

研究課題別 中間評価結果

1. **研究課題名:**細胞を標的とする送達ペプチド:機能解析と制御

2. **研究代表者:**二木 史朗 (京都大学 化学研究所 教授)

3. **研究概要:**

本研究は、様々なアルギニンペプチド類縁体の合成を通して、(1)アルギニンペプチドの細胞内取り込み機序の解明と細胞内移行の促進化、(2)標的細胞への薬物導入の制御、(3)抗体・遺伝子の細胞導入を目的としている。

(1)~(3)について、これまで得られた成果を要約する。

(1)アルギニンペプチドの細胞内取り込み機序の解明と細胞内移行の促進化

直鎖型や分岐型の典型的なアルギニンペプチドを 5 種類合成し、アクチンの重合化や細胞内情報伝達の活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、細胞表層のプロテオグリカンを持たない細胞ではアクチン重合とマクロピノサイトーシスの誘導がほとんど起こらず、アルギニンペプチドの細胞への移行量も大幅に低下した。また、アルギニンペプチドと細胞表層のプロテオグリカンが相互作用をする際、細胞内 Rac タンパク質の活性化が起こった。これにより、アクチン重合やマクロピノサイトーシスの誘導、細胞内でのシグナル伝達系の活性化において、アルギニンペプチドと細胞表層のプロテオグリカンの相互作用が極めて重要であることが分かった。

従来、アルギニンペプチドの細胞内移行にはプロテオグリカンの存在が重要であることが指摘されていたが、上記の結果は、正電荷に富むアルギニンペプチドと硫酸基由来の負電荷に富むプロテオグリカンとの静電的相互作用により、ペプチドが「細胞表層に濃縮」されるのみならず、「取り込みを積極的に促進」することで効果的な取り込みが行われることを初めて明らかにした。次にアルギニンペプチドの細胞膜透過は疎水性の対イオンにより促進されるとの仮定の下で検討を進めた結果、ピレンブチレート等により、アルギニンペプチドの細胞内移行が顕著に促進されること、さらに、この過程はエンドサイトーシスを介さず、膜を直接透過することにより起こることが明らかとなった。

(2)標的細胞への薬物導入の制御

標的細胞への薬物導入制御をねらい、標的細胞で切断を受け活性化されるようなリンカーを導入した R8 ペプチドを設計し、細胞移行性を検討したところ、予期に反して、適当なリンカー配列の付加により R8 の細胞移行能が 10 倍以上高まる場合もあることが分かった。この結果から、新たに導入したリンカー配列が新しい機序による配列特異的な取り込み促進効果を持つ可能性があることが示唆された。当初計画の標的細胞への薬物導入制御自体に関しては更なる検討が必要である。

(3)抗体・遺伝子の細胞導入への応用

遺伝子(プラスミド)を内包し、アルギニンペプチドが高密度に表面に呈示されたりポソームを

開発し、このリポソームを用いて細胞への遺伝子導入を行ったところ、現在最も効率が高いと言われているアデノウイルスを用いた遺伝子導入法に匹敵する効率での遺伝子導入が達成された。また、動物実験において毛髪の成長を促す遺伝子の導入等において良好な結果が得られた。

4. 中間評価結果

4-1. 研究の進捗状況と今後の見込み

さきがけ研究の成果を基に、SORST では一段と進展が見られている。アクチン重合とマクロピノサイトーシスにおけるアルギニンペプチドと細胞表層のプロテオグリカンとの相互作用の重要性、細胞内 Rac タンパク質の活性化、環状アルギニンペプチドの細胞内取り込みにおける有用性、アルギニン含有リポソームの高効率遺伝子導入系への応用等成果は多い。ただし、最終目標である、細胞移行のメカニズムの理解に基づいた合理的且つ効果的な標的細胞へのドラッグデリバリーに関しては方法論的展開も含めて不十分である。

4-2. 研究成果の現状と今後の見込み

研究代表者は、細胞がアルギニンペプチドと接することにより、細胞内 Rac タンパク質が活性化され、これがアクチン重合とマクロピノサイトーシスを誘導することを見出し、さらに、この誘導には細胞表層の硫酸化された糖鎖の存在が重要な役割を果たすことを示した。この結果は、「アルギニンペプチドと硫酸化された糖鎖との相互作用によるアルギニンペプチドの細胞表層への濃縮」と「アルギニンペプチドの細胞内への積極的な取り込みの誘導」により、アルギニンペプチドの効率的な細胞内移行が達成されることを示唆するものである。取り込みの向上にはこの二つの要因が重要と考えられる。

このような成果は研究代表者が推進した「ペプチド合成化学」によるところが大きく、従来の生化学レベルでは判然としなかったことを明らかにした意義は大きい。ただし、これらの成果をすぐに細胞に適用出来るかどうかは不明である。

4-3. 総合的評価

本研究は化学的見地でアルギニンペプチドの細胞膜通過の機序を解明しつつあるが、目標である実用化の可能性のあるペプチドの開発に向けて短期間に大きく進展する可能性は見出せない。細胞標的ペプチドの開発は、細胞選択性が不十分のままであれば、最終的に意義が薄く、活性ならびに選択性の高いペプチドの開発に向けて総力を上げて取り組む必要がある。