

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24年5月14日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659112

研究課題名（和文） コラーゲン様3重らせんペプチドの動態特性を利用した新規ドラッグキャリアの開発

研究課題名（英文） A novel drug carrier based on the collagen-like triple-helical peptide

研究代表者

小出 隆規（KOIDE TAKAKI）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：70322253

研究成果の概要（和文）：化学合成した3重らせんペプチドの、マウスあるいはラットにおける体内動態を解析した。その結果、3重らせん構造がプロテアーゼによる分解に強く抵抗することが分かった。また、コラーゲン様3重らせんペプチドは、未変化体として高い尿排泄性を示した。これらのことから、コラーゲン様3重らせんペプチドが、新しいタイプのドラッグデリバリーシステム（DDS）用キャリアー分子として応用可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The pharmacokinetics of synthetic collagen-like triple-helical peptides in mice and rats were investigated. The peptides were found to be stable in the bloodstream and efficiently excreted in urine as the intact forms. The triple-helical peptides were shown to have a potential to be utilized as novel-type drug carriers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	300,000	3,000,000

研究分野：蛋白質化学・生化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ドラッグデリバリー、コラーゲン、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

これまでコラーゲンペプチドの研究を行ってきた小出（研究代表者）と、薬物動態を専門とする安井（分担者）は、静脈注射したコラーゲン様3重らせんペプチドが、ペプチド性分子としては非常に長い血中半減期（10～12時間）と低い組織移行性（おそらく血小板に結合して血液部に分布していると考えられる）を示すという、これまでのペプチド性分子には見られなかった新知見を

得た。

不溶性コラーゲンのバイオマテリアルとしての利用は国内外で数多く知られているが、可溶性のコラーゲン様3重らせんペプチドを薬物として利用する研究はこれまでになかった。

2. 研究の目的

本研究は、コラーゲン様3重らせん構造を特徴とする化学合成ペプチドを、新しいタイ

ブのドラッグデリバリーシステム (DDS) 用キャリアー分子として利用することを目指して行った。この研究は、コラーゲン様 3 重らせん型ペプチドの、①プロテアーゼによる消化分解に対する抵抗性、②低い免疫原性による高い安全性、③アミド結合を介した機能性分子・薬物のコンジュゲート化といった汎用性に着目した萌芽的な薬学研究である。

本課題においては、独自にデザイン・化学合成した 3 重らせん型ペプチドを、ラットおよびマウスに投与し、その体内での安定性および吸収・分布・代謝・排泄といった体内動態に関する基礎的情報を収集することとした。さらに、機能性や薬効を付与したペプチドをデザイン・合成して、その医療応用へのポテンシャルを探った。

3. 研究の方法

(1) ペプチドの合成、精製、構造確認、およびコンフォメーション

ペプチドは Fmoc 型固相法により合成し、逆相 HPLC により精製後、MALDI-TOF 型質量分析計により目的物の構造であることを確認した。また円偏光二色性スペクトルをもちいて体温 (37°C) におけるペプチドのコンフォメーションを確認した。低分子薬物とのコンジュゲート化体についても、同様の構造確認およびコンフォメーションの確認を行った。

(2) 投与および生体サンプルの採取

健常マウスあるいはラットに経静脈的にペプチドを投与し、採尿ケージを用いて一定時間蓄尿した。また、必要に応じて血液を採取した。

(3) 生体サンプルからのペプチドの定量

尿中ペプチドの定量は、 ^{18}O あるいは ^{14}N にて安定同位体標識したペプチドを内部標準として用い MALDI-TOF 型質量分析計により行った。血液中のペプチドは、遠心分離して得た血漿を除タンパク後に HPLC-UV 法により定量した。また、蛍光基あるいはスピンプローブとペプチドとのコンジュゲート化体については、それぞれ HPLC-蛍光法および X-band 電子スピン共鳴 (ESR) 装置をもちいて定量した。

4. 研究成果

(1) コラーゲン様ペプチドが高い尿排泄性を示すための構造要件

体温でランダムコイル構造である (Pro-Pro-Gly)₁₀ および (Pro-Hyp-Gly)₅ をラットに経静脈投与した場合、未変化体は尿中から検出されなかった。一方、体温で 3 重らせん構造をとる (Pro-Hyp-Gly)₁₀ は、ほぼ定量的に尿中に未変化体として排泄されるが、この高い尿排泄性は、(Pro-Hyp-Gly)₁₀ 中の 1 つの Pro あるいは Hyp 残基をそれぞれ Asp およ

び Arg 残基に置換したペプチドにおいても保持された。また、同様のペプチドの C 末端をアミド化しても、その尿排泄性にはほとんど影響を及ぼさなかった。これらのことから、各鎖 30-mer 程度の 3 重らせんペプチドの尿排泄性は、軽微な正・負電荷の付与および末端の化学修飾により大きく変化しないことが明らかとなった (表および図 1)。

また、ヒト血清中での *in vitro* 安定性の試験から、コラーゲン様 3 重らせん構造を持つペプチドがプロテアーゼによる消化に強く抵抗することが分かった (半減期 > 1 日、図 2)。

表 種々のコラーゲン様ペプチドの構造と体温でのコンフォメーション

name	sequence	conformation @37°C
POG5	(POG) ₅	random coil
PPG10	(PPG) ₁₀	random coil
POG10	(POG) ₁₀	triple helical
PRG	(POG) ₄ PRG(POG) ₅	triple helical
DOG	(POG) ₄ DOG(POG) ₅	triple helical
POG10-amide	(POG) ₁₀ -amide	triple helical
PRG-amide	(POG) ₄ PRG(POG) ₅ -amide	triple helical
DOG-amide	(POG) ₄ DOG(POG) ₅ -amide	triple helical

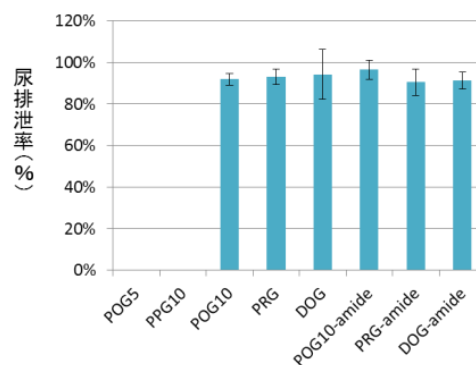


図 1 種々のコラーゲン様ペプチドの尿排泄率 (20 ug/ラット, 24 hr 蓄尿)

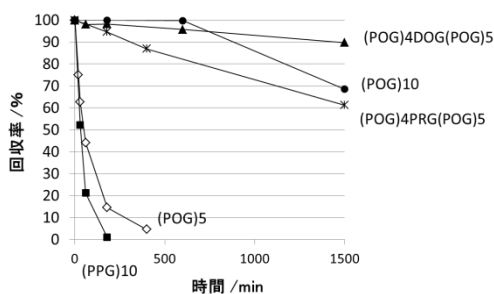


図 2 コラーゲン様ペプチドのヒト血清中の安定性

(2) コラーゲン様ペプチドとのコンジュゲート化による低分子量モデル薬物の動態特性の改変

スピンプローブとして用いられる Proxyl をモデル薬物として、コラーゲン様 3 重らせ

んペプチドの薬物担体としての応用可能性について検討した。マウスに経静脈投与した低分子量の Carbamoyl-proxyl の尿排泄率は10%以下であった。一方、コラーゲン様3重らせんペプチドとコンジュゲート化した Proxyl は、ほぼ定量的に尿中に排泄された。この効果はペプチドの3重らせん構造依存的であり、体温でランダムコイル構造であるペプチドとコンジュゲートした場合には、Proxyl は高い尿排泄率を獲得しえなかった(図3)。

また、蛍光物質であるフルオレセインをコンジュゲートした場合にも、同様の傾向が観察された。以上のことから、コラーゲン様3重らせんペプチドは、単体では組織移行性の高い低分子量薬物の動態特性を、血液指向性、高尿排泄性へと変化させうる薬物担体として利用可能であると考察された。

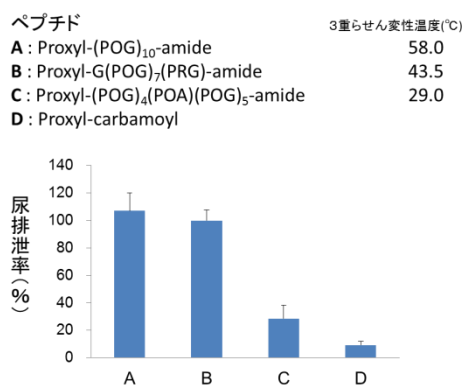


図3 コラーゲン様ペプチドの付加による低分子量モデル薬物 Proxyl の高尿排泄性の獲得 (5 nmol/マウス, 6 hr 蓄尿)

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6件)

- ① 小出隆規, コラーゲン三重らせんペプチドのデザイン、合成と応用、遺伝子医学 MOOK 21、査読無、2012、pp. 217-222
- ② S. Matsui, C. M. Yamazaki, T. Koide, Surface-modifiable free-floating films formed by multiway connection of collagen-like triple-helical peptides, Macromol. Rapid Commun., 査読有, in press
- ③ A. Sekiya, S. Oishi, N. Fujii, T. Koide, High-throughput turbidimetric screening for heparin-neutralizing agents and low-molecular-weight heparin mimetics, Chem. Pharm. Bull., 査読有, 60(3), 2012, pp. 371-376 (2012)
- ④ A. Sekiya, H. Okano-Kosugi, C. M.

Yamazaki, T. Koide, Identification of angiogenic regulatory domains of fibril-forming collagens using fibril-forming collagen-like triple helical peptides, Peptide Science 2011, 査読有, 2012, pp. 29-32

- ⑤ 関谷敦志, 小出隆規, コラーゲン結合性多機能 SERPIN、色素上皮由来因子 (PEDF) の構造-機能相関、酵素工学ニュース、査読無、66、2011、pp. 20-24
- ⑥ A. Sekiya, H. Okano-Kosugi, C. M. Yamazaki, T. Koide, Pigment epithelium-derived factor (PEDF) shares binding sites in collagen with heparin/heparan sulfate proteoglycans, J. Biol. Chem., 査読有, 286, 2011, pp. 26364-26374 (2011)

[学会発表] (計7件)

- ① 全田未悠, コラーゲンの細線維形成を阻害するプラチナ錯体の作用機構の解析 薬学会第132年会、2012年3月31日、北海道
- ② 小出隆規, コラーゲン3重らせんを模倣するペプチドの創薬およびバイオマテリアルへの応用、薬学会第132年会、2012年3月30日、北海道
- ③ 関谷敦志, コラーゲンの線維形成を利用した新規ヘパリン/ヘパラン硫酸阻害剤探索法の開発、薬学会第132年会、2012年3月30日、北海道
- ④ 小出隆規, Design, synthesis, and biomedical applications of collagen-mimetic triple-helical peptides、第14回ペプチドフォーラム、2011年12月16日、鹿児島
- ⑤ Takaki Koide, A facile high-throughput screening to obtain inhibitors of various collagen-binding macromolecules, The 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011年11月29日~12月2日、東京
- ⑥ 関谷敦志, コラーゲン様3重らせんペプチドを用いた線維形成型コラーゲンの血管新生調節ドメインの同定、第48回ペプチド討論会、2011年9月27日、北海道
- ⑦ 全田未悠, コラーゲン線維形成を阻害するプラチナ錯体の発見とその作用機構の解析、第58回マトリックス研究会 合同学術集会、2011年6月10日、大分

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: コラーゲン様ペプチドからなる薬物担体

発明者：小出隆規、山崎ちさと、安井裕之、
高尾敏文、栗田ちひろ
権利者：早稲田大学
種類：特許
番号：2012-011029
出願年月日：2012年1月23日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.waseda.ac.jp/koide/>

[http://www.kyoto-phu.ac.jp/labo/taisya/
index.html](http://www.kyoto-phu.ac.jp/labo/taisya/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 隆規 (KOIDE TAKAKI)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：70322253

(2) 研究分担者

安井 裕之 (YASUI HIROYUKI)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：20278443

(3) 連携研究者

高尾 敏文 (TAKAO TOSHIFUMI)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：10197048