

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14602
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：15K12543
研究課題名(和文)炎症シグナル応答型創傷治癒バイオマテリアルの開発

研究課題名(英文)Signal-responsive biomaterials for wound healing

研究代表者

橋本 朋子 (HASHIMOTO, Tomoko)

奈良女子大学・生活環境科学系・助教

研究者番号：10589930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、まずペプチド配列：GAGAGSの固定化性能の検証を行い、続いて、(GAGAGS)_nの鎖長最適化などの検討を詳細に進めた。また、固体NMR測定、FTIR-ATR測定、ラマン顕微鏡観察およびDSC測定を行い、シルクフィブロインフィルムの構造や特性が固定化に与える影響についても新たな知見を得た。さらに機能性モデル配列として、(GAGAGS)_n GRGDSペプチドを合成しペプチド固定化フィルム上細胞の伸展を促進する結果を得た。
シルクフィブロインフィルム上に固定化後、体内のシグナルに応答して機能性配列の徐放が達成できるハイブリッドペプチドの設計・評価を進め、その応答性を確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was found that peptides contain (GAGAGS)_n sequences immobilized on silk fibroin specifically. Solid-state ¹³C CP/MAS NMR, FTIR-ATR, Raman imaging spectroscopy and Differential scanning calorimetry were performed to investigate secondary structures and thermal properties of silk fibroin molecules. These results indicated that beta-sheet contents in silk fibroin films influenced the immobilization efficiency of peptides. Novel hybrid peptides composed of (GAGAGS)_n sequences, cleavable sequences and wound healing sequences were designed and synthesized. Immobilizations and cleavages of fluorescence-labeled hybrid peptides were evaluated.

研究分野：生体材料

キーワード：シルクフィブロイン 機能性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

シルクフィブリン(以下フィブリン)は、生体親和性を示し、成形後の適度な強度を有する生体高分子であり、近年は再生医療分野での応用が進んでいる。これまでに、申請者らはフィブリンで作製したスポンジやフィルムを用いて、ヒト皮膚細胞の上皮化・組織再生能を評価し、フィブリンバイオマテリアルの創傷被覆材としての有用性を示してきた。さらに治療効果の高い創傷被覆材の開発を目指し、本申請課題では、治療効果が示されている創傷治癒配列のペプチドを創部で徐放するフィブリンバイオマテリアルの創出を目指し検討を行った。

これまで検討されているフィブリンへの機能性ペプチドの固定化法として縮合剤による修飾、積層法などが報告されているが、強固に結合できる、簡便であるといったメリットの一方で、アミノ酸側鎖への修飾により修飾箇所が制御できないことや、材料からの徐放に問題があると考えられる。そのため、

(I) 安定に固定する

(II) 必要な部位・タイミングでのみ創傷治癒ペプチドをリリースする

上記2点のアプローチが、更なる創傷治癒効果を発揮するバイオマテリアルの開発に重要と考えた。

2. 研究の目的

そこで本申請課題では、(I)の安定固定のために、フィブリン表面の二次構造の割合に応じたフィブリン特異的接着(固定化)配列を選定する。(II)のリリースには、創部での発現が知られているMMPによって切断される酵素切断配列を利用する。これら両配列と創傷治癒配列をつなげた「ハイブリット型創傷治癒ペプチド」を合成し、得られたペプチド単体での酵素切断活性・創傷治癒活性を明らかにする。そして、フィブリンフィルムにペプチドを付与して「ハイブリット型創傷治癒ペプチド」固定化バイオマテリアル(図1)を作製し、*in vitro* 評価を行うことを目的とした。



図1. 「ハイブリット型創傷治癒ペプチド」固定化フィブリンバイオマテリアル

3. 研究の方法

本申請課題では、当初シルクフィブリン特異的固定化配列の探索法として、ファージディスプレイ法を予定していたものの、先だ

って検討したペプチド配列(GAGAGS)が、フィブリンフィルム材料へ特異的な固定化可能であることが示唆された。よって、最大の目的である(I)(II)を達成するため、この固定化配列を用いた検討にシフトし進めた。

(1) 二次構造含有率の異なるフィブリンフィルムの作製と構造解析

調整したシルクフィブリン水溶液を用い、基材上にキャスト、もしくはディップし、室温(RT)または50°C(50)において乾燥、乾燥後のメタノール処理の有(Me)無(Non)の組み合わせにより、4種類(RT/Non、50/Non、RT/Me、50/Me)のフィブリンフィルムを作製した。

固体¹³C CP/MAS NMR スペクトル測定(バルク)、FTIR-ATR スペクトル測定(表面近傍)、ラマン顕微分光スペクトル測定(表面近傍、二次元マッピング)により得られた各フィルムの構造解析を行った。

(2) RGDモデルペプチドと固定化・機能性評価

蛍光ラベル(GAGAGS)_n GRGDS (n=1~5)を合成した。精製後、水、もしくはメタノールに溶解した溶液を用いて固定化処理を行った。ただし、n=4、5のペプチドについては、複数のアルコールに溶解しなかったため、以下の評価ではn=1~3のペプチドを用いた。溶液をフィブリンフィルムへ滴下、所定時間経過後上清を除去、各溶媒で洗浄した。各フィルムを蛍光顕微鏡下で観察し撮像した。また固定化量定量のため、回収上清と洗浄液の蛍光強度を測定、検量線を用いて残ペプチド量を算出、得られた値からフィルムへ固定化されたペプチド量を見積もった。

モデルペプチドの機能性評価として、ペプチド固定化フィルムにマウス繊維芽細胞を播種後、所定時間経過後の初期細胞接着数をWST-1アッセイにより調べた。また接着形態を顕微鏡観察により評価した。

(3) フィブリンへの固定化メカニズムの解明

ペプチドとフィブリン分子間の相互作用を解明するため、(GAGAGS)_n GRGDS (n=0、1)を合成・精製後、ペプチド固定化シルクフィブリンフィルムのDSCによる熱分解特性、およびFTIR-ATRスペクトル測定による二次構造を評価した。

(4) ハイブリッドペプチドの設計と合成、固定化および徐放評価

固定化配列・MMP 応答酵素切断配列・創傷治癒促進配列から構成される機能性配列ハイブリットペプチドを合成した。蛍光ラベルペプチドを用いたフィブリンフィルムへの固定化、MMPに反応した機能性配列の徐放を調べた。

4. 研究成果

(1) 各フィブロインフィルムの構造解析

固体 NMR 測定、FTIR-ATR 測定による構造解析・スペクトルフィッティングの結果、バルク、表面近傍いずれにおいても加熱とアルコール処理の組み合わせにより、RT/Non、50/Non、RT/Me、50/Me の順にβシート含有率の向上することが認められた(図2)。

さらに、ペプチドの固定に寄与すると考えられるフィブロインフィルム表面近傍の構造の二次元分布を、ラマン顕微分光装置により評価した結果、同じフィルム内における構造含有率の分布が観察された。

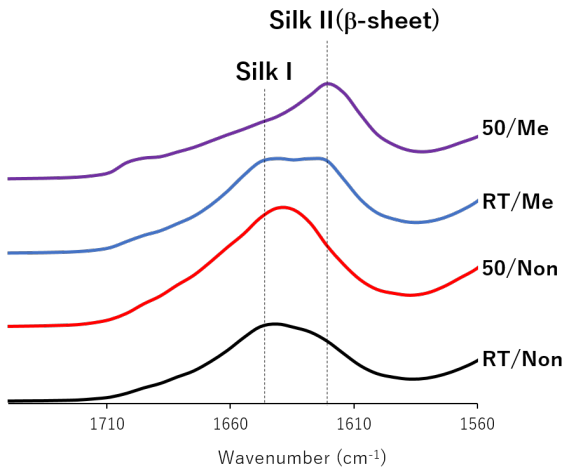


図 2. フィブロインフィルムの FTIR-ATR スペクトル(アミド I 領域)

(2) RGD モデルペプチドの固定化・機能性評価

まず接着配列の有無を比較した結果、固定化後フィルムの蛍光画像(図3)の輝度より、GAGAGS 配列のないペプチド(n=0)に比べ、GAGAGS GRGDS (n=1) は、より多くフィブロインフィルム上へ固定化されることが認められた。なお、(GAGAGS)_n GRGDS (n=1) を比較した場合、固定化量の明確な鎖長依存性は見られていない。さらに、固体 NMR や FTIR-ATR 測定、ラマン顕微測定による構造解析の結果をふまえ、固定化に与えるフィルム内βシート含有率の影響を評価した結果、ペプチドの固定はフィブロインフィルム中におけるβシート構造含有率が高い程向上することが明らかとなり、βシート含有率が異なる異なるメカニズムでペプチドがフィルムへ固定化されることが示唆された。

また、その固定化量は細胞接着に必要とされている単位面積当たりの密度を大きく上回る量であった。

(3) 固定化メカニズムの解明

ペプチドを固定化したフィブロインフィルムの DSC 測定による分解温度の解析より、

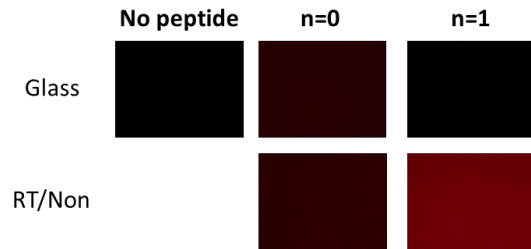


図 3. 蛍光ラベル (GAGAGS)_n GRGDS (n=0, 1) ペプチド固定化後のフィブロインフィルム蛍光画像

βシート含有率の低い RT/Non への固定化では、ペプチドおよびアルコールを添加しないフィルムに比べ、分解ピークが高温側にシフトした。FTIR-ATR スペクトル測定による二次構造に与える影響について調べた結果では、ペプチド固定化によるβシート構造増加が認められた。アルコールによるフィブロインのβシート化が起こると同時に、ペプチドの GAGAGS 配列がフィブロイン内βシート化をより促進しながら固定化され、フィルムの熱分解耐性向上に寄与したと考えられる。すなわち、ペプチドがフィブロインのβシート構造に固定化されることにより、フィブロインの結晶化度が高くなり、ペプチド固定化後のフィブロインフィルムではβシート含有率の増加と、分解温度の上昇がみられたと考えられる。一方、βシート含有率の高い 50/Me への固定化では、アルコール添加・ペプチド固定化前後において分解ピークのシフトや構造変化が認められなかった。この結果から、固定化前フィルム内のβシート含有率が高い場合、ペプチド内 GAGAGS 配列はフィブロインフィルム内の構造を変えることなく、既に存在するβシート構造に疎水性相互作用により固定化されていると推察される。

モデルペプチド固定化フィルムの *in vitro* 機能性評価として、マウス繊維芽細胞を用いた接着性試験を行った結果、ペプチド固定化量と初期接着細胞数に相関は認められなかったものの、固定化量が多かったフィルム上で培養初期時点での顕著な伸展が観察された。よって、接着配列を介して表面上に固定化された RGD ペプチドの細胞伸展への寄与が示唆された。

(4) 機能性ハイブリッドペプチドの設計と合成、固定化および徐放評価

特異的な固定化、機能発現の結果をふまえ、「固定化配列・MMP 応答酵素切断配列・創傷治癒促進配列」から構成される機能性ハイブリッドペプチドの蛍光ラベル体をフィブロインフィルムへの固定化した結果、ハイブリッドペプチドを用いた系では、特異性は低いものの、固定化配列を持たないペプチドと比較し固定化量の向上が示された。さらに MMP 応答性を評価した結果では、フィルム

上への MMP 添加後にペプチドの徐放を観察され、固定化ハイブリッドペプチドのシグナルへの応答性が示される結果を得た。

今後は、各機能性配列に応じた固定化配列の鎖長などの最適化を進め、固定化の長期安定性を評価するとともに、ハイブリッドペプチドを用いたさらなる検討を進めていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

橋本朋子、機能性材料創出を目指した固体 NMR 測定によるシルクフィブロイン構造解析、染色研究(査読無)、59、7-9(2015)

[学会発表](計5件)

中村優佳・橋本朋子・山岡哲二・亀田恒徳・玉田靖・黒子弘道、シルクフィブロインの二次構造解析と RGD ペプチド固定化、平成 28 年度 繊維学会秋季研究発表会、2016 年 9 月 20 日、山形大学(山形県米沢市)

Yuka Nakamura, Tomoko Hashimoto, Tetsuji Yamaoka, Tsunenori Kameda, Yasushi Tamada and Hiromichi Kurosu、Immobilization of cell-adhesive peptides to silk fibroin via GAGAGS sequences、9th International Conference on Fiber and Polymer Biotechnology、2016 年 9 月 8 日、大阪成蹊短期大学(大阪府大阪市)

Yuka Nakamura, Tomoko Hashimoto, Tetsuji Yamaoka, Tsunenori Kameda, Yasushi Tamada and Hiromichi Kurosu、Immobilization of RGD peptides to silk fibroin-based biomaterials via GAGAGS sequences、The 24th International Congress on Sericulture and Silk Industry、2016 年 8 月 13 日、Queen Sirikit National Convention Center (Bangkok, Thailand)

Tomoko Hashimoto, Yuka Nakamura, Tetsuji Yamaoka, Tsunenori Kameda, Yasushi Tamada, Hiromichi Kurosu、Immobilization of functional peptides to crystalline regions of silk fibroin-based biomaterial、The 10th World Biomaterials Congress、2016 年 5 月 18 日、The Palais des congrès de Montréal (Montreal, Canada)

橋本朋子・中村優佳・山岡哲二・亀田恒徳・玉田靖・黒子弘道、タンパク質二次構造変化を利用したシルクフィブロインへの機能性ペプチド固定化、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会、2015 年 11 月 9 日、京都テルサ(京都府京都市)

[図書](計1件)

橋本朋子、山岡哲二、株式会社シーエムシー出版、再生医療等製品の開発と実用化展望、2016、213-222

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 朋子 (HASHIMOTO, Tomoko)
奈良女子大学・研究院生活環境科学系・助教

研究者番号：10589930

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

中村 優佳 (NAKAMURA, Yuka)

山岡 哲二 (YAMAOKA, Tetsuji)

亀田 恒徳 (KAMEDA, Tsunenori)

玉田 靖 (TAMADA, Yasushi)

黒子 弘道 (KUROSU, Hiromichi)