

に向けて、2量体構造を作製し、またC末端領域から得られている活性ペプチドであるT20とSC34EKについても同様に単量体、2量体、3量体を作製し、それぞれの活性の違いについて検討しました。(図7)。結果として、C34は2量体においても3量体と同様の高い活性を有することが明らかになりました⁹⁾。また、T20、SC34EKについては多量体化による顕著な活性の向上は得られないこともわかりました。C34配列は比較的ランダムな構造を有することが結晶構造から明らかにされています。それと比較してT20は、C末端側の疎水性領域が宿主膜と相互作用することが示唆されている点、SC34EKはグルタミン酸-リジンによる塩橋を形成させることでヘリックス構造が誘起されている点が大きく異なります。C34の多量体化による活性の顕著な向上に関してはまだまだ研究を進める必要がありますが、新規な作用に基づく膜融合阻害活性をもつ分子として有用であると考えられます。これらの成果では複数の特許を出願しており、新たな抗HIV戦略を示すものとして注目されています。また、所属研究室で進行しているプロジェクトではHIV由来タンパク質群のペプチドライブラリーから感染阻害活性を有するペプチドを見出すことにも成功しており、その推進に注力しています¹⁰⁻¹³⁾。

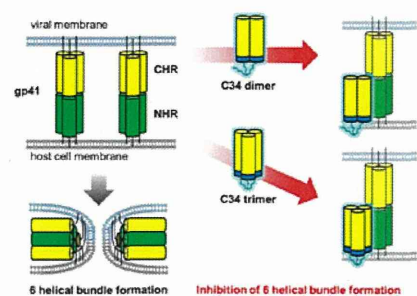


図7 HIV膜融合過程で生じるヘリックスバンドルを模倣したペプチドによる6ヘリカルバンドル形成の阻害機構について。C34三量体が単量体と比較して100倍強い阻害活性を示すことを明らかにし、最近の研究では二量体構造が活性の発現に重要であることも見出した。

おわりに

著者は、これら以外にも、DNA結合タンパク質であるジンクフィンガードメインを利用した新規人工酵素の開発研究^{14, 15)}やプロテインキナーゼのリガンド結合部位に環境応答性蛍光基を導入したセンサー機能を持つペプチドの開発研究¹⁶⁻¹⁸⁾、ZIPタグ-プローブペア¹⁹⁾の細胞内タンパク質ダイナミクスの可視化への応用に関する研究²⁰⁾など、生体分子間の相互作用に着目するという点に基づき、ペプチドを利用することで新たな研究領域の開拓を試みています。

最後になりますが、ここで紹介した研究は東京医科歯科大学生体材料工学研究所 玉村啓和教授のご指導

の下で行ったものであり、玉村教授に心より感謝申し上げます。また、研究を遂行するにあたってご協力いただいた多くの学生諸氏、共同研究者の先生方に改めて御礼申し上げます。ペプチド化学はさまざまなアプローチが可能であり、非常に魅力的な学問です。これからも更なる研究の発展に取り組み、研鑽を積み上げていく所存です。今後ともご指導、ご鞭撻のほど、よろしくお願い申し上げます。

- 1) Tamamura, H. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253; 877-882, 1998.
- 2) Fujii, N., *et al. Angew. Chem., Int. Ed.* 42: 3251-3253, 2003.
- 3) Nomura, W., *et al. Bioconjugate Chem.* 19; 1917-1920, 2008.
- 4) Tanaka, T., *et al. J. Am. Chem. Soc.* 132; 15899-15901, 2010.
- 5) Nakahara, T., *et al. Bioconjugate Chem.* 21; 709-714, 2010.
- 6) Hashimoto, C., *et al. Bioorg. Med. Chem.* 20; 3287-3291, 2012.
- 7) Nomura, W., *et al. ChemMedChem* 7; 205-208, 2012.
- 8) Otaka, A., *et al. Angew. Chem., Int. Ed.* 41; 2937-2940, 2002.
- 9) Nomura, W., *et al. Bioorg. Med. Chem.* 21; 4452-4458, 2013.
- 10) Narumi, T., *et al. Bioorg. Med. Chem.* 20; 1468-1474, 2012.
- 11) Suzuki, S., *et al. J. Med. Chem.* 53; 5356-5360, 2010.
- 12) Suzuki, S., *et al. Bioorg. Med. Chem.* 18; 6771-6775, 2010.
- 13) Nomura, W., *et al. ACS Chem. Biol.* in press.
- 14) Nomura, W., Barbas CF, III. *J. Am. Chem. Soc.* 129; 8676-8677, 2007.
- 15) Nomura, W., *et al. Biochemistry* 51; 1510-1517, 2012.
- 16) Nomura, W., *et al. Bioconjugate Chem.* 22; 923-930, 2011.
- 17) Nomura, W., *et al. ChemBioChem* 12; 535-539, 2011.
- 18) Ohashi, N., *et al. Bioconjugate Chem.* 22; 82-87, 2011.
- 19) Tsutsumi, H., *et al. Angew. Chem., Int. Ed.* 48; 9164-9166, 2009.
- 20) Nomura, W., *et al. Biopolymers (Pept. Sci.)* 94; 843-852, 2010.

のむら わたる
東京医科歯科大学生体材料工学研究所
メダシナルケミストリー分野
nomura.wr@tmd.ac.jp

ペプチド複合型 バイオアクティブバイオマテリアル ーポリ乳酸スキャホールドへのペプチド 修飾法の開発と末梢神経再生への展開ー

はじめに

バイオマテリアルは、血液成分、血球、細胞、組織や臓器などの生体成分に接触する材料のことであり、様々な医療用デバイスの構成素材として広く利用されている。2012年の日本人(女性)の平均寿命は86歳で、筆者の生まれた1978年の78歳か



柿木佐知朗

ら8年も長くなった。生活習慣病の発症数が増加しているにも関わらず平均寿命が大幅に延長したのは、医療技術の飛躍的な進歩による。医薬品や医療検査機器の種々たる発展に並んで、人工臓器などの医療用デバイスも着実に進歩を遂げてきた。さらに近年は、再生医療や組織工学が注目されており、バイオマテリアルは一層大きな役割を担いつつある。

生体組織の構造や機能は、主に細胞外マトリクス(ECM)タンパク質によって維持されている。バイオマテリアルの大きな目的は生体組織の代替であることから、生体組織の模倣、すなわち人工的なECMの前製が基本的な開発戦略となる。人工材料と生体組織との大きな隔たりを橋渡しするために様々な生体活性ペプチドが利用されている。本稿では、バイオマテリアル、組織工学およびバイオアクティブバイオマテリアルの概説と、筆者らの研究の一例としてポリ乳酸スキャホールドへのペプチドの固定化法と末梢神経再生誘導チューブへの応用について紹介する。

組織工学 (ティッシュエンジニアリング)

まず、日本ペプチド学会の先生方にはあまり馴染がないであろう組織工学 (ティッシュエンジニアリング) について紹介する。筆者が幼少の頃、ウーパールーパーと呼ばれて大人気であったメキシコサラマンダー (アホロートル) は、尻尾はもろんのこと、肢、脳、心臓などの一部を失っても再生する能力がある。一方、我々ヒトの組織は構造および機能を一度失うと再生することはない。しかし、切り傷程度であれば治癒するように、我々も自然治癒力を備えている。細胞の分化や増殖、さらには組織の構築をバイオマテリアルよりなる足場材料 (スキャホールド) で制御することによって自然治癒力を最大限に高めて、アホロートルのように失った組織を再生修復させようとする治療法が組織工学である。バイオマテリアルを用いた組織再生の誘導は、1980年代から末梢神経や歯周組織を対象に、Guided tissue regeneration (GTR) と呼ばれて検討されてきた。1993年にJ. Vacantiハーバード大学教授とR. Langerマサチューセッツ工科大学教授らがヌードマウスの皮下に軟骨組織を作製し、ティッシュエンジニアリングという概念を提唱して以降は、この呼び名が広く普及している¹⁾。Vacantiらの報告では、グリコール酸-乳酸共重合体の多孔質足場材料に軟骨組織を接種し、それをヌードマウスの皮下に移植することで軟骨組織を作製した。ヒトの耳を背負ったVacanti mouse²⁾の写真が御記憶にある先生方もいらっしゃるのではないだろうか。厳密には、細胞を用いず足場材料のみで組織再生を誘導するアプローチをGTR、足場材料と細胞とを組み合わせたアプローチを組織工学と区別するが、いずれにおいても足場材料は重要な役割を担っている。また、近年はES細胞やiPS細胞、体性幹細胞などの作製および採取法が確立されつつあり、それらの大量培養や分化制御を目指した培養基材としてのバイオマテリアル開発も盛んである。組織工学や再生医療では、最適な細胞外環境 (足場) を構築し、組織再生に有利な生体反応を誘導する能力がバイオマテリアルに求められる。そのために有用な技術が、後述のバイオアクティブバイオマテリアルで

ある。

バイオアクティブバイオマテリアル

バイオマテリアルは、コンタクトレンズや外科用縫合糸など身近なものから、人工血管、人工心臓、ステント、歯科用インプラント、透視用中空糸やカテーテルなどに用いられている。人工材料はウイルスや病原体とは異なり、生体にとって極めて特殊な異物であるため、それらが導入されると炎症や血液凝固などに加えて、カプセル化などの反応が惹起される。そのため、いかにして生体の免疫系を欺き共存できるバイオマテリアルを開発するかが重要となる。これまでは、生体に馴染み (生体親和性)、かつ血液が凝固しない (血液適合性) こと、すなわち「バイオイナート」を要点として、高分子 (合成・天然)、金属やセラミックスなどのバイオマテリアルが開発されてきた。しかし、実際の医療用デバイスでは、生体組織とデバイスとの接合部や人工血管の内腔など、特定の細胞や組織との積極的な接着が要求される場合も多い。さらに、組織工学用の足場材料には、生体内で細胞や組織に能動的に機能する「バイオアクティブ」なバイオマテリアルが求められている。

バイオアクティブバイオマテリアルの開発における基本的な戦略は、人工材料による生体組織の模倣である。ご存じの通り、生体の機能および恒常性は様々な分子によって支えられており、その中でもタンパク質の役割は極めて大きい。特に、コラーゲンなどのECMとサイトカインやケモカインなどの増殖因子は生体の治癒や再生を厳密に制御しており、バイオマテリアルにとって最も必要となる機能を備えた生体活性分子である。しかし、ECMおよび増殖因子が織りなす多様な機能やナノ構造を人工的に複製することは現状では不可能である。多くの場合、タンパク質の生体機能の発現には構成する全アミノ酸が寄与しているのではなく、数〜数十残基程度のアミノ酸配列 (活性部位) が機能している。分子生物学の進展に伴い、多くの活性配列がECMタンパク質から同定されている (表1)。活性配列 (ペプチド) を利用することで、必要とする生理的機能を人工材料に化学的に複合することが可能となる。このようなアプローチは1990年代から試みられており、その代表的なものにフィブロネクチン由来のインテグリン結合配列であるArg-Gly-Asp (RGD) で修飾された細胞接着性バイオマテリアルがある³⁾。また、本稿では詳細は割愛するが、Urry⁴⁾ やTirell⁵⁾らの人工エラスチンのように基本構造を模倣して設計された人工タンパク質や、Zhangらのβ-sheet型自己凝集ハイドロゲルなどもバイオアクティブバイオマテリアルの例として挙げられる。従来のバイオマテリアルの生体親和性 (バイオイナート) や分解吸収性に加えて生体活性が導入されたバイオアクティブバイオマテリアルは、新たな医療用デバイスの開発に有用と期待されている。この期待を現実のものとするためには、臨床応用を見据えた明確なターゲットの選定と最適なデバイス設計 (加工法や基材) およびペプチド修飾法が重要となる。筆者らは、末梢神経再生誘導チューブの開発を目指し、生体分解性高分子であるポリ乳酸へのペプチド修飾法を検討している。

コラーゲン様ペプチドの物理吸着を利用したポリ乳酸スキャホールドの機能化

ポリ乳酸は、生体内に埋入されると乳酸に加水分解され、最終的には代謝される。また、力学的強度や加工性にも優れており、ファイバー、スポンジ、フィルムやプレートなどの成型も容易で、生体分解吸収性の外科用縫合糸や骨固定・接合材として臨床利用されている。しかしながら、細胞や組織との親和性は乏しく、ポリ乳酸の生理的機能化が望まれている。また、我々がターゲットとしている末梢神経再生誘導チューブにおいても、臨床に用いられているものはポリ乳酸を基材としており、神経再生性を補うために動物由来のコラーゲンが内腔に充填されている。生物学的な危険性を踏まえると、動物由来タンパク質の利用は可能な限り避けることが好ましい。そのため、ポリ乳酸へのペプチドなどの生理活性分子の修飾法の研究は盛んに行われてきた⁸⁾。ポリ乳酸は分子内に反応性官能基を持たないため、異なるポリマーとの共重合、プラズマ照射、表面加水分解によって反応性官能基を導入し、それを介した生理活性分子の固定化が報告されている。しかし、これらの方法ではポリ乳酸の分子量の低下や加水分解速度の促進などの問題があった。そこで我々は、簡便性に優れ、かつポリ乳酸の特性を損なわないペプチド修飾法として物理吸着に注目して検討した。

我々はコラーゲン様繰り返し配列 ((Pro-Pro-Gly)₅)⁹⁾ を吸着リンカーとして用いた。また、ポリ乳酸を基材とした末梢神経再生誘導チューブへの応用を想定し、活性配列として東京薬科大学 野水基義教授らによって同定されたラミニン由来のAG73 (Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr)¹⁰⁾ を選択し、AG73-G₃(PPG)₅ という配列のペプチドを設計した。ポリ乳酸は疎水性高分子であることから、(PPG)₅セグメントが疎水性吸着し、結果としてポリ乳酸表面にAG73が固定された人工ECM層を構築しようというのが本アプローチである(図1)。ポリ乳酸のフィルム(分子量約13万; φ=6.0mm, t=0.5mm)を作製し、1mLのAG73ペプチドもしくはAG73-G₃(PPG)₅ (いずれも10μM)に24時間浸漬した。純水もしくは塩化ナトリウム水溶液(1.0M)で洗浄後、フィルム上で神経幹細胞のモデル細胞として用いられているラット副腎褐色細胞腫(PC12細胞)を神経成長因子(NGF)存在下で培養して接着数および神経突起数を評価した。そ

の結果、純水で洗浄した場合はAG73ペプチドとAG73-G₃(PPG)₅の両者においてPC12細胞の接着数および分化傾向に顕著な差は認められなかった。しかし、塩化ナトリウム水溶液で洗浄した場合、AG73ペプチドでは急激に細胞接着数が減少したのに対し、AG73-G₃(PPG)₅では純水で洗浄した場合とほぼ同様の活性を維持することができた(図2)。この結果は、AG73-G₃(PPG)₅がポリ乳酸フィルム上に強固に吸着し、AG73が安定に固定化されていることを示唆している。このようなアプローチは極めて単純に思えるが、物理吸着のみでポリ乳酸をペプチドで修飾することができれば、その臨床的意義は極めて大きい。

オリゴ乳酸-ペプチド複合体を用いたポリ乳酸スキャホールドの機能化

先の物理吸着は簡便性には優れているものの、生体内で長期間保持することは難しいと考えられる。細胞の接着(接触)や血清タンパク質の吸着などは移植直後に惹起されるため、それらの制御を目的とする場合は物理吸着によるペプチドの固定でも十分な効果が得られるであろう。しかし、組織の再生を誘導したい場合は、固定化されたペプチドは細胞が遊走してくるまでは保持されなければならない。末梢神経の再生を考えると、チューブ移植後にシュワン細胞の増殖と軸索の伸長が誘導されるまでペプチドを維持する必要がある。神経再生誘導チューブには(1)神経再生が完了する期間までの標的組織への誘導路の確保、(2)神経再生を促進する足場、(3)縫合等に耐える操作

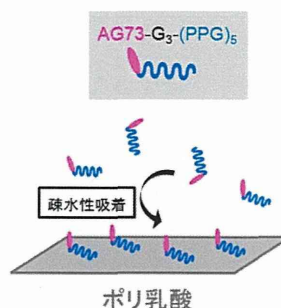


図1 物理吸着を利用したポリ乳酸へのペプチドの固定

表1 ECMタンパク質から同定された細胞接着性配列の例

Sequences	Origin	Function
RGD	Fibronectin, Vitronectin	Cell adhesion
REDV	Fibronectin (CS-III domain)	Endothelial cell adhesion
LDV	Fibronectin (CS-I domain)	Endothelial cell adhesion
YIGSR	Laminin	Cell adhesion
LRAHAVDVNG	N-cadherin	Cadherin-mediated cell adhesion
KRSR	Heparin binding domain	Cell adhesion (Osteoblast)
GFOGER	Collagen	Cell adhesion
WRTQIDSPLNGK	VCAM-1	Endothelial cell adhesion

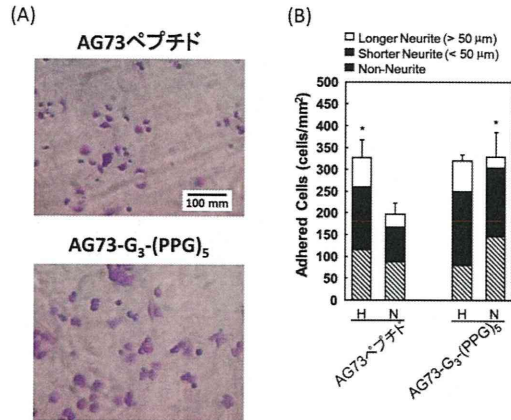


図2 AG73-G₃-(PPG)₅を吸着固定したポリ乳酸フィルム上でのPC12細胞の接着と神経突起の伸長⁹
 (A) NaCl水溶液で洗浄後のフィルム上でのPC12細胞
 (B) 純水(H)とNaCl水溶液(N)で洗浄後の各フィルム上でのPC12細胞の接着数と突起伸長

性と柔軟性、(4) 外部結合組織の侵入および癒着を防止し、かつ液性成分が透過できる構造、(5) 神経再生終了後に消失する分解吸収性、(6) 動物由来材料や化学架橋剤を用いない高い生体安全性といった特性が求められる。そのため、ポリ乳酸のファイバーやメッシュよりなるチューブを使った研究は数多いが、生理活性分子をチューブ内腔へ安定に修飾する技術がないために、コラーゲンなどの動物由来タンパク質で神経再生性が補われているのが現状である。乳酸にはL体とD体の2つの光学異性体が存在し、それらのポリマーを混合すると安定なステレオコンプレックスを形成することが知られている。我々は、オリゴD-乳酸/ペプチド複合体とポリL-乳酸とのステレオコンプレックス形成を利用したポリ乳酸スキャホールドへのペプチド固定化法を考案した^{11,12}。この方法は、オリゴD-乳酸/ペプチド複合体とポリL-乳酸とを混合し、急速に脱溶媒することによって均一なステレオコンプレックスを形成させることで、ポリ乳酸スキャホールド上にペプチドを固定化するものである(図3)。前節と同様に神経再生性ペプチドにはAG73を選択し、本方法によるポリ乳酸スキャホールドへの固定化を検討した。まず、Fmoc固相合成法でAG73を逐次伸長後、あらかじめ脱水縮合によって合成したオリゴD-乳酸(分子量700~1750Da)を樹脂上で縮合させることでオリゴD-乳酸/AG73複合体を得た。ポリL-乳酸とオリゴD-乳酸/AG73複合体を質量比97:3で混合して10%-ヘキサフルオロイソプロパノール溶液とし、スピニング法で薄膜を成型した。また、同溶液を電解紡糸(エレクトロスピンニング)することによってナノファイバー不織布も作製した。それらの上にPC12細胞を播種し、接着性および神経突起伸長活性を評価した。その結果、未修飾のポリL-乳酸と比較して、オリゴD-乳酸/AG73複合体を混合させることによってPC12細胞の接着および突起伸長が向上した(図4)。前節の物理吸着を利用した方法と比較しても、

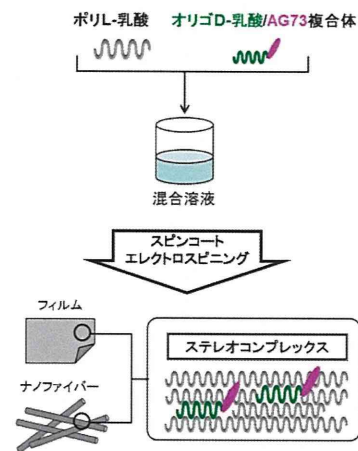


図3 ステレオコンプレックス形成を利用したポリ乳酸へのペプチドの固定

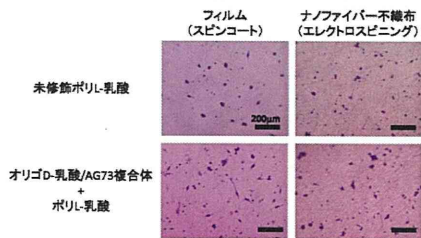


図4 オリゴD-乳酸/AG73複合体を混合成型したポリL-乳酸フィルムおよびナノファイバー不織布上でのPC12細胞の接着挙動¹²

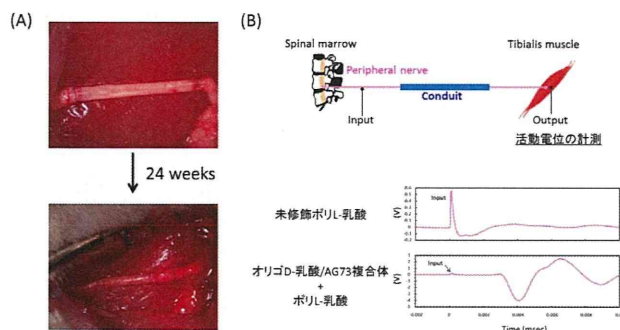


図5 オリゴD-乳酸/AG73複体ナノファイバー神経誘導チューブのラット坐骨神経欠損部への移植¹²
 (A) ラット坐骨神経欠損部に移植したチューブ [移植直後と24週後]
 (B) 移植24週後の活動電位測定

その差は明確であり、安定かつ充分量のペプチドが導入されていることが推察された。さらに、電解紡糸によってオリゴD-乳酸/AG73複合体とポリL-乳酸とを混合したナノファイバーを内層とした神経誘導チューブを作製し、ラットの坐骨神経に作製した10mmの神経欠損を架橋して24週後に神経再生を組織学的および電気生理学的に評価した(図5(A))。その結果、誘導チューブは生体内で分解されており、その内部にGFAP (glial fibrillary acidic protein) およびニューロフィラメント陽性神経組織の再生が認められた。また、電気生理学的な評価でも、誘導チューブ移植部中枢側からの電氣的刺激によって脛骨筋電位が検出され、機能神経が再生していることも明らかとした(図5(B))。このオリゴD-乳酸/ペプチド複合体を用いたポリL-乳酸の機能化法は、末梢神経再生誘導チューブのみならず、動物由来材料フリーの新しい医療用デバイス開発への展開が期待される。

おわりに

本稿では、バイオマテリアルおよび組織工学の概説と、バイオアクティブバイオマテリアル開発におけるペプチドの利用例として、ポリ乳酸スキャホールドへのペプチド修飾法に関する筆者らの2つのアプローチを紹介させて頂いた。我々は、コラーゲン様ペプチド((PPG)₆)の物理吸着およびオリゴD-乳酸/ペプチド複合体のステレオコンプレックス形成を利用することで、極めて簡便にポリ乳酸スキャホールドをペプチドで修飾することに成功した。また、オリゴD-乳酸/AG73複合体とポリL-乳酸よりなるナノファイバー神経再生誘導チューブにおいては、ラット坐骨神経欠損モデルを用いた*in vivo*試験でその有用性を明らかとした。

ペプチドがバイオマテリアルの機能化に有用であること示す報告は極めて多いものの、大部分は*in vitro*の評価に留まっており、実際にデバイスとして臨床利用されるに至った例はない。その理由の一つに、生体安全性、簡便性(操作性)や基材選択性など、臨床利用に必要な特性を備えたペプチド固定化法が少ない事

が挙げられる。我々は、マテリアルの研究者としてそれぞれの基材およびデバイスに適したペプチド固定化法を提供することで、ペプチドのバイオマテリアル開発への展開をよりスムーズにし、組織工学の実現ならび新規医療用デバイスの臨床応用へと発展するための一助となることができると考えている。

ここに紹介させて頂いた研究は、(独)国立循環器病研究センター研究所生体工学部の山岡哲二部長をはじめ、多くの共同研究者の方々の御指導ならび御支援によるものであり、ここに深く御礼申し上げます。また、末筆にて恐縮ながら、本PEPTIDE NEWSLETTER JAPANにてバイオマテリアルという少し異分野でのペプチドの有用性について紹介させて頂ける機会を賜わり、近畿大学理工学部生命科学科 日高雄二先生をはじめ、編集委員の先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Langer, R. et al., Science 260, 920-926 (1993)
2. Cao, Y. et al., Plast. Reconstr. Surg. 100, 297-302 (1997)
3. Hubbell, JA. Cur. Opi. Biotechnol. 10, 123-129 (1999)
4. Brandley BK. et al., Develop. Biol. 135, 74-86 (1989)
5. Urry, DW. et al., J. Protein Chem. 3, 403-436 (1984)
6. Creel, HS. et al., Macromolecules 24, 1213-1214 (1991)
7. Kisiday, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 9996-10001 (2002)
8. Yamaoka, T. et al., Koubunshi Ronbunshu 55, 328-333 (1998)
9. Kakinoki, S. et al., Acta Biomaterialia 6, 1925-1930 (2010)
10. Weeks, BS. et al., Exp. Cell Res. 243, 375-382 (1998)
11. Yamaoka, T. et al., In Proceedings of International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, HI, USA, 15-20 December 2005; Program No. 482.
12. Kakinoki, S. et al., Polymers 3, 820-832 (2011)

かきのき さちろう
 (独) 国立循環器病研究センター
 研究所生体工学部
 sachi@ncvc.go.jp

