

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22220009

研究課題名(和文)進化分子工学による結合性成長因子の創成と医学応用

研究課題名(英文)Creation of binding growth factors by molecular evolutionary engineering and their medical applications

研究代表者

伊藤 嘉浩(Ito, Yoshihiro)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・主任研究員

研究者番号：40192497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本発の成長因子固定化材料の概念を、化学的固定化だけでなく、成長因子に結合性を付与することで広く捉え直し、有機材料、生体組織、金属、無機材料への固定化も可能にした。結合性成長因子の創成のために、従来のタンパク質工学に加え、バイオ直交化学、進化分子工学、さらにこれらを融合した方法論を編み出した。調製した結合性成長因子は、直接あるいは基材に結合させて実験動物に投与し、それらが有効に作用することを見出し、再生医療分野で広く応用できる可能性を示した。同時に、新しい編み出した方法論は、これにまでない全く新しい機能性分子の創出法として応用展開できることも示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The concept of growth factor immobilization from Japan was confirmed by not only chemical immobilization, but also design of binding growth factor and extended from biological tissue or organic materials to metal or inorganic materials. For the creation of binding growth factors not only conventional recombinant gene method but also bioorthogonal chemistry, molecular evolutionary engineering, or the fused method was developed. The prepared binding growth factors were applied for direct injection or with substrate for implantation into animals and the effects were confirmed for future regenerative medicine. The developed methodology is also universally applicable for creation of novel functional molecules.

研究分野：生体材料学

キーワード：進化分子工学、成長因子、結合性、融合タンパク質、バイオマテリアル、タンパク質工学、再生医療、バイオ直交化学

1. 研究開始当初の背景

再生医療の実現のためには、生体再生を促進する基材をつくることの一つの重要な課題となっている。特に組織形成や臓器置換のためには、元になるマトリックスあるいはスキャフォールドが必須である。このような基材は、人工臓器材料研究でも古くから研究されてきており、基材表面に細胞接着性を付与したり、忌避したりする等の、いわゆる細胞の高次機能に関わらない機能を付与することはできようになった。しかし、細胞の成長や分化のような細胞内の情報伝達を介して遺伝子発現の変化を伴うような機能を付与することは困難であった。

そのような中、代表者らは、基材に生体分子である成長因子を固定化することで、細胞の成長や分化のような高次の細胞機能を制御できる新しい人工臓器材料を生み出すことができることを四半世紀に亘り日本発の概念として提唱し、明らかにしてきた。

図1上に示すように、通常は細胞表面の受容体と相互作用して細胞内に取り込まれて分解されてしまう成長因子を、基材や組織に固定化することで細胞内への取り込みを抑制し、長時間活性を保つことがわかってきた。固定化により局所濃度が高まることで、溶解状態より低濃度で、しかも長時間にわたり高い活性が観測されることがわかった。

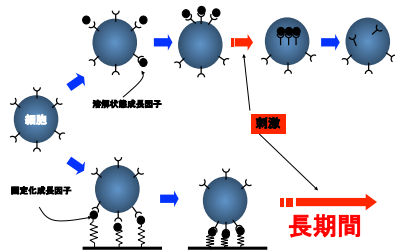


図1 通常は上に示すように成長因子は細胞表面の対応する受容体と相互作用した後、錯体を形成し、そのまま取り込まれ、ダウンレギュレーションを受ける。固定化されると長期間にわたり、細胞を活性化できる。

このような医療応用研究の一方で代表者らは、高分子合成化学として生体高分子の成り立ちに立ち返り、進化論を模した進化分子工学の手法で任意の標的や基材を分子認識できるペプチドを生み出す技術を発展させてきた。

2. 研究の目的

本研究では、これらの研究背景をもとに、1) 医療応用を目指した結合性成長因子の創成と2) 進化分子工学を「バイオものづくり」の一環として成長発展させることを目指した。

①結合性成長因子の創成では、従来の生体組織や有機高分子材料だけでなく金属・無機材料に結合する成長因子を作成し、医用材料あるいは医薬としての応用展開を図ることを目指した。

②合成の方法論として、タンパク質工学に加えて、バイオ直交化学、進化分子工学を活

用した。進化分子工学手法の発展として、通常では翻訳後修飾によってのみ導入される非コード・アミノ酸を組み入れた拡張進化分子工学を確立し、高い特異性で強い結合性を付与できるような成長因子設計を行うとともに、生み出される結合性分子(アプタマー)に新たな機能を付与する全く新しい試みを成功させることを目指した。

3. 研究の方法

①結合性成長因子は成長因子配列と、結合領域配列を複合化することにより創成した(図2)。結合領域は、i)細胞外基質のタンパク質からコードされる天然アミノ酸配列(タンパク質工学)、ii)その他のタンパク質から翻訳後修飾で作られる非コード天然アミノ酸を含むアミノ酸配列(バイオ直交化学)、iii)進化分子工学で設計された結合性のアミノ酸配列(進化分子工学)、iv)②と③を複合化したアミノ酸配列(拡張進化分子工学)、の四つの方法により設計した。

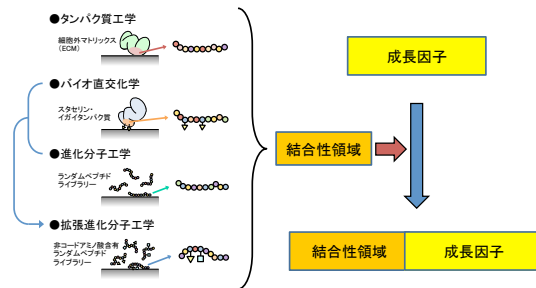


図2 結合性成長因子の設計指針。

②得られた生物活性を検討し、動物実験などにより医療応用の可能性を探った。図3で示すように、直接、あるいは基材に結合させて実験動物に投与し、その効果を検討した。

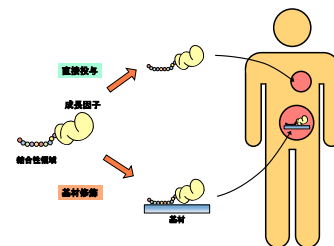


図3 結合性成長因子の性能評価。直接あるいは基材に結合させてから実験動物に投与し、その影響を調べた。

③図2のiv)でバイオ直交化学と進化分子工学を融合した、ミスアシル化 tRNA 法を無細胞翻訳系に導入して、非天然アミノ酸を組み入れたランダム配列ペプチド・ライブラリーを調製し、そこから標的に結合するペプチドを探索するという拡張進化分子工学の手法を確立できたので、結合性成長因子以外にも新たな機能性分子を創成した。

4. 研究成果

(1) タンパク質工学による結合性成長因子の創成と機能評価

①細胞接着タンパク質のフィブロネクチンは、いくつかの組織結合ドメインをもっている。この中のコラーゲン結合性あるいはフィブリン結合性ドメインを、タンパク質工学を用いて、上皮細胞成長因子 (EGF)、肝細胞成長因子 (HGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、骨形成タンパク質 (BMP)、血小板由来成長因子 (PDGF)、血管内皮細胞成長因子 (VEGF) に導入した。これら創成した結合性タンパク質は、各々コラーゲンあるいはフィブリンへの結合をもち、培養細胞に対し *in vitro* で生物活性を発揮することが明らかになった。

②コラーゲン結合性 BMP は、3次元のコラーゲンと生分解性高分子のポリ乳酸を複合化したスキャホールドに結合させることができ、内包したヒト骨髄由来間葉系幹細胞の骨誘導能に顕著な効果が観察された。生体内埋め込み実験を行ったところ、顕著な骨誘導 (骨由来遺伝子の発現、カルシウム沈着などのバイオミネラリゼーション) が観察され、結合性 BMP の有効性が明らかとなった。

③コラーゲン結合性 BMP を、新しく開発した即効性可視光硬化型ゼラチンと併用してラビットで骨軟骨再生を検討した。損傷モデルにおいて結合性 BMP が、可視光照射で形成されたゲル中に長期間に亘り残存し、再生を促進したことがわかった (図 4)。

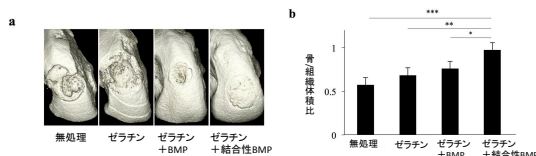


図 4 (a) 代表的な 3 次元 CT 像。CBD-BMP4 は結合性 BMP (b) 骨成長を骨体積 (BV) を組織体積 (TV) で割った値。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

④コラーゲン結合性 EGF をマウス心臓に注入したところ、長期間に亘り心臓内に残存し、心筋細胞の増殖を促進することを証明できた。

⑤コラーゲン結合性 BMP を、基材を用いず直接、動物 (マウス) の損傷部位に注射した場合もその部位に 2 週間以上とどまることが明らかになった (通常 BMP は 3 日後には消失)。そして顕著に骨関連遺伝子の発現を向上させ、成長因子の分泌も促進した。さらに、頭蓋骨を欠損させた箇所投与した場合でも、結合性 BMP はスキャホールドなしでも高い骨誘導能を示した。これらの結果は、結合性 BMP が損傷部位表面に露出したコラーゲンに結合して活性を発現できたものと考察された。これは、結合性ドメインがターゲティング素子としても活用できることを初めて示したものである。

⑥コラーゲン結合性 HGF を脊髄圧挫損傷モデルと脊髄切断モデルで試したところ、前者

では直接投与によって、HGF に結合性を付与することにより顕著な機能回復を、後者では可視光硬化型ゼラチンと併用することにより、神経、運動機能の回復を確認することができた。

(2) バイオ直交型タンパク質工学による結合性成長因子の創成

唾液の中にあるアパタイト結合性タンパク質スタセリンや、貝類が岩場に接着するための水中接着タンパク質の活性部位には、翻訳後修飾により各々リン酸基やカテコール基が存在している。これらは、従来のタンパク質工学では導入不可能であることから、新たな導入法を検討し、結合性成長因子の合成を開発した (図 5)。

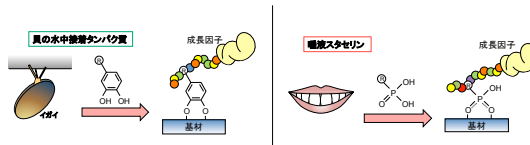


図 5 バイオ直交化学による結合性成長因子合成

①スタセリン内に存在する、リン酸化セリンをもつ活性部位ペプチドと EGF との融合ポリペプチドを固相法により合成したところ、得られた結合性 EGF はヒドロキシアパタイトやチタンに結合し、かつ細胞増殖活性を持つことや、その活性が、固定化 EGF による長時間の細胞内情報伝達タンパク質の活性化に基づくことを明らかにした。

②スタセリンの活性部位と BMP を融合した。BMP は高分子量なので、タンパク質リガーゼであるソルターゼ A を用いて融合を成功させた。すなわち、遺伝子組み替え法で、ソルターゼ認識部位を含む BMP を調製し、別に固相法で調製したリン酸基含有ペプチドをソルターゼを用いて融合した。調製したリン酸基含有 BMP はヒドロキシアパタイトに結合して培養細胞の骨分化を促進することがわかった。

③貝の水中タンパク質の活性部位に含まれる 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) を含むペプチドと EGF との融合ポリペプチドを設計し、固相法により合成したところ、有機、無機を問わず様々な基材に結合し、細胞成長促進活性を持つことと、その活性が、長時間の細胞内情報伝達タンパク質の活性化によることを明らかにした。

④リン酸基含有 BMP 調製法と同じ方法で、DOPA 含有ペプチド DOPA-Lys-DOPA-Lys-DOPA を、ソルターゼ A を用いて VEGF に導入することに成功した。DOPA 含有 VEGF は特に高 pH で結合性が増加することがわかった。ステント基材であるクロム合金への結合が観測され、実際にステントを被覆して動物に埋め込み検討したところ、血管内皮細胞が適度に増殖し、ステントの肥厚化を防ぐことができた (図 6)。

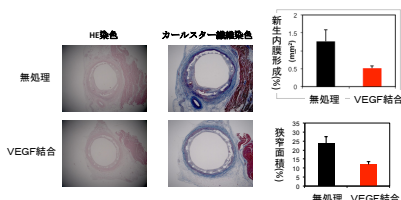


図6 Cr-Co スtentをそのままあるいはDOPA含有VEGFで処理してブタの血管に挿入して機能評価。

⑤上述の方法でDOPAを含むペプチドを骨形成タンパク質(BMP)へ連結させるか、あるいは、あらかじめBMP末端にチロシン配列を導入し、チロシナーゼを用いてチロシンをDOPAに変換する方法を検討した。これらの修飾BMPがチタンへ結合し、生物活性を発揮することを明らかにした。

(3) 進化分子工学の手法による結合性成長因子の創成

①EGFのアミノ末端に11アミノ酸からなるランダム配列を挿入し、チタン表面へ結合する結合性EGFの探索に成功した。この結合性EGFは、従来のファージ・ディスプレイで探索されたチタン結合性ペプチド配列を付加したEGFに比べて、より高い結合性をもち、生物活性においても無修飾のEGFと比較して遜色ないことが明らかとなった。従来法では、結合性ペプチドをEGFへ導入することにより、結合性ペプチドにコンホメーション変化を誘起してしまい結合能の低下を招いてしまうのに対し、本研究で開発した方法は、最初からEGFに組み入れた配列から結合性分子を探索するために、高い結合性を維持した分子が得られたものと推測され、今後の進化分子工学による結合性タンパク質(成長因子)設計のための重要な指針が得られた。

②VEGFについても同様にコラーゲン結合性を付与することに成功した。これはVEGFをコードするDNA配列に直接ランダム配列を導入し、コラーゲンに対するアフィニティ選別を行うことで遂行した。得られたVEGF誘導体は、コラーゲン結合性を持つとともに、血管内皮細胞の成長促進活性ももつことがわかり、従来知られているコラーゲン結合性ペプチドをそのまま導入した場合より高い活性を有していた。

(4) 進化分子工学とバイオ直交化学を融合させた拡張進化分子工学の確立

①拡張進化分子工学によりDOPAを担持したtRNAを用いたin vitro選別系でコラーゲン結合性VEGFの選別を実施した。

②環境に応答して蛍光が変化する蛍光基を側鎖に導入した非天然アミノ酸を組み込んだ進化分子工学を可能にし、カルモデュリンやペロ毒素と結合して蛍光を変化させるペプチドの合成に成功した。検体と混合するだけで標的の存在を定量的に評価でき、診断ツールとしての有用性が期待される。

③電気重合基を側鎖に導入した非天然ア

ミノ酸を組み込んだ進化分子工学を可能にし、インフルエンザウイルスを電気化学的に検出できることを明らかにした。電気化学センシングは安価にセンサーを調達でき、汎用性が高く、将来応用の可能性が高い。

④阻害剤を側鎖に導入した非天然アミノ酸を組み込んだ進化分子工学を可能にし、抗がん剤のターゲットであるキナーゼ活性を阻害剤単独より強力に阻害するペプチドの合成に成功した。新しい医薬設計法として期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計73件)

- ① Y. Yoshida (6番目)、T. Kitajima (8番目)、Y. Ito (9番目)、A. Matsukawa (11番目) (員数11), "A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering", *Sci. Rep.*, 4, 4457 (2014)
DOI:10.1038/srep04457
- ② S. Tada, E. Timucin, T. Kitajima, O. U. Sezerman, Y. Ito, "Direct in vitro selection of titanium-binding epidermal growth factor", *Biomaterials*, 35, 3497-3503 (2014)
DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.01.010
- ③ T. Uzawa (2番目)、S. Tada (6番目)、Y. Ito (13番目) (員数13) "A fluorogenic peptide probe developed by in vitro selection using tRNA carrying a fluorogenic amino acid", *Chem Commun.*, 50, 2962-2964 (2014)
DOI: 10.1039/C3CC47624C
- ④ S. Tada (2番目)、M. Sakuragi (3番目)、T. Kitajima (8番目)、Y. Ito (11番目) (員数11), "An epidermal growth factor derivative with binding affinity for hydroxyapatite and titanium surfaces", *Biomaterials*, 34, 9747-9753 (2013)
DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.09.004
- ⑤ Y. Ito (4番目) (員数4), "Spatial gradients of chemotropic factors from immobilized patterns to guide axonal growth and regeneration", *Biomaterials*, 34, 9593-9601 (2013)
DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.08.019
- ⑥ T. Kitajima (2番目)、Y. Yoshida (8番目)、Y. Ito (9番目)、A. Matsukawa (11番目) (員数11) "Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused BMP4", *Int. J. Nanomed.*, 8, 1349-1360 (2013)
DOI: 10.2147/IJN.S44124
- ⑦ T. Uzawa, S. Tada, W. Wang, Y. Ito, "Expansion of Aptamer Library from "Natural soup" to "Unnatural soup"", *Chem. Commun.*, 49, 1786 - 1795 (2013)
DOI: 10.1039/C2CC36348H
- ⑧ Y. Ito, S. Tada, "Bio-orthogonal and combinatorial approaches for design of binding growth factors", *Biomaterials*, 34, 7565-7574 (2013)

DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.06.037

- ⑨ T. Kitajima (3 番目), Y. Ito (8 番目) (員数 8)
“Spatial immobilization of bone morphogenetic protein-4 in a collagen-PLGA hybrid scaffold for enhanced osteoinductivity”, Biomaterials, 33, 6140-6146 (2012)
DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.05.038
- ⑩ B. Joddar, T. Kitajima, Y. Ito, “The effects of covalently immobilized hyaluronic acid substrates on the adhesion, expansion, and differentiation of embryonic stem cells for in vitro tissue engineering”, Biomaterials, 32, 8404-8415 (2011)
DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.07.083
- ⑪ M. Sakuragi, T. Kitajima, T. Nagamune, Y. Ito, “Recombinant hBMP4 incorporated with non-canonical amino acid for binding to hydroxyapatite”, Biotechnol. Lett., 33, 1885-1890 (2011)
DOI:10.1007/s10529-011-0637-1

[学会発表] (計 113 件)

- ① Y. Ito, “Molecular evolutionary engineering using expanded library from a “natural soup” to an “unnatural soup””, Xingda lecture at Beijing University, Beijing CHINA, Apr. (2014)
- ② Y. Ito, “Mussel-inspired biological surface modification toward bioactive materials”, 2014 Materials Research Society of Korea, Changwon KOREA, May (2014)
- ③ Y. Ito, “Design of binding epidermal growth factors”, TERMIS EU, Genova ITALY, Jun. (2014)
- ④ Y. Ito, “Design of Biofunctional Peptides by Bio-orthogonal In Vitro Selection”, Korean Polymer Society, Jeju KOREA, Oct. (2014)
- ⑤ Y. Ito, “Design and synthesis of binding growth factors”, WCPRM2014, Taipei TAIWAN, Nov. (2014)
- ⑥ Y. Ito, “Molecular Evolutionary Engineering for Creation of Functional Peptides”, ICSS Meeting, Hong Kong, Dec. (2014)
- ⑦ Y. Ito, “Engineered bone morphogenetic protein for hard tissue engineering”, BTE2015, Changchun CHINA, Jan. (2015)

[図書] (計 16 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 2 件)
名称: アプタマーを用いた電気化学検出法
発明者: 伊藤嘉浩、多田誠一
権利者: 国立研究開発法人理化学研究所
種類: 特許
番号: 2014-204677

出願年月日: 2014 年 10 月 3 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/nano-med.eng.lab/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤嘉浩 (ITO Yoshihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・主任研究員

研究者番号: 40192497

(2) 研究分担者

多田誠一 (TADA Seiichi)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号: 30598165

(平成25~26年度)

鶴澤尊規 (UZAWA Takanori)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員

研究者番号: 60554376

(平成 23~26 年度)

上田一樹 (UEDA Motoki)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・研究員

研究者番号: 10615040

(平成 26 年度)

松川昭博 (MATSUKAWA Akihiro)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 90264283

(平成 24~26 年度)

吉田靖弘 (YOSHIDA Yasuhiro)

北海道大学・歯学研究科・教授

研究者番号: 90281162

(平成 22~26 年度)

櫻木誠 (SAKURAGI, Makoto)

独立行政法人理化学研究所・基幹研究所・基礎科学特別研究員

研究者番号: 10435828

(平成 22 年度)

北嶋隆 (KITAJIMA, Takashi)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・協力研究員

研究者番号: 40399556

(平成 22~24 年度)