

令和元年6月14日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03186

研究課題名(和文) バイファンクショナル分子によるポリ乳酸スキャホールド内部への組織浸潤誘導

研究課題名(英文) Tissue ingrowth into poly(lactic acid) porous scaffolds by use of PLA/peptide bifunctional molecules

研究代表者

山岡 哲二 (Yamaoka, Tetsuji)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50243126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：オリゴ乳酸-ペプチド結合体によるポリ乳酸スキャホールドの機能的修飾に成功した。スキャホールド最表面に固定化されたペプチド密度を傾向染色法により定量することでペプチドの露出効率を解明し、それに基づいて、露出効率が高い新たなオリゴ乳酸-ペプチド結合体を設計した。親水セグメントを挿入した結合体によりマトリックス表面への固定化効率が向上し、また、ポリ乳酸のTg付近での水中加熱法で、表面ペプチド密度が大きく向上することを確認した。さらに、PC-12細胞を播種して神経細胞接着率に与えるペプチド露出効率の影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオマテリアルのエラスティシティが注目されているが、表面特性が重要であることも広く認識しており生理活性物質などの導入が進められてきた。その表面解析はESCAやEDSなどが用いられるが、いずれもある深さを持った解析となる。しかし、細胞や組織が認識するのは"最"表面に存在している情報のみであり、その結果、上述前者の工学的な導入率と細胞や組織の応答は必ずしも一致しない。我々は、化学反応を利用した最表面のリソグランド密度を測定することに成功し、それを用いたバイオマテリアル表面の活性化修飾法の確認にも成功した、今後のバイオマテリアル研究の基礎的知見となるものである。

研究成果の概要(英文)：Our ongoing work concerns the modification of poly(L-lactic acid) (PLLA) scaffolds with oligo(lactic acid)-oligo peptide heteroconjugates as a means to improve their bioactivity. Regrettably, the initial cell attachment exhibited by these scaffolds was unsatisfactory, most likely owing to an insufficient density of peptide molecules bound to the outermost surface of the scaffolds. We succeeded in visualizing and quantifying the peptide molecules at the outmost surface only by staining them with an aqueous solution of fluorescein isothiocyanate (FITC). FITC reacts only with the peptides at the surface but not those embedded in the matrices. In addition, by using this quantification method, an effective strategy to increase the peptide density at the PLLA surface was developed.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：再生医工学材料 スキャホールド ポリ乳酸 ヘテロ結合体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高分子多孔質体スキャホールドを用いた三次元組織の再生法には二つの戦略が提唱されている。第一は、多孔質体内部に、あらかじめ機能細胞を播種する戦略であり、1993年 MIT の Langer 教授らが、ポリグリコール酸と軟骨細胞で軟骨再生を報告した例である。一方、第二は多孔質体のみを埋入し、生体側から細胞や血管が浸潤して組織を再生させる戦略である。後者は、再生医療新法における低リスク群として実用化が期待されるが、ヒドロキシアパタイト多孔質体などを利用した骨補填あるいは歯周骨造成のみが可能で、実際には軟組織再生の誘導は容易ではない。ペルナック、インテグラ、テルダーミスなどの”人工真皮”は、一時的な創傷処置としてある程度有効であるが、肉芽様組織が生成するのみであり実際には真皮が再生しているわけではない。海外で認可されている合成高分子からなる多孔質体の場合には、埋入期間が長くなると皮膚破損を生じて多孔質体が露出するなどの事故報告もあり、我が国では未だ認可されていない。我々が構築したマウス皮下埋入モデルでは、埋入8週後に皮膚破損が50%の頻度で発症した。この原因は、スキャホールド基材に対するカプセル化が起こり細胞組織が内部に浸潤しないためと考えられる。

このように、合成材料多孔質スキャホールドを、臨床的環境あるいは非臨床 *in vivo* 環境にて評価すると、その軟組織再生誘導活性は極めて低く実用化は困難である。そこで、多孔質体の孔径、空隙率、コラーゲンによるコーティング、表面層分離構造などのアプローチが報告されているが、*in vitro* での細胞接着などの向上が認められるのみで、その組織再生能力を定量的に検討した報告は少なく、また、その効果も極めて限定的である。そこで、我々の基盤研究に基づいて、組織再生誘導型合成スキャホールドを開発する。

2. 研究の目的

皮膚組織の再生は1970年代から検討された標的であり、熱傷、褥瘡、潰瘍など、その適応範囲は極めて多い。古くは乾燥豚皮から、ヤナス型人工真皮が今も臨床で使用されているが、一時的処置という位置づけである。我々は、スキャホールド表面に弱正電荷を導入することで、臨床使用されているヘパリン液を静電的に吸着させ、さらに、bFGF 製剤であるフィブラストスプレーのヘパリン結合力を利用して非化学的に結合させた界面を構築した。このシステムをポリ乳酸に応用するにはポリ乳酸に、ヘパリン結合ペプチド (FHRRIKA、KRSR、あるいは非特異的 KKKKK や RRRRR) を導入する必要がある。ポリ乳酸主鎖や側鎖の化学修飾が一つの戦略であるが、結晶性の低下と親水性の向上から、力学的強度の大きな低下と分解速度の加速が避けられず、最終的なスキャホールドとしての特性を維持するのが困難である。さらに、新規物質となることからその毒性試験などに膨大な実験が必要となる。そこで“オリゴ乳酸とペプチドからなる、ヘテロ結合体を開発し、ポリ乳酸ドーブに1~3%程度混合した後に成形加工することで、ポリ乳酸に様々な生理活性を導入することに成功してきた。しかしながら、詳細に検討した結果、この方法で導入したペプチド分子は十分にマトリックス表面には分布しておらず、ペプチドの露出効率を向上させることが最大の課題となった。

3. 研究の方法

上記結合体によるポリ乳酸表面のペプチド修飾と、RGD 等を用いた細胞接着性向上、また、IKVAV 配列を用いた神経誘導活性の発現を検討した。ヘパリン結合ペプチドを選択することから、親水疎水バランスの最適化が重要であり、アセチル化オリゴ乳酸の分子量とペプチド配列の組成を検討し、その安定的結合を確認する必要がある。アセチル化オリゴ乳酸は以下のように合成した。L-乳酸 (あるいは、D-乳酸) を攪拌しながら大気圧で3時間、引き続き減圧調節器、真空ポンプと連結し、100mmHg で2時間、30mmHg で1時間、20mmHg で3時間、段階的に減圧していき150°Cで減圧脱水重縮合を行なった。生成したオリゴ-L-乳酸 (OLLA) に対して1等量の無水酢酸で、760mmHg で10分間、330mmHg で1時間、130mmHg で1時間、30mmHg で30分間、段階的に減圧していき130°Cで反応させた。生成物をジエチルエーテルで再沈殿した。生成物は¹H-NMR 測定にて行ない、数平均重合度を算出した。

オリゴ乳酸-ペプチドコンジュゲートは以下のようにして合成した。各オリゴペプチドの合成は全て Fmoc 固相合成法により実施した。オリゴペプチド (FHRRIKA、KRSR、KKKKK、RRRRR) に加えて、これらのタンデム配列、さらにコントロール配列としての変異配列を合成した。それぞれ Fmoc-PAL-PEG-PS 樹脂を DCM で膨潤。各カップリング過程は、20% ピペリジン/DMF による脱 Fmoc、樹脂に対し3倍等量の各 Fmoc-アミノ酸、活性化剤として、同3倍等量の HOBt、HBTU、6倍等量 (1.50mmol) の DIPEA、溶媒として DMF によるカップリングと続き、これを各 Fmoc-アミノ酸について繰り返した。脱 Fmoc、カップリングはカイザーテストにて確認して各反応を繰り返した。得られたオリゴペプチド付き樹脂の一部を分取し HPLC により配列の確認を行なった。

合成したオリゴペプチド付き樹脂に対して、続けて上述の acOLLA (5倍等量) を、固相上にて同様の反応条件によりカップリングを行った。

これまで、ペプチドの固定化に関しては、ESCA 測定、IR 測定、などで解析してきたが、いずれもある程度の深さをもって分子の存在と分布を解析してしまう。しかしながら、細胞や組織は、完全に表面に露出した最表層分子のみを認識しているので、これらでの評価は適切ではないと考えられた。そこで、多孔質構造に成形した後に、今回選択する一つの主な配列であるリ

ジン (K) に対して蛍光試薬反応を行う事で、表層に露出している機能性ペプチドの存在のみを定量的に解析することとした **olymer Degradation and Stability,156,66-74(2018)**。成型加工の手法は、電界紡糸を選択した。溶媒には、ポリ乳酸、および、ペプチドコンジュゲートの共溶媒であるヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) を用い、ポリマー溶液 (20w/v%) から紡糸した。このポリマー溶液をガラスシリンジに取り、13kV 印加下で、3mL/h の速度で押し出し、ステンレスタージット上に紡糸する (針先-ターゲット距離: 10~15cm)。

ナノファイバーの最表面での IKVAV 配列の露出効率を向上させるため、オリゴ乳酸と IKVAV の間にジエチレングリコール (diEG) を導入した親水性ヘテロ結合体を合成した。さらに水中熱処理法によりマトリックス表面への露出効率を検討した。PLLA とオリゴ乳酸-diEG-IKVAV 結合体を HFIP に溶解させて、エレクトロスピンニングによりナノファイバーシートを作成した。得られた不織布を 15mm×15mm の大きさに切り取り、24 ウェルプレートに入れた。それぞれの不織布の重量を測った。各ウェルにイオン交換水を入れ、水中で 60℃、70℃、又は 80℃ の温度に 1 時間さらした。その後、室温に戻して 100 μl のフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 溶液 (濃度: 1mg/ml) を添加して 4 時間反応させた。反応後、イオン交換水を置換する洗浄を 3 回繰り返し、DMF を入れ、5 分間超音波洗浄を行い、イオン交換水を置換する洗浄を 3 回繰り返した。その後、100 μl の HFIP と PBS との 1:1 の混合溶媒に溶解した後に、蛍光分光光度計にて蛍光強度を測定し、不織布の重量を割ることで表面に露出したペプチド密度を定量化した。また、作成した資料に対して、細胞接着、細胞増殖、PC12 細胞の形態変化、および、マウス皮膚置換モデル評価を実施した。

4. 研究成果

オリゴ乳酸-IKVAV を加えていない PLA で作製した不織布は熱処理により蛍光量の変化がなく、物理的に吸着したバックグラウンドの蛍光強度は得られた。したがって、全ての結果からこの数値を差し引いて検討した。オリゴ乳酸-IKVAV を加えた PLA で作製した不織布とオリゴ乳酸-ジエチレングリコール-IKVAV を加えた不織布で高い数値が得られ、表面のリジン残基と反応していることが判る。それらの値は後者で高く、親水性スパーサーの影響で露出効率が向上すること、また、この条件では水中への漏出もないことが明らかとなった。さらに、いずれの場合にも 60 度で水中熱処理した場合に最も高い値が確認され、熱処理温度を 70℃、80℃ と上昇させることにより蛍光量が低下した。すなわち、マトリックスの分子運動性が向上することで周囲の水環境へとペプチドセグメントが露出し、乳酸セグメントの疎水性が溶出を防止している条件が Tg 付近である 60 度処理であると考えられる。

得られた不織布を 15mm×15mm の大きさに切り取り、24 ウェルプレートに入れ、金属リングで不織布を固定し水中熱処理を施した後に 30 分 UV 滅菌した。継代した PC-12 細胞を、細胞数が 1×10^4 で播種し、37℃、5% CO₂ で 3 時間培養した。神経細胞接着数は [オリゴ乳酸-ジエチレングリコール-IKVAV を加えた PLA で作製した不織布] > [オリゴ乳酸-IKVAV を加えた PLA で作製した不織布] > [PLA で作製した不織布] となり、共焦点顕微鏡で観察した結果と一致した。中でも、60℃ の熱処理したオリゴ乳酸-ジエチレングリコール-IKVAV を加えた PLA で作製した不織布の神経細胞接着数が一番高く、熱処理の温度を 70 又は 80℃ に上昇させることによって細胞接着数が低下し、表面に露出したペプチド密度や共焦点顕微鏡で観察した結果と一致した。

IKVAV は神経誘導活性のみならず、他の細胞親和性や増殖活性も報告されている。そこで、上記条件をポリ乳酸凍結乾燥体に適応し、ラット禅僧皮膚欠損モデルに適応した。今回の実験ではヘテロ結合体による活性上昇が十分に認められず、コントロールとともに、組織再生が確認された。今後 FGF を搭載した真皮再生試験をさらに継続する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Y-I, Hsu and T. Yamaoka, Visualization and quantification of the bioactive molecules immobilized at the outmost surface of PLLA-based biomaterials、*Polymer Degradation and Stability*,156,66-74(2018)
DOI: 10.1016/j.polyimdeggradstab.2018.08.001
- ② Y. Kambe, A. Murakoshi, H. Urakawa, Y. Kimura and *T. Yamaoka, Vascular induction and cell infiltration into peptide-modified bioactive silk fibroin hydrogels、*Journal of Materials Chemistry B*, 5(36), 7557-7571 (2017)
DOI: 10.1039/c7tb02109g

[学会発表] (計 10 件)

- ① Yasuo Akizawa, Development of PLLA guide tube filled with unidirectional fiber to enhance axonal extension, 23rd Congress of the European Society of Biomechanic, 2017
- ② 山岡哲二, オリゴ乳酸-ペプチドヘテロ結合体によるポリ乳酸マトリックスの機能化修飾、第 66 回高分子討論会、2017

- ③ 柿木佐知朗、疎水性人工タンパク質の混合によるポリ乳酸の細胞機能化、第 66 回高分子討論会、2017
- ④ 徐 于懿、Surface modification of Poly(lactic acid) nerve regeneration tube using oligo(D-lactic acid) bioactive peptide conjugates、Tissue Engineering & Regenerative Medicine Annual Conference、2017
- ⑤ 徐 于懿、オリゴ乳酸-diEG-IKVVAV 結合体によるポリ乳酸神経誘導管の表面修飾と熱処理効果、第 17 回日本再生医療学会総会、2018
- ⑥ 飯田 啓太、オリゴ乳酸-REDV ペプチドヘテロ結合体によるポリ乳酸スキャホールドへの特異的細胞接着性の付与、第 65 回高分子学会年次大会、2016
- ⑦ 山岡哲二、多孔質スキャホールド内部への組織誘導に及ぼす表面特性の影響、第 45 回医用高分子シンポジウム、2016
- ⑧ 徐 于懿、Surface modification of poly(L-lactic acid) nanofiber conduits with oligo(D-lactic acid) bioactive peptide conjugates for nerve regeneration tube、the 6th Stanford Bio-X & ADATE Symposium (Stanford, CA, US)、2016
- ⑨ 徐 于懿、オリゴ乳酸-IKVVAV ペプチド結合体を用いた神経誘導管の高機能化、第 54 回日本人工臓器学会大会、2016
- ⑩ 飯田 啓太、内皮細胞親和性 REDV ペプチドによるポリ乳酸マトリックス表面の修飾、第 16 回日本再生医療学会総会、2017

〔図書〕(計 1 件)

- ① 山岡哲二 他、CMC 出版、細胞・生体分子の固定化と機能発現、2018、167-176

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称：生分解性オリゴマー、親水性セグメント、及び細胞接着性ペプチドから成る化合物及びその利用
 発明者：山岡哲二、徐 于懿、岩井敦史、中越琢也
 権利者：国立研究開発法人国立循環器病研究センター、東洋紡株式会社
 種類：特許
 番号：特願 2016-176496
 出願年：2016 年
 国内外の別： 国内
- ② 名称：生分解性オリゴマー、親水性セグメント、及び細胞接着性ペプチドから成る化合物及びその利用
 発明者：山岡哲二、徐 于懿、岩井敦史、中越琢也
 権利者：国立研究開発法人国立循環器病研究センター、東洋紡株式会社
 種類：特許
 番号：PCT/JP2017/032050
 出願年：2017 年
 国内外の別： 外国

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：神戸裕介

ローマ字氏名：KAMBE Yusuke

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：上級研究員

研究者番号 (8 桁)：30747671

研究分担者氏名：徐 ユイ

ローマ字氏名：HSU YUI

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：流動研究員

研究者番号（8桁）：10757678

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。