

膜透過促進ペプチドによる バイオ医薬品の細胞内デリバリー

慶應義塾大学 理工学部

生命情報学科

教授 土居 信英

世界の医薬品売り上げランキング

順位	2004年度	2009年度	2014年度
1	リピトール(高脂血症)	リピトール(高脂血症)	ヒュミラ(関節リウマチ)
2	エポジェン(腎性貧血)	セレタイド(抗喘息薬)	ランタス(インスリン製剤)
3	プラビックス(抗血小板薬)	レミケード(関節リウマチ等)	ソバルディ(C型肝炎)
4	ゾコール(高脂血症)	プラビックス(抗血小板薬)	エビリファイ(統合失調症薬)
5	ノルバスク(降圧剤)	ディオバン(降圧剤)	エンブレル(関節リウマチ等)
6	セレタイド(抗喘息薬)	アバスチン(抗がん剤)	セレタイド(抗喘息薬)
7	タケプロン(抗潰瘍剤)	リツキサン(悪性リンパ腫)	クレストール(高脂血症)
8	ジプレキサ(統合失調症薬)	エンブレル(関節リウマチ等)	レミケード(関節リウマチ等)
9	メバロチン(高脂血症)	ヒュミラ(関節リウマチ)	ネクシアム(抗潰瘍剤)
10	ネクシアム(抗潰瘍剤)	セロクエル(統合失調症薬)	リツキサン(悪性リンパ腫)

バイオ医薬 抗体医薬やタンパク質製剤の売り上げが増えている

バイオ医薬品の利点と課題

(小分子化合物医薬との比較)

利点

特異性が高い

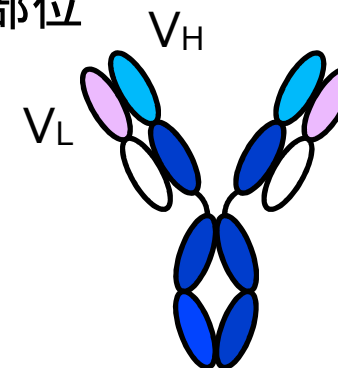
→ 副作用の恐れが少ない

課題

生産コストが高い

細胞膜透過性が低い → 疾患標的が限定

抗原結合部位



抗体

タンパク質の効率的な細胞内デリバリー技術が必要

従来技術とその問題点

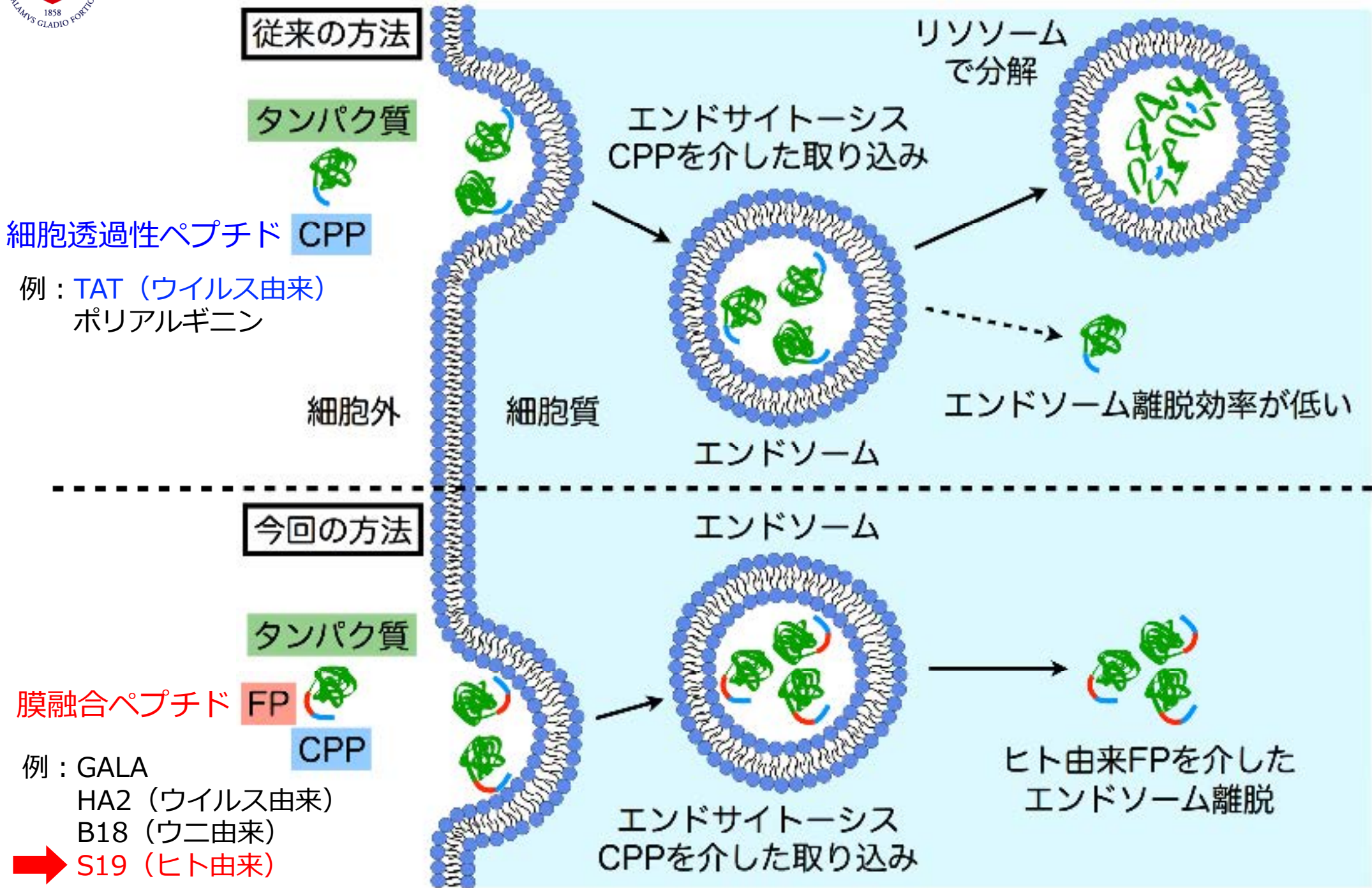
既に実用化されているものには、膜透過性ペプチドを利用する方法などがあるが、

細胞質への送達効率が低い

細胞選択性が低い

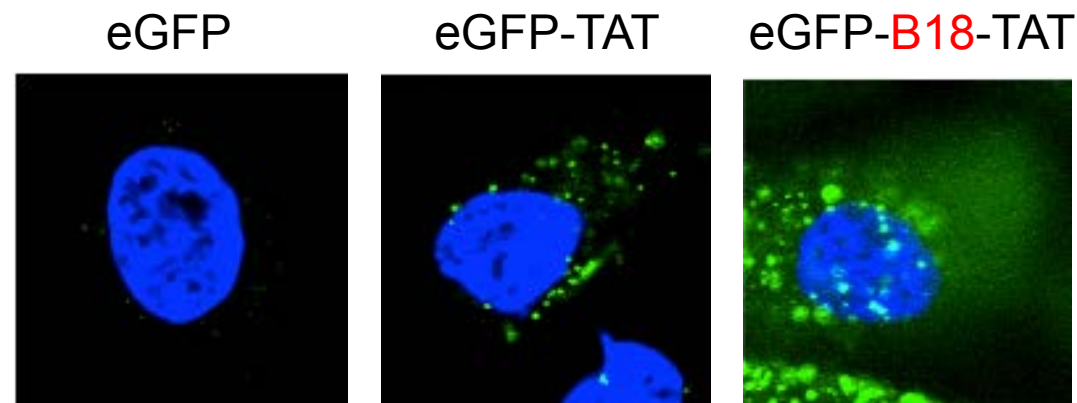
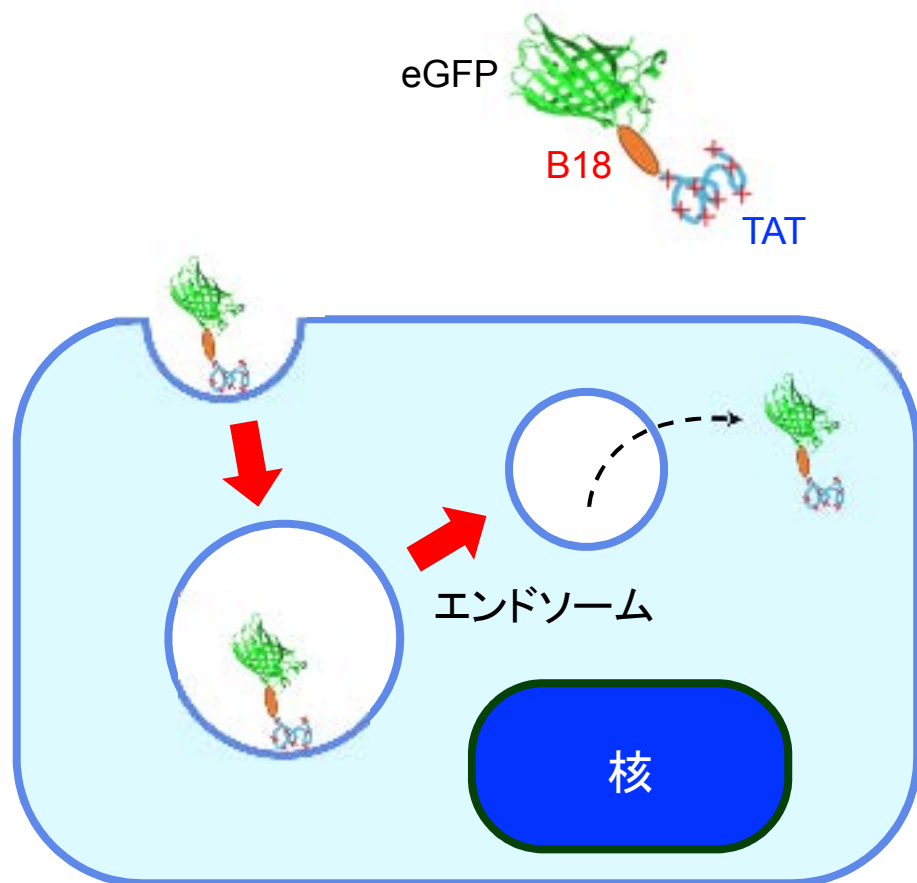
等の問題があり、広く利用されるまでには至っていない。

膜透過性ペプチドの利用



新技術に至った経緯

宿主細胞と膜融合するウイルスの膜融合ペプチド(FP)だけではなく、細胞同士の膜融合に関与するFPも膜透過促進活性を示すのでは？

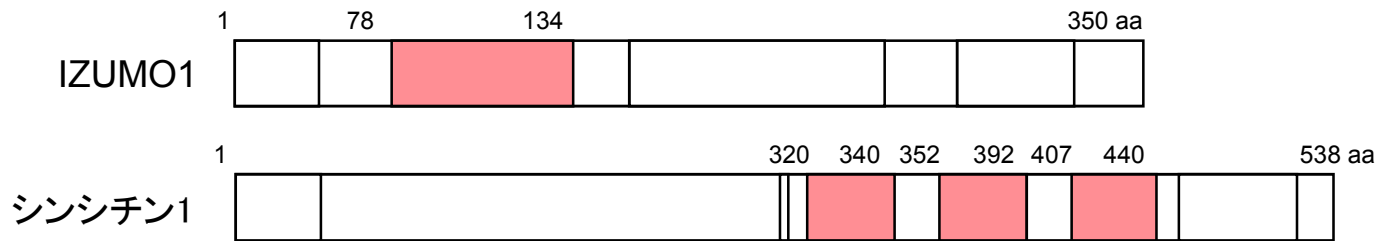


ウニの受精に関与するタンパク質バインディン由来の膜融合ペプチドB18が、連結した蛍光タンパク質(eGFP)の細胞質送達を促進することを発見

Niikura K. et al. (2015) *J. Control. Release* 212, 85-93

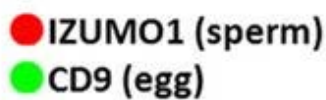
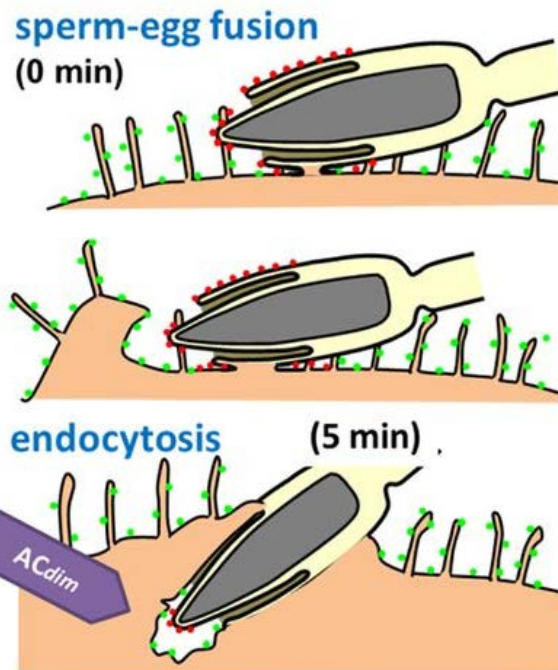
→ ウニ由来なので免疫原性の懸念があった

細胞膜融合に関わるヒトタンパク質



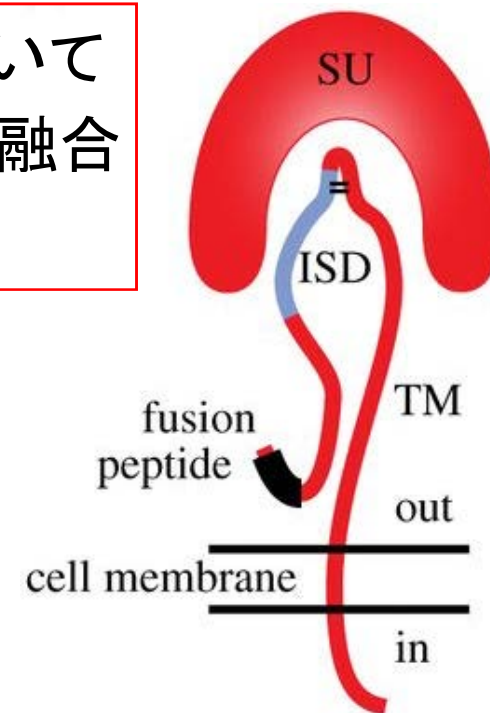
膜融合ペプチド

受精において精子と卵子の細胞融合に関与



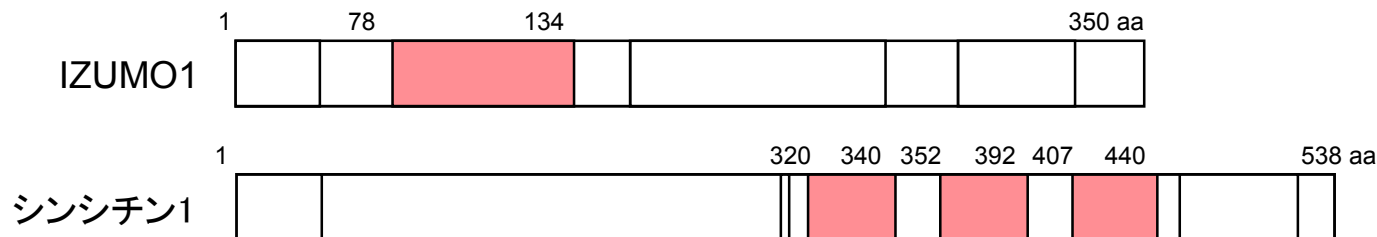
(Satouh *et al.*, 2012)

胎盤形成において母子由来細胞融合に関与



(Lavialle *et al.*, 2013)

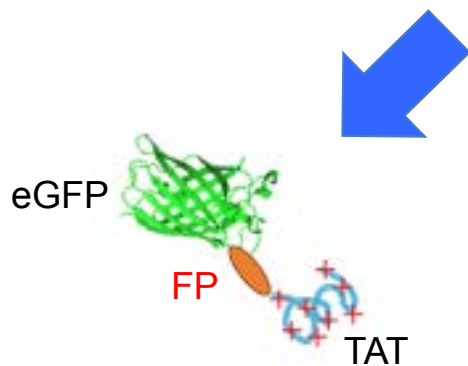
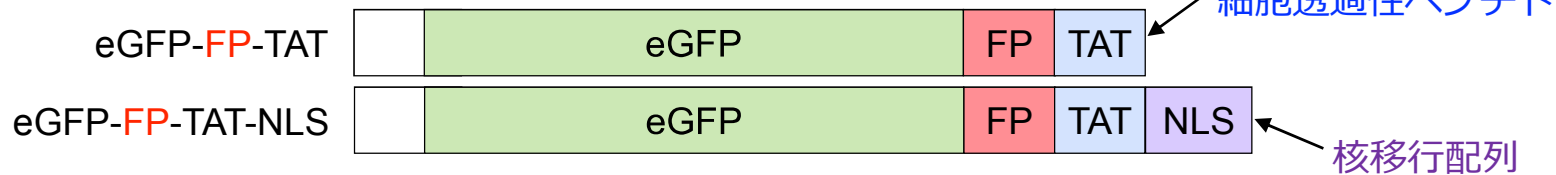
ヒト由来膜透過促進ペプチドの探索



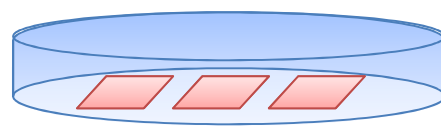
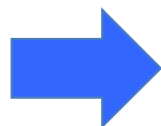
膜融合ペプチド



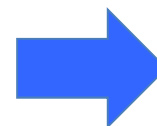
蛍光タンパク質



融合タンパク質
 の発現・精製



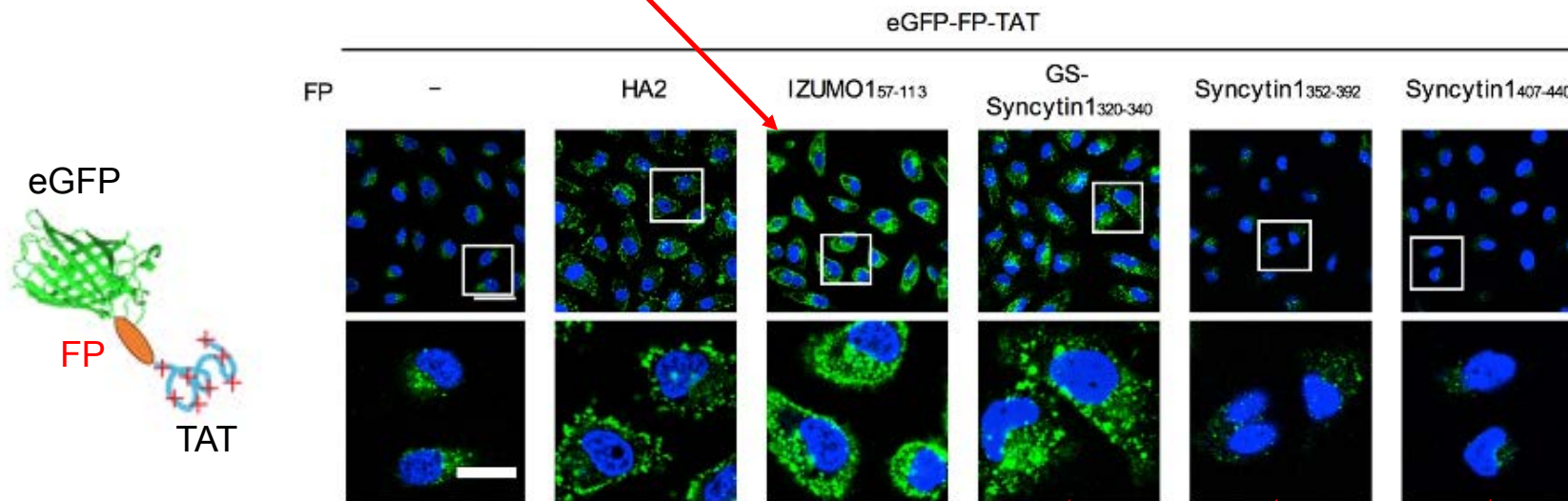
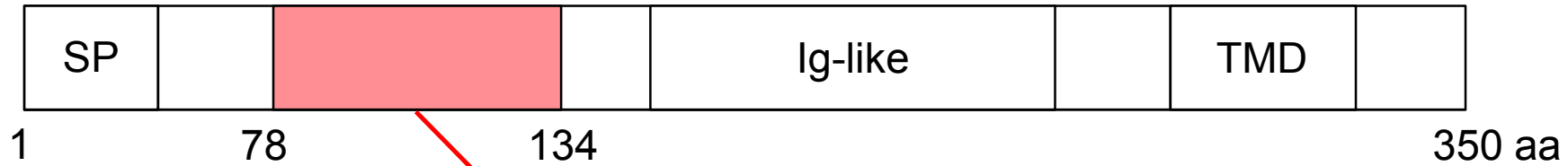
ヒト培養細胞に添加



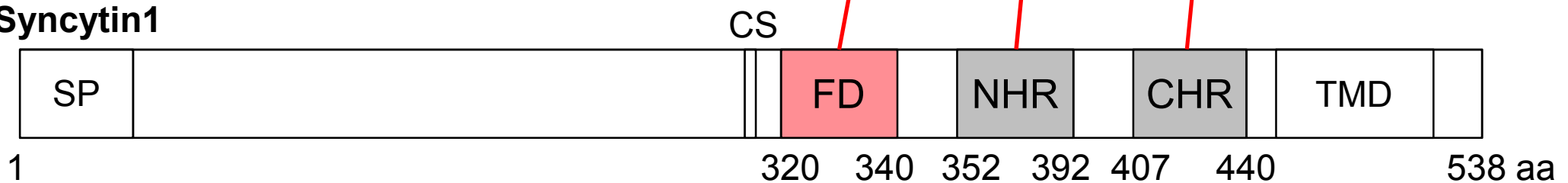
共焦点蛍光顕微鏡
 による局在観察

ヒト由来膜透過促進ペプチドの探索

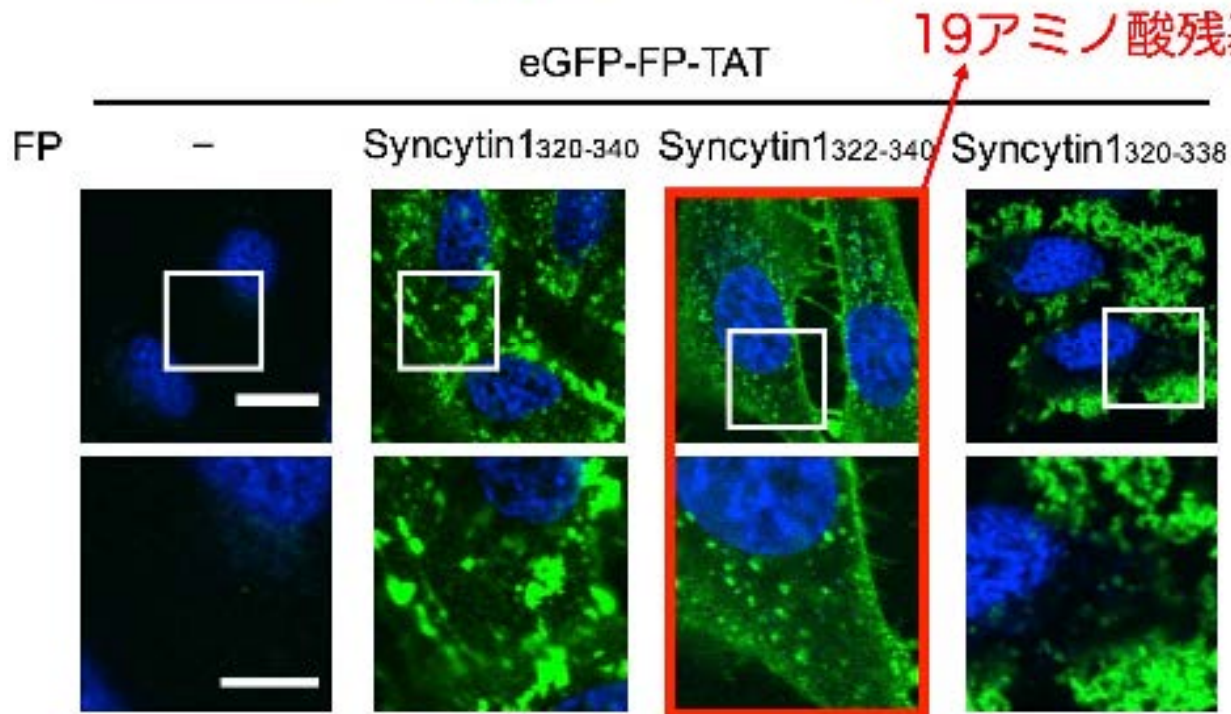
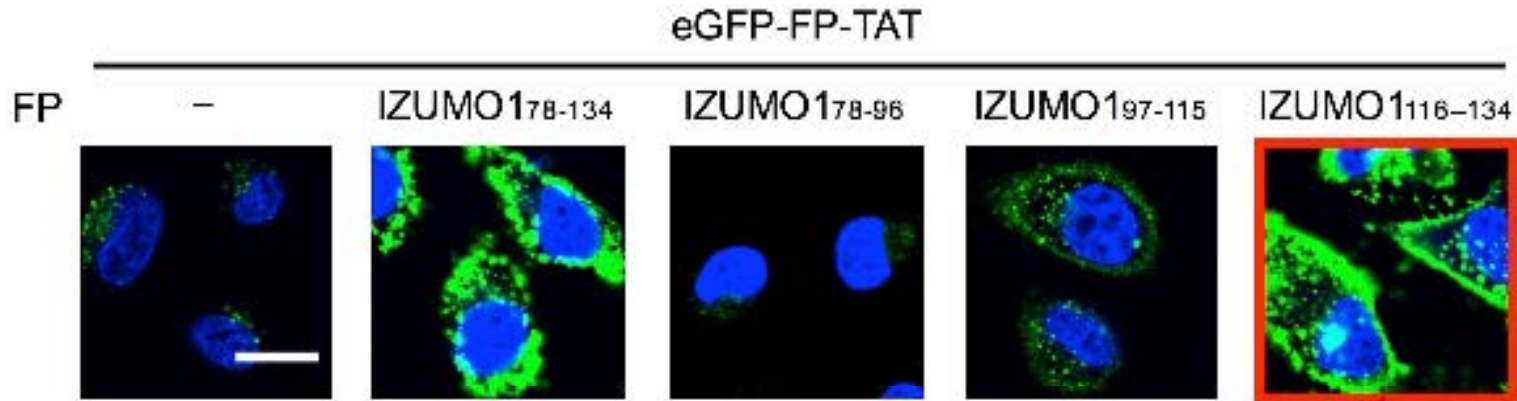
IZUMO1



Syncytin1

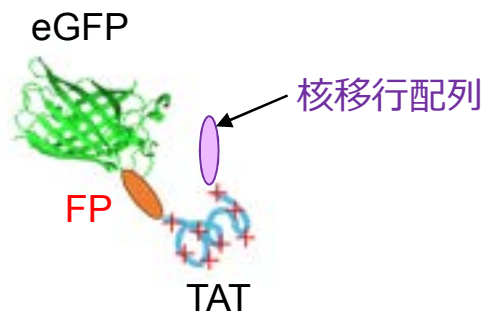


膜透過促進ペプチド配列の最適化

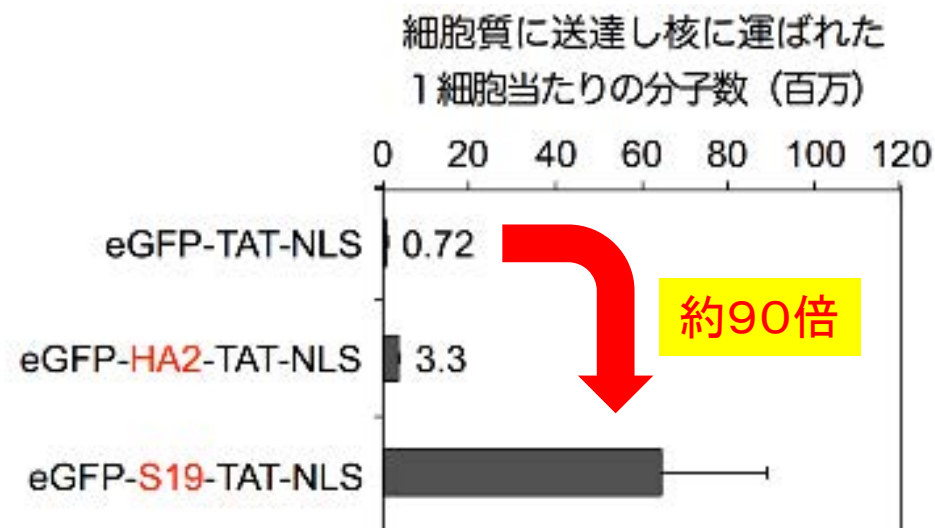
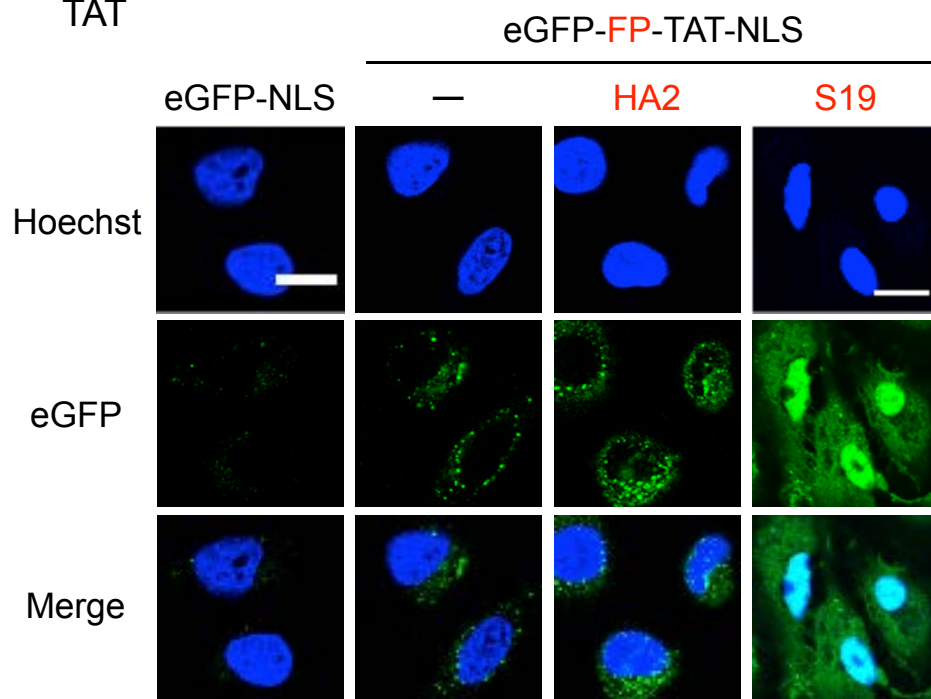


S19と命名

細胞質に送達された分子数の算出

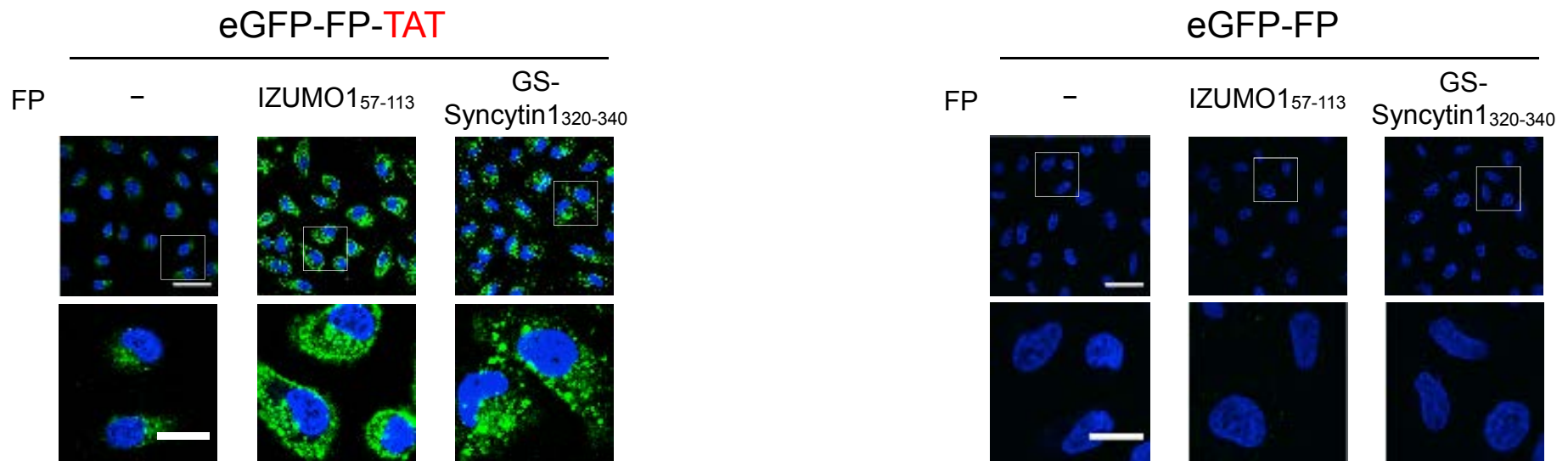


エンドソームを離脱し細胞質に送達された分子のみが核移行配列により核に運ばれるので、細胞抽出液を核とそれ以外の画分に分け、それぞれに含まれるタンパク質をウェスタンブロットにより定量



ヒト由来膜透過促進ペプチドは eGFP-TAT の細胞質送達を約90倍促進した

ヒト由来膜透過促進ペプチドは 単独では細胞膜と強く相互作用しない

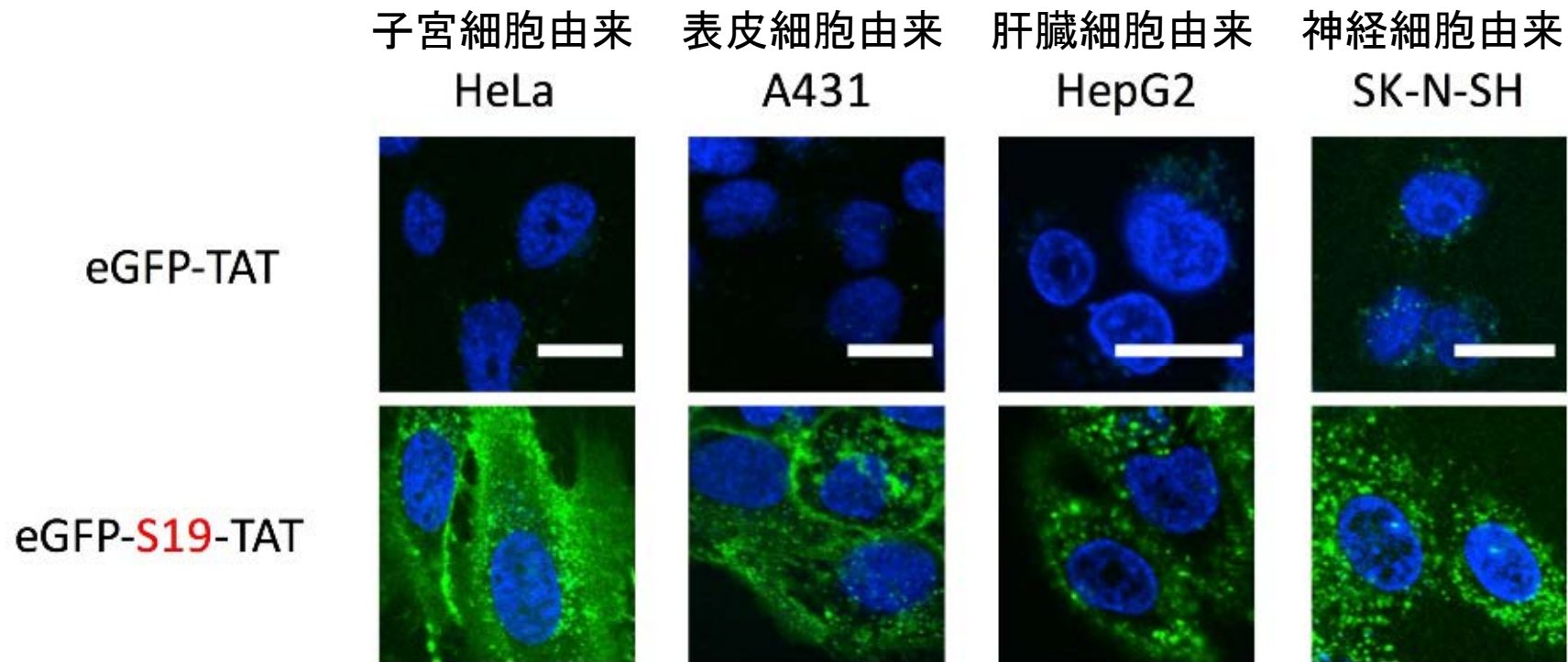


TATを抗体と置き換えることで
 細胞選択的なデリバリーに応用できる可能性がある

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、タンパク質などの生体高分子の細胞質送達(エンドソーム離脱)効率を数十倍向上することに成功した。
- 従来とは異なり、ヒト由来の膜融合ペプチドを用いるので、医薬品に適用する場合、免疫原性の恐れが少ない。
- 本技術の膜透過促進ペプチドは、単独では細胞膜と強く相互作用しないため、TATを別のリガンドと置き換えることで細胞選択性の付与が期待される。

汎用性の評価①

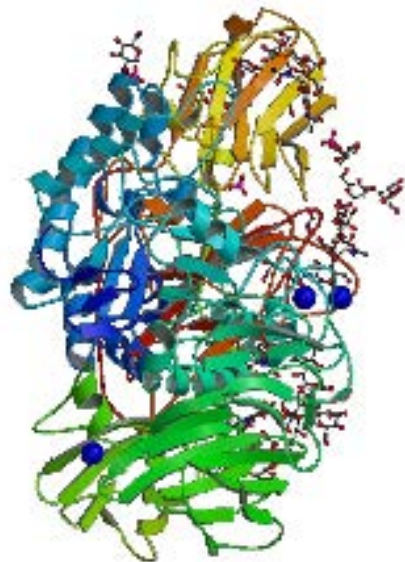


ヒト由来膜透過促進ペプチドは**様々なヒト培養細胞**において
 蛍光タンパク質 (eGFP) の細胞内取り込みを促進

汎用性の評価②

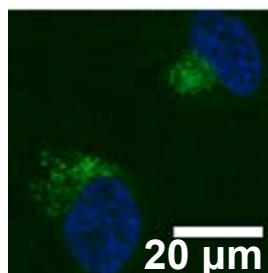
β-ガラクトシダーゼ
 (116 kDa x 4量体)

酵素活性により
 蛍光を発する基質

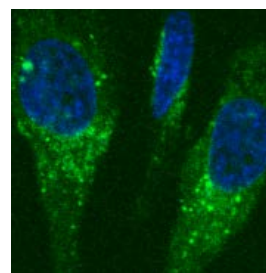


C₁₂-FDG
 +
 Hoechst

β-Gal-TAT



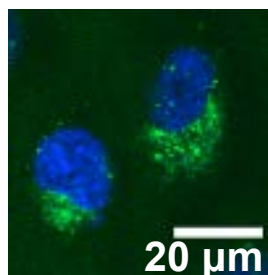
β-Gal-S19-TAT



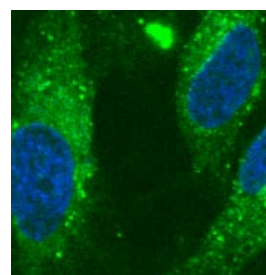
蛍光色素

BG-DY505
 +
 Hoechst

SNAP-TAT



SNAP-S19-TAT



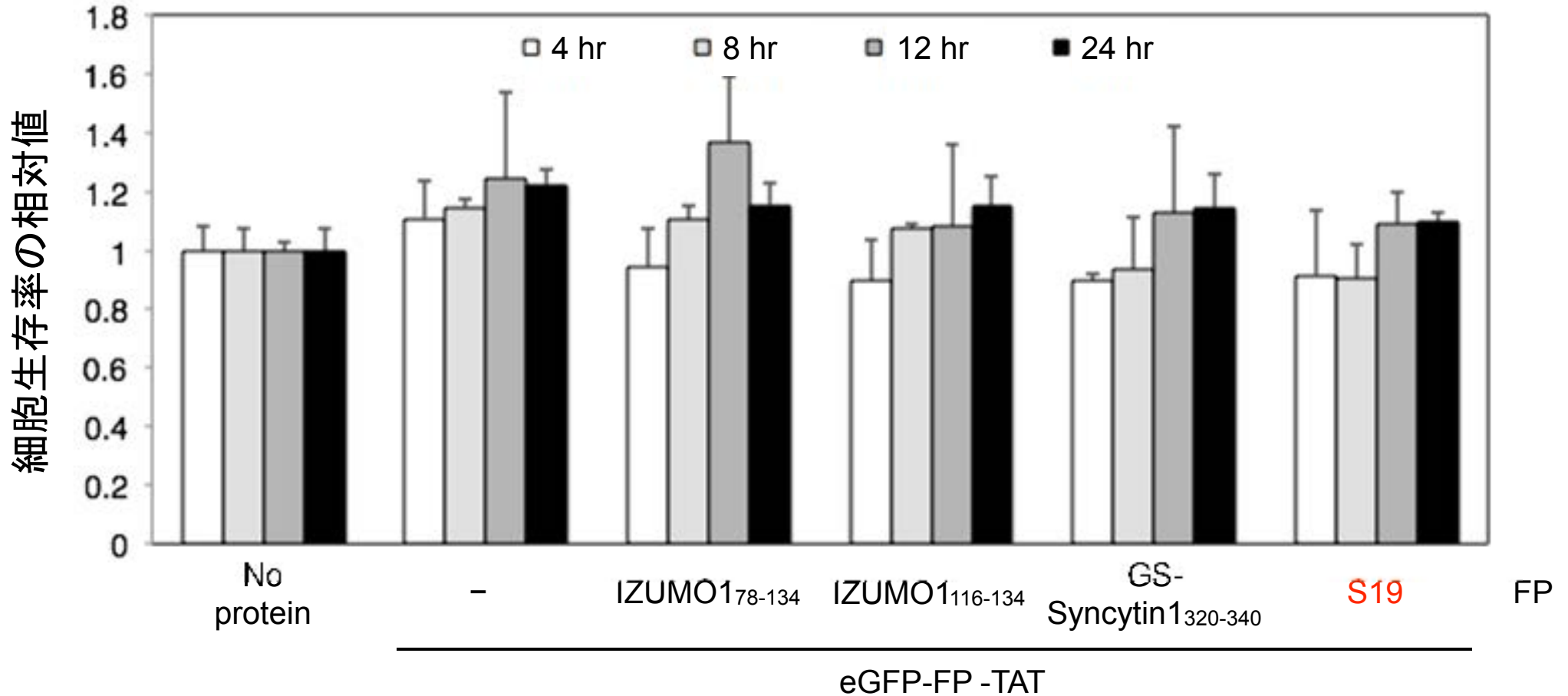
SNAPタグ (20 kDa)

ベンジルグアニン (BG)
 と共有結合

ヒト由来膜透過促進ペプチドは様々なタンパク質の細胞内取り込みを促進

安全性の評価

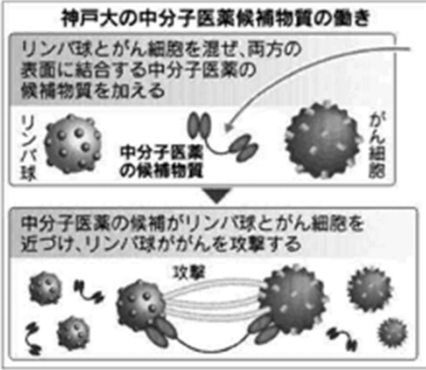
WST-1アッセイにより細胞増殖および生存への影響を検証



ヒト由来膜透過促進ペプチドは細胞の増殖や生存に影響を及ぼさない

新聞記事

日本経済新聞
2016.12.26



がん治療薬「オプジーボ」などの抗体医薬は、子葉のように安価に作れる分子のサイズが大きい高コストと期待される。神戸大の近藤啓彦教授は、胃がんや大腸がんを攻撃する抗体の一部を切り出した中分子医薬の候補物質を作製した。がん細胞の表面にあるたんぱく質と、がんを攻撃するリンパ球を結びつけ、リンパ球ががんを攻撃しやすくなる。胆管がんの細胞を培養した中分子医薬は、両者の間に人間のリンパ球を混ぜ、この物質を加えたところ、がん細胞は1割以下に減少した。

薬効・低コスト両立
「中分子医薬」でがん攻撃

神戸大 抗体から作製
大阪府大 マウスで効果

患部への到達効率に課題
中分子医薬への関心は、げん研究も始まっている。このペプチドを結合高まっている。文部科学省は、慶応義塾大学の土居信一と、細胞の中に効率よく入れるので、中分子医薬などのたんぱく質を、医薬品の幅が広がる。開発につながる研究を、細胞の中に効率よく届けようとする。ただ中分子医薬は、人の胎盤ができるように働く。間の体内で分解されやすいため、目的の細胞にたどり着くのが難しい。このことが実用化の障壁となっており、薬と患部への到達効率に課題がある。多くの場合、細胞表面などに作用する中分子医薬は、がん細胞に作用する。

慶応義塾大学の土居信一教授は、細胞の中にたんぱく質などを効率よく届ける技術を開発し、細胞内に取り込まれる効

率が数十倍に高まった。細胞の中に抗体医薬などを送り込む薬剤送達システム(DDS)に応用で

たんぱく質細胞に送達

慶応大 ペプチド付け効率数十倍

▼中分子医薬 分子サイズが小さくなった。たんぱく質の原料が数千種類の医薬品。遺伝子情報を用いる核酸医薬やペプチド製剤などがある。高分子医薬のように特定のたんぱく質に結合して作用し、低分子医薬のように化学合成などで製造できる。

▼中分子医薬の応用を拡大する。たんぱく質が複数集まったペプチドだ。マウスの皮下に大腸がんを移植して4回注射したところ、10日後に治療したがん細胞は1割以下に減少した。

土居教授らは胎盤形成時の細胞融合に関わるシリンチン1に注目した。その構造を解析し、細胞膜を通り抜けるために重要なペプチド(たんぱく質の断片)を特定した。

このペプチドを届けたいたんぱく質に付けたら、細胞膜に包まれた後に細胞の中まで到達する効率が上がった。

抗体や核酸などのバイオ医薬品は分子量が大きく、細胞膜を通り抜けるのが難しい。企業などは主に細胞の外にある標的を狙った薬の開発に力を入れている。土居教授らは今回のペプチドをDDSに利用できれば、細胞内でのたんぱく質などを標的にしたバイオ医薬品の開発も可能になると期待している。

慶応大がヒト由来ペプチドを発見
慶応大の土居信一教授らは、バイオ医薬品をより効率よく細胞内に運

ぶヒト由来ペプチドを発見したと発表した。胎盤形成における細胞融合に関与するたんぱく質シリンチン1の部分ペプチド(膜融合ペプチド)が、細胞膜透過性を向上させることに成功した。

たんぱく質の細胞質への送達効率を数十倍向上させる。ヒト由来のため、免疫原性の懸念も少ない。

抗体やペプチド、核酸などのバイオ医薬品は細胞膜透過性が低く、細胞内の疾患標的に作用させることが難しい。抗体などのたんぱく質をDDSに連結させて細胞質に送りこむ研究が行われている。DPを組み合わせて膜透過を促進できることも報告されているが、ヒト由来でないため免疫原性の懸念があった。

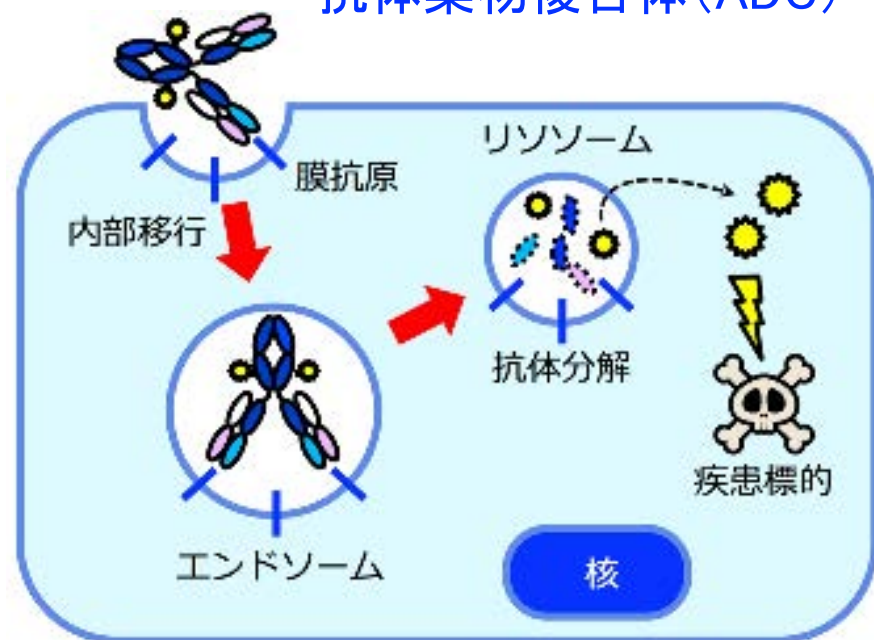
化学工業日報
2017.4.10

日経産業新聞
2017.4.14

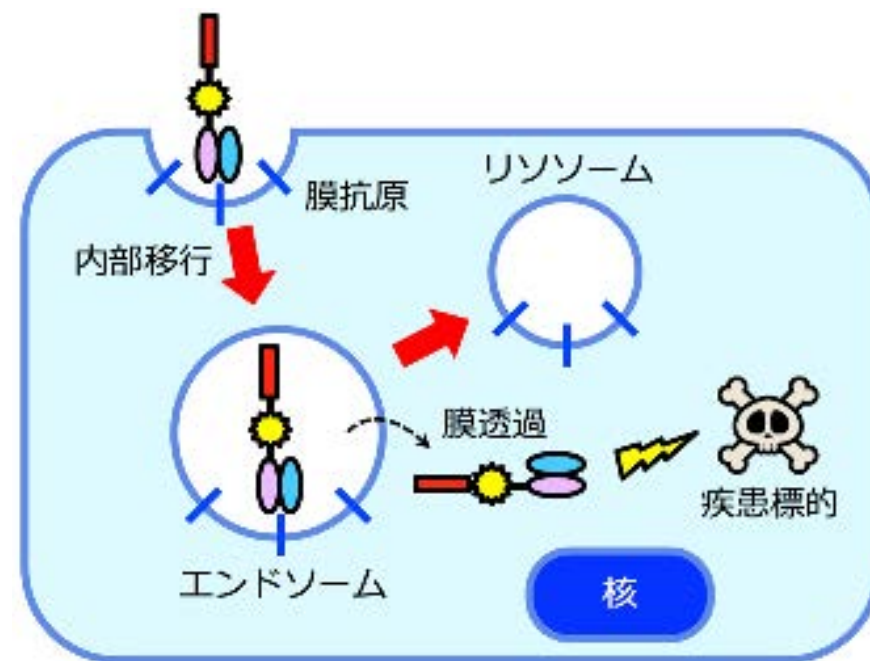
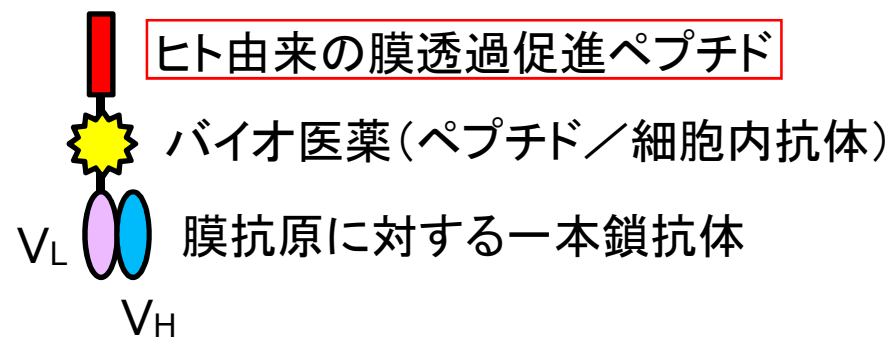
抗体を利用した 細胞選択的デリバリーへの応用



抗体薬物複合体(ADC)



<従来技術>



<新技術の応用>

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、バイオ医薬品のデリバリーに適用することで、**細胞質送達効率アップによるコスト削減**のメリットが大きいと考えられる。
- 上記以外に、**細胞選択性の付与による副作用低減**の効果が得られることも期待される。
- また、より早い実用化が期待できる用途として、分子細胞生物学の基礎研究におけるタンパク質（細胞内抗体、転写因子など）や核酸（プラスミドDNA、siRNAなど）の**細胞質送達用担体**や**膜透過促進剤**に応用することも可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 現在、S19-TATを連結した蛍光タンパク質やいくつかの酵素について *in vitro* で効率的な細胞質送達が可能なところまで実証済み。
- 今後、S19-TATを連結したバイオ医薬品について *in vitro* および *in vivo* で実験データを取得する必要がある。
- また、細胞選択性の付与に向けて、TATの代わりに抗体やリガンドを用いた技術を確立する必要もある。

企業への期待

- 細胞透過性ペプチド TAT を利用したバイオ医薬品や細胞内導入試薬を開発中の企業には、本技術 S19-TAT の利用が有効と思われる。このとき、S19-TAT を連続したまま S19 のN末側に積荷を連結することが重要。
- また、特定の細胞内疾患標的に対する細胞選択的なDDSの開発を企図している企業との共同研究を希望。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 融合タンパク質又は複合タンパク質、細胞内送達用担体、部分ペプチド、細胞膜透過促進剤、DNA、及びベクター
- 出願番号 : PCT/JP2016/066455
- 出願人 : 学校法人慶應義塾
- 発明者 : 須藤慧、新倉啓介、土居信英

JST 知財基盤強化支援(権利化支援)事業に採択

本技術に関する文献

Sudo, K., Niikura, K., Iwaki, K., Kohyama, S., Fujiwara, K., Doi, N.
Human-derived fusogenic peptides for the intracellular delivery of proteins.
J. Control. Release 255, 1–11 (2017)

土居信英:タンパク質の細胞質送達を促進するヒト由来膜融合ペプチド.
「医療・診断をささえるペプチド科学 – 再生医療・DDS・診断への応用 –」
シーエムシー出版 pp.232–238 (2017)

土居信英:ヒト由来膜融合ペプチドによるバイオ医薬のDDS.
細胞 49, 602–605 (2017)

土居信英:新規の膜透過促進ペプチドを利用した抗体医薬の細胞選択的
DDSに向けて.「ドラッグデリバリーシステム – バイオ医薬品創成に向けた
組織、細胞内、核内送達技術の開発 –」シーエムシー出版(印刷中)

お問い合わせ

慶應義塾大学
研究連携推進本部

URL <https://wwwdc01.adst.keio.ac.jp/kj/rcp/contact/index.html>

TEL 03-5427-1439

FAX 03-5440-0558

e-mail toiawasesaki-ipc@adst.keio.ac.jp