

Development of a Drug Delivery System that Uses Antimicrobial Peptides to Enhance Membrane Permeability

抗菌ペプチドを用いた薬物送達システムの開発

ITSUKI KURODA¹ & YUKI TAKAHASHI^{2*}

黒田逸月¹, 高橋有己^{2*}

¹Kindai University Wakayama Senior High School, 516 Zenmyouji, Wakayama, Wakayama 640-8471, Japan

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-shimo-adach-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8501, Japan

* ytakahashi@pharm.kyoto-u.ac.jp

¹近畿大学附属和歌山高等学校 (〒640-8471 和歌山県和歌山市善明寺516)

²京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町46-29)

* ytakahashi@pharm.kyoto-u.ac.jp

Abstract

Cell membrane permeability is one of the obstacles that must be overcome during drug development. In the present study, antimicrobial peptides that increase cell membrane permeability were used to overcome this obstacle. In particular, melittin, indolicidin, magainin, and dermcidin were selected. Evaluation of membrane permeability enhancement by calcein-encapsulated liposomes suggested that melittin and indolicidin increase membrane permeability. Therefore, we designed the novel peptides melittinR8, or melittin fused with R8, and indolicidinRGD, or indolicidin fused with RGD. Evaluation of membrane permeability enhancement by using calcein-encapsulated liposomes and 8 different cell types showed that melittinR8 exhibits the greatest permeability enhancement among the antimicrobial peptides tested. By using FITC-DNA and FITC-Dextran as model drugs, the enhancement of drug delivery into cells by melittinR8 was evaluated. As a result, high membrane permeability enhancement was observed in the case of delivering FITC-DNA into cancer cells. These results indicate that melittinR8 can be a tool to facilitate the delivery of DNA into cancer cells.

Key words: Antimicrobial peptide, Membrane permeability, Liposome, Cell membrane, Melittin

要旨

細胞膜透過性は医薬品開発における問題点の一つである。今回は、細胞膜透過性亢進作用を有する抗菌ペプチドに着目した。抗菌ペプチドとしてメリチン、インドリシジン、マガイニン、ダームシジンを選択した。カルセイン封入リポソームにより膜透過性亢進作用を評価したところ、メリチンとインドリシジンが高い膜透過性亢進作用を示した。そこで、メリチン R8、インドリシジン RGD を新たに設計し、リポソームおよび 8 種類の細胞を用いて評価したところメリチン R8 が高い膜透過性亢進作用を示した。モデル薬物として FITC-DNA と FITC-Dextran を用いてメリチン R8 による細胞内への送達を評価したところ、ガン細胞と FITC-DNA の組合せにおいて高い膜透過性亢進作用が得られた。以上、メリチン R8 は DNA をガン細胞内へ送達するデリバリーツールとなりえると考えらる。

重要語句: 抗菌ペプチド、膜透過性、リポソーム、細胞膜、メ

リチン

序論

細胞膜透過性は医薬品開発における大きな問題点の一つである。例えば、核酸医薬品はその標的特異性の高さなどからこれを利用した疾患治療法の開発が期待されているが、その実用化には細胞膜透過性の低さが大きな課題となっている。また、抗体をはじめとしたタンパク質医薬品も新世代の医薬品として期待され既に実用化されたものも比較的多数存在するが、そのほとんどは細胞外に存在するタンパク質を標的とした抗体医薬品や分泌性タンパク質などの細胞外受容体等の細胞外のタンパク質を標的としたものであり、細胞内のタンパク質等を標的としたタンパク質医薬品については未だ実用化されていない。細胞膜透過性を亢進することができれば、これらの細胞内に標的部位が存在する医薬品の実用化を加速するものと期待できる。

抗菌ペプチドは自然免疫反応において機能するペプチドであり、さまざまな生物が産生している。抗菌ペプチドはそのアミノ酸組成と構造的特徴により大きく 4 種類に分類できる (1)。抗菌ペプチドは免疫調節作用を始めとしたさまざまな作用を有するが、その作用の一つとして細胞膜透過性の亢進作用を有する。従って、抗菌ペプチドを利用することで、薬物の細胞膜透過性を改善できる可能性がある。しかし抗菌ペプチドを利用して薬物の細胞膜透過性の改善を試みた報告は乏しく、その作用の強弱や、標的細胞の選択性についてもほとんど検討されていない。また、どの抗菌ペプチドが強い細胞膜透過性亢進作用を示しうるかについてもほとんど調べられていない。

そこで本研究では、天然の抗菌ペプチドを 4 種類用意し、その膜透過性亢進作用について評価した。次に強い活性を示した天然の抗菌ペプチドをベースとして、機能性を有するペプチドを付加した抗菌ペプチドを新規にデザインすることで、作用の増強および標的細胞特異性の付加の可能性について検討した。機能性ペプチドとして、ガン細胞を始めとした種々の細胞膜に親和性を与えるカチオン性ペプチド R8 (2)、およびガン細胞を始めとした細胞に高発現するインテグリンに対して親和性を有するペプチド RGD を選択した (3)。各抗菌ペプチドについて、膜透過性亢進作用を評価した後、最も高い膜透過性亢進作用が得られた抗菌ペプチドによるモデル薬物の細胞内への送

達の可能性について検証した。

試料と方法

ペプチド

用いた抗菌ペプチドの配列を示す。

メリチン：GIG AVL KVL TTG LPA LIS WIK RKR QQ

メリチン R8：GIG AVL KVL TTG LPA LIS WIR RRR RRR R

インドリシジン：ILP WKW PWW PWR R

インドリシジン RGD：ILP WKW PWW PWR RGD

ダームシジン：SSL LEK GLD GAK KAV GGL GKL GKD A

マガイニン：GIG KFL HAS KKF GKA FVG EIM NS

抗菌ペプチドは以下の会社から購入した。

マガイニン（LKT laboratories）、ダームシジン（ペプチド研究所）、インドリシジン（ANA SPEC）メリチン、メリチン R8、インドリシジン RGD（GenScript）。

細胞

ガン細胞としてはマウスメラノーマ細胞 B16BL6 細胞、マウス結腸ガン細胞 colon26 細胞、マウス乳ガン細胞 4T1 細胞を用いた。モデルの通常細胞としてマウス筋芽細胞 C2C12 細胞、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞、マウス樹状細胞 DC2.4 細胞、マウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞、マウス血管内皮細胞 MAEC 細胞を用いた。

カルセイン封入リポソーム調製

5% グルコース水溶液 10 ml にカルセインを 0.6 mmol 加えた。100 ml のナスフラスコに 2 ml の CHCl_3 に溶解した DSPC 44 mg と 2 ml の CHCl_3 に溶解した cholesterol 23.7 mg を加えさらに CHCl_3 を 28 ml 加えた後、エバポレーターを用いて蒸発させることで脂質薄膜を形成し、これにカルセイン溶解 5% グルコース水溶液を 10 ml 加えた。70℃、140 rpm で 30 分インキュベートしたのち 100 nm のフィルターを装着した extruder を通しサイジングした。Sephadex カラムを用いてカルセイン封入中性リポソームを精製した後、Zetasizer (Malvern) で size と zeta potential を測定した。中性リポソームと同様の方法で、ただし DSPC 量を 3 分の 2 とし、かわりに Brain PS を加えて脂質の分子数を同様とした上で、同様の方法でカルセイン封入負電荷リポソームを調製した。

カルセイン封入リポソームを用いた膜透過性の評価

各抗菌ペプチドを PBS に溶解し、2.0 μM の濃度で準備した。これを等容量のカルセイン封入リポソームと混合し、37℃で 15 分インキュベートした後、蛍光強度を測定した。カルセインの最大放出量は、20% Triton-X100 を含んだ PBS でリポソームを破壊することで見積もった。

細胞を用いた膜透過性の評価

5 × 10³ cells/well で各細胞を 96-well プレートに添加し、各抗菌ペプチドを細胞に終濃度 1.0 μM となるように加え 37℃あるいは 4℃で 15 分インキュベートした。インキュベート終了後、プレートを 1000 rpm で 3 分遠心した後、上清を回収し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の酵素活性量を LDH 酵素活性測定キット (Wako) を用いた比色定量法により測定した。吸光度 (570nm) はマイクロプレートリーダーを用いて測定した。LDH の最大放出量は 20% Triton-X100 を含んだ PBS で細胞を処理することで見積もった。

メリチン R8 を用いたモデル薬物の細胞内送達の評価

250 μl のメリチン R8 溶液 (1.0 μM , 2.0 μM , 4.0 μM) を 250 μl の FITC-DNA(20-base; 0.28 $\mu\text{g}/\text{ml}$) あるいは FITC-Dextran(MW: 4k; 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とともに、前日に 24-well プレートに 5 × 10⁴ cells/well で播種した DC2.4 細胞、NIH3T3 細胞あるいは 4T1 細胞に添加した。37℃で 10 分インキュベートしたのち PBS で二回 wash 後、蛍光顕微鏡を用いて細胞内に取り込まれた蛍光を観測した。

結果

天然抗菌ペプチドの脂質膜透過性亢進作用

カルセインを封入した中性リポソームおよび負電荷リポソームに各抗菌ペプチドを添加し、リポソームからのカルセイン漏出による蛍光強度の増大を指標に、抗菌ペプチドの膜透過性亢進作用を評価した。その結果、インドリシジンとメリチンが負電荷リポソームに対して高い膜透過性亢進作用を示し、マガイニンはその半分程度の作用を示した。一方、ダームシジンによる膜透過性亢進作用は観察されなかった (図 1)。また、抗菌ペプチドによる膜透過性亢進作用は負電荷リポソームに対して強く示される可能性が示された。

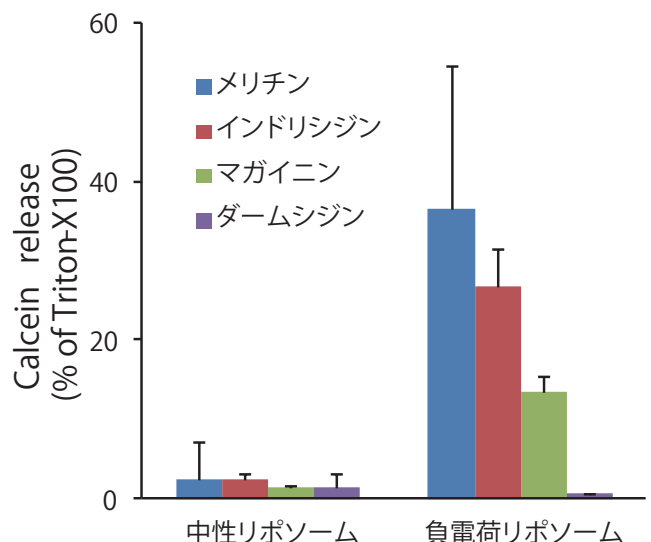


図 1. 天然抗菌ペプチドによる膜透過性亢進作用。

新規デザイン抗菌ペプチドの脂質膜亢進作用

上記の検討において、メリチンおよびインドリシジンが高い膜透過性亢進作用を示すことが明らかとなった。そこで、メリチンの C 末端に R8 を融合したメリチン R8、およびインドリシジンの C 末端に RGD を融合したインドリシジン RGD を新規に設計し、これら新規抗菌ペプチド、およびその元となった抗菌ペプチドの膜透過性亢進作用をカルセイン封入リポソームを用いて評価した。インドリシジンに RGD を融合することでその膜透過性亢進作用は低下した一方で、メリチンに R8 を融合することでその膜透過性亢進作用は上昇することが明らかとなった (図 2)。

抗菌ペプチドによる細胞膜透過性亢進作用評価

3 種類のモデルガン細胞および 5 種類のモデル正常細胞に各抗菌ペプチドを添加し、細胞内からの LDH の漏出を指標に細

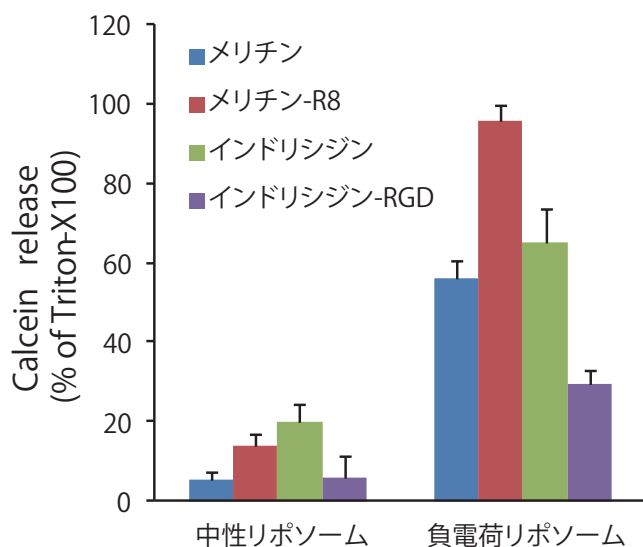


図2. 新規抗菌ペプチドによる膜透過性亢進作用.

胞膜透過性亢進作用を評価した。リポソームを用いた検討の結果と同様にメリチン R8 が全ての細胞種において最も高い細胞膜透過性亢進作用を示した (図3)。また 4℃においても抗菌ペプチドによる細胞膜透過性亢進作用は 37℃の場合とほぼ同等であった。

メリチン R8 によるモデル薬物の細胞内送達効果

以上の結果より、メリチン R8 が最も高い細胞膜透過性亢進作用を示すことが明らかとなったことから、モデル薬物として蛍光標識 DNA および蛍光標識デキストランを選択し、これらのモデル薬物の細胞内送達効率の改善作用について検討を行った。モデルのガン細胞として 4T1 細胞、正常細胞として DC2.4 細胞および NIH3T3 細胞を用いて検討を行った結果、メリチン R8 を添加してもデキストランについての細胞内送達はほとんど認められなかった。また、4T1 細胞においてメリチン R8 による DNA の効果的な細胞内送達が観察されたが (図4)、他の細胞においてはほとんど送達されなかった。

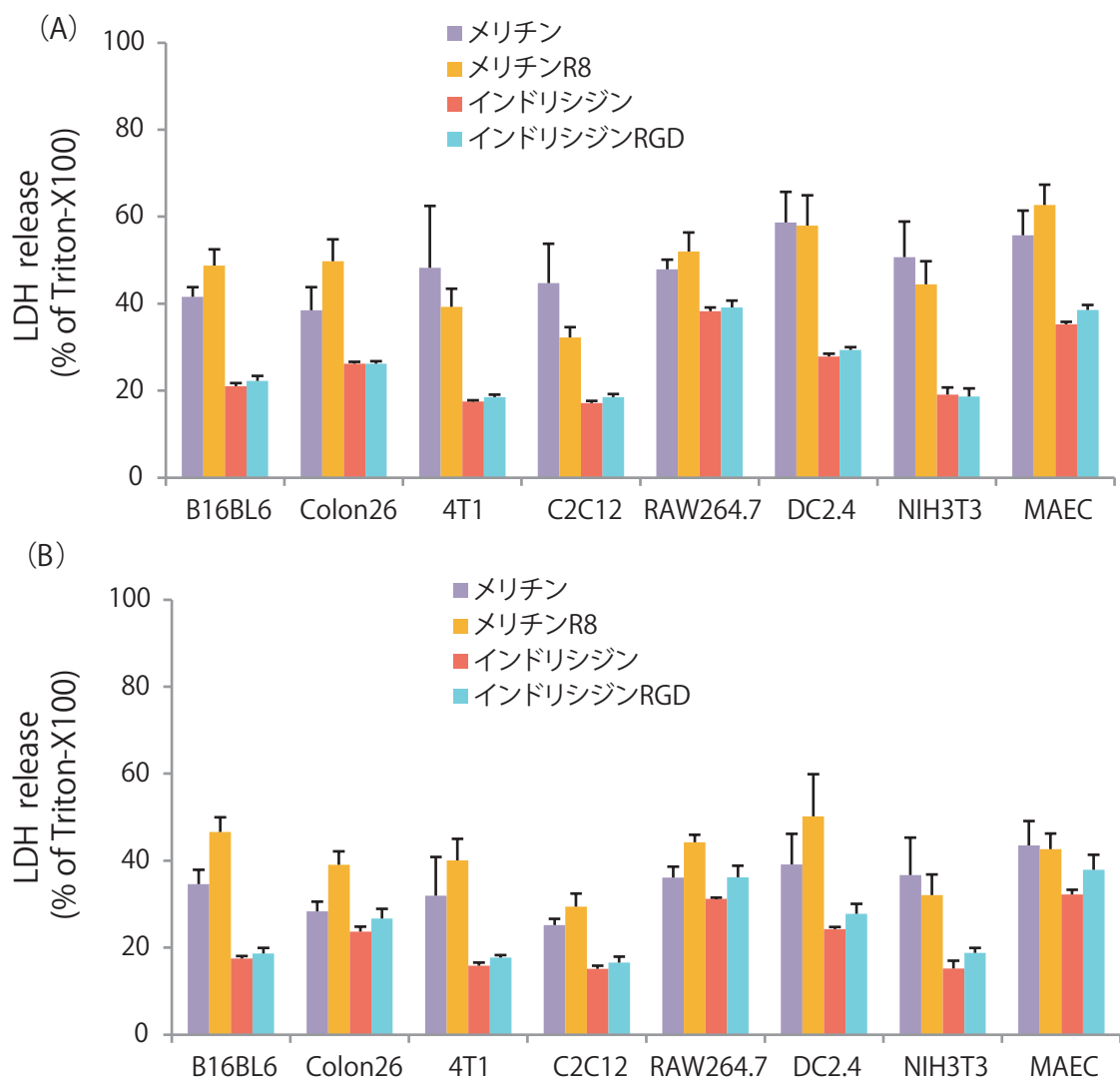


図3. 新規抗菌ペプチドによる膜透過性亢進作用. (A) 37℃で実験、(B) 4℃で実験.

メリチンR8

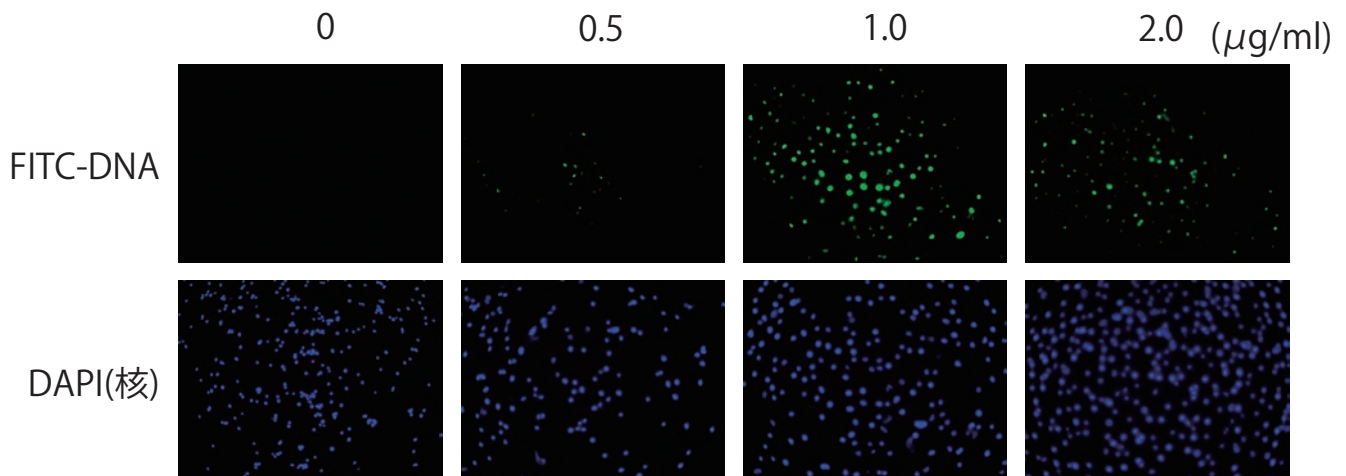


図 4. メリチン R8 による FITC-DNA の 4T1 細胞内送達.

考察

本研究では天然の抗菌ペプチドとしてメリチン、マガイニン、ダームシジン、インドリシジンの 4 種の抗菌ペプチドの膜透過性亢進作用についてカルセイン封入りポソームを用いた実験系について比較検討を行い、メリチンとインドリシジンが比較的高い膜透過性亢進作用を示すことを明らかとした。この時、中性リポソームに対してはいずれの抗菌ペプチドも透過性亢進作用は認められなかった一方で、負電荷リポソームにおいて高い透過性亢進作用が認められたが、これは今回使用した抗菌ペプチドは正電荷を有するアミノ酸を比較的多く含むものであったために、負電荷リポソームと相互作用しやすかったものと考えられる。また、その後の実験において、負電荷リポソームの実験において高い透過性亢進作用を示したメリチンおよびメリチン R8 が、細胞を用いた実験においても高い細胞膜透過性亢進作用を示したが、これは細胞表面も負電荷を有しているために同様の結果が得られたものと推察する。一方で、細胞を用いた実験において抗菌ペプチドによる細胞膜透過性亢進作用は温度による影響をほとんど受けなかったことからその作用はエネルギーに依存せず、細胞の取り込み活性によらないことが示された。以上の結果は、細胞膜透過性亢進作用の評価に際してはリポソームが使用可能であることを示す結果であるとともに、中性リポソームより負電荷リポソームの方が、妥当なスクリーニング系として利用可能であることを示すものである。

本研究では膜透過性亢進作用を示したメリチンおよびインドリシジンを基に、それぞれメリチン R8 およびインドリシジン RGD を新規に設計した。メリチン R8 は負電荷リポソームおよび細胞を用いた実験系においてメリチンより高い膜透過性亢進作用を示したが、これは R8 の付加によって、より強い正電荷を有するメリチン R8 はリポソームおよび細胞と相互作用をしやすくなったためではないかと考えられる。実際にメリチンおよびメリチン R8 のゼータ電位を測定したところそれぞれ 1.3mV および 16mV であった。一方で、インドリシジン RGD はインドリシジンより半分程度の膜透過性亢進作用を、負電荷リポソームを用いた実験系では示したが、細胞を用いた実験系での膜透過性亢進作用はほぼ同等であり、RGD の付加により、より高い膜透過性亢進作用を示した細胞も存在した。RGD の付

加によりインドリシジンとしての膜透過性亢進作用は低下したために、リポソームでの実験系においては膜透過性亢進作用が低下した一方で、インテグリンが存在する細胞においては、RGD が親和性を示したためにインドリシジンと同等あるいはより高い膜透過性親和性が得られたのではないかと考えられる。

メリチン R8 によるモデル薬物の細胞内送達効果について検討したところ、デキストランの細胞内送達についてはほとんど変化がなかった一方で、DNA の細胞内送達はメリチン R8 により大幅に上昇した。デキストランはほぼ中性である一方で、DNA は負電荷であるために、強い正電荷を有するメリチン R8 により細胞膜に形成された小孔への移行効率は DNA の方が高かったためではないかと推察する。また、メリチンあるいは R8 の利用によっても DNA の細胞内送達が観察された (data not shown) が、その効果はメリチン R8 よりも大幅に低いものであったことからメリチン R8 は DNA の細胞内送達に有用なツールであると期待できる。

以上、本研究では以下の三つのことを明らかとした。すなわち、メリチンは他の抗菌ペプチドと比較して高い細胞膜透過性亢進作用を有すること、メリチンに R8 を付加することで細胞膜透過性亢進作用を改善可能であること、そしてメリチン R8 は細胞内への DNA の導入効率を改善可能であることである。以上の結果からメリチン R8 は DNA をガン細胞内へ送達するデリバリーツールとなりえることが期待できる。

参考文献

1. Reddy, K. V., R. D. Yedery & C. Aranha. Antimicrobial peptides: Premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24: 536–547. (2004).
2. Nakase, I., T. Takeuchi, G. Tanaka & S. Futaki. Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 598–607. (2008).
3. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 697–715. (1996).