

膜傷害性ペプチド修飾多糖と抗体による
コアセルベート形成と抗体のサイトゾル送達

2024

道端 惇也

目次

序論	5
第一章 膜傷害性ペプチド修飾プルランー抗体複合コアセルベートによる 抗体のサイトゾル送達	9
第一節 プルラン-L17E コンジュゲート (PL-L17E) の設計と調製	11
第二節 PL-L17E/IgG(AF488) 粒子形成、および IgG(AF488) の サイトゾル送達	14
第三節 PL-L17E _{12/100} /IgG(AF488) 粒子の物理化学的性質	18
第四節 PL-L17E _{12/100} /IgG(AF488) 粒子による IgG(AF488) サイトゾル送達の様式	21
第五節 血清含有条件での IgG(AF488) 送達とペプチドの最適化	27
第六節 送達された IgG の標的認識能	30
第七節 初代培養肝細胞および人工多能性幹 (iPS) 細胞への IgG(AF488) 送達	32
第一章の考察	35

第二章	高効率なサイトゾル送達に必要な抗体量の低減	37
第一節	アルギニン残基導入 MLTX 修飾プルランの合成と性質の評価	39
第二節	アルギニン残基導入 MLTX 修飾プルランによる IgG(AF488) のサイトゾル送達	41
第三節	PL-MLTXR4 _{12/100} /IgG(AF488) を用いたサイトゾル送達の様式	44
第四節	送達された IgG の標的認識能	46
	第二章の考察	47
総括		49
実験の部		51
引用文献		65
謝辞		70

略語表

ANTS	8-aminonaphtalene-1,2,3-trisulfonic acid
α -MEM	α -minimum essential medium
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole
CLSM	confocal laser scanning microscope
CPP	cell-penetrating peptide
Cys	cysteine
CytD	cytochalasin D
DBCO	dibenzocyclooctyne
DCM	dichloromethane
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DLS	dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPX	<i>p</i> -xylene-bis(pyridinium)bromide
EDT	1,2-ethanedithiol
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
Gly	glycine
HBTU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
IgG(AF488)	Alexa Fluor 488-labeled human immunoglobulin G

LLPS	liquid – liquid phase separation
LUV	large unilamellar vesicle
MALDI-TOF MS	matrix assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry
M β CD	methyl- β -cyclodextrin
MLTX	M-lycotoxin
MWCO	molecular weight cut off
NMM	<i>N</i> -methylmorpholine
NMR	nuclear magnetic resonance
NPC	nuclear pore complex
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
RP-HPLC	reverse phase high performance liquid chromatography
TFA	trifluoroacetic acid

序論

一般にコアセルベートは、液-液相分離 (LLPS) を介して相反する電荷を持つ 2 種類の高分子が自己集合することで形成される^[1,2]。これを利用することで、混合するだけで一種または複数種の高分子を非共有結合的に一つの複合体にできる。このように、コアセルベートは形成が容易である利点を持つ。コアセルベートの効率的な生成や、治療分子の放出タイミングを制御する技術の設計、開発も行われている^[3,4]。また、コアセルベートは生体高分子薬物 (siRNA や mRNA など) を、脂質やポリマーからなるナノ粒子などの他のキャリアに封入する際にも利用される^[5,6]など、バイオ高分子のサイトゾル送達手法としても注目されており、盛んに研究が進められている^[7-10]。このように、コアセルベートはサイトゾル送達キャリアとして大きな可能性を秘めている一方で、高塩濃度や低濃度等の条件では不安定であり、実用化における課題となり得る。

siRNA や mRNA などの核酸のサイトゾル送達については複数の手法が報告^[11,12]されている一方で、タンパク質のサイトゾル送達についての報告は比較的少なく、そのサイトゾル送達は大きな課題の一つである。例えば、免疫グロブリン G (IgG) は究極の分子標的薬であり、抗体医薬として盛んに開発、利用されている^[13]。しかし、IgG は生体膜を通過することができないため、現状では抗体医薬の標的は細胞外または細胞膜上に存在するものに限られている^[14-19]。効率の良い抗体のサイトゾル送達手法の開発は、細胞内の因子を直接標的とする新たな抗体医薬の開発につながり得る。これまでに、膜傷害性ペプチド^[20-31]、膜透過性ペプチドと抗体のコンジュゲートまたはその他複合体^[32,33]や、脂質、ポリマー等からなるナノ粒子^[34-39]を用いた抗体のサイトゾル送達手法が開発されている (Fig. 1A) が、効率の向上や、送達を担う分子と抗体を共に標的臓器や細胞へ送達する手法の確立など、未だ課題は残っている。そのため、より有用なサイトゾルへの抗体送達手法の開発が望まれる。

このような背景から、所属研究室では、カチオン性アミノ酸と疎水性アミノ酸に富み、抗体 (IgG) をサイトゾルへ送達する機能を持つペプチドである L17E (IWLTKFLGKHAACKHEAKQQLSKL-amide) が開発されている。L17E はクモ毒由来の膜傷害性ペプチドである M-Lycotoxin (MLTX) の 17 位のロイシンをグルタミン酸に

置換したペプチドで、顕著な細胞毒性を示さずに細胞膜の透過性を一時的に向上させ、細胞外 IgG のサイトゾル内移行を可能にする^[20] [Fig. 1A(i)]。さらに、送達効率を向上させるため、Fc 領域結合配列を持つ L17E の 3 量体 [FcB(L17E)₃] も開発されている^[40] [Fig. 1B, C]。FcB(L17E)₃ は、負電荷をもつ蛍光色素 Alexa Fluor 488 (AF488) を修飾した IgG [IgG(AF488)] とコアセルベートを形成することが分かっている。FcB(L17E)₃ を用いた抗体のサイトゾル送達では、コアセルベートが細胞に付着してから 1 分以内に IgG の急速なサイトゾル内移行が見られた。コアセルベートからの IgG のサイトゾル内移行は、細胞膜から直接またはエンドサイトーシスの非常に早い段階で起こっており、細胞膜構造の動的変化を伴う独特な送達様式であることが示唆された。その他、Sun らのグループは、pH および酸化還元感受性修飾を施したヒスチジンに富むペプチドを用いたコアセルベートの形成と、それを用いたタンパク質のサイトゾル送達について報告している^[41]。

このように、IgG やその他タンパク質のサイトゾル送達におけるコアセルベートの有用性が示されつつある。そのため、本研究ではこのような手法について更なる知見を得るため、FcB(L17E)₃ とは異なるデザインのペプチド多量体をデザインし、同様にコアセルベートの形成や IgG(AF488) の送達が可能であるか、および送達効率等について改善が見られるか検討した。例えば、コアセルベートの不安定性は臨床応用においては課題になると考えられ、FcB(L17E)₃ を用いたものより安定かつ同等以上の活性を示すコアセルベートが得られれば、治療への応用がより現実的になり得る。そのため、新たなペプチド多量体のデザインにおいては、L17E と IgG 間の相互作用を増加させることを考慮した。また、バイオ高分子のサイトゾル送達手法をデザインする際の課題の一つとして、血清存在下での送達効率の低下が挙げられる^[42]。コアセルベートを使ったサイトゾル送達に関する既報では、上述した Sun らの報告を含め、血清による送達効率への影響を明確に言及していないものが多い^[9,41,43]。しかし、将来的な応用を想定すると、新たなデザインにおいても、FcB(L17E)₃/IgG(AF488) コアセルベートの場合と同様に血清含有培地中で機能することが望ましい。本研究の第一章では、このような条件を満たすツールとしてペプチド修飾プルランを開発し、形成されたコアセルベートの性質、送達様式、および応用可能性に関する検討を行った。第二章では、修飾するペプチドの改良により、低濃度の抗体を高い効率でサイトゾルに送達できるペプチド修飾プルランを開発した。

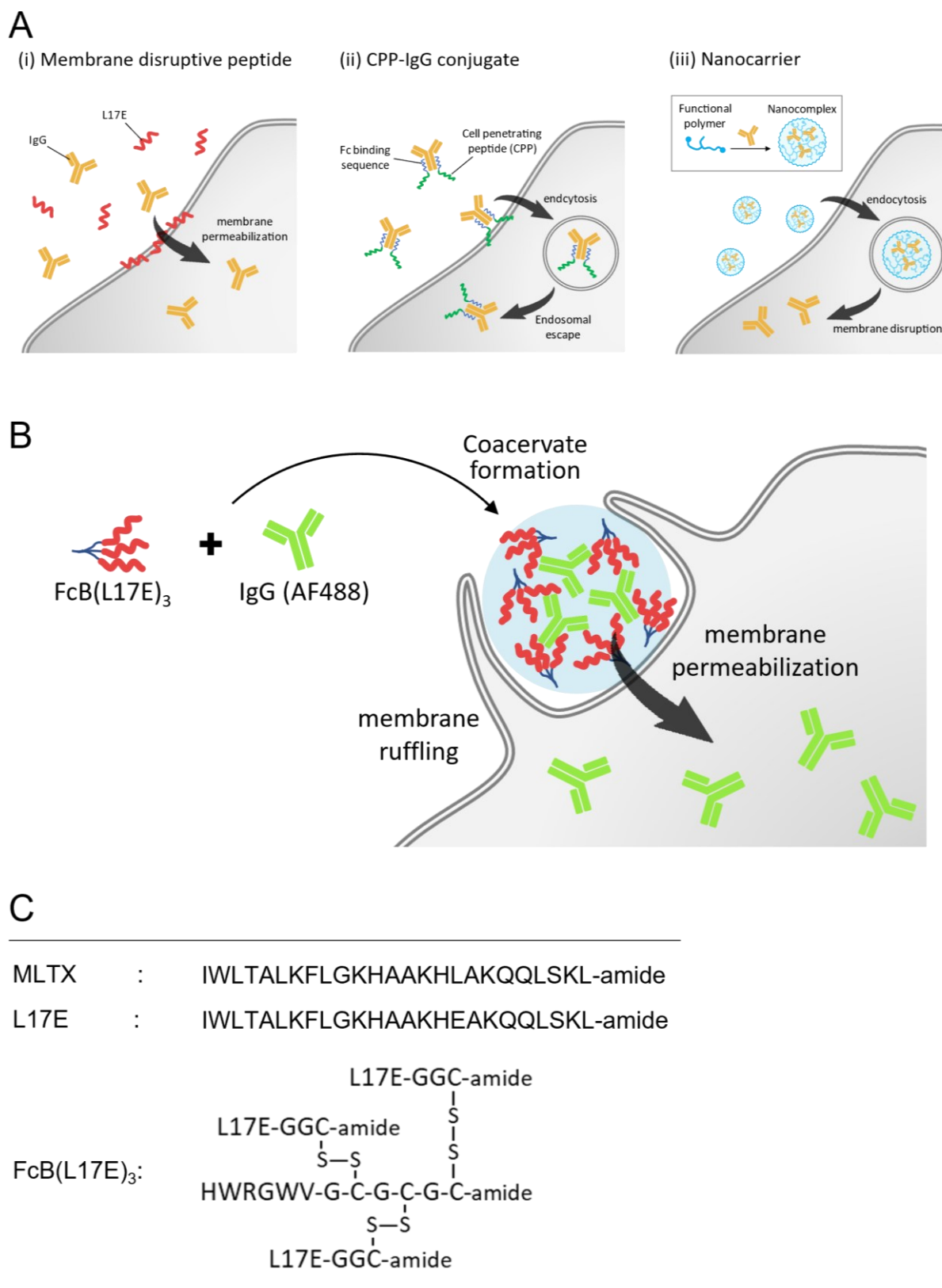


Figure 1. (A) Illustrations of cytosolic IgG delivery using (i) membrane-disruptive peptides, (ii) CPP-IgG conjugates and (iii) functional-polymer/IgG nanocomplex. (i) shows the delivery of IgG by L17E as the example of membrane-disruptive peptides. (ii) shows the scheme of CPP-IgG conjugate like IgG/LK-domain Z reported by Chong and coworkers^[33]. (iii) shows the scheme of nanocomplex like A2-B3-C2-S₂-P₂ reported by Liu and coworkers^[39]. (B) Illustrations of cytosolic IgG delivery using FcB(L17E)₃/ IgG(AF488) coacervate. (C) Sequences or structures of M-Lycotoxin (MLTX), L17E and FcB(L17E)₃.

第一章

膜傷害性ペプチド修飾プルラン—抗体複合コアセルベート による抗体のサイトゾル送達

安定なコアセルベートを形成し得るペプチド多量体として、本研究では多糖の一種であるプルランと L17E のような膜傷害性ペプチドとのコンジュゲートをデザインした。本研究ではこれを合成し、IgG とのコアセルベート形成および IgG のサイトゾル送達への応用の可能性を調べた (Fig. 2A)。1 分子あたり 4~12 分子程度の L17E を修飾したプルラン (PL-L17E) について、IgG(AF488) と混合することで直径約 2 μm のコアセルベートが形成された。この PL-L17E/IgG(AF488) コアセルベートは、高塩濃度条件下での安定性が非常に高く、コアセルベート中の IgG(AF488) の流動性が低かった。また、PL-L17E/IgG(AF488) コアセルベートは、FcB(L17E)₃/IgG(AF488) コアセルベートと同様に、IgG をサイトゾルに迅速に送達する能力を示した。PL-L17E/IgG(AF488) コアセルベートについては、血清存在下で IgG 送達活性に大幅な低下が見られたが、L17E の代わりにより膜傷害性の高いペプチドである M-lycotoxin (MLTX)^[44]を用いることで、血清存在下でも高い効率で IgG 送達が可能であった。このように、プルランを用いたペプチド多量体によるコアセルベートは、高い安定性と送達活性を持ち、コアセルベートを用いたサイトゾル送達手法の開発におけるこれまでの課題を克服している。さらに、初代肝細胞、未分化人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)、および iPS 細胞由来の腸上皮細胞への IgG 送達が可能であることも確認した。

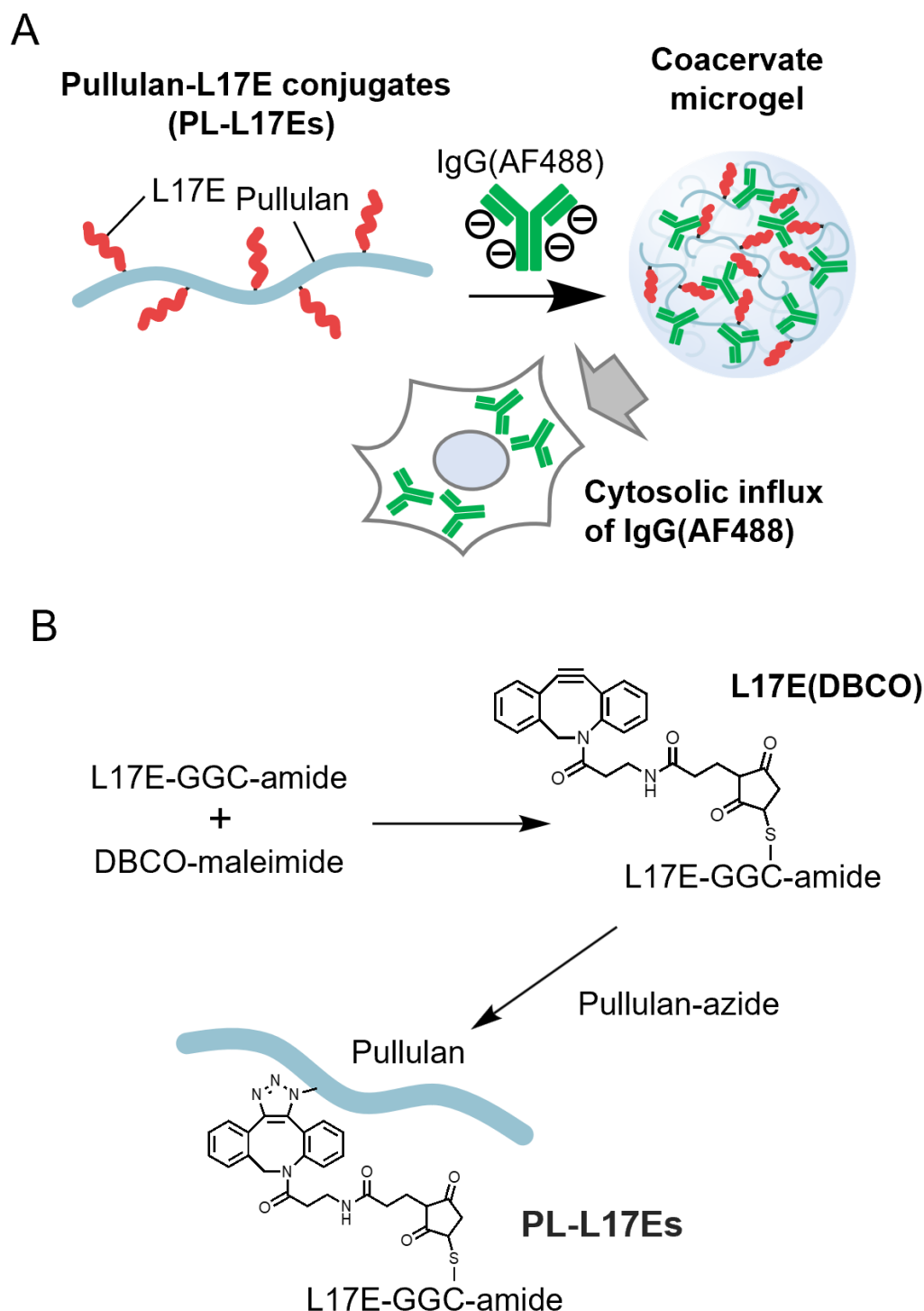


Figure 2. (A) Schematic representation of cytosolic IgG infusion from coacervate microgel. (B) Preparation of pullulan-L17E conjugates (PL-L17Es). Coacervate microgels, which achieve a marked cytosolic delivery of IgGs decorated with the negatively charged fluorophore Alexa Fluor 488 [IgG(AF488)], were typically formed by mixing with pullulan (~100 kDa consisting of ~550 glucose units) conjugated with ~66 molecules of L17E (PL-L17E_{12/100}). IgGs modified with 7–9 molecules of Alexa Fluor 488 were employed.

第一節 プルラン-L17E コンジュゲート (PL-L17E) の設計と調製

プルランは、 α -1,4 グリコシド結合で連結した 3 つのグルコースからなるユニットが、 α -1,6 グリコシド結合で連結された構造の繰り返しからなる、生体適合性の高い多糖である。秋吉らは、コレステロールを修飾したプルラン (CHP) が、コレステロール同士の疎水性相互作用によって架橋され、ナノゲルを形成することを報告している^[45-46]。CHP ナノゲルはタンパク質やその他バイオ高分子のキャリアとして、がん免疫療法や経鼻ワクチンへの適用可能性が既に検証されている^[47,48]。そこで私は、プルランにコレステロールの代わりに L17E を修飾することで、IgG とともに生体適合性の高い粒子またはコアセルベートを形成し、IgG のサイトゾル送達に応用できる可能性があると考えた。カチオン性と疎水性のアミノ酸残基を多く含む L17E との相互作用を増強しつつ、細胞への取り込みを可視化するために、2 つのスルホ基を持つ蛍光色素である Alexa Fluor 488 [IgG(AF488)] で修飾した IgG を使用した。先行研究^[40]においても、コアセルベートの形成とサイトゾル内 IgG 流入において IgG への負電荷修飾が重要であったため、同様にこのような修飾が重要であると考えられる。

合成について、まず、既報^[49]の方法に従って、プルラン (約 550 単糖、約 100 kDa) へアジド基を導入し、プルランアジドを合成した。これにより、100 単糖あたり 12.6 個のアジド基を持つプルランアジドを得た (Fig. 3)。次に、C 末端側に Gly-Gly-Cys-amide を持つ L17E (L17E-GGC-amide) を Fmoc 固相法により合成した後、ジベンゾシクロオクチン (DBCO) -マレイミドで修飾して L17E(DBCO)を得た。プルランアジドと L17E(DBCO) の結合は銅フリークリック反応によって行った (Fig. 2B, C)。

L17E 修飾量の重要性を調べるため、L17E 修飾量の異なる 5 種類のプルラン (PL-L17E: PL-L17E_{1/100}、PL-L17E_{4/100}、PL-L17E_{8/100}、PL-L17E_{12/100}、PL-L17E_{14/100}) を合成した。PL-L17E に続く数字は、クリック反応に用いた、プルラン 100 単糖に対する L17E の当量を表す。PL-L17E_{1/100}、PL-L17E_{4/100}、PL-L17E_{8/100}、PL-L17E_{12/100}、PL-L17E_{14/100} について実際の修飾量を ¹H NMR により測定したところ、それぞれ 0.66、3.53、7.39、11.41、12.21 であり (Fig. 4)、クリック反応はほぼ定量的に進行したと言える。PL-L17E_{14/100} と PL-L17E_{12/100} の修飾量の違いがわずかである理由は、アジドの修飾量 (12.6 個/100 単糖) に対して過剰量の L17E を反応させたためだと考えられる。

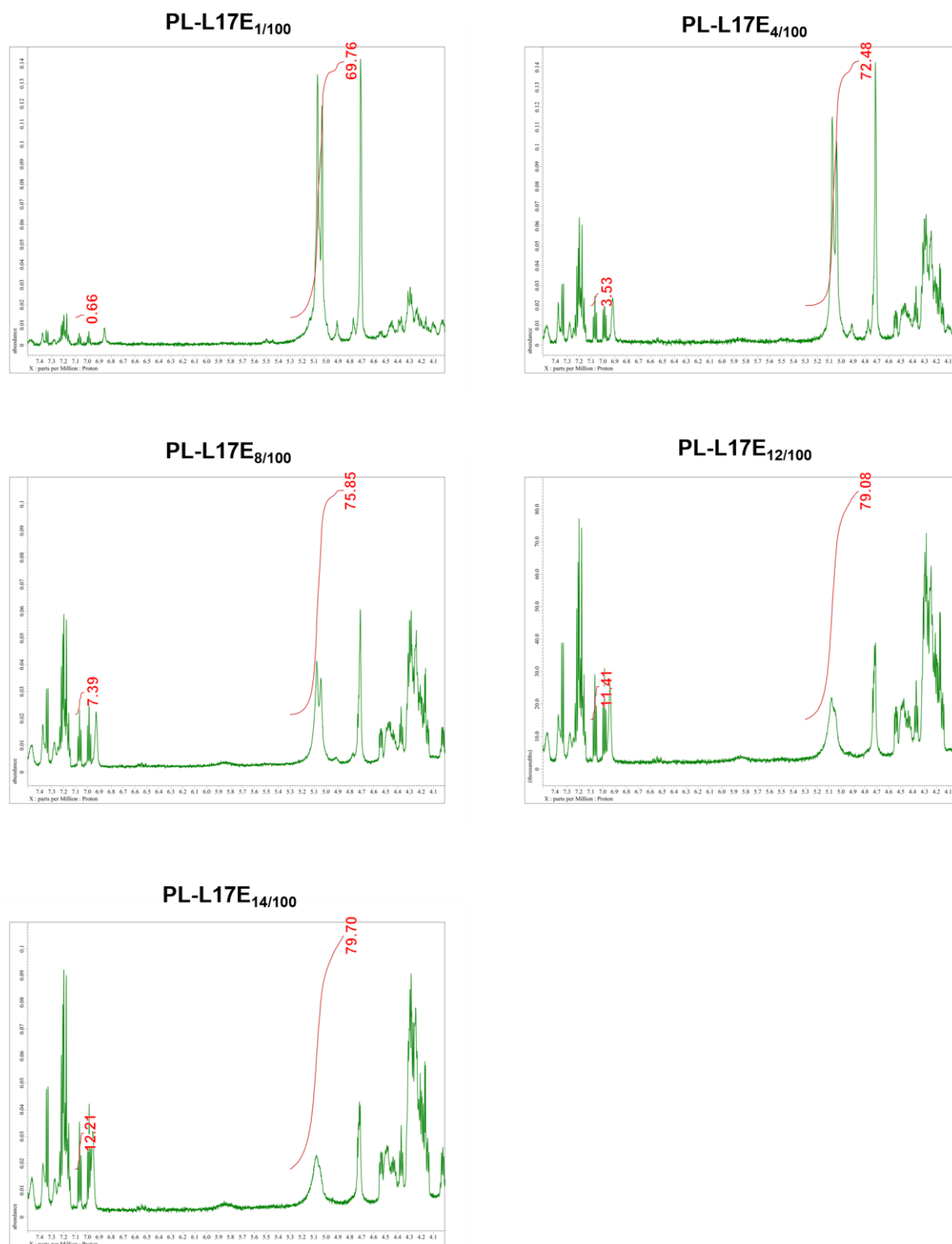


Figure 4. ^1H NMR of PL-L17Es. L17E modification ratios of PL-L17E_{1/100}, PL-L17E_{4/100}, PL-L17E_{8/100}, PL-L17E_{12/100}, and PL-L17E_{14/100} to 100 glucose units were 0.66, 3.53, 7.39, 11.41, and 12.21, respectively. L17E-DBCO had a proton peak at 5.00 ppm–5.30 ppm (derived from a proton adjacent to the nitrogen in the 8-membered ring of DBCO) that overlapped with those of α anomeric protons (Figure S1, B and C). The modification ratio of L17E to 100 glucose units was determined by the integration ratio of protons at the 6-position of tryptophan (7.03 ppm–7.10 ppm) to α anomeric protons involved in α -1,4-glycosidic linkages (4.85 ppm–5.30 ppm). Due to overlap with signals derived from the L17E peptide, the α anomeric proton peaks (4.60 ppm–4.85 ppm) were not used to determine the L17E modification ratio.

第二節 PL-L17E/IgG(AF488) 粒子形成、および IgG(AF488) のサイトゾル送達

PL-L17E と IgG(AF488) を L17E:IgG のモル比が 8:1 (L17E 濃度、約 40 μM) になるように混合し、23°C で 10 分間インキュベートした後、L17E の終濃度が 3 μM になるように希釈した。これを共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いて観察したところ、PL-L17E_{1/100} を除くすべての PL-L17E について、IgG(AF488) との混合液中に直径約 1-3 μm の粒子が見られた (Fig. 5A)。粒子は AF488 の蛍光シグナルを示しており、IgG(AF488) が粒子内に含まれていることが分かる。正電荷を持つ PL-L17E と負電荷を持つ IgG(AF488) の混合により粒子が形成されているため、FcB(L17E)₃/IgG(AF488) の場合^[40]と同様、これらはコアセルベートであると考えられる。また、動的光散乱 (DLS) の粒度分布によっても粒子の分析を行い、PL-L17E_{12/100} と IgG(AF488) との混合により、中央値 2 μm で 1~4 μm の粒度分布を持つ粒子の存在が示唆された (Fig. 6)。一方で、FcB(L17E)₃/IgG(AF488) の場合^[40]と同様、AF488 標識の無い IgG を用いた場合もしくは IgG 非存在下では、このようなサイズの粒子は検出されなかった。

次に、これらコアセルベートにより IgG をサイトゾルに送達することが可能か調べるため、送達試験を行った (Fig. 5B)。送達試験では、まず HeLa 細胞に、PL-L17E_{4/100}、PL-L17E_{8/100}、PL-L17E_{12/100}、または PL-L17E_{14/100} と IgG(AF488) の混合により形成された各コアセルベートを含む無血清培地を加え、1 時間インキュベートした。その後、CLSM 観察によって IgG(AF488) をサイトゾル内に含む細胞の数を調べることで送達能を評価した。PL-L17E_{1/100} は粒子を形成しなかったため、送達試験には使用しなかった。また、送達試験に用いた各 PL-L17E の使用濃度は、ミトコンドリアの代謝活性を評価する WST-8 アッセイを各 PL-L17E について行った結果より、顕著な細胞毒性が見られない最大の濃度に決定した (Fig. 7)。PL-L17E_{12/100} および PL-L17E_{14/100} では、3 μM (L17E 濃度) まで顕著な細胞毒性が見られなかった。PL-L17E_{12/100}、PL-L17E_{14/100} の終濃度が 3 μM となる条件で送達試験を行ったところ、細胞全体に広がる IgG(AF488) シグナルが約 70% の細胞で観察され (Fig. 5C)、IgG(AF488) の高効率なサイトゾル送達を示唆された。一方、PL-L17E_{4/100} および PL-L17E_{8/100} では、3 μM (L17E 濃度として) で若干の細胞毒性が見られたため、L17E の終濃度が 1 μM になるようにして送達試験を行った。修飾量によって細胞毒性が異なる原因は不明であるが、ペプチド濃度が同じ場合に修飾量が少ないもの程 PL-L17E 分子の濃度が高いことや、修飾量が少ないもの程 PL-L17E 分子のコンフォメーショ

ンの自由度が高いことが、膜とペプチドの相互作用しやすく毒性が現れやすい理由として推測される。PL-L17E_{4/100}、PL-L17E_{8/100}では、IgG(AF488)シグナルを持つ細胞の割合とその蛍光強度の両方について、より修飾量の多い PL-L17E より低く、サイトゾルに拡散したシグナルを示す細胞の割合は、それぞれ約 10%、約 25%であった (Fig. 5B, C)。また、40 μ M の L17E モノマーと 770 μ g/mL の IgG(AF488) の混合液で処理したところ、IgG(AF488) シグナルが見られる細胞の割合は約 40% であった。L17E モノマーは抗体と複合体を形成せず、一時的な細胞膜傷害により溶液中の抗体が受動的にサイトゾルへ移行するというメカニズムで抗体を送達している^[20]。そのため、送達効率が低く、比較的高濃度の IgG(AF488) を用いても送達できる割合は 40%程度にとどまるものと考えられる。使用できる濃度範囲や送達効率から、PL-L17E_{12/100} および PL-L17E_{14/100} を用いた本手法の有用性が示された。PL-L17E_{12/100} と PL-L17E_{14/100} は同程度の結果を示したため、以降の実験では PL-L17E_{12/100} を使用した。

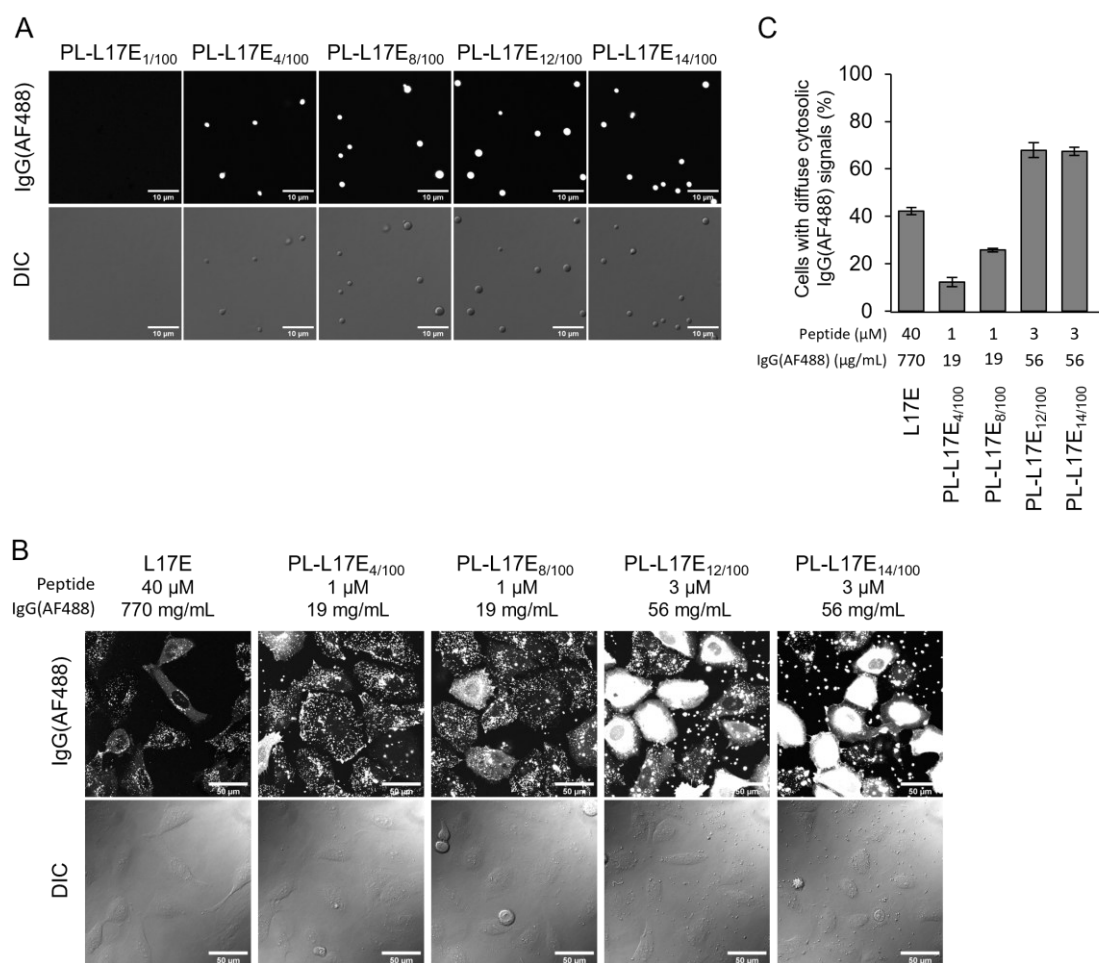


Figure 5. (A) Particle-like complex formation between PL-L17Es and IgG(AF488). Scale bars, 10 μ m. (B) Confocal microscopic observation of HeLa cells after incubation with the particles formed by PL-L17Es in the presence of IgG(AF488) for 1 h. Scale bars, 50 μ m. (C) Cells with cytosolic diffuse IgG(AF488) signals in (B). Results are presented as mean $\pm$ standard error (SE) (n=4).

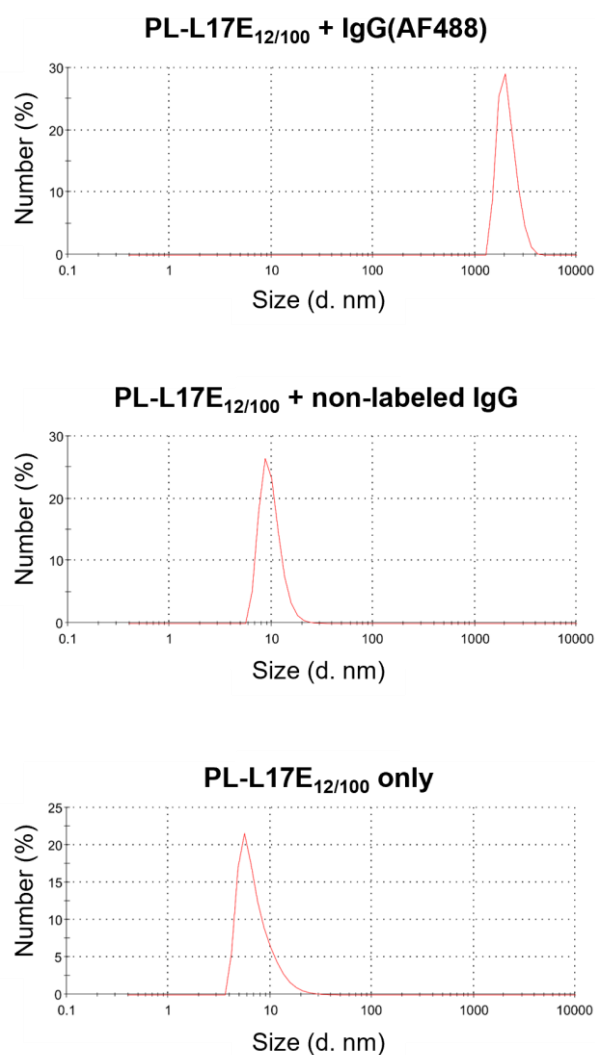


Figure 6. DLS analysis of particle size distribution of PL-L17E_{12/100} complexed with IgG(AF488), PL-L17E_{12/100} in the presence of non-AF488 labeled IgG, and PL-L17E_{12/100} alone.

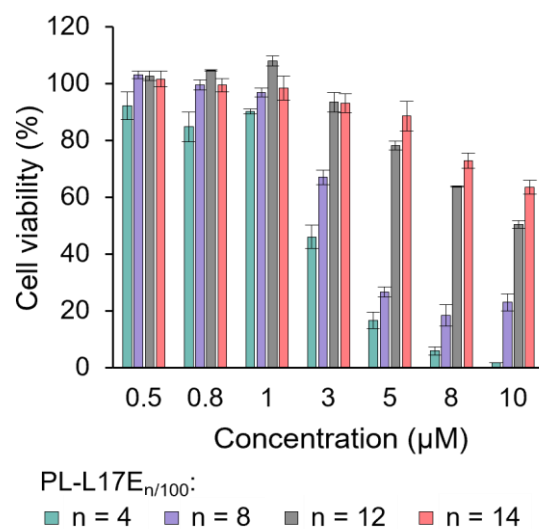


Figure 7. Cytotoxicity of PL-L17Es. HeLa cells were treated with the indicated concentration of PL-L17Es at 37°C for 1 hour. Results are presented as mean ± standard error (SE) (n=3).

次に、送達におけるペプチドの機能の重要性を調べた。L17E は、クモ毒由来の両親媒性ペプチド M-Lycotoxin (MLTX) ^[44] の疎水面になり得る 17 位のロイシン残基をグルタミン酸に置換することで、膜傷害活性を低下させたペプチドである。この Glu 置換の位置は送達活性に大きく影響を与えることが分かっており、MLTX の 6 位または 9 位を Glu 置換した L6E や L9E は、L17E と同じアミノ酸組成であるもののほとんど送達活性を示さない^[20] (Fig. 8A)。PL-L17E_{12/100} と同様に L6E-GGC-amide または L9E-GGC-amide を修飾したプルラン (PL-L6E_{12/100} および PL-L9E_{12/100}、修飾量は 100 単糖あたりそれぞれ 11.27 および 11.12) を調製し、IgG(AF488) と混合したところ、コアセルベート様の構造を形成した。一方、送達試験では IgG(AF488) のサイトゾル拡散シグナルが見られる細胞は少なかった (Fig. 8B)。コアセルベート様構造の形成は PL-L17E_{12/100} による IgG のサイトゾル送達に重要であると考えられるが、コアセルベート形成のみでは必ずしも送達が可能になるとは限らず、ペプチドの機能も重要であることが示唆された。

A

L17E-GGC-amide:	IWLTALKFLGKHAAKH E AKQQLSKL	-GGC-amide
L6E-GGC-amide:	IWLTA E KFLGKHAAKHLAKQQLSKL	-GGC-amide
L9E-GGC-amide:	IWLTALKF E GKHAAKHLAKQQLSKL	-GGC-amide
	membrane-interacting peptide	linker

B

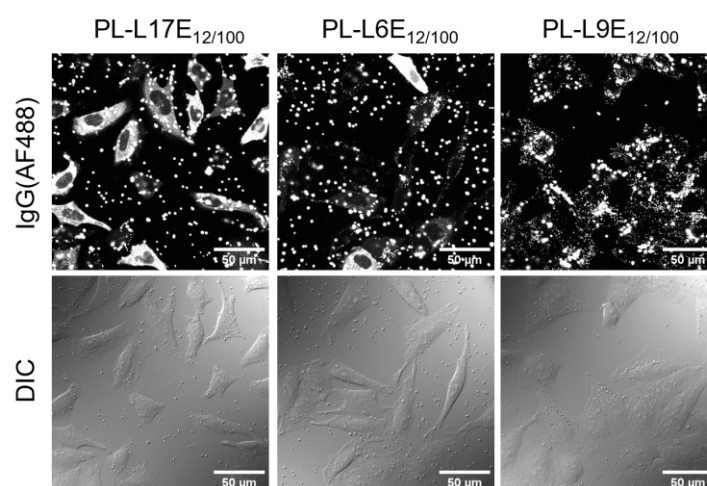


Figure 8. (A) The sequences of L17E-GGC-amide, L6A-GGC-amide and L9A-GGC-amide. (B) Distribution of IgG(AF488) signals in the cells treated with the IgG(AF488) complexes formed with PL-L17E_{12/100}, PL-L6E_{12/100}, and PL-L9E_{12/100} at 37°C for 1 h. Scale bars, 50 μm.

第三節 PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) 粒子の物理化学的性質

観察されたコアセルベートの性質について検討を行った。まず、コアセルベートを形成する相互作用について知見を得るため、塩濃度に対する安定性を調べた。NaCl 濃度による PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートの数や大きさに関する違いを確かめるため、濁度測定を行った (Fig. 9A)。NaCl 濃度が高い程、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) 粒子を含む溶液の 650 nm における吸光度が低かったものの、250 mM および 2 M という高い NaCl 濃度中でも、650 nm の吸光度は、それぞれ 124 mM NaCl 条件での吸光度の 77% および 48% 程度にとどまった (Fig. 9A)。これは、高 NaCl 濃度中でも粒子が残っていることを示唆しており、200 mM 以上の NaCl 濃度で粒子のほとんどが崩壊する FcB(L17E)₃/IgG(AF488)^[40] と比較して塩濃度に対して安定であると言える。また、CLSM 観察によっても 2 M NaCl 溶液中での粒子の存在を確認した (Fig. 9B)。

次に、この粒子中の IgG(AF488) の流動の様子について調べるため、光退色後蛍光回復 (FRAP) 分析を行った。FRAP は、相分離した液滴中の蛍光分子の流動性を測定するためによく用いられており^[25]、一般的に液滴中の蛍光回復は数分以内に起こることが多い。しかし、L17E_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートでは、光刺激後 30 分経過しても蛍光の回復はほとんど見られなかった (Fig. 9C)。これは、IgG(AF488) が粒子中で固定された状態であることを示唆しており、L17E_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートは一般的な液滴に比べ、よりゲルに近い性質を持っている可能性がある。同様の傾向は、PL-L17E_{4/100}、PL-L17E_{8/100}、および PL-L17E_{14/100} でも観察された (Fig. 10A)。

次に、PL-L17E および IgG(AF488) の粒子への内封率を調べた。粒子を含む溶液を遠心分離した後、上清の L17E と IgG(AF488) の濃度を測定することで内封率を評価した。PL-L17E_{12/100} は用いた量の約 50%、IgG(AF488) は約 35% が粒子内に存在していることが分かった (Fig. 10B)。AF488 の実効電荷が-2、L17E の実効電荷が+5 であることから、コアセルベート内の負電荷と正電荷の比は約 1:30 程度であると考えられる。また、コアセルベート内と抗体のみの溶液について蛍光強度の比較を行ったところ、コアセルベート内の蛍光強度の方が 10~15 倍高いことから、コアセルベートへの抗体の濃縮率も 10~15 倍程度であることが推測される。上記のような内封率の傾向は、PL-L17E_{8/100}/IgG(AF488) および PL-L17E_{14/100}/IgG(AF488) コアセルベートでも同様であった。一方、PL-L17E_{4/100} を用いた場合では、いずれの内封率についても、

他と比較して少なかった。コアセルベート形成のしやすさや PL-L17E の内封量が送達効率に影響する可能性があると考えられる。

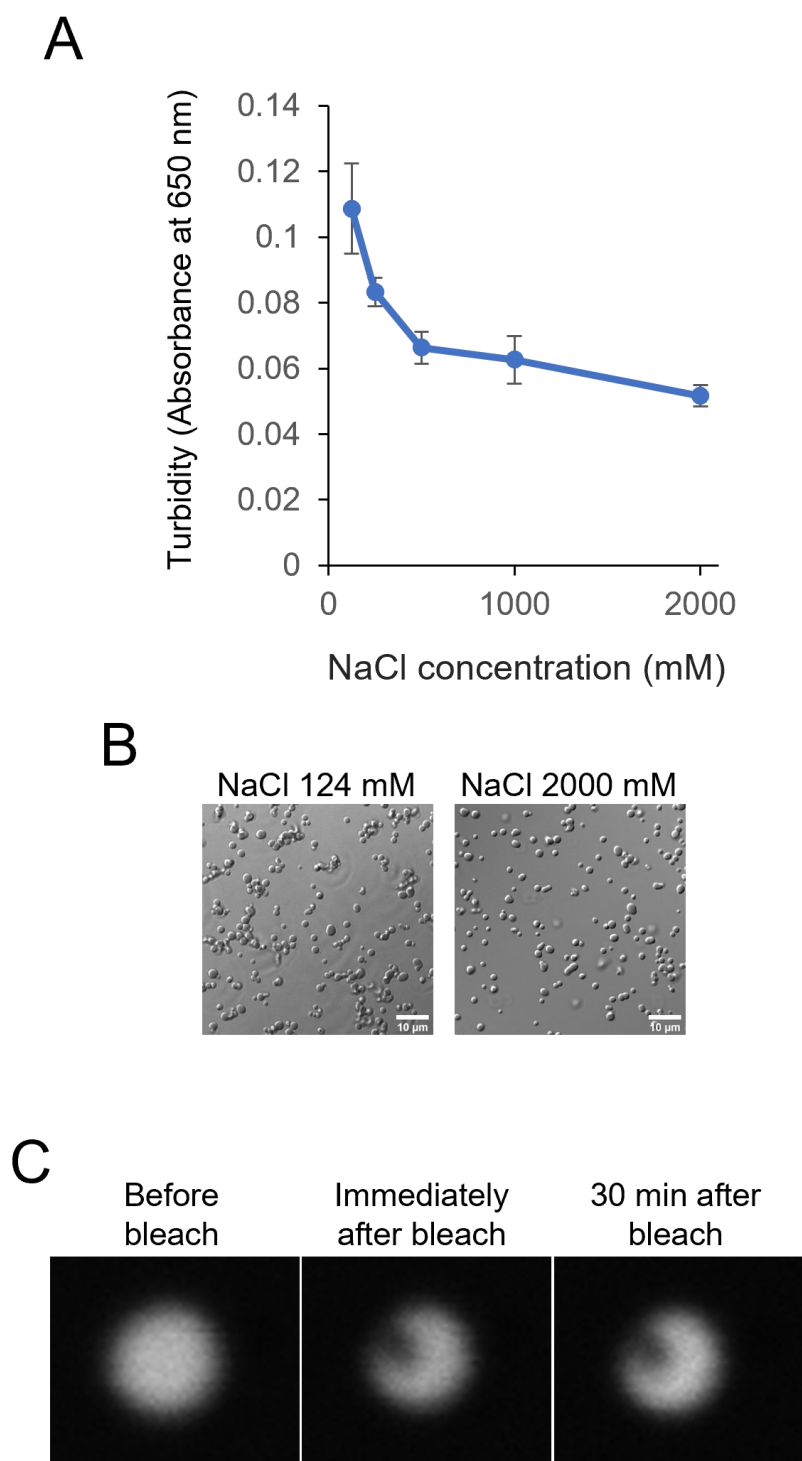


Figure 9. (A) Effect of NaCl concentration on the stability of the particle-like complex of PL-L17Es with IgG(AF488). Results are presented as mean $\pm$ SE ($n=3$). (B) DIC images of the samples at 124 and 2000 mM NaCl concentration. (C) FRAP analysis of IgG(AF488) in the particle-like complex of PL-L17E_{12/100} with IgG(AF488).

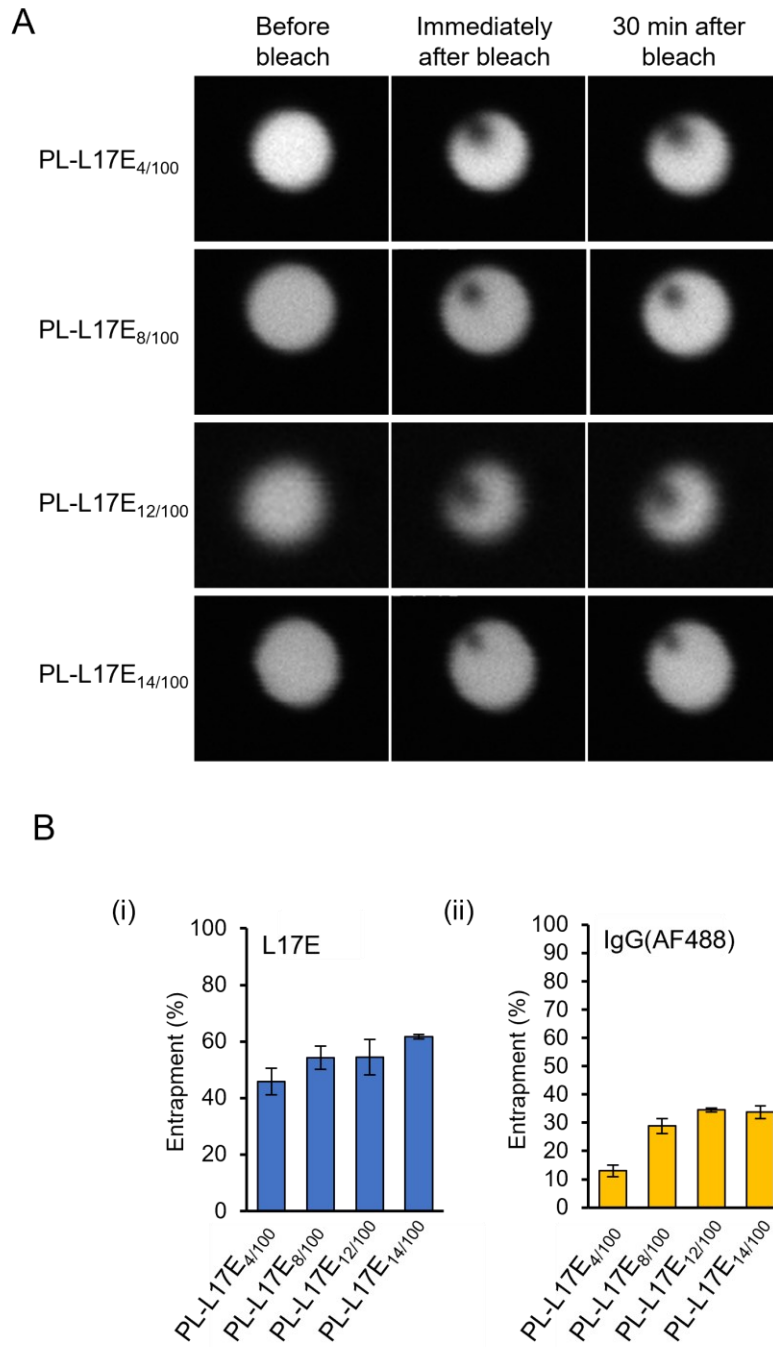


Figure 10. (A) FRAP analysis of IgG(AF488) in the particle-like complex of PL-L17E with IgG(AF488). The same images were used for PL-L17E_{12/100} as in Figure 3C. (B) Inclusion (%) of (i) PL-L17E and (ii) IgG(AF488) in the complex structures. These were calculated from the ratios of free, uncomplexed L17E and IgG(AF488) in the supernatant after centrifugation to the original amounts used for the assay, respectively. Results are presented as mean $\pm$ SE (n=3).

第四節 PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) 粒子による IgG(AF488) サイトゾル送達の様式

FcB(L17E)₃/IgG(AF488) 液滴を用いた IgG(AF488)のサイトゾル導入では、液滴が細胞膜へ付着した後、IgG(AF488) がサイトゾルへ瞬時に流入する様子が見られた^[40]。このとき、細胞膜と F-アクチン構造の動きも見られ、4°Cでは送達が起こらなかったことから、単なる細胞膜の傷害ではなく、細胞の機能も流入に関わっていることが示唆された。そこで、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) においても同様の様式で送達が行われるか検討するため、タイムラプス観察を行った。

PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートを含む培地を細胞に添加してタイムラプス観察を行ったところ、20～30 分後に粒子が細胞上に付着 (Fig. 11A、28 分の画像中で指された粒子) し、その後細胞全体に IgG(AF488) シグナルが拡散した (Fig. 11A、31～37分)。さらに、粒子が細胞膜に付着した後 IgG(AF488) が流入するまでの間に、周囲の膜が粒子を包むような動きをする様子も観察された (Fig. 11A、DIC 拡大図)。

この様子をより詳しく観察するため、コアセルベートを含む溶液で処理した細胞を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した (Fig. 11B(i))。細胞膜上に、輪郭が明瞭な粒子状構造 (黄色の鏤) と、輪郭があまり明瞭でないものが観察された (白色の鏤)。高解像度の拡大画像では、黄色で指された粒子状構造の周囲には微細な膜突起が付着していることが分かった (Fig. 11B(ii)、黄色の鏤、Fig. 12、中央段も参照)。一方、白色で指された粒子状の構造体は継ぎ目のない膜構造に覆われており、この粒子状構造体は何らかの細胞内取り込み経路で細胞内に取り込まれている可能性が示唆された (Fig. 11B(ii)、白色の鏤)。

次に、このような細胞膜の動きが粒子の取り込みであるか確かめるため、送達試験後の粒子の位置を調べた。ここでは、Lyn11-mCherry を発現する HeLa 細胞を用いて、上記同様に送達試験を行った (Fig. 11C)。Lyn11 はミリスチル化される配列 (GCIKSKGKDSA) を持つため、Lyn11-mCherry は細胞膜に局在する^[52]。送達後の細胞について、Fig. 11C(i) の線の位置で Z-stack 撮影を行ったところ、IgG(AF488) のシグナルが細胞内に存在することが分かった (Fig. 11C(ii)、AF488)。また、mCherry のシグナルが AF488 シグナルを取り囲むように観察されたことから、粒子が大きなエンドソーム様の小胞に包まれていることが示唆された (Fig. 11C(ii)、mCherry, merge)。これらの結果より、細胞膜に付着した粒子は膜に包まれ、粒子構造を維持したまま細胞に取り込まれていると考えられる。この取り込み様式と似た現象に関する報告

も存在している^[53]。この報告では HeLa 細胞に 3 μm プラスチックビーズを添加した際、ビーズが膜に補足されて小胞に包まれた状態で細胞内に取り込まれる様子を観察している。本研究で見られた PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) 粒子の取り込み機構は、この報告で見られる取り込みと一部類似していると言える。ただし、HeLa 細胞は貪食細胞ではなく、直径が数 μm の粒子をエンドサイトーシスで取り込むとは考えにくい。そのため、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) 粒子の細胞内取り込みには、非典型的な機構が関与している可能性が示唆される。また、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) 粒子と、FcB(L17E)₃/IgG(AF488) による IgG(AF488) の送達様式には類似点だけでなく、違いも見られる。FcB(L17E)₃/IgG(AF488) においても同様の細胞膜の運動が誘起されたが、IgG(AF488) のサイトゾル流入は細胞表面、またはエンドサイトーシスの非常に早い段階で起こっており、サイトゾル内で粒子構造を保つ様子は観察されなかった。このような違いが生じる理由として、粒子内部における L17E と IgG(AF488) の間の相互作用の強さが考えられる。

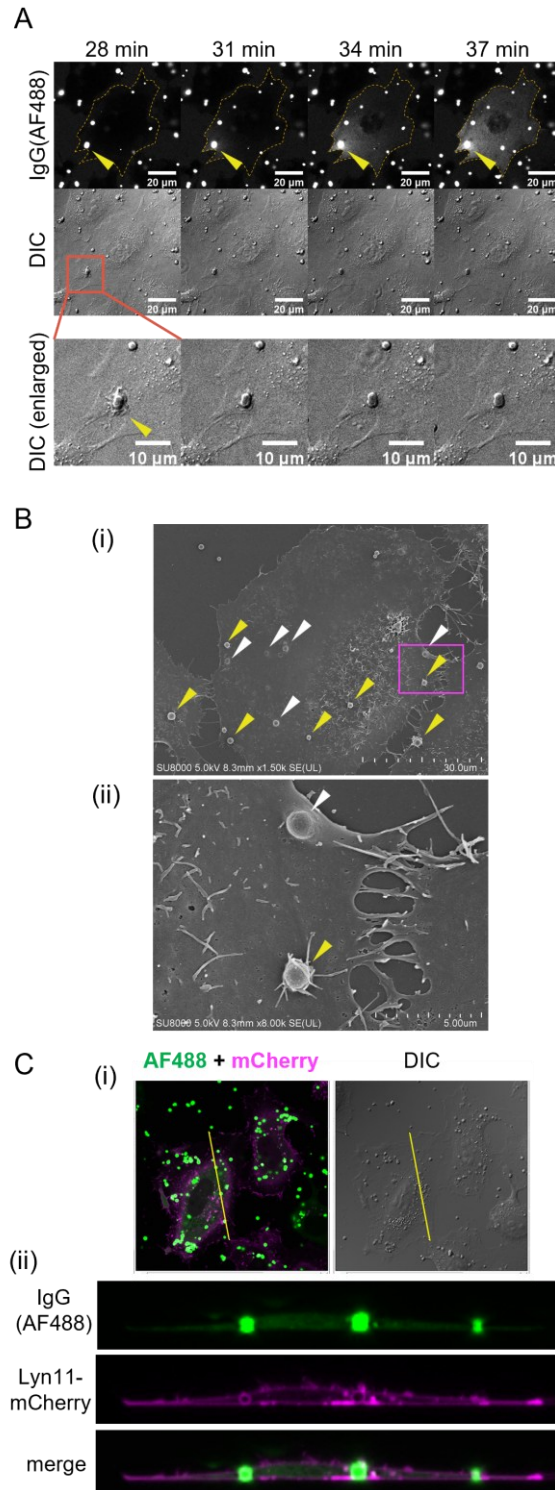


Figure 11. (A) Time-lapse imaging of cells treated with a mixture of PL-L17E_{12/100} and IgG(AF488). Arrowheads indicate a particle-like structure that interacts with the periphery of a cell, resulting in the distribution of IgG(AF488) signals within the cells (the cell boundary is highlighted with a dotted line). The enlarged DIC images corresponding to the position indicated by the red square are shown at the bottom. Note that the membrane structures surrounding the particle (28 min, arrowhead) became less visible with the infusion of IgG(AF488) into the cells. Scale bars, 20 μm (top and middle images) and 10 μm (bottom images) (B) (i) SEM analysis (×1,500) of cells treated with the PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) complex. Yellow arrowheads represent the typical particle-like structures on the cell membranes with fine membrane protrusions attached around the particles. White arrowheads represent the particle-like structures covered by smooth membranes. Scale bar, 30 μm. (ii) Magnified image (×8,000) of the area highlighted by the magenta box in (i). Scale bar, 5 μm. (C) (i) Confocal microscopy image of Lyn11-mCherry-expressing HeLa cells treated with the L17E_{12/100}/IgG(AF488) complex. (ii) Z-stack image of the HeLa cells along the line in (i).

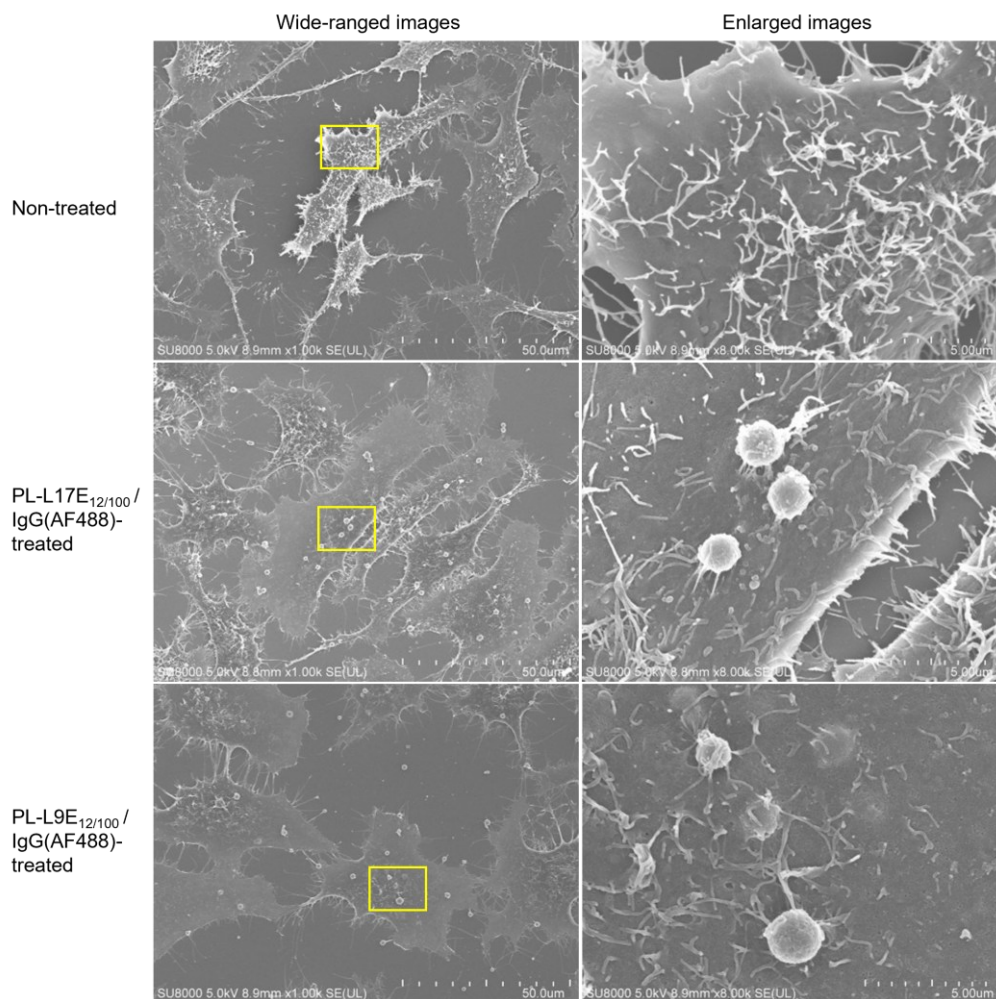


Figure 12. (Left) SEM analysis of untreated cells, cells treated with PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) complexes, and cells treated with PL-L9E_{12/100}/IgG(AF488) complexes. Magnification at $\times 1,000$. Scale bar, 50 μm . (Right) Enlarged images of the boxed area in the left panels. Magnification at $\times 8,000$. Scale bar, 5 μm .

次に、エンドサイトーシスおよびマクロピノサイトーシス阻害剤を用いた送達試験により、送達に関わる因子の推定を行った。F-アクチンに結合し、アクチンの再編成を阻害する作用を持つサイトカラシン D (CytD) の存在下で送達試験を行ったところ、IgG(AF488) が送達された細胞の割合が大幅に低下した。これより、送達に F-アクチンの再構築が関わっていることが示唆された (Fig. 13)。また、細胞膜からコレステロールを除去する作用を持つメチル- β -シクロデキストリン (M β CD) で処理した場合にも、送達が見られた細胞の数が約 35% まで減少した (Fig. 13)。これより、膜にコレステロールが存在していることが PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) の働きに重要であることが示唆された。

また、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) による IgG(AF488) の送達は、HeLa (ヒト子宮頸がん由来) だけでなく、HT1080 (ヒト線維肉腫由来)、T24 (ヒト膀胱がん由来)、A431 (ヒト類表皮がん由来)、Raw264.7 (マウスマクロファージ由来)、および HEK293T (ヒト胎児腎由来) でも見られた (Fig. 14)。送達された細胞の割合はそれぞれ、HeLa: 67%、HT1080: 87%、T24: 72%、A431: 43%、Raw264.7: 45%、HEK293T: 97% であった。これより、この粒子を用いた IgG 送達がさまざまな細胞に適用できる可能性が示唆された。

また、高効率なサイトゾル送達が見られなかった PL-L9E_{12/100}/IgG(AF488) 粒子についても、細胞表面で細胞膜に捕捉されている様子が観察された (Fig. 12、下段)。これより、PL-L9E_{12/100}/IgG(AF488) の送達効率が低い理由は、エンドサイトーシス様経路を誘起できないことではなく、エンドソーム様小胞の膜傷害ができないことである可能性が示唆された。

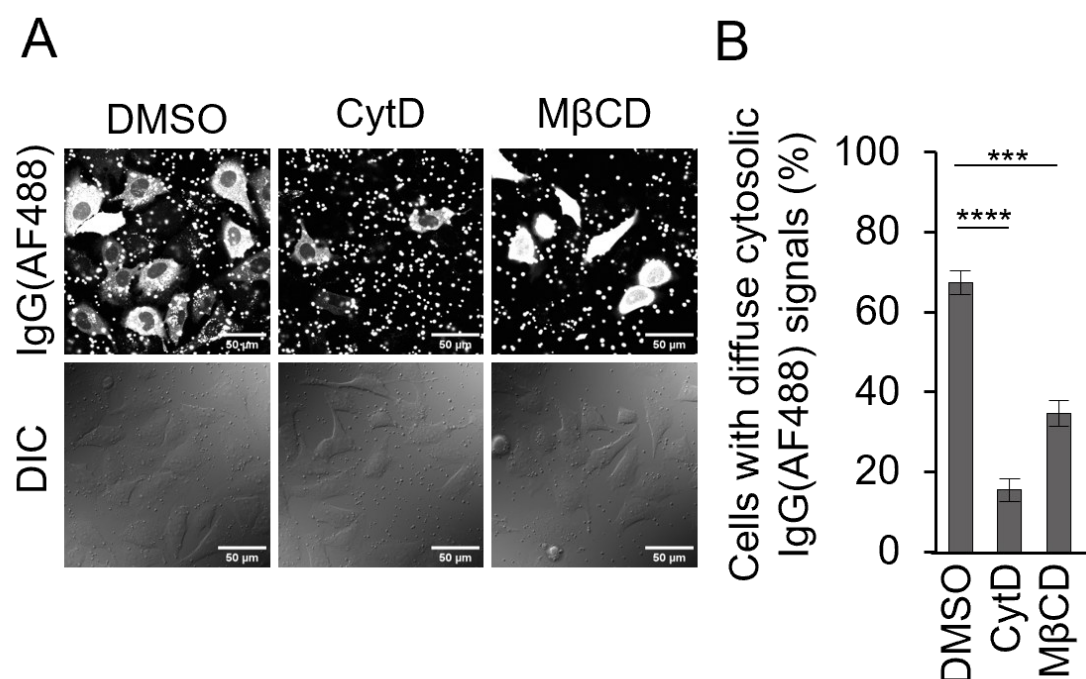


Figure 13. (A) Effect of cytochalasin D (CytD) and methyl- β -cyclodextrin (M β CD) on the cytosolic infusion of IgG(AF488) from the PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) complex analyzed by CLSM. Scale bars, 50 μ m. (B) The percentage of cells with diffuse cytosolic IgG(AF488) signals after the treatments. Results are presented as mean $\pm$ SE (n=3). ***, p<0.001, ****, p<0.0001 by Tukey-Kramer's honestly significant difference test.

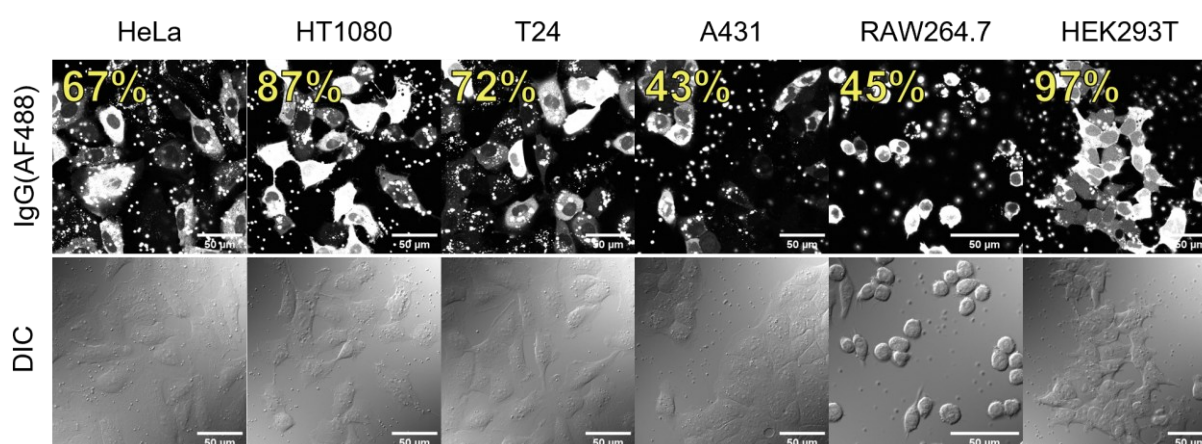


Figure 14. Cytosolic IgG(AF488) distribution in different cell lines treated with PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488). The percentages of cells with diffused cytosolic IgG(AF488) signals after treatments are shown on the images. Scale bars, 50 μ m.

第五節 血清含有条件での IgG(AF488) 送達とペプチドの最適化

これまでの検討は、無血清培地中で行ったものであるが、生体での応用を考慮すると、血清存在下で送達能を発揮できることが望ましい。しかし、血清含有培地を用いた送達試験では、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) による IgG 送達効率は大幅に低下することが分かった。PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) を無血清培地中で処理した場合、約 70% の細胞で IgG(AF488) のサイトゾル拡散シグナルが見られていたが、血清含有培地を用いた場合では約 20% の細胞にしかそのようなシグナルは見られなかった (Fig. 15B (i) および (ii)、PL-L17E_{12/100})。生体膜と相互作用するペプチドの膜傷害性は、一般的に血清存在下では低下することが多く^[42]、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) 粒子についてもペプチドの膜傷害性が不足しているために送達効率が低下したのではないかと考えられる。そこで、L17E の代わりに、より膜傷害性の高いペプチドを利用することにした。このようなペプチドとして、M-ライコトキシン (MLTX) と Q21E を用いた。MLTX は L17E の設計において元となったペプチドで、Q21E は MLTX の 21 位のグルタミンをグルタミン酸に置換したペプチドであり、いずれも L17E より強い膜傷害性を示す^[20]。C 末端に GGC リンカーを持つ Q21E ペプチドまたは MLTX (Fig. 15A) を Fig. 1B と同様にプルランに修飾した、PL-Q21E_{12/100} および PL-MLTX_{12/100} を合成し (修飾量はそれぞれ 100 単糖あたり 11.11 および 11.42)、上記同様の送達試験により IgG(AF488) の送達効率を評価、比較した。まず、血清の無い条件で PL-L17E_{12/100} より高い送達効率を示すか調べたところ、PL-Q21E_{12/100}、PL-MLTX_{12/100} のいずれについても、より多くの細胞に IgG(AF488) を送達できることが分かった (Fig. 15B(i)、PL-Q21E_{12/100}: 85%、PL-MLTX_{12/100}: 92%)。血清含有培地中での送達試験についても、PL-Q21E_{12/100} および PL-MLTX_{12/100} の両方で、PL-L17E_{12/100} よりも多くの細胞に IgG(AF488) を送達できた (Fig. 15B(ii)、それぞれ 41% および 82%)。Q21E および MLTX 自体には強い細胞毒性があり (50%細胞死濃度: それぞれ 3.54 μ M、1.36 μ M)、モノマーとして IgG の細胞移行促進に使用することは難しく、L17E が最も有用であると考えられていた^[20]。しかしプルランに修飾した場合、使用した条件 (ペプチド濃度 3 μ M) では、PL-Q21E_{12/100} および PL-MLTX_{12/100} は顕著な細胞毒性を示さなかった (Fig. 16)。また、血清含有培地中での PL-MLTX_{12/100}/IgG(AF488) による送達についてタイムラプス観察を行ったところ、無血清培地中で PL-L17E_{12/100} を使用した場合と同様の IgG(AF488) のサイトゾル拡散が観察された (Fig. 17)。特に PL-MLTX_{12/100} は最も

高効率で、血清存在下でも 80% の細胞へ送達できるほど活性を維持したため、以降の実験では PL-MLTX_{12/100} を使用した。

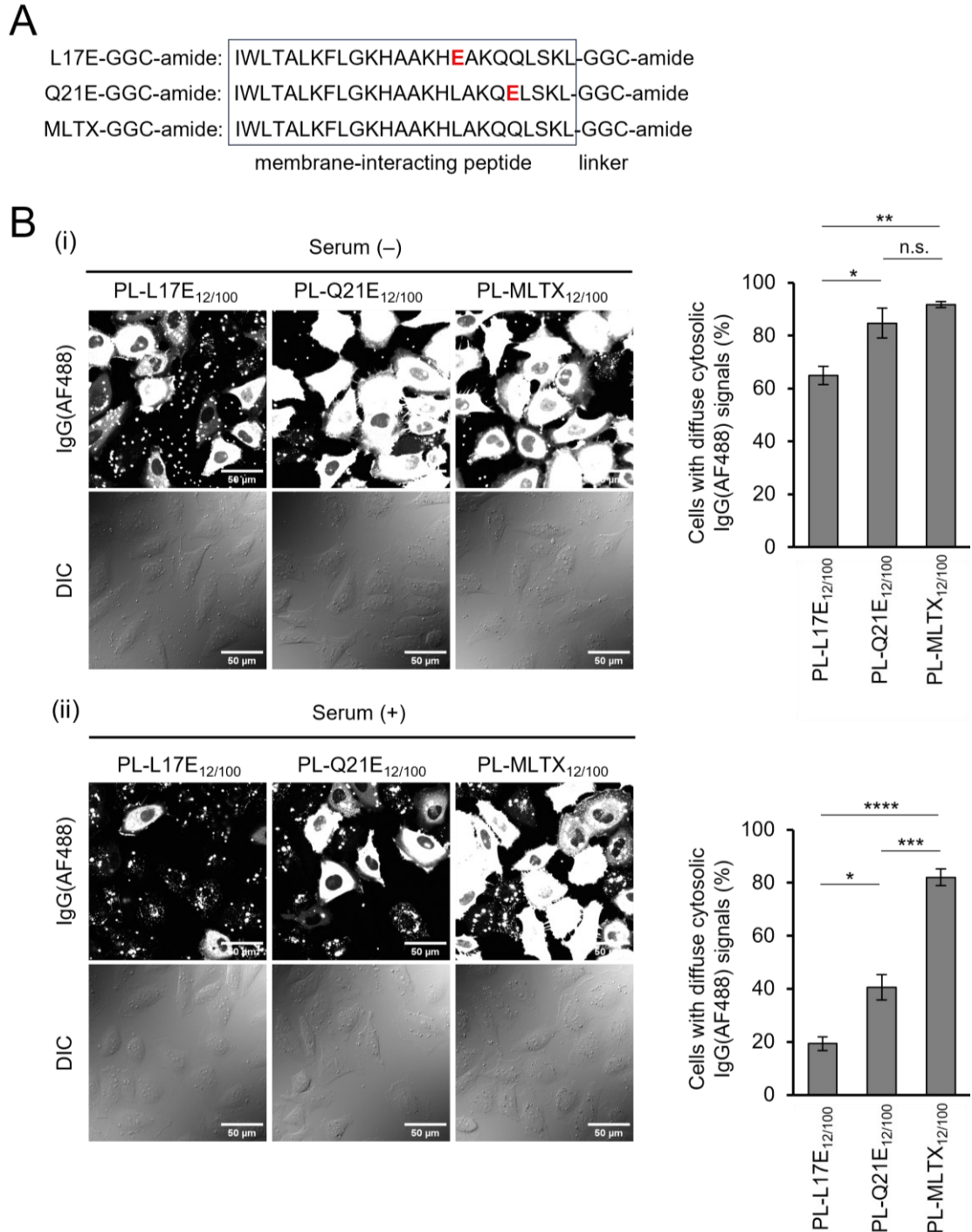


Figure 15. (A) The sequences of L17E-GGC-amide, Q21E-GGC-amide, and MLTX-GGC-amide. (B) Distribution of IgG(AF488) signals in the cells treated with the IgG(AF488) complexes formed with PL-L17E_{12/100}, PL-Q21E_{12/100}, and PL-MLTX_{12/100} in the absence (i) and presence (ii) of serum at 37°C for 1 h. Scale bars, 50 μ m. The percentages of cells with diffuse cytosolic IgG(AF488) signals are given on the IgG(AF488) images. Results are presented as mean $\pm$ SE (n=3). *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001, ****, p<0.0001, n.s.; not significantly different by Tukey-Kramer's honestly significant difference test.

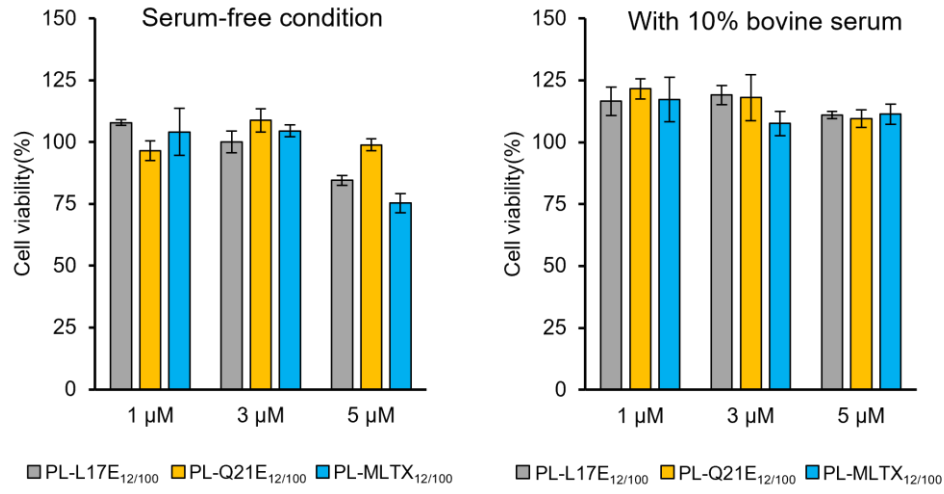


Figure 16. Cytotoxicity induced by treatment with PL-L17E_{12/100}, PL-Q21E_{12/100}, PL-MLTX_{12/100} in the presence and absence of serum, analyzed by the WST-8 assay. The concentrations of each peptide-pullulan conjugate were shown as peptide concentration.

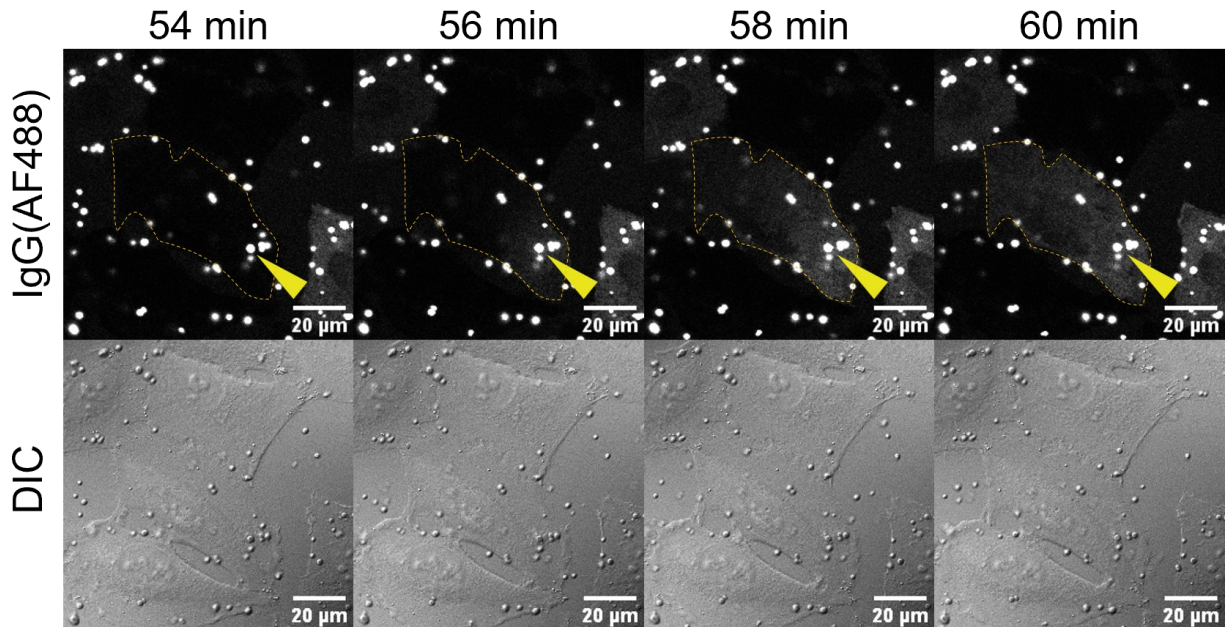


Figure 17. Time-lapse imaging of HeLa cells treated with PL-MLTX_{12/100}/IgG(AF488) complexes in serum-containing α-MEM.

第六節 送達された IgG の標的認識能

送達された IgG が標的に結合する能力を保持しているか確認するため、AF488 標識抗核膜孔複合体 mouse-IgG [anti-NPC IgG(AF488)、IgG 1 分子あたり 6.6 個の AF488 を標識] を用いた送達試験を行なった。血清含有培地中、PL-MLTX_{12/100}/anti-NPC IgG(AF488) で細胞を処理したところ、核周囲にサイトゾルに比べて輝度の高い蛍光シグナルが見られた (Fig. 18)。サイトゾルにもシグナルは見られるため、IgG の部分的な分解または変性等はあると考えられるものの、細胞に送達された IgG の一部は細胞内の標的タンパク質に対する特異的な結合力を保持していることが示唆され、本手法の妥当性が裏付けされたと言える。また、無血清培地中でも、PL-MLTX_{12/100}/anti-NPC IgG(AF488) および PL-L17E_{12/100}/anti-NPC IgG(AF488) の処理により、核周囲に anti-NPC IgG(AF488) シグナルの集積が見られた。以上より、本手法を用いて機能を維持した抗体を送達できると考えられる (Fig. 19)。

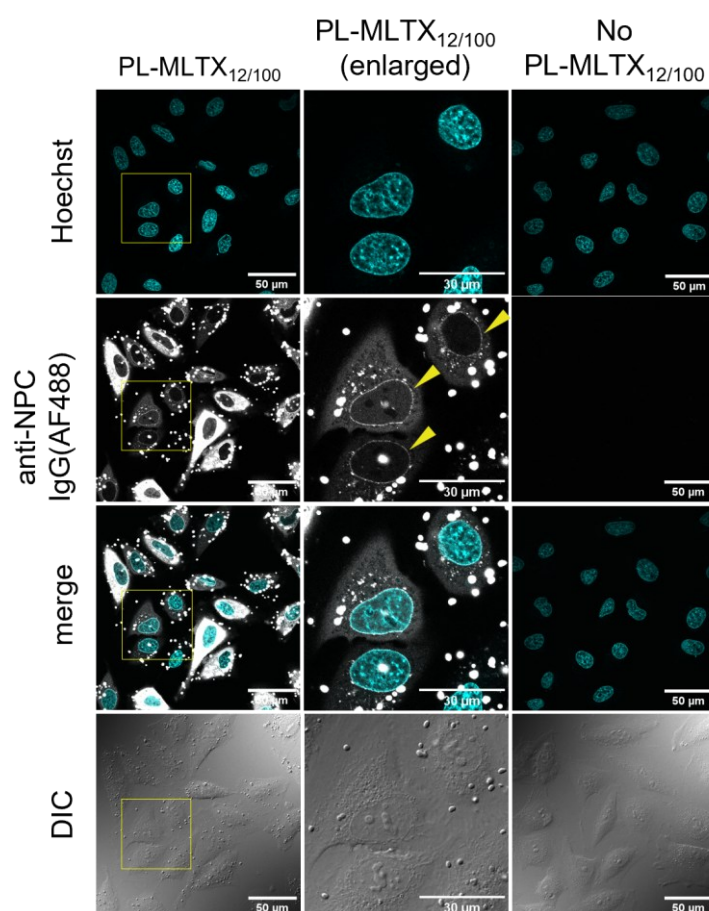


Figure 18. (A) Nuclear membrane accumulation of anti-nuclear pore complex (NPC) IgG(AF488) from the PL-MLTX_{12/100}/anti-NPC-IgG(AF488) complex after incubation in serum-containing α -MEM for 1 h. Concentrations of PL-MLTX_{12/100} and anti-NPC-IgG(AF488) used for complex formation: 3 μ M (as concentration of MLTX) and 56 μ g/mL, respectively.

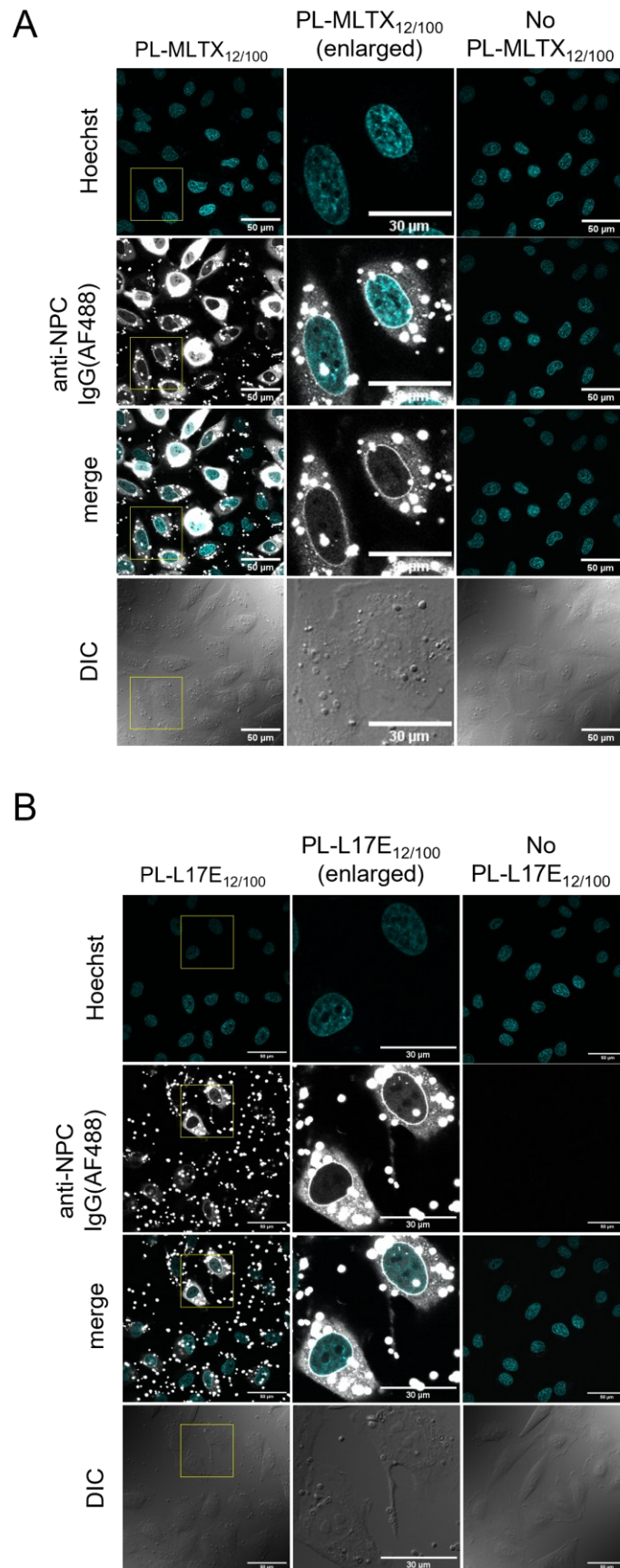


Figure 19. Nuclear membrane accumulation of anti-nuclear pore complex (NPC)-IgG(AF488) released from (A) the PL-MLTX_{12/100}/anti NPC-IgG(AF488) or (B) the PL-L17E_{12/100}/anti-NPC-IgG(AF488) complexes after incubation in serum-containing α -MEM for 1 h.

第七節 初代培養肝細胞および人工多能性幹 (iPS) 細胞への IgG(AF488) 送達

これまでに、L17E および MLTX などの膜障害性ペプチドを修飾したプルランと IgG(AF488)から形成されるコアセルベートによる IgG(AF488)のサイトゾル送達が可能であること、またアクチン再構築を伴う細胞膜の構造変化が送達に重要な役割を担うことや、細胞内タンパク質の標的化の可能性が示唆されてきた。また、本手法がさまざまな細胞株へ適用できる可能性も示唆されている (Fig. 14)。そこで、*in vivo*での送達実現に向けた第一歩として、本手法を用いた初代培養肝細胞への IgG 送達が可能か調べた。肝臓は血中の薬物が最もアクセスしやすい臓器である。肝臓は、肝細胞、マクロファージ (クッパー細胞)、星状細胞など、さまざまな種類の細胞で構成されているが、特に肝細胞は肝臓における主要な薬物標的である^[54]。そこで、PL-MLTX_{12/100}を用いたコアセルベートによる初代培養肝細胞への IgG(AF488)送達の可能性を調べた。

C57BL/6 マウスの肝臓から単離した初代肝細胞を、PL-MLTX_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートまたは IgG(AF488) で 1 時間処理した後、CLSM 観察を行なった (Fig. 20)。IgG(AF488) のみを処理した場合にはサイトゾル拡散シグナルが見られなかったのに対し、PL-MLTX_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートで処理した場合、多くの細胞で IgG(AF488) のサイトゾル拡散シグナルが観察された。このことから、PL-MLTX_{12/100} は肝臓での IgG のサイトゾル送達手法として適用可能であることが示唆された。また、IgG(AF488)の画像内の線における Z-stack 画像からは、Fig. 11 と同様に粒子が細胞内部に存在していることを示唆され、初代培養肝細胞においても類似の経路で細胞内に取り込まれている可能性が考えられる。

次に、PL-MLTX_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートによる人工多能性幹 (iPS) 細胞への IgG(AF488) 送達の可能性を評価した。ヒト iPS 細胞由来の体細胞およびオルガノイドは、疾患メカニズムの解明、薬物候補化合物の探索、薬物の有効性の評価、毒性の予測など、創薬に広く貢献し得ることが示されている^[55-56]。iPS 細胞の細胞内取り込み機構は分化細胞とは異なる可能性があるため、コアセルベートを使用してこれら細胞へのサイトゾル送達が可能であるか確認することは有益であると考えられる。未分化 iPS 細胞への一過的な IgG 送達が可能となれば、細胞内の分子相互作用を制御し、特定の細胞分化を誘発するための方法となり得る。また、iPS 細胞由

来の体細胞で効率的な IgG のサイトゾル送達が可能になれば、新たな薬物の創出や評価に利用できる可能性がある。

未分化 iPS 細胞を PL-MLTX_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートを含む培地で 1 時間処理し、CLSM 観察により IgG(AF488) の送達を評価した (Fig. 21A)。効率は十分とは言えないが、主にコロニーの周辺部の細胞において細胞全体に広がる IgG(AF488) シグナルが観察された。一方、PL-MLTX_{12/100} がない場合にはそのようなシグナルは観察されなかった。同様に、iPS 細胞由来の腸管上皮細胞でも PL-MLTX_{12/100}/IgG(AF488) による IgG(AF488) のサイトゾル送達を観察された (Fig. 21B)。現段階では、効率に改善の余地が非常に大きいものの、この結果は、将来的にコアセルベートを用いた送達手法の改良によって iPS 細胞サイトゾルに IgG を送達し、細胞内タンパク質の機能制御ができる可能性を示唆している。

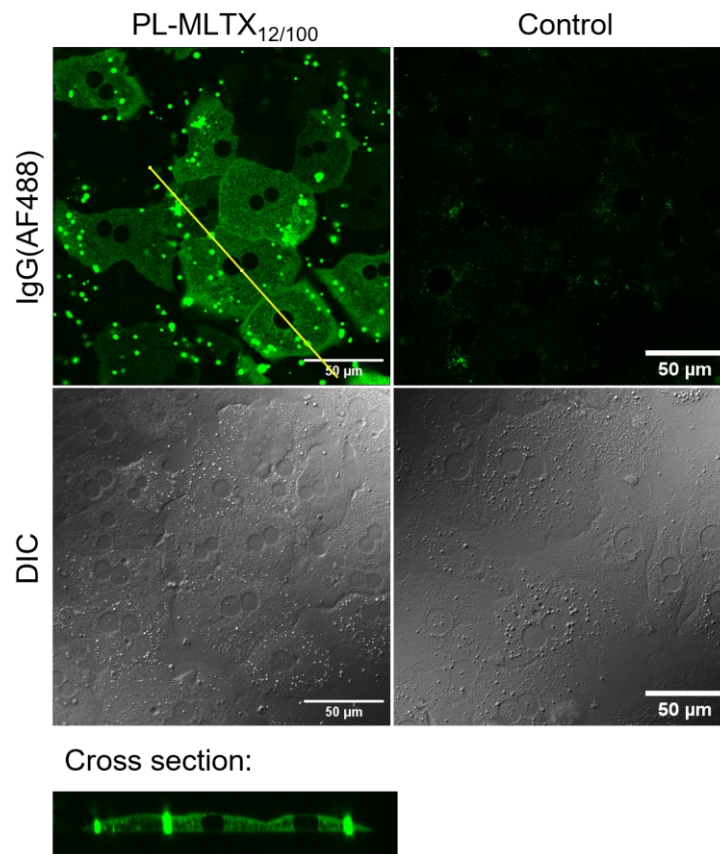


Figure 20. Primary hepatocytes treated with the PL-MLTX_{12/100}/IgG(AF488) complexes or IgG(AF488) alone (control) in serum-free Williams' Medium E for 1 h. Concentrations of PL-MLTX_{12/100} and IgG(AF488) used for complex formation: 3 μM (as concentration of MLTX) and 56 μg/mL, respectively. The Z-stack cross section image along with the line in the image of PL-MLTX_{12/100} and IgG(AF488) is also shown. Scale bars, 50 μm.

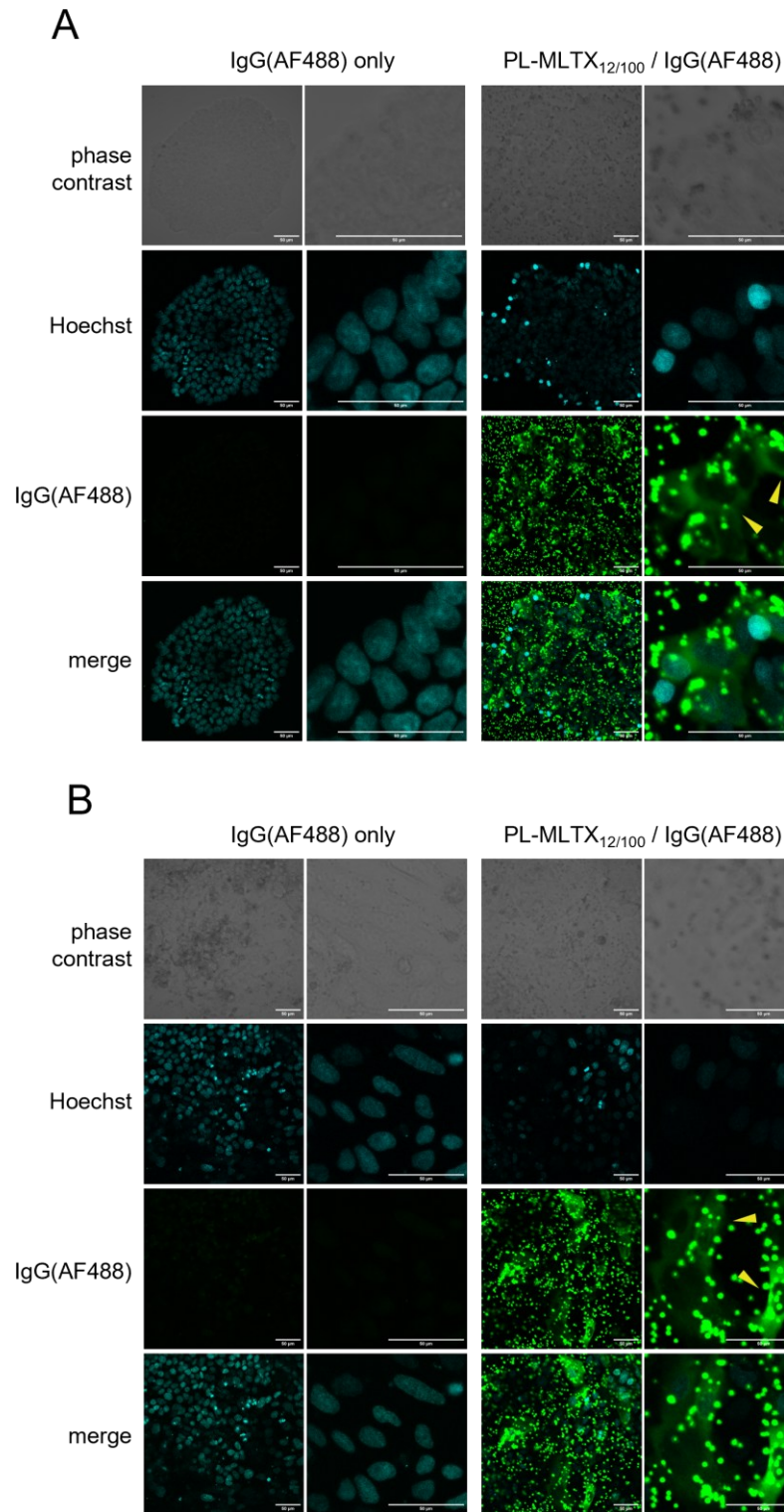


Figure 21. Treatment of (A) undifferentiated iPS cells and (B) iPS cell-derived intestinal epithelial cells with IgG(AF488) and PL-MLTX_{12/100}/IgG(AF488) complexes for 1 h. Enlarged images of the cells corresponding to the boxed area in the left panels are shown in the right panels. Arrowheads indicate the cells with cytosolic IgG(AF488) signals. Since the nuclear pore generally does not allow for translocation of macromolecules of $> \sim 30$ kDa, ^[57] this indicates that the majority of IgG(AF488) was delivered to the cytosol while being modified with IgGs, thus retaining IgG structures without suffering from proteolytic degradation. Due to the difficulty of culturing undifferentiated iPS cells on glass dishes and the tendency of these cells tend to form stacked colonies, the images were taken from the cells on plastic dishes, which may make it difficult to obtain high-resolution images. Scale bars, 50 μ m.

第一章の考察

本章では、多糖の一種であるプルランに L17E や MLTX などのペプチドを修飾することで、IgG(AF488) とコアセルベートを形成する新たなツールの開発を行った。先行研究により、Fc 領域結合ペプチドを持つ L17E の三量体 [FcB(L17E)₃] を IgG(AF488) と混合すると、液-液相分離により粒子状の液滴が形成され、さらに IgG をサイトゾルに移行させることが報告されている^[40]。本章では新たなペプチド多量体としてプルランと L17E のコンジュゲートである PL-L17E をデザイン・合成した。また、PL-L17E を用いた場合でも、IgG(AF488) とのコアセルベート形成および IgG(AF488) 高効率なサイトゾル送達を達成できることが分かった。多糖に膜傷害性ペプチドを修飾するデザインは他の報告^[58]でも用いられているものの、コアセルベート形成および抗体の送達にはこれまで応用されていなかった。

第二節の結果から、PL-L17E を IgG(AF488) と混合すると、コアセルベートの形成が確認され、細胞への添加により IgG(AF488) がサイトゾルに送達されることを確認した。中でも、100 単糖あたり約 12 分子の L17E を含む PL-L17E_{12/100} が IgG(AF488) の送達に最も効果的であることが分かった。またコアセルベート形成には AF488 標識により IgG に負電荷を付与することが必要であり、IgG(AF488) の送達には修飾するペプチドの膜傷害性や送達活性も重要であることが分かった。

第三節の結果から、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートは、高塩濃度条件下で非常に高い安定性を持ち、2 M NaCl の存在下でもコアセルベートが存在することが確認された。また、FRAP により、コアセルベート内の IgG(AF488) の流動性が低いことも示唆された。このような結果より、FcB(L17E)₃/IgG(AF488)^[40] や他のコアセルベート^[9,59,60]と比較して、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートではその形成に疎水性相互作用がより大きく関わっており、ゲルに近い性質を持つことが示唆される。PL-L17E_{12/100} は 1 分子中に含まれる L17E の数が多く、IgG(AF488) との静電相互作用および疎水性相互作用が多点で働くため、より高密度の相互作用ネットワークを作っている可能性がある。液滴やコアセルベートの薬物送達への応用において粒子の不安定性は課題の 1 つであるが、PL-L17E/IgG(AF488) コアセルベートは安定性が高くかつ凝集はしていないため、将来的な応用において有望なツールであると期待される。

また、ゲル様の安定性のために、細胞への取り込み過程を捉えることも可能であった。第四節では、CLSM および SEM 観察により、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートが細胞に取り込まれる様子を捉えることができ、送達の過程で細胞膜の動的な構造変化が起こることが分かった。サイトゾルへの IgG(AF488) の拡散が、膜の動きが見られた後に起こる様子も観察された。さらに、サイトゾル内で瞬時に崩壊することなく、膜に包まれた状態で細胞内部に存在する様子も捉えることができた。この細胞内取り込みは、ファゴサイトーシスと類似しているように思える。しかし、HeLa は食細胞ではないことから、非食細胞における微粒子の非典型的なエンドサイトーシス様経路の存在が示唆される。また、これに類似した取り込みは他のコアセルベート^[61]やプラスチックビーズ^[53]でも見られることが報告されており、コアセルベート等のマイクロ粒子の取り込みに共通する特徴である可能性も示唆される。

第五節では、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートによる IgG(AF488) サイトゾル送達の効率が血清含有培地では低下する課題を、MLTX や Q21E などの膜傷害性がより高いペプチドを使用することで解決した。コアセルベートを用いた送達手法については FcB(L17E)₃^[40]を除きほとんどが無血清条件での結果のみを報告している^[9,41]。そのため、Fig. 15B(i) で見られるように、血清を含む条件で効率よく IgG(AF488) を送達できることは、PL-MLTX_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベートの利点であると言える。

また、第六節では PL-MLTX_{12/100} と anti-NPC IgG(AF488) からなるコアセルベートが認識能を保った抗体をサイトゾルへ送達し得ることも明らかにした。さらに第七節では、PL-MLTX_{12/100} を用いることで、初代培養肝細胞および iPS 細胞サイトゾルへ IgG(AF488) を送達することが可能であることも示した。特に iPS 細胞について、mRNA の送達については報告があるが^[62]、IgG のサイトゾル送達を達成した報告は他に見られない。本手法の更なる改良によって iPS 細胞への IgG 送達効率が大きく改善されれば、抗体の特異的な結合を利用した新しい iPS 細胞制御技術の開発につながると期待される。

上記の通り、本章の結果は膜傷害性ペプチドを含むコアセルベートを用いた送達手法が、分子細胞生物学研究や薬物送達に有望かつ有効であることを示唆している。

第二章

高効率なサイトゾル送達に必要な抗体量の低減

第一章では、プルランに膜傷害性ペプチドを修飾した PL-L17E_{12/100} や、さらに活性の高い PL-MLTX_{12/100} を用いた IgG(AF488) とのコアセルベート形成、およびそのコアセルベートによる高効率な IgG(AF488) のサイトゾル送達を達成した。一方、PL-MLTX_{12/100} を用いた場合でも抗体を送達するために必要な IgG(AF488) 濃度は 56 $\mu\text{g/mL}$ であり、依然として多くの抗体を消費する。同程度の割合の細胞への送達を達成するのに必要な抗体量を低減できれば、基礎研究での利用や臨床応用等を見据えた際に、より使いやすいツールとなる。そこで、第二章では、抗体の必要量を低減することを目指した。

PL-MLTX_{12/100} を用いた第一章の手法において、単純に抗体と PL-MLTX_{12/100} の量を下げた場合、送達される細胞の割合は減少する。そこで、ペプチドと膜の相互作用をさらに高めるため、MLTX にアルギニン残基を導入した新たなペプチドを修飾したプルランを合成し、高効率なサイトゾル送達に必要な抗体量の低減が可能か検討した。膜傷害性ペプチド L17E にアルギニン 4 残基を導入した L17ER4 をタンパク質とコンジュゲートすることで、より効率的なタンパク質のサイトゾル送達が可能であることが報告されている^[63-65]。ペプチドやデザインが異なっても、膜傷害性ペプチドへのアルギニン残基の導入が送達効率の改善に効果的である可能性があると考えた。また、正電荷を持つアルギニン残基を導入することで、負電荷を持つ IgG(AF488) との相互作用が強くなることも期待した。アルギニン残基がペプチドの液-液相分離やコアセルベート形成を促進するという報告もある^[66,67]。高濃度の条件と比較すると、低濃度条件ではペプチド修飾プルランと IgG(AF488) との相互作用が弱まることが予想される。そこで、IgG(AF488) との相互作用を強く保ちコアセルベート形成能を高めるデザインとして、アルギニン残基導入が有効であると考えた。

本章では、MLTX に 2~8 残基のアルギニンを導入したペプチドを合成し、これらをプルランに修飾した。このようにして得られた PL-MLTXR_{n12/100} ($n=2, 4, 6, 8$) の内、特に PL-MLTXR_{412/100}、PL-MLTXR_{612/100}、および PL-MLTXR_{812/100} において高いコアセルベート形成能と、効率的な IgG(AF488) のサイトゾル送達活性が見られた。また、

PL-MLTXR4_{12/100}は、血清含有培地中において、PL-L17E_{12/100}(無血清条件)またはPL-MLTX_{12/100}(血清含有条件)と同程度の細胞へサイトゾル送達するのに必要な抗体量を、それぞれ 1/5 程度および 1/3 程度まで低減できることが分かった。また、PL-MLTXR4_{12/100}を用いた場合の送達様式が PL-MLTX_{12/100}を用いた場合と同様であることが示唆された。PL-MLTXR4_{12/100}/anti-NPC IgG(AF488) コアセルベートが認識能を保った抗体をサイトゾル送達できることも確かめた。

第一節 アルギニン残基導入 MLTX 修飾プルランの合成と物性の評価

合成について、まず、既報^[49]に従ってプルラン (約 550 単糖、約 100 kDa) ヘアジド基を導入し、プルランアジドを合成した (100 単糖あたり 13.6 個のアジド基)。次に、C 末端側にアルギニン残基と Gly-Gly-Cys-amide を持つ MLTX (MLTX-R_n-GGC-amide, n=2, 4, 6, 8) および MLTX-GGC を Fmoc 固相法により合成した (Fig. 22A)。その後、それぞれ DBCO-マレイミドで修飾した後、プルランアジドと銅フリークリック反応により結合させることで、PL-MLTXR_{n12/100} (n=2, 4, 6, 8) および PL-MLTX_{12/100} とした。プルランと反応させるペプチドは、前章で最も効果的であった 100 単糖あたり 12 当量とした。PL-MLTX_{12/100}、PL-MLTXR_{212/100}、PL-MLTXR_{412/100}、PL-MLTXR_{612/100}、および PL-MLTXR_{812/100} について、¹H NMR により決定した修飾量はそれぞれ 11.37、11.89、11.80、11.56、および 11.84 であった。

第一章では、L17E より膜傷害性の高いペプチドである Q21E や MLTX を利用することで送達活性の向上が見られた。また、先行研究において、L17E への R4 の導入によって、細胞毒性が上昇する傾向があることが分かっている^[63]。この毒性の上昇は膜傷害性の高さに関係している可能性がある。そこで、合成した PL-MLTXR_{n12/100} の膜傷害性の評価により、アルギニン導入の妥当性について検討した。ANTS/DPX 内封リポソームを用いた漏出試験を行った。POPC 100%の LUV から漏出した ANTS の蛍光強度とペプチド/脂質比の関係から、PL-MLTXR_{n12/100} では PL-MLTX_{12/100} と比べて小さいペプチド/脂質比で漏出が起こることが分かった (Fig. 22B)。これは、PL-MLTXR_{n12/100} の膜傷害性が PL-MLTX_{12/100} より高いことを示唆している。特に、PL-MLTXR_{412/100}、PL-MLTXR_{612/100}、PL-MLTXR_{812/100} は比較的高い膜傷害性を示している。これより、アルギニン残基の導入が MLTX 修飾プルランの膜傷害性向上に繋がることが示唆された。

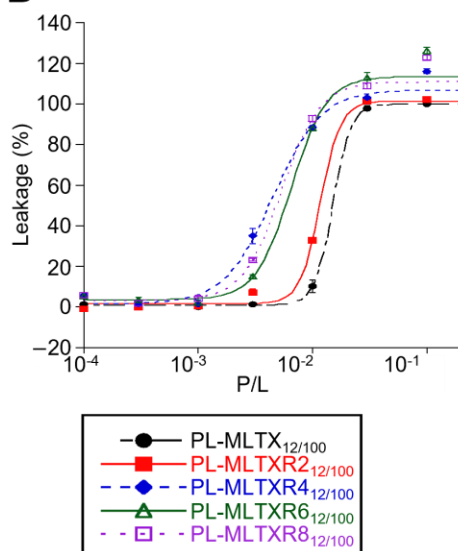
次に、アルギニン残基の導入により、IgG(AF488) とのコアセルベート形成能が向上しているか確かめた。正電荷を持つアルギニンは、静電相互作用の他に、カチオン- π 相互作用も形成しやすい^[68]。Alexa Fluor 488 は負電荷と芳香環の両方を持つことから、アルギニンの導入がコアセルベート形成に有利に働くのではないかと考えた。血清含有培地中での使用を想定し、各ペプチド修飾プルランと IgG(AF488) の混合により調製したコアセルベートに血清含有培地を加えた液について、濁度測定および粒子数測定を行った。濁度測定は 650 nm の吸光度を基に測定し、粒子数は蛍光顕微

鏡 BZ-X810 により画像解析することで測定した。アルギニン残基を導入したものの方が高い濁度を示し、粒子数も多い傾向であるため、アルギニン残基導入の狙いの一つであるコアセルベート形成の促進が達成できていると言える (Fig. 22C)。

A

MLTX-GGC : IWL TALKFLGKHA AKHLAKQQLSKLGGC-amide
 MLTXR2-GGC: IWL TALKFLGKHA AKHLAKQQLSKLRRGGC-amide
 MLTXR4-GGC: IWL TALKFLGKHA AKHLAKQQLSKLRRRRGGC-amide
 MLTXR6-GGC: IWL TALKFLGKHA AKHLAKQQLSKLRRRRRRGGC-amide
 MLTXR8-GGC: IWL TALKFLGKHA AKHLAKQQLSKLRRRRRRRRGGC-amide

B



C

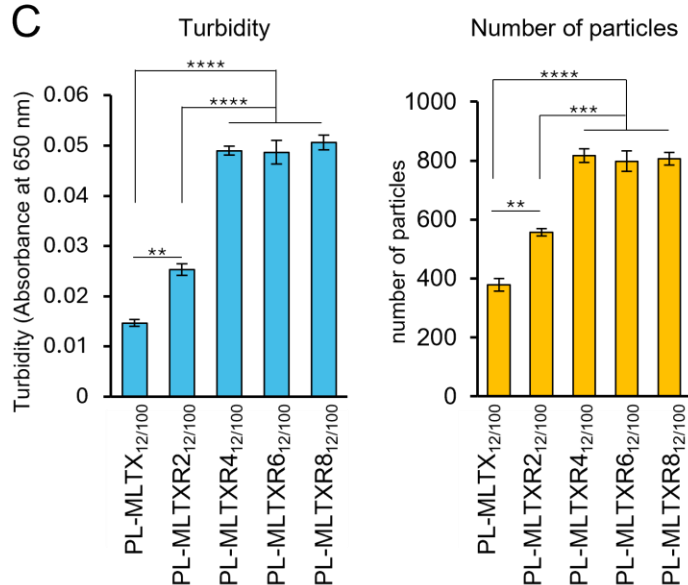


Figure 22. (A) The sequences of MLTX-GGC, MLTXR2-GGC, MLTXR4-GGC, MLTXR6-GGC, and MLTXR8-GGC. (B) Liposomal dye leakage by the treatment with each peptide-pullulan conjugate. Filled black circle, PL-MLTX_{12/100}; filled red square, PL-MLTXR2_{12/100}; filled blue diamond, PL-MLTXR4_{12/100}; open green triangle, PL-MLTXR6_{12/100}; open purple square, PL-MLTXR8_{12/100}. Lipid composition of LUV; POPC 100%. lipid concentration; 100 μ M. Temperature; 25°C, pH 7.4. Results are presented as mean $\pm$ SE (n=3). (C) Turbidity or the number of particles in the mixture of each peptide-pullulan conjugate and IgG(AF488). Turbidity was measured as the absorbance at 650 nm and the number of particles was counted using fluorescence microscopy BZ-X810. Peptide-pullulan conjugate concentration (as peptide concentration); 2.5 μ M. IgG(AF488) concentration; 50 μ g/mL. Results are presented as mean $\pm$ SE (n=3). **, p<0.01, ***, p<0.001, ****, p<0.0001 by Tukey-Kramer's honestly significant difference test.

第二節 アルギニン残基導入 MLTX 修飾プルランによる IgG(AF488) のサイトゾル送達

新たに合成したペプチド修飾プルランについて、送達活性の検討を行った。まず、PL-MLTXR2_{12/100}、PL-MLTXR4_{12/100}、PL-MLTXR6_{12/100}、および PL-MLTXR8_{12/100} の細胞毒性を調べたところ、いずれも 1 μ M 程度までは顕著な細胞毒性を示さなかった (Fig. 23A)。この結果をもとに、以降の細胞実験ではペプチド修飾プルランの終濃度は 0.5 μ M、IgG(AF488) の終濃度は 10 μ g/mL で用いることとした。次に、これらペプチド修飾プルランおよび PL-MLTX_{12/100} について、細胞へ添加する条件で IgG(AF488) とのコアセルベート形成が見られるか確かめた。各ペプチド修飾プルランと抗体を混合後、25 mM HEPES を含む α -MEM(+) (pH 7.4) で希釈した液中に、直径数 μ m のコアセルベートが形成していることを共焦点顕微鏡により確認した (Fig. 24A)。次に、これらを HeLa 細胞に添加して 1 時間処理後、CLSM 観察を行ったところ、PL-MLTXR2_{12/100}、PL-MLTXR4_{12/100}、PL-MLTXR6_{12/100}、PL-MLTXR8_{12/100} のいずれも PL-MLTX_{12/100} より高効率に IgG(AF488) をサイトゾルへ送達している様子が見られた (Fig. 24B)。送達効率は、自動撮影および画像解析機能を持つ蛍光顕微鏡 BZ-X810 により撮影、計数することで定量した (Fig. 24C)。PL-MLTX_{12/100} では 30%程度の細胞でしかサイトゾル送達が見られなかったのに対し、PL-MLTXR2_{12/100} では 50%程度、PL-MLTXR4_{12/100}、PL-MLTXR6_{12/100}、および PL-MLTXR8_{12/100} では 70%程度の細胞で送達が見られた。これより、4~8 残基程度のア르기ニンの導入が、低濃度の IgG(AF488) 送達における効率の改善に有効であることが示唆された。4 残基以上の導入では同程度の活性が見られたことから、以降の実験では最もペプチド鎖が短い PL-MLTXR4_{12/100} を用いた。

PL-MLTXR4_{12/100} の活性についてさらに詳しく調べるため、IgG(AF488) が送達される細胞の割合が、使用濃度の違いによってどのように変化するか確かめた。PL-MLTXR4_{12/100} と IgG(AF488) を用いて形成したコアセルベートに、異なる量の α -MEM(+) (25 mM HEPES 含有、pH 7.4) を加えて IgG(AF488) の最終濃度を 20, 10, 5, または 2.5 μ g/mL とした (PL-MLTXR4_{12/100} 濃度はそれぞれ 1, 0.5, 0.25, または 0.13 μ M)。これを HeLa 細胞に添加して上記同様に処理後、蛍光顕微鏡 BZ-X810 により観察および計数を行った (Fig. 24D)。その結果、濃度依存的に送達できる細胞の割合が変化し、5 μ g/mL までであれば比較的高い送達効率 (50%程度) を達成できることが分かった。また、IgG(AF488) が 20 μ g/mL の条件で約 80%、10 μ g/mL の条件で約 70%の細胞に送

達できているが、これはそれぞれ 56 $\mu\text{g/mL}$ の IgG(AF488) を、PL-L17E_{12/100} (無血清条件) または PL-MLTX_{12/100} (血清含有条件) と共に処理した場合と同程度の割合である。これより、PL-MLTXR₄_{12/100} は、血清含有条件において、PL-L17E_{12/100} (無血清)、および PL-MLTX_{12/100} (血清含有) と比べ、同程度の送達割合を得るのに必要な抗体量を、それぞれ 1/5 および 1/3 程度に低減したと言える。

また、導入するアルギニン残基の位置によって活性に違いが見られるか検討した。N 末端側にアルギニンを 4 残基導入した R4MLTX-GGC-amide を合成し、同様にプルランへ修飾して PL-R4MLTX_{12/100} とした [修飾量は 11.77、使用濃度で顕著な毒性なし (Fig. 23B)]。これを用いて上記同様にコアセルベート形成および HeLa 細胞への IgG(AF488) 送達活性を調べた。その結果、PL-R4MLTX_{12/100} は IgG(AF488) とコアセルベート様の粒子を形成できるものの、サイトゾル送達活性は低いことが分かった (Fig. 25)。これより、MLTX の C 末端へのアルギニン残基の導入が活性向上に効果的であることが示唆された。また、R8 のみを修飾したプルランである PL-R8 を同様に用いた場合サイトゾル送達はほとんど見られない (Fig. 25B)。CPP としての機能を持つ R8 を修飾したプルランでも本条件では送達が見られないため、機能を持たない R4 のみを修飾したプルランも同様であると推測され、R4 を導入した MLTX をプルランへ修飾することが重要であると考えられる。

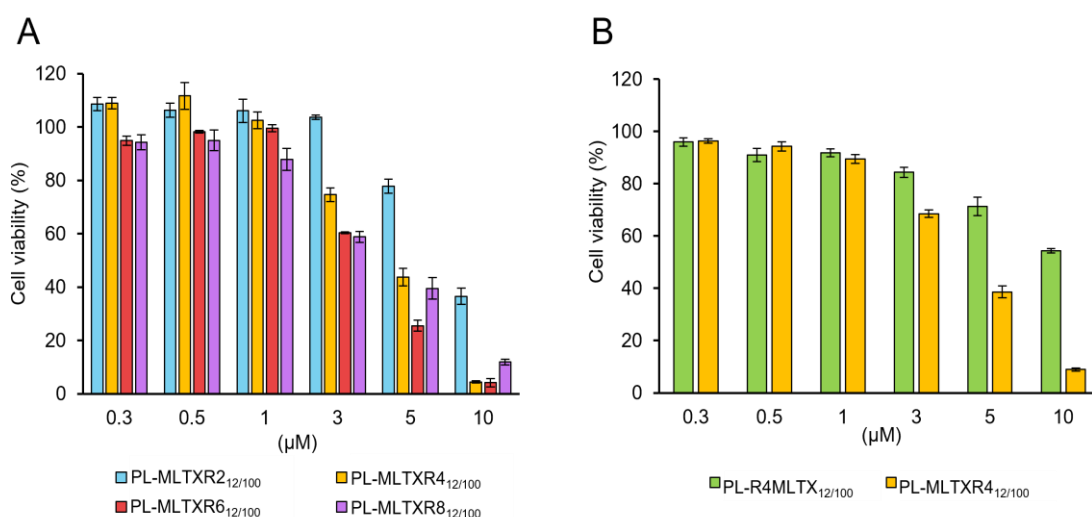


Figure 23. Cytotoxicity induced by treatment with (A) PL-MLTXR₂_{12/100}, PL-MLTXR₄_{12/100}, PL-MLTXR₆_{12/100}, or PL-MLTXR₈_{12/100}, and (B) PL-R4MLTX_{12/100} or PL-MLTXR₄_{12/100} in the presence of serum, analyzed by the WST-8 assay. The concentrations of each peptide-pullulan conjugate were shown as peptide concentration.

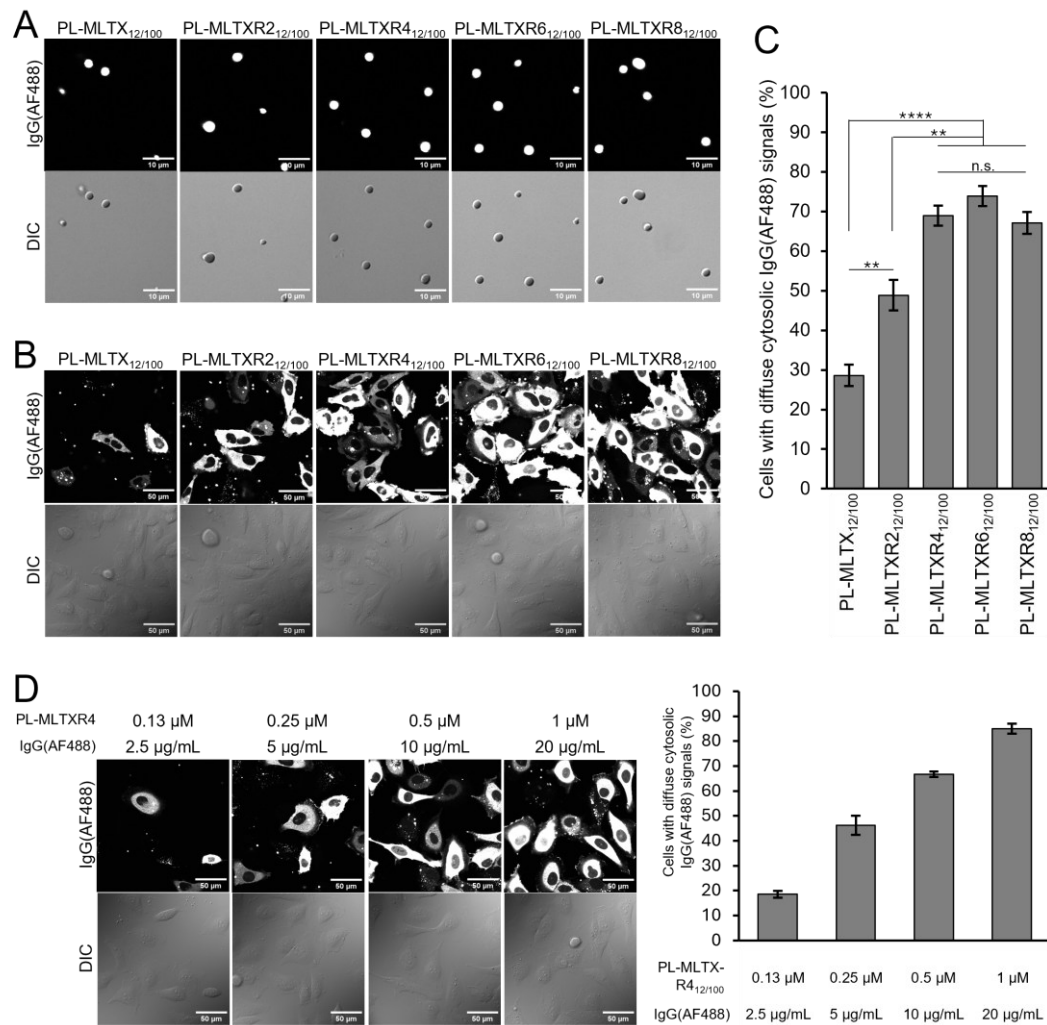


Figure 24. (A) Particle formation by each peptide-pullulan conjugate (PL-peptides) and IgG(Af488). Scale bars, 10 μ m. (B) CLSM observation of HeLa cells after treated with each PL-peptides/IgG(Af488) for 1 h. Scale bars, 50 μ m. (C) Cells with cytosolic diffused IgG(Af488) signals counted using fluorescence microscopy BZ-X810. Results are presented as mean $\pm$ standard error (SE) (n=3). **, p<0.01, ****, p<0.0001, n.s.; not significantly different by Tukey-Kramer's honestly significant difference test. Final concentrations of peptide-pullulan conjugates and IgG(Af488) used for (A), (B) and (C): 0.5 μ M (as peptide concentration) and 10 μ g/mL, respectively. (D) Cytosolic IgG(Af488) distribution in HeLa cells treated with PL-MLTXR4_{12/100}/IgG(Af488) at different concentration. Scale bars, 50 μ m. The percentages of cells with diffused signals are shown as the bar graph. Results are presented as mean $\pm$ SE (n=3).

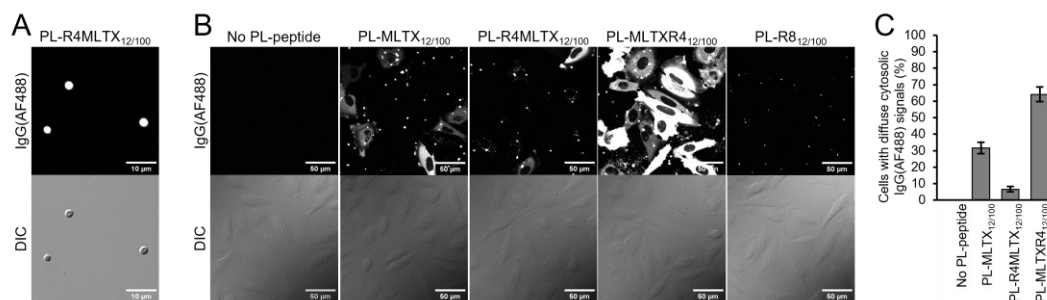


Figure 25. (A) Particle formation between PL-R4MLTX_{12/100} and IgG(Af488). Scale bars, 10 μ m. (B) Confocal microscopic observation of HeLa cells after incubation with each peptide-pullulan conjugate and IgG(Af488) for 1 h. Scale bars, 50 μ m. (C) Percentages of the cells with cytosolic diffuse IgG(Af488) signals counted using BZ-X810. Results are presented as mean $\pm$ standard error (SE) (n=3). Final concentrations of peptide-pullulan conjugates and IgG(Af488): 0.5 μ M (as peptide concentration) and 10 μ g/mL, respectively.

第三節 PL-MLTXR4_{12/100}/IgG(AF488) を用いたサイトゾル送達の様式

最も送達効率が高い傾向にあった PL-MLTXR4_{12/100} について、送達がコアセルベートから起こっているか確かめた。タイムラプス観察を行ったところ、コアセルベートから IgG(AF488) の拡散が始まる様子が見られた (Fig. 26A)。これより、コアセルベートが IgG(AF488) 送達を担っていることが示唆された。この送達様式は PL-L17E_{12/100} や PL-MLTX_{12/100} と類似しており、活性向上による送達様式の大きな変化はないと考えられる。

また、PL-MLTXR4_{12/100} について他の細胞種における送達効率を確かめた。IgG(AF488) と PL-MLTXR4_{12/100} の混合液を 25 mM HEPES 含有 DMEM(+) で希釈 (それぞれ終濃度 10 µg/mL、0.5 µM) して、HT1080 (ヒト線維肉腫細胞株)、A549 (ヒト肺癌細胞株)、および MIA PaCa-2 (ヒト膵臓腺癌細胞株) に添加後 1 時間インキュベートした。また、HeLa 細胞を第二節同様に処理した。これを蛍光顕微鏡 BZ-X810 で撮影、およびサイトゾル送達された細胞の割合を計数により求めた。いずれの細胞株についても PL-MLTXR4_{12/100} において PL-MLTX_{12/100} より高い割合を示した (Fig. 26B)。一方、細胞種による送達のしやすさについて変化は見られず、細胞選択性の傾向は同様であった。このことから、PL-MLTXR4_{12/100} は送達の様式を大きく変えずに活性を向上させていることが推測される。

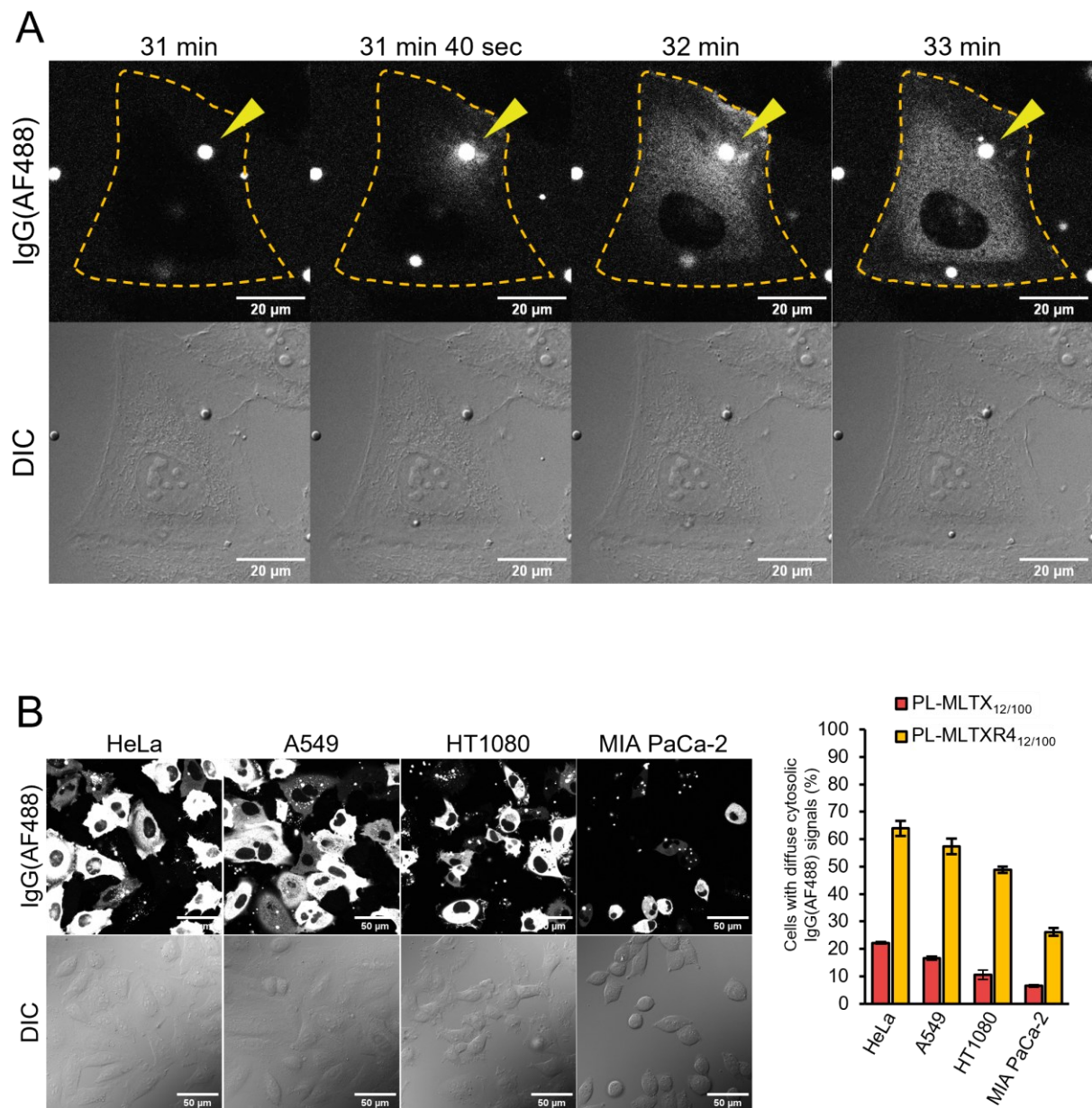


Figure 26. (A) Time-lapse imaging of cells treated with a mixture of PL-MLTXR4_{12/100} and IgG(AF488). Arrowheads indicate a particle-like structure that interacts with the periphery of a cell, resulting in the distribution of IgG(AF488) signals within the cells (the cell boundary is highlighted with a dotted line). PL-MLTXR4_{12/100} concentration; 0.5 μ M (as peptide concentration). IgG(AF488) concentration; 10 μ g/mL. Scale bars; 20 μ m. (B) Cytosolic IgG(AF488) distribution in different cell lines treated with PL-MLTX_{12/100} or PL-MLTXR4_{12/100} and IgG(AF488). Concentrations of peptide-pullulan conjugates and IgG(AF488) used for complex formation: 0.5 μ M (as peptide concentration) and 10 μ g/mL, respectively. Scale bars, 50 μ m. The percentages of cells with diffuse cytosolic IgG(AF488) signals are shown as the bar graph. Results are presented as mean $\pm$ SE (n=3).

第四節 送達された IgG の標的認識能

PL-MLTXR4_{12/100} によって送達された抗体についても認識能を保っているか確かめた。AF488 標識した anti-NPC mouse IgG [anti-NPC(AF488)] と PL-MLTXR4_{12/100} を混合後、25 mM HEPES を含む α -MEM(+) (pH 7.4) を加えて、HeLa 細胞に添加した。1 時間のインキュベートの後、CLSM 観察を行った。PL-MLTXR4_{12/100} による送達でも、核周囲に輝度の高いリング状の領域が確認されたことから、PL-MLTXR4_{12/100} は認識能を保った抗体をサイトゾル内に送達可能であると言える (Fig. 27)。

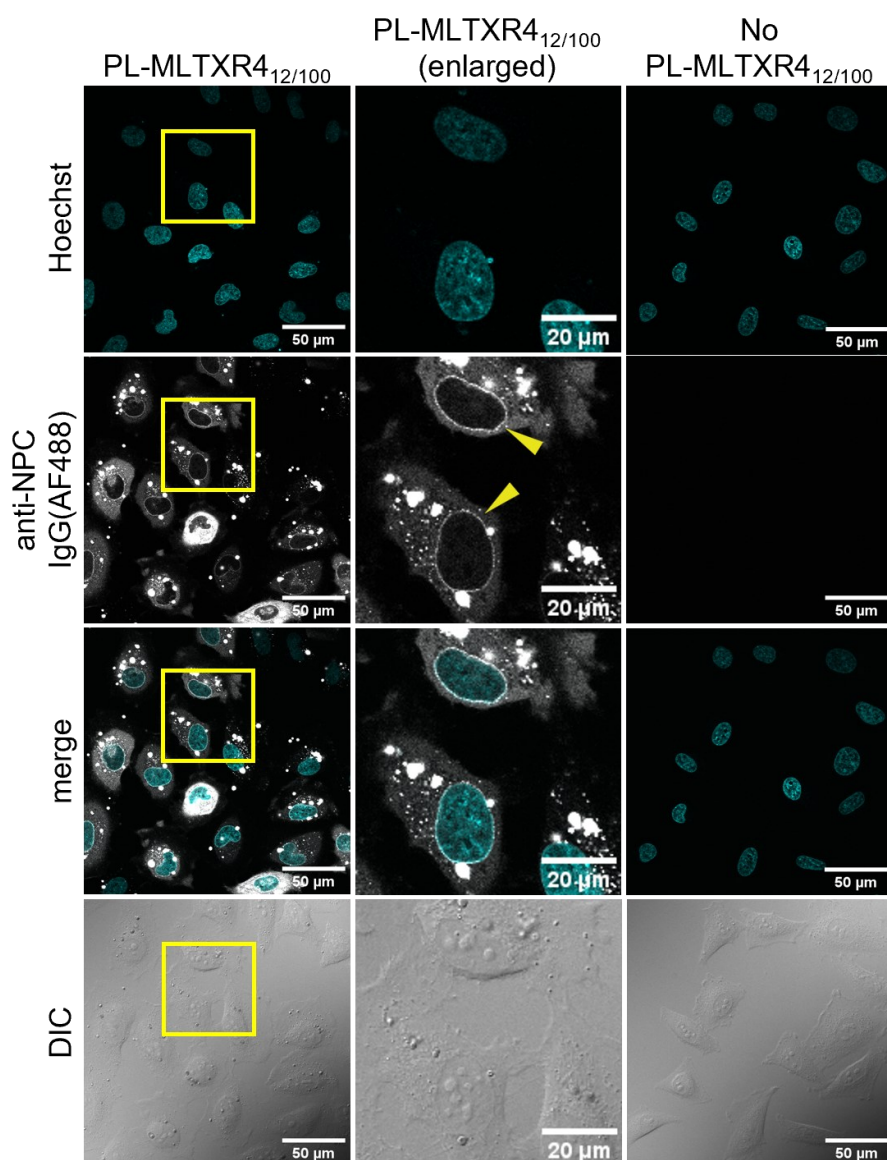


Figure 27. (A) Nuclear membrane accumulation of anti-nuclear pore complex (NPC) IgG(AF488) from the PL-MLTXR4_{12/100}/anti-NPC-IgG(AF488) complex after incubation in serum-containing α -MEM for 1 h. Concentrations of PL-MLTXR4_{12/100} and anti-NPC IgG(AF488) used for complex formation: 0.5 μ M (as peptide concentration) and 10 μ g/mL, respectively.

第二章の考察

本章では、サイトゾル送達に必要な抗体量を低減することを目指し、MLTX にアルギニン残基を導入した新たなペプチドを合成し、プルランへ修飾することで、より高活性なペプチド修飾プルラン PL-MLTXR_{n12/100} (n=2, 4, 6, 8) を得た。PL-MLTXR_{n12/100} のデザインにおいては、正電荷を持つアルギニンと負電荷をもつ IgG(AF488) との相互作用の増強によるコアセルベート形成能の向上を期待した。また、サイトゾル送達ペプチドへのアルギニン残基の導入によって送達活性が向上することは、タンパク質とのコンジュゲートにおいては既に報告されている^[63-65]。異なる送達コンセプトである、コアセルベートによるサイトゾル送達においても同様の送達効率向上が見られることを期待した。

第二節では、血清含有条件において、PL-MLTXR_{n12/100} (n=2, 4, 6, 8) を用いることで、PL-MLTX_{12/100} より多くの細胞へ低濃度 (10 µg/mL) の IgG(AF488) をサイトゾル送達できることが分かった。特に、PL-MLTXR_{412/100}、PL-MLTXR_{612/100}、PL-MLTXR_{812/100} を用いた場合では約 70% もの細胞に送達することができた。この割合は、第一章において Fig. 5B, C に示した、無血清条件で IgG(AF488) 56 µg/mL と PL-L17E_{12/100} 3 µM を用いた場合と同程度である。そのため、PL-L17E_{12/100} と比較すると、PL-MLTXR_{n12/100} (n = 4, 6, 8) の活性は大きく向上しており、約 1/5 への抗体量の低減を、血清を含む条件で達成したと言える。また、導入するアルギニンは2残基では不十分で、4~8 残基程度の導入が活性向上により効果的であり、送達効率の高さは、PL-MLTX_{12/100} < PL-MLTXR_{212/100} < PL-MLTXR_{412/100} ≒ PL-MLTXR_{612/100} ≒ PL-MLTXR_{812/100} となることが分かった。この傾向は、Fig. 22B に示す膜傷害性や、Fig. 22C に示す濁度および粒子数でも同様である。そのため、アルギニン導入によって膜傷害性が高くかつ粒子数が多くなったことが、送達割合の向上につながったと推測される。また、アルギニン 2 残基の導入が十分な活性向上に繋がらないという結果は、L17E とタンパク質とのコンジュゲートにおいても見られている^[63]。このように、タンパク質-L17E コンジュゲートと、ペプチドおよびデザインの異なる PL-MLTX コアセルベートで共通の傾向が見られたことから、アルギニン残基導入が幅広くサイトゾル送達効率の向上に有効である可能性があると考えられる。

また、PL-MLTXR_{412/100} を用いた IgG(AF488) のサイトゾル送達では、送達できる細胞の割合が使用濃度に依存して変化することが分かった。特に、IgG(AF488) 20

μg/mL および PL-MLTXR4_{12/100} 1 μM の条件では約 80%の細胞でサイトゾル送達が見られた。第一章において Fig. 15B(ii) に示すように、血清含有条件で IgG(AF488) 56 μg/mL と PL-MLTX_{12/100} 3 μM を用いた場合にも約 80%の細胞で送達が見られていた。そのため、PL-MLTXR4_{12/100} を用いることで、PL-MLTX_{12/100} と比べて約 1/3 まで必要抗体量を低減できたと言える。

第三節では PL-MLTXR4_{12/100} を用いた IgG(AF488) のサイトゾル送達の様式について検討した。タイムラプス観察では、PL-L17E や PL-MLTX の場合と同様に、コアセルベートから IgG(AF488) の流入が起こっていることを確認した。また、異なる細胞種を用いた送達試験では、細胞種に関わらず R4 導入による活性向上が見られることが分かった。このことから、アルギニン残基の導入による活性向上の普遍性が示唆される。一方で、細胞株間での送達効率の違いについては、PL-MLTX_{12/100} と同様の傾向を示し、細胞選択性に変化はなかった。さらに第四節において、PL-MLTXR4_{12/100} を用いた場合でも機能を保持した anti-NPC IgG(AF488) をサイトゾルへ送達できることを示した。これらより、PL-MLTXR4_{12/100} は PL-MLTX_{12/100} と同様の様式で、より高効率なサイトゾルへの IgG(AF488) 送達を達成すると考えられる。

10 μg/mL 程度の低濃度の抗体をサイトゾルへ送達できる手法についての報告^[9,33]は存在するものの、その数は非常に少なく、いずれも血清の無い条件でしか検討を行っていない。そのため、PL-MLTXR4_{12/100} は血清を含む条件で 10 μg/mL の抗体をサイトゾルへ送達できている点で、有用性が示せたと言える。

一方で、本手法により送達された抗体による細胞機能の制御や、*in vivo* での抗体送達は達成できていない。また、抗体への蛍光標識が必要である点は、生体での利用において大きな課題である。他のグループによる報告^[35,37,69]では、抗体のサイトゾル送達による機能制御や *in vivo* 応用を達成したものも存在しているが、その先の応用を目指す上では必要抗体量の多さは依然として課題である。本手法のさらなる改良により、低濃度かつ標識の無い抗体を効率良くサイトゾルへ送達する手法が開発できれば、医療への応用等もより現実的になるものと期待される。

抗体医薬はその特異性の高さから分子標的薬として高い効果を発揮できるものの、一般に高価であるため、その使用量の低減は本手法の幅広い適用において重要である。本章の結果は、コアセルベートを用いた抗体のサイトゾル送達技術のさらなる発展や、新たな利用法の開発につながると期待される。

総括

本研究では、多糖の一種であるプルランに膜傷害性ペプチドを修飾したペプチド修飾プルランを開発し、それを用いた抗体とのコアセルベート形成および効率的な抗体のサイトゾル送達を達成した。また、修飾するペプチドを変えることで、活性の向上と抗体の必要量低減を達成した。

一方、本研究では *in vivo* におけるサイトゾル送達は達成できていない。*in vivo* では、コアセルベートの組織浸潤能の低さや、細胞の状態の違い等の理由から、送達が難しいものと考えられる。今後のさらなる研究により、コアセルベートのサイズや物性の検討と改善、および送達様式への更なる理解が進むことで、本技術の *in vivo* 応用が可能になることが期待される。

また、親水性および生体適合性が高く、既報の方法で簡単にコンジュゲートが合成できることから、本研究ではプルランをモデルポリマーとして用いた^[45-46]。しかし、これら条件を満たすものであれば、他の多糖やポリマーであっても、同様に用いることができ得る。また、本研究では修飾するペプチドを変えることで送達効率を改善しているが、同様に、送達効率を維持しつつ別の機能を追加するようなペプチド改変も可能かもしれない。例えば、外部の刺激によってスイッチする機能を持つポリマーやペプチドの使用によって、刺激駆動型の放出制御が可能な粒子を作ることなどが可能かもしれない。様々な多糖やポリマー、および膜傷害性ペプチドを用いた検討によって、物理化学的性質と粒子径の制御が可能になれば、より有用なバイオ高分子のサイトゾル送達ツールの開発につながることを期待される。

実験の部

第一章の実験

ペプチド合成

ペプチド鎖は、ペプチド合成機 Syro I (Biotag) を使い、カップリングに 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate (HBTU)、1-hydroxybenzotriazole (HOBt)、*N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) を用いて、Rink アミド樹脂 (TGS-RAM、島津製作所) 上に構築した。Fmoc アミノ酸誘導体は、ペプチド研究所または渡辺化学工業で購入した。その後、TFA/EDT (95:5 (v:v)) で 23°C、3 時間処理して樹脂からのペプチド鎖の切り出しおよび脱保護を行い、RP-HPLC で精製した。また、MALDI-TOF MS により、得られたペプチドの質量が正しいことを確認した。

Table 1. ペプチド配列と MALDI TOF MS の結果

配列		[M+H] ⁺ (calc.)	実測値
L17E-GGC-amide	IWLTLKFLGKHAACKHEAKQQLSKL-GGC-amide	3075.74	3075.79
L6E-GGC-amide	IWLTAEKFLGKHAACKHLAKQQLSKL-GGC-amide	3075.74	3076.04
L9E-GGC-amide	IWLTLKFEGKHAACKHLAKQQLSKL-GGC-amide	3075.74	3076.03
Q21E-GGC-amide	IWLTLKFLGKHAACKHLAKQELSKL-GGC-amide	3060.77	3060.99
MLTX-GGC-amide	IWLTLKFLGKHAACKHLAKQQLSKL-GGC-amide	3059.78	3059.99

プルラン-L17E (PL-L17E) および他のペプチドとの複合体の合成

(i) L17E(DBCO)およびその他 DBCO 修飾ペプチドの合成

L17E-GGC-amide を、DMF/メタノール (1 : 1) 中で 1.2 eq の DBCO-マレイミド(東京化成工業)と NMM (10 eq) 存在下で 30 分間反応させ、L17E(DBCO)を合成した後、HPLC で精製した。その他のペプチドも同様に反応させ、L6E(DBCO)、L9E(DBCO)、Q21E(DBCO)、MLTX(DBCO) を得た。また、MALDI-TOF MS により、得られた DBCO-マレイミド修飾ペプチドの質量が正しいことを確認した。

Table 2. ペプチド配列と MALDI TOF MS の結果

配列		$[M+H]^+$ (calc.)	実測値
L17E(DBCO)	IWLTALKFLGKHA AKHEAKQLSKL-GGC(DBCO)-amide	3502.89	3503.00
L6E(DBCO)	IWLTAEKFLGKHA AKHLAKQLSKL-GGC(DBCO)-amide	3502.89	3503.10
L9E(DBCO)	IWLTALKFEGKHA AKHLAKQLSKL-GGC(DBCO)-amide	3502.89	3502.99
Q21E(DBCO)	IWLTALKFLGKHA AKHLAKQLSKL-GGC(DBCO)-amide	3487.92	3488.43
MLTX(DBCO)	IWLTALKFLGKHA AKHLAKQLSKL-GGC(DBCO)-amide	3486.94	3487.42

(ii) プルランアジドの調製

プルランアジドの合成法は既報に従った^[49]。まず、プルランを超脱水 DMSO (富士フイルム和光純薬) に溶解して約 20 mg/mL とし、1,1'-カルボニルジイミダゾール (CDI、東京化成工業) (100 単糖に対して 20 eq) を加えた後、約 23°C で 16 時間攪拌した。3-アジドプロピルアミン (東京化成工業) (100 単糖に対して 40 当量) を加えて 24 時間攪拌した後、純水に対して 3 回透析し、凍結乾燥した。100 単糖に対するアジド基の修飾量は、アノマー水素 (4.60 ppm-5.30 ppm) と N3 の隣の炭素上のプロトン (3-アジドプロピルカルバメート基の 3 位: 1.62 ppm-1.79 ppm) 間の ^1H NMR 積分比から決定した (Fig. 3)。DMSO- d_6 (Eurisotop) (600 μL) と D_2O (東京化成工業) (30 μL) で溶解したプルランアジドを、NMR チューブ (NES-600、OPTIMA) に移し、ECA600 (JEOL) (600 MHz、90°C、緩和時間 15 秒) を用いて NMR 測定を行った。

(iii) PL-L17E およびプルランと他のペプチドとの複合体の調製

上記により得たプルランアジドに L17E(DBCO) (1~14 eq/100 単糖) を加え、 H_2O /DMSO 中、約 23°C で一晩攪拌した。Amicon Ultra-0.5 (MWCO: 30,000、Merck) を用いた限外濾過によって、未反応の L17E(DBCO) と DMSO を除去しつつ溶媒を MilliQ 水へ交換した後、得られた PL-L17E 溶液を凍結乾燥した。

L17E のプルランへの修飾量は、アノマー水素 (プルラン由来の 4.85 ppm-5.30 ppm) とトリプトファンの 6 位のプロトン (L17E 由来の 7.03 ppm-7.10 ppm) 間の ^1H NMR 積分比を測定することによって決定した (Fig. 4)。L17E(DBCO) も 5.00 ppm-5.30 ppm に

DBCO の 8 員環の窒素に隣接するプロトン由来のシグナルを持つため (Fig. 3C)、これらのシグナルが重なることを考慮して (Fig. 3B)、L17E の修飾量は、プルランの 100 単糖における L17E の修飾量 (m) として次のように求めた:

- 1) m は、L17E のトリプトファンの 6 位のプロトン由来の 7.03 ppm-7.10 ppm のシグナルの積分値 ($I_{7.03 \text{ ppm}-7.10 \text{ ppm}}$) に対応する。
- 2) 4.85 ppm-5.30 ppm のシグナルの積分値 ($I_{4.85 \text{ ppm}-5.30 \text{ ppm}}$) は、DBCO の 8 員環の窒素に隣接するプロトンと、 α -1,4-グリコシド結合に関与するアノマー水素に由来するシグナルの合計となる。
- 3) DBCO の 8 員環の窒素に隣接するプロトンと、L17E のトリプトファンの 6 位プロトンはいずれも一つであることから、これらに由来するシグナルの積分値は同じである。
- 4) m と 100 グルコース単位中の α -1,4-グリコシド結合に関与するグルコース単位の数 ($n_{\alpha-1,4}$) の間には、次の関係が成り立つ:

$$\frac{I_{4.85 \text{ ppm}-5.30 \text{ ppm}}}{I_{7.03 \text{ ppm}-7.10 \text{ ppm}}} = \frac{m + n_{\alpha-1,4}}{m} \quad (\text{式 1})$$

$$m = \frac{n_{\alpha-1,4}}{\frac{I_{4.85 \text{ ppm}-5.30 \text{ ppm}}}{I_{7.03 \text{ ppm}-7.10 \text{ ppm}}} - 1} \quad (\text{式 2})$$

- 5) $n_{\alpha-1,4}$ は、図 S1B から

$$\frac{I_{4.85 \text{ ppm}-5.30 \text{ ppm}}}{I_{4.60 \text{ ppm}-4.85 \text{ ppm}} + I_{4.85 \text{ ppm}-5.30 \text{ ppm}}} \times 100 = 69.11$$

となる。ここで、 $I_{4.85 \text{ ppm}-5.30 \text{ ppm}}$ と $I_{4.60 \text{ ppm}-4.85 \text{ ppm}}$ は、それぞれ α -1,4 と α -1,6 グリコシド結合に関与するプロトンに由来するシグナルの積分値を表す。

プルランと他のペプチドのコンジュゲート (PL-L6E_{12/100}、PL-L9E_{12/100}、PL-Q21E_{12/100}、および PL-MLTX_{12/100}) も同様に合成し、修飾量の決定を行った。

(iv) PL-L17E の吸光係数

PL-L17E の濃度を決定するため、L17E 1 分子あたりの PL-L17E の吸光係数を求めた。まず、L17E(DBCO)の 280 nm におけるモル吸光係数 (ϵ) は、L17E 中のトリプトファンのモル吸光係数 ($\epsilon = 5,500$ ^[70]) および DBCO のモル吸光係数 ($\epsilon = 11,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)

¹[71]) の和である $16,500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ とした。次に、Methyl-PEG12-azide をモデル化合物として使用し、L17E(DBCO) の 280 nm での吸光度 ($A_{280}^{L17E(DBCO)}$) と、Methyl-PEG12-azide と反応した後の分子の吸光度 ($A_{280}^{L17E(DBCO)+azide}$) を比較することにより、以下の式から L17E 1 分子あたりの PL-L17E の吸光係数は $7,300 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ であると推定された。

$$\varepsilon = 16,500 \times \frac{A_{280}^{L17E(DBCO)+azide} \times a}{A_{280}^{L17E(DBCO)}} \approx 7,300$$

ここで a は、Methyl-PEG12-azide の DMSO 溶液を添加したことによる溶液量の増加を補正するための係数 (~ 1.03) である。

IgG(AF488)

IgG への AF488 の標識は、正常ヒト IgG (FUJIFILM Wako Chemicals、143-09501、10 mg/mL、150 mM NaCl、0.05 w/v% アジ化ナトリウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.2) に溶解) (100 μL)、PBS(−) (340 μL)、1 M NaHCO_3 水溶液 (50 μL)、および Alexa Fluor 488 5-SDP エステル (Thermo Fisher Scientific) (10 mg/mL in DMSO、10 μL) を混合し、穏やかに転倒混和しながら室温 (約 23°C) で 1 時間反応させることで行った。IgG(AF488) は PD-10 カラム (Cytiva) でゲル濾過後、Amicon Ultra-4 (MWCO: 50,000) で限外濾過して精製した。IgG の濃度は 280nm における吸光係数 $\varepsilon = 2.1 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, [72] を用いて決定し、AF488 修飾量は 495nm における吸光係数 $\varepsilon = 7.1 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, [73] を用い、AF488 濃度と IgG 濃度の比から決定した。本研究では 7 ～ 9 個の AF488 分子で修飾した IgG を使用した。抗核膜孔複合体抗体 (anti-NPC IgG) の修飾には、anti-NPC IgG 溶液 (1 mg/mL、BioLegend、カタログ番号 902902) (200 μL)、PBS(−) (66 μL)、1 M NaHCO_3 水溶液 (30 μL)、および Alexa Fluor 488 5-SDP エステル (10 mg/mL in DMSO、4 μL) を用い、上記同様に修飾した。

PL-L17E と IgG(AF488) の複合体形成の観察

150 mM NaCl を含む pH 5.0 の 10 mM MES 緩衝液 (MBS) 中の各 PL-L17E (45 μM 、6.7 μL) を IgG(AF488) の PBS(−) 溶液 (5.6 mg/mL、1 μL) に加えた。これを約 23°C で 10 分間静置した後、150 mM NaCl を含む pH 7.4 の 25 mM HEPES 緩衝液 (HBS) を加えて 100 μL とした。混合液を 35 mm ガラスボトムディッシュ (Iwaki) に載せ、粒子形成を共焦点顕微鏡 FV1000 (オリンパス) で観察した。

液－液相分離の評価

濁度測定と DIC 観察により、PL-L17E_{12/100} と IgG(AF488) によって形成された粒子が液－液相分離の性質を示すかどうか確かめた。PL-L17E_{12/100} (45 μ M) の MBS (pH 5.0) 溶液 6.7 μ L と IgG(AF488) (5.6 mg/mL) の PBS(−) 溶液 1 μ L の混合液を 約 23°C で 10 分間静置した後、異なる濃度の NaCl 含む 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を、NaCl 終濃度が 124、250、500、1000、または 2000 mM となるように加え、60 μ L とした。これら溶液を 96 well アッセイプレート (Iwaki) に移し、650 nm における吸光度を濁度として測定した。また、NaCl 終濃度が 124 mM および 2000 mM となる混合液については、同様に調製して DIC 観察も行った。

PL-L17E との複合体における IgG(AF488) の流動性 (FRAP 分析)

上記同様にコアセルベートを含む混合液を調製し、glass base dish に添加して共焦点顕微鏡 FV3000 (オリンパス) を用いて観察を行った。5 秒間隔で合計 380 フレーム撮影した。ブリーチは、はじめの 10 フレーム目の撮影後に、10% のレーザー強度で行った。

PL-L17E との複合体における IgG(AF488) の封入の評価

各 PL-L17E (45 μ M) の MBS (pH 5.0) 溶液 10 μ L と、IgG(AF488) (5.6 mg/mL) の PBS(−) 溶液 1.5 μ L を混合して約 23°C で 10 分間インキュベートした後、HBS (pH 7.4) を加えて全量を 25 μ L とした。これを 12,000 $\times$ g で 10 分間遠心し、上清の吸光度を測定した。コアセルベートに内封された IgG(AF488) の割合は、495 nm における上清の吸光度と、使用した IgG(AF488) 全量の吸光度を用いて算出した。プルラン上の L17E の割合は、280 nm における吸光度から IgG の寄与を差し引いた値を用いて算出した。

細胞培養

HeLa 細胞 (ヒト子宮頸部癌細胞株) は、European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)、A431 細胞 (ヒト類表皮癌細胞株) は、American Type Culture Collection (ATCC)、HT1080 細胞 (ヒト線維肉腫細胞株)、T24 細胞 (ヒト膀胱癌細胞株)、および HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞株) は、JCRB 細胞バンクから入手したものを使用した。いずれの細胞も、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で培養し、2～3 日ごとに継代を

行った。HeLa 細胞の培養には、10% (v/v) 不活化ウシ血清(BS、Gibco)を含む α 最小必須培地 (α -MEM、FUJIFILM Wako Chemicals) を使用した。HT1080、T24、A431、および Raw264.7 細胞の培養には、10% (v/v) 不活化ウシ胎児血清 (FBS、Gibco) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (高グルコース) (FUJIFILM Wako Chemicals) を使用した。HEK293T 細胞の培養には、10% (v/v) 不活化 FBS を含む DMEM (低グルコース) (FUJIFILM Wako Chemicals) を使用した。

細胞毒性アッセイ

PL-L17E の細胞毒性は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて測定した。PL-L17E は MBS (pH 5.0) 溶液であるため、これを加えた際の pH 変化を低減すべく、アッセイでは 25 mM HEPES を含む無血清 α -MEM [α -MEM(-)] (pH 7.4) を用いることで、培地 pH のさらなる安定化を図った。

HeLa 細胞 (1.0×10^4 cells/well) を 96 well プレートに播種し、上記培養条件で一晩インキュベートした。PL-L17E (45 μ M) 31 μ L を 25 mM HEPES 含有 α -MEM(-) (pH 7.4) で 450 μ L (PL-L17E 終濃度: 10 μ M) となるよう希釈した。また、この一部をさらに 25 mM HEPES 含有 α -MEM(-) (pH 7.4) で希釈することで、8、5、3、1、0.8、および 0.5 μ M の PL-L17E 溶液各 160 μ L を調製した。細胞を PBS(-) で洗浄した後、上記サンプル (各 50 μ L/well) を加え、細胞を培養条件で 1 時間インキュベートした。細胞を PBS(-) で洗浄した後、25 mM HEPES を含む 10% BS 含有 α -MEM [α -MEM(+)] (pH 7.4) (91 μ L) と WST-8 溶液 (9 μ L) の混合物を加えた。細胞を 37°C で 1 時間インキュベート後、ホルマザンの吸光度 ($A_{450\text{nm}} - A_{600\text{nm}}$) を測定した。PL-Q21E_{12/100} および PL-MLTX_{12/100} の細胞毒性も同様に評価した。また、血清含有条件での細胞毒性評価では、サンプル調製時に α -MEM(-) の代わりに α -MEM(+) を用いて同様の操作を行った。

IgG のサイトゾル送達試験

HeLa 細胞 (1.8×10^5 cells/dish) を 35mm glass base dish に播種し、80~90%コンフルエンスに達するまで上記同様インキュベートした。

PL-L17E サンプルは、以下の通り調製した。

PL-L17E_{4/100} および PL-L17E_{8/100}: PL-L17E_{4/100} (または PL-L17E_{8/100}) の MBS (pH 5.0) 溶液 (15 μ M) 10 μ L を、IgG(AF488) の PBS(-) 溶液 (1.9 mg/mL) 1.5 μ L と混合し、約 23°C

で 10 分間インキュベートした。その後、25 mM HEPES 含有 α -MEM(-) (pH 7.4) を加えて全量を 150 μ L とした。

PL-L17E_{12/100} および PL-L17E_{14/100}: PL-L17E_{12/100} (または PL-L17E_{14/100}) の MBS (pH 5.0) 溶液 (45 μ M) 10 μ L を、IgG(AF488) の PBS(-) 溶液 (5.6 mg/mL) 1.5 μ L と混合し、上記同様に処理した。

細胞を PBS(-) で 2 回洗浄した後、上記の混合液を加えて培養条件で 1 時間インキュベートした。その後サンプル溶液を除去し、細胞を 0.5 mg/mL ヘパリンを含む PBS(-) で 2 回洗浄した。Hoechst 33342 (25 mM HEPES 含有 α -MEM(+)) (pH 7.4) 中、5 μ g/mL を細胞に加えて 5 分間インキュベートし、核を染色した。細胞を洗浄後、25 mM HEPES 含有 α -MEM(+)) (pH 7.4) を加えて共焦点顕微鏡 FV3000 (オリンパス) で観察した。他の細胞株での送達試験は、適切な培地を使用して同様に行った。PL-Q21E_{12/100} および PL-MLTX_{12/100} での送達試験も同様に実施した。また、コントロールとして 4 mM L17E の DMSO 溶液 1.5 μ L、25 mM HEPES 含有 α -MEM(-) (pH 7.4) 135 μ L、および 8.6 mg/mL IgG(AF488) PBS(-) 溶液 13.4 μ L の混合液 (L17E: 40 μ M、IgG(AF488): 770 μ g/mL) も用いた。

また、阻害剤による活性の変化については、5 μ M サイトカラシン D または 10 mM メチル- β -シクロデキストリンの 25 mM HEPES および 0.67% DMSO を含む α -MEM(-) (pH 7.4) 溶液で細胞を 30 分間処理した後、上記同様の操作によって、IgG(AF488) の送達試験を行うことで検討した。コアセルベート内に阻害剤が濃縮される可能性があるため、阻害剤の処理はサンプル添加前の 30 分間のみとし、PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) による細胞処理は阻害剤を含まない 25 mM HEPES 含有 α -MEM(-) (pH 7.4) 中で行った。

送達された IgG の標的認識能の評価では、anti-NPC IgG(AF488) を用いて上記同様の操作を行った。

タイムラプスイメージング

HeLa 細胞を 35mm glass base dish に播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で一晩培養し、80~90%コンフルエンスとした。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄した後、25 mM HEPES 含有 α -MEM(-) (pH 7.4) で添加し、FV3000 に取り付けられた STX ステージトッピインキュベーター (TOKAI HIT) (37°C、5% CO₂) にセットした。タイムラプスイメージ

ング (20 秒間隔) を開始し、3 分間撮影した後、培地を IgG(AF488) (56 $\mu\text{g/mL}$) と PL-L17E_{12/100} (3 μM) を含む 25 mM HEPES 含有 α -MEM(-) (pH 7.4) に交換し、さらに撮影を続けた。

Z スタックイメージング

Z スタックイメージングでは、まず、HeLa 細胞に Lyn11-mCherry プラスミド (500 ng/dish) と Lipofectamine LTX with PLUS 試薬を添加した。これを培養条件で 4 時間処理した後、細胞を洗浄し、 α -MEM(+) で 37°C で一晩インキュベートした。この細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、IgG(AF488) (56 $\mu\text{g/mL}$) と PL-L17E_{12/100} (3 μM) の 25 mM HEPES 含有 α -MEM(-) (pH 7.4) 溶液で培養条件で 1 時間処理した。細胞を PBS(-) で洗浄して PL-L17E_{12/100}/IgG(AF488) コアセルベート溶液を除去し、25 mM HEPES 含有 α -MEM(+) (pH 7.4) を加えた後、FV3000 でイメージングした。

走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

SEM 画像は、既報のとおり撮影した^[74]。HeLa 細胞を、IgG(AF488) (56 $\mu\text{g/mL}$) と PL-L17E_{12/100} (3 μM) の 25 mM HEPES 含有 α -MEM(-) (pH 7.4) 溶液で 1 時間処理後、PBS で 3 回洗浄し、2% PFA および 2.5% グルタルアルデヒドを含む 0.1% カコジル酸緩衝液を用いて室温で 2 時間静置して固定し、その後 4°C で保存した。次に、細胞をエタノール/水 (20、50、70、90、および 100%) の勾配でそれぞれ 10 分間脱水し、その後 t-ブタノールに浸漬して -20°C で 30 分間保存した。凍結サンプルは、FDU-1200 凍結乾燥機 (EYELA) で 24 時間脱水した。次に、パラジウムでスパッタリングした後、サンプルを 5kV 加速電圧で SEM (SU8000、日立ハイテクノロジーズ) で観察した。

一次培養肝細胞への IgG(AF488)送達

肝細胞は、既報の通り収集した^[75]。まず、門脈からのコラーゲナーゼ灌流で C57BL/6 マウスの肝臓を消化し、50 $\times g$ で 1 分間遠心して肝細胞を分離した。肝細胞は、10% FBS (Cytiva) とペニシリン-ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) を含むウィリアム培地 E (Thermo Fisher Scientific) を使い、コラーゲンコーティングした dish 上で培養後、無血清培地中で一晩培養した。肝細胞は、IgG(AF488) (5.6 mg/mL)

1.5 μL と PL-MLTX_{12/100} (45 μM) 10 μL の混合液、またはコントロールとして IgG(AF488) (5.6 mg/mL) 1.5 μL のみを含むウィリアム培地 E 中で 1 時間処理した。その後、PBS(-) で洗浄し、4% PFA (ナカライテスク) で固定し、FV3000 により観察を行った。

IgG(AF488) の未分化および分化 iPS 細胞への IgG(AF488) 送達

PL-MLTX_{12/100} の MBS (pH5.0) 溶液 (45 μM) 70 μL を、IgG(AF488) の PBS(-) 溶液 (5.6mg/mL) 10.5 μL と混合し、約 23°C で 10 分間静置した。これに、各培養培地を加えて全量を 1050 μL とした。PBS(-) で 2 回洗浄した細胞に、上記サンプルまたは IgG(AF488) のみを含む、AK02N 培地 (味の素) または腸管分化培地^[76]を加え、細胞を 37°C で 1 時間インキュベートした。サンプル溶液を除去し、細胞を PBS(-) で 2 回洗浄した。Hoechst 33342 の PBS(-) 溶液 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を細胞に加え、5 分間インキュベートして核を染色した。細胞を洗浄して培地を添加し、FV3000 で観察した。

第二章の実験

ペプチド合成

ペプチド鎖は、ペプチド合成機 Syro I (Biotag) を使い、カップリングに HBTU、HOBt、DIEA を用いて、Rink アミド樹脂 (TGS-RAM、島津製作所) 上に構築した。Fmoc アミノ酸誘導体は、ペプチド研究所または渡辺化学工業で購入した。その後、TFA/EDT (95:5 (v:v)) で 23°C、3 時間処理して樹脂からのペプチド鎖の切り出しおよび脱保護を行い、RP-HPLC で精製した。また、MALDI-TOF MS により、得られたペプチドの分子量が正しいことを確認した。また、これらに前章同様 DBCO-マレイミドを付加、精製した後、MALDI-TOF MS により得られた質量がペプチドの分子量と一致することを確認した。

Table 3 ペプチド配列と MALDI TOF MS の結果

	配列	[M+H] ⁺ (calc.)	実測値
MLTX-GGC	IWLTALKFLGKHA AKHEAKQQLSKL-GGC-amide	3059.78	3059.99
MLTXR2-GGC	IWLTALKFEGKHA AKHLAKQQLSKLRR-GGC-amide	3371.98	3372.28
MLTXR4-GGC	IWLTALKFLGKHA AKHLAKQELSKLRRRR-GGC-amide	3684.19	3683.29
MLTXR6-GGC	IWLTALKFLGKHA AKHLAKQQLSKLRRRRRR-GGC-amide	3996.39	3996.58
MLTXR8-GGC	IWLTALKFLGKHA AKHLAKQQLSKLRRRRRRRR-GGC-amide	4308.59	4308.90
R4MLTX-GGC	RRRRIWLTAEKFLGKHA AKHLAKQQLSKL-GGC-amide	3684.19	3683.23
R8-GGC	RRRRRRRRGGC	1483.90	1483.99
MLTX(DBCO)	MLTX-GGC(DBCO)-amide	3486.94	3487.42
MLTXR2(DBCO)	MLTXR2-GGC(DBCO)-amide	3799.14	3799.31
MLTXR4(DBCO)	MLTXR4-GGC(DBCO)-amide	4111.34	4111.94
MLTXR6(DBCO)	MLTXR6-GGC(DBCO)-amide	4423.54	4422.91
MLTXR8(DBCO)	MLTXR8-GGC(DBCO)-amide	4735.74	4735.37
R4MLTX(DBCO)	R4MLTX-GGC(DBCO)-amide	4111.34	4112.03
R8(DBCO)	R8-GGC(DBCO)	1911.05	1911.15

ペプチド修飾プルランの合成

前章同様の方法で合成したプルランアジド (13.6 N₃/100 単糖) に、それぞれ MLTX(DBCO) 、 R4MLTX(DBCO) 、 MLTXR2(DBCO) 、 MLTXR4(DBCO) 、 MLTXR6(DBCO)、および MLTXR8(DBCO) (12 eq/100 単糖) を加え、H₂O/DMSO 中、約 23°C で一晩攪拌した。Amicon Ultra-0.5 (MWCO: 30,000、Merck)を用いた限外濾過によって、未反応のペプチドと DMSO を除去しつつ溶媒を MilliQ 水へ交換した後、得られた溶液を凍結乾燥した。修飾量は、前章同様に式2より決定した。ただし、本章で用いたプルランアジドでは、 $n_{\alpha-1,4} = 69.41$ であった。

リポソーム調製

リン脂質として 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) (NOF) を用い、100% POPC large unilamellar vesicle (LUV) を調製した。ナス型フラスコに POPC 10 mg のクロロホルム溶液 (800 μ L) を加え、ロータリーエバポレーターを用いてフラスコ底面に脂質薄膜を形成した。脂質薄膜を真空乾燥した後、蛍光色素 8-aminonaphtalene-1,2,3-trisulfonic acid (ANTS, 12.5 mM) とその消光剤 *p*-xylene-bis(pyridinium)bromide (DPX, 45.0 mM) を含む 10 mM MBS (pH 7.4) で水和させた。凍結融解を 5 回繰り返した後、LiposoFast extruder system (Avestin) を用い、Nucleopore Track-Etch Membrane 0.1 μ m (Cytiva) 2 枚を 11 回通過させることで粒径を均一 (100 nm) にした LUV を調製した。これを、PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより ANTS/DPX 内包 LUV を遊離色素から分離精製した。精製後の LUV 濃度は LabAssay Phospholipid Kit (富士フイルム和光純薬) を用いてリン脂質の濃度として求めた。

ANTS/DPX 漏出試験

ペプチド修飾プルランのリポソーム不安定化活性は ANTS/DPX 内包 LUV から漏出した ANTS の蛍光強度により評価した。各ペプチド修飾プルランを 100 μ M LUV と共に、10 mM MBS (pH 7.4) 中、37°C で 1 時間インキュベートした。蛍光は Nivo (PerkinElmer) にて励起波長 355 nm、蛍光波長 530 nm で測定した。界面活性剤 (TritonX-100, 最終濃度 0.1% (v/v)) を加えたときの蛍光強度 ($F_{\max}$) を 100%として以下

の式で求められる leakage (%) からペプチド修飾プルランの膜不安定化活性を評価した (F_{blank} , ペプチド修飾プルランがないときの蛍光強度)。

$$leakage (\%) = \frac{F_{obs} - F_{blank}}{F_{max} - F_{blank}} \times 100$$

コアセルベート形成能の評価

濁度測定と蛍光顕微鏡による観察から、各ペプチド修飾プルランと IgG(AF488) のコアセルベート形成能を評価した。PL-MLTX_{12/100} または PL-MLTXR_{n12/100} (n=2, 4, 6, 8) (75 μ M) の MBS (pH 5.0) 溶液 1.7 μ L と IgG(AF488) (1.5 mg/mL) の MBS (pH 5.0) 溶液 1.7 μ L の混合液を約 23°C で 10 分間静置した後、25 mM HEPES 含有 α -MEM(+) (pH 7.4) をそれぞれ 47 μ L 加え、50 μ L とした。これら溶液を half area 96 well アッセイプレート (Corning) に移し (各 3 well)、650 nm における吸光度を濁度として測定した。測定後、プレートを約 23°C で 30 分間静置した後、BZ-X810 を用いて撮影および粒子の計数を行った。

細胞培養

HeLa 細胞および HT1080 細胞 は前章同様に培養を行った。A549 細胞 (ヒト肺癌細胞株)、MIA PaCa-2 細胞 (ヒト膵臓腺癌細胞株) は理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN BRC) から入手した。いずれの細胞も、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で培養し、2~3 日ごとに継代を行った。A549、および MIA PaCa-2 細胞の培養には、10% (v/v) 不活化ウシ胎児血清 (FBS、Gibco) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (高グルコース) (FUJIFILM Wako Chemicals) を使用した。

細胞毒性アッセイ

各ペプチド修飾プルランの細胞毒性は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて測定した。HeLa 細胞 (1.0×10^4 cells/well) を 96 well プレートに播種し、上記培養条件で一晩インキュベートした。各ペプチド修飾プルラン (750 μ M) 11 μ L を 25 mM HEPES 含有 α -MEM(+) (pH 7.4) で 270 μ L (終濃度: 10 μ M) となるよう希釈した。また、この一部をさらに 25mM HEPES (pH7.4) 含有 α -MEM(+) で希釈することで、5、3、1、0.5、および 0.3 μ M の各ペプチド修飾プルラン溶液 160 μ L ずつを調製した。細胞を PBS(-) で洗浄した後、上記サンプル (各 50 μ L/well) を加え、細胞を培養条件で 1 時間インキ

ュベートした。細胞を PBS(-)で洗浄した後、25mM HEPES 含有 α -MEM(+) (pH 7.4) (91 μ L) と WST-8 溶液 (9 μ L) の混合物を加えた。細胞を 37°C で 1 時間インキュベート後、ホルマザンの吸光度 ($A_{450nm}-A_{600nm}$) を測定した。

IgG のサイトゾル送達試験

HeLa 細胞 (2.0×10^5 cells/dish) を 35mm glass base dish に播種し、80~90%コンフルエンスに達するまで上記同様インキュベートした。各ペプチド修飾プルランの MBS (pH 5.0) 溶液 (75 μ M) 1 μ L を、IgG(AF488) の MBS (pH 5.0) 溶液 (1.5 mg/mL) 1 μ L と混合し、約 23°C で 10 分間インキュベートした。その後、25 mM HEPES 含有 α -MEM(+) (pH 7.4) を加えて全量を 150 μ L とした。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄した後、上記の混合液を加えて培養条件 で 1 時間インキュベートした。その後サンプル溶液を除去し、細胞を 0.5 mg/mL ヘパリンを含む PBS(-) で 2 回洗浄した後、25 mM HEPES 含有 α -MEM(+) (pH 7.4) を加えて共焦点顕微鏡 FV3000 (オリンパス) で観察した。送達された IgG の標的認識能の評価では、anti-NPC IgG(AF488) を用いて上記同様の操作を行った。他の細胞株での送達試験は、適切な培地を使用して同様に行った。

IgG 送達割合の定量

HeLa 細胞 (8.0×10^4 cells/well) を 24 well plate (Thermo Fisher Scientific) に播種し、80~90%コンフルエンスに達するまで上記同様インキュベートした。各ペプチド修飾プルランの MBS (pH 5.0) 溶液 (75 μ M) 5.2 μ L を、IgG(AF488) の MBS (pH 5.0) 溶液 (1.5 mg/mL) 5.2 μ L と混合し、約 23°C で 10 分間インキュベートした。その後、25 mM HEPES 含有 α -MEM(+) (pH 7.4) を加えて全量を 780 μ L とした。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄した後、上記の混合液を加えて培養条件 で 1 時間インキュベートした。その後サンプル溶液を除去し、細胞を 0.5 mg/mL ヘパリンを含む PBS(-) で 2 回洗浄した。Hoechst 33342 (PBS(-) 中、5 μ g/mL) を細胞に加えて 5 分間インキュベートし、核を染色した。細胞を洗浄後、4% パラホルムアルデヒド PBS(-) 溶液を細胞に加えて 10 分間インキュベートし、細胞を固定した。PFA を除いた後、PBS(-) を加えて BZ-X810 (キーエンス) で撮影を行った。撮影後、画像解析によりサイトゾルに IgG(AF488) が送達された細胞を計数し、その割合を算出した。他の細胞株での送達試験は、適切な培地を使用して同様に行った。

タイムラプスイメージング

HeLa細胞を 35mm glass base dish に播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で一晩培養し、80~90%コンフルエンスとした。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄した後、25 mM HEPES 含有 α -MEM(+) (pH 7.4) を添加し、FV3000 に取り付けられた STX ステージトップインキュベーター (TOKAI HIT) (37°C、5% CO₂) にセットした。タイムラプスイメージング (20 秒間隔) を開始し、3 分間撮影した後、培地を IgG(AF488) (10 μ g/mL) と PL-MLTXR4_{12/100} (0.5 μ M) を含む 25 mM HEPES 含有 α -MEM(+) (pH 7.4) に交換し、さらに撮影を続けた。

引用文献

- [1] Priftis, D., Tirrell, M. Phase behaviour and complex coacervation of aqueous polypeptide solutions. *Soft Matter* 2012, 8 (36), 9396–9405.
- [2] Blocher, W. C., Perry, S. L. Complex coacervate-based materials for biomedicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2017, 9 (4), No. e1442.
- [3] Liu, J., Spruijt, E., Miserez, A., Langer, R. Peptide-based liquid droplets as emerging delivery vehicles. *Nature Reviews Materials* 2023, 8 (3), 139–141.
- [4] Ma, L., Fang, X., Wang, C. Peptide-based coacervates in therapeutic applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2023, 10, No. 1100365.
- [5] Johnson, N. R., Wang, Y. Coacervate delivery systems for proteins and small molecule drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2014, 11 (12), 1829–32.
- [6] Pir Cakmak, F., Marianelli, A. M., Keating, C. D. Phospholipid membrane formation templated by coacervate droplets. *Langmuir* 2021, 37 (34), 10366–10375.
- [7] Zhou, L., Shi, H., Li, Z., He, C. Recent advances in complex coacervation design from macromolecular assemblies and emerging applications. *Macromol. Rapid Commun.* 2020, 41 (21), No. e2000149.
- [8] Ban, E., Kim, A. Coacervates: recent developments as nanostructure delivery platforms for therapeutic biomolecules. *Int. J. Pharm.* 2022, 624, No. 122058.
- [9] Bao, Y., Chen, H., Xu, Z., Gao, J., Jiang, L., Xia, J. Photo-responsive phase-separating fluorescent molecules for intracellular protein delivery. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 2023, 62 (42), No. e202307045.
- [10] Lu, T., Javed, S., Bonfio, C., Spruijt, E. Interfacing coacervates with membranes: from artificial organelles and hybrid protocells to intracellular delivery. *Small Methods* 2023, 7 (12), No. e2300294.
- [11] Simonsen, J. B. Lipid nanoparticle-based strategies for extrahepatic delivery of nucleic acid therapies - challenges and opportunities. *J. Controlled Release* 2024, 370, 763–772.
- [12] Forenzo, C., Larsen, J. Complex coacervates as a promising vehicle for mRNA delivery: a comprehensive review of recent advances and challenges. *Mol. Pharmaceutics* 2023, 20 (9), 4387–4403.
- [13] Carter, P. J., Rajpal, A. Designing antibodies as therapeutics. *Cell* 2022, 185 (15), 2789–2805.
- [14] Niamsuphap, S., Fercher, C., Kumble, S., Huda, P., Mahler, S. M., Howard, C. B. Targeting the undruggable: emerging technologies in antibody delivery against intracellular targets. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2020, 17 (9), 1189–1211.
- [15] Allen, J., Najjar, K., Erazo-Oliveras, A., Kondow-McConaghy, H. M., Brock, D. J., Graham, K., Hager, E. C., Marschall, A. L. J., Dübel, S., Juliano, R. L., Pellois, J. P. Cytosolic delivery of macromolecules in live human cells using the combined endosomal escape activities of a small molecule and cell penetrating peptides. *ACS Chem. Biol.* 2019, 14 (12), 2641–2651.
- [16] Singh, K., Ejaz, W., Dutta, K., Thayumanavan, S. Antibody delivery for intracellular targets: emergent therapeutic potential. *Bioconjug. Chem.* 2019, 30 (4), 1028–1041.
- [17] Rabbitts, T. H. Intracellular antibodies for drug discovery and as drugs of the future. *Antibodies (Basel)* 2023, 12 (1), 24.
- [18] Lopez-Estevez, A. M., Lapuhs, P., Pineiro-Alonso, L., Alonso, M. J. Personalized cancer nanomedicine: overcoming biological barriers for intracellular delivery of biopharmaceuticals. *Adv. Mater.* 2024, 36 (14), No. e2309355.
- [19] Futaki, S., Arafles, J. V. V., Hirose, H. Peptide-assisted intracellular delivery of biomacromolecules. *Chem. Lett.* 2020, 49 (9), 1088–1094.

- [20] Akishiba, M., Takeuchi, T., Kawaguchi, Y., Sakamoto, K., Yu, H. H., Nakase, I., Takatani-Nakase, T., Madani, F., Graslund, A., Futaki, S. Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide. *Nat. Chem.* 2017, 9 (8), 751–761.
- [21] Tamemoto, N., Akishiba, M., Sakamoto, K., Kawano, K., Noguchi, H., Futaki, S. Rational design principles of attenuated cationic lytic peptides for intracellular delivery of biomacromolecules. *Mol. Pharmaceutics* 2020, 17 (6), 2175–2185.
- [22] Sakamoto, K., Akishiba, M., Iwata, T., Murata, K., Mizuno, S., Kawano, K., Imanishi, M., Sugiyama, F., Futaki, S. Optimizing charge switching in membrane lytic peptides for endosomal release of biomacromolecules. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 2020, 59 (45), 19990–19998.
- [23] Nomura, Y., Sakamoto, K., Akishiba, M., Iwata, T., Hirose, H., Futaki, S. Improved cytosolic delivery of macromolecules through dimerization of attenuated lytic peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020, 30 (17), No. 127362.
- [24] Yu, H.-H., Sakamoto, K., Akishiba, M., Tamemoto, N., Hirose, H., Nakase, I., Imanishi, M., Madani, F., Graslund, A., Futaki, S. Conversion of cationic amphiphilic lytic peptides to cell-penetration peptides. *Peptide Science* 2020, 112 (1), No. e24144.
- [25] Sakamoto, K., Akishiba, M., Iwata, T., Arafiles, J. V. V., Imanishi, M., Futaki, S. Use of homoarginine to obtain attenuated cationic membrane lytic peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2021, 40, No. 127925.
- [26] Sakamoto, K., Michibata, J., Hirai, Y., Ide, A., Ikitoh, A., Takatani-Nakase, T., Futaki, S. Potentiating the membrane interaction of an attenuated cationic amphiphilic lytic peptide for intracellular protein delivery by anchoring with pyrene moiety. *Bioconjug. Chem.* 2021, 32 (5), 950–957.
- [27] Arafiles, J. V. V., Hirose, H., Akishiba, M., Tsuji, S., Imanishi, M., Futaki, S. Stimulating macropinocytosis for intracellular nucleic acid and protein delivery: a combined strategy with membrane-lytic peptides to facilitate endosomal escape. *Bioconjug. Chem.* 2020, 31 (3), 547–553.
- [28] Arafiles, J. V. V., Hirose, H., Hirai, Y., Kuriyama, M., Sakyamah, M. M., Nomura, W., Sonomura, K., Imanishi, M., Otake, A., Tamamura, H., Futaki, S. Discovery of a macropinocytosis-inducing peptide potentiated by medium-mediated intramolecular disulfide formation. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 2021, 60 (21), 11928–11936.
- [29] Kawaguchi, Y., Kawamura, Y., Hirose, H., Kiyokawa, M., Hirate, M., Hirata, T., Higuchi, Y., Futaki, S. E3MPH16: an efficient endosomolytic peptide for intracellular protein delivery. *J. Controlled Release* 2024, 367, 877–891.
- [30] Pazo, M., Salluce, G., Lostale-Seijo, I., Juanes, M., Gonzalez, F., Garcia-Fandiño, R., Montenegro, J. Short oligoalanine helical peptides for supramolecular nanopore assembly and protein cytosolic delivery. *RSC Chem. Biol.* 2021, 2 (2), 503–512.
- [31] Tietz, O., Cortezon-Tamarit, F., Chalk, R., Able, S., Vallis, K. A. Tricyclic cell-penetrating peptides for efficient delivery of functional antibodies into cancer cells. *Nat. Chem.* 2022, 14 (3), 284–293.
- [32] Du, S., Liew, S. S., Zhang, C. W., Du, W., Lang, W., Yao, C. C. Y., Li, L., Ge, J., Yao, S. Q. Cell-permeant bioadaptors for cytosolic delivery of native antibodies: a "Mix-and-Go" approach. *ACS Cent. Sci.* 2020, 6 (12), 2362–2376.
- [33] Chong, S. E., Oh, J. H., Min, K., Park, S., Choi, S., Ahn, J. H., Chun, D., Lee, H. H., Yu, J., Lee, Y. Intracellular delivery of immunoglobulin G at nanomolar concentrations with domain Zfused multimeric α -helical cell penetrating peptides. *J. Controlled Release* 2021, 330, 161–172.
- [34] Yang, T., Mochida, Y., Liu, X., Zhou, H., Xie, J., Anraku, Y., Kinoh, H., Cabral, H., Kataoka, K. Conjugation of glucosylated polymer chains to checkpoint blockade antibodies augments their efficacy and specificity for glioblastoma. *Nat. Biomed. Eng.* 2021, 5 (11), 1274–1287.

- [35] Hirai, Y., Kawaguchi, Y., Kasahara, C., Hirose, H., Futaki, S. Liquid droplet-mediated formulation of lipid nanoparticles encapsulating immunoglobulin G for cytosolic delivery. *Mol. Pharmaceutics* 2024, 21 (4), 1653–1661.
- [36] Dutta, K., Kanjilal, P., Das, R., Thayumanavan, S. Synergistic interplay of covalent and non-covalent interactions in reactive polymer nanoassembly facilitates intracellular delivery of antibodies. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 2021, 60 (4), 1821–1830.
- [37] Wang, H. H., Tsourkas, A. Cytosolic delivery of inhibitory antibodies with cationic lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019, 116 (44), 22132–22139.
- [38] Davis, H. C., Posey, N. D., Tew, G. N. Protein binding and release by polymeric cell-penetrating peptide mimics. *Biomacromolecules* 2022, 23 (1), 57–66.
- [39] Liu, X., Zhao, Z., Wu, F., Chen, Y., Yin, L. Tailoring hyperbranched poly(β -amino ester) as a robust and universal platform for cytosolic protein delivery. *Adv. Mater.* 2022, 34 (8), No. e2108116.
- [40] Iwata, T., Hirose, H., Sakamoto, K., Hirai, Y., Arafles, J. V. V., Akishiba, M., Imanishi, M., Futaki, S. Liquid droplet formation and facile cytosolic translocation of IgG in the presence of attenuated cationic amphiphilic lytic peptides. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 2021, 60 (36), 19804–19812.
- [41] Sun, Y., Lau, S. Y., Lim, Z. W., Chang, S. C., Ghadessy, F., Partridge, A., Miserez, A. Phase-separating peptides for direct cytosolic delivery and redox-activated release of macromolecular therapeutics. *Nat. Chem.* 2022, 14 (3), 274–283.
- [42] Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A. T., Futaki, S. Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug. Chem.* 2008, 19 (3), 656–664.
- [43] Sun, Y., Xu, X., Chen, L., Chew, W. L., Ping, Y., Miserez, A. Redox-responsive phase-separating peptide as a universal delivery vehicle for CRISPR/Cas9 genome editing machinery. *ACS Nano* 2023, 17 (17), 16597–16606.
- [44] Yan, L., Adams, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J. Biol. Chem.* 1998, 273 (4), 2059–2066.
- [45] Akiyoshi, K., Kobayashi, S., Shichibe, S., Mix, D., Baudys, M., Kim, S. W., Sunamoto, J. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: complexation and stabilization of insulin. *J. Controlled Release* 1998, 54 (3), 313–320.
- [46] Sasaki, Y., Akiyoshi, K. Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications. *Chem. Rec.* 2010, 10 (6), 366–376.
- [47] Muraoka, D., Harada, N., Shiku, H., Akiyoshi, K. Self-assembled polysaccharide nanogel delivery system for overcoming tumor immune resistance. *J. Controlled Release* 2022, 347, 175–182.
- [48] Yuki, Y., Nochi, T., Kong, I. G., Takahashi, H., Sawada, S., Akiyoshi, K., Kiyono, H. Nanogel-based antigen-delivery system for nasal vaccines. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2013, 29 (1), 61–72.
- [49] Sasaki, Y., Tsuchido, Y., Sawada, S.-i., Akiyoshi, K. Construction of protein-crosslinked nanogels with vitamin B6 bearing polysaccharide. *Polym. Chem.* 2011, 2 (6), 1267–1270.
- [50] Dignon, G. L., Zheng, W., Kim, Y. C., Mittal, J. Temperature-controlled liquid-liquid phase separation of disordered proteins. *ACS Cent. Sci.* 2019, 5 (5), 821–830.
- [51] Hanashima, S., Mito, K., Umegawa, Y., Murata, M., Hojo, H. Lipid chain-driven interaction of a lipidated Src-family kinase Lyn with the bilayer membrane. *Org. Biomol. Chem.* 2022, 20 (32), 6436–6444.
- [52] Inoue, T., Heo, W. D., Grimley, J. S., Wandless, T. J., Meyer, T. An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways. *Nat. Methods* 2005, 2 (6), 415–418.

- [53] Hirose, H., Maekawa, M., Ida, H., Kuriyama, M., Takahashi, Y., Futaki, S. A noncanonical endocytic pathway is involved in the internalization of 3 μ m polystyrene beads into HeLa cells. *Biomater. Sci.* 2022, 10 (24), 7093–7102.
- [54] Springer, A. D., Dowdy, S. F. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2018, 28 (3), 109–118.
- [55] Rowe, R. G., Daley, G. Q. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Genet.* 2019, 20 (7), 377–388.
- [56] Yamanaka, S. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges. *Cell Stem Cell* 2020, 27 (4), 523–531.
- [57] Frey, S., Gorlich, D. A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes. *Cell* 2007, 130 (3), 512–523.
- [58] Becker, B., Englert, S., Schneider, H., Yanakieva, D., Hofmann, S., Dombrowsky, C., Macarrón-Palacios, A., Bitsch, S., Elter, A., Meckel, T., Kugler, B., Schirmacher, A., Avrutina, O., Diederichsen, U., Kolmar, H. Multivalent dextran hybrids for efficient cytosolic delivery of biomolecular cargoes. *J. Pept. Sci.* 2021, 27 (4), No. e3298.
- [59] Yewdall, N. A., Buddingh, B. C., Altenburg, W. J., Timmermans, S. B. P. E., Vervoort, D. F. M., Abdelmohsen, L. K. E. A., Mason, A. F., van Hest, J. C. M. Physicochemical Characterization of Polymer-Stabilized Coacervate Protocells. *Chembiochem* 2019, 20 (20), 2643-2652.
- [60] Gracia, P., Polanco, D., Tarancón-Díez, J., Serra, I., Bracci, M., Oroz, J., Laurents, D. V., García, I., Cremades, N. Molecular mechanism for the synchronized electrostatic coacervation and co-aggregation of alpha-synuclein and tau. *Nat. Commun.* 2022, 13 (1), No. 4586.
- [61] Shebanova, A., Perrin, Q. M., Zhu, K., Gudlur, S., Chen, Z., Sun, Y., Huang, C., Lim, Z. W., Mondarte, E. A., Sun, R., Lim, S., Yu, J., Miao, Y., Parikh, A. N., Ludwig, A., Miserez, A. Cellular Uptake of Phase-Separating Peptide Coacervates. *Adv. Sci. (Weinh)* 2024, 11 (42) No. e2402652.
- [62] Cao, Y., Chen, H., Qiu, R., Hanna, M., Ma, E., Hjort, M., Zhang, A., Lewis, R. S., Wu, J. C., Melosh, N. A. Universal intracellular biomolecule delivery with precise dosage control. *Sci. Adv.* 2018, 4 (10), No. eaat8131.
- [63] Shinga K., Iwata T., Murata K., Daitoku Y., Michibata J., Arafiles J. V. V., Sakamoto K., Akishiba M., Takatani-Nakase T., Mizuno S., Sugiyama F., Imanishi M., Futaki S. L17ER4: A cell-permeable attenuated cationic amphiphilic lytic peptide. *Bioorg. Med. Chem.* 2022, 61, No. 116728.
- [64] Kawaguchi Y., Terada S., Futaki S. An approach for the intracellular delivery of IgG via enzymatic ligation with a cell-permeable attenuated cationic amphiphilic lytic peptide. *Bioorg. Med. Chem.* 2024, 111, No. 117835.
- [65] Giancola J. B., Raines R. T. Endosomolytic peptides enable the cellular delivery of peptide nucleic acids. *Chem. Commun. (Camb)* 2024, 60 (100), 15019-15022.
- [66] Hong Y., Najafi S., Casey T., Shea JE., Han S. I., Hwang D. S. Hydrophobicity of arginine leads to reentrant liquid-liquid phase separation behaviors of arginine-rich proteins. *Nat. Commun.* 2022, 13 (1), No. 7326.
- [67] Rekhi S., Garcia C. G., Barai M., Rizuan A., Schuster B. S., Kiick K. L., Mittal J. Expanding the molecular language of protein liquid-liquid phase separation. *Nat. Chem.* 2024, 16 (7), 1113-1124.
- [68] Gallivan J. P., Dougherty D. A. Cation-pi interactions in structural biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96 (17), 9459-9464.
- [69] Chen, P., Yang, W., Hong, T., Miyazaki, T., Dirisala, A., Kataoka, K., Cabral, H. Nanocarriers escaping from hyperacidified endo/lysosomes in cancer cells allow tumor-targeted intracellular delivery of antibodies to therapeutically inhibit c-MYC. *Biomaterials* 2022, 288, No. 121748.

- [70] Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 1995, 4 (11), 2411-2423.
- [71] Kotagiri N., Li Z., Xu X., Mondal S., Nehorai A., Achilefu S. Antibody quantum dot conjugates developed via copper-free click chemistry for rapid analysis of biological samples using a microfluidic microsphere array system. *Bioconjug. Chem.* 2014, 25 (7), 1272-1281.
- [72] Dandekar T., Gramsch C., Houghten R. A., Schulz R. Affinity purification of β -endorphin-like material from NG108CC15 hybrid cells by means of the monoclonal β -endorphin antibody 3-E7. *Neurochem. Int.* 1985, 7 (2), 247-253.
- [73] Takayama K., Hirose H., Tanaka G., Pujals S., Katayama S., Nakase I., Futaki S. Effect of the attachment of a penetration accelerating sequence and the influence of hydrophobicity on octaarginine-mediated intracellular delivery. *Mol. Pharm.* 2012, 9 (5), 1222-1230.
- [74] Xu, W., Kadoya, Y., Sennari, K., Islam, W., Zhang, T., Sawa, T., Akizuki, F., Hirose, H., Futaki, S., Fujiwara, Y., Komohara, Y., Niidome, T. Disulfiram encapsulated in polymer nanoparticles ameliorates thioacetamide-induced liver injury. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 2023, 88, No. 104981.
- [75] Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., Fritz B. R., Wyman S. K., Pogosova-Agadjanyan E. L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K. C., Allen A., Lin D. W., Urban N., Drescher C. W., Knudsen B. S., Stirewalt D. L., Gentleman R., Vessella R. L., Nelson P. S., Martin D. B., Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 105 (30), 10513-10518.
- [76] Watanabe Y., Kimura I., Hashimoto R., Sakamoto A., Yasuhara N., Yamamoto T. Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium, Sato K, Takayama K. Virological characterization of the 2022 outbreak-causing monkeypox virus using human keratinocytes and colon organoids. *J. Med. Virol.* 2023, 95 (6), No. e28827.

謝辞

終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました、京都大学化学研究所 二木 史朗 教授に謹んで感謝の意を表します。

数々の御指導、御助言を頂きました今西 未来 博士（京都大学化学研究所 准教授）、川口 祥正 博士（京都大学化学研究所 助教）、広瀬 久昭 博士（コロラド州立大学）、河野 健一 博士（京都大学大学院薬学研究科 助教）に深く御礼申し上げます。

プルランのご供与、ならびに第一章の実験に関してご指導、ご助言をいただきました秋吉 一成 特任教授（京都大学大学院医学研究科）、佐々木 善浩 教授（京都大学大学院工学研究科）、第一章の SEM 観察にご協力いただきました新留 琢郎 教授、徐 薇 助教（熊本大学大学院先端科学研究部）、第一章の初代培養肝細胞への送達実験にご協力いただきました江口 暁子 准教授（三重大学医学部附属病院）、第一章の iPS 細胞への送達実験にご協力いただきました高山 和雄 講師、出口 清香 特定助教（京都大学 iPS 細胞研究所）、NMR 測定に関してご指導、ご助言いただきました上田 善弘 博士（産業技術総合研究所）、前野 綾香 様（京都大学化学研究所）に深く御礼申し上げます。また、折に触れご助言や激励をいただきました坂本 健太郎 博士（大阪大学蛋白質研究所）、実験の一部を担当してくださいました古山 雄聖 氏、日々支え合ってきました同期の音成 兼光 氏、栗山 理志 氏をはじめ、研究のみならず様々な面で支援して下さった京都大学化学研究所 生体機能設計化学領域の皆様にご心より感謝致します。

また本研究の一部は日本学術振興会 DC2 および科学技術イノベーション創出に向けた大学フェローシップ創設事業の援助によるものであり、改めて感謝致します。

最後に、私の研究活動を温かく見守り支えてくださった家族に、この場を借りて深く感謝申し上げます。