

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14303
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2022
課題番号：19K12800
研究課題名（和文）電場駆動型細胞膜透過性ペプチドナノニードルによるタンパク質医薬の細胞質直接送達

研究課題名（英文）Direct cytoplasmic delivery of protein drugs by electric field-driven cell membrane-permeable peptide nanoneedles

研究代表者
和久 友則（Waku, Tomonori）

京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授

研究者番号：30548699
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質医薬の細胞質内導入を実現するためのキャリアの開発をねらいとして、その作製に必要な要素技術として、マルチブロック構造を有するペプチドナノファイバーの作製技術を開発した。組成の異なるシードとモノマーの組み合わせであっても、線維形成配列が共通していれば、シードからの線維伸長が可能であり、異種セグメントから成るマルチブロック構造をもつナノファイバーを作製できることがわかった。また、それぞれのセグメントの長さも自在に制御できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究で開発したマルチブロック構造を有するペプチドナノファイバーの作製技術は、従来の高分子ミセルなどの球状キャリアとは異なる機能を有する新たなドラッグデリバリーキャリアの開発に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：Aiming at the development of a carrier for cytoplasmic delivery of protein drugs, we have developed a technique for preparing peptide nanofibers with a multi-block structure as an element technology necessary for the preparation. Even with combinations of seeds and monomers with different compositions, if the fibril-forming sequences were common, fibers were elongated from the seeds, and nanofibers with a multi-block structure consisting of heterogeneous segments were formed. It was also found that the length of each segment can be freely controlled.

研究分野：高分子化学、バイオマテリアル

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 自己組織化 ペプチド ナノ材料 ナノファイバー

1. 研究開始当初の背景

細胞生物学および分子生物学の近年の進歩により、疾患と細胞内タンパク質の関連性が示された。これに伴い、様々な種類のタンパク質が、がんや免疫疾患などの難治疾患のための薬として有効であることが明らかになった。しかしながら、大きな期待に反してその実用化は立ち遅れている。最大のネックとなっているのは、細胞の中(細胞質)に、タンパク質医薬を到達させることが難しい点にあり、タンパク質医薬を細胞質へと送達するための技術が渴望されている。

これまでに、この課題を解決すべく様々な研究が活発に進められているが、その大半は、細胞に元来備わっている細胞外物質を取り込む機構である『エンドサイトーシス』を利用する方法である。すでに確立された手法を用いれば、エンドサイトーシスによる細胞取り込みを促進することは比較的容易であるが、エンドサイトーシスにより取り込まれたタンパク質医薬はエンドソームと呼ばれる小胞内にトラップされてしまう。するとそのタンパク質医薬は、細胞質内のターゲット分子に作用することができず薬としての機能を発揮することはできない。これに対して、『細胞膜の直接透過』によるアプローチは、細胞質への送達効率が100%という点で大変魅力的である。しかし、この戦略に基づいたタンパク質医薬デリバリーに関する報告例は極めて限られている。これは、親水性の分子表面をもつ高分子であるタンパク質は、疎水性の脂質から成る細胞膜を透過することができないためである。また、低分子医薬のように化学修飾や部分的な構造変換によって、その細胞膜透過性を改善することも難しい。

2. 研究の目的

タンパク質医薬の細胞質内導入を実現するためのキャリアとして、プラスに帯電したブロックとマイナスに帯電したブロックをそれぞれ末端に有するマルチブロックナノファイバー(ナノニードル)の開発を研究開始当初の研究の目的に設定した。このナノニードルの両末端は、電場印加下においてそれぞれ反対方向のクーロン力を受ける。従って、電場方向にナノファイバーは配向し、電荷のバランスに応じて一方向に電気泳動される。細胞膜に対して垂直方向の電場を印加した場合、細胞膜を構成するリン脂質分子の配向方向と同じ向きにナノファイバー(直径数nm)は泳動されるので、細胞に大きなストレスを与えることなく細胞内に貫入させることができるのではないかと考えた。このナノファイバーに、細胞質内環境で選択的に開裂する結合(ジスルフィド結合)を介してタンパク質医薬を固定化すれば、タンパク質医薬を細胞質内に高効率に送達することができるかと考えた。

β -シートペプチドナノファイバー(アミロイド様線維)は、モノマーペプチドが一次的に集合化することによって形成する超分子ポリマーであり、核形成過程と生長過程を経て形成する。興味深いことに、核となる線維断片(シード)を外添加した場合には、核形成過程を経ることなくNFsが生長することが知られている。このような特徴に着目し、シードとシードから伸長させるモノマーにそれぞれ別のペプチドを用いることにより、マルチブロック型のナノファイバーを作製することができるかどうかについて検討した。

3. 研究の方法

E₅ペプチド(FVIFLDGSGSIINFEKL-EEEE)をリン酸緩衝生理食塩水の4倍濃縮液(PBS($\times 4$))中で60°C、24h、加熱することでNFsを作製した(300 μ M)。得られたNFs分散液に超音波照射することにより、シード分散液(線維長約100nm)を調製した。EG₂₄ペプチド(FVIFLDGSGSIINFEKL-oligo(ethylene glycol)₂₄)をDMSOに溶解したものをペプチドストック溶液とした。シード分散液にモノマーストック溶液を添加し、37°Cでインキュベーションした。このときの、線維伸長過程をチオフラビンT(ThT)蛍光アッセイにより評価した。得られたNFsの線維長を透過型電子顕微鏡(TEM)像より見積もった。

4. 研究成果

シードのビルディングブロックおよびモノマーとして E₅ ペプチドと EG₂₄ ペプチドを選択した。E₅ シード非存在下もしくは存在下での EG₂₄ モノマーペプチドの線維形成挙動を ThT 蛍光アッセイによって評価した (Fig. 1)。EG₂₄ モノマーのみの場合、蛍光強度の立ち上がりが確認されなかったことから、この濃度では EG₂₄ は自発的に会合しないことが確認された。一方、E₅ シードと EG₂₄ モノマーを混合した場合には、測定開始直後から蛍光強度が増加し、約 6-12 h で蛍光強度の飽和が確認された。さらに、シード濃度の増加に伴って伸長初速度が大きくなった。このことから、核形成を経ることなくシードから線維伸長したことが示唆された。このことから、組成の異なるシードとモノマーの組み合わせであっても、線維形成配列が共通していれば、シードからの線維伸長が可能であることがわかった。

次に、E₅ シードに対して EG₂₄ モノマーを逐次添加した場合の線維形成挙動を ThT 蛍光アッセイによって評価した (Fig. 2)。E₅ シードのみの場合には蛍光強度の立ち上がりが確認されなかった。一方、EG₂₄ モノマーを添加した場合には、添加直後から蛍光強度の増加が確認された。さらに、蛍光強度の飽和時に EG₂₄ モノマーを添加すると、添加する度に蛍光強度が増加した。このことから、伸長反応終了時も生長末端は活性を失っておらず、新たにモノマーを添加することで再び線維伸長することが示唆された。この手法により、マルチブロック構造の各セグメントの長さは自在に制御できることが示唆された。

次に、この ThT の蛍光強度変化が線維長と関連するかを調べるために、各ステップで形成した NFs を TEM により観察した。Fig. 3 には TEM 画像から任意の NFs (n = 100) の平均線維長を測定した結果を示す。シードに用いた E₅ NFs の線維長は 110 ± 40 nm であった。一方、E₅ シードに対して EG₂₄ モノマーを添加した場合、添加回数 1, 2, 3 回の線維長はそれぞれ、160 ± 70 nm、290 ± 120 nm、330 ± 140 nm であり、モノマーの添加回数の増加に伴って NFs の線維長が長くなることがわかった。

以上より、添加するモノマーの濃度および添加回数により線維長の制御が可能であることがわかった。また、シードとモノマーに用いるペプチドを適切に選択することで、マルチブロック型の NFs の作製が可能であることが示唆された。

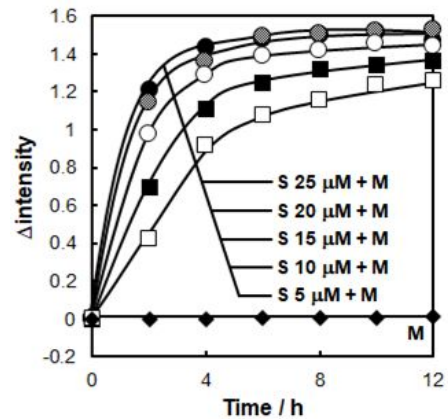


Fig. 1 Time-course of ThT fluorescence intensity of solution of EG₂₄ monomer (M) (5 μM) in the presence of E₅ seeds (S) (0-25 μM) incubated at 37°C for 24 h.

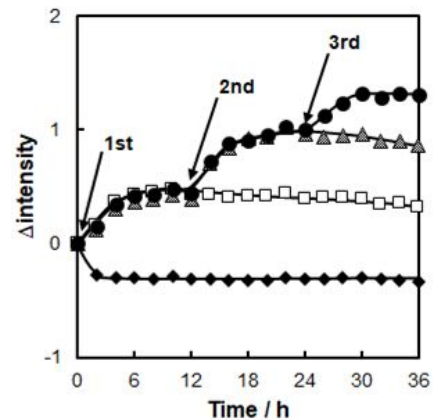


Fig. 2 Time-course of ThT fluorescence intensity of solution of EG₂₄ monomer in the presence of E₅ seeds (15 μM) incubated at 37°C. The EG₂₄ monomer solution (monomer conc. 400 μM) was added at T = 0, 12, 24 h. The number of addition was zero (closed diamond), once (open square), twice (closed triangle), and three times (closed circle).

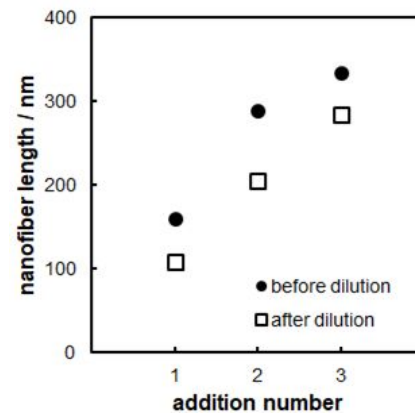


Fig. 3 Relationship between nanofiber length and addition number.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Taira Kazuya, Tomonori Waku, Yoshimichi Hagiwara	4. 巻 9
2. 論文標題 Ice growth suppression in the solution flows of antifreeze protein and sodium chloride in a mini-channel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 processes	6. 最初と最後の頁 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pr9020306	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 Tanaka N., Okuda M., Nishigaki T., Tsuchiya N., Kobayashi Y., Uemura T., Kumo S., Sugimoto H., Miyata S., Waku T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of a brain-permeable peptide nanofiber that prevents aggregation of Alzheimer pathogenic proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0235979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0235979	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 T., Kasai A., Kobori A., Tanaka N.	4. 巻 21
2. 論文標題 Investigation on the interactions between self-assembled -sheet peptide nanofibers and model cell membranes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21249518	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 Koshio K., Waku T., Hagiwara Y.	4. 巻 114
2. 論文標題 Ice-phobic glass-substrate surfaces coated with polypeptides inspired by antifreeze protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Refrigeration	6. 最初と最後の頁 201 - 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijrefrig.2020.01.025	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, Kobayashi Yukako, Wada Mei, Hamawaki Taiga, Handa Akihiro, Okuda Michiaki, Sugimoto Hachiro, Kobori Akio, Tanaka Naoki	4. 巻 49
2. 論文標題 Inhibition of Amyloid Fibrillation by Nanoparticles Composed of Ovalbumin-derived Amphiphilic Peptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 383 ~ 385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200048	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中尾建介、和久友則、小堀哲生
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精密作製法の開発
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 秋田楓、和久友則、小堀哲生
2. 発表標題 両性イオン型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70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomonori Waku, Kaede Akita, Akio Kobori
2. 発表標題 Development of cytoplasmic antigen delivery system using by amphoteric ion type peptide nanofibers
3. 学会等名 8th Asian Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今堀陽太、松尾和哉、和久友則、小堀哲生
2. 発表標題 断片不凍ペプチドの細胞凍結保護剤としての機能評価
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本真也、松尾和哉、和久友則、小堀哲生
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ペプチドの細胞内デリバリー
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山知沙・和久友則・小堀哲生・田中直毅
2. 発表標題 抗原を担持した細胞内環境応答性ペプチドナノファイバーの 設計と機能評価
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山魁人・和久友則・小堀哲生・田中直毅
2. 発表標題 ペプチドナノファイバーの線維長精密制御と抗原デリバリー キャリアへの応用
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川貴士・和久友則・小堀哲生・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 PVA 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 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山知沙・和久友則・小堀哲生・田中直毅
2. 発表標題 抗原を担持した細胞内環境応答性ペプチドナノファイバー の作製と機能評価
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山魁人・和久友則・小堀哲生・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精密作製と 抗原デリバリーキャリアへの応用
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和久友則・小枝清花・小堀哲生・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精密作製と抗原デリバリーキャリアへの応用
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Waku・Akio Kobori・Naoki Tanaka
2. 発表標題 Design of Intracellular Environment-responsive Peptide Nanofibers for Antigen Delivery
3. 学会等名 5th International Symposium on Advances in Sustainable Polymers (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	小堀 哲生 (Kobori Akio) (00397605)	京都工芸繊維大学・分子化学系・教授 (14303)	

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
---------	---------