

様式第 1 号

論文内容要旨

Helix-Stabilized Cell-Penetrating Peptides for Delivery of
Antisense Morpholino Oligomers: Relationships among
Helicity, Cellular Uptake, and Antisense Activity

学位申請者氏名：高田 浩行
研究指導教員：出水 庸介

1. 序

ペプチドフォルダマーとはヘリックス構造など特定の二次構造を形成するオリゴペプチドの総称で、ペプチドの二次構造は標的タンパクへの結合親和性や細胞内移行性、プロテアーゼ耐性など種々の性質に影響する¹。HIV-1 の転写制御タンパクに由来する TAT ペプチドやアルギニン残基が連続したオリゴアルギニンペプチドは細胞膜を透過する性質を有することから膜透過性ペプチドと呼ばれるが、この膜透過性ペプチドの分子設計においても化学修飾による二次構造の制御が盛んに試みられている²。例えば、山下・出水らはオリゴアルギニンペプチドに α,α -ジ置換アミノ酸を導入したペプチドが安定なヘリックス構造を形成し、ランダムコイル型のペプチドに比べて高い細胞内取り込み量を示すことを報告している³。

膜透過性ペプチドは、近年注目を集めている抗体や核酸といった細胞膜透過性の低い高分子医薬品のデリバリーツールとして期待されており、例えば、アンチセンス核酸¹の一種であるモルフォリノ核酸² (PMO) においては膜透過性ペプチドとのコンジュゲート化合物 (peptide-conjugated PMO, PPMO³) の開発がこれまで精力的に進められてきた。2004 年に Moulton らがノナルギニン (R9) ペプチドを結合させた PPMO が未修飾の PMO に比べて高い細胞内取り込み量とアンチセンス活性を示すことを報告して以来、複数の研究グループがペプチド構造の最適化により更なる活性の向上を達成している⁴。しかしながら、この PPMO の開発において二次構造を制御したペプチドフォルダマーが活用された例はほとんど報告されておらず、ペプチドの二次構造が PPMO の細胞内動態やアンチセンス活性に与える影響については良く知られていない。そこで私は、高活性の新規アンチセンス核酸医薬品の開発を目指して、 α,α -ジ置換アミノ酸を導入したヘリックス型膜透過性ペプチドと対応する PPMO を合成し、その機能評価を行なった (Figure 1)。

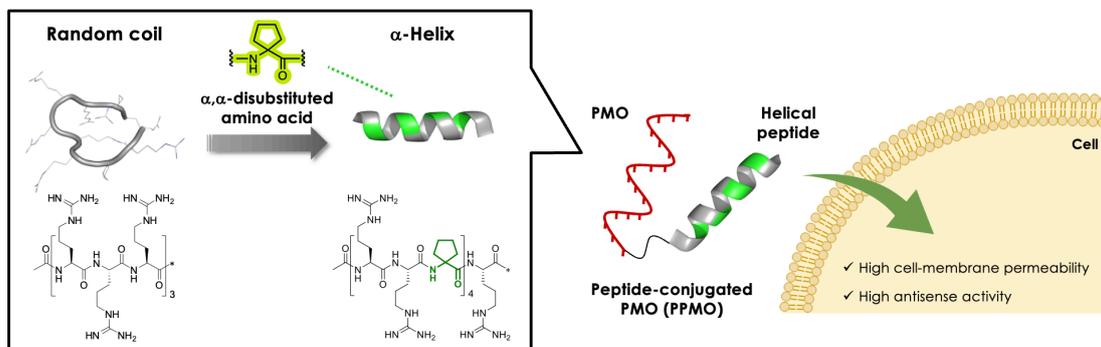


Figure 1. ヘリックス型膜透過性ペプチドの設計と PPMO への適用

2. 実験方法

ペプチドの合成: Biotage Syro I 合成機を用いてペプチド固相合成法によりペプチドを合成した。樹脂は NovaPEG Rink Amide resin、縮合剤は HBTU-HOBt、塩基は DIPEA、脱保護試薬はピペリジンを使用し、Fmoc 法によりペプチド鎖を伸長した。伸長したオリゴペプチドの N 末端のアミノ基は無水酢酸を用いてアセチル化した。固相担体からの切り出し、脱保護により得られた粗ペプチドを逆相 HPLC により精製した。得られたペプチドの純度測定および質量分析は

HPLC、LC-MS を用いて行なった。

ペプチド-核酸コンジュゲートの合成: 5'末端にアルキン基が修飾された PMO (5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA-3') を Gene Tools 社より購入した。PMO およびペプチドを水-DMSO 溶媒に溶解し、硫酸銅(II)、アスコルビン酸ナトリウム、TBTA を添加して銅触媒下アジド-アルキン環化付加反応によりコンジュゲート体を合成した。反応液を陽イオン交換クロマトグラフィーで精製し、濃縮、脱塩後に高純度の PPMO を得た。得られた PPMO の純度測定および質量分析は LC-MS を用いて行なった。

CD スペクトル分析: 円二色性 (Circular Dichroism, CD) スペクトルの測定により、ペプチドの二次構造を分析した。ペプチドを 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) に 100 μ M の濃度で溶かし、JASCO CD spectrometer を用いて 37°C で CD スペクトルを測定した。

アンチセンス活性の評価: ノースカロライナ大学より購入した HeLa pLuc705 細胞を 10% FBS、200 U/mL ペニシリン、200 μ g/mL ストレプトマイシン、100 μ g/mL ハイグロマイシンを含む DMEM 培地中で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。培養した細胞を 30,000 cells/well の密度で 48 ウェルプレートに播種し、24 時間後に培地を取り除いて PPMO を含む OptiMEM 培地を添加した。37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベーションした後に、Glo Lysis Buffer を用いて細胞溶解液を調製し、遠心後に上澄み液と luciferase assay reagent を混合させルミノメーターで発光強度を測定した。試料中のタンパク量を BCA 法により定量し、発光強度をタンパク量で補正することによりアンチセンス活性を算出した。

細胞内取り込み量の評価: HeLa pLuc705 細胞を 100,000 cells/well の密度で 24 ウェルプレートに播種し、24 時間後に培地を取り除いて PPMO を含む OptiMEM 培地を添加した。37°C、5% CO₂ 条件下で 2-24 時間インキュベーションした後に、培地を取り除き、20 U/mL ヘパリンを含むリン酸塩緩衝液で細胞表面を洗浄し、トリプシンを用いて細胞を剥離した。得られた細胞懸濁液をフローサイトメーターに注入し、細胞内の蛍光強度を測定した。

共焦点レーザー顕微鏡観察: HeLa pLuc705 細胞を 20,000 cells/well の密度でガラスボトムディッシュに播種し、24 時間後に培地を取り除いて PPMO を含む OptiMEM 培地を添加した。37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間インキュベーションした後に、培地を取り除き、Hoechst 33342 および LysoTracker Red を含む OptiMEM 培地を添加して核およびエンドソーム・ライソソームを染色した。得られた細胞を共焦点レーザー顕微鏡 Nikon A1 を用いて観察した。

3. 研究結果

1) 膜透過性ペプチドフォルダマーの二次構造解析、および、PPMO のアンチセンス活性評価

R9 ペプチド **2a** に種々の α,α -ジ置換アミノ酸 (X^1-X^4) を 4 残基導入したペプチド **3a-6a** を合成し、CD スペクトル測定により二次構造を解析した (**Figure 2**)。R9 ペプチド **2a** がランダムコイル構造に特徴的な 196 nm 付近の負の極大を示すのに対し、 X^1 =Aib を有する **3a** は 203 nm および 225 nm 付近に負の極大を示し、期待した通り α -ヘリックス構造に特徴的な CD スペクトルを示した。さらに、環状 α,α -ジ置換アミノ酸 Ac₄c、Ac₅c、Ac₆c を有する **4a-6a** は、208 nm および 223 nm 付近に **3a** より大きな負の極大を示した。このことから、**4a-6a** はより安定なヘリッ

クス構造を形成しているものと考えられる。

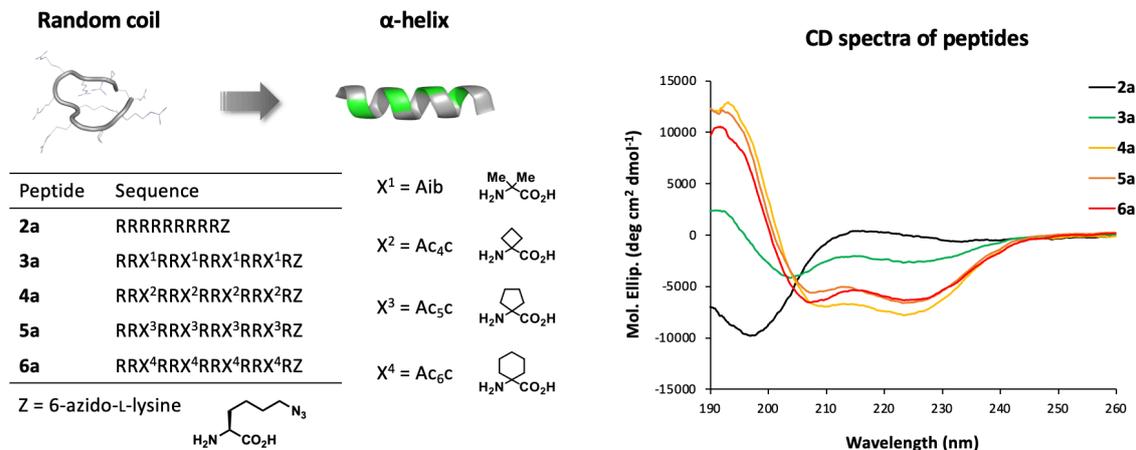


Figure 2. R9 ペプチド **2a** および α,α -ジ置換アミノ酸を導入したペプチド **3a-6a** の CD スペクトル (Takada, H. *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33*, 1311-1318.)

次に、これらのペプチドと PMO のコンジュゲート化合物 PPMO **2-6** のアンチセンス活性を HeLa pLuc705 細胞を用いて評価した。HeLa pLuc705 細胞はルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドベクターが導入されているが、ルシフェラーゼ遺伝子中に変異配列が挿入されているために異常なスプライシングが誘発され、正常なルシフェラーゼタンパクの発現が阻害されている⁵ (Figure 3)。この変異配列に相補的なアンチセンス核酸を作用させると、スプライシングが正常化されルシフェラーゼタンパクの発現が回復する。そこで、PPMO **2-6** を HeLa pLuc705 細胞に添加し、正常に発現したルシフェラーゼによる発光強度を測定することで PPMO のアンチセンス活性を評価した (Figure 4)。Moulton らの報告通り、未修飾の PMO **1** がほとんど活性を示さないのに対し、R9 コンジュゲート **2** は濃度依存的に高いアンチセンス活性を示した。さらに、ヘリックス型ペプチド **3a-6a** を有する PPMO **3-6** は、R9 コンジュゲート **2** よりも高いアンチセンス活性を示した。中でも、環状 α,α -ジ置換アミノ酸 Ac₅C を導入した PPMO **5** が最も高いアンチセンス活性を有することが分かった。

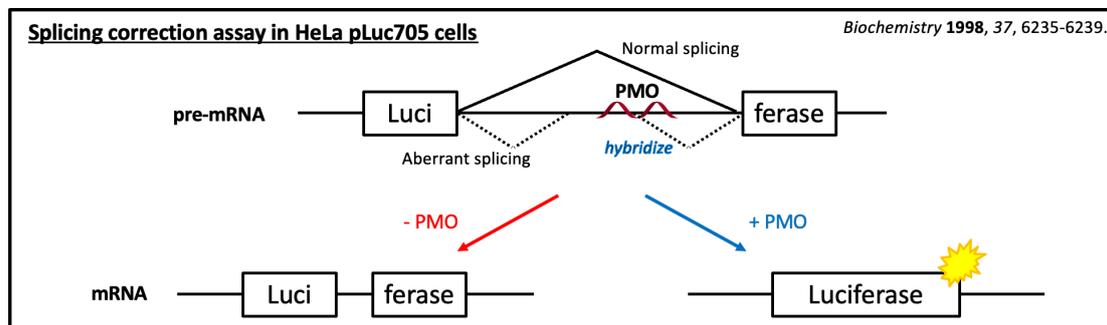


Figure 3. HeLa pLuc705 細胞を用いたアンチセンス活性評価の模式図

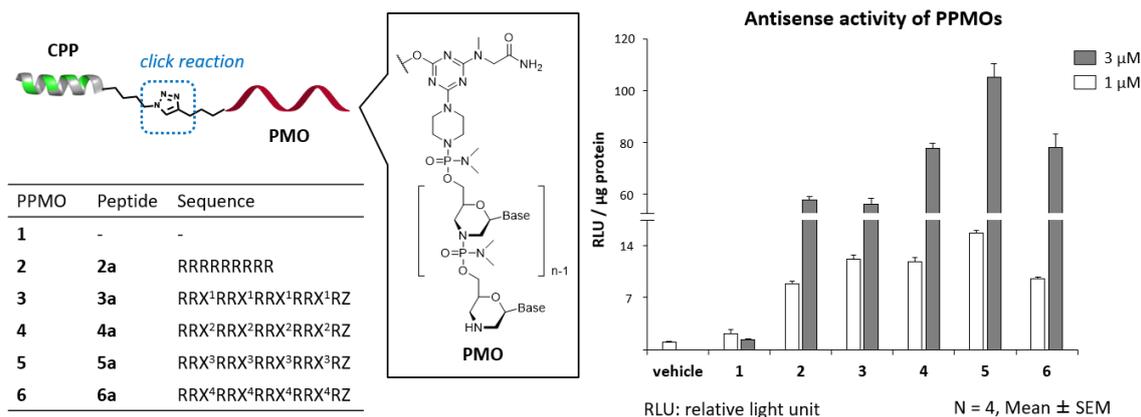


Figure 4. R9 ペプチドおよびヘリックス型ペプチドから成る PPMO 2-6 のアンチセンス活性 (Takada, H. *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2022, 33, 1311-1318.)

2) ペプチドの二次構造と細胞内取り込み量およびアンチセンス活性の相関関係

ヘリックス型ペプチド **3a-6a** は α,α -ジ置換アミノ酸の導入により R9 ペプチド **2a** と比べて疎水性が向上していることから、PPMO **3-6** で見られた活性の向上はヘリックス構造の安定化によるものではなく疎水性の向上に起因している可能性が考えられる。従って、ペプチドの二次構造とアンチセンス活性の相関を精査するには、疎水性を維持しながら異なるヘリシティを有するペプチドを用いて比較する必要がある。

ペプチド **5a** は右巻きのヘリックス構造を形成しているが、これは **5a** が右巻きの指向性を有する L 体アルギニンと、アキラルな α,α -ジ置換アミノ酸によって構成されているためである。従って、L 体アルギニンを D 体アルギニンに置換すると左巻きヘリックスの形成が誘導され、また、L 体および D 体アルギニンを混合させた場合は右巻き指向性と左巻き指向性が打ち消し合うことによりヘリックス構造が不安定化すると予想される。そこで、同じ元素組成を有しながら異なるヘリシティを有するペプチドとして、**5a** の L 体アルギニン残基の一部あるいは全てを D 体アルギニンに置換した **7a** および **8a** を合成した (Figure 5)。また、細胞内取り込み量を評価するためにこれらの N 末端を蛍光色素のフルオレセインで修飾した **5a-F**、**7a-F**、および **8a-F** を合成した。得られたペプチドの二次構造を CD スペクトル測定により解析した結果、**5a-F** が **5a** 同様に右巻きヘリックス構造を形成するのに対し、L 体および D 体アルギニンから構成される **7a-F** においては予想通りシグナル強度が大きく減弱し、ヘリシティの低下が認められた。D 体アルギニンのみで構成される **8a-F** は 208 nm および 223 nm 付近に正の極大を示し、左巻きヘリックス構造の形成が確認された。但し、**8a-F** のシグナル強度は **5a-F** に比べて若干低下しており、これは **8a-F** が C 末端に L 体の 6-azido-L-lysine を含むためだと考えられる。また、これらのペプチドを逆相 HPLC で分析した結果、いずれのペプチドも同程度の保持時間を示したことから、**7a-F** および **8a-F** は期待通り **5a-F** と同等の疎水性を有することが分かった。

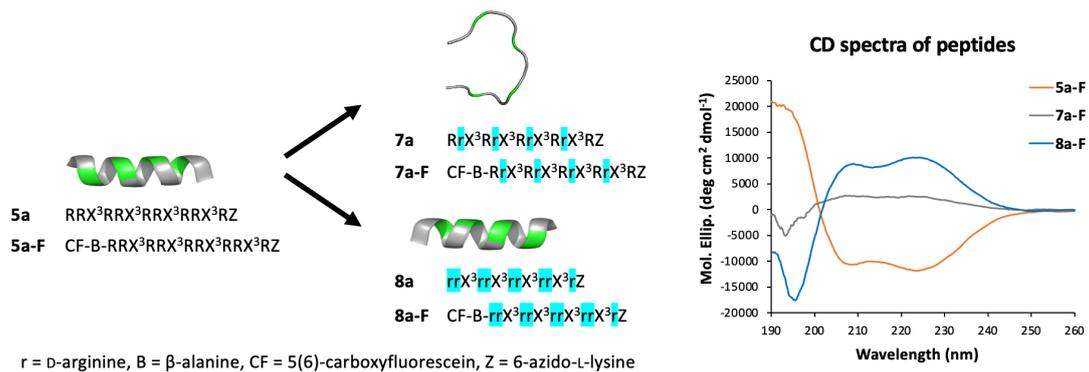


Figure 5. ペプチド **5a** の立体異性体 **7a** および **8a** の設計、および、CD スペクトル測定結果 (Takada, H. *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33*, 1311-1318.)

蛍光ペプチド **5a-F**、**7a-F**、および **8a-F** を用いて合成した PPMO **5-F**、**7-F**、および **8-F** の細胞内取り込み量をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、ヘリックス型ペプチドを有するコンジュゲート **5-F** および **8-F** は、非ヘリックス型ペプチドから成る **7-F** に比べて高い細胞内取り込み量を示した (**Figure 6a**)。この結果から、ペプチドのヘリックス構造を安定化させることにより、PPMO の細胞内取り込み量が向上することが明らかとなった。**5-F** は **8-F** よりも更に高い細胞内取り込み量を示したが、これには **5a-F** のヘリシティが **8a-F** よりも高いことが影響している可能性が考えられる。次に、**5a**、**7a**、および **8a** を用いて合成した PPMO **5**、**7**、および **8** のアンチセンス活性を比較したところ、細胞内取り込み量とは相関せず、これらの PPMO がほぼ同等のアンチセンス活性を示すことが分かった (**Figure 6b**)。

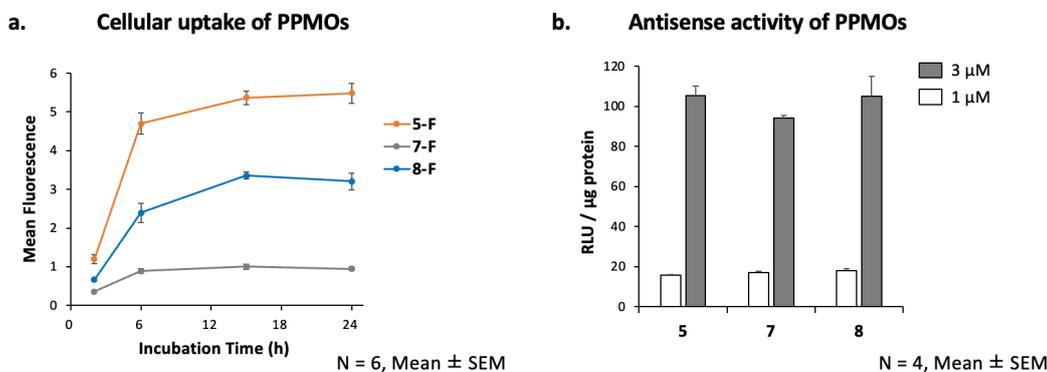


Figure 6. PPMO **5-F**、**7-F**、**8-F** の細胞内取り込み量、および、PPMO **5**、**7**、**8** のアンチセンス活性 (Takada, H. *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33*, 1311-1318.)

3) 細胞内取り込み量の向上とエンドソーム脱出促進によるアンチセンス活性への相乗効果

PPMO **5**、**7** および **8** のアンチセンス活性が細胞内取り込み量と相関しない原因としては、細胞内に取り込まれた後の細胞内局在の影響が考えられる。アルギニンを含む膜透過性ペプチドから成る PPMO は、エンドサイトーシス⁴によって細胞内に取り込まれることが報告されている⁶⁻⁹。従って、細胞内に取り込まれた PPMO が標的の pre-mRNA に作用する為には、エンドソームから脱出し核内へと移行する必要がある。実際に PPMO **5-F** を処置した HeLa pLuc705

細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、**5-F** のフルオレセイン由来の蛍光シグナルは細胞内で粒子状に広がっており、また、エンドソーム・ライソゾームマーカーである LysoTracker と共局在していることから、細胞内に取り込まれた **5-F** の大部分はエンドソームあるいはライソゾーム内に留まり核に到達していないことが示唆された (Figure 7)。

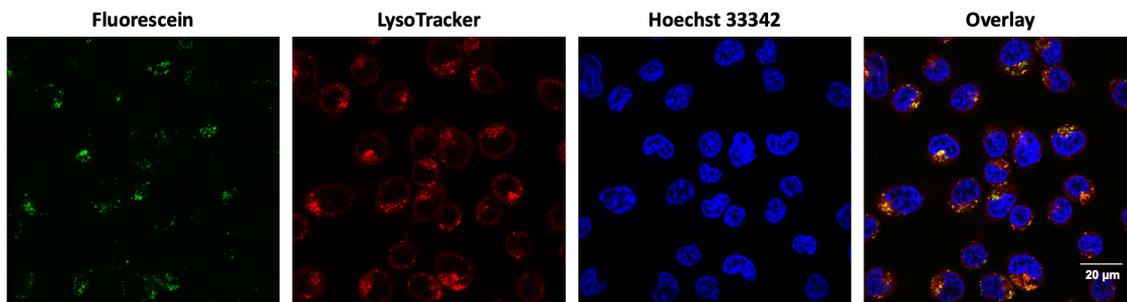


Figure 7. PPMO **5-F** および染色試薬で処置した HeLa pLuc705 細胞の顕微鏡観察像 (Takada, H. *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2022, 33, 1311-1318.)

そこで、エンドソーム脱出を促進させる効果のあるクロロキンを共添加した条件で PPMO **5**、**7**、および **8** のアンチセンス活性を評価したところ、クロロキン非存在下に比べて全ての PPMO において活性の向上が見られたが、中でもヘリックス型ペプチドから成る PPMO **5** および **8** は PPMO **7** に比べて高いアンチセンス活性を示した (Figure 8a)。この結果から、ヘリックス構造の安定化による細胞内取り込み量の向上と、エンドソーム脱出効率の向上による相乗効果が示唆された。最後に、PPMO **8** の N 末端にエンドソーム脱出を促進することで知られる疎水性の GFWFG 配列¹⁰を導入した PPMO **9** を合成したところ、元の PPMO **8** に比べて顕著に高いアンチセンス活性を示した (Figure 8b)。

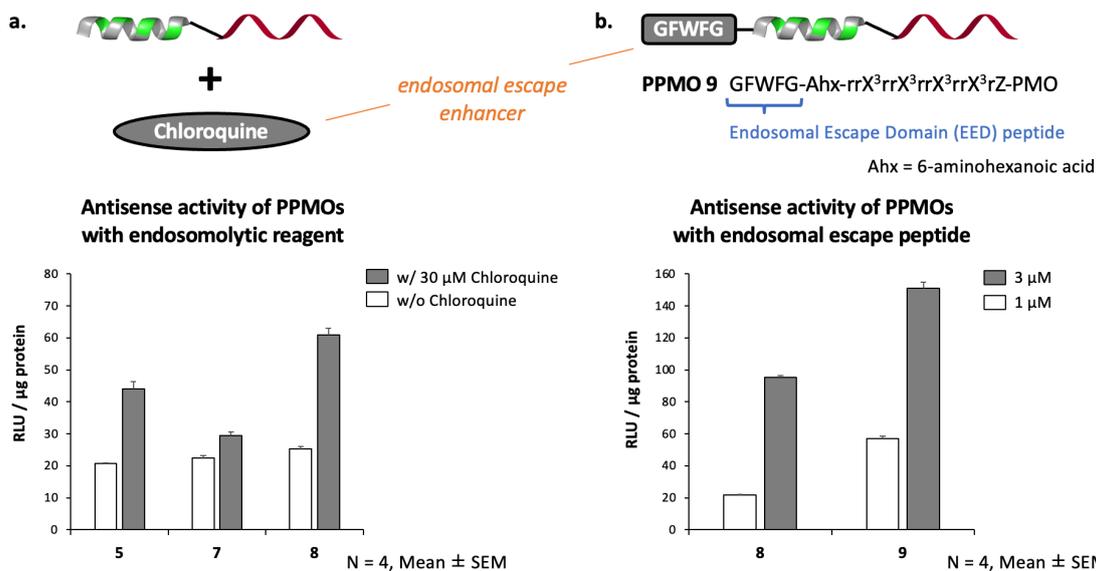


Figure 8. エンドソーム脱出を促進させた条件下におけるアンチセンス活性の評価 (Takada, H. *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2022, 33, 1311-1318.)

4. 討論

本研究では、ヘリックス型膜透過性ペプチドフォルダマーから成る PPMO を合成し、ペプチドの二次構造と PPMO の細胞内取り込み量およびアンチセンス活性の相関関係を精査した。ヘリックス型ペプチドを有する PPMO **5-F** および **8-F** が非ヘリックス型ペプチドから成る PPMO **7-F** よりも高い細胞内取り込み量を示したことから、ペプチドのヘリックス構造を安定化させることにより PPMO の細胞内移行性が向上することが明らかとなった。アルギニンを含むペプチド（以下、アルギニンペプチド）は、アルギニン側鎖のグアニジノ基が細胞表面のプロテオグリカンやリン脂質に結合し、エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれることが知られている¹¹。山下・出水らが開発したオリゴアルギニンに Aib が挿入されたヘリックス型アルギニンペプチドもエンドサイトーシス、主にマクロピノサイトーシスを介して細胞内に移行することが分かっている³。また、分子量が数千を超えるようなオリゴペプチドやオリゴ核酸が低分子化合物のように細胞膜を直接透過することは困難であり¹²、PMO やアルギニンペプチドから成る PPMO もエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが先行研究より明らかとなっている^{6,9,13}。したがって、本研究で用いた PPMO も同様にエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれているものと考えられる。実際に、PPMO **5-F** や **7-F** を処置した細胞の顕微鏡画像においては PPMO 由来の蛍光シグナルが細胞内に粒子状に分布しており、エンドソームに PPMO が内包されていることが示唆されている。つまり、ヘリックス型ペプチドから成る PPMO **5-F** および **8-F** の細胞内取り込み量の向上はエンドサイトーシスによる取り込みが促進したこと起因すると考えられるが、この原因の一つとしてペプチドと細胞表面の結合親和性が関与している可能性がある。Amand らは膜透過性ペプチドの細胞内移行性が、ペプチドとプロテオグリカンの一種であるヘパラン硫酸、および、ペプチドと細胞表面の結合親和性に相関することを報告しており¹⁴、また、Abes らは PPMO においてもヘパラン硫酸との結合親和性の向上に伴って細胞内取り込み量が増加することを報告している^{6,15}。薬物分子の設計においては標的分子との結合親和性を向上させるために分子のコンフォメーションを制御し結合に伴うエントロピーの減少を抑制するといった手法が用いられるが、カチオン性膜透過性ペプチドの分子設計においても Nagel・Raschle らがヘリックス構造を安定化させることによりヘパラン硫酸との結合親和性および細胞内取り込み量が向上することを報告している¹⁶。以上のことから、PPMO **5-F** および **8-F** においてもヘリックス構造の安定化によって細胞表面との結合親和性が向上し、その結果エンドサイトーシスを介した細胞内への取り込みが促進した可能性が考えられる。

ヘリックス構造の安定化により細胞内取り込み量が向上した一方で、PPMO **5** および **8** のアンチセンス活性は PPMO **7** と同等であったことから、アンチセンス活性の向上には細胞内取り込み量を向上させるのみでは不十分であり、細胞内に取り込まれた後のエンドソームからの脱出効率を向上させることが必要であると考えられる。実際に、エンドソーム脱出を促進させるクロロキンを添加した条件においては、PPMO **5** が PPMO **7** に比べて細胞内取り込み量と同様に高いアンチセンス活性を示した。またこの時、PPMO **8** は PPMO **5** よりも更に高いアンチセンス活性を示した。連続した L 体アルギニン残基を有するペプチドは細胞内で速やかにペプチダーゼによって分解されることが知られているが¹⁷、PPMO **8** は非天然型の D 体アルギニンで構

成されているためペプチダーゼに対して高い分解耐性を有すると考えられる。つまり、PPMO 8 が高いアンチセンス活性を示したことから、分解されずに残ったペプチド部分がエンドソーム脱出や核内への移行、標的 RNA への結合、スプライシングの制御といった工程においてアンチセンス活性を向上させる方向に作用している可能性が示唆された。以上の結果から、今後更に高活性の PPMO を探索するにあたっては、1) ヘリックス構造の安定化により細胞内移行性を向上させ、2) 疎水性残基の導入によりエンドソーム脱出効率を向上させ、3) 非天然型アミノ酸の活用により分解耐性を向上させる、といったペプチドの分子設計戦略が有効であると考えられる。

5. まとめ

- 1) R9 ペプチド **2a** に α,α -ジ置換アミノ酸を導入したペプチド **3a-6a** は安定なヘリックス構造を形成し、PMO とのコンジュゲート化合物 **3-6** は R9 コンジュゲート **2** よりも高いアンチセンス活性を示した。
- 2) ヘリックス型ペプチドから成る PPMO **5-F** および **8-F** は、非ヘリックス型ペプチドから成る PPMO **7-F** に比べて高い細胞内移行性を示した。一方で、PPMO **5** および **8** と PPMO **7** のアンチセンス活性は同等であった。
- 3) エンドソーム脱出を促進させた条件下においては、PPMO **5** および **8** はその高い細胞内取り込み量と相関して、PPMO **7** よりも高いアンチセンス活性を示した。

6. 論文リスト

主論文

Hiroyuki Takada, Keisuke Tsuchiya, Yosuke Demizu; Helix-Stabilized Cell-Penetrating Peptides for Delivery of Antisense Morpholino Oligomers: Relationships among Helicity, Cellular Uptake, and Antisense Activity. *Bioconjugate Chemistry*, 33, 1311-1318 (2022).

参考論文

- 1) Masaaki Komatsuda, Ayane Suto, Hiroki Kondo, Jr, Hiroyuki Takada, Kenta Kato, Bunnai Saito, Junichiro Yamaguchi; Ring-opening fluorination of bicyclic azaarenes. *Chemical Science*, 13, 665-670 (2022).
- 2) Hiroyuki Takada, Akira Kaieda, Michiko Tawada, Tomoko Nagino, Katsunori Sasa, Tatsuo Oikawa, Akiko Oki, Tomoya Sameshima, Kazumasa Miyamoto, Makoto Miyamoto, Yuko Kokubu, Ryuichi Tozawa, Hidetoshi Sakurai, Bunnai Saito; Identification of 2,6-Disubstituted 3*H*-Imidazo[4,5-*b*]pyridines as Therapeutic Agents for Dysferlinopathies through Phenotypic Screening on Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 9175-9187 (2019).
- 3) Ryu Sakamoto, Tomomi Yoshii, Hiroyuki Takada, Keiji Maruoka; A Synthetic Route to Sodium α -Aminoalkanesulfonates and Their Application in the Generation of α -Aminoalkyl Radicals for Radical Addition Reactions. *Organic Letters*, 20, 2080-2083 (2018).

7. 参考文献

1. Istvan M. Mandity, Ferenc Fülöp; An overview of peptide and peptoid foldamers in medicinal chemistry. *Expert Opin. Drug Discovery*, 10, 1163-1177 (2015).
2. Hidetomo Yokoo, Takashi Misawa, Yosuke Demizu; De Novo Design of Cell-Penetrating Foldamers. *Chem. Rec.*, 20, 912-921 (2020).
3. Hiroko Yamashita, Yosuke Demizu, Takuji Shoda, Yukiko Sato, Makoto Oba, Masakazu Tanaka, Masaaki Kurihara; Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability. *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 2403-2408 (2014).
4. Maria K. Tsoumpira, Seiji Fukumoto, Toshio Matsumoto, Shinichi Takeda, Matthew J.A. Wood, Yoshitsugu Aoki; Peptide-conjugate antisense based splice-correction for Duchenne muscular dystrophy and other neuromuscular diseases. *EBioMedicine*, 45, 630-645 (2019).
5. Shin-Hong Kang, Moo-Jung Cho, Ryszard Kole; Up-Regulation of Luciferase Gene Expression with Antisense Oligonucleotides: Implications and Applications in Functional Assay Development. *Biochemistry*, 37, 6235-6239 (1998).
6. Saïd Abes, Hong M. Moulton, Philippe Clair, Paul Prevot, Derek S. Youngblood, Rebecca P. Wu, Patrick L. Iversen, Bernard Lebleu; Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)₄ peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents. *J. Controlled Release*, 116, 304-313 (2006).
7. Taavi Lehto, Alejandra Castillo Alvarez, Sarah Gauck, Michael J. Gait, Thibault Coursindel, Matthew J. A. Wood, Bernard Lebleu, Prisca Boisguerin; Cellular trafficking determines the exon skipping activity of Pip6a-PMO in *mdx* skeletal and cardiac muscle cells. *Nucleic Acids Research*, 42, 3207-3217 (2014).
8. Justin M. Wolfe, Colin M. Fadzen, Zi-Ning Choo, Rebecca L. Holden, Monica Yao, Gunnar J. Hanson, Bradley L. Pentelute; Machine Learning To Predict Cell-Penetrating Peptides for Antisense Delivery. *ACS Cent. Sci.*, 4, 512-520 (2018).
9. Colin M. Fadzen, Rebecca L. Holden, Justin M. Wolfe, Zi-Ning Choo, Carly K. Schissel, Monica Yao, Gunnar J. Hanson, Bradley L. Pentelute; Chimeras of Cell-Penetrating Peptides Demonstrate Synergistic Improvement in Antisense Efficacy. *Biochemistry*, 58, 3980-3989 (2019).
10. Peter Lönn, Apollo D. Kacsinta, Xian-Shu Cui, Alexander S. Hamil, Manuel Kaulich, Khirud Gogoi, Steven F. Dowdy; Enhancing Endosomal Escape for Intracellular Delivery of Macromolecular Biologic Therapeutics. *Sci. Rep.*, 6, 32301 (2016).
11. Shiroh Futaki, Ikuhiko Nakase; Cell-Surface Interactions on Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides Allow for Multiplex Modes of Internalization. *Acc. Chem. Res.*, 50, 2449-2456 (2017).
12. Pär Matsson, Jan Kihlberg; How Big Is Too Big for Cell Permeability? *J. Med. Chem.*, 60, 1662-1664 (2017).
13. Patrick L. Iversen, Katherine M. Aird, Rebecca Wu, Michael M. Morse, Gayathri R. Devi; Cellular Uptake of Neutral Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 10, 579-588

(2009).

14. Helene L. Åmand, Hanna A. Rydberg, Louise H. Fornander, Per Lincoln, Bengt Nordén, Elin K. Esbjörner; Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818, 2669-2678 (2012).
15. Rachida Abes, Hong M. Moulton, Philippe Clair, Sung-Tae Yang, Said Abes, Kamran Melikov, Paul Prevot, Derek S. Youngblood, Patrick L. Iversen, Leonid V. Chernomordik, Bernard Lebleu; Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)₄ peptides: structure-activity studies. *Nucleic Acids Research*, 36, 6343-6354 (2008).
16. Yvonne A. Nagel, Philipp S. Raschle, Helma Wennemers; Effect of Preorganized Charge-Display on the Cell-Penetrating Properties of Cationic Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 122-126 (2017).
17. Derek S. Youngblood, Susie A. Hatlevig, Jed N. Hassinger, Patrick L. Iversen, Hong M. Moulton; Stability of Cell-Penetrating Peptide-Morpholino Oligomer Conjugates in Human Serum and in Cells. *Bioconjug. Chem.*, 18, 50-60 (2007).

8. 用語集

*1) アンチセンス核酸：標的 RNA とワトソン-クリック塩基対を形成して遺伝子発現制御を行う、10-30 塩基程度で構成されるオリゴ核酸。RNase H1 を介して標的 RNA の分解を誘導するギャップマー型アンチセンス核酸や、スプライシング機構に関与するスプライシング制御型アンチセンス核酸などがある。

*2) モルフォリノ核酸 (PMO)：Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer の略。核酸のリボース環がモルフォリノ環に置換された人工核酸。DNA や RNA と異なってリン酸部分に電荷を持たず、ヌクレアーゼ耐性が高く細胞内移行性が低いといった特徴を有する。

*3) PPMO：Peptide-conjugated PMO の略。ペプチドとモルフォリノ核酸が共有結合を介して結合しているコンジュゲート化合物の総称。

*4) エンドサイトーシス：細胞が細胞外の物質を取り込む過程の一種。細胞膜がエンドソームと呼ばれる小胞を形成し、細胞外物質をエンドソーム内に内包する形で細胞内へ輸送する。アンチセンス核酸が細胞内に侵入する際の主要経路であり、標的の RNA に作用するためには細胞内でエンドソームから脱出する必要がある。