

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02103

研究課題名(和文)新規のヒト由来膜透過促進ペプチドを利用したバイオ医薬の細胞選択的DDSの開発

研究課題名(英文)Development of cell-specific DDS for biopharmaceuticals using a novel human-derived membrane penetration-enhancing peptide

研究代表者

土居 信英(DOI, Nobuhide)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：50327673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：標的分子に対して高い特異性と親和性をもつ抗体/ペプチド/核酸などのバイオ医薬は、従来の低分子化合物医薬と比べて副作用が少なく、治療効果が高い究極の分子標的薬として注目されているが、細胞膜透過性が低いという欠点があり、効率のよいドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が求められていた。本研究では、我々が発見した膜透過促進ペプチドを利用して、抗体/ペプチド/核酸を従来よりも効率よく細胞質に送達できることを示した。また、基礎研究として、その膜透過促進メカニズムの解明も並行して進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が発見した膜透過促進ペプチドはヒト天然タンパク質由来であり免疫原性の懸念が少ないという利点もあることから、この独自の膜透過促進ペプチドを連結した抗体/ペプチド/核酸がヒト細胞の細胞質に効率よく送達されるという本研究の成果は、将来的に、細胞内の疾患標的に作用する新しい抗体医薬の開発や、ペプチドや核酸からなる中分子医薬の効率的なデリバリーに応用することが期待できる。これにより、我が国のバイオ創薬技術の基盤強化、ひいては国民の医療・福祉の向上に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Biopharmaceuticals consisting of antibodies, peptides or nucleic acids, which have high specificity and affinity for target molecules, are attracting attention as the ultimate molecular targeted drugs with less side effects and higher therapeutic effects than conventional drugs consisting of low-molecular compounds. However, biopharmaceuticals have a drawback of low cell membrane permeability, and thus development of an efficient drug delivery system (DDS) for biopharmaceuticals has been required. In this study, we discovered a membrane penetration-enhancing peptide for efficient cytoplasmic delivery of antibodies, peptides, and nucleic acids. In addition, as a basic research, we analyzed the membrane permeation mechanism.

研究分野：分子生物学

キーワード：抗体 ペプチド 核酸 ドラッグデリバリーシステム 細胞膜透過

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 標的分子に対して高い特異性と親和性をもつ抗体/ペプチド/核酸などのバイオ医薬は、従来の低分子化合物医薬と比べて副作用が少なく、治療効果が高い究極の分子標的薬として注目されているが、細胞膜透過性が低いという欠点があった。これまでに HIV1 由来の TAT やポリアルギニンなどの細胞膜透過性ペプチド (CPP) を融合することで抗体やペプチドを細胞内に輸送した例はあるが、これらの CPP は細胞選択性に乏しいため将来的な臨床応用では副作用の問題が危惧されており、また、エンドソームから細胞質への脱出効率が低いという課題もあった。当時、申請者らは、ウニの受精に関与するタンパク質 Bindin に含まれる膜融合促進ペプチド (FP) が、タンパク質や核酸のエンドソーム離脱を促進することを発見していた (文献①)。さらに、ウニ由来のペプチドでは医薬に応用しようとする場合に免疫原性が懸念されることから、新たにヒト由来の膜融合に関与する様々なタンパク質の部分ペプチドについて同様の膜透過促進活性を探索した結果、Syncytin1 の部分ペプチド (S19 と命名) が、様々なヒト培養細胞の増殖や生存に影響を及ぼすことなく、連結したタンパク質の細胞質送達を TAT の約 100 倍向上させることを見出していた (特許出願 2015-118432 ; 文献②)。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、申請者らが発見したヒト Syncytin1 由来の膜透過促進ペプチドを利用して、ペプチド/抗体/核酸などのバイオ医薬を従来よりも効率よくエンドソーム離脱させ、細胞選択的に細胞質に送達させることができる汎用的なドラッグデリバリーシステム (DDS) の確立を目的とした。具体的な細胞内の疾患標的として前立腺がんの悪性化に関与するアンドロゲン受容体 (AR) のスプライスバリエント (AR-V7) に作用できる細胞内抗体医薬/核酸医薬を作成し、その効率的な細胞内送達の実現を目指した。また、基礎研究としてヒト Syncytin1 由来ペプチドによる膜透過促進メカニズムの解明も並行して進めた。様々なバイオ医薬の細胞選択的 DDS を確立することができれば、我が国のバイオ創薬技術の基盤強化、ひいては国民の医療・福祉の向上に多いに貢献することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) モデルペプチドの細胞質送達および膜透過促進メカニズムの解析

膜透過促進ペプチド S19 に変異を導入し、従来の CPP である TAT とともに蛍光タンパク質 eGFP に融合したタンパク質を大腸菌で大量発現・精製し、HeLa 細胞に添加後、共焦点蛍光顕微鏡で観察することで細胞内取り込み活性を調べた。また、いくつかの変異体について、S19-TAT ペプチドを化学合成し、CD スペクトル測定により二次構造を解析した。さらに、この融合タンパク質が細胞質に送達していることを確認するために、細胞質内の標的に結合して生育阻害を起こすモデルペプチドを融合して、その作用を調べた。

(2) 抗アンドロゲン剤抵抗性前立腺がんに対する抗体医薬の細胞内送達

AR とそのスプライスバリエント (AR-V7) の両方に作用できる細胞内抗体医薬を創出するために、両者共通の DNA 結合ドメインをベイトとして、当研究室で開発された mRNA ディスプレイ法による試験管内選択をおこなった。細胞内抗体に S19-TAT を融合して、ヒト培養細胞に添加し、細胞内取り込みを観察した。

(3) 抗アンドロゲン剤抵抗性前立腺がんに対する核酸医薬の細胞内送達

AR と AR-V7 の共通の遺伝子領域に作用する siRNA をデザインし、S19-TAT を融合した RNA 結合ドメイン (RBD) との複合体をヒト培養細胞に添加し、標的遺伝子のノックダウンを検証した。

4. 研究成果

(1) S19-TAT は後期エンドソーム膜への結合にともないベータ構造を形成し、細胞質に離脱している可能性が示唆されていた (文献②)。そこで、この機構が正しいかどうかを確認するために、Ala スキャニング変異解析をおこなった (図 1)。具体的には S19 ペプチドのうち 2 カ所の Ala を除く 17 個のアミノ酸

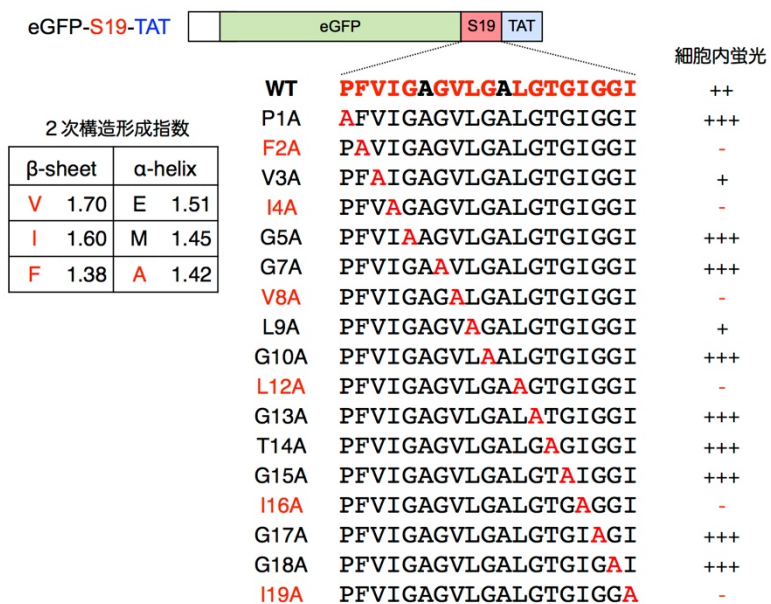


図1 膜透過促進ペプチドS19のアラニンスキャニング変異解析

を1カ所ずつ Ala に置換した変異体を作製し、それらの膜透過促進活性と二次構造を調べた結果、ベータ構造を形成しやすいアミノ酸を Ala に置換した場合に膜透過促進活性が減少あるいは消失し、そのとき S19 の二次構造がベータ構造からヘリックス構造に変換あるいはベータ構造が減少する傾向にあることが示された。また、変異体の一部は野生型 S19 よりも高い細胞内取り込み活性をもつことが示唆された。

(2) 細胞質内の標的に結合して生育阻害を起こすモデルペプチドとして、まず、N末端で機能する MDM2 阻害ペプチド (MIP) を N 末端に、膜透過促進ペプチドを C 末端に融合したタンパク質を大腸菌で大量発現・精製し、ヒト培養細胞に添加したところ生育阻害を示した。一方、C末端で機能するサイクリン依存性キナーゼ阻害ペプチド p27C についても検証するために、膜透過促進ペプチドを N 末端に付け替えても膜透過促進活性を示すかどうか検討したところ、細胞質送達効率が低下することが分かった。そこで、S19 と TAT の連結順序や位置を変えて細胞内取り込み活性を検討した結果、N 末端に膜透過促進ペプチドを融合しても膜透過促進活性を示すパターンを見出すことができた。そこで、新たに見出した S19 と TAT の連結順序を利用して、C 末端で機能する p27C や p53 活性化ペプチドについてコンストラクトを作製し (図2A)、細胞内取り込みによる生育阻害活性を検証した。まず、p53 活性化ペプチドを TAT-S19-eGFP の C 末端に融合したタンパク質の発現用遺伝子を作成し、この融合タンパク質が細胞内においてペプチド医薬としての機能を有することを確認するために、この遺伝子発現用プラスミドをトランスフェクションして MDM2 過剰発現細胞内で発現させたところ期待通り細胞生育阻害活性が見られた。そこで、この p53 活性化ペプチド融合タンパク質を大腸菌発現・精製し、MDM2 過剰発現細胞に添加したところ、野生型 p53 を発現する細胞において p53 下流のアポトーシス関連因子である p21 の発現量の増加が観察されたことから、融合タンパク質が細胞質に送達していることが示唆された。また、同様に p27C 融合タンパク質を前立腺がん細胞株に添加したところ、内在性のがん抑制因子 p27KIP1 の発現量の増加 (図2B) と細胞生存率の減少 (図2C) を確認できた。

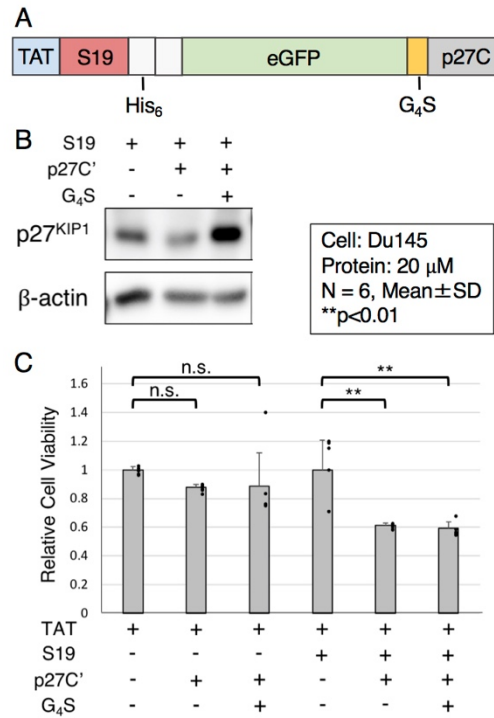


図2 細胞生育阻害ペプチドの細胞内送達

(3) 膜抗原として様々ながん細胞で過剰発現することが知られている上皮成長因子受容体 (EGFR) に pH 依存的に結合する一本鎖抗体を作製し、eGFP および膜透過促進ペプチドを融合したタンパク質を大腸菌で大量発現・精製した。これをヒト培養細胞に添加して共焦点顕微鏡で観察したところ、EGFR 高発現株の A431 細胞の細胞内部に eGFP の緑色蛍光が観察された。また、モデル細胞内抗体として β-チューブリンを認識する一本鎖抗体を膜透過促進ペプチド S19-TAT と融合し (図3A)、細胞内取り込みを調べた結果、細胞質で微小管に結合したと推定される放射状の局在が観察された (図3B)。このことから、我々の膜透過促進ペプチドにより一本鎖抗体が機能を保持したまま細胞質にデリバリーできることが示唆された。

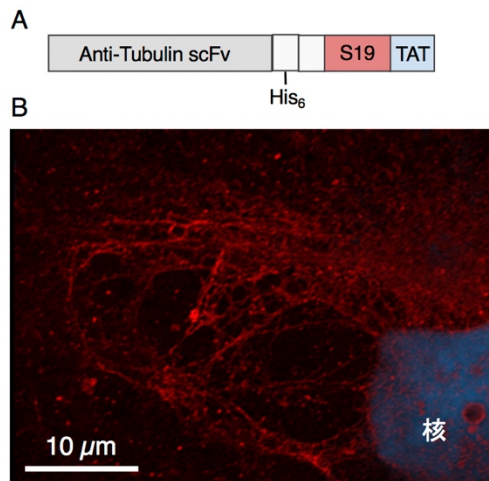


図3 抗βチューブリン一本鎖抗体の細胞内送達

(4) そこで、AR の DNA 結合ドメイン (AR-DBD) を認識する VH ドメイン抗体を mRNA ディスプレイ法を用いて創出するために、AR-DBD を大腸菌で大量発現・精製し、これをベイトとして、mRNA ディスプレイ法による VH ドメイン抗体ライブラリー (図4A) の試験管内選択を還元的条件下で4ラウンドおこなった。その結果、異なる CDR 配列をもつ VH ドメイン抗体クローンを多数取得することができた。ELISA によりジスルフィド結合なしで AR-DBD に結合できるか検証した結果、17 個中 9 個のドメイン抗体がベイト特異的な結合活性を示した (図4B)。現在、これらのドメイン抗体に膜透過促進ペプチドおよび NLS を融合したタンパク質を調製し、核内への送達と転写抑制活性を検証中である。

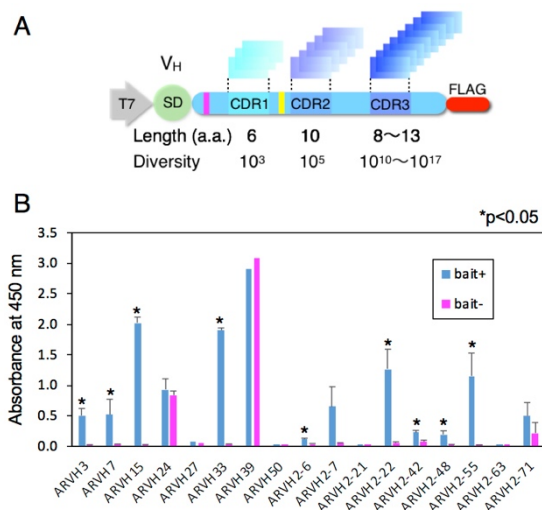


図4 抗AR-DBDドメイン抗体の試験管内選択

(5) 膜透過促進ペプチド S19 が抗体やペプチドだけではなく核酸医薬の細胞質送達の促進にも適用できるかを確認するために、siRNA に配列非特異的に結合する RNA 結合ドメイン (RBD) の C 末端に S19-TAT を融合したタンパク質を調製し、蛍光標識 siRNA との複合体をヒト培養細胞に添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。その結果、TAT のみを融合した場合と比べて S19-TAT を融合すると細胞内の蛍光が強く観察され、siRNA の細胞内送達を確認できた (図5A)。また、AR および AR-V7 遺伝子の共通部分配列に対する siRNA を用いた場合に、標的遺伝子がノックダウンされることを RT-qPCR により確認できた (図5B)。このことから、我々の膜透過促進ペプチドにより siRNA を細胞質にデリバリーできることが示された。

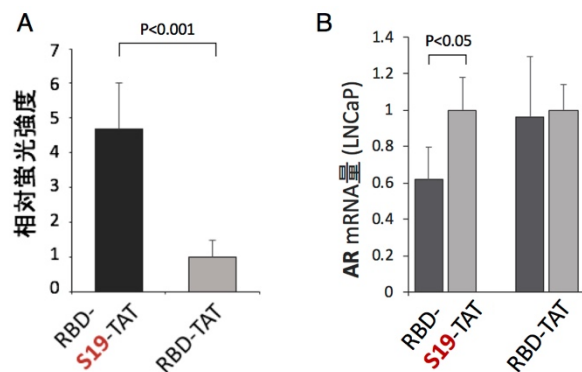


図5 核酸医薬の細胞内送達

<引用文献>

- ① Niikura, K., Horisawa, K., Doi, N. : A fusogenic peptide from a sea urchin fertilization protein promotes intracellular delivery of biomacromolecules by facilitating endosomal escape. *J. Control. Release* 212, 85-93 (2015)
- ② Sudo, K., Niikura, K., Iwaki, K., Kohyama, S., Fujiwara, K., Doi, N. : Human-derived fusogenic peptides for the intracellular delivery of proteins. *J. Control. Release* 255, 1-11 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sudo, K., Niikura, K., Iwaki, K., Kohyama, S., Fujiwara, K., Doi, N.	4. 巻 255
2. 論文標題 Human-derived fusogenic peptides for the intracellular delivery of proteins.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Control. Release	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2017.03.398	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 土居信英	4. 巻 49
2. 論文標題 ヒト由来膜融合ペプチドによるバイオ医薬のDDS.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 602-605
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 無
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11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩城洸汰, 須藤慧, 光山隼史, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 ヒトSyncytin1由来膜融合ペプチドによるタンパク質の細胞質送達機構の解析
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 漆島穰一, 海野佑樹, 須藤慧, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 mRNAディスプレイ法によるヒト抗GPCR単一ドメイン抗体の試験管内選択
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菊地萌希, 岩城洸汰, 漆島穰一, 須藤慧, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 ヒト由来膜透過促進ペプチドによるバイオ医薬の効率的な細胞質送達の可能性評価
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土居信英
2. 発表標題 タンパク質の細胞質送達を促進するヒト由来ペプチドの発見とDDSへの応用
3. 学会等名 LIP横浜オープンイノベーションカンファレンスIII (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩城洸汰, 菊地萌希, 須藤慧, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 ヒト由来膜融合ペプチドと積み荷タンパク質の連結様式がその細胞質送達活性に与える影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土居信英
2. 発表標題 ヒト由来膜透過促進ペプチドを利用したDDSの可能性
3. 学会等名 第21回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地萌希, 岩城洸汰, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 ペプチド医薬の細胞質送達に向けたヒト由来膜透過促進ペプチドの応用
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木麻友子, 岩城洸汰, 須藤慧, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 ヒト・シンシチン1由来膜透過促進ペプチドのアラニンスクヤニング変異解析
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前村帆南, 岩城洸汰, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 LDL受容体を標的とする細胞選択的なタンパク質のデリバリーのためのヒト由来膜透過促進ペプチドの最適化
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村桃子, 藤原慶, 土居信英
2. 発表標題 ヒト由来膜透過促進ペプチドS19を利用したsiRNAデリバリー
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuchi, M., Iwaki, K., Fujiwara, K., Doi, N.
2. 発表標題 Application of a human-derived fusogenic peptide to intracellular delivery of therapeutic peptides
3. 学会等名 The Cold Spring Harbor Asia conference on Chemical Biology and Drug Discovery (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 土居信英	4. 発行年 2017年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 医療・診断をささえるペプチド科学 - 再生医療・DDS・診断への応用 -	

1. 著者名 土居信英	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 ドラッグデリバリーシステム - バイオ医薬品創成に向けた組織、細胞内、核内送達技術の開発-	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース：タンパク質の細胞質送達を促進するヒト由来ペプチドを発見  <a href="https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/4/6/28-20259/index.html">https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/4/6/28-20259/index.html</a></p>
---



## 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	藤原 慶 (FUJIWARA Kei) (20580989)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・講師  (32612)	
研究協力者	岩城 洸汰 (IWAKI Kota)		
研究協力者	漆島 穰一 (URUSHIMA Joichi)		
研究協力者	菊地 萌希 (KIKUCHI Moeki)		
研究協力者	鈴木 麻友子 (SUZUKI Mayuko)		
研究協力者	前村 帆南 (MAEMURA Honami)		
研究協力者	中村 桃子 (NAKAMURA Momoko)		
研究協力者	井本 正哉 (IMOTO Masaya)		