

学位論文 博士（工学）

ウニ配偶子認識タンパク質由来膜融合促進ペプチドの  
機能解析と抗体 DDS への応用

2015年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

新倉 啓介

# 主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	新倉 啓介
主 論 文 題 目 :				
ウニ配偶子認識タンパク質由来膜融合促進ペプチドの機能解析と抗体 DDS への応用				
(内容の要旨)				
<p>抗体分子を利用した抗体医薬は、従来の化学合成によって作られる低分子医薬と比較して、標的への高い親和性や特異性、生体内での高い安定性などの長所を有する。しかし、抗体は巨大な分子であるため細胞内へ透過しにくく、細胞内の分子に対して直接作用できないという課題がある。先行研究において、ドラッグデリバリーシステム (DDS) に用いられる細胞膜透過性ペプチドを利用することで細胞内因子を標的とした抗体の構築が試みられてきたが、エンドソーム離脱効率が低く実際に細胞質に到達する分子が少ないことや、細胞非特異的に透過してしまうなどの課題があった。そこで、本研究ではエンドソーム内の pH 依存的に脂質膜を不安定化し、エンドソーム離脱を促進する膜融合促進ペプチドに着目し、ウニ配偶子認識タンパク質 Bindin の脂質結合領域に存在する B18 および B55 ペプチドのヒト培養細胞における機能を検証し、これらのペプチドを利用して抗体 DDS を構築することを目的とした。</p> <p>第 1 章は序論であり、本論文の背景となる既存の抗体医薬の問題点およびその解決策について説明し、本研究の目的と意義を示している。</p> <p>第 2 章では、B18 および B55 ペプチドの eGFP 融合タンパク質を作製し、HeLa 細胞を用いてその機能を検証した。その結果、B18 が <i>cis</i> 型の、B55 が <i>trans</i> 型の膜透過を促進することがわかった。また、B18 および B55 共に細胞毒性はみられず、B55 においては弱酸性環境と高 Zn<sup>2+</sup>濃度環境で性質が異なることがわかった。さらに、B55 は抗体や RNase の <i>trans</i> 型の膜透過を促進し、これらのタンパク質は細胞質に移行した後もその機能を維持していることが示唆された。</p> <p>第 3 章では、B18 は <i>cis</i> 型の、B55 は <i>trans</i> 型の膜透過促進に応用できると考え、これらのペプチドの抗 EGFR 一本鎖抗体融合タンパク質を作製した。作製した抗体は、いずれも抗原である EGFR 特異的な結合能を有していた。そこで、実際に EGFR および NLS 付加による核移行と細胞分画による核抽出を組み合わせることで、各抗体のエンドソーム離脱効率を定量的に評価した。その結果、B18 を融合した抗体ではエンドソーム離脱効率が向上しており、これらのペプチドが抗体の <i>cis</i> 型の膜透過を促進することが示唆された。また、B55 を融合した抗体は共添加した dextran の <i>trans</i> 型の膜透過を EGFR 高発現細胞特異的に促進することが示唆された。</p> <p>第 4 章では、総括として全体のまとめと今後解決すべき課題、および本研究の将来的な応用について示している。</p> <p>以上より、本研究で B18 および B55 を利用して構築した抗体 DDS は、<i>cis</i> 型および <i>trans</i> 型の 2 種類の作用機序によって、抗体の膜透過性向上や薬剤の細胞内送達に応用できると期待される。</p>				

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name NIIKURA, Keisuke
<b>Title</b>  Functional Analysis of Fusogenic Peptides Derived from a Sea Urchin Gamate Recognition Protein and their Application to Antibody-DDS		
<b>Abstract</b> <p>Antibody drugs have higher affinity and specificity to targeted molecules compared with small molecular medicines. However, antibodies with large and complex structure cannot target intracellular molecules due to their low-membrane permeability. It was reported previously that cell-penetrating peptide was applied to antibody in order to increase its membrane permeability, but there were some issues such as the low endosomal escape efficiency and the non-specific penetration to cells. In this study, we focused on fusogenic peptides (FPs) B18 and B55 derived from a <i>sea urchin</i> gamate recognition protein 'Bindin', and performed functional analysis of these peptides in human cells for construction of antibody-drug delivery systems (DDS).</p> <p>Chapter 1 states Introduction that describes current issues of antibody therapeutics and solutions, and showed the purpose and meaning of this study.</p> <p>In Chapter 2, we prepared the eGFP fusion proteins of B18 and B55, and demonstrated that B18 and B55 facilitate the intracellular uptake of itself in <i>cis</i>, and dextrans in <i>trans</i>, respectively. In addition, we revealed that these peptides have no toxicity to the HeLa cells, and B55 also facilitates the intracellular uptake of antibodies and RNase retaining their activity in the cytosol.</p> <p>In Chapter 3, we prepared the anti-EGFR scFv fusion proteins of B18 and B55. As a result of quantitative analysis utilizing nuclear localization signal and cell-fractionation, it was suggested that B18 promotes the endosomal escape of anti-EGFR scFv, and facilitates the intracellular uptake of scFv in <i>cis</i>. Moreover, it was also suggested that anti-EGFR scFv fused with B55 facilitated the intracellular uptake of dextrans specifically to the cells expressed EGFR at a high level in <i>trans</i>.</p> <p>Finally, Chapter 4 sums up this study and states left issues and applications in future.</p> <p>According to above results, the antibody-DDS constructed by utilizing B18 and B55 in this study are expected to contribute enhancing permeability of antibodies and delivery of drugs intracellularly <i>via</i> the two types of mechanisms, in <i>cis</i> and <i>trans</i>.</p>		