様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　　８　日現在

機関番号：　８２６２６
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2015～2016
課題番号：　１５Ｋ１６３３４

研究課題名（和文）炎症性疾患治療のための活性酸素除去能と細胞認識能を備えたタンパク質フィルムの開発

研究課題名（英文）Creation of multifunctional protein film for the treatment of inflammatory diseases

研究代表者

山添　泰宗（YAMAZOE, HIRONORI）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：００４０２７９３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アルブミン、Superoxide dismutase (SOD)、抗体の3種類のタンパク質を用いて活性酸素除去能と細胞認識能を有するタンパク質フィルムの開発を行った。本フィルムを用いることで、活性酸素を分泌する細胞を捕捉し、分泌された活性酸素を即座に除去できることが分かった。本フィルムは過度の炎症を抑える効果が期待でき、炎症性疾患の治療において有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, protein film was constructed by combining three types of protein with different functions, including albumin, the antibody, and superoxide dismutase (SOD). The constructed protein microfilm successfully captured the reactive oxygen species (ROS)-secreting cells using the incorporated antibody, and 70 % of ROS, secreted from the captured cells, was eliminated by SOD in the microfilm. This protein microfilm is thought to be useful for the treatment of inflammatory diseases.

研究分野：　バイオマテリアル

キーワード：　タンパク質　活性酸素　炎症性疾患　SOD　抗体

１．研究開始当初の背景

体内で過剰に発生した活性酸素は過度の炎症を引き起こし、様々な病気に結び付くことが分かっている。そこで、活性酸素を除去する活性を持つ酵素 Superoxide dismutase (SOD) を治療薬として用い炎症を鎮静化させることが考えられている。しかし、pH の影響（炎症部は酸性）、プロテアーゼによる分解、SOD に対する抗体ができるなど、SOD の活性酸素除去能の低下に繋がる様々な問題がある。また、効率良く活性酸素を除去するためには、活性酸素を分泌する細胞の周囲に SOD を到達させることが重要であるが、SOD が自発的に特定の細胞に集積することはない。細胞膜に親和性を有するリン脂質のレシチンを結合したレシチン化 SOD が開発され、SOD を細胞に集積させることが可能となったが、レシチンの性質上、全ての種類の細胞を無差別に認識し、活性酸素を分泌する細胞のみに集積させることはできない。また、細胞への集積性以外の問題は解決できていない。

研究代表者はこれまで、タンパク質を原料としてフィルムを創製する研究に従事してきた。通常、タンパク質からフィルムを作製した場合、水分が失われることや化学処理によるダメージによって、フィルム化後のタンパク質の高次構造は大きく破壊されている。研究代表者の研究の特徴は、タンパク質の構造を大きく変化させること無くフィルム化できることであり、構造が保たれていることで、フィルム化後も個々のタンパク質が持つ機能を発揮できる。

そこで、この独自技術をもとに従来の SOD を用いた治療における問題点の解決を試みた。すなわち、SOD をフィルム化して安定性を向上させ、更に、SOD フィルムの表面に活性酸素を分泌する細胞を認識する抗体を組み込むことで SOD フィルムが細胞を捕捉し細胞近傍に SOD を存在させることを考えた。本研究では、この SOD と抗体を含むタンパク質フィルムを局所炎症部に注射器で注入し、炎症部において、活性酸素を分泌する細胞をフィルムが抗体の働きにより捕捉し、捕捉した細胞から分泌された活性酸素をフィルム内の SOD が速やかに除去することで炎症を鎮静化させることを想定し研究を行った。

２．研究の目的

本研究は、上記の局所炎症性疾患の新たな治療法の確立を目指し、治療に用いるフィルムの開発とその機能性の評価を行うことを目的とする。具体的には、以下の 3 項目に関して検討を行った。

（１）検討１：フィルムの作製方法の確立

フィルムの内部に SOD を、また、表面に抗体が組み込まれたタンパク質フィルムを作製する方法を確立する。

（２）検討２：フィルムサイズの微小化

検討 1 において確立したフィルム作製法をもとに、より微小なサイズを有するフィルム（直径 約 100 μm）を調製する方法を確立する。

（３）検討３：マイクロフィルムの機能評価

検討 2 で作製した微小なマイクロフィルムと好中球（活性酸素を分泌する細胞）を用いて、フィルム内の抗体と SOD の働きによる細胞認識能と活性酸素除去能を評価する。

３．研究の方法

（１）SOD 含有フィルムの作製

ウシ血清アルブミンとウシ赤血球由来 Cu, Zu - SOD の混合溶液（アルブミン：SOD＝100 mol :1 mol）を調製し、架橋剤 エチレングリコールジグリシジルエーテルを用いて架橋アルブミン-SOD 溶液を作製した。架橋アルブミン-SOD 溶液にトレハロースを少量添加し、37℃で乾燥させることによりタンパク質フィルムを作製した。フィルム化後の SOD の酵素活性は、テトラゾリウム塩 WST-1 を用いて測定した。また、フィルム内のタンパク質の高次構造は円偏光二色性（CD）スペクトルの測定により評価した。

（２）SOD フィルムへの抗体の組み込み

図１に示す方法により、抗体の配向を制御し、SOD フィルムの表面に抗原認識部位を外側に向ける形で抗体の組み込みを行った。手順としては、末端にメチル基、または、ビオチン（抗原）を有するアルカンチオールを用いて、金基板上に自己組織化単分子膜を形成させ、メチル基をバックグラウンドとして、一定量のビオチン（抗原）が存在する表面を作製した。この基板に抗ビオチン抗体を加えて、基板上に抗体を配列させた後、フィルムの元となる架橋アルブミン-SOD とトレハロースで構成される反応液を加えた。37℃で乾燥処理を行ってフィルムを作製後、エタノールに暴露することにより、抗原と抗体を解離させて基板からフィルムを剥離した。フィルムに組み込まれた抗体の抗原認識能は、ビオチン化 horseradish peroxidase（HRP）をフィルム内の抗体と結合させ、HRP の活性を蛍光試薬を用いて測定することで評価した。な

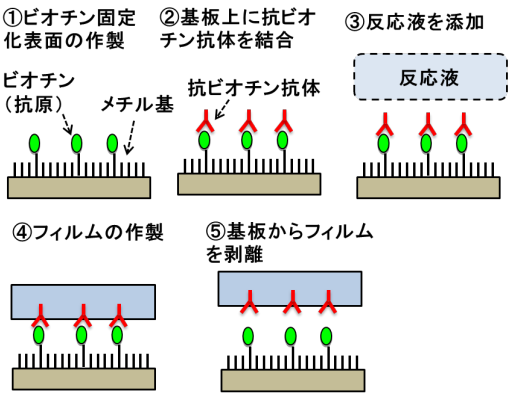

図１　抗体をSODフィルムに組み込む方法

お、この段階ではフィルムの作製方法を確立することが目的であるので、実験操作のやり易さから cm サイズの大きなフィルムを使って実験を行った。

（3）マイクロフィルムの作製

上記の（2）において確立した方法をもとに微小なサイズ（直径約 100 μm）を有するフィルムを作製した。基本的な手順は、図1と同じであるが、手順③の段階で、タンパク質溶液の吐出に特化したインクジェットプリンターを用いて、基板上に微量（約 600 pL）の反応液を滴下することで微小なマイクロフィルムを作製した。作製したマイクロフィルムの形状は、レーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。

（4）マイクロフィルムの機能評価

活性酸素を分泌する細胞（好中球様細胞）を用いてマイクロフィルムが有する細胞認識能と活性酸素除去能を評価した。好中球様細胞は、DMSO を用いて HL60 細胞を分化させることで調製した。また、ビオチン化抗 CD43 抗体を利用してこの好中球様細胞の表面にビオチンを導入した。

フィルムの細胞認識能は、フィルムの表面に抗ビオチン抗体が組み込まれているマイクロフィルムとビオチン化好中球様細胞をチャンバーに加え1時間インキュベートした後、フィルムによる細胞の捕捉の程度を顕微鏡で観察することにより評価した。

マイクロフィルムの活性酸素除去能は、フィルムに捕捉された好中球様細胞が分泌する活性酸素（スーパーオキシドアニオン）を化学発光法にて測定することで評価した。具体的には、細胞を捕捉しているマイクロフィルムを測定用チューブに入れ、化学発光試薬(Diogenes)と混合した後、刺激物質である Phorbol Myristate Acetate（PMA）を添加して好中球様細胞のスーパーオキシドアニオンの分泌を促し、分泌されたスーパーオキシドアニオンに起因する化学発光をルミネッセンスリーダーにて測定した。

4．研究成果

(1) SOD 含有フィルムの作製

架橋したアルブミン-SOD 溶液を用いてフィルムを作製し、フィルム内の SOD の活性を測定したところ、架橋反応や乾燥処理などを経てフィルムにした後においてもその活性が残存していることが分かった。また、CD スペクトル測定によりフィルム内のタンパク質の高次構造を評価した結果、架橋前の天然のタンパク質溶液の状態と比較して、スペクトルにほとんど変化が見られず、架橋反応やフィルム形成によってタンパク質の構造が大きく破壊されていないことが示唆された。さらに、天然の SOD が完全に失活するような条件下（90℃で 10 分間加熱、pH=2 の酸性溶液に 30 分間暴露）においてもフィルム内の SOD は、完全に失活せず活性が残存しており、SOD をフィルム化することで安定性が大きく向上していることが分かった。

（2）SOD フィルムへの抗体の組み込み

図1に示した方法により、SOD フィルムの表面に配向を制御した形で抗体を組み込んだ。このフィルムに組み込まれた抗体の抗原認識能を評価したところ、抗体の配向制御法として広く用いられているプロテイン G を利用した方法よりも高い認識能を有していることが分かった。さらに、抗体の安定性の向上も見られ、70℃で 10 分間加熱や各種溶液[6M グアニジン、酸 (pH=2)、アルカリ(pH=12)]への暴露など、タンパク質の変性を促す処理を行った後においてもその抗原認識能を保持していることが分かった。

（3）マイクロフィルムの作製

インクジェットプリンターを利用して、微量のタンパク質溶液を取り扱うことで微小なタンパク質フィルムを作製することに成功した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、基板上に付着している状態のマイクロフィルムの形状を解析した結果、中央部で薄く（膜厚：約 170 nm）、外周部で分厚い（膜厚：約 740nm）形をしていることが分かった（図2）。

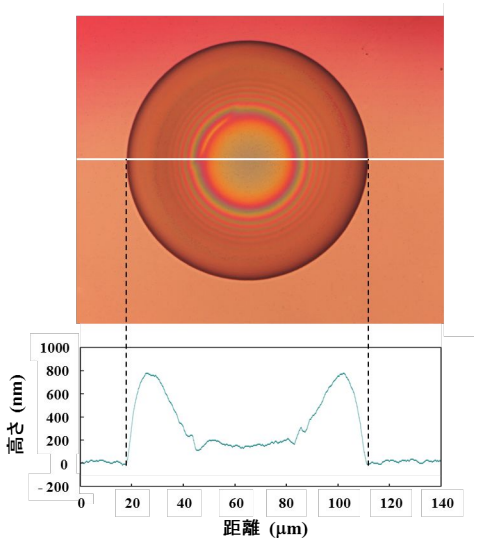

図2 微小タンパク質フィルムの形状

（4）マイクロフィルムの機能評価

（3）の項で作製したマイクロフィルムの細胞認識能と活性酸素除去能の評価を行った。ビオチン化した好中球様細胞とマイクロフィルムを混合し、顕微鏡で観察したところ、フィルムが良好に細胞を捕捉していることが分かった（図3a）。細胞はフィルム全面に付着しており、直径 100μm のマイクロフィルムに約 22 個の細胞が捕捉されていた。なお、フィルム表面に抗体を組み込んでいないコントロールサンプルにおいては細胞の捕捉は見られなかった（図3b）。

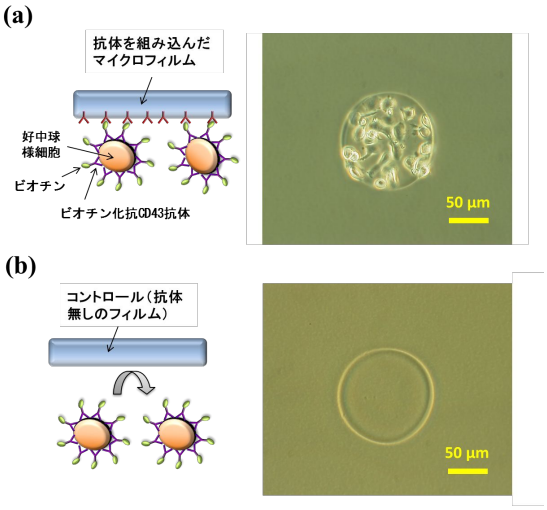

図３ 微小タンパク質フィルムによる細胞の捕捉

また、細胞を捕捉したマイクロフィルムを用いて、周囲の外液に分泌された活性酸素（スーパーオキシドアニオン）の量を測定したところ、フィルムに捕捉されていないフリーの状態の細胞に比べて、検出される活性酸素の量が 70%減少していることが分かった。これはフィルムが捕捉した細胞から分泌された活性酸素の大部分がフィルム内部の SOD によって即座に除去されたためだと考えられる。このように本マイクロフィルムは良好な細胞認識能と活性酸素除去能を備えていることが分かった。

本研究で開発した機能性タンパク質フィルムは、SOD を用いた従来の治療法の種々の問題点を解決し、クローン病やリウマチなどの局所炎症性疾患に対する新たな治療法を確立するために有用であると考えられる。

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 2 件）

①Yamazoe H., Ichikawa T., Hagihara Y., Iwasaki Y. Generation of a patterned co-culture system composed of adherent cells and immobilized nonadherent cells. Acta Biomaterialia, Vol. 31, pp. 231-240, 2016.（査読有）
DOI: 10.1016/j.actbio.2015.12.016.

②Yamazoe H., Nakanishi H., Kashiwagi Y., Nakamoto M., Tachibana A., Hagihara Y., Tanabe T. Changes in cell adhesiveness and physicochemical properties of crosslinked albumin films after ultraviolet irradiation. Langmuir, Vol.32, pp. 203-210, 2016.（査読有）
DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b03958.

〔学会発表〕（計 5 件）

①山添泰宗、局所炎症性疾患治療のための機能性タンパク質デバイスの開発、第 46 回医用高分子シンポジウム、2017 年 7 月 24 日、産業技術総合研究所　臨海副都心センター（東京）

②田中信行、山添泰宗、古谷俊介、永井秀典、佐藤麻子、髙原順子、川井隆之、田中陽、架橋アルブミン微小構造体を利用した細胞パターニング、ロボティクス・メカトロニクス 講演会-2017、2017 年 5 月 11 日、ビッグパレットふくしま（福島）

③ Hironori Yamazoe, Takashi Ichikawa, Yoshihisa Hagihara, Yasuhiko Iwasaki、Fabrication of patterned co-culture composed of adherent cells and immobilized nonadherent cells on the albumin-based substrate、10th World Biomaterials Congress、2016 年 5 月 18 日、Palais des congress de Montreal (Montreal, Canada)

④山添泰宗、市川貴士、萩原義久、岩﨑泰彦、機能性フィルムを利用した癌細胞と免疫細胞から成るパターン化共培養の構築とその応用、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会、2015 年 11 月 10 日、京都テルサ（京都）

⑤山添泰宗、萩原義久、癌細胞と間質細胞の共培養系を用いた抗癌剤の薬効評価、第 44 回医用高分子シンポジウム、2015 年 7 月 28 日、産業技術総合研究所　臨海副都心センター（東京）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：抗体を含むタンパク質フィルム及びその製造方法
発明者：山添泰宗
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2017-029525
出願年月日：2017 年 2 月 20 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
http://www.aist.go.jp/

６．研究組織
(1)研究代表者
山添　泰宗　（HIRONORI, Yamazoe）

国立研究開発法人 産業技術総合研究所・バ

イオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：402793