

# 腫瘍組織内環境を標的とした低 pH 環境応答型薬物輸送 ペプチドライブラリの構築と応用研究

鳥取大学 農学部 生物資源環境学科 生体制御化学分野  
岩崎 崇

## 1. 背景・目的

細胞膜透過ペプチドは、タンパク質や核酸を細胞内へ導入するためのツールとして、現在広く使用されている。細胞膜透過ペプチドの共通の特徴として、塩基性アミノ酸のアルギニン(R)(側鎖 $pK_a=12.5$ )を豊富に含むことが知られており、その代表例としてオクタアルギニン(R<sub>8</sub>:RRRRRRRR-NH<sub>2</sub>)が挙げられる。R残基は生理的条件下で正電荷を帯びるため、R<sub>8</sub>は正電荷に富む。この高い正電荷密度が、効率的な細胞内取込みに重要であることが知られている<sup>1)</sup>。そこで本研究では、低pH(pH6.0付近)限定的に正電荷を帯びるヒスチジン(H)(側鎖 $pK_a=6.0$ )に着目した。R残基とH残基のハイブリッドペプチドは、pH6.0～生理的条件下の間で正電荷が急激な上昇を示す。この現象を利用して、低pH限定的に正電荷を帯び、細胞膜を透過する「低pH応答型RHハイブリッドペプチド」の開発が可能であると考えられた。腫瘍組織内部は低pH環境(pH6.0～6.9)が特異的に形成されていることから、上記ハイブリッドペプチドの開発を通じて、腫瘍組織特異的な薬物輸送技術の開発に挑戦した。

## 2. 方法

### 2.1 ペプチド合成

異なる数のアルギニン残基とヒスチジン残基を含んだRHハイブリッドペプチドまたはオリゴヒスチジンペプチドを化学合成し、C末端をアミド化修飾、N末端をTetramethyl rhodamine(TAMRA)蛍光色素で標識した(Table 1, 2)。

### 2.2 細胞培養

本研究では、ヒト肝臓癌細胞:HepG2(理研細胞バンク:RBC1648)を用いた。細胞培養には、10%FBS(ウシ胎児血清)および抗生物質(100  $\mu$ g/ml/ ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリン、250ng/ml アンフォテリシン)を含有したD-MEM培地(1.0g/l glucose)を用いて、CO<sub>2</sub>濃度5.0%、37°Cの条件で培養を行った。

### 2.3 フローサイトメトリー

pH6.0とpH7.4の二つの条件下において、RHハイブリッドペプチドまたはオリゴヒスチジンペプチドの細胞内取り込みをフローサイトメーターにより定量した。HepG2細胞を、6wellマルチプレートに $5.0 \times 10^5$  cells/well(9.6cm<sup>2</sup>)の細胞密度になるように播種し、10  $\mu$  Mの各ペプチドを含んだ細胞培地(HClまたはNaOHを用いてpH6.0またはpH7.4に調整済み)中で、24時間、37°C、5.0%CO<sub>2</sub>濃度の条件でインキュベートした。その後、細胞培地を除去し、10mMリン酸緩衝液にて細胞を洗浄後、0.05%トリプシン(0.53mM

EDTA含有)によって細胞をプレートから剥離させた。細胞を遠心分離機にて500g x 5分の条件で回収し、500  $\mu$  lのフローサイトメトリー用緩衝液(2%FBSを含んだ10mMリン酸緩衝液)で懸濁した後に、フローサイトメーターにて細胞内蛍光(TAMRA由来赤色蛍光)強度を測定した。各ペプチドで処理した細胞集団(2.0x10<sup>4</sup> cells)のMean Fluorescence Intensity (MFI)を指標とすることで、各ペプチドの細胞膜透過効率を評価した。

### 3. 結果

#### 3.1 RHハイブリッドペプチドの細胞膜透過効率の解析

本研究で合成した全てのRHハイブリッドペプチドを用いて、pH6.0とpH7.4の両条件におけるHepG2細胞株に対する細胞膜透過効率の評価を行った。その結果、全てのRHハイブリッドペプチドに関して、pH条件の変化に伴う細胞膜透過効率の顕著な変化(上昇)は認められなかった。しかしながら、その一方で、既知の細胞膜透過ペプチドであるオクタアルギニン(R8)との比較を行ってみると、pH6.0およびpH7.4の両条件において、ヒスチジンのみで構成されたH16が極めて高い細胞膜透過効率を示すことが明らかとなった。R8に対するH16の相対的な細胞膜透過効率は、pH6.0条件下で5.95倍、pH7.4条件下で5.55倍であった(Fig.1)。

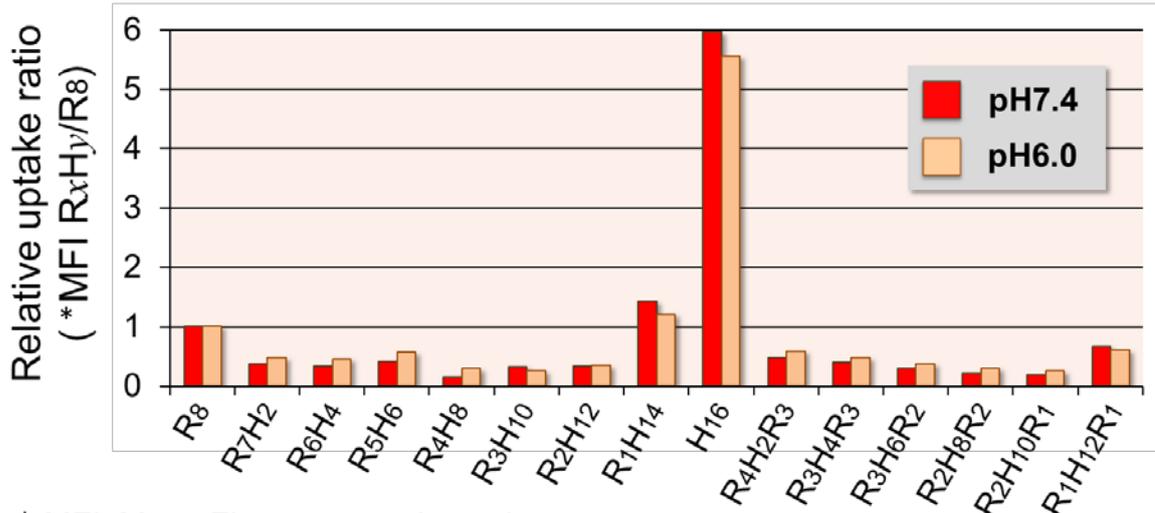
**Table 1. 本研究で用いたRHハイブリッドペプチド(RxHy)**

Peptide	Sequence	* Net charge	
		pH7.4	pH6.0
R8	** TAMRA-RRRRRRRR-NH <sub>2</sub>	+9	+9
R7H2	TAMRA-RRRRRRRHH-NH <sub>2</sub>	+8	+9
R6H4	TAMRA-RRRRRRHHHH-NH <sub>2</sub>	+7	+9
R5H6	TAMRA-RRRRRHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+6	+9
R4H8	TAMRA-RRRRHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+5	+9
R3H10	TAMRA-RRRHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+4	+9
R2H12	TAMRA-RRHHHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+3	+9
R1H14	TAMRA-RHHHHHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+2	+9
H16	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+9
R4H2R3	TAMRA-RRRRHHRRR-NH <sub>2</sub>	+8	+9
R3H4R3	TAMRA-RRRHHHHRRR-NH <sub>2</sub>	+7	+9
R3H6R2	TAMRA-RRRHHHHHRR-NH <sub>2</sub>	+6	+9
R2H8R2	TAMRA-RRHHHHHHHRR-NH <sub>2</sub>	+5	+9
R2H10R1	TAMRA-RRHHHHHHHHR-NH <sub>2</sub>	+4	+9
R1H12R1	TAMRA-RHHHHHHHHHHR-NH <sub>2</sub>	+3	+9

\* Net charge; ペプチドの総電荷

\*\* TAMRA; 赤色蛍光色素 Tetramethyl rhodamine

**Fig.1 R8に対するRHハイブリッドペプチド(RxHy)の相対的細胞膜透過効率**



\* MFI; Mean Fluorescence Intensity

### 3.2 オリゴヒスチジンの細胞膜透過効率の解析

様々なRHハイブリッドペプチドの中で、唯一ヒスチジンのみで構成されたH16が極めて高い細胞膜透過効率を示したことから、様々な鎖長のオリゴヒスチジン(ヒスチジンのみが連続したペプチド配列)を化学合成し、ヒスチジン残基数と細胞膜透過効率の関連性を解析した。ヒスチジンが6残基連続したH6から24残基連続したH24までのオリゴヒスチジン(N末端TAMRA標識、C末端アミド化)を用いて、フローサイトメーターによりpH6.0とpH7.4の両条件下におけるHepG2細胞株に対する細胞膜透過効率の評価を行った。その結果、ヒスチジンが12残基連続したH12において顕著な細胞膜透過(R8と同等もしくはそれ以上の細胞膜透過効率)が観察され、H16において細胞膜透過効率はピークを迎えた。H16からH24においてはほぼ同等の高い細胞膜透過効率が観察された(Fig.2)。

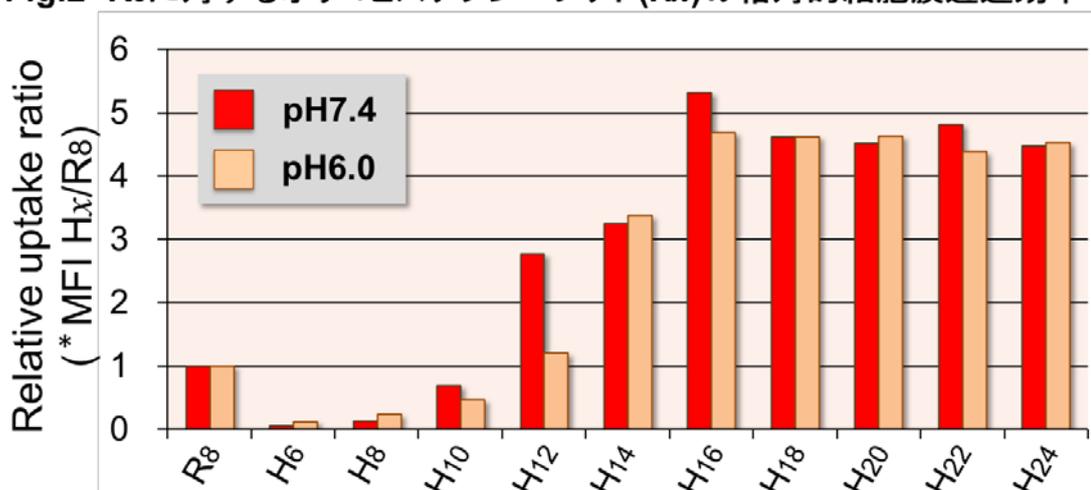
**Table 2. 本研究で用いたオリゴヒスチジンペプチド(Hx)**

Peptide	Sequence	* Net charge	
		pH7.4	pH6.0
H6	** TAMRA-HHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+4
H8	TAMRA-HHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+5
H10	TAMRA-HHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+6
H12	TAMRA-HHHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+7
H14	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+8
H16	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+9
H18	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+10
H20	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+11
H22	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+12
H24	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-NH <sub>2</sub>	+1	+13

\* Net charge; ペプチドの総電荷

\*\* TAMRA; 赤色蛍光色素 Tetramethyl rhodamine

Fig.2 R8に対するオリゴヒスチジンペプチド(Hx)の相対的細胞膜透過効率



\* MFI; Mean Fluorescence Intensity

#### 4. 考察

本研究では、既存の細胞膜透過ペプチドであるオクタアルギニン(R8)の一部をヒスチジン残基へ置換することで、低pH限定的に高い正電荷を帯びるRHハイブリッドペプチドを合成し、低pH選択的な細胞膜透過の制御を試みた。しかしながら、本研究で合成した何れのRHハイブリッドペプチドも低pH(pH6.0)選択的な細胞膜透過を示すに至らなかった(Fig.1)。しかしその一方で、我々の予想とは異なり、ヒスチジンのみが連続したオリゴヒスチジン(特に、H16以上の長鎖ペプチド)が、R8よりも高い細胞膜透過効率を示すことが発見された(Fig.2)。ヒスチジンのみで構成されるペプチドが細胞膜を透過することはこれまでに全く知られていなかったことから、本研究により得られた知見は極めて新規性が高く、かつ学術的に非常に興味深いものであると言える。

まず、オリゴヒスチジンの細胞膜透過は、既存の細胞膜透過ペプチドの細胞膜透過メカニズムでは説明できない点が大変興味深い。既存の細胞膜透過ペプチドはアルギニンやリジンの正電荷に依存した細胞膜透過メカニズムを有するのに対して、オリゴヒスチジンはヒスチジンが正電荷を帯びないpH条件(pH7.4)においても、正電荷を帯びるpH条件(pH6.0)においても、ほぼ同等の高い細胞膜透過効率を示した。この事実は、既知の正電荷依存的な細胞膜透過メカニズムとは異なる、新たなメカニズムがオリゴヒスチジンの細胞膜透過に関与している可能性を示唆している。現段階の研究結果のみではオリゴヒスチジンの細胞膜透過メカニズムに迫ることはできないが、今後、オリゴヒスチジンの細胞膜透過メカニズムを解明していく上で、細胞膜透過ペプチドの新知見の発見につながることを期待される。

以上のように、本研究より得られた成果は、学術的に大変意義深いものであると同時に、多数の課題点を我々に明示した。今後は、これらの研究課題を一つ一つ解決・解明していくことで、オリゴヒスチジンから得られる知見を学術的・社会的に還元していきたいと考えている。

#### 5. 参考文献

1. Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y. (2001) Arginine-rich Peptides. *J. Biol. Chem.* **276**: 5836-5840.