

2018年7月26日(木)
14:30~14:55

④

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

■ 新技術の概要

細胞融合に関与するヒトタンパク質から新規の膜透過促進ペプチドを同定した。このペプチドを連結したタンパク質はヒト培養細胞内に高効率で送達されることから、ヒト細胞内へのタンパク質導入を必要とする基礎研究やドラッグデリバリーシステムなどの応用研究に貢献することが期待できる。

■ 従来技術・競合技術との比較

これまでにタンパク質や核酸の細胞質送達に広く用いられていた TAT などの細胞透過性ペプチドと比較して、(1) 細胞質への送達効率が高く、(2) 医薬品に応用する場合、免疫原性の懸念が少なく、さらに、(3) 細胞選択性を付与しやすい、という点に優位性がある。

■ 新技術の特徴

- このペプチドは、タンパク質などの生体高分子を従来よりも数十倍効率よくヒト培養細胞内に導入できる。
- このペプチドはヒト由来なので、医薬品に応用する場合、異物として認識される恐れが少ない。
- このペプチド単独では細胞膜と強く相互作用しないので、細胞選択マーカーに結合する抗体やリガンドと組み合わせることで、将来的に細胞選択的 DDS への応用も期待できる。

■ 想定される用途

- 分子細胞生物学の基礎研究におけるタンパク質（抗体、ペプチド、転写因子など）の細胞内導入試薬
- 細胞質の疾患標的に対するバイオ医薬品（抗体、ペプチド、核酸など）の（細胞選択的）デリバリーシステム

新技術説明会

**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**

1

新技術説明会

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	リビトール(高脂血症)	リビトール(高脂血症)	ヒュミラ(関節リウマチ)
2	エボジェン(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	ブラビックス(抗血小板薬)	レミケード(関節リウマチ等)	ソバルディ(O型肝炎)
4	ゾコール(高脂血症)	ブラビックス(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)	アバステン(抗がん剤)	セレタイド(抗喘息薬)
7	タケブロン(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	ジブレキサ(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	メパロチン(高脂血症)	ヒュミラ(関節リウマチ)	ネクスアム(抗潰瘍剤)
10	ネクスアム(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

2

新技術説明会

**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

3

新技術説明会

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。

4

新技術説明会

膜透過性ペプチドの利用

従来の方法

タンパク質

細胞透過性ペプチド CPP
例: TAT (ウイルス由来)
ポリアルギニン

エンドサイトーシス CPPを介した取り込み

エンドソーム

エンドソームで分解

エンドソーム離脱効率が低い

今回の方法

タンパク質

膜融合ペプチド FP
CPP

例: GALA
HA2 (ウイルス由来)
B18 (ウニ由来)
S19 (ヒト由来)

エンドサイトーシス CPPを介した取り込み

ヒト由来FPを介した
エンドソーム離脱

5

新技術説明会

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するFPも膜透過促進活性を示すのでは？

eGFP B18 TAT

エンドソーム

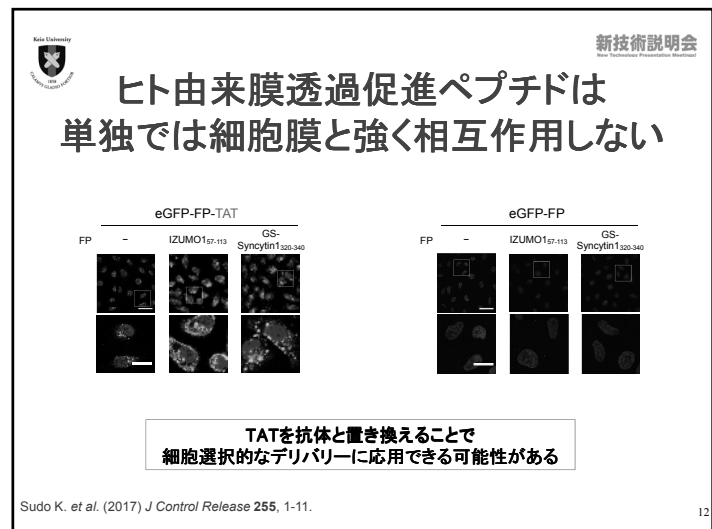
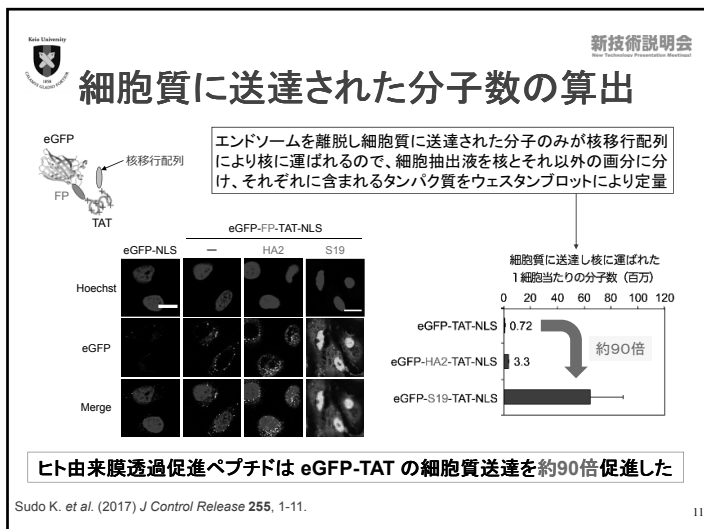
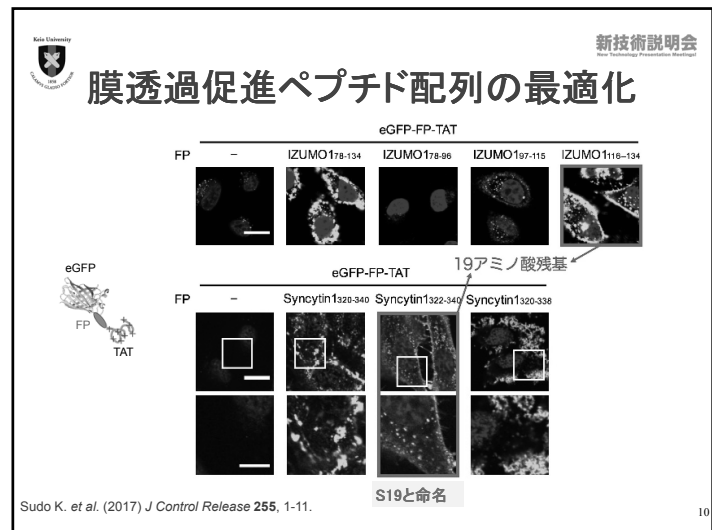
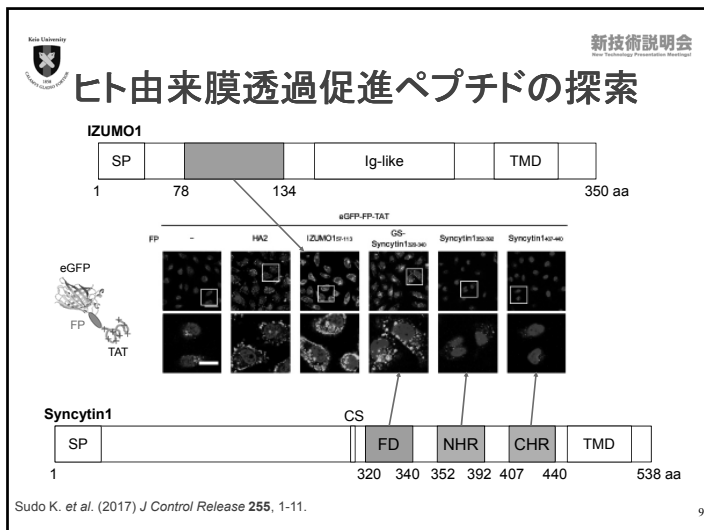
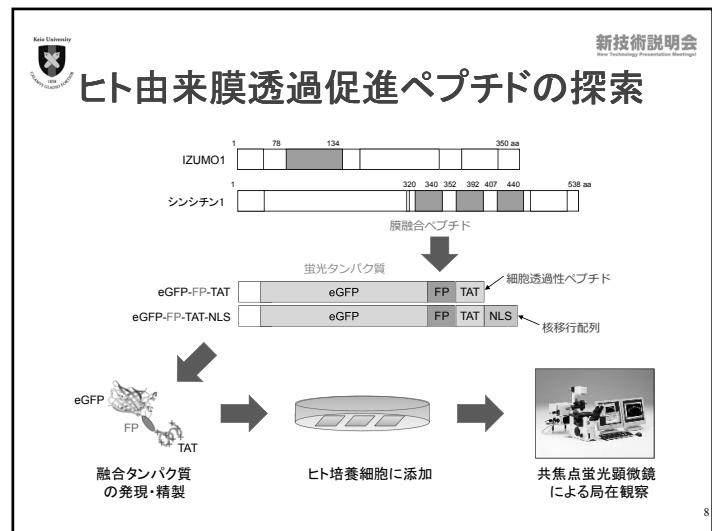
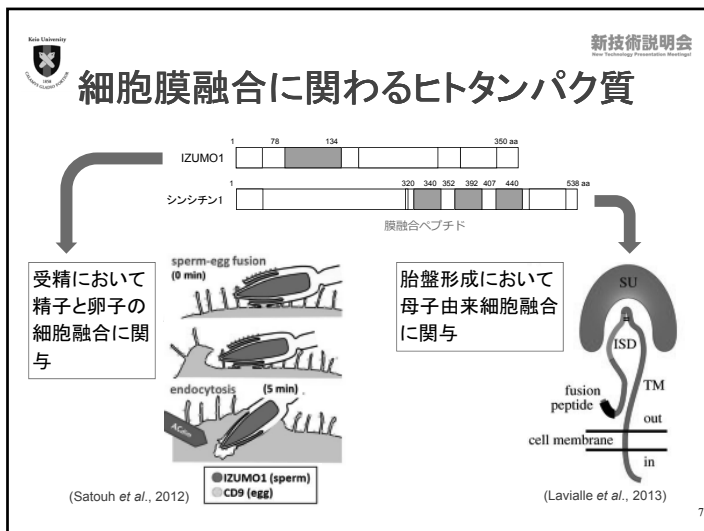
核

eGFP eGFP-TAT eGFP-B18-TAT

ウニの受精に関するタンパク質バインデ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

6



新技術説明会

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。

13

新技術説明会

汎用性の評価①

	子宮細胞由来 HeLa	表皮細胞由来 A431	肝臓細胞由来 HepG2	神経細胞由来 SK-N-SH
eGFP-TAT				
eGFP-S19-TAT				

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

14

新技術説明会

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

20 μm

蛍光色素
BG-DY505 + Hoechst

SNAP-TAT SNAP-S19-TAT

20 μm

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

15

新技術説明会

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

細胞生存率の相対値

eGFP-FP-TAT

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

16

新技術説明会

新聞記事

日本経済新聞 2016.12.26

薬効・低コスト両立
抗体から作製
大阪府大

患者への到達効率に課題

たんばく質細胞に送達
腫瘍大ペプチド付効効率十倍

化学工業日報 2017.4.10

日経産業新聞 2017.4.14

17

新技術説明会

抗体を利用した 細胞選択的デリバリーへの応用

膜抗原に対する完全抗体

薬物(小分子化合物)

抗体薬物複合体(ADC)

内部移行

膜抗原

リソソーム

抗体分解

疾患標的

エンドソーム

核

ヒト由来の膜透過促進ペプチド

バイオ医薬(ペプチド/細胞内抗体)

膜抗原に対する一本鎖抗体

内部移行

膜抗原

リソソーム

膜透過

疾患標的

エンドソーム

核

<従来技術>

<新技術の応用>

18



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。

19



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ど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。

20



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。

21



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

22



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)

23



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

24