

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05227

研究課題名(和文) 骨再生マテリアル創出のための『ペプチド-高分子』コンビナトリアル探索研究

研究課題名(英文) "Peptide-polymer" combinatorial screening research for the creation of bone regeneration materials

研究代表者

蟹江 慧 (Kanie, Kei)

近畿大学・工学部・准教授

研究者番号：80636407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞の増殖・分化をコントロール(細胞選択性)する、骨再生マテリアルに適した材料開発を最終目標とする。医療材料表面で表したい細胞選択性は、土台である高分子材料と機能性分子(ペプチド)の組合せによる総合的な効果で決まると考えられる。しかし、高分子材料やペプチドは種類や配合比、濃度だけでも無数に考えられ、総当たりで設計しては非効率である。本研究では、高分子材料とペプチドの物性値計測をし、情報処理解析技術やコンビナトリアル技術を用い、ハイブリッド骨再生マテリアルの創出を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請の基盤的要素の研究動向として、ポリマーマイクロアレイとインフォマティクスを用いた最適なバイオマテリアル探索の報告がある(Acta Biomater. 1:34:60-72.2016)。しかし、これらは高分子材料そのものの特性しか調べられておらず、ペプチドのような機能性分子の組合せに関しては論じられておらず、学術的な意義が高い。

また、応用的要素の動向として、i-FACTORと呼ばれるペプチド入り骨セメントが開発されているが、使用ペプチドは15残基の細胞接着ペプチドである。本研究が目指す9残基以下の骨再生ペプチドの効果が得られれば、製品開発としての実現性も十分に考えられる。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this research is to develop materials suitable for bone regeneration that controls cell proliferation and differentiation (cell selectivity). The cell selectivity desired to be expressed on the surface of medical material is considered to be determined by the overall effect of the combination of the base polymer material and functional molecules (peptides). However, there are many types, compounding ratios, and concentrations of polymer materials and peptides, and designing them in a comprehensive manner is inefficient. In this research, we aim to create a hybrid bone regeneration material by measuring the physical properties of polymer materials and peptides and using information processing analysis technology and combinatorial technology.

研究分野：生物工学

キーワード：骨再生 ペプチド ロボティクス 高分子 インフォマティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

事故や病気によって生じた骨欠損には、医師が、自家骨、他家骨、人工骨の中から材料を選択し、骨移植術を行う。骨移植に使用される人工骨の課題には、「骨伝導能(周辺骨と融合し一体化する能力)」と「骨誘導能(自らが骨を形成できる能力)」がある。近年、ハイドロキシアパタイトや β 型リン酸カルシウムの利用により、骨伝導能が大幅に改善され、1980年にはほぼ自家骨の骨移植が、現在では、人工骨が50-55%程度選択されている。しかしながら、未だ「骨誘導能」を持つ人工骨はない。また、異物が残り続けることで生体内にて常に炎症反応を起こし続け、感染症などが引き起こされる可能性がある(Eur Spine J. 2004;13:S89.)。このため、新規骨再生マテリアルの開発には、生分解性の合成高分子材料と、高分子材料高機能化のための骨再生能力を付与させる設計が必要である。

生分解性高分子に機能化分子をハイブリッドさせた、骨再生マテリアルの開発には2つの課題が存在する。一つは『どのような機能分子を高分子材料に配合させるか』ともう一つは『どの様に組み合わせを行うか』である。

前者では、骨再生機能分子の中でも有名なものに、骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein: BMP)があり、米国ではBMP-2がFDAの認証を取得し、整形外科領域では臨床応用が進んでいる。しかし、BMPを高濃度で生体に曝露すると、炎症反応や浮腫、異所性骨化などの合併症を誘発する安全性リスクの問題が報告されている。また一般的にタンパク質合成はペプチドなどの低分子合成と比べ、コストや純度が問題とされることが多い。そこで、本研究では、タンパク質の機能部位を利用したペプチドを機能分子のターゲットとする。人工骨の欠点である『骨誘導能』を補い、BMPの『安定供給』や『コスト』の課題をクリアするペプチドの取得が望まれる。

後者では、高分子材料の高機能化によるハイブリッドマテリアルの設計には、高分子材料の種類や配合率、機能分子の数が無数に存在し、その「組み合わせ」は膨大となり、試行錯誤に頼らざるを得ないという問題がある。つまり、体系的かつより効率的な組合せ検証を行い、最適なハイブリッドマテリアルを創出できるかが課題である。本研究では、課題の効率化に向けて、①情報処理解析と②コンビナトリアルの2つの技術を駆使し、骨再生マテリアルの創出を目指す。①ではペプチドと高分子の物性値情報を使用し、最適なマテリアル設計を行い、②ではロボット分注機を用いペプチドの濃度系列や組合せ、実験の安定化を目指す。

ペプチドと高分子の両方に着目した物性解析によるマテリアル設計の例はほとんどなく、学術的に新規の観点に基づく網羅的な解析であり、バイオマテリアル分野においても新規性が高い。また、バイオマテリアル分野において実験そのものの安定性に着目し、効率化を求める研究例はほとんどなく、学術の基盤を担う研究となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、細胞の増殖・分化をコントロール(細胞選択性)する、骨再生マテリアルに適した材料開発を最終目標とする。医療材料表面で表したい細胞選択性は、土台である高分子材料と機能性分子(ペプチド)の組合せによる総合的な効果で決まると考えられる。しかし、高分子材料やペプチドは種類や配合比、濃度だけでも無数に考えられ、総当たりで設計しては非効率である。本研究では、高分子材料とペプチドの物性値計測をし、情報処理解析技術やコンビナトリアル技術を用い、ハイブリッド骨再生マテリアルの創出を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、高分子材料とペプチドの物性値計測をし、情報処理解析技術やコンビナトリアル技術を用いることで、ハイブリッド骨再生マテリアルの創出を目指す。具体的に以下の5点を明らかにするため、5つの計画とした。

計画1. 骨再生関連タンパク質の配列情報解析(2020年度前半)

骨再生に関与する、ECMタンパク質、サイトカインタンパク質をデータベース(UniProt)から約100種類抽出し、相同配列検索、物性値類似解析を行い、スクリーニングを行う候補ペプチドを約1000種類抽出する。得られたペプチド配列から、クラスター解析により類似物性を有するペプチド配列を排除し、候補ペプチドをさらに約100種類程度に絞り込む。

計画2. 骨再生ペプチドのスクリーニングと物性値取得(2020年度前半～後半)

3残基、6残基配列の骨再生ペプチドのスクリーニングをペプチドアレイ上で行う。細胞選択性としては、骨再生能に関わる骨芽細胞は増やし、骨吸収能に関わる破骨細胞は増やさないことを目標とする。得られたスクリーニング結果からインフォマティクスを利用した骨再生ペプチドのルール化を行う。

計画3. 生分解性高分子の作製と物性値情報解析(2020年度後半～2021年度前半)

医療材料に使用可能な高分子材料の種類を増やすため、合成高分子(ポリカプロラクトン(PCL)、ポリ乳酸(PDLLA)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)など)を10数種類用い、シート状に作製する。さらに高分子材料の表面物性(接触角、ゼータ電位、粘弾性など)を測定し、骨分化誘導と物性値の関係をルール化する。

計画4. 『ペプチド-高分子』ハイブリッドマテリアルの創出(2021年度前半～2022年度前半)

ペプチド、高分子材料と分化誘導能とのルールを統合し、ハイブリッド骨再生マテリアルを作製する。高分子材料にペプチドを修飾する際の濃度や組合せの検証は、ロボット分注機を用い、効率化を図る。作製したマテリアル上にて培養細胞を用いた *in vitro* 試験を行う。

計画5. 医師の操作性検証および動物実験(2022年度前半～後半)

作製した骨再生マテリアルに対し医師の操作性の確認を含めた、動物試験(ラット)を行う。

4. 研究成果

計画1. 骨再生関連タンパク質の配列情報解析(2020年度前半)

骨再生に関与する、ECMタンパク質、サイトカインタンパク質をデータベース(UniProt)から約100種類抽出し、相同配列検索、物性値類似解析を行い、クラスター分析により候補ペプチドを約100種類程度に絞り込むことができた。

計画2. 骨再生ペプチドのスクリーニングと物性値取得(2020年度前半～後半)

3残基、6残基配列の骨再生ペプチドのスクリーニングをペプチドアレイ上で実施した。間葉系幹細胞を用い、ALP活性測定、アリザリン染色を行うことで、短残基ペプチドにおいても、骨再生能が高い可能性を示すことができた。また、歯髄幹細胞を用いたスクリーニングを行うことで、骨再生に関与するペプチドを取得することにも成功している。

計画3. 生分解性高分子の作製と物性値情報解析(2020年度後半～2021年度前半)

医療材料に使用可能な高分子材料の種類を増やすため、種々の高分子材料に対してペプチドの効果の検証をおこなった。その結果、高分子材料だけではなく、無機材料の関与も重要な要因となっていることが分かった。

計画4. 『ペプチド-高分子』ハイブリッドマテリアルの創出(2021年度前半～2022年度前半)

高分子材料にペプチドを修飾する際の濃度や組合せの検証は、ロボット分注機を用い、効率化を図った。本期間においては、高分子材料として培養細胞に使用しているポリスチレン素材上にて、ペプチド配列の組み合わせ検証を実施した。その結果、骨芽細胞において、ペプチドの組み合わせによって、細胞接着力の効果が向上するものや、低下するものが見られた。また、ある高機能なペプチド配列においても、周りの物性が異なるペプチドを配置することで、その効果が向上する場合や、低下する場合があることが分かった。これは、周囲にどのようなアミノ酸があるかによって、機能が左右されることを意味しており、ペプチドを今後医療材料開発に応用するにあたり、大きな設計指針になると考えている。

計画 5. 医師の操作性検証および動物実験(2022 年度前半～後半)

作製した骨再生マテリアルに対し医師の操作性の確認を含めた、動物試験を実施し、組織学的評価を行った。その結果、骨再生ペプチドによって、骨再生が促進されていることが示唆された。また、新規取得した骨再生ペプチドを用い、ラットによる歯髄の再生効果を検証した結果、あるペプチド配列において骨再生の効果を示すことが示された。

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 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okamoto Motoki, Matsumoto Sayako, Sugiyama Ayato, Kanie Kei, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Ali Manahil, Ito Yuki, Miura Jiro, Hirose Yujiro, Uto Koichiro, Ebara Mitsuhiro, Kato Ryuji, Yamawaki-Ogata Aika, Narita Yuji, Kawabata Shigetada, Takahashi Yusuke, Hayashi Mikako	4. 巻 12
2. 論文標題 Performance of a Biodegradable Composite with Hydroxyapatite as a Scaffold in Pulp Tissue Repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 937 ~ 937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym12040937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe M., Okamoto M., Komichi S., Huang H., Matsumoto S., Moriyama K., Ohshima J., Abe S., Morita M., Ali M., Takebe K., Kozaki I., Fujimoto A., Kanie K., Kato R., Uto K., Ebara M., Yamawaki-Ogata A., Narita Y., Takahashi Y., Hayashi M.	4. 巻 102
2. 論文標題 Novel Functional Peptide for Next-Generation Vital Pulp Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 322 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345221135766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 1件／うち国際学会 8件）

1. 発表者名 杉山亜矢斗・蟹江慧・霜古田一優・宇都甲一郎・荏原充宏・緒方藍歌・成田裕司・加藤竜司
2. 発表標題 ペプチド・高分子ハイブリッド型再生促進材料開発に向けた基盤技術開発
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のオンラインセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayato Sugiyama, Kei Kanie, Kazumasa Shimofuruta, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Aika Ogata, Yuji Narita, Ryuji Kato
2. 発表標題 Effect of Immobilized Peptide Atmosphere on Cell Adhesion
3. 学会等名 YABEC2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山亜矢斗・蟹江慧・霜古田一優・宇都甲一郎・荏原充宏・緒方藍歌・成田裕司・加藤竜司
2. 発表標題 「ペプチド・高分子」ハイブリッドマテリアルのための組合せ効果検証
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会、第8回アジアバイオマテリアル学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本瑛代、蟹江慧、緒方藍歌、宇都甲一郎、荏原充宏、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 「短鎖機能性ペプチドの効果に及ぼすタグペプチドのコンピナトリアル検証」
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 第二回オンラインセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本瑛代、蟹江慧、緒方藍歌、宇都甲一郎、荏原充宏、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 細胞接着ペプチドの機能性にもたらす物性リンカーの評価
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第33回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山亜矢斗・蟹江慧・宇都甲一郎・荏原充宏・緒方藍歌・成田裕司・加藤竜司
2. 発表標題 細胞培養最適化のためのペプチド-培養基材の相互作用効果の分析
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第33回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akiyo Fujimoto, Kei Kanie, Aika Ogata, Yuji Narita, Ryuji Kato
2. 発表標題 Combinatorial Analysis of Linker-Effect on Short Cell-adhesion Peptides
3. 学会等名 JAACT2020 Fuchu (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayato Sugiyama, Kei Kanie, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Aika Ogata, Yuji Narita, Ryuji Kato
2. 発表標題 Development of tissue adhesion barrier sheet functionalized with cell-selective adhesion peptides
3. 学会等名 JAACT2020 Fuchu (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本瑛代、蟹江慧、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 組織再生促進のための細胞選択的接着ペプチド分子デザイン
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山亜矢斗・蟹江慧・緒方藍歌・宇都甲一郎・荏原充宏・成田裕司・加藤竜司
2. 発表標題 組織再生のためのペプチド分子と合成高分子とのハイブリッド化検証
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山亜矢斗、蟹江慧、加藤竜司
2. 発表標題 実験オートメーションを導入した細胞接着材料表面の評価系構築
3. 学会等名 第10回 超異分野学会 本大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本瑛代、竹本悠人、蟹江慧、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 短鎖機能性ペプチドに対する物性リンカー導入効果の検証
3. 学会等名 化学工学会 第86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山亜矢斗、蟹江慧、霜古田一優、宇都甲一郎、荏原充宏、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 生体分子-高分子の組合せ効果検証のためのハイスループット細胞アッセイ系の構築
3. 学会等名 化学工学会 第86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 霜古田一優、蟹江慧、杉山亜矢斗、原光生、宇都甲一郎、荏原充宏、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 細胞制御表面改質のためのハイスループット細胞アッセイ系の構築
3. 学会等名 シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 霜古田一優、蟹江慧、杉山亜矢斗、原光生、宇都甲一郎、荏原充宏、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 細胞制御表面改質のためのハイスループット細胞アッセイ系の構築
3. 学会等名 化学工学会 第86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蟹江慧
2. 発表標題 生体・合成高分子材料の高機能化のためのプラズマ処理によるアミノ基付加検討
3. 学会等名 名古屋大学共同利用・共同研究拠点 低温プラズマ科学研究センターバイオシステム科学部門研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蟹江慧
2. 発表標題 生体模倣ペプチドの網羅探索によるハイパーフレキシブル骨再生マテリアルの開発研究
3. 学会等名 令和2年度 第2回メドテックマッチング 革新的技術が変えるこれからの医療：若手研究者によるオープンイノベーション
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayato Sugiyama, Kei Kanie, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Aika Ogata, Yuji Narita, Ryuji Kato
2. 発表標題 High-content image-based profiling for evaluating the effect of peptide coating effect on medical devices
3. 学会等名 7th world congress of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2022(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akiyo Fujimoto, Kei Kanie, Aika Ogata, Yuji Narita, Ryuji Kato
2. 発表標題 Peptide array Peptide functionalization, Cell-selective adhesion
3. 学会等名 7th world congress of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2022(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山亜矢斗、蟹江慧、加藤竜司
2. 発表標題 骨再生を促進する短鎖ペプチド界面設計の網羅検証
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayato Sugiyama, Kei Kanie, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Aika Ogata, Yuji Narita, Ryuji Kato
2. 発表標題 High-content image-based profiling for evaluating the effect of peptide coating effect on medical devices
3. 学会等名 Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC 2022)(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayato Sugiyama, Kei Kanie, Aika Ogata, Yuji Narita, Ryuji Kato
2. 発表標題 High-content image-based profiling for evaluating the effect of peptide coating effect on medical devices
3. 学会等名 GTR Annual Meeting 2022
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤本瑛代、蟹江慧、緒方藍歌、成田裕司、加藤竜司
2. 発表標題 Influence of C-terminal Linker priority for Cell Adhesion
3. 学会等名 GTR Annual Meeting 2022
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山亜矢斗・蟹江慧・宇都甲一郎・荏原充宏・緒方藍歌・成田裕司・加藤竜司
2. 発表標題 骨再生促進のための短鎖ペプチドを用いた移植材料界面設計
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayato Sugiyama, Kei Kanie, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Aika Ogata, Yuji Narita, Ryuji Kato
2. 発表標題 Development of tissue adhesion barrier sheet functionalized with cell-selective adhesion peptides
3. 学会等名 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Meeting 2023(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akiyo Fujimoto, Kei Kanie, Aika, Ogata, Yuji Narita, Ryuji Kato
2. 発表標題 Combinatorial analysis of tag peptides for enhancement of cell adhesion peptides
3. 学会等名 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Meeting 2023(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉山 亜矢斗・藤本 瑛代・蟹江 慧・加藤 竜司	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 500
3. 書名 マテリアルズインフォマティクスのためのデータ作成とその解析、応用事例	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Protein S100由来のアミノ酸配列からなる新規ペプチドを用いた覆髄材	発明者 蟹江慧、加藤竜司、 成田裕司、緒方藍 歌、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、WUS0002119(学内番号)	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	成田 裕司 (Narita Yuji) (60378221)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	緒方 藍歌 (Ogata Aika) (70718311)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	
研究分担者	宇都 甲一郎 (Uto Koichiro) (30597034)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク トニクス研究拠点・独立研究者 (82108)	
研究分担者	加藤 竜司 (Kato Ryuji) (50377884)	名古屋大学・創薬科学研究科・准教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 雄介 (Takahashi Yusuke)		
研究協力者	岡本 基岐 (Okamoto Motoki)		
研究協力者	渡邊 昌克 (Watanabe Masakatsu)		

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