

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14061

研究課題名（和文）インフォマティクスを利活用した『ペプチド 高分子』ハイブリッド人工血管材料の創出

研究課題名（英文）Development of "peptide-polymer" hybrid vascular graft material using informatics

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、細胞の接着・増殖をコントロール(細胞選択性)する、人工血管に適した材料を効率的に開発する。医療材料表面で表したい細胞選択性は、土台である高分子材料と機能性分子(ペプチド)の組合せによる総合的な効果で決まると考えられる。しかし、高分子材料やペプチドは種類や配合比だけでも無数に考えられ、総当たりで設計しては非効率である。本研究では、高分子材料とペプチドの物性値計測をし、情報処理解析技術を用いることで、目的のハイブリッド人工血管材料を効率的に創出することを目標とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、細胞の接着・増殖をコントロール(細胞選択性)する、人工血管に適した材料を効率的に開発する。医療材料表面で表したい細胞選択性は、土台である高分子材料と機能性分子(ペプチド)の組合せによる総合的な効果で決まると考えられる。しかし、高分子材料やペプチドは種類や配合比だけでも無数に考えられ、総当たりで設計しては非効率である。本研究では、高分子材料とペプチドの物性値計測をし、情報処理解析技術を用いることで、目的のハイブリッド人工血管材料を効率的に創出することを目標とする。

研究成果の概要（英文）：This study efficiently develops materials suitable for artificial blood vessels that control cell adhesion and proliferation (cell selectivity). The cell selectivity to be expressed on the surface of the medical material is considered to be determined by the overall effect of the combination of the base polymer material and the functional molecule (peptide). However, innumerable polymer materials and peptides can be considered based on their types and compounding ratios alone, and it is inefficient to design them in a brute force manner. In this research, we aim to efficiently create the target hybrid artificial blood vessel material by measuring the physical property values of polymer materials and peptides and using information processing analysis technology.

研究分野：生物学、バイオマテリアル

キーワード：人工血管 ペプチド コラーゲン CMC コンビナトリアル 線維化 ビトリゲル 分化誘導

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工血管の研究は50年以上にも及ぶ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

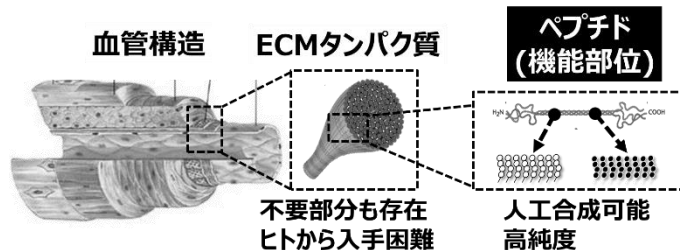


図1. 高機能化のためのペプチド分子

材質的・構造的・生化学的に再現できる人工材料が少ないためである。このため、高分子材料に「生体に学んだ機能性分子」を付加する高機能化研究が進められている。特に、細胞の機能を制御する細胞外マトリックス(ECM)タンパク質由来の細胞接着ペプチドの修飾(Adv Drug Deliv Rev.63(4-5):221-41.2011)が進められており(図1)、人工合成可能かつ高純度などの観点からも高分子材料の高機能化研究にペプチドがよく使用されている。

しかし、高分子材料の高機能化による『ハイブリッド人工血管材料』の開発には「組み合わせ」と「メカノバイオロジー」を考慮すべきと考える(図2)。まず、高分子材料の種類や配合率、ペプチドの配列数が無数に存在するため、高分子材料と

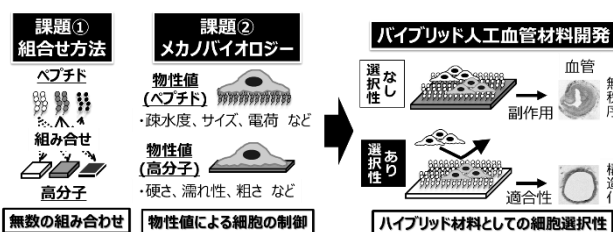


図2. 『ペプチド-高分子』ハイブリッド人工血管材料の課題

ペプチドの「組み合わせ」は膨大となり、経験者の判断や試行錯誤に頼らざるを得ないという課題がある。さらに問題なのは、同じペプチドでも修飾先の高分子材料の濡れ性が違うと、効果が低減することが我々の最新の研究により分かっており、組み合わせによる制御を非常に難しくしている。次に、細胞の運命の制御は、ECMの様な生化学的側面だけでなく、高分子材料がもつ力学特性や物理化学的性質(疎水度、硬さ、濡れ性など)である物性値にも起因する問題である。Englerらにより間葉系幹細胞(MSC)の分化が、基質材料の硬さで制御されることが報告されて以来(Cell. 2006 Aug 25;126(4):677-89.)、力学特性により細胞挙動の運命を制御する「メカノバイオロジー」の分野が注目されている(Biomaterials. 52:26-43.2015)。さらに我々も、ペプチドが持つ物理化学的性質が細胞接着に影響を及ぼすことを示しており、ハイブリッド材料の設計において、いかにして物理化学的性質を制御するかが重要であると考えられる。

つまり、ペプチドと高分子材料を組み合わせれば、相乗効果が生まれるという単純な問題ではなく、何百種類もの細胞が存在する複雑な組織内で、個々の細胞を緻密に制御する(選択性)ための材料設計には、細胞と物性値の効果を理解した効率的な手法が求められる。

2. 研究の目的

本研究は、細胞の接着・増殖をコントロール(細胞選択性)する、人工血管に適した材料を効率的に開発する。医療材料表面で表したい細胞選択性は、土台である高分子材料と機能性分子(ペプチド)の組み合わせによる総合的な効果で決まると考えられる。しかし、

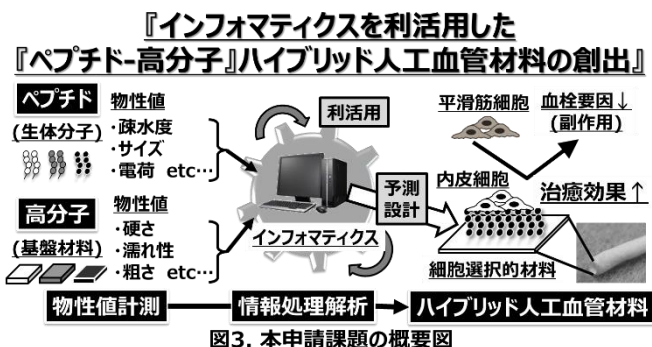


図3. 本申請課題の概要図

高分子材料やペプチドは種類や配合比だけでも無数に考えられ、総当たりで設計しては非効率である。本研究では、高分子材料とペプチドの物性値計測をし、情報処理解析技術を用いることで、目的のハイブリッド人工血管材料を効率的に創出することを目標とする(図3)。

3. 研究の方法

本研究では物性値のルールに基づく『ペプチド-高分子』ハイブリッド人工血管材料の創出を目指し、*in vitro* 検証を行う。具体的に次の3点を明らかにする。

① 細胞選択的ペプチド配列の網羅的スクリーニングとルール化

3 残基配列 8000 種類 of 全網羅スクリーニング、6 残基配列のスクリーニングに着手し、細胞選択的ペプチドの種類を拡張を行う。得られたスクリーニング結果からインフォマティクスを利用した細胞選択的ペプチドのルール化を行う。スクリーニング方法としてはセルロースメンブレン基板上のペプチドアレイの技術とノウハウを応用し、ガラススライド上にペプチド配列が合成されたペプチドマイクロアレイ (PEPperCHIP) での細胞選択的接着ペプチドスクリーニングを遂行する。

② 合成・生体高分子材料へのペプチド修飾方法の確立と物性値の計測とルール化

高分子材料へのより効率的・効果的なペプチド修飾方法の検討、多種類の高分子材料の物性値測定を行う。さらに、物性値情報を用いた細胞選択的接着のルール化を行う。

高分子材料へのペプチドを修飾手法として、主に 4 種類(クリックケミストリーが用いられるようにアルキン鎖を導入する方法、アミノリシス修飾、チロシン修飾、クロスリンカー修飾)の方法を検討する。この中から、反応効率やペプチド導入効率が良いものを選抜する。

医療材料に使用可能な高分子材料の種類を増やすため、合成高分子(ポリカプロラクトン(PCL)、ポリ乳酸(PDLLA)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)など)、生体高分子(コラーゲン、カルボキシメチルセルロース(CMC)、フィブリンなど)を数種類用い、シート状に作製する。さらに高分子材料の表面物性(接触角、ゼータ電位、粘弾性など)を測定し、細胞選択的接着と物性値の関係をルール化する。

③ 『ペプチド-高分子』ハイブリッド人工血管材料の *in vitro* 試験

1、2 で得られたペプチド、高分子材料の細胞選択的接着ルールを統合し、ハイブリッド人工血管材料を作製し、培養細胞を用いた *in vitro* 試験を行う。ルール化のアルゴリズム開発に関しては、同研究室の加藤竜司氏のアドバイスをいただき遂行する。

4. 研究成果

① 細胞選択的ペプチド配列の網羅的スクリーニングとルール化

3 残基配列 8000 種類 of 全網羅スクリーニングを開始するにあたり、*in silico* クラスタの見直しを行った。データベース上にある全アミノ酸指標、566 を使用して、最適な 13 指標を選抜した。そのうえで、3 残基配列 8000 種類を *in silico* クラスタに分割した。

細胞アッセイのスクリーニングにおいては、ガラススライド上にペプチド配列が合成されたペプチドマイクロアレイ (PEPperCHIP) での細胞選択的接着ペプチドスクリーニングの遂行を試みたが、細胞アッセイ系には適しておらず、従来のペプチドアレイにて新規細胞選択的ペプチドの探索の開始をした。その結果、内皮細胞選択的接着ペプチドを新たに数 10 種類取得することに成功した。血管構造を構築する細胞だけに限らず、血管組織構築に必要な抗炎症作用を持つペプチドの探索の着手を試み、10 種類の抗炎症作用を示すペプチドを取得した。

② 合成・生体高分子材料へのペプチド修飾方法の確立と物性値の計測とルール化

ペプチド修飾方法の確立に関しては、主にチロシンを使用した修飾方法、脱水縮合反応の2点にトライした。特にチロシンを使用した修飾に関しては血管を構築する細胞において効果が見られた。基盤材料には、PCL、PTFE、PDMSなどの素材を利用して評価した。さらにペプチド修飾に加え、ペプチドと基板材料の間のリンカーの検証、N末端のアセチル化の検討など、詳細に検証を行った。その結果、アセチル化の効果が細胞接着に強く影響していることが判明した。

更に、細胞選択的ペプチドと高分子材料のハイブリッド材料のプレ検証として、歯科治療用材料の作製、*vivo* 検証も行い、その有効性の検証も行った。この検証は、『ペプチド-高分子』ハイブリッド人工血管材料を作製する上での参考になると考えている。

③ 『ペプチド-高分子』ハイブリッド人工血管材料の *in vitro* 試験

生体高分子材料である、コラーゲンと CMC を基盤高分子材料としてペプチド修飾を行い、ハイブリッド効果の検証を試みた。具体的には、コラーゲンと CMC の配合比率、CMC の種類の選定、さらにはハイブリッド材料の作成方法等、多岐にわたり検証を行った。さらに、作製したハイブリッド材料の強度の検証も併せて行った。その結果、最適な生体高分子材料の作製方法、安定的な作製方法を見出すことに成功した。また、強度試験においても、生体血管に見られるような Jカーブ曲線を描くことも確認された。

また、合成高分子材料である、PTFE、PDMS、ポリエステル、さらには金属材料である 316L ステンレスを用い、ペプチド修飾を行い、ハイブリッド効果の検証を試みた。具体的には、修飾の際の濃度検証、反応時間、使用する細胞の培養期間等を詳細に検証した。その結果、最適な修飾条件を個々の材料に対して見出すことに成功した。

さらに、効果検証を行う中で、安定して検証を行うため、使用する内皮細胞の細胞材料としての品質に関しても評価する必要が出てきたため、画像解析を用いた評価試験を試みた。その結果、使用する細胞の品質によって、アッセイ結果が異なることが分かった。

また、使用している材料が歯骨研究に対しても有用性があることが確認されたため、派生研究として歯骨評価も行った。さらに、人工血管の副作用として線維化が考えられたため、線維芽細胞抑制ペプチドの評価研究も展開し、新規ペプチドを 20 種類獲得することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Motoki Okamoto, Sayako Matsumoto, Ayato Sugiyama, Kei Kanie, Masakatsu Watanabe, Hailing Huang, Manahil Ali, Yuki Ito, Jiro Miura, Yujiro Hirose, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Ryuji Kato, Aika Yamawaki-Ogata, Yuji Narita, Shigetada Kawabata, Yusuke Takahashi and Mikako Hayashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Performance of a Biodegradable Composite with Hydroxyapatite as a Scaffold in Pulp Tissue Repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 polymers	6. 最初と最後の頁 937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym12040937	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 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 王悦、蟹江慧、金子喬士郎、緒方藍歌、成田裕司、竹澤俊明、加藤竜司
2. 発表標題 多糖高分子を用いたペプチドハイブリッド足場材料の構築と評価
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yue Wang, Kei Kanie, Kyoshiro Kaneko, Aika Ogata, Yuji Narita, Ryuji Kato
2. 発表標題 Construction and evaluation of peptide hybrid scaffold materials using polysaccharide polymers
3. 学会等名 The 24th Symposium of Young Asian Biological Engineer's Community (YABEC 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蟹江 慧, 王 悦, 金子 喬士郎, 緒方 藍歌, 成田 裕司, 竹澤 俊明, 加藤 竜司
2. 発表標題 多糖高分子を用いたペプチド被覆足場材料の改良と機能評価
3. 学会等名 第18会再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蟹江慧、西涼香、杉山亜矢斗、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 細胞選択的ペプチドの医療機器材料への修飾条件の検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yue Wang , Kei Kanie, Kyoshiro Kaneko, Aika Ogata , Yuji Narita, Toshiaki Takezawa, Ryuji Kato
2. 発表標題 Construction and evaluation of peptide hybrid scaffold materials using polysaccharide polymers
3. 学会等名 2019 Sakura-Bio Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kei Kanie , Rio Kurimoto , Jing Tian , Aika Yamawaki-Ogata , Koichiro Uto , Mitsuhiro Ebara , Yuji Narita , Hiroyuki Honda , Ryuji Kato
2. 発表標題 Screening of Osteogenic-Enhancing Short Peptides from BMPs for Biomimetic Material Applications
3. 学会等名 5th TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aika Yamawaki-Ogata , Hiroto Suenaga , Tsukasa Ohno , Kei Kanie , Ryuji Kato , Koichiro Uto , Mitsuhiro Ebara , Hideki Ito , Yuji Narita
2. 発表標題 Osteogenic Enhancing Short Peptide with Biodegradable Polymer as a New Bone Hemostatic Material
3. 学会等名 5th TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Wang, K. Kanie, K. Kaneko, A. Ogata, Y. Narita, T. Takezawa, R. Kato
2. 発表標題 Cell-selective peptide functionalized polysaccharide-collagen hybrid material for medical application
3. 学会等名 TERMIS EU 2019 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山亜矢斗、蟹江慧、宇都甲一郎、荏原充宏、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 細胞選択的機能性ペプチドを応用した癒着防止シートの開発
3. 学会等名 2019年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王悦、蟹江慧、金子喬士郎、杉本礼子、緒方藍歌、宇都甲一郎、荏原充宏、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 多糖とペプチドを用いたハイブリッド細胞足場材料の最適化検証と評価
3. 学会等名 第71回日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山亜矢斗、蟹江慧、宇都甲一郎、荏原充宏、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 中皮細胞選択的接着ペプチドを利用した癒着防止シートの開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王悦、蟹江慧、金子喬士郎、杉本礼子、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 Cell-selective peptide functionalized polysaccharide-collagen hybrid material for medical application
3. 学会等名 APCchE2019 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王悦、蟹江慧、金子喬士郎、杉本礼子、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 多糖とペプチドを用いたハイブリッド細胞足場材料の最適化検証と評価
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 藤本瑛代、蟹江慧、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 ペプチドの組合せ手法による細胞接着ペプチドの効果検証
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 杉山亜矢斗、蟹江慧、霜古田一優、宇都甲一郎、荏原充宏、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 中皮細胞選択的接着ペプチドを利用した癒着防止シートの開発
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 蟹江慧
2. 発表標題 細胞選択的ペプチドを用いた再生促進型医療材料開発
3. 学会等名 2019年度中部地区 医療・バイオ系シーズ発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王悦, 蟹江慧, 金子喬士郎, 杉本礼子, 緒方藍歌, 宇都甲一郎, 荏原充宏, 成田裕司, 竹澤俊明, 加藤竜司
2. 発表標題 多糖とペプチドを融合したハイブリッド足場材料の安定作製法の最適化
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山亜矢斗, 蟹江慧, 霜古田一優, 宇都甲一郎, 荏原充宏, 緒方藍歌, 成田裕司, 加藤竜司
2. 発表標題 中皮細胞選択的接着ペプチドを応用した癒着防止シートの開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本瑛代, 蟹江慧, 緒方藍歌, 成田裕司, 加藤竜司
2. 発表標題 短鎖機能性ペプチドの効果に及ぼすタグペプチドのコンビナトリアル検証
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蟹江慧、西涼香、今井祐太、加藤竜司
2. 発表標題 機能性マテリアル評価における細胞形態画像解析を用いた細胞実験再現性の向上
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西涼香、蟹江慧、今井祐太、竹本悠人、加藤竜司
2. 発表標題 機能性マテリアル評価における細胞形態画像解析を用いた細胞実験再現性の向上
3. 学会等名 化学工学会 第85回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王悦、蟹江慧、金子喬士郎、杉本礼子、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 多糖とペプチドを用いたハイブリッド細胞足場材料の最適化検証と評価
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西涼香、蟹江慧、今井祐太、竹本悠人、加藤竜司
2. 発表標題 機能性マテリアル評価における細胞形態画像解析を用いた細胞実験再現性の向上
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本瑛代, 蟹江慧, 緒方藍歌, 成田裕司, 加藤竜司
2. 発表標題 機能性接着ペプチドの効果に及ぼすタグペプチドのコンビナトリアル検証
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 歯科治療用組成物	発明者 蟹江慧、他8名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-205226	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ビトリゲル	発明者 蟹江慧、他3名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-207613	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----