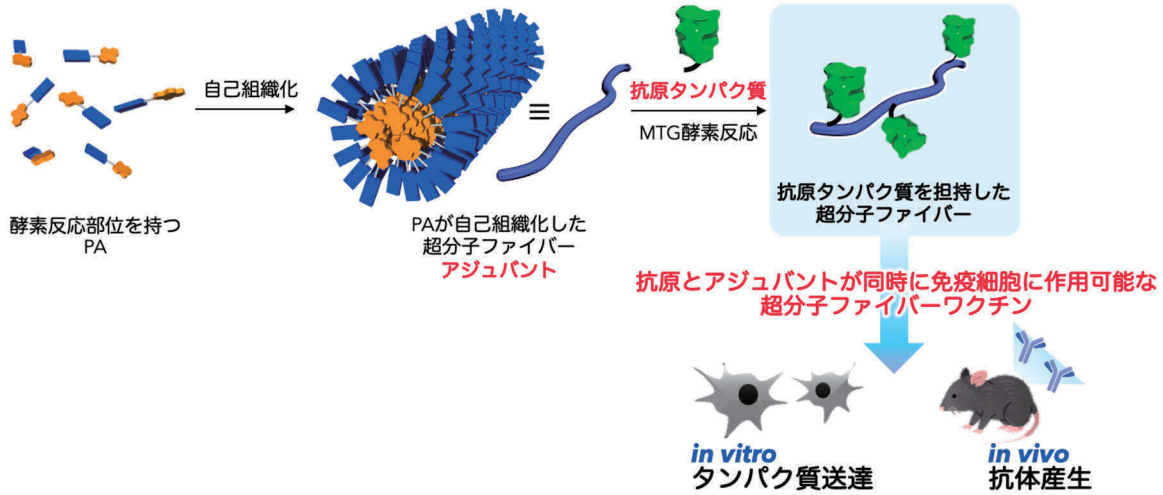
85　超分子ファイバーを基盤としたワクチンの物性と免疫	若林　里衣

【目的】本研究の目的は、高いワクチン効果と誘導される免疫反応の制御が可能なワクチンの創製である。そのために、抗原タンパク質と免疫賦活剤（アジュバント）を同時に免疫細胞に作用できる材料が有効であると考えた。そこで本研究では、アジュバント能を示すことが報告されている、両親媒性ペプチド（PA）が自己組織化により形成する超分子ファイバーに対し酵素反応性を付与することで、酵素反応を用いて抗原タンパク質を直接結合可能な超分子ファイバーの創製とワクチン応用を目指した。

【方法】我々がこれまでに開発している微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTG）反応性の PA の分子設計を基に、本研究では細胞への送達能を考慮し、新たに疎水部に Pyrenyl 基を持つ 2 種類の PA、Pyr-L2QG と Pyr-L3QG を設計・合成した。水溶液中での自己組織化、形成された超分子ファイバーへの MTG 反応によるモデル抗原タンパク質 Ktag-EGFP の担持と免疫細胞への送達能、およびマウスへの免疫化による抗体産生について評価を行った。

【結果】本研究で新たに設計・合成した 2 種類の PA は、いずれも Pyrenyl 基間のπ-π相互作用とペプチド間の水素結合形成により自己組織化し、一次元に成長した超分子ファイバーを形成した。これらの超分子ファイバーは高い MTG 反応性を持ち、モデル抗原タンパク質 Ktag-EGFP の反応率はいずれの PA 超分子ファイバーに対しても 80%以上であった。また反応後のファイバー上に EGFP が担持されていることが蛍光顕微鏡観察により確認された。マウス由来樹状細胞 DC2.4 細胞を用いた細胞への送達性評価においては、Ktag-EGFP 単独、あるいは超分子ファイバーとの物理混合物と比較して、ファイバーへ直接担持したサンプルを用いた場合に、抗原タンパク質の送達性が有意に高くなることが確認された。これはマウスを用いた免疫化実験においても同様であり、抗原特異的な抗体産生が向上することが確認された。つまり、超分子ファイバーは抗原と同時に投与することでアジュバント能を示すものではなく、直接抗原を担持することで免疫細胞への高い送達能と抗体産生を可能にするものであることが示され、抗原タンパク質とアジュバントを直接結合するという本研究の戦略の有効性を示すことに成功した。

抗原タンパク質を直接担持した超分子ファイバーの創製とワクチン応用



85. 超分子ファイバーを基盤としたワクチンの物性と免疫

若林　里衣

九州大学 大学院工学研究院

Key words：ワクチン，アジュバント，両親媒性ペプチド，超分子，酵素反応

緒　言

ワクチンは、数々の感染症の予防や症状の重篤化を抑制するために有効な医薬品であり、細菌やウイルス由来の抗原を投与、あるいは体内で発現することで、抗原特異的な免疫を誘導する。ワクチンによる高い免疫効果を得るためには、抗原の免疫系細胞へのデリバリーと免疫賦活剤（アジュバント）の同時投与が重要である［1］。例えば Oil-in-Water （O/W）型エマルションであるアジュバント MF59 は抗原と同時に投与することでアジュバント効果を示すことが知られており、インフルエンザワクチンに用いられている［2］。しかしながら従来のアジュバントはいずれのものも、抗原とは直接結合されず、物理的に混合され投与される。そのため、アジュバントと抗原は必ずしも同一の免疫細胞に作用するのではなく、メカニズムは未解明な点も多い。我々は、アジュバントと抗原を同時に特定の免疫細胞に作用させることができれば、高いワクチン効果を得ると同時に、誘導される免疫反応の制御が可能になるのではないかと考えた。そこで両親媒性ペプチド（PA）が自己組織化により形成する超分子ファイバーがアジュバントとして機能する報告に着目した［3］。我々はこれまでに微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTG）反応部位を持つ PA を開発し、この PA が形成する超分子ファイバー上にタンパク質を直接結合させることに成功している［4，5］。本研究ではこの PA を基に、抗原タンパク質を担持した超分子ファイバーを基盤としたワクチンの創製を目的とした（図 1）。細胞への送達能を考慮し設計した PA を用いて形成した超分子ファイバーは、抗原タンパク質を高効率に免疫細胞へ送達し、マウス体内において高い抗体産生を示した。

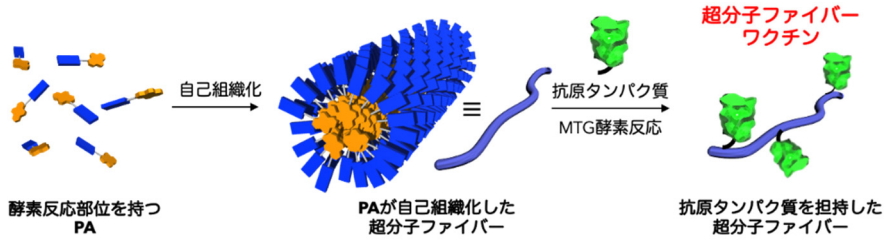


図 1. 本研究のワクチン創製の概略図
酵素反応部位を持つ PA を開発し、水中で集合させた超分子ファイバーを作製する。MTG 酵素反応により抗原タンパク質を担持した超分子ファイバーをワクチンとして用いる。

方　法

1. PA の合成および自己組織化評価

疎水部に Pyrenyl 基を持つ PA を設計し、固相合成法により合成した（図 2）。得られた PA 粉末に各種緩衝液（クエン酸もしくはリン酸緩衝液）を加え、加熱し溶解させた後、室温まで冷却し、自己組織化させた（PA 濃

度 : 1.0 mM)。自己組織化の評価は蛍光スペクトル、フーリエ変換赤外分光スペクトル（FT-IR）測定により行った。また透過型電子顕微鏡（TEM）観察により超分子ファイバーの形態観察を行った。

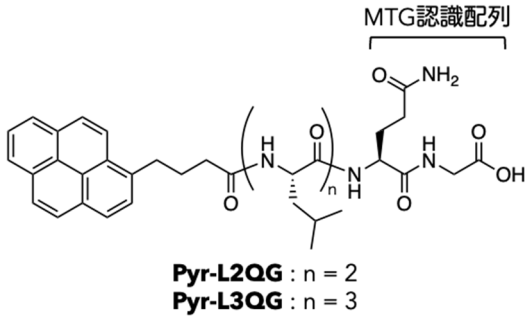


図2. 本研究で用いたPAの分子設計
MTG酵素反応部位としてQG配列を持ち、疎水部にPyrenyl基および複数のLeu残基を持つPAを設計した。

2. 超分子ファイバーへの MTG 反応を用いた抗原タンパク質の担持

モデル抗原タンパク質として、MTG 反応性の Lys 含有ペプチド配列を導入した緑色蛍光タンパク質（Ktag-EGFP）を用いた。上記に従い形成した超分子ファイバーに Ktag-EGFP、MTG を加え、37℃で 2 時間反応を行った。反応率は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により算出した。また超分子ファイバー上への Ktag-EGFP の担持は共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）観察により行った。超分子ファイバーは 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid（ANS）により染色し観察した。

3. 抗原タンパク質の免疫細胞への送達能評価

免疫細胞としてマウス由来樹状細胞 DC2.4 細胞を用いた。DC2.4 細胞を 24-well マルチウェルプレートに播種し、24 時間培養した。上記形成させた Ktag-EGFP 担持超分子ファイバーおよび各種コントロールサンプルを添加し、4 時間後にサンプルを除去した。洗浄後、細胞を剥離し、フローサイトメトリにより細胞に送達された Ktag-EGFP 量を定量した。また、細胞内局在については CLSM 観察により評価した。

4. 抗体産生能評価

B57BL/6N マウスに上記作製した Ktag-EGFP 担持超分子ファイバーおよび各種コントロールサンプルを用いて免疫化を行った。免疫化は 2 週間おきに 2 回行い、免疫化前および初回免疫から隔週で血清を採取し、血清中の抗 EGFP 抗体価を ELISA 法により測定した。

結果および考察

1. PA の合成および自己組織化評価

Pyrenyl 基を有する 2 種類の PA は、HPLC による精製後、MALDI-TOF-MS および HPLC による分析を行った。自己組織化の評価は、純水、クエン酸緩衝液（pH 6.5）およびリン酸緩衝液（pH 6.5）中で行った。蛍光スペクトル測定では、Pyr-L2QG は緩衝液依存性を示し、純水中では Pyrenyl 基のモノマー由来の発光が支配的であったのに対し、緩衝液中においてはエキシマー発光が見られ、Pyrenyl 基間のπ-π相互作用が働くことが示された。Pyr-L3QG は、全ての溶液中において強いπ-π相互作用が確認された（図 3a）。FT-IR を用いたペプチド間の水素結合の評価では、いずれの PA も、全ての溶液中でペプチド間の水素結合形成が支持された（図 3b）。TEM 観察より、Pyr-L2QG および Pyr-L3QG ともに一次元方向に発達したファイバーの形成が確認された（図

3c)。以上より、本研究で新たに合成した PA は、クエン酸あるいはリン酸緩衝液中において Pyrenyl 基間のπ-π相互作用とペプチド間の水素結合形成により、発達した超分子ファイバーを形成することが明らかになった。

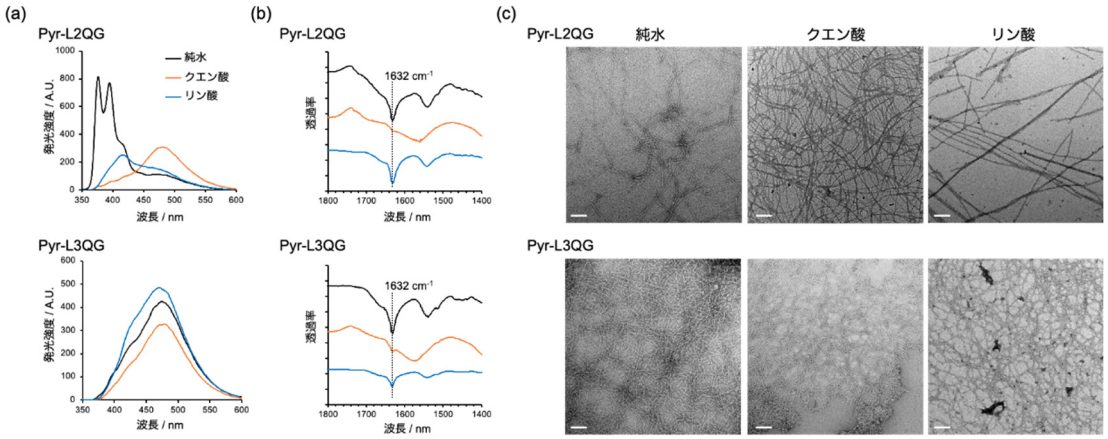


図 3. PA の自己組織化評価

純水、クエン酸、リン酸緩衝液中での PA の自己組織化を評価した。[PA]＝1.0 mM。

a）蛍光スペクトルを用いた評価。励起波長は 340 nm である。

b）FT-IR を用いた評価。凍結乾燥した固体を用い、ATR モードで測定を行った。

c）TEM 観察結果。スケールバー：100 nm。

2. 超分子ファイバーへの MTG 反応を用いた抗原タンパク質の担持

HPLC による反応率の算出結果、いずれの PA も 80%以上の Ktag-EGFP が MTG 反応により PA と反応したことが示された。CLSM により直接観察を行うと、ANS で染色された超分子ファイバーに沿って EGFP 由来の緑色蛍光が観察され、超分子ファイバー上に抗原タンパク質を担持できることが示された（図 4）。

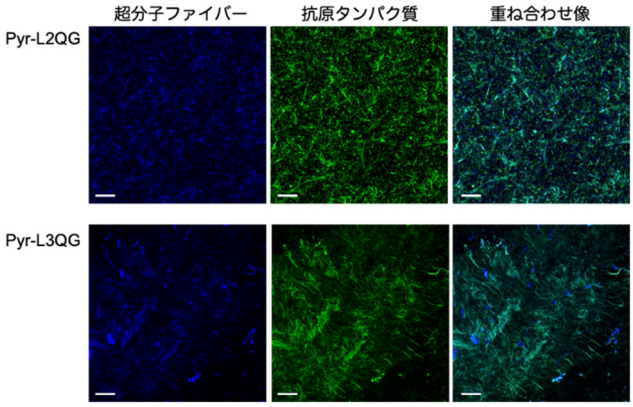


図 4. MTG 反応による抗原タンパク質の超分子ファイバーへの担持

ANS（青色）で染色された超分子ファイバーに沿って抗原タンパク質である EGFP 由来の緑色蛍光が観察された。スケールバー：10 μm。

3. 抗原タンパク質の免疫細胞への送達能評価

フローサイトメトリによる定量結果、上記調製した EGFP が超分子ファイバー上に担持されたサンプルを添加した場合において、Ktag-EGFP 単独あるいは Ktag-EGFP と超分子ファイバーを物理混合したサンプルと比較して有意に高い細胞への送達が確認された。このことは、超分子ファイバーが共存することではなく、超分子フ

ファイバー上に直接担持することで、抗原タンパク質の細胞への送達能が向上することを示している。また、PA 種で比較すると、Pyr-L2QG と比較して Pyr-L3QG が形成するファイバーを用いた場合に細胞への送達性が向上した（図 5a）。これは CLSM 観察によっても支持され、超分子ファイバーに担持された EGFP が細胞内や細胞膜上に存在することが確認された（図 5b）。

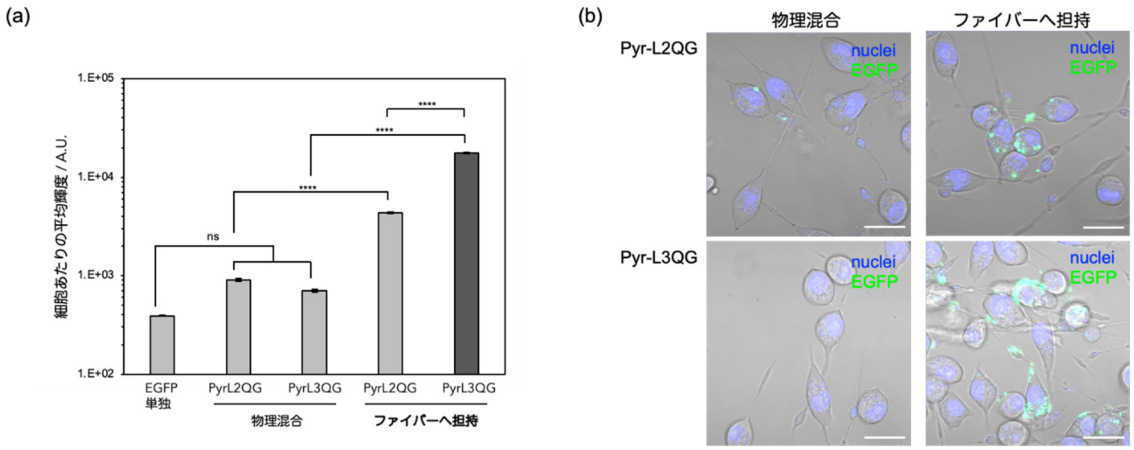


図 5. 超分子ファイバーへの担持による抗原タンパク質の細胞への送達性の向上

マウス由来樹状細胞 DC2.4 への抗原タンパク質 EGFP の送達性を評価した。

a）フローサイトメトリによる細胞へ送達された EGFP の定量結果（N＝3、mean±SD）。統計処理は Graphpad Prism9 により行い、ANOVA の後 Tukey 法による事後検定を　行った（n.s.：not significant、****：$p<0.0001$）。

b）CLSM による細胞周辺の EGFP の局在評価。スケールバー：10 μ m。

4. 抗体産生能評価

B57BL/6N マウスを用いた免疫化実験の結果、Ktag-EGFP 単独あるいは超分子ファイバーと物理混合したものを投与した群と比較して、超分子ファイバーに Ktag-EGFP を直接担持させたものを投与した群において高い抗体産生が確認された（図 6）。以上より、本研究で新たに作製した PA 超分子ファイバーは、抗原と同時投与するだけでアジュバント効果を示すものではなく、その構造体上に抗原を直接担持することで免疫細胞への高効率な送達能と免疫誘導を示すものであることが示唆された。現在詳細なメカニズムの評価およびさらなる超分子ファイバー、製剤の改良を行っているところである。

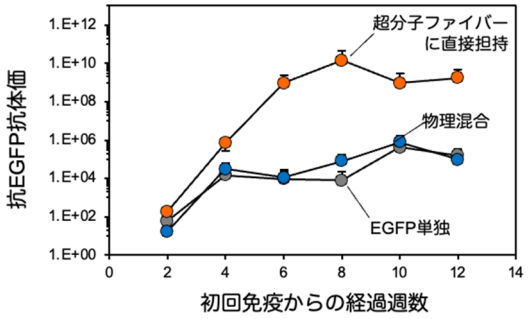


図 6. C57BL/6N マウスを用いた抗体産生評価

EGFP単独あるいは超分子ファイバーと物理混合して投与した群と比較して、超分子ファイバーに直接担持した群において、高い抗体産生が確認された（N＝5、mean±SD）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院工学研究院応用化学部門後藤・神谷研究室の後藤雅宏教授、神谷典穂教授、Ghazian Dzaky 氏、樋口亜也斗氏、難波江友紀氏である。本研究遂行のためにご支援賜りました上原記念生命科学財団に心より感謝を申し上げます。

文　献

1） Luis A. Brito, Derek T. O'Hagan, Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. J. Controlled Release. 2014 Sep 28;190:563-79. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24998942 DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.06.027

2） D. T. O'Hagan, G. S. Ott, E. De Gregorio, A. Seubert, The mechanism of action of MF59 – an innately attractive adjuvant formulation. Vaccine. 2012 Jun 19;30(29):4341-8. PMID: 22682289 DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.061

3） Conor L. O'Neill, Paresh C. Shrimali, Zain P. Clapacs, Megan A. Files, Jai S. Rudra, Peptide-based supramolecular vaccine systems. Acta Biomater. 2021 Oct 1;133:153-167. Epub 2021 May 16. PMID: 34010691 DOI: 10.1016/j.actbio.2021.05.003

4） Rie Wakabayashi, Ayumi Suehiro, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, Designer aromatic peptide amphiphiles for self-assembly and enzymatic display of proteins with morphology control. Chem. Commun (Camb). 2019 Jan 10;55(5):640-643. PMID: 30628590 DOI: 10.1039/c8cc08163h

5） Rie Wakabayashi, Ayato Higuchi, Hiroki Obayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, pH-Responsive Self-Assembly of Designer Aromatic Peptide Amphiphiles and Enzymatic Post-Modification of Assembled Structures. Int. J. Mol. Sci. 2021 Mar 27;22(7):3459. PMID: 33801602 DOI: 10.3390/ijms22073459