

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560228

研究課題名(和文)細胞特異的なエッセンシャルペプチドマトリックス(EP-Matrix)の創製

研究課題名(英文)Development of cell-specific essential peptide matrix (EP-Matrix)

## 研究代表者

野水 基義(NOMIZU, MOTYOYOSHI)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00311522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラミニン-111の由来の活性ペプチド(60種類)を高分子多糖のキトサンに固定化したペプチド-マトリックスを作成し、線維芽細胞と神経細胞を用い生物活性を測定し、活性の違いにより5種類のグループに分類した。各グループの中で最も活性の強いエッセンシャルなペプチド-マトリックスを選定した。さらに高活性なペプチド-マトリックスを作製するため、ペプチドと多糖の間のスペーサーの検討を行い、各ペプチドの最適なスペーサーを見いだした。最適なスペーサーを用いてエッセンシャルなペプチド-マトリックスを組み合わせることで、組織工学に応用可能なバイオマテリアルの開発が可能になった。

研究成果の概要(英文)：Sixty active peptides derived from laminin-111 were conjugated onto a chitosan matrix and examined their biological activity using fibroblasts and neuronal cells. Twenty-six peptide-chitosan matrices promoted biological activities and were categorized into five groups depending on their activities. The most active peptide-chitosan matrices were selected in each group as an essential peptide matrix. Additionally, the effect of spacer on the biological activity of each peptide-chitosan matrix was examined using various lengths of spacers. The spacer-optimization for each peptide is important for designing effective peptide-chitosan matrices. The mixed essential peptide-chitosan matrices with the optimized spacer are useful as a biomaterial for tissue engineering.

研究分野：生化学

キーワード：バイオマテリアル 細胞外マトリックス 基底膜 ラミニン ペプチド マトリックス 細胞接着 キトサン

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療への応用を目的とした組織・細胞工学の発達により、細胞特異的なバイオマテリアル(足場材料)の開発が求められてきている。また、今までの培養皿での2次元培養に加え、生体本来の環境に近い3次元での培養が必須のものと認識されるようになってきた。生体内の細胞が置かれている環境を模倣した人工細胞外マトリックスの中で様々な細胞を培養することにより、細胞の本来の機能が再生できることがわかってきた。

基底膜はうすい膜状の細胞外マトリックスで、ほとんどの組織に存在し、発生や再生、器官形成、血管新生、創傷治癒などに深く関与している。基底膜の主役的存在であるラミニンは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3種類の鎖からなるヘテロ3量体タンパク質で、15種類のアイソフォームが知られている。我々は、全ラミニンアイソフォームの中に埋め込まれている活性ペプチド配列を探索する目的で、約3,000種類の合成ペプチドによる全ラミニン分子の網羅的スクリーニングを行い、これまでに50種類以上の特徴的な活性ペプチドを同定してきた。これらの中に、インテグリン、シンデカン、ジストログリカン、CD44などの細胞膜レセプターに特異的に結合するものや、神経細胞や血管内皮など細胞特異的に作用するものを発見してきた。また、これらのラミニン由来活性ペプチドをキトサンなどの高分子多糖に結合することにより、細胞に対して効率的に作用するペプチド-多糖マトリックスの開発を行ってきた。また、レセプターの異なる複数の活性ペプチドを同時に高分子多糖マトリックスに結合することにより、相乗効果によりペプチドの活性が飛躍的に増大することを見いだしてきた。このように、ペプチドを固定化したペプチド-多糖マトリックスの実際の医療応用可能なバイオマテリアルとしての開発が期待されてきた。

## 2. 研究の目的

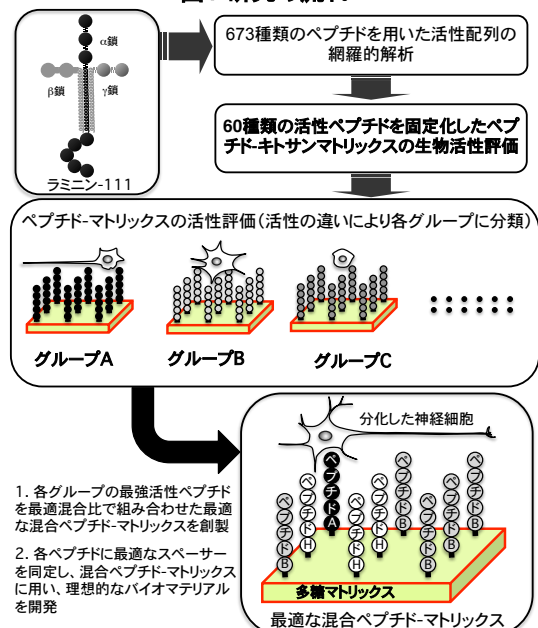
本研究は細胞外マトリックスタンパク質のラミニンの分子解剖によって同定された活性ペプチドの中からエッセンシャルなものを抽出し、それらを用いて細胞特異的に作用するエッセンシャルペプチドマトリックスとして再構築するもので、細胞工学分野に革新的な基材を提供することのできる斬新的なテーマである。個体の発生や再生の場を提供する基底膜は、構成するタンパク質は互いに集合してマトリックスを形成しており、細胞に対し最も機能的に働いている細胞外マトリックスである。近年、再生医療への応用を目的とした組織・細胞工学の発達により、細胞特異的な培養基材が求められてきている。我々は、すべてのラミニンサブユニットの細胞特異的な機能部位の全容を明らかにする目的で、独自に開発した合成ペプチドを

用いた網羅的な解析を行い、ラミニンアイソフォームの分子解剖を遂行してきた。今までに約3000種類の合成ペプチドの中から数多くの強い活性を持つペプチドを同定し、それらのペプチドの細胞膜上レセプターの同定および細胞内情報伝達の解明を行ってきた。インテグリン、シンデカン、ジストログリカン、CD44などをレセプターとする活性ペプチドを同定してきた。また、ラミニン活性ペプチドを多糖類のキトサンに固定化したペプチドマトリックスを作成したところ、固定化したペプチドによって細胞に対する作用が異なることを見出し、神経細胞に対して神経突起伸長の促進作用を有するペプチド-マトリックスの作成にも成功した。本研究では、我々が同定したラミニン-111由来の60種類の活性ペプチドを用いたペプチド-多糖マトリックスを作製し、生物活性やレセプター特異性の違いによって分類しグループ分けをして、各グループから顕著な活性を持つエッセンシャルペプチドを選び、それらを組み合わせることで多糖マトリックスに組み込むことにより、細胞特異的なエッセンシャルペプチドマトリックス(EP-Matrix)を創製することを目的としている。

## 3. 研究の方法

図1の研究の流れにしたがって研究を行った。我々が同定したレセプターの異なるラミニン-111の活性ペプチド(60種類)を高分子多糖のキトサンマトリックスに固定化した単一ペプチド-キトサンマトリックスを作成し、線維芽細胞と神経細胞を用い、生物活性やレセプター特異性の違いによって6種類のグループに分けた。次に、各グループから顕著な活性を持つエッセンシャルペプチドを選び、それらを組み合わせることで多糖マトリ

図1 研究の流れ



ックスに組み込むことにより、混合ペプチド-マトリックスを作製し、活性を評価した。

### 1、ラミニン活性ペプチドの多糖類への固定化と活性測定

我々がこれまでに同定したレセプターの異なるラミニン活性ペプチドにシステインと2残基グリシンをスペーサーとして付加した60種類のペプチド(CGG-ペプチド)を合成した。2価官能性試薬の *N*-(3-マレイミドベンゾイルオキシ)スクシンイミド(MBS)を付したMB-キトサンにCGG-ペプチドを加え、ペプチドを共有結合でキトサンに固定したペプチド-キトサンマトリックスを作成した。本実験方法は、以前の我々の報告にしたがって行った(*Biomaterials* 31:3237-3243, 2010)。

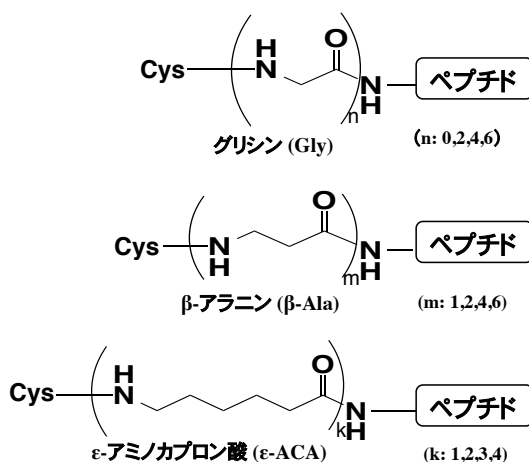
次に、60種類のペプチド-キトサンマトリックス上での線維芽細胞の細胞接着と細胞伸展活性を測定する。細胞接着活性のあったものに関してはEDTAとヘパリンで阻害実験を行った後、EDTAのみで阻害されたペプチドマトリックスの細胞接着活性をインテグリン抗体を用いた阻害実験やレセプター強制発現細胞を用いた実験を行いレセプターの同定を行った。また、60種類のペプチド-キトサンマトリックス上での神経突起伸長活性を測定した。本実験は、以前我々が報告している評価方法にしたがった(*J Neurosci Res* 61:302-312, 2000)。

混合ペプチドキトサンマトリックスは各ペプチドを等モル混合し、MB-キトサンに結合し、活性を測定した。

### 2、様々なスペーサーを用いたペプチド-キトサンマトリックスの合成

活性ペプチドとキトサンとの結合のスペーサーを変化させて、各ペプチドにおける最適なスペーサーを検討した。スペーサーとして、図2に示すようにグリシン(Gly)、β-アラニン(β-Ala)、ε-アミノカプロン酸(ε-ACA)を1~6残基用い、長さを変化させて作成したペプチド-キトサンマトリックスを作製した。

図2 実験に用いたスペーサー



## 4. 研究成果

### 1、ラミニン-111 活性ペプチド (60 種類) のキトサンへの固定化と活性測定

これまでの研究で我々が同定した60種類のラミニン-111由来ペプチドをキトサンマトリックスに固定化し、線維芽細胞を用いて生物活性を評価した。60種類のペプチド-キトサンマトリックスの中で、28種類が細胞接着活性を示した。キトサンマトリックスに固定化したときに活性を示さなかった32種類のペプチドは、ペプチドの凝集などにより活性を示したことが考えられる。活性を示した28種類のペプチドの中には細胞伸展を促進するもの、細胞接着活性がEDTAやヘパリンで阻害されるもの、神経突起伸張を促進するペプチド-キトサンマトリックスが存在した。また、これらの中にはインテグリンやシンデカンなどのレセプターに結合するものが見いだされた。これらを表1に示すようにA~Fの6種類のグループに分類した。

表1 ペプチド-キトサンマトリックスの活性の違いによる分類

グループ	A	B	C	D	E	F
細胞接着	+	+	+	+	+	-
細胞伸展	++	++	+	+	-	-
阻害	EDTA	+	+	+	-	-
	ヘパリン	-	-	+	+	-
神経突起伸長	+	-	+	-	+	+
レセプター	インテグリン	インテグリン	インテグリン シンデカン	インテグリン シンデカン	シンデカン	?

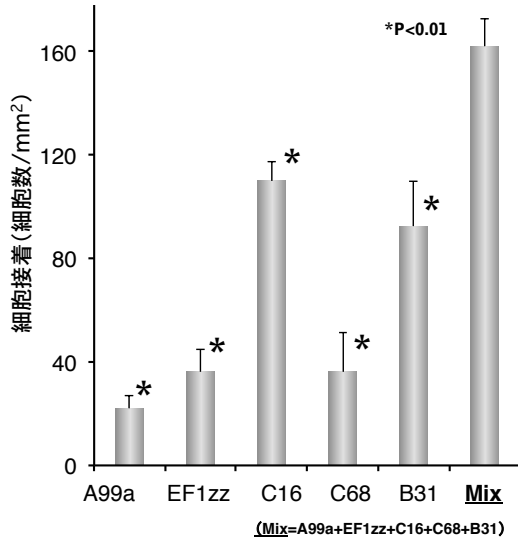
細胞接着活性を示したA~Eの5種類のグループの中で最も活性の強いペプチド(エッセンシャルペプチド)を選んだ(表2にエッセンシャルペプチドの配列を示した)。

表2 各グループのペプチドと最強活性ペプチドの配列

グループ	ペプチドと最も活性の強いペプチドの配列
A	A99a A99a: ALRGDN
B	EF-1zz EF-1zz: ATLQLQEGRLLHFXFDLGKGR
C	A13 AG32 AG103 C16 C57 C64 C16: KAFDITYVRLKF
D	A3 A55 A65 A119 A167 A174 AG10 AG28 AG56 B30 B133 B160 C59 C68 C68: TSIKIRGTYSER
E	A206 AG73 B7 B31 B31: TNLRIKFVKLHT
F	A25 A112 A194

次に、各グループから選んだ顕著な活性を持つエッセンシャルペプチドを等モルずつ1/5のペプチド量で組み合わせた混合ペプチド-キトサンマトリックスを作製した。また、コントロールとして各エッセンシャルペプチドをキトサンマトリックスに固定化したマトリックスを用いて細胞接着活性を測定した。図3に示したように、ペプチド量は同じであるにもかかわらず、混合ペプチド-キトサンマトリックスが最も強い細胞接着活性を示した。また、細胞伸展活性や神経突起伸張活性も混合ペプチド-キトサンマトリックスが最も強

図3 混合ペプチド-キトサンマトリックスの細胞接着活性



い活性を示した。このことは、レセプターの異なる活性ペプチドを混合することにより、相乗的な効果が得られ、活性が増大したことによるものと考えられる。混合するペプチドの種類や、混合比の検討を行うことによりさらに強力な混合ペプチド-キトサンマトリックスの創製が期待される。

## 2. ペプチド-キトサンマトリックスの生物活性に及ぼすスペーサー効果

受容体特異的に作用する細胞接着ペプチドを高分子多糖類に結合することで、ペプチドの活性が増大し、細胞外マトリックスを模倣した形で細胞に作用することや、ペプチドや高分子多糖類の種類によりペプチド-高分子多糖マトリックスの細胞に対する作用が変化することなどを報告してきた。近年、feeder-free 条件下、ラミニン-511 を用い ES 細胞や iPS 細胞を未分化のまま維持・培養するにはインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  が重要な役割を担っていることが示唆されている。以前、我々は合成ペプチドを用いた網羅的なスクリーニングからインテグリン  $\alpha 6 \beta 1$  に結合するペプチド A2G10(SYWYRIEASRTG)を同定し、A2G10 をキトサンマトリックスに固定化することにより、強い細胞接着活性を示すことを報告してきた。そこで、効率的な ES・iPS 細胞の培養基材の開発にも大きく寄与する、さらに最適なペプチド-高分子多糖マトリックスの作成にも応用可能なペプチドと多糖類間の生物活性に及ぼすスペーサー効果について検討した。

本研究では、A2G10 や A99a などのインテグリンやシンデカンに作用するペプチドと AG73 に代表されるシンデカンに結合するペプチドの高分子多糖類間のスペーサー効果を調べる目的で、図2に示したように、グリシン(Gly)、 $\beta$ -アラニン( $\beta$ Ala)、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸( $\epsilon$ ACA)を用い、スペーサーの長さを変化させて作成したペプチド-キトサン

図4 種々のスペーサーを用いたA2G10-キトサンマトリックスの細胞接着活性

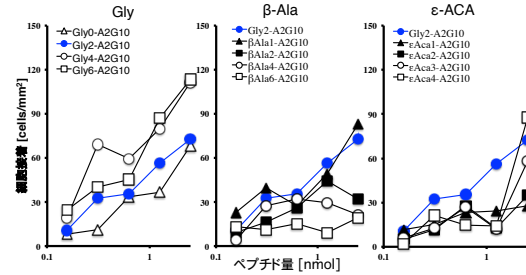
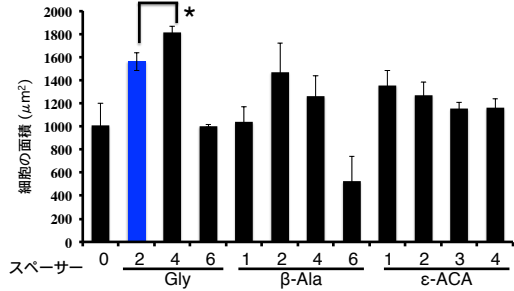


図5 種々のスペーサーを用いたA2G10-キトサンマトリックスの細胞伸展活性



マトリックスの細胞に対する活性評価を行った。図4と図5に示すように、A2G10 をキトサンマトリックスに固定化する場合、Glyの長さを変化させてスペーサーとして用いた時、Gly が 4 残基のとき最も強い細胞接着活性や細胞伸展活性を示した。一方、Gly より疎水性の高い  $\beta$ Ala や  $\epsilon$ ACA の長さを変化させてスペーサーとして用いた時、長いほど活性が低下する傾向が示された。スペーサーの長さや物性の違いによりペプチドの表面への露出度が変化し、細胞との結合に影響を与えたと考えられ、固定化するペプチドに適したスペーサーの検討が必要であることが示唆された。これらの結果を表3にまとめた。シンデカンに結合するペプチドはスペーサーの影響を受けにくく、いずれのスペーサーを用いても強い活性を示した。インテグリンに結合するペプチドはスペーサーの影響を受けやすく、個々のペプチドにより親水性や疎水性などの物性や長さの最適な条件が存在することがわかった。

表3 ペプチド-キトサンマトリックスのスペーサー効果のまとめ

ペプチドと配列	A2G10 SYWYRIEASRTG	A99a ALRGDN	AG73 RKRLQVLSIRT
レセプター	インテグリン $\alpha 6 \beta 1$	インテグリン $\alpha v \beta 3$	シンデカン
最適な長さ	Gly $\times$ 4	$\epsilon$ -ACA $\times$ 4	—
適した物性	親水性	疎水性	—

以上、ラミニン-111 の由来の活性ペプチド (60 種類) を高分子多糖のキトサンに固定化したペプチド-マトリックスを作成し、線維芽細胞と神経細胞を用い生物活性を測定し、活性の違いにより 5 種類のグループに分類した。各グループの中で最も活性の強いエッセンシャルなペプチド-マトリックスを選定した。さらに高活性なペプチド-マトリックスを作製するため、ペプチドと多糖の間のスペーサーの検討を行い、各ペプチドの最適な

スペーサーを見いだした。最適なスペーサーを用いてエッセンシャルなペプチド-マトリックスを組み合わせるにより、組織工学に応用可能なバイオマテリアルの開発が可能になった。このエッセンシャルペプチドマトリックスを用いることにより、iPS 細胞やES 細胞などの分化・増殖の制御が困難な細胞に対しても特異的に機能するバイオマテリアルの創製が期待される。

これらの研究成果の一部は、ペプチド-高分子多糖マトリックスの開発研究に関してまとめた総説として発表した(発表論文②)。また、8回にわたり国内外の学会で発表するとともに、原著論文2報に報告した(発表論文①、③)。

#### 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)

① K. Hozumi, C. Fujimori, F. Katagiri, Y. Kikkawa, M. Nomizu (2014) Suppression of Cell Adhesion Through Specific Integrin Crosstalk on Mixed Peptide-polysaccharide Matrices. *Biomaterials*, 37, 73-81

② K. Hozumi, J. Kumai, Y. Yamada, M. Nomizu (2015) Active Peptide-conjugated Chitosan Matrices as an Artificial Basement Membrane. *Polymers*, 7, 281-297

③ J. Kumai, J. F. Katagiri, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu (2015) Effect of spacer, between peptide and polysaccharide, on the biological activity of peptide-polysaccharide matrices. *Peptide Science 2014*, The Japanese Peptide Society, Osaka, Japan, pp. 381-384

[学会発表] (計8件)

① M. Nomizu, Laminin cell adhesive peptides for tissue engineering. 15<sup>th</sup> Akabori Conference Japanese-German Symposium on Peptide Science; 2014年9月7日; Boppard, Germany

② 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; 2014年10月13日; Cleveland, OH, USA

③ 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; 2014年12月07日; Philadelphia, PA, USA

④ 熊井準, 片桐文彦, 保住建太郎, 吉川大和, 野水基義. ペプチド高分子多糖マトリックスの生物活性に及ぼすスペーサー効果. 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; 2014年06月07日; 名古屋

⑤ 熊井準, 片桐文彦, 保住建太郎, 吉川大和, 野水基義. ペプチド高分子多糖マトリックスのスペーサーによる生物活性への影響. 第46回若手ペプチド夏の勉強会; 2014年8月3日; 宮津市 京都

⑥ 熊井準, 片桐文彦, 保住建太郎, 吉川大和, 野水基義. 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ペーサー効果. 第63回高分子討論会; 2014年09月24日; 長崎市 長崎

⑦ 保住建太郎, 藤森能, 片桐文彦, 吉川大和, 野水基義. 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; 2014年09月24日; 長崎市 長崎

⑧ J. Kumai, F. Katagiri, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Effect of spacer, between peptide and polysaccharide, on the biological activity of peptide-polysaccharide matrix. 第51回ペプチド討論会; 2014年10月22日; 徳島

[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

野水基義 (NOMIZU MOTOYOSHI)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 00311522

##### (2) 研究分担者

吉川大和 (KIKKAWA YAMATO)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 20274227

保住建太郎 (HOZUMI KENTARO)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 10453804

片桐文彦 (KATAGIRI FUMIHIKO)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 60420642