

学 位 論 文 題 名

Identification of a novel peptide ligand for caveolae targeting and its application for an efficient siRNA delivery

(新規カベオラ標的化ペプチドリガンドの同定と効率的な
siRNA デリバリーへの応用)

学位論文内容の要旨

Targeting the gene vector to a specific organ after an i.v. administration is an ideal strategy for non-invasive gene therapy. It has been demonstrated that the mechanism underlying passive tumor accumulation can be achieved by prolonging the blood circulation and controlling the size. This phenomenon is known as enhanced permeability and retention (EPR) effect. In tumor, neovascular structure is immature. Therefore, small particle (< 200 nm) pass through the vasculature via paracellular route. To regulate a stability in blood circulation, polyethylene glycol (PEG) was generally modified on the surface of liposomes. This modification is also useful for controlling the size. Therefore, grafting ligand on the liposomes membrane is essential for the targeting of tissue. In the present study, I intended to identify a novel targeting peptide, which can target endothelial cells derived from muscle and adipose tissue by in vivo phage display technique.

Within the phage genome, the 21 mer of DNA encoding a random 7 amino acids were inserted in the pIII protein expressed on the M13 phage. In the screening of new ligands, phage display libraries were injected to mouse via the tail vein. Successive rounds of phage injection were performed to increase their binding to endothelial cells. Candidate peptides were refined from 96 clones isolated from muscle or adipose based on our original algorithm, in which homology among each peptide sequence was taken into consideration. We selected clone 52 (IRQ peptide) since it showed the highest accumulation to the muscle confirmed by i.v. administration. In the biodistribution study, conjugation of the IRQ to the

terminal of PEG moiety significantly enhanced accumulation of PEG liposomes to adipose. Based on this results, the novel peptide was identified, IRQ peptide, which promotes targeting to endothelial cell of adipose.

Pharmaceutical application of the IRQ peptide was investigated to deliver therapeutic agents such siRNA into the cytosol. To achieve this purpose multifunctional envelope-type nano device (MEND), a concept of program packaging of therapeutic agent, has been established. The siRNA was first condensed with polycation followed by coating the condensed particle with lipid envelope. The MEND was modified with the IRQ and ability for siRNA of interest in cytosolic delivery was investigated. By optimizing the topology, density and lipid composition of the vector, the MEND induced the significant silencing siRNA effect. These results prompt to investigate uptake mechanism and intracellular trafficking of IRQ-modified liposomes. Generally, liposomes are taken up via clathrin-mediated endocytosis (CME). However, IRQ-modified liposomes depicted a unique characteristics. IRQ-modified liposomes were internalized into cells via caveolar endocytosis along with CME. Collectively, the results presented in this study show that the discovered IRQ peptide is useful as targeting ligand for adipose. This IRQ peptide promotes internalization into cells via caveolar endocytosis. It is generally accepted that caveolar endocytosis plays a role in transcytosis. Therefore, the IRQ may have great potential for delivery therapeutic agents by transcytosis to overcome the endothelial barrier. Finally, IRQ-modified liposomes is potent in releasing the encapsulated siRNA into the cytosol to induce significant silencing effect.

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	原 島 秀 吉
副 査	助教授	紙 谷 浩 之
副 査	教 授	横 沢 英 良
副 査	助教授	川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

Identification of a novel peptide ligand for caveolae targeting and its application for an efficient siRNA delivery

(新規カベオラ標的化ペプチドリガンドの同定と効率的な
siRNA デリバリーへの応用)

2型糖尿病治療などの疾患治療を行う上で、糖代謝に大きく関与する脂肪組織への遺伝子／薬物デリバリーシステムを構築する事は有用である。ディッキームダキュル氏は、その為に必要な、骨格筋へのターゲッティングリガンドを検索する為、*in vivo* phage display 法により筋肉及び脂肪組織に移行性を示すペプチド配列の同定をおこなった。任意の7アミノ酸をコードするM13ファージ由来のファージライブラリをマウスに尾静脈投与し、一定時間後に脱血し、臓器からファージを回収した。得られたファージをさらに増幅し、再度、尾静脈投与した。このサイクルを3回繰り返し、筋肉及び脂肪組織を回収した。本作業を繰り返すにつれて、徐々に回収されるファージ量が上昇した。3回目に筋肉及び脂肪組織より回収されたファージを96個回収し、シーケンスを評価した。得られた96個のファージのシーケンスを互いに比較することによって、候補となるペプチドシーケンスの絞込みを行った。両組織ともに、イソロイシンとグルタミンを含み、アルギニンに富むペプチド配列が多くとれた。筋肉より得られた20個の候補ファージを尾静脈内投与し、どれがもっとも骨格筋に集積するかを解析した。その結果、IRQRRRRという配列を持つファージがもっとも骨格筋に集積することが明らかとなった。また、本ペプチドをPEG化リポソームの表面に修飾し、尾静脈投与を行った結果、本リポソームは筋肉よりむしろ脂肪組織に

対して高い蓄積性を示す事が明らかとなった。このことから、本ペプチドは、リポソームなどのキャリアに修飾した際には、脂肪組織へのターゲッティングペプチドとして機能することが明らかとなった。

また、細胞への取り込み経路を探索するために、ペプチドを修飾したリポソームの細胞内取り込みを評価した。コントロールとして、配列が非常に類似し、マクロピノサイトーシスで取り込まれると知られるオクタアルギニン修飾リポソームを用いた。クラスリン介在性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス、カベオラの阻害剤として知られるスクロース、アミロライド、フィリピンにより細胞を処理し、その後の細胞内取り込み活性を評価した。オクタアルギニン修飾リポソームの場合、アミロライドによってのみ阻害がかかることが明らかとなった。一方、I R Qペプチド修飾リポソームについては、アミロライドによる阻害は全く受けなかった。興味深いことに、本リポソームの取り込みは、フィリピンによって阻害をうけることが明らかとなった。このことから、本リポソームは、配列上はたった2つのアミノ酸しか違わないにもかかわらず、カベオラという非常にユニークな経路で細胞内に取り込まれることが明らかとなった。カベオラは、血管内皮細胞において、トランスサイトーシス経路に非常に重要な役割を果たしていると考えられており、本リポソームは、将来的に血管内皮バリアを突破して、組織実質まで物質を送達可能なシステムとなることが期待できる。

最後に、本 I R Q ペプチド修飾リポソームに siRNA を封入し、遺伝子のノックダウン実験をおこなった。siRNA をステアシル化オクタアルギニンによって凝集体形成を行い、さらに、エンドソーム脱出能力の高い脂質によって封入した際、安定に発現した遺伝子の抑制効果は、70%以上にまで及ぶことが明らかとなった、このことから、本 I R Q ペプチドは、siRNA デリバリーへ応用できる可能性が考えられる。

以上、ディッキームダキュル氏の研究は、脂肪組織への標的化と、カベオラへの標的化という二つの機能を有するユニークなペプチドを探索することに成功し、siRNA への応用の可能性を示したという点で非常に興味深くかつ有用であり、博士論文として十分な価値を有するものであると考えられる。