

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01401

研究課題名(和文) 抗炎症作用を有する機能性タンパク質フィルムの創製と炎症性疾患治療への応用

研究課題名(英文) Preparation of functional protein film for the treatment of inflammatory disease

研究代表者

山添 泰宗 (Yamazoe, Hironori)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：00402793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：炎症は様々な病気に広く関与しており、炎症部において過剰に発生した活性酸素が炎症悪化の原因となっている。本研究では、独自のタンパク質加工技術により、3種類のタンパク質(血清アルブミン、SOD、カタラーゼ)を原料として、活性酸素を除去できるタンパク質フィルムを開発した。炎症性腸疾患に着目し、腸炎モデルマウスを用いたフィルムのin vivo評価を行った結果、フィルムを腸の炎症部に滞在させ、炎症を軽減できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様な機能を有するタンパク質は、生体適合性に優れた機能性材料を開発するうえで有望な素材である。また近年、薬として利用されるようになり、医療分野におけるタンパク質の重要性がますます増している。本研究では、タンパク質を用いて作製したフィルムが、炎症性腸疾患治療に応用できることを示した。本研究成果は、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患に対するタンパク質を活用した新たな治療法の確立において重要な知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：Cell damage, caused by excess reactive oxygen species (ROS), is implicated in numerous human diseases. In this study, we prepared a protein film by combining three types of protein, including serum albumin, superoxide dismutase (SOD), and catalase. Because SOD and catalase is an antioxidant enzyme that removes hydrogen peroxide by converting it into water and oxygen, prepared film have the ROS eliminating ability. The anti-inflammatory effect of protein film was evaluated in an ulcerative colitis model induced by dextran sulfate sodium. Results showed that our prepared film contributes to the reduction of inflammation. Our approach using protein film will provide the useful information for the establishment of novel treatment for the inflammatory bowel disease called ulcerative colitis and Crohn's disease.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：タンパク質 活性酸素 炎症性腸疾患 フィルム 粘膜付着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症は様々な病気に広く関与しており、炎症部において過剰に発生した活性酸素や炎症性サイトカインが炎症悪化の原因となっている。近年、バイオテクノロジーの進歩により、生体に微量しか存在しないタンパク質を大腸菌、酵母、培養細胞などを用いて大量生産することが可能となり、タンパク質を医薬品として利用する道が開けた。炎症性疾患の治療においては、活性酸素を除去する活性がある酵素や炎症性サイトカインに結合する抗体などのタンパク質が治療薬として有望である。

しかし、体内に投与されたタンパク質医薬品には、pHの影響による変性、プロテアーゼによる分解、タンパク質医薬品に対する抗体ができるなど、薬効の低下に繋がる様々な問題がある。また、現在、注射により全身に投与しているタンパク質医薬品を、炎症部のみに持続的に集積させることができれば、治療効果の向上と副作用の軽減が期待できるため重要な検討課題である。

研究代表者はこれまで、タンパク質を原料として生体適合性に優れた機能性材料を創製する研究に従事してきた。通常、タンパク質をフィルムや微粒子などの固形材料に加工した場合、物理化学処理や乾燥工程でのダメージによって、その立体構造は破壊され機能が失われる。我々の研究の特徴は、タンパク質の構造を大きく変化させることなく固形材料に加工できることであり、構造が保たれていることで、加工後も個々のタンパク質が持つ機能を発揮できる。近年、この独自技術を駆使し、血清アルブミンを母材として、その内部に抗炎症作用を持つ酵素や抗体を組み込んだタンパク質フィルムの作製に成功した。タンパク質のフィルム化により、酵素や抗体をフィルム内部に安定な状態で存在させることができるため、pHやプロテアーゼの影響を受けず、抗タンパク質抗体の問題も回避できる。

そこで本研究では、抗炎症作用を持つタンパク質をフィルムに加工し、さらに、フィルムを炎症部に滞在させることで、より効率の良い新たな炎症性疾患治療法を確立することを考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、独自のタンパク質加工技術により、抗炎症作用を持つタンパク質を原料として炎症性疾患治療に役立つタンパク質フィルムを作製すること、ならびに、炎症性腸疾患に着目し、腸炎モデルマウスを用いて本フィルムの抗炎症作用についての *in vivo* 評価を行いその有用性を実証することである。

3. 研究の方法

本研究では、まず、抗炎症作用を持つタンパク質を原料としてフィルムを作製し、その後、マウスを用いてフィルムの腸表面への付着性や抗炎症作用についての *ex vivo*、および、*in vivo* 評価を行った。

(1) 抗炎症作用を有するタンパク質フィルムの作製

3種類のタンパク質(血清アルブミン、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ)を用いて抗炎症作用を持つタンパク質フィルムを作製した。この際、インクジェット印刷技術を利用することで直径 100 μm の微小なサイズを持つフィルムを作製した。作製したフィルムについて、生体内における様々な環境を想定して、フィルム内に含有している酵素の安定性を評価した。また、腸表面への付着性を向上させるために、粘膜付着性を有するポリマーをフィルム表面に結合させた。

(2) マウスを用いたタンパク質フィルムの評価

マウスから採取した大腸を用いて、作製したフィルムの腸への付着性について *ex vivo* 評価を行った。また、腸炎モデルマウスを用いて、フィルムの抗炎症効果について *in vivo* 評価を行った。

4. 研究成果

(1) 抗炎症作用を有するタンパク質フィルムの作製

血清アルブミン、SOD、カタラーゼの混合溶液(アルブミン:SOD:カタラーゼ=100 mol:1 mol:1 mol)を調製し、架橋剤を用いて架橋タンパク質溶液を作製した。その後、架橋タンパク質溶液に保水剤を少量添加し、37℃で乾燥させることによりタンパク質フィルムを作製した。なお、タンパク質の構造を大きく破壊することなくフィルム化するために最適化した種々の条件(架橋剤や保水剤の種類と濃度、水分を飛ばす時の湿度や時間)により、フィルムの作製を行った。

腸内の様々な環境(大腸液は弱アルカリ性、炎症の進行により、腸組織のpHが酸性側に傾く、ガスが通過する)を考慮し、作製したタンパク質フィルムの耐アルカリ性、耐酸性、耐乾燥性、について評価した。フィルムを酸性(pH=4)やアルカリ性(pH=10)溶液に暴露する、また、24時間乾燥状態に置く、などの処理をした後においても、フィルム内部のSODやカタラーゼの酵素活性が損なわれておらず、フィルム化することでタンパク質の安定性が著しく向上することを明らかにした。

(2) タンパク質マイクロフィルムの作製と腸への付着性向上処理

上記の(1)において確立した方法をもとに、インクジェット印刷技術を利用することで微小なサイズ(直径約100 μm)を有するフィルムを作製した。方法としては、タンパク質溶液の吐出に特化したインクジェットプリンターに架橋タンパク質溶液を充填し、シリコンシート上に微量(約600 pL)の液滴を一定の間隔を置いてアレイ状に滴下して乾燥させた後、エタノールを用いて基板上から剥離することでマイクロフィルムを得た。図1にシリコンシート上にアレイ状にタンパク質マイクロフィルムが配列している様子を示す。なお、フィルムは無色透明であるが、写真では、フィルムを識別しやすくするために、青色の色素で染色している。

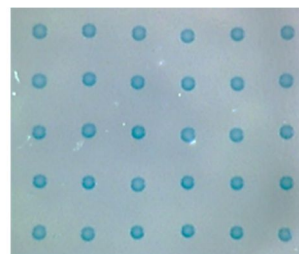
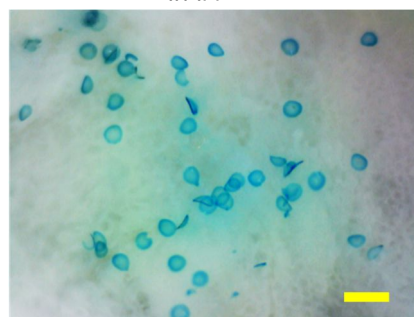


図1 シリコンシート上にアレイ状に配列しているタンパク質マイクロフィルム

炎症性腸疾患では、腸表面の粘膜に炎症が起きており、この炎症部に抗炎症作用があるフィルムを持続的に存在させることが理想的である。そこで、フィルムの腸粘膜への付着性を向上させるために、粘膜に優れた付着性を示す材料として広く利用されているカーボポール(架橋型アクリル酸共重合体)をフィルム表面に結合させることにした。方法としては、カーボポールのカルボキシル基を活性化させ、フィルムのアミノ基との間に共有結合を形成させることで、フィルム表面に固定化した。QCM(水晶振動子マイクロバランス)装置の測定により、フィルム表面にカーボポールが良好に結合していることを確認した。

(3) タンパク質マイクロフィルムの腸への付着性についての ex vivo 評価

マウスの腸を用いてタンパク質マイクロフィルムの腸への付着性について検討を行った。マウスから採取した新鮮な大腸に、カーボポールを結合させたマイクロフィルムの分散液を導入して付着させた後、シリンジポンプを用いて0.2 ml/minの流速で腸管内にPBSを1時間流した。その結果、PBSの送液後においても、導入したフィルムの56%が剥離せずに腸に付着していることが分かった。図2に、腸の表面にフィルムが付着した様子を示す。なお、フィルムを識別しやすくするために、フィルムを青色の色素で染色している。



300 μm

図2 腸に付着したタンパク質マイクロフィルム

また、接触針の先にフィルムを貼り付け、このフィルム付きの接触針を、腸表面に接触させた後剥離する操作を行い、この工程における接触針に作用する力を計測することで、腸表面とフィルムの付着力を測定した。その結果、付着力は、0.94 N/cm²であり、十分な付着強度でフィルムが腸に貼り付いていることが分かった。

(4) タンパク質マイクロフィルムの抗炎症作用についての in vivo 評価

作製したタンパク質マイクロフィルムの有用性を実証するために、腸炎モデル動物を用いて、in vivo 評価を行った。本研究では、炎症性腸疾患モデル動物として、Dextran sodium sulfate (DSS)をマウスの飲水中に混ぜることにより腸に炎症を発症させる潰瘍性大腸炎モデルマウスを使用した。図3に、DSSにより炎症を発症させたマウスの大腸の写真を示す。正常な



図3 正常なマウスの大腸と炎症を誘発させた大腸の写真

マウスに比べ腸の長さが短くなることが知られている。マウスの腸に炎症を発症させた後、フィルムの分散液を注射器に入れ、マウスの肛門から注射器を挿入して、直腸に投与した。数日間、複数回にわたってフィルムを投与した後、フィルムを導入した箇所(大腸の下末端)を採取し、炎症の重篤度を反映するミエロペルオキシダーゼ活性を指標に炎症の程度を評価した。その結果、フィルムを投与していない群と比較して、フィルム投与群においてMPO活性の低下が見られ、フィルム治療により炎症の改善が見られることが分かった。

このように本研究では、抗炎症作用を有するタンパク質を原料として作製したフィルムが、炎症性腸疾患の治療に有用であることを示すことができた。本研究成果は、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患に対するタンパク質を活用した新たな治療法の確立において有用である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yigang Shen, Nobuyuki Tanaka, Hironori Yamazoe, Shunsuke Furutani, Hidenori Nagai, Takayuki Kawai, Yo Tanaka	4. 巻 15
2. 論文標題 Flow analysis on microcasting with degassed polydimethylsiloxane micro-channels for cell patterning with cross-linked albumin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0232518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0232518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takaaki Kurinomaru, Akiko Inagaki, Masamichi Hoshi, Chikashi Nakamura, Hironori Yamazoe	4. 巻 7
2. 論文標題 Protein microswimmers capable of delivering cells for tissue engineering applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials Horizons	6. 最初と最後の頁 877-884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9mh01799b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hironori Yamazoe	4. 巻 100
2. 論文標題 Antibody immobilization technique using protein film for high stability and orientation control of the immobilized antibody	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 209-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2019.02.114.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hironori Yamazoe	4. 巻 127
2. 論文標題 Spectroscopic study on the conformation of serum albumin in film state	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 515-519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.09.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hironori Yamazoe	4. 巻 155
2. 論文標題 Multifunctional protein microparticles for medical applications	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2017.10.045.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 栗之丸隆章、稲垣明子、星柁充、中村史、山添泰宗
2. 発表標題 細胞輸送デバイスの開発と生体組織工学への応用
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗之丸隆章、稲垣明子、星柁充、中村史、山添泰宗
2. 発表標題 生体組織構築を志向する細胞輸送デバイスの開発
3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hironori Yamazoe
2. 発表標題 Multifunctional protein microdevice designed to cope with excess reactive oxygen species
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山添泰宗
2. 発表標題 抗体の配向制御と安定性向上を実現する新規抗体固定化法の開発
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中信行、山添泰宗、古谷俊介、永井秀典、佐藤麻子、高原順子、川井隆之、田中陽
2. 発表標題 架橋アルブミン微小構造体を利用した細胞パターンニング
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス 講演会-2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中陽、ヤリクンヤシャイラ、佐藤麻子、古谷嘉英、川井隆之、田中信行、山添泰宗、古谷俊介、永井秀典
2. 発表標題 超薄板ガラスチップによるマイクロ流体デバイスのウェアラブル展開に向けた検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第35回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川井 隆之、古谷 俊介、田中 信行、山添 泰宗、永井 秀典、田中 陽
2. 発表標題 遺伝子・代謝物解析の統合による安全性の多重評価
3. 学会等名 第24回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山添泰宗
2. 発表標題 局所炎症性疾患治療のための機能性タンパク質デバイスの開発
3. 学会等名 第46回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山添泰宗
2. 発表標題 タンパク質を用いた機能性マイクロデバイスの創製
3. 学会等名 第66回高分子討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山添泰宗
2. 発表標題 タンパク質を用いた多機能マイクロデバイスの創製
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山添泰宗
2. 発表標題 タンパク質を用いた機能性バイオマテリアルの創製
3. 学会等名 第17回 LS-BT合同発表会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 細胞移送デバイス、それをを用いた細胞移送システムおよび細胞移送方法	発明者 山添泰宗、栗之丸隆章	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-000712	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗体を含むタンパク質フィルム及びその製造方法	発明者 山添泰宗	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-174215	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

産業技術総合研究所ホームページ プレスリリース http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2017/pr20171117/pr20171117.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----