

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21700490  
 研究課題名（和文） コラーゲンを特異的に認識するインテリジェント生体架橋剤の創製

研究課題名（英文） Development of Intelligent Biogelators Possessing Collagen Specificity

研究代表者

松崎 典弥 (MATSUSAKI MICHIYA)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：00419467

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、コラーゲンの三重らせん形成に着目した弱い分子間相互作用を駆動力とするコラーゲン選択的インテリジェント生体架橋剤の創製である。多分岐ポリエチレングリコールにコラーゲンペプチドを結合した化合物が超分子ナノ粒子を形成し、線維性コラーゲンのみを選択的に架橋することを見出し、家兎水疱性角膜症モデルを用いた動物実験で角膜再生医療に有効であることを確認した。本生体架橋剤は、コラーゲン特異的な生体架橋剤として医療分野への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Purpose of this study is the development of collagen specific intelligent biogelators focused on weak intermolecular interaction during triple-helix formation of collagen fibers. We synthesized multi-armed poly(ethylene glycol)s terminally conjugated with collagen peptides and confirmed supramolecular nanoparticle formation of these compounds. Furthermore, these supramolecular nanoparticles specifically crosslinked fibrous collagens. We also confirmed the effect of the nanoparticles on bullous keratopathy rabbit models. Accordingly, the supramolecular nanoparticles would be useful as a collagen specific biogelator in tissue engineering field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
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：バイオマテリアル、高分子化学、インテリジェント材料、再生医学、ナノバイオ

#### 1. 研究開始当初の背景

医療分野において、生体組織を架橋してゲルを形成する生体架橋剤は組織接着剤として重要であり、近年では薬物徐放制御（DDS）への応用など幅広く研究されている。現在臨

床で用いられている生体架橋剤の多くは、化学架橋を駆動力に利用している。例えば、シアノアクリレートモノマーの重合反応を利用した「シアノアクリレート系架橋剤」やホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドによ

りゼラチンを架橋する「ゼラチン-アルデヒド系架橋剤」が市販されているが、有害なアルデヒド基や未反応モノマーの残存による毒性が問題とされている。また、低い生体適合性と非生体吸収性による創傷治癒の阻害・癌化も報告されている。一方、血液凝固反応を利用した「フィブリングルー」も市販されているが、組織接着性に乏しく、また血液製剤であるため感染の危険性がある。そのため、生体適合性や生分解性を有し、かつ組織接着性に優れた新しい生体架橋剤が求められている。

近年、様々な生体架橋剤が報告されており、「化学架橋」を駆動力とする研究と「生物由来接着成分」を用いた研究に大別することができる。しかし、化学架橋型架橋剤では未反応官能基の残存による毒性の問題を解決することができず、また、生物由来接着成分の多くは接着メカニズムが未解明であり、材料として応用するのは困難である。一方、生体内では弱い分子間相互作用を巧みに利用した組織化・ゲル形成が行われている。特にコラーゲン分子は、ヒドロキシプロリン (Hyp: O) の分子間水素結合を駆動力として三重らせんを形成し、コラーゲン繊維を構築する。申請者は、コラーゲンの三重らせん形成メカニズムに着目し、分子間水素結合に伴う三重らせん形成を駆動力とする独創的な生体架橋剤を考案した。10量体のコラーゲンモデルペプチド ((Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>: (POG)<sub>10</sub>) を架橋点に用いることで、生体組織内のコラーゲン分子と多点で水素結合を形成し、三重らせん形成によりゲル化する。弱い分子間相互作用を駆動力とした「物理架橋」であるが、三重らせん形成により組織内のコラーゲン分子と強固に結合すると期待される。さらに、本架橋剤はコラーゲン分子との三重らせん形成が駆動力であるため、組織中のコラーゲン分子を認識して選択的に架橋するインタージェントな架橋剤であると期待される。これまで生体組織の特定分子を認識して架橋する生体架橋剤は報告例が無く、独創性に優れている。

## 2. 研究の目的

本研究期間では、【①コラーゲンモデルペプチドを架橋点に有する架橋剤の合成とコラーゲン分子との架橋評価】、【②架橋構造の解明とコラーゲン選択性評価】、【③組織接着性評価およびコラーゲン架橋ゲルの薬物徐放効果】を検討し、架橋メカニズムの解明と生体接着剤としての有効性を評価する。本架橋剤は、生体内に注入することでコラーゲン分子を認識して直接ゲル化するため、溶液に様々な薬物を担持すると薬物を徐放するゲル担体となり、DDS 分野への応用も期待される。

る。

## 3. 研究の方法

### 【①新規生体架橋剤の合成とコラーゲン分子との架橋評価】

#### ①-1. 新規生体架橋剤 4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub> の合成

新規生体架橋剤として、生体適合性に優れた4本鎖 PEG (4-arm-PEG) の末端にコラーゲンモデルペプチド ((POG)<sub>10</sub>) を結合した 4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub> を合成する。スクシイミドエステル化 4-arm-PEG と (POG)<sub>10</sub> を炭酸ナトリウムバッファー中で縮合反応させることで 4-arm-PEG の末端に (POG)<sub>10</sub> を導入する。反応は <sup>1</sup>H-NMR や FT-IR スペクトル測定より解析する。申請者は予備実験より 4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub> の合成が可能であることを既に確認している。合成された 4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub> の三重らせん形成を CD スペクトル測定で解析する。(POG)<sub>10</sub> は室温にて三重らせんを形成し、コラーゲンと同様に 225 nm において正のピークを示し、80°C に加熱することで三重らせんが崩壊することが知られている (R.T. Raines et al., *Nature* 1998)。また、4本鎖以外に2本鎖・8本鎖の PEG を用いて 2-arm や 8-arm の PEG-(POG)<sub>10</sub> を同様に合成し、PEG 鎖の本数が三重らせん形成に与える影響を詳細に検討する。

#### ①-2. 4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub> とコラーゲン分子との架橋形成評価

得られた 4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub> のコラーゲン分子との架橋形成を評価する。コラーゲンを溶解させた酸性水溶液 (pH=3.0) や、熱変性により一本鎖に解離させたコラーゲンのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液に 4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub> の PBS 溶液を添加し、ゲル化を目視観察により評価する。申請者は既に、コラーゲン PBS 溶液に 4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub> を溶解させることで、約5分後にはゲルが形成することを見出している。ゲル形成前後の CD スペクトル測定より、架橋剤とコラーゲン分子との三重らせん形成を確認する。また、(POG)<sub>10</sub> は 79°C 以上で三重らせんが解離することが知られているため、熱的安定性と CD スペクトルを関連して評価することで、三重らせん形成とゲル化の関係を明らかにする。さらに、2-arm や 8-arm の PEG-(POG)<sub>10</sub> を用いて同様の実験を行うことで、コラーゲン架橋への PEG 鎖の効果を明らかにすると共に、ゲル化に最適な条件を見出す。

### 【②架橋構造の解明とコラーゲン選択性および組織接着性評価】

得られたゲルの架橋構造を、透過型 (TEM)・走査型 (SEM) 電子顕微鏡観察や架橋剤の蛍光ラベル化による共焦点レーザー顕微鏡観察より確認し、コラーゲン繊維と架橋ネットワークの構造を確認する。また、X線回折よりコラーゲン分子・繊維の配向と構造を解析し、IR スペクトルと二次元 NMR スペクトル測定より、4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub> とコラーゲン分子の相互作用部位を明らかにする (B. Brodsky et al., J. Biol. Chem. 2007 を参考に)。また、本架橋剤のらせん形成挙動やコラーゲンとのらせん間相互作用を分子レベルで定量的に解明するため、1 $\mu$ L の極少量で蛍光スペクトルを測定できる NanoDrop3300 を用いて詳細に評価する。これまでの報告より、(POG)<sub>10</sub> 鎖はコラーゲン繊維のギャップ領域に結合することが知られており (S. M. Yu et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2006)、本架橋剤もギャップ領域への相互作用により架橋を形成すると予想される。

本架橋剤のコラーゲン分子選択的架橋形成能を評価する。組織内の細胞外マトリックス成分であるタンパク質 (エラスチン・フィブロネクチン等) やグリコサミノグリカン (ヒアルロン酸・コンドロイチン硫酸等) との架橋形成を評価する。また、コラーゲンの種類によるゲル形成の違いを検討する。例えば、原繊維コラーゲンである Type I と層状網目構造コラーゲンである Type IV では構成アミノ酸や立体構造が大きく異なる。(POG)<sub>10</sub> 鎖は Type I コラーゲンのモデルペプチドであり、Type I コラーゲンのみを選択的に認識してゲルを形成すると期待される。これまで、コラーゲンの種類までも認識してゲル化する架橋剤は報告例が無く、本研究より達成できれば、革新的なコラーゲン選択的インテリジェント架橋剤としてその応用が期待される。

#### 【③組織接着性評価および薬物徐放効果の検討】

本架橋剤の生体接着剤としての機能の評価するため、ラット組織片の接着強度を引っ張り試験により検討する。接着組織の生理環境下での安定性を調べるため、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にインキュベート後の接着強度を経時的に評価する。また、架橋剤の生分解性を評価するため、コラゲナーゼによる分解試験を行う。さらに、架橋剤の細胞毒性を調べることで安全性を評価する。また、予め架橋剤溶液に薬物を添加しておくことで、組織接着部位で薬物を持続的に徐放できると期待される。そこで、モデル薬物として蛍光ラベル化アルブミンを用い、接着部位から

の徐放挙動を蛍光スペクトル測定と共焦点レーザー顕微鏡観察より評価する。

#### 4. 研究成果

平成21年度は、生体架橋剤の合成と最適化、またコラーゲン分子との架橋形成の評価を研究した。縮合反応の条件を検討することで、2, 4, 8本鎖のPEGにコラーゲンモデルペプチド (POG)<sub>10</sub> を結合することができた。収率・POGの導入率共に80%以上で良好であった。得られたPEG-(POG)<sub>10</sub>とコラーゲン分子との架橋形成を評価した。申請前の知見として、I型コラーゲンと4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub>を混合するとゲル化することをすでに見出していた。そこで、II型、III型、IV型、V型コラーゲンと様々な種類のコラーゲンとの架橋形成を検討した結果、I型、II型、III型と線維性のコラーゲンはゲル化するが、IV型など非線維性のコラーゲンは認識せず、ゲル化しないことを見出した。また、コラーゲン以外の合成高分子、天然由来高分子、タンパク質は認識せず、まったく架橋しないことも明らかとなった。生体のコラーゲンのみの特異的に認識する生体架橋剤はこれまで例が無く、初めてである。また、表面プラズモン共鳴スペクトル装置により、4-arm-PEG-(POG)<sub>10</sub>と各種コラーゲンの相互作用力を評価した結果、やはり線維性コラーゲンのみ相互作用し、非線維性コラーゲンとは相互作用しないことが確認された。さらに、I型、II型、III型との解離定数 ( $K_D$ ) は  $10^{-7}$ M と非常に強く結合していることが明らかとなった。

以上より、平成21年度は極めて順調に計画を推進することができた。本数の異なる新規生体架橋剤を合成することに成功し、また線維性コラーゲンに対する高い特異性を見出すことができた。

平成22年度は、円錐角膜症への応用に関する基礎知見の収集として、コラーゲンのゲル化における透明性を検討した。また、家兎水疱性角膜症モデルに対する架橋剤点眼の治療効果を検討した。

ブタI型コラーゲンを酸性およびアルカリ性水溶液に溶解し、pHを中性に調整した後に架橋剤と混合して透明性を評価した。酸性で溶解させたコラーゲンの場合、中性にした時点で沈殿が生じたため使用することが困難であることが明らかとなった。一方、アルカリ性水溶液で溶解させたコラーゲンの中性溶液は、4度では高濃度においても透明性が高かった。しかし、37度に加温すると白濁したゲル状態へと変化したため、濃度を2 wt%以下にすることで37度でも透明性を保つことが確認さ

れた。さらに、この状態で架橋剤を混合することで、4度では透明なゲル状態を保てることが明らかとなった。透明性に最適なコラーゲンの溶解方法ならびに濃度が確認された。さらに、家兎水疱性角膜症モデルに本架橋剤を点眼することで、角膜コラーゲンが架橋されることで角膜厚が減少し、水疱性角膜症に対して一定の治療効果を有することが確認された。

本生体架橋剤は、コラーゲン特異的生体架橋剤として医療分野への応用が期待される。

#### 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1件) 査読有

1. M. Matsusaki, R. Amekawa, M. Matsumoto, Y. Tanaka, A. Kubota, K. Nishida, M. Akashi, "Physical and Specific Crosslinking of Collagen Fibers by Supramolecular Nano-Gelators", *Adv. Mater. in press*.

[学会発表] (計8件)

1. 松崎典弥、雨川量太郎、松本匡広、田中佑治、久保田 享、西田幸二、相馬剛至、明石 満、“三重らせんを有するナノ粒子による選択的コラーゲン架橋と角膜再生医療への応用”、第32回日本バイオマテリアル学会大会、2010年11月30日、グランドプリンスホテル広島 (広島)
2. M. Matsusaki, R. Amekawa, T. Waku, Y. Tanaka, A. Kubota, K. Nishida, and M. Akashi, "Collagen Recognizable Biocompatible Nanogelator for Tissue Engineering", SFB 2010 annual meeting, April 10, 2010, Washington state convention center (Seattle, USA)
3. 雨川量太郎・和久友則・松崎典弥・田中佑治・久保田 享・西田幸二・明石 満、“コラーゲングル認識ゲル化剤の円錐角膜治療への応用”、第31回日本バイオマテリアル学会大会、2009年11月17日、京都テルサ (京都)
4. 松崎典弥・雨川量太郎・和久友則・西田幸二・明石 満、“三重らせん間相互作用を駆動力とするコラーゲン認識ゲル化剤の創製”、第58回高分子討論会、2009年9月17日、熊本大学 (熊本)
5. 雨川量太郎・和久友則・松崎典弥・明石 満、“多分岐ポリエチレングリコール/コラーゲンモデルペプチドの感熱応答ゾルゲル転移”、第58回高分子討論会、2009年9月17日、熊本大学 (熊本)
6. 雨川量太郎・和久友則・松崎典弥・田中佑治・久保田 享・西田幸二・明石 満、“角

膜治療を目的とした生体適合性コラーゲングル化剤の調製”、日本バイオマテリアル学会第4回関西若手研究発表会、2009年8月7日、大阪大学銀杏会館 (大阪)

7. 雨川量太郎・和久友則・松崎典弥・明石 満、“コラーゲンモデルペプチドの自己会合を利用した生体適合性感熱応答ゲルの調製”、第55回高分子研究発表会 (神戸)、2009年7月17日、兵庫県民会館 (神戸)
8. 雨川量太郎・和久友則・松崎典弥・明石 満、“多分岐ポリエチレングリコール/コラーゲンモデルペプチドの感熱応答性ゾルゲル転移”、第58回高分子学会年次大会、2009年5月27日、神戸国際会議場 (神戸)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：非共有結合型コラーゲン架橋剤

発明者：明石 満・西田幸二・松崎典弥・久保田 享・和久友則

権利者：国立大学法人大阪大学・国立大学法人東北大学

種類：特許権

番号：PCT/JP2009/058554

出願年月日：2009年5月1日

国内外の別：外国

[その他]

ホームページ

<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~akashi-lab/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

松崎 典弥 (MATSUSAKI MICHIIYA)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：00419467