



2020 年度 助成

研究 経過 ・ 終了 報告書

※ゴシック文字で記入下さい。

研究テーマ	細胞種選択的な細胞膜透過能を有する中分子薬剤キャリアの開発
研究の結果	<p><取り組んだ実験内容と得られた結果の概要></p> <p>(1) 細胞種選択的な細胞膜透過キャリア (cp-PG) の開発 これまでに我々の研究室で開発したジェミニ型のリポペプチド (PG-surfactant) ベースの細胞膜透過キャリア (cp-PG) に、多くの癌細胞に高発現のみられる受容体 (EGFR) に対し高い結合活性を持ったペプチド (GE11 ペプチド) を導入することで、細胞種選択的な cp-PG の開発が可能か検討を行った。cp-PG は、ここに含まれるペプチド配列を選択することで膜透過性のコントロールが可能であり、取り込み効率の高いもの (DKDKC₁₂-K₃)、中程度のもの (DKDKC₁₂-K₁)、低いもの (DKDKC₁₂-D₃) に対して GE11 ペプチドをそれぞれ導入し、表皮癌由来の A431 細胞、線維芽細胞 NIH3T3 細胞間で取り込み選択性が得られるか評価した。FACS 測定による分析の結果、中程度の膜透過性を有する DKDKC₁₂-K₁ と GE11 ペプチドの複合体 (GE11-DKDKC₁₂-K₁) を用いることで、A431 細胞に対して5倍程度と最も高い細胞種選択性の付与に成功した。</p> <p>(2) 細胞種選択的な細胞膜透過キャリアを用いた、細胞種選択的なアポトーシス誘導実験 Pro-apoptotic domain(PAD)ペプチドは、細胞質まで送達された時にミトコンドリア膜にダメージを与え、アポトーシスの誘導を引き起こす。従って (1) で開発した細胞種選択性 cp-PG が、実際に生理活性ペプチドを細胞質まで送達できたか否かを、細胞死の割合から評価可能である。そこで GE11-cp-PG と複合化した場合の、A431 細胞、NIH3T3 細胞間での取り込み選択性の評価を行った。その結果、PAD ペプチドが極端に高いカチオン性を持つが故に、単純に GE11-DKDKC₁₂-K₁ を複合化して用いた場合には、細胞種選択性がほとんど見られなくなってしまった。しかし、膜透過性を低下させた GE11-DKDKC₁₂-D₃ を cp-PG として用いることで、2倍程度の細胞種選択性を発揮させることができることはわかった。</p> <p>(3) 細胞種選択的な細胞膜透過キャリアを用いた細胞種選択的な TGF-β シグナル阻害実験 PAD ペプチドと異なり、総電荷がゼロ付近の生理活性ペプチドであれば、GE11-cpPG を用いてより高い選択性をもった生理活性ペプチドの送達が可能となるか、次に検討を進めた。ここでは、TGF-β シグナルを媒介するシグナル分子 smad2 に対し細胞内で結合した場合に TGF-β シグナルの伝達を阻害可能となる、SBD ペプチドの細胞内送達を元に検討した (図1)。TGF-β シグナルは細胞の上皮-間葉転換に関連し、このシグナルが On になると細胞遊走性が高まる。そこで TGF-β を添加後の細胞遊走性に対する阻害効果に対して、cp-PG を用いて SBD ペプチドを送達した時の、A431 細胞、NIH3T3 細胞間での細胞種選択性を評価した。その結果、GE11-DKDKC₁₂-K₁ を用いることで、A431 細胞に対して3倍程度の細胞種選択性が得られることがわかった。</p>  <p>図1 細胞種選択性を持った cpPG を用いた TGF-β シグナルの細胞種選択的な阻害</p> <p><本研究のまとめ></p> <p>我々の研究室で開発された細胞膜透過キャリア (cp-PG) に対して、標的とする細胞に特異的に結合するペプチド配列を導入することで、細胞種選択的な cp-PG の開発が可能であることがわかった。cp-PG の分子量が 1.5 kDa 程度と比較的低分子量であるが故に、送達したい生理活性ペプチドに極端な電荷の偏りなどがあると、細胞種選択性に減弱傾向が見られた。しかしその場合でも、cp-PG 側の元々の細胞膜透過性をコントロールすることで、ある程度の細胞種選択性を発揮可能となることがわかった。非常に大きな細胞種選択性の付与とまではいかなかったが、研究期間の延長を認めて頂き (3) についても検討を進めることができ、当初の研究目的は果たすことができた。</p>
研究発表 (実績)	<p><研究発表></p> <ol style="list-style-type: none"> 「細胞種選択的な細胞膜透過キャリアとなる PG-surfactant の開発」 山田桃果、水野稔久 第70回高分子年次大会、ポスター、2021.5.26 "Development of the PG-surfactants, functioning as a cell-type-selective membrane permeation carrier" M. Yamada, N. Sumito, N. Umezawa, Y. Inoue, T. Mizuno GPS-K2021, Oral, 2021.7.31 「外来ペプチドの輸送を可能とする細胞種選択的な PG-surfactant の開発」 山田桃果、住藤夏美、井上靖道、梅澤直樹、水野稔久 第71回高分子年次大会、ポスター、2022.5.26 「細胞膜透過 PG-surfactant を用いた新規細胞内 TGFβ シグナル伝達抑制剤の開発」 山田桃果、住藤夏美、井上靖道、梅澤直樹、水野稔久 第71回高分子討論会、ポスター、2022.9.7 <p><論文発表></p> <p>・ "Cytosolic Delivery of External Protein Using the Cell-Penetration PG-surfactant DKDKC₁₂-K₃" K. Kaie, M. Yamada, S. Kato, N. Umezawa, Y. Inoue, S. Tsukiji, T. Mizuno (近日中に再投稿の予定)</p>

提出期限：研究期間終了後、すみやかに助成金の「必要経費使途明細書」「領収書」と合わせて提出下さい。
 年度をまたぐ場合は毎年3月末日までに、途中経過をご記入の上、報告願います。