するためには、疾患罹患細胞への的確な診断薬や治療薬物の送達待望されている。各種の臓器や細胞に選択的に侵入する技術をペプチドを用いて創出したものであり、幅広い疾患診断・治療法の開発に応用可能な基盤技術になる。人工ペプチドを用いた診断・治療システムが確立されると、それに付随する診断用の化合物などの多種類のイメージング用プローブの開発や、細胞選択的侵入ペプチドを利用する新しい医療機器の開発に繋がることが期待される。また、本システムは各種臓器、細胞を標的とすることが可能であり、癌だけでなく他疾患や基礎研究への幅広い波及効果も期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a method for directly controlling the biological function by introducing a target molecule into a cell by binding such as a protein to a cell invasion peptide that invades the cell. Unlike the method using a virus, since the protein is directly introduced into cells, there is no side effect such due to DNA damage, and the application to stem cell regulation technology and medical application is rapidly spreading. However, since the intracellular invasion peptides developed all over the world invade all cell types, in this study, we studied peptides that can selectively invade target cells. We have investigated the therapeutic effects in disease models using cell type specific invasion peptides that have been developed so far and that can be transported only to the target cells, and have newly developed peptides that penetrate the blood-brain barrier.

研究分野：細胞生理学

キーワード：細胞膜 ペプチド 神経疾患 細胞内除法伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先進医療としての標的治療は、抗体医薬、ウイルスを用いた遺伝子治療、低分子化合物、および RNA 干渉薬 (siRNA) の開発によって目覚ましい展開を示しつつあります。これらは、従来医学の欠点を補う、より副作用の少ない有望な先進医薬であることから今後の発展が一層期待されています。しかし、標的治療研究においては最大の難関として、目的とする細胞にのみ必要な効果を及ぼす、という“選択的な細胞標的システムの構築”が依然世界的に大きな課題として取り残されています。私たちは、これまで11個のアルギニンからなるペプチドに機能性ペプチドやタンパク質を融合することにより、目的の分子を直接細胞内に導入し、細胞内情報伝達を制御する方法の開発を行ってきました (J. Neurosci 21: 6000-6007, 2001; Nat Med 10: 305-309, 2004, Patent No:US7,659,249B2)。また、細胞内へ侵入するペプチドを利用した siRNA のデリバリー法の開発にも成功しています。本申請計画では、私たちが長年に渡り研究開発を行ってきた細胞侵入ペプチドを応用することにより開発に成功した癌細胞選択的侵入ペプチド技術 (Nature Communications 2012, BBRC 2014) をさらに発展することによって、我が国発信の先進医療技術や基礎医学の発展に貢献することを目的としています。健康社会の実現に向け、疾患の早期診断や副作用のない治療を推進するためには、疾患罹患細胞への的確な診断薬や治療薬物の送達が待望されています。本研究提案は、各種の臓器や細胞に選択的に侵入する技術をペプチドを用いて創出する試みであり、幅広い疾患診断・治療法の開発に応用可能な基盤技術になりえます。人工ペプチドを用いた診断・治療システムが確立されると、それに付随する診断用の化合物などの多種類のイメージング用プローブの開発や、細胞選択的侵入ペプチドを利用する新しい医療機器の開発に繋がることが期待されます。また、本システムは各種臓器、細胞を標的とすることが可能であり、癌だけでなく他疾患や基礎研究への幅広い波及効果も期待できます。

2. 研究の目的

私たちは、細胞内に侵入するペプチドにタンパク質などの高分子を結合させることにより、目的の物質を直接細胞内に導入し、生体機能を制御する方法の開発を行ってきました。ウイルスを用いる方法と違い、タンパク質を直接細胞内に導入するため DNA 損傷による癌化などの副作用がなく、幹細胞制御技術や医療への応用が急速に広まっています。しかしながら、世界中で開発されている細胞内侵入ペプチドは全ての細胞種に侵入するため、私たちは“目的の細胞にのみ選択的に侵入可能なペプチド”を長年にわたり研究し、その開発に成功しています。目的の臓器や細胞にのみ、化合物、タンパク質、核酸などを導入する技術は、新たな診断・治療法を創造することが期待されます。本研究は「自在に改変・修飾ができ、からだにやさしい人工ペプチド」を細胞選択的な輸送用プローブとして用い、高感度な診断技術・革新的な治療法を開発することを目的としています。

3. 研究の方法

平成29年度

(1) mRNA Display ペプチドライブラリー

既存の Phage display などのペプチドライブラリーが 10^9 種類のペプチドを提示するのに対して、我々の使用している改変型の mRNA display ペプチドライブラリーは試験管内無細胞系による合成のため 10^{12} 種類のペプチドを提示することが可能であり、実験の最も大切なソースの部分で世界的に優位に立てる。ペプチドライブラリーは提示ペプチドと mRNA がピューロマイシン (Pur) を介して結合するため複合体が安定である。

(2) 各種神経系の細胞でのスクリーニング

細胞選択的侵入ペプチドのスクリーニングについては、先行研究で方法論も確立しており、この方法を各種の腫瘍細胞を標的細胞として展開した。スクリーニング方法は、培養した標的細胞に mRNA Display ライブラリーを培養液中に添加し、表出ペプチドに細胞侵入能がある場合はライブラリー複合体が細胞内に侵入する。その後、過剰なライブラリーを洗浄し、細胞内部の mRNA ペプチド複合体を PCR により増幅・再構築した。この一連の操作を6~8回繰り返すことにより、ライブラリーの濃縮を行った。濃縮されたライブラリーの塩基配列を決定し、予想されるアミノ酸配列よりペプチドを人工合成した。この方法は Nature Communications 2012 で確立している。

(3) 再構成系の血液脳関門でのスクリーニング

血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) の再構成系を用いてスクリーニングを行う。mRNA display ペプチドライブラリーの中に、血管内皮細胞やペリサイトから構成された BBB を通過可能なペプチドが含まれていると、メンブレンフィルターを通過したペプチド-mRNA 複合体は外側溶液に存在するため、外側溶液を回収後、濃縮し上記と同様の方法でライブラリーを増幅する一連の操作を繰り返すことにより BBB 通過ペプチドを分離する。大量の mRNA display library を用いて生体で行うことも可能である。さらに、In vivo Panning の方法も用い、マウス尾静脈からの mRNA display ライブラリーや Phage display ライブラリーを投与後に脳を摘出し、ライブラリーの回収と濃縮を繰り返すことにより、脳神経へ侵入するペプチドをスクリーニングした。

(4) ペプチドの細胞選択性評価

スクリーニングにより選択的に細胞に侵入するアミノ酸配列より人工合成した蛍光ペプチド (FITC 結合ペプチド) を、他種類の癌や初代培養細胞などを含む各種細胞パネルに添加し、細胞選択性を蛍光顕微鏡で観察し決定した。さらに、マウス個体への投与により BBB 通過や脳神経への侵入を検証した。これまでの経験で、上記スクリーニングにより回収されアミノ酸配列の決定されたペプチド群の 10% 程度に選択性を持つペプチドが存在する。

平成 30 年度～令和元年度

(1) 神経変性疾患 (ALS)

変異 SOD1 過剰発現系モデルマウスを用いて、神経細胞特異的侵入ペプチドに従来の方法では神経細胞に導入できなかった機能性ペプチドを結合し治療効果の検証を行った。血液脳関門を通過するペプチドに神経細胞侵入ペプチドを融合した。このハイブリッドペプチドに、治療用の機能性ペプチドを加えた。変異 SOD1 過剰発現マウスでは、小胞体ストレスが亢進することが発症の原因であることが明らかとなっている。さらに、この小胞体ストレスは変異 SOD1 が小胞体内の変性タンパク質を排出する穴を塞ぐことが原因であり、変異 SOD1 と変性タンパク質排出複合体の構成分子である Derlin-1 の変異 SOD1 への結合阻害ペプチドも同定されている (Nishitoh et al., Gen & Dev 2008)。これらの知見をもとに、ペプチドを人工合成し、血行性にこのペプチドを神経細胞に侵入させることにより治療効果を組織病理学的、生化学的、および行動実験で検証した。ペプチドデザインでは、BBB 侵入ペプチドと神経細胞侵入ペプチドを融合した。シャペロンタンパク質の導入なども試みた。

(2) グリオブラストーマ診断

グリオブラストーマに選択的に侵入可能なペプチド群を既に発見している。平成 29 年度計画のコア配列や光学異性体により、より侵入効率の高いペプチドの創生を試みた。脳腫瘍モデルマウスを用いた生体イメージングに関しては、腫瘍モデルマウスへの選択的侵入ペプチドのコア配列を蛍光標識し投与することにより脳腫瘍への集積を検証した。スクリーニングにより発見された Peptide1 の脳腫瘍移植モデルでの脳腫瘍細胞への取り込みが確認された。

(3) グリオブラストーマ治療

グリオブラストーマの脳移植モデルを作成し、特異的侵入ペプチドと癌細胞にアポトーシスを誘導する機能性ペプチドとの融合ペプチドを用いて、モデル動物に投与し治療効果を検証した。細胞レベルでは、グリオブラストーマにはアポトーシスを起こし、正常細胞 (ヒト繊維芽細胞) には全く効果を及ぼさないペプチドをデザインしている (BBRC 2014)。しかしながら、生体では治療効果が弱いため、より選択制や侵入性の高いペプチドをスクリーニングにより創出を試みた。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系への人工ペプチドを用いた Drug Delivery System (DDS) の開発を通じて、革新的な診断方法や治療方法の開発を目指した研究を行った。中枢神経系へ高分子を送達するためには、血液脳関門 (BBB) を通過するペプチドを開発する必要がある。中枢神経系への治療分子の輸送に臨床的に適用されたものの様々な制限を受けてきたこれまでの送達システムと比較して、膜透過ペプチドによる送達システムは、低毒性ながらも高効率に巨大分子を細胞膜透過させるという優位性を持っている。DDS として最も困難で重要な BBB 通過ペプチド創出のための実験系の確立を行った。BBB 透過性ペプチドの創出には、ファージペプチドライブラリーを尾静脈注射し、脳を摘出することを繰り返すパニングの方法を用いて行った。ファージ投与量、投与後の脳回収時間などの条件設定を行い、実験系を確定した。

(2) 難治性癌細胞選択的侵入ペプチドの開発

がん細胞に超効率かつ選択的に取り込まれる性質を利用した PET 用のペプチドトレーサーの開発や、蛍光ペプチドによる術中転移巣の発見など多様な早期診断技術を創出することが期待される。同時に、癌選択的侵入ペプチドは治療分子を輸送する手段として用いることも可能であり、選択的導入による副作用の軽減、核酸などの高分子導入による革新的治療法の開発も可能である。これらの目的のために、これまで血液系の腫瘍で特異的に導入されるペプチドを開発してきたが、固形癌に応用するためのイメージング用の担癌モデルマウスを作成することができた。今後は、このモデルマウスとデリバリーシステムを用いてイメージングプローブの開発を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mittermeier L, Demirkhanyan L, Stadlbauer B, Breit A, Recordati C, Hilgendorff A, Matsushita M, Braun A, Simmons DG, Zakharian E, Gudermann T, Chubonov V	4. 巻 116
2. 論文標題 TRPM7 is the central gatekeeper of intestinal mineral absorption essential for postnatal survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 4706-4715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1810633116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kaitsuka T, Kiyonari H, Shiraishi A, Tomizawa K, Matsushita M	4. 巻 11
2. 論文標題 Deletion of Long Isoform of Eukaryotic Elongation Factor 1B Leads to Audiogenic Seizures and Aversive Stimulus-Induced Long-Lasting Activity Suppression in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Millman J, Okamoto S, Kimura A, Uema T, Higa M, Yonamine M, Namba T, Ogata E, Yamazaki S, Shimabukuro M, Tsutsui M, Matsushita M, Ikematsu S, Masuzaki H	4. 巻 9
2. 論文標題 Metabolically and immunologically beneficial impact of extra virgin olive and flaxseed oils on composition of gut microbiota in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Nutr	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00394-019-02088-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	片桐 千秋 (KATAGIRI CHIAKI) (00443664)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高松 岳矢 (TAKAMATSU GAKUYA) (90801431)	琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・助教 (18001)	
研究 分 担 者	早川 朋子 (HAYAKAWA TOMOKO) (30420821)	琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・助教 (18001)	