

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700479

研究課題名(和文)ペプチドナノニードルを用いたマルチステップ抗原デリバリーによる細胞性免疫制御

研究課題名(英文)Control of cellular immunity by multi-step antigenic peptide delivery using peptide nano-needles

研究代表者

和久 友則(WAKU, Tomonori)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・助教

研究者番号：30548699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：がんペプチドワクチン療法は、患者への負担や副作用が小さいことから、従来法に代わる新たながん治療法として注目されている。効率的ながん免疫誘導のためには、抗原ペプチドを抗原提示細胞の細胞質に送達することが重要である。研究代表者らは、ペプチドナノニードルを用いた抗原デリバリーシステムの開発に取り組んでいる。本研究では、デリバリーシステムを設計するために必要な基礎的知見を得ることを目的として、ニードル長が種々異なるナノニードルを作製し、長さが細胞取り込みに与える影響を評価した。

研究成果の概要(英文)：Synthetic immunogenic peptides are ideal vaccine subunit components for cancer immunotherapy due to advances in safety, stability, and design. Cytoplasmic delivery system of antigenic peptides has been required for effective cancer immunotherapy. In this study, we develop the direct cytoplasmic delivery system of antigenic peptides by using beta-sheet peptide nano-needles as carriers. We investigated the effect of nano-needle length on their cellular uptake by RAW264 cells and the cellular internalization pathway. The amount of cellular uptake was significantly affected by the length of the nano-needles. Interestingly, the short nano-needles with a length of 40 nm was internalized by non-endocytosis pathway, in contrast that the longer nano-needles with a length of 120 nm - 800 nm via endocytosis pathway. The size-regulated peptide nano-needles are expected to be useful as a novel delivery carrier of antigenic peptides into cytoplasm of antigen-presenting cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ペプチド 免疫 ドラッグデリバリーシステム ナノ粒子 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は、次世代の治療・予防法として注目を集めている。工学分野では、ワクチン抗原を抗原提示細胞に効率よく送達することを目的として、高分子ナノ微粒子やリポソームなどの球状粒子キャリアの開発が精力的に進められてきた。一方で、ナノチューブやナノファイバーなどの異方性形態を持つ粒子に関する報告例は極めて少なく、キャリア機能に関する知見が十分に蓄積されていない。しかし、粒子の形態は、粒子と細胞との相互作用に関わる重要な因子であると認識されており、異方性形態に由来する新規キャリア機能の開拓が求められている。最近、研究代表者は、 β -シートペプチドが形成するナノファイバー状会合体に着目し、これをワクチン抗原キャリアへと応用する研究を進めてきた。具体的には、 β -シート形成能をもつ配列に抗原配列を導入したハイブリッドペプチドを合成し、このペプチドの自己組織化を利用することで、極細構造を有する抗原集積化デバイス（ペプチドナノニードル）の作製に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、『異方性形態に由来する新規キャリア機能の開拓』を目的として、ペプチドナノニードルの構造精密制御およびナノニードルと細胞との相互作用の解析を行う。また、この知見をもとに、効率的な免疫誘導に必要な二種類の抗原ペプチドを、細胞内の狙いとする場所にまでそれぞれ送達する『マルチステップデリバリーシステム』を開発する。

3. 研究の方法

β -シートナノニードルの構造を精密に制御し、その形態や構造の違いが抗原提示細胞との相互作用（取り込み機構や細胞内動態）に与える影響について詳細な評価を行った。

具体的には、ニードル長の異なるナノニードルを作製し、長さが細胞取り込みに与える影響を評価した。

4. 研究成果

(1) β -OVA-EG₁₂ ナノニードルの長さ制御

ナノ会合体のビルディングブロックとして、 β -シート形成配列 (FVIFLD) に抗原配列 (SIINFEKL) と親水性鎖 (オリゴエチレングリコール, 12mer) を導入した β -OVA-EG₁₂ ペプチドを設計した。この β -OVA-EG₁₂ ペプチドと蛍光基を導入した β -OVA-EG₁₂-FAM ペプチドを PBS 中 1:19 のモル比で混合し、60°C で 24 時間インキュベートすることでおよそ数 μ m オーダーの長さを持つ蛍光ラベル化 β -OVA-EG₁₂ ナノニードル (NNs) を調製した。さらに、この NNs 分散液を孔径 1.2、0.45、0.20、0.02 μ m のシリンジフィルターで濾過することで、それぞれ 810 ± 460 、 280 ± 210 、 120 ± 90 、 40 ± 20 nm の平均ニードル長を持つ NNs を作製した。

(2) ニードル長が細胞取り込みに与える影響

長さの異なる 4 種類の β -OVA-EG₁₂ NNs (810、280、120、40 nm) を用いて、ニードル長の違いが細胞取り込みおよびその経路に与える影響を評価した。具体的には 4 種類の NNs を PBS 中で RAW264 細胞に取り込ませ、その取り込み量をフローサイトメーターにより評価した。さらに、無血清培地 (FBS (-)) および血清含有培地 (FBS (+)) 中での取り込み試験を行い、培地中の成分が β -OVA-EG₁₂ NNs の取り込みに与える影響について評価した。PBS、FBS (-) 中での取り込みは多い順に $280 \text{ nm} = 120 \text{ nm} > 40 \text{ nm} > 810 \text{ nm}$ であった。一方で、FBS (+) 中での細胞取り込みは長さに因らずほぼ一定の値を示し、一樣に取り込み量が少なかった。以上より、NNs の細胞取り込みはその長さに依存することが確認された。

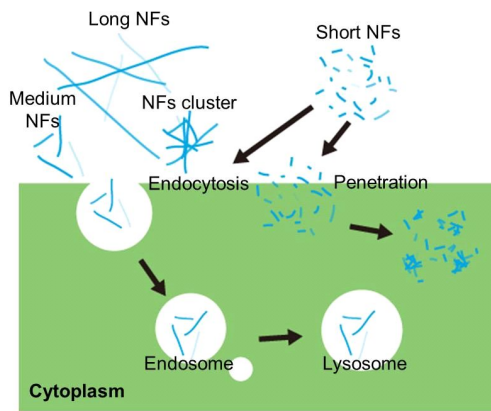


Figure 1. Schematic illustration of cellular uptake pathway for β -OVA-EG₁₂ nano-needles (NNs) with different length.

次に、長さの異なる NNs (810、280、120、40 nm) の細胞取り込み経路を調べることを目的として、エンドサイトーシス阻害剤 (アジ化ナトリウム, NaN_3) が細胞取り込みに与える影響について評価した。 NaN_3 溶液中で 30 分プレインキュベートした RAW264 細胞に、各ニードル長の NNs を終濃度 50 μM で 30 分取り込ませ、洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。エンドサイトーシス阻害条件下において、120、280、810 nm の NNs を取り込ませた場合、蛍光は主に細胞表面からのみ観察され、内部からの蛍光は観察されなかった。この結果より、120、280、810 nm の NNs は主にエンドサイトーシス経路で取り込まれていることが示された。一方、興味深いことに 40 nm の NNs はエンドサイトーシス阻害条件下においても確かに細胞内に取り込まれていることが認められた。以上の結果より、長さの違いは NNs の細胞取り込み経路に大きく影響を与えることが示された (Fig. 1)。言い換えると、NNs の長さによって、取り込み経路を合目的的に制御することが可能であることが示された。さらに、小角 X 線散乱、赤外分光、透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡により、 β -OVA-EG₁₂ NNs の構造解析を詳細に行ったところ、NNs はフィラメント状ミセルのような円柱構造ではなく直方体構造をもち、親水性面と疎水性面の両方

をもつ特殊な表面をもつことが示唆された。このような両親媒性の表面構造が β -OVA-EG₁₂ NNs の細胞取り込みに影響を与えていると考えられる。以上の知見をもとに、今後、がん細胞を直接攻撃するキラー T 細胞を活性化するペプチドと、キラー T 細胞を補助する働きを持つヘルパー T 細胞を活性化するペプチドとの 2 種類のペプチドを細胞内の狙いとする場所にまでそれぞれ送達する『マルチステップデリバリーシステム』を開発する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Tomonori Waku、 Yuichi Kitagawa、 Kazufumi Kawabata、 Saki Nishigaki、 Shigeru Kunugi、 Naoki Tanaka
Self-assembled β -sheet Peptide Nanofibers for Efficient Antigen Delivery、 *Chem. Lett.*、 査読有、 **42** 巻、2014、1441-1443

[学会発表](計 20 件)

杉村友里・西垣早希・和久友則・功刀滋・田中直毅『抗原を担持させたペプチドナノファイバーのワクチンキャリアとしての機能評価』日本化学会第 94 春季年会 (2014 年 3 月 27 日 - 30 日、名古屋大学)

笠井彩音・川端一史・和久友則・功刀滋・田中直毅『抗原を担持させたペプチドナノファイバーの細胞取り込みにおけるサイズ効果』日本化学会第 94 春季年会 (2014 年 3 月 27 日 - 30 日、名古屋大学)

川端一史・西垣早希・和久友則・功刀滋・田中直毅『ベータシートナノニードルの細胞取り込みにおけるサイズ効果』第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月 25 日 - 26 日、タワ

ーホール船堀)

和久友則・川端一史・西垣早希・功刀滋・田中直毅『Effect of fiber length on cellular uptake of antigen-loaded peptide nanofiber』第7回ナノメディシン国際シンポジウム (2013年11月7日 - 9日、九州工業大学)

和久友則・川端一史・西垣早希・南 拓磨・眞田雄介・櫻井和朗・功刀 滋・田中直毅『抗原を担持させたニードル状ペプチドナノ会合体の作製と細胞取り込み』第7回バイオ関連化学シンポジウム (2013年9月27日 - 29日、名古屋大学)

川端一史・西垣早希・和久友則・功刀滋・田中直毅『抗原を担持させたペプチドナノファイバーの細胞取り込みに与える線維長の影響』第62回高分子討論会 (2013年9月11日 - 13日、金沢大学)

和久友則・川端一史・西垣早希・功刀滋・田中直毅『抗原を担持させたペプチドナノファイバーの細胞取り込みに与える線維長の影響』日本バイオマテリアル学会第8回関西若手研究発表会 (2013年8月31日、大阪大学)

和久友則・川端一史・西垣早希・功刀滋・田中直毅『ニードル状形態を有するペプチドナノ会合体による抗原ペプチドの細胞質デリバリー』第23回バイオ高分子研究会シンポジウム (2013年7月31日 - 8月1日、東京工業大学)

和久友則・北川雄一・川端一史・功刀滋・田中直毅『Cytoplasmic delivery of antigenic peptides by needle-shaped peptide nano-assemblies』The 4th Asian Biomaterials Congress (2013年6月26日 - 29日、The Hong Kong University of Science and Technology)

和久友則・北川雄一・川端一史・功刀

滋・田中直毅『Cytoplasmic delivery of antigenic peptides by needle-shaped peptide nano-assemblies』第62回高分子学会年次大会 (2013年5月29日 - 31日、京都国際会議場)

和久友則・川端一史・北川雄一・功刀滋・田中直毅『ニードル状形態を有するペプチドナノ会合体による抗原ペプチドの細胞質デリバリー』日本化学会第93春季年会 (2013年3月26日 - 29日、立命館大学)

和久友則・北川雄一・川端一史・功刀滋・田中直毅『The effect of shape of antigen-loaded peptide nano-assemblies on their adsorption and internalization by cells』The 9th SPSJ International Polymer Conference (12月11日 - 14日、神戸国際会議場)

和久友則・北川雄一・川端一史・功刀滋・田中直毅『異方性形態を有するペプチドナノ会合体による抗原ペプチドの細胞質デリバリー』日本バイオマテリアル学会シンポジウム (2012年11月26日 - 27日、仙台国際センター)

和久友則・川端一史・北川雄一・功刀滋・田中直毅『異方性形態を有するペプチドナノ会合体による抗原ペプチドの細胞質デリバリー』第6回バイオ関連化学シンポジウム (2012年9月6日 - 8日、北海道大学)

北川雄一・川端一史・和久友則・功刀滋・田中直毅『 β シートペプチドナノ会合体の形態制御と抗原キャリアとしての機能評価』第6回バイオ関連化学シンポジウム (2012年9月6日 - 8日、北海道大学)

和久友則・北川雄一・川端一史・功刀滋・田中直毅『異方性形態を有するペプチドナノ会合体による抗原ペプチドの細胞質デリバリー』第61回高分子討

論会 (2012 年 9 月 19 日 - 21 日、名古屋工業大学)

川端一史・北川雄一・和久友則・功刀滋・田中直毅『**ペプチドナノキャリアの形態制御と細胞取り込みへの影響**』

第 61 回高分子討論会 (2012 年 9 月 19 日 - 21 日、名古屋工業大学)

川端一史・和久友則・功刀 滋・田中直毅『**形態異方性を有するペプチドナノ会合体の細胞取り込みとその機構**』

第 58 回高分子研究発表会 [神戸] (2012 年 7 月 13 日、兵庫県民会館)

和久友則・北川雄一・川端一史・功刀滋・田中直毅『**異方性形態を有するペプチドナノ会合体の細胞取り込みとその機構**』第 22 回バイオ・高分子シンポジウム (2012 年 6 月 25 日 - 26 日、東京大学)

和久友則・北川雄一・川端一史・功刀滋・田中直毅『**The effect of shape of antigen-loaded peptide nano-assemblies on their adsorption and internalization by cells**』 International Association of Colloid and Interface Scientists 2012 (2012 年 5 月 13 日 - 18 日、仙台国際センター)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和久 友則 (WAKU, Tomonori)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教
研究者番号：30548699

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし