

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K20202
研究課題名(和文) 光に応答して可逆的自己凝集を示すペプチドを用いた光線力学療法の薬物送達担体の開発

研究課題名(英文) Development of drug delivery carriers for photodynamic therapy using peptides exhibiting photoresponsive reversible self-aggregation

研究代表者
巢山 慶太郎 (Suyama, Keitaro)
九州大学・基幹教育院・助教

研究者番号：60707222
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、天然アミノ酸を原料とすることで生分解性・生体適合性が高く、温度依存的可逆自己集合(コアセルベーション)特性を示すエラスチン由来の合成ペプチド・ELP (Elastin like peptide)を母体として、がん医療、特に、光線力学的療法に適用可能なペプチド性医療材料を開発することを目的とした。我々が以前報告した低分子で温度応答性を示すELPと、光に応答して構造変化を示す分子を組み合わせ、がん細胞への薬物送達能力と、光によるがん細胞傷害活性を合わせ持つELP誘導体の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光線力学療法は、侵襲性が非常に低い、腫瘍周辺の臓器機能の温存を可能とする先端治療法であり、麻酔を安全に施すことができない等の手術が困難な場合や、臓器温存が必要な場合に必要となる。一方で、ELPは生体や環境にやさしい生体分子素材であり、その温度依存的な自己集合特性を利用し、薬物輸送担体としての応用が期待されている。本研究では、温度と光で自己集合を制御可能な新しい薬物輸送担体を開発し、光線力学療法に適用可能な新しい生体分子素材の開発を目標として行った。

研究成果の概要(英文)：ELPs (elastin-like peptides) are synthetic peptide derived from elastin and possess excellent biodegradability and biocompatibility because they consist of natural amino acids. ELPs exhibit temperature-dependent reversible self-assembly (coacervation) characteristics. The aim of this study was to develop peptide-based biomaterials applicable to cancer therapy, especially photodynamic therapy. We have previously reported the ELPs that exhibits temperature responsiveness with small molecular weight. In this study, we attempted to develop the ELP analogs that combined with light-responsive cancer cell injury activity with the ability to deliver drugs to cancer cells by combining molecules that exhibit structural changes in response to light.

研究分野：生物化学

キーワード：エラスチン様ペプチド 温度応答性分子 光応答性分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法は、侵襲性が非常に低い、腫瘍周辺の臓器機能の温存を可能とする先端治療法であり、麻酔を安全に施すことができない等の手術が困難な場合や、臓器温存が必要な場合に必要となる。一方で、ELP (Elastin like peptide) は生体や環境にやさしい生体分子素材であり、その温度依存的な自己集合特性を利用し、薬物輸送担体としての応用が期待されている。そこで、光照射により瞬時に分子構造を切り替えることで自己集合能を変化させられる ELP を開発できれば、温度と光により薬物送達を制御可能な光線力学療法用の分子素材を開発可能であるという発想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、生分解性を持ち生体適合性が高い天然アミノ酸からなる温度依存的可逆自己集合 (コアセルベーション) 特性を示す合成ペプチド・ELP (Elastin like peptide) を母体として、光線力学的療法 (Photodynamic Therapy: PDT) に適用可能なペプチド性医療材料を開発することを目的とした。ELP は、そのコアセルベーション特性により凝集体を形成することで、腫瘍組織に薬剤を選択的に送達することが可能な素材である。これまでの研究で、我々は既存の ELP と比べて低分子量、低濃度で、さらに体温付近でコアセルベーションを起こす ELP を開発した。本研究では、これを用いて有効成分のがん組織・がん細胞への送達能力と、光によるがん細胞傷害活性をあわせ持つ ELP 誘導体を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 光応答性ペプチドの分子デザイン

合成が容易で温度・光応答性を示すエラスチンペプチドアナログのデザインを行った。ELP の自己集合能は疎水性および芳香族アミノ酸残基の数、鎖長等により変化するため、十分な水溶性と自己集合能を有する新規な配列を探索した。光応答性については、光照射によって可逆的にシス・トランス異性化するアゾベンゼン誘導体を ELP の繰り返し配列の間に任意の数だけ導入し、光照射によって分子構造が大きく、かつ鋭敏に変化するように設計した。また、ELP は直鎖ペプチドに加え、より高い自己集合能を示す環状および分枝状ペプチドも検討した。

(2) 光応答性ペプチドの合成

光応答性ペプチドは、ペプチド部分とアゾベンゼン部分に分割して合成し、これらを縮合させることにより合成した。ペプチド部分の合成には Fmoc 固相合成法を、アゾベンゼンの合成にはマイクロウェーブ法を用いて検討した。

(3) 光応答性ペプチドの機能評価

温度依存的自己凝集能の評価

合成したエラスチンペプチドアナログの温度依存的自己凝集能の評価は、ペプチド溶液の濁度変化を、温度調節機能付きセルを接続した分光光度計で追跡することで実施した。濁度変化曲線からその変化量の半分となる温度を T_t () として、凝集能の評価指標とした。

光応答性の評価

溶液中のペプチドの光照射による構造変化を、蛍光光度計および分光光度計によって検証した。まずアゾベンゼンに由来する特徴的な吸光波長を調べ、その波長の光を蛍光光度計で照射した後に、分光光度計でスペクトル変化を調べた。また、シス・トランス異性体の比率について超高速液体クロマトグラフィー質量分析装置 (UPLC-MS) により追跡した。

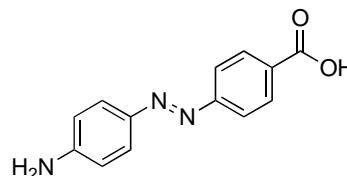
4. 研究成果

(1) 光応答性ペプチドの分子デザイン

ペプチド鎖部分について、より低分子で自己集合能を発揮するペプチドを得るため、配列の検討を行った。ELP の自己集合には、天然のエラスチンタンパク質に由来する Val-Pro-Gly-Val-Gly (VPGVG) のような繰り返し配列が重要である。本研究では、我々が開発した Phe-Pro-Gly-Val-Gly (FPGVG) の 5 回繰り返し配列・(FPGVG)₅ をベースとして複数の ELP アナログをデザインし、低濃度かつ室温付近で自己集合を示す ELP を探索した。その結果、(FPGVG)₅ の N 末端アミノ酸 1 残基のみを別のアミノ酸に置換することによって、自己集合能を劇的に変化させることができることが判明した。特に、芳香族アミノ酸への置換が自己集合能の向上にきわめて有効な方法であることが示された (論文投稿中)。加えて、(FPGVG) 配列の最後の Gly を削除した (FPGV) 配列は、(FPGVG) 配列よりも短い鎖長でより高い自己集合能を示すことが判明した。この結果は、エラスチンペプチドをバイオ素材としてより安価な調製コストで用いる上で重要な発見となった (論文投稿中)。

(2)光応答性ペプチドの合成

光応答性ペプチドは、(FPGVG)配列および(FPGV)配列の繰り返し間にアゾベンゼンを組み込むことにより合成した。合成に用いるアゾベンゼンは、4-アミノフェニルアゾ安息香酸を用いた。これは、二つの芳香環のそれぞれにアミノ基とカルボキシル基を一つずつ有するため、アミノ酸の伸長反応に用



4-アミノフェニルアゾ安息香酸

いる固相合成法でペプチドに組み込むことが可能である。そこで、(FPGVG)₂ および(FPGV)₂ の短鎖ペプチドフラグメントを固相合成法により合成しておき、これを 4-アミノフェニルアゾ安息香酸にフラグメント縮合で導入することにより数種類のアナログを合成した。加えて、導入したフラグメントの N 末端と C 末端を縮合させることで、より高い自己集合能が期待される環状化ペプチドの合成も行った。

(3)光応答性ペプチドの機能評価

温度依存的自己凝集能の評価

2 分子の(FPGVG)₂ と 4-アミノフェニルアゾ安息香酸(Azob)を組み合わせたペプチド F2-Azob-F2 について、純水中に溶解させた水溶液を調製し、ペプチド溶液の温度依存的自己集合に伴う濁度変化を分光光度計で追跡した。F2-Azob-F2 は、分子サイズとしては(FPGVG)₅ と対応するサイズである。(FPGVG)₅ は純水中で自己集合を示すのに 30 mg/mL 程度の濃度を必要とし、その相転移温度は 35°C 付近であったが、F2-Azob-F2 は 1.0 mg/mL 以下の温度で相転移温度が 10°C 以下であり、自己集合能が著しく向上していることが明らかとなった。一方、F2-Azob-F2 の N 末端と C 末端を縮合させた環状ペプチド・cyclo[F4-Azob]は、極めて疎水性が高く、水にほぼ不溶であった。同様に、(FPGV)₂ と 4-アミノフェニルアゾ安息香酸を組み合わせた F'2-Azob-F'2 も難溶性であったため、より短い配列である F'1-Azob-F'1 を用いた検証を行った。この検証にあたり、アゾベンゼン部分の構造がエラスチン繰り返し配列中の構造変化に重要な Pro-Gly と同様の構造を取りうるということが明らかとなったため、Phe-Azob-Val といった配列を新たに組み込み、これらが高い自己集合能を有することを明らかにした。

光応答性の評価

合成したアナログのアゾベンゼン部分に由来する光応答性について、蛍光光度計および分光光度計を用いた検証を行った。4-アミノフェニルアゾ安息香酸の 100 μM の水溶液を調製し、吸光スペクトル測定を行ったところ、波長 258 nm, 386 nm において吸光ピークを示した。蛍光光度計を用いてそれぞれの吸光波長、特に trans 体から cis 体への構造変化を誘起する紫外光 258 nm の波長における光照射を行い、直後に吸光スペクトル測定を実施したが、大きなスペクトルの変化は見られなかった。これは、ペプチドと縮合していないアゾベンゼンの cis-trans 異性化が極めて速く、紫外光で励起しても熱平衡により速やかに trans 体に戻ってしまうためと考えられた。一方、F2-Azob-F2 で同様の実験を行ったところ、吸光ピークは 246 nm および 364 nm と短波長側にシフトしていた。スペクトル分析では大きな変化が見られなかったものの、UPLC-MS ではこのペプチドに由来するピークが 2 つ検出され、それぞれ cis 体、trans 体と同定された。また、この比率が光照射により変化していることから、光照射を用いてペプチドの自己集合能を制御可能であることが示唆された。

(4)光応答性ペプチドを用いた細胞障害活性の検討について

合成した光感受性 ELP に、テトラフェニルポルフィリン P(V)錯体を組み合わせ、光応答性ペプチド凝集体を調製することを試みた。この錯体は、光照射により励起するとがん細胞内での活性酸素生成を促進して細胞の壊死・アポトーシスを誘導し、また、錯体自体も強い酸化力を発揮して細胞中のタンパク質のアミノ酸(特に、チロシン、トリプトファン)を酸化することでがん細胞中の生体分子を損傷するため、血流量が少なく低酸素状態のがん細胞に対しても効果的に傷害活性を発揮できると期待された。ポルフィリン錯体と光感受性 ELP を水溶液中に共溶解した後昇温し、生じた凝集体をゲルろ過クロマトグラフィーで精製を行ったが、ELP が非常に低濃度であったため検出が困難であり、現在も検証を行っている。また、この凝集体を培養がん細胞(HeLa, MCF-7 等)に投与し、光照射・非照射下における細胞傷害活性の有無について、MTT 試験、LDH 放出試験により検討するため、細胞系の構築を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suyama Keitaro, Mawatari Mika, Tatsubo Daiki, Maeda Iori, Nose Takeru	4. 巻 6
2. 論文標題 Simple Regulation of the Self-Assembling Ability by Multimerization of Elastin-Derived Peptide (FPGVG) _n Using Nitrilotriacetic Acid as a Building Block	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 5705 ~ 5716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c06140	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 Liu Xiaohui, Suyama Keitaro, Nose Takeru, Shimohigashi Miki, Shimohigashi Yasuyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Bisphenol-C is the strongest bifunctional ER -agonist and ER -antagonist due to magnified halogen bonding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246583	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 Iwasaki Wataru, Kataoka Chiwa, Sawadaishi Kazuyuki, Suyama Keitaro, Morita Nobutomo, Miyazaki Masaya	4. 巻 20
2. 論文標題 A Simple, Low Cost, Sensitive, and Portable Electrochemical Immunochromatography Sensing Device to Measure Estrone-3-Sulfate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 4781 ~ 4781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s20174781	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 Suyama Keitaro, Shimizu Marin, Maeda Iori, Nose Takeru	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of Pheresidues in elastin-like peptide (FPGVG) ₅ on self-assembly properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptide Science 2021	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Sumiyoshi Shogo, Suyama Keitaro, Nose Takeru	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of self-aggregating elastin-like peptide analogs with a metal-binding sequence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptide Science 2021	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Maeda Iori, Taniguchi Suguru, Moriuchi Yumi, Sawa Naruhiko, Inoue Asako, Usa Tomoyuki, Watanabe Noriko, Suyama Keitaro, Nose Takeru	4. 巻 -
2. 論文標題 Fractionation of water-soluble elastin from pigaorta by coacervation method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptide Science 2021	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Tagawa Koki, Suyama Keitaro, Kesamaru Hitoshi, Masuya Takahiro, Nose Takeru, Matsushima Ayami	4. 巻 -
2. 論文標題 Design and synthesis of a universal coactivator peptide binding to the estrogen receptor and NURR1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptide Science 2021	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Sumiyoshi Shogo, Suyama Keitaro, Tatsubo Daiki, Tanaka Naoki, Tomohara Keisuke, Taniguchi Suguru, Maeda Iori, Nose Takeru	4. 巻 12
2. 論文標題 Metal ion scavenging activity of elastin-like peptide analogues containing a cadmium ion binding sequence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05695-w	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 Iwamoto Masaki, Masuya Takahiro, Hosose Mari, Tagawa Koki, Ishibashi Tomoka, Suyama Keitaro, Nose Takeru, Yoshihara Eiji, Downes Michael, Evans Ronald M., Matsushima Ayami	4. 巻 297
2. 論文標題 Bisphenol A derivatives act as novel coactivator-binding inhibitors for estrogen receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101173 ~ 101173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101173	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 Suyama Keitaro, Sumiyoshi Shogo, Tanaka Naoki, Ando Takumi, Nagata Akihiko, Tomohara Keisuke, Taniguchi Suguru, Maeda Iori, Nose Takeru	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of temperature-responsive short-chain peptide analogues based on elastin-like peptide FPGVG	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptide Science 2021	6. 最初と最後の頁 141 ~ 142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Tanaka Naoki, Suyama Keitaro, Tomohara Keisuke, Maeda Iori, Nose Takeru	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of temperature-responsive peptides by EDTA-mediated multimerization of short (FPGVG) _n chains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptide Science 2021	6. 最初と最後の頁 83 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 巢山慶太郎、清水真凜、谷口 卓、前田衣織、野瀬 健
2. 発表標題 温度応答性ペプチド・(FPGVG) ₅ のフェニルアラニン残基置換による自己集合特性への影響
3. 学会等名 令和2年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suyama Keitaro, Shimizu Marin, Maeda Iori, Nose Takeru
2. 発表標題 Role of Pheresidues in elastin-like peptide (FPGVG) ₅ on self-assembly properties
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sumiyoshi Shogo, Suyama Keitaro, Nose Takeru
2. 発表標題 Development of self-aggregating elastin-like peptide analogs with a metal-binding sequence
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Maeda Iori, Taniguchi Suguru, Moriuchi Yumi, Sawa Naruhiko, Inoue Asako, Usa Tomoyuki, Watanabe Noriko, Suyama Keitaro, Nose Takeru
2. 発表標題 Fractionation of water-soluble elastin from pigaorta by coacervation method
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tagawa Koki, Suyama Keitaro, Kesamaru Hitoshi, Masuya Takahiro, Nose Takeru, Matsushima Ayami
2. 発表標題 Design and synthesis of a universal coactivator peptide binding to the estrogen receptor and NURR1
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 巢山慶太郎
2. 発表標題 エラスチンのアミノ酸配列を母体とした温度応答性ペプチド・(FPGVG) _n アナログの自己集合能と分子構造に関する研究
3. 学会等名 令和3年度日本生化学会九州支部例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中尚輝、住吉勝伍、巢山慶太郎、友原啓介、前田衣織、野瀬 健
2. 発表標題 金属結合性配列を導入した短鎖エラスチン様ペプチドアナログの金属結合性
3. 学会等名 令和3年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本雅輝、巢山慶太郎、野瀬 健、松島綾美
2. 発表標題 有害環境化学物質ビスフェノールC構造に基づく新規なエストロゲン受容体阻害剤
3. 学会等名 令和3年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 巢山慶太郎、馬渡弥佳、前田衣織、野瀬 健
2. 発表標題 短鎖エラスチン由来ペプチド(FPGVG) _n の多量体化による温度応答性を有する機能性分子素材の開発
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本雅輝、巢山慶太郎、野瀬 健、松島綾美
2. 発表標題 ビスフェノール構造に基づくエストロゲン受容体の新規アンタゴニストの系統的合成
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keitaro Suyama, Shogo Sumiyoshi, Naoki Tanaka, Takumi Ando, Akihiko Nagata, Keisuke Tomohara, Suguru Taniguchi, Iori Maeda, Takeru Nose
2. 発表標題 Development of temperature-responsive short-chain peptide analogues based on elastin-like peptide FPGVG
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Tanaka, Keitaro Suyama, Keisuke Tomohara, Iori Maeda, Takeru Nose
2. 発表標題 Development of temperature-responsive peptides by EDTA-mediated multimerization of short (FPGVG) n chains
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------