

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650283

研究課題名(和文) ガングリオシド結合性ペプチドを用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発

研究課題名(英文) Development of novel drug delivery system using ganglioside-binding peptides

研究代表者

佐藤 智典 (Sato, Toshinori)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：00162454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞標的性のドラッグデリバリーシステム(DDS)の設計として、エンドサイトーシス経路を制御した細胞内導入を達成するペプチドの開発を行なった。そのために、細胞膜に存在するガングリオシド(GM3およびGM1)に結合するペプチドをファージライブラリー法で探索して、細胞認識素子として用いた。それらペプチド提示リポソームおよびペプチド修飾タンパク質を作製して、細胞内導入機構や細胞内局在などの評価を行なった。その結果、ペプチド特異的な細胞内導入が達成され、ラフト/カベオラ介在型のエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが明らかとなった。これにより新たなDDSの素材の開発を行なった。

研究成果の概要(英文)：For the design of cell-targetable drug delivery system (DDS), the development of peptides which achieve the selective endocytosis was carried out. For this purpose, the peptides which bind to cell surface ganglioside (GM3 and GM1) were selected by phage-displayed peptide library method, and were employed as cell recognition device. The peptide-displayed liposomes and the peptide-conjugated proteins were prepared, and cell uptake mechanism and sub-cellular localization were investigated. The GM3- and GM1-binding peptides showed sequence-specific interaction with cells, and the liposomes and proteins modified with the peptides were efficiently uptaken by raft/caveolae-mediated endocytosis. It was found that the ganglioside-binding peptides developed in the present study are novel cell-penetrating peptides.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ペプチド リポソーム 細胞内導入 エンドサイトーシス フローサイトメーター 共焦点レーザー顕微鏡 脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に存在しているスフィンゴ糖脂質は、毒素やウイルスなどの受容体として感染症等の疾病に関与していることが知られている。本研究者は、糖鎖と抗体、毒素、レクチン、ウイルスおよび細胞との相互作用に関する研究を行ってきた (BBA(1996), (1998)など)。また、糖鎖認識デバイスの開発を目指して、ファージ提示ペプチドライブラリーを用いて糖脂質 (特にガングリオシド GM3 および GM1) に結合するペプチドの探索を行ってきた (TIGG (2007))。得られたガングリオシド結合性ペプチドは、糖脂質のクラスター (Langmuir (2007)) や老齢マウスのシナプトゾーム (BBA(2008)) への高い親和性を有していた。さらに、コレラ毒素と受容体分子 GM1 との結合を阻害し (FEBS Lett. (1999))、インフルエンザウイルスの感染を阻害する (J. Med. Chem. (2009)) などの優れた機能を有していた。このようなガングリオシド結合性ペプチドの探索を世界に先駆けて成功し、新規な機能を明らかにしてきた。ところが、ごく最近、GM3 結合性ペプチドを修飾したアビジン-ビオチン複合体と細胞との相互作用を観察したところ、ラフト/カベオラ介在型のエンドサイトーシスにより高効率に取り込まれることを見いだした。膜透過性ペプチドとして知られている HIV 由来 TAT ペプチドやポリアルギニンとは取り込み機構が異なっていた。カベオラを介した経路で取り込まれるウイルスとしては Simian Virus (SV40) が知られている。しかしながら、糖鎖認識性を有するラフト/カベオラ介在型の DDS はこれまでに確立されていない。そこで、ガングリオシド結合性ペプチドをラフト/カベオラの認識デバイスとして利用することで、タンパク質や核酸などのバイオ医薬品に対する新規な DDS の開発を着想した。

2. 研究の目的

細胞標的性のインテリジェントなドラッグデリバリーシステム (DDS) の設計においては、細胞内への取り込み機構と細胞内輸送経路の解析が不可欠である。細胞内への取り込み経路として、ラフト/カベオラ介在、マクロピノサイトーシス、およびクラスリン介在が知られている。本研究では、ラフト/カベオラ依存型エンドサイトーシ

スによる細胞内導入を目指した DDS の開発を行う。そのために、ラフト/カベオラに存在するガングリオシド (GM3 や GM1 など) に結合するペプチドを細胞認識デバイスとして用いる。ペプチドの認識を利用したりポソームあるいはタンパク質などの細胞内導入機構、細胞内導入後の輸送経路や局在の解析、タンパク質やオリゴ核酸の活性評価を行う。ラフト/カベオラ介在型の DDS の特徴と意義について検討することで、本研究で開発するペプチドの特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

1) ガングリオシド結合性ペプチドの探索

ファージディスプレイ法の概要は図 1 に示した。シアル酸を有するスフィンゴ糖脂質 (ガングリオシド) を含んだ気-液界面単分子膜を作製し、疎水性の基板に 1 層累積する。15 残基のペプチドライブラリーを含んだファージを用いて、ガングリオシド結合性のペプチド配列を探索する。GM1 および GM3 などのガングリオシドに結合するペプチド配列を同定した。

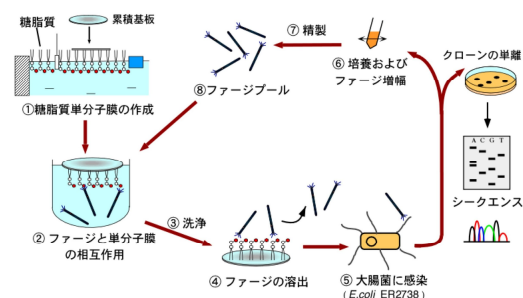


図 1 ファージライブラリー法の概要

2) ペプチドを結合したバイオコンジュゲートの設計

ペプチドを結合したバイオコンジュゲートを作製した。

ビオチン化ペプチドとしては、ガングリオシド結合性ペプチド配列の末端にビオチン化リジンを経延長した配列を自動合成機で作製した。蛍光標識アビジンと混合することでアビジン-ビオチン複合体 (ABC 複合体) を作製した。

ペプチド提示リポソームの作製においては、シアル酸含有オリゴ糖鎖に結合するペプチドとして、GM3 および GM1 結合性ペプチドを用いた。ペプチド末端にアルキル基を導入することで、リポソームへの提示を行なった。薄膜水和法と押し出し法を用い

て卵黄ホスファチジルコリン (EggPC) およびコレステロール (Chol) から成るリポソームを作製し、EggPC に対して 3.85 mol% のステアリル化ペプチド (C18-c01) を加えることで、ペプチド提示リポソームを作製した。蛍光標識された脂質を、EggPC に対して 0.20 mol% 加えてリポソームを標識した。

ペプチド融合 GFP は GFP 発現ベクターにペプチド配列を導入し、大腸菌で発現させることによって調製した。ペプチドは GM3 結合性 c01 ペプチドおよびコントロールとして既知の細胞膜透過性ペプチドである TAT ペプチドを用いた。

3) ペプチドの糖鎖認識性の定量的評価

ペプチド提示リポソームのガングリオシドに対する認識は表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて評価した。ペプチドと糖脂質単分子膜との相互作用を定量的に評価して、ペプチドと糖鎖との結合特異性および親和性について検討した。

4) ペプチドと細胞との相互作用の解析

ペプチドを担持した ABC 複合体あるいはペプチド提示リポソームと細胞との相互作用をフローサイトメーター (FCM) および共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により解析した。細胞としては、GM3 を発現する B16 メラノーマ細胞および GM3 と GM1 を高発現する COS7 細胞などを用いた。細胞内への取り込み経路 (ラフト/カベオラ、マクロピノサイトーシス、クラスリン) を各種阻害剤 (MβCD、フィリピン、サイトカラシン D、クロルプロマジンなど) を用いて解析した。カベオラやクラスリンへの局在は、抗カベオリン抗体やトランスフェリンとの共局在により観察した。細胞内輸送経路についても阻害剤 (バフィロマイシンやノコダゾールなど) を用いて解析した。ゴルジや小胞体への移行は、各オルガネラ標識プローブとの共局在により観察した。TAT ペプチドなどをコントロールとして細胞内輸送経路の比較解析を行ない、ガングリオシド結合性ペプチドの細胞内動態の解明を行なった。

ペプチド融合 GFP と HeLa 細胞との相互作用も同様に共焦点レーザー顕微鏡またはフローサイトメーターを用いて検討した。さらにガングリオシド結合性ペプチドの糖鎖特異性はシアル酸を共投与することにより

評価した。また細胞内移行メカニズムはエンドサイトーシス阻害剤を使用することにより評価した。

4. 研究成果

1) ペプチド融合タンパク質の細胞内へのデリバリー

GM3 結合性 c01 ペプチドを有する ABC 複合体と HeLa 細胞との相互作用をフローサイトメトリー法により定量的に評価した。その結果、細胞と相互作用する複合体の量は時間依存的に増加した。投与後 90 分で c01 ペプチド複合体と TAT 複合体を比較すると、TAT 複合体の方が細胞と相互作用している複合体の量は多かったが、細胞内に取り込まれている複合体の量はほぼ同程度であった。さらに c01 複合体では相互作用した複合体の 90% が取り込まれたのに対して、TAT 複合体では 32% しか取り込まれていなかった。つまり、c01 複合体の方が効率よく細胞内に取り込まれていた。次に糖鎖認識の関与を知るためにシアル酸を共投与した。フローサイトメトリーでの測定により、c01 複合体は取り込みが 55% 阻害されたのに対して、TAT 複合体では 16% しか阻害されなかった。また共焦点レーザー顕微鏡の結果からも、シアル酸存在下での c01 ペプチドの取り込みの減少が観察された。これより、c01 ペプチドは細胞表面のシアル酸含有糖鎖特異的に細胞と相互作用していることが示唆された。

次に、エンドサイトーシス阻害剤を用いて、ペプチド複合体の細胞内移行メカニズムを調べた。結果、c01 複合体はカベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤である MβCD で取り込みが大幅に減少した。一方、TAT 複合体は MβCD やマクロピノサイトーシス阻害剤であるサイトカラシン D で取り込みが減少した。このことより、c01 複合体はカベオラ介在性エンドサイトーシスで取り込まれるのに対して、TAT 複合体はカベオラ介在性エンドサイトーシスやマクロピノサイトーシス経路の複数の経路で細胞内に取り込まれることが示唆された。一方、クラスリン介在性エンドサイトーシスは取り込みに関与していないことが示唆された。さらに、カベオラの主要要素であるカベオリン-1 とペプチド複合体の共局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。結果、c01 複合体のほとんどがカベオリン-1 と共局在していたのに対して、TAT 複合体は一部

しか共同在していなかった。このことは、c01 複合体は主にカベオラ介在性エンドサイトーシスでのみ取り込まれ、TAT 複合体は複数の経路で取り込まれるというエンドサイトーシス阻害実験の結果と良い相関が見られた。

2) ペプチド融合タンパク質の細胞内へのデリバリー

GM3 結合性 c01 ペプチドを融合した GFP と HeLa 細胞との相互作用を共焦点レーザー顕微鏡とフローサイトメーターを用いて検討した。シアル酸を共投与した結果、c01 融合 GFP の取り込みは 75% 阻害されたのび対して、TAT 融合 GFP は 21% しか阻害されなかった。このことより、c01 融合 GFP はシアル酸含有糖鎖特異的に細胞と相互作用していることが示唆された。また、エンドサイトーシス阻害剤を用いた実験では、ペプチド複合体を用いた実験の結果と同様に、c01 融合 GFP はカベオラ介在性エンドサイトーシスで取り込まれ、TAT 融合 GFP は複数の経路で取り込まれることを示唆するものであった(図2)。さらにリソソーム標識試薬であるライソトラッカーとペプチド融合 GFP の共同在を観察した結果、c01 融合 GFP では共同在は観察されなかったが、TAT 融合 GFP では共同在が観察された。

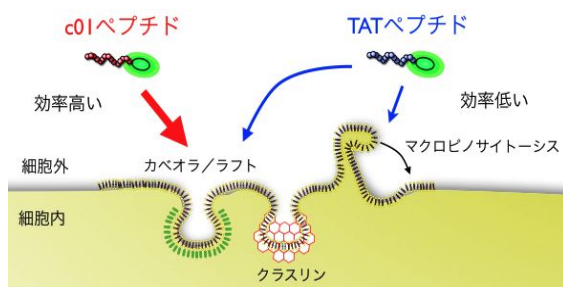


図2 ペプチド修飾 GFP の細胞内への取り込み機構

3) GM3 結合性 c01 ペプチド提示リポソームの糖鎖認識性と細胞内へのデリバリー

ペプチド提示リポソームと糖脂質単分子膜との相互作用は表面プラズモン共鳴法により定量した。c01 ペプチドの提示により、リポソームの GM3 単分子膜への結合量は増加した。リポソーム (EggPC/Chol = 100 : 50) の GM3 単分子膜への結合は、ほとんど観察されなかったのに対し、c01 ペプチド提示リポソーム (EggPC/Chol/C18-c01 = 100 : 50 : 3.85) では、[EggPC] = 75 μ M の時に約 5,000 ~ 7,000 RU の結合量が観察

された。一方、Chol を含んでいない c01 ペプチド提示リポソームおよび EggPC と等モルの Chol を含んだ c01 ペプチド提示リポソームでは結合が観察されず、適度なコレステロールの存在がペプチドの糖鎖認識に必要であることが示された。

さらに、c01 ペプチド提示リポソーム (EggPC/Chol/C18-c01 = 100 : 50 : 3.85) と細胞との相互作用を CLSM により観察した。短時間では形質膜表面に強い蛍光が観察され、投与 1 時間後から細胞内への取り込みが見られ、2 時間以降では細胞内での強い蛍光が観察された。また、c01 ペプチド提示リポソームを 4 で B16 細胞と相互作用させた際には、細胞内での蛍光が観察されなくなったことから、細胞内への取り込みにエンドサイトーシスが寄与していることが示された。

c01 ペプチド提示リポソームは、そのペプチド配列依存的に効率良く細胞内に取り込まれた。また、エンドサイトーシス阻害実験により、カベオラ介在性エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスの両方が細胞内への取り込みに寄与していることが示唆された。

4) GM1 結合性 p3 ペプチドを用いた細胞との相互作用

ビオチン化した p3 ペプチドと蛍光標識したアビジンとの ABC 複合体を作製した。GM1 を発現している COS7 細胞、HeLa 細胞、MDCK 細胞、GM1 を発現していない B16 細胞に投与した。また、COS7 細胞および B16 細胞を用いて、p3 ペプチド ABC 複合体の配列特異性、濃度依存性、時間依存性を CLSM および FCM を用いて検討した。4 種の細胞に p3 ペプチド複合体を投与し CLSM で観察したところ、B16 細胞以外は細胞内へ多く取り込まれることがわかった。そこで、取り込み量が多かった COS7 細胞との相互作用の検討を行った。

COS7 細胞において、p3 ペプチドの配列依存性を FCM で測定した結果、コントロールの糖鎖結合性を有していないペプチド複合体と比較して p3 ペプチド複合体の結合量に有意差が見られた。次に、複数の濃度での p3 ペプチド複合体を投与したところ、ペプチド複合体濃度依存的な細胞との相互作用が見られた。さらに、p3 ペプチド複合体と細胞との相互作用時間を検討したところ、相互作用時間が短いと主に細胞表面に結合しており、相互作用時間が長くな

るに伴い細胞内へ取り込まれていた。以上の様に、COS7 細胞と B16 細胞の p3 ペプチド複合体の相互作用の比較では、配列依存性、濃度依存性、時間依存性の検討の結果すべてにおいて、COS7 細胞の方が p3 ペプチド複合体と相互作用していた。さらに、取り込み経路を CLSM で観察した結果、COS7 細胞においては主にカベオラ/ラフト介在エンドサイトーシスで取り込まれ、リソソームへの移行は少なかった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Carbohydrate recognition by pentadecapeptide ligands for a series of sialylated oligosaccharides, T. Matsubara, A. Onishi, T. Sato, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20**, 6452-6458 (2012) 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 糖脂質からスタートした糖鎖生命工学の展開、佐藤 智典、GlycoTOKYO2013 シンポジウム、2013 年 10 月 19 日、成蹊大学(特別講演)
2. ペプチド提示リポソームのシアル酸含有糖鎖を介した細胞内への取り込み機構の解析、松原 輝彦・木村 尊斗・金智英・佐藤 智典、第23回バイオ・高分子シンポジウム、2013年8月1日、東工大
3. Development of A Novel Cell-Penetrating Peptide for Intracellular Delivery of Proteins and Liposomes, T. Sato, R. Ohtani, T. Kimura And T. Matsubara, The 40th Annual Meeting of The Controlled Release Society, July 21 – 24, 2013, Hawaii Convention Center, Honolulu
4. GM3 結合性ペプチドを用いたリポソームの細胞内導入効率の向上、藤本 美穂、木村 尊斗、金 智英、松原 輝彦、佐藤 智典、第 63 回高分子学会年次大会、2013 年 5 月 29 日、名古屋国際会議場
5. GM3結合性ペプチドを提示したリポソームの選択的なカベオラ介在性エンドサイトーシス、木村尊斗、金智英、松原輝彦、佐藤 智典、日本化学会第93春季年会、2013年3月25日、立命館大
6. シアル酸含有糖鎖に結合するペプチドで行うタンパク質の細胞内輸送、松原輝彦、木村 尊斗、金 智英、大谷 亮平、山下 美季、佐藤 智典、第61回高分子討論会、2012年 9月20日、名古屋大学

7. 細胞表面の糖鎖クラスターを検出するペプチドの分子設計、松原 輝彦、飯島一智、加藤 大貴、佐藤 智典、第22回バイオ・高分子シンポジウム、2012年6月26日 東京大学

8. GM3結合性ペプチドを提示したリポソームとB16細胞との相互作用機構の解析、木村 尊斗、金 智英、青山 由果、松原 輝彦、佐藤 智典、第22回バイオ・高分子シンポジウム、2012年6月25日、東京

9. GM3結合性ペプチドを修飾したリポソームと細胞との相互作用、木村 尊斗、金 智英、松原 輝彦、佐藤 智典、第61回高分子学会年次大会、2012年 5月29日、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 智典 (SATO, Toshinori)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：00162454