

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15982

研究課題名(和文)細胞膜透過ペプチドの機能制御に向けた膜摂動機構の解明と新規評価法の構築

研究課題名(英文)Unraveling membrane perturbation mechanisms and developing novel evaluation methods for controlling the function of cell-penetrating peptides

研究代表者

原矢 佑樹 (Haraya, Yuki)

国立医薬品食品衛生研究所・薬品部・主任研究官

研究者番号：30634604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、薬物の細胞内送達を可能にする細胞膜透過能をもつペプチド(細胞膜透過ペプチド)が、細胞脂質膜への力学的な作用によってその機能を発揮していると仮説を立て、細胞膜モデルとしての人工脂質膜小胞(リボソーム)の膜の硬さ(膜剛性)を低下させるペプチドの作用を「膜摂動力」と定義し、これを直接定量するための原子間力顕微鏡法を開発した。これによって、アミノ酸配列や高次構造の異なる種々のペプチドの膜摂動力と細胞膜透過性および細胞毒性の連関について定量的な評価を可能にし、高い細胞膜透過性を示すペプチドを設計するための新規方法論を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「細胞毒性が低くかつ高い細胞膜透過性を示すペプチドを開発するためには、膜摂動力を最適化する必要がある」という新たな学術的仮説を提示すると同時に、この方法論の実践のために構築した評価法の有用性を示すものである。本評価法を用いて、塩基性アミノ酸/疎水性アミノ酸数、疎水性度、両親媒性度などの構造特性を説明変数とする様々なペプチドの膜摂動力と機能の連関について解明を進めることで、より有用な薬物キャリアの開発が可能となる。また、膜摂動力と細胞毒性の連関解明に本評価手法を用いることで、ペプチドの細胞膜障害性を利用した「耐性のつきにくい抗がん/抗菌剤」の開発に資する基盤研究を展開できる。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that cell-penetrating peptides, which enable intracellular delivery of drug molecules, exert their cell membrane penetration through mechanical perturbation on plasma lipid membranes. We defined the effect of peptides that reduce the membrane stiffness of artificial cell membranes (liposomes) as 'membrane perturbation' and developed an atomic force microscopy method to directly quantify it. This allowed for quantitative evaluation of the relationship between the membrane perturbation of various peptides with different amino acid sequences and structural conformations, and their cell membrane penetration and cytotoxicity. As a result, we demonstrated a novel methodology for designing peptides with high cell penetration ability.

研究分野：物理系薬学/生物物理化学

キーワード：細胞膜透過ペプチド 脂質膜 膜摂動 膜透過 原子間力顕微鏡法 ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

アルギニン残基に富む正荷電のペプチド(アルギニンペプチド)は、トランスポーターやイオンチャネルをはじめとする膜タンパク質を介することなく、従来の生物学の常識や油/水分配-拡散仮説に反して、疎水性障壁である細胞脂質膜を物理的(自発的)に透過するユニークなペプチドであり、この膜透過能によって、膜透過性の低い薬物を細胞内へ輸送できる。しかし、その細胞膜透過メカニズムの詳細が不明であることが、アルギニンペプチドに代表される cell-penetrating peptide (CPP) の細胞膜透過・細胞膜障害の制御を困難にし、臨床での実用化に至っていない主要な原因となっている [Angew. Chem. Int. Ed. 56, 10294, 2017; Molecules 22, 1929, 2017; Molecules 23, 295, 2018]。

一方、上記の細胞膜透過メカニズムに関して研究代表者らは、様々な物理化学的手法を駆使して得た独自の知見から、「アルギニンペプチドは、膜への作用によって脂質膜に生成する極短寿命の親水経路を介することで、細胞脂質膜を透過する」という膜摂動機構を提唱し、学术界から評価を得てきた [例えば、2017 年度日本膜学会第 23 回研究奨励賞や筆頭著者としての原著論文: Langmuir 27, 7099, 2011; Pharmaceuticals 10, 42, 2017; Biochim. Biophys. Acta 1858, 1339, 2016; 1861, 541, 2019]。本機構における親水経路の生成・消失の本質は、脂質膜の変形のしづらさの物理量である「膜剛性」の低下により起きる脂質膜の変形であり、膜剛性の低下はアルギニンペプチドの膜作用に起因していると考えられる。

そこで本研究は、上記の CPP 開発課題を解決する科学基盤の確立に向けて、アルギニンペプチドによる膜剛性の低下作用を「膜摂動力」と新たに定義し、この膜摂動力の定量法を開発するとともに、膜摂動力の観点から CPP の細胞膜透過メカニズムの解明と機能制御を可能にする方法論の構築を目指して開始された。

2. 研究の目的

本研究は、膜摂動力を新たな指標に用いて、アルギニンペプチドの細胞膜透過を制御する方法論を構築することを目的とした。具体的には、研究代表者らが世界に先駆け確立した原子間力顕微鏡法 (AFM) による細胞膜モデルとしての人工脂質膜小胞 (リポソーム) の膜剛性の直接定量法 [Langmuir 32, 6074, 2016; 34, 7805, 2018; Anal. Chem. 91, 10432, 2019] を活用し、両親媒性など構造特性の異なる種々のアルギニンペプチドを研究対象としながら、膜摂動力の定量法を確立する。その上で、円偏光二色性法、蛍光分光法、共焦点レーザー顕微鏡法などの従来手法を駆使し、膜摂動力と、ペプチドの二次構造や脂質膜への結合性等の物理化学的特性および細胞膜透過性・細胞毒性との相関を解明する。こうして獲得される一貫して定量的な膜摂動機構に関する知見に基づき、細胞膜透過性が高くかつ細胞毒性の低い薬物輸送ペプチドを創製するための新規方法論の構築を目的とした。

3. 研究の方法

アルギニンペプチドの設計と作製

研究代表者らが独自に開発した「脂質膜への結合親和性および細胞膜透過性の高い両親媒性 α -ヘリックス構造のペプチド A2-17 [Biochim. Biophys. Acta 1861, 541, 2019]」を構造的基盤として、アミノ酸の配置交換を行い、両親媒性の数値的指標である疎水性モーメント (μH) が異なる 3 種の構造異性体 (R10L/L11R, R7L/L8R, L14R/R15L) を設計した (図 1)。さらに、両親媒性をより精密に制御することを目的として、ヘリックス安定性を高める化学修飾を適用した A2-17 誘導体を設計した (公表可能範囲の関係より、後日再提出の研究成果報告書で追記)。これらペプチドは Fmoc 固相合成法により作製され、液体クロマトグラフィー法および質量分析法によって純度が 95% 以上であることが確認されたものを用いた。

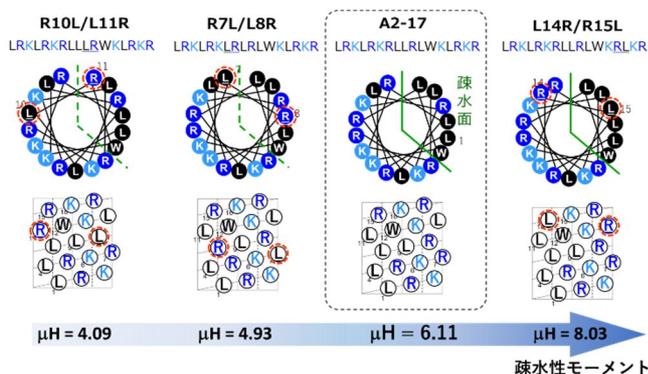


図1. A2-17を基盤とした構造異性体の設計

アルギニンペプチドの膜摂動力の評価

研究代表者は、カンチレバー (板バネとその先端に固定された探針) の精密操作によって、水中環境で固体基板に固定した様々な脂質組成のリポソームの形態を観察すると同時に、カンチレバーでリポソームを押し当てた際の負荷-変形曲線の傾きから膜剛性を直接定量できる「AFMを応用した計測手法」を確立している [Langmuir 32, 6074, 2016; 34, 7805, 2018; Anal. Chem. 91, 10432, 2019]。そこで本手法を用いて、作製したペプチドの脂質膜結合による膜剛性の変化 (膜摂動力) を定量し、細胞膜透過性および細胞毒性との相関を調査した。

アルギニンペプチドの物理化学的特性の評価

作製したペプチドの物理化学的特性として、「両親媒性ヘリックスの含量および脂質膜への結合親和性・膜疎水部への結合深さ」を明らかにするために、粒子径と脂質組成を制御したリポソームの系において、研究代表者らが過去に報告した円偏光二色性法およびペプチドのトリプトファン残基を利用する蛍光分光法 [Langmuir 27, 7099, 2011; Biochim. Biophys. Acta 1858, 1339, 2016; 1861, 541, 2019] を用いた解析を行った。

アルギニンペプチドの細胞膜透過性・細胞毒性の評価

細胞による能動的な物質の取り込み過程であるエンドサイトーシスの寄与を抑制した 4 の条件で、チャイニーズハムスター卵巣細胞系にペプチドを添加し、研究代表者らが過去に報告している共焦点レーザー顕微鏡法、フローサイトメトリー法、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 漏出アッセイ [Biochim. Biophys. Acta 1858, 1339, 2016; Biochim. Biophys. Acta 1861, 541, 2019] を用いて、ペプチドの細胞膜透過性および細胞毒性を評価した。本評価では、ペプチドの細胞膜透過を検出するために、低分子薬物モデルであり蛍光プローブとなるカルボキシフルオレセインを共有結合させたペプチド蛍光標識体を用いた。なお、細胞内へのペプチド蛍光標識体の移行 (細胞膜透過) は、ImageJ ソフトウェア [Nat. Methods 9, 671, 2012] を用いて、細胞内のカルボキシフルオレセイン由来の輝度解析を行い、定量評価した。

4. 研究成果

ペプチドの膜摂動力の検出と定量法の開発

「ペプチドが脂質膜の剛性を低下させる」仮説を視覚的に示す成果として、A2-17 の添加によるリポソームの形態変化を明らかにした (図 2)。本評価系では、カンチレバーで測定表面をなぞり、高さ情報に基づいて、固体基板に固定したリポソームの形態を画像化 (AFM イメージング) している。この時、リポソームの剛性由来する膜弾性エネルギーが固体基板への付着エネルギーよりも強い場合、リポソームの球状構造が観察される。反対に、膜弾性エネルギーが付着エネルギーに抵抗できなくなると、球状構造が崩壊しうる [Langmuir 25, 6997, 2009; Microscopy 65, 383, 2016]。したがって、A2-17 がリポソーム球状構造を脂質二分子膜へ変形させた現象 (図 2) は、同ペプチドの膜摂動力に起因していると考えられた。

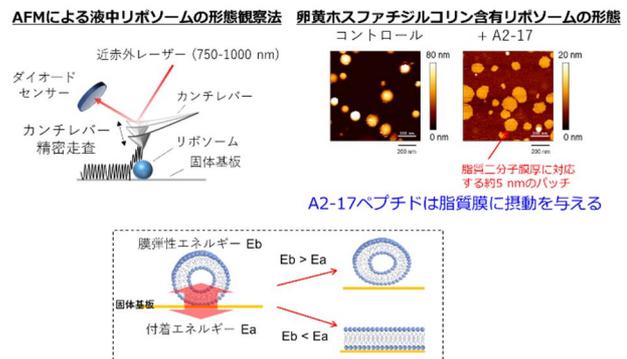


図2. AFMによるリポソームの形態観察とA2-17の膜摂動力の定性的な検出

さらに、飽和脂質で構成されるリポソームの球状構造がペプチド存在下でも維持される計測条件を見出し、観察されるリポソームに対してカンチレバーを押し当て得られる負荷-変形曲線の傾き (剛性) の変化を解析することで、ペプチドの膜摂動力を定量評価する AFM 計測手法を確立した (図 3)。本計測手法によって、A2-17 がリポソームの剛性を低下させる作用 (膜摂動力) を有することが定量的に明らかになったと同時に、様々なペプチドの膜摂動力の定量が可能になった。

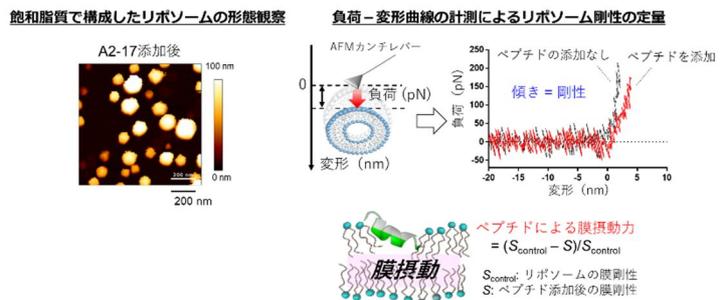


図3. AFMによるペプチド膜摂動力の定量法

ペプチドの膜摂動力と細胞膜透過

「1. 研究開始当初の背景」に記述した本研究の提唱する膜摂動機構を裏付ける成果を得た (図 4)。まず、図 1 に設計した A2-17 構造異性体の膜摂動力は、それらの疎水性モーメントとともに増加することを明らかにした。一方、A2-17 異性体の細胞内の移行率 (細胞膜透過性) は、疎水性モーメントの増加とともに向上する傾向が示された。しかし、A2-17 よりも疎水性モーメントおよび膜摂動力が高い A2-17 構造異性体 (L14R/R15L) の細胞膜透過性は、A2-17 と同等以下であった。また、L14R/R15L

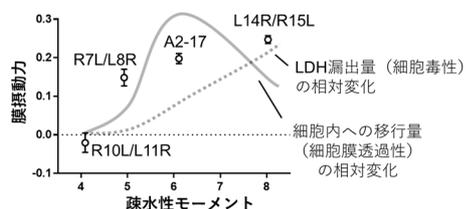


図4. 疎水性モーメント-膜摂動力-細胞膜透過性・毒性の関係

は、細胞の辺縁部に蓄積する傾向があり、同ペプチドの細胞膜への損傷を示す LDH 漏出量が、A2-17 の場合より大きいことが判明した。さらに、L14R/R15L は、脂質膜への結合に伴い両親媒性ヘリックス構造が安定化され、「脂質膜の疎水部への結合性」および「安定な膜孔の形成を誘起する性質」が、他の A2-17 構造異性体よりも顕著であることを明らかにした。

以上、研究代表者らが過去に開発した高い細胞膜透過性を有する A2-17 [Biochim. Biophys. Acta 1861, 541, 2019] は、細胞脂質膜に与える最適な摂動によって細胞膜を通過しているという膜摂動機構 (図 5) を裏付ける成果を得て、オープンアクセスの国際学術雑誌 Scientific Reports で論文発表を行った [Sci. Rep. 12, 4959, 2022]。本成果は、細胞膜透過性が高くかつ細胞毒性の低い薬物送達ペプチドの開発のために、AFM による膜摂動力の定量法の有用性を示すものになっており、令和 5 年度物理系薬学部会奨励賞によっても評価された。このように、研究目的に適った成果を収めることができ、科学研究費助成事業の支援に心より感謝申し上げます。

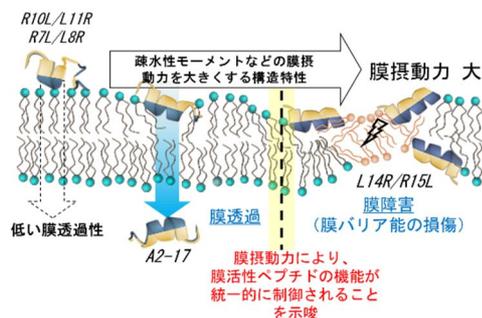


図5. ペプチドの膜摂動と機能

本研究の実施により、「膜に作用するペプチド (膜活性ペプチド) の膜摂動力は、本質的にその機能としての細胞膜透過性および細胞膜障害性に通じている」という新たな着想を得て、2023 年度からは、科学研究費助成事業基盤研究 (C)「膜活性ペプチドの細胞膜透過性・障害性を統一的に制御する機構の解明と方法論の構築 (課題番号: 23K06092, 2023-2025 年度)」において研究する機会を頂いている。当該研究課題では、本研究で確立した評価系を駆使しながら、細胞膜透過性または細胞膜障害性またはその両方の性質を有するより広範な膜活性ペプチドの構造特性と膜摂動力の関係について調査を進めていく。これにより、膜活性ペプチドを応用した薬物キャリアならびに抗がん/抗菌剤の開発に資する「細胞膜透過性と細胞膜障害性の制御に具備すべきペプチドの構造特性」について、基盤的知見を獲得していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuki Takechi-Haraya, Takashi Ohgita, Mana Kotani, Hiroki Kono, Chihiro Saito, Hiroko Tamagaki-Asahina, Kazuchika Nishitsuji, Kenji Uchimura, Takeshi Sato, Ryuji Kawano, Kumiko Sakai-Kato, Ken-ichi Izutsu, Hiroyuki Saito	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of hydrophobic moment on membrane interaction and cell penetration of apolipoprotein E-derived arginine-rich amphipathic α -helical peptides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-08876-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuki Takechi-Haraya, Takashi Ohgita, Yosuke Demizu, Hiroyuki Saito, Ken-ichi Izutsu, Kumiko Sakai-Kato	4. 巻 23
2. 論文標題 Current Status and Challenges of Analytical Methods for Evaluation of Size and Surface Modification of Nanoparticle-Based Drug Formulations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 AAPS PharmSciTech	6. 最初と最後の頁 150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1208/s12249-022-02303-y	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 Yuki Takechi-Haraya, Akiko Usui, Ken-ichi Izutsu, Yasuhiro Abe	4. 巻 112
2. 論文標題 Atomic Force Microscopic Imaging of mRNA-lipid Nanoparticles in Aqueous Medium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 648-652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2022.11.026	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Takechi-Haraya
2. 発表標題 Role of glycosaminoglycan interaction on direct cell membrane penetration of arginine-rich peptides
3. 学会等名 Wakayama Medical University International Symposium on Japan-France Glycopathophysiology 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原矢佑樹, 扇田隆司, 小谷真菜, 河野弘樹, 齊藤千尋, 朝比奈裕子, 西辻和親, 内村健治, 佐藤毅, 川野竜司, 加藤くみ子, 伊豆津健一, 齋藤博幸
2. 発表標題 両親媒性アルギニンペプチドの脂質膜相互作用および細胞膜透過に及ぼす疎水性モーメントの影響
3. 学会等名 日本膜学会第44年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原矢佑樹
2. 発表標題 原子間力顕微鏡法を用いたナノ脂質膜小胞の力学的特性計測法の開発とその応用
3. 学会等名 日本薬学会第143年会(物理系薬学部会シンポジウム)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 原矢佑樹, 齋藤博幸	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 580
3. 書名 新規モダリティ医薬品のための新しいDDS技術と製剤化 第4節 Cell-penetrating peptideの物理化学的特性評価	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	齋藤 博幸 (Saito Hiroyuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	扇田 隆司 (Ohgita Takashi)		
研究協力者	伊豆津 健一 (Izutsu Ken-ichi)		
研究協力者	川野 竜司 (Kawano Ryuji)		
研究協力者	西辻 和親 (Nishitsuji Kazuchika)		
研究協力者	内村 健治 (Uchimura Kenji)		
研究協力者	佐藤 毅 (Sato Takeshi)		
研究協力者	朝比奈 裕子 (Asahiina Hiroko)		
研究協力者	加藤 くみ子 (Kato Kumiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------