

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500410

研究課題名（和文） 機能性ペプチドを用いた再生医工学用ハイブリッド材料の創成

研究課題名（英文） Functional peptides based hybrid biomaterial for tissue engineering

研究代表者

平野 義明 (HIRANO YOSHIAKI)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：80247874

研究成果の概要：

本研究の目的は、細胞の機能をコントロールできるペプチドハイブリッド足場材料の設計を行い、組織工学や再生医工学への応用を目指す。その結果、細胞接着性ペプチドと β -シート構造を組み合わせることで、3次元足場の創出に成功した。オリゴペプチド固定化材料の創成においては、アルギン酸に β -シート構造を形成するペプチドを非共有結合型架橋剤として導入し、アルギン酸ゲルの作製に成功した。また、血管内皮細胞増殖に関するペプチドを合成しその機能を評価、顕著な細胞増殖活性を有することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：(1) 再生医工学 (2) 足場 (3) ペプチド (4) 細胞接着 (5) 自己組織化 (6) コンホメーション解析 (7) 原子移動型ラジカル重合(ATRP) (8) Homing Peptide

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム配列の決定は、ゲノム科学の遺伝子配列を明らかにしようとする「構造解析」から、遺伝子の発現産物による「機能解析」へと移りつつある。まさに時代は、プロテオミクス・プロテオームの時代である。機能解析が進むと共に、タンパク質の構造-機能の相関関係も今後さらに明らかになるであろう。生体の機能発現などに重要な因子であるタンパク質にかかわる詳細な情報が得られること

で、タンパク質中の1次構造ならびに2次構造が明らかにされ、生理活性部位のアミノ酸配列も次々と解明されている。

これらの成果から、再生医療にとって大変重要な細胞外マトリックスタンパク質を始め、細胞増殖因子である血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などの生理活性部位のアミノ酸配列などが明らかにされてきた。このアミノ酸配列を利用すれば、遺伝子組み換えによるリコンビナント法で産出されているタンパク質と

同等の細胞増殖活性が認められると推測される。

テキサス大学の R.Pasqualini らは、組織特異的に集積するペプチドをファージディスプレイ法・コンビナトリアル化学の手法を駆使し明らかにした。それは **Homing Peptide** と命名され、生化学・分子生物学分野で大変注目を集めている。これらペプチドはわずか 3 残基から 10 残基オリゴペプチドサイズであり、骨組織、脂肪組織、皮膚組織、筋肉組織などに集積し、細胞表面レセプターに特異的に相互作用することが明らかにされた。

一方、合成高分子の分野では、原子移動型ラジカル重合(ATRP)が見いだされ分子鎖長が揃った高分子を合成することが可能となった。N. R. Washburn らは、ペプチド主鎖を起点に原子移動型ラジカル重合を施し、ペプチド-高分子ハイブリッドを合成することに成功している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、先に示したこれらペプチドを考慮に入れ、細胞とペプチド-刺激応答性高分子ハイブリッド材料との相互作用を明らかにし、細胞の機能をコントロールできるペプチドハイブリッド足場材料(人工細胞外マトリックス)の設計・合成(マトリックス工学)を行い、組織工学や再生医工学への応用を目指すことにある。加えて、各種ペプチド構造体の構造解析と構造活性相関機構の把握を通じて、組織工学や再生医工学への応用の有用性について検討を行う。デザインしたペプチドを期間内に合成・実験的・理論的構造解析ができ、作用機構解明の基礎的知見を得ることが出来る。刺激応答成功分子とペプチドの取鎖-取鎖間同士でのコンジュゲート分子の創成技術を確認し、**Double Stimuli Responsive Polymer** の特性解析を行い、機能を多方面から評価する。

3. 研究の方法

① 研究代表者が以前から研究を展開している機能性ペプチドである細胞接着・伸展・誘導活性部位のアミノ酸配列を含む分子と、**Homing Peptide** を組み合わせたダブルリガンドタイプのペプチド分子を設計し、その構造活性相関を明らかにする。

② **Homing Peptide** とペプチド工学的要因である β -シート構造や、 α -ヘリックスによるコイルド-コイル構造を組み合わせ、自己集積・組織化等を利用したペプチドハイブリッド体を効率よく合成し、細胞特異的に培養可能な再生医療用高機能性足場を構築する。

③ 原子移動型ラジカル重合により鎖長が揃った単分散の刺激応答性高分子鎖をペプチド鎖に導入することで、多機能な足場材料を構築する。

本研究は再生医工学用材料として、機能性足場や増殖因子に代わる細胞特異的な活性ペプチドの合成が主目的である。その際に、キーとなる機能性ペプチドの合成・構造・人工細胞外マトリックスをはじめ、再生医工学用材料としての機能との相関性を、実験的・理論的研究の両面から系統的に行うことが可能であること、ペプチド工学と組織工学を自由自在に融合できることが特徴である。

4. 研究成果

1. 生理活性ペプチド配列の分子設計:血管内皮細胞増殖に関するペプチドを合成しその機能を評価した。その結果、顕著な増殖活性が確認できた。現在は、ペプチドの作用機構解明のため分子生物学的手法によりシグナル伝達の解析を行っている。

2. ペプチド-無機材料ハイブリッド足場の創成:バイオミネラリゼーション機能を有するペプチドの設計と合成を完了し、現在ペプチド-無機複合材料の構築を目指している。無機イオン存在下では、合成したペプチドがイオン濃度に依存して構造変化を起こしていることを明らかにした。

3. ペプチド-高分子(有機)材料ハイブリッド足場の創成:細胞接着性オリゴペプチドを用いた高機能足場の構築に関しては、ペプチドのみでファイバー状の足場を作製した。その3次元足場内で細胞培養を行ったところ、ペプチド由来の市販のハイドロゲルタイプの足場材料に比べて顕著な細胞の接着・伸展・増殖が確認された。また、オリゴペプチド固定化材料(高機能性足場)の創成においては、酸性多糖であるアルギン酸に、 β -シート構造を形成するペプチドを導入し、分子間の相互作用を利用することで非共有結合型架橋剤の設計を試みた。その結果、アルギン酸カルシウムハイドロゲルと同様のアルギン酸ゲルの作製に成功した。このハイドロゲルは、硬組織のみだけではなく、軟組織用足場材料としての利用の可能性を有していることが明らかとなった。

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 8 件)

1. T. Kawaguchi, H. Kataoka, Y. Hirano, M. Oka, Synthesis and conformational

- analysis of Poly(L-Pro-D-Pro), Peptide Science, 2007, pp.409-410, 2008, 有
2. M. Oka, M. Teraoka, T. Kawaguchi, Y. Hirano, Investigation on the repetitive amino-acid sequences of native proteins and a hydrothesis on the earliest proteins, Peptide Science, 2007, pp.411-414, 2008, 有
 3. N. Nishishita, J. Jo, M. Yamamoto, Y. Tabata, Y. Hirano, The gene transfection cell attachment peptides for gene therapy, Peptide Science, 2007, pp.443-446, 2008, 有
 4. M. Toda, T. Kitazawa, I. Hirata, Y. Hirano, H. Iwata, Complement activation on surfaces carrying amino groups, Biomaterials, 29, pp.407-417, 2008, 有
 5. 西下直希、紀村浩希、宮澤光博、平野義明、自己組織化 β -シートペプチドを架橋点に利用したアルギン酸ヒドロゲルの設計、高分子論文集、65、pp.745-750、2008、有
 6. S. Kakinoki, M. Kitamura, M. Yuge, M. Furuta, M. Oka, Y. Hirano, K. Kono, I. Kaetu, Solution Property and Irradiation Effect of Random Copolypeptides Composed of Ala and Pro Residues, Polymer Bulletin, 58, 393-400, 2007, 有
 7. J. Jo, T. Ikai, A. Okazaki, M. Yamamoto, Y. Hirano, Y. Tabata, Expression profile of plasmid DNA by spermine derivatives of pullulan with different extents of sperimine introduced, Journal of Controlled release, 118, 389-398, 2007, 有
 8. K. Y. Lee, N. Nishishita, Y. Hirano, D. Mooney, Controlled Angiogenic Factor Release from Alginate Gels, Key Engineering Materials, 342-343, 517-520, 2007, 有
- [学会発表] (計 61 件)
1. 伊藤友樹、平野義明、プロリンを用いたバイオマテリアルの設計、第25回関西ペプチドセミナー、2008/12/13、東大阪市
 2. 和田全展、平野義明、 β -シートペプチドを用いたバイオマテリアルの設計—その2、2008/12/13、東大阪市
 3. 西村直剛、平野義明、 β -シートペプチドを用いたバイオマテリアルの設計—その1、2008/12/13、東大阪市
 4. 西下直希、森本佳孝、平野義明、自己組織化ペプチドを利用したハイドロゲルの創成、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008、2008/11/17、東京都
 5. T. Kawaguchi, Y. Hirano, M. Oka, Molecular dynamic simulations of α -hairpin structures in aqueous solution system, 第45回ペプチド討論会、2008/10/29、東京都
 6. T. Kawaguti, Y. Hirano, M. Oka, Theoretical design of new conjugated system in main-chain of peptides, 第45回ペプチド討論会、2008/10/29、東京都
 7. N. Nishishita, Y. Morimoto, M. Oka, Y. Hirano, Built up of stimulus-responsive hydrogels using self-assembling β -hairpin peptides, 第45回ペプチド討論会、2008/10/29、東京都
 8. H. Kodera, N. Nishishita, H. Yasui, Y. Hirano, Y. Kiso, Y. Hayashi, Synthesis of side chain functionalized polylactides from a lysine-derived homobislactone, 第45回ペプチド討論会、2008/10/29、東京都
 9. 平野義明、西下直希、岡 勝仁、宮澤光博、 β -シート構造を有するペプチドを用いたバイオマテリアルの設計、第57回高分子討論会、2008/09/24、大阪市
 10. 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、水溶液系における α -ヘアピン構造の動的挙動、第57回高分子討論会、2008/09/24、大阪市
 11. 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、主鎖に二重結合を有するアミノ酸残基の分子特性、第57回高分子討論会、2008/09/24、大阪市
 12. 西下直希、藤井秀司、平野義明、ペプチドを含む重合開始剤を用いた刺激応答性高分子の合成、日本バイオマテリアル学会 第3回関西若手研究発表会、2008/08/07、吹田市
 13. 西下直希、宮澤光博、平野義明、ペプチド間の相互作用を利用したハイドロゲルの創成、日本バイオマテリアル学会 第3回関西若手研究発表会、2008/08/07、吹田市
 14. 西下直希、平野義明、川真田伸、ペプチドナノファイバーを足場として利用したES細胞の培養、第37回医用高分子シンポジウム、2008/07/28、東京都
 15. 西下直希、藤井秀司、平野義明、ペプチドベース重合開始剤を用いた刺激応答性高分子の合成、第54回高分子研究発表会(神戸)、2008/07/18、神戸市

16. 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、ab initio 計算による 3-アミノプロペン酸残基の構造特性の解析、第 54 回高分子研究発表会 (神戸)、2008/07/18、神戸市
17. 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、分子動力学計算による α -ヘアピン構造の解析 第 54 回高分子研究発表会 (神戸)、2008/07/18、神戸市
18. 西下直希、紀村浩希、平野義明、自己組織化ペプチドを架橋剤に利用したアルギン酸ハイドロゲルの設計、繊維学会、2008/06/20、東京都
19. 平野義明、西下直希、ペプチドファイバーを用いた人工細胞外マトリックスの設計、第 40 回日本結合組織学会学術大会第 55 回マトリックス研究会大会合同学術大会、2008/05/30、東京都
20. 西下直希、森本佳孝、宮澤光博、平野義明、刺激応答性ペプチドハイドロゲルの設計とその応答特性の検討、第 57 回高分子学会年次大会、2008/05/28、横浜市
21. N. Nishishita, Y. Tabata, M. Oka, Y. Hirano, Designed of peptide 3D scaffold for tissue engineering, 8th World Biomaterials Congress, 2008/05/28, Amsterdam
22. 川口卓也、平野義明、岡 勝仁、プロリンリッチなポリペプチドの水溶液系における分子動力学計算、第 57 回高分子学会年次大会、2008/05/28、横浜市
23. 西下直希、紀村浩希、平野義明、自己組織化ペプチドを架橋剤として利用したハイドロゲルの設計、第 57 回高分子学会年次大会、2008/05/28、横浜市
24. 西下直希、森本佳孝、宮澤光博、平野義明、刺激応答性ペプチドハイドロゲルの設計とその応答特性の検討、第 57 回高分子学会年次大会、2008/05/28、横浜市
25. 紀村浩希、豊永一世、水沼 大、平野義明、架橋剤としての自己組織化ペプチドを用いたハイドロゲルの設計、第 24 回関西地区ペプチドセミナー、2007/12/08、大阪市
26. 田宮伸剛、橘 弥沙、平野義明、分岐型 β -シート構造を利用した自己組織化スキャホールドの設計、第 24 回関西地区ペプチドセミナー、2007/12/08、大阪市
27. 西下直希、森本佳孝、田畑泰彦、平野義明、ペプチドを用いた組織工学用足場の設計、第 24 回関西地区ペプチドセミナー、2007/12/08、大阪市
28. N. Nishishita, Y. Morimoto, Y. Hirano, Designed of Stimuli-Responsive β -Hairpin Peptides for Injectable Scaffold, 第 24 回関西地区ペプチドセミナー、2007/12/08、大阪市
29. N. Nishishita, Y. Morimoto, Y. Hirano, Designed of Stimuli-Responsive β -Hairpin Peptides for Injectable Scaffold, 1st Asian Biomaterials Congress, 2007/12/06-08, Tsukuba, Japan
30. 折口智哉、平野義明、城潤一郎、田畑泰彦、蛍光物質-酸化鉄ナノ粒子複合体を用いた腫瘍イメージング効率の向上、第 29 回日本バイオマテリアル学会大会、2007/11/26-27、吹田市
31. 西下直希、森本佳孝、田畑泰彦、平野義明、ペプチドを用いた機能性足場材料の設計、第 29 回日本バイオマテリアル学会大会、2007/11/26-27、吹田市
32. 西下直希、城潤一郎、山本雅哉、田畑泰彦、平野義明、遺伝子治療のための細胞接着性ペプチドを用いた遺伝子導入、第 44 回ペプチド討論会、2007/11/07-09、富山市
33. 岡 勝仁、寺岡真由美、川口拓也、平野義明、天然タンパク質の反復アミノ酸配列の特徴と原始タンパク質についての一つの仮説、第 44 回ペプチド討論会、2007/11/07-09、富山市
34. 川口拓也、片岡英樹、平野義明、岡 勝仁、poly(L-Pro-D-Pro)の合成とコンホメーション解析、第 44 回ペプチド討論会、2007/11/07-09、富山市
35. 西下直希、平野義明、宮澤光博、川口拓也、岡 勝仁、田畑泰彦、ペプチドファイバーを利用した人工細胞外マトリックスの構築、第 56 回高分子討論会、2007/09/21、名古屋市
36. 小寺宏美、木曾良明、西下直希、平野義明、野水基義、林 良雄、マレイミド化ポリ乳酸を用いた表面修飾可能な粒子の作製、第 56 回高分子討論会、2007/09/21、名古屋市
37. 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、ポリプロリンの会合様式の解析、第 56 回高分子討論会、2007/09/20、名古屋市
38. 片岡英樹、川口拓也、平野義明、岡 勝仁、L-Pro残基とD-Pro残基の反復からなるポリプロリンの合成とコンホメーション解析、第 56 回高分子討論会、2007/09/20、名古屋市
39. 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、プロリンリッチなブロックコポリペプチドの

- 水溶液系における超二次構造、第 56 回高分子討論会、2007/09/20、名古屋市
40. 岡 勝仁、寺岡真由美、川口拓也、平野義明、天然のタンパク質における反復アミノ酸配列の考察と分子進化仮説、第 56 回高分子討論会、2007/09/19、名古屋市
 41. 平野義明、生体吸収性材料と足場技術 (講演)、再生医療の実際を知るための夏季集中講座、2007/08/27、京都市
 42. N. Nishishita, Y. Hirano, Designing cell adhesion 3-D-materials used of self-assembly peptides, 234th American Chemical Society National Meeting & Exposition, 2007/08/19-23, Boston, MA
 43. Y. Hirano, N. Nishishita, Y. Morimoto, Evaluation of stimuli responsive de novo β -hairpin peptides, 234th American Chemical Society National Meeting & Exposition, 2007/08/19-23, Boston, MA
 44. 山本敬介、馬原 淳、平野義明、山岡哲二、In vitro 血管組織再生のための灌流型バイオリクター内遺伝子導入システム、日本バイオマテリアル学会 第 2 回関西若手研究発表会、2007/08/03、堺市
 45. 折口智哉、平野義明、城潤一郎、田畑泰彦、腫瘍イメージング効率向上のための蛍光物質-酸化鉄ナノ粒子複合体の作製、日本バイオマテリアル学会 第 2 回関西若手研究発表会、2007/08/03、堺市
 46. 西下直希、森本佳孝、平野義明、 β -シート構造を利用した刺激応答性ペプチドハイドロゲルの分子設計と機能評価、第 36 回医用高分子シンポジウム、2007/07/30-31、東京都
 47. 川口拓也、吉川知幸、岡 勝仁、平野義明、ポリプロリンの水中における二分子間会合様式の解析、第 53 回高分子研究発表会 (神戸)、2007/07/20、神戸市
 48. 片岡英樹、川口拓也、岡 勝仁、平野義明、Poly(L-Pro-D-Pro)のコンホメーション特性、第 53 回高分子研究発表会 (神戸)、2007/07/20、神戸市
 49. 東 晃至、中村友亮、橘 洋一、平野義明、山岡哲二、有機無機複合化多孔質スキャフォールドを用いた皮膚組織の再建、第 53 回高分子研究発表会 (神戸)、2007/07/20、神戸市
 50. 折口智哉、平野義明、城潤一郎、田畑泰彦、蛍光物質-酸化鉄ナノ粒子複合体による腫瘍イメージング効率の増強、第 53 回高分子研究発表会 (神戸)、2007/07/20、神戸市
 51. Y. Hirano, N. Nishishita, Y. Morimoto, M. Oka, Self-Assembly Peptide for Tissue Engineering Scaffold, International Conference on Materials for Advanced Technologies 2007, 2007/07/01-06, Singapore
 52. H. Kodera, N. Nishishita, Y. Hirano, Y. Kiso, Y. Hayashi, Synthesis of Poly l actides with Side Chain Functionality : Ring-Opening Polymerization of a Homobislactone Prepared from Lysine, 20th American Peptide Society Symposium, 2007/06/26-30, Canada
 53. 森本佳孝、西下直希、平野義明、自己組織化機能を有する刺激応答性ペプチドゲルの設計と機能評価、繊維学会、2007/06/22、東京都
 54. 井上幸子、飯田慶美、平野義明、田畑泰彦、細胞接着ペプチドRGDS固定化表面への脂肪前駆細胞の接着と伸展、第 56 回高分子学会年次大会、2007/05/31、京都市
 55. 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、 α -ヘアピン構造の構造特性、第 56 回高分子学会年次大会、2007/05/30、京都市
 56. 川口拓也、吉川知幸、平野義明、岡 勝仁、プロリンリッチなブロックコポリペプチドが形成する超二次構造の解析、第 56 回高分子学会年次大会、2007/05/30、京都市
 57. 川口拓也、寺岡真由美、平野義明、岡 勝仁、プロリン残基とバリン残基とアラニン残基からなるポリ (テトラペプチド)のコンホメーション解析、第 56 回高分子学会年次大会、2007/05/30、京都市
 58. 弓削光裕、片岡英樹、柿木佐知朗、平野義明、岡 勝仁、ポリプロリンの構造転移のエントロピー的考察、第 56 回高分子学会年次大会、2007/05/30、京都市
 59. 西下直希、森本佳孝、岡 勝仁、平野義明、刺激応答性ペプチドハイドロゲルの分子設計、第 56 回高分子学会年次大会、2007/05/30、京都市
 60. 山本敬介、馬原 淳、平野義明、山岡哲二、In vitro 血管組織再生のための灌流型バイオリクター内遺伝子導入システム、第 56 回高分子学会年次大会、2007/05/29、京都市
 61. 山本敬介、北川達哉、平野義明、山岡哲二、In vitro 血管組織再生のための灌流型バイオリクター内遺伝子導入システム、第 46 回日本生体医工学会大会、

2007/04/25-27、仙台市

〔図書〕(計 1 件)

1. 田畑泰彦 編、進みつづける細胞移植治療の実際(上巻)、株式会社メディカル・ドゥ、2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野義明(HIRANO YOSHIAKI)
関西大学・化学生命工学部・教授
研究者番号：80247874

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

藤井秀司(FUJII SYUJI)
大阪工業大学・工学部・講師
研究者番号：70434785

岡 勝仁(OKA MASAHITO)
大阪府立大学・総合教育研究機構・教授
研究者番号：70203966