

平成 21年 5月 31日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790092

研究課題名 (和文) 糖鎖の多元的認識ペクターの開発と細胞選択的な薬物送達への展開

研究課題名 (英文) Development of Arginine-Rich Peptides for Proteoglycan-Dependent Intracellular Delivery of Bioactive Molecules into Target Cells

研究代表者

中瀬 生彦 (NAKASE IKUHIKO)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：40432322

研究成果の概要：

本研究課題では、癌細胞への選択的な薬物送達を目指し、細胞膜のプロテオグリカンを認識して高効率に細胞内へ移行する膜透過性アルギニンペプチドに、癌細胞膜に高発現しているトランスフェリン受容体に対して親和性が高いペプチド配列を組み込むことで、新しい薬物送達ペクターを創製した。このペクターは受容体依存的に細胞内へ取り込まれ、サイトゾル及び核内へ移行することが観察された。また、生理活性を有するタンパク質にペクターに組み込んだ場合にも、受容体依存的な活性上昇が確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品化学・ペプチド化学

1. 研究開始当初の背景

これまで、標的となる細胞に対して、如何にして生理活性をもつタンパク質やペプチド、核酸ならびに有機化合物を細胞選択的に細胞内まで送達させるかに関して、活発な研究が行われてきた。細胞表面に特異的過剰提示されているレセプターに対するリガンドタンパク質や、近年注目されているファージディスプレイ法などで見出された細胞選択的ターゲティングペプチドなどについて、薬

物送達に応用できるか検討されている。しかし、これらの手法を用いた場合、細胞膜における標的物への親和性が高いものの、細胞内移行性が低いため、さらなる高効率な細胞膜透過性を有する細胞選択的キャリアの開発が強く望まれていた。

2. 研究の目的

研究代表者は、細胞内へ高効率に移行する

エイズウイルス由来の Tat ペプチドや、所属研究室で見出されたアルギニン 8 残基で構成されたペプチド (R8) 等の塩基性ペプチドについて、細胞内移行メカニズムや、細胞内導入キャリアとしての応用に関して検討を行ってきた。これらのペプチドは、細胞毒性が極めて低く、エンドサイトーシスやマクロピノサイトーシス経路にて細胞内に取り込まれる。また、ペプチド配列中におけるアルギニンクラスター密度によって、ペプチドが認識する細胞表層上の糖鎖が異なることも明らかされ、ペプチドの細胞内移行におけるマクロピノサイトーシス経路において、細胞膜に存在するプロテオグリカンが重要な役割をしていることが確認されている。

癌細胞において、細胞表面に syndecan-1 や glypican-1 などのヘパラン硫酸を糖鎖中にもつプロテオグリカンが、正常細胞と比較して発現量が非常に高いことが報告されている (例えば、glypican-1 mRNA の発現量が胸部癌細胞において、正常な胸部細胞の 6.4 倍発現量が高いことが明らかとなっている)。癌細胞は、これらの糖鎖を細胞表面に提示することで、細胞増殖因子を効率よく受容体に結合させることや、臓器組織への結合・転移に重要な役割をしている。よって、塩基性ペプチドに生理活性物質をコンジュゲートすることで、細胞表面における糖鎖の提示の違いによって、細胞内へ送達される生理活性物質の量や、活性自体を制御できる可能性が大いに期待できる。

本研究課題では、更なる高効率な癌細胞選択的な薬物送達を目指し、細胞膜上の糖鎖を認識する塩基性ペプチドに、さらに癌細胞に高発現している受容体に親和性の高いペプチドを配列中に組み込むことで新しい薬物送達ベクターを創出し、それらの選択的細胞内移行能や移行メカニズムに関して詳細に検討する。また、生理活性物質をこれらの送達ベクターにコンジュゲートさせ、標的細胞に対する生理活性の選択性に関しても評価する。ファージディスプレイ法によって見出された、癌細胞に高い発現が認められるトランスフェリン受容体に対して親和性の高いペプチド配列と、膜透過性アルギニンペプチドとの結合体を調製し、この結合体の細胞内移行性に関して、詳細な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 糖鎖および癌細胞特異的な受容体を認識する薬物送達ベクターの合成

癌細胞に高発現し、細胞増殖に必要な鉄イオンを細胞内に供給するトランスフェリン蛋白質の受容体 (TfR) に対して、高い親和性をもつペプチド (TfRbp) (Lee, 2001) と、細胞膜のプロテオグリカンを認識し、高効率に細胞内へ移行するオクタアルギニンペプチド (R8) と

の融合ペプチド (TfRbp-R8) を合成した。ペプチドは Fmoc 式固相法で調製し、細胞内移行評価を行うために、ペプチド配列中の C 末端にシステイン残基を配置し、Alexa488 C₅ maleimide にて蛍光ラベルした。

(2) 合成した薬物送達ベクターの細胞膜における糖鎖および受容体の認識と細胞内移行の検討

上記の調製したペプチドの細胞膜表面における糖鎖および受容体の認識機能と細胞内移行能に関して、共焦点顕微鏡ならびにフローサイトメーターを用いて、調製した薬物送達ベクターの細胞内移行について評価した。標的となる受容体への依存的な細胞内移行については、siRNA で受容体をノックダウンすることで移行への影響を検討した。

(3) TfR 依存的な細胞毒性の誘発に関する検討

TfRbp-R8 の細胞内導入ベクターとしての応用性について、細胞毒性を誘発するタンパク質の細胞内送達に関して検討した。リボソーム不活化タンパク質である saporin をストレプトアビジン化したタンパク質 (〜128 kDa) と、ビオチン修飾した TfRbp-R8 の複合体について、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞に対する細胞毒性の評価をおこなった。また siRNA で TfR をノックダウンした HeLa に対する細胞毒性についても比較した。

4. 研究成果

(1) TfRbp-R8 ペプチドの細胞内移行に関する検討

蛍光ラベルした TfRbp-R8 の細胞内移行を、共焦点顕微鏡を用いて検討した。血清含有培地に合成したペプチドを溶解し、この培地を用いて HeLa 細胞を培養した結果、TfRbp-R8 (5 μ M) は高効率に細胞膜を通過し、サイトゾル及び核内へ短時間 (10 分) で移行することが観察された。一方で、TfRbp 配列のみの場合では、細胞内移行量が低く、しかもエンドソーム内にトラップされており、TfRbp-R8 の場合と比較してサイトゾルへ移行したペプチド量が低い様子が観察された。R8 ペプチドのみの場合においても、この実験条件においては TfRbp 配列のみの場合と同様に、ほとんどがエンドソーム内にとどまっていることが確認された。

フローサイトメーターによって、細胞内移行量を検討したところ、TfRbp-R8 は R8 及び TfRbp のそれぞれ約 6 倍、17 倍の移行量を示した (ペプチド濃度 1 μ M, 処理時間 10 分)。よって、TfRbp と R8 をハイブリッド化させることで、相乗的に細胞内へ高効率に移行することが明らかとなった。

また、蛍光ラベルしていない高濃度の

TfRbp (100 μ M) 存在下における TfRbp-R8 の細胞内移行に関して、競合実験を行った結果、TfRbp を前処理及び同時投与することで TfRbp-R8 の移行量は顕著に減少した。一方では、コントロールとして TfRbp のアミノ酸配列をスクランブル化した sTfRbp を用いた場合には、TfRbp-R8 の細胞内移行は、ほとんど阻害されなかった。これらの結果より、TfRbp-R8 が細胞表面において、TfRbp 標的的部位に対して特異的に送達され、細胞内移行することが確認された。

(2) siRNA によるトランスフェリン受容体ノックダウン細胞における TfRbp-R8 の細胞内移行への影響

トランスフェリン受容体に対する標的化について調べるために、トランスフェリン受容体を siRNA でノックダウンした細胞における TfRbp-R8 の細胞内移行を検討した。その結果、siRNA でトランスフェリン受容体をノックダウンした細胞では、共焦点顕微鏡での観察により、TfRbp-R8 の移行量は明らかに減少することが確認された。また、フローサイトメーターによるペプチドの移行量に関する検討においても、トランスフェリン受容体をノックダウンすることで細胞内移行量は 42% 減少することが確認された。よって、TfRbp-R8 のハイブリッドペプチドが、TfR 依存的に細胞内へ移行することが確認された。

(3) TfR 依存的な細胞毒性の誘発に関する検討

トランスフェリン受容体依存的な細胞毒性を誘発するために、ビオチン修飾した TfRbp-R8 と、リボソーム不活化タンパク質である saporin をストレプトアビジン化したタンパク質 (~128 kDa) との複合体を調製し、細胞毒性の誘発に関して検討した。結果として、血清含有培地に調製した TfRbp-R8 と saporin の複合体を溶解 (50 nM) し、この培地を用いて HeLa 細胞を 2 日間培養した結果、細胞増殖が約 40% 抑制された。また siRNA で TfR をノックダウンした HeLa に対する細胞毒性を検討した結果、細胞増殖へはほとんど影響が無いことが確認された。

本研究結果は、上記ハイブリッドペプチドを用いることで、TfR を標的とする薬物送達への応用が可能であることを示唆するものである。

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 8 件)

1. Kentaro Takayama, Ikuhiko Nakase, Hiroyuki Michiue, Toshihide Takeuchi,

Kazuhiro Tomizawa, Hideki Matsui, Shiroh Futaki.

Enhanced Intracellular Delivery Using Arginine-Rich Peptides by the Addition of Penetration Accelerating Sequences (Pas). *Journal of Controlled Release* (in press) (査読有り).

2. Kentaro Takayama, Akiko Tadokoro, Silvia Pujals, Ikuhiko Nakase, Ernest Giralt, Shiroh Futaki.

Novel System to Achieve One-Pot Modification of Cargo Molecules with Oligoarginine Vectors for Intracellular Delivery.

Bioconjugate Chemistry 20, 249-257 (2009) (査読有り).

3. Ikuhiko Nakase, Byron Gallis, Tomoka Nakase, Steve Oh, Eric Lacoste, Narendra P. Singh, David R. Goodlett, Seigo Tanaka, Shiroh Futaki, and Tomikazu Sasaki.

Transferrin Receptor-Dependent Cytotoxicity of Artemisinin-Transferrin Conjugates on Prostate Cancer Cells and Induction of Apoptosis.

Cancer Letters 274, 290-298 (2009) (査読有り).

4. Michie Kosuge, Toshihide Takeuchi, Ikuhiko Nakase, Arwyn T. Jones, Shiroh Futaki.

Cellular Internalization and Distribution of Arginine-Rich Peptides as a Function of Extracellular Peptide Concentration, Serum, and Plasma Membrane Associated Proteoglycans.

Bioconjugate Chemistry 19, 656-664 (2008) (査読有り).

5. Ikuhiko Nakase, Toshihide Takeuchi, Gen Tanaka, Shiroh Futaki.

Methodological and Cellular Aspects That Govern the Internalization Mechanisms of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides.

Advanced Drug Delivery Reviews 60, 598-607 (2008) (査読有り).

6. Ikuhiko Nakase, Henry Lai, Narendra P. Singh, Tomikazu Sasaki.

Anticancer Properties of Artemisinin Derivatives and Their Targeted Delivery by Transferrin Conjugation.

International Journal of Pharmaceutics 354, 28-33 (2008) (査読有り).

7. Shouju Kameyama, Mayo Horie, Takeo

Kikuchi, Takao Omura, Akiko Tadokoro, Toshihide Takeuchi, Ikuhiko Nakase, Yukio Sugiura, and Shiroh Futaki.

The Use of Acid Wash in Determining Cellular Uptake of Fab/Cell-Permeating Peptide Conjugates.

Biopolymers 88, 98-107 (2007) (査読有り).

8. Shiroh Futaki, Ikuhiko Nakase, Akiko Tadokoro, Toshihide Takeuchi, Arwyn T. Jones.

Arginine-rich Peptides and their Internalization Mechanisms.

Biochemical Society Transactions 35, 784-787 (2007) (査読有り).

[学会発表] (計 10 件)

1. 細胞選択的な薬物送達を目指したトランスフェリン受容体を標的とする膜透過ペプチドの開発.

小西雄介、中瀬生彦、東野俊介、二木史朗.
日本薬学会 第 129 年会 (2009 年 3 月 26 日～28 日、京都) .

2. アルギニンペプチドの細胞膜透過におけるマクロピノサイトーシス誘導の重要性.

中瀬生彦、広瀬久昭、二木史朗.
日本薬学会 第 129 年会 (2009 年 3 月 26 日～28 日、京都) .

3. Efficient Cellular Uptake of Flock House Virus Derived Peptide.

Ikuhiko Nakase, Hisaaki Hirose, Shiroh Futaki.

第 45 回ペプチド討論会 (2008 年 10 月 29～31 日、東京) .

4. アルギニンペプチドの効率的マクロピノサイトーシス誘導と細胞内移行

中瀬生彦.
インテックセンター生体医工学研究部門講演会・グローバル COE 化学系バイオ若手バイオシンポジウム (2008 年 9 月 29 日、京都大学桂キャンパス) .

5. Effective Macropinocytosis Induction and Membrane Penetration by FHV Peptide.

Ikuhiko Nakase, Hisaaki Hirose, Toshihide Takeuchi, Shiroh Futaki.

Cell-Penetrating Peptides (CPP) Satellite Symposium of 30th European Peptide Symposium (30-31 August 2008, Helsinki).

6. FHV ペプチドの効率的な膜透過機能.

中瀬生彦、広瀬久昭、二木史朗.
第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウ

ム (2008 年 8 月 7 - 8 日、札幌).

7. Effective induction of macropinocytosis and internalization of the FHV peptide.

Hisaaki Hirose, Ikuhiko Nakase, Gen Tanaka, Shiroh Futaki.

2nd International Symposium Cellular Delivery and Therapeutic Macromolecules (June 22-25, 2008, Cardiff University).

8. Effect of Peptide Concentration and Serum on the Modes of Internalization of Arginine-rich Peptides.

Shiroh Futaki, Toshihide Takeuchi, Michie Kosuge, Ikuhiko Nakase.

第 29 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2007 年 11 月 26-27 日、仙台) .

9. 膜透過性アルギニンペプチドの効率的な細胞内移行.

中瀬生彦.
平成 19 年度 ペプチド若手の集い (第 44 回ペプチド討論会) (2007 年 11 月 6 日、富山).

10. 膜透過性アルギニンペプチド:細胞による効率的な取り込みとプロテオグリカン依存性.

中瀬生彦、田所明子、武内敏秀、二木史朗.
日本ケミカルバイオロジー研究会 第 2 回年会 (2007 年 5 月 9-10 日、京都) .

[その他]

ホームページ等

http://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/index_J.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中瀬 生彦 (NAKASE IKUHIKO)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号: 4 0 4 3 2 3 2 2