

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08947

研究課題名(和文) サイトゾル移行型ドラッグデリバリーを用いた生体治療(心筋梗塞モデルでの検証)

研究課題名(英文) Biological treatment using cytosolic migration type drug delivery (Validation in myocardial infarction model)

研究代表者

奥田 明子(田所明子)(Okuda, Akiko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60454584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織へのタンパク質導入技術は、細胞生物学的基礎研究から創薬・臨床研究に至るまで幅広い分野で必要とされている。しかし、現状では培養細胞レベルでさえ導入方法は確立されているとは言えない。我々は細胞膜透過性ペプチドに疎水性配列を付加したサイトゾル移行型膜透過ペプチド(Pas2r12)を開発した。Pas2r12は、カベオラエンドサイトーシスという特殊なエンドサイトーシスを介して抗体や緑色蛍光タンパク質をサイトゾルへと導入させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床的な治療において、遺伝子ではなくタンパク質を導入するメリットの一つは、即効性にある。導入された遺伝子は、発現まで1日以上かかることから、一刻を争うような治療には向いていない。このような場面において、タンパク質は既存の小分子薬剤と同様に即効性を示す可能性があり、小分子薬剤とは異なる作用点を狙うことができる。つまり、これまで治療薬とはなり得なかったタンパク質を新規治療薬として創造することができる。

研究成果の概要(英文)：Experimental techniques for introducing proteins into cells are still immature and should be developed for future therapies and diagnostics. We have developed a cytosolic transition type membrane-penetrating peptide (Pas2r12) in which a hydrophobic sequence is added to cell membrane-penetrating peptide (r12). It was found that Pas2r12 introduces antibodies and green fluorescent protein into cytosol via caveolae mediated endocytosis.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：膜透過ペプチド カベオラ依存性エンドサイトーシス 抗体 ドラッグデリバリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

病態への核酸導入による治療法が盛んに研究されている。しかし、核酸導入から発現までは1日以上かかることから、心筋梗塞などの一刻を争うような治療法には向いていない。このような場面において、タンパク質の導入は、既存の小分子薬剤と同様に即効性を示すことが可能であり、小分子薬剤とは異なる作用点を狙うことができる。しかし、現状では培養細胞レベルでさえ導入方法は確立されていない。

タンパク質導入法として、膜透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide: CPP) を

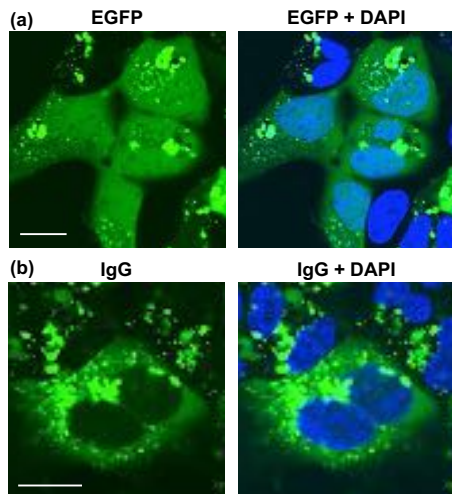


図1 Pas2r12によるHEK293 細胞への高分子の導入  
(a) 細胞内にEGFPが拡散している様子 (b) 細胞内にIgGが拡散している様子 (scale bars = 20 μm)

用いた方法がある。CPP と目的のタンパク質とを結合させ、細胞培養液へと加えるだけでタンパク質をほぼ100%の細胞へと導入させることができる。しかし、CPP とタンパク質複合体は、エンドサイトーシスで取り込まれるので、導入分子の多くがエンドソームにトラップされたまま活性を示すことができないという問題点があった。申請者は、CPP に疎水性配列を付加することで緑色蛍光タンパク質 EGFP や IgG 抗体などの生理活性分子を、サイトゾルへと導入することができる“サイトゾル移行型 CPP (Pas2r12)”を見出した (図1)。

### 2. 研究の目的

Pas2r12 によるサイトゾル移行型ドラッグデリバリーの有効性について、細胞内への導入メカニズムの解明と、生体への応用を目指した。

### 3. 研究の方法

① 細胞培養実験: HEK293 細胞を用いてエンドサイトーシス阻害剤存在下における、Pas2r12 とモデルカーゴ (EGFP) の複合体を添加し、サイトゾルへの導入について共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。

② 生体投与実験: 生後11週のマウス (C57BL/6NCr1, メス) の腹腔内に、EGFPのみ (control) あるいは Pas2r12/EGFP の複合体を投与した。投与2時間後あるいは24時間後に、尾静脈からの採血および臓器摘出を行った。各臓器に組織溶解液を加え、物理的に粉砕して遠心分離を行い、上清を臓器抽出液とした。血液および臓器抽出液にサンプル調製液を加えて熱処理を行い、SDS-PAGE後にウェスタンブロッティングを行った。

### 4. 研究成果

#### ① サイトゾル移行メカニズムの解析

アジ化ナトリウムあるいは低温条件下において Pas2r12/EGFP の複合体を細胞へ投与し、培養したところ、EGFP のサイトゾルへの移行はほとんどみられなかった (図2)。また、細胞骨格のアクチン重合を阻害するサイトカラシン D で処理した細胞では、EGFP のサイトゾルへの移行はほとんどみられなかった。これらの結果から、EGFP のサイトゾルへ

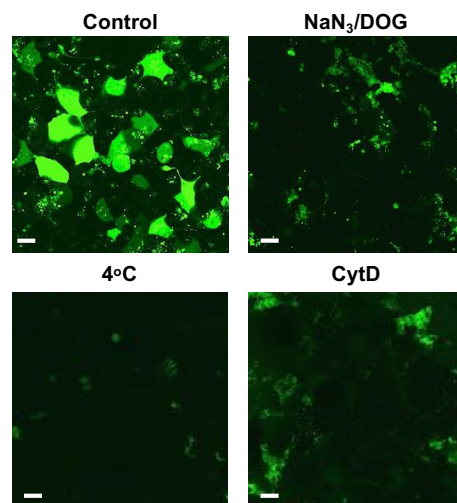


図2 各種阻害条件下におけるPas2r12によるEGFPの細胞内導入の様子 (scale bars = 20 μm)

の移行は、エネルギーに依存しており、アクチン重合が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

次に、エンドサイトーシスのうちクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤 (Chlorpromazine)、マクロピノサイトーシスの阻害剤 (EIPA あるいは Wortmannin)、カベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害剤 (Genistein あるいは M $\beta$ CD) で細胞をそれぞれ処理し、同様に Pas2r12/EGFP の複合体を細胞へ投与し、

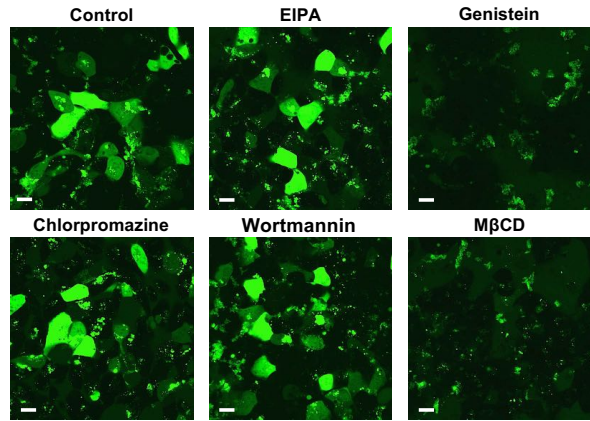


図3 各種エンドサイトーシス阻害剤存在下におけるPas2r12によるEGFPの細胞内導入の様子 (scale bars = 20  $\mu$ m)

培養した。カベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害剤 (Genistein あるいは M $\beta$ CD) の存在下でのみサイトゾルへの移行が阻害された (図 3)。カベオラ依存性エンドサイトーシスは、カベオラという窪み構造内あるいはその周辺に存在する特異的な受容体にリガンドが結合し、カベオラ構造ごと細胞内へと引き込まれ、細胞膜からくびり取られる。このカベオラ構造の主要構成要素の一つである Caveolin-1 を阻害することで、カベオラ依存性エンドサイトーシスが阻害されることが知られている。そこで、Caveolin-1 の siRNA を行い、Pas2r12/EGFP の複合体を細胞へ投与し、培養したところ、EGFP のサイトゾルへの移行は、コントロールと比べて低下した (図 4)。以上の結果から、Pas2r12/EGFP のサイトゾルへの移行には、カベオラ依存性エンドサイトーシスが関与していることが示唆された。

## ② マウス生体への投与実験

Pas2r12 と EGFP の複合体をマウス腹腔内に投与したところ、投与後 2 時間では control と Pas2r12/EGFP 共に各臓器に EGFP が検出された (図 5)。しかし、投与後 24 時間では control と

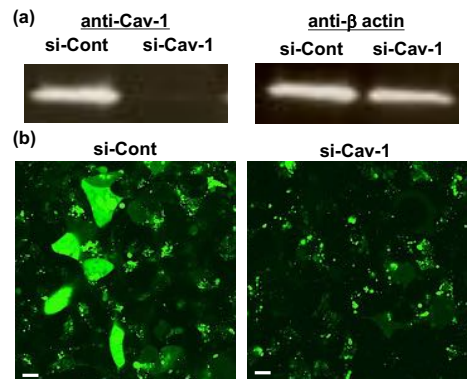


図4 (a) siRNAによるcaveolin-1の発現抑制 (b)caveolin-1ノックダウン細胞におけるPas2r12によるEGFPの細胞内導入の様子 (scale bars = 20  $\mu$ m)

Pas2r12/EGFP 共に EGFP はほとんど検出されなかった。一方、血液中の EGFP は投与後 2 時間では検出されたが、24 時間ではほとんど検出されなかった。これらの結果から、投与 2 時間後で control と Pas2r12/EGFP 共に各臓器に EGFP が検出されたのは、臓器に含まれる血液や間質液等に EGFP が存在した為ではないかと考えられた。今後は、2 時間での組織切片を作製し、免疫染色等により組織細胞内への移行の有無や、生体内蛍光イメージングによる Pas2r12 と EGFP の両方の動態について経時的なモニタリングを行う必要がある。

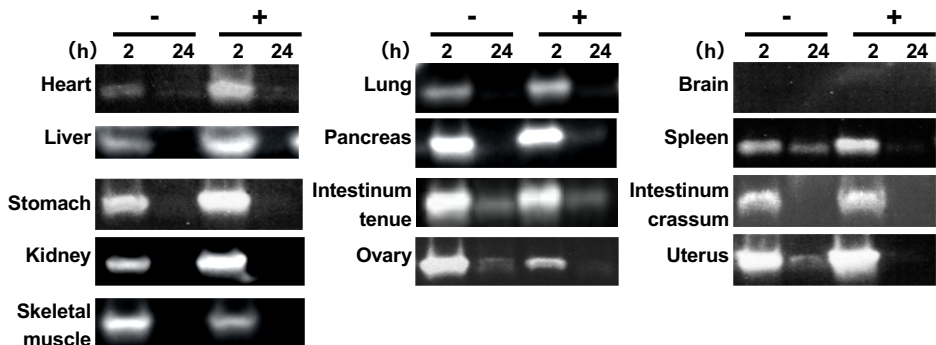


図5 Pas2r12 による EGFP の臓器分布 Pas2r12 と EGFP の複合体をマウスに腹腔内投与し、2 時間後または 24 時間後に臓器を抽出し、ウェスタンブロッティングにより EGFP を検出 (EGFP のみ (-) , Pas2r12 + EGFP (+))

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akiko Okuda, Shinya Tahara, Hisaaki Hirose, Toshihide Takeuchi, Ikuhiko Nakase, Atsushi Ono, Masanori Takehashi, Seigo Tanaka, and Shiroh Futaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Oligoarginine-bearing tandem repeat penetration-accelerating sequence delivers protein to cytosol via caveolae-mediated endocytosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 1849-1859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biomac.8b01299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小野敦、田原慎也、奥田明子
2. 発表標題 改変型膜透過ペプチドによる抗体のサイトゾル導入に関する検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（横浜）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田原慎也、奥田明子、竹橋正則、田中静吾、二木史朗
2. 発表標題 改変型膜透過ペプチドによるEGFPのサイトゾル導入にエンドサイトーシス阻害剤が与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（金沢）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田原慎也、小野敦、奥田明子
2. 発表標題 改変型膜透過ペプチドによるEGFPのサイトゾル導入にCaveolin-1の過剰発現が与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Okuda
2. 発表標題 Dodeca-arginine-bearing tandem repeat penetration-accelerating sequence delivers protein to cytosol
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 meeting (Washington, DC, USA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥田明子、小川真史、佐藤玲樹、田原龍稀
2. 発表標題 サイトソル移行型膜透過ペプチドによるタンパク質導入 -生体への応用を目指して-
3. 学会等名 第30回生物試料分析科学会年次学術集会 (大阪)
4. 発表年 2020年

〔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	池主 雅臣  (Chinushi Masaomi)  (40303151)	新潟大学・医歯学系・教授   (13101)	
連携 研究者	二木 史朗  (Futaki Shiroh)  (50199402)	京都大学・化学研究所・教授   (14301)	