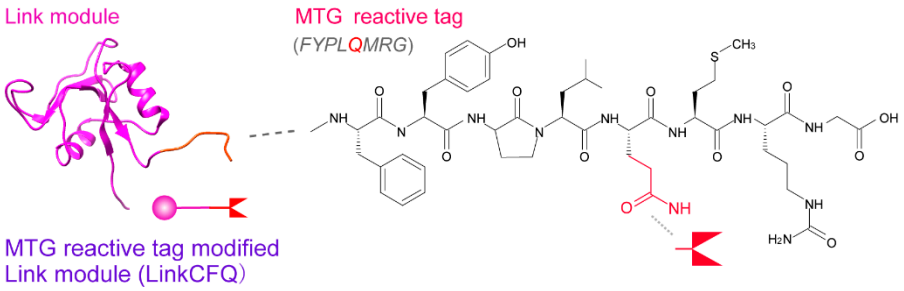
74　Link moduleを用いた炎症制御性癒着防止材の開発	伊藤　大知

【目的】術後腹膜癒着は多くの外科医に取って永遠の課題である。 外科手術により腹膜中皮細胞層が障害され消化器や生殖器と腹壁や臓器同士が癒着し腸の通過障害・不妊・2 次手術のリスクを増大させる。臨床においては特に肝臓がん切除に伴う腹膜癒着が重篤でありヒアルロン酸 （HA）を主原料にした Seprafilm 等の既存の癒着防止材の性能が不十分である。そこで本研究では、再生医療においてステロイド治療抵抗性の GVDH に承認された MSC 細胞製品が、IL10 非依存的な炎症ルートとして着目されている TSG-6 を分泌することの重要性に着目し，その HA 結合部位であるリンクモジュールを用いた炎症制御性 injectable ハイドロゲルの開発を目指した。

【方法】リンクモジュールの C 末端に微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTG）反応性 tag を付加した機能化リンクモジュールを設計後、大腸菌で発現しアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。等温滴定型カロリメトリー（ITC）により HA 結合能を定量的に評価した。また、ゼラチンとの混合系を用いて異なる pH 条件下における機能化リンクモジュールの MTG 反応性を検討した。さらに、医用応用のためのエンドトキシン除去法の検討を行った。最後に機能化リンクモジュールを HA およびゼラチンと混合し MTG で架橋することでハイドロゲル作製を検討した。

【結果】設計したリンクモジュールの発現・精製に成功し、＞1 mg/L culture スケールを達成した。精製した機能化リンクモジュールは pH 依存的な HA 結合特性を示し、pH6.0 から pH7.4 において相互作用に伴うエンタルピー変化が減少するとともに、タンパク当たりに結合可能な HA の単糖数が減少することが示された。機能化リンクモジュールとゼラチンの混合系での MTG 反応性は、より高い pH において反応が進み pH8.0、9.0 では 90%以上の反応率を示した。ゼラチンと HA のゲルでは白濁したゲルが得られた一方で機能化リンクモジュールの混合系では、透明のゲルが形成されハイドロゲルの作製に成功した。押し込み試験によってゲルの力学強度を評価した結果、機能化リンクモジュールの混合系では Young’s modulus が増加する傾向にあることが示された。

機能化リンクモジュールの設計とハイドロゲルの作製



74. Link module を用いた炎症制御性癒着防止材の開発

伊藤　大和

東京大学 大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 医療材料・機器工学部門

Key words：リンクモジュール，ヒアルロン酸，抗炎症，ハイドロゲル，癒着防止

緒　言

術後腹膜癒着は外科分野で重要な問題である。外科手術により腹膜中皮細胞層が障害され消化器や生殖器と腹壁や臓器同士が癒着し腸の通過障害・不妊・2 次手術のリスクを増大させる。臨床においてはヒアルロン酸（HA）を主原料にした Seprafilm 等の既存の癒着防止材が使用されているが、性能は十分とは言えない。そこで我々は様々な切除方法によるラット肝臓切除癒着モデルを世界に先駆けて開発し積層型フィルムや積層型ハイドロゲルスプレーの癒着防止材を開発した［1，2］。さらにデキサメタゾンの徐放速度を制御した DDS 積層型フィルムにより過度な炎症を抑制することで 70%肝切除により引き起こされる超重篤な癒着にも成功した。一方で潜在的な感染症併発リスクの増加によりステロイドの臨床適用は難しく今後は新たな炎症制御機構に立脚したゲル状癒着防止材の開発が望まれる。

本研究では，再生医療において MSC 細胞製品が、IL10 非依存的な炎症ルートとして着目されている TSG-6 を分泌することの重要性に着目した。TSG-6 のヒアルロン酸結合部位であるリンクモジュールのみでも抗炎症効果を持つことに着目し、遺伝子組み換えによる新しい機能化リンクモジュール開発を行い。さらにヒアルロン酸・ゼラチン・トランスグルタミナーゼと機能化リンクモジュールから成り、ダブルシリンジで混合投与することで速やかにゲル化する新しい injectable ハイドロゲルの開発に成功した。今後、抗炎症効果や癒着防止効果を示すことが期待される。

方法および結果

1.　機能化リンクモジュールの設計と発現・精製系の検討

本研究では、タンパクの機能化方法として微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTG）による酵素反応に着目した。MTG はグルタミン残基とリシン残基間でのイソペプチド結合形成を触媒する酵素であり、一般的には Food and Drug Administration（FDA）の認可を得て食品タンパクの改質等に広く用いられている。 特に近年 MTG 反応性 tag が開発され、タンパク同士及び DNA とのコンジュゲイション等汎用的なタンパク機能化方法として着目されている［3，4］。

そこで本研究では MTG 反応性 tag（FYPLQMRG）を TSG-6 のヒアルロン酸結合部位であるリンクモジュールの C 末端に付加した機能化リンクモジュール（LinkCFQ）を設計した。 タンパクの発現では可溶性タンパク発現のため LinkCFQ の N 末端に SUMO tag を導入し、大腸菌 BL21（DE3）を用いて発現した。続いて His-tag 精製及びサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）等のアフィニティークロマトグラフィーによってタンパクを精製した。さらに、低温発現系の検討やシャペロンプラスミドベクターとの共発現系の検討によってタンパク精製量を増加させ、＞1 mg/L culture スケールの発現・精製系を確立した。

2.　機能化リンクモジュールとゼラチンの MTG による反応の検討

機能化リンクモジュールの MTG 反応性の検討では、グルタミン残基とリシン残基を有し、優れた生体適合性及び細胞接着性等の性質から医用材料として広く使用される高分子であるゼラチンを用いた。pH7～9 で MTG 反応によって機能化リンクモジュールとゼラチンのコンジュゲイション反応を検討した結果、より高い pH において反応が進み、pH8.0、9.0 では 90%以上の反応率を示した（図 1）。

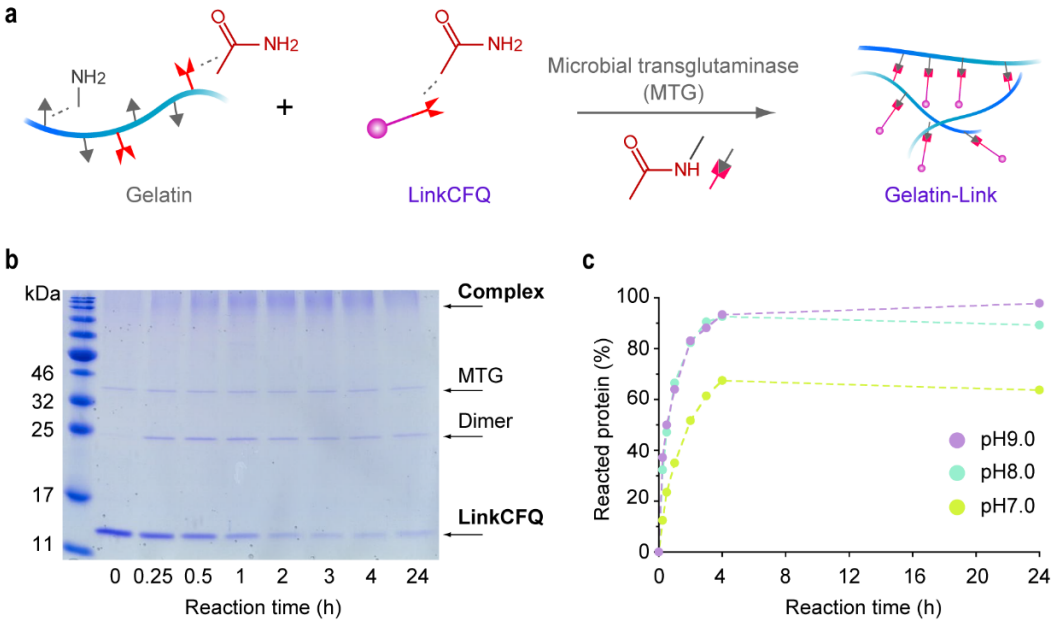


図 1. 機能化リンクモジュールの MTG 反応性評価

a) MTG 反応の概略図。

b、c) MTG 反応の SDS-PAGE 解析（pH8.0）と ImageJ による反応率の定量。

3. 機能化リンクモジュールのヒアルロン酸（HA）の結合能評価

天然構造のリンクモジュールは、Anthony らの報告により pH6.0 の酸性環境下において高い HA 結合能を示し、pH7.4 の中性環境下ではその結合能が低くなることが定性的に評価されている［5, 6］。そこで本研究のタンパク機能解析では等温滴定型カロリメトリー（ITC）を用いて HA 結合能を pH6.0 及び pH7.4 において評価した。結果 pH6.0 及び pH7.4 の両条件で LinkCFQ と HA との相互作用による発熱が見られた（図 2）。一方で pH6.0 から pH7.4 において相互作用に伴うエンタルピー変化が減少するとともに、タンパク当たりに結合可能な HA の単糖数が減少することが示された。

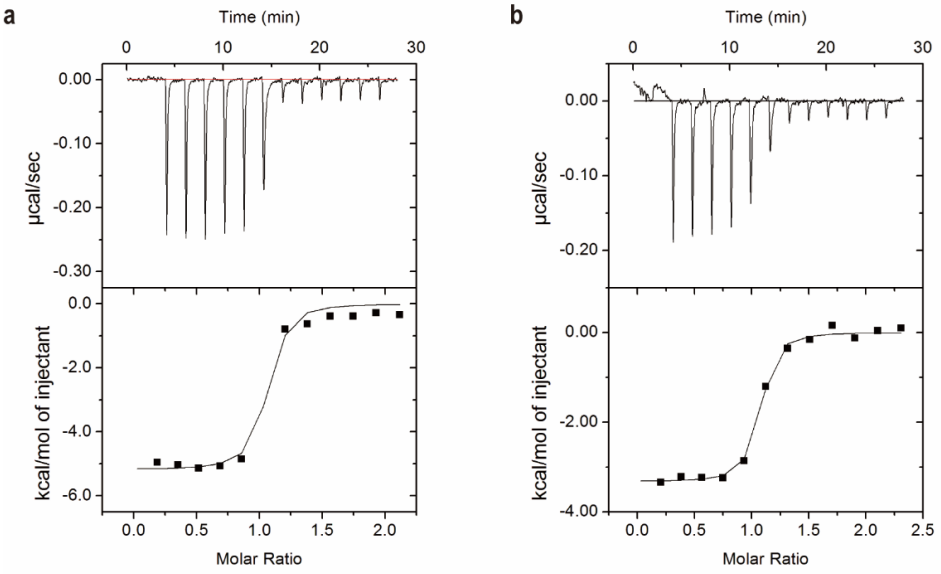


図 2. ITC 測定による機能化リンクモジュールの HA 結合能評価

pH6.0（a）および pH7.4（b）条件での機能化リンクモジュールと HA の ITC を用いた相互作用解析。

4. 精製タンパク中のエンドトキシン除去法の検討

本研究で大腸菌から精製したタンパクには、大腸菌成分であるエンドトキシン等が含まれると予想されるため、その除去法の検討が必要不可欠である。そこで、リン酸カルシウムベースのカラム担体を用いたイオン交換クロマトグラフィー法によるエンドトキシン除去法の検討を行った。まず、リン酸バッファー（pH6.5）用いた 5～500 mM リン酸グラジエントによるイオン交換クロマトグラフィーでは、タンパクとエンドトキシンの溶出位置が重なりエンドトキシン除去が困難であった。そこで 5 mM リン酸バッファー（pH6.5）を用いて 0～1.5 M NaCl グラジエントによるイオン交換クロマトグラフィーを行い、その後 500 mM リン酸バッファー（pH6.5）によるカラム吸着物の溶出を行った。リムルステストにより各溶出フラクション中のエンドトキシン量を評価した結果、タンパクから大部分のエンドトキシン除去を確認できた（図 3）。

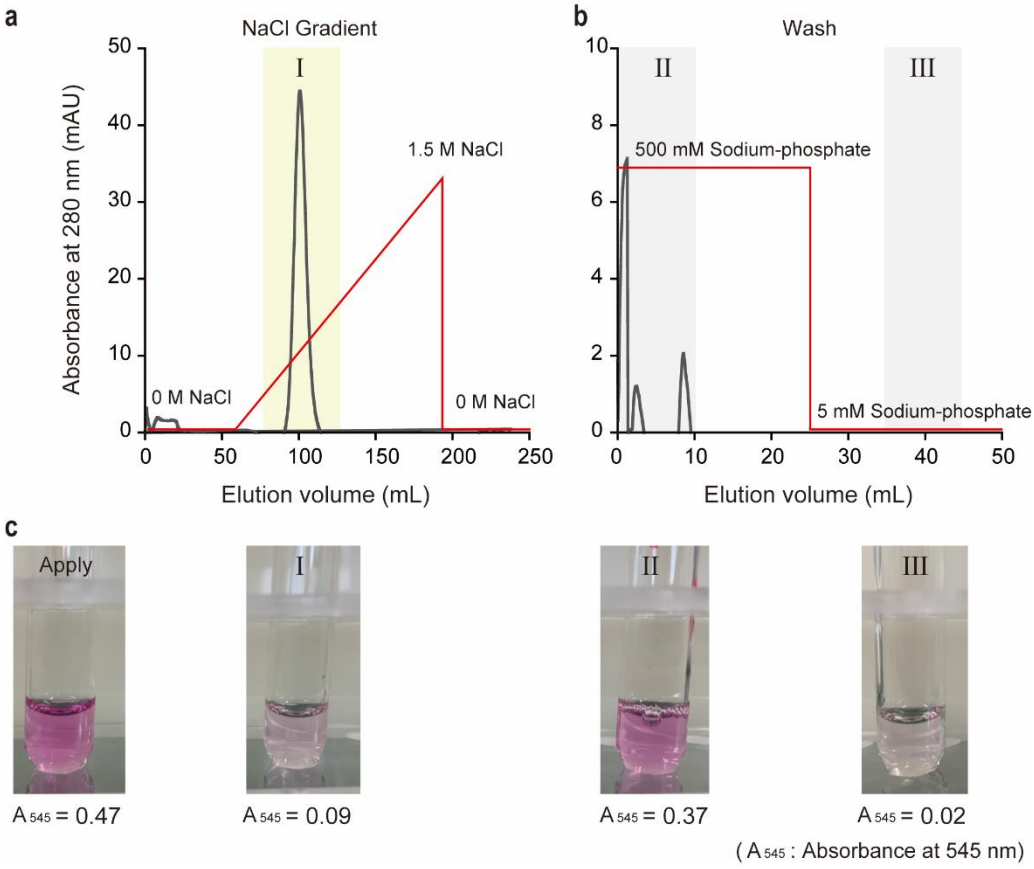


図 3. 精製タンパク中のエンドトキシン除去法の検討

a、b）イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラム。

c） リムルステストによるエンドトキシン量の評価。

5. ハイドロゲルの作製

本研究で開発したタンパクがゼラチンとの反応性が優れていたため、当初の計画で予定していたリンクダイマーを用いず、HA とゼラチンとの混合系によってゲルの作製を行った。機能化リンクモジュールは pH が 8.0 以上で優れた MTG 反応性を示したことから、Tris-HCl バッファー（pH8.0）にてゲルの作製を検討した。ゼラチンと HA のゲルでは白濁したゲルが得られた一方で LinkCFQ の混合系では、透明のゲルが形成された（図 4 a）。また、押し込み試験によってゲルの力学強度を評価した結果、LinkCFQ の混合系では Young's modulus が増加する傾向が示された（図 4b）。

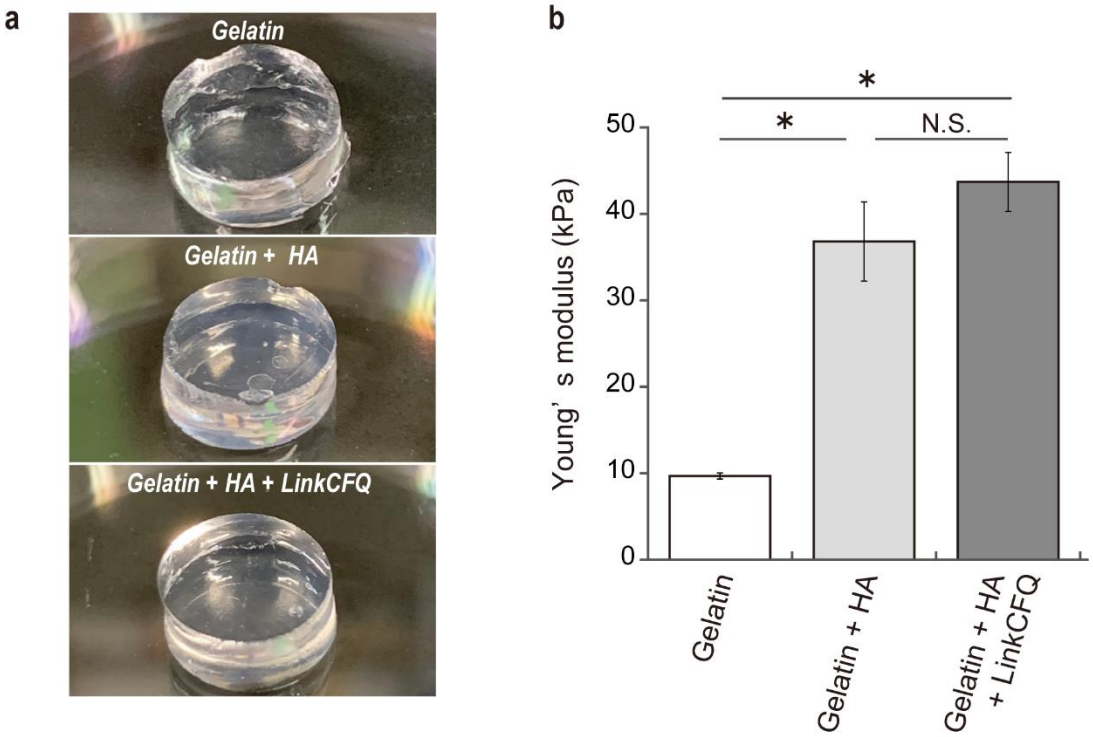


図 4. ゲルの作製

a) ゼラチンと HA, LinkCFQ を用いて MTG 架橋反応によって作製したゲルの外観。

b) 押し込み試験によるゲルの力学特性評価（ANOVA Tukey post-hoc test, * $p<0.05$）。

考　察

本研究では、MSC 細胞製品が TSG-6 を分泌することの重要性に着目し、新しい抗炎症性癒着防止材の素材として、HA 結合部位であるリンクモジュールを用いた新たなゲル材料開発を目指し、成功した。設計したリンクモジュールの安定的な発現・精製系を確立し、HA 結合能と酵素反応性の 2 つの機能を有することが確認できた。これらの結果から MTG 反応性 tag のみにとどまらず、リンクモジュールへ様々な機能性ペプチドを導入できる可能性が示されたと考えられる。現在精製したタンパクにおける大部分のエンドトキシン等の大腸菌成分の除去にも成功しており、今後は特に TSG-6 に由来する IL-10 非依存的な炎症制御ルートに着目し、本研究で作製したゲルの炎症制御機能を検証するとともに腹膜癒着の予防応用へと展開していく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学大学院工学系研究科の博士課程大学院生の大川将志氏を中心に行われたものである。また共同研究者である東京大学大学院工学系研究科の津本浩平教授、長門石特任准教授、田部特任助教と東京大学医学部附属病院肝胆膵外科の長谷川潔教授に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Shimizu A, Suhara T, Ito T, Omichi K, Naruse K, Hasegawa K, Kokudo N. New hepatectomy-induced postoperative adhesion model in rats, and evaluation of the efficacy of anti-adhesion materials. Surg Today. 2014 Feb;44(2):314-23. doi: 10.1007/s00595-013-0530-8. Epub 2013 Mar 16. PMID: 23504003.

2) Ohta S, Toda T, Inagaki F, Omichi K, Shimizu A, Kokudo N, Hasegawa K, Ito T. The Prevention of Hepatectomy-Induced Adhesions by Bilayer Sponge Composed of Ultrapure Alginate. J Surg Res. 2019 Oct;242:286-295. doi: 10.1016/j.jss.2019.04.063. Epub 2019 May 21. PMID: 31125842.
3) Takahara M, Wakabayashi R, Minamihata K, Goto M, Kamiya N. Primary Amine-Clustered DNA Aptamer for DNA-Protein Conjugation Catalyzed by Microbial Transglutaminase. Bioconjug Chem. 2017 Dec 20;28(12):2954-2961. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00594. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29131594.
4) Tanaka Y, Tsuruda Y, Nishi M, Kamiya N, Goto M. Exploring enzymatic catalysis at a solid surface: a case study with transglutaminase-mediated protein immobilization. Org Biomol Chem. 2007 Jun 7;5(11):1764-70. doi: 10.1039/b701595j. Epub 2007 May 9. PMID: 17520145.
5) Mahoney DJ, Blundell CD, Day AJ. Mapping the hyaluronan-binding site on the link module from human tumor necrosis factor-stimulated gene-6 by site-directed mutagenesis. J Biol Chem. 2001 Jun 22;276(25):22764-71. doi: 10.1074/jbc.M100666200. Epub 2001 Apr 3. PMID: 11287417.
6) Higman VA, Briggs DC, Mahoney DJ, Blundell CD, Sattelle BM, Dyer DP, Green DE, DeAngelis PL, Almond A, Milner CM, Day AJ. A refined model for the TSG-6 link module in complex with hyaluronan: use of defined oligosaccharides to probe structure and function. J Biol Chem. 2014 Feb 28;289(9):5619-34. doi: 10.1074/jbc.M113.542357. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24403066; PMCID: PMC3937638.