

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450493

研究課題名(和文)糖鎖の化学修飾による絹フィブロイン由来血管内皮細胞培養基材の開発

研究課題名(英文) Development of a glycoconjugated silk fibroin substrate for vascular endothelial cell culture

研究代表者

後藤 洋子 (GOTOH, Yohko)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・新機能素材研究開発ユニット・上級研究員

研究者番号：00391574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：蚕が生産する絹フィブロインタンパク質に血管内皮細胞が認識・結合すると考えられるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)糖鎖を導入するため、架橋剤を用いてGlcNAcの二糖の化学修飾を絹フィブロインに行なった。糖鎖修飾絹フィブロインのNMRスペクトル解析とレクチンとの凝集反応から、絹フィブロインへのGlcNAc糖鎖の導入を確認した。糖鎖修飾絹フィブロインは絹フィブロインよりも高い血管内皮細胞の接着性と増殖性を示したことから、糖鎖導入によって絹フィブロインは血管内皮細胞の培養基材に適するように改変されたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Biopolymer silk fibroin was chemically modified with N,N'-diacetylchitobiose bearing N-acetylglucosamine (GlcNAc) using a coupling reagent to incorporate the vascular endothelial cell-binding GlcNAc site into silk fibroin. NMR measurements and the reaction with lectins confirmed the covalent incorporation of GlcNAc into silk fibroin. Attachment and growth of human umbilical vein endothelial cells on the modified silk fibroin were higher than those on silk fibroin. These results suggest that the incorporation of GlcNAc made silk fibroin suitable for vascular endothelial cell culture substrates.

研究分野：農学

キーワード：絹タンパク質 細胞培養足場基材 血管内皮細胞 化学修飾 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

絹フィブロインは蚕が作る繭の主成分の構造タンパク質で外科手術用縫合糸として利用された経緯があり、絹フィブロイン水溶液を原料にしてフィルム・スポンジ・不織布・チューブなどに成形加工することができる。そのため、近年再生医療材料の研究分野において細胞培養用の足場基材や人口血管材料への利用が検討されている。これまでに線維芽細胞・骨芽細胞・軟骨細胞などの培養基材や、間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化誘導培養基材として絹フィブロインが適していることが示されたが、絹フィブロインをそのまま利用するだけでは用途に限界があるため、遺伝子組換えや化学修飾による絹フィブロインの機能改変も行われている。天然の抗血栓機能を持つ血管内皮細胞の接着や増殖が優れた基材は、抗血栓性を有することが必要な人工血管材料としても優れていると考えられることから、遺伝子組換え技術を用いて細胞接着配列や血管内皮細胞増殖因子を導入した絹フィブロインが作出されている。

2. 研究の目的

血管内皮細胞などの間葉系細胞においては、ケラチンと同じ細胞骨格タンパク質に属するピメンチンが細胞表面に出現し、細胞がピメンチンを介して N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 糖鎖を認識して結合することが最近伊勢らによって報告されている。この細胞-糖鎖相互作用に着目し、本研究では合成化学的手法を用いて遺伝子組換え技術では導入が困難な GlcNAc 糖鎖の絹フィブロインへの導入を行い、糖鎖導入によって血管内皮細胞培養基材に適するよう絹フィブロインが改変されるか検証を行った。

3. 研究の方法

GlcNAc 糖鎖を絹フィブロインに導入するため、塩化シアヌルを架橋剤に用いて GlcNAc の二糖 (N,N'-ジアセチルキトビオース) を絹フィブロインのアミノ酸残基に化学修飾した。作出した糖鎖修飾絹フィブロインの核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの解析から目的糖鎖の導入を確認するとともに、導入糖鎖量も明らかにした。細胞認識部位としての導入糖鎖の機能発現性を事前に検証するため、GlcNAc 糖鎖を特異的に認識して結合する小麦胚芽レクチン (WGA) と糖鎖修飾絹フィブロインとの凝集反応試験を行い、紫外可視分光光度計を用いて反応を検出した。糖鎖修飾絹フィブロインあるいは絹フィブロインを吸着コートしたマイクロプレートを足場基材に用いてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の培養を行い、各基材における細胞接着と細胞増殖の比較評価から血管内皮細胞培養基材としての修飾絹フィブロインの適性を検証した。

4. 研究成果

(1) 糖鎖修飾絹フィブロインの作出と NMR 解析

繭を出発材料とし、繭の精練によって得られた絹フィブロイン繊維を臭化リチウム水溶液に溶解して、原料の絹フィブロイン水溶液を調製した。GlcNAc の二糖と架橋剤の反応を行って修飾剤を合成し、修飾剤と絹フィブロインのアミノ酸残基 (チロシン・リジン残基) との反応を行って、目的の糖鎖修飾絹フィブロイン (図 1) を合成した。

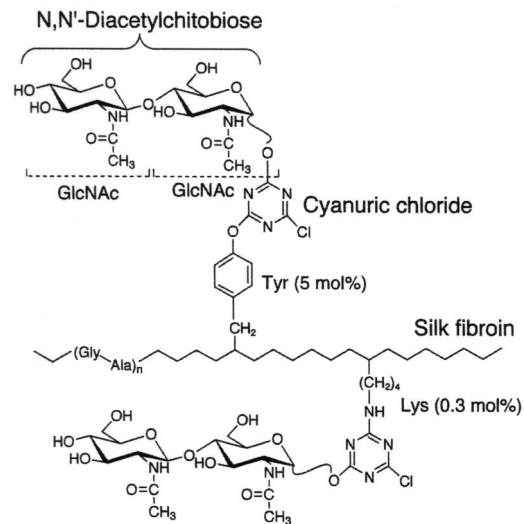


図 1. 糖鎖修飾絹フィブロインの化学構造

化学修飾反応後に透析・限外ろ過によって精製した修飾絹フィブロインの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定を行った。スペクトルでは糖鎖由来のピークが 2ppm 付近に現れるとともに、7ppm 付近のチロシン残基由来ピークの低磁場シフトが観測されたことから、目的糖鎖の導入とチロシン残基が修飾剤との反応サイトであることが確認された (図 2)。また、混合比既知の原料の二糖と絹フィブロインの混合物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおける 2ppm 付近の糖鎖由来ピークの積分値と 1.3ppm 付近のアラニン残基由来ピークの積分値の比較から、修飾絹フィブロイン中の糖鎖含有量を 10wt% と推定した。

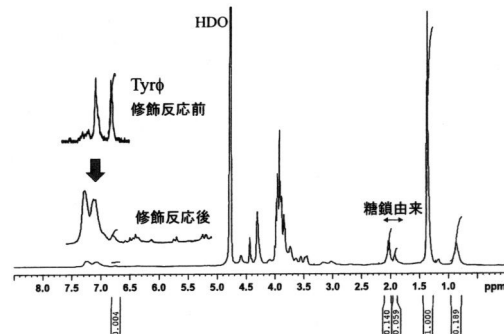


図 2. 糖鎖修飾絹フィブロインの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

(2) 糖鎖修飾絹フィブロインとレクチンとの凝集反応

絹フィブロイン水溶液に WGA を加えても濁度の上昇が観測されなかったのに対し、糖鎖修飾絹フィブロイン水溶液では WGA が結合し凝集したことによる濁度の上昇が観測された。また、修飾絹フィブロインと WGA の混合液に WGA と高い親和性を持つ GlcNAc の二糖を加えたところ、糖との結合置換による急激な濁度減少が観測された(図3)。これらの結果は絹フィブロインに導入した糖鎖が WGA の認識部位として機能したことを示し、導入糖鎖が細胞の認識部位としても機能すると考えられる。

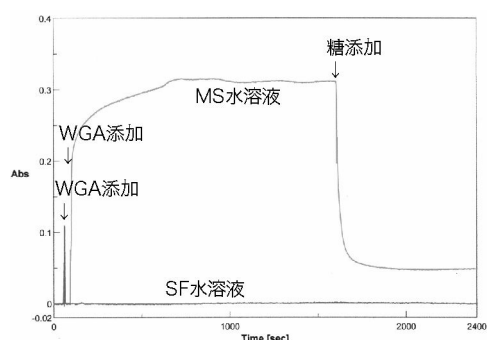


図3 . WGA 添加による糖鎖修飾絹フィブロイン (MS) 水溶液及び絹フィブロイン (SF) 水溶液の濁度変化

(3) 糖鎖修飾絹フィブロインにおける血管内皮細胞の接着性と増殖性の評価

糖鎖修飾絹フィブロインあるいは絹フィブロインをコートしたマイクロプレートと、比較対照区のノンコートのマイクロプレートにおいて HUVEC を播種し、2%血清添加培地を用いて HUVEC の培養を行った。培養2時間後の各基材において接着した細胞数を WST-8 アッセイにより相対評価したところ、絹フィブロインではノンコートプレートに比べ低い接着数を示したが、糖鎖修飾絹フィブロインにおいてはノンコートプレートと同等の接着数を示した(図4)。また、各基材における接着細胞の形態を顕微鏡観察したところ、修飾絹フィブロインとノンコートプレート上の細胞の大部分は伸展していたのに対し、絹フィブロイン上では球状で他の基材に比べて細胞接着が抑制されていることが示唆された(図5)。

一方、培養3日後の各基材において増殖した細胞数についても WST-8 アッセイにより相対評価したところ、絹フィブロインはノンコートプレートより低い増殖数を示したが、糖鎖修飾絹フィブロインはノンコートプレートより高い増殖数を示した(図6)。なお、各基材における増殖細胞の形態については差がなく、いずれの基材においても伸展形態を示した。

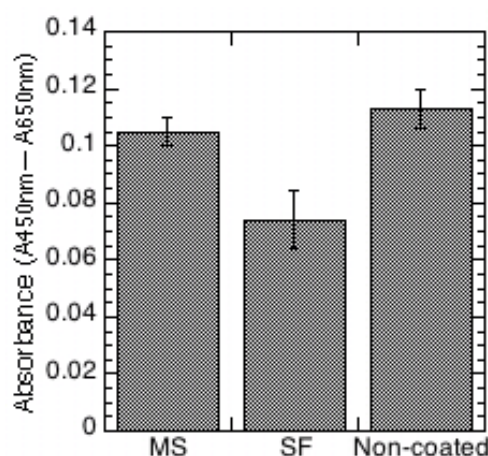


図4 .WST-8 アッセイによる糖鎖修飾絹フィブロイン (MS)・絹フィブロイン (SF)・ノンコートプレートにおける HUVEC の接着性評価

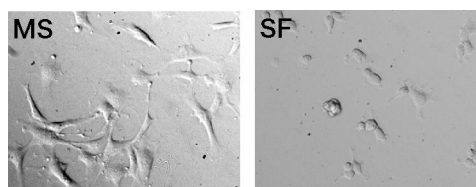


図5 . 糖鎖修飾絹フィブロイン (MS) と絹フィブロイン (SF) における HUVEC の接着形態

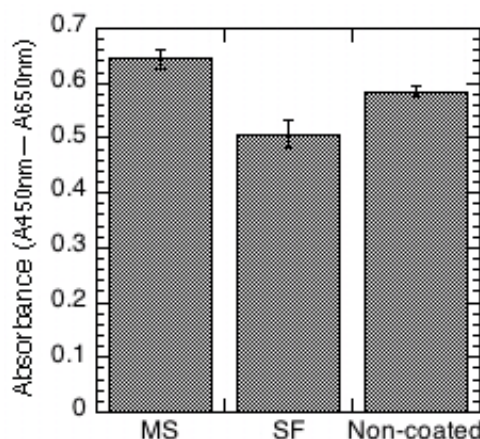


図6 .WST-8 アッセイによる糖鎖修飾絹フィブロイン (MS)・絹フィブロイン (SF)・ノンコートプレートにおける HUVEC の増殖性評価

以上の結果から、絹フィブロインへの GlcNAc 糖鎖の導入は血管内皮細胞の接着と増殖を向上させ、血管内皮細胞培養足場基材に適するよう改変する方法として有効性があると考えられる。今後は細胞の接着や増殖の促進により効果のある GlcNAc 糖鎖の導入法を検索する目的で別のオリゴ糖による化学修飾を検討するとともに、絹フィブロインへの GlcNAc 糖鎖の導入が血管内皮細胞以外の細胞の接着等に影響を与えるのか検討を進める予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

後藤洋子、山崎俊正、石塚保行、新見伸吾、伊勢裕彦、血管再生足場材料としてのN-アセチルグルコサミン糖鎖修飾絹フィブロインの創出、第65回高分子学会年次大会、2016年5月25日、神戸国際会議場・展示場(神戸市)

後藤洋子、山崎俊正、石塚保行、新見伸吾、伊勢裕彦、絹フィブロインにおける糖鎖修飾導入と血管内皮細胞の接着性評価、平成28年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(日本蚕糸学会第86回大会)、2016年3月18日、京都工芸繊維大学(京都市)

後藤洋子、石塚保行、新見伸吾、絹フィブロインおよびコラーゲンをコートした培養基材における血管内皮細胞の接着性評価、第1回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会、2015年2月26日、東京農工大学(東京都小金井市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 洋子(GOTOH, Yohko)
国立研究開発法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え研究センター・新機能素材研究開発ユニット・上級研究員
研究者番号：00391574

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

新見 伸吾(NIIMI, Shingo)
国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・部長
研究者番号：80172609