

京都大学	博士（薬学）	氏名	高山 健太郎
論文題目	アルギニンペプチドを用いた細胞内デリバリーの効率化に関する研究		
（論文内容の要旨） 序論 アルギニンペプチドは、タンパク質や核酸誘導体などの膜透過性が低い化合物の細胞内送達キャリアとして近年注目を集めている。アルギニンペプチドの細胞内移行メカニズムの検討が盛んに行われる一方で、送達キャリアとしての応用例も数多く報告されている。より幅広い分野での応用を念頭に置くと、アルギニンペプチドを用いた導入法の更なる信頼性の向上は不可欠と考えられる。そこで本研究では、1) 簡便なアルギニンペプチド修飾法の開発、2) 高効率に細胞内移行するアルギニンペプチドの開発を行い、操作の簡便化および細胞内移行効率の向上を図った。 第一章 細胞内送達のためのアルギニンペプチドのワンポット修飾法 アルギニンペプチドを送達キャリアとして用いる場合、細胞内へ送達したい分子（カーゴ分子）に対する共有結合的修飾が必要となる。本研究では、架橋剤を用いる修飾法に着目し、コンジュゲーションの効率化に関する検討を行った。従来の手法では、第一段階においてカーゴ分子を架橋剤で修飾し、第二段階でアルギニンペプチドを繋げる段階的な修飾を行うものが多かった。このような段階的修飾は、それぞれのステップでゲルろ過や透析などの精製を必要とする煩雑なものであった。また、タンパク質を修飾する場合、処理時間の長期化は不活性化や不溶性沈殿物の生成を招く可能性が懸念される。 そこで bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS³) を用いて、一段階でカーゴ分子をアルギニンペプチド修飾する方法を考案した。この方法は、あらかじめアルギニンペプチドの N 末端を BS³ で修飾し、アミノ基反応性ペプチドを調製する。カーゴ分子として抗体 Fab フラグメント、ポリエチレングリコール、量子ドットの 3 種を選択し、アミノ基反応性アルギニンペプチドと PBS 等の中性水溶液中で 1～2 時間程度反応させることで、アルギニンペプチド修飾されたカーゴ分子が簡単に得られた。中でも、抗体 Fab フラグメントに対しては、段階的に修飾する方法を用いた場合のタンパク質回収率が約 30% であったが、新規法を用いた場合の回収率は 60～75% と格段に向上した。よってワンポット修飾法は、操作の簡便化とカーゴ分子回収率向上に貢献する方法論と言える。 第二章 膜透過促進配列の付加に伴うアルギニンペプチドの効率的な細胞内移行 アルギニンペプチドは主にエンドサイトーシス経路を経由して細胞内へ移行するが、この際アルギニンペプチドのエンドソームからサイトゾルへの移行が十分でな			

い場合がしばしば見受けられる。これまでに pH 依存性膜融合ペプチドを用いてエンドソームを破壊する方法、クロロキンや光増感剤を用いてエンドソーム脱出を促進させる方法などが試みられてきた。しかし、前者は更に 20 残基を超えるペプチドの細胞内導入分子への付加を必要とするためにコストがかかり、後者は *in vivo* への応用を考えると難しい。ゆえに、より実用性のあるアプローチを開発する余地が残っていた。

そのような中、アルギニン 8 残基から成る R8 ペプチドに対して cathepsin D の切断配列由来断片の逆順配列ペプチド (FFLIPKG) を付加することで、ペプチドの細胞膜透過性が顕著に増加し、更にサイトゾル及び核への移行量を増大させる効果があることを見出した。これを膜透過促進配列 (Pas) と名付け、HIV-1 由来 Tat ペプチドやフロックハウスウイルス由来 FHV ペプチド等のアルギニンペプチドに対しても同様の効果が見られることを確認した。そこで、細胞増殖抑制活性を有する p53 C 末端由来ペプチド (p53C') の細胞内デリバリーへ応用し、Pas の有用性を検証した。Pas 付加されたアルギニンペプチドは Pas 未付加のペプチドに比して p53C' を効率的に細胞内へ送達し、3 種のグリオーマ細胞の増殖をいずれも顕著に阻害した。本結果より、Pas 付加は、アルギニンペプチドを用いた細胞内デリバリーにおける新たなアプローチとなり得ると考えられる。更に、Pas 付加がアルギニンペプチドの細胞内移行を促進する要因に関して検討を加えた。

以上の研究成果は、カーゴ分子のアルギニンペプチド修飾体の簡便な調製ならびに効率的な細胞内送達のための新しい方法論を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

アルギニンペプチドは、特別な機器を用いることなく細胞に添加するのみで細胞内移行することから、これまでにタンパク質や生理活性ペプチド、オリゴヌクレオチドおよびその誘導体、リポソームや量子ドットのようなナノ粒子、合成ポリマー等の細胞内送達のキャリアとして応用されてきた。この細胞内導入技術は、細胞機能に関する基礎的研究だけでなく、薬物送達や細胞機能操作の分野にも応用が図られている。しかしながら、カーゴ分子をアルギニンペプチド修飾する操作の煩雑さや、エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれたアルギニンペプチドの多くがエンドソーム小胞内でトラップされてしまうなどの問題点があることから、これらを解決するための新たな方法論の開発が求められていた。申請者は、アルギニンペプチドの簡便な修飾操作法の開発およびサイトゾル移行効率の向上を目指し、先駆的かつ独創的な研究を行い、以下に示すような価値ある知見を得た。

第一章では、BS³ 修飾アルギニンペプチドを用いたアミノ基を有するカーゴ分子に対するワンポット修飾法の開発を行った。タンパク質モデルとして抗体 Fab フラグメント、ポリマーモデルとしてポリエチレングリコール、ナノ粒子モデルとして量子ドットに対する適用性を検討した結果、いずれのカーゴ分子に対しても、アミノ基反応性アルギニンペプチドの水中での添加により容易に修飾体を得られ、顕著な不溶性沈殿物を形成することなく高収率で目的物が得られることが示された。

第二章では、アルギニンペプチドのサイトゾルへの到達効率を向上させる膜透過促進配列 Pas を見出し、その応用性および細胞内移行亢進に関わる要因を検証した。Pas を用いた方法論は、副次的な試薬を必要とすることなく、短鎖ペプチドの付加によってサイトゾルへの到達量を向上させる新しい方法論である。検討の結果、Pas を付加したアルギニンペプチドは、特に親水性の生理活性ペプチドの細胞内送達に有効であった。さらに分子量の大きい分子に対する応用性や、コンジュゲート全体の物性と細胞内移行効率の関係性などの課題が見えてきたが、本研究の成果は効率的な細胞内送達法を確立する上での第一歩となる貴重な情報といえる。

以上、本論文は、アルギニンペプチドを用いた細胞内送達の効率化に関して、修飾操作とサイトゾル到達効率の二面からのアプローチによる新たな方法論を提供するものであり、アルギニンペプチドがより幅広い分野で有用なツールとして用いられていく上での有益な知見を与えるものと考えられる。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成23年2月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降