

# 平成 24 年度 学内研究助成金 研究報告書

近畿大学

課題番号：KD11

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	細胞特異的マーカーのスクリーニング法と細胞分取システムの開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：産業理工学部 生物環境化学科 准教授 森田 資隆 共同研究者：産業理工学部 生物環境化学科 教授 河津 博文 産業理工学部 生物環境化学科 教授 藤井 政幸	

## 1. 研究目的・内容

本研究は、様々な種類の配列を含むペプチドライブラリーとして有用な薬剤候補を含む集団から、特徴的な細胞を特異的に認識して結合するペプチドや遺伝子創薬などに利用できる有用なペプチドなどを探索することを目的とした。そして、単離したペプチドを担体に固定したカラムを作製することにより、特異的に結合する細胞を分離するシステムの開発や、細胞上に提示されている細胞特有のマーカー分子を探索・特定し、細胞間のシグナル解析を行うツールの開発を目指すことを目的とした。

## 2. 研究経過及び成果

本研究では、ハイスループットテクノロジーとして注目されているコンビナトリアル・ペプチドライブラリーやバイオチップなどを用いて、神経成長因子 (Nerve Growth Factor: NGF) 様作用を持つペプチドのスクリーニングを行った。NGF は、神経細胞の分化を促す作用、神経細胞の生存を維持する作用、脳の損傷時に修復する作用などがあるタンパク質である。また、脳血管性痴呆やアルツハイマー型痴呆病の治療に有効であると注目されている。まず、マイクロチャンバー・アレイチップの作製は、シリコン基板にフォトリソグラフィ技術と異方性エッチングにより作製した。シリコン基板に酸化膜を形成させてフォトレジストを塗布し、その面にフォトマスクを接触させて紫外線を照射することで、パターンニングを行った。そして、余分なレジストと酸化膜を除去し、異方性エッチングを行い、マイクロチャンバー・アレイチップを作製した。そして、粒径 80  $\mu\text{m}$  のポリスチレン製のペプチド合成用レジンに側鎖保護基が結合したバリン (V)、イソロイシン (I)、メチオニン (M)、フェニルアラニン (F)、ロイシン (L) を用いて、自動ペプチド合成装置により、5 残基を持つペプチドを合成した。次に、このペプチドを用いて NGF 様作用ペプチドのスクリーニングを行った。まず、マイクロチャンバー・アレイチップ上に、合成したオンビーズ・ペプチドライブラリーを配置した。ラット副腎褐色細胞由来 PC12 細胞は、コラーゲンタイプ水溶液を塗布したスライドガラス上に添加し、ビーズを配置したマイクロチャンバー・アレイチップを張り合わせることで細胞チップとした。この細胞チップ培養液中で 37°C、5% 二酸化炭素雰囲気下で 3 日間、細胞を培養し、NGF 作用ペプチドのスクリーニングを行った。その結果、チャンバー内でペプチドの影響で神経突起の伸張が生じた細胞が見つかった。そこで、チャンバー内からマイクロマンピペーターを用いてビーズを取り出し、プロテインシークエンサーを用いてアミノ酸配列決定を行ったところ、アミノ酸配列が M-M-V-I-F のペプチド A を得ることができた。この NGF 様作用を持つと思われる、ペプチド A の神経突起の伸長に対する特性を調べた。まず、ペプチド A、もしくは NGF とコントロールペプチド (アミノ酸配列: V-V-V-V-V) をそれぞれ PC12 細胞に加え、37°C、5% 二酸化炭素雰囲気下で培養し、1 日ごとに神経突起の伸張の割合を調べた。この際、細胞自身から 2 倍以上神経突起が伸張した細胞を、神経突起の伸張が起こった細胞とした。その結果、ペプチド A と NGF は、時間に依存して神経突起の伸張が見られたが、コントロールペプチドでは、神経突起の伸張がほとんど見られなかった。培養から 4 日目には、ペプチド A を加えたときに約 15% の伸張が見られ、NGF を加えたときには約 70% の伸張が見られた。このように、ペプチド A は、PC12 細胞において、神経突起の伸張を起こす作用があることがわかった。

また、様々な細胞に分化する前の幹細胞を分取するシステムの構築を目指し、幹細胞を模した

細胞として、神経細胞に分化するマウス胚性腫瘍由来 P19C6 細胞、および P19 細胞、心筋細胞に分化するマウス胚性腫瘍由来 P19CL6 細胞を培養した。これらの多分化能と自己複製能を有する未分化な細胞から、特異的な細胞マーカーを探索した。方法としては、ファージディスプレイ法を用いて、分化した細胞には結合せず、未分化な細胞のみを特異的に認識して結合するペプチドの探索を試みた。その結果、未分化状態の P19 細胞に結合するペプチド配列：A-L-P-S-T-S-S-Q-M-P-Q-L を提示しているファージペプチドが得られた。このファージペプチドを用いた蛍光免疫アッセイにより、このファージペプチドが選択的に未分化状態の P19 細胞に結合することが分かり、さらに固相合成法により化学的に合成したペプチドのみでも、未分化状態の P19 細胞に結合するということが示された。そして、このペプチドを担体に固定したカラムを作製し、これを用いて未分化細胞を分離するシステムの開発を行い、ターゲット細胞上に提示されている幹細胞特有のマーカー分子（幹細胞マーカー）の探索を試みた。しかし、カラムからの溶出の際に得られるタンパク質量を調べたところ、期待される数値が得られなかった。

さらに、癌細胞に特異的に発現する hTERT 遺伝子や bcr/abl 遺伝子をターゲットとして、それぞれの遺伝子に特異的な siRNA と核外輸送シグナル (NES) ペプチドのコンジュゲート体を、独自に開発した固相フラグメント縮合法により合成し、その siRNA-NES コンジュゲートを用いて、それぞれの標的遺伝子をサイレンシングした。その結果、天然型 siRNA によるサイレンシング効果をはるかに上回る効果が得られた。例えば、慢性骨髄性白血病細胞 K562 に発現する bcr/abl 遺伝子は天然型 siRNA では約 60% しかサイレンシングされないが、siRNA-NES コンジュゲートでは 95% 以上のサイレンシング効果が観測できた。さらに、siRNA を毒性なく細胞に導入することのできるペプチドを探索したところ、ある種の両親媒性ペプチド (P-fect) と siRNA の複合体が効率よく細胞内に導入されることを見出した。この P-fect は静電的相互作用により  $\beta$ -シート構造をとりながら 2 重鎖核酸のグループに沿って結合し、掲載された複合体の外側表面は疎水性となることから、細胞膜を容易に透過することができるようになったと考えられる。P-fect と siRNA の複合体は細胞に対して全く毒性がなく、しかも、血清中でヌクレアーゼに対して分解されず、その半減期は天然型 siRNA の 2.5 時間から 48 時間以上に大きく伸長した。その結果、P-fect と siRNA-NES コンジュゲートの複合体を用いることにより、bcr/abl 遺伝子を 95% 以上サイレンシングすることに成功した。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

今後は、ペプチド A による PC12 細胞への神経突起の伸長の割合や濃度依存性など、ペプチド A の神経突起の伸長に対する様々な特性を調べ、ペプチド A の PC12 細胞への神経突起伸長のメカニズムや細胞上の受容体の探索などを行い、医薬品などへの応用研究を行う予定である。また、ファージディスプレイ法を用いて、様々な種類のペプチド配列が提示されたコンビナトリアル・ペプチドライブラリーから、神経細胞や心筋細胞に分化する前の未分化な幹細胞などを特異的に認識して結合するペプチドの探索を網羅的に行い、様々な幹細胞に特異的に結合するペプチド分子のデータベースの構築を目指す。そして、単離されたペプチドを担体に固定したカラムを作製し、これを用いて未分化細胞を分離するシステムの開発を行い、ターゲット細胞上に提示されている未分化細胞特有のマーカー分子（幹細胞マーカー）を特定し、幹細胞のシグナル解析を行うツールの開発を目指す予定である。さらに、P-fect と siRNA-NES コンジュゲートの複合体を用いて、*in vivo* における bcr/abl 遺伝子のサイレンシングに応用し、医薬品としての実用化に向けた研究を行う予定である。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
生物工学会誌	雑誌	2012 年 5 月
244 <sup>th</sup> ACS National Meeting	ポスター発表	2012 年 8 月 19 日

Organic & Biomolecular Chemistry	雑誌	2012 年
Journal of Peptide Science	雑誌	2012 年
日本薬学会第 132 年会	口頭発表	2012 年 3 月 28-31 日
8 <sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society	口頭発表	2012 年 10 月 28-31 日
Langmuir	雑誌	2012 年
分析化学	雑誌	2012 年
プラスチックエージ	雑誌	2012 年
11 <sup>th</sup> International Conference on Sustainable Energy Technologies	口頭発表	2012 年 9 月 5 日
10 <sup>th</sup> International Conference on Nano-Molecular Electronics	ポスター発表	2012 年 12 月 12 日
Journal of Bioscience and Bioengineering	雑誌	2011 年 8 月
第 48 回化学関連支部合同九州大会	ポスター発表 (2 件)	2011 年 7 月 9 日
日本農芸化学会 2011 年度大会	口頭発表	2011 年 3 月 25 日
Progress in Drug Delivery Systems	雑誌	2011 年
Journal of Nucleic Acids	雑誌	2011 年
6 <sup>th</sup> Cambridge Symposium	口頭発表	2011 年 9 月 4-7 日
第 38 回核酸化学シンポジウム	口頭発表	2011 年 11 月 9-11 日
Journal of Nano-particle Research	雑誌	2011 年
ネットワークポリマー	雑誌	2011 年
6 <sup>th</sup> International Symposium on Feedstock Recycling of Polymeric Materials	口頭発表	2011 年 11 月 6 日
第 9 回近畿大学環境科学研究会	口頭発表 (2 件)	2010 年 7 月 10 日
第 47 回化学関連支部合同九州大会	ポスター発表 (2 件)	2010 年 8 月 8 日
Molecular BioSystems	雑誌	2010 年
Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids	雑誌	2010 年
The 6 <sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society	口頭発表 (2 件)	2010 年 10 月 20-23 日