

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300165

研究課題名(和文) 成長因子の構造安定化と放出制御機能を兼備した血管再生用マテリアルの創製

研究課題名(英文) Design of Scaffold Materials Bearing Stabilization of Growth Factors Toward Angiogenesis

研究代表者

大谷 亨(Ooya, Tooru)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10301201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円、(間接経費) 3,330,000円

研究成果の概要(和文)：ポリグリセロール dendrimer (PGD) が生理活性タンパク質の構造安定性に及ぼす影響を検討した。アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)をモデルタンパク質として熱変性におけるPGD添加効果を検討したところ、PGD存在下において熱処理後もADH活性を保持できる濃度条件が存在した。また、PGDは塩基性アミノ酸残基と相互作用し、これによって塩基性繊維芽細胞増殖因子の安定性に寄与していることが細胞培養実験から明らかになった。PGDは簡便な架橋反応にゲル状に加工可能であったことから、PGDを用いて生理活性タンパク質、特に塩基性タンパク質の構造と活性を安定化する足場材料として機能することが示された。

研究成果の概要(英文)：In this project, polyglycerol dendrimers (PGDs) were focused as a candidate of protein stabilizers aiming at creation of new polymeric scaffolds bearing growth factor stabilization. Thermal denaturation of alcohol dehydrogenase (ADH), as a model protein, was found to be prevented in the presence of PGDs, suggesting that the PGDs act as a stabilizer of proteins. This effect was due to modulation of water structure, which was clarified by NMR studies. In addition, PGDs could interact with basic amino acids, which was investigated by isothermal titration calorimetric studies, and biological activity of basic fibroblast growth factor (bFGF) was apparently preserved by the addition of PGDs. Therefore, PGDs are feasible to use as a protein stabilizer, and can be applicable as a polymeric scaffold bearing growth factor stabilization.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体医工学・生体材料学

キーワード：成長因子 安定化 dendrimer 水の構造 細胞 疎水場 ポリグリセロール

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会における革新的な医療の推進において、生体の自己再生能力を利用した再生医療は重要な研究課題である。血管組織再生に不可欠な成長因子等の生理活性タンパク質を生体内と同様に機能させて再生させるための足場となる生体適合性材料と、その材料に含有した細胞成長因子の放出制御が重要であるにも関わらず、水分子の材料内への侵入とそれに伴う材料の膨潤から初期バースト放出され、細胞応答に適した放出制御の達成は困難であった。また、従来の足場材料の構造にタンパク質の安定性を付与する機能はなく、その生理活性の保持を考慮した足場材料とはなっていない。これまでの研究の予備的知見から、グリセロールがナノサイズに凝縮されたポリグリセロール dendrimer (PGD) の生体適合性を示してきた。PGD を架橋したヒドロゲルの調製も可能であることから、PGD のグリセロール局所密度増大に伴うタンパク質の安定化とその架橋ゲルによるタンパク質放出制御が可能ではないかとの発想に至った。

2. 研究の目的

樹状構造を有するグリセロール (ポリグリセロール dendrimer: PGD) が生理活性タンパク質の構造安定性に及ぼす寄与を明らかにし、構造安定化された細胞成長因子放出制御が可能な血管再生用材料を創製する。PGD の生体適合性に加え、(1) PGD の高密度水酸基の存在による水の運動性への影響とタンパク質の熱力学的安定性との関連性を明らかにし、(2) 安定化された生理活性タンパク質を内包する PGD 架橋ゲルの調製とその生分解性を解析し、(3) 得られたゲルの生分解性とタンパク質の放出挙動の関連から放出制御の要件を明確にする。得られた知見をもとに、(4) 成長因子を内包した PGD 架橋ゲルを調製し、その放出制御による細胞応答機能を明らかにすることによって、安全性に優れた血管再生用材料を創製する。

3. 研究の方法

(1) PGD 存在下でのタンパク質の熱安定性の評価

PGD がタンパク質の熱力学的安定性に及ぼす影響を明らかにするため、比較的不安定なモデルタンパク質としてアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) を選択し、PGD の世代数が ADH の酵素活性に及ぼす影響を検討した。PGD G1, G2, G3、及びグリセロールをそれぞれ 5 wt% ずつ溶解させた緩衝液に、ADH を加え、60 で 2 時間加熱しながら濁度変化を測定した。その後、補酵素である NAD⁺、基質であるエタノールを加え、340

nm の吸光度変化を測定することによって ADH 活性を測定した。

(2) PGD 存在下における水の構造変化の評価

各 PGD 濃度変化に伴う H₂O/D₂O 混合系における H₂O の核磁気共鳴 (NMR) スピン-格子緩和 (T₁) 測定を 300 MHz NMR 装置を利用して行った。対照としてグリセロールを用いた。各 PGD 濃度変化に伴う水の浸透圧を蒸気圧法オズモメーターを用いて測定し、重量ミリオスモル濃度 (mmol/kg) を算出した。

(3) PGD 存在下での塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) 安定性評価

NIH/3T3 細胞前培養後に bFGF を添加し、添加後 24, 48 時間の生細胞数を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。このとき、bFGF と PGD を緩衝溶液中にて混合し、添加して NIH/3T3 細胞の生細胞数を測定することによって PGD 添加の効果を検討した。また、PGD の bFGF 熱安定性への効果を検討するため、マイクロチューブに bFGF および PGD を入れ、70 の恒温槽に 1 時間浸けた。その後、上記と同様に NIH/3T3 細胞の生細胞数を測定した。

(4) 塩基性アミノ酸残基と PGD との相互作用評価

種々のアミノ酸およびアミノ酸類似化合物と PGD との相互作用を等温滴定型熱量 (ITC) 測定から評価した。

(5) PGD 架橋ゲルの調製

架橋剤としてエチレングリコールジグリシジルエーテル (EGDGE) 及びポリエチレングリコールジグリシジルエーテル (PEGE) を使用して NaOH 水溶液中もしくは DMSO 中にて PGD ヒドロゲルを調製した。このとき、架橋剤と PGD 濃度を変化させてゲルを調製した。

4. 研究成果

(1) PGD 存在下でのタンパク質の熱安定性の評価

グリセロール存在下では濁度変化が見られなかったが、世代数の異なる PGD (Fig. 1) 存在下では、世代数の増大に伴って濁度が上昇し、凝集体の形成が見られた。この凝集体を回収し、ADH 活性を測定したところ、PGD G2 では約 70%、PGD G3 では約 50% の活性を保持したが、グリセロールを加えたものでは約 10% しか活性が維持されなかった。そこで、疎水性蛍光プローブによる疎水

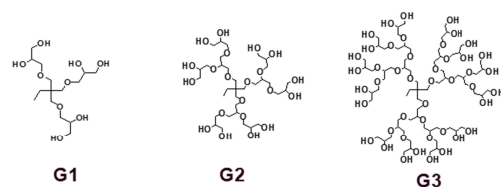


Fig. 1 Chemical structure of polyglycerol dendrimers (PGDs)

場を解

析したところ、PGD 世代数の増大による疎水場の存在が証明された。従って、PGDs はグリセロールとは異なり変性作用を示すが、疎水場の存在によって活性保持に必要な水素結合を安定化していると考えられる。以上より、PGD 水溶液中では ADH の活性状態は G2 存在下において最も保持されることが明らかとなり、グリセロール表層の水酸基密度に最適な条件があることから、グリセロールよりも低濃度にてタンパク質を安定化できることが明らかとなった。

(2) PGD 存在下における水の構造変化の評価

T₁ 測定の結果、水 1 分子あたりの PGD 水酸基数 (N_{OH}) が増加するに伴い、T₁ 値が低下する傾向が見られた(Fig. 2)。N_{OH} が 1.3 の時、T₁ 値は、PGD-G3 < G2 < G1 < グリセロールの順に大きかった。このことは、水酸基数が多くなるほど水の運動性が抑制される傾向にあることを示していた。さらに、浸透圧測定から PGD の世代数が平衡状態にある水の浸透圧へ与える影響を検討したところ、同モル濃度における浸透圧は、世代数の増加に伴って低下する傾向がみられた。このことから、平衡状態において、水酸基密度が高くなるほど結合水量が増加し、自由水が少なくなる傾向にあるものと示唆された。

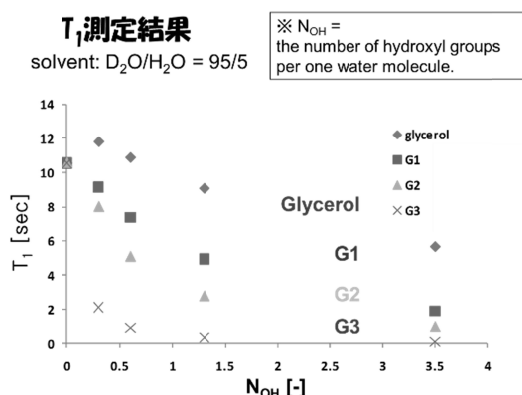


Fig. 2 T₁ values changes as a function of N_{OH}.

(3) PGD 存在下での塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) 安定性評価

対照 (bFGF なし) に比べて bFGF を添加したもので細胞数が有意に増大し、さらに、PGD 添加によって細胞数が増大する傾向が見られた。0.1wt% PGDs のみでは NIH/3T3 細胞生存率は変化しなかったから、このことは、PGDs 存在下において bFGF の細胞増殖活性を増強させる効果があることを示唆していた。一方、bFGF を熱処理すると、対照に比べて熱処理 bFGF を添加しても細胞数の有意な増大は見られず、bFGF の熱変性による細胞増殖活性の低下が見られたが(Fig. 3)、熱処

理時に PGDs を添加して細胞数を比較したところ、PGDs 非添加の場合と比較して、有意に細胞数の増大が見られた(Fig. 3)。このことは、bFGF の熱変性を抑制に PGDs が寄与しており、PGD 存在下においては bFGF の構造と活性を保持するように機能していることが明らかとなった。

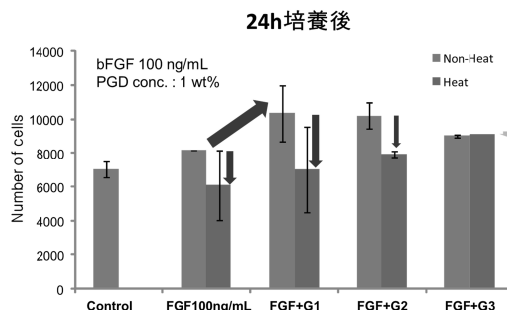


Fig. 3 Effect of PGDs on NIH/3T3 cells numbers in the presence of bFGF.

(4) 塩基性アミノ酸残基と PGD との相互作用評価

細胞成長因子の放出制御のためには PGD と細胞成長因子の相互作用が支配的となる。bFGF は塩基性タンパク質であるため、その表層に存在するアルギニンとの相互作用が重要と考え、アルギニンと PGD との相互作用を等温滴定型熱量 (ITC) 測定から評価したところ、L-アルギニン、L-リシン、L-ヒスチジンが PGD-G3 と相互作用した。従って、PGD-G3 との相互作用には塩基性部位が必要であり、これら塩基性部位に付加しているプロトンが PGD-G3 内部のエーテル性酸素とファンデルワールス相互作用していることが示された。

(5) PGD 架橋ゲルの調製

PDG と EGDGE の濃度を変更して合成を行ったところ、水中での膨潤率は、EGDGE の濃度が上がり、PGD-G3 の濃度が下がれば上昇したことから最適な架橋濃度条件が存在することが明らかとなった。しかし、全てのヒドロゲルは円板状の形態を維持しうる程度の強度を有していたが、緩衝液中にて bFGF を導入するとヒドロゲルの形態が崩れてしまったため、架橋方法及びその条件については今後の検討課題であるとした。

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3件)

H. J. Lee, T. Ooya, ¹⁹F-NMR, ¹H-NMR, and fluorescence studies of interaction between 5-fluorouracil and polyglycerol dendrimers, *Journal of*

Physical Chemistry B, 2012, 116, 12263-12267. (査読有), DOI: 10.1021/jp307710b.

H. J. Lee, T. Ooya, Generation-dependent Host-Guest Interactions: Solution States of Polyglycerol Dendrimers of Generations 3 and 4 Modulate the Localization of a Guest Molecule, *Chemistry - A European Journal*, 2012, 18, 10624-10629. (査読有), DOI: 10.1002/chem.201200748.

H. J. Lee, T. Ooya, Dendritic nanospace constructed by only glycerol units enhanced uptake of a fluorescent molecule in aqueous solution, *Chemical Communications*, 2012, 48, 546-548. (査読有), DOI: 10.1039/C1CC15949F.

[学会発表](計 36 件)

Y. Kawashima, T. Ooya, Branched Glycerol-Modified Liposomes as a New Candidate of Drug Carriers, *the 41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society*, 2014/7/14, Chicago, U.S.A.

山本阿里、大谷 亨、成長因子と相互作用するアニオン性ブロック共重合体、第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 30 日、名古屋

T. Ooya, Effect of Nano-sized Polyols on Cell Death and Cellular Activation, *International Symposium on Nanomedicine Molecular Science (NMMS2013)* 2013/10/8, 東京.

大谷 亨、小川貴也、岡田健太郎、李 恵柱、竹内俊文、ポリグリセロール dendrimer とタンパク質との分子間相互作用による生理活性制御へのアプローチ、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月 8 日、札幌

大谷 亨、低分子と高分子の狭間の分子設計：ポリグリセロール dendrimer は両親媒性？、第 8 回高分子若手研究会（関西）招待講演、2013 年 7 月 27 日、大阪

T. Ooya, Nitrogen-free Dendritic Biomaterials: From Host-Guest Chemistry to Biomolecular Interactions, *The 6th International Symposium on Intelligent Drug Delivery Systems (Invited)* 2012/3/15, Seoul, Korea.

大谷 亨、小川貴也、竹内俊文、ポリグリセロール dendrimer 水溶液の水の構造がタンパク質との相互作用へ及ぼす影響、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、2011 年 11 月 22 日、京都

H. J. Lee, T. Ooya, T. Takeuchi,

Molecular Interaction between Polyglycerol Dendrimers and 4-Amino-3-Hydroxynaphthalene-1-Sulfonic Acid (AHSA), *Tenth International Conference on Materials Chemistry (MC10)*, 2011/7/4, UK.

岡田健太郎、大谷 亨、竹内俊文、グリセロール dendrimer とタンパク質の分子間相互作用解析、日本化学会第 91 春季年会、2011/3/26、横浜

T. Ooya, T. Takeuchi, Polyglycerol Dendrimers as a Tool for Biomedical Applications, *International Conference on Biomaterials Science 2011*, 2011/3/16, 筑波.

T. Ogawa, T. Ooya, T. Takeuchi, Enzymatic Activity in Polyglycerol Dendrimer-contained Solution, *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, 2010/12/17, Honolulu, USA.

李 恵柱、三田地善樹、大谷 亨、竹内俊文、ポリグリセロール dendrimer の親水・疎水的特性評価、第 59 回高分子学会年次大会、2010/5/28、横浜

[他 24 件]

[図書](計 1 件)

竹内俊文、大谷 亨、酵素利用技術体系（監修：小宮山 眞）、エヌ・ティー・エス、2010、総ページ数：1064.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称：ポリグリセロール dendrimer の精製法

発明者：大谷 亨

権利者：富山県

種類：特許認定

番号：特許第 5201550 号

取得年月日：2013 年 2 月 22 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~ooya/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 亨 (Tooru Ooya)

神戸大学大学院工学研究科 准教授

研究者番号：1 0 3 0 1 2 0 1