

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 機能分子創製化学研究室
職・氏名 准教授・和田 俊一

研究テーマ：

miRNA 創薬を目指した医薬連携研究

研究期間：

2018 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 和田 俊一 (大阪薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 浦田 秀仁 (大阪薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 林 淳祐 (大阪薬科大学・薬学部・助教)

<共同研究機関>

研究代表者 内山 和久 (大阪医科大学・一般・消化器外科学教室・教授)

研究分担者 谷口 高平 (大阪医科大学・トランスレーショナルリサーチ部門 (一般・消化器外科学教室)・副部門長)

研究目的：

共同研究者の谷口らは、microRNA (miRNA)-143 及び -145 が膀胱癌や大腸癌で抗腫瘍効果を示すことを明らかにし、これらが miRNA 創薬の有力なシーズであることを明らかにしてきた。しかし、RNA 創薬を実現するためには RNA 分解酵素の制御と薬物輸送システム (DDS) の開発研究が必須であり、現在、この分野に関する研究が活発に行われているが、臨床応用されているものは RNAi 治療薬である Patrisiran に用いられている脂質ナノ粒子のみでその数はまだ少ない。我々は、アミノ酸の一種である α -aminoisobutyric acid (Aib, U) とリシン (Lys, K) などを組み合わせた両親媒性ヘリックスペプチドに癌細胞標的認識能を付与させたペプチド性 DDS デバイス、MAP(Aib)-cRGD (PI) (Fig. 1) を開発し、このデバイスが、分解酵素に対して耐性を示しつつ RNA を細胞内に効率良く導入することを明らかにしてきた。また PI は直接的な細胞膜透過を示すため、多くの DDS デバイスが生じるエンドソームトラップを回避できるという特長を有している。そこで本申請研究では、このペプチド性 DDS デバイスを用いて miRNA の細胞へのデリバリー効果を検討し、miRNA 創薬へと展開することを目的とする。

acetyl-KLULKLULKULKAULKLUGC20(cRGDfC)-NH₂

Fig. 1. Sequence of MAP(Aib)-cRGD (PI).

Letter U in the sequence: α -aminoisobutyric acid (Aib). The conjugation of Aib-containing peptide with cRGD was conducted via the formation of a disulfide bond.

研究内容および研究成果：

Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチド MAP(Aib) の C-末端に cRGDfc を結合させた MAP(Aib)-cRGD (PI) が、抗癌作用を有する microRNA-145-5p の DDS キャリアとして有用であることを明らかにした。

まず 4 種の細胞 (A549, U-87 MG, WiDr, NIH3T3) を用いて、静電的相互作用で形成した PI /AlexaFluor488-labeled 2 本鎖 RNA complex (1.2 μM/23 nM) の細胞内導入効果を検討した。4 種の細胞それぞれに血清存在下、上記 PI/RNA complex を加え、37 °C, 24 h インキュベーション後、細胞溶解液の蛍光を測定することで細胞導入効果を評価した。その結果、癌細胞である A549, U-87 MG, WiDr の順に complex が細胞内に導入されやすく、正常細胞である NIH3T3 細胞は最も導入されにくかった。

次に PI /miRNA-145-5p complex (1.0 μM/20 nM) を大腸癌細胞である WiDr 或いは DLD-1 細胞に 37 °C, 60 h 作用させ、各種タンパク質の発現量の変動をウェスタンブロット法で評価し、同時に細胞増殖抑制効果の検討を行った。各種タンパク質の発現量の変動に関しては、miRNA-145-5p の代表的なターゲット遺伝子である FSCN 由来タンパク質 (FSCN1) の発現量の減少が認められ (Fig. 2), またアポトーシス関連タンパク質 (cleaved PARP1, cleaved CASP3) の発現誘導が認められた。さらにその PI /miRNA-145-5p で処理した細胞の核を Hoechst 33342 で染色したところ、核の断片化が認められたことからアポトーシスが誘導されていることが分かり、実際、細胞増殖抑制効果も認められた。さらに、Akt 阻害剤である perifosine と PI /miRNA-145-5p との併用は、アポトーシス誘導の相加作用が認められた。これらの結果から、miRNA-145-5p の DDS キャリアとして PI が有用であることを明らかにした。これらの結果は、以下の雑誌等に発表した。

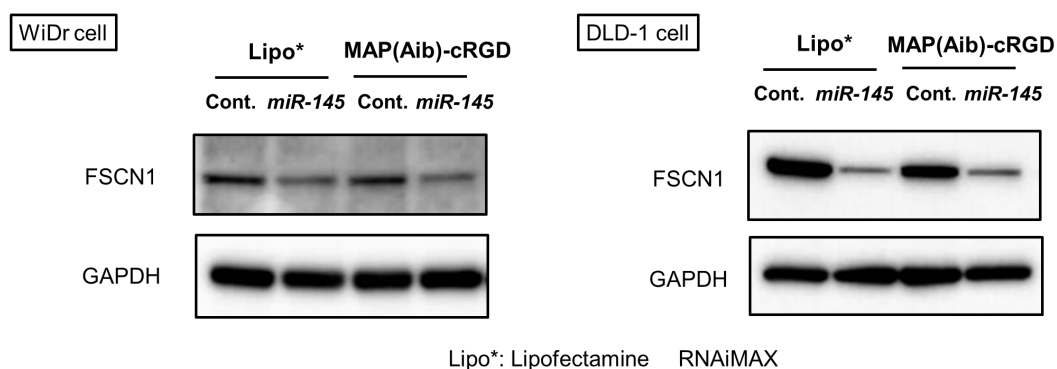


Fig. 2. FSCN1 expressions in WiDr and DLD-1 cells.

Lipo*: Lipofectamine RNAiMAX; MAP(Aib)-cRGD: PI

成果発表：

<原著論文>

- S. Wada, K. Taniguchi, H. Hamazaki, A. Yamada, J. Hayashi, K. Uchiyama, H. Urata.
Influence of lysine residue in amphipathic helical peptides on targeted delivery of RNA into cancer cells
Bioorg Med Chem Lett. 29(15), 1934-1937 (2019).
- K. Taniguchi, S. Wada, Y. Ito, J. Hayashi, Y. Inomata, S.-W. Lee, T. Tanaka, K. Komura, Y. Akao, H. Urata, K. Uchiyama

α -Aminoisobutyric acid-containing amphipathic helical peptide-cyclic RGD conjugation as a potential drug delivery system for microRNA replacement therapy in vitro

Mol. Pharm., 16(11), 4542-4550, (2019).

<学会発表>

- S. Wada, K. Taniguchi, H. Hamazaki, A. Yamada, J. Hayashi, K. Uchiyama, H. Urata
Delivery of siRNA and microRNA into Cells by Aib-containing Amphipathic Helical Peptides
10th International Peptide Symposium, 2018 年 12 月 (Kyoto)
- 和田俊一, 谷口高平, 林淳祐, 内山和久, 浦田秀仁
ペプチド性キャリア MAP(Aib)-cRGD による microRNA-145 の細胞内導入
日本薬学会第 139 年会, 3 月 (千葉)
- 和田俊一, 谷口高平, 林淳祐, 内山和久, 浦田秀仁
Aib 含有ペプチドによる microRNA-145 の細胞内導入大腸癌細胞増殖抑制効果
第 37 回 メディシナルケミストリーシンポジウム, 11 月 (東京)

<その他>

- S. Wada, K. Taniguchi, H. Hamazaki, A. Yamada, J. Hayashi, K. Uchiyama, H. Urata
Delivery of siRNA and microRNA into Cells by Aib-containing Amphipathic Helical Peptides
Peptide Science 2018 (日本ペプチド学会, プロシーディング)