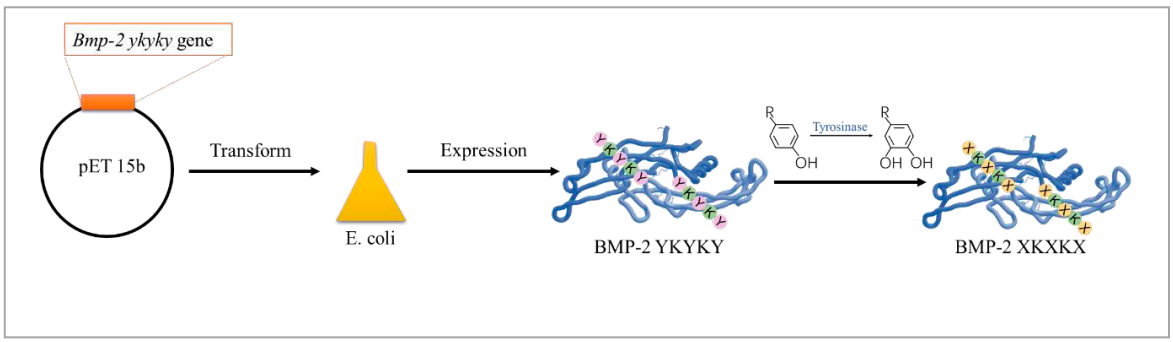
218　医用材料の生体機能化のための接着性成長因子の開発	伊藤　嘉浩

【目的】成長因子固定化は、医療用材料に生理活性を付与するうえで重要な技術である。しかし、これまでの成長因子の固定化は、有機系バイオマテリアルや生体組織が中心で、硬組織置換材料に用いられる無機系バイオマテリアルの金属（チタンなど）やセラミックス（ヒドロキシアパタイトなど）への固定化は困難があった。そこで、我々は、これら無機材料へも容易に固定化可能な接着性の成長因子タンパク質そのものを創り出すことを考え、ムール貝が分泌する水中接着タンパク質から発想を得、成長因子タンパク質のインシュリン様成長因子に、水中接着タンパク質の活性部位の主成分アミノ酸 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン（DOPA）を導入し、チタン結合性の付与に成功した。本研究では、どのような成長因子にも基材接着性を付与できる、より一般的な DOPA 導入法を開発する。そして、応用性が高く、しかもチロシンが活性部位にある骨形成たんぱく質や血管内皮細胞成長因子への接着性付与を行った。

【方法】骨形成たんぱく質には、遺伝子組換え法で、末端にチロシン残基を含む配列を挿入し、タンパク質として発現させた後、チロシナーゼで処理することにより、DOPA を導入した。血管内皮細胞成長因子へは、ソルターゼを用いて、あらかじめ固相法で合成した DOPA を含むペプチドを結合させることによって調製した。

【結果】DOPA 導入骨形成タンパク質、血管内皮細胞成長因子、ともに合成をマススペクトルにより確認した。DOPA 導入骨形成タンパク質は、チタン結合性をもち、DOPA 導入血管内皮細胞成長因子は、クロム合金への結合性をもつことがわかった。また、DOPA 導入骨形成タンパク質はチタン表面で、UE6E7T-12 細胞の骨分化を促進し、DOPA 導入血管内皮細胞成長因子固定化表面は、ヒト血管内皮細胞の成長を促進することがわかった。

チタン結合性を付与された骨形成タンパク質の調製スキーム



218. 医用材料の生体機能化のための接着性成長因子の開発

伊藤　嘉浩

理化学研究所 開拓研究本部 伊藤ナノ医工学研究室

Key words：成長因子，金属材料，固定化，水中接着タンパク質，タンパク質工学

緒　言

再生医療の発展のためには細胞から組織形成のためのスキャホールド、さらに細胞機能を様々に制御できる材料は必要不可欠である。しかし、材料は、細胞接着性やそれに伴う機能制御がせいぜいで、増殖や分化のような高次の細胞機能制御を、人工的な材料に担わせることは困難と考えられていた。そのような中、研究代表者は、固定化成長因子が、溶解状態の成長因子と異なり、長期間に亘り活性を保持できることを、1990 年代初頭に世界で初めて明らかにし、バイオマテリアル開発のための重要な要素であることを明らかにした［1］。さらに、これまでに、結合性成長因子が、溶解状態の成長因子と異なり、ダウンレギュレーションが阻害され、長期間に亘り活性を保持できることを、1990 年に世界で初めて明らかにし、1996 年にはその機構を明らかにした［2］。その後、マサチューセッツ工科大学の Griffith のグループでも、その効果が確認された［3］。現在では、世界中の多くのグループで、その効果が確認されるようになり、バイオマテリアル研究の大きな潮流のひとつとなっている。成長因子固定化の概念は、細胞機能を積極的に刺激するバイマテリアルとして、再生医療に、さらには幹細胞培養基材として益々重要性を増している［4］。

我々は、当初、成長因子の固定化法よりは、その作用原理の確認に主眼を置き、通常の化学的方法で有機材料に固定化し、精密な表面制御を行うものであったが、90 年代後半には、半導体製造技術で使われる光リソグラフィでマイクロパターン状に固定化して細胞機能を観測する手法を編み出し、固定化領域と非固定化領域上での細胞挙動を可視化できるようにして、固定化成長因子研究を大きく発展させることに成功した［5］。同時に、固定化成長因子特有の現象も多く見出した。特に溶解状態では成長を促進する上皮細胞成長因子（EGF）が、固定化すると分化を促進するようになる新しい発見を行ったことは、バイオマテリアル研究者だけでなく、広く細胞生物学研究者の関心を引き、生物学者による固定化成長因子の研究も始まった。その後、コラーゲンなど生体組織に結合する成長因子を、接着タンパク質のコラーゲン結合領域を成長因子と遺伝子組換え技術で融合させることによって調製し、生体内で高い活性を持つことを明らかにし、医療応用にむけての取り組みにも成功してきた。

ただし、これまでの成長因子の固定化は、有機系バイオマテリアルや生体組織が中心で、硬組織置換材料に用いられる無機系バイオマテリアルの金属（チタンなど）やセラミックス（ヒドロキシアパタイトなど）への固定化は困難があった［6］。そこで、我々は、これら無機材料へも容易に固定化可能な接着性の成長因子タンパク質そのものを創り出すことを考え、ムール貝が分泌する水中接着タンパク質から発想を得、成長因子タンパク質のインシュリン様成長因子（Insulin-like Growth Factor：IGF）に、水中接着タンパク質の活性部位の主成分アミノ酸 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン（DOPA）を導入し、チタン結合性の付与に成功した［7］。

本研究では、どのような成長因子にも基材接着性を付与できる、より一般的な DOPA 導入法を開発する。そして、応用性が高く、しかもチロシンが活性部位にある骨形成たんぱく質（Bone Morphogenetic Protein：BMP-2）や血管内皮細胞成長因子（Vascular Endothelial Growth Factor：VEGF）への接着性付与を行うとともに、短鎖のポリペプチドの上皮細胞成長因子（EGF）やインスリン様成長因子（IGF）については固相法による合成を試みた。

方　法

本研究では、以下の二つの方法を用いて、成長因子内のアミノ酸に影響を及ぼさない新しい一般的な DOPA 導入法を開発して接着性成長因子を開発し、チタンやクロム合金への結合性を付与する。

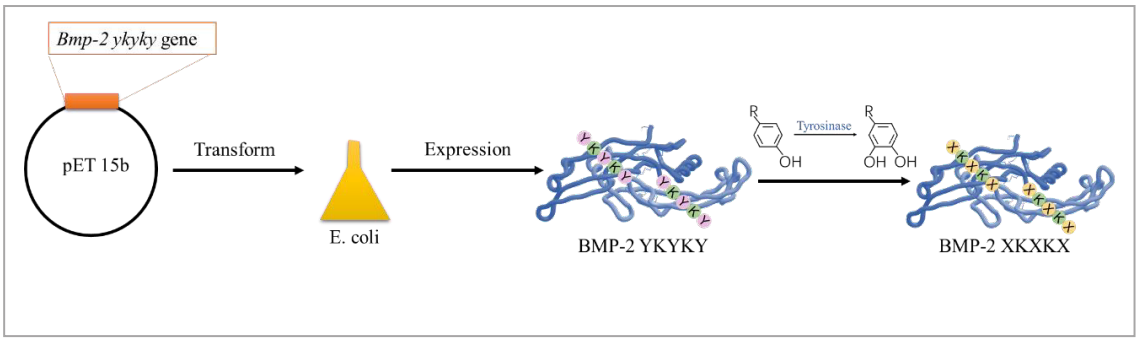


図 1.　接着性 BMP-2（BMP-2 - XKXKX）の合成方法
BMP-2 のカルボキシル基末端に YKYKY 配列を挿入し、大腸菌で発現させて精製した後、チロキシナーゼを用いてチロシンを DOPA に変換。

第一には、図 1 に示すように、DOPA 導入 BMP-2（BMP-2 - XKXKX）を合成した。これは、チタン接着性 IGF 合成と同様に、チロキシナーゼによるチロシン変換反応により合成した。

第二には、図 2 に示すようにタンパク質連結酵素であるソルターゼを用いて、従来の遺伝子工学で調製する成長因子と化学合成した DOPA を含むペプチドをライゲーションすることにより合成した。ソルターゼ連結反応に必要なアミノ酸配列（Leu-Glu-Pro-Tyr-Gly-Gly：LEPTGG）を VEGF に付加した配列の cDNA を設計し、調製、大腸菌によって大量合成し、精製した。このような VEGF 側に対して、非天然アミノ酸 DOPA を含有する結合性ペプチドに、ソルターゼ認識サイト Gly-Gly-Gly を付加した配列を固相法により合成し、結合させて VEGF - DOPA を調製した。

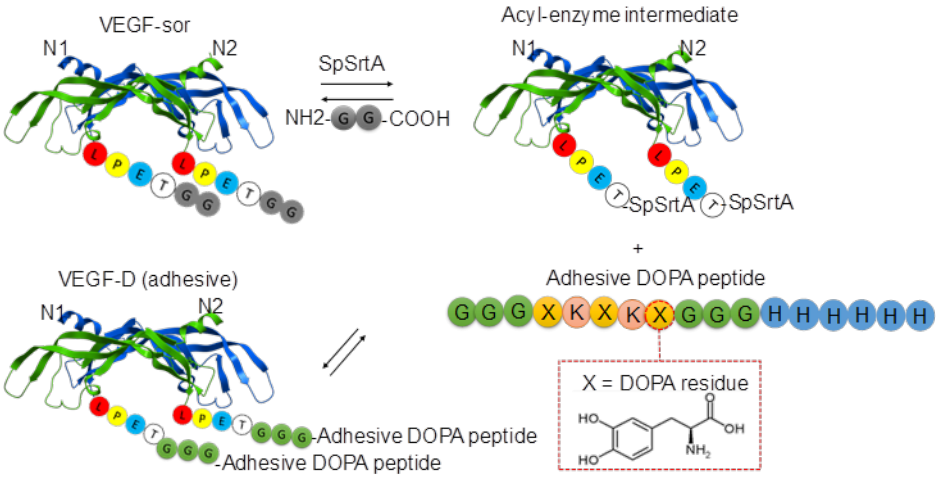


図 2.　接着性 VEGF の合成
VEGF 遺伝子にソルターゼ認識配列を導入し、大腸菌に発現させ、精製した後ソルターゼを用いて DOAP 含有ペプチドを結合させることにより合成。

第三には、EGF と IGF-1 のそれぞれの C 末端に、DOPA 含有接着性ペプチド配列 X-K-X-K-X-G（X : DOPA、K : リジン、G : グリシン）を連結したポリペプチド EGF-DOPA と IGF-DOPA を合成した。

結　果

1. 接着性 BMP-2

調製した BMP-2 - XKXKX に DOPA が導入されていることは、LC-MS/MS により確認した。チタンへの結合性を QCM-D で評価すると、 BMP-2 - XKXKX は、変換前の BMP-2 - YKYKY より高いチタン結合性をもつことがわかった。

UE6E7T-12 細胞を培養すると、BMP-2 固定化チタン上では骨分化と指標となるアルカリホスファターゼ活性が有意に増加することがわかった。さらに遺伝子発現を調べると骨マーカーとなる *RUNX2*、*OSTERIX* や *ALP* の遺伝子発現が、増強されていることもわかった。

2. 結合性 VEGF

VEGF - DOPA の合成確認も LC-MS/MS.で行った。Co-Cr 合金への結合性も QCM-D を用いて行った。DOPA 導入により顕著な合金結合性の増強が観測された。

VEGF - DOPA 修飾表面の生物学的評価は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（human umbilical vein endothelial cel : HUVEC）を用いて行ったところ、VEGF - DOPA 修飾表面で顕著な細胞増殖活性を観測することができた。

3. 結合性 EGF（EGF - DOPA）、結合性 IGF（IGF - DOPA）

弱アルカリ性の水溶液に溶かした両ポリペプチドの結合性を金属材料のチタン、セラミックス材料のヒドロキシアパタイト、有機材料のポリスチレンの各材料表面で評価したところ、いずれの材料表面上でも DOPA 含有接着性ペプチドの連結によってタンパク質の結合量が増加した（図 3）。

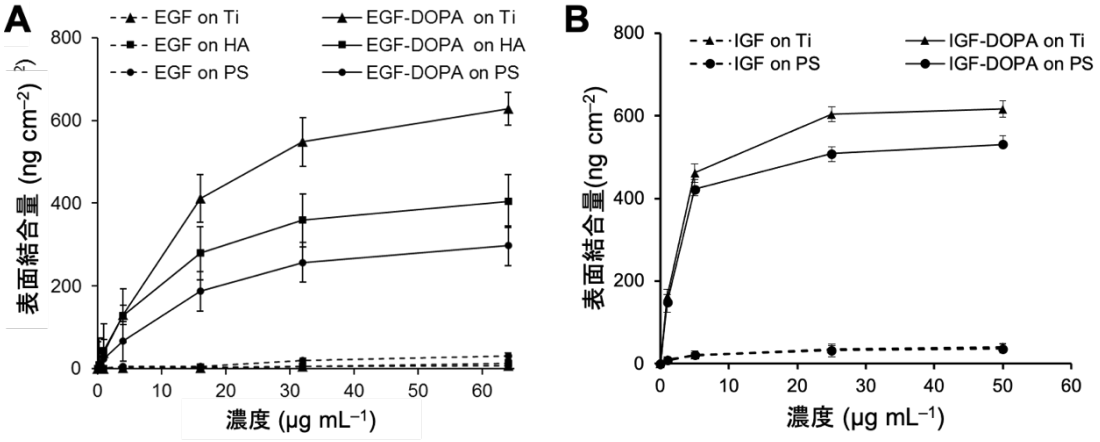


図 3. 接着性成長因子の材料表面への結合量

A）上皮細胞成長因子（EGF）およびポリペプチド EGF - DOPA の材料表面への結合量。Ti は、金属材料のチタン、HA はセラミック材料のヒドロキシアパタイト、PS は有機材料のポリスチレンを示す。EGF だけでは材料表面への結合は弱いが（破線）、DOPA を含有させたポリペプチドでは強い結合が見られた（実線）。数値は平均値±標準偏差（n=3）。

B）インスリン様成長因子（IGF）およびポリペプチド IGF - DOPA の材料表面への結合量。IGF だけでは材料表面への結合は弱いが（破線）、DOPA を含有させたポリペプチドでは、チタンとヒドロキシアパタイトでは強い結合が見られた（実線）。数値は平均値±標準偏差（n=3）。

次に、EGF - DOPA と IGF - DOPA の表面固定時の生理活性を評価した。3 種の材料表面に EGF - DOPA を固定化した表面上で NRK49F 細胞（ラット腎由来）を培養したところ、接着性ペプチドのない通常の EGF が培養液中に存在している場合と比較して、各材料表面で最大約 1.5 倍の細胞増殖誘導効果の増大が確認された（図 4A～C）。IGF - DOPA を固定化したチタン表面では、MC3T3-E1 細胞（マウス頭蓋冠由来）の骨芽細胞分化に伴う石灰化を評価したところ、通常の IGF と比較して最大 2.2 倍の分化誘導効果の増加が確認された（図 4D）。

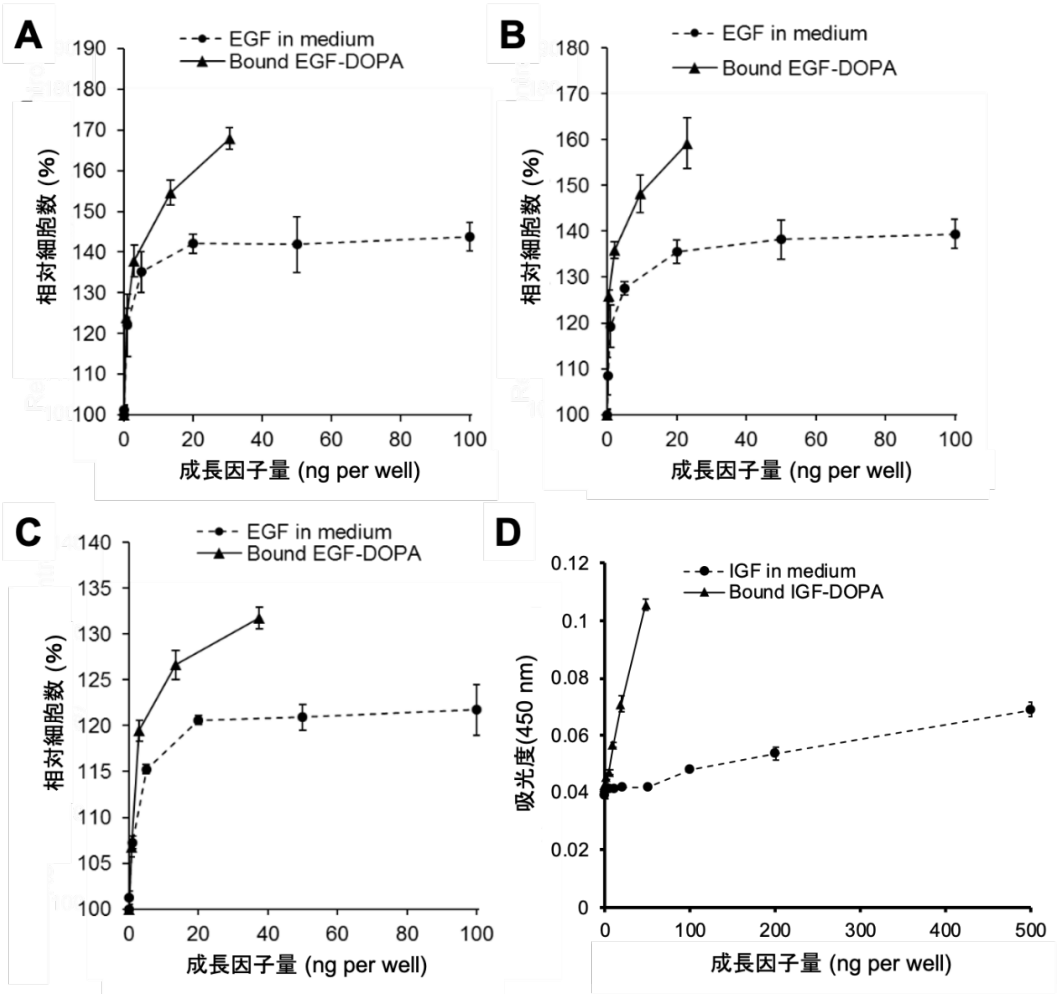


図 4. 接着性成長因子の生理活性評価

A、B、C）EGF - DOPA 固定化表面上での NRK49F 細胞（ラット腎由来）の増殖誘導効果。相対細胞数は EGF を添加しない条件での細胞数を 100%とした時の比率を示す。A はチタン上、B はヒドロキシアパタイト上、C はポリスチレン上の効果を示す。通常の EGF と比較して各材料表面で細胞増加率が最大約 1.5 倍増加した。数値は平均値±標準偏差（n=3）。

D）IGF - DOPA 固定化チタン表面上での MC3T3-E1 細胞（マウス頭蓋冠由来）の骨芽細胞誘導能評価。アリザリンレッドによる染色後、吸光度測定により定量化した。通常の IGF と比較して、細胞分化による吸光度増加率が最大 2.2 倍増加した。数値は平均値±標準偏差（n=3）。

また、チタン表面に固定化された EGF - DOPA は細胞内に取り込まれることなく、持続的に細胞を刺激し、増殖誘導していることが分かった。さらに、固定化された EGF - DOPA は細胞の接着面から細胞（細胞膜に存在する受容体）を刺激していることが共焦点顕微鏡による観察結果から明らかになった（図 5）。

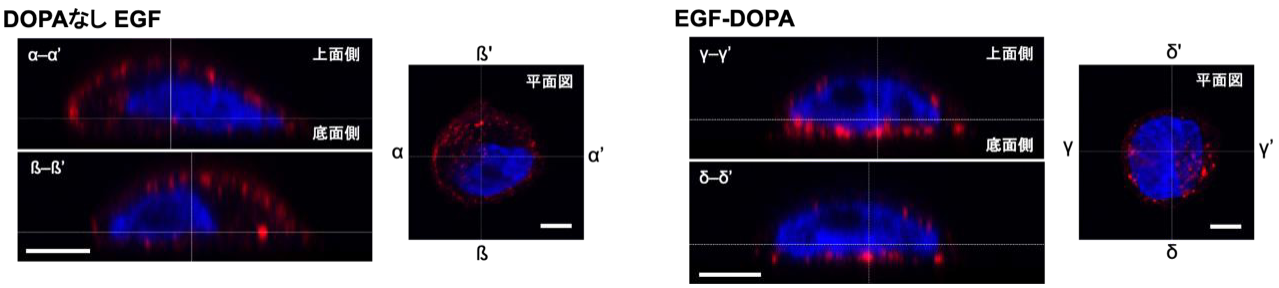


図 5. EGF-DOPA 固定化表面上での細胞刺激

α-α'、β-β'、γ-γ'、δ-δ'はそれぞれ、平面図に示された箇所の垂直断面図。赤色部は EGF によって刺激された細胞膜受容体（リン酸化 EGF 受容体）、青色部は核を示している。左側の DOPA のない通常の EGF では細胞膜全体に EGF 刺激箇所が分布しているが、右側の EGF - DOPA 表面上では EGF 刺激箇所が底部に集中している。スケールバーは 5 μ m。

考　察

本研究により、DOPA 導入により、チタンも Co-Cr 合金へも結合可能な成長因子の調製が可能となった。DOPA 導入により様々な材料へ固定化可能な成長因子の調製ができるようになることから、応用範囲は極めて広くなると期待できる。

結合性 BMP-2 そのものの応用範囲としては、チタン製の人工関節（膝関節、股関節）、骨固定化材、歯科インプラントへの応用が考えられる。BMP-2 固定化により早期のチタンの組織結合性の強化が期待できる。また、固定化するターゲットは、DOPA を用いることで、チタン以外のものも可能となり、ヒドロキシアパタイトを含む様々なセラミックスでできた骨充填剤へも応用できる。この場合も早期の骨修復が期待できる。結合性 VEGF は、ステントや人工弁への応用が期待でき、早期の組織修復、再生が期待できる。その他にも、肝細胞成長因子（HGF）、神経成長因子（NGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）などへも適用してゆくことで、従来の人工臓器で課題となっていた早期の生着性や、長期間の生着性維持を実現できると期待できる。

高齢化社会を迎え、様々な生体材料が必要になっている。本研究成果は上記の従来の人工臓器の性能向上だけでなく、現在研究が進められている再生医療による大型臓器の構築にも大きな寄与が期待できる。通常、組織工学では、スカフォールドと成長因子が別々に論じられることが多いが、本研究の成果をもとにすれば、これらは一体として作用し、精密に種類の異なる細胞を配置できるようになり、大型臓器構築に貢献できる。広く生体材料科学を介しての臨床応用の道を大きく拓くと期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立研究開発法人理化学研究所創発物性科学研究センター創発生体工学材料研究チームの多田誠一博士、開拓研究本部伊藤ナノ医工学研究室の宮武秀行博士、Xueli Ren 修士である。

文　献

1) Ito, Y.; Liu, S. Q.; Imanishi, Y. Enhancement of cell growth on growth factor-immobilized polymer film. Biomaterials 1991, 12, 449– 453, DOI: 10.1016/0142-9612(91)90141-V

2) Ito, Y.; Zheng, J.; Imanishi, Y.; Yonezawa, K.; Kasuga, M. Protein-free cell culture on an artificial substrate with covalently immobilized insulin. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A 1996, 93, 3598– 3601, DOI: 10.1073/pnas.93.8.3598

3) Kuhl, P. R.; Griffith-Cima, L. G. Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced simulation from the solid phase. Nat. Med. 1996, 2, 1022– 1027, DOI: 10.1038/nm0996-1022
4) Ito, Y. Growth factor engineering for biomaterials, ACS Biomater. Sci. Eng., 2019, 5 5597-5609, DOI: 10.1021/acsbiomaterials.8b01649
5) Ito, Y.; Kondo, S.; Chen, G.; Imanishi, Y. Patterned artificial juxtacrine stimulation of cells by covalently immobilized insulin. FEBS Lett. 1997, 403, 159– 162, DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00045-8
6) Zhou, D.; Ito, Y. Inorganic material surfaces made bioactive by immobilizing growth factors for hard tissue engineering. RSC Adv. 2013, 3, 11095– 11106, DOI: 10.1039/c3ra23313h
7) Zhang, C.; Miyatake, H.; Wang, Y.; Inaba, T.; Wang, Y.; Zhang, P.; Ito, Y. A bioorthogonal approach for the preparation of a titanium-binding insulin-like growth factor-1 derivative using tyrosinase. Angew. Chem., Int. Ed. 2016, 55, 11447– 11451, DOI: 10.1002/anie.201603155