

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680055

研究課題名(和文)細胞選択性ペプチドを用いた医療機器被覆用ミニマムECMの設計

研究課題名(英文)Design of minimum ECM using cell-selective peptides for medical implant coating

研究代表者

加藤 竜司(Kato, Ryuji)

名古屋大学・創薬科学研究科・准教授

研究者番号：50377884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、次世代医療機器のための革新的バイオマテリアルとして細胞選択性を有する人工合成細胞外マトリクス『ミニマム(最小単位)ECM』の設計を、ペプチドのアレイ化技術とバイオインフォマティクス解析技術を融合させて行うことを目標として行った。結果、3残基の網羅的なペプチドに対して細胞選択性・血液凝固阻害能・ECM結合能を全て評価することで、ミニマムECMとして有効性の高い配列を多数取得・ランキングすることに成功した。さらには、これら細胞選択性配列と医療機器表面の物理化学的相性のルール化に成功し、より効果的にペプチド被覆を行える手法を開発するに至った。

研究成果の概要(英文)：This research was conducted to develop novel bio-material for the coating organic molecules for next generation medical implants. Especially, we focused to find the Minimum short peptide sequences to construct artificial Extracellular Matrix (ECM) to function as cell-selective performance. We succeeded to exhaustively screen the 8000 short peptide libraries for their cellular selectivity, anti-thrombosis effect, and ECM adhesive effect and found the minimum sequences and their rankings to construct artificial ECM.

研究分野：複合領域

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：細胞選択性 ECM 人工血管 ポリカプロラクトン エレクトロスピニング クリックケミストリー ペプチドマイクロアレイ 再生促進

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第2位は動脈硬化を基盤にした虚血性心疾患(心筋梗塞・狭心症)を含む、心疾患である。また、米国においては半世紀の間、心疾患が死因の第1位であり、世界的に見ても、多くの先進国で虚血性心疾患の患者数は増加している。

虚血性心疾患を含めた「動脈硬化」を基盤とする疾患の治療には、血管内に留置するステントや人口血管などの医療機器が多く用いられている。しかし、医療機器の多くは生体(血管内)に異物を留置するという人為的な行為によって、留置組織の生体秩序を乱し、これがきっかけとなって多くの副作用を引き起す。例えば、通常血管の内側を覆っている内皮細胞の層が破壊されると、血中のタンパク質成分・リンパ球・血小板などが接着しやすくなり、血栓形成や血管狭窄が引き起こされる。また、細胞の層構造が乱されると、通常血管に強度を与えるために存在する平滑筋細胞が血管内腔へと浸潤・過増殖を引き起こし、治療部位の再狭窄が生じる。即ち、長期に渡って治療効果を患者にもたらす医療機器を開発するためには、生体組織と「調和する」ための機能付加が必要不可欠である。

これまで体内留置方医療機器の長期安定性は、薬剤塗布や表面修飾によって「一つの生体現象を阻害する」というコンセプトで設計されており、大きな成果と市場開拓が実現されてきている。しかし生体内の組織は、様々なバランスによって巧妙に調節されている。このため、DESは有効性こそ示したが、徐放する薬剤に特異性が無いため、正常な内皮細胞の接着増殖までが阻害され、ステント血栓症やその予防のための抗血小板剤の長期投与による出血性合併症などの副作用が臨床では蓄積されてしまいつつある。

一方、正常な生体内の血管では、血管の損傷は全ての細胞がバランスをとって増殖または非増殖することで、傷口を再生させている。本研究では、このような生体そのものに存在する機能に学ぶことで、従来の「一つの生体現象を阻害する」コンセプトとは異なり、「目的の生体現象を促進し、目的以外の生体現象は阻害する」というようなバランスを持った生体材料が設計できないかと発想した。

2. 研究の目的

本研究は、次世代医療機器のための革新的バイオマテリアルとして細胞選択性(目的の細胞を生着させ、目的以外の細胞を阻害する機能)を有する人工合成細胞外マトリクス(ECM: Extracellular Matrix) = 『ミニマム(最小単位)ECM』の設計を、ペプチドのアレイ化技術とバイオインフォマティクス解析技術を融合させて行う。

3. 研究の方法

本研究では、目的であるCMの本来の機能性を

最小限の細胞選択性ペプチド分子の組み合わせで復元する『ミニマムECM』の設計のため、「材料設計」と「機能性評価」の両方を順次行う。また、本研究では、最終の適用例として「小口径人工血管」に標的を絞り、各種検証を行う。

「材料設計」では、これまでに取得している細胞選択的ペプチドを様々な濃度比、配列組み合わせで導入した「ペプチド含有材料」または「ペプチド被覆材料」を調製・成形する。

「機能性評価」では、各材料を簿層シートに加工し(1)材料の分析(表面、物性)、(2)in vitro細胞アッセイ(接着・増殖)を第一に行い材料設計を最適化する。材料設計とin vitroでの効果が最適化された時点で、開発材料を人工小口径血管型に加工し、(3)動物実験によるin vivoでの生体内での有効性を検証する。

4. 研究成果

本研究は、次世代医療機器のための革新的バイオマテリアルとして細胞選択性(目的の細胞を生着させ、目的以外の細胞を阻害する機能)を有する人工合成細胞外マトリクス『ミニマム(最小単位)ECM』の設計を、ペプチドのアレイ化技術とバイオインフォマティクス解析技術を融合させて行うことを目標としている。

H23年度は細胞選択性ペプチドの組み合わせ効果のin vitroスクリーニングを中心研究課題として進め、大きく3つの検証を行った。細胞選択性ペプチド(粉末)の受託合成:約10配列の既に取得していた細胞選択性ペプチドおよび新規取得したECM集積化選択性ペプチドを合成し、PCLのエレクトロスピニングシートへと加工して人工血管の基礎材料を10種類作製した。ペプチドアレイを用いた配列組み合わせ・濃度組み合わせのin vitroスクリーニングでは、これまでECMに特化して探索してきたスクリーニングの規模をさらに広げ、3残基ペプチドの全組み合わせの中から特にECMに特徴的な配列を約300種類スクリーニングし、新たに細胞選択性ペプチドの取得と、これを説明する物理化学的性質のルール発見を行った。最適条件に基づくマテリアル設計(シート)と詳細検証においては、上記マテリアルシートを加工後、SEMやXPS等で表面分析する評価技術を、他施設実験装置を用いて確立した。上記3つの検証を順調に進めたことで本研究はしい候補の発見やECMの物性の理解という科学的な発見と共に、実際の人工血管マテリアルの試作まで達成できた。これらの成果は論文発表および新聞報道(9月28日経産省新聞)や企業からの問い合わせのような反響を受け、社会的ニーズに沿う研究意義を確認することができた。

H24年度は、実施計画の通り細胞選択性ペプチドの組合せin vitroスクリーニングを実施し、各細項目について下記のような実績を得た。ペプチドガラスアレイ上での網羅的効果検証。3-merペプチド全網羅配列を配

したガラスアレイを用いて血管内皮細胞および平滑筋細胞の選択性アッセイ方法を確認し、これによりいくつかの物性モチーフが各選択性を支配していることを突き止めた（配列は特許出願準備中）。ただし、ガラスアレイでの再現性には多少のバラツキが見られ、これをより深く、かつ細かく検証するためアッセイ系の改良を進めた。細胞選択性ペプチドにより校正された人工ECM被覆人工血管材料の invitro および invivo 評価。ポリプロラクトン製の人工血管材料であるナノファイバーシートにペプチドを固着化する系を開発し、固着のみにて各細胞の選択性が示せることを invitro にて確認した。物性評価においては、各種測定法を試みたが、最も安定性の高い接触角およびゼータ電位測定を用いる評価系を確認し、これを用いて選択性ペプチドが最も効果的に選択性を示すための基礎物性マップを作製した。ただし、invivo に興じるために十分な人工血管を作出するには至らなかった。細胞選択性ペプチドの組合せ効果の再検証。ペプチドを組み合わせた評価を行うためにはポリマー上へ固定化結合法を開発しなくてはならず、アミノ基導入 PNIPAM の合成開発およびアミノ酸の PCL 上への導入系の開発を進めた。結果幾つかの有機合成方法を用いて足場材料にクリックケミストリーで利用できる活性基を導入できる系を見出すことができた。

H25 年度は特にこれまでのスクリーニングで取り漏らしてきたペプチドの細胞選択性を検証するため、さらに検証範囲を insilicoscreening との組合せ検証の他に、8000 種類の網羅的 3 残基配列の ECM 結合能、および、血栓原因物質トロンピン結合能をデータ取得し、これまで得られてきた細胞選択性ペプチドおよびミニマム ECM 配列のさらなる選抜と特徴付けを行った。さらには、これら医療機器に応用する実用的検証を進め、ポリプロラクトンでの人工血管形成を行ったが、この際発見された「ポリマーとペプチドとの組合せ」という影響によるペプチド機能の増強や欠失という現象をヒントに、ポリマーの物性値およびこれまで取得してきた細胞選択性ペプチドの組合せ効果を検証できる機能性表面の設計に成功した。結果、PCL などの人工血管の素材ポリマーの上で、最も強く細胞選択性を発揮できるペプチド配列およびその物性ルールを発見するに至り、研究目標であったミニマム ECM をたった 3 残基のアミノ酸配列のペプチドと、医療材料との組合せで設計できる可能性を示唆することに成功した。これらの結果は、ECM を代替する人工ペプチドの発見という意味だけでなく、医療機器のペプチド被覆デザイン方法の最適化方法の発見でもあり、当初の研究目標としての人工ミニマム ECM 配列の設計に成功したと同時に、重要なデザイン方法の発見であると考えている。

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)

Kanie K, Narita Y, Zhao Y, Kuwabara F, Satake M, Honda S, Kaneko H, Yoshioka T, Okochi M, Honda H, Kato R.: Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells., *Biotechnology Bioengineering*, 109(7),1808-1816 (2012) 査読有

〔学会発表〕(計 22 件)

1. Rio Kurimoto, Design of medical device surface for vascular tissue regeneration, International Symposium on Smart Biomaterials, NIMS, 筑波, Poster
2. 蟹江慧、栗本理央、荏原充宏、井戸田直和、成田裕司、本多裕之、加藤竜司, 医療機器高機能化のための表面・生体分子・細胞接着の最適化界面ツール, 第 13 回日本再生医療学会, 京都国際会議場, 京都, Oral
3. 栗本理央、蟹江慧、荏原充宏、井戸田直和、鈴木庸元、成田裕司、本多裕之、加藤竜司, 医療機器設計を目指したペプチド修飾材料表面の物性評価と細胞接着の関係, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀、東京, Oral
4. 蟹江慧、趙瑛梓、大脇潤己、桑原史明、佐竹真、兼子博章、成田裕司、本多裕之、加藤竜司, 医療機器被覆のための細胞選択的接着ペプチドの探索, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀、東京, Oral
5. 蟹江慧、鈴木庸元、成田裕司、本多裕之、加藤竜司, 骨再生促進のための骨芽細胞成熟化ペプチドのスクリーニング法の開発, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島国際会議場、広島, Poster
6. Tsuneharu Suzuki, Kei Kanie, Yuuji Narita, Hiroyuki Honda and Ryuji Kato, Screening of cell-maturation peptides for enhancing bone regeneration, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, 名古屋大学、愛知, Poster
7. Rio Kurimoto, Kei Kanie, Mitsuhiro Ebara, Naokazu Idota, Tsuneharu Suzuki, Yuji Narita, Hiroyuki Honda and Ryuji Kato, Design of medical device surface for vascular tissue regeneration, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, 名古屋大学、愛知, Poster
8. Kei Kanie, Junki Owaki, Yuji Narita,

- Yingzi Zhao, Fumiaki Kuwabara, Makoto Satake, Susumu Honda, Hiroaki Kaneko, Hiroyuki Honda and Ryuji Kato, Screening of cell-specific adhesion peptides for medical device coating, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, 名古屋大学、愛知, Poster
9. Ryuji Kato, Hiroyuki Honda, Peptide-based Interpretation of Cell-type Specific Adhesion for Tissue Engineering, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, 名古屋大学、愛知, Symposium
 10. 鈴木 庸元, 蟹江慧, 成田 裕司, 本多 裕之, 加藤竜司, 骨芽細胞成熟化促進ペプチドの網羅的スクリーニング法の開発, 2012 年度 日本生物工学会若手研究者の集い, フェニックスシーアガイアリゾー、宮崎, Poster
 11. 蟹江 慧, 加賀 千晶, 森川 健正, 山下 祐加, 長岡 利, 本多 裕之, 加藤竜司, 情報処理解析を用いた胆汁酸結合短鎖ペプチドの効率的探索と解釈, 日本薬学会第 133 年会, パシフィコ横浜、神奈川, Poster
 12. 蟹江 慧, 鈴木 庸元, 成田 裕司, 本多 裕之, 加藤竜司, 骨芽細胞成熟化促進ペプチドの網羅的スクリーニング法の開発, 第 12 回日本再生医療学会, パシフィコ横浜、神奈川, Poster
 13. 蟹江 慧, 大脇 潤己, 趙 瑛梓, 桑原 史明, 成田 裕司, 佐竹 真, 兼子 博章, 本多 裕之, 加藤竜司, 再生促進医療機器被覆のための細胞選択的ペプチドの探索, 化学工学会第 78 年会, 大阪大学豊中キャンパス、大阪, Oral
 14. K. Kanie, S. Nagaoka, C. Kaga, H. Honda, R. Kato, Enhanced screening and understanding of hypolipidemic peptides assisted by informatics, 生命医薬情報学連合大会, TowerHall 船堀, 東京, Poster
 15. Kei Kanie, Junki Owaki, Yingzi Zhao, Fumiaki Kuwabara, Makoto Satake, Susumu Honda, Hiroaki Kaneko, Yuji Narita, Hiroyuki Honda and Ryuji Kato, Comprehensive screening of cell-selective adhesion peptides and characteristic analysis by using clustering method, International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting, Pacifico Yokohama, Yokohama, Oral
 16. 蟹江慧, 大脇潤己, 成田裕司, 趙瑛梓, 桑原史明, 佐竹真, 本多裕之, 加藤竜司, 再生促進型医療機器表面改質のための細胞選択的ペプチドの網羅的探索, 第 11 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜、横浜, Oral
 17. 蟹江慧, 近藤優人, 大脇潤己, 成田裕司, 佐竹真, 本多裕之, 加藤竜司, 細胞選択性ペプチド含有エレクトロスピンニングファイバーシートの有効性, 第 11 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜、横浜, Poster
 18. Ryuji Kato, Peptide coating for selective cell adhesion on the medical device, International Conference on Thin Films (ICTF-15), Kyoto Terresa, Kyoto, Oral
 19. 大脇潤己, 蟹江慧, 加藤竜司, 趙瑛梓, 桑原史明, 佐竹真, 本多進, 兼子博章, 成田裕司, 本多裕之, 再生促進医療機器被覆のための細胞選択的接着ペプチドの効率的探索, 第 63 回生物工学会大会, 東京農工大学、東京, Oral
 20. 大脇潤己, 蟹江慧, 加藤竜司, 成田裕司, 本多裕之, クラスタリングを用いた細胞選択性ペプチドの網羅的探索と特性分析, 化学工学会第 43 回秋季大会, 名古屋工業大学、名古屋, Poster
 21. 近藤優人, 大脇潤己, 蟹江慧, 加藤竜司, 成田裕司, 本多裕之, コラーゲン Type IV 選択性ペプチドの探索, 化学工学会第 43 回秋季大会, 名古屋工業大学、名古屋, Poster
 22. 大脇潤己, 蟹江慧, 加藤竜司, 成田裕司, 大河内美奈, 本多裕之, 再生促進医療機器被覆のための細胞選択性ペプチド探索, 生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー2011, 春日井びゅうほてる、山梨, Poster
- 〔産業財産権〕
出願状況（国内出願準備中 計 2 件）
- 6 . 研究組織
(1)研究代表者
加藤 竜司 (KATO, Ryuji)
名古屋大学・大学院創薬科学研究科・准教授
研究者番号 : 50377884
- (2)研究分担者 なし
- (3)連携研究者
成田 裕司 (NARITA, Yuji)
名古屋大学・医学系研究科・講師
研究者番号 : 60378221