

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500530

研究課題名(和文) 合成マトリゲルの創製

研究課題名(英文) Development of Matrigel mimicked biomaterial

## 研究代表者

保住 建太郎 (Hozumi, Kentaro)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10453804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞の足場として汎用されているマトリゲルの主成分であるラミニンの機能を、合成ペプチドを用いて解析し、得られたラミニン由来活性ペプチドを用いた合成マトリゲル(ペプチド多糖マトリックス)の開発を目指した。研究期間中に、インテグリンと特異的に結合するラミニン由来ペプチドの探索と、レセプター特異的活性ペプチドを混合した混合ペプチド多糖マトリックスの生物活性をコントロールする方法に関して検証を行った。新たなインテグリン結合ペプチドを同定すると共に、レセプター特異的なペプチドの種類・混合比によって混合ペプチド多糖マトリックスの生物活性を促進および減少させる混合レシピを開発した。

研究成果の概要(英文)：Matrigel is one of the extensive and common cell culture matrices, which promotes cell adhesion and maintains the pluripotency of stem cells. The major component of Matrigel is laminin, a multi-functional extracellular matrix protein. Multi-laminin derived active peptides conjugated polysaccharide matrices are explored to develop the cell adhesive matrix that is mimicking the function of Matrigel. The biological activities of multi-peptide-polysaccharide matrices could control by the optimized selection and mixture ratios of different active peptides. These findings are critical to design the Matrigel mimicked biomaterials.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞外マトリックス 基底膜 マトリゲル ラミニン ペプチド 高分子多糖 インテグリン クロストーク

1. 研究開始当初の背景

細胞工学や再生医療分野では、生体内の細胞外マトリックス (ECM) を模倣した細胞培養基質のスタンダードとして、マトリゲルを利用しているが、マウス腫瘍由来であるため医療への応用は困難となっている。マトリゲルは様々なレセプターを介して細胞に作用する ECM タンパク質複合体で、人工的な模倣は困難であると考えられていた。一方、これまで ECM の機能解析には、ECM のフラグメント (酵素分解物、組換えタンパク質、合成ペプチドなど) を用いた広範な研究が行われてきた。ECM は、酵素消化されることにより活性が変化し新たな機能を発現することが知られ、組換えタンパク質やペプチドを用いた研究から分子全体では見えてこなかった活性が多数報告されてきた。そこで我々は、複雑な機能を示す ECM を人工的に構築するために、活性の異なるフラグメント (合成ペプチド) を混合することで ECM タンパク質の機能を模倣する方法の開発を試みてきた。

2. 研究の目的

以前から、ECM タンパク質の一種でマトリゲルの主成分であるラミニンの活性配列を、合成ペプチドを用いて同定してきた。また、得られた様々な活性ペプチドを高分子多糖に固定化することで、生物活性を有した高分子多糖マトリックスが構築できることを明らかにしてきた。本研究ではラミニン由来活性ペプチド-高分子多糖マトリックスからなる人工 ECM ともいえる合成マトリゲルの開発を目指した。具体的には、新規ラミニン由来活性ペプチドのレセプターを決定し、レセプター特異的に結合するペプチドをキトサン、アルギン酸、アガロース、ヒアルロン酸などの高分子多糖類に固定化する。得られた合成ペプチド-高分子多糖マトリックスの生物活性パラメーター (ペプチドの種類とペプチド混合率) を調整しながら様々な細胞を用いて接着・増殖・分化を評価することで、細胞の挙動をコントロール可能で、マトリゲルを模倣した細胞培養基質の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規ラミニン由来活性ペプチドの同定

ラミニン由来ペプチド-高分子多糖マトリックスに利用可能な新規活性ペプチドの同定に向けて、これまでスクリーニングがなされていなかったラミニン  $\alpha 2$  鎖の N 末端領域に注目した。手法としては、ラミニン  $\alpha 2$  鎖の N 末端領域由来合成ペプチドの生物活性を、細胞接着、伸展、神経突起伸長、細胞内シグナル解析アッセイ等で試験した。また、ペプチドとタンパク質の相関性の検証と、タンパク質とペプチドの活性を比較検討するために各ペプチドに対応する変異導入組換えタンパク質を作製し、その生物活性を評価した。

(2) レセプター特異的な混合パラメーターの最適化

異なる複数のレセプターに作用することで、マトリゲルの主要な機能を担っている多機能タンパク質ラミニンの生物活性を模倣するために、活性の異なるラミニン由来ペプチドを混合した多機能マトリックス (混合ペプチド-高分子多糖マトリックス) の開発を行った。本研究計画では、混合ペプチド-高分子多糖マトリックスの細胞接着活性、細胞伸展活性に注目し、活性ペプチドを混合することによる相乗的な生物活性の上昇と、逆に抑制する相乗効果について検証した。

(3) マウス幹細胞を用いた混合ペプチドキトサン膜の細胞接着活性の検証

マトリゲルの主成分であるラミニン-111 由来の活性ペプチドを用いて、マウス ES 細胞 (B6-6) の細胞接着活性の検証を行った。1 種類の単体ペプチド-高分子多糖マトリックスでのスクリーニング後は、活性のあったペプチドを混合した混合ペプチドを用いた検証も行った。

4. 研究成果

(1) 新規ラミニン由来活性ペプチドの同定

基底膜の構成成分であるラミニンは  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖、 $\gamma$  鎖からなるヘテロトリマー構造をとっており、ラミニン  $\alpha$  鎖は組織や発生段階特異的に発現することでバラエティに富む基底膜機能の発現に寄与している。ラミニン  $\alpha 2$  鎖は神経や筋組織特異的に発現し、N 末端短腕部や C 末端 G ドメインの遺伝子異常では筋ジストロフィーや神経変性を引き起こす事が報告されている。しかし、これまで G ドメインに関しては活性部位の同定をはじめ様々な研究が行われてきたが、N 末端領域に関する研究はあまり進んでいない。本研究ではマウスラミニン  $\alpha 2$  鎖 N 末端領域 (短腕部とコイルド-コイル領域にわたる 2149 アミノ酸配列) を網羅する 214 種類の合成ペプチド (A2-1 から A2-214) と 8 種類の組換えタンパク質を調製し、細胞接着活性、

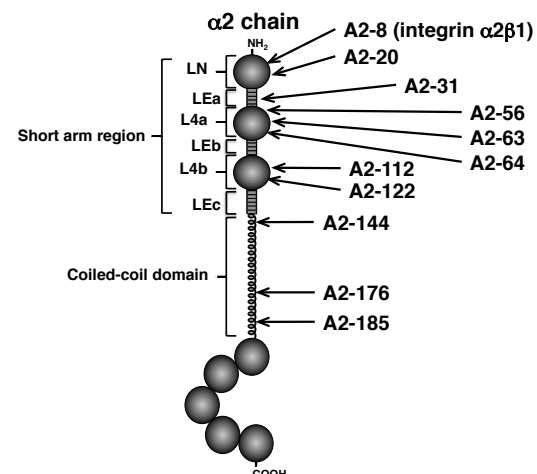


図 ラミニン  $\alpha 2$  鎖 N 末端領域の活性ペプチド

細胞伸展活性、神経突起伸張促進活性を評価した。214 種類の合成ペプチドを用いて細胞接着活性スクリーニングを行った結果、11 種類のペプチドが細胞接着活性を示した。次に 11 種類の活性ペプチドの細胞接着活性に関与するレセプターの情報を検証するために、ヘパリンおよび EDTA による細胞接着阻害実験を行ったところ、3 種類のペプチドはヘパリンと EDTA の両方によって、7 種類のペプチドはヘパリンのみによって、A2-8 (YHYVTITLDLQQ, aa 117-128) は EDTA のみによって細胞接着活性が阻害され、A2-8 の細胞接着活性にインテグリンの関与が示唆された。抗インテグリン抗体を用いた細胞接着阻害実験を行ったところ抗  $\alpha 2\beta 1$  インテグリン抗体によって細胞接着が阻害された。また、N 末端短腕部の組換えタンパク質 rec-a2N と、N 末端 LN ドメインの組換えタンパク質 rec-a2LN も細胞接着活性を持ち、抗  $\alpha 2\beta 1$  インテグリン抗体によって接着が阻害された。これらの結果から、ラミニン  $\alpha 2$  鎖 N 末端の LN ドメインが N 末端短腕部の細胞接着活性に重要であり、A2-8 配列を介して  $\alpha 2\beta 1$  インテグリンと結合することが示唆された。次に A2-8 配列中のアミノ酸を 1 残基ずつ Ala に置換したペプチドを合成し細胞接着活性を評価したところ、122 番目の Ile 残基と 124 番目の Leu 残基、125 番目の Asp 残基が必須であることがわかった。さらに、rec-a2LN に変異を導入したところ、この 3 アミノ酸残基がいずれも rec-a2LN の細胞接着活性に重要であることが示された。以上の結果から、合成ペプチドを用いたスクリーニングによりマウスラミニン  $\alpha 2$  鎖 N 末端短腕部の活性配列部位を同定できた。今後、A2-8 や他の活性ペプチドを用いた  $\alpha 2$  鎖の機能解析が期待される (発表論文①)。なお、本研究成果は結合組織研究の進歩に寄与する顕著な研究として、日本結合組織学会大高賞の受賞対象となった。

## (2) レセプター特異的な混合パラメーターの最適化

ペプチド-高分子多糖マトリックスは、活性ペプチドを固定化することによりその生物活性を増強し、細胞膜上の特異的なレセプターを介して細胞接着を促進する。一方で、生体内の細胞は、インテグリンやシンデカンなど様々なレセプターを介して ECM を同時に認識することで生体機能の維持、発生、創傷治癒など動的および静的な機能を担っている。そこで、インテグリン結合ペプチドとシンデカン結合ペプチドを固定化した 2 種混合ペプチド-高分子多糖マトリックスを調製したところ、レセプター間の相乗的なクロストークを誘起することで顕著な生物活性の上昇を示した。この結果、ペプチド-高分子多糖マトリックスを用いることで生体内でおきている異なるレセプター間クロストーク

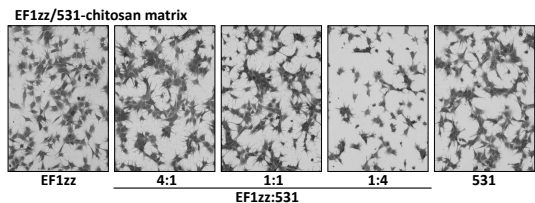


図 異なるインテグリン結合ペプチドを混合すると細胞接着活性が低下した

クを人工的に模倣することを可能とした (発表論文⑤)。一方、ECM と結合する主要なレセプターであるインテグリンは 20 種類のサブタイプが知られているが、異なるサブタイプ間のインテグリン-インテグリンクロストークに関しては未だ限定的な検証に限られている。本研究では、6 種類の異なるインテグリン結合ペプチドを様々な組合せで混合した混合ペプチド-高分子多糖マトリックスを調製し、異なるサブタイプ間でのインテグリン-インテグリンクロストークを検証した。インテグリン結合ペプチドを固定化した 6 種類のペプチド-キトサンマトリックスは、全てが細胞接着活性を示し、接着した細胞はインテグリンを介した細胞接着に特異的な伸展形態を示した。次に、インテグリン-インテグリン間クロストークを検討するために 6 種類のペプチドを 2 種ずつ異なるモル比 (9:1, 4:1, 1:1, 1:4, 1:9) で混合した 2 種混合ペプチド-キトサンマトリックスを様々な組合せ (14 種類) で作成し、細胞接着活性におよぼす影響を検証した。9 種類の組み合わせでは混合による変化は観察されず、3 種類の組合せは混合することにより細胞接着活性が上昇し、インテグリン間クロストークにより相乗的に細胞接着活性を促進していることが示された。インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  とインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  結合ペプチドの組み合わせでは細胞接着活性が減少し、負の生物活性を示すクロストークを誘起することが示唆されインテグリン  $\alpha 2\beta 1$  とインテグリン  $\alpha 3\beta 1$  結合ペプチドの組み合わせでは細胞接着活性が減少した。負のクロストークを調整するメカニズムを検証するためにインテグリンおよび細胞内シグナルの活性を検証した結果、インテグリンが活性化されておらず、その下流にあるシグナル FAK も活性化していないこと、PI3K を介して細胞接着

Schematic drawing of HDF attachment suppression mechanisms on the EF1zz/531 (1:4)-polysaccharide matrix

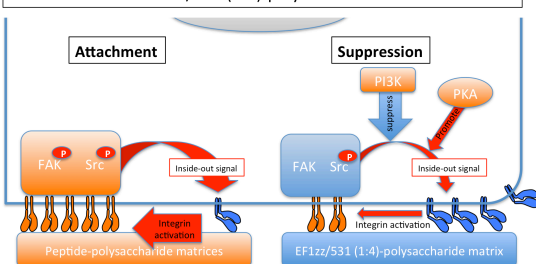


図 細胞接着活性低下のメカニズム

活性を減少させていること、PKA を介して細胞接着活性の減少に干渉すること等により、細胞接着の低下を引き起こしていることがわかった（発表論文⑦）。これらの結果は、異なるレセプターに作用するペプチドを混合することで、細胞の機能をコントロールできるペプチド-高分子多糖マトリックスの作製が可能であり、本方法を用いることにより細胞レセプター間のクロストークを *in vitro* にて詳細に検証できること、異なる活性を持つレセプター特異的結合性リガンドを混合した人工マトリゲルのデザインにはレセプター間クロストークパラメーターの精査が重要であることを強く示唆している。

(3) マウス幹細胞を用いた混合ペプチドキトサン膜の細胞接着活性の検証

幹細胞が多く発現している細胞表面レセプター（インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  と  $\alpha 3 \beta 1$ ）に着目し、これらと特異的に結合するペプチドを固定化したペプチド-キトサンマトリックスを用いて幹細胞培養能を評価した。接着活性試験の結果、インテグリンの種類によって幹細胞接着活性が異なることが分かった。また、異なるインテグリンと結合するペプチドを 1:4 で混合すると接着活性が上昇することがわかった。以上の結果から、インテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  と  $\alpha 3 \beta 1$  と結合するペプチドを固定化することによってマトリゲルの一つの機能である幹細胞培養基材として、混合ペプチド-高分子多糖マトリックスの応用に向けた可能性を示すことが来た。

また、以上の結果を社会に開示する目的として、ペプチド-高分子多糖マトリックスの開発とマトリゲル作製へ向けた応用に関してまとめた総説を 2 報発表した（発表論文⑧、発表図書①）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）

- ① Hozumi K, Ishikawa M, Hayashi T, Yamada Y, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M. (2012) Identification of cell adhesive sequences in the N-terminal region of the laminin  $\alpha 2$  chain. *J. Biol. Chem.*, 287, 25111-25112
- ② Katagiri F, Takeyama K, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M. (2012) Structural requirement of fibrogenic laminin-derived peptide A119 (LSNIDYILIKAS) for amyloid-like fibril formation and cellular activity. *Biochemistry*, 51, 8218-8225
- ③ Kikkawa Y, Hozumi K, Katagiri F, Nomizu M, Kleinman HK, Koblinski JE. (2013) Laminin-111-derived peptides and cancer. *Cell Adh. Migr.*, 7, 150-256
- ④ Kikkawa Y, Ogawa T, Sudo R, Yamada Y, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M, Miner JH. (2013) The Lutheran/Basal Cell Adhesion Molecule Promotes Tumor Cell Migration by

Modulating Integrin-Mediated Cell Attachment to Laminin-511 Protein. *J. Biol. Chem.*, 288, 30990-31001

⑤ Otagiri D, Yamada Y, Hozumi K, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M. (2013) Cell Attachment and Spreading Activity of Mixed Laminin Peptide-Chitosan Membranes. *Biopolymers*, 100, 751-759

⑥ Yamada Y, Hozumi K, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M. (2013) Laminin-111-Derived Peptide-Hyaluronate Hydrogels as a Synthetic Basement Membrane. *Biomaterials*, 34, 6539-6547

⑦ Hozumi K, Fujimori C, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M. (2014) Suppression of Cell Adhesion Through Specific Integrin Crosstalk on Mixed Peptide-polysaccharide Matrices. *Biomaterials*, 37, 73-81

⑧ Hozumi K, Kumai J, Yamada Y, Nomizu M. (2015) Active Peptide-conjugated Chitosan Matrices as an Artificial Basement Membrane. *Polymers*, 7, 281-297

〔学会発表〕（計 2 2 件）

① 保住建太郎等. ラミニン-111由来活性ペプチドを混合付加した高分子マトリックスの生物活性. 第44回日本結合組織学会学術大会 第59回マトリックス研究会 大会 合同学術集会; 20120607-20120608; 東京

② K. Hozumi, Y. Yamada, F. Katagiri, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Multifunctional peptide-polysaccharide matrices using laminin derived peptides. 2012 Gordon Research Conference -Signal Transduction by Engineered Extracellular Matrices; 20120708-20120713; Biddeford, ME, USA.

③ 保住建太郎等. 異なる細胞接着活性ペプチドを混合付加した高分子多糖マトリックスの生物活性. 第61回高分子討論会; 20120919-20120921; 名古屋

④ K. Hozumi, Y. Nishioka, Y. Yamada, F. Katagiri, Y. Kikkawa, et al. Development of multi-peptide-polysaccharide matrices mimicking the biological function of Laminin-111. 第49回ペプチド討論会; 20121107-20121109; 鹿児島市 鹿児島

⑤ K. Hozumi, Y. Yamada, F. Katagiri, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Biological activities of laminin-derived cell adhesive peptides conjugated on polysaccharide matrices. The Third International Conference of the Matrix Biology Working Group of the Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology Emerging Roles of Cell-Matrix Interaction in Human Diseases (招待講演); 20121123; Seoul, Korea

⑥ K. Hozumi, C. Fujimori, F. Katagiri, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Subtype specific integrin

suppression on the integrin binding peptide conjugated polysaccharide matrices. 2012 Annual Meeting the American Society for Cell Biology; 20121215-20121219; San Francisco, CA, USA

⑦ K. Hozumi. Biological activities of laminin derived cell adhesive peptides-polysaccharide matrices. Symposium on The Stem Cell Center of Hadassah Hebrew University Hospital (招待講演); 20130203; Jerusalem, Israel

⑧ K. Hozumi, Y. Yamada, M. Nomizu. Multipeptide-polysaccharide matrices mimicking the biological function of laminin-111. Japan-Israel-USA joint meeting-Application of Laminin in the Tissue Engineering; 20130312; Bethesda, MD, USA

⑨ 保住建太郎等. フィブロネクチン由来活性ペプチドを混合した混合ペプチド-キトサン膜の細胞接着活性. 第45回日本結合組織学会学術大会 第60回マトリックス研究会大会 合同学術集会; 20130628-20130629; 和歌山市 和歌山

⑩ 保住建太郎等. 混合フィブロネクチン由来活性ペプチド-キトサン膜の細胞接着活性. 第62回高分子討論会; 20130911-20130913; 金沢市 石川

⑪ 佐藤和広, 保住建太郎等. ラミニン由来インテグリン結合ペプチドと高分子多糖を用いた人工基底膜の創製. 第62回高分子討論会; 20130911-20130913; 金沢市 石川

⑫ 八幡幸洋, 保住建太郎等. 線維芽細胞の長期培養に適したラミニン由来活性ペプチド-高分子多糖マトリックスの探索. 第62回高分子討論会; 20130911-20130913; 金沢市 石川

⑬ K. Hozumi, M. Miyagi, T. Nakajima, W. Sano, F. Katagiri, et al. Mixed fibronectin derived active peptide conjugated chitosan matrix promoted different cell attachment activity depending on cell types. 4<sup>th</sup> Asia-Pacific International Peptide Symposium/ 50<sup>th</sup> Japanese Peptide Symposium; 20131106-20131108; 吹田市 大阪

⑭ K. Hozumi, C. Fujimori, F. Katagiri, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Mixed fibronectin derived active peptide conjugated chitosan matrix effectively promoted cell attachment. 9<sup>th</sup> Pan Pacific Connective Tissue Symposium; 20131124-20131127; Hong Kong, China

⑮ 保住建太郎. ラミニン由来活性ペプチドを混合固定化した高分子多糖マトリックスの生物活性. 第9回ペプチドフォーラム (招待講演); 20131206; 米沢市 山形

⑯ K. Hozumi, M. Miyagi, T. Nakajima, W. Sano, F. Katagiri, et al. Mixed fibronectin derived multipeptide-chitosan matrix promoted different cell attachment activity depending on cell types. 2013 Annual Meeting the American Society for

Cell Biology; 20131214-20131218; New Orleans, LA, USA

⑰ 保住建太郎等. ラミニン $\alpha$ 2鎖N末端領域における細胞接着活性配列の同定(大高賞受賞記念講演). 第46回日本結合組織学会学術大会 第61回マトリックス研究会大会 合同学術集会 (招待講演); 20140606-20140607; 名古屋

⑱ 保住建太郎. ペプチド高分子多糖マトリックスを用いた受容体間相互作用の解明. 第46回若手ペプチド夏の勉強会 (招待講演); 20140803-20140805; 宮津市 京都

⑲ 熊井準, 保住建太郎等. 受容体特異的ペプチド-高分子マトリックスの生物活性に及ぼすスパーサー効果. 第63回高分子討論会; 2014年09月24日; 長崎市 長崎

⑳ 保住建太郎等. インテグリン-インテグリン間クロストークを誘起するバイオマテリアルの開発. 第63回高分子討論会; 20140924-20140926; 長崎市 長崎

㉑ K. Hozumi, C. Fujimori, F. Katagiri, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Integrin-integrin crosstalk promotes and/or suppresses fibroblasts adhesion depending on the integrin subtypes. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2014; 20141012-20141015; Cleveland, OH, USA

㉒ K. Hozumi, C. Fujimori, F. Katagiri, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Integrin-integrin crosstalk suppresses fibroblasts adhesion via PI3K signaling. 2014 Annual Meeting the American Society for Cell Biology; 20141206-20141210; Philadelphia, PA, USA

[図書] (計 1件)

① 保住建太郎, 野水基義. ラミニン由来活性ペプチドを用いた機能性高分子複合体の開発-ペプチド医薬の最前線; 89-93; 2012; (株)シーエムシー出版

[その他]

ホームページ等

東京薬科大学・薬学部・病態生化学教室

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/byotaiseika/ResearchMap>

<http://researchmap.jp/KentaroHozumi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保住建太郎 (HOZUMI KENTARO)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 10453804