

Title	膜透過促進ペプチドとpH応答性低分子抗体を組み合わせた細胞選択的膜透過技術の開発
Sub Title	Fusogenic peptides combined with pH-dependent antibody fragments for cell-specific intracellular drug delivery
Author	土居, 信英(Doi, Nobuhide) 新倉, 啓介(Niikura, Keisuke) 須藤, 慧(Sudo, Kei) 岩城, 洸汰(Iwaki, Kota)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>受精や胎盤形成における細胞膜融合に関与するタンパク質の部分ペプチドが、様々な高分子の人為的な膜透過を促進するツールとして利用できる可能性を提唱し、従来の細胞膜透過性ペプチドによるタンパク質の細胞質送達効率を数十倍向上させることができ、かつ、免疫原性の懸念がないヒト由来の膜透過促進ペプチドを発見した。また、我々が開発したPURE mRNAディスプレイ法を用いて、膜抗原に中性pH(細胞外)で結合し酸性pH(エンドソーム内)で解離するpH応答性の一本鎖抗体の試験管内進化に成功した。膜透過促進ペプチドとpH応答性抗体とを融合することで、</p> <p>バイオ医薬の細胞選択的なデリバリーシステムへの応用が期待できる。</p> <p>Here we focused on fusogenic peptides (FPs) from proteins involved in membrane fusion (e.g., gamete recognition and fusion, and placental morphogenesis) as a tool for promoting the membrane penetration of biomacromolecules. We identified novel human-derived FPs that possessed strong intracellular uptake activities with potentially low immunogenicity. In addition, we succeeded the directed evolution of a pH-dependent antibody fragments, which binds to an antigen at a neutral pH (extracellular environment) but dissociates from the antigen at an acidic pH (endosomal environment), by using our PURE mRNA display system. Our human-derived FPs that fused with pH-dependent antibodies would be useful for the cell-specific intracellular delivery of therapeutic proteins and nucleic acids.</p>
Notes	<p>研究種目：挑戦的萌芽研究 研究期間：2015～2016 課題番号：15K12545 研究分野：タンパク質(抗体・ペプチド)の進化工学</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K12545seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K12545seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12545

研究課題名(和文)膜透過促進ペプチドとpH応答性低分子抗体を組み合わせた細胞選択的膜透過技術の開発

研究課題名(英文) Fusogenic peptides combined with pH-dependent antibody fragments for cell-specific intracellular drug delivery

研究代表者

土居 信英 (DOI, Nobuhide)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授

研究者番号：50327673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：受精や胎盤形成における細胞膜融合に関するタンパク質の部分ペプチドが、様々な高分子の人為的な膜透過を促進するツールとして利用できる可能性を提唱し、従来の細胞膜透過性ペプチドによるタンパク質の細胞質送達効率を数十倍向上させることができ、かつ、免疫原性の懸念がないヒト由来の膜透過促進ペプチドを発見した。また、我々が開発したPURE mRNAディスプレイ法を用いて、膜抗原に中性pH(細胞外)で結合し酸性pH(エンドソーム内)で解離するpH応答性の一本鎖抗体の試験管内進化に成功した。膜透過促進ペプチドとpH応答性抗体とを融合することで、バイオ医薬の細胞選択的なデリバリーシステムへの応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Here we focused on fusogenic peptides (FPs) from proteins involved in membrane fusion (e.g., gamete recognition and fusion, and placental morphogenesis) as a tool for promoting the membrane penetration of biomacromolecules. We identified novel human-derived FPs that possessed strong intracellular uptake activities with potentially low immunogenicity. In addition, we succeeded the directed evolution of a pH-dependent antibody fragments, which binds to an antigen at a neutral pH (extracellular environment) but dissociates from the antigen at an acidic pH (endosomal environment), by using our PURE mRNA display system. Our human-derived FPs that fused with pH-dependent antibodies would be useful for the cell-specific intracellular delivery of therapeutic proteins and nucleic acids.

研究分野：タンパク質(抗体・ペプチド)の進化学

 キーワード：膜融合ペプチド 免疫原性 mRNAディスプレイ pH応答性一本鎖抗体 試験管内進化 細胞内抗体医薬  
 中分子医薬 ドラッグデリバリーシステム

### 1. 研究開始当初の背景

標的分子に対して高い特異性と親和性をもつ抗体やペプチドなどのバイオ医薬は、従来の低分子化合物医薬と比べて副作用が少なく、治療効果が高い究極の分子標的薬として注目されているが、細胞膜透過性が低いという欠点があった。これまでに HIV1-TAT (*Science* **285**, 1569, 1999) やポリアルギニンなどの細胞膜透過性ペプチド (CPP) を融合することで抗体やペプチドを細胞内に輸送した例はあるが、これらの CPP は細胞選択性に乏しいため、将来的な臨床応用では副作用の問題が危惧されていた。細胞選択的マーカー (膜抗原) に対する一本鎖抗体 (scFv) や Fab などの低分子抗体 (図 1 A) を利用して特定の細胞へのターゲティングを行えば、低分子抗体・膜抗原複合体がエンドサイトーシスによって細胞選択的にエンドソームに取り込まれることが期待されるが、エンドソームから細胞質への脱出効率が低いことが問題となっている。最近、我々は、棘皮動物の受精に関与するタンパク質 Bindin に含まれる膜作用性ペプチドが、分子メカニズムは未だ不明ながら、哺乳類培養細胞に共添加した IgG などの細胞質への膜透過を促進することを発見した。このペプチドを膜抗原に対する低分子抗体と融合させれば共存するバイオ医薬の細胞選択的な膜透過促進が期待できるが、その効率を上げるにはエンドソームに移行した低分子抗体が膜抗原から解離する必要があると考えた。

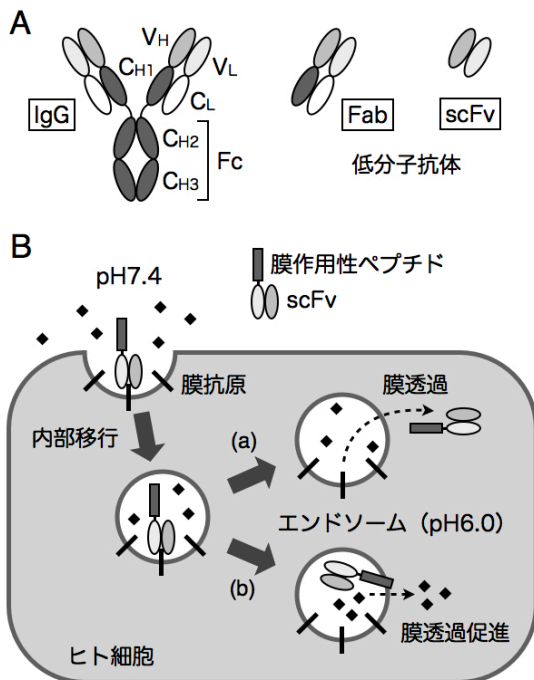


図 1 : 抗体の構造 (A) と膜透過 (B) の模式図

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が見出した新規の膜作用性ペプチドを pH 応答性の低分子抗体と組み合わせることで、膜非透過性のバイオ医薬を細胞選択的に膜透過させる新たな技術を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、申請者らが独自に開発した無細胞ディスプレイ技術 (*Nucleic Acids Res.* **31**, e118, 2003; *ibid.* **32**, e169, 2004) とマイクロ流体デバイス (*Anal. Chem.*, **86**, 9570, 2014) を組み合わせることで、(1)細胞表面に相当する pH7.4 で抗原に結合し、エンドソーム内に相当する pH6.0 で抗原から解離する pH 応答性の低分子抗体を作製する手法を確立した。

次に、この pH 応答性低分子抗体に膜作用性ペプチドを融合することで、細胞表面の膜抗原に結合してエンドソームに移行し、pH の違いにより抗原から解離した後、膜作用性ペプチドを介して、(2)あらかじめ細胞内の標的に対するバイオ医薬を連結した低分子抗体自身がエンドソームから細胞質に脱出できる膜透過抗体 [図 1 B(a)]、または、(3)同時に取り込んだバイオ医薬のエンドソームから細胞質への輸送を向上させる膜透過促進抗体 [図 1 B(b)] の作製を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) pH によって抗原結合能が変化する pH 応答性低分子抗体の試験管内進化

scFv の効率的な試験管内選択を可能とする PURE mRNA ディスプレイ法 (*J. Biochem.* **159**, 519, 2016) を新たに確立し、この手法を用いて、抗 EGFR scFv 遺伝子の CDR にヒスチジン残基を多めに導入したランダム変異体ライブラリーを構築し、細胞外環境と同じ pH7.4 で EGFR の細胞外ドメインに結合し、エンドソーム内環境と同じ pH5.5~6.0 で EGFR から解離する pH 応答性の scFv の試験管内選択を 5 ラウンドおこなった (図 2 A)。

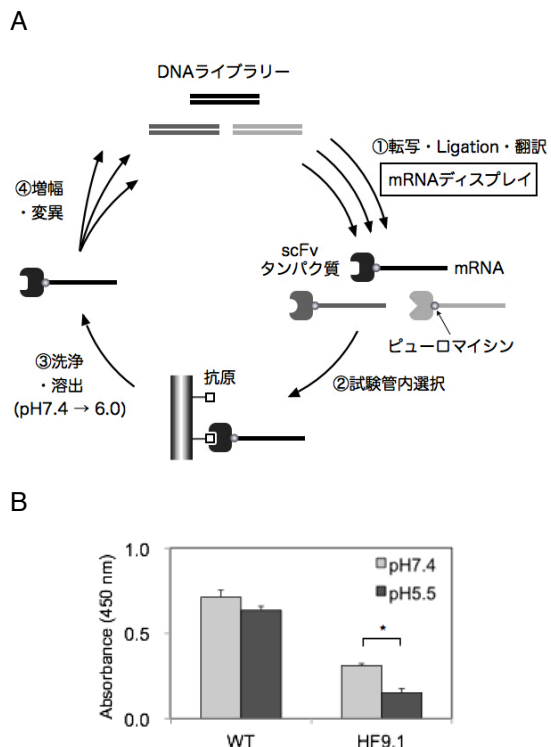


図 2 : 無細胞ディスプレイ技術による pH 応答性低分子抗体の試験管内進化

その結果、pHの違いによって抗原に対する結合力が変化する抗 EGFR scFv の変異体 HF9.1 を取得することに成功した (図 2B)。

## (2) シス型膜透過性ペプチドを融合した膜透過抗体の作製

我々が以前に見出していたウニ由来シス型膜透過促進ペプチド B18 (*J. Control. Release*, **212**, 85, 2015) と抗 EGFR 一本鎖抗体とを融合したタンパク質が、EGFR の発現量が多いヒト培養細胞に選択的に取り込まれることを確認した (*J. Biochem.* **159**, 123, 2016)。

しかし、B18 はウニ由来であったため、バイオ医薬に適用するには免疫原性の懸念があった。そこで、新たにヒトの受精に関与することが知られていた IZUMO1 およびヒト胎盤形成における細胞融合に関与するシンシチン 1 というタンパク質の中から、人工的な膜透過促進ペプチドとして機能し得る部分ペプチドを探索した。具体的には、様々な部分ペプチド (図 3A; 赤色) を CPP である TAT とともに蛍光タンパク質 eGFP に融合し (図 3B 上)、タンパク質を大腸菌で大量発現・精製して、ヒト培養細胞に添加した。その後、蛍光タンパク質の細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡で観察した結果、特に、シンシチン 1 の 19 アミノ酸残基のペプチド (S19 と命名) を融合した場合に高い取り込みが観察された (図 3C; 緑色)。このとき、ヒト培養細胞の増殖や生存には影響はなかった。

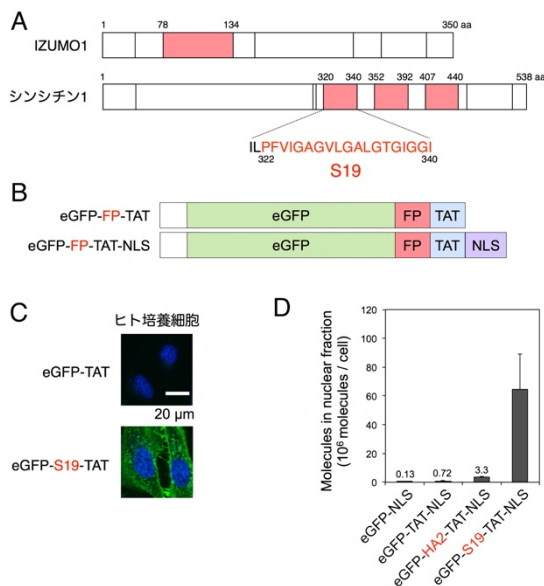


図 3 : ヒト由来膜透過促進ペプチドの発見

さらに、これらの膜透過促進ペプチド融合タンパク質の膜透過性を迅速かつ正確に評価するために、核移行シグナル配列 (NLS) の利用について検討した。従来の方法では、エンドソーム内のタンパク質と細胞質のタンパク質を区別して定量することは困難であったが、融合タンパク質に NLS を融合しておくことにより (図 3B 下)、細胞質に移行した融合タンパク質のみが核に輸送されるため、その

後、分画により核画分を抽出し、Western blotting により核に移行した融合タンパク質を定量することで、それらの膜透過性を定量的に評価することができた (図 3D)。その結果、S19 を融合することで、TAT のみの場合よりも約 90 倍、従来から知られていたインフルエンザウイルス由来の HA2 を用いた場合よりも約 20 倍高い細胞質送達効率を示すことが分かった。

さらに、この S19 の効果は、様々なヒト培養細胞 (図 4A) に対して、eGFP 以外のタンパク質 (図 4B) を融合した場合にも観察されたことから、膜透過促進ペプチドとして汎用性が高いことも示された。

以上のように、従来の膜作用性ペプチドよりも効率よく細胞質送達を促進するヒト由来の膜透過促進ペプチド配列を世界で初めて同定することに成功した (*J. Control. Release*, **255**, 1, 2017; 特許出願)。

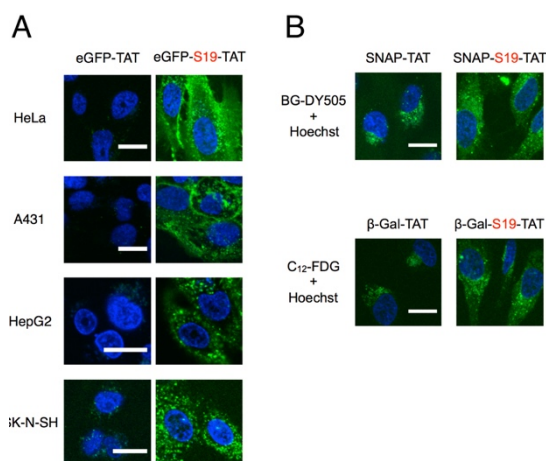


図 4 : ヒト由来膜透過促進ペプチドの汎用性

そこで、この膜透過促進ペプチド S19 と pH 応答性一本鎖抗体とを融合した遺伝子を作製し、大腸菌を用いて発現した融合タンパク質が膜抗原の細胞外ドメインに結合することを ELISA により確認できた。しかし、これを膜抗原過剰発現ヒト培養細胞に作用させ、共焦点顕微鏡により細胞内取り込みを観察するには収量が不十分であった。そこで、大腸菌の宿主や培養条件を変えて、大量発現条件の検討をおこなった結果、収量を数倍改善することができた。

## (3) トランス型膜透過促進ペプチドを融合した膜透過促進抗体の作製

我々が以前に見出していたウニ由来トランス型膜透過促進ペプチド B55 (*J. Control. Release*, **212**, 85, 2015) と抗 EGFR 一本鎖抗体とを融合したタンパク質を作製した。この融合タンパク質と共添加した蛍光標識デキストランが、EGFR の発現量が多いヒト培養細胞に選択的に取り込まれることが確認された (*J. Biochem.* **159**, 123, 2016)。

一方、新たに同定したヒト由来の膜透過促進ペプチド S19 はシス型の膜透過は促進した

がトランス型の膜透過は促進しなかったことから、トランス型膜透過促進ペプチドのデザインの参考とするために、B55 によるトランス型の膜透過促進メカニズムの詳細な解析をおこなった。具体的には、B55 のトランス型の膜透過促進に必要な最小領域を特定するために、55 アミノ酸残基の B55 の欠失変異体を作製した。その結果、B55 の C 末端側 38 アミノ酸残基である B38C はトランス型膜透過促進活性を失ったが、B55 の N 末端側 38 アミノ酸残基である B38N は活性を保持していることが示唆された。

#### (4) 今後の展望

今回我々が発見したヒト由来の膜透過促進ペプチドと、様々な膜抗原に対する低分子抗体とを組み合わせることで、細胞内の疾患標的に対する抗体医薬や中分子（ペプチド、核酸）医薬などのバイオ医薬の細胞選択的なデリバリーシステムへの応用が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- ① 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*, 査読有, Vol. 255, 2017, pp. 1-11  
DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.398
- ② Nakayama, M., Komiya, S., Fujiwara, K., Horisawa, K., Doi, N.: *In vitro* selection of bispecific diabody fragments using covalent bicistronic DNA display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, Vol. 478, 2016, pp. 606-611  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.113
- ③ Fujiwara, K., Doi, N.: Biochemical preparation of cell extract for cell-free protein synthesis without physical disruption. *PLoS ONE*, 査読有, Vol. 11, 2016, e0154614  
DOI: 10.1371/journal.pone.0154614
- ④ Nagumo, Y., Fujiwara, K., Horisawa, K., Yanagawa, H., Doi, N.: PURE mRNA display for *in vitro* selection of single-chain antibodies. *J. Biochem.* 査読有, Vol. 159, 2016, pp. 519-526  
DOI: 10.1093/jb/mvv131
- ⑤ Niikura, K., Horisawa, K., Doi, N.: Endosomal escape efficiency of fusogenic B18 and B55 peptides fused with anti-EGFR single chain Fv as estimated by

nuclear translocation. *J. Biochem.* 査読有, Vol. 159, 2016, pp. 123-132  
DOI: 10.1093/jb/mvv083

- ⑥ Niikura, K., Horisawa, K., Doi, N.: A fusogenic peptide from a sea urchin fertilization protein promotes intracellular delivery of biomacromolecules by facilitating endosomal escape. *J. Control. Release*, 査読有, Vol. 212, 2015, pp. 85-93  
DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.06.020

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 須藤慧, 新倉啓介, 藤原慶, 土居信英: ヒト由来膜融合促進ペプチドと pH 依存性抗体を組み合わせた膜透過抗体の開発. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年 11 月 30 日. パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
- ② 須藤慧, 新倉啓介, 藤原慶, 土居信英: ヒト由来膜融合促進ペプチドによる生体高分子の細胞内送達. 第 31 回日本 DDS 学会学術集会. 2015 年 7 月 2 日. 京王プラザホテル（東京都・新宿区）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

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  
発明者：須藤慧, 新倉啓介, 土居信英  
権利者：学校法人慶應義塾  
種類：特許権  
番号：2015-118432（PCT/JP2016/066455）  
出願年月日：2015 年 6 月 11 日  
国内外の別：国内および国外

〔その他〕

プレスリリース

<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/4/6/28-20259/index.html>

日経産業新聞朝刊 8 面 2017 年 4 月 13 日

日本経済新聞朝刊 13 面 2016 年 12 月 26 日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

土居 信英 (DOI, Nobuhide)  
慶應義塾大学・理工学部・准教授  
研究者番号：50327673

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 主な研究協力者

新倉 啓介 (NIIKURA, Keisuke)  
慶應義塾大学・理工学研究科・大学院生

須藤 慧 (SUDO, Kei)  
慶應義塾大学・理工学研究科・大学院生

岩城 洸汰 (IWAKI, Kouta)  
慶應義塾大学・理工学部・学部生