

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01391

研究課題名(和文) 親疎水パターン化表面構造をもつ膜透過性ナノチューブの開発と抗原デリバリーへの応用

研究課題名(英文) Development of cell-penetrating nanotube with hydrophilic and hydrophobic patterned surface for antigen delivery

研究代表者

和久 友則 (WAKU, TOMONORI)

京都工芸繊維大学・分子化学系・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

研究成果の概要(和文)：親水性基と疎水性基の交互配列をもち、8残基のアミノ酸から構成される環状ペプチドを合成した。得られた環状ペプチドは水/有機溶媒混合溶媒中で、線維状のナノ会合体を形成することがわかった。このナノ会合体分散液の分散媒を水に置換すると、ナノ会合体の形態は球状に変化した。球状ナノ会合体は表面に疎水性領域を持ち、樹状細胞に作用させると細胞内に取り込まれることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ材料は、薬物および遺伝子のデリバリーなどの生医学分野において利用されている。ナノ材料表面の親疎水性バランスは、細胞との相互作用に影響を与える。本研究で作製した親水部と疎水部を表面に併せ持つナノ会合体は、新たなデリバリーキャリアとして有用であり、医療の発展に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The cyclic peptides consisting of eight amino acid residues with alternating sequence of hydrophilic and hydrophobic groups were synthesized. The cyclic peptides formed fibrous nanostructures in water/organic mixed solvents. The exchange of dispersant to water induced morphological change to sphere. These nanostructures had hydrophobic region on their surface and were taken up by dendritic cells.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ペプチド ナノチューブ 自己組織化 ドッグデリバリーシステム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

物質が細胞膜を透過して細胞質へと移行するためには、リン脂質の疎水性コアを横切る必要がある。表面親水性ナノ粒子は疎水性領域との親和性は低く膜内へ移行しにくいのに対して、表面疎水性ナノ粒子はコア内へ移行する性質を持ち膜内に留まりやすいと考えられる。では、疎水基が親水基の中に均一に分散した表面（親疎水ナノパターン化表面）をもつナノ粒子は、細胞膜との相互作用する際どのように振る舞うのか？興味深い問題である。これに関する重要知見として、2008年、F. Stellacciらにより、親水性基と疎水性基がストライプ状に配列した表面構造をもつ金ナノ粒子が細胞膜を透過して細胞内へ移行することが報告された (F. Stellacci et al. *Nat. Mater.* 7, 588 (2008))。これに続いて、ナノパターン化表面構造を持つナノ粒子の細胞膜透過のシミュレーションが多く報告され、細胞膜透過における親疎水ナノパターン化構造の重要性が示された(例 H. J. Gao et al. *Nanoscale* 4, 3768 (2012)、A. Alexander-Katz et al. *Soft Matter* 7, 11312 (2011) など)。しかしながら、その重要性にも関わらず、F. Stellacciらのグループに続く実験的研究の報告例は乏しく、十分な知見は集積されていない。また、疎水性基（免疫細胞のレセプターなどにより認識される）が表面に均一分布するナノパターン化表面に由来するキャリア機能は興味深い但未開拓である。ナノパターン化表面を持つナノ粒子の作製法を確立することにより、ナノパターン化構造と膜透過性機能の相関およびナノパターン化表面に由来する機能を明らかにすることができると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、環状ペプチドの自己組織化制御に基づく親疎水ナノパターン化表面ナノチューブの精密作製技術の確立を目的とする。また、ナノチューブと細胞との相互作用の解析を行うことにより、ナノパターン化表面に由来した機能の探索を行う。さらに、ナノチューブをキャリアに用いて、がん抗原ペプチドを樹状細胞の細胞質へと高効率に送達するためのシステムを構築する。

### 3. 研究の方法

親疎水ナノパターン化表面をもつナノキャリアの設計に当たり、研究代表者は、DL体のアミノ酸が交互に並んだ環状ペプチド (CP) が一次元方向に連なって形成するペプチドナノチューブ (PNT) に着目した。Fig. 1 に示す二種類の環状ペプチド  $c\text{-}[\text{E}\text{-}\underline{\text{C}}\text{-}\text{L}\text{-}\underline{\text{C}}\text{-}\text{R}\text{-}\underline{\text{C}}\text{-}\text{L}\text{-}\underline{\text{C}}\text{-}]$  (CP1) および  $c\text{-}[\text{E}\text{-}\underline{\text{L}}\text{-}\text{C}\text{-}\underline{\text{L}}\text{-}\text{R}\text{-}\underline{\text{L}}\text{-}\text{C}\text{-}\underline{\text{L}}\text{-}]$  (CP2) を、Fmoc 固相ペプチド合成法により合成した (下線有は D 体アミノ酸、下線無は L 体アミノ酸)。片末端にマレイミド基をもつメトキシ化オリゴエチレングリコール (EG<sub>8</sub>,

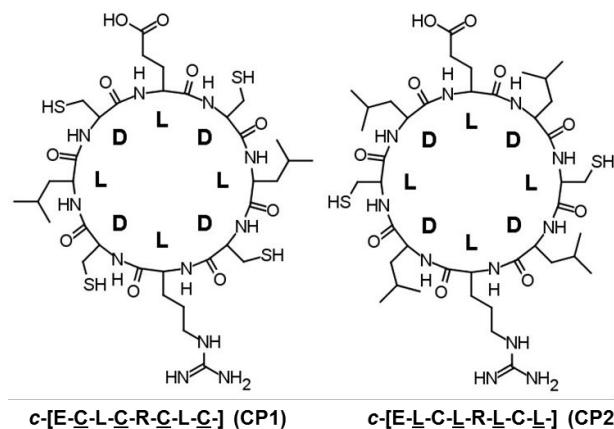


Fig. 1 Chemical structure of cyclic peptides. Peptide sequences are written using the conventional one-letter code for amino acids, but residues having a D stereochemistry are underlined.

8mer) と、CP1 および CP2 のシステイン側鎖チオール基との反応により、CP1 および CP2 にオリゴエチレングリコールを修飾した CP1-(EG<sub>8</sub>)<sub>4</sub> と CP2-(EG<sub>8</sub>)<sub>2</sub> を合成した。CP1-(EG<sub>8</sub>)<sub>4</sub> および CP2-(EG<sub>8</sub>)<sub>2</sub> のジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液に、種々の組成の 1,4-ジオキサン/水 (pH 7) 混合溶媒を添加し、40°C、24 時間静置した。その際、得られた会合体の形態を透過型電子顕微

鏡 (TEM) で観察した。得られたナノ会合体分散液を、水およびリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を外液に用いて透析することにより分散媒の置換を行い、このときの会合体の形態変化を TEM 観察により評価した。細胞との相互作用を評価するために BODIPYFL *N*-(2-aminoethyl)maleimide により蛍光標識した CP1-(EG<sub>8</sub>)<sub>4</sub> および CP2-(EG<sub>8</sub>)<sub>2</sub> を合成した。標識化ペプチドと未標識のペプチドの混合溶液からナノ会合体を作製し、得られたナノ会合体を JAWSII 細胞に 30 分間作用させた後、細胞を共焦点レーザー顕微鏡観察により観察した

#### 4. 研究成果

まずは環状ペプチドの自己組織化について報告している既報の文献 (J. D. Hartgerink et. al., *J. Am. Chem. Soc.* 118, 43 (1996).) に従って、CP1-(EG<sub>8</sub>)<sub>4</sub> と CP2-(EG<sub>8</sub>)<sub>2</sub> の自己組織化挙動を検討した。トリフルオロ酢酸に溶解させたペプチド溶液を、水蒸気環境下、25 °C で三日間静置した。この手法では、CP1-(EG<sub>8</sub>)<sub>4</sub> と CP2-(EG<sub>8</sub>)<sub>2</sub> ともに不定形な凝集物を形成するのみで、目的とするナノチューブ状会合体は得られなかった。次に、ペプチド

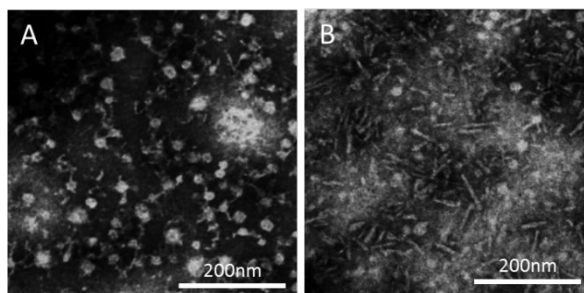


Fig. 2 TEM images of nanostructure of CP1-(EG<sub>8</sub>)<sub>4</sub> obtained by incubation at 40°C for 24h in the mixture solvent (A) DO : H<sub>2</sub>O = 1 : 99, (B) DMSO : DO : H<sub>2</sub>O = 1 : 50 : 49.

ドの DMSO 溶液に水を添加することによりどのようなナノ会合体を形成するかについて検討したが、この場合にも不定形な凝集物しか得られなかった。環状ペプチドが一次元方向に並びナノチューブを形成するには分子間での水素結合が重要である。そこで、水素結合の形成を促すために誘電率が低く、水と相溶性のある 1,4 ジオキサンを含む混合溶媒系での会合体形成を検討した。種々の検討の結果、CP1-(EG<sub>8</sub>)<sub>4</sub> と CP2-(EG<sub>8</sub>)<sub>2</sub> ともに、ジオキサン含率が 50vol% のときに線維状の会合体を形成することが TEM 観察から確認された。線維幅は 10 nm 程度であることより、環状ペプチドが一次元方向に連なった会合体が、さらにバンドル化しているものと考えられる。次に、得られたナノ会合体の分散液を水および PBS で透析することにより分散媒を置換し、このときの形態の変化を TEM 観察により評価した。その結果、CP1-(EG<sub>8</sub>)<sub>4</sub> および CP2-(EG<sub>8</sub>)<sub>2</sub> の会合体形態は、球状に変化していることが確認された。水中において形態を維持することができなかったのはオリゴエチレングリコール鎖長が長く水溶性が高いためではないかと考え、より短い 3mer のオリゴエチレングリコールを CP1 および CP2 に導入した CP1-(EG<sub>3</sub>)<sub>4</sub> と CP2-(EG<sub>3</sub>)<sub>2</sub> を合成して、同様の検討を行った。しかし、これらのペプチドからは有機溶媒/水混合溶媒系においても不定形な凝集物しか得られなかった。当初の目的では、水中において環状ペプチドが一軸方向に集合化したナノ会合体を作製し、得られたナノチューブと細胞との相互作用を解析する予定であった。試行錯誤の結果、水中で安定なナノチューブ構造を得ることはできなかったが、CP1-(EG<sub>8</sub>)<sub>4</sub> および CP2-(EG<sub>8</sub>)<sub>2</sub> が水中で形成するナノ会合体の会合体表面には疎水性領域が存在することを、疎水性蛍光プローブである 8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸を用いた解析により確認したので、この球状ナノ会合体と細胞との相互作用を検討することにした。蛍光標識化ナノ会合体を 37 °C で 30 分間、JAWSII 細胞に作用させた際の、ナノ会合体の細胞による取り込みを共焦点レーザー顕微鏡により観察した。細胞質全体より蛍光シグナルが確認されたことより、CP1-(EG<sub>8</sub>)<sub>4</sub> および CP2-(EG<sub>8</sub>)<sub>2</sub> 会合体の細胞内取り込みを確認した。しかし、会合体を作用させていない細胞と比較すると、蛍光シグナル強度の増加は僅かであり、取り込み効率は低いことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Waku Tomonori, Imanishi Yuko, Yoshino Yuta, Kunugi Shigeru, Serizawa Takeshi, Tanaka Naoki	4. 巻 12
2. 論文標題 Fusion of polymeric material-binding peptide to cell-adhesion artificial proteins enhances their biological function	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biointerphases	6. 最初と最後の頁 021002 ~ 021002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1116/1.4979577	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 -
1. 著者名 WAKU Tomonori, TERASAWA Kimi, TAKIMOTO Kazuhiko, ICHIKAWA Masahiro, HANDA Akihiro, TANAKA Naoki	4. 巻 74
2. 論文標題 Nanoparticle Formation of Ovalbumin with Cationic Oligopeptides	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 KOBUNSHI RONBUNSHU	6. 最初と最後の頁 285 ~ 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1295/koron.2016-0069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Waku Tomonori, Tanaka Naoki	4. 巻 66
2. 論文標題 Recent advances in nanofibrous assemblies based on -sheet-forming peptides for biomedical applications	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Polymer International	6. 最初と最後の頁 277 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pi.5195	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 -
1. 著者名 WAKU Tomonori, KANAMARU Kaori, HIROYAMA Yoshinori, SASAKI Ruriho, MORIMOTO Naoya, TANAKA Naoki	4. 巻 75
2. 論文標題 Preparation of Nanoparticles Composed of Egg White Protein and their Application for Cell Adhesion Control	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 KOBUNSHI RONBUNSHU	6. 最初と最後の頁 61 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1295/koron.2017-0070">https://doi.org/10.1295/koron.2017-0070</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Waku Tomonori, Hirata Naoyuki, Nozaki Masamichi, Nogami Kanta, Kunugi Shigeru, Tanaka Naoki	4. 巻 11
2. 論文標題 Morphological Transformation of Peptide Nanoassemblies through Conformational Transition of Core-forming Peptides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 39 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym11010039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Waku Tomonori, Nishigaki Saki, Kitagawa Yuichi, Koeda Sayaka, Kawabata Kazufumi, Kunugi Shigeru, Kobori Akio, Tanaka Naoki	4. 巻 20
2. 論文標題 Effect of the Hydrophilic-Hydrophobic Balance of Antigen-Loaded Peptide Nanofibers on Their Cellular Uptake, Cellular Toxicity, and Immune Stimulatory Properties	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3781 ~ 3781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20153781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小枝清花・出呂町剛大・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 細胞性免疫誘導効率化のための抗原担持ペプチドナノファイバーの設計
3. 学会等名 第66回高分子学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和久友則・渋谷忠杜・田中直毅
2. 発表標題 細胞内環境応答性ペプチドナノファイバーによる抗原デリバリー
3. 学会等名 第66回高分子学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 細胞内環境応答性ペプチドナノファイバーによる抗原デリバリー
2. 発表標題 和久友則・小枝清花・出呂町剛大・田中直毅
3. 学会等名 第27回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和久友則・小枝清花・渋谷忠杜・田中直毅
2. 発表標題 細胞内環境応答性ペプチドナノファイバーによる抗原デリバリー
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック第12回若手研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 出呂町剛大・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 ペプチドナノファイバーの集合・解離制御と抗原デリバリーキャリアへの応用
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 出呂町剛大・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 ペプチドナノファイバーの集合・解離制御と抗原デリバリーキャリアへの応用
3. 学会等名 第66回高分子討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 出呂町剛大・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 ペプチドナノファイバーの集合 - 解離制御に基づく抗原ペプチドの細胞内デリバリー
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西郷知樹・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 両親媒性表面をもつペプチドナノ集合体の作製と細胞との相互作用評価
3. 学会等名 日本化学会第97春季年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹嶋紗織・小枝清花・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 抗原デリバリーへの応用を指向した細胞内環境応答性ペプチドナノファイバーの設計
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小枝清花・竹嶋紗織・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 ペプチドナノファイバーの形成制御と抗原デリバリーへの応用
3. 学会等名 第28回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小枝清花・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 線維長の制御されたペプチドナノファイバーの作製と抗原デリバリーへの応用
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック第13回若手研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹嶋紗織・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 細胞内環境応答性ペプチドナノファイバーの作製と抗原デリバリーへの応用
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック第13回若手研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小枝清花・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 抗原デリバリーへの応用を目指した単分散性ペプチドナノファイバーの作成
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小枝清花・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 線維長の制御されたペプチドナノファイバーの作製と抗原デリバリーへの応用
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 西山魁人・小枝清花・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 線維長の制御されたペプチドナノファイバーの作製と抗原ペプチドデリバリーへの応用
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川貴士・和久友則・田中直毅
2. 発表標題 卵殻膜ペプチドを修飾した電界紡糸ポリマーナノファイバーの作製と細胞培養基板への応用
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 和久友則・田中直毅	4. 発行年 2017年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 2
3. 書名 化学	

1. 著者名 和久友則・田中直毅	4. 発行年 2017年
2. 出版社 じほう	5. 総ページ数 5
3. 書名 PHARM TECH JAPAN	

1. 著者名 和久友則・田中直毅	4. 発行年 2018年
2. 出版社 NTS出版	5. 総ページ数 10
3. 書名 アルツハイマー病 発症メカニズムと新規診断法・創薬・治療開発	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----