

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21070

研究課題名(和文)小口径人工血管開発を目指した『ペプチド・ECM』選択的ペプチドの網羅的探索

研究課題名(英文) Screening of ECM-selective peptide for Small-diameter artificial blood vessels

研究代表者

蟹江 慧 (Kanie, Kei)

名古屋大学・創薬科学研究科・助教

研究者番号：80636407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、人工血管の治癒効果を高める『短鎖選択的接着ペプチド』を取得することである。具体的には、特定の細胞外マトリックス(ECM)だけを接着させるペプチド、内皮細胞だけを接着させるペプチドをコンビナトリアルに網羅的に探索し、最適配列を発見することである。研究1年目の平成27年度では、特に上記の特定のECMタンパク質だけを接着させるペプチドの探索を行い、3残基ペプチドにてコラーゲンIV選択的接着ペプチドを数種類発見した。研究最終年度の平成28年度では、内皮細胞を選択的に接着させるペプチド配列の最適化を試み、高分子材料との組み合わせによる効果の検証と制御に成功した。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is obtaining short selective-peptides for enhancing the effect of artificial blood vessel. There are two detail aims, one is screening ECM-selective adhesion peptides, and another is screening endothelial cell(EC)-selective adhesion peptides. As a result, some Collagen IV-selective peptides and EC-selective peptides were successfully obtained in this two years. Additionally, combination of peptide and polymeric materials could control the EC-selectivity.

研究分野：生物化学工学

キーワード：ペプチド 人工血管 バイオマテリアル 内皮細胞 高分子材料 コラーゲンIV 間葉系幹細胞 骨再生

1. 研究開始当初の背景

人工血管の研究は50年以上にも及び研究があるにも関わらず、自家血管に勝る人工血管(特に小口径・直径6mm以下)はいまだに開発されていない(Int J Cardiol. 167(4):1091-100.2013)。最大の理由は、生体血管を材質的・構造的に再現できる人工材料が少ないためである。

このため、近年は人工血管に「生体に学んだ機能性」を付加する高機能化分子の開発が盛んである。人工血管材料への抗体分子の修飾(J Mater Sci Mater Med. 2009 Jul;20(7):1513-23.)、細胞接着ペプチドの修飾(Acta Biomater. 2010 Dec;6(12):4634-41.)などが進められているが、まだその機能性には「生体親和性」と「選択的機能性」の二つの課題がある。第一に、抗体分子などの大きな分子や動物由来の高分子は、感染リスクの問題や抗原性を低減するためのキメラ化などの課題が残る。第二に、これまで利用されてきた多くの生体分子は、細胞接着性などの単一機能性は担保しているが、「目的以外の物質や細胞に対する副作用」が相対的に評価されていない。具体的には、多くの接着分子は「血栓誘発物質も接着させてしまう」「血管過増殖細胞も接着させてしまう」ため、再狭窄という副作用の課題を解決できていない。

2. 研究の目的

研究の目的は、人工血管の治癒効果を高める「短鎖選択的接着ペプチド」を取得することである。具体的には

特定の細胞外マトリクス(ECM)だけを接着させる

内皮細胞だけを接着させる

ペプチドをコンビナトリアルに網羅的に探索し、最適配列を発見することである。

3. 研究の方法

具体的には、以下の2点を明らかにする。

1. コラーゲン Type IV・ラミニン・トロンプインの選択的接着・非接着ペプチドの網羅的探索

コラーゲン Type IV はコラーゲンの中でも特に基底膜成分として血管構成細胞の機能性制御を行う分子で、ラミニンも血管構成成分の極性獲得・成熟化に重要な分子であるため、これらの選択的接着配列を8000種類のペプチド(3残基ペプチドの全網羅)で解析する。トロンプインは血栓分子であり、これに関しては上記ECM成分と対比して「いかに阻害できるか」を解析する。

2. 内皮細胞を選択的に接着させるペプチドの網羅的探索

これまでの研究(業績6,7)では、3残基ペプチドの中で約1000種類をコンピュータ解析

による構造評価を活用して(業績16,17)広範囲に探索・評価してきたが、全網羅しておらず、真の意味でのルール化は行っていない。本研究ではPIASPAC法の原理をペプチドマイクロアレイへ応用し、全8000種類へ拡大する。具体的に血栓阻害の最も重要な血管内皮被覆に寄与する内皮細胞選択的接着ペプチドを取得・解析する。(対象には過増殖細胞である平滑筋細胞、血小板を使用)

4. 研究成果

本研究の目的は、人工血管の治癒効果を高める『短鎖選択的接着ペプチド』を取得することである。具体的には、特定の細胞外マトリクス(ECM)だけを接着させるペプチド、内皮細胞だけを接着させる、ペプチドをコンビナトリアルに網羅的に探索し、最適配列を発見することである。

平成27年度では、上記特定のECMタンパク質だけを接着させるペプチドの探索と内皮細胞だけを接着させるペプチド探索の条件検討を試みた。この特定のECMタンパク質だけを接着させるペプチド探索では、血管の内皮化に必要なコラーゲンIV、血栓形成の原因となるトロンプインに対して実験を行った。使用したのは、PEPperPRINT社のPEPperCHIPを用い、3残基全8000種類のペプチドに対してスクリーニングを行った。その結果、545種類のペプチドがコラーゲンIVには接着し、トロンプインには接着しない、コラーゲンIV選択的接着ペプチドであることが分かった。さらに、アミノ酸の物理的性質(疎水度、電荷、サイズなど)を表す指標を用い、詳細にコラーゲンIV選択的ペプチドを解析したところ、選択性が低いグループは電荷や疎水度だけでは言い表せない複雑なルールが存在することが分かった。選択性が高いグループでは、ルールが明確化しており、特に3残基目の影響が大きいことが分かった。この内皮細胞接着ペプチド探索にも、PEPperPRINT社のペプチドマイクロアレイを用いた検討を行ったが、ペプチド合成量が足りず、細胞接着実験がうまく進まなかった。しかし、本研究室で開発したペプチドアレイ法を用いることにより、スループット性は落ちるものの探索可能であるため、28年度はペプチドアレイ法を用いた探索を開始した。

研究最終年度の平成28年度では、特にこの内皮細胞だけを接着させるペプチドの配列最適化を試みた。ペプチドの最適化には、ペプチドそのものの濃度検討なども考えられるが、ペプチドを修飾させる先の高分子材料の違いによっても効果が異なるため、ペプチドと高分子の組み合わせの最適化も考慮して研究を展開した。探索により得られた代表的な細胞選択的ペプチド4種類と、異なる物性値を有する6種類の合成高分子を組み合わせ、合計24種類の足場材料を作製した。高分子材料には、細胞培養環境(37°C)において

モノマー配合率を変えることで結晶状態や融点が変わる poly(ϵ -caprolactone-co-D,L-lactide)(以下、P(CL-DLLA)と表記)を用いCLとDLLAの配合率や分子量の違いによる、異なる流動性を持つ6種類の高分子材料の作製に成功した。作製した24種類の足場材料に対し、3種類の細胞(FB、EC、SMC)の1日後の接着実験を行った。その結果、情報解析手法である主成分分析(高次元情報を2次元に圧縮表示する統計学的手法)を用い、ペプチド物性値、高分子材料物性値と細胞接着の関係性をマップ化することができた。さらに、ペプチド物性値と高分子材料物性値により表される物性値マップ図上にて、細胞接着の傾向を評価でき、物性値にて細胞接着の制御ができる可能性が示唆された。また、細胞種によって同じ物性表面に対する応答が異なっており、この差を最大にする物性値の組み合わせを見つければ、細胞選択性を生み出す可能性が見えた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Kei Kanie, Yuto Kondo, Junki Owaki, Yurika Ikeda, Yuji Narita, Ryuji Kato, Hiroyuki Honda, Focused screening of ECM-selective adhesion peptides on cellulose-bound peptide microarrays, *Bioengineering*, 査読あり, 3(4), 2016, 31

DOI:10.3390/bioengineering3040031Rio

Rio Kurimoto, Kei Kanie, Koichiro Uto, Shun Kawai, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, Masanobu Naito, Mitsuhiro Ebara, Ryuji Kato, Combinational Effects of Polymer Viscoelasticity and Immobilized Peptides on Cell Adhesion to Cell-Selective Scaffolds, *Analytical Sciences*, 査読あり, 32(11), 2016, 1195-1202

DOI: 10.2116/analsci.32.1195

Kei Kanie, Rio Kurimoto, Jing Tian, Katsumi Ebisawa, Yuji Narita, Hiroyuki Honda and Ryuji Kato, Screening of Osteogenic-Enhancing Short Peptides from BMPs for Biomimetic Material Applications, *Materials*, 査読あり, 9(9), 2016, 730

DOI:10.3390/ma9090730

Kurimoto, Kei Kanie, Naokazu Idota, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Takehiko Tsukahara, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, Masanobu Naito, Mitsuhiro Ebara, Ryuji Kato, Combinational Effect of Cell Adhesion Biomolecules and Their Immobilized Polymer Property to Enhance

Cell-Selective Adhesion, *International Journal of Polymer Science*, 査読あり, 2016, Article ID 2090985

DOI:10.1155/2016/2090985

〔学会発表〕(計16件)

1. 堀川美希, 蟹江慧, 成田裕司, 竹澤俊明, 加藤竜司, 細胞選択的ペプチドを応用した高機能足場素材の開発, 第67回日本生物工学会大会, 城山観光ホテル, 2015.10.26 – 2015.10.28

2. 堀川美希, 蟹江慧, 栗本理央, 成田裕司, 竹澤俊明, 加藤竜司, 細胞選択的ペプチドを応用した高機能足場材料の開発, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ, 2015.11.09 – 2015.11.10

3. 大口明日基, 栗本理央, 原田知佳, 蟹江慧, 堀川美希, 下川淳, 北村雅人, 成田裕司, 本多裕之, 荏原充宏, 加藤竜司, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ, 2015.11.09 – 2015.11.10

4. 加藤竜司, 堀川美希, 蟹江慧, 竹澤俊明, 成田裕司, 清水一憲, 本多裕之, 細胞選択的ペプチドを応用した高機能足場材料の開発, 第15回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場, 2016.03.19

5. Rio Kurimoto, Kei Kanie, Ryuji Kato, Masanobu Naito and Mitsuhiro Ebara, Design of a smart polymer platform in combinations with biomolecules for biosensor, Japan-Thailand Joint Meeting on Functional Nanomaterials 2016, Bangkok, Thailand, 2016.05.27

6. Rio Kurimoto, Kei Kanie, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiro Ebara, Design of a smart polymer platform in combinations with biomolecules, NanoCentre Annual Conference 2016, Flinders University, Adelaide, Australia, 2016.06.14

7. 栗本理央, 蟹江慧, 宇都甲一郎, 河合駿, 原光生, 永野修作, 成田裕司, 加藤竜司, 内藤昌信, 荏原充宏, 合成高分子と短鎖ペプチドとの組み合わせ効果を用いた細胞選択的材料表面の設計, 日本生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー2016, ホテルコンチネンタル府中, 東京, 2016.07.16

8. Rio Kurimoto, Kei Kanie, Koichiro Uto, Shun kawai, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiro Ebara, Combinational Effects of

Viscoelasticity of Substrate and the Immobilized Peptides on Selective Cell Adhesion, 2nd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, MANA, NIMS, Japan, 2016.07.27

9. 蟹江慧、清水一憲、本多裕之、加藤竜司、バイオマテリアルデザインのための細胞選択的ペプチド探索, 第 89 回日本生化学会大会, 仙台国際センター、東北大学川内北キャンパス, 2016.09.25

10. 蟹江慧、伊藤圭祐、本多裕之、加藤竜司、アミノ酸性指標を用いたペプチドインフォマティクスの可能, 第 68 回日本生物工学会大会, 富山国際会議場, 2016.09.28

11. 蟹江慧、インシリコ技術を活用したペプチドのスクリーニング, 技術情報協会セミナー「ペプチド医薬スクリーニングでの分子設計・合成方法の開発」, 技術情報協会セミナールーム, 2016.12.14

12. 蟹江慧、加藤竜司、生体内における組織再生を促進する細胞選択的ペプチド, 平成 28 年度 中部地区 医療・バイオ系シーズ発表会, 吹上ホール, 2016.12.08

13. Rio Kurimoto, Kei Kanie, Koichiro Uto, Shun kawai, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiko Ebara, Map analysis of combinational effects between viscoelastic polymers and peptides for design of selective cell adhesion surface, MANA symposium 2017, Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, 2017.03.01

14. 蟹江慧、金子喬士郎、堀川美希、竹澤俊明、緒方藍歌、成田裕司、清水一憲、本多裕之、加藤竜司、多糖高分子を用いたペプチドハイブリッド足場材料の開発, 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 2017.03.07

15. 蟹江慧、大口明日基、栗本理央、下川淳、北村雅人、緒方藍歌、成田裕司、清水一憲、本多裕之、荏原充宏、加藤竜司、細胞機能性ペプチド修飾ポリカプロラク톤の設計と機能性評価, 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 2017.03.08

16. 栗本理央、蟹江慧、宇都甲一郎、河合駿、原光生、永野修作、成田裕司、本多裕之、内藤昌信、荏原充宏、加藤竜司、メカノバイオロジーにおける流動性材料と機能性生体分子の組み合わせによる細胞選択的な接着性制御の検討, 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター, 2017.03.08

〔図書〕(計 2 件)

1. 蟹江慧、栗本理央、荏原充宏、加藤竜司、細胞接着の性能を高める「ペプチド合成高分子」ハイブリッド素材の開発, バイオサイエンスとインダストリー, 74(6),519-521, 2016.11.10

2. 蟹江慧、成田裕司、加藤竜司、インフォマティクスを活用した細胞選択的ペプチド被覆型医療機器材料の設計, シーエムシー出版, 50 - 62, 2017.02.23

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 骨再生を促進させる生体適合性を有した止血材料

発明者: 蟹江慧、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司、荏原充宏、宇都甲一郎

権利者: 名古屋大学・物質・材料研究機構

種類:

番号: 特願 2017-066904

出願年月日: 2017.03.30

国内外の別: 国内

〔その他〕

1. 再生促進型医療機器のための細胞選択的ペプチド

<http://www.aip.nagoya-u.ac.jp/unite/jp/detail/0000239.html>

2. ペプチドアレイを用いた医療機器表面を機能化するペプチドスクリーニング技術

<http://www.aip.nagoya-u.ac.jp/unite/jp/detail/0000240.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

蟹江 慧 (KANIE, Kei)

名古屋大学・大学院創薬科学研究科・助教
研究者番号: 80636407

(2)研究協力者

加藤 竜司 (KATO, Ryuji)

名古屋大学・大学院創薬科学研究科・准教授

荏原 充宏 (EBARA, Mitsuhiko)

物質・材料研究機構・MANA ナノシステム分野・MANA 准主任研究者