

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－スウェーデン研究交流）

1. 研究課題名：「核酸医薬品送達のための新規方法論の開発」
2. 研究期間：平成21年7月～平成25年3月
3. 支援額： 総額 29,000,000 円
4. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	二木史朗	京都大学化学研究所	教授
研究者	松林伸幸	京都大学化学研究所	准教授
研究者	小暮健太郎	京都薬科大学	教授
研究者	田中 弦	京都大学化学研究所	博士研究員
研究者	広瀬久昭	京都大学化学研究所	博士後期課程学生
研究者	高山翔太	京都大学化学研究所	修士課程学生
参加研究者 のべ7名			

相手側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	Ülo Langel	ストックホルム大学神経化学	教授
研究者	Astrid Gräslund	ストックホルム大学生化学	教授
研究者	Fatameh Madani	ストックホルム大学生化学	博士課程学生
研究者	Rania Abdo	ストックホルム大学神経化学	博士課程学生
研究者	Peter Guterstam	ストックホルム大学神経化学	博士課程学生
研究者	Staffan Lindberg	ストックホルム大学神経化学	博士課程学生
参加研究者 のべ10名			

5. 研究・交流の目的

合成オリゴ核酸とその類縁体により特定の遺伝子の機能を効果的に調節できることが明らかにされて以来、核酸医薬の研究が強力に推し進められている。アンチセンスあるいはアンチジーン作用による遺伝子機能の制御がこれまで検討されてきたが、最近 siRNA (small interfering RNA、低分子干渉 RNA) が遺伝子を抑制する核酸医薬として加わった。核酸医薬品が広く臨床的に使われるためには技術的な向上が必要であり、なかでもこれらを細胞内に効率的に送達できる新しい方法論の開発が必要である。

近年、細胞透過ペプチド (cell penetrating peptide、CPP) が新しい非ウイルス性のオリゴ核酸の細胞内送達ベクターとして注目されている。CPP を用いたこれまでの検討により、従来の遺伝子導入系と比較して、毒性の低さや、初代培養細胞への送達の可能性といった多くの利点があることが明らかとなっている。そこで本研究では、膜透過性のペプチドとの複合体形成により効果的に標的細胞へのオリゴ核酸の導入を図り、遺伝子発現の調節を行うための方法論、特に遺伝子を不活性化するための新しい方法論の開発を目指した。さらに、効率的細胞内移行能をもつ CPP でリポソームを修飾することにより、内包された siRNA などのオリゴ核酸の細胞内導入効率を格段に向上させることを中心的課題の一つとして試みた。

6. 研究・交流の成果

6-1 研究の成果

siRNAをはじめとする核酸医薬品は究極の分子標的薬として実用化が求められているが、親水性が高く、分子量も一般的な小分子薬物に比べて非常に大きいことから、その標的細胞への送達が開発の大きな障害となっている。本研究では、核酸医薬品の細胞内送達の効率化という観点から、以下のような検討を行い、結果を得た。

1. 疎水性対イオン分子の添加効果

ピレンブチレートなどの疎水性対イオン分子の存在下、アルギニンに富む CPP が細胞膜を効率的に透過しうることを二木らは以前に報告していた。CPP にはこのようなアルギニンにと富むタイプのものや疎水性の比較的高いタイプのものなど種々の物性を有するものが報告されているが、核酸送達という観点からこれらの特性を比較検討した例は少なかった。本研究で、種々の CPP と核酸医薬品の複合体のエンドソーム膜透過におけるピレンブチレートとの添加効果を検討した結果、アルギニンに富む CPP と核酸医薬品の複合体のエンドソーム脱出に関して対イオン分子は有意な促進効果を示しうることを見だし、専門学術雑誌に論文として発表 (*Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, 1788, 2509) した。

2. 種々の CPP のエンドソーム膜透過様式の検討

エンドソーム内の pH は細胞内で酸性化することが知られている。スウェーデン側参画者の Gräslund らは、照射により内部の pH を調節できるリポソーム系を開発しており、本研究では、これをエンドソームのモデル系として、種々の CPP のエンドソーム膜透過特性をこの系を使って検討した。疎水性の比較的高い CPP は pH 低下によりエンドソーム膜透過能が向上したのに対し、アルギニンに富む CPP は pH 低下時も膜透過性はほとんど変わらず、これらの CPP のエンドソーム脱出機序が異なることが示唆された (論文発表: *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1828, 1198)。

3. アルギニンに富む CPP の取り込み促進受容体の同定

アルギニンに富む CPP はマクロピノサイトーシスという特殊なエンドサイトーシスを活性化して細胞内に取り込まれることを二木らは以前に報告しているが、この経路を活性化することで核酸医薬品の細胞内への取り込みも促進されると期待される。今回、CXCR4 とよばれる細胞表面受容体がマクロピノサイトーシス活性化に関わる受容体の一つであることを世界に先駆けて報告した (*Chem. Biol.* **2012**, 19, 1437)。さらに、この受容体の刺激により、R12 の取込自体も向上することが分かり、アルギニンに富む CPP を用いた核酸医薬品の細胞内取込にこの系を活用できる可能性が提示された。

4. 高いエンドソーム脱出能を有する CPP により修飾したリポソームによる siRNA の送達
これまで、アルギニンに富む R8 などの CPP により修飾されたリポソームを用いて、遺伝子導入が行われてきたが、2 の研究から疎水性の比較的高いタイプの CPP を用いることでより効率的なエンドソーム脱出と細胞内への移行が期待できることが示唆された。スウェーデン側研究者の Langel らが開発した CPP (PepFect6) を用いて、siRNA を細胞内に導入したところ、従来の CPP 修飾リポソームに比べて格段に高い RNAi 効果が得られた (投稿中)。

5. 研究遂行途上での、情報交換や討論の結果、種々の CPP の細胞内取込機序や CPP を用いた核酸医薬品の送達の特長や異同が明らかとなり、これらの結果を総説として発表することができた (*J. Biophysics* **2011**, 2011, 414729; *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1132; *Mol. Biosyst.* **2013**, 9, 855)。

6. 研究遂行の過程で、日本側代表の二木が開発中の新規エンドソーム脱出促進ペプチドの開発にスウェーデン側の持つ内部 pH 可変のリポソーム系が非常に有用であることがわかり、本共同研究の一環として検討を行った。これに関連して、この系の樹立を行ったスウェーデン側大学院生が博士号取得後、京都大学に博士研究員として約 4 ヶ月滞在し、ペプチド設計や培養細胞系での機能評価を行った。このプロジェクトは双方の強みを補完する形で現在も継続中である。

6-2 人的交流の成果

1. 研究期間中、日本側研究者が 2009 年 12 月、2011 年 12 月の計 2 回ストックホルム大学を訪問、また、スウェーデン側研究者が 2010 年 10 月、2012 年 1 月の計 2 回京都大学を訪

問して、共同研究の打ち合わせと討論を行った。また、日本側、あるいはスウェーデン側の研究者が招待講演者として招かれた CPP 関連国際会議(2010年4月と2011年5月に開催)等の機会を利用して、情報収集と共同研究打ち合わせを行った。

2. 上述のように、スウェーデン側メンバーとして参加した大学院生が博士号取得後、京都大学に博士研究員として4ヶ月滞在し、ペプチド設計や培養細胞系での機能評価を行った。また、帰国後も継続して共同研究を行っている。

3. 本プロジェクトに参加した日本側大学院生の一名は、海外の研究者との共同研究に触発され、大学関連での研究職を志望し、現在、フランス国立科学センター(CNRS)の博士研究員として留学中である。さらに、別の大学院生は博士号取得後、化学系企業に研究職として修飾した。また、修士で卒業した学生は企業に一旦就職したものの、研究職の道を志し、現在他大学の博士課程に在籍中である。このように、本共同研究は参画した学生にとっても良い刺激を与えた。さらに、日本側メンバーであった博士研究員は、本研究中の成果等々を評価され2013年4月より杏林大学医学部助教に就任した。

7. 主な論文発表・特許等 (5件以内)

相手側との共著論文については、その旨を備考欄にご記載ください。

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、 出願番号、出願人、発明者等	備考
論文	Madani F, Abdo R, Lindberg S, Hirose H, Futaki S, Langel U, Gräslund A. Modeling the endosomal escape of cell-penetrating peptides using a transmembrane pH gradient. <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> 2013 , 1828, 1198-204.	共著
論文	Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, Kawaguchi Y, Takatani-Nakase T, Langel U, Gräslund A, Okawa K, Matsuoka M, Fujii N, Hatanaka Y, Futaki S. CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. <i>Chem. Biol.</i> 2012 , 19, 1437-46.	共著
論文	Nakase I, Akita H, Kogure K, Gräslund A, Langel U, Harashima H, Futaki S. Efficient intracellular delivery of nucleic acid pharmaceuticals using cell-penetrating peptides. <i>Acc. Chem. Res.</i> 2012 , 45, 1132-9.	共著
論文	Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Gräslund A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. <i>J. Biophys.</i> 2011 , 2011, 414729.	共著
論文	Guterstam P, Madani F, Hirose H, Takeuchi T, Futaki S, El Andaloussi S, Gräslund A, Langel U. Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate. <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> 2009 , 1788, 2509-17.	共著