

鳥取県環境学術研究等振興事業費補助金研究実績報告書（環境創造部門）

研究期間（2年目/3年間）

研究者 又は 研究代表者	氏名	(ふりがな) まつうらかずのり 松浦 和則
	所属研究機関 部局・職	鳥取大学 大学院工学研究科・教授 電話番号 0857-31-5262 電子メール ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp
研究課題名	ペプチドナノカプセルを活用した人工ワクチンの開発	
研究結果	<p>[本年度の研究結果（研究方法、実験結果、分析結果等）について、当初の研究計画に沿って端的に記すこと。詳細なデータ等については、別に添付も可。]</p> <p>[非公開としたい部分は、罫線で囲うなどして明確にし、その理由を記すこと。]</p> <p>Fmoc固相合成によりCys残基を有するβ-Annulusペプチドを合成し、5'末端にアミノ基を有する核酸系アジュバントCpGと架橋剤で連結することに成功した。また、β-Annulus-CpGペプチドコンジュゲートの水中での自己集合挙動を動的光散乱(DLS)測定、透過型電子顕微鏡(TEM)観察、ζ電位測定により評価した。核酸系アジュバントCpGを提示した人工ウイルスキャプシドをマウス(C57BL/6系統)骨髄由来pDC細胞に導入し、各種サイトカイン(IL-6, IL-12, IFNα, IFNγ)の産生量をELISA法により評価した。</p>	
研究成果	<p>[本年度の研究成果（知見・技術）について、具体的に記すこと。詳細なデータ等については、別に添付も可。]</p> <p>[非公開としたい部分は、罫線で囲うなどして明確にし、その理由を記すこと。]</p> <p>β-Annulus-CpGペプチドコンジュゲートを水中に分散させ、自己集合させることにより、100nm程度の粒径の球状集合体を形成していることが動的光散乱(DLS)測定および透過型電子顕微鏡(TEM)観察から明らかとなったが、時間経過とともに、数百nmの凝集体を形成することがわかった。また、ζ電位測定から、核酸CpGがナノカプセル表面にあることがわかった。これをマウス(C57BL/6系統)骨髄由来pDC細胞に導入したところ、サイトカインIL-6およびIFNγの産生量がCpGのみの場合と比べて増大することがわかった。つまり、CpGを人工ウイルスキャプシドに提示することで、アジュバント効果が増強されていることがわかった。核酸を提示した人工ウイルスキャプシドの自己集合挙動に関しては、以下の論文に発表した。Yoko Nakamura, Saki Yamada, Shoko Nishikawa, and Kazunori Matsuura, "DNA-modified Artificial Viral Capsids self-assembled from DNA-conjugated β-Annulus Peptide", <i>J. Pept. Sci.</i>, 2017 [DOI: 10.1002/psc.2967].</p>	
次年度研究計画	<p>[次年度の研究計画について簡潔に記すこと]</p> <p>現在得られているCpG提示人工ウイルスキャプシドは、凝集しやすいという欠点があるので、分子設計を見直し、凝集しないようなCpG提示人工ウイルスキャプシドを合成する。また、ヒトパピローウイルスやWilms腫瘍(WT1)の抗原ペプチドを提示した人工ウイルスキャプシドを合成し、抗体産生能などを評価する。</p>	
報告責任者	所属・職 氏名	鳥取大学 研究推進部 研究推進課 研究助成係 高田 志保 電話番号 0857-31-5494 電子メール ken-jyosei@ml.adm.tottori-u.ac.jp

注1) 表題には、環境部門、地域部門、北東アジア学術交流部門のいずれかを記載すること。

2) 「研究期間（ 年目/ 年間）」及び「次年度研究計画」は、環境部門のみ記載すること。

3) 研究者の知的財産権などに関する内容等で、非公開としたい部分は、罫線で囲うなど明確にし、その理由を記すこと。

4) 研究実績のサマリーを併せて提出すること。

「ペプチドナノカプセルを活用した人工ワクチンの開発」

鳥取大学 大学院工学研究科・教授 松浦和則

緒言

ウイルス性感染症の拡大を防止することは、科学のみならず社会問題として緊急に解決すべき課題である。これらの感染防御法として、新たなコンセプトに基づくワクチンの開発が強く望まれている。我々はこれまで、天然のトマトブッシュスタンウイルスの骨格形成に関わっているとされる β -Annulus 配列の 24 残基ペプチドを合成し、その自己集合によりウイルス様ナノカプセルを構築することに世界で初めて成功している。本研究では、新たな人工ワクチンの開発を指向して、自己集合性のペプチドナノカプセルの表面に核酸系免疫活性化分子 (CpG) を構造制御して提示する方法を開拓し、その細胞内導入および抗体産生能を評価することを目的としている

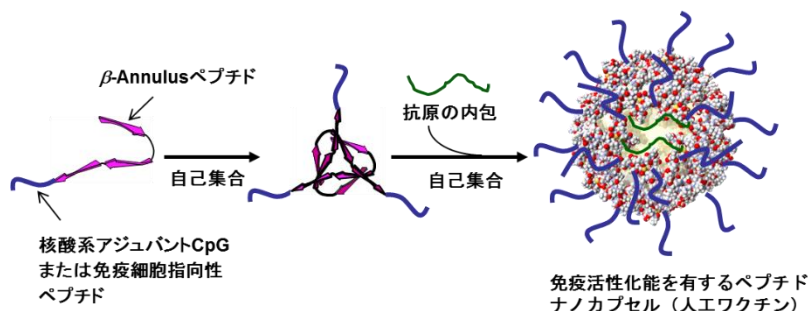


図 1. 核酸系免疫活性化分子 (CpG) を提示したペプチドナノカプセルの構築

(図 1)。昨年度までに、Fmoc 固

相合成により Cys 残基を有する β -Annulus ペプチドを合成し、5'末端にアミノ基を有する核酸系アジュバント CpG と架橋剤で連結することに成功した。また、 β -Annulus-CpG ペプチドコンジュゲートの水中での自己集合挙動を動的光散乱(DLS)測定、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察、 ζ 電位測定により評価し、100 nm 程度の CpG 提示人工ウイルスキャプシドが構築できたことを確認した。

本年度の成果

β -Annulus-CpG ペプチドコンジュゲートを滅菌蒸留水に溶解し、79 μ M (CpG 換算 500 μ g/mL) に調製し、比較として CpG(K3)及び CpG(D35)をコンジュゲートと同濃度(CpG 換算)に調製した。マウス(C57BL/6 系統)骨髄由来 pDC 細胞(FLT3-Ligand で 1 週間培養)を 96 well plate に 1×10^7 cells/mL で 50 μ L/well 播種し (final 5×10^5 cells/100 μ L/well)、これに各濃度のサンプルを 50 μ L/well 添加後、37°C で 1 日培養した。培養上清を回収し、各種サイトカイン(IL-6, IL-12, IFN α , IFN γ)を ELISA にて測定した。その結果、IL-6 及び IFN- γ については、 β -Annulus-CpG ペプチドコンジュゲートとすることで、フリーの CpG(K3)と比較して産生量が増大することがわかった (図 2)。一方、IL-12 及び IFN- α では、 β -Annulus-CpG ペプチドコンジュゲートとフリーの CpG(K3)で産生量の差が認められなかった。さらに、マウス(C57BL/6 系統)に下記の (群) の通り耳に免疫後、7 日目にリンパ節を回収し、FACS により OVA 特異的細胞障害性 T 細胞を測定した。その結果、ばらつきはあるものの、CpG 15 μ g 群と比較して、 β -Annulus-CpG ペプチドコンジュゲートとすること細胞障害性 T 細胞が多く誘導されていることが明らかとなった (図 3)。以上のことから、 β -Annulus-CpG ペプチドコンジュゲートが自己集合して形成される人工ウイルスキャプシドによって、免疫アジュバント効果が増強されることは確かだと考えられる。

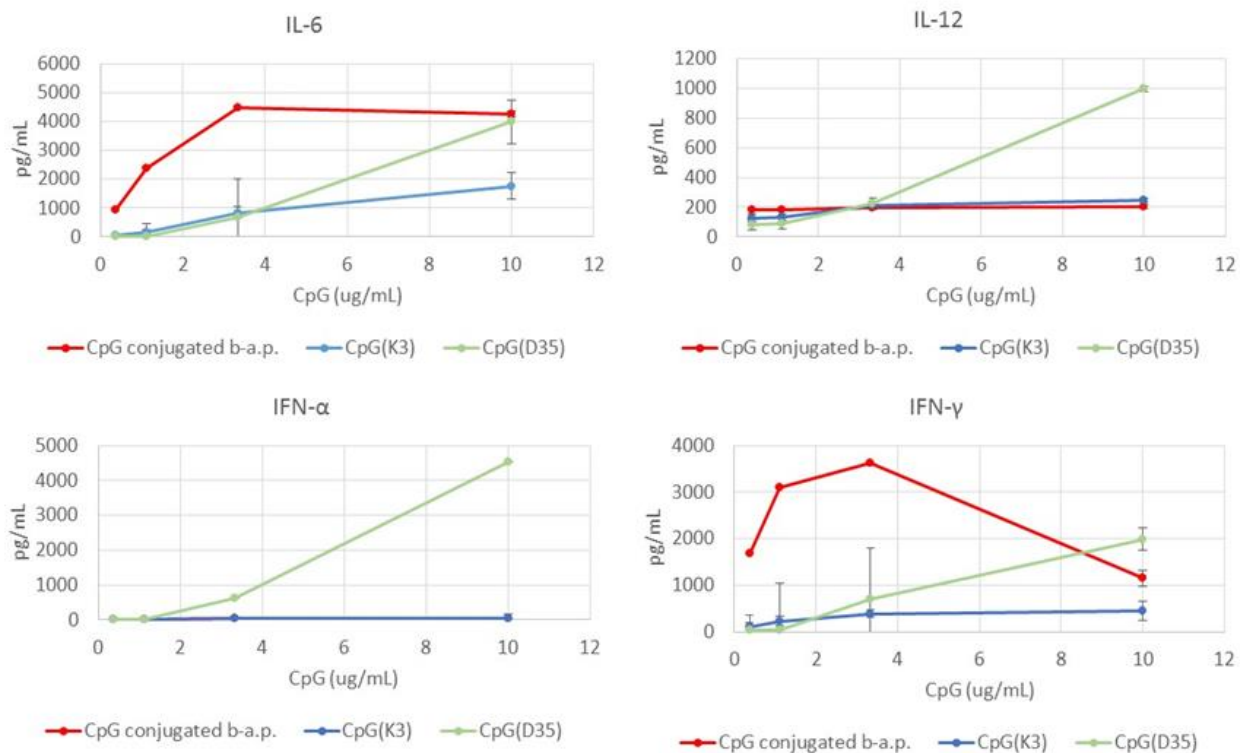


図 2. CpG および β -Annulus-CpG ペプチドコンジュゲートによるサイトカインの誘導.

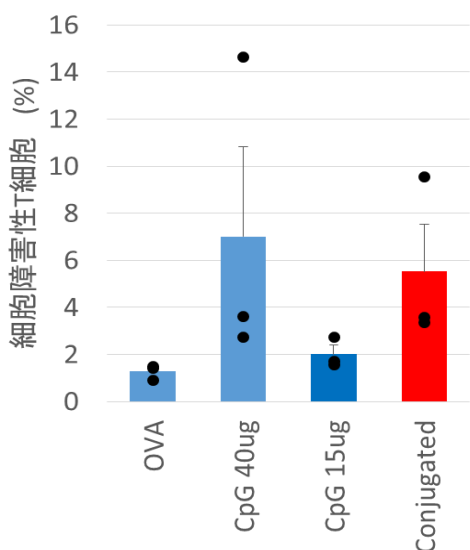


図 3. CpG および β -Annulus-CpG ペプチドコンジュゲートによる細胞障害性 T 細胞の誘

今後の研究計画

現在得られている CpG 提示人工ウイルスキャプシドは、凝集しやすいという欠点があるので、分子設計を見直し、凝集しないような CpG 提示人工ウイルスキャプシドを合成する。また、ヒトパピローマウイルスや Wilms 腫瘍(WT1)の抗原ペプチドを提示した人工ウイルスキャプシドを合成し、抗体産生能などを評価する。

また、DNA を有する人工ウイルスキャプシドの基礎的な諸性質を明らかにするために、dA₂₀ および dT₂₀ 修飾 β -Annulus ペプチドコンジュゲートを合成し、それらの自己集合挙動やハイブリダイゼーション挙動を調査した。その結果、これらのコンジュゲートは核酸を表面に有する 100 nm 程度の人工ウイルスキャプシドを形成し、部分的にハイブリダイゼーションできることが蛍光スペクトルおよび TEM 観察から明らかとなった (論文成果 1)。

成果発表

- 1) Yoko Nakamura, Saki Yamada, Shoko Nishikawa, and Kazunori Matsuura, “DNA-modified Artificial Viral Capsids self-assembled from DNA-conjugated β -Annulus Peptide”, *J. Pept. Sci.*, 2017 [DOI: 10.1002/psc.2967].