

## 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25年 6月25日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590109

研究課題名（和文）膜透過性 Aib 含有ペプチドの核酸医薬への応用

研究課題名（英文） Development of membrane-permeable Aib-containing peptide for delivery of oligonucleotide drugs

## 研究代表者

和田 俊一（WADA SHUN-ICHI）

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30278593

研究成果の概要（和文）：核酸医薬に用いられるオリゴヌクレオチドは、極性高分子のため細胞膜を透過することが困難である。そこで  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib) 含有膜透過性ペプチドをデザイン・合成し、このペプチドの膜透過性を利用して、オリゴヌクレオチドを細胞内に移行させることができた。さらにその細胞内に移行したオリゴヌクレオチドがアンチセンス効果を発揮することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Oligonucleotide (ODN) drugs have interesting therapeutic potentials in various biological applications. However, charged polar ODNs typically exhibit poor membrane permeabilization. My designed Aib-containing peptides show membrane permeable properties, and have the potential for delivery of ODNs into cells.

## 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	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：Aib・膜透過性ペプチド・ヘリックス・核酸医薬・アンチセンス

## 1. 研究開始当初の背景

核酸医薬品（アンチセンス、siRNA、リボザイム、アプタマー、デコイ核酸など）は、核酸をマテリアルとし、疾患関連分子の遺伝子発現や機能を抑制することで、病気の発症や進行を止める作用をもつ薬剤のことをさす。近年の遺伝子科学の発展に伴い、疾患関連遺伝子の同定が進み、今後益々、核酸医薬品の重要性が増加することが予測される。現在のところ核酸医薬品として場市されてい

る化合物は筆者の知るところ、Vitravene と Macugen の2種のみである。核酸導入分子の活発な開発研究は、ウイルスベクター、リポソーム、塩基性ペプチドなどの有用な方法論を生み出している。しかし、ウイルスベクターの使用は安全性の確保や抗原性の排除等の点に課題を残し、リポソーム、塩基性ペプチドは毒性やエンドサイトーシス機構によるエンドソームによるトラップ、核酸分子の細胞内への導入率等の問題点が残る。新規

の核酸導入分子の開発や方法論の確立は核酸医薬品発展にとって必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

核酸医薬品の開発の障壁となっているものの1つとして核酸分子の膜透過性の悪さが挙げられる。この問題点を克服可能な分子機能を兼ね備えた分子を開発できれば、今後急増すると予測される核酸医薬品の開発に大きく貢献することが期待できる。筆者がこれまでに発見した  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib) 含有ペプチド (TV-XIIa) は、非エンドサイトーシス機構 (受動輸送機構) で細胞膜を容易に透過し、細胞内に移行することを明らかにしてきた。そこで、Aib 含有ペプチドの膜透過機能を利用し、核酸医薬品の1つアンチセンスオリゴヌクレオチド (A-ODN) の細胞膜透過とそのアンチセンス効果を検討することを目的とする。A-ODN を用いるアンチセンス法とは、メッセンジャーRNA (mRNA) と相補的塩基配列を有する 20mer 程度のオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) を細胞内に導入し、mRNA と ODN が相補的に結合、タンパク質への翻訳を阻害する手法である。また、種々の Aib 含有ペプチドを合成し、細胞膜透過性を検討するとともに、核酸医薬品の細胞膜透過性への応用を検討する。

## 3. 研究の方法

(1)膜透過性ペプチド (TV-XIIa) を用いたオリゴヌクレオチドの細胞膜透過性及びアンチセンス効果を検討した。具体的には、以下の①及び②の方法で行い、どちらのタイプが膜透過作用、アンチセンス作用の点で優れているか検討した。

①静電的結合型 TV-XIIa-A-ODN 複合体の膜透過性:ペプチドの N-末端側に膜透過性ペプチド (TV-XIIa : Ac-U-N-I-I-U-P-L-L-U-P-Iol ; Ac: acetyl; U: Aib; Iol: isoleucinol), C-末端側に A-ODN 結合部位 [4~10 mer のリシン (K)] を配置し、リシン側鎖の正電荷と A-ODN のリン酸基の負電荷の静電的相互作用により複合体を形成し (静電的結合型), TV-XIIa の膜透過性を基盤に、複合体の細胞内への移行を検討した。

②共有結合型 TV-XIIa-A-ODN 複合体の細胞膜透過性及びアンチセンス効果:上記①とは分子設計を変え、直接、TV-XIIa と A-ODN 分子を共有結合させ、TV-XIIa-A-ODN 分子の膜透過作用、アンチセンス作用を検討した。

(2)Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドの細胞膜透過性の検討およびそれを用いたオリゴヌクレオチドの細胞膜透過性: Aib と Lys を組み合わせた両親媒性ヘリックスペ

プチドをデザインし、デザインしたペプチドの膜透過性及びオリゴヌクレオチドの細胞膜透過性について検討した。

## 4. 研究成果

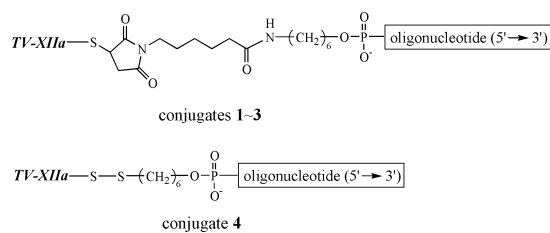
(1)膜透過性ペプチド (TV-XIIa)-オリゴヌクレオチドの細胞膜透過性及びアンチセンス効果。

①静電的結合型 TV-XIIa-A-ODN 複合体の膜透過性

TV-XIIa-(Lys)<sub>10</sub> を Fmoc 固相合成法で合成し、蛍光ラベル化 20mer ODN と静電的 complex を形成させた後、2種類の細胞 [マウス繊維芽細胞 (NIH3T3); ヒト肺がん腺細胞 (A549)] に種々の濃度で、37°C, 2h インキュベーション後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞膜透過性を観察した。NIH3T3 細胞においては、細胞膜を透過し細胞内にその complex が移行していることが分かったが、A549 細胞においては、complex が膜に集積し、細胞内に移行していないことが分かった。また、濃度を上昇させると細胞毒性を示すことがわかった。

②共有結合型 TV-XIIa-A-ODN 複合体の細胞膜透過性及びアンチセンス効果

TV-XIIa-A-ODN コンジュゲート体の合成に関しては、架橋試薬 *N*-6-maleimidocaproyloxysuccinimide 或いは、2,2'-dipyridyl disulfide を用いて、C-末端にシステインを結合させた TV-XIIa と ODN の 5'-末端にアミノ基或いはチオール基を有した 20mer ODN とを反応させることを行って行った。用いた ODN の塩基配列は、p53 遺伝子のエクソン 10 の 1071-1090 番目に対するアンチセンス鎖、及びネガティブコント



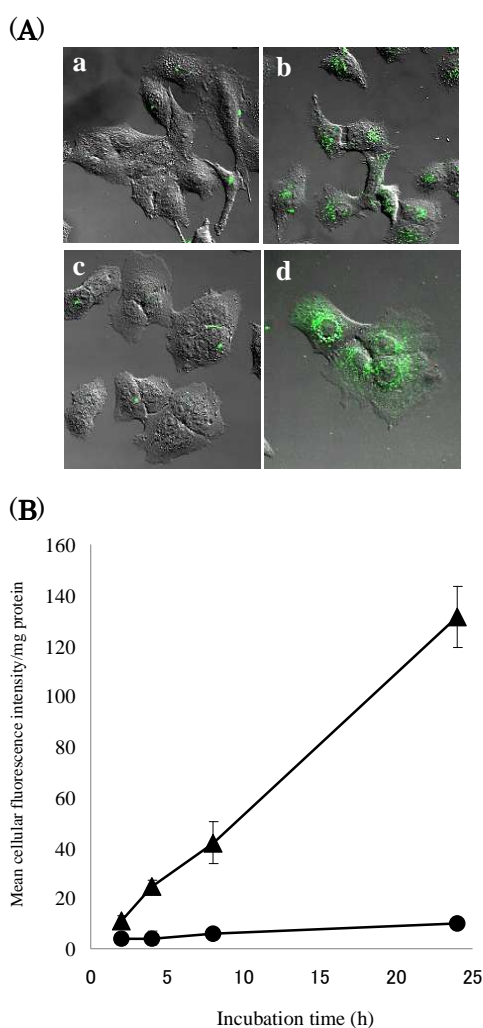
conjugate	oligonucleotide (5'→3')
1	CCCTGCTCCCCCTGGCTCC-FI <sup>a</sup>
2	CCCTGCTCCCCCTGGCTCC <sup>b</sup>
3	GGAGCCAGGGGGGAGCAGGG <sup>c</sup>
4	CCCTGCTCCCCCTGGCTCC <sup>b</sup>

<sup>a</sup>FI: fluorescein. <sup>b</sup>アンチセンスオリゴヌクレオチドはホスホロチオエート体を用い、その塩基配列は p53 遺伝子のエクソン 10 に位置する 1071-1090 番目の塩基配列に対して相補的塩基配列を有するものを用いた。 <sup>c</sup>コントロールとしてそのセンス鎖を用いた。

Fig. 1 TV-XIIa-オリゴヌクレオチド コンジュゲート体の構造

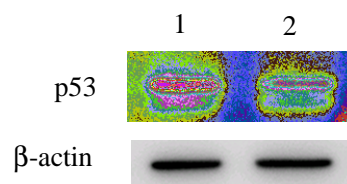
ロールとしてそのセンス鎖を用いた (Fig. 1). 蛍光ラベル化コンジュゲート体 **1** の A549 細胞に対する膜透過能について Fig. 2 に示した. TV-XIIa が結合していない蛍光ラベル化 20mer ODN のみでは, ほとんど膜透過が認められなかったが, コンジュゲート体 **1** は濃度及び時間依存的に細胞内に移行していることが分かった. また, コンジュゲート体は, 10  $\mu\text{M}$ , 24h インキュベーションしても毒性を示さなかった.

次に, コンジュゲート体 **2~4** を用いて A549 細胞の p53 タンパク質の発現に対す



**Fig. 2** TV-XIIa-オリゴヌクレオチド コンジュゲート体 **1** の A549 細胞に対する膜透過性. (A) 共焦点レーザー顕微鏡像. TV-XIIa が結合していない蛍光ラベル化 20mer ODN (a, c) 或いはコンジュゲート体 **1** (b, d) を 1.0  $\mu\text{M}$ , 37°C, 2h (a, b) 或いは 24h (c, d) インキュベーションした. (B) 細胞内移行量の時間変化. TV-XIIa が結合していない蛍光ラベル化 20mer ODN (●) 或いはコンジュゲート体 **1** (▲) を 1.0  $\mu\text{M}$ , 37°C, 2~24 h インキュベーションした.

るアンチセンス効果をウエスタンブロット法を用いて検討した. 1  $\mu\text{M}$  の濃度においては, アンチセンス鎖を有するコンジュゲート体 **2** 及び **4** はほとんど活性を示さなかったが, 5  $\mu\text{M}$  に濃度を上昇させると, それぞれ 50%, 20% のタンパク質発現量の低下が認められた (Fig. 3). 一方, コントロールのコンジュゲート体 **3** はまったく阻害作用を示さなかった. しかし, トランスフェクション試薬である lipofectamine 2000 の阻害率 (A-ODN 1  $\mu\text{M}$  で約 80% 阻害) に比べると弱いものであった. 細胞毒性の観点からみると, lipofectamine 2000 の顕著な細胞毒性に対してコンジュゲート体はほとんど細胞毒性を示さない. これらの結果から考慮すると, TV-XIIa は核酸医薬品に用いられるオリゴヌクレオチドを毒性を示さず細胞内に移行させ, その機能を発現させることができたことから, TV-XIIa が有用なデリバリーツールになる可能性を示すことができた.



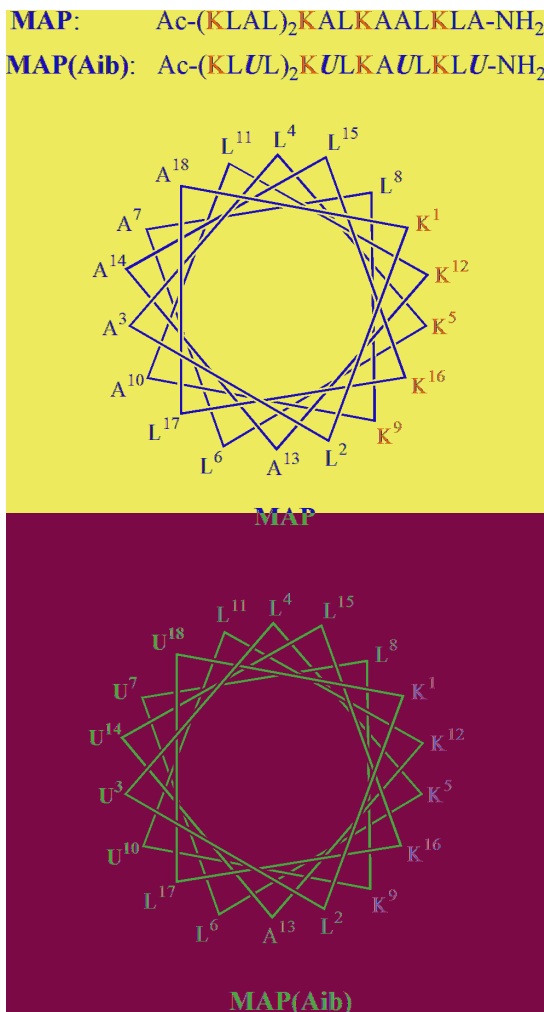
**Fig. 3** TV-XIIa-オリゴヌクレオチド コンジュゲート体 **2** のアンチセンス効果

レーン 1: 無処理 (細胞のみ); レーン 2: 5  $\mu\text{M}$  のコンジュゲート体 **2**

(2) Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドの細胞膜透過性の検討およびそれを用いたオリゴヌクレオチドの細胞膜透過性

膜透過性ペプチド MAP (Model Amphipathic Peptide) は, 疎水性アミノ酸 (Leu, Ala) と親水性塩基性アミノ酸 (Lys) を組み合わせてデザインされた両親媒性ヘリックスペプチドである. この MAP の細胞膜透過性や MAP を用いた核酸分子のデリバリーが報告されている [Oehlke, J. et al., *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes*, **1414**, 127 (1998); *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4025 (2002)].

筆者がこれまで扱ってきた Aib をペプチド中に組み込むと, コンフォメーションの自由度が制限され, そのペプチドはヘリックス構造を指向することが知られており, また脂溶性の増大による膜に対する親和性の上昇や生体内での安定性の上昇などが認められる. そこで MAP 中の Ala 残基を Aib に置換 [MAP(Aib)] すれば, 膜への親和性上昇による膜透過性の向上や生体内での安定性 (酵素耐性) を有した膜透過性ペプチドを創製できるのではないかと考え, MAP(Aib) の合成,



**Fig. 4** MAP と MAP(Aib) のアミノ酸配列とヘリカルホイールダイアグラム

評価を行った (Fig. 4).

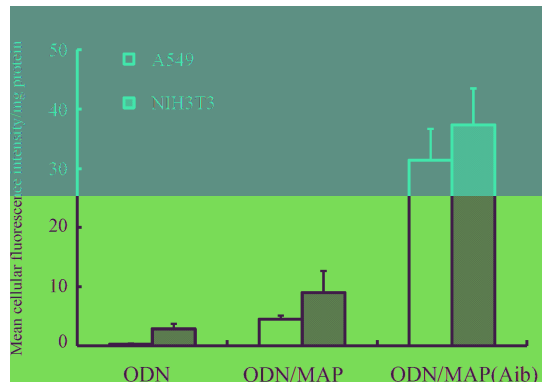
まずコンフォメーションについては、Tris-バッファー/トリフルオロエタノール中で、両者は類似したヘリックス構造をとり、デザインした MAP(Aib) が目的とした両親媒性ヘリックス構造を取っていることを示唆した。

またトリプシンやプロナーゼに対する酵素安定性については、MAP(Aib) が両酵素に対して強い耐性を示すことがわかった。

ペプチドの膜透過性を A549 細胞を用いて検討した。蛍光ラベル化した MAP 及び MAP(Aib) を 0.5~2.0 $\mu$ M で 37 $^{\circ}$ C、3~24h インキュベーションすると、両ペプチドとも濃度、時間依存的に細胞膜を透過し、細胞内に移行することが分かった。細胞膜透過性は、MAP(Aib) が MAP よりも強いことが分かった。

次に、これらペプチドを用いた ODN の細胞内導入を検討した。静電的相互作用により ODN/ペプチド (0.1  $\mu$ M/2.0 $\mu$ M) の複合体を

調製し、その複合体を、37  $^{\circ}$ C、3h、細胞に作用させた。MAP 及び MAP(Aib) は、双方ともオリゴヌクレオチドを細胞内に移行させ、それらは細胞質内に局在していることが分かった。また細胞内移行量を定量的に評価すると、MAP (Aib) は MAP より顕著に移行量が多いことが分かった (Fig. 5)。以上の結果から、Aib をペプチド中に組み込むことによって、より優れた膜透過性ペプチドを創製することができた。



**Fig. 5** MAP と MAP(Aib)-オリゴヌクレオチド複合体の細胞内取り込み

蛍光ラベル化 ODN のみ、蛍光ラベル化 ODN/ペプチド (0.1  $\mu$ M/2.0 $\mu$ M) を、37  $^{\circ}$ C、3h インキュベーション後、細胞ライセートを作製し、蛍光光度計を用いて測定した

## 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 2 件)

- ① Cellular Uptake of Covalent Conjugates of Oligonucleotide with Membrane-modifying Peptide, Peptaibol, Shun-ichi Wada, Yasunari Hitora, Saori Yokoe, Osamu Nakagawa, and Hidehito Urata, *Bioorg. & Med. Chem.*, 20, 3219-3222 (2012), 査読有, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.054>
- ② Cellular Uptake of Aib-containing Amphipathic Helix Peptide, Shun-ichi Wada, Hirokazu Tsuda, Terumi Okada, and Hidehito Urata, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 21, 5688-5691 (2011), 査読有, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.08.030>

[学会発表] (計 6 件)

- ① 橋本佑樹, 津田浩和, 中川治, 和田俊一, 浦田秀仁, Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドを用いたオリゴヌクレオチドの細胞内移送, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27 日, 横浜

- ② 和田俊一, 橋本侑樹, 津田浩和, 中川治, 浦田秀仁, Designed Aib-containing amphipathic helix peptide for oligonucleotide delivery into cells, 第 49 回ペプチド討論会, 2012 年 11 月 8 日, 鹿児島
- ③ 和田俊一, 横江沙緒里, 人羅康匠, 中川治, 浦田秀仁, TV-XIIa-オリゴヌクレオチド複合体のアンチセンス効果の検討, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 30 日, 札幌
- ④ 津田浩和, 岡田てる美, 和田俊一, 浦田秀仁, Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドを用いたオリゴヌクレオチドの細胞膜透過性検討, 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011 年 11 月 22 日, 神戸
- ⑤ 和田俊一, 人羅康匠, 横江沙緒里, 浦田秀仁, Conjugates of antisense oligonucleotides with Aib-containing peptide: effects on cellular uptake and antisense effect, 2011 年 9 月 28 日, 札幌
- ⑥ 津田浩和, 岡田てる美, 和田俊一, 浦田秀仁, Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドの細胞膜透過性, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 31 日, 静岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 俊一 (WADA SHUN-ICHI)  
大阪薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：30278593

### (2) 研究分担者

浦田 秀仁 (URATA HIDEHITO)  
大阪薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：80211085