

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：33708

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22507

研究課題名（和文）血管内皮前駆細胞を効率的に捕捉する内皮誘導足場表面の設計と開発

研究課題名（英文）Design and development of artificial scaffolds capturing vascular endothelial progenitor cells with high efficiency for accelerating endothelialization

研究代表者

磯野 蒼 (Isono, Aoi)

岐阜医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：50880481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：小口径人工血管の開発では、植え込み後の内壁における速やかな内皮化が課題となっている。本研究では、ガラス表面にpoly(glycidyl methacrylate) (pGMA) からなる高分子ブラシ層を作成し、それを血管内皮細胞表面に発現するインテグリン 4 1の結合リガンドであるArg-Glu-Asp-Val (REDV) 配列を含むペプチドで修飾した。ヒト不死化臍帯静脈血管内皮細胞 (HUEhT-1) 細胞を用いた接着実験では、ペプチド修飾表面における接着促進効果が認められ、REDV修飾pGMAが血管内皮細胞の人工足場として機能することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

6 mm以下の小口径人工血管は、生体内に移植後の長期開存率が不良であるため、自己移植血管以上に優れるものは存在せず、侵襲的な方法がとられてきた。このような背景から小口径人工血管の開発は医療現場や患者から切望されている。

本研究で内皮化を促進するために作成したREDV修飾pGMAは内皮細胞足場として効果的に機能することが示唆された。この足場は生体由来材料を必要とせず、また様々な材料表面に合成可能であることから、新たな人工血管材料として応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The development of small-diameter vascular grafts with rapid endothelialization of the inner wall has been highly demanded. In this study, we synthesized poly (glycidyl methacrylate) (pGMA) brushes on a glass substrate to use as an interface for immobilizing REDV peptide, a ligand for integrin 4 1 which is expressed in abundance by endothelial cells, and examined the functionality as artificial scaffolds for endothelialization. Immortalized human umbilical vein endothelial cell line (HUEhT-1) was used for the cell adhesion test. The results showed that the REDV peptide-immobilized pGMA brush surface significantly promoted the HUEhT-1 adhesion as compared with substrates without REDV peptide, indicating that the REDV peptide immobilized in pGMA brushes was effectively recognized by HUEhT-1 and the surface acted as an artificial scaffold for endothelial cell adhesion.

研究分野：ペプチド化学、高分子合成

キーワード：内皮化 細胞接着性ペプチド 細胞足場 セルインプリント

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管置換術やバイパス手術は、血管外科において一般的な術式となっている。そのうち、小口径人工血管(6 mm 以下)の長期開存率は不良なため、特に、四肢末梢や冠動脈などの直径 2-5 mm の血管に対しては、一般的に、自己移植血管が適用される。自己移植血管の使用は、長さや質、および患者の既往歴により、その選択が困難なことも多く、また、グラフト採取の手術リスクおよび手術侵襲による患者の負担を増大させる。このような背景から、小口径人工血管の開発に対する医療現場や患者の期待は大きい。

小口径人工血管の課題は、植え込み後、内壁における速やかな血管内皮細胞による完全被覆(内皮化)である。人工血管内壁での内皮化は、人工血管両端吻合部からの正常血管内皮細胞の遊走、および、血液中に循環する血管内皮前駆細胞の接着によって進行すると考えられ、一定の長さがある場合、その機構も重要である。そこで、小口径人工血管開発の基盤研究として、それらの機能を発現する人工材料表面の開発を目指し、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血管内皮細胞を効率よく、捕捉、接着する人工材料表面の設計と開発である。そのような表面開発の設計戦略として、本研究では、血管内皮細胞表面に発現するインテグリン $\alpha_4\beta_1$ の結合リガンドである Arg-Glu-Asp-Val (REDV) 配列に注目した。¹ これまでに、REDV 配列を含むペプチドを固定化した材料表面において、血管内皮細胞の接着が促進されることが報告されている。² そこで、人工材料表面に、この REDV ペプチド固定化するために、本研究では、高分子ブラシを人工材料とペプチドとのインターフェイスに利用した。高分子ブラシは、高分子鎖の片末端が材料表面に結合した、高密度の高分子鎖層(高分子ブラシ)であり、親水性高分子からなる高分子ブラシは、高い排除体積効果による生体成分の非特異的吸着を抑制するのに効果的である。また、高分子ブラシは各種材料表面に合成可能であり、人工血管のような柔軟性素材表面に作成しても、高分子鎖と基板との結合点は一点のみであるため、材料の変形に対してブラシ層の剥離が起きにくいと考えられる。本研究では、poly(glycidyl methacrylate) (pGMA) の高分子ブラシの利用を検討した。pGMA のグリシジル基は、アミノ基のような求核性官能基と容易に反応するため、ペプチド固定化に有利であり、また、未反応のグリシジル基は加水分解により親水性を示すことから、親水性の高分子ブラシ表面に REDV ペプチドを固定化した表面が構築可能と考えた。

3. 研究の方法

(1) ガラス基板の表面修飾

ペプチド修飾表面構築のためのガラス基板の修飾スキームを図 1 に示す。

ガラス基板表面での pGMA ブラシの合成

pGMA 高分子ブラシは、以下の手順に従い、ガラス基板上から glycidyl methacrylate (GMA) の原子移動ラジカル重合(ATRP)により合成した。

3-(2-bromoisobutyramido)propyl(trimethoxy)silane (BrTMOS) を既報の方法に従い合成し³、ガラス表面に ATRP 開始剤を導入するための修飾剤として用いた。基板には、カルチャーカバークラス(直径 13 mm, 松浪硝子工業株)表面をエタノール中および水中でそれぞれ、10 分間超音波洗浄(28 Hz)後、エタノールで表面を洗い流したものを減圧乾燥して用いた。十分乾燥させたものを、ソフトプラズマエッチング装置(SEDE-GE, メイワフォーシス株)にて、3 分間酸素プラズマ(17 Pa, 10 mA)処理し、表面に水酸基を導入したのち、8 mM となるように BrTOMS を加えたジクロロメタン中で、一晚反応させ、ARTP 開始剤修飾ガラス基板を調製した。

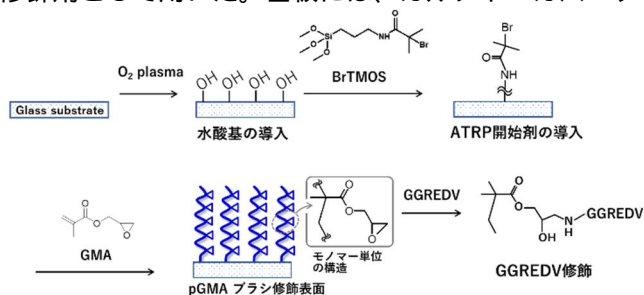


図 1 REDV ペプチド修飾表面合成のスキーム

溶媒に DMF:H₂O=9:1 (v/v) を用い、[GMA(1.5M)]:[CuBr]:[CuBr₂]:[2,2'-bipyridyl] となるように調製しモノマー溶液を凍結脱気処理後、ARTP 開始剤修飾ガラス基板を設置した別のガラス容器に移し、窒素環境下、40°Cにて、15 時間 ATRP を実施した。反応後、DMF 中で 3 分間超音波洗浄(100 kHz)、DMF 中で 3 時間攪拌し、未反応物を溶出させ、pGMA ブラシ修飾ガラス基板を合成した。

pGMA ブラシの REDV ペプチド修飾

REDV 配列を含む GGREDV ペプチド(以下、REDV ペプチドとする)を Fmoc 固相合成により合成した。0.6 mg/mL の REDV ペプチド DMF 溶液中で、pGMA ブラシ修飾ガラス基板を攪拌下、室温にて、一晚反応させ、ペプチド修飾を実施した。

(2) 表面親水性の評価

基板表面の親水性は、自動接触角計 (SImage AUTO100, Excimer Inc.) により評価した。

(3) 細胞培養実験

ペプチド修飾表面での細胞接着実験は、ヒト不死化臍帯静脈血管内皮細胞 (HUEhT-1) の接着性を評価した。

HUEhT-1 は、10% FBS、0.03 g/L endothelial cell growth supplement (ECGS)、5 µg/mL ヘパリンナトリウム、10 mM L-グルタミンを添加した MCDB 培地で、5% CO₂ 存在下 37 °C で培養した。2 日ごとに培地交換を行い、約 4 日ごとに、継代した。培養した細胞 (3×10⁴ cells/well) を未処理、pGMA ブラシ修飾、REDV ペプチド修飾ガラス基板を入れた 24 穴プレートに播種した。24 時間培養後、培地、HBSS(-) でそれぞれ洗浄した後、Hoechst 33342 (1.0 µg/mL) 含有 HBSS(-) で 10 分間インキュベートした。HBSS(-) で 3 回洗浄した後、蛍光顕微鏡 (BZ-X800, (株) キーエンス) で観察して細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) pGMA ポリマーブラシ修飾

表面修飾に伴うガラス基板の表面親水性の変化を図 2 示す。酸素プラズマ処理後ガラス表面は拡張ぬれの挙動を示し、水接触角の測定はできなかった。これは、酸素プラズマ処理によるガラス基板表面のシラノール基の密度増大によるものである。次に、ATRP 開始剤修飾に伴い、水接触角は約 71° まで増大した。この変化は、ガラス基板表面が BrTMOS の自己組織化膜で覆われ、ガラス基板表面に ATRP 開始剤が高密度で導入されたことを示唆するものである。また、pGMA ブラシで修飾することにより、水接触角は約 50° となり、これらの表面親水性の変化から、図 1 に示したスキームで pGMA ブラシ修飾が達成できていることが確認できた。

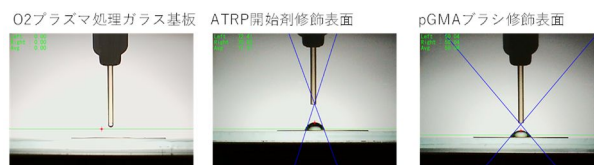


図 2 表面修飾に伴う基板表面の水接触角の変化

pGMA ブラシに REDV ペプチド修飾した試料について、HUEhT-1 を用いた細胞接着性の評価を行った。図 3 は、24 時間培養後、未接着細胞を洗い流した後の接着細胞を観察した結果を、比較の目的で、未修飾ガラスおよび pGMA ブラシ修飾表面のものとともに示したものである。いずれの表面においても一定数の接着細胞は認められ、また、接着形態についても明らかな差異は認められなかった。図 4 は、単位面積当たりの細胞接着数を計測し比較したものである。REDV ペプチド修飾表面では、他の表面と比較して約 2 倍の接着密度が明らかとなり、REDV ペプチド修飾表面において、細胞接着が有意に促進されていることが示された。

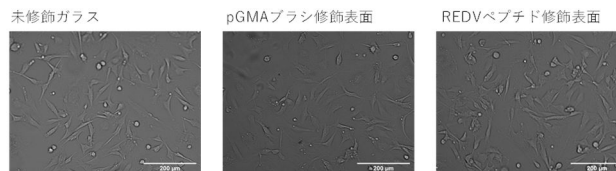


図 3 各基板表面での接着 HUEhT-1 の顕微鏡画像

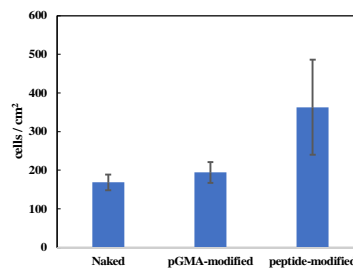


図 4 接着細胞数の比較

図 3 および図 4 より、今回、HUEhT-1 培養の推奨培地を使用した接着実験を実施しており、その結果、培地中の成分が表面に吸着することで接着の足場として作用している可能性が示唆された。その中で、REDV ペプチド修飾表面では、明らかな細胞接着促進効果が認められ、これは、pGMA ブラシに導入した REDV ペプチドが HUEhT-1 の足場として機能していることを示唆している。

以上より、今回合成した REDV ペプチド修飾 pGMA ブラシが内皮細胞の足場として効果的に機能することを明らかにすることができた。一方、今回、REDV ペプチド修飾 pGMA ブラシによる細胞接着促進が、内皮細胞特異であるかは確認することができなかった。また、今回の細胞接着促進効果が人工血管への応用を考えたときに、十分なものなのか今後検証が必要である。それら追加の検討結果も踏まえ、本知見を血管内皮前駆細胞への適応に活用していきたい。また、当初計画していた細胞の形態を高分子ブラシ表面に反映させること (セルインプリント) による内皮化促進効果についても検討を予定している。

< 引用文献 >

1. S. P. Massia, J. A. Hubbell, *J. Bio. Chem.*, 267, 14019-14026 (1992)
2. A. Mahara, S. Somekawa, N. Kobayashi, Y. Hirano, Y. Kimura, T. Fujisato, T. Yamaoka, *Biomaterials*, 58, 54-62 (2015)
3. K. Jalili, F. Abbasi, A. Milchev, *Macromolecules*, 46, 5260-5278 (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	笹井 泰志 (Sasai Yasushi)	岐阜医療科学大学・薬学部薬学科・教授 (33708)	
研究協力者	逢坂 大樹 (Ousaka Daiki)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

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