

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	高田 浩行	
学位の種類	博士(理学)	
学位記番号	甲第1922号	
学位授与の日付	令和5年3月24日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Helix-stabilized cell-penetrating peptides for delivery of antisense morpholino oligomers: relationships among helicity, cellular uptake, and antisense activity	
主研究指導教員	出水 庸介	
論文審査委員	(主査) 高橋 栄夫	教授
	(副査) 鈴木 厚	教授
	(副査) 西澤 知宏	教授
	(副査) 秋山 泰身	大学院客員教授

## 論文内容の要旨

HIV-1の転写制御タンパク質に由来するTATペプチドやオリゴアルギニン、細胞膜を透過する性質を有することから細胞膜透過性ペプチド(CPP)と呼ばれ、これまでに出水研を含む複数のグループから、化学修飾により二次構造が制御されたCPPが高い細胞内移行性を示すことが報告されている。CPPは、抗体や核酸等の膜透過性の低い高分子医薬品の細胞内デリバリーツールとして期待されている。例えば、アンチセンス核酸の一種であるモルフォリノ核酸(PMO)においては、CPPとのコンジュゲート化合物(peptide-conjugated PMO, PPMO)の開発がこれまで精力的に進められてきた。しかし、PPMOの開発において二次構造が制御されたペプチド(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、CPP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殆ど研究されていなかった。そこで高田氏は、新規アンチセンス核酸医薬品の開発を目指して、非天然型アミノ酸を導入したヘリックス型CPPと対応するPPMOをデザイン・合成し、その機能評価を行なった。

代表的なCPPのひとつであるノナルギニン(R9)に、ヘリックス構造を安定化させる非天然型アミノ酸のひとつである $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸(dAA)を導入したCPPをデザイン、合成した。次いで、PMOとクリック反応を行うことで目的のPPMOを合成した。ペプチドの二次構造はCDスペクトル測定により解析した。PPMOのアンチセンス活性は、HeLa pLuc705細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより評価した。またPPMOの細胞内取り込み量は、PPMOのペプチドN末端をフルオレセインで蛍光標識しフローサイトメーターで細胞内の蛍光強度を測定することで評価した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡観察によりPPMOの細胞内局在を評価した。

はじめに、合成したCPPの二次構造を解析した結果、R9に種々のdAAを導入したCPP、特に環状dAAを導入したCPPは、安定な $\alpha$ -ヘリックス構造を形成していることが判明した。次に、これらのCPPとPMOのコンジュゲート化合物であるPPMOのアンチセンス活性を評価したところ、ヘリックス型CPPを導入したPPMOは、非ヘリックス型のものより高いアンチセンス活性を示した。なかでも、5員環型dAAであるAc<sub>5c</sub>を導入したPPMOが最も高いアンチセンス活性を有することが明らかとなった。

一方で、ヘリックス型CPPはdAAの導入によりR9ペプチドと比べて疎水性が高まっていることから、PPMOで見られた活性の向上は疎水性の向上に起因している可能性が考えられた。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二次構造を有するペプチドを用いて比較する必要がある。そこで、同じ元素組成を有しながら異なる二次構造を有するCPPとして、Ac<sub>5c</sub>を含むCPPのL-Argの一部あるいは全てをD-Argに置換したヘテロキラル型CPPおよびエナンチオマー型CPPをデザイン、合成した。CDスペクトル測定により、ヘテロキラル型CPPはランダム構造を、エナンチオマー型CPPは左巻きの $\alpha$ -ヘリックス構造を形成していることを確認した。これらのCPPを有するPPMOの細胞内取り込み量を評価した結果、ヘリックス型PPMOは、非ヘリックス型PPMOに比べて高い細胞内取り込み量を示した。この結果から、CPP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。しかしながら、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、ヘリックス型、非ヘリックス型PPMO共に同等の活性を示すことが分かった。

ヘリックス型と非ヘリックス型PPMO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た。Argを含むCPPから成るPPMOは、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から、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、蛍光標識したヘリックス型PPMOの細胞内局在を観察した結果、取り込まれたPPMO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。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ところ、全てのPPMOにおいて活性の向上が見られ、中でもヘリックス型PPMOは非ヘリックス型PPMOよりも高いアンチセンス活性を示した。また、ヘリックス型PPMO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配列を導入したPPMOは、元のPPMOに比べて顕著に高いアンチセンス活性を示した。以上の結果から、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アンチセンス活性の増強効果が確認された。

本研究では、ヘリックス構造を安定化させたCPPから構成されるPPMOが高い細胞内移行性を示すこと、更に、エンドソーム脱出を促進させた条件下においては、高いアンチセンス活性を示すことを明らかとした。本研究の成果は、高機能アンチセンス核酸医薬品の開発に活用でき、革新的な中分子ペプチド医薬品やペプチド-薬物複合体等の中分子創薬に大きなインパクトを与えるものといえる。

## 論文審査結果の要旨

本学位論文の審査は、提出された論文の内容、公聴会・審査会での発表、および質疑応答に基づき、4名の審査委員（主査：高橋栄夫、副査：鈴木厚、西澤知宏、秋山泰身）によって、令和5年2月15日に行われた。公聴会・審査会では、専門分野、関連分野（理学）、および外国語について、各審査委員と以下のような質疑応答が行われた。尚、公聴会は対面と Zoom を用いたハイブリット形式で、審査会は対面形式で実施された。

高橋主査より、代謝安定性の高い細胞膜透過性ペプチド（以下、CPP）を設計することで、分解されずに残ったペプチドの毒性リスクが生じるのではないかとの質問があり、高田氏から、配列にも依存するが一部のペプチドではL体よりもD体ペプチドの方が毒性が高いという報告もあるため、ペプチドの毒性については注意深く評価していく必要があるとの回答があった。また、組織選択的な送達は可能であるかとの質問があり、一般にカチオン性 CPP の取り込みには細胞表面のプロテオグリカンが関与しており組織選択性は高くないと考えられるが、一方で、一部の CPP においてはプロテオグリカン以外にも細胞内取り込みに寄与している受容体タンパクがケミカルバイオロジー的な手法で同定されている例もあるため、そういった標的タンパクの発現分布次第では組織選択的な送達の可能性も考えられると説明された。さらに、高橋主査と鈴木副査より、CPP のヘリックス構造の安定化が細胞内取り込み量の向上に繋がる理由について質問があり、CPP の細胞内取り込み量は CPP とヘパラン硫酸等のプロテオグリカンの結合親和性に相関することが関連論文を引用しながら説明された。自身の CPP においても、ヘリックス型 CPP が非ヘリックス型 CPP に比べ、ヘパラン硫酸の一種であるヘパリンに対して高い結合親和性を示すことが蛍光偏光アッセイにより確認されていると説明された。

鈴木副査より、CPP とモルフォリノ核酸（PMO）のコンジュゲート体（以下 PPMO）がエンドソームから効率的に脱出するための更なる工夫について質問があり、他の研究グループからエンドソーム脱出を促進するペプチドフラグメントを導入している例が報告されていると回答された。しかし、今回の博士論文のようにヘリックス型 CPP と併用した例はなく、また現在、ヘリックス型 CPP のヘリックス中に疎水性残基を導入しエンドソーム脱出能力をさらに向上させた CPP のデザインと評価を行っており、それらの試験結果についても説明があった。

秋山副査より、リードアウトとして PPMO のアンチセンス活性を見ているが、細胞内への取り込み、ペプチド部分の分解、エンドソームからの脱出、細胞内局在、標的 mRNA への結合など、活性に到達するまで様々なファクターが関連していると考えられるが、各段階についてどの程度実験的な検証がされているのかとの質問があり、細胞内でのペプチドの代謝や標的 mRNA との結合親和性などは評価出来ていないが、本研究では CPP の二次構造と PPMO の細胞内移行量の関係を実験的に確認し、また、アンチセンス活性にはエンドソーム脱出効率が影響していることを取り込み阻害実験や蛍光顕微鏡観察、クロロキン添加実験の結果から考察しているとの回答があった。

西澤副査より、どのようなメカニズムで PPMO がエンドソームから抜け出しているのかについて質問があり、エンドソーム脱出フラグメントを搭載した PPMO は、疎水性配列がエンドソーム膜と相互作用することで脂質膜のパッキングを緩めて PPMO が透過する空間を作っていると予想されるが、実

際に PPMO がエンドソーム膜を通過する、あるいは、エンドソーム膜の構造が破綻するといった様子をリアルタイムで蛍光観察するような検証は出来ていないとの説明があった。また、ランダム構造を有するヘテロキラル型 CPP は代謝安定性が低くなり、それによりアンチセンス活性が低下するのではないかとの質問があり、ヘテロキラル型 CPP は L-Arg が連続する部分構造を持たないため、L-Arg からのみ構成される CPP よりもペプチダーゼに対する分解耐性は高いと考えられ、実際にトリプシン酵素を使用した安定性試験においてもヘテロキラル型 CPP は D-Arg のみで構成されるエナンチオマー型 CPP に次いで安定であることが分かっているとの回答があった。

関連分野（理学）では、高橋主査より、製薬業界で注目されている中分子ペプチドの構造特性について質問があり、高田氏から、中分子ペプチド創薬の潮流として構造固定化による機能性向上が挙げられ、特に環状ペプチドが開発の主流であり、立体構造の安定化により細胞膜透過性や代謝安定性、標的タンパク質への結合活性の向上が期待されている、との説明があった。鈴木副査より、ルシフェラーゼアッセイの評価方法についての質問があり、ウェル間の細胞数のバラつきを考慮して、細胞溶解液中のタンパク量を定量し、発光強度をタンパク量で割り込むことによりアンチセンス活性を算出しているとの回答があった。また、ステーブル細胞の意味とその作製方法についての質問があり、ステーブル細胞の意味については適切に回答できたが、作製方法は把握できていなかった。秋山副査より、Tat ペプチド等の CPP の細胞内取り込みメカニズムについて質問があり、高田氏から、カチオン性 CPP は低濃度ではエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが多いが、10  $\mu$ M 以上の高濃度ではエネルギー非依存的な直接の膜透過も起きると言われている、との説明がされた。また、直接的な膜透過やエンドサイトーシス以外の取り込み経路として、ジスルフィド結合を持つペプチドが膜タンパク質のシステイン側鎖とジスルフィド交換反応を起こして細胞内に取り込まれる経路も報告されており、これを利用した抗体や siRNA の細胞内輸送についても近年研究されているとの説明があった。西澤副査より、物質の細胞内取り込みの経路についてどのようなものがあるかとの質問があり、高田氏から、エンドサイトーシスには、クラスリン介在型、カベオラ型、マクロピノサイトーシス、およびファゴサイトーシスといった種類があること、またそれ以外にも直接的な膜透過や前述のチオール介在型の取り込みが存在する、との説明があった。導入試薬を用いた PMO の細胞内導入方法について質問があり、PMO は DNA や RNA と異なり負電荷を持たないため Lipofectamine 等の導入試薬は適さず、実験室レベルでは Endo-Porter と呼ばれる両親媒性ペプチド試薬と PMO を混合させることで細胞内への導入が可能であるという回答がされた。ただし、医薬品として開発するためには製剤としての安定性や、投与後血中で安定な粒子構造を維持することが必要とされ、siRNA 医薬で用いられている脂質ナノ粒子のように臨床応用するのは難しいとの説明があった。

外国語科目について、研究全体の総括に関するスライド 1 枚を使って、英語で発表した。高橋主査より、英文報告書は本人が執筆したものか、他者による校閲がなされていないかとの質問があり、高田氏より、全て自身で執筆したとの回答があった。また、予備発表会で質問のあった点を中心に英文報告書にディスカッションを追記したとの説明があった。審査員による合議の結果、スライド 1 枚を用いた英語口頭発表に問題はなく、全体として博士の学位レベルに到達していると判断された。

最終的に審査委員全員で討論を行った結果、専門分野の知識、質疑応答、英語力すべてにおいて合格点に達していることから、総合的に高田浩行氏は、博士（理学）の学位を授与されるのに相応しい資質を有していると判断された。