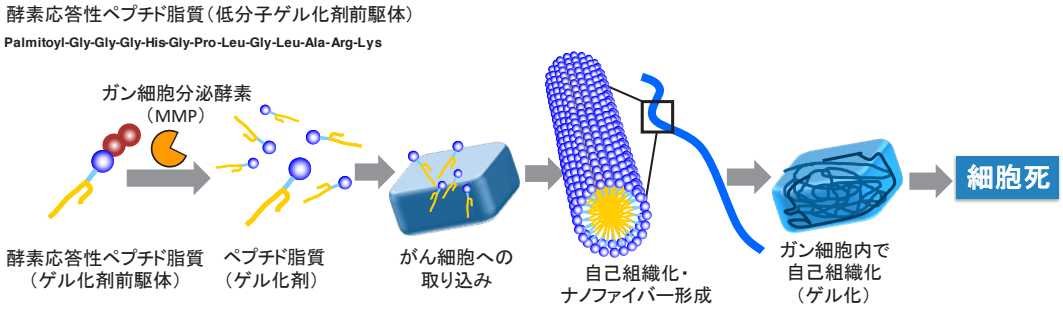
90　ペプチド脂質の自己組織化による新規抗ガン活性の創出	丸山　達生

【目的】本研究では、精密に分子設計したペプチド脂質分子がガン細胞に選択的に取り込まれ、細胞内でファイバー状の自己組織体を形成し（細胞質をゲル化）、この自己組織体が顕著な抗ガン活性を発揮するという全く新しい抗ガン活性システムの実証を目指した。従来の生理活性・薬理活性物質は、化合物の分子が単体で薬理活性を示していた。本研究では、単一分子では特段の薬理活性を示さないが、ガン細胞の中でペプチド脂質分子が集合化し、物理的に大きな組織体（μm スケール）をつくることで初めて抗ガン活性を示すという新しい薬理活性コンセプトを目指した（図 1）。

【方法】分子構造の異なるペプチド脂質各種をペプチド固相合成により合成した。合成したペプチド脂質の自己組織化能は緩衝液のゲル化により検証した。ペプチド脂質の細胞毒性は、MTT アッセイにより数種のガン細胞と正常細胞を用いて評価した。細胞内でのペプチド脂質の局在化は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

【結果】本研究では、ペプチド脂質の自己組織化（ゲル化）を封印した分子設計を行い、特定の刺激に応じてその封印を解き、自己組織化（ゲル化）が進行するように分子をデザインした。特定の刺激として、「ガン細胞が過剰に分泌する酵素 MMP-7」と「一部のガン細胞内低 pH 環境」を選択し、これに応答して自己組織化し、ガン細胞内でゲルを形成し死滅させることを狙った。MMP-7 に応答してゲル化するペプチド脂質を作製したところ、MMP-7 を多く分泌しているガン細胞に対してより強い毒性を示し、ガン細胞選択的に死滅させることに成功した。ガン細胞への取り込み挙動も観察され、またガン細胞内でペプチド脂質が自己組織体を形成し、細胞質の流動性が顕著に低下していることも強く示唆された。このことから、細胞内での合成分子の自己組織化制御に成功し、またこれを利用してガン細胞選択的に殺傷可能であることが明らかになった。また本研究では、一部のガン細胞の細胞内 pH が正常細胞のそれよりわずかに低いことに着目し、このわずかに低い pH に応答して自己組織化（ゲル化）するペプチド脂質の開発を行った。その結果 pH 7 以上ではゲル化せず、pH 7 以下でゲル化するペプチド脂質の開発に成功した。このペプチド脂質を、細胞内 pH のわずか異なる 4 種の培養細胞に添加したところ、細胞内 pH が低い細胞（HEK293、HeLa 細胞）に対してこのペプチド脂質が選択的な細胞毒性を示すことが判明した。このペプチド脂質の細胞取り込み挙動も確認されており、細胞内にてペプチド脂質の自己組織化体が形成し、これが細胞機能に重大な損傷を与えていることが示唆された。以上の検討より、特定の疾患細胞の刺激に応答して自己組織化するペプチド脂質を適切に設計することで、疾患細胞選択的な毒性（ここではガン細胞選択的抗ガン活性）を発現させることに成功した。本研究で提案する抗ガン活性は従来と全く異なる作用機序であることから、新たな薬理機構の提案につながると期待される。

本研究で提案する“ペプチド脂質分子の自己組織化による選択的抗ガン活性”



90. ペプチド脂質の自己組織化による新規抗ガン活性の創出

丸山　達生

神戸大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 化学工学講座

Key words：抗ガン活性，自己組織化，ペプチド脂質，ナノファイバー，細胞選択的

緒　言

創薬分野では何十万という多種類の低分子化合物群（ライブラリー）から目的の薬理活性を示す化合物を探し出す“スクリーニング”に多大な労力がつぎ込まれ、わずかな成功例が新薬として登録され、これまで実用化されてきた。このようにして開発された薬剤は、ほとんどの場合単一の分子でその機能を発現し、単一分子で薬として働いていた。その一例として、分子標的薬に代表される、病気に関わる酵素に対する阻害剤があげられる。一方でライブラリー設定およびスクリーニング手法に限界があり、新しい新薬候補が近年見つかりにくくなっている。また阻害剤等の分子標的薬は、長期投与により病原菌や疾患細胞が薬剤耐性を獲得するケースがあり、薬剤耐性の克服が大きな課題となっている。最近我々は、単純な分子構造を有するペプチド脂質分子が多数集まることでガン細胞を死滅できることを発見した［1］。これは上述の単一分子で機能する薬と大きく異なり、単一分子では特段の機能を示さず、分子が多数集合して自己組織化（ゲル化）することで、ガン細胞を死滅させるというこれまでの作用機序と全く異なるものである。そこで本研究ではこの自己組織化（ゲル化）という新しい作用機序に基づき、ガン細胞特有の細胞環境に応じて特定のガン細胞を選択的に死滅させることに挑戦した。ここではガン細胞特有の細胞環境刺激として、ガン細胞が多く分泌する酵素 （マトリックスメタロプロテイナーゼ 7、MMP-7）と細胞内 pH の違いを選択し、これらの刺激に応答してガン細胞を選択的に殺傷することを検討した。

我々はこれまでのゲル化剤の研究の中で、単純な短鎖ペプチドと脂肪酸を結合させたペプチド脂質が、水や緩衝液に対して強力なゲル化剤として機能することをみいだした。例えば、我々が開発したパルミチン酸（炭素数 16）を結合させたテトラペプチド（C16-Gly-Gly-Gly-His）は、たった 0.03 wt%で水をゲル化することができる［2］。このペプチド脂質は水中で自発的にファイバー上の自己集合体を形成し（自己組織化）、これが絡まり合うあるいは分岐することで、水中に三次元ネットワークを形成し、結果としてゲル化が引き起こされる。このペプチド脂質はその単純構造故に分子構造を改変しやすい。そこで我々はこのペプチド脂質の自己組織化（ゲル化）を封印した分子設計を行い、特定の刺激に応じてその封印を解き、自己組織化（ゲル化）が進行するように分子をデザインした。特定の刺激として、「ガン細胞が過剰に分泌する酵素 MMP-7」と「一部のガン細胞内低 pH 環境」を選択し、これに応答して自己組織化し、ガン細胞内でゲルを形成し死滅させることを狙った。このガン死滅機構は、これまでの抗ガン剤と比較してその作用機序が大きく異なるために、これまでの抗ガン剤に対して耐性を有していたような細胞にも有効であると期待できる。

方　法

1.　ペプチド脂質の合成と物性評価

Fmoc 固相ペプチド合成法により、各種ペプチド脂質の合成を行った。化合物の精製は高速液体クロマトグラフィー、同定は MALDI-TOF/MS を用いて行った。ゲル化の判断は試験管倒置法を採用した。

2.　細胞毒性試験

ペプチド脂質をヒト由来ガン細胞（数種）と正常ヒト皮膚毛細血管内皮細胞（MvE 細胞）に添加し、蛍光染色剤による Live-Dead test を行い、共焦点蛍光顕微鏡（CLSM）により観察した。細胞生存率は MTT アッセイにより

測定した。

結果および考察

1. 酵素 MMP-7 に応答してゲル化するペプチド脂質（C16-GGGHGPLGLGLARK）

想定では、設計したペプチド脂質 C16- GGGHGPLGLGLARK が MMP-7 の触媒作用により加水分解され、C16-GGGHGPLG が生成する。そこでまずこの C16-GGGHGPLG を合成し、この自己組織化能（ゲル化能）を調べた。C16-GGGHGPLG をリン酸緩衝液に、濃度 2 wt%となるように溶かしてゲルを作製し、これを凍結乾燥してキセロゲルを作製した。このキセロゲルを TEM 観察したところ、太さ数十 nm のナノファイバーを観察できた（図 1）。このナノファイバーは C16-GGGHGPLG が自己組織化し、これが絡まり合うことでゲル化に関与していると考えられる。

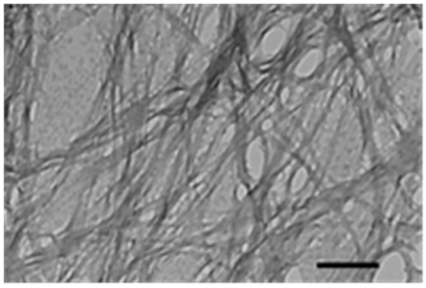


図 1. 透過型電子顕微鏡による 2 wt% C16-GGGHGPLG によるゲル観察
PBS をゲル化させ、これを凍結乾燥させてサンプルとした。（スケールバー：100 nm）。

合成したゲル化剤前駆体（C16-GGGHGPLGLGLARK）を 0.2 wt%でリン酸緩衝液に溶かしに、酵素 MMP-7（2 μg/ml）を添加するとゲル化することを確認した。このゲルについても透過型電子顕微鏡観察により、図 1 同様のナノファイバー構造を観察した。

C16-GGGHGPLGLGLARK のガン細胞への影響を評価するため、ヒト由来ガン細胞 5 種（HeLa、MIAPaCaII、SKBR3、MCF-7、A431 細胞）、ヒト由来正常細胞 2 種（MvE、PE 細胞）を用いて細胞毒性試験を行った。その結果、C16-GGGHGPLGLGLARK はガン細胞に対して強い毒性を示すが、正常細胞に対してはあまり毒性を示さないことが判明した（図 2a）。ここで用いている C16-GGGHGPLGLGLARK は細胞から分泌される MMP-7 によって、細胞毒性のあるゲル化剤（C16-GGGHGPLG）へと変換されることを想定している。そこでここで用いた細胞の MMP-7 分泌量を測定したところ、用いた 5 種のガン細胞が正常細胞 2 種に比べて高い MMP-7 分泌量を示した（図 2b）。つまり MMP-7 分泌量と C16-GGGHGPLGLGLARK の細胞毒性に相関があり、MMP-7 によって生じるゲル化剤（C16-GGGHGPLG）が細胞毒性に強く関連することが示された。

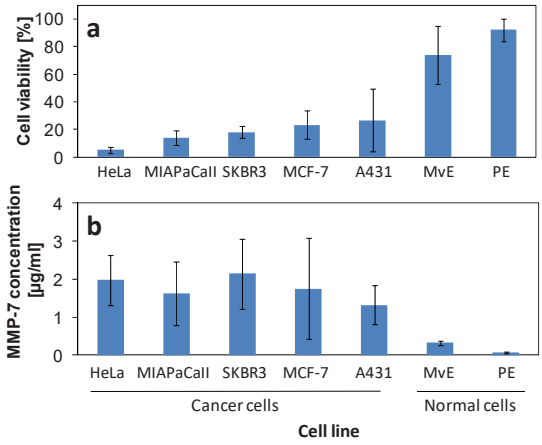


図 2. C16-GGGHGPLGLGLARK の毒性評価と各種細胞の MMP-7 分泌量

a) 各種細胞に対する C16-GGGHGPLGLGLARK（0.025 wt%）の毒性評価。

b) 各種細胞の MMP-7 の分泌量。

またこの C16-GGGHGPLGLGLARK の細胞毒性機構を解明するために、蛍光ラベル化したペプチド脂質を HeLa 細胞培地に添加した。その結果、HeLa 細胞内部で蛍光物質由来の蛍光が観察された。更にその蛍光物質の一部に強いレーザー光を当てて消光させ、その蛍光物質が時間経過と共に拡散するか確認した（光褪色後蛍光回復法：FRAP）。その結果、蛍光褪色後 40 分が経過しても細胞内部の蛍光が回復しなかった（図 3）。このことから細胞内部は流動性の低い状態、つまりゲル化した状態であることが示唆された。

また C16-GGGHGPLGLGLARK により死滅後の細胞破砕液を用いたゲル化試験でゲルの形成を確認した。このゲル化試験溶液を MALDI-TOF/MS で分析したところ、MMP-7 により加水分解後のゲル化剤由来の MS スペクトルが観測された。このことからも C16-GGGHGPLGLGLARK がガン細胞の分泌する MMP-7 によって加水分解され、ガン細胞内部で自己組織化することで細胞毒性を示していることが示唆された。

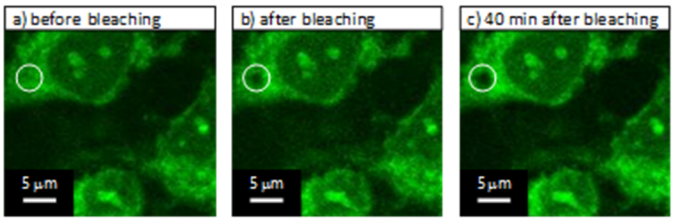


図 3. 共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）によるガン細胞（HeLa 細胞）内でのペプチド脂質観察

ペプチド脂質に蛍光物質を結合させ緑色蛍光を発するペプチド脂質を C16-GGGHGPLGLGLARK とともに培養細胞に添加した。図内の〇部分にフォトブリーチングを行い、蛍光の回復を調べた。

a）フォトブリーチング前、b）フォトブリーチング後、c）フォトブリーチング後 40 分経過後。

2. pH に応答してゲル化するペプチド脂質

一部のガン細胞やウイルスが感染した細胞では細胞内 pH が正常細胞より若干低いことが報告されている［3］。そこでここでは正常細胞内 pH 7.4 ではゲル化せず、pH 7 以下でゲル化するペプチド脂質の開発を行った。脂肪酸と短鎖ペプチドが結合したペプチド脂質の分子構造を 20 種類以上設計・合成し、微小 pH 変化応答性ペプチド脂質を探索した。その結果、C16-Val-Val-Ala-Glu-Glu-Glu (C16-VVAEEE) は、pH 7.4 ではゲル化せず、pH 7 以下でゲル化（自己組織化）することが明らかとなった（図 4）。C16-VVAEEE は炭素鎖の疎水性相互作用及び、Val、Ala の

β-シート形成能によって pH 6.8 付近では自己組織化が促進され、その結果ゲルが形成される。一方 pH 6.8 から pH が上昇すると Glu のカルボキシ基のプロトンが解離し、静電反発生じるようになる。その結果自己組織化（ゲル化）が阻害される。このようなプロセスによって、これまでにはない微小 pH 変化によるゾル／ゲル転移が可能となったと考えられる。

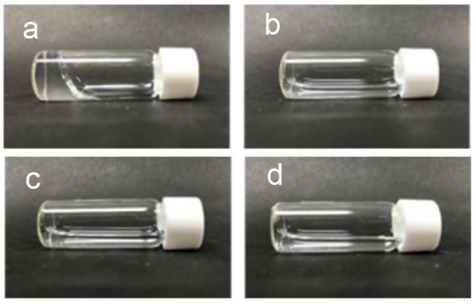


図 4.　0.15 wt% C16-VVAEEE によるリン酸緩衝液のゲル化試験
（a）pH 6.8、（b）7.0、（c）7.2、（d）7.4。

ヒト由来ガン細胞 3 種およびヒト正常細胞（MvE 細胞）の細胞内 pH を、pH 応答性蛍光物質と蛍光活性化セルソーティングシステムを用いて測定した（表 1）。その結果、HEK293 細胞は細胞内 pH が顕著に低く、pH 6.7 程度で有り、また HeLa 細胞も細胞内 pH は 7.1 程度と他の細胞（pH 7.5 程度）に比して低かった。

表1. 測定した細胞内pH

Cell line	pHi
MvE	7.5
A431	7.5
HeLa	7.1
HEK293	6.7

pHrodo™ Green AMを用いて細胞内pHを測定した。

C16-VVAEEE（0.0125 wt%）を添加し、ヒト由来ガン細胞 3 種およびヒト正常細胞（MvE 細胞）を 24 時間培養し、その生存率を測定した（図 5）。その結果、HEK293 細胞や HeLa 細胞に対して強い毒性を示したが、MvE 細胞や A431 細胞に対してはあまり毒性を示さなかった。この観測された生存率は細胞内 pH が低くなるにつれて低くなっていることが示された。前述の MMP-7 応答性ペプチドと同様に本件においても同様に細胞内でのペプチド脂質の自己 組織化が細胞毒性につながったものと考えている。また C16-VVAEEE および緑色蛍光ラベル化した C16-VVAEEE　類縁体（NBD-C12-VVAEEE）を HEK293 細胞に取り込ませ、共焦点蛍光顕微鏡による観察を行ったところ、細胞内核近傍にて緑色蛍光を確認できたことから、C16-VVAEEE が細胞に取り込まれていることが確認された。

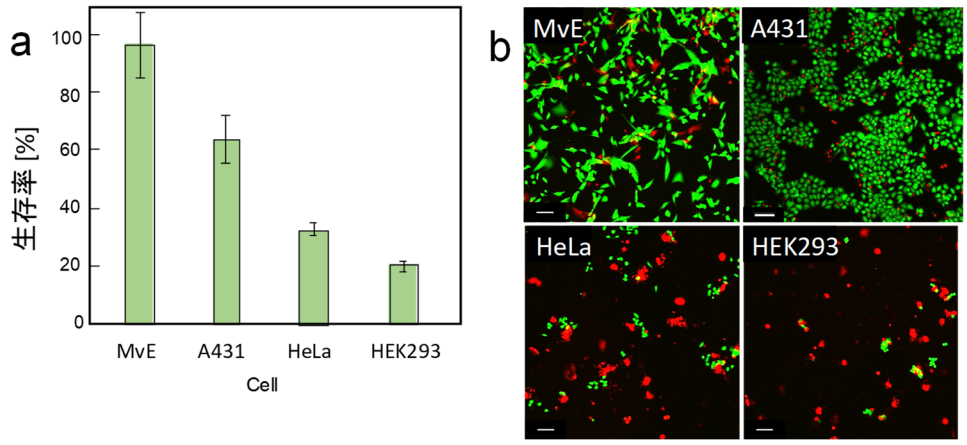


図 5. C16-VVAEEE の細胞毒性評価

a) MTT アッセイによる細胞生存率. C16-VVAEEE（0.05 wt%）添加して 24 時間後の細胞生存率を測定した。

b) 共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）による Live/dead アッセイ。緑色蛍光は生細胞、赤色蛍光は死細胞を示す（スケールバー：100 μm）。

3. まとめ

本研究では、「ガン細胞が過剰に分泌する酵素」および「わずかに低いガン細胞内 pH」の刺激に応答して自己組織化、ゲル化するペプチド脂質を開発した。これらのペプチド脂質をガン細胞に取り込ませることで、細胞内という極めて限定された空間のみでゲルを形成させ、細胞機能に損傷を与え、ガン細胞選択的に死滅させることに成功した。このペプチド脂質によるガン死滅は、従来と全く異なる作用機序で薬理活性を示すことから、ガン細胞選択的な薬剤として機能することが期待されるとともに、新たな薬理機構の提案につながると期待される。

文　献

1) Tanaka A, Fukuoka Y, Morimoto Y, Honjo T, Koda D, Goto M, Maruyama T. Cancer cell death induced by the intracellular self-assembly of an enzyme-responsive supramolecular gelator. J Am Chem Soc. 2015 Jan 21;137(2):770-5. PMID: 25521540 DOI: 10.1021/ja510156v

2) Koda D, Maruyama T, Minakuchi N, Nakashima K, Goto M. Proteinase-mediated drastic morphological change of peptide-amphiphile to induce supramolecular hydrogelation. Chem Commun (Camb). 2010 Feb 14;46(6):979-81. PMID: 20107670 DOI: 10.1039/b920359a

3) Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Avilés-Salas A, Marín-Hernández A, Carreño-Fuentes L, Maldonado-Lagunas V, Moreno-Sánchez R. Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. J Cell Physiol. 2008 Jul;216(1):189-97. PMID: 18264981 DOI: 10.1002/jcp.21392