ペプチドとの相補的共集合による オンデマンド型DDSキャリアの創製

若　林　里　衣*

On-demand Drug Delivery Carriers by a Complementing Co-assembly with Peptides

Rie WAKABAYASHI*

Self-assembled materials have a great potential as a carrier for drug delivery system (DDS). In this study, we used self-assembly peptides as a base material to develop on-demand DDS nanocarrier with a control of the size and shape by the design of the peptides. To co-assemble with drug-model molecules, we introduced a complementary interaction pair, cyanuric acid and melamine derivatives, to the peptides and drug-model molecules, respectively. Upon mixing, they formed one-dimensional nanostructures and the size of the structures was controlled by the number of alkyl spacers introduced to the peptides. Moreover, the intracellular delivery of the co-assembled carriers was dependent on the size of the carrier. These results would give a new idea to design DDS carrier for a specific target.

１．はじめに

ドラッグデリバリーシステム (DDS) とは，薬物を適切な濃度で適切な部位に送達するためのシステムである．リポソームやミセル等，脂質分子や高分子等の天然あるいは人工分子が自発的に組織化し形成する自己組織化材料が DDS を達成するためのナノキャリアとして注目されている．ナノキャリアの最大の特徴は，サイズや形状をナノスケールで制御できることである．近年の DDS 研究において，キャリアのサイズ[1]や形状[2]が体内動態や標的細胞への取り込みに与える影響が報告されており，標的に応じてこれらを自在に制御することが重要であると言える．

本研究では，自己組織化材料の一つであり構造多様性に富む自己組織化ペプチドを基材とし，自己組織化ペプチドの設計によりキャリアのサイズや形状を制御したオンデマンド型のナノ DDS キャリアを形成することを目的とした．ここで，キャリアへの薬物の担持法として相補的相互作用を利用し，自己組織化ペプチドと薬物分子とを共集積化させる戦略により，薬物搭載量の制御も可能なシステムの構築を目指した (図１)．[3]

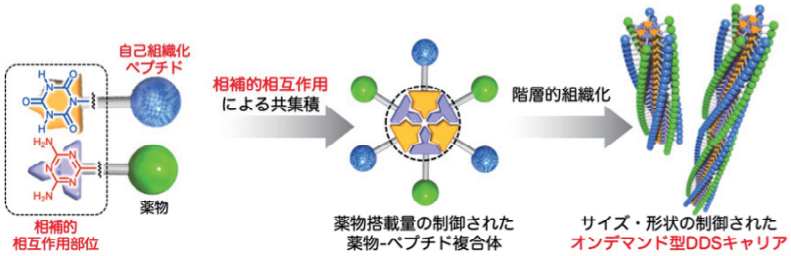

図 １　本研究の概念図．相補的相互作用により自己組織化ペプチドと薬物を共集積化，続く階層的組織化によりナノ DDS キャリアを形成する．

２．自己組織化ペプチドの分子設計と共集合体のサイズ制御

自己組織化ペプチドは，相補的相互作用部位，自己組織化部位，生理活性部位の 3 つの部位に分け設計を行った．本研究では相補的相互作用部位として 3:3 の多重水素結合を形成するシアヌル酸とメラミン誘導体，生理活性部位にはがん細胞に高発現するインテグリンに対するリガンド Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を導入した．自己組織化部位にはアルキル基スペーサーと水素結合性のペプチド配列を導入し，アルキル基スペーサーの数を変化させることでキャリアのサイズ制御を目指した．これらのペプチド Cya-PA と共集積化させる薬物モデル分子には蛍光プローブ nitrobenzofurazan をメラミン誘

2020年3月8日 受理
* 豊田理研スカラー
九州大学大学院工学研究院応用化学部門

導体と結合した Mel-NBD を用いた (図 2A). Cya-PA, Mel-NBD はいずれも特定の構造体を形成しなかったが，両者を 1:1 のモル比で混合した際に一次元構造体の形成が認められた. 興味深いことに，Cya-PA1/Mel-NBD では数百 nm 程度，Cya-PA2/Mel-NBD では数マイクロメートル以上の構造体が形成された (図 2B). FT-IR スペクトル解析を行った結果，Cya-PA2/Mel-NBD ではペプチドのアミド間水素結合が強く働き，長軸方向への成長を促していることが示唆された. さらにアルキル基スペーサーの数や水素結合性ペプチド配列の数を変化させた結果，本設計においては主にアルキル基スペーサーの数により共集合体のサイズや形状の制御が可能であることが示された.

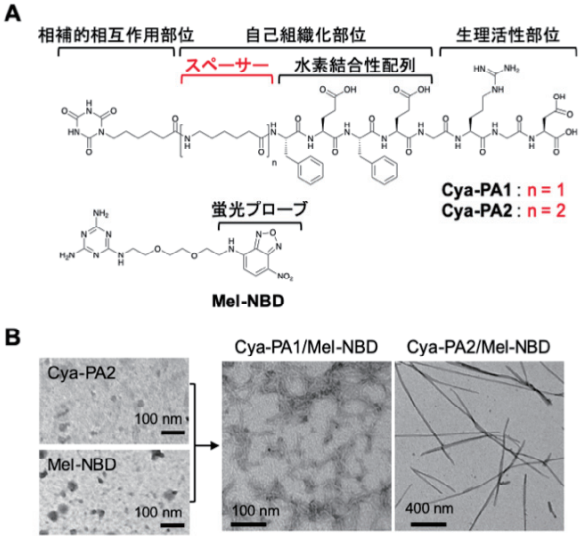

図 2 (A) 本研究で用いた自己組織化ペプチドと薬物モデル分子の設計. (B) Cya-PA1/Mel-NBD および Cya-PA2/Mel-NBD 共集合体前後の電子顕微鏡画像.

3. サイズに依存したがん細胞への取り込み制御

得られた共集合体の薬物キャリアとしての評価を行うため，子宮頸がん由来の HeLa 細胞への *in vitro* 取り込み評価を行った. 蛍光顕微鏡を用いた観察の結果，NBD 由来の緑色蛍光が細胞内に見られ，いずれの Cya-PA/Mel-NBD 共集合体も速やかに細胞内へ取り込まれることが明らかになった (図 3A). フローサイトメトリーを用いた定量評価において，共集合化により細胞内取り込み効率が向上すること，取り込み効率は共集合体のサイズに依存することが示された (図 3B). 細胞内取り込みのメカニズムの解析より，集合体表面の RGD 配列が細胞表層のインテグリンに結合することが取り込み効率の向上に寄与すること，エンドサイトーシスを経由せず細胞膜に直接作用する経路で取り込みが生じていることが示唆された. 現在，取り込まれた薬物モデル分子の細胞内局在の評価を進めており，今後細胞種依存性や体内動態の評価，抗がん剤を用いた検討を行っていく予定である.

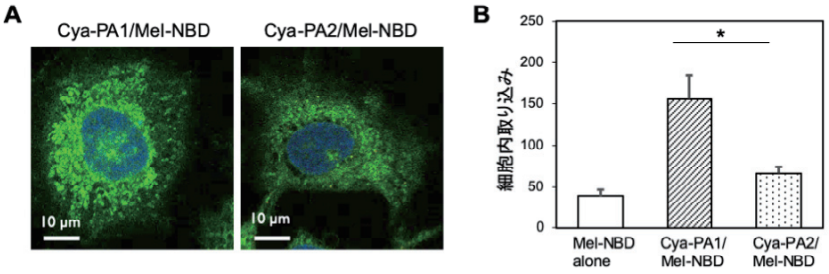

図 3 (A) Cya-PA1/Mel-NBD および Cya-PA2/Mel-NBD 共集合体の HeLa 細胞内への取り込みと細胞内局在. 核 (青色蛍光) は Hoechest 33342 により染色. (B) 細胞内取り込み量の定量評価. N = 3, mean ± SD, *p<0.05.

4. まとめ

本研究では，相補的相互作用を用いて薬物分子を自己組織化ペプチドと共集積化させる手法により，サイズや形状を制御した DDS キャリアの創製を行った. その結果，相補的相互作用を核とした構造体形成という戦略を用いることで，アルキル基スペーサーという比較的単純な構造因子により構造体のサイズ制御を達成することができた. さらに自己組織化材料が細胞へ相互作用する際に，サイズが重要な因子であることが確認され，自己組織化ペプチドを用いた DDS 研究における重要な知見が得られた.

謝辞

本研究は公益財団法人豊田理化学研究所の豊田理研スカラーのご支援のもと，九州大学工学研究院応用化学部門　後藤・神谷研究室で実施されました. 豊田理化学研究所の関係各位ならびに共同研究者である後藤雅宏教授, 神谷典穂教授, 大林洋貴氏に感謝申し上げます.

REFERENCES

1) Kataoka, *et al., Nat. Nanotech.*, **6** (2011) 815-823.
2) D. Crespy, *et al., Small*, **8** (2012) 2222-2230.
3) R. Wakabayashi, *et al., Chem. Commun.*, **55** (2019) 6997-7000.