

令和元年6月15日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19006

研究課題名(和文)レクチンを用いた次世代in situ架橋ハイドロゲルの開発

研究課題名(英文)Development of novel in situ crosslinked hydrogel using lectins

研究代表者

伊藤 大知(Ito, Taichi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：50447421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外マトリクス(ECM)は、コラーゲンとヒアルロン酸を主成分とするハイドロゲルである。ヒアルロン酸にはLink Proteinを介してコアタンパク質やグリコサミノグリカンが結合し、複合化・構造化されている。組織が外傷を負った時の創傷治癒の機転において、ヒアルロン酸ハイドロゲルが一過性のECMとして大きな働きをすることが明らかになってきた。この組織修復に着目し、本研究ではレクチン/ヒアルロン酸複合体ゲルを模倣したin situ架橋ハイドロゲルを実現するため、機能性配列を導入したLinkモジュール(LMP)の開発を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以上のように、大腸菌を用い機能性配列を導入したLinkモジュール(LMP)を発現させたが、とくに精製法において困難が見られていたが、改善の見通しを得つつある。精製法の改善や収率の向上が今後の課題として残ったが、各種Linkモジュールタンパク質を遺伝子工学的に設計する知見を得た。学術的意義としては、レクチンinjectableゲルを創製するための初めての試みを行い、多糖類やバイオマテリアル、タンパク質工学の新しい分野への提案が行えたと考えられる。また社会的意義として、今後の更なる研究を通して、再生医療の足場材料や新規創傷被覆材などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Extracellular matrix (ECM) is a hydrogel mainly composed of collagen and hyaluronic acid (HA). Core proteins and glycosaminoglycans bind to HA via link proteins, and HA is highly structured. Recently, these HA-based natural hydrogels composed of HA and lectins greatly contribute the wound healing process. In the present research, we tried to develop new injectable hydrogels by mimicking HA/lectin composed hydrogels to achieve anti-inflammatory and cell proliferation effect without using cells such as MSCs for tissue engineering and regenerative therapy.

研究分野：医用化学工学

キーワード：ハイドロゲル レクチン TSG-6 炎症 リンクモジュール

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリクス (ECM) は、細胞が住む“家”であり、コラーゲンとヒアルロン酸を主成分とするハイドロゲルである。ヒアルロン酸には Link Protein を介してコアタンパク質やグリコサミノグリカンが結合し、複合化・構造化されている。ところが組織が外傷を負うと、住人である細胞も、家である ECM もすべて破壊された状態になり、人体は急ピッチで組織の再建を果たす必要がある。近年の知見からとくに創傷治癒の機転において、ヒアルロン酸ハイドロゲルが「仮の家」として大きな働きをすることが明らかになってきた。創傷部には線維芽細胞が誘引されてきてヒアルロン酸を分泌し、間葉系幹細胞がヒアルロン酸に結合するレクチンである TSG-6 を放出し、TSG-6 が二量体化あるいは三量体化してヒアルロン酸を架橋することで、急増で ECM を作る。さらに血小板から放出された TSP-1 が架橋点を補強する。あたかも周囲から多数の住人(細胞)が一時的にやってきて、柱や梁や釘を出し合って、急ごしらえで仮設住宅を建てるのに似ている。この仮の家は、抗炎症性・増殖因子の吸着・細胞接着による細胞への刺激・分解性など、あらゆる観点で優れた足場材料の機能を持っている。

もしもこの創傷治癒で形成される TSG-6/ヒアルロン酸複合体ゲルを完全に模倣した *in situ* 架橋ゲルが実現できれば、MSC などの細胞源が不要な、組織工学・再生医療において究極の injectable な足場材料となるのではないかと期待される。しかしレクチンを架橋剤としたレクチン/多糖類 *in situ* 架橋ゲルは存在しない。

そこで本研究では、TSG-6 のヒアルロン酸結合部位であるリンクモジュールをリンカーで結合した人工レクチン「リンクモジュールタンパク質 (LMP; 分子量約 2 万) 図 5 参照」を遺伝子組み換えにより開発する。LMP は架橋点である TSG-6 ダイマーの弱い相互作用を共有結合により置換して安定化した新しい架橋剤タンパク質である。さらに LMP とヒアルロン酸(HA) を投与時混合することで速やかに溶液からハイドロゲルへ変化する究極の *in situ* 架橋ハイドロゲルを開発する。

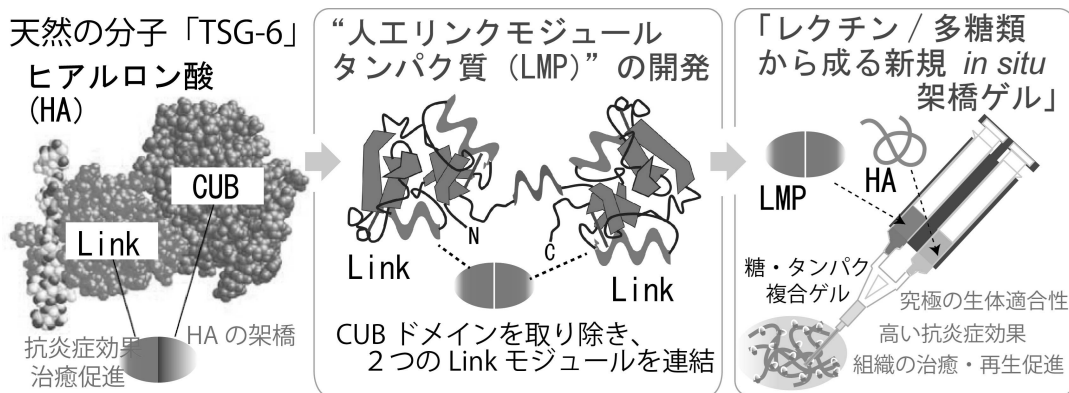


図 1 研究の目的： LMP/ヒアルロン酸 *in situ* 架橋ハイドロゲルの開発

2. 研究の目的

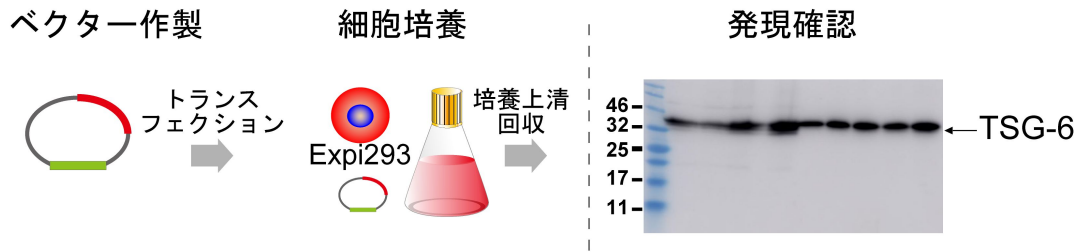
そこで本研究では、TSG-6 の機能不明な CUB ドメインを取り除き、ヒアルロン酸結合部位であるリンクモジュールだけを残して、さらに 2 つのリンクモジュールをリンカーで結合した人工レクチン「リンクモジュールタンパク質 (LMP; 分子量約 1.2 万)」を遺伝子組み換えにより開発する。LMP は TSG-6 ダイマーの弱い相互作用を共有結合で置換した新しい架橋タンパク質である。さらに LMP とヒアルロン酸(HA) を投与時混合することで速やかに溶液からハイドロゲルへ変化する新しい *in situ* 架橋ハイドロゲルの開発を将来可能することを目標とする。

3. 研究の方法

LMP の遺伝子組み換えによる発現を目指し、2 つの Link モジュールをつなぐリンカー設計を行って、LMP の開発を行う。

まず予備検討として、近年に報告された(1)Expi293 細胞による TSG-6 の大量発現検討を試みた。(2)次に CUB ドメインを取り除いた Link モジュールタンパク質の発現を大腸菌発現系によって試みた。

(1) Expi293 を用いた TSG-6 の発現



(2) LMP の設計と大腸菌による発現

LMP の設計

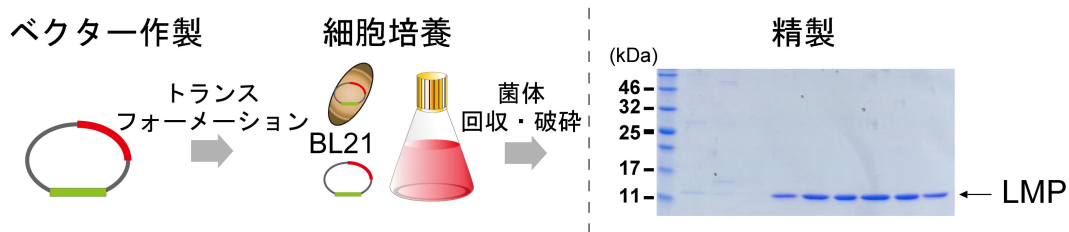
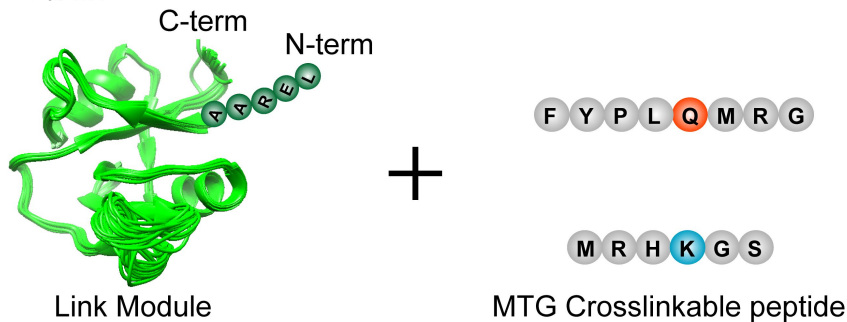


図 2 研究の方法および結果： Expi293 細胞を用いた TSG-6 の発現と LMP の設計と大腸菌による発現

(1) Expi293 細胞を用いた TSG-6 の発現

Full length の TSG-6 の発現では、可溶性タンパクの高発現システムとして知られている Expi293 細胞を用いて行った。まず、Expi293 細胞へのトランスフェクション用ベクターを、pCDNA3.1 ベクターを鋳型、TSG-6 の Full Length 配列(PDB: BC030205)をインサートとしてライゲーション法によって作製した。その後、Expi293 細胞に対してトランスフェクションを行い、37 で振盪培養を行った。トランスフェクション後一日目にエンハンサーを培養液に添加し、タンパク発現を誘導し、7 日間の培養を行った。培養上清をサンプリングし、Western-Blotting によってタンパク発現を確認した(図 2 (1))。

(2) LMP の設計と大腸菌による発現

TSG-6 ダイマーの弱い相互作用を共有結合で置換した新しい架橋タンパク質を設計するため、LMP の C 末端および N 末端に微生物由来トランスグルタミナーゼ(MTG)による酵素架橋によってグルタミン(Q)とリシン(K)間に共有結合を形成するペプチド配列(FYPLQMRG および MRHKGS)を導入し設計を行った(図 2 (2))。

LMP の発現では、大腸菌 BL21 細胞を用いて行い、可溶性タンパクとして発現させるため、LMP の N 末端にタンパクの正確なフォールディング効率を高め、可溶性タンパク発現を促進する SUMO-tag を導入し発現させた。まず、BL21 細胞へのトランスフォーメーション用ベクターを、SUMO-tag を含む pET28 ベクターを鋳型、TSG-6 の LMP を含む配列をインサートとして制限酵素を用いて作製した。BL21 細胞にトランスフォーメーションし、100 mL の培養液を用いて 37 で振盪培養し、大腸菌の前培養を行った。OD 値が 0.6 の条件で培養液に IPTG を添加し、その後 20 で振盪培養することでタンパク発現を誘導した。タンパク発現誘導後 4 または 20 h 後に培養上清をサンプリングし、SDS-PAGE および Western-Blotting によってタンパク発現

を確認した。

さらに、LMP の C 末端にペプチド配列(MRHKGS)を導入した LMP を 1 L の培養液を用いて培養し、培養後 4 h で菌体を回収し、超音波によって菌体を破砕した。His-tag 精製によって、LMP-SUMO-tag 複合タンパクを精製し、続く UIP1 の酵素処理によって、LMP と SUMO-tag を切り離した。その後サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により LMP を最終精製した。SEC のフラクションを回収し、SDS-PAGE によってタンパク精製を確認した。

4 . 研究成果

(1) Expi293 細胞を用いた TSG-6 の発現

Expi293 細胞を用いた TSG-6 の発現では、His-tag を用いた Western Blotting により培養上清中への TSG-6 の分泌を確認し、最大 7 日間の培養で培養日数が増えるにつれ、タンパク発現量が増加した。

(2) LMP の設計と大腸菌による発現

LMP の設計・発現

C 末端および N 末端にペプチド配列(FYPLQMRG および MRHKGS)を導入した 4 種類 LMP の発現を SDS-PAGE および Western-Blotting によって確認し、C 末端および N 末端によらず、4 種類すべての LMP が大腸菌によって発現されることを確認した。さらに、タンパク発現は 4 h 後と 20 h 後を比較した結果、タンパク発現誘導時間が短い方が、正確にフォールディングされた可溶性タンパクとしての発現量が増加することを確認した。

LMP の精製

His-tag 精製のよる LMP-SUMO-tag 複合タンパクの精製を行った結果、この複合体が His-tag 精製によって、その他の夾雑物と分離できることを確認した。さらに、UIP1 による酵素処理を行った結果、LMP が SUMO-tag が切り離されたことを確認した。SEC 精製後、SDS-PAGE によってタンパク精製を確認した結果、12kDa に LMP の単一バンドを確認し、純度の高い精製の達成した(図 2 (2))。

以上のように、大腸菌を用い機能性配列を導入した Link モジュール(LMP)を発現させたが、とくに精製法において困難が見られていたが、改善の見通しを得つつある。精製法の改善や収率の向上が今後の課題として残ったが、各種 Link モジュールタンパク質を遺伝子工学的に設計する知見を得た。学術的意義としては、レクチン injectable ゲルを創製するための初めての試みを行い、多糖類やバイオマテリアル、タンパク質工学の新しい分野への提案が行えたと考えられる。また社会的意義として、今後の更なる研究を通して、再生医療の足場材料や新規創傷被覆材などへの応用が期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件 全て査読あり)

Takuro Hozumi, Tatsuto Kageyama, Seiichi Ohta, Junji Fukuda and Taichi Ito
“An Injectable Hydrogel with Slow Degradability Composed of Gelatin and Hyaluronic Acid Crosslinked by Schiff’s Base Formation”
Biomacromolecules, 2018, 19(2), 288–297
[DOI:10.1021/acs.biomac.7b01133](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01133)

Yuki Amano, Pan Qi, Yoshiyuki Nakagawa, Katsuhisa Kirita, Seiichi Ohta, and Taichi Ito
“Prevention of peritoneal adhesions by ferric ion-crosslinked hydrogels of hyaluronic acid modified with iminodiacetic acid”
ACS Biomaterials Science and Engineering, 2018, 4(9), 3405-3412
[DOI: 10.1021/acsbiomaterials.8b00456](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00456)

[学会発表](計 10 件)

大川将志・太田誠一・伊藤大知，鎖長の異なる低分子量ポリリン酸の金属イオンによるゲル形成能と生体適合性評価，第 40 回日本バイオマテリアル学会，2018 年

伊藤大知，in situ 架橋ハイドロゲルを用いた癒着防止、止血、ドラッグデリバリーシステムの開発，高分子同友会勉強会，2018 年

大川将志・太田誠一・伊藤大知，ポリリン酸と金属イオンによるゲル形成とその生体適合性評価，化学工学会 第 50 回秋季大会，2018 年

Yuki Amano, Seiichi Ohta, Chun Man Lee, Taichi Ito , Antitumor effects of cisplatin-incorporating hyaluronan nanogel for malignant pleural mesothelioma , 256th ACS National Meeting & Exposition , 2018

天野由貴・太田 誠一・李 千萬・伊藤 大知, シスプラチン内包ヒアルロン酸ナノゲルの悪性胸膜中皮腫治療効果の検討, 第 34 回 日本 DDS 学会学術集会, 2018 年

Taichi Ito, Injectable hydrogels for medical applications, 化学工学会 第 83 年会, 2017 年
伊藤大知, ハイドロゲルによる中皮組織の再生と癒着防止, 第 17 回再生医療学会総会, 2017 年

伊藤大知, 癒着防止材・止血材料の操作性と被覆性, 技術情報協会ゼミナー, 2017 年

Zheng Ying Grace・太田 誠一・戸田健夫・長谷川潔・國土典宏・伊藤大知, スプレー投与による in situ 架橋マルチレイヤーハイドロゲルの形成, 化学工学会 第 49 回秋季大会, 2017 年

伊藤大知, 生体内でゲル化するハイドロゲルの開発と医療材料・癒着防止材への応用, 技術情報協会ゼミナー, 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/itolab/publications.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 太田 誠一

ローマ字氏名: (OHTA, seiichi)

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 大学院医学系研究科

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 40723284

研究分担者氏名: 津本 浩平

ローマ字氏名: (TSUMOTO, kohei)

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 大学院工学系研究科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 90271866

(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。