

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21014

研究課題名（和文）組織工学による顎裂部閉鎖治療を目的としたタンパク質因子の放出制御

研究課題名（英文）Controlled release of protein factors for the treatment of cleft palate by tissue engineering

研究代表者

中野 綾菜（Nakano, Ayana）

広島大学・医系科学研究科（歯）・研究員

研究者番号：60911568

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：口唇・口蓋裂に伴う顎裂部の閉鎖治療に有効な組織工学的手法の確立を目的として、コラーゲンからなる足場材料にストローマ細胞由来因子1 α 、骨形成因子-2、血管内皮細胞成長因子を複合化した材料の設計に取り組んだ。この目的のため、それらの因子にコラーゲン結合性ポリペプチドを融合したが、融合に伴う構造・機能への影響を評価するため、高次構造予測プログラムを用いた解析を試みるとともに、予測された構造の妥当性を実験的に検証した。その結果、三種類のキメラタンパク質の構造と機能について基礎的知見を得ることができた。また、本研究で用いたプログラムがキメラタンパク質の高次構造予測に有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、骨組織再生法の発展に寄与するものである。それによって、従来の骨移植法に代わる新たな顎裂部閉塞治療法が確立されれば、矯正歯科分野における恩恵は計り知れない。また、骨再生は顎裂部閉鎖術のみならず、医療の広い分野において待望される手法であるため、本研究の成果は、歯学のみならず、医学の進歩にも大きな貢献を果たすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：With the aim of establishing an effective tissue engineering method for the treatment of cleft palate, an attempt was made to design collagen-based scaffolds incorporating stromal cell-derived factor-1 α , bone morphogenetic factor-2, and vascular endothelial growth factor. For this purpose, collagen-binding domain (CBD) was fused to these factors. In this study, special attention was paid to the effect of CBD on the structure and function of fused factors. To evaluate the higher order structure, an AI-based computer program was used and the results were experimentally validated. As a result, basic knowledge could be obtained on the structures and functions of these chimeric proteins. Furthermore, it was suggested that the program used in this study is useful for predicting higher-order structure of chimeric proteins.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：顎裂部閉塞治療 組織工学 細胞成長因子 キメラタンパク質 高次構造予測 コラーゲン 間葉系幹細胞 ケモカイン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

顎裂を伴う口唇裂・口蓋裂の治療を目的として骨移植が行われる。多くの場合、患者自身の腸骨を採取して移植するが、小児患者への侵襲が大きく、採取骨量に限界があるため、代替法の確立が強く求められている。顎裂部骨形成において重要なことは、十分な骨量が早期に得られ、その新生組織が継続的に維持されると共に、リモデリングによる成熟過程を経て、天然組織に類似した皮質骨-海綿骨構造が形成されることである。これらが達成されて初めて、その後の歯の萌出や移動を伴う歯列矯正が可能となり、一連の顎裂治療が完結に至る。近年、新たな顎裂治療法として組織工学が注目されている。生体分解性の足場材料と細胞成長因子等との複合体を骨欠損部に移植して骨新生を誘導する方法や、足場材料に間葉系幹細胞を組み込んで骨形成を加速する方法が世界中で試みられてきた。しかしながら、従来の骨移植術を代替できる臨床的意義の高い治療法は未だに確立されていない。

骨の再生において、新生骨量および形成速度は、骨形成細胞の数に依存する。細胞誘引を目的として、骨分化能を有する幹細胞を足場材料に埋植したり、ケモカインの一種であるストローム細胞由来因子 (SDF-1 α) を放出して内在性の間葉系幹細胞を患部に誘引する試みがなされてきた。また、移植・誘引された間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化促進のため、骨形成因子 (BMP-2) の組み込みが検討されてきた。一方、新生骨の維持・成熟には、新生組織内に十分な血管形成が起り、酸素や栄養の供給と老廃物の除去が最適化されるとともに、破骨細胞前駆体である単球やマクロファージの供給されることが大切である。これには血管内皮細胞成長因子 (VEGF) の放出が効果的であると報告されている。以上のように、骨新生の加速・最適化には SDF-1 α 、BMP-2、VEGF などのタンパク質性因子が効果的であると考えられる。しかしながら、それらの因子の生理活性を高く維持しながら、適切な速度で放出させる手法の開発は今後の課題である。

上記の課題を解決する上で、本研究では、遺伝子組換え技術を用いたキメラタンパク質の分子設計に着目した。遺伝子組換え技術は、求める特性を持たせるためにかかる時間が大幅に短縮できる技術であり、食物など農業分野や、ワクチンや医薬品の製造など医療の分野で広く応用されている。所属研究グループはこれまでに、遺伝子組換え技術を用いて、足場材料に親和性をもつ人工ペプチドの設計に取り組んできた。その結果、ペプチドおよび足場材料の極性や静電的性質に基づいて親和性の制御が可能であり、そのようなペプチドをタンパク質性因子に融合すれば、当該因子を足場材料表面に簡便に担持できることを見出した (Nakano A, et al, *J Biomater Sci, Polym Ed* 2021, 32:76-92)。その基礎的知見を踏まえ、骨形成を促進する3種類のタンパク質性因子 (SDF-1 α 、BMP-2、VEGF) のそれぞれの末端に、コラーゲンへ結合することが知られているポリペプチドを融合することで、細胞誘引、細胞分化、血管形成の全てを同時に促進すれば、骨新生の加速・最適化をさらに強力に図ることが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子組換え技術を駆使して、足場材料結合性ペプチドを種々のタンパク質性因子に融合し、その濃度や放出を制御することで、骨新生の加速・最適化が図られた、新しい顎裂部閉鎖術の確立を最終の目標とする。遺伝子組換え技術を通して、タンパク質の担持および放出制御を達成しようとする手法は極めて独自性が高い。また、細胞誘引、細胞分化、血管形成という骨再生の3ステップすべての亢進を目指す点に創造性がある。骨再生は顎裂部閉鎖術のみならず、医療の広い分野において待望される課題であるものの、従来の自家骨移植に代わる骨再生治療法は、現在のところ確立されておらず、本研究は歯学のみならず学術的に高い意義があると考えられ、医学の進歩にも大きな貢献を果たすと考えられる。

以上の背景のもと、本研究では、複数タンパク質性因子のコラーゲン製足場材料への担持およびその足場材料からの放出を制御する方法の確立を目的とし、遺伝子組換え技術を用いて3種類のキメラタンパク質を設計および作製した。すなわち、SDF-1 α 、BMP-2、VEGFのそれぞれにコラーゲン結合性ポリペプチド (CBD) が融合したキメラタンパク質である。

ところで、これらのキメラタンパク質を有効に利用する上で、比較的大きい2つのポリペプチドドメインを融合することによる高次構造と機能発現への影響について詳細に調べることは重要である。しかしながら、キメラタンパク質のような人工タンパク質の高次構造に関して、X線回折に基づく結晶構造解析、あるいは、核磁気共鳴法を用いた溶液中での高次構造解析を行った例は我々の知る限り報告されていない。これは、それらの手法が多く経験や高度な手技を必要とするため、キメラタンパク質の応用研究に携わる分野外の研究者らにとってハードルが高いことが原因であると思われる。一方、計算機シミュレーションに基づく高次構造予測が古くから行われてきたが、構造データベースに登録されているのは天然タンパク質由来の情報であり、キメラタンパク質の高次構造予測には適さなかった。

近年、機械学習に基づくタンパク質高次構造予測プログラムが開発されている (AlphaFold 2,

DeepMind Technologies, UK)。このプログラムを用いれば、キメラタンパク質の人工的な配列であっても、その一次構造のみを情報源として、2次構造、3次構造といった高次の構造を予測することが可能である。そこで、本研究では、作製した3種類のキメラタンパク質 SDF-1 α -CBD、BMP-2-CBD、VEGF-CBD について、AlphaFold 2 による高次構造予測を行った。一方、実際に合成した3種類のキメラタンパク質の構造解析および機能評価を行うことで、予測結果の妥当性を検証した。

3. 研究の方法

3.1 高次構造予測

キメラタンパク質の高次構造予測には、前述の AlphaFold 2 を用いた。予測に用いたアミノ酸配列は、以下の9種類である。ただし、SDF、BMP、H₆はそれぞれ SDF-1 α 、BMP-2、およびヘキサヒスチジン（精製のためのヒスチジンタグ配列）の略記である。

- 1) SDF-GGG-CBD-H₆ (以下 SDF-CBD と略)
- 2) CBD-GGG-SDF-H₆ (以下 CBD-SDF と略)
- 3) SDF-H₆
- 4) CBD-H₆

- 5) H₆-CBD-GGG-BMP (以下 CBD-BMP と略)
- 6) H₆-CBD-GGG-VEGF (以下 CBD-VEGF と略)
- 7) H₆-BMP
- 8) H₆-VEGF
- 9) H₆-CBD

また、レファレンス構造として、SDF、BMP、VEGF、CBD に関するプロテインデータベース (PDB, URL: <http://www.wwpdb.org/>) の情報を用いた。

3.2 キメラタンパク質の作製

上記の1)~9)の構造をもつキメラタンパク質(1, 2, 5, 6)およびコントロールタンパク質(3, 4, 7, 8, 9)を遺伝子組換え技術ならびに大腸菌発現系を用いて作製した。SDF、BMP、VEGF、CBDをコードする遺伝子をヒト cDNA ライブラリーあるいは既存のプラスミドからポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅した。また、キメラ遺伝子はオーバーラップ伸長 PCR 法によって作製した。それらの遺伝子を pET-22b (1~4) あるいは pET-15b (5~9) ベクターに挿入し、DH5 α 大腸菌に導入してクローン化した。得られたプラスミドをタンパク質発現用大腸菌株 (BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL) に導入し、IPTG 誘導法によりタンパク質を発現させた。1~9のいずれのタンパク質も不溶性物質として得られたため、8M 尿素の変性条件下で回収し、ニッケルカラムクロマトフィーにより精製した。精製後、段階的透析法で尿素を除去するとともに、タンパク質分子のリフォールディングを行った。最終的に得られた産物は、タンパク質の溶解性に応じて、1~4ではクエン酸緩衝液、5~9では Tween20 を含むリン酸緩衝液を溶媒とするタンパク質溶液とした。

3.3 キメラタンパク質の構造解析

キメラタンパク質(1, 2, 5, 6)およびコントロールタンパク質(3, 4, 7, 8, 9)の純度および分子サイズを評価するため、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色によってタンパク質を可視化した。

また、タンパク質の2次構造に関する情報を得るため、円二色性分光分析 (CD 分析) を行った。分析には日本分光製 J-850 を用い、温度 20、波長範囲 190 nm ~ 260 nm、積算回数 16 回の条件で測定した。

3.4 キメラタンパク質の機能アッセイ

SDF キメラタンパク質(1, 2)およびコントロールタンパク質(3, 4)の機能を評価するため、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs, Lonza 製) を用いた移動アッセイをポイデンチャンパー法により行った。SDF の作用で運動性が亢進し、マイクロポアをもつ膜を通り向けた細胞を DAPI により染色して、蛍光顕微鏡下でその数を数えた。

BMP の機能評価には、hMSCs を用いた骨芽細胞への分化アッセイ系を行い、キメラタンパク質の添加による分化促進の程度を評価した。分化の評価は、分化マーカーの遺伝子発現量を定量 PCR 法を用いて求めることにより行った。

また、CBD ドメインの機能は、I 型コラーゲンコート表面への結合量を BCA タンパク質アッセイ法を用いて測定することで評価した。

4 . 研究成果

4 . 1 SDF キメラタンパク質の構造と機能

SDF キメラタンパク質の評価では、CBD を C 末端に融合した SDF-CBD および N 末端に融合した CBD-SDF を比較することで、CBD 融合に基づく SDF ドメインへの影響に焦点を当てた。

SDF-CBD および CBD-SDF を配列情報を用いて AlphaFold 2 による高次構造解析を行った。また、レファレンス配列として結晶構造 (PDB: 6SHR) および溶液中の構造 (PDB: 1SDF) に関するデータを参照し、キメラタンパク質内の SDF ドメインの構造が CBD との融合によってどのような影響を受けるかについて調べた。その結果、SDF-CBD および CBD-SDF 中の SDF ドメインは、CBD が C 末端あるいは N 末端のどちらに融合されても大きな影響を受けず、天然型の SDF と類似の高次構造をとることが定性的に示された。この結果を定量的に裏付けるため、キメラタンパク質内の SDF ドメインと天然型 SDF との間で、構成原子の平均二乗偏差 (Root Mean Square Deviation; RMSD) を求めた。その結果、いずれも RMSD = 1 程度であり、天然型とよく一致することが分かった (Baker D, Sali A. *Science* 2001, 294:93-96)。また、キメラタンパク質が SDF の特異的受容体である CXCR4 に結合した状態の高次構造解析においても同様に、CBD のとの連結順序の影響は認められなかった。

一方、SDS-PAGE 分析の結果、SDF-CBD と CBD-SDF は同様の分子サイズをもつことが分かった。また、CD 分析では、いずれのキメラタンパク質も SDF-H₆ (上記 3) および CBD-H₆ (上記 4) の CD スペクトルを単純に加算した合成スペクトルと同様の形状を取ったことから、CBD との融合およびその連結順序の影響は認められないと判断した。

さらに、hMSCs の移動アッセイにおいて、SDF-CBD および CBD-SDF の細胞移動促進効果は、SDF-H₆ と比較するとやや劣るものの、両者に有意差は認められなかった。

以上のように、AlphaFold 2 による高次構造予測結果は、実験的な構造評価や機能評価の結果とよく一致した。このことから、AlphaFold 2 がキメラタンパク質の高次構造評価手法として有用であることが示唆された。

4 . 2 BMP および VEGF キメラタンパク質の構造と機能

CBD-BMP、CBD-VEGF の AlphaFold 2 による高次構造予測の結果、CBD、BMP、VEGF の各ドメインの構造は、それらの天然型構造と類似しており、2 つのドメインを融合した影響は少ないと思われた。

一方、キメラタンパク質 (CBD-BMP、CBD-VEGF) およびコントロールタンパク質 (CBD) のコラーゲンコート表面への結合量には大差はなく、BMP や VEGF を融合することの影響は少なかった。

hMSCs を用いた骨分化アッセイでは、CBD-BMP によるアルカリフォスファターゼ発現量の上昇がみられた。この点に関しては、未だ十分に実験的検討が完結したとは言えないが、BMP と同様に CBD-BMP によって骨分化が促進することを示唆する結果であった。

以上の結果は、CBD、BMP、VEGF を融合しても各ドメインの構造や機能には大きな影響がないことを示唆する。これらのキメラタンパク質の場合にも、AlphaFold 2 による高次構造予測結果は、これまでに得られた実験結果と一致していることから、AlphaFold 2 がキメラタンパク質の高次構造評価手法として有用であると推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ayana Nakano, Isao Hirata, Binh Vinh Pham, Ajay Shakya, Kotaro Tanimoto, Koichi Kato	4. 巻 32
2. 論文標題 Evaluation of a peptide motif designed for protein tethering to polymer surfaces	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biomater. Sci., Polym. Ed.	6. 最初と最後の頁 76-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09205063.2020.1816870	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 該当する

1. 著者名 Ayana Nakano, Koichi Kato	4. 巻 20
2. 論文標題 Recombinant protein synthesis for nanomaterial assembly: Technical overview	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bull. Soc. Nano Sci. Technol.	6. 最初と最後の頁 31-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Fumika Abe, Ayana Nakano, Isao Hirata, Kotaro Tanimoto, Koichi Kato
2. 発表標題 Structure and function of engineered stromal cell-derived factor-1alpha
3. 学会等名 第56回広島大学歯学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ayana Nakano, Koichi Kato	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 895
3. 書名 Nanomedicine, Chapter 16 Regenerative nanotechnology: Engineering surfaces for stem cell production (pp. 605-622)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------