

## 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：

Aib 含有ヘリックスペプチドを基盤としたエンドソーム脱出機能を有する DDS キャリアの創製

研究期間：

2020 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 和田 俊一 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

研究分担者 浦田 秀仁 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

研究分担者 林 淳佑 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)

研究目的：

我々は、アミノ酸の一種である  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib) 含有両親媒性ヘリックスペプチドの C-末端に癌細胞に特異的に結合する環状 RGD ペプチドを結合させた DDS キャリア、**MAP(Aib)-cRGD** を報告してきた。本研究では **MAP(Aib)-cRGD** 分子中の C-末端に配置していた環状 RGD を両親媒性ヘリックスペプチドの疎水性面に配置させ、その変更した **PI** 及びその誘導体について、RNA の DDS キャリアとしての有用性を検討することを目的とした。**PI** は両親媒性ヘリックスペプチドの疎水性面に極性の環状 RGD ペプチドを配置する分子デザインにより、両親媒性構造が崩れ、両親媒性ヘリックスペプチドの特徴である細胞膜傷害性が軽減される。さらに **PI** 中のヘリックスペプチドと環状 RGD をジスルフィド結合で繋げば、細胞内還元環境下に応答して **PI** から環状 RGD が脱離され、ヘリックスペプチドの再構築が可能であると考えられる。このような特徴を活かし、**PI** を RNA のキャリアとして用いると、細胞外では低毒性で、細胞内に移行後、還元環境に応答し **PI** から両親媒性ヘリックスペプチドが再構築され、ヘリックスペプチドの膜傷害性作用によるエンドソーム膜の破壊及び RNA のエンドソーム脱出、細胞質に移行した RNA の機能発現が期待でき、有用な DDS キャリアを創製できるのではないかと考え本研究を行った (Fig. 1)。さらに構造活性相関研究の一環として、ヘリックスペプチドと

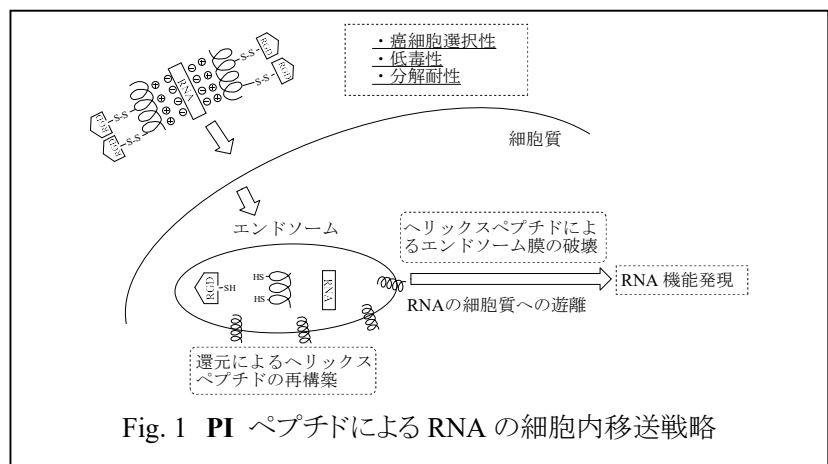


Fig. 1 PI ペプチドによる RNA の細胞内移送戦略

環状 RGD の間にメチレン基を追加し、還元反応のスペースを広げることによってヘリックスペプチドと環状 RGD の細胞内での解離を促進し、エンドソーム脱出を促進できるかどうか検討することを行った。また、MAP(Aib)-cRGD についても両親媒性ヘリックス鎖の長さの影響を検討する目的で誘導体を合成し、構造活性相関研究を行った。

### 研究内容および研究成果：

#### (1) エンドソーム脱出能を期待したペプチドのデザイン及び合成 (PI-PIV)

ヘリックスペプチドと環状 RGD を結合させるジスルフィド結合の形成は、ヘリックスペプチドと環状 RGD に Cys 或いは Cys よりも側鎖の炭素数が 1 つ多いホモシステイン (HCy, X) を組み込んで行った。PI の場合、ヘリックスペプチドと環状 RGD 中にすべて Cys (C) を組み込み、ヘリックスペプチドと環状 RGD の主鎖を繋ぐリンカー部位は  $-C^{\beta}H_2-S-S-C^{\beta}H_2-$  となっている。PII、PIII は Cys と HCy を組み込み、PI より炭素数が 1 個増炭したジスルフィド結合の位置が異なるリンカーに、PIV はすべて HCy のみを組み込み、最も長いリンカーを設計、合成した (Fig. 2)。

	アミノ酸配列 <sup>a, b</sup>	リンカー部位 <sup>c</sup>
PI	acetyl-K <b>C</b> (cRGDf <b>C</b> )ULKLULKULKA <b>C</b> (cRGDf <b>C</b> )LKLUG-NH <sub>2</sub>	$-C^{\beta}H_2-S-S-C^{\beta}H_2-$
PII	acetyl-K <b>C</b> (cRGDf <b>X</b> )ULKLULKULKA <b>C</b> (cRGDf <b>X</b> )LKLUG-NH <sub>2</sub>	$-C^{\beta}H_2-S-S-C^{\gamma}H_2-C^{\beta}H_2-$
PIII	acetyl-K <b>X</b> (cRGDf <b>C</b> )ULKLULKULKA <b>X</b> (cRGDf <b>C</b> )LKLUG-NH <sub>2</sub>	$-C^{\beta}H_2-C^{\gamma}H_2-S-S-C^{\beta}H_2-$
PIV	acetyl-K <b>X</b> (cRGDf <b>X</b> )ULKLULKULKA <b>X</b> (cRGDf <b>X</b> )LKLUG-NH <sub>2</sub>	$-C^{\beta}H_2-C^{\gamma}H_2-S-S-C^{\gamma}H_2-C^{\beta}H_2-$

<sup>a</sup> Aib 含有両親媒性ヘリックスペプチドと cRGDfC [cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys-)]、cRGDfX [cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-HCy-)] の縮合は、ジスルフィド結合形成により行った。<sup>b</sup> U :  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib); X : homocysteine (HCy). <sup>c</sup> ヘリックスペプチドの主鎖アミノ酸残基 (C 或いは X) の側鎖  $\beta$  位から環状 RGD の主鎖アミノ酸残基 (C 或いは X) の側鎖  $\beta$  位までの構造。

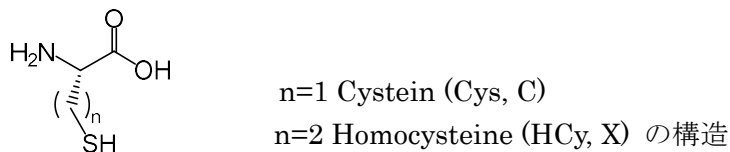


Fig. 2 設計、合成したペプチドとシステイン (Cys, C) 及びホモシステイン (HCy, X) の構造。

#### (2) PI-PIV の siRNA の DDS キャリアとしての可能性

##### (2-1) 蛍光ラベル化 siRNA のペプチドによる細胞内取り込み

3 種の癌細胞、A549、U-87 MG、WiDr 細胞と正常細胞のマウス NIH3T3 細胞を用いて、静電的相互作用で形成したペプチド/AlexaFluor488-labeled siRNA (1.2  $\mu$ M/23 nM) 複合体の細胞内導入効果を検討した。4 種のペプチドによる複合体を 37°C、30 分インキュベーションすることにより形成させ、各細胞に 37°C、24 時間作用させた後、細胞を溶解し、その溶解液を蛍光測定することにより細胞内の取り込みを評価した (Fig. 3)。ヘリックスペプチドと環状 RGD のリンカー部が最も短い PI が最も蛍光が強く、PIII、PIV の順で蛍光強度が弱くなり、PII に関してはほとんど蛍光が認められず、細胞内に移行していないことが分かった。また各ペプチドにおける細胞選択性に着目すると、癌細胞に多く取り込みが認められる傾向があることが分かった。

次に細胞内に取り込まれた複合体の細胞内挙動を調べる目的で、A549 細胞に対して上述の実験と同じ条件で、共焦点レーザー顕微鏡測定を行った。上述の蛍光測定の結果と同じ細胞内取り込みの傾

向を示し、細胞内に取り込まれた蛍光像を見ると、多くが斑点状を示しており、エンドサイトーシス経路で取り込まれ、エンドソーム中に局在していることが予測された。

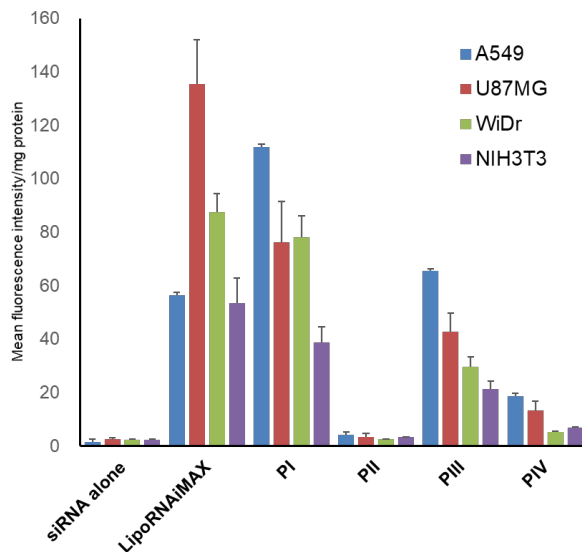


Fig. 3 ペプチド/蛍光 siRNA 複合体による細胞内取り込み

ペプチド/AlexaFluor488-labeled siRNA (1.2  $\mu$ M/23 nM) 複合体を 10% 血清含有培地中に調整し、その溶液を各細胞に 24 時間、37  $^{\circ}$ C 作用させた後、細胞を洗浄し、細胞溶解液を作成後、蛍光光度計で測定した。

(2-2) RNA 干渉効果：ルシフェラーゼ安定発現 A549 (A549-Luc) 細胞に対する検討

ルシフェラーゼ遺伝子を標的とした siRNA を用い、ペプチド/siRNA の複合体を A549-Luc 細胞に作用させ、37 $^{\circ}$ C、24 及び 72 時間インキュベーションした。その後、細胞を採取し、洗浄後、細胞溶解液を作製した。その細胞溶解液中のルシフェラーゼ酵素を蛍光分析により定量し、RNA 干渉効果を検討した (Fig. 4)。抗ルシフェラーゼ-siRNA は次の配列のものを用いた。sense strand: 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A dTdT-3'; antisense strand: 5'-UCG AAG UAC UCA GCG UAAG dTdT-3'。Fig. 4 のグラフの縦軸は何も作用させていない細胞のルシフェラーゼの発現量を 1.0 とし、ペプチド/siRNA の複合体を作用させた時のその相対量で示している。これらの結果は、蛍光実験で行った結果で示したペプチドのキャリアとしての能力と相関しており、PI が RNA 干渉効果が最も高く、24 時間で約 50%、72 時間で 60%程度の効果を示し、次に PIII、PIV、PII の順でその効果が弱くなることが分かった。

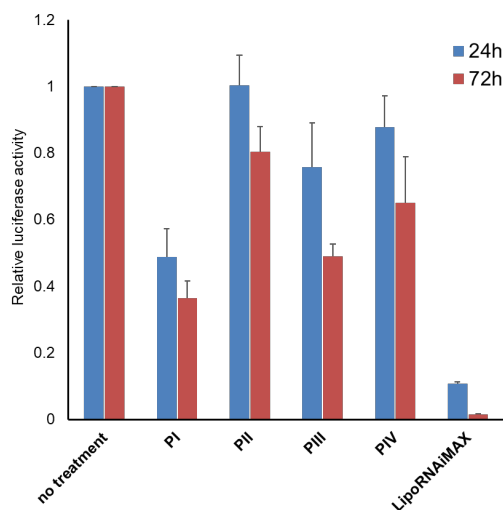


Fig. 4 ペプチド/anti-Luc siRNA 複合体による RNA 干渉効果

ペプチド/ anti-Luc siRNA (1.0  $\mu$ M/10 nM) 複合体を 10% 血清含有培地中に調整し、その溶液を細胞に 24 或いは 72 時間、37  $^{\circ}$ C 作用させた。その後、細胞を洗浄し、細胞溶解液を作成した。その溶解液に含まれるルシフェラーゼ量をアッセイキットを用いて測定した。

(2-3) **PI** 及び **PII** の dithiothreitol (DTT) による還元性：ヘリックスペプチドと環状 RGD の還元的開裂について

キャリアとしての能力が最も高かった **PI** と最も低かった **PII** のリンカー部のジスルフィド結合の還元性について検討した。ペプチド溶液中に 10 mM DTT 還元剤を加え、37°C、1~24 時間インキュベーションし、その反応液を経時的に HPLC で分析することにより、ヘリックスペプチドと環状 RGD の還元的開裂能を検討した。その結果、反応 24 時間後で、両ペプチドにおける 2 個のジスルフィド結合の内の 1 個は還元反応が進んでいたが、もう 1 つのジスルフィド結合は開裂しにくく、2 個のジスルフィド結合が完全に還元されて生成したヘリカルペプチドはごくわずかのみしか観測されなかった。詳細は分からないが、DTT が入り込めるスペースが小さいコンフォメーションをとっている可能性があると考えられる。

(2-4) 結論

ヘリックスペプチド-環状 RGD 間のリンカー部の長さの異なるペプチド性キャリアをデザイン・合成し、siRNA のキャリアとしての相対的な能力と、リンカー部の還元性について検討してきた。我々の戦略として提案した、RNA と複合体を作ることにより、ヌクレアーゼ耐性や毒性の軽減を実現し、癌細胞選択的に細胞内にエンドサイトーシス経路で導入することができた。しかしリンカー部位での還元性が悪く、エンドソーム膜の破壊する能力が弱く、RNA 干渉効果が弱いものと考えられる。今後、リンカー部位の改良が必要と考え還元以外で切断される、リンカーの設計も含めて今後検討することを考えている。(以上は、学会発表①及び②で発表)

(3) **MAP(Aib)-cRGD** の構造活性相関研究：両親媒性ヘリックス鎖の長さの影響

**MAP(Aib)-cRGD** の構造活性相関研究の一環として、20 残基で構成されている両親媒性ヘリックス鎖である **MAP(Aib)** のペプチド鎖の長さを検討する目的で、C-末端から 1~3 残基短くしたヘリックスペプチド 3 種 (19, 18, 17 残基で構成) を合成し、ペプチド - cRGD を合成した。上述の方法で DDS キャリアとしての能力を検討した結果、ヘリックスペプチド 19 残基のペプチドは、**MAP(Aib)-cRGD** と比べるとキャリアとしての能力はかなり低く、またヘリックスペプチド 18 及び 17 残基のペプチドは全くキャリアとしての能力は示さなかった。これらの結果から **MAP(Aib)-cRGD** のヘリックス部分の長さは 20 残基必要であることが分かった。(以上は、原著論文①、学会発表③で発表)

成果発表：

<原著論文>

① S. Wada, A. Shibaike, J. Hayashi, H. Urata.

Influence of Aib-Containing Amphipathic Helical Chain Length in MAP(Aib)-cRGD as Carrier for siRNA Delivery

*Chem. Biodiv.*, 19(2), e202100728 (2022)

<学会発表>

① 和田俊一

核酸医薬のデリバリーを指向した Aib 含有ペプチドの創製

日本薬学会第 141 年会、2021 年 3 月 (オンライン開催)

② S. Wada, M. Kusuyama, J. Hayashi, H. Urata

CONJUGATES OF MAP(Aib) AND cRGD THROUGH DISULFIDE LINKAGES AS siRNA

## CARRIERS

第 58 回ペプチド討論会, 2021 年 10 月 (オンライン開催)

③ 和田俊一、芝池央、林淳祐、浦田秀仁

ペプチド性 siRNA キャリア MAP(Aib)-cRGD の構造活性相関研究：ヘリックスペプチドにおける  
C-末端残基及びヘリックス鎖の長さの影響

日本薬学会第 142 年会、2022 年 3 月 (オンライン開催)