

原 著

細胞内移行性ペプチドの細胞内移行能評価法とそのカインेटクス解析

深澤 美景, 深畑 早紀, 安保 明博

A More Accurate Method for Assessment of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptide (CPP)-Conjugated Cargo and its Delivery Kinetics

Mikage FUKASAWA, Saki FUKAHATA, and Akihiro AMBO

(Received November 20, 2016)

Cell-penetrating peptides (CPPs) are able to penetrate cell membrane and transport various cargoes into cells. It is a promising strategy to transport therapeutic agent by using CPPs as carrier into the cells. An accurate method for assessment of cellular uptake of CPPs can help to develop more potent carriers for drug delivery. For this reason, we designed a CPP-conjugated cargo which nonarginine peptide labeled with 4-[(4-dimethylamino)phenylazo]benzoyl (Dabcyl, fluorescence quencher) was coupled to a fluorescein-5(6) carbonyl (FAM)-labeled dipeptide cargo via a disulfide bond and assessed the cellular uptake of the CPP-conjugated cargo by flow cytometry using ImageStream® technology. When K562 cells were treated with 5 μ M of the peptide at 37°C in 10%FBS/RPMI1640 medium, the peptide uptake was observed in a concentration- and time-dependent manner and reached its maximum in about 60 minutes. Also, the rate constants of absorption and elimination of FAM-cargo peptide were determined by regression analysis; $k_a = 30.79 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $k_e = 9.287 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, respectively. Furthermore, cellular uptake was significantly affected by diluting by PBS(-) before measurement. This result suggests that washing cells with PBS(-) may cause artifacts leading to a misestimation of cellular uptake rate, similar to cell fixation.

Key words — cell penetrating peptide; fluorescence resonance energy transfer (FRET); flow cytometric analysis; kinetics analysis

緒 論

細胞膜透過性ペプチド (CPP) と呼ばれる一連のペプチドは細胞膜を通過し, 細胞内へと移行する性質を持つ. そのため細胞内への送達キャリアとしての応用が種々検討されている.¹⁻⁶⁾ 最初の CPP ともいえる Tat ペプチドの細胞内移行性^{7,8)} が報告されてからこれまで 20 年以上にわたって多数の CPP が見いだされ, それらの細胞内移行能の評価や細胞内移行メカニズムについて研究が行われてきている. CPP の細胞内移行メカニズムにはカベオリンやクラスリンが介在するエンドサイトーシスやペプチドが直接的に細胞膜を透過するメカニズム (direct penetration) などが提唱されており,^{9,10)} 特にアルギニンリッチな CPP ではマクロピノサイトーシス, すなわち細胞膜周辺のアクチンフィラメントが重合することにより細胞膜が外側に突き出し, 細胞内に取り込まれる形式の関与

が示唆されている.^{11,12)}

これまでの CPP 研究で用いられている細胞内移行能の評価には様々な問題がある. 例えば CPP や細胞などの実験条件が異なっており, 報告間での比較が難しい. また, 多くの研究は蛍光標識 CPP の取り込みにより評価されていて, 実際のバイオアベラビリティと一致しないことも少なくない. 特にカチオン性 CPP では細胞膜表面への結合があり, 一般的なフローサイトメーターでは細胞の蛍光強度を測定しても, 細胞表面の結合と細胞内取り込みとを区別することができない. これらを区別するためには, 細胞表面に結合した蛍光標識 CPP をトリプシン処理により除去しなくてはならない.¹³⁾ 一方, 共焦点顕微鏡での蛍光観察では細胞表面に結合した蛍光標識 CPP を除去することなく細胞内外の区別のみならず, エンドソーム, 核のいずれに局在するかの区別が容易である. しかし, 観察できる個数が限られているために細胞集

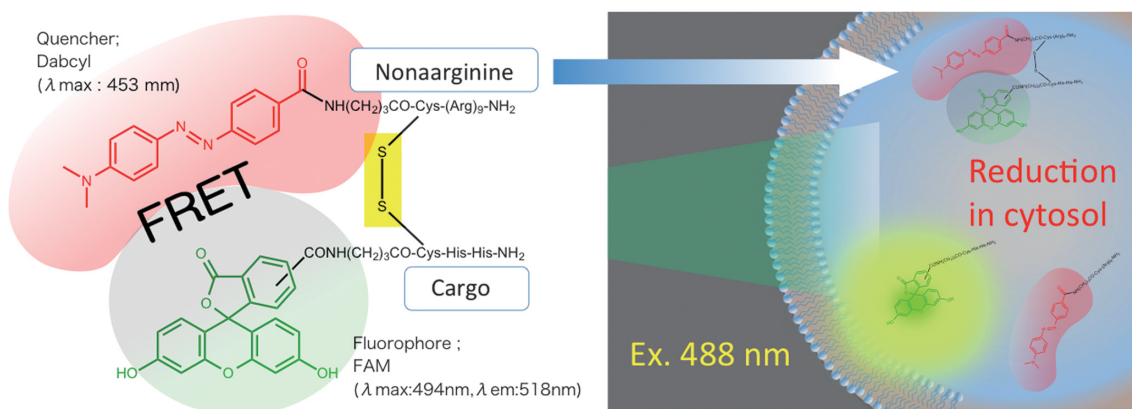


Fig. 1. Determination of cellular uptake using Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH. The peptide are constructed from FAM- and Dancyl-fragments linked by a disulfide bond. FAM fluorescence is quenched by the Dancyl group when in close proximity. In intracellular reductive condition, cleavage of the disulfide bond causes dequenching, and fluorescence emission by FAM group.

団全体を反映しているとは言い難い。加えて、メタノールなどによる緩和な固定処理でもアーティファクトを生じることが知られている。¹⁴⁾ さらに、取り込み量の評価方法として CPP 処理細胞のライセートを用いた分光分析や HPLC¹⁵⁾ 分析あるいは MALDI-TOF 質量分析による定量^{16,17)} などが行われている。最近では Rezgui らが細胞内取り込み量測定における正確さを目指した方法としてセルソーター (BD FACSAria III) と蛍光相関分光法の組み合わせを用い、CPP の細胞内移行をカイネティクス解析している。¹⁸⁾

以上のとおり現状では細胞内移行能の測定作業が煩雑なうえ、様々な問題が含まれていてカイネティクス解析を正しくかつ簡便に行う方法がない。そこで Fig. 1 に示す測定原理に基づく測定法を考案した。使用する CPP (図ではノナルギニン) は N 末端部に Gab-Cys を介して 4-[(4-dimethylamino) phenylazo]benzoyl (Dabcyl) 基を付加し、カーゴ (CPP に運搬させる荷物。図ではジヒスチジンペプチド) には同様に N 末端部に Gab-Cys を介して fluorescein-5(6)carbonyl (FAM) 基を付加した (後述するがこの FAM 基を持つジヒスチジンペプチドは単独ではほとんど細胞内に移行しない)。これら 2 つのペプチドを互いの Cys 間でジスルフィド結合により連結させる (以下 Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH と表す)。FAM 基は 490 nm 付近の光で励起すると 520 nm 付近の蛍光を発する。しかし連結ペプチドでは隣接した部位に Dabcyl 基があり、その蛍光が吸収されるため観察されない (FRET 現象)。この連結ペプチドが細胞質内に入

ると還元的環境によって速やかにジスルフィド結合が開裂し、CPP とカーゴとの距離が離れる。その結果、FRET 現象が解消されると CPP によって運搬されたカーゴに由来する FAM 基の蛍光が観察されるようになる。すなわちペプチドが細胞内に取り込まれたときに初めて蛍光が観察されるため、評価上問題となっている細胞外に結合した CPP による影響を除外できる。細胞内の蛍光強度は ImageStream[®]X Mark II Imaging Flow Cytometer (Merck) を用いて分析を行ない、細胞内取り込み量を評価する。ImageStream[®] は測定した細胞像によりフローサイトメトリー解析を行うため、細胞内の蛍光の局在なども解析できる利点を持つ。

本研究では以上の原理に基づく測定法によって CPP の細胞内移行能の評価が的確に行えるか否かを検討した。

実験材料および方法

1. 合成ペプチドの諸分析

分析 HPLC では、COSMOSIL AR-II カラム (2.0×150 mm, nacalai tesque) を用いて、溶出液 A 液 (0.06% TFA) および溶出液 B (0.06% TFA 含有 80% アセトニトリル) を移動相として、流速 0.4 mL/min, 40 分間で 10%B から 50%B となるような直線的濃度勾配で溶出した。ペプチドの溶出は 220 nm あるいは 500 nm (Dabcyl 化ペプチド) の吸収によりモニターした。MALDI-TOF 質量分析は Autoflex II (Bruker Daltonics) を用い、標準

的プロトコルにて測定した。マトリックスには α -4-シアノ- β -ヒドロキシ桂皮酸を用いた。ペプチドの蛍光特性として、ペプチドを RPMI 1640 培地に溶解し (20 μ M), プレートリーダー Infinite[®]M1000 (TECAN) を用い, 488 nm で励起したときの 450 nm から 750 nm における蛍光強度を測定した。

2. ペプチドの合成

保護ペプチド樹脂は, 一般的な Fmoc 固相合成法により構築した。Fmoc-NH SAL 樹脂 (0.58 mmol/g, 渡辺化学) を出発樹脂として, ペプチド鎖を延長した。¹⁹⁾ 脱 Fmoc 化は PIP/DBU/DMF (2:2:96) を用い, 縮合反応は樹脂に対して 2 当量の Fmoc-アミノ酸を 2 当量の 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU)/1-hydroxybenzotriazole (HOBt) および 4 当量の diisopropylethylamine (DIPEA) 存在下 30 分間反応させた。保護アミノ酸には, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Gab-OH, Fmoc-His(Trt)-OH を用いた。Dabcylation は, 固相樹脂に対して 2 当量の Sodium 4-[(4-Dimethylamino)phenylazo]benzoic acid を 2 当量の HBTU/HOBt および 4 当量の DIPEA 共存下 30 分間反応させた。FAM 化は, 5 (6)-carboxyfluorescein (Fluka) を樹脂に対して 2 当量, HBTU/HOBt を 3 当量および 6 当量の DIPEA を用い, DMF 中で 2 時間反応させた。

1) Dabcylation-Gab-Cys-(Arg)₉-NH₂

出発樹脂として Fmoc 固相樹脂 (0.58 mmol/g, 200 mg), Cys 残基導入に Fmoc-Cys(Trt)-OH を用いた。構築した保護ペプチド樹脂 (380 mg) を 5% phenol/2.5% triisopropylsilane (TIS)/trifluoroacetic acid (TFA) 溶液中で 1 時間攪拌し, 最終脱保護および樹脂からのペプチド脱離を行った。TFA 溶液を減圧濃縮した後, 無水エーテルを加え, ペプチドを沈殿させた。得られた粗ペプチド画分 (495 mg) を Develosil ODS カラムにて 220 分間で 15-55%B となる直線的濃度勾配で溶出した。目的物の分子イオンピークを示し, 95%純度を示す画分を集め, 濃縮したのち, 凍結乾燥した。最終的に精製ペプチドを 53.3 mg 得た (出発樹脂から求めた収率は 24.7%)。分析 HPLC: $t_R = 18.88$ 分, MALDI TOF-MS: *Calcd for* C₇₆H₁₃₆N₄₂O₁₂S₁: *m/z*: 1861.1043. *Found*: 1862.7260 ([M+H⁺]).

2) FAM-Gab-Cys(Npys)-(His)₂-NH₂ および FAM-Gab-Cys-(His)₂-NH₂

出発樹脂として Fmoc 固相樹脂 (0.58 mmol/g, 800 mg), Cys 残基導入に Fmoc-Cys(Acm)-OH を用いた。構築した保護ペプチド樹脂を 10 mL の 5% Phenol/TFA 溶液中で 2 時間攪拌し, 最終脱保護および樹脂からのペプチド脱離を行った。TFA 溶液を減圧濃縮したのち, 無水エーテルを加え, ペプチドを沈殿させ, 粗ペプチド画分 (770 mg) を得た。次いで Acm 基の Npys 基への変換を行うため, すべての粗ペプチド画分を 6 mL の TFA/AcOH (1:1) 溶液に溶解し, Npys-Cl (133 mg) を加え, 室温で 4 時間激しく攪拌した。反応完結を HPLC で確認した。得られたペプチドを Develosil ODS カラムにて 220 分間で 20-60%B となる直線的濃度勾配で溶出した。95%純度を示す画分を集め, 濃縮したのち, 凍結乾燥した。最終的に FAM-Gab-Cys(Npys)-(His)₂-NH₂ を 179 mg 得た (出発樹脂から求めた収率は 39.1%)。分析 HPLC: $t_R = 24.78$ 分, MALDI TOF-MS: *Calcd for* C₄₅H₄₁N₁₁O₁₂S₂: *m/z*: 991.2378. *Found*: 992.3890 ([M+H⁺]).

また, 本合成条件下で副生成物として生じたジスルフィド二量体を pH 7 付近にてジチオトレイトール (DTT) により還元した。Develosil ODS カラムにて 220 分間で 20-60%B となる直線的濃度勾配で溶出し, 最終的に FAM-Gab-Cys-(His)₂-NH₂ を 8.7 mg 得た。分析 HPLC: $t_R = 17.57$ 分, MALDI TOF-MS: *Calcd for* C₄₀H₃₉N₉O₁₀S₁: *m/z*: 837.2541. *Found*: 838.3400 ([M+H⁺]).

3) 連結ペプチド (Dabcylation~R9_SS_FAM~CHH)

精製した Dabcylation-Gab-Cys-(Arg)₉-NH₂ (28 mg) を水 500 μ L に溶解し, 次いで FAM-Gab-Cys(Npys)-(His)₂-NH₂ のメタノール溶液 (およそ 15 mg/mL) を 1 mL 加えて, 37°C で 30 分間振とうした。未反応の FAM-Gab-Cys(Npys)-(His)₂-NH₂ をクエンチングするために Cys (100 mg) を加えた。反応混液を濃縮後, Develosil ODS カラムにて 220 分間で 10-50%B となる直線的濃度勾配でペプチドを溶出した。最終的に連結ペプチドを 12.2 mg 得た (収率 31.2%, 反応に用いた Dabcylation-Gab-Cys-(Arg)₉-NH₂ から算出)。分析 HPLC: $t_R = 23.44$ 分, MALDI TOF-MS: *Calcd for* C₁₁₆H₁₇₃N₅₁O₂₂S₂: *m/z*: 26963.427. *Found*: 2698.0920 ([M+H⁺]).

3. 細胞および培養

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 細胞は, 東北大学加齢医学研究所細胞資源センターより供給さ

れたものを用いた。細胞は、10%非働化牛胎児血清 (FBS) を含む RPMI 1640 培地中で 37°C, 5%CO₂ 条件下で培養した。細胞の計数は、細胞液 10 μL とトリパンブルー (TB) 10 μL を混合したものを専用カウンティングスライドにマウントし、TC20TM 全自動セルカウンター (BIO-RAD) にて生細胞数を測定した。

4. ペプチドの細胞内移行能の評価

K562 細胞懸濁液 (5×10⁶ あるいは 1×10⁷/mL) 40 μL 中に任意の濃度となるようにペプチドを添加し、一定時間後、ImageStream®X Mark II Imaging Flow Cytometer に細胞 10000 個を取り込ませ、細胞内蛍光強度を測定した。特に断らない限り、細胞は希釈、洗浄など行わずに装置に取り込ませた。すべての実験の撮像における蛍光検出感度を一定にした。また、10%FBS/RPMI 1640 培地中 5 μM 処理、37°C, 1 時間後の細胞内移行による蛍光強度分布の幾何平均 (Geo. Mean) を 100% として、個々のデータを相対強度で示した。データ解析には IDEAS® (Merck) を用いた。

ヨウ化プロピジウム (PI) 染色では、K562 細胞 (5×10⁶ あるいは 1×10⁷/mL) 40 μL に PI/DMSO 溶液 (1 mg/mL) を RPMI 1640 培地で 100 倍に希釈した溶液 10 μL (最終濃度 2 μg/mL) を加え、攪拌した後 30 分以上静置した。PI 処理した細胞に適宜 R9 連結ペプチドを添加し測定を行った。トリパンブルー (TB) 添加による解析では、0.5%TB 染色液を 10%FBS/RPMI 1640 培地で 5 倍に希釈し、細胞懸濁液に測定 5 分前に 2 μL を添加した。

5. ペプチドの細胞内移行のカイネティクス解析

ペプチドによる細胞内の蛍光強度の増強が吸収 (ペプチドの細胞膜通過から細胞質への移動と還元によるペプチドの遊離) と消失の 2 つの過程において 1 次速度変化する 1 コンパートメントモデルであると仮定した。実験から得られる Geo. Mean の相対蛍光強度から GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software) のカーブフィッティング機能を利用し、以下の 2 つの式から誘導されるモデルの最大相対蛍光強度 (FI_{max}), 吸収速度定数 (k_a) および消失速度定数 (k_e) を算出した。なお、 FI_t は時間 t における相対蛍光強度であり (1) 式から得られる。また、 FI_0 は時間 0 における全ペプチドが開裂した場合に得られる相対蛍光強度であるが、ImageStream® による測定では得ることができないため、(2) 式から導いた。

$$FI_t = \frac{FI_0 k_a}{k_a - k_e} (e^{-k_e t} - e^{-k_a t}) \quad (1)$$

$$FI_{max} = FI_0 \left(\frac{k_e}{k_a} \right)^{k_e / (k_a - k_e)} \quad (2)$$

結 果

1. 連結ペプチド Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH の蛍光特性

連結ペプチド Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH を、RPMI 1640 培地に溶解し (20 μM), プレートリーダーにより 450 nm から 750 nm における蛍光強度をスキャンしたところ、FAM 基の最大蛍光波長である 520 nm 付近に蛍光が観察されなかった (Fig. 2)。一方、DTT 処理した場合には 520 nm 付近に顕著な蛍光強度の増大が認められた。また、RPMI 1640 培地に溶解して 12 時間以上放置した場合は 520 nm 付近での蛍光が DTT 処置に対し 1/6 程度まで増大した。なお、データには示さないが PBS (-) 中 1 時間以内には RPMI 1640 培地と同様な蛍光スペクトルが見られ、24 時間放置後でも蛍光強度の増強が認められなかった。

2. ペプチドの細胞内移行性

カーゴとする FAM-Gab-Cys-(His)₂-NH₂ を細胞に添加したのち 60 分間の細胞内移行を測定した。Fig. 3 にはペプチド添加後 60 分の蛍光強度のヒス

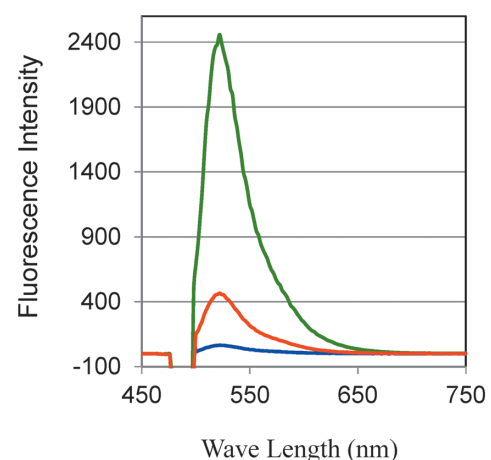


Fig. 2. Fluorescence property of Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH in RPMI1640 medium. Fluorescence spectra are shown before (blue) and after (green) reduction by dithiothreitol. Red line shows the emission curve of peptide solution without dithiothreitol over 12 hours.

トグラムおよび ImageStream[®] で取り込まれた細胞像を示す。分布から、およその細胞では細胞内の蛍光強度が小さく、画像からも細胞外に強い蛍光が観察された。

次に 37°C, 10%FBS/RPMI 1640 中の K562 細胞に 5 μ M となるように Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH を添加し、5 分から 120 分後まで経時的に ImageStream[®] で測定した。グラフには 5 μ M 処理, 37°C, 1 時間後の細胞内移行による蛍光強度分布の

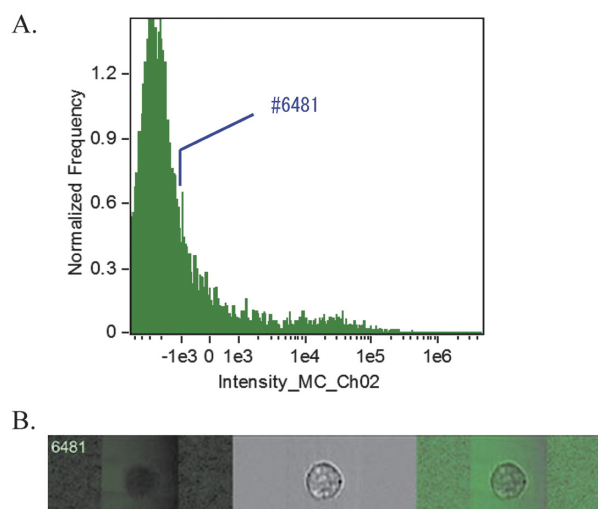


Fig. 3. Flow cytometry analysis on K562 cells treated with FAM-Gab-Cys-(His)₂-NH₂ (5 μ M) using ImageStream[®]. (A) The histogram represents intracellular emission intensity. (B) Representative images of cells acquired in ImageStream[®]; FAM fluorescence (left), bright field (middle) and merged images (right).

Geo. mean を 100% として、個々の Geo. mean の相対蛍光強度をプロットした。Fig. 4A に示すように Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH を K562 細胞に添加すると時間の経過とともに蛍光強度が増加し、60 分頃のピークを境に蛍光強度が低下する変化を示した。Fig. 4B に各種濃度の Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH を添加したときの 1 時間後の相対蛍光強度を示す。500 nM から 10 μ M の範囲でペプチドの濃度依存的に細胞内の蛍光強度は増大した。

3. ペプチドの細胞内移行に対する培地中血清濃度あるいは PBS(-) 希釈による影響

2%FBS/RPMI 1640 培地, 無血清の RPMI 1640 培地あるいは PBS(-) 中で細胞に Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH (終濃度 5 μ M) を添加し、37°C で加温したのち任意の時間に細胞内蛍光強度を測定した。10%FBS/RPMI 1640 培地中で行ったものと比較したところ (Fig. 5A), いずれの条件でも 10%FBS/RPMI 1640 培地よりも高い細胞内蛍光強度が認められた。RPMI 1640 培地間でピーク時の最大相対蛍光強度を比較すると 2%FBS, 無血清ではそれぞれ 153%, 163% と FBS 濃度が低くなるに従って蛍光強度が増大した。無血清の RPMI 1640 培地と PBS(-) を比較すると最大相対蛍光強度はほぼ同程度であったが、ピークに達する時間はそれぞれ 60 分, 30 分となり PBS(-) の方が短かった。また、ピーク後の減少の割合は PBS(-) の方が大きく、添加 120 分後では無血清の RPMI 1640 培地よりも 20% 以上も下回った。

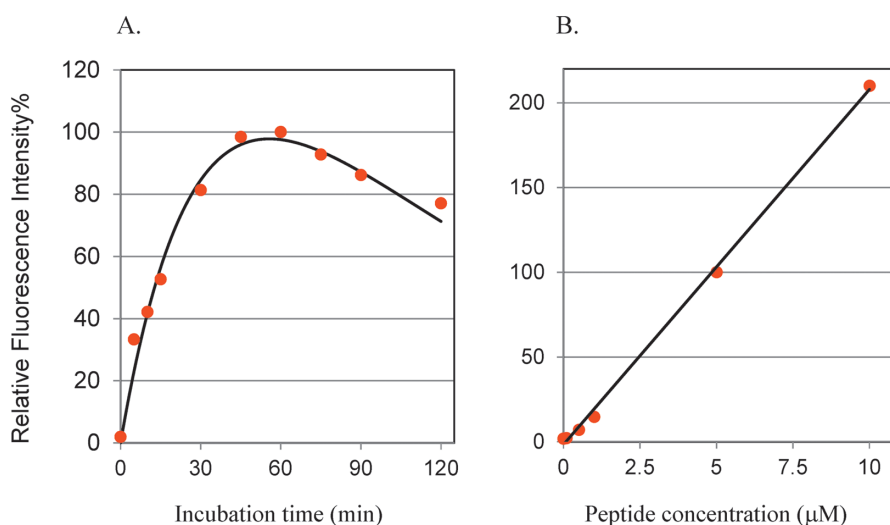


Fig. 4. Time- and concentration-dependent uptake of Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH in K562 cells. (A) Cells were incubated with 5 μ M peptide at 37°C in 10%FBS/RPMI1640 medium. (B) Cells were treated with various concentrations of the peptide for 60 minutes. The experiments were conducted in duplicate and repeated twice. Data are shown as mean.

測定時直前に培養液と同量のPBS(-)で希釈した場合の細胞内の蛍光強度を希釈を行わないものと比較した。その結果Fig. 5Bに示すように15分以内に相対蛍光強度が最大となり、15分以降は希釈しないものよりわずかに低い相対蛍光強度を示した。

以上の検討した条件における細胞内蛍光強度変化のカイネティクス解析を行った。細胞内の蛍光強度変化が1コンパートメントモデルであると仮定したところ、測定値とよく一致する曲線が得られた (R^2 : 0.963–0.997)。Table 1に FI_{max} , k_a および k_e をまとめた。

4. ペプチドの細胞内移行能評価における死細胞の影響

ペプチドの細胞内取り込みの測定における死細胞の影響を調べるために、PI処理を行った細胞を

用いて Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH を添加した60分後にフローサイトメトリー解析を行った。Fig. 6のスキッタプロットには縦軸に488 nm励起によるPI由来する蛍光強度 (Ch04) を、横軸にはペプチドのFAM基由来する蛍光強度 (Ch02) を示す。全細胞数のおよそ5%がPIポジティブ (領域R1) すなわち死細胞であり、少数ではあるが生細胞に比べてFAMによる蛍光強度が高く、ヒストグラムからもわかるように全細胞中の蛍光強度の高い部分を占めていた。Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH を添加し、測定5分前にTBを加えてフローサイトメトリー解析を行った。Fig. 7B下段に示す細胞像で明らかなように死細胞ではTBが排出されないため明視野では黒く撮像されており、細胞内の蛍光は全く観察されない。一方、生細胞とみられる細胞では明視野では明瞭に撮像されており

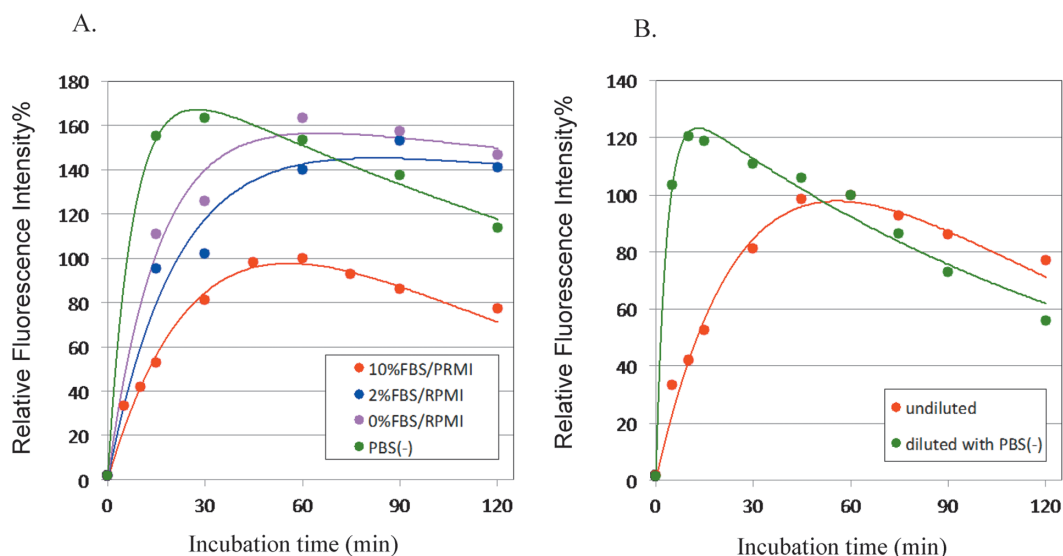


Fig. 5. Effect of incubation medium on cellular uptake. (A) K562 cells were incubated with $5 \mu\text{M}$ Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH at 37°C in 10%FBS/RPMI 1640 (red), 2%FBS/RPMI 1640 (blue), RPMI 1640 (magenta), and PBS(-) (green). (B) Influence of dilution with PBS(-) on cellular uptake of the peptide. The green dots; Incubated cell suspension was diluted with an equal volume of PBS(-) before loading onto ImageStream®.

Table 1. Kinetic parameters of the cellular uptake of Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH in K562 cells

| | Incubation medium | | | | 10%FBS/RPMI1640 & dilution by PBS(-) |
|---|-------------------|----------------|----------------|--------|---|
| | 10%FBS/RPMI1640 | 2%FBS/RPMI1640 | 0%FBS/RPMI1640 | PBS(-) | |
| FI_{max} | 97.8 | 145.3 | 156.5 | 167.3 | 123.4 |
| k_a ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) | 30.79 | 47.54 | 63.38 | 129.2 | 298.3 |
| k_e ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) | 9.287 | 1.000 | 1.094 | 4.143 | 6.654 |
| t_{max} (min) | 55.7 | 83.0 | 65.2 | 27.5 | 13.0 |
| R^2 | 0.972 | 0.963 | 0.980 | 0.997 | 0.987 |

*The R^2 value shows the goodness of a fit.

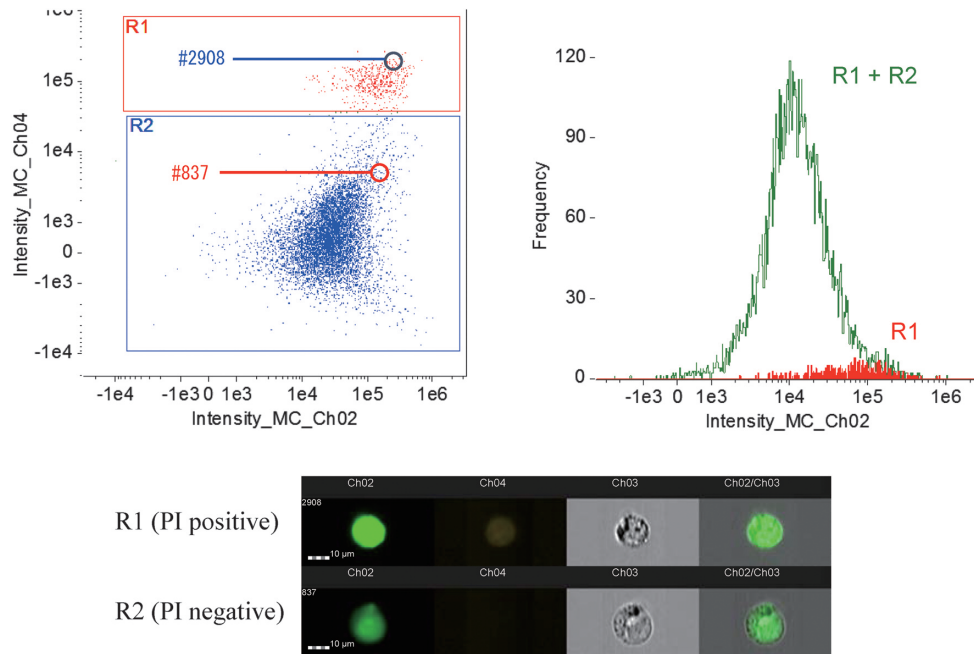


Fig. 6. Flow cytometry analysis on K562 cells treated with Dabcy1~R9_SS_FAM~CHH ($5 \mu\text{M}$) and PI ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$). Scatterplot and histogram represent intracellular emission intensity. Representative images of cells acquired in ImageStream[®]; FAM fluorescence (Ch02), PI fluorescence (Ch04), bright field (Ch03), merged image (Ch02/Ch03), scale bar: $10 \mu\text{m}$

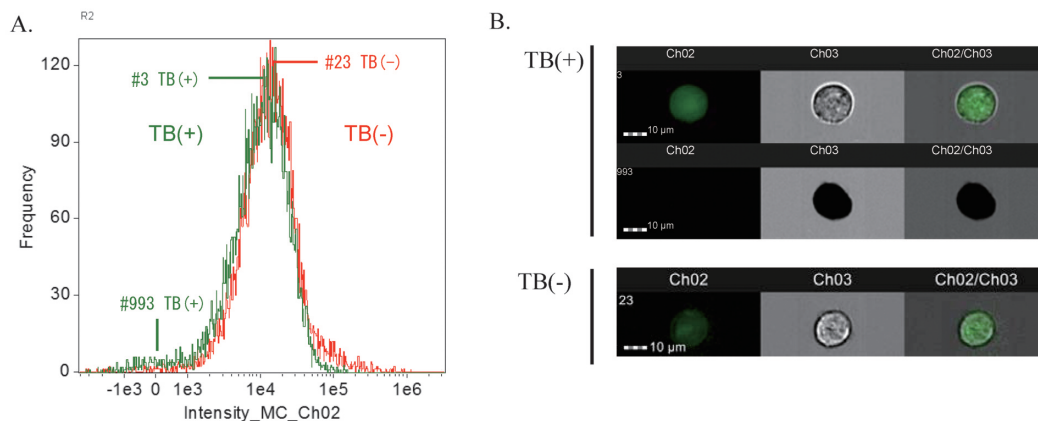


Fig. 7. Effect of trypan blue (TB) on intracellular fluorescence. (A) The histogram represents intracellular FAM emission intensity in the absence (TB(-), red) or presence of TB (TB(+), green). (B) Representative images of cells acquired in ImageStream[®]; FAM fluorescence (Ch02), bright field (Ch03), merged image (Ch02/Ch03), scale bar: $10 \mu\text{m}$

(Fig. 7B 上, 中段), 同時に細胞内の FAM の蛍光が観察された。TB の有無で比較すると TB を添加したものでは, わずかに蛍光強度の低い側にヒストグラムが分布した。

考 察

種々の CPP の細胞内移行性についてこれまで多くの報告がある。しかし, CPP や細胞などの個々

の実験条件が異なっており, 報告間での比較が難しい。また, 一般には蛍光標識 CPP を用いたフローサイトメーターによる測定や共焦点顕微鏡による観察が行われるほか, 細胞ライセートを用いた定量などによって細胞内移行能が評価されている。しかし, これら分析法には一長一短があり, カイネティクス解析を正しくかつ簡便に行えるとは言い難い。そこで本研究では分子内 FRET を持つペプチドを設計し, 撮像した細胞像からフロー

サイトメトリ解析ができる ImageStream[®] を利用した方法によって細胞内移行能を評価できるかを検討した。

Fig. 1 に示すように設計したペプチドでは, CPP 部であるノナルギニンの N 末端部に Dabcyl 基を付加し, 単独では細胞内に移行できない FAM-Gab-CHH-NH₂ (Fig. 3) をカーゴとしてこれらをジスルフィド結合で連結した。この連結ペプチドは還元的環境において速やかにジスルフィド結合が開裂し, 2つのペプチドに分かれ, FAM 基に由来する蛍光を発する (Fig. 2)。また, RPMI 1640 培地には少量ではあるがグルタチオンが含まれているため, 12 時間以上培地中で放置すると一部が還元を受ける。しかし, 用時調製したものは測定時間の 2 時間以内ではほぼ安定である。

連結ペプチド, Dabcyl~R9_SS_FAM~CHH を 10%FBS/RPMI 1640 培地中ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 細胞に加え, 37°C で加温したところ濃度あるいは時間依存的に細胞内の蛍光強度の増大が確認された (Fig. 4)。また, 経時変化を 1 コンパートメントモデルと仮定して解析を行った結果, 良好なカーブフィットを与える曲線が得られ, 5 μ M のペプチドを用いたときの吸収速度定数と消失速度定数がそれぞれ $30.79 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $9.287 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ と求められた (Table 1)。このように実験操作上, CPP 処理した細胞懸濁液をそのまま装置に取り込ませ, 簡便に細胞内の蛍光の時間的な変化を測定し, カイネティクス解析を行うことができた。また, データには示さないがペプチド添加後に細胞を蛍光顕微鏡下で観察すると細胞外の蛍光が時間の経過と共に上昇することから, 生じた FAM-Gab-Cys-(His)₂-NH₂ が細胞外に排泄されたことより細胞内の蛍光が減少したと考えられる。

CPP のうち, 本研究で用いたようなオリゴアルギニンペプチドでは処理溶液中の血清濃度が細胞内取り込みに大きく影響することが知られている。^{20,21)} そこで血清濃度の異なった培養液中で細胞にペプチドを添加して細胞内蛍光を測定したところ, これまでの知見と同様に FBS 濃度の低下に伴い細胞内の蛍光強度が増大した。特に PBS(-) 中では 10%FBS/RPMI 1640 培地に対し吸収速度定数 (k_a) が 4 倍以上となり, 30 分で細胞内蛍光強度がピークに達した (Table 1)。以上の結果から, CPP の細胞内移行能の評価では血清濃度の影響が大きいことが本測定法でも示された。次に PBS(-) での

CPP の細胞内移行が 10%FBS/RPMI 1640 培地よりも速やかであることから, 測定時における PBS(-) による希釈の影響を調べた。Fig. 5 に示すように添加後 30 分までに細胞内の蛍光強度が顕著に増大し, 60 から 120 分後では減少して希釈を行わない条件と同様な結果となった。通常, 蛍光標識 CPP を用いた実験系では細胞膜表面に結合した CPP を除去するためにトリプシン処理や緩衝液による洗浄を行う。また, 一般的なフローサイトメーターによる測定時には PBS(-) と類似した組成からなるからなるシース液などで細胞を懸濁して測定に用いる。本研究で得られた結果は, これまで多くの研究で行われていた緩衝液などによる細胞の洗浄や希釈によって細胞内の取り込み量が大きく影響されることを示唆し, 多くの研究結果にアーティファクトが含まれていることを予想させる。本測定法では希釈なしに装置に付しているため流路中の PBS(-) の影響が小さく, アーティファクトが小さく抑えられていると考えられる。一方, 細胞膜表面に結合した CPP を考慮しなくて良いという利点から, 本研究以外にも前例として FRET を利用した方法が報告されている。^{22,23)} これらの報告では付着培養系細胞を用いているためにペプチド処理後にトリプシンによって細胞を剥離し, PBS で洗浄したのちにフローサイトメーターにより細胞内の蛍光を測定している。よって, これらの結果にも上述したアーティファクトが含まれていると考えられる。さらに, これらの報告では HEK 細胞や HeLa 細胞などをペプチド処理後にそのまま分光蛍光光度計により蛍光強度を測定し, カイネティクス解析を行っているが, 使用されているペプチドが細胞内に取り込まれたのち細胞外に排出されるか否かを検討していない。もし, ペプチドが細胞外に排出されているとすると, 一定時間後に細胞内外の蛍光を合わせて測定している可能性がある。本研究で用いた測定法は浮遊培養系細胞には適用できるが, 付着培養系細胞では培養プレートからの剥離や洗浄を要するため不向きである。もし, 付着培養系細胞を用いる場合には細胞を剥離, 洗浄することなく, 高速かつ多数の細胞をイメージングすることによって細胞内蛍光を観察, 定量できる IN Cell Analyzer (GE Healthcare Life Science) などと分子内 FRET を持つペプチドとの組み合わせが有効と考えられる。

さらに, 本研究ではペプチドの細胞内移行能評

価における死細胞の影響についても検討した。まず、フローサイトメーターによる測定では同時にPI染色の測定ができることから死細胞の判別を行い、それらの細胞内の蛍光を測定した。実験では死細胞は全細胞数の5%程度であったが、いずれも高い蛍光強度を示しており、ペプチドが死細胞中に残存する還元力により還元され、蛍光を発していることを確認した (Fig. 6)。本実験での結果では死細胞の有無によってGeo. meanにはほとんど影響がなかったものの、死細胞の割合が多い場合にはCPPの細胞内への取り込み量の評価に大きく影響を与えると考えられる。次に、TBの添加についても検討した。通常、TBは死細胞では排出されず青く染色するため、死細胞の判定に用いられる。また、TBは好中球などの食細胞の食菌活性をフローサイトメトリー分析で評価する上で、食細胞に取り込まれなかった蛍光標識菌体からの蛍光をクエンチングする目的で使用される。²⁴⁾ TB添加によって死細胞中に由来する蛍光が抑制されるため、TBを添加しない場合と比べると蛍光強度の分布がわずかに低蛍光強度側にシフトした (Fig. 7)。これら二つの結果から、CPPの細胞内への移行を評価する場合には死細胞の影響が少なからず考えられることから、その影響を抑制するためにPIによる同時染色やTBの添加が効果的であることが判明した。

以上の通り本研究では浮遊培養系細胞であるK562細胞を用い、分子内FRETを持つペプチドとImageStream[®]との組み合わせによって種々のアーティファクトを抑え、CPPの細胞内移行能を的確に評価し、カイネティクス解析を行うことができた。特に、フローサイトメーターによる分析時にはPSB(-)による希釈がCPPの細胞内移行に大きく影響を与えることを明らかにした。この結果は反面、PSB(-)による希釈がCPPの細胞内移行を促進することも示しており、細胞内送達効率の向上には有用な知見である。

REFERENCES

- 1) Juliano R. L., Alam R., Dixit V., Kang H. M., *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **1**, 324–35 (2009).
- 2) Järver P., Mäger I., Langel Ü., *Trends Pharmacol. Sci.*, **31**, 528–535 (2010).
- 3) Skotland T., Iversen T. G., Torgersen M. L., Sandvig K., *Molecules*, **20**, 13313–13323 (2015).
- 4) Zahid M., Robbins P. D., *Molecules*, **20**, 13055–130570 (2015).
- 5) Lehto T., Ezzat K., Wood M., Andaloussi S., *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **106**, 172–182 (2016).
- 6) Dinca A., Chien W. M., Chin M. T., *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 263 (2016).
- 7) Vivès E., Brodin P., Lebleu B., *J. Biol. Chem.*, **272**, 16010–16017 (1997).
- 8) Green M., Loewenstein P. M., *Cell*, **55**, 1179–1188 (1988).
- 9) Suzuki T., Futaki S., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 2437–2443 (2002).
- 10) Herce H. D., Garcia A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **104**, 20805–20810 (2007).
- 11) Nakase I., Tadokoro A., Kawabata N., Takeuchi T., Katoh H., Hiramoto K., Negishi M., Nomizu M., Sugiura Y., Futaki S., *Biochemistry*, **46**, 492–501 (2007).
- 12) Futaki S., Nakase I., Tadokoro A., Takeuchi T., Jones A. T., *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 784–787 (2007).
- 13) Lindgren M., Gallet X., Soomets U., Hällbrink M., Bråkenhielm E., Pooga M., Brasseur R., Langel U., *Bioconjug. Chem.*, **11**, 619–626 (2000).
- 14) Richard J. P., Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M. J., Chernomordik L.V., Lebleu B., *J. Biol. Chem.*, **278**, 585–590 (2003).
- 15) Holm T., Johansson H., Lundberg P., Pooga M., Lindgren M., Langel Ü., *Nat. Protoc.*, **1**, 1001–1005 (2006).
- 16) Burlina F., Sagan S., Bolbach G., Chassaing G., *Nat. Protoc.*, **1**, 200–205 (2006).
- 17) Lécorché P., Walrant A., Burlina F., Dutot L., Sagan S., Mallet J. M., Desbat B., Chassaing G., Alves I. D., Lavielle S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 448–457 (2012).
- 18) Rezgui R., Blumer K., Yeoh-Tan G., Trexler A. J., Magzoub M., *Biochim. Biophys. Acta Bba-Biomembr.*, **1858**, 1499–1506 (2016).
- 19) Ambo A., Niizuma H., Sasaki A., Kohara H., Sasaki Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1269–1272 (2003).
- 20) Wender P. A., Mitchell D. J., Pattabiraman K., Pelkey E. T., Steinman L., Rothbard J. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **97**, 13003–13008 (2000).

- 21) Kosuge M., Takeuchi T., Nakase I., Jones A.T., Futaki S., *Bioconjug. Chem.*, **19**, 656–664 (2008).
- 22) Cheung J. C., Kim Chiaw P., Deber C. M., Bear C. E., *J. Control. Release.*, **137**, 2–7 (2009).
- 23) Mäger I., Eiriksdóttir E., Langel K., El Andaloussi S., Langel U., *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**, 338–343 (2010).
- 24) Busetto S., Trevisan E., Patriarca P., Menegazzi R., *Cytometry A.*, **58**, 201–206 (2004).