

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13781

研究課題名(和文)人工血管を指向した生体融和多機能タンパク質材料の構築

研究課題名(英文)Construction of multi-functional protein materials for artificial blood vessels

研究代表者

小畠 英理 (Kobatake, Eiry)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：00225484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で使用する人工血管等の高分子材料に高密度配向集積するタンパク質材料を開発するため、構造部位として人工血管内面に集積する基本骨格配列を設計した。一方機能部位として、細胞接着能を有するペプチド配列を利用した。上記の構造部位、機能部位を組み合わせて設計したタンパク質の遺伝子構築を行い、組換え大腸菌を作製し、目的のタンパク質を得た。得られたタンパク質の疎水性高分子材料表面への集積状態は、免疫化学的手法により評価した。その結果、タンパク質が疎水性高分子材料表面に、強固に集積できることが明らかとなった。さらに、タンパク質を集積した疎水性高分子材料表面は優れた細胞接着性を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We constructed a novel multi-functional protein which can assemble on a hydrophobic surface with high density and high orientation. A structural unit with hydrophobic property was combined with functional unit with cell adhesive activity. The designed protein was expressed in E.coli and purified with affinity chromatography. The resulting protein was assembled well on the hydrophobic polymer which was generally used for the artificial blood vessels. Furthermore, the surface of the protein-assembled hydrophobic polymer showed well cell adhesive property.
The newly constructed protein in this study would be a useful material for the artificial blood vessels.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：多機能タンパク質 人工血管 生体融和材料 疎水性材料 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

現在人工血管として多用されている疎水性高分子材料は、短期間は血管代替機能を発揮するものの、血栓形成がみとめられ長期使用は不可能である。またこのため小口径人工血管では目詰まりを起こし、内径 3 mm 以下の人工血管はバイパス血管として需要が高いにも関わらず未だ実現されていない。そこで本研究は人工血管の材料として使用されている疎水性高分子材料表面と細胞・血液のインターフェイスとなる生体融和型タンパク質材料の開発を目指して行った。代表者はこれまでに、タンパク質分子集積 (*J. Biotechnol.*, **150**, 447-451, 2010) や細胞機能制御 (*Biomaterials*, **29**, 2977-2986, 2008, *Biomaterials*, **34**, 3315-3323, 2013) 等を目的とした人工タンパク質機能材料の設計・合成に関する研究を行ってきた。このようなタンパク質材料を生体内利用へと展開するにあたって、タンパク質の特性を活かした適切な機能化が必要と考え、本申請課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、生体内で使用する人工血管等の高分子材料に高密度配向集積する多機能タンパク質材料の開発を目的として行った。多機能タンパク質は、細胞の接着状態を制御可能、かつ血小板の吸着を阻害する複数の機能ペプチド配列を、疎水性で安定な構造を有する基本骨格となる構造ユニットに、配向・配置を精密に制御して組み込むことにより構築する。本研究により、生体内での使用においても拒絶されることなく機能発現できる、生体融和性を有するタンパク質材料が開発できれば、心筋梗塞や脳血管疾患の治療において切望されている、小口径人工血管の構築が可能となり、材料開発の基礎研究、臨床応用両面にわたる多大な貢献が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 構造ユニットの設計と合成

本研究では、人工血管内面に集積する基本骨格配列を、天然エラスチンの配列に基づいて設計した。エラスチンは哺乳類の血管や腱、筋肉など弾性に富む組織に存在するタンパク質で、(APGVGV) n や (GVGV) n といった特徴的な繰り返し配列を有する。これらの配列は疎水性に富み安定な構造を形成するため、ePTFE の疎水性表面に疎水性相互作用により容易に集積することができる。またもともと生体由来の配列であるため、生体適合性に優れているという大きな利点がある。設計したアミノ酸配列に基づいて遺伝子構築を行い、大腸菌で遺伝子発現が可能な発現ベクターを作製した。このベクターを大腸菌に導入して組換え大腸菌を作製し、タンパク質の合成・精製を行った。

(2) 機能ユニットの設計と合成

細胞接着部位として、フィブロネクチン由

来の RGD 配列、PHSRN 配列等を利用した。これらの配列はそれぞれ細胞膜表面のレセプターを介して細胞接着することが知られており、さらに両配列が相乗的に働き、細胞接着能を増強する。しかし、相乗効果が有効に発現されるためには両配列間の距離を 50 nm 程度に制御する必要があり、精密な設計が要求される。また血小板の吸着阻害配列として、コラーゲンに存在する GEOGER 配列を利用した。血小板が吸着しなければ材料表面に血小板の凝集、血栓形成が起こらず、小口径動脈用の人工血管が構築可能であり、また長期使用に耐え得ることが期待される。これらの機能配列を分子配向、分子間距離等を精密に制御しながら基本骨格に組み込み、生体融和型タンパク質材料とした。

(3) 疎水性高分子基板への集積と細胞接着能評価

得られたタンパク質を、人工血管材料として多用されている ePTFE 表面に集積した。機能部位の配向・配置について、分光学的手法、免疫化学的手法、電子顕微鏡観察等により評価した。また ePTFE 表面に集積したタンパク質材料に血管内皮細胞を播種し、生理食塩水フローによるシアストレス下細胞接着状態を評価した。さらに ePTFE 表面に集積したタンパク質材料に血清を添加し、血小板の吸着状態を評価した。

4. 研究成果

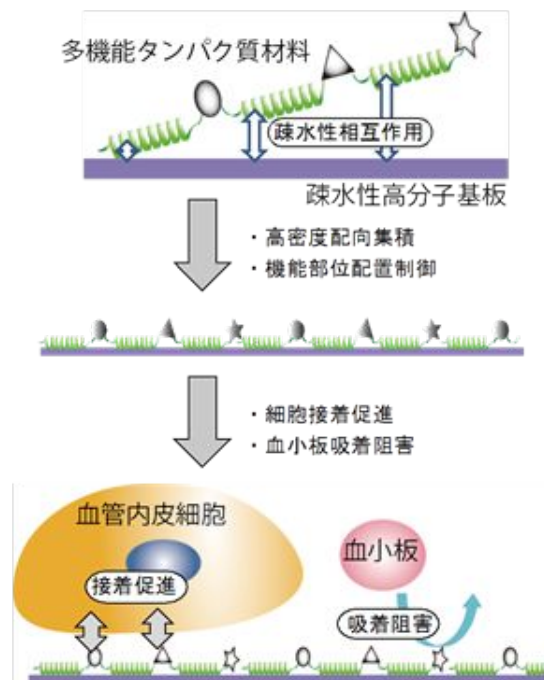
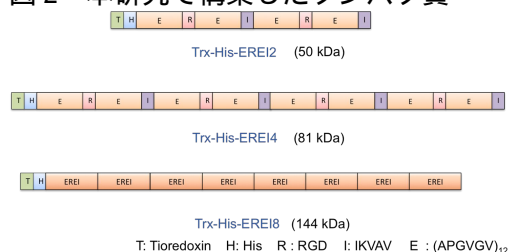


図1 本研究の概念図

生体内で使用する人工血管等の高分子材料に高密度配向集積する多機能タンパク質材料を開発するため、構造部位として人工血管内面に集積する基本骨格配列を、天然エラスチンの配列に基づいて設計した。エラスチンに存在する (APGVGV) n や (GVGV) n といった特徴的な繰り返し配列は疎水性に富み安

定な構造を形成するため、疎水性高分子である ePTFE の表面に疎水性相互作用により容易に集積することができる。また元来生体由来の配列を元に設計しているため、生体適合性に優れているという大きな利点がある。一方機能部位として、細胞接着能を有するフィブロネクチン由来の RGD 配列、ラミニン由来の IKVAV 配列等を利用した。これらの配列はそれぞれ細胞膜表面のレセプターを介して細胞接着することが知られている。血管内皮細胞が生着すれば、血小板の吸着を抑制できるため材料表面に血小板の凝集、血栓形成が起これば、小口径動脈用の人工血管が構築可能であり、また長期使用に耐え得ることが期待される。

図2 本研究で構築したタンパク質



上記の構造部位、機能部位を組み合わせ設計したアミノ酸配列に基づいて遺伝子構築を行い、大腸菌で遺伝子発現が可能な発現ベクターを作製した。このベクターを大腸菌に導入して組換え大腸菌を作製し、目的のタンパク質を得ることができた。得られたタンパク質を、人工血管材料として多用されている疎水性高分子材料表面に集積した。集積状態は抗体を利用した免疫化学的手法により評価した。その結果、タンパク質が疎水性高分子材料表面に、疎水性相互作用により強固に集積できることが明らかとなった。

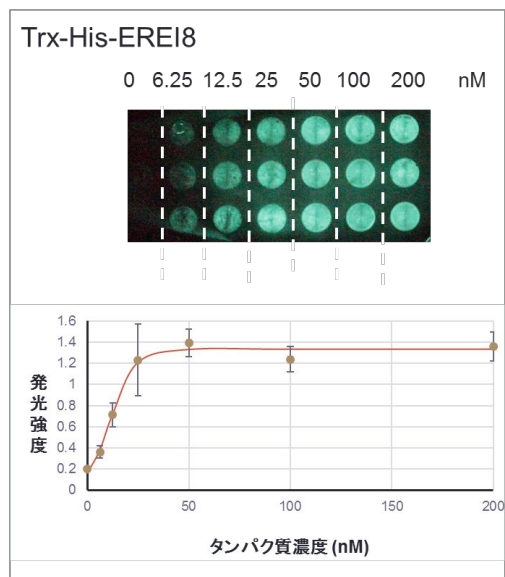


図3 ePTFE シートへの吸着能

さらに、タンパク質を集積した疎水性高分子材料表面に血管内皮細胞を播種し、観察することにより、優れた細胞接着性を有するこ

とが明らかとなった。

以上の結果より、本研究で構築した多機能タンパク質材料は、小口径人工血管を実現するための材料として利用できる可能性が示された。

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 5 件)

1. Ken-ichiro Kamei, Yasumasa Mashimo, Momoko Yoshioka, Yumie Tokunaga, Christopher Fockenber, Shiho Terada, Yoshie Koyama, Minako Nakajima, Teiko Shibata-Seki, Li Liu, Toshihiro Akaike, Eiry Kobatake, Siew-eng How, Motonari, Uesugi, Yong Chen, Microfluidic-nanofiber hybrid array for screening of cellular microenvironments, *Small* (2017) doi: 10.1002/smll.201603104
2. Kenji Usui, Masayasu Mie, Takashi Andou, Hisakazu Mihara, Eiry Kobatake, Fluorescent and luminescent fusion proteins for analyses of amyloid beta peptide aggregation, *J. Peptide Sci.* (2017) **23** (7-8), 659-665. doi: 10.1002/psc.3003.
3. Yun Heo, Eun-Hye Kim, Eiry Kobatake, Jae-Woon Nah, Yoshihiro Ito, Tae-Il Son, Preparation of phosphonated gelatin-coated titanium containing rhBMP-2 by UV irradiation for improved osteoinduction and function, *J. Ind. Eng. Chem.* (2016) **36**, 66-73, doi.org/10.1016/j.jiec.2016.01.006
4. Masayasu Mie, Tatsuya Naoiki, Eiry Kobatake, Tracking a protein following dissociation from a protein-protein complex using a split SNAP-tag system. *Anal. Biochem.* (2015) **477**, 53-55, doi: 10.1016/j.ab.2015.02.019
5. Yasmine Assal, Yoshinori Mizuguchi, Masayasu Mie, Eiry Kobatake, Growth factor tethering to protein nanoparticles via coiled-coil formation for targeted delivery. *Bioconjugate Chem.* (2015) **26** (8), 1672-1677, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00266

[学会発表](計 6 件)

1. 井上 澗、池田 裕介、眞下 泰正、三重 正和、小島 英理、タンパク質の安定性向上を目指したエラスチン様ポリペプチド融合タンパク質の構築、日本化学会第 98 春季年会 2018 年 3 月 20 日～23 日、日本大学理工学部 船橋キャンパス

2. がん細胞を標的とした高機能化タンパク質ナノ粒子の開発、池田裕介、眞下泰正、三重正和、小島英理、第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 2017 2017 年 11 月 20 日、21 日、タワーホール船橋
3. 池田裕介、眞下泰正、三重正和、小島英理、タンパク質ナノ粒子を利用した高感度バイオセンシングシステムの開発、つくば医工連携フォーラム 2017 2017 年 1 月 20 日、物質・材料研究機構
4. 水口佳紀、眞下泰正、三重正和、小島英理、三次元生体組織構築を目指した多機能タンパク質ハイドロゲルの設計、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 2016 年 11 月 21 日、22 日、福岡国際会議場
5. 西岡宣之、眞下泰正、三重正和、小島英理、抗血栓性人工血管の開発を目的とした細胞外マトリックスタンパク質の構築、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会 2015 年 11 月 9 日～10 日、京都テルサ
6. N. Nishioka, Y. Mashimo, M. Mie, E. Kobatake、Development of RGD containing hydrophobic extracellular matrix for small-caliber vascular grafts、2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), December 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 英理 (KOBATAKE, Eiry)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：00225484