

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22533

研究課題名(和文)異種分子の自己組織化に基づく薬理機能制御が可能なメディカルゲル

研究課題名(英文)A function-adjustable medical gel based on co-assembly of peptide-type gelator with various functional agents

研究代表者

森田 健太 (Morita, Kenta)

神戸大学・工学研究科・助教

研究者番号：60804127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、短いペプチド型ハイドロゲル化剤(P1)の自己組織化が、既存の抗真菌薬であるamphotericin B (AmB)に新たな抗真菌選択性を与えることに成功した。P1はAmBと複合体を形成することで水中に溶解した。その際、複合体化によってAmBは抗真菌活性を抑制された。プロテアーゼによるP1の分解によりAmBの抗真菌活性が回復し、プロテアーゼを分泌する真菌に対して選択的な殺菌効果を示した。自己組織化ペプチドと疎水性薬剤の複合体化を用いた戦略は、既存の抗真菌薬のドラッグリポジショニングにつながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗真菌薬の新薬開発数は減少傾向であり、既存の認可薬剤をこれまで以上に有効活用することが求められている。本研究によって、自己組織化性ペプチド(P1)と抗真菌薬のco-assemblyは、既存の抗真菌薬の機能を制御してプロテアーゼ分泌菌への特異性を付与することが示唆された。プロテアーゼは、病原菌が分泌し、人体に感染する際に利用していることが知られている。P1を用いて既存の抗真菌薬にプロテアーゼ分泌菌特異性を付与すれば、患者の組織やそれ以外の常在菌を保護したまま感染症治療を行うことができる。すなわち、既存の抗真菌薬の適応範囲を広げる「ドラッグリポジショニング」を実現する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The study demonstrates that the nano-assembly of a short-peptide hydrogelator (P1) imparts novel antifungal selectivity to amphotericin B (AmB), expanding its application range. AmB's limitations of poor solubility and toxicity are addressed by P1, a low-molecular-weight hydrogelator with low cytotoxicity. P1 successfully solubilizes AmB in water as micelle-like nano-complexes (NCs), reducing its toxicity against *Saccharomyces cerevisiae*. Protease degradation of P1 in the NCs restores AmB's antifungal activity. Moreover, high-concentration P1 forms an AmB-incorporating hydrogel (AmB-P1 gel), effectively suppressing AmB's antifungal activity. Protease-secreting *Aspergillus oryzae* fails to grow on the AmB-P1 gel, indicating selective fungicidal effects. Co-assembly strategies hold promise for "drug repositioning" in the medical field, particularly against protease-secreting infectious fungi.

研究分野：バイオナノマテリアル

キーワード：ペプチド 抗真菌薬 ハイドロゲル ドラッグリポジショニング 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

20世紀は高分子の時代と呼ばれる。「ゲル」という分野においてもこれまでは高分子が常識であった。一方、この20年の間に水をゲル化する低分子(ハイドロゲル化剤)が新しいバイオマテリアルとして注目されてきた。ところが、これまでの低分子ゲル化剤に関する研究はゲル化剤分子の合成的な開発と基礎物性の解明が焦点であり、産業的に実用化された例は未だ皆無である。そこで本研究課題の核心をなす学術的「問い」として、高分子ではなく低分子ゲル化剤でしか成し得ない独特の性質・機能は何かというテーマが生まれた。

私の研究チームでは、D体ペプチドのみで構成される低分子ゲル化剤は細胞毒性が低く、安定性が高いことを見出している。そこでドラッグデリバリーシステム(DDS)研究を背景に持つ申請者は、低分子ペプチドゲル化剤に薬剤を共に自己組織化(co-assembly)させることで新たなメディカルゲル分野を構築できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

研究代表者が所属する研究室において、以前、Ac-Phe-Phe-Phe-Gly-Lys という配列のオリゴペプチド(Ac-FFFGK; P1)は脂質鎖を持たないにもかかわらず比較的低濃度で自己組織化しヒドロゲルを形成することが知られていた。^[1]天然アミノ酸のみから構成されるため生体適合性が高く、プロテアーゼによって分解可能という性質を生かしたバイオマテリアルとして期待されている。P1のような自己組織化性ペプチドはその自己組織化体の内部の疎水空間に疎水性の高い外部分子を取り込むことが知られている。このco-assemblyを利用してメディカルゲルを作製する。

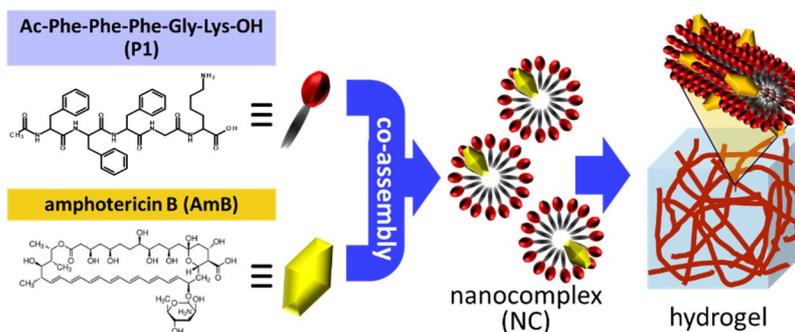


図1 amphotericin B (AmB)とオリゴペプチド型ハイドロゲル化剤(P1)のco-assemblyによるナノ複合体とハイドロゲルの形成

Amphotericin B (AmB)は50年以上前から真菌感染症治療に用いられる抗真菌薬である。真菌の細胞膜にのみ存在するエルゴステロールと結合してチャンネルを形成することで抗真菌効果を発揮する。しかし、AmBは疎水性が高く水に溶けないこと、また、病原性真菌に対する特異性を持たないという限界があった。

そこで、本研究ではP1とAmBをco-assemblyすることで簡単にAmBの性状・機能を制御することを目的とした。具体的には、P1とAmBのco-assemblyによってAmBに水溶性を付加する。P1の濃度に応じてナノ複合体(NC)とハイドロゲルを作り分け、任意の形態の製剤化する。さらに、病原真菌に選択的な抗真菌活性へ機能を制御する。

そこで、本研究ではP1とAmBをco-assemblyすることで簡単にAmBの性状・機能を制御することを目的とした。具体的には、P1とAmBのco-assemblyによってAmBに水溶性を付加する。P1の濃度に応じてナノ複合体(NC)とハイドロゲルを作り分け、任意の形態の製剤化する。さらに、病原真菌に選択的な抗真菌活性へ機能を制御する。

3. 研究の方法

AmB-P1 ナノ複合体 (NCs) の作製

0.2 mg/ml AmB と 0.1 wt% P1 を 10 mM リン酸緩衝液(PB)に投入し、加熱することでP1を全て溶解した。遠心分離によりAmBの残渣を除去し、AmB-P1 NCの分散液を得た。

AmB-P1 NCsの抗真菌活性評価

YPD培地中で前培養した*Saccharomyces cerevisiae*をOD660=0.01の濃度で96 well plateに播種した。ここにAmB-P1 NCsを添加した後、30で静置培養を行った。24h後、OD660を測定し50%阻害濃度(IC50)を算出することで抗真菌活性を評価した。DMSOに溶解したAmB(free AmB)を遊離のAmB溶液として用い、コントロールとした。また、AmB-P1 NCsと同時にプロテアーゼの一種であるキモトリプシン(ChT)を添加し同様に抗真菌活性評価を行った。

AmB-P1/YPDゲル培地の作製

YPD培地にP1(1 wt%)とAmBを加え、加熱によってすべて溶解した後96 well plateに分注してAmB-P1ゲル培地を作製した。対照としてDMSOに溶解したAmBとAgaroseを用いてAmB-Agarゲル培地も作製した。

AmB-P1/YPDゲル培地の抗真菌活性評価

濃度を調製した*S. cerevisiae*を播種し30で静置培養した。24h後にコロニー形成を確認することで抗真菌活性評価を行った。

プロテアーゼ分泌菌選択的な毒性の発現

スキムミルクを窒素源に用いた *Aspergillus oryzae* 用プロテアーゼ高分泌培地 (MCD 培地) を作製した。上と同様にして AmB-P1/MCD ゲル培地と AmB-agar/MCD ゲル培地を作製し *A. oryzae* または *S. cerevisiae* を播種した。30 °C で 24 h 静置培養した後、顕微鏡観察によってコロニー形成あるいは菌糸の生長を確認することで抗真菌活性を評価した。

4. 研究成果

P1 は Fmoc 固相合成法によって作製した。最低ゲル化濃度以下の濃度の P1 と AmB をリン酸緩衝液中で加熱、冷却することで AmB-P1 NCs の分散液を得た。AmB-P1 NCs は 100 nm-500 nm の粒径分布を有していた (図 2)。

AmB-P1 NCs は free AmB よりも *S. cerevisiae* に対する毒性が低かった (図 3)。つまり、AmB は P1 と co-assembly するとその抗真菌活性が抑制されることがわかった。その理由として、次のように考察した。AmB は真菌の膜状で複雑なチャンネルを形成することで殺菌することが知られている。AmB は P1 と co-assembly することで正しくチャンネルを形成できなくなったと考えられる。さらに、AmB-P1 NCs と同時に ChT を添加すると AmB の抗真菌活性は回復した (図 3)。これは、AmB と NC を形成していた P1 が ChT によって分解され、AmB が溶液中に放出されたためと考えられる。

最低ゲル化濃度以上の P1 と AmB をリン酸緩衝液中で加熱、冷却することで黄色く一様な AmB-P1 ゲルを作製できた (図 4a)。P1 ゲルを校正しているナノファイバーは

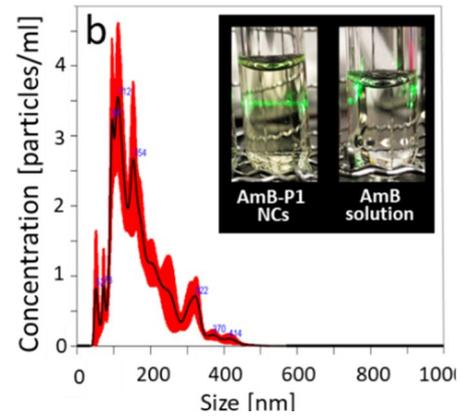


図 2 Nanosight を用いた AmB-P1 NCs の粒径分布測定

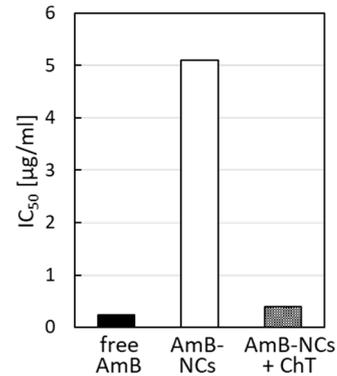


図 5 AmB-P1 NCs の *S. cerevisiae* に対する抗真菌活性

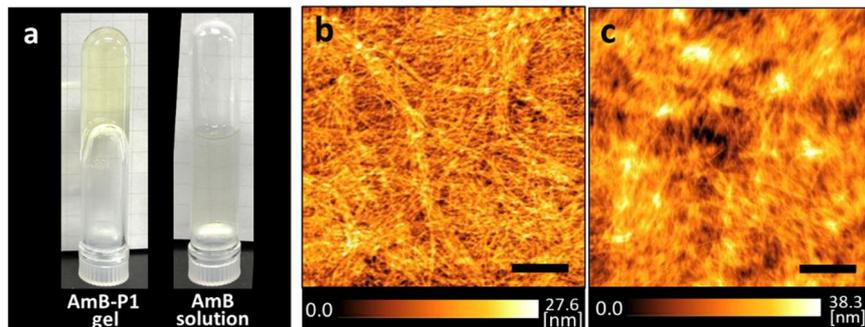


図 4 (a)AmB と P1 の co-assembly によって作製したゲル (AmB-P1 ゲル) の外観。 (b)P1 のみによって作製したゲルの AFM 像。 (c)AmB-P1 ゲルの AFM 像。

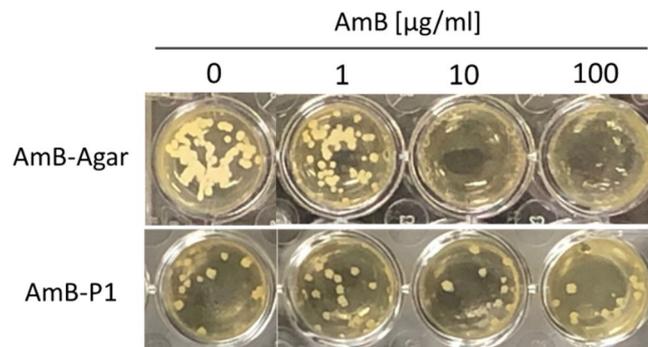


図 3 Agar によってゲル化し遊離の AmB を加えた YPD ゲル培地 (AmB-Agar) と、AmB と P1 の co-assembly によって作製した YPD ゲル培地 (AmB-P1) 上での *S. cerevisiae* のコロニー形成

均一で長く、複雑なネットワークを形成していた(図 4b)。一方、AmB-P1 ゲルのナノファイバーは短く細かった(図 4c)。AmB は P1 と co-assembly することで P1 の整列を乱していることが示唆された。

遊離の AmB を添加したゲル培地である AmB-Agar ゲル培地は AmB 濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上で *S. cerevisiae* の生育を完全に阻害した。一方で、AmB と P1 の co-assembly によって作製した AmB-P1 ゲル培地は AmB 濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ でも阻害が見られなかった(図 5)。AmB-P1 NCs の場合と同様に、P1 は AmB と co-assembly することで AmB の抗真菌活性を抑制したと考えられる。

最後に、AmB-P1 ゲルの病原真菌への選択的毒性について検討した。病原真菌は哺乳動物に感染する際にプロテアーゼを分泌することが知られている。^[2]そこで、病原真菌モデルとして、MCD 培地上でプロテアーゼを分泌していることが報告されている *A. oryzae* を用いた。^[3]まず、遊離の AmB を添加した AmB-agar/MCD ゲル培地上では *S. cerevisiae* も *A. oryzae* も共に生育できなかった(図 6a,b)。一方で、AmB-P1/MCD ゲル培地上では、*S. cerevisiae* は生育できたが *A. oryzae* は生育できなかった(図 6c,d)。その理由として次のように考察した。AmB は P1 と co-assembly したことで抗菌活性を抑制され、*S. cerevisiae* は生育できた。しかし、*A. oryzae* は MCD ゲル培地上でプロテアーゼを分泌することが示されている。つまり、*A. oryzae* は分泌したプロテアーゼによって AmB-P1/MCD ゲル培地中の P1 を分解していると考えられる。その結果 AmB が放出され、その抗真菌活性によって *A. oryzae* は生育できなかったと考えられる。

結論として、P1 は AmB と co-assembly することで AmB を内包した NCs やゲルファイバーといった組織化体を形成した。その際、AmB の抗菌活性は抑制され、NCs やゲルは抗菌活性を示さなかった。ここにプロテアーゼを作用させると組織化体の P1 が分解されることで AmB の放出が起こり、AmB の抗菌活性が回復した。さらに、AmB-P1/MCD ゲル培地はプロテアーゼを分泌する *A. oryzae* に特異的な毒性を示した。以上から、P1 と抗菌薬の co-assembly は、既存の抗菌薬の機能を制御してプロテアーゼ分泌菌への特異性を付与することが示唆された。プロテアーゼは、病原菌が分泌し、人体に感染する際に利用していることが知られている。P1 を用いて既存の抗菌薬にプロテアーゼ分泌菌特異性を付与すれば、患者の組織やそれ以外の常在菌を保護したまま感染症治療を行うことができる。すなわち、既存の抗菌薬の適応範囲を広げる「ドラッグリポジショニング」を実現する可能性がある。

以上の成果は米国化学会の科学雑誌 ACS Applied Nano Materials に掲載された。^[4]

5. 参考文献

- [1] W. K. Restu, Y. Nishida, S. Yamamoto, J. Ishii, T. Maruyama, *Langmuir* **2018**, *34*, 8065-8074.
- [2] M. Monod, S. Capoccia, B. L chenne, C. Zaugg, M. Holdom, O. Jousson, *Int. J. Med. Microbiol.* **2002**, *292*, 405-419.
- [3] H. Kumura, T. Ishido, K. Shimazaki, *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 657-667.
- [4] K. Morita, Y. Nishimura, J. Ishii, T. Maruyama, *ACS Appl. Nano Mater.* **2023**, *6*, 1432-1440.

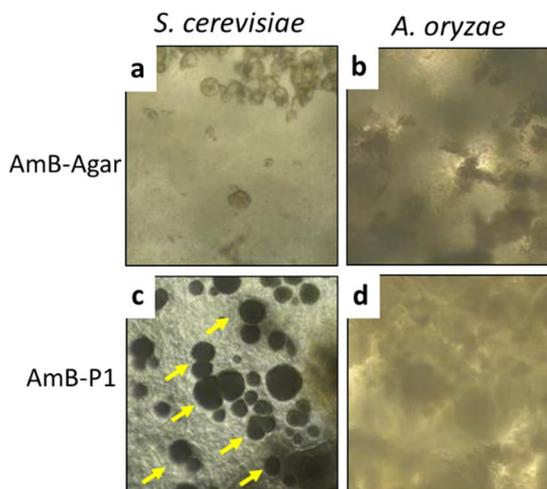


図 6 Agar によってゲル化し遊離の AmB を加えた MCD ゲル培地(AmB-Agar)と、AmB と P1 の co-assembly によって作製した MCD ゲル培地 (AmB-P1) 上での *S. cerevisiae* と *A. oryzae* のコロニー形成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morita Kenta, Nishimura Yuya, Ishii Jun, Maruyama Tatsuo	4. 巻 6
2. 論文標題 Micelle-like Nanoassemblies of Short Peptides Create Antimicrobial Selectivity in a Conventional Antifungal Drug	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 1432 ~ 1440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.2c05183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森田健太、レストウウィタカルティカ、西村勇哉、石井純、丸山達生
2. 発表標題 オリゴペプチドとのco-assemblyによる薬剤分子の機能制御
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenta Morita, Restu Witta Kartika, Yuya Nishimura, Jun Ishii, Tatsuo Maruyama
2. 発表標題 Function Control of Hydrophobic Antimicrobial Molecules by utilizing Self-Assembly of Oligopeptide-Type Low Molecular Weight Hydrogelator
3. 学会等名 4th G' L' owing Polymer Symposium in KANTO (GPS-K2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田健太、レストウウィタカルティカ、西村勇哉、石井純、丸山達生
2. 発表標題 短鎖ペプチドの自己組織化による抗菌性分子の機能制御
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田健太、レストウウイタカルティカ、西村勇哉、石井純、丸山達生
2. 発表標題 短鎖ペプチドの自己組織化を利用した疎水性抗菌分子の機能制御
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田健太、西村香音、山本翔太、清水なつみ、青井貴之、田村厚夫、丸山達生
2. 発表標題 がん細胞内部で自己組織化シアポトーシス死を引き起こすペプチド脂質の開発
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田健太、レストウウイタカルティカ、西村勇哉、石井純、丸山達生
2. 発表標題 ペプチド型低分子ゲル化剤の自己組織化を利用した抗菌ゲルの機能制御
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田健太、レストウウイタカルティカ、西村勇哉、石井純、丸山達生
2. 発表標題 オリゴペプチドゲル化剤で作製した抗菌メディカルゲルの機能変調研究
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田健太、レストウウイタカルティカ、西村勇哉、石井純、丸山達生
2. 発表標題 ペプチド型低分子ゲル化剤を用いた疎水性薬剤の剤形および効能の調節
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	丸山 達生 (Maruyama Tatsuo) (30346811)	神戸大学・大学院工学研究科・教授 (14501)	
連携研究者	石井 純 (Ishii Jun) (40512546)	神戸大学・先端バイオ工学研究センター・准教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------