

研究テーマ (和文) AB		腫瘍組織内環境を標的とした低 pH 応答型薬物輸送ペプチドの開発と応用研究																					
研究テーマ (欧文) AZ		Development of low-pH activatable cell penetrating peptides for novel drug delivery system.																					
研究氏 代 表 名 者	カカナ CC	姓) イワサキ	名) タカシ	研究期間 B	2010 ~ 2011 年																		
	漢字 CB	岩崎	崇	報告年度 YR	2011 年																		
	ローマ字 CZ	IWASAKI	TAKASHI	研究機関名	鳥取大学 農学部																		
研究代表者 CD 所属機関・職名		鳥取大学農学部 生物資源環境学科 生体制御化学分野 助教																					
<p>概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)</p> <p>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 (R8 : RRRRRRRR-NH₂) 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、R8 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。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」の開発を行った。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。本研究では以下 15 種の RH ハイブリッドペプチドを合成し、pH6.0 と pH7.4 における細胞膜透過効率を評価した。</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>R8 : RRRRRRRR-NH₂</td> <td>R4H2R3 : RRRRHRRR-NH₂</td> </tr> <tr> <td>R7H2 : RRRRRRRH-NH₂</td> <td>R3H4R3 : RRRHHHRRR-NH₂</td> </tr> <tr> <td>R6H4 : RRRRRHHHH-NH₂</td> <td>R3H6R2 : RRRHHHHHRR-NH₂</td> </tr> <tr> <td>R5H6 : RRRRRHHHHH-NH₂</td> <td>R2H8R2 : RRHHHHHHHRR-NH₂</td> </tr> <tr> <td>R4H8 : RRRRHHHHHH-NH₂</td> <td>R2H10R1 : RRHHHHHHHHR-NH₂</td> </tr> <tr> <td>R3H10 : RRRHHHHHHH-NH₂</td> <td>R1H12R1 : RHHHHHHHHHHR-NH₂</td> </tr> <tr> <td>R2H12 : RRHHHHHHHHH-NH₂</td> <td></td> </tr> <tr> <td>R1H14 : RHHHHHHHHHHH-NH₂</td> <td></td> </tr> <tr> <td>H16 : HHHHHHHHHHHH-NH₂</td> <td></td> </tr> </table> <p>その結果、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。しかし、我々の予想とは異なり、H 残基のみが連続した H16 (HHHHHHHHHHHHH-NH₂) が、非常に高い細胞膜透過効率を示すことが発見された。R8 に対する H16 の相対的な細胞膜透過効率は、マウスマクロファージ細胞 RAW264 に対しては 3.13 倍 (pH6.0) と 2.35 倍 (pH7.4)、ヒト肝臓癌細胞 HepG2 に対しては 5.95 倍 (pH6.0) と 5.55 倍 (pH7.4) であった。これまでに、このような H 残基のみから構成されるペプチドが細胞膜透過を示すことは、全く知られていなかった。また、H16 は正電荷を帯びない pH7.4 と、正電荷を帯びる pH6.0 の両 pH 条件において、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 H16 の細胞膜透過に関与している可能性を示唆している。本研究では当初の目的を達成することは出来なかったが、予想外の大変興味深い現象を発見するに至った。</p>						R8 : RRRRRRRR-NH ₂	R4H2R3 : RRRRHRRR-NH ₂	R7H2 : RRRRRRRH-NH ₂	R3H4R3 : RRRHHHRRR-NH ₂	R6H4 : RRRRRHHHH-NH ₂	R3H6R2 : RRRHHHHHRR-NH ₂	R5H6 : RRRRRHHHHH-NH ₂	R2H8R2 : RRHHHHHHHRR-NH ₂	R4H8 : RRRRHHHHHH-NH ₂	R2H10R1 : RRHHHHHHHHR-NH ₂	R3H10 : RRRHHHHHHH-NH ₂	R1H12R1 : RHHHHHHHHHHR-NH ₂	R2H12 : RRHHHHHHHHH-NH ₂		R1H14 : RHHHHHHHHHHH-NH ₂		H16 : HHHHHHHHHHHH-NH ₂	
R8 : RRRRRRRR-NH ₂	R4H2R3 : RRRRHRRR-NH ₂																						
R7H2 : RRRRRRRH-NH ₂	R3H4R3 : RRRHHHRRR-NH ₂																						
R6H4 : RRRRRHHHH-NH ₂	R3H6R2 : RRRHHHHHRR-NH ₂																						
R5H6 : RRRRRHHHHH-NH ₂	R2H8R2 : RRHHHHHHHRR-NH ₂																						
R4H8 : RRRRHHHHHH-NH ₂	R2H10R1 : RRHHHHHHHHR-NH ₂																						
R3H10 : RRRHHHHHHH-NH ₂	R1H12R1 : RHHHHHHHHHHR-NH ₂																						
R2H12 : RRHHHHHHHHH-NH ₂																							
R1H14 : RHHHHHHHHHHH-NH ₂																							
H16 : HHHHHHHHHHHH-NH ₂																							
キーワード FA	細胞膜透過ペプチド	ヒスチジン	低 pH 環境	腫瘍組織																			

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA							
研究機関番号 AC					シート番号							

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

Cell penetrating peptides (CPPs) are widely used as intracellular delivery tools for proteins and nucleic acids. Common features of CPPs are arginine(R)/lysine(K) rich sequence and high positively charged sequence, because R/K are protonated and obtain positive charge in physiological condition. Octaarginine (R8), one of the major CCPs, also shows effective intracellular uptake and high positive charges. The high positive charges are thought as an important factor for R8 to penetrate cellular membrane.

In this study, we focused on histidine (H), a sole of basic amino acid obtains positive charge in low-pH (< pH6.0) dependent manner, as low-pH acctivatable trigger. RH hybrid peptides (R8 analogs partially substituted with H) show rapid increase of positive charge near the low-pH condition (pH6.0) and are expected to penetrate cellular membrane in low-pH condition (pH6.0) dependent manner. The low-pH condition (pH6.0~6.9) is specifically formed in solid tumor tissue. Therefore, The RH hybrid peptides are expected to be a solid tumor tissue specific drug delivery tool. To confirm the above hypothesis, we synthesized 15 kinds of RH hybrid peptides described below and measured intracellular uptake ratio in physiological condition (pH7.4) and low-pH condition (pH6.0).

- | | | | |
|-------|-----------------------------------|---------|----------------------------------|
| R8 | : RRRRRRRR-NH ₂ | R4H2R3 | : RRRRHRRR-NH ₂ |
| R7H2 | : RRRRRRRHH-NH ₂ | R3H4R3 | : RRRHHHRRR-NH ₂ |
| R6H4 | : RRRRRRHHHH-NH ₂ | R3H6R2 | : RRRHHHHHRR-NH ₂ |
| R5H6 | : RRRRRHHHHHH-NH ₂ | R2H8R2 | : RRHHHHHHHRR-NH ₂ |
| R4H8 | : RRRRHHHHHHHH-NH ₂ | R2H10R1 | : RRHHHHHHHHHHR-NH ₂ |
| R3H10 | : RRRHHHHHHHHHH-NH ₂ | R1H12R1 | : RHHHHHHHHHHHHR-NH ₂ |
| R2H12 | : RRHHHHHHHHHHHH-NH ₂ | | |
| R1H14 | : RHHHHHHHHHHHHHH-NH ₂ | | |
| H16 | : HHHHHHHHHHHHHHH-NH ₂ | | |

As a result, unfortunately, there were no RH hybrid peptides showing low-pH condition (pH6.0) selective intracellular uptake. However, in contradiction to our expectation, the H16 (all sequence consisted of only H residue) showed large intracellular uptake in both pH condition. Compared to the R8, the H16 showed 3.13-fold (pH6.0) and 2.35-fold (pH7.4) higher intracellular uptake ratio against mice macrophage cell line RAW264, and 5.95-fold (pH6.0) and 5.55-fold (pH7.4) higher intracellular uptake ratio against human kidney carcinoma cell line HepG2. It has been unknown that the peptide consisted of only H residue penetrates cellular membrane effectively, and the finding that H16 showed large intracellular uptake in low-pH independent manner suggests that navel positive charge independent mechanism may be associated with cellular membrane penetration of H16.