

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2019～2022

課題番号：19KK0278

研究課題名（和文）組織再生の空間制御法に関する研究

研究課題名（英文）Strategy for spatially-controlled tissue regeneration

研究代表者

加藤 功一（Kato, Koichi）

広島大学・医系科学研究科（歯）・教授

研究者番号：50283875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：組織工学によって空間特異的な生体組織構造を再現するには、細胞の分化を方向付ける複数種類のタンパク質性因子を空間特異的に配置した足場材料を用いることが有効であるとの仮説に基づき、遺伝子組換えによって足場材料結合性ドメインを融合したタンパク質性因子の合成とその機能評価に取り組んだ。まず、高分子材料に親和性をもつペプチドを融合したタンパク質性因子と各種高分子表面との相互作用ならびにそのような表面が細胞に及ぼす影響について基礎的知見を得た。さらに、高分子溶融体を用いた3次元造形技術の導入に取り組み、生体分解性多孔質体を造形するさいの条件を最適化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本共同研究では、それぞれが有する技術を融合させ、組織再生過程の組織内における生物学的条件と構造的条件を最適化しようとするものであり、その成果は、ヘテロ構造をもつ組織の再生に新たな展望を生み出すものとなる。また、ヘテロ組織の再生技術は臨床的意義も大きい。例えば、重度の関節軟骨変性には軟骨の再生治療が効果的であると考えられている。しかしながら、とくに摺動面の潤滑に問題があり、関節としての機能の点で決して満足できる状況ではない。本研究が出发点となって、将来、顎関節軟骨の特徴である構造的・生化学的に異なる細胞層で構成されたゾーン構造が再現できるようになれば、その恩恵は計り知れない。

研究成果の概要（英文）：Based on the hypothesis that it would be effective to use scaffolds in which multiple types of protein factors that direct cell differentiation are incorporated in a spatially specific manner, to reproduce spatially specific biological tissue structures by tissue engineering, attempts were made to synthesize and functionally evaluate protein factors fused with a scaffold-binding peptide. As a result, we gained basic knowledge about the interactions between the protein factors and various polymeric surfaces, and the effects of such surfaces on mesenchymal stem cells. Furthermore, we tried to introduce 3D printing technology that uses polymer melts as a ink and optimized the conditions for 3-dimensionally printing biodegradable porous scaffolds.

研究分野：生体材料学

キーワード：組織工学 空間制御 細胞成長因子 キメラタンパク質 遺伝子組換え 3次元造形

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 「組織工学」研究分野における課題

1990年代初頭から、組織工学の研究分野が急速に発展した。組織工学は、損傷した生体組織を『細胞』『時間とともに生体内で分解吸収される足場材料』『細胞制御因子(細胞成長因子のようなタンパク質)』の3つの力を活用して修復する新たな治療技術である。近年では、人工皮膚のように、すでに臨床応用されている例もみられる。一方、2000年代に入って著しく進展した幹細胞生物学の知識や技術のおかげで、組織工学の可能性はさらに広がった。このような組織工学・再生医療の発展の中で、同研究分野における次の課題は、多くの天然組織・器官にみられるような秩序的な組織構造を創り出す方法を見出すことであろう。その実現には斬新なアイデアに基づくブレークスルーが必須である。

このような課題の解決は、臨床的な観点から極めて重要である。例えば、顎関節変性症の患者数は極めて多いが、関節軟骨は自然治癒力に乏しいことから、組織工学による組織修復技術の発展が強く望まれている。しかしながら、従来の組織工学的手法では、関節軟骨に求められる「摺動」という機能を回復させるのは困難であり、十分な治療効果は望めない。その原因は、関節軟骨が本来もっている傾斜的組織構造(表層から深層にかけて構築されるゾーン構造)を再現することが難しいためである。

### (2) 我々のそれまでの取り組み

研究代表者は、生体組織類似体を人工的に作製する方法の確立が組織工学分野における次の重要課題であると認識し、それを可能にする新技術の開発を進めてきた。そのための独自戦略として、足場材料 - 幹細胞からなる複合体内部で幹細胞の分化・組織形成を空間特異的に制御することが効果的であるとの仮説を立て、その実証研究を進めた。

とくに、間葉系幹細胞を細胞ソースとして、生体組織に類似した関節軟骨をどのように作り出すかという課題に取り組んできた。本研究開始時までに、間葉系幹細胞から軟骨表層部と深層部の生化学的性質(とくにコラーゲンの部位特異的な発現パターン)に類似した組織体構築のための培養方法の確立、そして、別々に作製した表層部/深層部類似体を合着させることによって軟骨表層部と軟骨深層部に類似した部位を一つの組織体中に配置することに成功した。しかしながら、天然の関節軟骨の表層部と深層部でみられる細胞の分布や細胞外マトリックスの特異性の差異を十分には再現することはできず、組織体構築方法の抜本的な改良が必要であることがわかった。

### (3) 関連する国内外の研究動向と我々の新たなアイデア

組織工学の手法を用いた関節軟骨の修復に関する研究分野では、以前より、天然の関節軟骨がもつゾーン構造を秩序正しく再構築するための有効な手段が必要であると認識され、その開発に複数の研究グループが挑んできた。それらの戦略は大きく分けて2つに分類される。

まずは、表層部と深層部の細胞外マトリックス成分の生化学的特徴を模倣した足場材料を用いる方法である。タイプの異なるコラーゲンや多糖類を足場材料の深さ方向に傾斜配置したハイドロゲルを用いた研究が複数みられる(例えば、**Reboredo JW, et al., Adv. Healthcare Mater. 5: 2192-8, 2016**)。一方、3次元プリンティング法や様々な多孔質材料作製法の発展に伴って、孔空形状を傾斜的に変化させた多孔質材料の利用が可能になってきた。これらを上手く利用して、ゾーン構造を創り出そうとする研究も近年注目されている(**Steele JAM, et al., Acta Biomaterialia 10: 2065-75, 2014**)。

以上のような研究の流れの中で、我々は、再生過程の組織内における生物学的条件(細胞成長因子の種類と分布)と構造的条件(空孔の形態と分布)の双方を最適化すれば、ゾーン構造の再

構築を一層高いレベルで実現できるのではないかと考えた。

#### (4) 課題解決に必要な基盤技術

上記の課題解決のためのアイデアを実現するには、次の3つの基盤要素が重要である。すなわち、①細胞分化制御能のあるタンパク質性因子を高分子表面に吸着させ、それを数週間にわたって徐々に放出させる技術、②生体分解性高分子を用いて、マイクロメートルオーダーで構造制御された多孔質足場材料を作製する技術、③多孔質足場材料の3次元空間内に複数の異なるタンパク質性因子を部位特異的に配置する技術である。

①を達成するには、タンパク質を高分子親和性ペプチドで修飾する技術が有効であると考えられるが、研究代表者は、それまでに、遺伝子組換え技術を駆使してタンパク質にペプチドが連結されたキメラタンパク質の設計に関して多くの経験を積んできた。

一方、②に関しては、様々な多孔質材料作製技術の中で、3次元プリンターを用いた造形技術が有効と考えられる。3次元プリンティングには様々な様式があるが、中でも、生体分解性高分子材料の微細構造制御を可能にするのは、エレクトロスピンニング(電界紡糸)法を併用しながら高分子融液をインクとして用いる3次元描画法が有効であると考えた。海外共同研究者は、同技術の開発において世界の第一人者であり、高分子融液直接描画装置の自作機を複数台保有するとともに、同技術の医療応用に強い関心をもつことから、国際共同研究パートナーとして最も相応しいと考えた。

本研究の主眼は、上記の①と②の技術を融合して③を達成することである。海外共同研究者は、本研究開始前の数年間、本研究代表者と研究内容に関して情報交換する中で、共同研究を通して互いの技術を融合すれば、③の達成が可能であり、その結果、空間特異的な組織再生技術の確立に一歩近づくと確信に至った。

## 2. 研究の目的

前述のように、再生過程の軟骨組織内における「生物学的条件」と「構造的条件」を最適化するには、次の3つに係る技術が必須である。すなわち、①細胞分化制御因子の高分子表面への担持、②生体分解性高分子からなる多孔質足場材料の作製、③足場材料内への細胞分化制御因子の部位特異的配置を可能にする技術である。

そこで本研究では、組織工学用足場材料として用いる多孔質材料の作製において、足場材料の多孔構造を空間特異的に精密に制御する技術と、幹細胞の分化制御に有効なタンパク質性因子を空間特異的に担持する技術とを融合することによって、3次元的に秩序ある組織形成を促ことが可能であるとの仮説に基づき、その実証研究を推進することを目的とした。とくに、足場材料の多孔質構造や、そこに担持される細胞分化制御因子の局所分布が、単一組織体内での異種組織の形成にどのように寄与するかを解明することが本研究における最も重要な問いであった。

具体的には、以下の課題に取り組むこととした。

① キメラタンパク質の合成と機能評価：間葉系幹細胞から各種の組織の作り分けに効果のあるタンパク質性因子に、遺伝子工学の手法を用いて高分子結合性ペプチドを融合する。これらのキメラタンパク質がポリカプロラクトン製多孔体に対して親和性があることを示す。

② 多孔質足場材料との複合化と評価：上記のキメラタンパク質を、ヘテロ多孔質構造をもつポリ(ε-カプロラクトン)製足場材料内に部位特異的に担持し、その内部で骨髄幹細胞を培養することによって、ヘテロ構造をもつ移植片を作製できることを示す。

しかしながら、本研究開始直後に新型コロナウイルス感染症が世界規模で拡がり、海外渡航ができなくなっただけではなく、海外共同研究機関では長期にわたって活動停止を余儀なくされた。その影響は本研究の終了時まで続いたため、海外共同研究者との研究交流を実質的に行うことはできなかった。そこで、**2020**年度から、研究の進め方を修正し、コロナ禍の様子を伺いながら、③キメラタンパク質の合成と機能評価、及び、④高分子溶融体を用いた3次元造形技術の導入について研究を進めることとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) キメラタンパク質の合成と機能評価

細胞培養基材や組織工学足場材料のように細胞の接着基質として使用される材料表面へのタンパク質の固定化に焦点を当て、タンパク質の構造を維持しながら、種々の高分子材料表面へタンパク質を安定に固定化するための方法について検討した。とくに本研究では、生理的環境下において高分子表面に親和性のあるペプチドモチーフを設計し、そのペプチドを遺伝子工学的手法によってタンパク質に融合することを試みた。このような融合タンパク質は、温和な条件下で高分子表面へ吸着することが期待された。

一般に合成高分子材料の表面は疎水性が高く、水中では塩化物イオン等の表面吸着によって負の表面電位をもつことが知られている。そこで、ペプチドモチーフを構成するアミノ酸として、疎水性アミノ酸であるロイシン (**L**) 及び塩基性アミノ酸であるリシン (**K**) に着目した。本研究では、**K** 及び **L** からなるジペプチド **KL** が 5 回繰り返されたペプチド **KLKLKLKLKL** (**KL5**) を設計し、**KL5** ペプチドのタンパク質固定用モチーフとしての特性を評価した。

まず、性状の異なる 3 種類のタンパク質 (**EGF**、**bFGF**、**SDF-1 $\alpha$** ) の **C** 末端に **KL5** を融合したキメラタンパク質を大腸菌を用いた遺伝子組換え法により作製した。それらの構造を **ab initio** 法によって予測するとともに、円二色性分光 (**CD**) 分析法によって実験的に調べた。また、**KL5** 融合タンパク質の高分子表面への吸着について表面プラズモン共鳴 (**SPR**) 分析法によって分析した。このとき、高分子にはポリスチレン (**PS**)、表面親水化 **PS** 及びポリカプロラクトン (**PCL**) のスピンコート薄膜を用いた。これらの実験結果をもとに、**KL5** の融合がタンパク質の立体構造及び高分子表面との相互作用に及ぼす影響について検討した。さらに、それらの結果、**KL5** は **EGF** と融合した場合にペプチドモチーフとしての効果をもっとも顕著であったことから、次に、**EGF-KL5** 融合タンパク質を表面固定したポリスチレン製組織培養プレート (**TCP**) 及び **PCL** フィルム上でヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (**hMSC**) を培養し、経時的に細胞数を測定した。

#### (2) 高分子溶融体を用いた 3 次元造形技術の導入

インク材料としてポリカプロラクトンと炭酸アパタイトからなる複合材料を合成した。一方、3 次元造形装置として、所属機関に導入されたセルインク社製 **BioX 3D Printer** を用いた。同装置に熱可塑性高分子の押し出しが可能な加熱型ノズルを装着し、ポリカプロラクトン-炭酸アパタイト複合体の 3 次元描画を試みた。種々の押し出し温度、吐出速度、走査速度等で描画を行い、3 次元描画の正確性について評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) キメラタンパク質の合成と機能評価

大腸菌発現系を用いることによって、**KL5** を融合した **FGF**、**bFGF**、及び **SDF-1 $\alpha$**  を作製することが可能であった。また同時に、**KL5** を含まない **FGF**、**bFGF**、及び **SDF-1 $\alpha$**  も調製し、コントロールとして実験に供した。

**ab initio** 法によるコンピュータシミュレーション及び **CD** 分析の結果、**KL5** の融合は、パートナーである **FGF**、**bFGF**、及び **SDF-1 $\alpha$**  の立体構造に大きな影響は与えないことがわかった。また、融合タンパク質の **KL5** 領域は、融合パートナーの種類によって、それぞれ  $\beta$  ストランド、コイル、 $\alpha$  ヘリックスのように異なる構造を取る傾向にあることがわかった。しかし、いずれの場合も **KL5** は融合タンパク質の外側に露出しており、高分子表面へのアクセシビリティの点で有利であることが示唆された。

**SPR** 分析法による吸着実験の結果をもとに、各融合タンパク質の高分子表面への吸着速度定数及び飽和吸着量を求めた。それらのデータを比較した結果、**KL5** による吸着促進効果はパートナータンパク質とポリマー表面の特性に影響されることが明らかになった。中でも酸性タンパク質である **EGF** では、塩基性タンパク質である **bFGF** 及び **SDF-1 $\alpha$**  に比べて、融合した **KL5**

のペプチドモチーフとしての効果が発揮されやすことが明らかとなった。また、その効果は、比較的極性の高い親水化 **PS** 及び **PCL** 表面で顕著であった。

**KL5** 融合 **EGF** を吸着させた **TCP** 及び **PCL** フィルムの表面で **hMSC** を培養した結果、未処理の表面及び **KL5** をもたない **EGF** が物理吸着した表面に

比べ、7日後の細胞数が有意に多かった。**KL5** を介して表面提示された **EGF** が細胞膜に発現する **EGF** 受容体を効果的に活性化し、それによって細胞増殖が促進されたものと思われる。

以上の結果から、**KL5** は、融合するタンパク質の物理化学的性質や基材となる高分子の表面性状を適切に選択することによって、ペプチドモチーフとしての効果を発揮するものと考えられ、細胞機能制御を目的とした高分子表面修飾に効果的であると結論した。

以上の研究成果を論文のまとめ公表した ( Nakano A, Hirata I, Pham BV, Shakya A, Tanimoto K, Kato K. Evaluation of a peptide motif designed for protein tethering to polymer surfaces. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 2021, 32:76–92 )。

## ( 2 ) 高分子溶融体を用いた 3 次元造形技術の導入

研究開始直後に海外共同研究者のグループを訪問し、同研究者らが開発した 3 次元造形装置を用いて、**PCL** からなるメッシュ状スキャホールドの作製を行った。これを日本に持ち帰り、タンパク質担持及び細胞培養試験に関する予備実験を開始した。その結果、細胞培養試験では、図 1 に示すように、スキャホールド上での **hMSC** の培養が可能であり、3 次元足場の微細構造が細胞接着・増殖・分化もたらす影響について検討を開始することができた。しかしながら、その後、新型コロナウイルス感染症拡大の影響を受けて、実質的な共同研究が困難となった。

そこで、海外共同研究者らが保有する技術に類似した 3 次元造形技術を我々の研究室に導入することとした。すなわち、海外共同研究者らの手法である高分子溶融体を用いた 3 次元描画法を採用して **PCL** 炭酸アパタイト複合体からなる多孔質体の作製を試みた。3 次元描画装置は所属機関が保有する熱溶解積層方式の装置を用いた ( 図 2a )。多孔質体の構成要素となる微細ストラットの形状制御について造形条件の最適化を行うことができた ( 図 2b )。

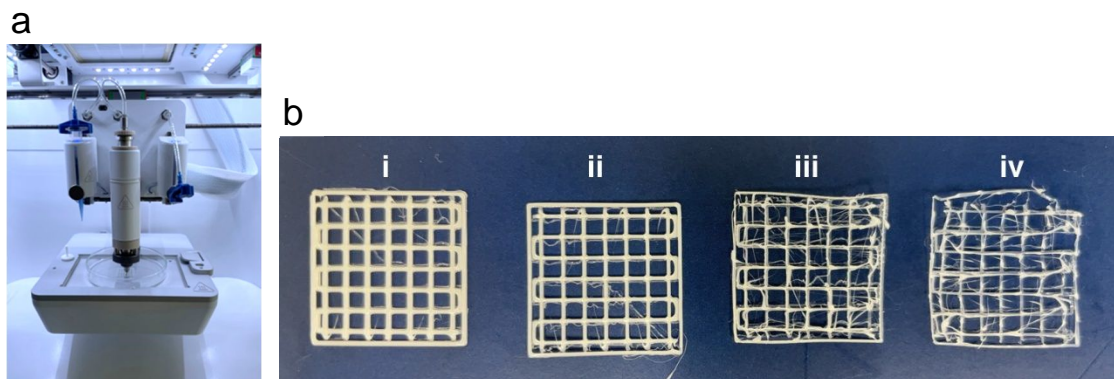


図 2 . ( a ) 熱可塑性高分子の押出しが可能な加熱型ノズルを装着した **BioX 3D Printer** (セルインク社製) . ( b ) ポリカプロラクトン-炭酸アパタイト複合体の 3 次元描画の例 . 走査速度 ( mm/s ) : ( i ) 1 , ( ii ) 2 , ( iii ) 3 , ( iv ) 4 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Ayana Nakano, Isao Hirata, Binh Vinh Pham, Ajay Shakya, Kotaro Tanimoto, Koichi Kato | 4. 巻<br>32          |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of a peptide motif designed for protein tethering to polymer surfaces    | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>J. Biomater. Sci., Polym. Ed.  | 6. 最初と最後の頁<br>76-92 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1080/09205063.2020.1816870                                       | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する        |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Ayana Nakano, Koichi Kato  | 4. 巻<br>20          |
| 2. 論文標題<br>Recombinant protein synthesis for nanomaterial assembly: Technical overview | 5. 発行年<br>2022年     |
| 3. 雑誌名<br>Bull. Soc. Nano Sci. Technol.  | 6. 最初と最後の頁<br>31-37 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ayana Nakano, Isao Hirata, Binh Vinh Pham, Ajay Shakya, Kotaro Tanimoto, Koichi Kato |
| 2. 発表標題<br>A peptide motif for creating bioactive polymer surfaces                              |
| 3. 学会等名<br>8th Japan-China Symposium on Nanomedicine（招待講演）（国際学会）                                |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ayana Nakano, Isao Hirata, Binh Vinh Pham, Ajay Shakya, Kotaro Tanimoto, Koichi Kato |
| 2. 発表標題<br>Tandem repeats of lysine and leucine as a peptide tag for protein immobilization     |
| 3. 学会等名<br>6th Joint Scientific Meeting in Dentistry（国際学会）                                      |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Koichi Kato  |
| 2. 発表標題<br>Bioengineering challenges toward regenerative dentistry          |
| 3. 学会等名<br>6th Dental Materials Conference and Exhibition, Indonesia (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Koichi Kato   |
| 2. 発表標題<br>Bioinspired surfaces designed for stem cell expansion                 |
| 3. 学会等名<br>European Materials Research Society 2023 Spring Meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計1件

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Ayana Nakano, Koichi Kato   | 4. 発行年<br>2023年 |
| 2. 出版社<br>Springer  | 5. 総ページ数<br>895 |
| 3. 書名<br>Nanomedicine, Chapter 16 Regenerative nanotechnology: Engineered surfaces for stem cell production (pp. 605-522) |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|-----------|---|---|----|
| 研究<br>分担者 | 谷本 幸太郎<br><br>(Tanimoto Kotaro)<br><br>(20322240) | 広島大学・医系科学研究科(歯)・教授<br><br><br><br>(15401) |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 平田 伊佐雄<br><br>(Hirata Isao)<br><br>(40346507) | 広島大学・医系科学研究科(歯)・助教<br><br><br><br>(15401) |    |
| 研究分担者 | 吉見 友希<br><br>(Yoshimi Yuki)<br><br>(50707081) | 広島大学・病院(歯)・病院助教<br><br><br><br>(15401)    |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関                             |  |  |  |
|---------|-------------------------------------|--|--|--|
| ドイツ     | University Hospital of<br>Wuerzburg |  |  |  |