

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390038

研究課題名（和文） 細胞選択的導入ペプチドを用いた疾患治療戦略

 研究課題名（英文） Strategy for treatment of diseases
by cell type specific invasive peptides

研究代表者

松下 正之（MATSUSHITA MASAYUKI）

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30273965

研究成果の概要（和文）：ランダムペプチドライブラリーをソースとしてヒト各種がん細胞を対象とした広汎なスクリーニングを行うことにより、このライブラリー中から標的とする細胞の系統別に対応して高浸透能を発揮する新規細胞侵入ペプチドを分離する技術を確認した。

研究成果の概要（英文）：We identify novel cell penetrating peptides (CPPs) that are selectively and efficiently incorporated into human tumor cells according to their lineage. Thus, we established the novel technology that isolation of tumor lineage-homing CPPs from a random peptide library generated by mRNA display method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：ペプチド、癌、イメージング、先進医療

1. 研究開始当初の背景

先進医療としての標的治療は、ウイルスを用いた遺伝子治療、低分子化合物、抗体医薬、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。本計画は、私たちが長年に渡り研究開発を行ってきた細胞内導入ペプチド（J. Neurosci 21: 6000-6007, 2001; Nat Med 10: 305-309, 2004）を応用展開した細胞選択的導

入システムによって、この難問を解決し、我が国発信の先進医療技術の開発に貢献することを目的としています。

2. 研究の目的

私たちの開発したタンパク質導入法は、11 個のアルギニン(11R)からなるペプチドを目的のタンパク質に融合する事により、すべての細胞へ *in vivo* 導入できる方法です。ウイルスと違い、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、iPS 細胞作製や幹細胞分化技術への応用が急速に広まっています。この 11R ペプチドは、全ての細胞に導入されるため、目的の細胞にのみ選択的に導入可能な技術を長年にわたり研究し、その開発に成功しました。

本申請研究は“細胞選択的な導入システム”の確立による先進医療のための基盤技術を提供することを目的としています。

3. 研究の方法

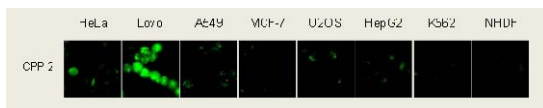
(1) ランダムペプチドライブラリー (研究計画にて詳細に記述) からの“細胞選択的導入能を発揮する導入ペプチド(Protein Transduction Domain: PTD)”の分離。先行研究で、15残基ランダムアミノ酸配列をコードするペプチドライブラリー群に対して、正常繊維芽細胞、癌などの疾患関連細胞株を用いた細胞導入アッセイによるスクリーニングを行い、従来汎用されている TAT や 11R などに比較して、より選択性を持った細胞内導入を発揮する PTD ペプチドを分離できています。このスクリーニング法を各種初代培養細胞を含めた広範な細胞種に適用し細胞選択的導入ペプチドを発見した。

(2) 既に得られている新規 PTD 約 50 種類ほどについて、その配列内に 1~2 アミノ酸変異を導入し、細胞浸透性能の増強や選択的細胞透過能の有無を検討した。※ これまでの研究結果から、1 残基アミノ酸置換によって、従来の PTD ペプチドが有していた透過性と細胞親和性を大きく変化させることが判明しています。多種類のヒト細胞培養パネル (がん細胞株、肉腫細胞株、血球系腫瘍細胞株、各種初代培養正常細胞: 計 30 種類程度含むもの) を用意し、各々について細胞透過アッセイを再度実施します。以上の段階を経由して、各種細胞に選択的・特異的透過能を発揮する PTD ペプチドを見出した。

(3) 細胞選択的透過性 PTD の応用技術の開発を行った。過去 2 年間の研究成果で得られた細胞選択的導入ペプチドの応用技術を確認するための研究ステップで、がん細胞選択的導入ペプチドによる制癌技術の開発を行った。

4. 研究成果

(1) 癌選択的侵入ペプチド 10 種類を発見。下記に示す大腸癌に特異的に侵入する蛍光ペプチド CPP2 のように、添付の論文で示した 10 種類の癌種特異的に侵入するペプチドを発見し、国際特許出願を行った。



(2) 蛍光ペプチドによる腫瘍イメージング。腫瘍選択的侵入ペプチドの生体応用例として、急性骨髄性白血病の腹膜播種モデルで白い矢印で示すような微小転移巣の描出を可

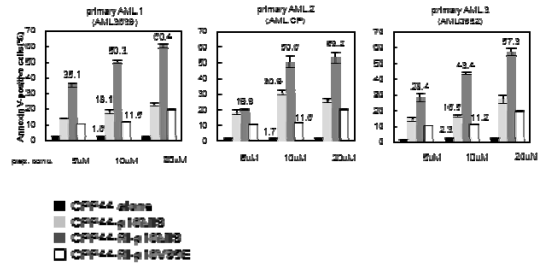
能とする蛍光ペプチドプローブの開発に成



功した。

(3) 細胞での治療効果

白血病の初代培養細胞で特異的侵入ペプチドに癌抑制ペプチド (p16INK4a) を融合した治療用人工ペプチドを開発し、その投与により細胞レベルで増殖抑制効果を認めた。



CPP44: 導入ペプチドのみ

CPP44-p16MIS: 導入ペプチドとがん抑制ペプチドの融合ペプチド

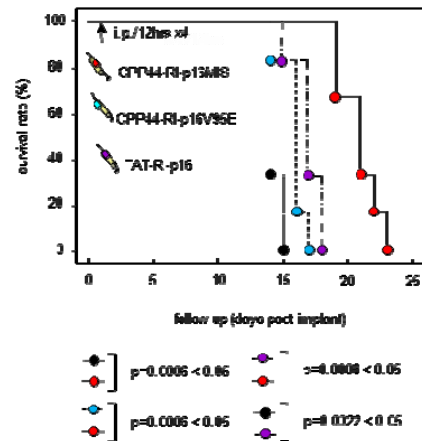
CPP44-RI-p16MIS: 導入ペプチドと光学異性体のがん抑制ペプチドの融合ペプチド

CPP44-RI-p16VMISE: 導入ペプチドと機能しないがん抑制ペプチドの融合ペプチド

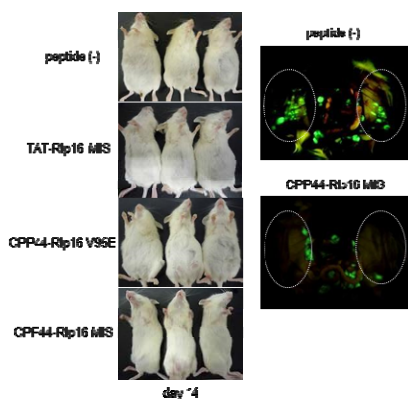
縦軸はアネキシン V によるアポトーシス細胞数を示している。CPP44-RI-p16MIS ペプチドが最も強い細胞死誘導効果を認めた。さらに、点変異を導入した機能しないペプチドを細胞に加えても細胞死は誘導しなかった。

(4) マウス腫瘍モデルでの治療効果

担癌モデルマウスで特異的侵入ペプチドに癌抑制ペプチド (p16INK4a) を融合した治療用人工ペプチドを投与し、下図のような CPP44-RI-p16MIS ペプチドにおいて副作用のない有意な延命効果を認めた。

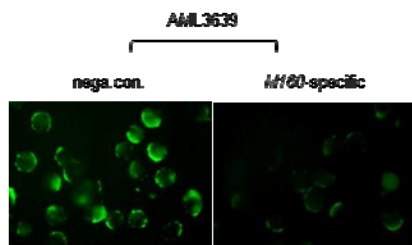


本実験では、腫瘍細胞には GFP の蛍光タンパク質が恒常的に発現しているため、このペプチド投与治療を行ったマウスの腫瘍細胞を蛍光下で観察すると CPP44-RI-p16MIS で治療したマウスでは腫瘍細胞の明らかな減少が認められた。

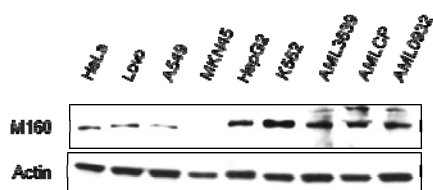


(5) 癌特異的侵入ペプチドの選択的侵入メカニズム解明

ペプチドの選択的侵入に関与する標的遺伝子を RNAi ライブラリーを用いたスクリーニングにより発見した。下図に示すように M160 遺伝子を RNAi によりノックダウンした細胞では蛍光ペプチドの取り込みが有意に低下していた。



さらに、p160 が癌種選択的に発現増加していることを見いだした。CPP44 の導入効率の高い AML 細胞には発現が高く、導入効率の低い Hela 細胞などでは発現が低いことが下図のウェスタンブロットによる p160 の発現比較より明らかである。この成果は、癌の新たな増殖メカニズムや標的治療への応用が期待される成果である。



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 Kondo E, Saito K, Tashiro Y, Kamide K, Uno S, Furuya T, Mashita M, Nakajima K, Tsumuraya T, Kobayashi N, Nishibori M, Tanimoto M, Matsushita M. Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems. *Nature Communications* 3 : 951 (2012) doi: 10.1038/ncomms1952 査読あり
- ② Kaitsuka T, Tomizawa K, Matsushita M. Transformation of eEF1Bdelta into heat shock response transcription factor by alternative splicing. *EMBO reports* 12: 673-681(2011) doi: 10.1038/embor.2011.82. 査読あり
- ③ Saito K, Kondo E, Matsushita M. MicroRNA 130 Family Regulates the Hypoxia Response Signal through the P-body Protein DDX6. *Nucleic Acids Research* 39: 6086-6099(2011) doi: 10.1093/nar/gkr194 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

- ① シンポジウム: 松下正之 「細胞選択的侵入ペプチドによる疾患治療戦略」
第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会全国学術集会合同大会
2011 年 3 月 28 日 横浜 (東日本大震災のため誌上発表)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 癌細胞選択的膜透過性ペプチドおよびその利用

発明者: 松下正之、近藤英作

権利者: 三菱化学、愛知県

種類: 国際出願

番号: PCT/JP2011/058616

出願年月日: 2011 年 4 月 5 日

国内外の別: 国外

○特許取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://ryukyu-physiology.info/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 正之 (MATSUSHITA MASAYUKI)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30273965

(2) 研究分担者

中村 真理子 (NAKAMURA MARIKO)
琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40180400

砂川 昌範 (SUNAGAWA MASANORI)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70325835

(3) 連携研究者

近藤 英作 (KONDO EISAKU)
愛知県がんセンター研究所・腫瘍病理部
部長
研究者番号：30252951