

平成30年 5月25日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15162

研究課題名(和文)新規小腸透過ペプチドの透過分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of permeable mechanism of new intestinal permeable peptide

研究代表者

大槻 純男(OHTSUKI, Sumio)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：60323036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高分子医薬品の開発には高分子の小腸透過を可能とするキャリアの実現が望まれている。独自に同定した小腸透過を促進する新規環状ペプチドを用い、本研究では、環状ペプチドの小腸透過の特性と機構の解明を目的とした。Caco-2細胞及びマウス小腸closed loop両方においてファージの透過は合成ペプチドによって阻害された。また、蛍光標識環状ペプチドがCaco-2細胞内に取り込まれ、その取り込みはエネルギー依存性の担体が介在し、マクロピノサイトーシスが関わることを示唆した。加えて、小腸透過促進には環状構造が必要なこと、また小腸透過環状ペプチドは密着結合を弱めず小腸上皮細胞への毒性が低いことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to develop macromolecular drugs, it has been desired to realize carriers that allow macromolecule to permeate the small intestine. Using a newly identified cyclic peptide that promotes penetration of the small intestine, the purpose of this study was to elucidate the characteristics and mechanism of cyclic peptide permeation through the small intestine. Phage penetration was inhibited by synthetic peptides in both Caco-2 cells and mouse small intestine closed loop. In addition, it was suggested that the fluorescence labeled cyclic peptide was internalized into Caco-2 cells and its internalization was mediated by energy-dependent process, and macro-pinocytosis was involved. In addition, it was revealed that cyclic structure is necessary for promoting the penetration, and that small the cyclic peptides do not weaken tight junctions and have low toxicity to small intestinal epithelial cells.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：環状ペプチド 小腸透過 Caco-2細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、ペプチド製剤やタンパク質製剤等の高分子医薬品の開発が盛んに行われており、現在 40 種類以上の高分子医薬品が発売されている。また、臨床試験段階のものを含めると 670 種類以上にも及ぶ。しかし、高分子医薬品は消化管内において酵素分解を受け、小腸において吸収されないため、バイオアベイラビリティが低いことが大きな課題である。従って、高分子医薬品の小腸吸収性を向上させる技術として、分解の抑制に加え、高分子の小腸透過を可能とするキャリアの開発が必須である。

高分子医薬品の小腸透過キャリアとして膜透過ペプチドが注目されている。これまでに膜透過ペプチドである penetratin を用いて insulin や IFN- β のバイオアベイラビリティが上昇したことが報告されている (Khafagy et al. 2009, Nielsen et al. 2014)。Penetratin をはじめとした膜透過ペプチドは arginine を主とする塩基性アミノ酸を多く含み、エネルギー非依存的機構が膜透過に関わっていることが報告されている。これまでの研究は、同様の性質を有する膜透過ペプチドを用いて行われていること、また膜透過ペプチドは細胞へ入る過程を促進することから、バイオアベイラビリティ向上と応用性に限界があった。したがって、小腸上皮細胞の“透過”を促進する中高分子に適用可能な新規キャリアの開発が望まれている。

このようなニーズの元、研究代表者はヒト小腸上皮細胞モデル細胞である Caco-2 細胞の細胞透過系と環状ペプチドを提示するファージディスプレイを利用し、ファージの Caco-2 細胞を透過を促進する環状ペプチド (cDNP ペプチド) を同定した (Yamaguchi et al. 2017)。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者が新規に同定した小腸上皮細胞を透過する環状ペプチドの小腸透過特性と機構を解明することによって、これまでとは異なる透過機構による高分子の小腸透過技術の開発に挑戦することを目的とする。

本環状ペプチドは塩基性アミノ酸を含まない 7 アミノ酸から構成される小型環状ペプチドであるため、新規の機構で小腸上皮細胞を横切ることが予想される。さらに巨大分子の小腸透過を可能とする特徴がある。この小腸透過の特性及び透過に関わる新規分子機構を明らかにすることは、本環状ペプチドを小腸透過キャリアとして応用するために必須であることに加え、能動的な小腸透過速度の制御や、受容体側からすぐれた小腸透過キャリアの設計が可能となり、新規小腸透過技術として関連領域に大きな影響を与えることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞透過実験 (図 1、2)

Caco-2 細胞もしくは hCMEC/D3 細胞を transwell 上に播種し、培養する。透過実験に先立って経上皮細胞電気抵抗値 (TEER) を測定し、密着結合の形成を確認する。Transwell 上部にファージもしくはペプチドを添加し、下部から回収されるファージもしくはペプチド量を測定することによって細胞透過活性を測定する。

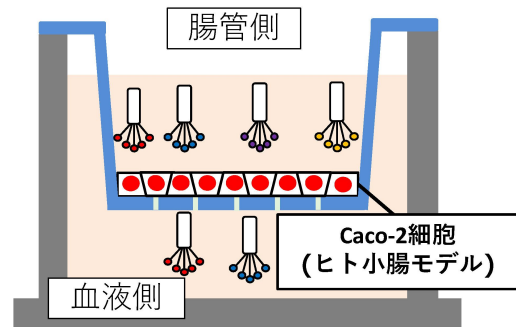


図 1 Transwell を用いた細胞透過実験

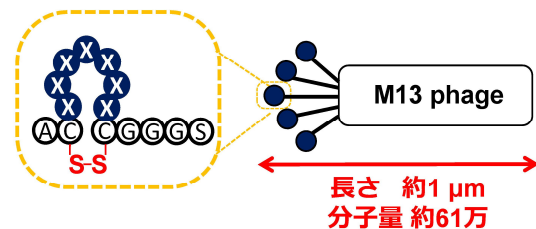


図 2 環状ペプチドを提示するファージ

(2) In vivo 小腸透過実験

In vivo における小腸透過能の測定はマウス小腸の in situ closed loop 法によって行った。ICR マウスの小腸を結紮することによって closed loop を作成し、ファージもしくはペプチドを投与した。門脈から採血し、小腸を透過し血液に移行したファージもしくはペプチドを計測した。

4. 研究成果

(1) 小腸透過環状ペプチドの Caco-2 細胞透過特性の検討

小腸透過環状ペプチドを提示するファージが環状ペプチドを介して小腸を透過しているか確認するために、透過に対する合成環状ペプチドの阻害効果を検討した。その結果、Caco-2 細胞においてファージの透過は合成ペプチドによって阻害された。また、蛍光標識した小腸透過環状ペプチドが Caco-2 細胞内に取り込まれ、その取り込みは非標識合成環状ペプチドによって阻害されることを確認した。取り込み機構を検討するために温度依存性とマクロピノサイトーシス阻害剤の影響を検討した。その結果、蛍光標識環状ペプチドの Caco-2 細胞内への取り込みは 4 度及

びマクロピノサイトーシス阻害剤によって阻害された。また、環状ペプチドを提示したファージの Caco-2 細胞への取り込みも同様に阻害された(図3)。したがって、蛍光標識環状ペプチドや環状ペプチドを提示するファージの小腸上皮細胞への取り込み過程には、エネルギー依存性の担体が介在し、さらにマクロピノサイトーシスが関わっていることが示唆された。

密着結合への影響を経上皮細胞電気抵抗値(TEER)によって計測した結果、100 μ M 環状ペプチドの 24 時間の処理によっても TEER は変化しなかった。この結果は、小腸透過環状ペプチドが Caco-2 細胞の密着結合に影響しないことを示している。

ペプチドの構造に関しても検討を実施した。小腸透過環状ペプチドと同じ配列を有する直鎖ペプチドの Caco-2 細胞透過を測定した。蛍光標識小腸透過環状ペプチドは Caco-2 細胞を透過したのに対して、蛍光標識直鎖ペプチドは Caco-2 細胞を透過しなかった。したがって、小腸透過能には環状化が必要である事が明らかになった。

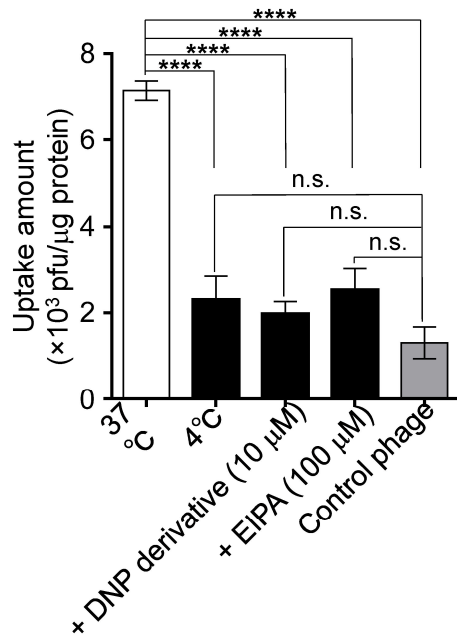


図3 小腸透過環状ペプチドを提示するファージの Caco-2 細胞への取り込みに対する阻害効果

(2)小腸上皮細胞以外の細胞の透過促進効果の検討

小腸透過環状ペプチドの細胞透過促進効果が小腸上皮細胞以外の細胞でもあらわれるかを検討するために、ヒト脳毛細血管内皮細胞(hCMEC/D3細胞)に対する効果を検討した。小腸透過環状ペプチドを提示するファージの hCMEC/D3 細胞の透過速度はペプチドを提示しないコントロールファージと差はなかった。本結果は、小腸透過環状ペプチドの細胞透過促進効果には細胞特異性がある事を示している。

(3) 小腸透過環状ペプチドのマウス小腸透過特性の検討

小腸透過環状ペプチドの in vivo 小腸透過を検討するために、小腸透過環状ペプチドを提示するファージをマウス小腸の in situ closed loop に投与し、血中のファージを定量した。その結果、投与後 30 分において小腸透過環状ペプチドを提示するファージの血中濃度は、ペプチドを提示しないコントロールファージと比較して 620 倍高かった。したがって、小腸透過環状ペプチドは in vivo においてファージの小腸透過を促進することが明らかとなった(図4)。

小腸透過環状ペプチドの小腸に対する毒性を投与 2 時間後の LDH 漏出によって評価した。小腸透過環状ペプチド投与時の LDG 漏出は vehicle 投与と有意差がなかった。したがって、短時間においては小腸透過環状ペプチドは小腸に対して毒性は示さないことが明らかになった。また、血液生化学検査も実施した結果、いずれのパラメータも腸透過環状ペプチド投与時は vehicle 投与と有意差がなかった。

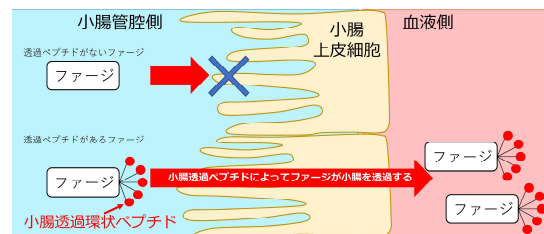


図4 小腸透過環状ペプチドを提示するファージは in vivo 小腸を透過する。

<引用文献>

- S. Khafagy, M. Morishita, N. Kamei, Y. Eda, Y. Ikeno, K. Takayama: Efficiency of cell-penetrating peptides on the nasal and intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. *Int J Pharm*, 381:49-55 (2009)
- EJB. Nielsen, S. Yoshida, N. Kamei, B. Iwama, S. Khafagy, J. Olsen, UL. Rahbek, BL. Pedersen, K. Takayama, M. Takeda-Morishita: In vivo proof of concept of oral insulin delivery based on a co-administration strategy with the cell-penetrating peptide penetratin. *J control Release*. 189:19-24 (2014)
- S. Yamaguchi, S. Ito, M. Kurogi-Hirayama,: Identification of cyclic peptides for facilitation of transcellular transport of phages across intestinal epithelium in vitro and in vivo. *J Control Release*. 262:232-238 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

S. Yamaguchi, S. Ito, M. Kurogi-Hirayama, S. Ohtsuki: Identification of cyclic peptides for facilitation of transcellular transport of phages across intestinal epithelium in vitro and in vivo. J Control Release. 262:232-238 (2017)、査読有り
DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.07.037

〔学会発表〕(計5件)

大槻純男、増田豪、伊藤慎悟：環状ペプチドによる小腸透過キャリアの開発、立命館大学創剤研究コンソーシアム 2017年度第2回研究会、滋賀、2018年02月02日

原田智徳、山口駿介、増田豪、伊藤慎悟、大槻純男：経口投与型高分子医薬品の開発を目指した小腸透過性環状ペプチドの同定と評価、第41回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、熊本、2017年8月31日-9月2日

山口駿介、伊藤慎悟、平山未央、大槻純男：経口投与型バイオ医薬品の開発に資する小腸透過性環状ペプチドの同定、第33回日本薬学会九州支部大会、鹿児島、2016年12月3-4日

Shunsuke Yamaguchi, Shingo Ito, Mio Hirayama, Sumio Ohtsuki: Identification of Novel Cyclic Peptides for Facilitating Intestinal Permeability of Macromolecule, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, Denver, 13-17 Nov, 2016

山口駿介、伊藤慎悟、平山未央、大槻純男：高分子医薬品の小腸透過を改善させる小腸透過性環状ペプチドの同定、第32回DDS学会、静岡、2016年6月30-7月1日、

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：新規な細胞膜透過性ペプチド

発明者：伊藤慎悟、大槻純男

権利者：熊本大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/064767

出願年月日：平成28年5月18日

国内外の別： 国外

名称：新規な細胞膜透過性ペプチド

発明者：伊藤慎悟、大槻純男

権利者：熊本大学

種類：特許

番号：US 15/575331

出願年月日：平成29年11月17日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ohtsuki-lab.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大槻 純男 (OHTSUKI, Sumio)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：60323036