生体分子及び細胞選択的機能制御のための Biomaterials Informatics (BI) 的 バイオマテリアル設計法の提案

栗　本　理　央

２０１８年　２月

筑波大学大学院博士課程

数理物質科学研究科博士論文

博士（工学）

生体分子及び細胞選択的機能制御のための Biomaterials Informatics (BI) 的 バイオマテリアル設計法の提案

栗　本　理　央

物質・材料工学専攻

目次

第 1 章 1
1.1. 医療分野における高分子材料の進歩 2
1.2. 臨床で用いられる医療機器における高分子材料 3
1.2.1. 生体分子によって機能化された医療機器 3
1.2.2. 小分子リガンドによって機能化された医療機器 4
1.2.3. リガンドとしての生体適合性合成高分子材料 5
1.2.3.1. Polyethylene glycol (PEG) 5
1.2.3.2. Poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) 6
1.2.3.3. Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) 7
1.2.3.4. 生体適合性合成高分子材料の設計課題 7
1.2.4. 情報解析を用いた生体適合性合成高分子材料の開発 8
1.3. 本論文の主題と構成 11
1.3.1. 本論文の主題：リガンドと高分子材料との組み合わせ 11
1.3.2. 本論文の構成 13
1.4. 参考文献 14
第 2 章 18
2.1. 緒言 19
2.1.1. 自己免疫疾患 19
2.1.2. 自己免疫疾患に対するアフェレーシス治療に用いられる吸着カラム 19
2.1.3. 本研究のストラテジー及び目的 20
2.2. 実験 20
2.2.1. 実験材料 20
2.2.2. EVOH ナノファイバーメッシュ材料の調製 21
2.2.3. EVOH フィルム材料の調製 21
2.2.4. EVOH ナノファイバーメッシュ及びフィルム材料へのカルボキシ基修飾 21
2.2.5. EVOH ナノファイバーメッシュ材料のキャラクタリゼーション 21
2.2.6. γ-グロブリン及びアルブミン吸着評価 21
2.3. 結果と考察 22
2.3.1. MA 修飾前後における EVOH ナノファイバーメッシュのキャラクタリゼーション 22
2.3.2. γ-グロブリンの吸着評価 24
2.3.3. ナノファイバーメッシュ材料上における γ-グロブリンの吸着に関する定性評価 27
2.3.4. γ-グロブリン及びアルブミンの吸着選択性評価 27
2.4. 結論 28
2.5. 参考文献 29
第 3 章 33
3.1. 緒言 34
3.1.1. 自己免疫疾患と抗 DNA 抗体 34

3.1.2. 免疫吸着カラムと吸着リガンド 34
3.1.3. DNA リガンドの合成方法 35
3.1.4. 本研究のストラテジー及び目的 35
3.2. 実験 35
3.2.1. DNA 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの作製及び抗 ssDNA 抗体吸着能評価 35
3.2.1.1. 実験材料 35
3.2.1.2. EVOH ナノファイバーメッシュへの DMT-dG の固定化 36
3.2.1.3. DMT-dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの脱保護 37
3.2.1.4. dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの抗 ssDNA 抗体吸着能評価 37
3.2.2. DNA コンジュゲート高分子材料の抗 ssDNA 抗体吸着能評価及びメッシュ化の検討 37
3.2.2.1. 実験材料 38
3.2.2.2. DNA コンジュゲートモノマーの合成 38
3.2.2.3. DNA コンジュゲートモノマーの重合 38
3.2.2.4. DNA コンジュゲート高分子材料の標的分子の吸着評価 38
3.2.2.5. DNA コンジュゲート高分子材料のナノファイバーメッシュ化の検討 39
3.3. 結果と考察 39
3.3.1. DNA 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの作製及び抗 ssDNA 抗体吸着能評価 39
3.3.1.1. EVOH ナノファイバーメッシュへの DMT-dG の固定化 39
3.3.1.2. DMT-dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの脱保護 39
3.3.1.3. dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの抗 ssDNA 抗体吸着能評価 41
3.3.2. DNA コンジュゲート高分子材料の抗 ssDNA 抗体吸着能評価及びメッシュ化の検討 42
3.3.2.1. DNA コンジュゲートモノマーの合成 42
3.3.2.2. DNA コンジュゲートモノマーの重合 43
3.3.2.3. Poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long の抗 ssDNA 抗体吸着能評価 45
3.3.2.4. Poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long のナノファイバー化の検討 45
3.4. 結論 47
3.5. 参考文献 47
第 4 章 49
4.1. 緒言 50
4.1.1. 臨床で用いられる骨接合材料の現状と課題 50
4.1.2. 骨再生促進タンパク質 50
4.1.3. 本研究のストラテジー及び目的 51
4.2. 実験 51
4.2.1. 実験材料 51
4.2.2. In silico スクリーニングによる候補ペプチドの絞り込み 53
4.2.3. 細胞培養 53
4.2.4. ペプチドアレイ合成 53
4.2.5. ペプチドアレイを用いた細胞増殖評価 53
4.2.6. ペプチドアレイを用いた ALP 活性評価 53

4.2.7. 統計解析 53
4.3. 結果と考察 54
4.3.1. ペプチドアレイスクリーニングの条件検討 54
4.3.2. In silico スクリーニングによる候補ペプチドの決定 55
4.3.3. ペプチドアレイを用いた骨形成細胞増殖ペプチドの探索 55
4.3.4. ペプチドアレイを用いた骨分化促進ペプチドの探索 55
4.3.5. 細胞選択的骨形成促進ペプチドの決定 63
4.4. 考察 63
4.5. 結論 65
4.6. 参考文献 65
第 5 章 70
5.1. 緒言 71
5.1.1. 循環器系医療機器表面における生体機能性向上のためのアプローチ 71
5.1.2. 細胞接着性リガンドとしての短鎖ペプチドの生体機能性と医療機器への応用 71
5.1.3. 高分子材料の物性と細胞接着性の関係 71
5.1.4. 本研究のストラテジー及び目的 72
5.2. 実験 73
5.2.1. 実験材料 73
5.2.2. 組み合わせ検証プラットフォームの作製 73
5.2.3. 組み合わせプラットフォームのキャラクタリゼーション 74
5.2.4. 細胞培養 75
5.2.5. 細胞接着評価 75
5.2.6. 統計解析 75
5.3. 結果 75
5.3.1. 組み合わせプラットフォームのキャラクタリゼーション 75
5.3.2. 細胞接着評価 77
5.4. 考察 79
5.5. 結言 80
5.6. 参考文献 81
第 6 章 85
6.1. 緒言 86
6.2. 実験 87
6.2.1. 実験材料 87
6.2.2. Poly(CL-*co*-DLLA)のキャラクタリゼーション 87
6.2.3. ペプチド固定化 poly(CL-*co*-DLLA)基板の調製 89
6.2.4. 細胞培養 89
6.2.5. 細胞接着評価 89
6.2.6. 細胞接着評価の多変量解析 91
6.2.7. 細胞接着性マップの生体材料設計指針としての応用検証 91

6.3. 結果 91
6.3.1. 高分子材料の性質のキャラクタリゼーション 91
6.3.2. 細胞接着評価 93
6.3.3. 細胞接着性に対するペプチドと高分子材料の組み合わせ効果のマップ化 99
6.3.4. 細胞接着性に対するペプチドと高分子材料の組み合わせ効果のマップ化 101
6.4. 考察 102
6.5. 結言 105
6.6. 参考文献 106
第 7 章 109
【発表リスト】 112
【発表論文 (Proceedings 含む)】 112
【発表総説】 112
【国際学会及びシンポジウムにおける研究発表】 112
【国内学会及びシンポジウムにおける研究発表】 115
【受賞歴等】 117
【アウトリーチ活動】 117
【報道】 118
【その他】 118
【謝辞】 119

第 1 章

緒言

1.1. 医療分野における高分子材料の進歩

日本のプラスチック製品の消費量は約 1000 万 t/年であると算出されているように、我々の生活はプラスチック製品に支えられているといっても過言ではない [1] (Fig. 1-1)。また、100 円均一ショップにある日用品の殆どが、プラスチック製品であることからも明白である。プラスチック製品は、高分子材料で作られており、その材料の特徴として、軽い、安価な製造コスト、優れた機械的特性、柔軟性、成型加工性に富む等の性質を有する。こうした特徴から、生活用品から衣料品、食品、医療製品など様々な分野で汎用的に用いられてきた。その中でも特に、医療分野における高分子材料の進歩は医療機器の開発に密接に関わってきている。高分子材料の医療分野への応用は 1940 年頃から始まったといわれている [2]。Fig. 1-2 の年表にあるように、1939 年に動脈瘤の破裂を防止するための補強材料としてセロファンが用いられた。さらに、1941 年には、ナイロン製の縫合糸が開発されてきた。また、1940 年代に入ると、poly(methylmethacrylate) (PMMA)製の眼内レンズが開発され、1947 年には polyethylene (PE)製の骨(軟骨)を代替する材料も開発されたと報告されている。このように、医療用高分子材料の歴史は、まだ 70~80 年程度であるものの、様々な高分子材料が医療分野に応用され、改良を加えられながら、昨今の医療機器として形を成している。しかしながら、上述のような医療用高分子材料だけでなく、汎用的な高分子材料の開発や産業化も医療分野にとって大きな影響を与えてきた。その中でも、1928 年にアメリカにて実用化が開始された polyvinyl chloride (PVC)[3] や 1957 年にイタリアにて実用化が始まった polypropylene (PP)[4] は医療機器のディスポーザブル化という点において、非常に重要な材料であった [5]。このように、医療機器の進歩は高分子材料の開発・産業化に推し進められてきた。

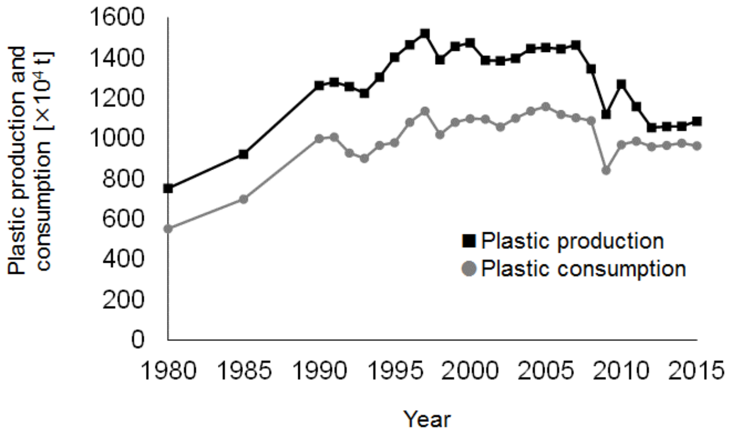


Fig. 1-1 Domestic plastic production and consumption from 1980 to 2015[1].

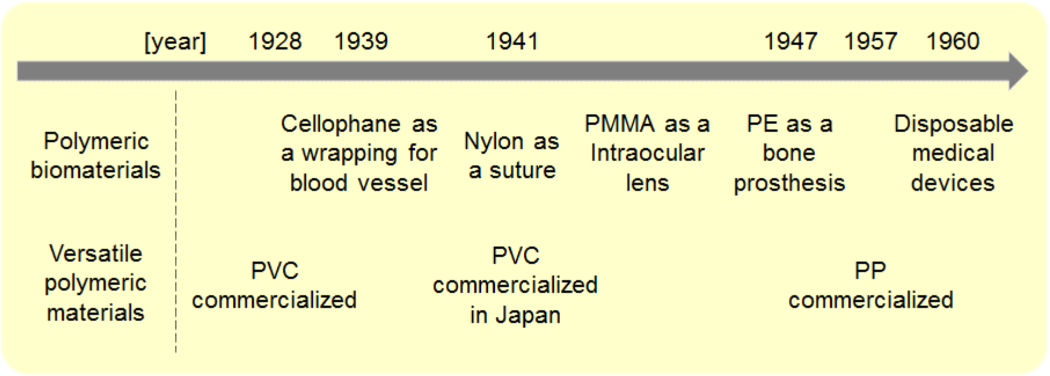


Fig. 1-2 Chronicles of polymeric biomaterials and versatile polymeric materials[2-5].

1.2. 臨床で用いられる医療機器における高分子材料

わが国の医療現場で用いられる医療機器は 50 万種類以上にも及び、それらの殆どの医療機器の設計には、高分子材料は必要不可欠である。例えば、バイオセンサーのような医療機器では、polyacrylamide ゲルが用いられていたり、血液浄化カラムには、アガロースや poly(vinyl alcohol) (PVA)、ethylenevinylalcohol copolymer (EVOH)がよく利用されている [6]。カテーテルは、polyurethane (PU)や PE、expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)などの高分子材料によって構成されることが多い [5]。組織修復パッチもしくはチューブ材料においては、移植後に生分解されるような設計を狙って PU や poly-L-lactic acid (PLLA)、polycaprolactone (PCL)、poly(glycol acid) (PGA)が用いられている [7]。人工血管は、移植型の医療機器であるが、血液の安定的な供給を維持するため、現状ではしばしば分解性の低いポリエステル系高分子材料や ePTFE を用いて設計されている。

1.2.1. 生体分子によって機能化された医療機器

汎用性の高い高分子材料において、高分子材料自身では生体との親和性は十分でないことが多い。そのため、その親和性を高めるような機能化として、タンパク質や deoxynucleic acid (DNA)、糖鎖などを高分子材料表面に固定化する手法がよく取り組まれている [8]。本博士論文中では、高機能化を図るために材料表面に固定化される生体分子などの分子を“リガンド”として定義する。医療機器の機能化にしばしば用いられるリガンドの種類について、その相互作用の種類や作用力、主な担体材料、医療応用例などの情報と共に Table. 1 にまとめた。Table. 1 (a)では、酵素-基質及び抗原-抗体、基質-受容体の相互作用、または Fc 結合などを作用力とする生物学的なリガンドについて紹介する。Table. 1 (a)からわかる様

Table. 1-1 Developed or developing medical devices immobilizing with biological (a) or non-biological (b) ligands.

(a)

Ligand	Target molecule	Binding mode	Substrate	Application
Glucose oxidase	Glucose	Enzyme-substrate	Polyacrylamide gel	Biosensor
Protein A	IgG (Immunocomplex)	Fc binding	Porous silica	Blood purification system
Antibody	Low density lipoprotein (LDL)	Antigen-antibody	Agarose beads, Silica beads	Blood purification system
Urokinase	Plasminogen	Enzyme-substrate	polyurethane	Anti-thrombogenic retentive catheter
Collagen, gelatin	Endothelial cell	Ligand-receptor	ePTFE	Artificial blood vessel
Collagen	Nerve cell	Ligand-receptor	PGA	Conduit for peripheral Nerve Regeneration
Antibody	Cell membrane protein	Antigen-antibody	Magnetic beads	MACS
Calf thymus DNA	Anti-nucleotide antibody	Antigen-antibody	Agarose beads	Blood purification system
Glycopolymer	Verotoxin	Ligand-receptor	Cellulose	Blood purification system
Saccharide	HepG2	Ligand-receptor	PIPAAm	Temperature-esponsive cell cultureware

(b)

Ligand	Target molecule	Binding mode	Substrate	Application
Hexadecyl group	β2-microglobulin	Hydrophobic interaction	Polyacrylic acid beads	Blood purification system
Carboxy group	IgG	Hydrophobic (Electrostatic) interaction	Magnetic beads	Vitro diagnostic kit
Phenilalanine Triptphan	Anti-acetylcholie receptor antibody Anti-nucleotide antibody	Complex interaction (hydrophobic and electrostatic)	PVA gel beads	Blood purification system
Peptide	Endothelial cell Smooth muscle cell	Complex interaction (hydrophobic and electrostatic)	PCL	Artificial blood vessel Tissue repairing patch

に、これらのリガンドは、グルコースのような小分子から細胞のようなマイクロスケールの物質まで様々なサイズ・種類の標的物質を対象として利用され、バイオセンサーから血液浄化装置、再生医療まで様々な医療機器に応用されている。

一方、Table. 1 (b)では、疎水結合や静電結合などの物理化学的な相互作用を作用力とするヘキサデシル基及びカルボキシ基のような官能基やフェニルアラニンなどのアミノ酸・ペプチドのリガンドについて紹介する。物理化学的な相互作用に基づく作用力は、一般的に生物学的な作用力に比べて弱いものの、タンパク質や細胞に対して十分に特異的に作用すると報告されている [9-12]。

1.2.2. 小分子リガンドによって機能化された医療機器

Table. 1 のリガンドの種類の中でも、ペプチドやアミノ酸のように断片化された分子はタンパク質のような 3 次元的な立体構造を持たないため、化学合成や精製がより容易である。したがって、工業化を考慮した際には、より小さなリガンド分子を用いた医療機器設計を行うことで滅菌過程の効率が改善されうるなどの大きな期待が寄せられる。この期待度の高さは、抗体医薬品の分野におけるペプチド医薬の注目の高さからも伺える [13]。Table. 1 において、特に注目すべき点は、断片化された分子のリガンドは生物学的な相互作用だけでなく、リガンド分子全体の物理化学的な相互作用が組み合わされた、総合的な相互作用を利用している点である。一般的に生物学的な相互作用 (解離定数 (Kd) $< 10^{-7}$)よりも弱いものの、十分な特異性があると報告されている [14]。その例として、フェニルアラニンもしくはトリプトファンがリガンドとして固定化されたイムソーバ PH®及び TR®は、静電結合と疎水結合が組み合わさった複合的な作用力で自己免疫疾患の病原物質である Immunoglobulin G (IgG)抗体や免疫複合体などを選択的に吸着除去するため、全身性エリテマトーデス (SLE)などの自己免疫疾患の血液浄化治療に頻繁に用いられている [9, 10] (Fig.1-3)。その他の例として、短鎖ペプチドリガンドの物理化学的な性質によって細胞を選択的に接着促進する効果についても報告されている [11, 12]。Kanie らは、ペプチドリガンドのアミノ酸配列 (RGD: Arg-Gly-Asp, フィブロネクチンの機能性部位)以外に物理化学的な性質が細胞接着に関与しているという仮説を立て、特に ECM タンパク質が有する細胞選択的な接着性の違いに着目し、ECM タンパク質に特徴的に存在する配列群を 3 残基で断片化した。それら候補ペプチドリガンドの細胞選択的な接着促進能は、ペプチドアレイ合成機によって作製されたペプチドアレイ上にて調べられた [12, 15, 16] (Fig. 1-4)。その結果として、間葉系幹細胞を選択的に接着させるペプチド (ALNGR: Ala-Leu-Asn-Gly-Arg)や、血管内皮細胞選択的接着ペプチド (CAG: Cys-Ala-Gly 及び III: Ile-Ile-Ile)、平滑筋細胞選択的接着ペプチド (ATK: Ala-Thr-Lys)などの様々な細胞種に対して選択的な接着能を有する細胞選択的ペプチドを

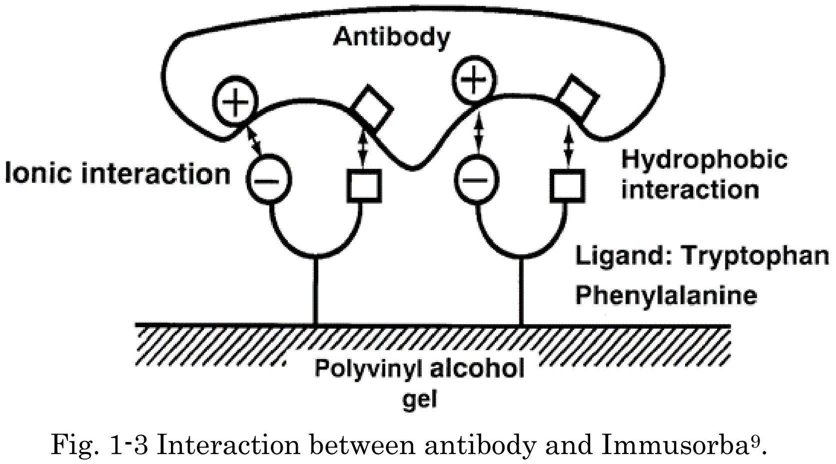


Fig. 1-3 Interaction between antibody and Immusorba[9].

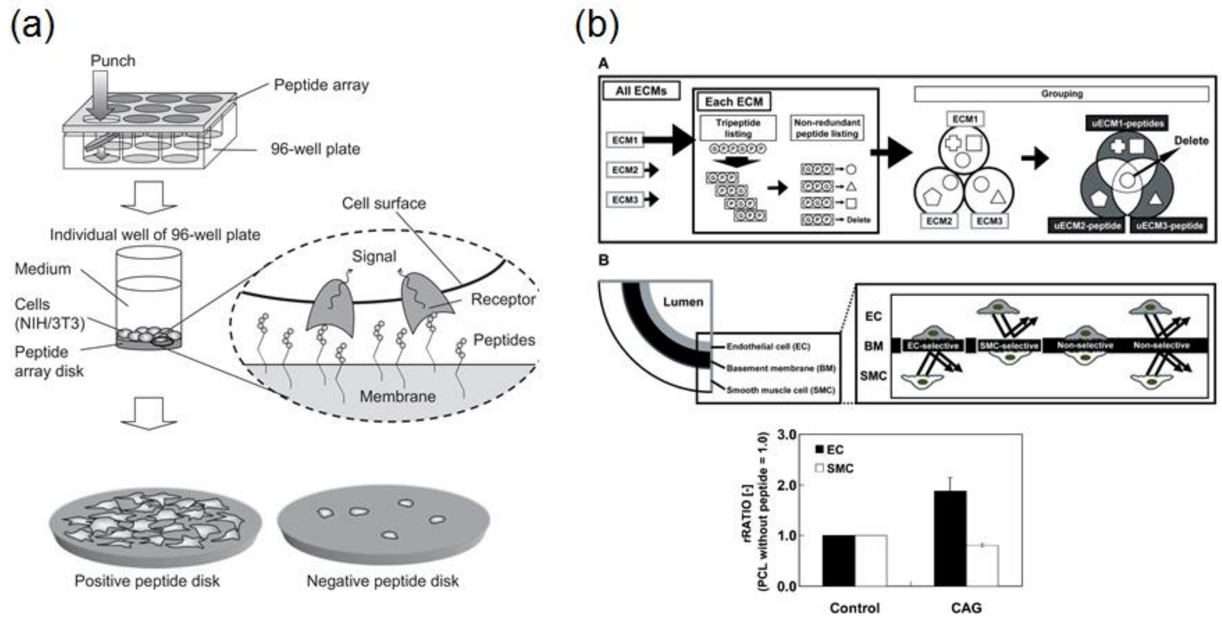


Fig. 1-4 (a) Schematic illustrations of peptide array-based interaction assay of solid-bound peptides and anchorage-dependent cells (PIASPAC)[16], (b) A schematic concept of unique ECM-specific peptides, flow in silico analysis to obtain unique ECM-specific peptides (A), and model of expected function of unique collagen IV-specific peptides (B). A result of cell adhesion assay on PCL fine-fiber sheet with or without CAG peptide[12].

取得してきている[12, 17]。これらの報告されている物理化学的に作用する小分子リガンドは承認審査の厳しい我が国において、非常に重要な機能化リガンドであるといえる。

1.2.3. リガンドとしての生体適合性合成高分子材料

1.2.1.及び 1.2.2.にて述べたリガンドを用いた医療機器設計の他に、高分子材料そのものだけで生体適合性を高めるためのアプローチもよく取り組まれている。その歴史の中でも古くから研究されてきている高分子材料の一つが、polyethylene glycol (PEG)である。古くは、1950 年頃から水性二相分配法に用いられるようになり[18]、1980 年代に入ってからは生体適合性基材の開発研究に用いられるようになった[19]。こうした歴史を踏まえて、これまでに様々な生体適合性合成高分子材料が開発されてきたが、それらの中でも特筆すべき開発例は、Tanaka らが開発した poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA)[20, 21] と、Ishihara らが開発した poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC)である[22, 23]。これらの生体適合性合成高分子材料について、リガンドの概念に触れながら PEG 及び PMEA、PMPC それぞれについて、1.2.3.1. 及び 1.2.3.2.、1.2.3.3.にて詳細に述べる。

1.2.3.1. Polyethylene glycol (PEG)

PEG は、ethylene glycol が連なった化学構造の合成高分子であり、主鎖骨格中のエーテル酸素において水分子と強い水素結合を形成する[19]。故に、水溶媒との高い親和性を示す。また、PEG は大きな排除体積効果及び水溶媒中での高い運動性を合わせもつ[24]。そして、これらの性質によって PEG の生体適合性基材開発研究への可能性が見出されてきた。電気的に中性で運動性の高い PEG を基材表面に固定化

すると、その表面上にはタンパク質や細胞の接着が抑制される[25]。これまでに、この性質を生かした生体適合性表面が数多く報告されている。特に、Nagasaki らは、長鎖の PEG と短鎖の PEG を組み合わすことで PEG 鎖の高密度化を図り、非特異吸着抑制能の向上を実現している[26] (Fig. 1-5 (a))。さらに、Nagasaki らは、この非特異吸着を抑制する表面設計技術を酵素結合免疫測定法 (ELISA)などで用いられるブロッキング処理への応用にも取り組んでいる[27] (Fig. 1-5 (b))。ここで特筆すべきことは、抗体とのハイブリッド界面を構築した際に、ただ単にブロッキングによる非特異吸着を抑制するだけでなく、抗体の配向性が安定化し、抗原認識能も向上した点である。このような技術は、生体センサなどの装置中のセンシング部の設計などに有用である。

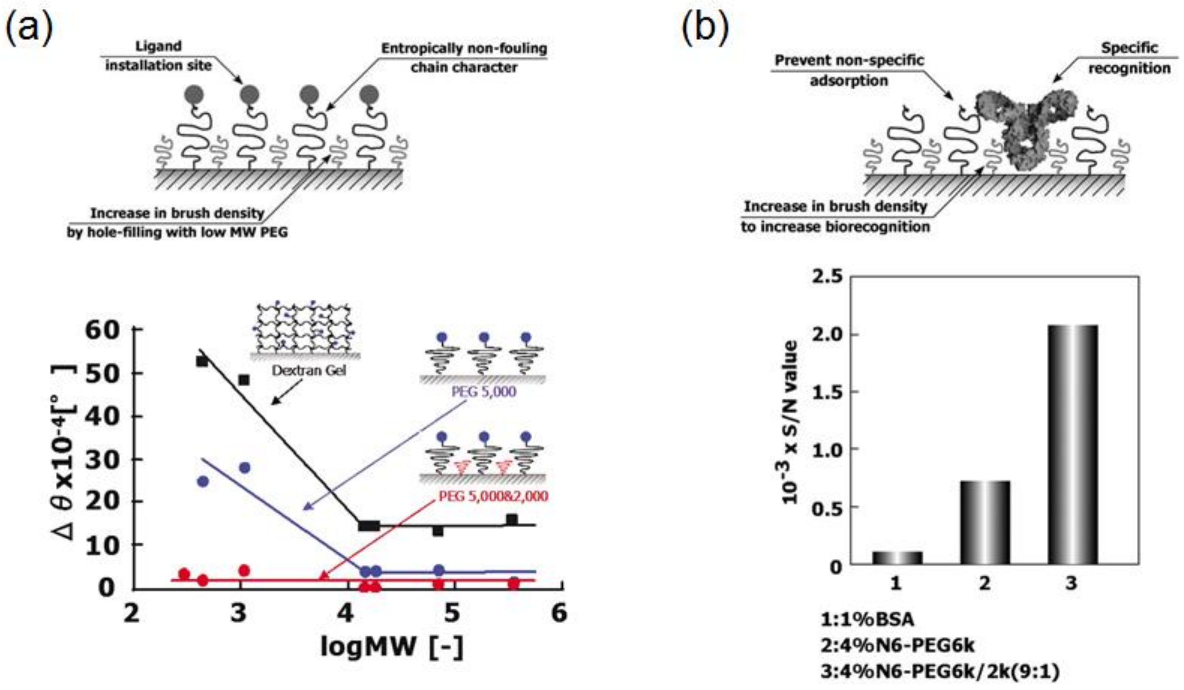


Fig. 1-5 (a) Mixed-poly(ethylene glycol) (PEG) tethered-chain surface (long PEG chain improves non-fouling character, and short PEG chain increases PEG chain density)[25]. Molecular weight dependency of the nonspecific adsorption of proteins and peptides on the poly(ethylene glycol) (PEG) chain surface and the values given by the carboxyl-dextran sensor chip[19]. (b) Antibody/mix poly(ethylene glycol) (PEG) hybridized surface (densely packed mix PEG chain improves not only non-fouling character but also orientation of antibody)[25]. Effect of fill-in treatment of short N6-PEG on S/N data[27].

1.2.3.2. Poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA)

PMEA は、alkoxyalkylacrylate を主成分とする合成高分子の一種であり、非水溶性であるにもかかわらず優れた血液適合性を発現することが 2000 年に Tanaka らによって見出された[21]。その優れた血液適合性は、PMEA が蛋白質の吸着変性を促進する疎水性側鎖を分子内に持たず、エーテルとエステルによる適度な親水性と高い分子運動性とを有し、そのコーティング表面に中間水による安定した水和構造を形成することに起因すると考えられている。その結果、PMEA でコーティングした表面では血漿蛋白質の吸着変性が抑えられ、高い血液適合性を発現するものと考えられている[21]。

さらに、この PMEA をフルコーティングした人工心肺システムは、現在世界中の心臓手術で使用されており、良好な成績を得ている。その血液適合性については、国内外の臨床グループより多くの報告がなされている [28]。また、この PMEA をリガンドのように扱う取り組みも行われている。PP は、優れた耐薬品性、水・有機溶媒中における寸法安定性や高い機械的強度を有するものの、その材料表面において生体との親和性は低い。そのため、プラズマ開始気相グラフト重合法を用いて PP の表面から 2-methoxyethylacrylate (MEA)をグラフトすることで、PP 表面に優れた血液適合性の機能付加が可能となる。さらに、別の分子認識側鎖を有するモノマーと共重合させることで選択的吸着性の機能付加も実現している [29] (Fig. 1-6)。このように、PMEA をコーティング材料として扱うことで、様々な応用が期待できる。

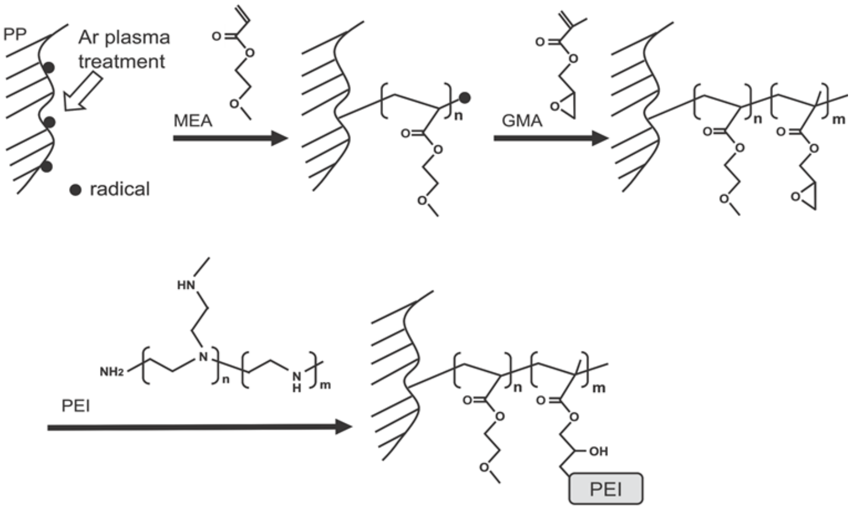


Fig. 1-6 Synthetic scheme of blood-compatible and target molecule-selective adsorptive PP membrane[29].

1.2.3.3. Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC)

一方、PMPC は、1978 年に細胞膜表面の物理化学的特徴をヒントに細胞膜のリン脂質を模倣した高分子材料として、その血液との高い親和性が Kadoma らによって見出された [23]。その後、1990 年に Ishihara らによって大量合成が可能な画期的な方法が開発された後、加速的に PMPC の生体親和性に関する研究が発展していった [22]。この PMPC は、タンパク質の吸着を抑制するために、細胞系の反応や免疫反応、組織反応を誘起しない、当時は世界で初めて生体になじむポリマーであった、と言われている。そのため、PMPC も PMEA 同様、コーティング材料として扱うことで、様々な生体非親和性材料の機能化が実現可能となる [30] (Fig. 1-7)。これまでにコンタクトレンズや人工肺、人工腎臓、人工水晶体、血管拡張ステント、化粧品素材など、様々な応用に関する研究が進められてきており、その中でも、埋め込み型人工心臓の表面処理材としての応用は非常に良好な結果を示し、埋め込み型人工補助心臓 EVAHEART®にも用いられている [31]。

1.2.3.4. 生体適合性合成高分子材料の設計課題

1.2.3.1.及び 1.2.3.2.、1.2.3.3.において、最も有名な生体適合性合成高分子材料として、PEG 及び PMEA、PMPC についての開発過程やその応用例を紹介した。しかしながら、これらの生体適合性合成高分子材料のもつ課題として、研究から開発までの期間の長さが挙げられる。こうした完全合成高分子材料では、

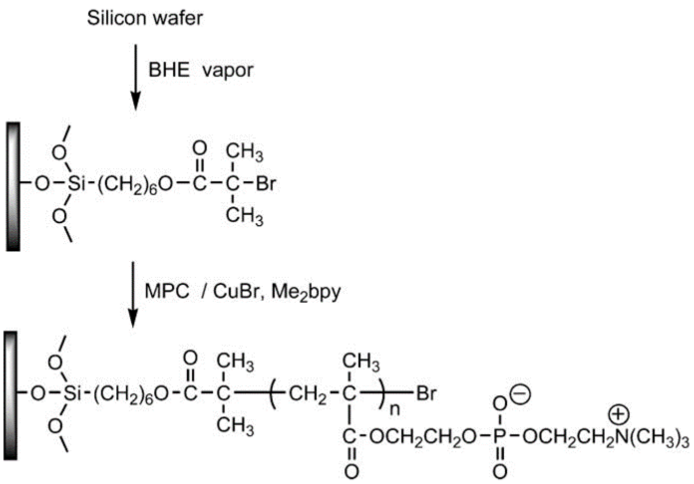


Fig. 1-7 Synthetic scheme of PMPC[30].

仮説に基づいた、目標とする化学構造での機能性評価だけでなく、安定的な合成プロセスの構築が求められるため、開発期間が長引いてしまう可能性がある。実際に、PMPC の開発例をとると、1978 年に PMPC が初めて開発されたものの[23]、合成プロセスの問題から PMPC の特性評価及び医療機器表面への応用は 1990 年代になって進み出した[22]。したがって、材料設計段階の研究に約 12 年要したことになり、生体適合性合成高分子材料の開発研究の難しさが伺える。

1.2.4. 情報解析を用いた生体適合性合成高分子材料の開発

1.2.3.にて述べた生体適合性合成高分子材料は、長い開発期間が要するものの、生物由来の成分を用いない完全合成材料であることから非常に価値の高い材料であることは明白である。そのため、こういった生体適合性合成高分子材料の開発期間の短縮を目指した試みとして、情報解析の技術を取り入れたアプローチ (Biomaterials Informatics)も取り組まれている。この Biomaterials Informatics 的なアプローチに関する研究の歴史を Fig. 1-8 にまとめた。Fig. 1-8 の年表からわかるように、この分野における歴史は非常に浅く、最も古いであろうと思われる研究でも 1997 年である[32]。すなわち、この情報解析を取り入れた生体適合性合成高分子材料の分野の研究は 30 年にも満たない、まだまだ未成熟な分野であると言え

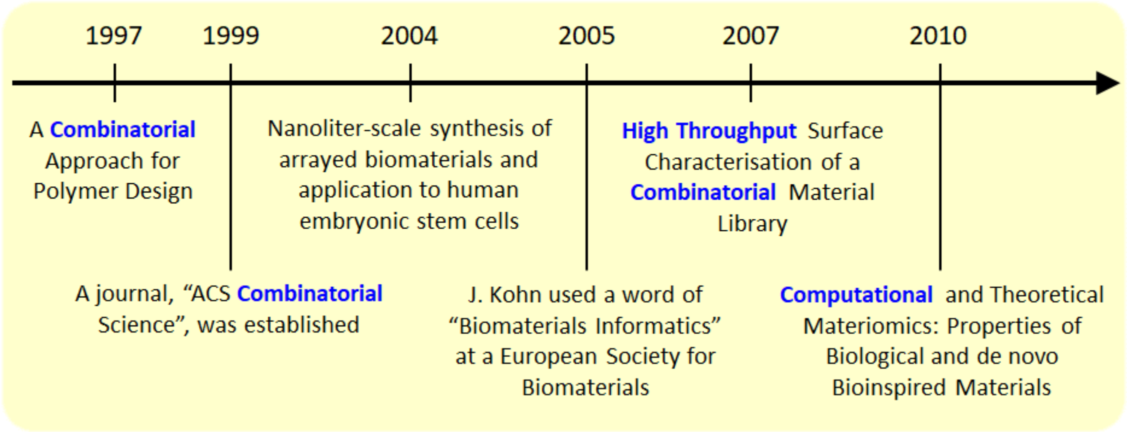


Fig. 1-8 Chronicle of Biomaterials Informatics[32,35,36,38].

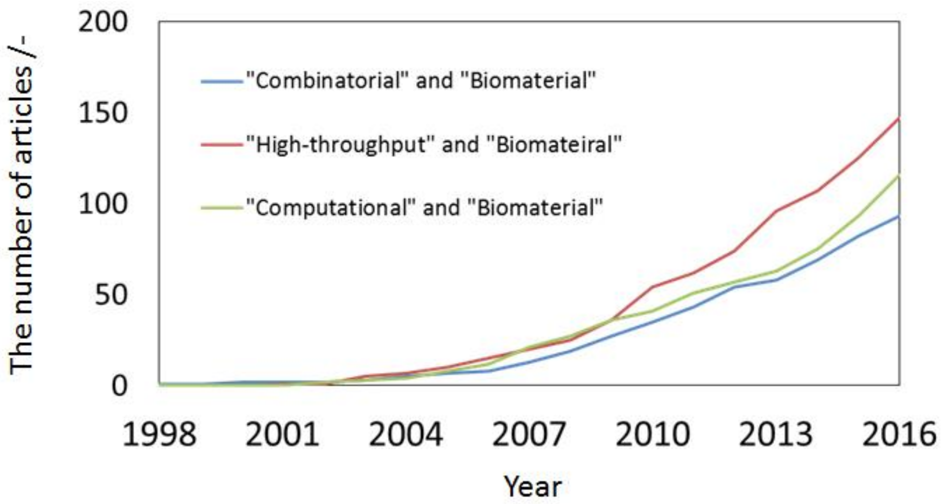


Fig. 1-9 Histories of key words for Biomaterials Informatics.

る。そして、生体適合性合成高分子材料と情報解析の関係性を語る上で、以下の 3 つのキーワードが重要であるといわれている[33, 34]。1) コンビナトリアル (Combinatorial analysis)、2) ハイスループットスクリーニング (High throughput screening)[35]、3) 計算モデリング (Computational modelling)[36] である。生体材料研究の分野において、これらのキーワードは、Fig. 1-9 のグラフのように、20 世紀に入ってから急激に使用されるようになってきた。さらにこの分野の歴史をひもとくと、1997 年に Brocchini らが生体適合性合成高分子材料設計のための高分子ライブラリ構築のコンセプトを提唱し[32] (Fig. 1-10 (a))、2004 年にはこの高分子ライブラリを用いて細胞増殖性を予測する ANN 回帰モデルを構築している[33] (Fig. 1-10 (b))。2001 年には Lynn らも parallel synthesis や高分子ライブラリを用いた設計アプローチを報告し[37]、2004 年にはコンビナトリアルな高分子マイクロアレイを用いたハイスループットな細胞接着評価系を構築している[38] (Fig. 1-11 (a))。さらに、2010 年には、高分子マイクロアレイから得られる高分子材料の物性データに基づいて幹細胞のコロニー形成能を予測する計算モデリングを構築され、情報解析を取り入れた細胞培養基材の設計法が提唱された[39] (Fig. 1-11 (b))。

また、Brocchini らの作製した高分子ライブラリはエステル系高分子によって構成されている[32]。つまり、生分解が起こりうる材料を用いて、長期培養が必要となる細胞の増殖性を予測することに成功している[33]。これは、生分解性の高分子材料を用いたライブラリでも、生物学的な相互作用の結果を予測するための高分子ライブラリとして有用であることを示している。

Biomaterials Informatics 的なアプローチによって、生物学的な相互作用を予測できれば、生体材料を設計する際の設計方針を決定するツールとしても利用が期待される。そして、予測モデルを構築する際の入力値となるデータベースのライブラリの大きさが大きくなるほど、精度の高いツールとなりうる。しかしながら、大きなデータベースでは、入力値の中には予測モデリングに不要な指標も存在することが多い。そのため、近年ではモデル構築時に不要な指標を排除していくことが可能な (スパースな)推定アルゴリズムとして、Tibshirani らによって開発された Lasso 回帰が注目されている[40]。この Lasso 回帰を用いる利点として、不要な指標を排除することによる計算量の減少や入力されるデータベースに対する過学習の抑制が期待されている。

また、これまでの情報解析を用いた生体適合性合成高分子材料の開発研究において、リガンドとその固定先となる高分子材料との組み合わせに着目した取り組みはまだ報告されていない。

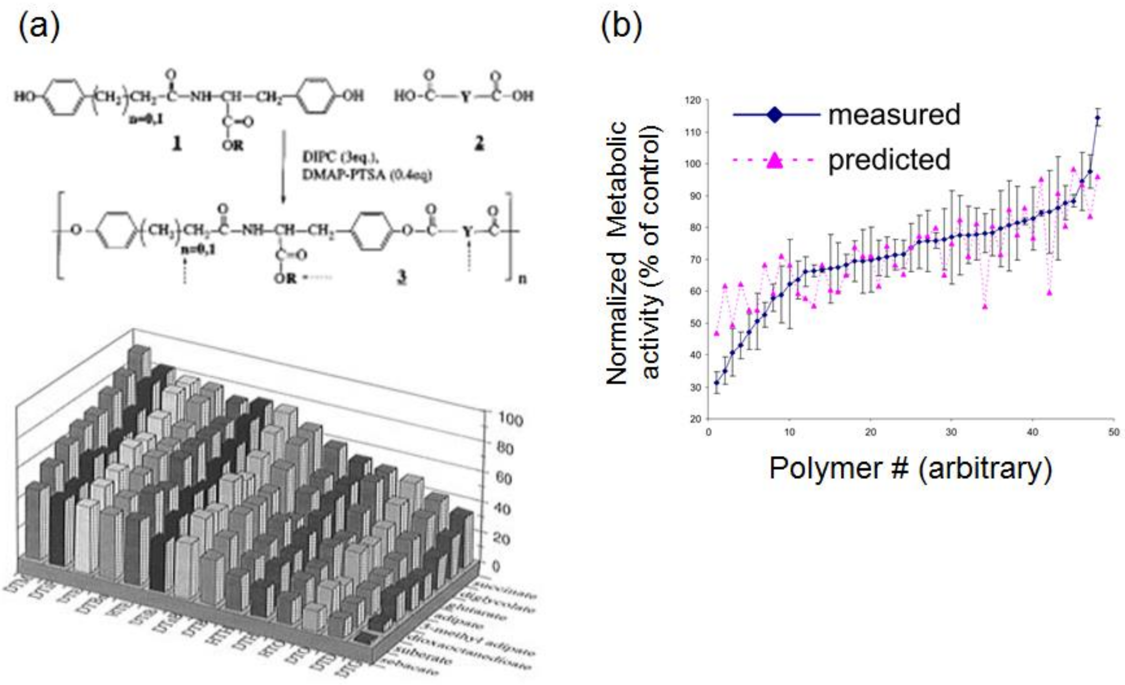


Fig. 1-10 (a) Library of 112 polyarylates (3) was derived from 14 tyrosine-derived diphenols (1) and eight diacids (2), which provides various polymer glass transition temperatures as function of the diacids present in the polymer backbone (y axis) and the diphenol alkyl esters which determine the structure of the polymer pendent chain (x axis)[32]. (b) Comparison between experimental values for fibrinogen adsorption and the values predicted by the ANN[33]. The figure in the reference report was modified.

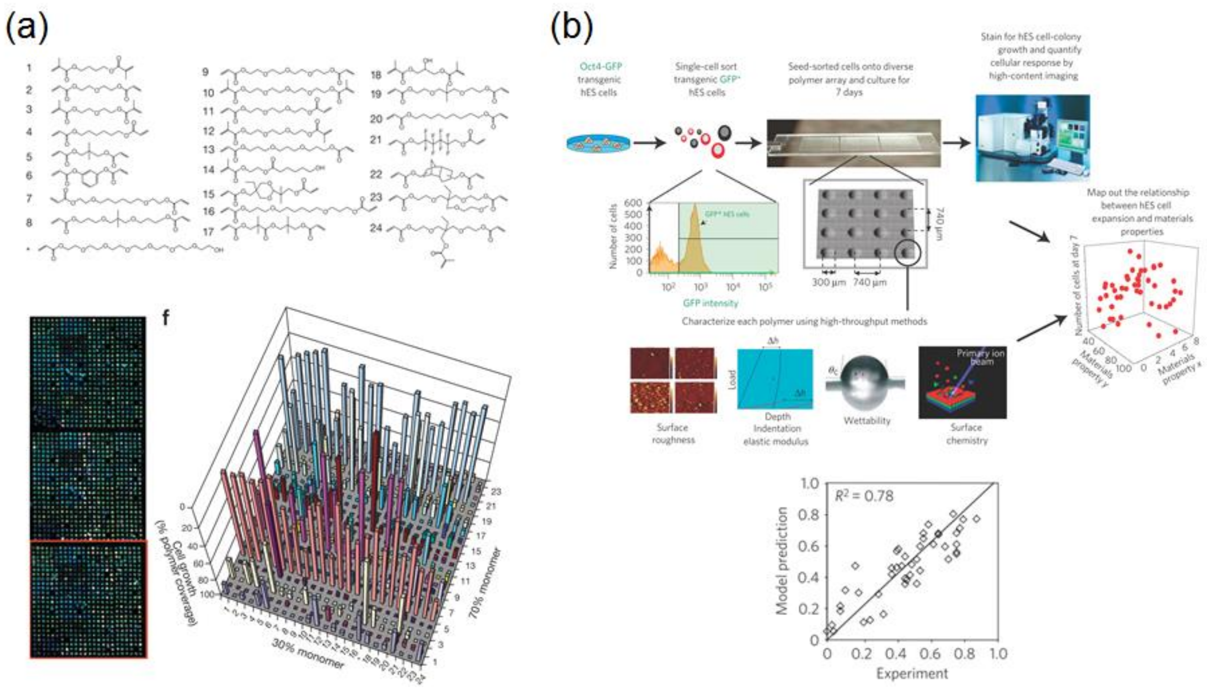


Fig. 1-11 (a) Monomers used for biomaterial microarray synthesis, hES cells grown on polymer arrays, and cell attachment and growth (z axis) as a function of polymer composition (x, y axis)[38]. (b) Schematic diagram of the screen. Each polymer was also characterized using high-throughput methods to characterize its surface roughness, indentation elastic modulus, wettability (water contact angle, θ_C) and surface chemistry. Finally, the cellular response on polymer array was quantified by using laser-scanning cytometry, and structure-function relationships were determined by numerical analysis of both the cellular response and materials characterization data[39].

1.3. 本論文の主題と構成

1.3.1. 本論文の主題：リガンドと高分子材料との組み合わせ

1.2.において紹介したように、高分子材料を用いた医療機器の設計においてリガンドを用いた設計は非常に簡便で、有用なアプローチであることがわかる。しかしながら、それらのリガンドを固定する先となる高分子材料自身の物理化学的な性質も標的物質との相互作用に影響を及ぼしうるため、リガンドと高分子材料の組み合わせ次第では、リガンドの有する機能が大きく変化してしまうことが懸念される。細胞接着性のリガンドである RGD ペプチドでは、固定先の固さの違いによってペプチドの効果が変化することが Ye らによって報告されている [41] (Fig. 1-12)。具体的には、硬い基材 (3170 kPa)の上では、RGD の接着促進効果が大きく見られるのに対し、柔らかい基材 (130 kPa)においては、その効果が減弱した。さらに RGD の固定化密度が減少すると、硬い基材に比べて柔らかい基材においてより接着が促進された。また、筆者らも、スクリーニングから選抜された複数種類の内皮細胞選択的な接着促進ペプチドを医療用ステント基材 (Diamond-like Carbon コーティング)上に修飾したところ、その選択性の効果が消失してしまう現象を確認している (Fig. 1-13)。

これらの結果からも、リガンドの効果は、その固定先となる材料の性質によって影響を受けることは

明白である。したがって、本来、スクリーニング等によって選抜されてきた“標的物質と選択的に相互作用するリガンド”の効果が維持されるような、リガンドと高分子材料の組み合わせを最適化するようなアプローチが重要となる。しかしながら、Fig. 1-14 に示すように、リガンドの固定先となる高分子材料の性質は硬さ及び電荷、濡れ性など多種多様な指標で複合的に表されるため、それらの指標のうち、どの指標がどのくらい影響を及ぼすか、についての複合的な検証は難しい。そこで、筆者はリガンドと高分子材料の性質とを組み合わせた際の複合的な効果について検証するため、複合的な指標の関係性を扱える回帰分析の手法を用いることを考えた。したがって、本論文では、情報解析の技術を用いた生体材料の設計法として、Biomaterials Informatics (BI) 的アプローチを用いた新規生体材料設計について提案していく。

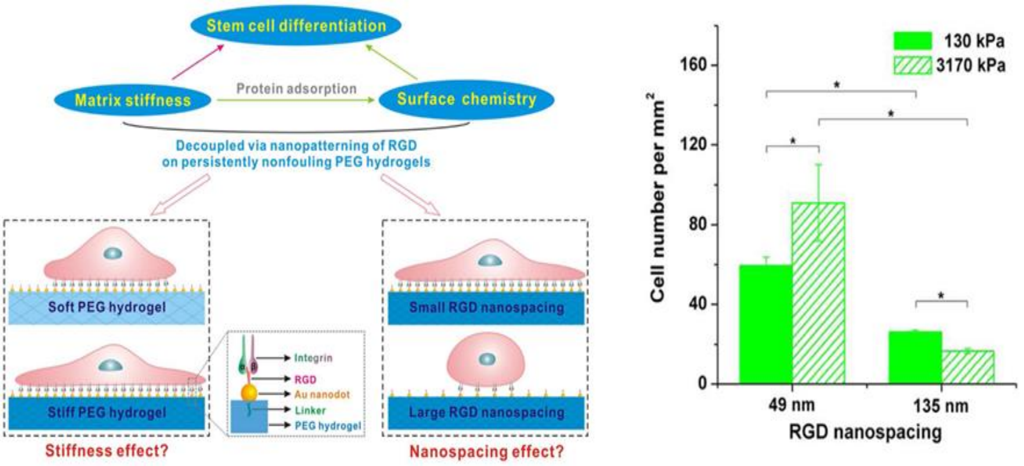


Fig. 1-12 Schematic illustration of the idea to investigate the effects of stiffness of matrix and organization of cell-adhesive ligands on cell adhesion[41].

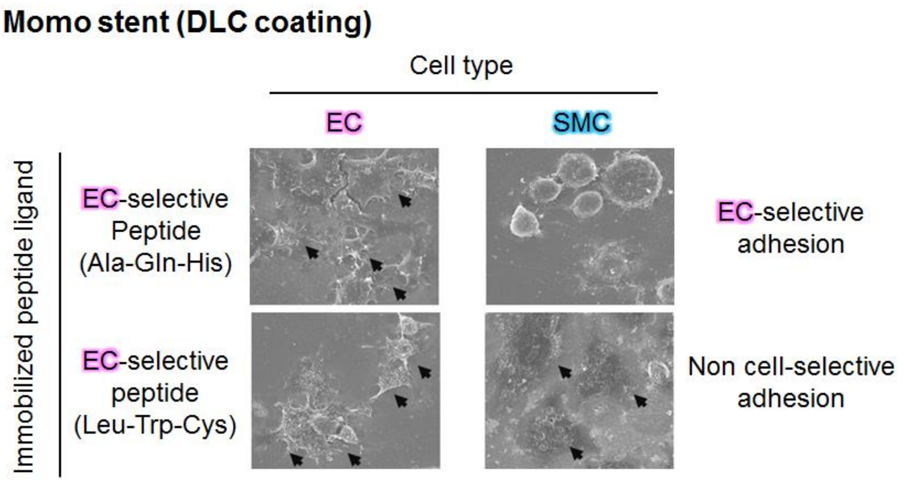


Fig. 1-13 Mismatch combinations between a material (DLC coated stent material) and ligands (EC-selective adhesion peptides: AQH and LWC) on cell adhesion assay for EC and SMC.

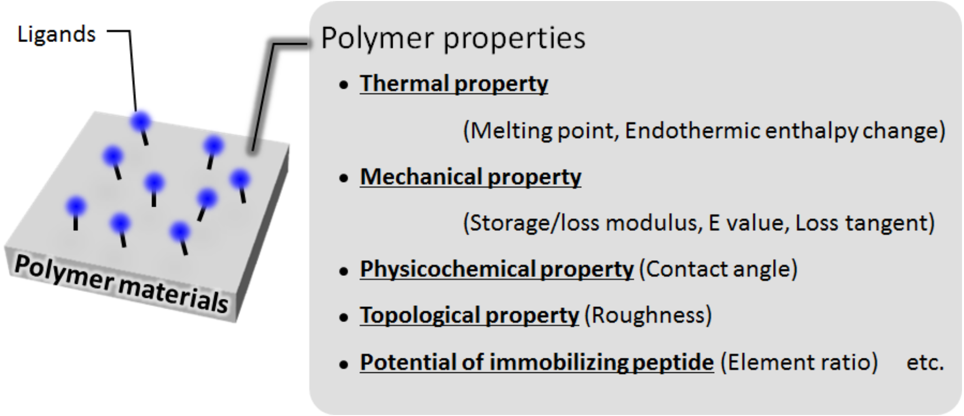


Fig. 1-14 Important polymer properties to design biomaterials.

1.3.2. 本論文の構成

本論文では、応用先となる医療機器のタイプを「一時的に生体成分と接触する医療機器のためのリガンド固定化高分子材料」と「移植型医療機器のためのリガンド固定化高分子材料」に分けることでリガンドと高分子材料の組み合わせにおける研究例を紹介していく (Fig. 1-15)。

この二種類のそれぞれ医療機器のケースにおいて、リガンドと高分子材料の組み合わせを利用した医療材料の設計を目指した。第 2 章及び第 3 章では、①血液浄化用カラムなどの一時的に生体成分と接触する医療機器開発に焦点を当て、リガンドと高分子材料の組み合わせによる血漿タンパク質等の選択的な吸着制御について述べる。続いて、第 4 章及び第 5 章では、②骨接合材料や人工血管等の移植型医療機器に着目し、リガンドと高分子材料の組み合わせによる細胞挙動 (接着及び増殖、分化)の選択的な制

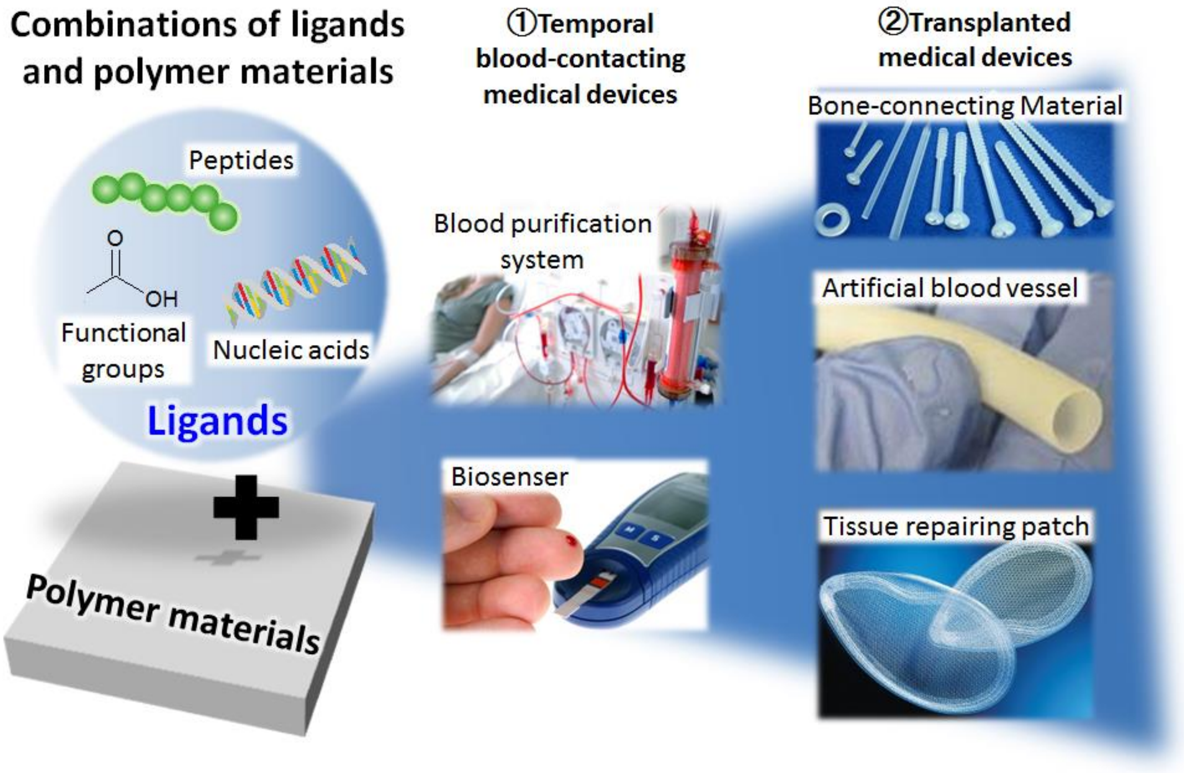


Fig. 1-15 Conceptual diagram of combinational effects of ligands and polymers.

御について述べる。最後に、第 6 章では、複数の因子と様々な相互作用を取りうる“ファジー”な標的成分である細胞をより効果的に制御するために、Biomaterials Informatics (BI) 的アプローチを用いた新規生体材料設計法について提案する。

1.4. 参考文献

1 *2015 年 プラスチック製品の生産・廃棄・再資源化・処理処分の状況*; 一般社団法人 プラスチック循環利用協会: 2016.

2 Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., *Biomaterials Science, 3rd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*. 2012.

3 Mulder, K.; Knot, M., PVC plastic: a history of systems development and entrenchment. *Technology in Society* **2001,** *23*, 265-286.

4 中村真悟, 石油化学工業における多品種大量生産プロセスの成立と展開: ポリプロピレン生産プロセスを事例に. **2014.**

5 千秋和久, 医療機器の現況と,それを支える高分子素材. *高分子* **2007,** *56*, 758-761.

6 Nakano, A., Ethylene Vinyl Alcohol Co-Polymer as a High-Performance Membrane: An EVOH Membrane with Excellent Biocompatibility. *High-Performance Membrane Dialyzers* **2011,** *173*, 164-171.

7 高澤弘明, 生体吸収性高分子の医療材料への応用. *繊維機械学会誌* **1996,** *49*, P111-P121.

8 Idota, N.; Ebara, M.; Kotsuchibashi, Y.; Narain, R.; Aoyagi, T., Novel temperature-responsive polymer brushes with carbohydrate residues facilitate selective adhesion and collection of hepatocytes. *Science and Technology of Advanced Materials* **2012,** *13*.

9 Hirata, N.; Kuriyama, T.; Yamawaki, N., Immusorba TR and PH. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* **2003,** *7*, 85-90.

10 Yoshida, M.; Tamura, Y.; Yamada, Y.; Yamawaki, N.; Yamashita, Y., Immusorba TR and immusorba PH: Basics of design and features of functions. *Therapeutic Apheresis* **2000,** *4*, 127-134.

11 Kanie, K.; Kato, R.; Zhao, Y. Z.; Narita, Y.; Okochi, M.; Honda, H., Amino acid sequence preferences to control cell-specific organization of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. *Journal of Peptide Science* **2011,** *17*, 479-486.

12 Kanie, K.; Narita, Y.; Zhao, Y. Z.; Kuwabara, F.; Satake, M.; Honda, S.; Kaneko, H.; Yoshioka, T.; Okochi, M.; Honda, H.; Kato, R., Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells. *Biotechnology and Bioengineering* **2012,** *109*, 1808-1816.

13 藤井郁雄, 次世代抗体医薬：立体構造規制ペプチド・ライブラリーを用いた分子標的ペプチド（マイクロ抗体）の創出. *Drug Delivery System* **2011,** *26*, 593-603.

14 Hatanaka, Y., Selective Adsorption of Immunoglobulin G and Immunoglobulin M from Plasma without Adsorption of Fibrinogen by Using Thienyl Amino Acids as Ligands. *Journal of Chromatography & Separation Techniques* **2013,** *04*.

15 Kato, R.; Kaga, C.; Kanie, K.; Kunimatsu, M.; Okochi, M.; Honda, H., Peptide Array-Based Peptide-Cell Interaction Analysis. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2011,** *8*, 171-177.

16 Kato, R.; Kaga, C.; Kunimatsu, M.; Kobayashi, T.; Honda, H., Peptide array-based interaction assay of solid-bound peptides and anchorage-dependant cells and its effectiveness in cell-adhesive peptide design. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2006,** *101*, 485-495.

17 Kurimoto, R.; Kanie, K.; Uto, K.; Kawai, S.; Hara, M.; Nagano, S.; Narita, Y.; Honda, H.; Naito, M.; Ebara, M.; Kato, R., Combinational Effects of Polymer Viscoelasticity and Immobilized Peptides on Cell Adhesion to Cell-selective Scaffolds. *Analytical Sciences* **2016,** *32*, 1195-1202.

18 Zalipsky, S.; Harris, J. M., Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol). In *Poly(ethylene glycol)*, American Chemical Society: 1997; Vol. 680, pp 1-13.

19 長崎幸夫, 生体適合性ポリエチレングリコール表面の構築. *高分子* **2012,** *61*, 77-82.

20 Morita, S.; Tanaka, M.; Ozaki, Y., Time-resolved in situ ATR-IR observations of the process of sorption of water into a poly(2-methoxyethyl acrylate) film. *Langmuir* **2007,** *23*, 3750-3761.

21 Tanaka, M.; Motomura, T.; Kawada, M.; Anzai, T.; Kasori, Y.; Shiroya, T.; Shimura, K.; Onishi, M.; Mochizuki, A., Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) - relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface. *Biomaterials* **2000,** *21*, 1471-1481.

22 Ishihara, K.; Ueda, T.; Nakabayashi, N., Preparation of Phospholipid Polymers and Their Properties as Polymer Hydrogel Membranes. *Polymer Journal* **1990,** *22*, 355-360.

23 門磨義則; 中林宣男; 増原英一; 山内淳一, ホスホリルコリン基を有するポリマーの合成と溶血性. *高分子論文集* **1978,** *35*, 423-427.

24 Allen, C.; Santos, N.; Gallagher, R.; Chiu, G.; Shu, Y.; M Li, W.; Johnstone, S. A.; S Janoff, A.; Mayer, L.; Webb, M.; B Bally, M., *Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol).* 2002; Vol. 22, p 225-250.

25 Nagasaki, Y., Construction of a densely poly(ethylene glycol)-chain-tethered surface and its performance. *Polymer Journal* **2011,** *43*, 949.

26 Uchida, K.; Hoshino, Y.; Tamura, A.; Yoshimoto, K.; Kojima, S.; Yamashita, K.; Yamanaka, I.; Otsuka, H.; Kataoka, K.; Nagasaki, Y., Creation of a mixed poly(ethylene glycol) tethered-chain surface for preventing the nonspecific adsorption of proteins and peptides. *Biointerphases* **2007,** *2*, 126-130.

27 Nagasaki, Y.; Kobayashi, H.; Katsuyama, Y.; Jomura, T.; Sakura, T., Enhanced immunoresponse of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface construction of high-performance immunomagnetic ELISA system. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007,** *309*, 524-530.

28 Onishi, M.; Shimura, K.; Seita, Y.; Yamashita, S., Design of a new plasma separation membrane by graft copolymerization. *Radiation Physics and Chemistry* **1995,** *46*, 219-223.

29 大西誠人, 高分子材料の表面機能化と医療機器への応用. *表面科学* **2011,** *32*, 581-596.

30 Kobayashi, M.; Terayama, Y.; Hosaka, N.; Kaido, M.; Suzuki, A.; Yamada, N.; Torikai, N.; Ishihara, K.; Takahara, A., Friction behavior of high-density poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) brush in aqueous media. *Soft Matter* **2007,** *3*, 740-746.

31 Snyder, T. A.; Tsukui, H.; Kihara, S.; Akimoto, T.; Litwak, K. N.; Kameneva, M. V.; Yamazaki, K.; Wagner, W. R., Preclinical biocompatibility assessment of the EVAHEART ventricular assist device: Coating comparison and platelet activation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007,** *81A*, 85-92.

32 Brocchini, S.; James, K.; Tangpasuthadol, V.; Kohn, J., A combinatorial approach for polymer design. *Journal of the American Chemical Society* **1997,** *119*, 4553-4554.

33 Smith, J. R.; Seyda, A.; Weber, N.; Knight, D.; Abramson, S.; Kohn, J., Integration of combinatorial synthesis, rapid screening, and computational modeling in biomaterials

development. *Macromolecular Rapid Communications* **2004,** *25*, 127-140.

34 Cranford, S. W.; de Boer, J.; van Blitterswijk, C.; Buehler, M. J., Materiomics: An -omics Approach to Biomaterials Research. *Advanced Materials* **2013,** *25*, 802-824.

35 Urquhart, A. J.; Anderson, D. G.; Taylor, M.; Alexander, M. R.; Langer, R.; Davies, M. C., High throughput surface characterisation of a combinatorial material library. *Advanced Materials* **2007,** *19*, 2486-+.

36 Buehler, M. J., Computational and Theoretical Materiomics: Properties of Biological and de novo Bioinspired Materials. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience* **2010,** *7*, 1203-1209.

37 Lynn, D. M.; Anderson, D. G.; Putnam, D.; Langer, R., Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: Parallel synthesis and screening of degradable polymer library. *Journal of the American Chemical Society* **2001,** *123*, 8155-8156.

38 Anderson, D. G.; Levenberg, S.; Langer, R., Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* **2004,** *22*, 863-866.

39 Mei, Y.; Saha, K.; Bogatyrev, S. R.; Yang, J.; Hook, A. L.; Kalcioglu, Z. I.; Cho, S. W.; Mitalipova, M.; Pyzocha, N.; Rojas, F.; Van Vliet, K. J.; Davies, M. C.; Alexander, M. R.; Langer, R.; Jaenisch, R.; Anderson, D. G., Combinatorial development of biomaterials for clonal growth of human pluripotent stem cells. *Nature Materials* **2010,** *9*, 768-778.

40 Tibshirani, R., Regression shrinkage and selection via the Lasso. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* **1996,** *58*, 267-288.

41 Ye, K.; Wang, X.; Cao, L. P.; Li, S. Y.; Li, Z. H.; Yu, L.; Ding, J. D., Matrix Stiffness and Nanoscale Spatial Organization of Cell-Adhesive Ligands Direct Stem Cell Fate. *Nano Letters* **2015,** *15*, 4720-4729.

第２章

化学官能基リガンドを導入した高分子
ナノファイバーメッシュ材料による
血漿タンパク質の選択的吸着制御

2.1. 緒言

2.1.1. 自己免疫疾患

研究対象となる疾患において最も主要なトピックは、がんや循環器系疾患であるが、自己免疫疾患のような慢性疾患は二十一世紀において深刻な課題である。この自己免疫疾患の患者は先進国において約 40 万人と見積もられており、その数はますます増加の一途をたどっている [1, 2]。自己免疫疾患は、感染細胞を攻撃する代わりに自己組織を攻撃してしまう自己抗体が産生される免疫異常に起因し、臓器などの組織において炎症反応が引き起こす。全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE)や 1 型糖尿病、関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA)、慢性炎症性腸疾患などのような臨床的に明確な自己免疫疾患は 80 種類を越えると見積もられている。多くの自己免疫疾患は、今もなお根治療法が未確立であるため、その対処療法に注目が集まっている。血液中において最も一般的なタイプの抗体である免疫グロブリン G (IgG)や、その他体液の生産を抑制するため、コルチコステロイドやリツキシマブのような免疫抑制剤がよく用いられる [3]。しかしながら、副作用は用いる免疫抑制剤の種類によって大きく異なる。加えて、このアプローチでは、IgG のサブクラスの血中半減期が約三週間ほどであるため、IgG の産生を抑制しても血中から除くには長い治療期間を要する [4]。

2.1.2. 自己免疫疾患に対するアフェレーシス治療に用いられる吸着カラム

アフェレーシス治療の内、特に免疫吸着療法は、急性増悪期の自己免疫疾患患者に対する短期的な治療として、現在最も有望な治療方法である [5]。現在、臨床現場で用いられる免疫吸着療法用の医療機器のほぼ全てにおいて、IgG や低密度リポプロテイン、炎症性サイトカインのような標的分子を吸着するための機能性リガンドが固定化された親水性高分子ビーズが採用されている。旭化成メディカル (東京、日本)のイムソーバ TR®及び PH®は、非生物学的 (= 物理化学的)な免疫吸着材として世界で初めて開発された吸着カラムであるが、カラムの中には、吸着リガンドとしてトリプトファン (TR)やフェニルアラニン (PH)が固定化されたポリビニルアルコール (PVA)からなる多孔質ゲルが充填されている [6, 7]。これらの非生物学的かつ合成高分子からなる吸着材では、疎水性相互作用及び静電相互作用のような物理化学的な相互作用によって標的分子の吸着を実現している。一般的に、非生物学的リガンドはプロテイン A のような生物学的リガンドと比較して選択性が弱いものの、非生物学的なリガンドは安全かつ安価で、品質が安定しており、適切な滅菌処理が可能などのメリットがある [6]。しかしながら、イムソーバ TR®及び PH®などの吸着カラムに用いられる吸着材の平均粒径は約 100 μm であり、構造的な吸着容量の制限があるため、吸着効率の点で大きな課題が残っている。

吸着容量を高めるために、三次元的なナノ構造を有する材料が求められる。ナノファイバーメッシュは数百 nm 以下の繊維径の繊維状材料であり、しばしばエレクトロスピニングと呼ばれる汎用的かつコスト効率のよいプロセスにより作製される。高い比表面積を含む特徴的な性質をもつため、標的アフィニティーや色素–リガンドアフィニティー、静電相互作用、疎水性相互作用などの異なる駆動力に基づくナノファイバーからなる吸着材の開発研究が数多く行われてきた [8]。筆者らはこれまでに、尿毒素を吸着・除去するためのゼオライト含有ナノファイバーメッシュの開発を報告している [9, 10]。Wang らは、タンパク質精製のための応用として、カルボキシ基を導入した PVA 架橋ナノファイバーメッシュを開発しており、チゾチームに対する非常に良好な吸着性能 (177 mg/g)を示していた [11]。Lan らは、cellulose diacetate nitrate からなるナノファイバーメッシュを開発し、アニオン性タンパク質であるウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA)が吸着されることを報告している [12] (300.11 mg/g)。さらに、Ma らは、プロテイン A/G が固定化された poly(ether sulfone)ナノファイバーメッシュが IgG 特異的な吸着性能 (11.42 mg/g)を示すことを報告している [13]。これらのナノファイバーメッシュ材料は、それぞれのタンパ

ク質に対して良好な吸着容量を示しているが、IgG に対する吸着性能は十分ではない。

2.1.3. 本研究のストラテジー及び目的

そこで、本研究では、上記のような課題を解決すべく、無水マレイン酸 (maleic anhydride: MA)を導入した ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH)からなるナノファイバーメッシュを作製し、γ-グロブリンに対する吸着選択性について検証した (Fig. 2-1)。EVOH ナノファイバーメッシュはエレクトロスピニングによって作製された。さらに、γ-グロブリンはアルブミンのような他の血漿タンパク質と比較して高い等電点 (pI)を有するため、選択的な吸着を目的としてカルボキシ基が導入された。結果として、作製したナノファイバーメッシュが選択的かつ高効率な γ-グロブリンの吸着容量を示した。

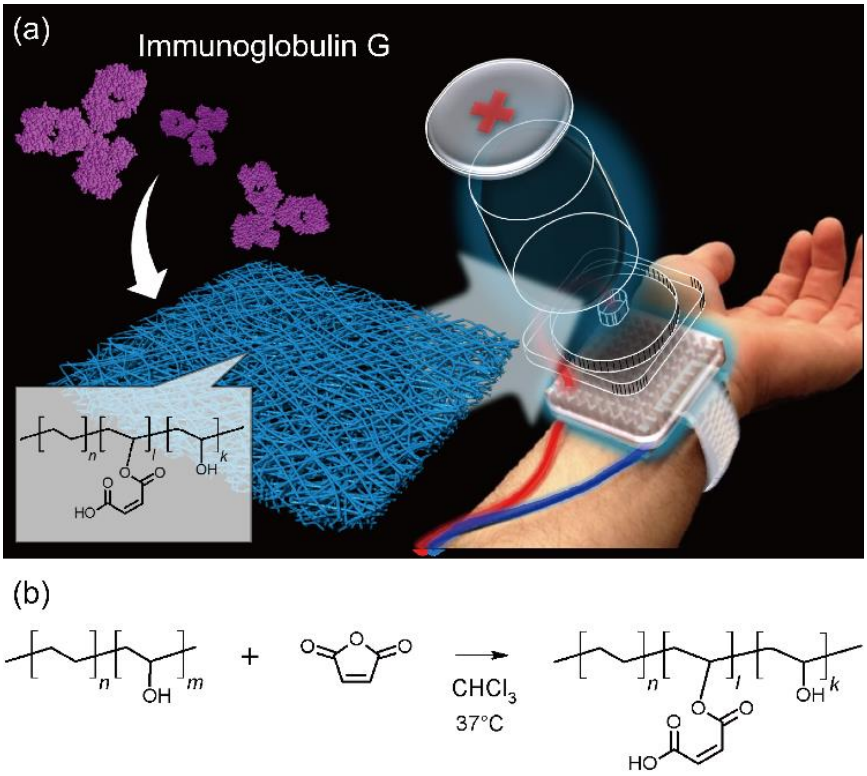


Fig. 2-1 (a) Schematic of γ-globulin-selective adsorption on a MA-modified EVOH nanofiber mesh for immunoadsorption therapy. (b) Graft reaction scheme between EVOH and maleic anhydride.

2.2. 実験

2.2.1. 実験材料

EVOH の共重合体 (vinyl alcohol ユニット比: 56 及び 75%)は日本合成化学 (大阪、日本)から頂いた。1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP)及び Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)はナカライテスク株式会社 (京都、日本)から購入した。Chloroform 及び dichloromethane、ヒト由来のアルブミン及び γ-グロブリンは和光純薬工業 (大阪、日本)から購入した。さらに、maleic anhydride (MA)は Sigma Aldrich (東京、日本)から購入した。

2.2.2. EVOH ナノファイバーメッシュ材料の調製

エレクトロスピニングに用いた溶液は、EVOH を HFIP に 7 w/v%の濃度になるように溶解させて調製した。紡糸条件は、先行研究を参考にして、印加電圧: 25 kV、紡糸距離: 10 cm、フローレート: 1.0 mL/h、ニードルゲージ: 25 G とし、MECC 株式会社 (福岡、日本)のエレクトロスピニング装置 (Nanon-01A)を用いて EVOH ナノファイバーメッシュを作製した [9, 10]。EVOH を紡糸する前に PVA 溶液をコレクター上に犠牲層として紡糸しておき、犠牲層上に作製された EVOH ナノファイバーメッシュを純水に浸すことで、コレクターから剥離し、剥離された EVOH ナノファイバーメッシュを減圧乾燥した。

2.2.3. EVOH フィルム材料の調製

EVOH のフィルム材料は溶媒キャスト法によって調製された。まず、HFIP 中に溶解させた EVOH 溶液 (7 w/v%)を PTFE 製の鋳型 (5 cm × 5 cm)に流し込み、減圧乾燥した。。

2.2.4. EVOH ナノファイバーメッシュ及びフィルム材料へのカルボキシ基修飾

EVOH ナノファイバーメッシュ及びフィルム材料が様々な濃度の MA 溶液 (180 µM、18 mM、0.9 mM、1.8 mM、3.6 M)に 12 時間、37°C にて、浸漬された (Fig. 2-1 (b))。12 時間後、メッシュを dichloromethane で 3 回洗浄し、減圧乾燥した。

2.2.5. EVOH ナノファイバーメッシュ材料のキャラクタリゼーション

ナノファイバーの形態評価のために、日本電子株式会社 (東京、日本)の走査型電子線顕微鏡 (scanning electron microscope: SEM) NEO-Scope JCM-5000 table top SEM を用いて観察を行った。SEM 画像中のナノファイバーの繊維径は、報告されている方法に従って image J を用いて測定した [9, 10]。水接触角測定は、協和界面科学株式会社 (埼玉、日本)の接触角計 (DM-701)を用いて行った。化学的なキャラクタリゼーションとして、株式会社 島津製作所 (京都、日本)のフーリエ変換赤外(Fourier transform infrared: FTIR;)分光光度計 (FTIR-8400S)及び、日本電子株式会社の核磁気共鳴 (^{1}H-nuclear magnetic resonance: ^{1}H-NMR)装置 (AL300)を用いて測定を行った。続いて、ナノファイバーメッシュの純水透過試験は、Sterlitech Corporation (WA、USA)の Sterlitech UHP 76 450 mL のデッド-エンド攪拌式セル及び 19 L のステンレス製圧力容器を用いて行った。メッシュのろ過性能を測定するために、窒素ガスを充填し設置した。ナノファイバーメッシュは直径 2.6 cm の円形に切り抜かれた。その際の各サンプルにおける理論的な有効表面積は、EVOH の平均繊維径、サンプル重量及び密度から算出された (EVOH 56%: 0.21 m^2、MA-EVOH 56%: 0.22 m^2、EVOH 75%: 0.15 m^2、MA-EVOH 75%: 0.18 m^2)。

2.2.6. γ-グロブリン及びアルブミン吸着能評価

γ-グロブリン及びアルブミンの吸着試験は、Bradford 試薬 (BIORAD, CA, USA)を用いた上澄み溶液濃度の定量評価にて行った。タンパク質溶液は D-PBS 中に 0.02 mg/mL 及び 0.20 mg/mL、2.00 mg/mL で調製され、24 well-plate に添加された。続いて、EVOH ナノファイバーメッシュもしくはフィルムが浸漬された。37°C にて 0.5 及び 1.5、2.5、4.0、12.5 時間振とうした後、上澄み溶液をサンプリングし、Bradford 法にて残存濃度を測定した。浸漬された EVOH ナノファイバーメッシュは、さらに株式会社日立ハイテクノロジーズ (東京、日本)のエネルギー分散型 X 線分析 (energy dispersive X-ray spectroscopy: EDX)装置

を用いて、表面の化学組成について調べられた。また、ナノファイバーメッシュのγ-グロブリンの吸着性を評価するため、fluorescein 5-isothiocyanate (FITC)でラベル化されたγ-グロブリン溶液 (1.00 mg/mL)にナノファイバーメッシュが浸漬され、12 時間、37℃にて振とうされた。振とう後、メッシュは Xenogen Corporation (CA, USA)の in vivo イメージングシステム (in vivo imaging system: IVIS)を用いて観察された。

2.3. 結果と考察

2.3.1. MA 修飾前後における EVOH ナノファイバーメッシュのキャラクタリゼーション

本研究では、vinyl alcohol ユニット比: 56 及び 75%の EVOH を用いてナノファイバーメッシュの作製を検討した。その理由として、以下の三つがある。(1) vinyl alcohol の繰り返しユニットによって高い親水性を有しているが、ethylene の繰り返しユニットにより水中において不溶[14]、(2)生体親和性に富む[15, 16]、(3) vinyl alcohol ユニット中の水酸基を利用して更なる機能化が可能[17]、の三つである。Namekawa らは、EVOH のナノファイバーメッシュを isopropanol もしくは、HFIP を溶媒として作製していたが[9]、本研究では、より安定的にナノファイバーを作製できる HFIP の溶媒を用いた。

ナノファイバー状の構造は非常に高い比表面積を有するため、フィルム材料をコントロールとし、比較した。ナノファイバーメッシュとフィルムのいずれも MA によって表面が改質された。EVOH は、vinyl alcohol のコンテント量の異なる二種類のタイプを用いた。Fig. 2-2 (a)に、EVOH ナノファイバーメッシュの SEM 観察の画像をまとめた。Fig. 2-2 (a)から、ナノファイバーは均一な繊維径を有しており、ビーズ状の凝集体は観察されなかった。それぞれの SEM 画像から算出された平均繊維径は、450 ± 140

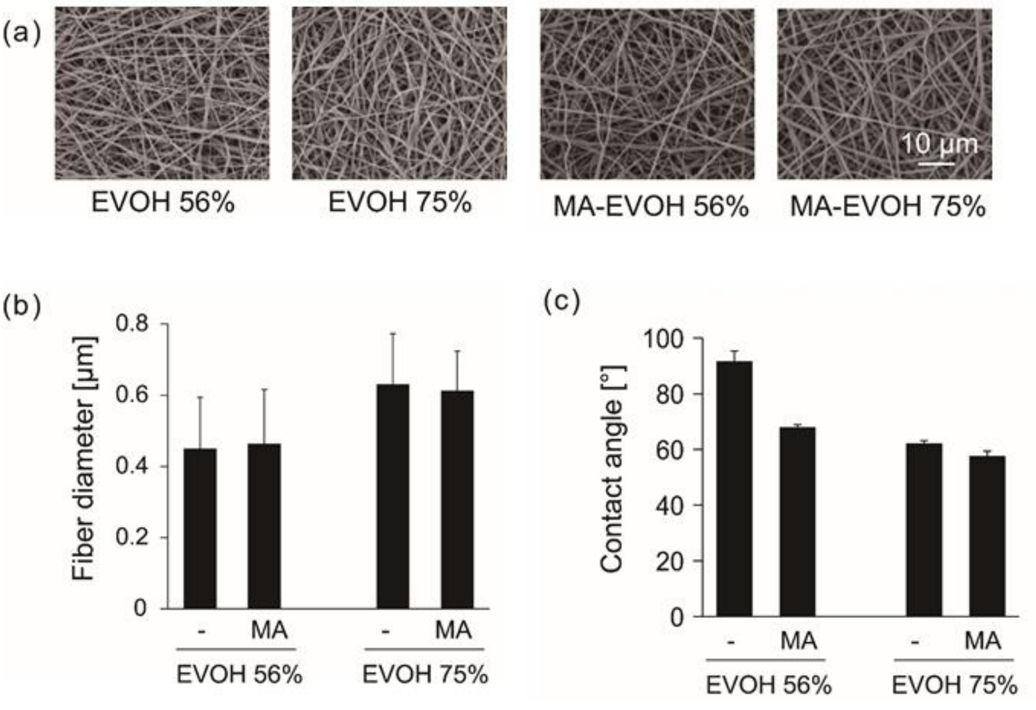


Fig. 2-2 (a) SEM images of EVOH nanofiber meshes (scale bar: 10 μm), (b) average diameters of electrospun EVOH nanofibers with and without MA modification and (c) contact angles on the EVOH films with and without MA modification.

nm (EVOH 56%)及び 460 ± 150 nm (MA-EVOH 56%)、630 ± 140 nm (EVOH 75%)、610 ± 110 nm (MA-EVOH 75%)であった (Fig. 2-2 (b))。EVOH 56%の繊維径が、EVOH 75%と比較して僅かに小さかったが、これは、ethylene ユニット量に由来する結晶性が高いことによる影響であると考えられる。また、MA による表面処理操作後においても、ナノ繊維構造は維持されていた。それぞれのフィルム材料表面の SEM の観察の画像を Fig. 2-3 にまとめた。ナノファイバーメッシュ上において、水接触角の測定は困難であったため、代わりに EVOH フィルムを用いて測定を行った (Fig. 2-2 (c))。Fig. 2-2 (c)の結果から、水接触角が、MA 処理によって、EVOH 56%では 91.7 ± 3.6°から 68.1 ± 0.9°に、EVOH 75%では 62.3 ± 1.0°から 57.7 ± 1.7°に減少した。これは、MA が EVOH ナノファイバー表面に導入されたことを示す補足的な結果であると言える。

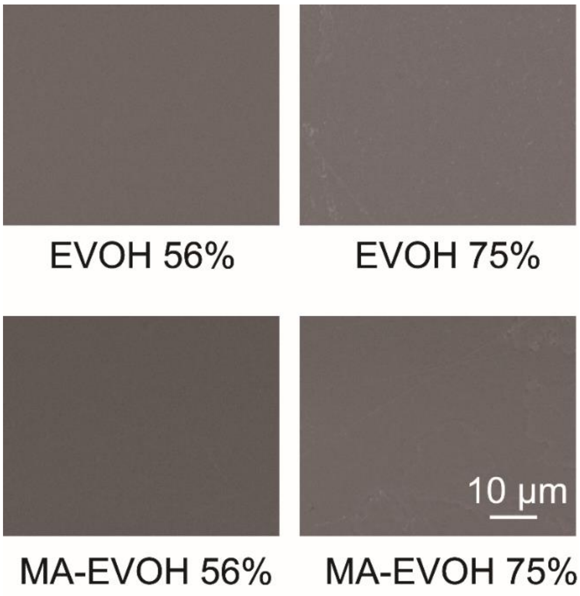


Fig. 2-3 SEM images of EVOH films (scale bar: 10 um)

MA の修飾がされていることを確認するために、FTIR 及び ^{1}H-NMR による解析を行った。ナノファイバーメッシュ及びフィルムの FTIR 測定の結果を Fig. 2-4 (a)、(b)にそれぞれまとめた。Fig. 2-4 において、3274-3308 cm^{-1} 及び 1707-1711 cm^{-1} の吸収帯のピークはそれぞれ–OH 及び C=O の伸縮振動に帰因している [18]。さらに、Fig. 2-5 のグラフから、反応溶液中の MA の濃度に依存して、MA 修飾後に 3274-3308 cm^{-1} の吸収帯のピーク強度が減少している一方で、1707-1711 cm^{-1} の吸収帯のピーク強度は増加している様子が確認された。これらの結果は、MA の修飾により、COOH 基が EVOH 表面に十分導入されていることを示している。続いて、^{1}H-NMR の結果を Fig. 2-6 にまとめた。Fig. 2-6 のチャート図において、化学シフトはそれぞれ、δ = 4.0-5.2 ppm (-OH)、δ = 6.2-6.5 ppm (-CH=CH-)であり、MA の導入率はそれぞれ、5.7% (MA-EVOH 56%)と 1.7% (MA-EVOH 75%)であった。MA-EVOH 56%と MA-EVOH 75%の MA の導入率を比較すると、EVOH 75%の方が-OH 基が多く存在するにも関わらず、EVOH 56%の方がよく MA が導入されていた。この結果は、EVOH 56%の方が EVOH 75%よりも反応溶媒である chloroform に膨潤しやすく、より MA の-OH との反応頻度が上がったためであると考えられる。

高い開気孔性構造を有する材料の利点の一つは、水の高い透過能である。MA 処理前後での EVOH ナノファイバーメッシュの水透過性について評価した (Fig. 2-7)。その結果、MA 処理前後のいずれのサンプルにおいても、加える圧力が増加するにつれて、水透過量は著しく増加した。全体の傾向として、EVOH 75%のメッシュの方が EVOH 56%に比べて透過率は高かった。また、いずれの圧力条件においても、MA 修飾後のナノファイバーメッシュの方が水透過量は減少した。これの理由として、SEM では観察できな

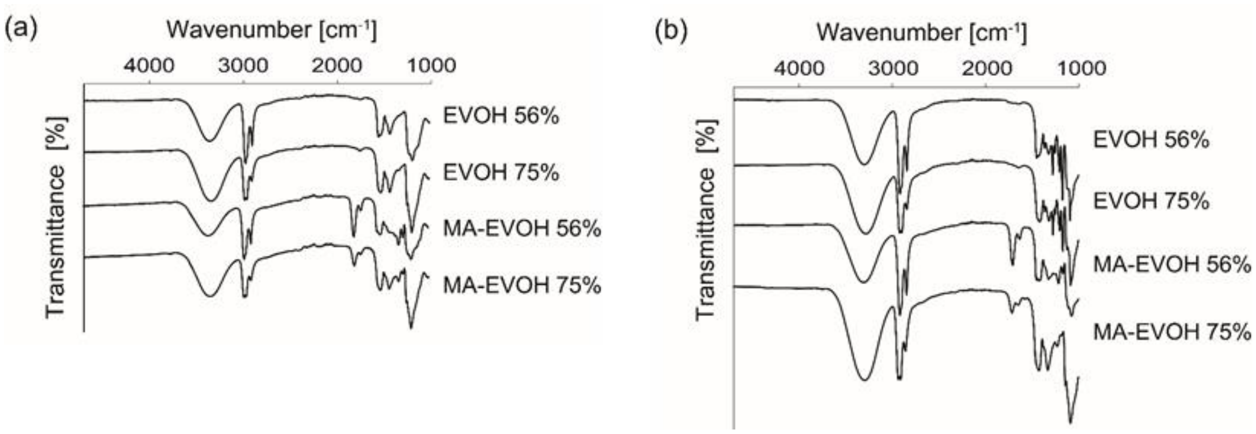


Fig. 2-4 FTIR spectra of various the EVOH nanofiber meshes (a) and films (b) modified with MA

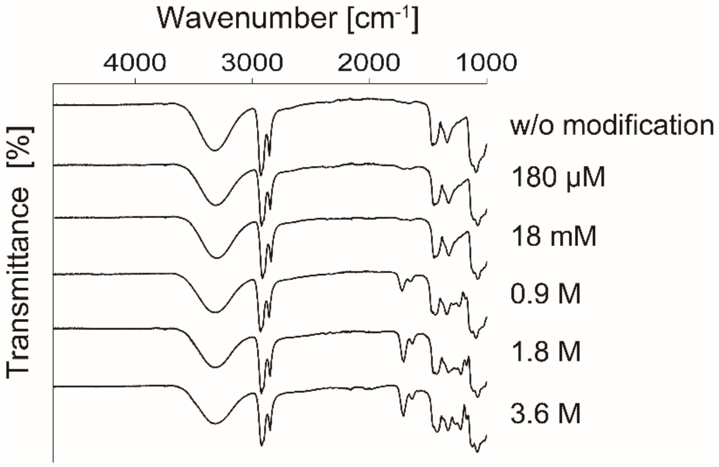


Fig. 2-5 FTIR spectra of the EVOH nanofiber meshes modified with various MA concentrations.

いほど小さいナノスケールでのファイバー状構造の変化があったと考えられ、もう一つの理由として、MA 修飾によりせん断応力が上昇した可能性も考えられる。

2.3.2. γ-グロブリンの吸着性評価

以上の結果を踏まえ、MA 修飾された EVOH 56%が γ-グロブリンの吸着試験に用いられた。IgG は γ-グロブリンのサブクラスであり、全体の 70%を占める。ヒトの血漿タンパク質は主に、グロブリン (≈40%)、アルブミン (≈60%)から構成されており、γ-グロブリンの pI (= 6.3-8.4)はアルブミンの pI (= ~4.7)と比較して高い。MA 処理後の EVOH メッシュ上における γ-グロブリンの吸着容量を評価するため、EVOH メッシュが 0.2 mg/mL の γ-グロブリン溶液中に 37°C で浸漬された。12.5 時間の浸漬後、γ-グロブリンの吸着量が初期濃度から計算された。Fig. 2-8 (a)から、MA 修飾された EVOH ナノファイバーメッシュの γ-グロブリン吸着容量は約 5.6 mg/g であった。この値は、MA 修飾されていない EVOH ナノファイバーメッシュと比較して、明らかに高かく ($p < 0.05$)、フィルムの結果と比較しても、十分高い結果であった。次に、初期の γ-グロブリン濃度による MA 修飾 EVOH ナノファイバーメッシュの吸着性能への影響を調査するため、様々な初期濃度 (0.02-2.00 mg/mL)における吸着平衡時の吸着量を検証した (Fig.

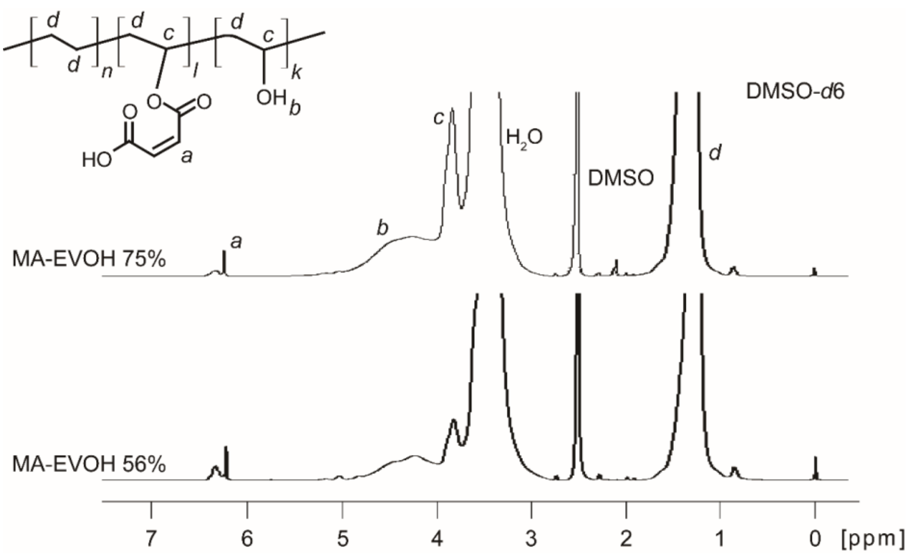


Fig. 2-6 ^{1}H-NMR spectra of the MA-modified EVOH nanofiber meshes.

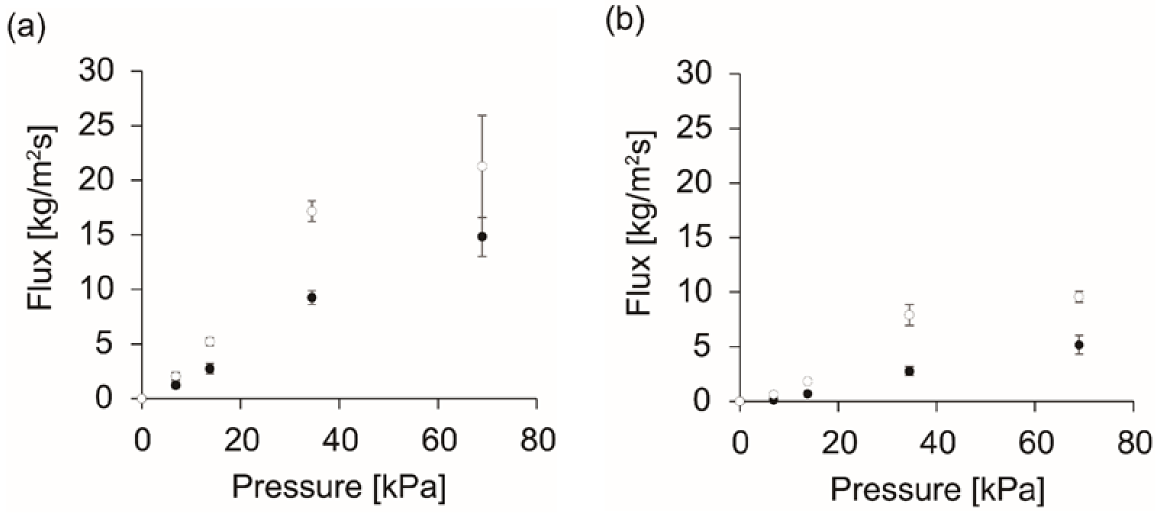


Fig. 2-7 Flux capacity of EVOH nanofiber meshes before (a) and after (b) MA modification. The open circles indicate EVOH 75% nanofiber mesh and the closed circle indicated 56%.

2-8 (b))。結果、0.02-2.00 mg/mL の濃度範囲において、吸着量は γ-グロブリンの初期濃度に依存して、線形的に増加した (相関係数: $R^2 = 0.98$)。この結果は、γ-グロブリンに対する吸着効率が高いことを示唆している。

吸着等温式による定量的な解析のため、以下の Langmuir (式 (2-1))と Freundlich (式 (2-2))のモデルを用いて検証した[19,20]。式 (2-1)中における、q_e、q_{max}、K_a 及び C はそれぞれ q_e: 吸着剤単位質量当りの吸着量(mg/g)、q_{max}: 飽和吸着量 (mg/g)、K_a: 吸着平衡定数 (mL/mg)、C: 平衡濃度 (mg/mL)である。式 (2-2)中における、q_e、C、n 及び K_F はそれぞれ、q_e: 吸着剤単位質量当りの吸着量(mg/g)、C: 平衡濃度 (mg/mL)、n 及び K_F: 平衡定数である。

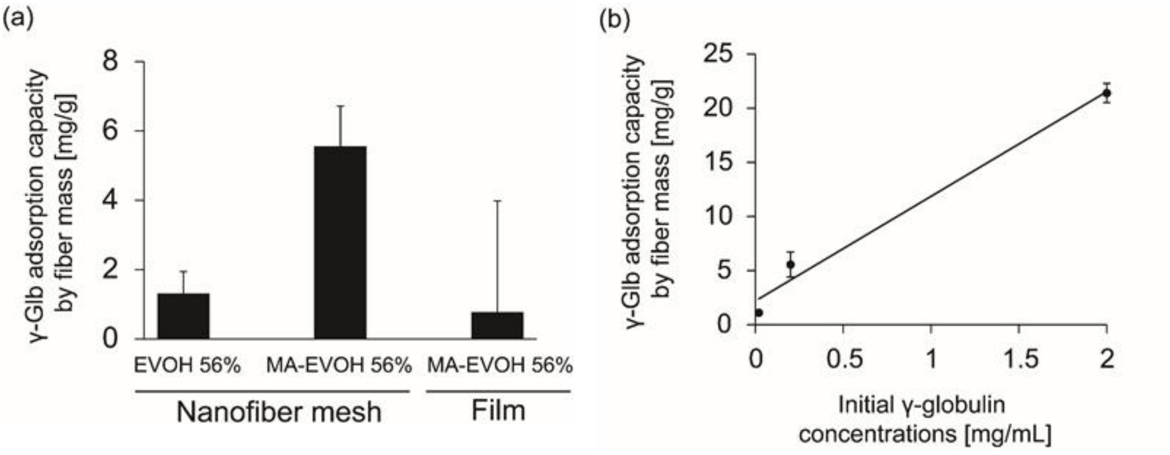


Fig. 2-8 (a) γ-Globulin adsorption capacity of the fabricated EVOH 56% nanofiber mesh, MA-EVOH 56% nanofiber mesh, and MA-EVOH 56% film and (b) effect of initial concentration of γ-globulin on the adsorption performance.

$$\text{Langmuir:}\ \frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{max}} + \frac{1}{q_{max}\,K_a\,C} \qquad (2\text{-}1)$$

$$\text{Freundlich:}\ \log q_e = \frac{\log C}{n} + \log K_F \qquad (2\text{-}2)$$

平衡時のγ-グロブリン濃度の逆数に対するγ-グロブリンの吸着容量の逆数についてプロットすることで MA 修飾 EVOH ナノファイバーメッシュにおける γ-グロブリンの Langmuir の吸着等温線のグラフを作製した (Fig. 2-9 (a))。また、同様に、平衡時の γ-グロブリン濃度の常用対数に対する γ-グロブリンの吸着容量の常用対数についてプロットすることで Freundlich の吸着等温線のグラフを作製した (Fig. 2-9 (b))。Table 2-1 から、Langmuir の吸着モデルの相関係数 ($R^2 = 1$)が Freundlich の吸着モデルより高いことがわかる。したがって、γ-グロブリン分子の吸着は単層吸着であり、γ-グロブリン分子同士の相互作用がはるかに弱いことを示している。さらに、K_a は 1.3 mL/mg であると算出された。Ma らは、カチオン性タンパク質であるリゾチームと MA 修飾ファイバー材料の間の K_a は 0.089 mL/mg であると報告している [21]。

一般的に、タンパク質の吸着は表面の自由エネルギーや分子間力、疎水性相互作用、イオン間相互作用、静電相互作用などを駆動力として起きる。本研究において、MA-EVOH 56%における γ-グロブリン吸着容量の増加は MA-EVOH 表面の静電相互作用や疎水性相互作用によるものであると考えられる。また、負電荷の強いチャージをもつ表面には γ-グロブリンは吸着しにくいという結果も報告されている [22, 23]。プロテイン A は、抗体の Fc 領域との強い相互作用 ($K_a \approx 10^8$ M^{-1})を通して抗体を選択的に吸着する

Table. 2-1 Langmuir and Freundlich constants and correlation coefficient for γ-globulin adsorption on the maleic anhydride-modified EVOH nanofiber mesh for immunoadsorption therapy.

Langmuiur model			Freundlich model		
q_{max} [mg/g]	K_a [mL/mg]	R^2	K_F	n	R^2
30	1.3	1	14	1.4	0.98

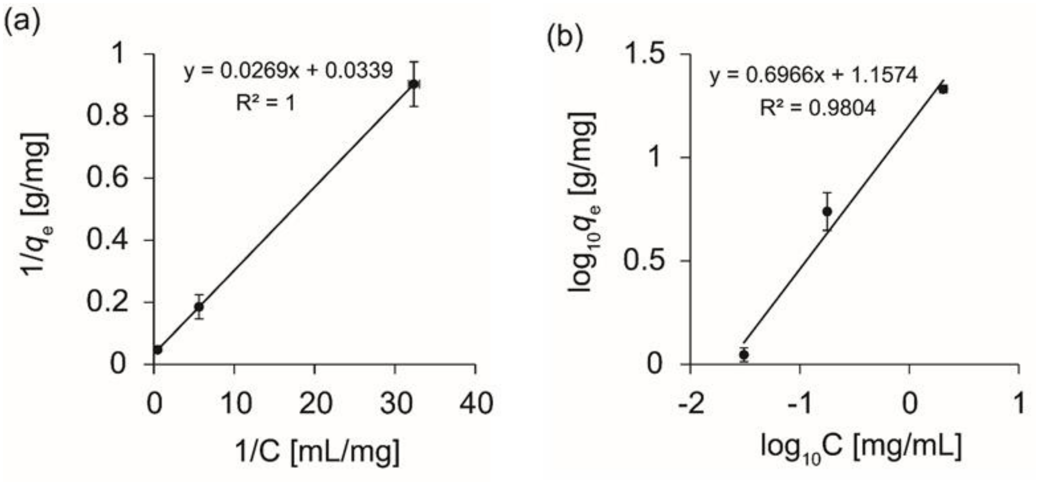


Fig. 2-9 The fitting curves of (a) Langmuir and (b) Freundlich isotherm models for γ-globulin adsorption on the MA-modified EVOH nanofiber mesh.

リガンドとして有名であり [24,25]、Fc 領域への相互作用が主な結合サイトであるため、補体の活性のを抑制することも報告されている [22,25]。Muramatsu らは、γ-グロブリンは弱い負電荷のチャージをもつ表面においては Fc 領域を通して吸着し、その結果補体の活性が抑制されることを報告している。この報告の結果から、MA 修飾した EVOH ナノファイバーメッシュは γ-グロブリンの Fc 領域を通して吸着している可能性が示唆された。

2.3.3. ナノファイバーメッシュ材料上における γ-グロブリンの吸着に関する定性評価

γ-グロブリンの吸着を視覚的に確認するため、FITC ラベル化された γ-グロブリンを用いて吸着試験を行った (Fig. 2-10 (a))。Fig. 2-10 (a)の写真から、γ-グロブリンは MA 修飾 EVOH ナノファイバーメッシュに吸着していることが確認された。次に、γ-グロブリンに対する吸着試験を行った後の MA 修飾 EVOH メッシュについて IVIS (Fig. 2-10 (b))及び SEM/EDX (Fig. 2-10 (c)、(d))それぞれを用いて、分析された。Fig. 2-10 (c)は、MA 修飾 EVOH ナノファイバーメッシュ表面の SEM 画像に窒素原子に対する元素マッピング画像を重ね合わせた画像である。Fig. 2-10 (d)は、γ-グロブリン及びアルブミン、PBS のみのそれぞれの溶液に 12 時間浸漬した後の MA 修飾 EVOH ナノファイバーメッシュ表面における元素組成分析の結果を示している。Fig.2-10 (c)、(d)の結果から、MA 修飾 EVOH ナノファイバーメッシュには本来存在しない窒素元素が γ-グロブリン溶液に浸漬した際に顕著に検出された。これらの結果から、γ-グロブリンが MA 修飾 EVOH ナノファイバーメッシュの全体に吸着していることが明らかとなった。

2.3.4. γ-グロブリン及びアルブミンの吸着選択性評価

タンパク質の吸着材として実際の応用を考慮すると、異なる二種類のタンパク質に対する選択的な吸着能力は重要である。選択性評価のためのコントロールとしてアルブミンを用いた。Fig. 2-11 (a)、(b)は MA 修飾 EVOH メッシュと未修飾の EVOH メッシュそれぞれに対する γ-グロブリンとアルブミンの吸着容量を示している。未処理の EVOH メッシュは抗血栓性材料として知られているように、アルブミンと γ-グロブリンの両方において、ほとんど吸着は見られなかった。一方で、MA 修飾 EVOH メッシュでは、γ-グロブリンが選択的に吸着されることが確認された。また、2 時間で吸着平衡に達し、12.5 時間後

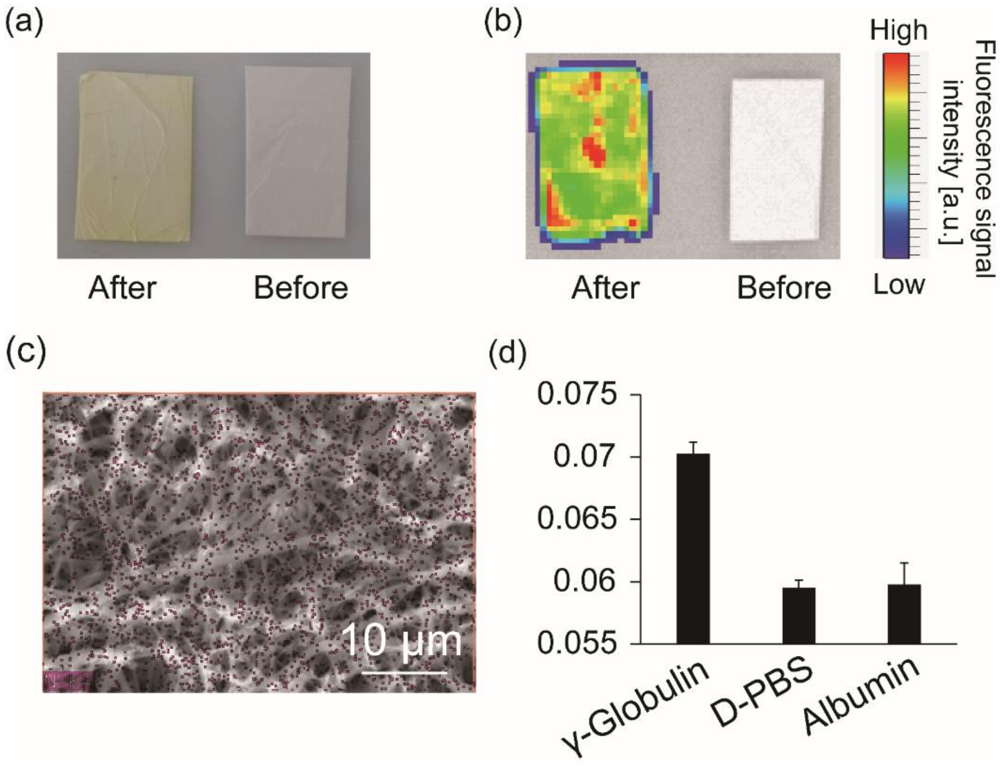


Fig. 2-10 (a) Optical images of the MA-modified EVOH nanofiber mesh before (right) and after adsorption of FITC labelled γ-globulin (left), (b) observation of the MA-modified EVOH nanofiber mesh adsorbing FITC labelled γ-globulin by an IVIS, (c) SEM/EDX images of the MA-modified EVOH nanofiber mesh (scale bar: 10 µm), the nitrogen mapping image overlaid on the SEM image (pink dots) and (d) composition ratio of nitrogen and carbon using the EDX spectrum after adsorption.

には、5.6 ± 1.2 mg/g の吸着効率で γ-グロブリンを吸着し、2.6 ± 0.3 mg/g の効率でアルブミンを吸着した。また、12.5 時間における未修飾の EVOH メッシュ上のアルブミンに対する γ-グロブリンの吸着量比は、約 0.8 であったが、MA 修飾 EVOH メッシュ上では 2.1 であった (Fig. 2-11 (c))。

MA 修飾 EVOH メッシュの吸着容量から、γ-グロブリンの初期添加量の内 22.1%まで捕捉していることがわかった。この値は、臨床現場で用いられる免疫吸着療法用のカラム材料に充填されている吸着材の吸着効率 (32.2%)に匹敵する結果である [26]。さらに、アルブミンに対する γ-グロブリンの吸着量比 (2.1)は、免疫吸着療法用カラム材料の吸着材の吸着量比 (1.7)より、高いことがわかった。

2.4. 結論

本研究では、γ-グロブリンを選択的に吸着するために、新たなアプローチでの MA 修飾 EVOH ナノファイバーメッシュの作製し、γ-グロブリン-選択的な吸着能を実証した。高い比表面積や高い開気孔性構造により、EVOH ナノファイバーメッシュの繊維表面上への効果的な MA の修飾が確認された。さらに、作製された MA 修飾 EVOH ナノファイバーメッシュは 12.5 時間以内で 5.6 mg/g の吸着効率を示した。さらに、γ-グロブリンの吸着はアルブミンの吸着と比較して、γ-グロブリン選択性の様子が確認された。この結果は、自己免疫疾患の患者血から γ-グロブリンを選択的に吸着・除去するような医療機器を設計・開発する際におけるナノファイバーメッシュの有用性を示している。

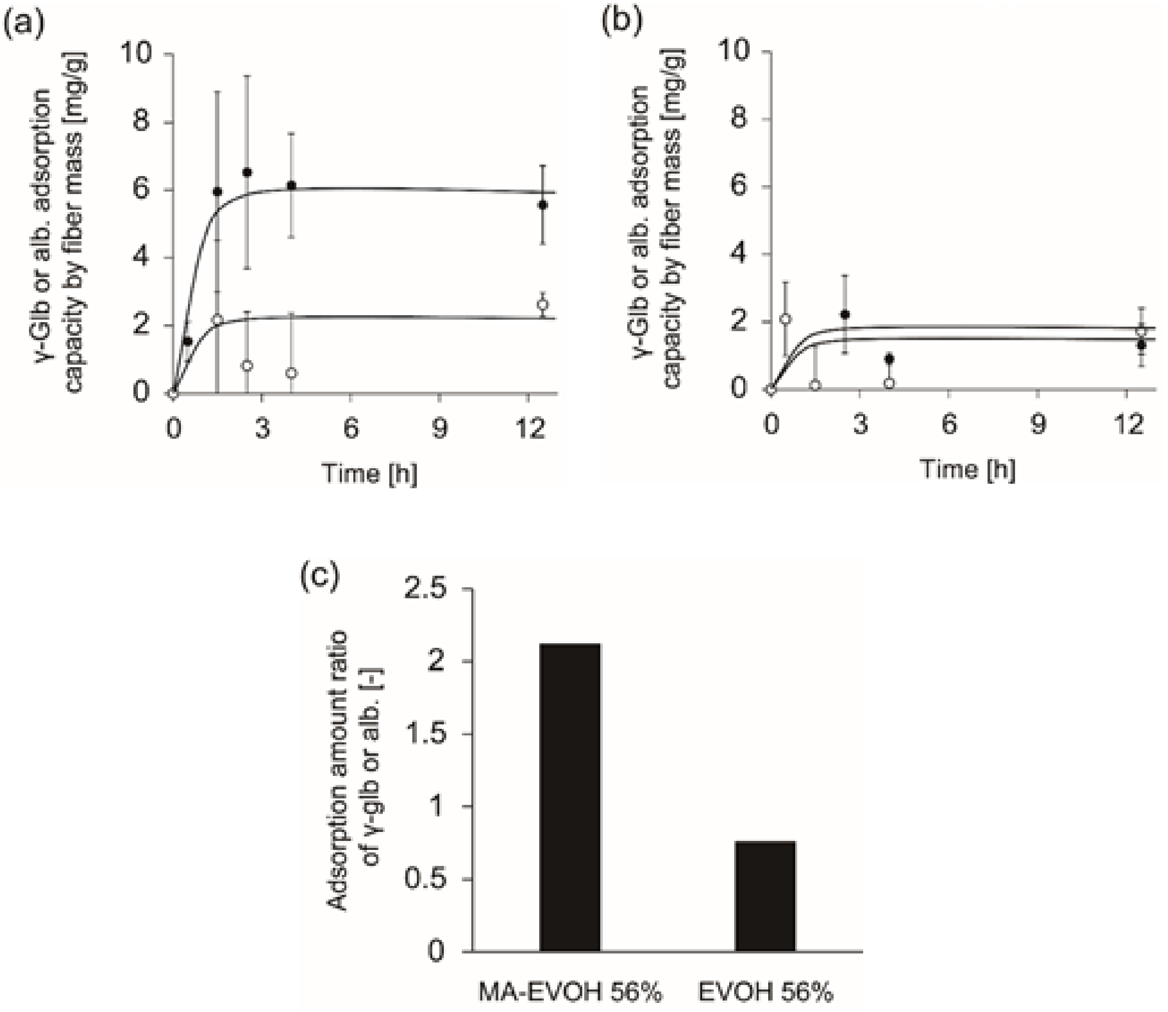


Fig. 2-11 (a) Adsorption performance of the MA-modified EVOH nanofiber mesh in γ-globulin (closed circle) and albumin (open circle) solution (0.2 mg/mL), (b) adsorption performance of the EVOH nanofiber mesh in γ-globulin (closed circle) and albumin (open circle) solution (0.2 mg/mL) and (c) adsorption ratio of γ-globulin to albumin.

2.5. 参考文献

1 Bambauer, R.; Latza, R.; Bambauer, C.; Burgard, D.; Schiel, R., Therapeutic apheresis in autoimmune diseases. *Open access rheumatology : research and reviews* **2013,** *5*, 93-103.

2 Davidson, A.; Diamond, B., Autoimmune diseases - Reply. *New England Journal of Medicine* **2001,** *345*, 1708-1708.

3 Wiseman, A. C., Immunosuppressive Medications. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2016,** *11*, 332-343.

4 Kaplan, A. A., Therapeutic Plasma Exchange: Core Curriculum 2008. *American Journal of Kidney Diseases* **2008,** *52*, 1180-1196.

5 Gold, R.; Hohlfeld, R.; Toyka, K. V., Review: Progress in the treatment of myasthenia gravis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* **2008,** *1*, 99-114.

6 Hirata, N.; Kuriyama, T.; Yamawaki, N., Immusorba TR and PH. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* **2003,** *7*, 85-90.

7 Yoshida, M.; Tamura, Y.; Yamada, Y.; Yamawaki, N.; Yamashita, Y., Immusorba TR and immusorba PH: Basics of design and features of functions. *Therapeutic Apheresis* **2000,** *4*, 127-134.

8 Menkhaus, T. J.; Varadaraju, H.; Zhang, L. F.; Schneiderman, S.; Bjustrom, S.; Liu, L.; Fong, H., Electrospun nanofiber membranes surface functionalized with 3-dimensional nanolayers as an innovative adsorption medium with ultra-high capacity and throughput. *Chemical Communications* **2010,** *46*, 3720-3722.

9 Namekawa, K.; Schreiber, M. T.; Aoyagi, T.; Ebara, M., Fabrication of zeolite-polymer composite nanofibers for removal of uremic toxins from kidney failure patients. *Biomaterials Science* **2014,** *2*, 674-679.

10 Takai, R.; Kurimoto, R.; Nakagawa, Y.; Kotsuchibashi, Y.; Namekawa, K.; Ebara, M., Towards a Rational Design of Zeolite-Polymer Composite Nanofibers for Efficient Adsorption of Creatinine. *Journal of Nanomaterials* **2016**.

11 Wang, X. L.; Fu, Q. X.; Wang, X. Q.; Si, Y.; Yu, J. Y.; Ding, B., In situ cross-linked and highly carboxylated poly(vinyl alcohol) nanofibrous membranes for efficient adsorption of proteins. *Journal of Materials Chemistry B* **2015,** *3*, 7281-7290.

12 Lan, T.; Shao, Z. Q.; Gu, M. J.; Zhou, Z. W.; Wang, Y. L.; Wang, W. J.; Wang, F. J.; Wang, J. Q., Electrospun nanofibrous cellulose diacetate nitrate membrane for protein separation. *Journal of Membrane Science* **2015,** *489*, 204-211.

13 Ma, Z. W.; Lan, Z. W.; Matsuura, T.; Ramakrishna, S., Electrospun polyethersulfone affinity membrane: Membrane preparation and performance evaluation. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009,** *877*, 3686-3694.

14 Mokwena, K. K.; Tang, J., Ethylene Vinyl Alcohol: A Review of Barrier Properties for Packaging

Shelf Stable Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2012,** *52*, 640-650.

15 Lou, P.-J.; Chiu, M.-Y.; Chou, C.-C.; Liao, B.-W.; Young, T.-H., The effect of poly (ethylene-co-vinyl alcohol) on senescence-associated alterations of human dermal fibroblasts. *Biomaterials* **2010,** *31*, 1568-1577.

16 Young, T. H.; Lin, C. W.; Cheng, L. P.; Hsieh, C. C., Preparation of EVAL membranes with smooth and particulate morphologies for neuronal culture. *Biomaterials* **2001,** *22*, 1771-1777.

17 Kotsuchibashi, Y.; Ebara, M., Facile Functionalization of Electrospun Poly(ethylene-co-vinyl alcohol) Nanofibers via the Benzoxaborole-Diol Interaction. *Polymers* **2016,** *8*.

18 Fu, Q. X.; Wang, X. Q.; Si, Y.; Liu, L. F.; Yu, J. Y.; Ding, B., Scalable Fabrication of Electrospun Nanofibrous Membranes Functionalized with Citric Acid for High-Performance Protein Adsorption. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2016,** *8*, 11819-11829.

19 Che, A. F.; Huang, X. J.; Xu, Z. K., Polyacrylonitrile-based nanofibrous membrane with glycosylated surface for lectin affinity adsorption. *Journal of Membrane Science* **2011,** *366*, 272-277.

20 Tian, P.; Han, X. Y.; Ning, G. L.; Fang, H. X.; Ye, J. W.; Gong, W. T.; Lin, Y., Synthesis of Porous Hierarchical MgO and Its Superb Adsorption Properties. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2013,** *5*, 12411-12418.

21 Ma, J. C.; Wang, X. Q.; Fu, Q. X.; Si, Y.; Yu, J. Y.; Ding, B., Highly Carbonylated Cellulose Nanofibrous Membranes Utilizing Maleic Anhydride Grafting for Efficient Lysozyme Adsorption. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2015,** *7*, 15658-15666.

22 Muramatsu, N.; Kondo, T., Adsorption Characteristics Of Gamma-Globulin On Carboxylated Microcapsules. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1986,** *34*, 827-832.

23 Bagchi, P.; Birnbaum, S. M., Effect of pH on the adsorption of immunoglobulin-G on anionic poly(vinyltoluene) model latex-particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1981,** *83*, 460-478.

24 Choe, W.; Durgannavar, T. A.; Chung, S. J., Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides. *Materials* **2016,** *9*.

25 Lancet, D.; Isenman, D.; Sjodahl, J.; Sjoquist, J.; Pecht, I., Interactions between staphylococcal

protein-A and immunoglobulin domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1978,** *85*, 608-614.

26 Hatanaka, Y., Selective Adsorption of Immunoglobulin G and Immunoglobulin M from Plasma without Adsorption of Fibrinogen by Using Thienyl Amino Acids as Ligands. *Journal of Chromatography & Separation Techniques* **2013,** *04*.

第 3 章

核酸リガンドを導入した高分子材料による抗核抗体の選択的吸着制御

3.1. 緒言

3.1.1. 自己免疫疾患と抗 DNA 抗体

2 章にて紹介した通り、自己免疫疾患は免疫システムの異常により、外来の病原体ではなく自己組織や臓器を標的とする抗体が産生されてしまうことで生じる疾患である。自己免疫疾患の治療は主に、ステロイド剤や、シクロホスファミドなどの細胞障害性薬剤を用いた免疫抑制療法である。全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE)は自己免疫疾患の一つであるが、女性が罹患しやすい傾向にあり、患者の 90%が妊娠可能期間の女性となることも報告されている [1]。しかしながら、妊婦や結核などの感染症を患っている患者には、免疫抑制剤の投与は望ましくない。そのため、免疫抑制剤の投与が実施できない場合や、急性期のような深刻な場合では、免疫吸着療法が実施される [2]。免疫吸着療法は、患者の血液を吸着材が充填されたカラム内に循環させて行う。吸着材は一般的に有害な抗体に対する高い親和性を有する様々な種類のリガンドが修飾されている。本研究では、自己免疫疾患のプロトタイプである SLE に焦点を当てていく。

SLE は不治の病とされており、Fig. 3-1 に示すように日本では 6～10 万人が罹患していると考えられている。SLE の特徴として、抗二本鎖 (double strand: ds)DNA 抗体や抗一本鎖 (single strand: ss)DNA 抗体、など様々な抗核抗体が産生される [3]。

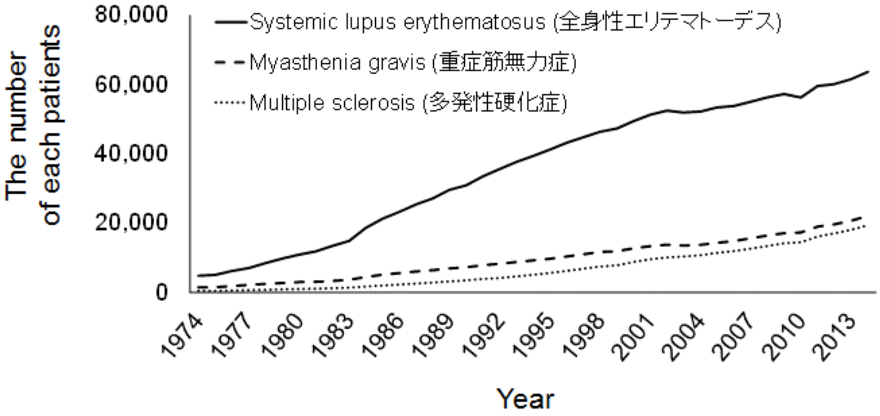


Fig. 3-1 The number of each patients estimated by Japanese Intractable Diseases Information Center.

3.1.2. 免疫吸着カラムと吸着リガンド

SLE に対する免疫吸着療法では、先駆的な材料が実際の治療に用いられている。特に、Terman らによって、初めてプロテイン A 固定化吸着カラムを用いた SLE に対する免疫吸着療法が提唱された [4]。ヒト抗 DNA 抗体を吸着するために DNA-コロジダン-チャコールからなる膜の有効性も示されている [5]。SLE の治療として、抗 DNA 抗体を吸着する DNA 固定化吸着材についても臨床での研究が行われてきた [4-6]。ssDNA とセルロースが導入されたアガーゲルの免疫吸着カラムは、血清から 65%の DNA の回収性能を示すことが報告されている [6]。これらの研究に続いて、SLE 患者の臨床治療に対して DNA を固定化した免疫吸着材が用いられ、抗 ssDNA 自己抗体や腎組織中の免疫複合体の力価が減少し、患者の症状が改善されることが報告されている [7]。更に、南海大学 (中国)での多くの患者に対する数十年間に及ぶ臨床研究が DNA 固定化免疫吸着材を用いた免疫吸着療法の有効性を報告している [8, 9]。

比較的高価で繊細なタンパク質や核酸などの生物学的なリガンドの代替手段として、ロバストな特異性はないものの疎水性と電荷の両性質を有するようなリガンドが 1990 年代に開発され始めた。デキストラン硫酸やポリアクリレート、スルファニル酸などが修飾されることによって陰イオン的に帯電したセルロースからなる免疫吸着材において、抗 ds/ssDNA 抗体の高い結合能が示された。この結合能は、リジンが固定されたカチオン性状態の吸着材や、トリプロファンやフェニルアラニンが修飾された疎水的な吸着材と比較しても高いことがわかっている [10, 11]。特筆すべき点は、一般的な DNA 固定化吸着材はデキストラン硫酸やトリプトファン、フェニルアラニンが修飾された非特異的な免疫吸着材と比較して、SLE 患者の治療時の抗 dsDNA 抗体の結合能が一桁大きい [12]。また、ビーズが充填された免疫吸着材がよく用いられているが、これまでには DNA 固定化 polyethylene terephthalate (PET)[13] 及び polyvinylidene difluoride (PVDF)[14] の膜状免疫吸着材も用いられている。

3.1.3. DNA リガンドの合成方法

DNA はホスホロアミダイト法による合成 [15] や PCR による合成 [16] など様々な合成経路が報告されているため、目的に応じて DNA リガンドの合成手法を選択することが可能である。また、生物由来の DNA リガンドとして、ウシ胸腺 DNA が用いられることもあるが [17]、異種生物由来の感染リスクの課題が残る。こうした背景から、DNA をリガンドとした吸着材の大量生産を考慮すると、異種生物などに由来する感染リスクが低く、かつ生産コスト効率の良い DNA 導入材料の開発が重要となる。

3.1.4. 本研究のストラテジー及び目的

このような背景のもと、筆者は、以下の二つのアプローチにて、核酸をリガンドとする高分子メッシュ材料の開発に取り組んだ (Fig. 3-2)。一つ目のアプローチとして、血液適合性高分子材料である EVOH のメッシュ材料に DNA を固相反応にて固定化することで、DNA 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュを作製した(Fig. 3-2 ①)。また、二つ目のアプローチとして、DNA をアクリレート系モノマーに導入し、DNA コンジュゲートモノマーの合成及び重合化に取り組んだ(Fig. 3-2 ②)。具体的には、ホスホロアミダイト法にて DNA の 3'末端に 2-Hydroxypropylmethacrylate (HPMA)を導入し、DNA コンジュゲートモノマーとした。さらに、DNA コンジュゲートモノマーを重合することで、DNA コンジュゲート高分子材料を作製した。さらに、膜状吸着材としての可能性を検証するために、エレクトロスピニング法により DNA コンジュゲート高分子材料をナノファイバーメッシュ化する検討を行った。さらに、作製した DNA 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュ及び、DNA コンジュゲート高分子材料の抗 ssDNA 抗体に対する吸着能を評価した。

3.2. 実験

3.2.1. DNA 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの作製及び抗 ssDNA 抗体吸着能評価

本アプローチは、Fig. 3-3 に示すスキームに従って進めた。

3.2.1.1. 実験材料

DMT-dG (ib) Phosphoramidite (以下、DMT-dG)は、Sigma Aldrich (東京、日本)から購入した。Dicyanoimidazole (DCI)は、東京化成 (東京、日本)から購入した。Acetonitrile (ACN)及び ammonia Solution (28%)、chloroform、acetic acid、D-PBS は、和光純薬工業 (大阪、日本)から購入した。Anti-ssDNA polyclonal

antibody は、Creative Diagnostics (NY, USA)から購入した。

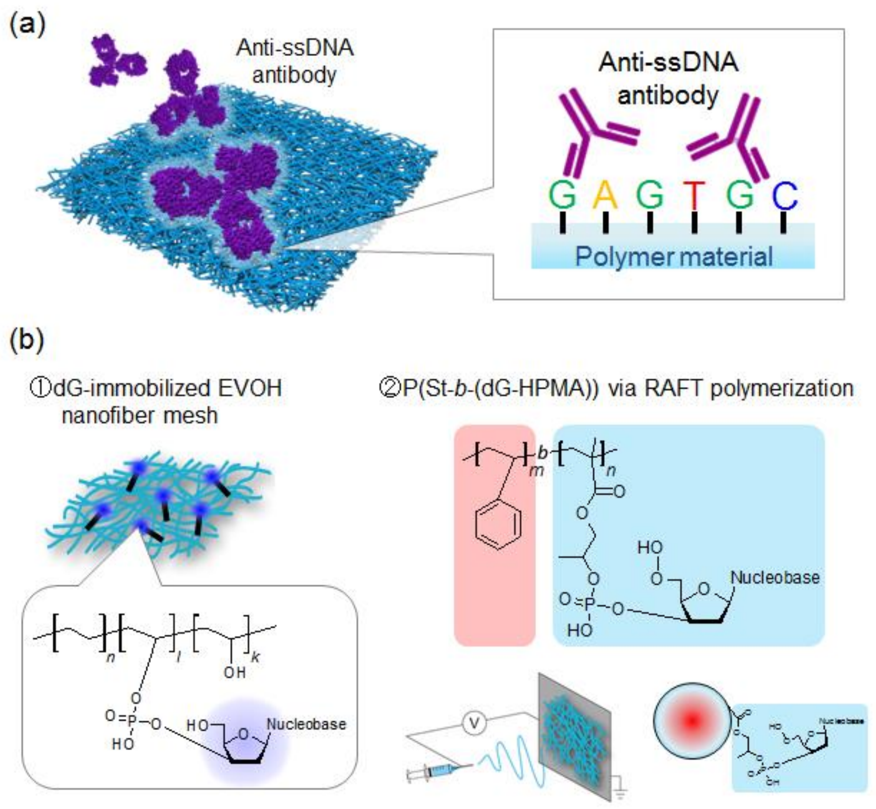


Fig. 3-2 (a) Schematic illustration of functionalized nanofiber meshes with DNA to adsorb anti-ssDNA antibody via two approaches (b).

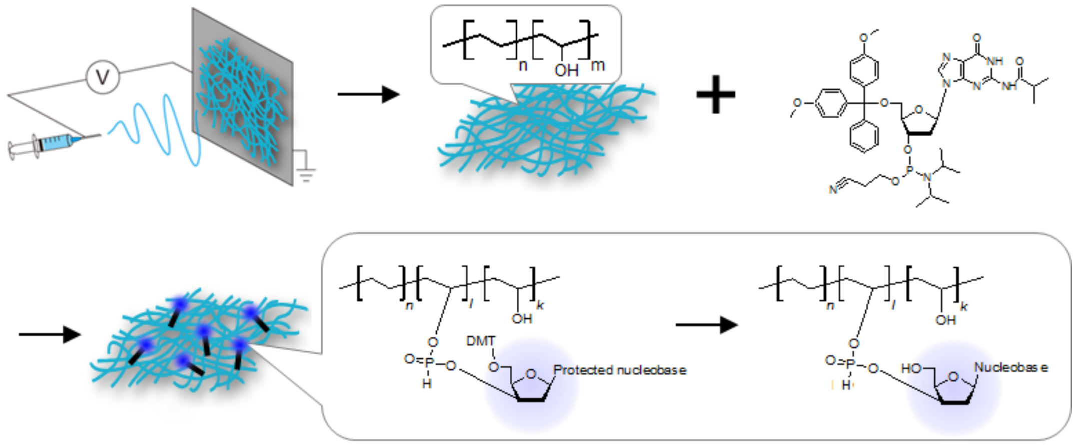


Fig. 3-3 Fabrication scheme for the dG-grafted EVOH nanofiber meshes

3.2.1.2. EVOH ナノファイバーメッシュへの DMT-dG の固定化

まず始めに、DCI を ACN 中に 0.8 M の濃度で溶解し、モレキュラーシーブス (4A)を加えて、プレ溶液とした。EVOH ナノファイバーメッシュは 2.2.2.にて作製したものを用いた。まず、1.5 cm 四方に成

形された EVOH ナノファイバーメッシュ 0.10 g 及び DMT-dG を 1.0 g をナスフラスコに添加し、一晩減圧乾燥した。乾燥後、6 mL の DCI プレ溶液を追添し、4°C で 12 時間静置した。静置後、溶液系から取り出したメッシュ材料を ACN 及び純水で十分に洗浄した。

3.2.1.3. DMT-dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの脱保護

3.2.1.2.にて合成した DMT-dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの脱保護反応を行うため、まず DMT-dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュを ammonia Solution (28%)中に浸漬し、50°C で 36 時間振とうした。振とう後、純水で十分に洗浄し、乾燥させた。続いて、乾燥したメッシュ材料を acetic acid (80%)中に浸漬し、25°C で 1 時間振とうした。振とう後、純水及び chloroform で十分に洗浄し、乾燥させた。一連の操作における反応の進行度等の確認は、核磁気共鳴分光法 (^{1}H-NMR 及び ^{31}P-NMR)及び SEM (EDX)にて行った。

3.2.1.4. dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの抗 ssDNA 抗体吸着能評価

3.2.1.3.にて脱保護処理を施された dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの抗 ssDNA 抗体の吸着能を評価は、Bradford 試薬 (BIORAD, CA, USA)を用いた上澄み溶液濃度の定量評価にて行った。抗 ssDNA 抗体溶液は D-PBS 中に 0.20 mg/mL で調製され、24 well-plate に添加された。続いて、dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュが浸漬された。37°C にて 1 時間及び 5 時間、7 時間、12 時間振とうした後、上澄み溶液をサンプリングし、Bradford 法にて残存濃度を測定した。

3.2.2. DNA コンジュゲート高分子材料の抗 ssDNA 抗体吸着能評価及びメッシュ化の検討

本アプローチは、Fig. 3-4 に示すスキームに従って進めた。

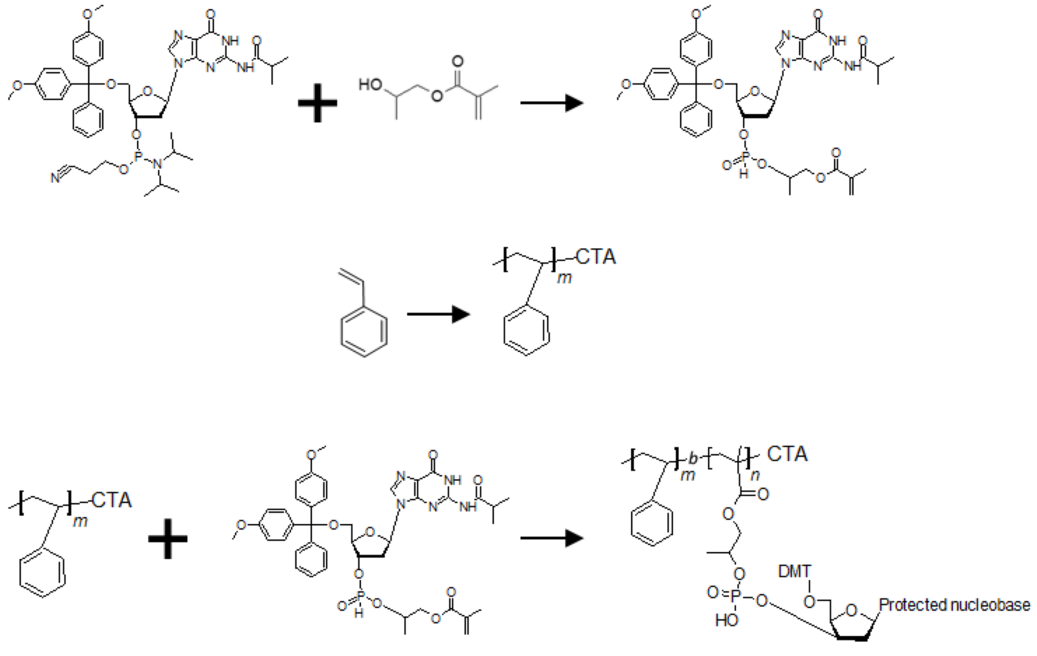


Fig. 3-4 Synthetic scheme of poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA)).

3.2.2.1. 実験材料

HPMA 及び dicyanoimidazole (DCI)、styrene は、東京化成 (東京、日本)から購入した。DMT-dG 及び 2-(dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionic acid (DDMAT)、polystyrene (M_w: 35000)は、Sigma Aldrich (東京、日本)から購入した。Acetonitrile (ACN)及び ethyl acetate (EtAc)、dichloromethane (DCM)、triethylamine (TEA)、azobisisobutyronitrile (AIBN)、xylene、2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (V-70)、methanol は、和光純薬工業 (大阪、日本)から購入した。Anti-ssDNA polyclonal antibody は、Creative Diagnostics (NY, USA)から購入した。

3.2.2.2. DNA コンジュゲートモノマーの合成

予め、HPMA を ACN 中に 0.2 M の濃度で溶解し、同様に DCI を ACN 中に 0.8 M の濃度で溶解し、それぞれにモレキュラーシーブス (4A)を加えて、プレ溶液とした。続いて、DMT-dG を一晩減圧乾燥した後、窒素充填下で HPMA のプレ溶液に 0.2 M となるように添加した。さらに、HPMA のプレ溶液と等量の DCI のプレ溶液を追添した後、4°C で 4 時間静置した。静置後、EtAc: DCM: TEA = 45: 45: 10 の混合溶液を加え、-30°C で一晩静置した。続いて、反応溶液に DCM と純水を加え、分液操作を行い、DCM 層を回収した。合成化合物は、質量分析法 (MS spectrometry)及び核磁気共鳴分光法 (^{1}H-NMR)にて評価した。

3.2.2.3. DNA コンジュゲートモノマーの重合

3.2.2.2.において合成及び精製した DNA コンジュゲートモノマー (以下、DMT-dG -HPMA)を可逆的付加開裂連鎖移動 (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer: RAFT)重合法にて重合した。具体的な操作は以下に示す。

まず、polystyrene-macroCTA を合成するために、styrene モノマー及び DDMAT をそれぞれ 1.0 M、2.5 mM の濃度となるように xylene に溶解し、130°C にて重合反応を 12 時間行った。重合反応後、反応溶液に THF を添加し、methanol 中へ滴下することで、析出した黄色固体を回収し、polystyrene-macroCTA とした。次に、DNA コンジュゲートモノマー及び polystyrene-macroCTA、V-70 をそれぞれ 63 mM、3.2 mM、0.65mM の濃度となるように DMF に溶解し、35°C にて重合反応を 24 時間行った。重合反応後、反応溶液を分画分子量 (MWCO)が 5kDa の透析膜チューブに移し、DMF 中で透析操作を行った。二日間の透析後、回収した溶液を乾燥させ、薄黄色固体を回収し、poly(St-*b*-(DMT-dG -HPMA))_short と定義した。また、同様の操作を、dG-HPMA 及びホモ polystyrene-macroCTA、V-70 がそれぞれ 140 mM、3.0 mM、0.65mM の濃度の条件にて行い、poly(St-*b*-(DMT-dG -HPMA))_long と定義した。

合成化合物は、^{1}H-NMR 及び、ゲル透過クロマトグラフィ (gel permeaion chromatography: GPC)にて評価した。

3.2.2.4. DNA コンジュゲート高分子材料の標的分子の吸着評価

3.2.2.3.にて合成及び精製した DNA コンジュゲート高分子材料 (poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))_short 及び poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))_long)の標的分子の対する吸着性能を評価するため、96 well-plate (以下、PSt 容器)上に DNA コンジュゲート高分子材料を溶媒キャスト法にて固定化した。具体的には、chloroform 中に 5 w/v%となるように poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))_long を溶解させ、PSt 容器の底面が覆われるまで溶液を添加した。添加後すぐに、減圧条件にて乾燥させた。さらに、高分子鎖中の dG ユニットの脱保

護反応を行うため、poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))_long が固定化されているウェルに 28% ammonium 溶液を 250 uL ずつ添加し、50°C にて 36 時間振とうした。振とう後、純水にて十分に洗浄操作を行い、減圧条件にて乾燥した。続いて、上記の操作を行ったウェルに 80％ acetic acid 溶液を 250 uL 添加し、室温(25°C)にて 2 時間振とうした。振とう後、メタノール及び、純水を用いて十分に洗浄し、減圧条件にて乾燥した。

作製した DNA コンジュゲート高分子材料が固定化された PSt 容器を用いて、DNA コンジュゲート高分子材料の抗 ssDNA 抗体の吸着能評価を行った。まず、2 ug/mL の濃度となるなるように D-PBS 中に抗 ssDNA 抗体を溶解した。続いて、調製した抗 ssDNA 抗体溶液を、DNA コンジュゲート高分子材料が固定化してあるウェルに添加した。37°C にて 5 時間振とうした後、上澄み溶液をサンプリングし、Bradford 法にて残存濃度を測定した。

3.2.2.5. DNA コンジュゲート高分子材料のナノファイバーメッシュ化の検討

DNA コンジュゲート高分子材料からなるナノファイバーメッシュ材料を作製するため、まず、分子量の近い polystyrene (M_w: 35000)及び DMF (溶媒)を用いて、紡糸条件 (濃度、印加電圧、フローレート等)の検討を行った。最適化した紡糸条件を参考に、poly(St-*b*-(DMT-dG -HPMA))_long を用いることで、エレクトロスピニング法にて DNA コンジュゲート高分子材料のナノファイバーメッシュを作製した。

3.3. 結果と考察

3.3.1. DNA 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの作製及び抗 ssDNA 抗体吸着能評価

Fig. 3-2 に示すアプローチのうち、①のアプローチの検討結果を以下にまとめる。

3.3.1.1. EVOH ナノファイバーメッシュへの DMT-dG の固定化

EVOH ナノファイバーメッシュへの DMT-dG の固定化反応の進行を ^{1}H-NMR 及び ^{31}P-NMR にて確認した。その結果を Fig. 3-5、6 に示す。Fig. 3-5 の結果は、EVOH ナノファイバーメッシュのファイバー表面に DMT-dG が固定化されていることを示している。さらに、Fig. 3-6 の ^{31}P-NMR の結果から、僅かではあるが、140 ppm 付近に固定化された DMT-dG 由来のピークが確認された。従って、固定化された DMT-dG のリン酸ジエステル中のリンは三価の状態であることが示唆された。

3.3.1.2. DMT-dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの脱保護

3.3.1.1.にて合成された DMT-dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの脱保護操作により DMT 基が外れているかを ^{1}H-NMR にて確認した (Fig. 3-7)。Fig. 3-7 の結果は、100%ではないが、脱保護反応が進行していることを示唆する結果であった。また、脱保護反応時の酸・塩基処理によるナノ構造への影響について SEM を用いて表面形状を観察することで調査した (Fig. 3-8)。結果として、脱保護反応後においても、ナノファイバー状の構造を維持されていることが明らかとなった (Fig. 3-8 (a))。さらに、EDX での評価 (Fig. 3-8 (b))より、P 元素のピークが検出されたことから、脱反応後もメッシュ材料表面に dG が固定化されていることが示唆された。

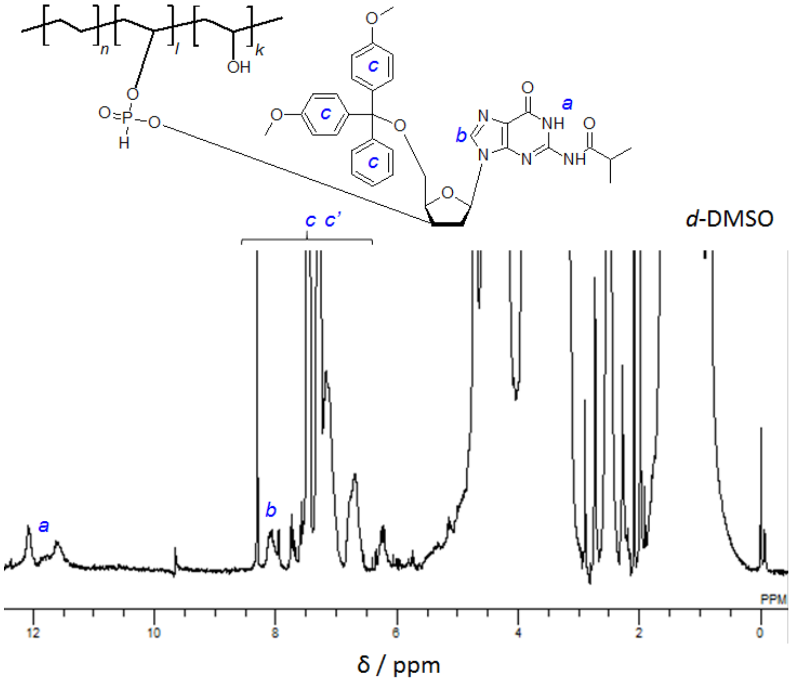


Fig. 3-5 ^{1}H-NMR spectrum of the DMT-dG-immobilized EVOH nanofiber mesh.

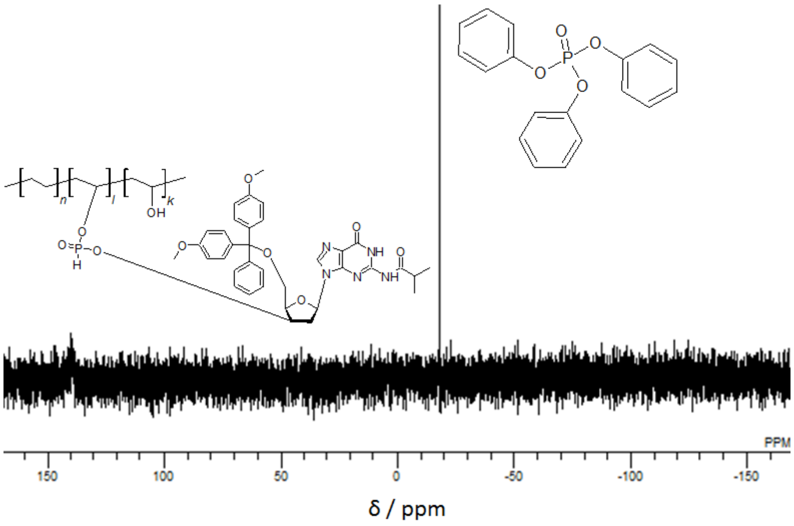


Fig. 3-6 ^{31}P-NMR spectrum of the DMT-dG-immobilized EVOH nanofiber mesh.

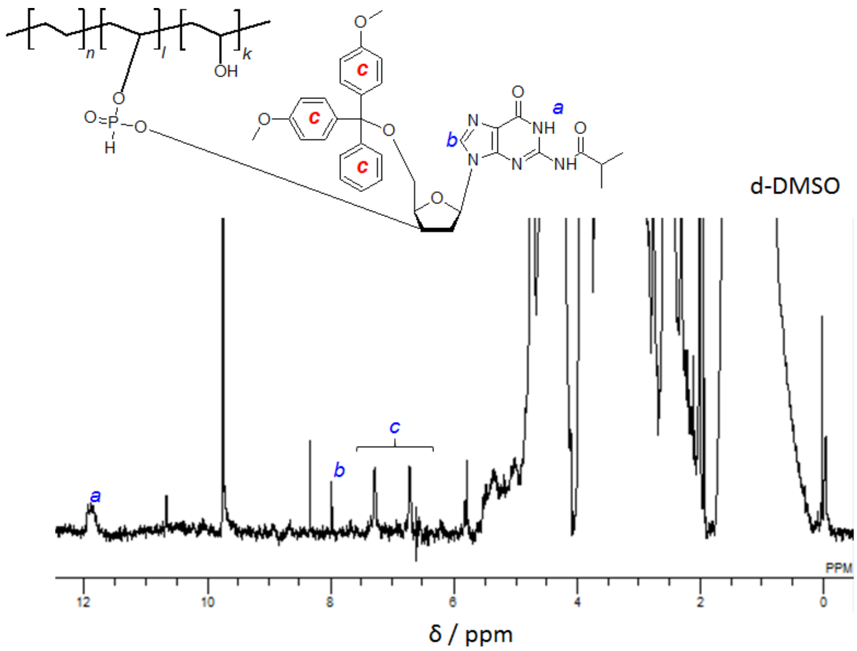


Fig. 3-7 ^{1}H-NMR spectrum of the dG-immobilized EVOH nanofiber mesh.

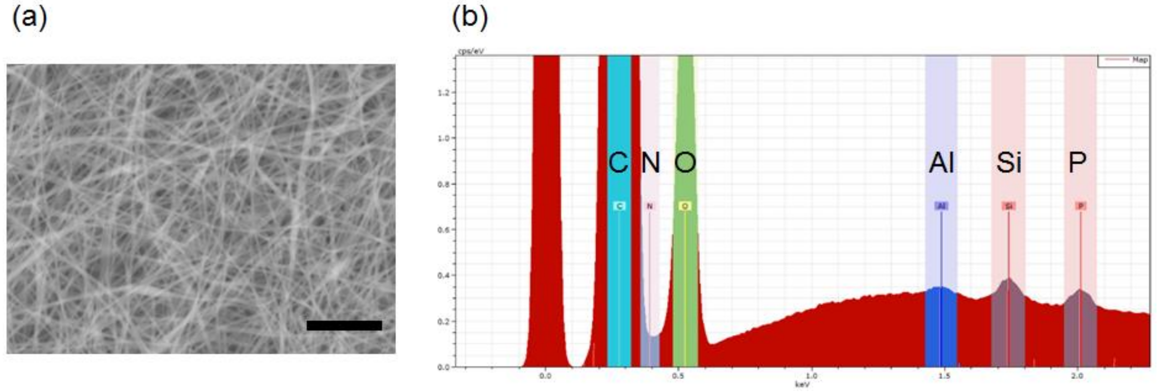


Fig. 3-8 (a) An SEM image and (b) an EDX spectrum of the dG-immobilized EVOH nanofiber mesh. The scale bar: 30 µm.

3.3.1.3. dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの抗 ssDNA 抗体吸着能評価

SLE 患者では抗 ssDNA 抗体が過剰に産生されることが報告されており、またその病原性についても報告されている。そこで、本章では、標的分子として抗 ssDNA 抗体を用いた。dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュの抗 ssDNA 抗体吸着能を評価するため、0.2 mg/mL 抗 ssDNA 抗体溶液中に 37°C で浸漬された。1 時間及び 5 時間、7 時間、12 時間の浸漬後、抗 ssDNA 抗体の吸着量が初期濃度から計算された。Fig. 3-9 から、dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュでは、顕著な吸着は確認されなかった。しかしながら、脱保護前の DMT-dG 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュにおいては、有意に吸着している様子が観察された。これは、保護基の疎水的な性質による非特異的な吸着が生じている可能性が考えられる。

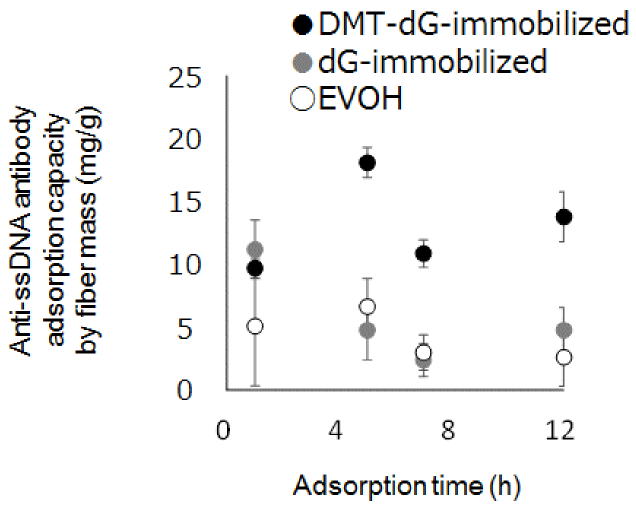


Fig. 3-9 Adsorption performance of the DMT-dG-immobilized (closed circle), dG-immobilized (grey circle) and EVOH nanofiber mesh (open circle) in anti-ssDNA antibody solution (0.2 mg/mL)

3.3.2. DNA コンジュゲート高分子材料の抗 ssDNA 抗体吸着能評価及びメッシュ化の検討

アプローチ②についての検討結果を以下にまとめる。

3.3.2.1. DNA コンジュゲートモノマーの合成

Fig. 3-4 に示すスキームに従い、DNA コンジュゲートモノマーを合成し、質量分析法及び ^{1}H-NMR によって評価した。それぞれの結果を、Fig. 3-10、11 にまとめた。Fig. 3-10 のグラフから、主に目標化合物である分子量 830.32 m/z の化合物が取得されたことが確認された。また、852.30 m/z 及び 868.29 m/z の化合物も混在していることが確認されたが、これらは何れも HPMA と反応した DNA コンジュゲート

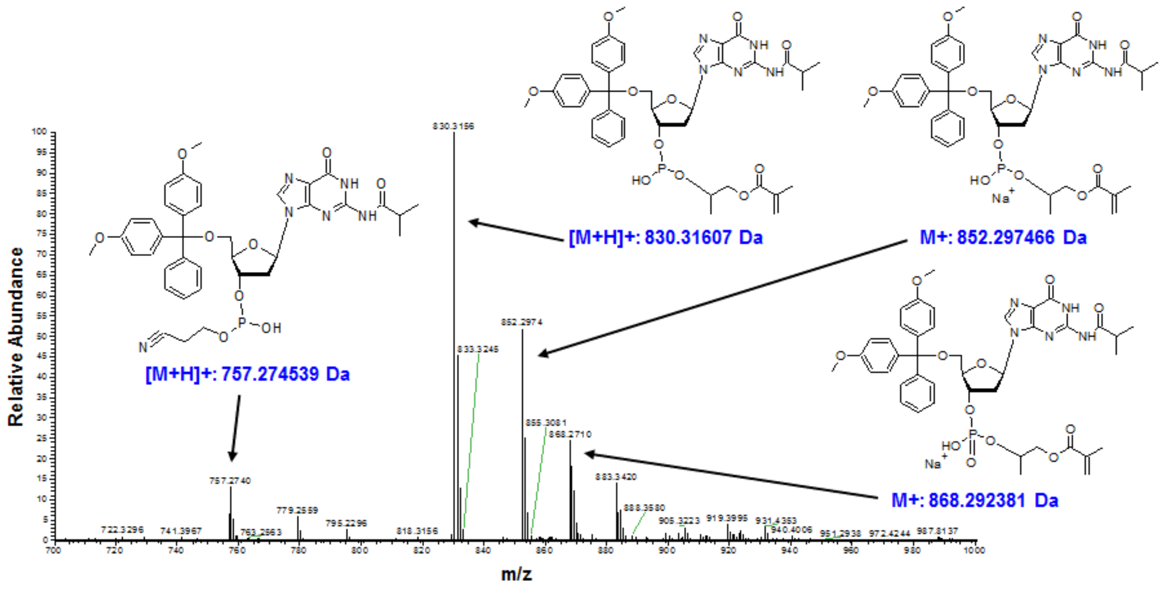


Fig. 3-10 ESI-MS Spectrum of DMT-dG-HPMA, acquired with ZAPLOUS ADV Q- Exactive system (AMR Inc., Tokyo, Japan).

モノマーであることが示唆された。さらに、Fig. 3-11 の ^{1}H-NMR の結果からも同様に、DMT-dG 及び HPMA のカップリング反応が進行していることが示唆された。

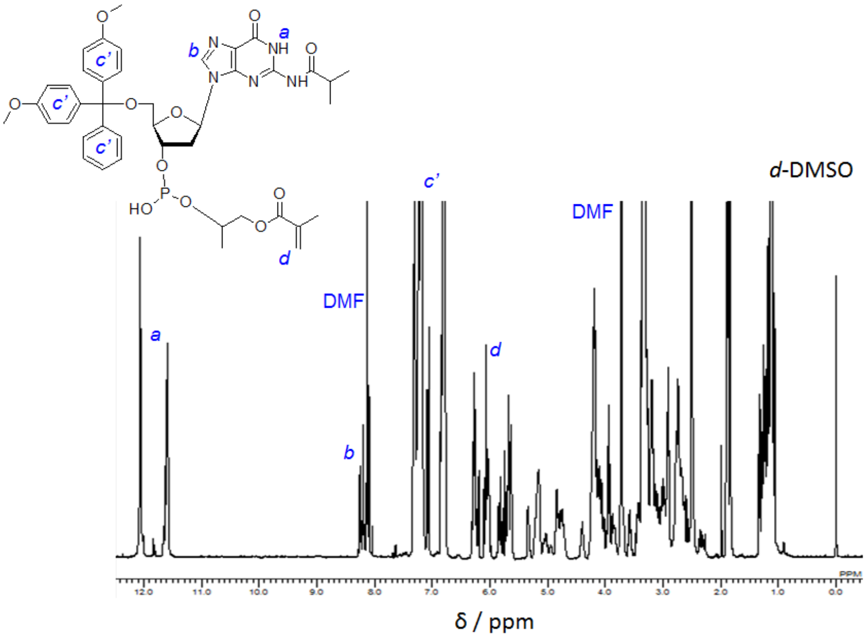


Fig. 3-11 ^{1}H-NMR spectrum of the DMT-dG-HPMA.

3.3.2.2. DNA コンジュゲートモノマーの重合

続いて、3.2.2.2.で合成された DNA コンジュゲートモノマー (DMT-dG-HMPA)及び 3.2.2.3.にて合成された polystyrene-macroCTA を用いて、二つの異なる仕込み比で RAFT 重合を行った。重合反応後、回収された薄黄色固体について ^{1}H-NMR 及び ^{31}P-NMR、GPC による評価し、結果を Fig. 3-12、13 及び Table. 3-1 にまとめた。まず、Fig. 3-12 の ^{1}H-NMR チャートより、polystyrene-macroCTA から DMT-dG-HMPA が重合されていることを示唆する結果が得られた。また、Fig. 3-13 の ^{31}P-NMR の結果から、重合後のリン酸ジエステル中のリンが五価の状態になっていることがわかった。重合反応によりリンが三価から五価に酸化された現象は、以下の二つの原因が考えられる。一つは、RAFT 重合反応時に発生するラジカルによってリンが酸化された可能性である。もう一つは、空気中の水分による酸化である。前者の場合では、重合の進行が著しく妨げられることが想定される。上記の考察を踏まえ、polystyrene-macroCTA 及び poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))の分子量を GPC により評価した (Table. 3-1)。GPC 測定の結果から、それぞれの数平均分子量 (M_n)が 3.26 × 10^4 (polystyrene-macroCTA)及び 3.45 × 10^4 (poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))_short)、3.83 × 10^4 (poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))_long)であることがわかった。したがって、それぞれの重合反応にて polystyrene-macroCTA に DMT-dG-HMPA モノマーが約 2 及び 7 ユニット導入されていると考えられる。この重合反応における、polystyrene-macroCTA と DMT-dG-HMPA 仕込み比は 1 :30 及び 1 : 50 であったことから、重合効率が非常に低いことが伺える。したがって、この結果は、上記のリンの酸化現象の原因が RAFT 重合時に発生するラジカルによる影響が大きいことを示唆している。

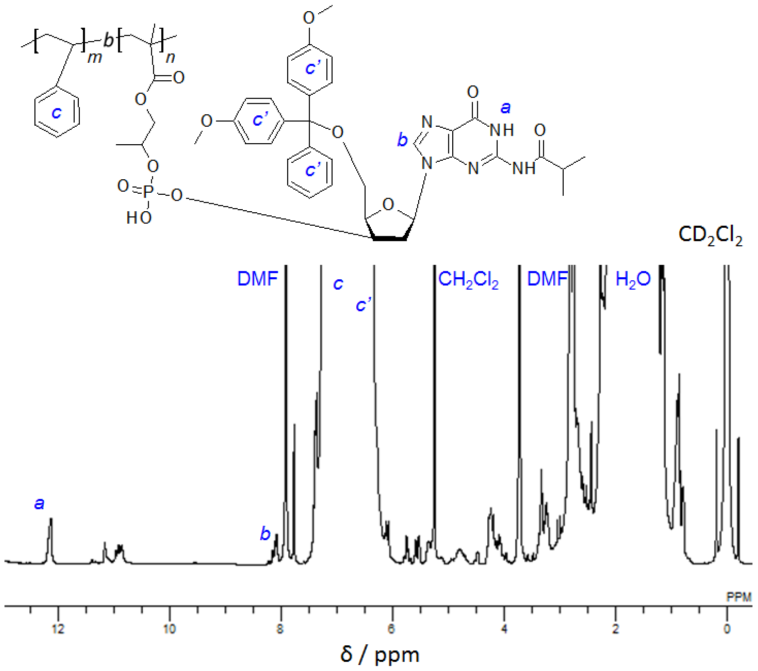


Fig. 3-12 ^{1}H-NMR spectrum of the poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA)).

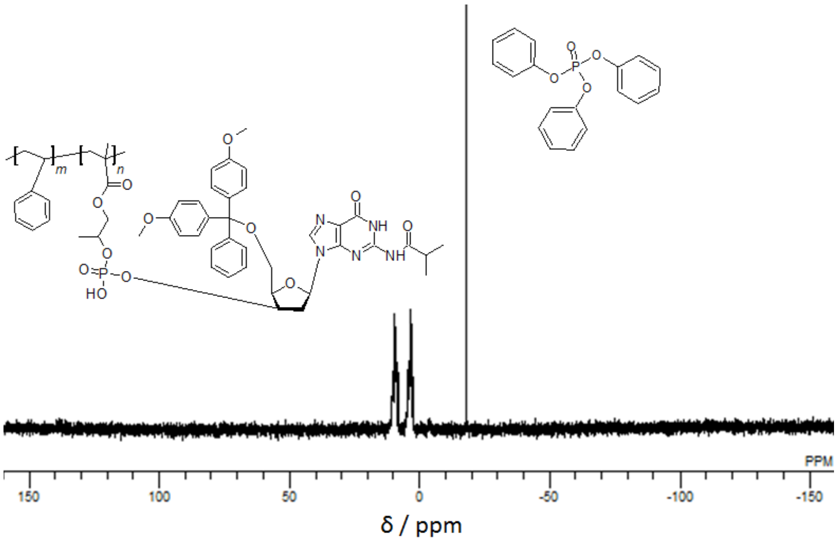


Fig. 3-13 ^{31}P-NMR spectrum of the poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA)).

Table. 3-1 Characteristic data of polystyrene-macroCTA and poly(St-*b*-(dG-HPMA))

Sample name	polystyrene-macroCTA	poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))	
		short	long
M_n	3.26×10^4	3.45×10^4	3.83×10^4
M_w	3.64×10^4	3.81×10^4	4.63×10^4
PDI	1.11	1.21	1.12

3.3.2.3. Poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long の抗 ssDNA 抗体吸着能評価

3.2.2.2.にて重合した poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))_long から保護基 (DMT 基)を取り除いた poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long の抗 ssDNA 抗体に対する吸着能を評価するため、poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))_long 及び、poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long が固定化された PSt 容器中に 2 ug/mL の濃度の抗 ssDNA 抗体を添加した。5 時間の振とう後、抗 ssDNA 抗体の吸着量が初期濃度から計算された。その結果を Fig. 3-14 に示す。Fig. 3-14 から、コントロールである PSt と比較して、poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long では抗 ssDNA 抗体が有意に吸着することが確認された。これの結果は、固定化された poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long から提示される dG ユニットに起因すると考えられる。

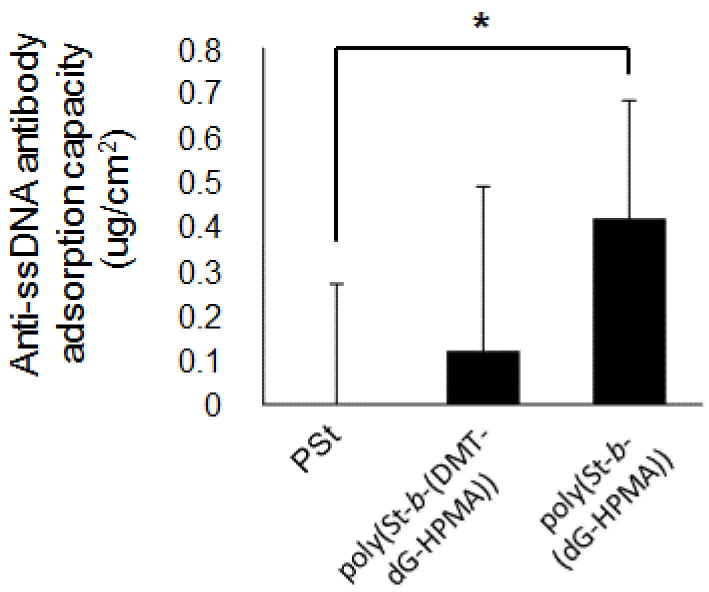


Fig. 3-14 Adsorption performance of the PSt (control), poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))_long, and poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long in anti-ssDNA antibody solution (2 ug/mL). *$p < 0.05$ tested by Student's t-test (n=6).

3.3.2.4. Poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long のナノファイバー化の検討

3.2.2.3.にて合成された poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))のうち、poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))_long を用いて、ナノファイバー化の検討に取り組んだ。まずエレクトロスピニングの条件検討を行うため、分子量の近い polystyrene (M_w: 35000)を用いて、最適条件の探索を行った。その結果を Fig. 3-15 に示す。Fig. 3-15 から、polystyrene の濃度が 100 w/v%の時に上手くファイバー構造が形成されることがわかった。何れの印加電圧の条件においても、同様の繊維径 (数 µm)であることが観察された。この結果を踏まえて、より細い繊維系を作製するための条件検討として、polystyrene の濃度を 80 w/v%の条件でもの検討を深めたが、60 w/v%の時と同様ファイバー構造は得られなかった。この結果から、poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))濃度を 100 w/v%及び印加電圧を 25 kV の条件で、エレクトロスピニングを行ったところ、polystyrene 同様、poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))においてもファイバー状の構造を持つ材料が得られた (Fig. 3-16)。興味深いことに、polystyrene と同じ条件で作製した、poly(St-*b*-(DMT-dG-HPMA))の方が細い繊維径のファイバー状材料であることがわかった。さらに、EDX によるメッシュ表面の元素分析の結果から、poly(St-*b*-

(DMT-dG-HPMA))からなるファイバー材料であることが示唆された。

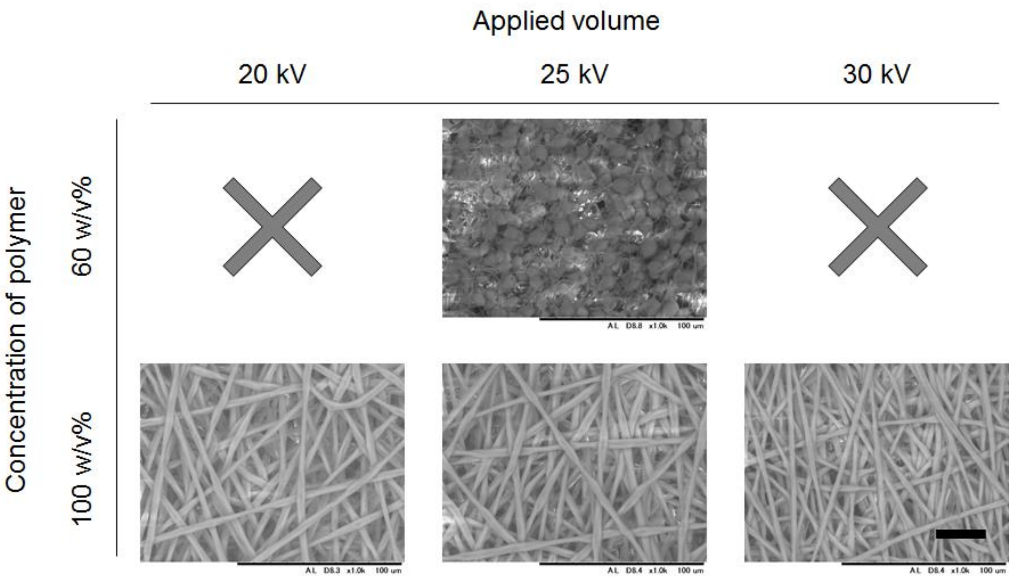


Fig. 3-15 SEM images of fabricated polystyrene meshes. Needlegage: 25 G, Gap: 15 cm. The scale bar: 30 μm.

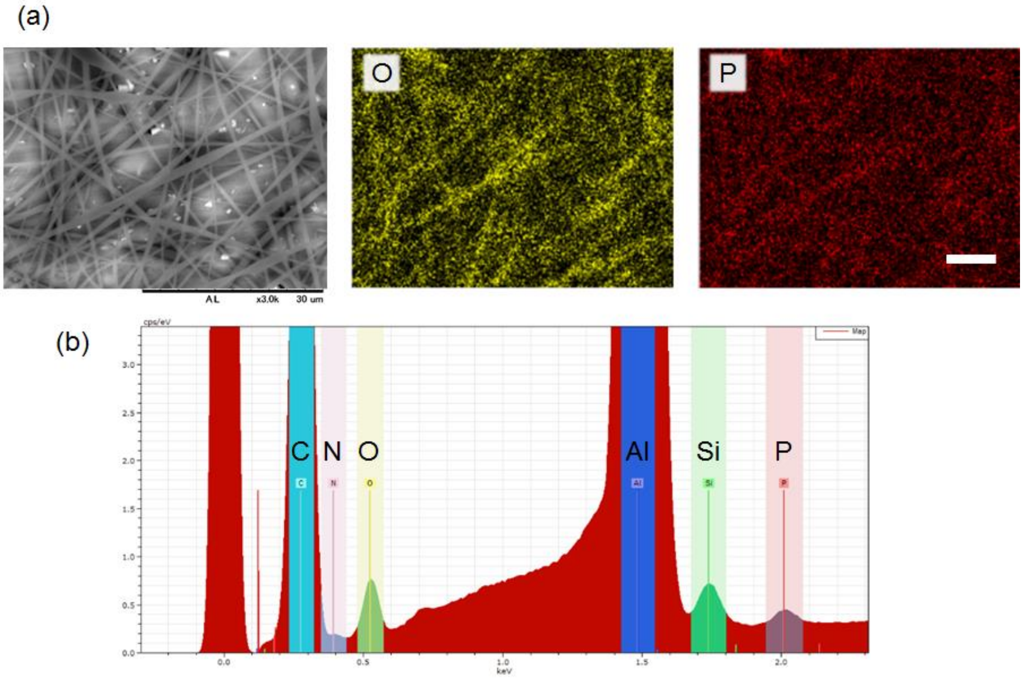


Fig. 3-16 (a) An SEM image and EDX mappings of O and P on poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long meshes. The scale bar: 30 μm. (b) An EDX spectrum of the poly(St-*b*-(dG-HPMA))_long meshes.

3.4. 結論

本章では、SLE の治療としての応用を目指した抗 DNA 抗体を吸着可能な高分子系メッシュ材料の開発を目指し、DNA リガンドを用いた高分子系メッシュ材料の作製に取り組んだ。具体的には、EVOH ナノファイバーメッシュ材料へ DNA を固定化するアプローチと DNA の methacrylate 系モノマーを合成し、styrene とのジブロック高分子材料を作製することによって、ファイバー化の検討を行うアプローチの、二つのアプローチを試みた。両アプローチから DNA リガンドを固定化したメッシュ材料の作製に成功した。二つのアプローチから作製した、DNA 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュ及び、DNA コンジュゲート高分子材料の抗 ssDNA 抗体に対する吸着能を評価した結果、DNA 固定化 EVOH ナノファイバーメッシュでは有意な吸着挙動は確認されなかったが、DNA コンジュゲート高分子材料においては、抗 ssDNA 抗体が有意に吸着される様子が確認された。今後の展望として、アルブミンなどの異なるタンパク質成分における吸着能を検証することで、DNA コンジュゲート高分子材料の抗 ssDNA 抗体の選択的な吸着能について評価し、免疫吸着療法への応用の可能性を探索することが期待される。

3.5. 参考文献

1 Rahman , A.; Isenberg , D. A., Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine* **2008,** *358*, 929-939.

2 Euler, H. H.; Zeuner, R. A.; Schroeder, J. O., Plasma exchange in systemic lupus erythematosus. *Transfusion Science* **1996,** *17*, 245-265.

3 Zabriskie, J. B., *Essential Clinical Immunology*. Cambridge University Press: 2009.

4 Terman, D. S.; Stewart, I.; Hoffmann, A.; Carr, R.; Harbeck, R., Specific removal of DNA antibody with an immunoadsorbent. *Experientia* **1974,** *30*, 1493-1494.

5 Terman, D. S.; Petty, D.; Harbeck, R.; Carr, R. I.; Buffaloe, G., Specific removal of DNA antibodies in vivo by extracorporeal circulation over DNA immobilized in collodion charcoal. *Clinical Immunology and Immunopathology* **1977,** *8*, 90-96.

6 Terman, D. S.; Stewart, I.; Robinette, J.; Carr, R.; Harbeck, R., Specific removal of DNA antibodies in vivo with an extracorporeal immuno-adsorbent. *Clinical and Experimental Immunology* **1976,** *24*, 231-237.

7 Terman, D.; Buffaloe, G.; Cook, G.; Sullivan, M.; Mattioli, C.; Tillquist, R.; Carlos Ayus, J., Extracorporeal immunoadsorption: Initial experience in human systemic lupus erythematosus. *The Lancet* **1979,** *314*, 824-827.

8 Kong, D. L.; Chen, C. Z.; Lin, E. F.; Yu, Y. T., Clinical trials of Type I and in vitro studies of Type

II immunoadsorbents for systemic lupus erythematosus therapy. *Artificial Organs* **1998,** *22*, 644-650.

9 Yu, Y., Adsorbents in blood purification: From lab search to clinical therapy. *Chinese Science Bulletin* **2013,** *58*, 4357-4361.

10 Paul, W.; Sharma, C. P., *Plasma perfusion using immunoadsorpbents*. 2007.

11 Aotsuka, S.; Funahashi, T.; Tani, N.; Okawatakatsuji, M.; Kinoshita, M.; Yokohari, R., Adsorption of anti-dsDNA antibodies by immobilized polyanionic compounds. *Clinical and Experimental Immunology* **1990,** *79*, 215-220.

12 Özgür, E.; Bereli, N.; Türkmen, D.; Ünal, S.; Denizli, A., PHEMA cryogel for in-vitro removal of anti-dsDNA antibodies from SLE plasma. *Materials Science and Engineering: C* **2011,** *31*, 915-920.

13 Boru, Z.; Iwata, H.; Deling, K.; Yaoting, Y.; Kato, K.; Ikada, Y., Preparation of DNA-immobilized immunoadsorbent for treatment of systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1999,** *10*, 341-350.

14 Lin, D.-J.; Lin, D.-T.; Young, T.-H.; Chen, T.-C.; Chang, H.-H.; Cheng, L.-P., Immobilization of DNA on Microporous PVDF Membranes by Plasma Polymerization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2009,** *20*, 1943-1959.

15 Scaringe, S. A.; Francklyn, C.; Usman, N., Chemical synthesis of biologically active oligoribonucleotides using beta-cyanoethyl protected ribonucleoside phosphoramidites. *Nucleic Acids Research* **1990,** *18*, 5433-5441.

16 平尾一郎, アプタマーの可能性を広げる合成生物学. *サイトメトリーリサーチ* **2009,** *19*, 9-17.

17 Xu, C.; Carlsson, D. O.; Mihranyan, A., Feasibility of using DNA-immobilized nanocellulose-based immunoadsorbent for systemic lupus erythematosus plasmapheresis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016,** *143*, 1-6.

第 4 章

細胞挙動を選択的に制御可能な
ペプチドリガンドの探索

4.1. 緒言

4.1.1. 臨床で用いられる骨接合材料の現状と課題

骨形成や骨再生の現象は、骨粗鬆症や口唇口蓋裂、手術などによる骨欠損部位において重要である。骨粗鬆症の特徴は、骨密度や骨強度の低さ微小骨折であり、これらが脆弱性骨折のリスクを高める [1]。高齢者人口が増えるにつれて、骨粗鬆症患者の数は増加の一途を辿っていくと見積もられている。骨粗鬆症による骨折のリスクは 40%程度まで上り、脊椎や腰、手首の骨折は患者の QOL を大きく下げてしまう。口唇口蓋裂では、口唇部分に構造欠損が生じるため、その症状が一目でわかる [2]。先進国において、口唇口蓋裂は死に直結することはないものの、小児患者の罹患率は深刻である。口唇口蓋裂から生じる摂食障害や発音障害は手術や歯科治療により改善されるため、治療に用いる骨移植用材料についての臨床が取り組まれてきている [3]。また、胸部循環器系の手術では、胸骨正中切開時に胸骨の断面からの止血材としての骨ろうや [4]、胸骨閉鎖時の胸骨の固定に胸骨ピンが用いられている [5]。しかしながら、これらの材料には、それぞれ課題が残っている。骨ろうは、その使用部位において感染源となることや、骨癒合を妨げることが報告されている [4]。一方、胸骨ピンは、結晶性の高さから poly-L-lactide が原料として用いられているが、骨伝導性や骨癒合性が十分ではない。これらの材料は骨治療材料として広く研究されているものの [6, 7]、骨再生を促進するような材料開発には課題が残されている。

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC)は再生医療や組織工学の分野において、最も有望な細胞リソースである。骨髄 (bone marrow: BM)や脂肪 (adipose tissue: AT)、臍帯 (umbilical cord: UC)など様々な細胞ソース由来の MSC は、骨の細胞治療や組織工学の研究に頻繁に用いられてきた [8]。特に、UC-MSC は多能性幹細胞の性質を示し、骨芽細胞や軟骨細胞、神経細胞、内皮細胞への分化能を有する。UC-MSC は、一般的に医療用廃棄物となる臍帯組織から得られるため、他のソース由来の MSC と比較して、母親と子に対して低侵襲的な手法で回収することができるという利点をもつ [9]。さらに、UC-MSC は骨細胞系列への分化能も十分有している一方で [10, 11]、脂肪細胞系列への分化は難しいと報告されている [9]。

4.1.2. 骨再生促進タンパク質

骨形成タンパク質 (bone morphogenetic proteins: BMPs)は骨形成を誘導する増殖因子のファミリーであり、MSC の骨細胞系列への分化に関する研究が行われてきた [12]。BMP は、1965 年に Urist によって発見されて以来 [13, 14]、数多くの in vitro 及び in vivo 研究、臨床研究からヒトの骨格のリモデリングにおける中心的な役割が同定されてきた [14, 15]。これまでに、40 種類以上の BMP ファミリーが特定されており、それぞれが骨細胞分化や骨形成において重要な役割を果たしていることから、骨粗鬆症を起因とする骨折の治療に関与すると考えられてきた。様々な BMP ファミリーの中でも特に、BMP-2 及び BMP-4、BMP-6、BMP-7 は、骨粗鬆症に関する研究の対象とされ、その経路などが関連付けられてきた [14]。BMP-2 及び BMP-4、BMP-6、BMP-7 は、in vitro 及び in vivo の研究において、MSC の骨分化や、骨再生を制御することが報告されている [16-20]。BMP のアミノ酸配列は種を越えて高度に保存されている。BMP-2 のタンパク質構造中に存在する knuckle エピトープやそのエピトープ由来のペプチドが BMP-2 の効果を置き換え得ることもわかっている [21]。詳細として、knuckle エピトープは骨前駆細胞のアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase: ALP)の高活性化や、in vivo モデルでの石灰化の誘導を促進する [22]。さらに、knuckle エピトープ由来の KIPKASSVPTELSAISTLYL ペプチドと RGD ペプチドを固定化したハイドロゲルが、骨髄間質前駆細胞の骨分化や石灰化に影響を与えることが報告されている [23]。また、いくつかの BMP-7 由来のペプチドが骨芽細胞の石灰化プロセスを促進することが明らかとなっており [24, 25]、poly(lactic-*co*-glycolic acid)に導入することで、MSC の骨分化を促すことがわかっている [26]。BMP-2 と BMP-7 を比較した研究において、それぞれのタンパク質構造中の生体活性部位のアミノ酸配列は酷似し

ており、その機能も似ていることが示唆されている[24, 25]。さらに、BMP-7 の別の機能部位は bone forming peptide-1 (BFP-1)と定義されており、BFP-1 で処理された MSC を移植した動物モデルにおいて骨形成の著しく促進されることが報告されている[27]。また、BMP に由来しない骨分化誘導ペプチドも発見されている。RANKL タンパク質結合ペプチドである W9 ペプチド (YCWSQYLCY)は、破骨細胞形成を抑制し、骨前駆細胞における骨芽細胞への分化や石灰化を知られている[28]。その他にも、ヒストン H4 タンパク質の C 末端領域の正電荷をもつ 14 残基のペプチド (ALKRQGRTLYGFGG)が骨形成ペプチドとして、同定されている[29]。さらに、その骨形成ペプチドの骨形成効果は、in vitro[30] 及び in vivo[31] のいずれにおいても調べられてきた。

しかしながら、生体材料が移植されると、一般的に損傷を受けた組織の周囲において炎症反応が誘発され、細胞外マトリックスタンパク質からなる線維性結合組織が過剰に産生される。その結果、線維化が生じ、深刻な臓器障害にも繋がる[32]。腸組織において、線維芽細胞 (FB)の増殖や遊走、MSC からの FB への分化などによって進行する線維化のメカニズムは、炎症反応によって誘導される[33, 34]。したがって、FB の増殖や遊走の制御や MSC の FB への分化の抑制は、生体材料の移植時において重要となる。MSC 自身は、抗炎症性メディエーターである TNF 刺激遺伝子-6 タンパク質の分泌を促すため、線維症の治療に有効であると示唆されている[35]。移植材料上において骨形成や骨再生を促進するためには、FB の増殖を阻害し、骨系細胞の骨分化細胞や増殖を促進するような細胞選択的な制御は非常に重要となる。

4.1.3. 本研究のストラテジー及び目的

しかしながら、4.1.2.で紹介したような細胞選択的なコンセプトによる生体分子のスクリーニング及び生体材料の開発研究は、殆ど報告されていない。そこで、筆者らは、骨系細胞の増殖や分化を促進し、FB の増殖を抑制するような骨形成ペプチドのスクリーニングを試みた。上記のコンセプトのペプチドをスクリーニングするため、SPOT 合成機を用いて合成されたペプチドアレイ上において[36, 37]、報告されている手法に従い、細胞-ペプチド間の相互作用のスクリーニングを行った[38, 39]。

具体的には、骨形成促進作用 (骨系細胞選択的な増殖及び骨系細胞への分化促進)を評価するためのペプチドスクリーニングプラットフォームを構築し、骨形成促進作用を有する短鎖ペプチドを複数種類特定した。骨形成促進作用の評価には、骨形成初期の評価で用いられる ALP 活性測定を行った。ペプチドのスクリーニングの前に、W9 ペプチドを用いたスクリーニング条件の検討を行った。さらに、スクリーニングの候補ペプチドを絞り込むために、骨分化促進に関与する様々な BMP について 8 種の生物種間におけるホモロジー解析を行った (Fig. 4-1)。候補ペプチドの残基数は W9 ペプチドを参考に、9 残基とした。ホモロジー解析から選択された 9 残基の候補ペプチド 25 種類について、骨形成促進作用を有するペプチドのスクリーニングを実施した結果、3 種の骨形成促進作用を有するペプチドが取得された。

4.2. 実験

4.2.1. 実験材料

全ての Fmoc-amino acid 及び Fmoc 11-aminoundecanoic acid は、渡辺化学工業株式会社 (広島、日本)から購入した。WST-8 は、同人堂 (熊本、日本)から購入した。SIGMAFAST™ p-nitrophenyl phosphate tablets は、Sigma Aldrich (東京、日本)から購入した。

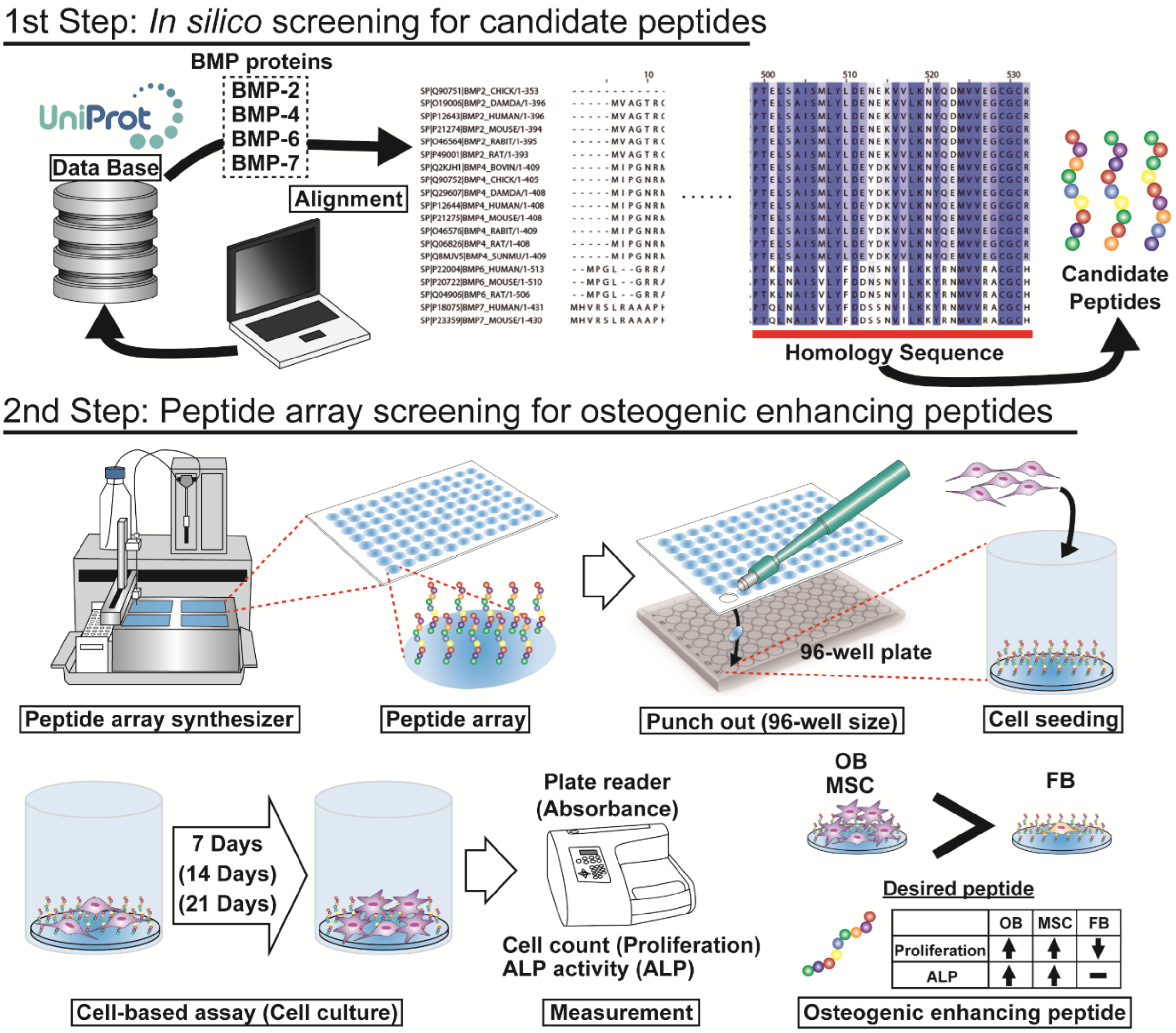


Fig. 4-1 Schematic of this study. First, in silico screening of candidate peptides was performed. From the protein database UniProt, the sequences of several BMPs, such as BMP-2, BMP-4, BMP-6 and BMP-7, from several species were obtained. The protein sequences were aligned in the UniProt database, and homologous sequences were defined. From the homologous sequences, candidate 9-mer peptides were selected for the next peptide array screening. Second step, peptide array screening of osteogenic-enhancing peptides was conducted. A peptide array was fabricated using a peptide array synthesizer and was punched out in the 96-well plate size in a 96-well plate. Cells were seeded and cultured for several days. Cell proliferation and osteogenic differentiation were detected by cell counting and ALP activity, respectively. The desired peptides exhibit higher proliferation of osteoblasts (OBs) and MSCs than of fibroblasts (FBs) and high ALP activity in OBs and MSCs.

4.2.2. In silico スクリーニングによる候補ペプチドの絞り込み

まず、in silico スクリーニングとして、UniProt から取得された BMP の配列がデータベース上に配列された。配列されたデータベースは多重アライメントビューワー (Jalview; ver. 2.9.0.b2)を用いて描画された。

4.2.3. 細胞培養

実験に用いた、Normal human osteoblasts 及び Human mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix、Normal human dermal fibroblasts は、それぞれ LONZA (Basel, スイス)及び Promo Cell (Heidelberg, ドイツ)、KURABO (大阪、日本)から、購入した。そして、各細胞は、それぞれ OGM Bullet Kit (LONZA)及び mesenchymal stem cell growth medium (Promo Cell)、10%の fetal bovine serum (FBS)血清 (NICHIREI BIOSCIENCES: 東京、日本)及び 1%の penicillin streptomycin (和光純薬工業株式会社)が含有された Dulbecco’s modified Eagles’ medium (DMEM) (和光純薬工業株式会社)を用いて、37°C、5%CO_2のインキュベーターで培養し、1~2 日おきの培地交換及び 2~5 日おきの継代を行った。接着評価には、全て 4~5 継代目の細胞を用いた

4.2.4. ペプチドアレイ合成

ペプチドアレイは、Intavis AG (Köln、ドイツ)のペプチド合成機 (ASP222)を用いて、既に報告されている Fmoc 固相合成法に基づく作製手法により [40, 41]、作成された (Fig. 4-1)。ペプチドアレイの設計において、合成されるペプチド配列はいずれもアレイ上に n = 3 で作製された。

4.2.5. ペプチドアレイを用いた細胞増殖評価

細胞増殖アッセイは、報告されている PIASPAC の方法を応用した [40, 41]。OB 及び UC-MSC、FB は、それぞれ 1.4×10^4 cells/cm^2 及び、2.9×10^4 cells/cm^2、1.4×10^4 cells/cm^2 の播種密度でアッセイプラットフォーム上に播種され、37°C、5%CO_2のインキュベーターで 7 日間培養された。培養 7 日後、WST-8 を培地中に添加し、37°C で 1 時間静置した後、上澄みの吸光度 (450 nm)を Bio-Rad 社 (CA、USA)の吸光プレートリーダー (iMark™ Microplate Absorbance Reader)により測定した。

4.2.6. ペプチドアレイを用いた ALP 活性評価

ALP 活性のアッセイも同様に、報告されている PIASPAC の方法を応用した [40, 41]。OB 及び UC-MSC、FB は、それぞれ 1.4×10^4 cells/cm^2 及び、2.9×10^4 cells/cm^2、1.4×10^4 cells/cm^2 の播種密度でアッセイプラットフォーム上に播種され、37°C、5%CO_2のインキュベーターで 7 日間培養された。培養 7 日後、milliQ 水に溶解させた SIGMAFAST™ p-nitrophenyl phosphate tablets を培地中に添加し、37°C で 30 分間静置した後、上澄みの吸光度 (405 nm)を Bio-Rad 社 (CA、USA)の吸光プレートリーダー (iMark™ Microplate Absorbance Reader)により測定した。

4.2.7. 統計解析

ペプチドアレイを用いた細胞増殖評価及び ALP 活性評価における有意差検定は Student の t 検定にて

評価した。

4.3. 結果と考察

4.3.1. ペプチドアレイスクリーニングの条件検討

ペプチドアレイを用いた骨形成促進ペプチドのスクリーニングを行う前に、評価するための最適な条件の検討を行った。具体的には、細胞増殖及び骨分化評価には、7、14、21 日間ペプチドアレイ上にて培養された UC-MSC を用いて検討した。比較のコントロールとして、ペプチドを固定化していない条件(BLANK)及び RGD ペプチド (接着ペプチド)または W9 ペプチド (骨分化ペプチド)が固定された条件を用いた。増殖評価において、BLANK 及び RGD ペプチドの条件を比較したが、7、14、21 日間いずれにおいても、顕著な差は確認できなかった (Fig. 4-2 (a))。W9 ペプチドは、14 日間にて、特に RGD ペプチドと比較して、高い増殖性を示した ($p = 0.068$)。また、ALP 活性評価では、BLANK と RGD の間では、いずれの培養期間においても顕著な差が確認されなかったが (Fig. 4-2 (b))、W9 は 7 日間培養した条件において、RGD ペプチドと比べて顕著な差を示した ($p < 0.05$)。ALP 評価の最終評価点を定義するため、ALP 活性量を細胞数で除したものを用いたところ (Fig.4-2 (c))、7 日間培養した W9 ペプチドの条件において RGD ペプチドの条件よりも僅かに大きい様子が確認された ($p = 0.079$)。したがって、ALP 活性は骨分化の初期段階で確認される分化マーカーであることからもペプチドアレイスクリーニングでは 7 日間の培養が採用することとした。

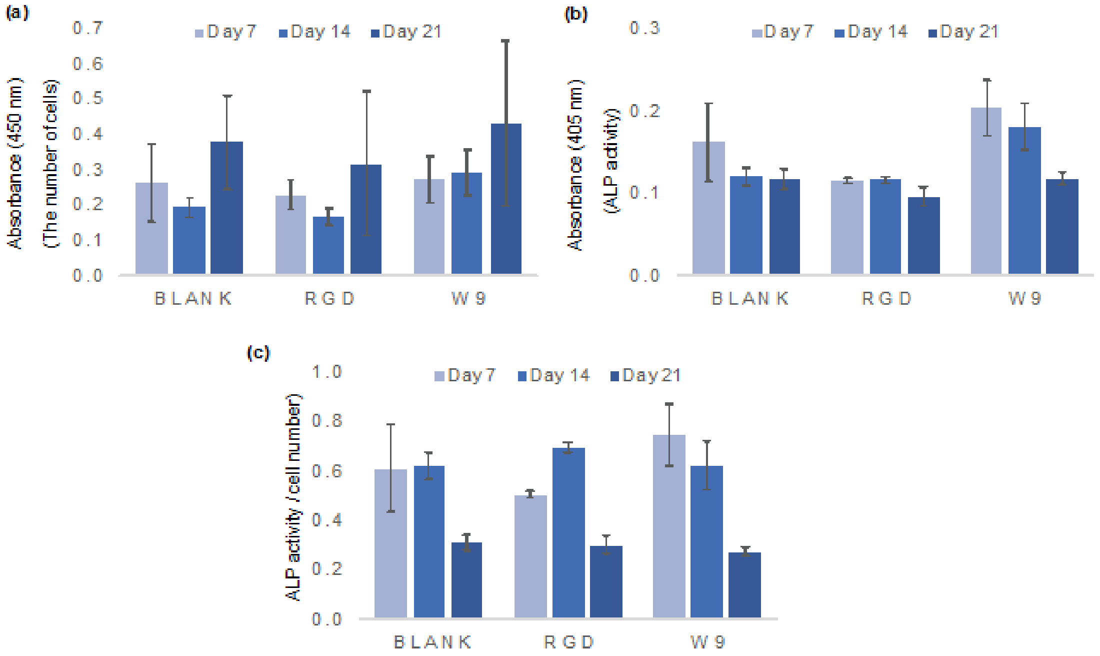


Fig. 4-2 Conditions used for the peptide array screening. UC-MSCs were used for the experiment. (a) Proliferation assay by WST-8; (b) ALP activity assay; (c) ALP activity/cell number. Each assay was performed at Days 7, 14 and 21. Blank indicates no peptide. All experiments were performed in triplicate.

4.3.2. In silico スクリーニングによる候補ペプチドの決定

In silico スクリーニングとして、UniProt から取得した複数の BMP のアミノ酸配列を Table 4-1 にまとめた。まず、BMP-2 及び、-4、-6、-7 の 4 種類の BMP ファミリーを 8 種類の生物種 (CHICK 及び DAMDA、HUMAN、MOUSE、RAT、BOVINE、RABBIT、SUNMU)から合計 19 種類の BMP が用意された。なお、BMP-2 及び BMP-4 は、骨分化促進評価のために最もよく調べられてきている BMP ファミリーである。

ペプチドスクリーニングに用いる候補ペプチドを決定するため、19 種類の BMP のアミノ酸配列を並べ、骨分化に関連するような重要な配列を定義した。候補ペプチドを絞り込むために、以下の二つの仮説が用いられた。まず、異なる生物種を越えても保存されているホモロジー配列部分は骨分化能の可能性があり (仮説 1)、9 残基のような短鎖ペプチドでも骨形成能をもつ (仮説 2)。ホモロジー解析の結果は、Fig. 4-3 に示す。ホモロジー配列は BMP のアミノ酸配列中の中心部分や C-末端近傍において確認され、この解析から、25 種類の候補ペプチドが取得された (Table 4-2)。

4.3.3. ペプチドアレイを用いた骨形成細胞増殖ペプチドの探索

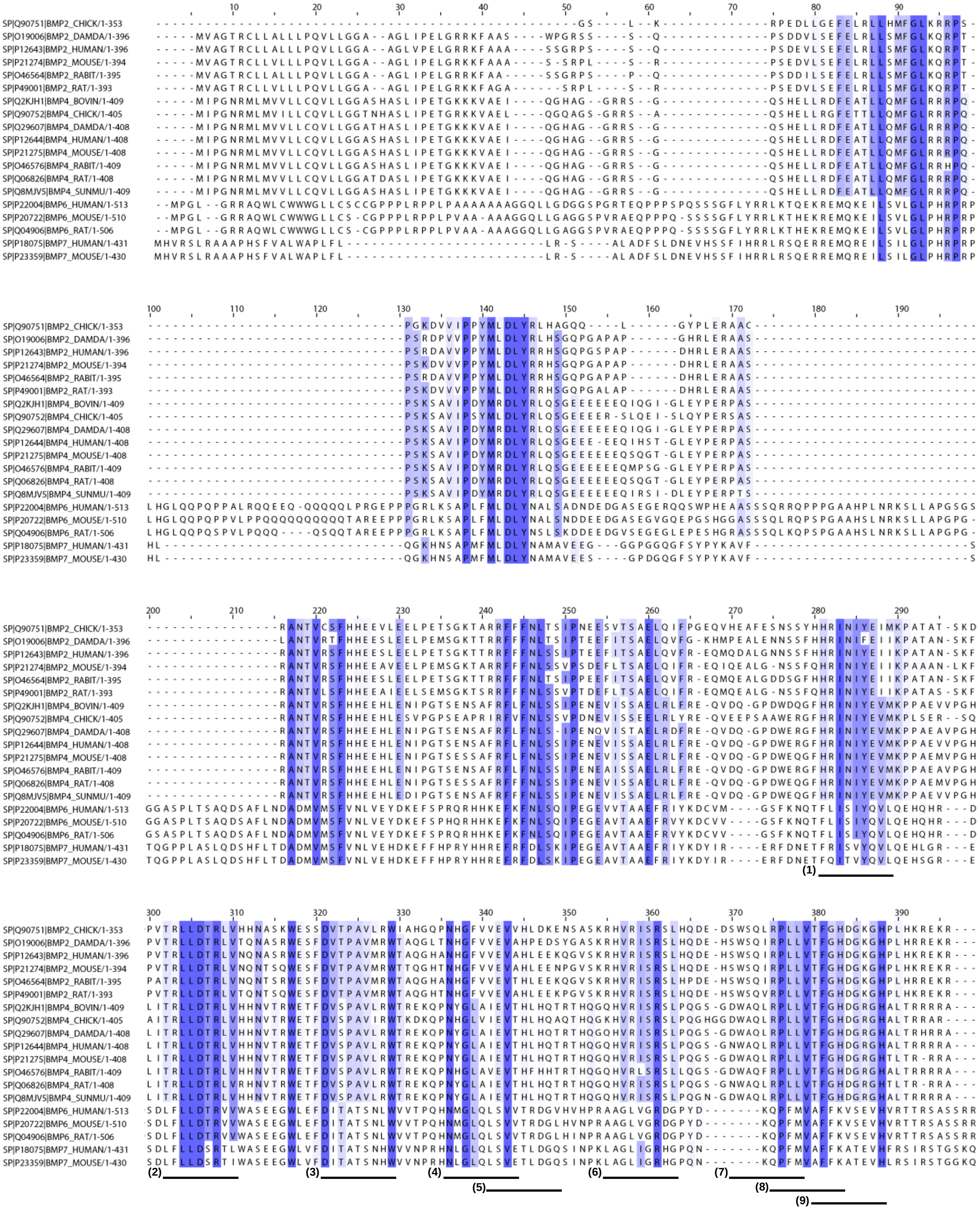
候補ペプチド 25 種類の中から骨形成細胞増殖ペプチドを特定するため、RGD 及び BLANK も同様にペプチドアレイ上に用意された。このスクリーニングでは、細胞選択的な骨形成促進ペプチドを探索するために、骨系細胞の増殖性及び骨分化評価を行った。そして、Fig. 4-4 は、OB 及び UC-MSC、FB の増殖性評価の結果を示す。OB の増殖性評価では、14 種類のペプチドが BLANK と比較して高い増殖能を示した (Fig 4-4 (a))。特に、ペプチド番号 1 のペプチドでのみ、有意差が確認された ($p < 0.05$)。続いて、UC-MSC の増殖評価では、7 種のペプチドが BLANK と比較して高い増殖能を示した (Fig 4-4 (b))。しかしながら、どの条件においても有意差が確認されなかった。一方、FB の増殖評価では、17 種のペプチドが BLANK と比較して低い増殖能を示した (Fig 4-4 (c))。そして、ペプチド番号 11 のペプチドでのみ、有意差が確認された ($p < 0.05$)。これらの結果から、ペプチド番号 2 のペプチドが、OB の高い増殖性及び UC-MSC 及び FB の低い増殖性の性質を示し、さらに、ペプチド番号 1、6 のペプチドが、OB の高い増殖性及び FB の低い増殖性の性質を示すことがわかった。したがって、ペプチド番号 1、2、6 のペプチドを骨形成細胞選択的増殖ペプチドと定義した。

4.3.4. ペプチドアレイを用いた骨分化促進ペプチドの探索

次に、OB 及び UC-MSC の骨分化促進ペプチドを探索するために、ALP 活性評価を行った。その結果を Fig. 4-5 に示す。このスクリーニングから、OB の骨分化を促進するペプチドとして、BLANK よりも活性の高いペプチドが 11 種類取得された (Fig. 4-5 (a))。特に、ペプチド番号 4 及び 6、16 のペプチドでのみ、有意差が確認された ($p < 0.05$)。続いて、UC-MSC の骨分化を促進するペプチドとして、BLANK よりも活性の高いペプチドが 15 種類取得された (Fig. 4-5 (b))。しかしながら、どの条件においても有意差が確認されなかった。また、ALP 活性を評価する際には、単位細胞辺りの ALP 活性量が考慮する必要がある。したがって、Fig. 4-6 において、OB 及び UC-MSC それぞれの単位細胞辺りの ALP 活性量の結果を示す。まず、OB では、BLANK よりも活性の高いペプチドが 12 種類取得された (Fig. 4-6 (a))。特に、ペプチド番号 4 及び 6、11、18、20、22、RGD のペプチドで、有意差が確認された ($p < 0.05$)。UC-MSC では、BLANK よりも活性の高いペプチドが 20 種類取得された (Fig. 4-6 (b))。特に、ペプチド番号 2 及び 9、10、11、12、15、16、19、21 のペプチドで、有意差が確認された ($p < 0.05$)。これらの結果から、BMP 由来の骨分化促進ペプチドが複数種類取得され、そのいくつかにおいて、ペプチド番号 11 のような OB 及び UC-MSC 両方の分化を促進するペプチドも取得された。

Table. 4-1 BMPs used in alignment analysis.

No	Entry	Entry name	Protein names	Organism	Length
1	Q90751	BMP2_CHICK	Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) (Fragment)	*Gallus gallus* (Chicken)	353
2	O19006	BMP2_DAMDA	Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)	*Dama dama* (Fallow deer) (*Cervus dama*)	396
3	P12643	BMP2_HUMAN	Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) (Bone morphogenetic protein 2A) (BMP-2A)	*Homo sapiens* (Human)	396
4	P21274	BMP2_MOUSE	Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) (Bone morphogenetic protein 2A) (BMP-2A)	*Mus musculus* (Mouse)	394
5	O46564	BMP2_RABIT	Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)	*Oryctolagus cuniculus* (Rabbit)	395
6	P49001	BMP2_RAT	Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) (Bone morphogenetic protein 2A) (BMP-2A)	*Rattus norvegicus* (Rat)	393
7	Q2KJH1	BMP4_BOVIN	Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)	*Bos taurus* (Bovine)	409
8	Q90752	BMP4_CHICK	Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)	*Gallus gallus* (Chicken)	405
9	Q29607	BMP4_DAMDA	Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)	*Dama dama* (Fallow deer) (*Cervus dama*)	408
10	P12644	BMP4_HUMAN	Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) (Bone morphogenetic protein 2B) (BMP-2B)	*Homo sapiens* (Human)	408
11	P21275	BMP4_MOUSE	Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) (Bone morphogenetic protein 2B) (BMP-2B)	*Mus musculus* (Mouse)	408
12	O46576	BMP4_RABIT	Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)	*Oryctolagus cuniculus* (Rabbit)	409
13	Q06826	BMP4_RAT	Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) (Bone morphogenetic protein 2B) (BMP-2B)	*Rattus norvegicus* (Rat)	408
14	Q8MJV5	BMP4_SUNMU	Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) (sBmp4)	*Suncus murinus* (Asian house shrew) (Musk shrew)	409
15	P22004	BMP6_HUMAN	Bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) (VG-1-related protein) (VG-1-R) (VGR-1)	*Homo sapiens* (Human)	513
16	P20722	BMP6_MOUSE	Bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) (VG-1-related protein) (VGR-1)	*Mus musculus* (Mouse)	510
17	Q04906	BMP6_RAT	Bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) (VG-1-related protein) (VGR-1)	*Rattus norvegicus* (Rat)	506
18	P18075	BMP7_HUMAN	Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) (Osteogenic protein 1) (OP-1) (Eptotermin alfa)	*Homo sapiens* (Human)	431
19	P23359	BMP7_MOUSE	Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) (Osteogenic protein 1) (OP-1)	*Mus musculus* (Mouse)	430


SP|Q90751|BMP2_CHICK/1-353
SP|O19006|BMP2_DAMDA/1-396
SP|P12643|BMP2_HUMAN/1-396
SP|P21274|BMP2_MOUSE/1-394
SP|O46564|BMP2_RABIT/1-395
SP|P49001|BMP2_RAT/1-393
SP|Q2KJH1|BMP4_BOVIN/1-409
SP|Q90752|BMP4_CHICK/1-405
SP|Q29607|BMP4_DAMDA/1-408
SP|P12644|BMP4_HUMAN/1-408
SP|P21275|BMP4_MOUSE/1-408
SP|O46576|BMP4_RABIT/1-409
SP|Q06826|BMP4_RAT/1-408
SP|Q8MJV5|BMP4_SUNMU/1-409
SP|P22004|BMP6_HUMAN/1-513
SP|P20722|BMP6_MOUSE/1-510
SP|Q04906|BMP6_RAT/1-506
SP|P18075|BMP7_HUMAN/1-431
SP|P23359|BMP7_MOUSE/1-430
(1)
(2)
(3)
(4)
(5)
(6)
(7)
(8)
(9)

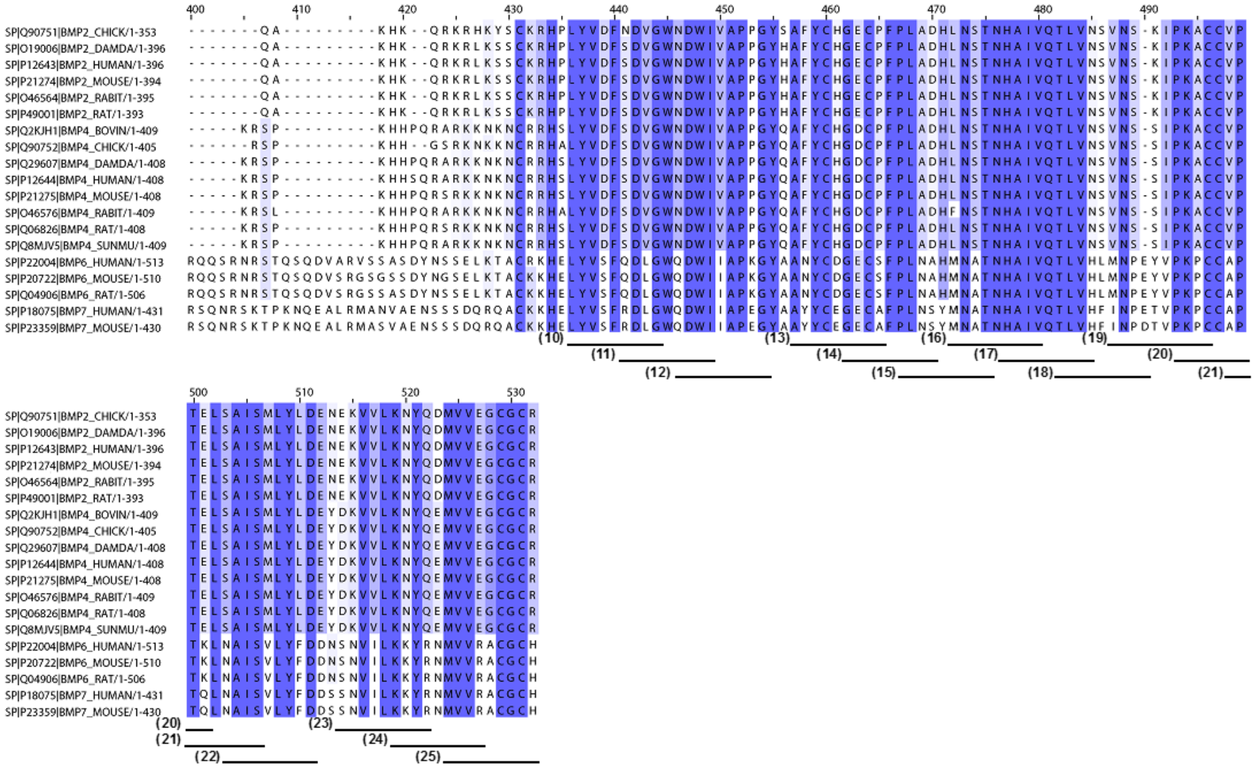


Fig. 4-3 Homology analysis of BMP sequences for screening candidate peptides in silico. Darker blue-colored amino acids indicate high homology, and lighter blue-colored amino acids indicate low homology. Numbered underlines at the bottom of the peptide sequence alignment indicate the 25 peptide sequences selected for peptide array screening (Underlines (1) to (25)). For example, Underline (1) indicates the peptide sequence HRINIYEII (derived from BMP-2), which is listed in Table 2 as the No. 1 peptide.

Table. 4-2 Candidate peptides for the peptide array screening.

No	Peptide sequences
(1)	HRINIYEII
(2)	TRLLDTRLV
(3)	DVTPAVMRW
(4)	NHGFVVEVT
(5)	VEVTHLEEK
(6)	RHVRISRSL
(7)	SWSQIRPLL
(8)	RPLLVTFGH
(9)	TFGHDGKGH
(10)	LYVDFSDVG
(11)	SDVGWNDWI
(12)	NDWIVAPPG
(13)	AFYCHGECP
(14)	GECPFPLAD
(15)	PLADHLNST
(16)	LNSTNHAIV
(17)	HAIVQTLVN
(18)	TLVNSVNSK
(19)	VNSKIPKAC
(20)	PKACCVPTE
(21)	VPTELSAIS
(22)	SAISMLYLD
(23)	EKVVLKNYQ
(24)	KNYQDMVVE
(25)	MVEEGCGCR
	RGD
	BLANK(no peptide)

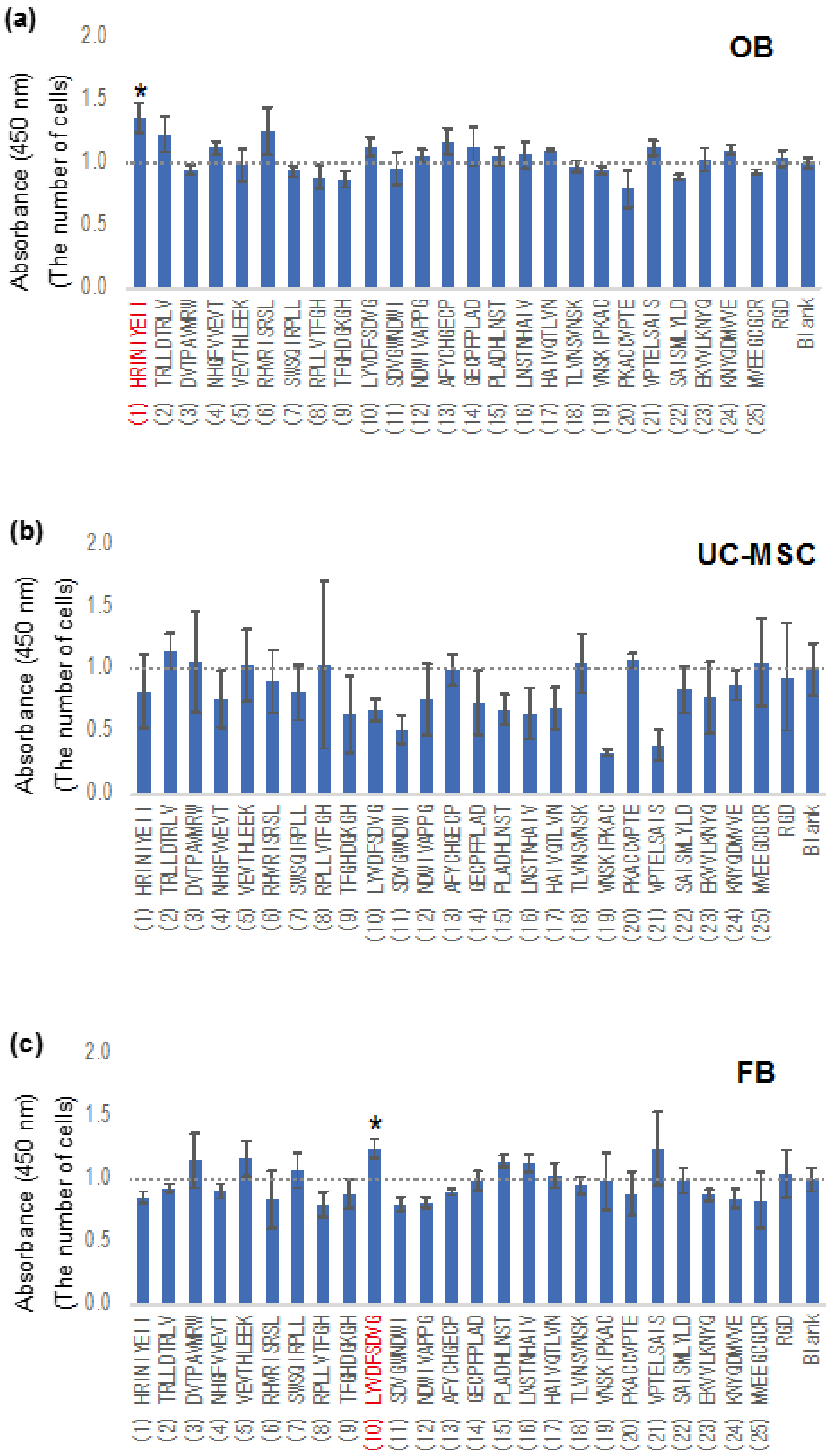


Fig. 4-4 Results of the cell proliferation assay. The number of cells was calculated by the WST-8 assay at Day 7. The value was normalized to Blank (value of no peptide = 1.0). (a) OB; (b) UC-MSC; and (c) FB. All experiments were performed in triplicate. * Denotes statistical significance compared to Blank (no peptide), $p < 0.05$, Student's t-test.

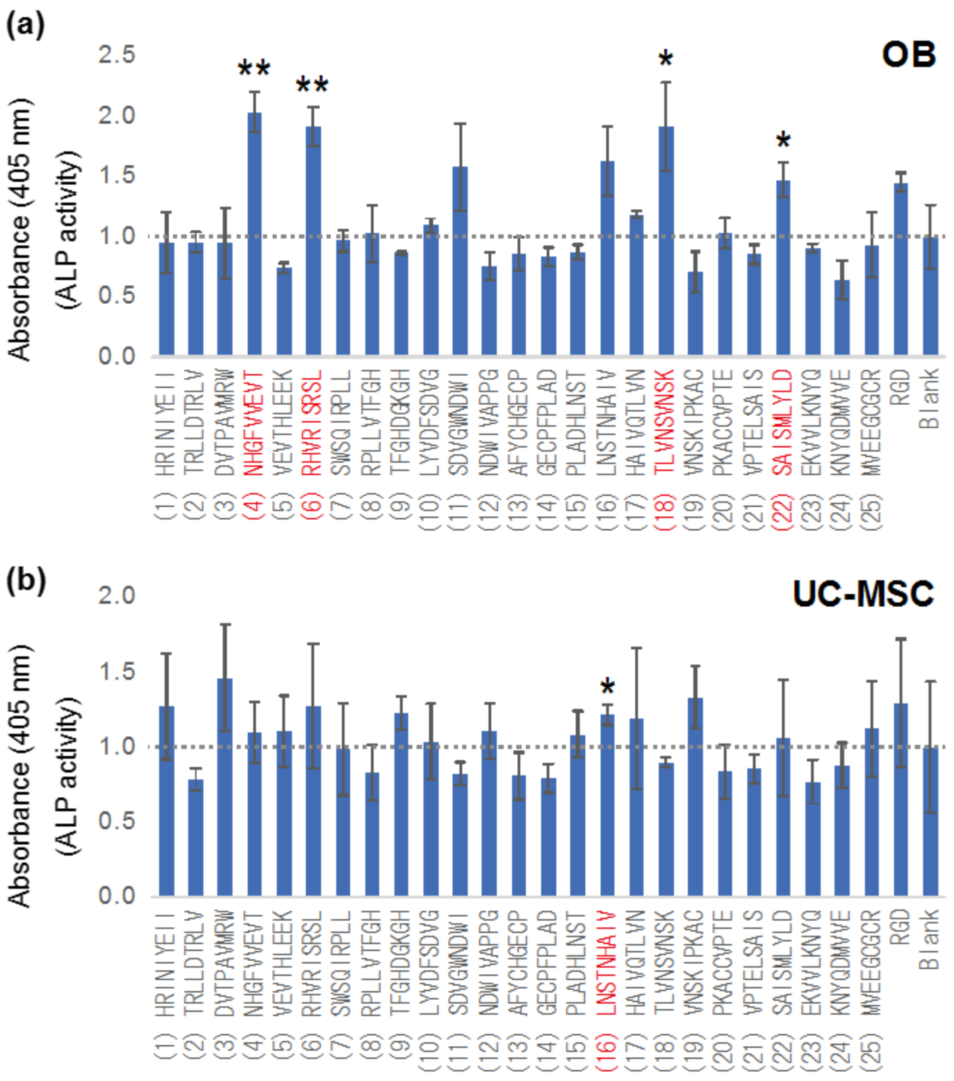


Fig. 4-5 Results of cell activity assay. The osteogenic differentiation of cells was determined by the ALP assay at day 7. The values were normalized to that of the Blank (value of no peptide = 1.0). (a) OBs, (b) UC-MSCs. All experiments were performed in triplicate. *: Denotes statistical significance compared to Blank (no peptide), $p < 0.05$, Student's t-test. **: Denotes statistical significance compared to Blank, $p < 0.01$, Student's t-test.

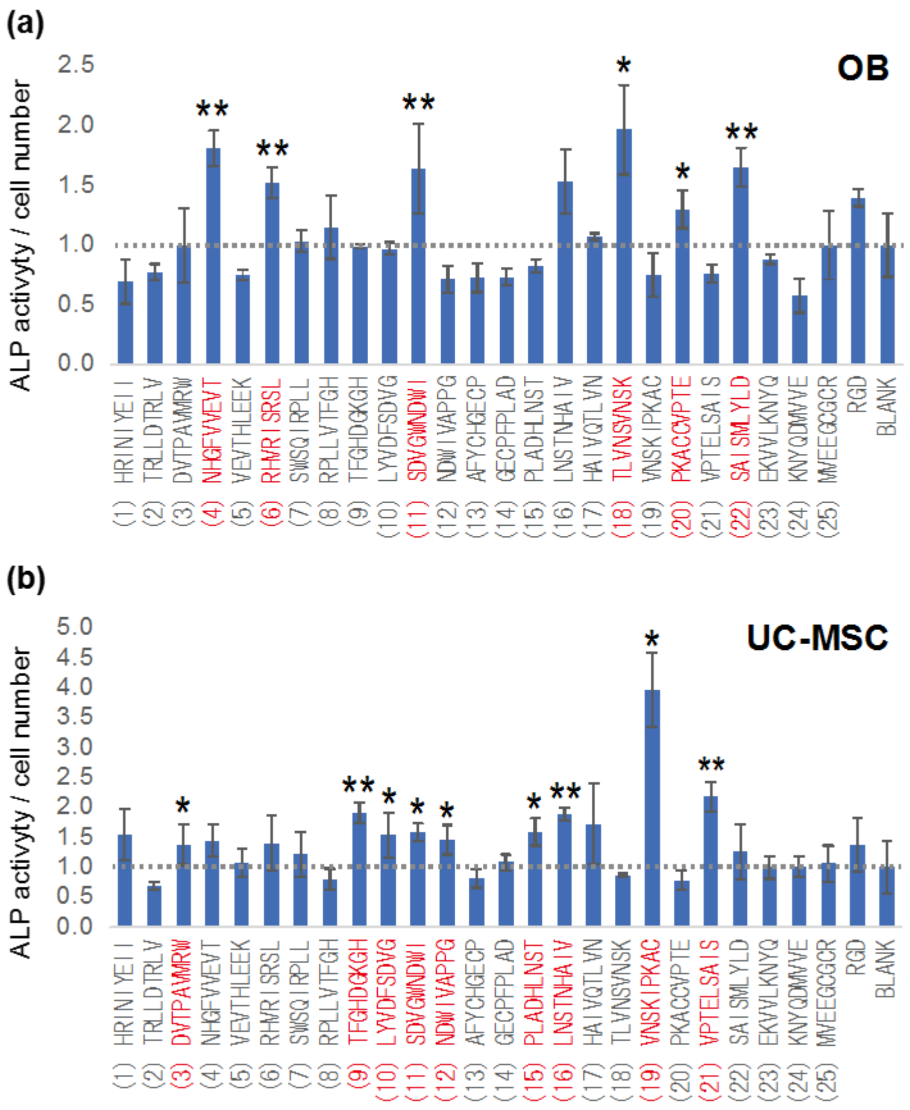


Fig. 4-6 Results of ALP activity per unit cell number. The value was calculated by dividing the ALP activity by cell number and normalized to BLANK (value of no peptide = 1.0). (a) OBs; (b) UC-MSCs. All experiments were performed in triplicate. * Denotes statistical significance compared to BLANK (no peptide), $p < 0.05$, Student's t-test. ** Denotes statistical significance compared to BLANK, $p < 0.01$, Student's t-test.

4.3.5. 細胞選択的骨形成促進ペプチドの決定

細胞選択的に骨形成を促進するペプチドを特性するため、それぞれのペプチドに対して、増殖性及び骨分化能の評価値に基づくスコアを与えた。Fig. 4-7 にその結果を示す。それぞれのスコアの中で、RGD と比較して高いスコアをもつペプチドについてオレンジ色のハイライトがかけられており、骨形成細胞増殖ペプチドとして、11 種類のペプチドが同定された。また、骨分化促進ペプチドとして、10 種類のペプチドが同定された。これらの結果を組み合わせることで、ペプチド番号 4 及び 6、18 の 3 種類のペプチドが細胞選択的骨形成ペプチドとして取得された。これらの結果から、本研究にて構築したペプチドアレイスクリーニングの評価系を通して、BMP の配列由来の骨形成を促進するペプチドが取得された。

No	Sequences	Proliferation			ALP		Proliferation			ALP		Score		
		OB	UC-MSC	FB	OB	UC-MSC	OB	UC-MSC	FB	OB	UC-MSC	Proliferation	ALP	Evaluation
(1)	HRINIYEII						1.4	0.8	0.9	0.7	1.5	1.3	2.2	
(2)	TRLLDTRLV						1.2	1.1	0.9	0.8	0.7	1.4	1.5	
(3)	DVTPAVMRW						0.9	1.1	1.2	1.0	1.4	0.9	2.4	
(4)	NHQFVVEVT						1.1	0.8	0.9	1.8	1.4	1.0	3.3	○
(5)	VEVTHLEEK						1.0	1.0	1.2	0.8	1.1	0.8	1.8	
(6)	RHVRISRSL						1.3	0.9	0.8	1.5	1.4	1.3	2.9	○
(7)	SWSQIRPLL						0.9	0.8	1.1	1.0	1.2	0.7	2.2	
(8)	RPLLVTFGH						0.9	1.0	0.8	1.2	0.8	1.1	2.0	
(9)	TFGHDGKGH						0.9	0.6	0.9	1.0	1.9	0.6	2.9	
(10)	LYVDFSDVG						1.1	0.7	1.2	1.0	1.5	0.6	2.5	
(11)	SDVGWNDWI						1.0	0.5	0.8	1.6	1.6	0.7	3.2	
(12)	NDWIVAPPG						1.1	0.8	0.8	0.7	1.5	1.0	2.2	
(13)	AFYCHGECP						1.2	1.0	0.9	0.7	0.8	1.3	1.5	
(14)	GECPFPLAD						1.1	0.7	1.0	0.7	1.1	0.9	1.8	
(15)	PLADHLNST						1.1	0.7	1.1	0.8	1.6	0.6	2.4	
(16)	LNSTNHAIV						1.1	0.6	1.1	1.5	1.9	0.6	3.4	
(17)	HAIVQTLVN						1.1	0.7	1.0	1.1	1.7	0.8	2.8	
(18)	TLVNSVNSK						1.0	1.0	1.0	2.0	0.9	1.1	2.8	○
(19)	VNSKIPKAC						0.9	0.3	1.0	0.7	4.0	0.3	4.7	
(20)	PKACCVPTE						0.8	1.1	0.9	1.3	0.8	1.0	2.1	
(21)	VPTELSAIS						1.1	0.4	1.2	0.8	2.2	0.3	2.9	
(22)	SAISMLYLD						0.9	0.8	1.0	1.7	1.3	0.7	2.9	
(23)	EKVVLKNYQ						1.0	0.8	0.9	0.9	1.0	0.9	1.9	
(24)	KNYQDMVVE						1.1	0.9	0.8	0.6	1.0	1.1	1.6	
(25)	MVEEGCGCR						0.9	1.1	0.8	1.0	1.1	1.1	2.1	
	RGD						1.0	0.9	1.0	1.4	1.4	0.9	2.8	
	Blank						1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	

Fig. 4-7 Results of ALP activity per unit cell number. The value was calculated by dividing the ALP activity by cell number and normalized to Blank (value of no peptide = 1.0). (a) OBs; (b) UC-MSCs. All experiments were performed in triplicate. * Denotes statistical significance compared to Blank (no peptide), $p < 0.05$, Student's t-test. ** Denotes statistical significance compared to Blank, $p < 0.01$, Student's t-test.

4.4. 考察

本研究では、報告されている PIASPAC の方法を応用して、骨形成促進ペプチドのスクリーニングを行った。まず始めに、8 種類の異種生物種から計 19 種類の BMP を並べ、in silico によるホモロジー解析により、9 残基の候補ペプチドを 25 種類取得した。続いて、取得した 25 種類のペプチドの細胞増殖性及び骨分化能について、PIASPAC 法を用いて検証した結果、3 種類の骨形成促進ペプチドが取得された。Fig. 4-2 (b)にて示されたように、W9 の条件での ALP 活性は BLANK や RGD の条件と比較して 1.3-2.0 倍高かった。この結果と似た傾向が既に Furuya らによって報告されている [28]。Furuya らの報告では、W9 ペプチドの ALP 活性は BLANK 条件と比較して、1.3-3.0 倍高かくなることがわかっている。

スクリーニング候補選抜において、骨形成に関連する配列は、8 種類の異種生物種から取得した 19 種類の BMP 中で相同性を有する領域に保存されているという仮説のもと、ホモロジー解析を行った。こ

の解析から、いくつかのホモロジー領域が観察された (Fig. 4-3)。さらに、これらの領域は BMP の配列のうち C-末端近傍に存在していた。この結果は、既に報告されている、骨形成関連配列である BMP-2 の knuckle ペプチドや BMP-7 の骨形成ペプチドの領域と一致する結果であった [22, 24, 25]。

ペプチドスクリーニングの結果、25 種類の候補ペプチドから 3 種類のペプチドが骨形成促進ペプチドであるとして発見された (Fig. 4-7)。これらの 3 種類の機能性ペプチドを含む機能性ペプチドの位置について検証した結果を Fig. 4-8 に示す。ペプチド番号 18 及び 19 のペプチドのような高機能性ペプチドが knuckle ペプチドや骨形成ペプチドの付近に位置していることが明らかとなった [22, 24, 25]。さらに、ペプチド番号 21 及び 22 のように骨形成細胞選択的ではないと定義されたペプチドも高い骨分化促進を示した。これらの 4 種類のペプチド (ペプチド番号: 18 及び 19、21、22)は、knuckle ペプチドや骨形成ペプチドの領域の付近また重なっていた。それらに加えて、knuckle ペプチドに関連のない新規のペプチド (ペプチド番号: 4 及び 6)も、骨形成機能を有していることがわかった。この結果は、本研究にて用いられたペプチドアレイスクリーニングの手法は骨形成促進ペプチドの探索に有用であることが示唆された。

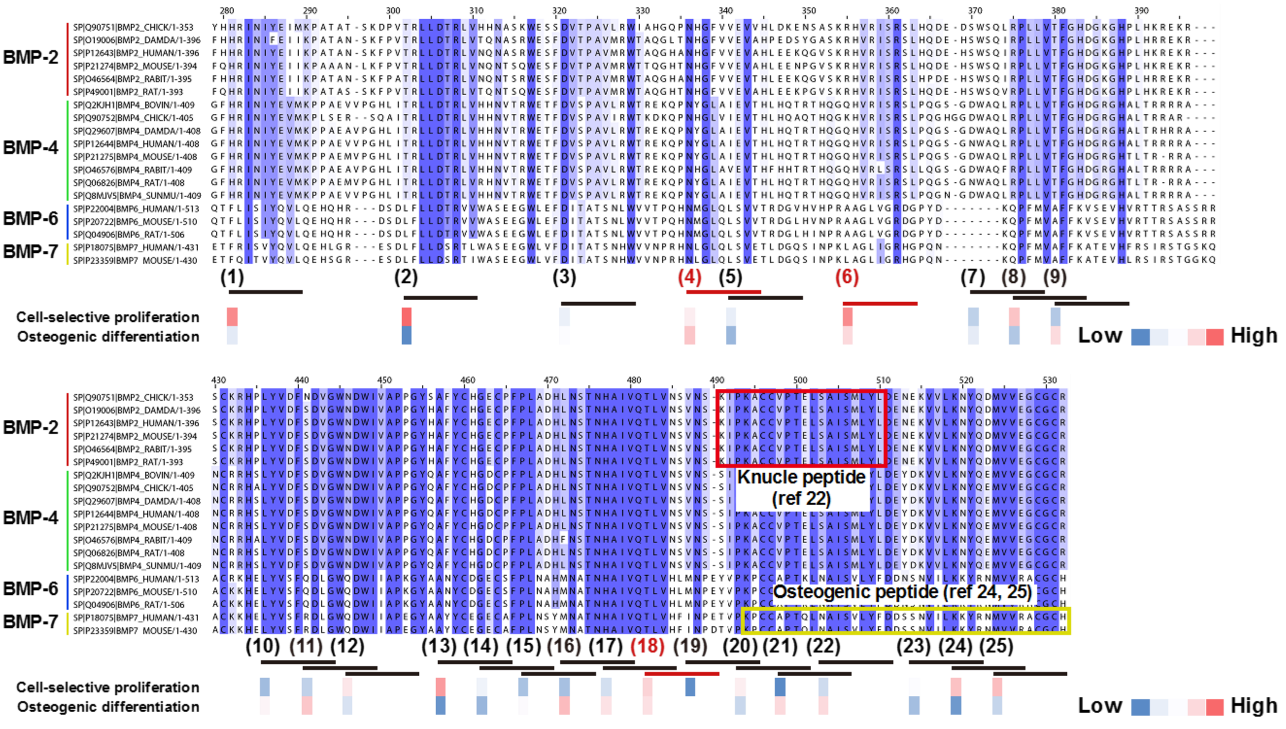


Fig. 4-8 Location of osteogenic-enhancing peptides. The results of osteogenic cell-selective proliferation and osteogenic differentiation peptides and their locations in the BMP sequences are indicated.

本研究の結果から、以下の二つの仮説が示唆されており、(1)BMP のホモロジー部分において、骨形成促進の機能が存在し、(2)9 残基のような短鎖ペプチドでも骨形成促進機能をもつ。結果として、3 種類の骨形成促進機能を有する短鎖ペプチドが BMP のホモロジー配列から同定された。これらの結果は上記の仮説を支持するものであったが、アリザリンレッド染色を用いた in vitro 及び in vivo での成熟骨の形成評価や骨再生に関与する遺伝子 (RUNX2 及びオステカルシン、I 型コラーゲンなど) の mRNA の発現量の解析など、更なる研究が必要である。また、本研究で用いた 25 種類のペプチド以外のペプチドについての検証も必要である。その他、取得した 3 種類の骨形成促進ペプチドの細胞選択的な機能性 (線維化の抑制など)も調査する必要がある。本研究で構築されたペプチドアレイプラットフォームは細胞選択的なペプチドの探索には非常に有効であり、生体材料設計開発を助けるツールであると言える。

4.5. 結論

本研究では、骨形成促進ペプチドの探索のため、新規のペプチドスクリーニングプラットフォームが構築された。まず、骨再生タンパク質として知られる19種類のBMPの配列を比較するために、in silico解析を行った。その結果、25種類の9残基ペプチドホモロジー配列として取得された。取得されたペプチドには既に報告されている骨形成を促進する配列から選ばれたものもあった。さらに、それら25種類のペプチドの細胞選択的な増殖性及び骨分化能について、ペプチドアレイを用いて評価することで、3種類の骨形成促進ペプチドが同定された。

4.6. 参考文献

1 Rachner, T. D.; Khosla, S.; Hofbauer, L. C., Osteoporosis: now and the future. *Lancet* **2011,** *377*, 1276-1287.

2 Dixon, M. J.; Marazita, M. L.; Beaty, T. H.; Murray, J. C., Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews Genetics* **2011,** *12*, 167-178.

3 Iwai, S.; Shimizu, H.; Suzawa, Y.; Akashi, M.; Yura, Y., Hydroxyapatite agarose composite gels as a biochemical material for the repair of alveolar bone defects due to cleft lip and palate. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* **2015,** *27*, 637-644.

4 Alhan, C.; Arıtürk, C.; Senay, S.; Okten, M.; Güllü, A. U.; Kilic, L.; Karabulut, H.; Toraman, F., Use of bone wax is related to increased postoperative sternal dehiscence. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska = Polish Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **2014,** *11*, 385-390.

5 Fu, X.-m.; Oshima, H.; Araki, Y.; Narita, Y.; Mutsuga, M.; Okada, N.; Tsunekawa, T.; Usui, A., A comparative study of two types of sternal pins used for sternal closure: poly-l-lactide sternal pins versus uncalcined hydroxyapatite poly-l-lactide sternal pins. *Journal of Artificial Organs* **2013,** *16*, 458-463.

6 Vestergaard, R. F.; Nielsen, P. H.; Terp, K. A.; Soballe, K.; Andersen, G.; Hasenkam, J. M., Effect of Hemostatic Material on Sternal Healing After Cardiac Surgery. *Annals of Thoracic Surgery* **2014,** *97*, 153-160.

7 Shikinami, Y.; Matsusue, Y.; Nakamura, T., The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly L-lactide (F-u-HA/PLLA). *Biomaterials* **2005,** *26*, 5542-5551.

8 Shafiee, A.; Seyedjafari, E.; Soleimani, M.; Ahmadbeigi, N.; Dinarvand, P.; Ghaemi, N., A

comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnology Letters* **2011,** *33*, 1257-1264.

9 Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Kluter, H.; Bieback, K., Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **2006,** *24*, 1294-1301.

10 Ciavarella, S.; Dammacco, F.; De Matteo, M.; Loverro, G.; Silvestris, F., Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: Role of Regulatory Genes in Their Differentiation to Osteoblasts. *Stem Cells and Development* **2009,** *18*, 1211-1220.

11 Diao, Y. Z.; Ma, Q. J.; Cui, F. Z.; Zhong, Y. F., Human umbilical cord mesenchymal stem cells: Osteogenesis in vivo as seed cells for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2009,** *91A*, 123-131.

12 Zhao, L.; Tang, M.; Weir, M. D.; Detamore, M. S.; Xu, H. H. K., Osteogenic Media and rhBMP-2-Induced Differentiation of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Encapsulated in Alginate Microbeads and Integrated in an Injectable Calcium Phosphate-Chitosan Fibrous Scaffold. *Tissue Engineering Part A* **2011,** *17*, 969-979.

13 Urist, M. R., Bone - formation by autoinduction. *Science* **1965,** *150*, 893-&.

14 Kanakaris, N. K.; Petsatodis, G.; Tagil, M.; Giannoudis, P. V., Is there a role for bone morphogenetic proteins in osteoporotic fractures? *Injury-International Journal of the Care of the Injured* **2009,** *40*, 21-26.

15 Carragee, E. J.; Hurwitz, E. L.; Weiner, B. K., A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine Journal* **2011,** *11*, 471-491.

16 Moussa, M.; Carrel, J. P.; Scherrer, S.; Cattani-Lorente, M.; Wiskott, A.; Durual, S., Medium-Term Function of a 3D Printed TCP/HA Structure as a New Osteoconductive Scaffold for Vertical Bone Augmentation: A Simulation by BMP-2 Activation. *Materials* **2015,** *8*, 2174-2190.

17 Pountos, I.; Georgouli, T.; Henshaw, K.; Bird, H.; Jones, E.; Giannoudis, P. V., The Effect of Bone Morphogenetic Protein-2, Bone Morphogenetic Protein-7, Parathyroid Hormone, and Platelet-Derived Growth Factor on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived From Osteoporotic Bone. *Journal of Orthopaedic Trauma* **2010,** *24*, 552-556.

18 Karfeld-Sulzer, L. S.; Siegenthaler, B.; Ghayor, C.; Weber, F. E., Fibrin Hydrogel Based Bone Substitute Tethered with BMP-2 and BMP-2/7 Heterodimers. *Materials* **2015,** *8*, 977-991.

19 Zhang, X. S.; Linkhart, T. A.; Chen, S. T.; Peng, H. R.; Wergedal, J. E.; Guttierez, G. G.; Sheng, M. H. C.; Lau, K. H. W.; Baylink, D. J., Local ex vivo gene therapy with bone marrow stromal cells expressing human BMP4 promotes endosteal bone formation in mice. *Journal of Gene Medicine* **2004,** *6*, 4-15.

20 Friedman, M. S.; Long, M. W.; Hankenson, K. D., Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *Journal of Cellular Biochemistry* **2006,** *98*, 538-554.

21 Senta, H.; Park, H.; Bergeron, E.; Drevelle, O.; Fong, D.; Leblanc, E.; Cabana, F.; Roux, S.; Grenier, G.; Faucheux, N., Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: Biomedical applications and limitations. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2009,** *20*, 213-222.

22 Saito, A.; Suzuki, Y.; Ogata, S.; Ohtsuki, C.; Tanihara, M., Activation of osteo-progenitor cells by a novel synthetic peptide derived from the bone morphogenetic protein-2 knuckle epitope. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **2003,** *1651*, 60-67.

23 He, X. Z.; Ma, J. Y.; Jabbari, E., Effect of Grafting RGD and BMP-2 Protein-Derived Peptides to a Hydrogel Substrate on Osteogenic Differentiation of Marrow Stromal Cells. *Langmuir* **2008,** *24*, 12508-12516.

24 Kirkwood, K.; Rheude, B.; Kim, Y. J.; White, K.; Dee, K. C., In vitro mineralization studies with substrate-immobilized bone morphogenetic protein peptides. *Journal of Oral Implantology* **2003,** *29*, 57-65.

25 Chen, Y. P.; Webster, T. J., Increased osteoblast functions in the presence of BMP-7 short peptides for nanostructured biomaterial applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2009,** *91A*, 296-304.

26 Lock, J.; Liu, H. N., Nanomaterials enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells similar to a short peptide of BMP-7. *International Journal of Nanomedicine* **2011,** *6*, 2769-2777.

27 Kim, H. K.; Kim, J. H.; Park, D. S.; Park, K. S.; Kang, S. S.; Lee, J. S.; Jeong, M. H.; Yoon, T. R., Osteogenesis induced by a bone forming peptide from the prodomain region of BMP-7.

Biomaterials **2012,** *33*, 7057-7063.

28 Furuya, Y.; Inagaki, A.; Khan, M.; Mori, K.; Penninger, J. M.; Nakamura, M.; Udagawa, N.; Aoki, K.; Ohya, K.; Uchida, K.; Yasuda, H., Stimulation of Bone Formation in Cortical Bone of Mice Treated with a Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand (RANKL)-binding Peptide That Possesses Osteoclastogenesis Inhibitory Activity. *The Journal of Biological Chemistry* **2013,** *288*, 5562-5571.

29 Bab, I.; Gazit, D.; Chorev, M.; Muhlrad, A.; Shteyer, A.; Greenberg, Z.; Namdar, M.; Kahn, A., Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP) - a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. *EMBO Journal* **1992,** *11*, 1867-1873.

30 Spreafico, A.; Frediani, B.; Capperucci, C.; Leonini, A.; Gambera, D.; Ferrata, P.; Rosini, S.; Di Stefano, A.; Galeazzi, M.; Marcolongo, R., Osteogenic growth peptide effects on primary human osteoblast cultures: Potential relevance for the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of Cellular Biochemistry* **2006,** *98*, 1007-1020.

31 Zhao, Z. Y.; Shao, L.; Zhao, H. M.; Zhong, Z. H.; Liu, J. Y.; Hao, C. G., Osteogenic Growth Peptide Accelerates Bone Healing During Distraction Osteogenesis in Rabbit Tibia. *Journal of International Medical Research* **2011,** *39*, 456-463.

32 Wynn, T. A.; Ramalingam, T. R., Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine* **2012,** *18*, 1028-1040.

33 Rieder, F.; Fiocchi, C., Intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease - Current knowledge and future perspectives. *Journal of Crohns & Colitis* **2008,** *2*, 279-290.

34 Lin, W. R.; Brittan, M.; Alison, M. R., The role of bone marrow-derived cells in fibrosis. *Cells Tissues Organs* **2008,** *188*, 178-188.

35 Prockop, D. J., Inflammation, fibrosis, and modulation of the process by mesenchymal stem/stromal cells. *Matrix Biology* **2016,** *51*, 7-13.

36 Frank, R., Spot-synthesis - an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **1992,** *48*, 9217-9232.

37 Frank, R., The SPOT synthesis technique - Synthetic peptide arrays on membrane supports - principles and applications. *Journal of Immunological Methods* **2002,** *267*, 13-26.

38 Kato, R.; Kaga, C.; Kunimatsu, M.; Kobayashi, T.; Honda, H., Peptide array-based interaction assay of solid-bound peptides and anchorage-dependant cells and its effectiveness in cell-adhesive peptide design. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2006,** *101*, 485-495.

39 Kato, R.; Kaga, C.; Kanie, K.; Kunimatsu, M.; Okochi, M.; Honda, H., Peptide Array-Based Peptide-Cell Interaction Analysis. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2011,** *8*, 171-177.

40 Kanie, K.; Kato, R.; Zhao, Y. Z.; Narita, Y.; Okochi, M.; Honda, H., Amino acid sequence preferences to control cell-specific organization of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. *Journal of Peptide Science* **2011,** *17*, 479-486.

41 Kanie, K.; Narita, Y.; Zhao, Y. Z.; Kuwabara, F.; Satake, M.; Honda, S.; Kaneko, H.; Yoshioka, T.; Okochi, M.; Honda, H.; Kato, R., Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells. *Biotechnology and Bioengineering* **2012,** *109*, 1808-1816.

第 5 章

ペプチドリガンドと高分子材料の 組み合わせによる細胞の選択的接着制御

5.1. 緒言

5.1.1. 循環器系医療機器表面における生体機能性向上のためのアプローチ

人工血管のような長期間の移植が予想される医療機器における血栓形成などの不具合は患者の死に直結するため、医療機器表面には高い細胞親和性と抗血栓性が求められる [1, 2]。この安定した二つ機能性の実現を目指して、これまでに様々な医療機器表面の機能化アプローチが取り組まれてきた。
医療用高分子材料において、細胞接着性などの生体機能性を改善するためのアプローチの一つとして、細胞外マトリックス (ECM)タンパク質 [3-6] や抗体 [7]、ペプチド [8-13] などの生体分子を固定化する手法がある。細胞接着は移植により損傷した組織を再生するために重要なステップである。例えば、人工血管の内皮化は材料表面への内皮細胞 (EC)の接着性を高めることで促進される。そして、早期の内皮化は、血栓形成や新生内膜の過形成を防ぐことが報告されている [14-16]。したがって、早期の内皮細胞の接着により再狭窄のリスクが低減し、人工血管やステントの移植後の機能性維持が可能となる。
高分子材料表面への細胞の接着性の向上のために、しばしばペプチドが用いられる。細胞膜タンパク質であるインテグリンと相互作用する配列として知られる RGD (Arg-Gly-Asp)は、最も有名な細胞接着性ペプチドリガンドである [17]。この他にも、様々な ECM タンパク質由来の細胞接着性ペプチドが報告されている。Kanie らは、短鎖ペプチド (3 残基から 7 残基)が単純な細胞の接着性だけでなく、細胞選択的に接着性を向上させられることを報告している [18, 19]。具体的には、ECM タンパク質由来の 3 残基ペプチドである CAG (Cys-Ala-Gly)が EC のみを選択的に接着促進させ、SMC の接着を抑制するような機能を有することや、血小板の接着を抑制することが分かっている [20, 21]。さらに、この CAG を導入した PCL 製メッシュ材料から作製した人工血管を in vivo モデルに移植した際には、人工血管内腔において早期の内皮化が促進されることも報告されている [22]。また、Kanie らは細胞接着性ペプチドのスクリーニング評価系を用いた検証から、細胞接着性ペプチドの作用様式は二つのクラスターに分けられると提唱している。一つは、RGDS や YIGSR などのリガンド - 受容体間の厳密な相互作用であり、もう一つは、ペプチドリガンドの有する物理化学的な性質に大きく依存する相互作用である。後者には配列の多様性が認められる。これは、リガンド - 受容体による細胞とペプチド間での相互作用のような配列自身だけでなく、ペプチドリガンドの物理化学的な性質も同様に細胞選択的な接着の制御が可能であることを示唆している。その他にも、3 残基及び 7 残基の Ile 含有ペプチドは EC の接着を選択的に促進し、SMC や FB の接着を抑制すると報告されている [19]。

5.1.2. 細胞接着性リガンドとしての短鎖ペプチドの生体機能性と医療機器への応用

短鎖ペプチドは、抗体や ECM 由来のサイズの大きなたんぱく質に比べて合成や精製が容易であるため、生産コストや製品純度の点において大きなメリットがある。しかしながら、ペプチドリガンドは、固定化反応における化学的な副反応や固定化による構造及び配向性の変化、固定密度などの固定先となる高分子材料との組み合わせの相性による影響によってそれ自身のもつ効果が減弱してしまうことがしばしば報告されている [23]。したがって、ペプチドリガンドを医療機器表面に応用する際には、その組み合わせの相性について十分に考慮する必要があり、リガンドの固定化状態を精密に設計するための熟練した技術も必要とされる。

5.1.3. 高分子材料の物性と細胞接着性の関係

高分子材料自身の性質も細胞の接着性に影響を及ぼすことが分かっている。高分子材料の濡れ性 [24] や弾性率 [25]、トポロジー [26] は生体との親和性に重要な因子であり、Ebara らは、RGDS を固定化した poly(*N*-

isopropylacrylamide) (polyNIPAAm)基板において、疎水度の程度に依存して細胞の接着挙動が変化することを報告している [27-29]。これらの知見から、筆者らは、生体分子とその固定先となる高分子材料の性質との組み合わせの相性 (組み合わせ効果)があり、この組み合わせ効果によって総合的な機能性が減弱もしくは増強される、という仮説を立てた。そのような、組み合わせ効果について検証するために、筆者らは、温度に応答して材料の性質をスイッチさせられる polyNIPAAm を応用することで、同一表面上で異なった性質の材料表面と生体分子との組み合わせの効果を検証できる細胞アッセイプラットフォームを構築した (Fig. 5-1)。本プラットフォームを細胞培養温度付近 (20-37°C)で温度を変化させることにより、細胞の接着性に対する、濡れ性の性質と生体分子との組み合わせ効果についての検証が可能となる。

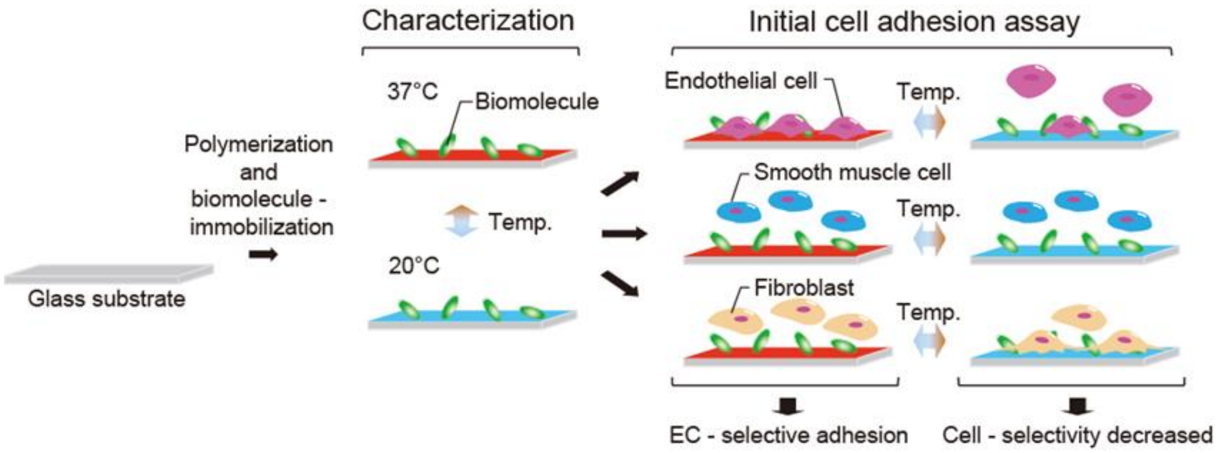


Fig. 5-1 Schematic image of evaluating cell adhesion performance as a combination effect of biomolecules and its immobilized polymer property. poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm) surface was fabricated to create the cell assay platform. Due to the thermo-responsive polyNIPAAm effect, the cell adhesion performance of the same immobilized biomolecules can be tested; the polymer properties can be compared by changing the temperature. Cell-selective adhesion was compared among three types of cells (ECs, SMCs, and FBs), which control the regeneration process of vascular tissue engineering.

5.1.4. 本研究のストラテジー及び目的

本章では、polyNIPAAm をベースとする温度応答性高分子表面を細胞アッセイプラットフォームをとして用い、細胞の接着性を評価した。具体的には、表面開始原子移動ラジカル重合 (表面開始 ATRP)により、NIPAAm 誘導体である 2-(carbonyl)isopropylacrylamide (CIPAAm)と NIPAAm の共重合体からなる高分子膜表面をガラス基板上にて調製し、CIPAAm ユニットの側鎖にあるカルボキシ基に生体分子を縮合反応にて固定化することで、細胞アッセイプラットフォームを構築した。さらに、そのプラットフォームを用いて血管系の EC、FB、SMC の三種類の細胞における生体分子と高分子材料の接着性の傾向を検証することで、細胞の選択的な接着性を評価した (Fig. 5-1)。結果として、高分子材料の濡れ性違いによって、組み合わせた生体分子の細胞接着性に対する効果が変化することがわかった。したがって、この結果は細胞選択的な接着性リガンドを用いた高分子製医療機器を設計する際に、最適な組み合わせを選択することが重要であることを示唆している。

5.2. 実験

5.2.1. 実験材料

マルチウェル化されたガラス基板 (TF1205)及び、ガラス基板 (F1205)は、松浪硝子工業株式会社(大阪、日本)から購入した。(Chloromethyl)phenylethyl-trimethoxysilane は Gelest, Inc. (PA, USA)から購入した。Methanol はキシダ化学株式会社 (大阪、日本)から購入した。NIPAAm は興人 (東京、日本)から購入した。n-Hexane 及び $Cu(II)Cl_2$、methanesulfonic acid、PBS は、和光純薬工業株式会社 (大阪、日本)から購入した。2-Propanol 及び Cu(I)Cl、dichloromethane は、関東化学株式会社 (東京、日本)から購入した。Me_6TREN は株式会社三菱ケミカルホールディングス (東京、日本)から頂いたものを減圧蒸留した。4-Ethylbenzyl chloride (EBC)は、東京化成工業株式会社 (東京、日本)から購入した。Gly-Arg (mono-Arg)、Gly-Ile (mono-Ile)、Gly-Arg-Arg-Arg (tri-Arg) 及び、Gly-Ile-Ile-Ile (tri-Ile)のペプチド(いずれも純度 90%以上)は、BIOMATIK Corporation (ON、カナダ)から受託合成品として購入した。RGDS のペプチドは、株式会社ペプチド研究所 (大阪、日本)から購入した。1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)及び Calcein-AM は、同仁化学研究所株式会社 (熊本、日本)から購入した。

5.2.2. 組み合わせ検証プラットフォームの作製

重合開始基が修飾された基板表面での poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)の合成は、表面開始 ATRP 法にて行った [30] (Fig. 5-2)。本章にて用いた基板は、マルチウェル化されたガラス基板及び 1 cm×2.5 cm サイズのガラス基板である。これらの洗浄は、ウシオ電機製エキシマ光照射ユニット H0017 の真空紫外光 (Vacuum Ultra Violet: VUV)を用いたエキシマ VUV/O_3 処理にて行った。VUV 光源には Xe ガスを封入したエキシマランプ (中心波長: 172 nm、放射照度: 10 mW/cm^2)を用い、圧力を 1.3×10^3 Pa、光照射及び O_3 供給時間を 10 分として処理した。

基板表面への重合開始基の導入は、vapor 法によるシランカップリング反応にて行った。以下に手順を記す。まず、ガラス染色バットの底面にろ紙を敷き、スライドガラスを介して洗浄直後のガラス基板を設置した。次に、ATRP の開始剤となる(chloromethyl)phenylethyl-trimethoxysilane を滴下し、染色バットに蓋をした。90°C のインキュベータ内で染色バットを 3 時間静置した後に、110°C で 1 時間静置して

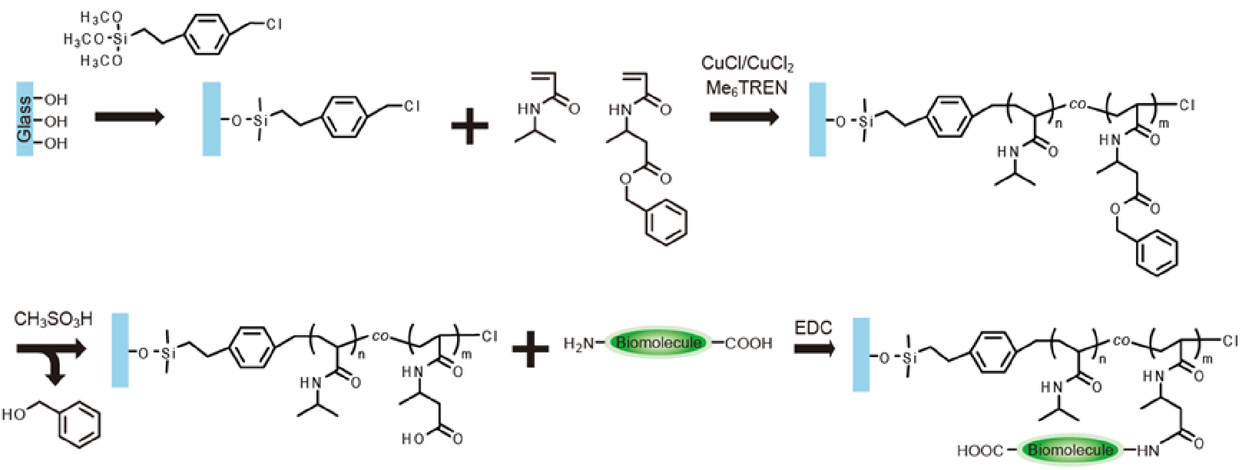


Fig. 5-2 Fabrication scheme for the poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm) graft and biomolecule immobilization.

シランカップリング反応を進行させた。反応後、methanol を基板表面にかけて結合していない

(chloromethyl)phenylethyl-trimethoxysilane を洗浄した。

NIPAAm は、購入後に n-hexane に 40°C で溶解させてろ過した後、ろ液を室温静置して再結晶を行い、回収し減圧乾燥したものを使用した。また、2-(benzyloxycarbonyl)isopropylacrylamide (CIPAAmBz)は報告されている手法にて合成した [31]。以降の操作は N_2 充填されたグローブボックス内で行った。NIPAAm 及び CIPAAmBz をそれぞれ 2 mol/L、0.02 mol/L の濃度となるように 80 mL の減圧蒸留された 2-propanol 中に溶解し、Cu(I)Cl を 72 mg、Cu(II)Cl_2 を 10 mg 加えて攪拌した。攪拌後、先ほどの染色バット内に加えた。最後に、Me_6TREN を 226.6 μL、EBC を 11.8 μL 加え、室温で 17 時間重合反応させた。17 時間後に反応容器をグローブボックスから出して、反応系に空気 (O_2)を加えることで重合反応を停止させた。反応終了後の基板は 2-propanol と methanol を基板表面にかけて洗浄し、減圧乾燥させた。また、反応溶液は分画分子量が 50 kDa の RC 透析チューブ ポア 6 にて水溶媒で透析した。その後、凍結乾燥にてフリーの poly(NIPAAm-*co*-CIPAAmBz)を得た。得られたフリーの poly(NIPAAm-*co*-CIPAAmBz)の分子量を評価するため、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)にて調査した。具体的には、東ソー株式会社(東京、日本)の TOSOH TSK-GEL α-2500 を用いて測定した。結果、合成したフリーの poly(NIPAAm-*co*-CIPAAmBz)の数平均分子量 (M_n)が 6.95×10^3 g/mol であることがわかった (Table 1)。

CIPAAmBz のベンジル基の脱保護には methanesulfonic acid を用いた。まず、dichloromethane 中に methanesulfonic acid を 15 vol%となるように溶解させ、poly(NIPAAm-*co*-CIPAAmBz)の高分子膜がグラフトされたガラス基板を浸漬させ、室温で 17 時間静置した。その後、基板は dichloromethane 及び methanol を基板表面にかけて洗浄し、減圧乾燥させた。

生体分子 (mono-Arg、mono-Ile、tri-Arg、tri-Ile 及び RGDS)は、EDC を用いて poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)の高分子膜中のカルボキシ基に導入させた。各ペプチドと EDC を純水に溶かした反応溶液 (各 2 mmol/L)をガラス基板のそれぞれのウェルに 30 μL 滴下し、湿潤条件かつ室温にて 17 時間静置させた。17 時間後、ガラス基板は純水をかけて洗浄し、減圧条件で乾燥させた。

5.2.3. 組み合わせプラットフォームのキャラクタリゼーション

調製した組み合わせプラットフォームのキャラクタリゼーションとして、X 線反射率測定 (XRR)及び水接触角測定を行った。まず、XRR は株式会社リガク (東京、日本)の薄膜構造評価専用 X 線回折装置にて評価した。Cu Kα線 (λ = 0.154 nm)を X 線源に用い、三つのスリット(1st slit: 1 mm×10 mm、2nd slit: 5 mm×0.05 mm、RS: 10 mm×0.1 mm)にて集光した。RS のみ試料と検出器の間に設置し、反射 X 線はシンチレーションカウンタにて検出した。入射 X 線と試料とのアライメントを調整した後、2θ = 0.3°から 3°までの範囲を 0.2°/min の速度にて掃引して反射率データを得た。その後、X 線反射率解析ソフトウェアを用いたフィッティング解析にて、測定データからポリマー膜の膜厚及び密度を算出した。また、グラフトされた高分子鎖の密度 (σ)は、以下の式 (5-1)を用いて算出された [30]。

$$\sigma = h\rho N_{\mathrm{A}} / M_n \qquad (5\text{-}1)$$

式 (5-1)中の h、ρ、N_{A} 及び M_n はそれぞれ、高分子膜の厚さ (nm)、高分子膜の密度 (g/cm^3)、アボガドロ定数 (個/mol)及び数平均分子量 (g/mol)であり、h 及びρは XRR、M_n は GPC により測定したものを用いた。

続いて、組み合わせプラットフォームの水接触角測定は、協和界面科学株式会社 (埼玉、日本)の接触角計を用いて行った。細胞接着評価時の環境とより近い条件で行うために、PBS 中において基板表面に気泡を接触させ、基板に対する気泡の接触角を測定した [32]。その後、測定した気泡の接触角の値を 180°から減ずることにより、各基板の水接触角と定義した。PBS の温度は、株式会社ラウダ (神奈川、日本)の低温循環恒温槽を用いて制御し、20°C 及び 37°C に調節した。同一サンプルの場所違いで 4 点ほど接

触角を測定し、平均値をそのサンプルの水接触角とした。

5.2.4. 細胞培養

実験に用いた、Normal human umbilical vein ECs、Human aorta SMCs 及び Normal human adult dermal FBs は全て Kurabo (大阪、日本)から購入した。 各細胞は、それぞれ HuMedia-EG2 (Kurabo)、Complete Medium Kit with Serum with CultureBoost (Cell Systems: WA、USA)及び 10%の fetal bovine serum (FBS)血清 (NICHIREI BIOSCIENCES: 東京、日本)及び 1%の penicillin streptomycin (和光純薬工業株式会社)が含有された Dulbecco’s modified Eagles’ medium (DMEM) (和光純薬工業株式会社) を用いて、37°C, 5%CO_2 のインキュベーターで培養し、1~2 日おきの培地交換及び 2~5 日おきの継代を行った。接着評価には、全て 5 継代目の細胞を用いた。

5.2.5. 細胞接着評価

細胞の接着評価は、すでに報告されている手法を参考に行った [30]。細胞はそれぞれ、最終継代時に Calcein-AM にて染色された後、1.56 × 10^4 cells/cm^2 の播種密度にて組み合わせプラットフォーム上に液滴にて播種された。組み合わせプラットフォームの poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)の親水/疎水性の性質を変化させるため、まず細胞が播種されたプラットフォームを 37°C にて 1 時間培養した後、オリンパス株式会社 (東京、日本)の蛍光顕微鏡及び Molecular Devices LLC. (CA、USA)のソフトウェア (MetaMorph) で細胞画像の撮影 (n = 6)を行った。撮影後、迅速に 20°C の条件下で再度 1 時間の培養を行った。1 時間後、同様に細胞画像の撮影を行った。接着細胞数のカウントには、MetaMorph を用いた。

5.2.6. 統計解析

水接触角の結果及び細胞接着評価の結果は、37°C と 20°C における有意差検定は Student の t 検定にて評価した。また、同じ温度条件におけるサンプル間の有意差検定は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) にて行った。

5.3. 結果

5.3.1. 組み合わせプラットフォームのキャラクタリゼーション

生体分子と高分子の性質との組み合わせによる効果を検証するため、グラフト化 poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)からなる評価プラットフォームを構築した。そして、poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)の温度応答性の性質を利用することで、同一表面において同じ生体分子に対して異なる高分子の性質と組み合わせ効果の検証が可能となる。

組み合わせプラットフォームのキャラクタリゼーションとして、まず XRR 測定により組み合わせプラットフォーム上の高分子膜の厚さ及び密度を算出した。結果、膜厚は 3.66 ± 0.42 nm、密度は 0.95 ± 0.02 g/cm^3 であることが分かった (Table 5-1)。グラフトされた高分子鎖のグラフト密度は、式 (5-1)より 0.30 chains/nm^2 と算出された。この結果は、報告されている結果を再現していた [30, 33]。また、合成した poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)の下限臨界溶液温度 (LCST)を調査したところ、20°C から 37°C の間において

Table. 5-1 Characterization of the grafted polymer.

Thickness (nm)[a]	Density (g / cm^3)[a]	$M_n \times 10^{-3}$ [b]	M_w / M_n [b]	Graft density (chains / nm^2)[c]
3.66	0.95	6.95	1.21	0.30

a Determined by XRR with Cu Kα radiation (0.154 nm) under dry conditions.

b Determined by GPC (standard: PEG; eluent: DMF with 10 mmol/L LiBr; flow rate: 0.6 ml/min; temperature: 40°C).

c Calculated using the thickness, density, and number-average molecular weight.

LCST が確認された (Fig. 5-3)。したがって、グラフトされた poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)の高分子膜も 20°C

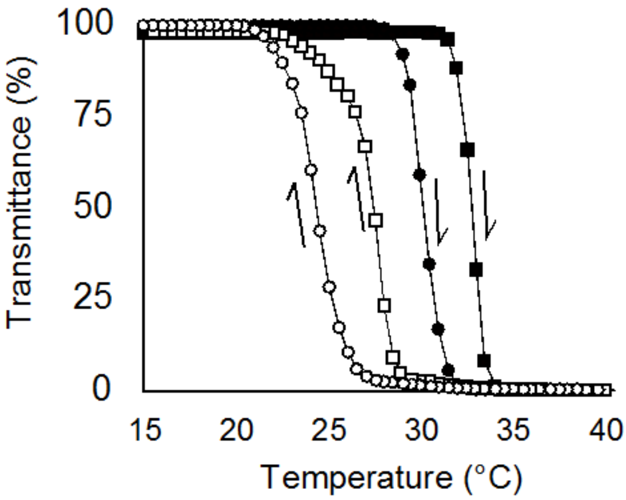


Fig. 5-3 Temperature-dependent transmittance changes for free poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm) in a PBS buffer. (open squares) poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm) from 40°C to 15°C, (open circles) poly(NIPAAm-*co*-CIPAAmBz) from 40°C to 15°C, (closed squares) poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm) from 15°C to 40°C, and (closed circles) poly(NIPAAm-*co*-CIPAAmBz) from 15°C to 40°C. Lower critical solution temperature (LCST) was measured by the temperature-dependent transmittance changes of the free polymer. Transmittance of the polymer in PBS at 500 nm was continuously monitored at a heating and a cooling rate of 0.5°C/min using a UV-visible spectrometer (V-550, JASCO International Co, Ltd, Tokyo, Japan).

と 37°C の温度変化による刺激によって親水/疎水を変化しうることが示唆された。

表面の性質を示すパラメータとして、プラットフォーム表面の水接触角を測定した結果、20°C では 40.0° ± 0.8°、37°C では 44.6° ± 1.7°であることが分かった (Fig. 5-4)。各サンプル間における 20°C 及び

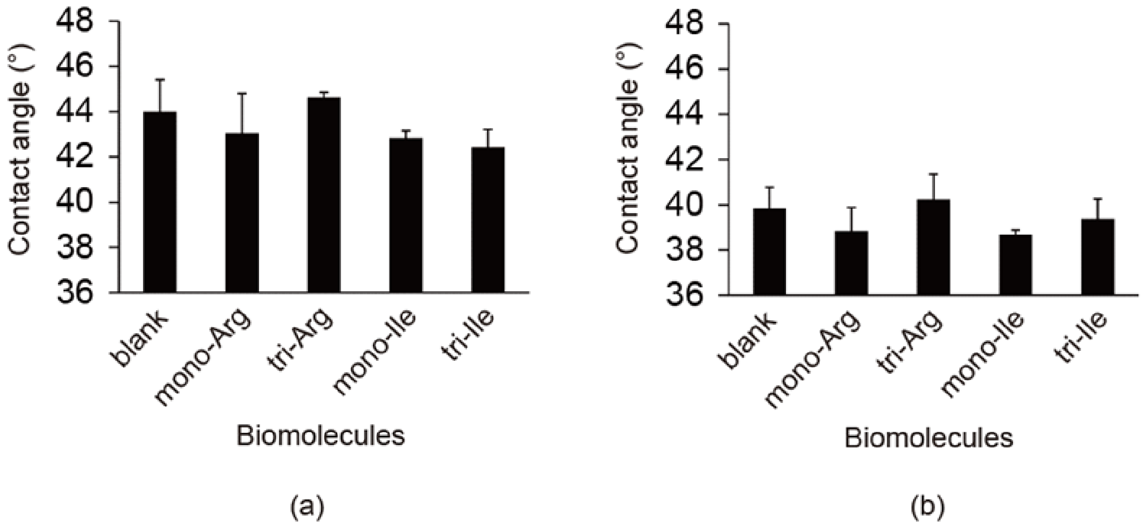


Fig. 5-4 Contact angles (CAs) on the cell assay platform in this study measured at (a) 37°C and (b) 20°C.

37°C での水接触角の変化については Student の t 検定による有意差が確認されたが (20 °C vs. 37 °C: blank (without biomolecules) ($p < 0.05$)及び mono-Arg ($p < 0.05$)、mono-Ile ($p < 0.01$)、tri-Arg ($p < 0.001$)、tri-Ile ($p < 0.05$))、同一温度条件における固定された生体分子の違いに対する one-way ANOVA による有意差は確認されなかった ($p > 0.1$: 37°C、$p > 0.1$: 20°C)。したがって、合成した poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)のは固定化された生体分子に依存せず温度に応答して表面の性質を十分に変化させられることが分かった。

5.3.2. 細胞接着評価

構築した組み合わせプラットフォーム上を用いて、20°C 及び 37°C それぞれの条件において細胞接着評価を行った。EC、FB、SMC の接着評価時に撮影した蛍光画像の様子をさらに、画像中の細胞数をカウントしたものを Fig. 5-5 に示す。まず、生体分子を固定化していない条件では、疎水的な性質の条件で全ての細胞の接着が促進された。特に、FB は親水/疎水性の変化に対する応答が EC、SMC に比較して小さかった。この結果は、親水/疎水性どちらの表面においても FB が強い接着していることを示している。続いて、RGDS ペプチドの条件では、いずれの細胞においても疎水的(37°C)、親水的(20°C)の両条件で接着の促進が確認された (20°C vs. 37°C: RGDS (ECs: $p > 0.05$ 及び FBs: $p > 0.05$、SMCs: $p > 0.05$))。さらに、mono-Arg 及び tri-Arg が固定された表面では、三細胞に対してどちらの温度条件においても同様の傾向が確認された。また、細胞ごとに注目すると、SMC では、今回調製した基板のいずれの条件においても接着が抑制される傾向にあったが、FB は mono-Arg 及び tri-Arg に対して接着しやすい傾向にあった。EC は、mono-Arg 及び tri-Arg に対しては、20°C の親水的な条件において接着が抑制されていたものの、37°C の疎水的な条件ではその接着性が回復している様子が確認された。この傾向は、mono-Ile に対する FB の接着評価の結果でも同様に確認された。一方で、tri-Ile 固定化表面では、EC の接着の様子が顕著に変化していた (20°C vs. 37°C ($p < 0.03$))。高分子膜表面がより疎水的な条件では、親水的な条件と比較して EC の接着は 2.5 倍以上に増加していた。各細胞において、ほとんどの細胞接着量の様子は RGDS の条件よりも低かったが、EC の tri-Ile に対する接着性は RGDS よりも大きかった。

RGDS は、どの細胞に対しても顕著な接着促進能を示したが、その他の生体分子では三細胞間での接着選択性の傾向が確認された (Fig. 5-5)。生体分子なしの条件 (blank)では、特に 20°C の条件で FB が選択的に接着し、EC 及び SMC では接着が抑制されていた (ECs vs. FBs vs. SMCs ($p < 0.01$))。また、mono-

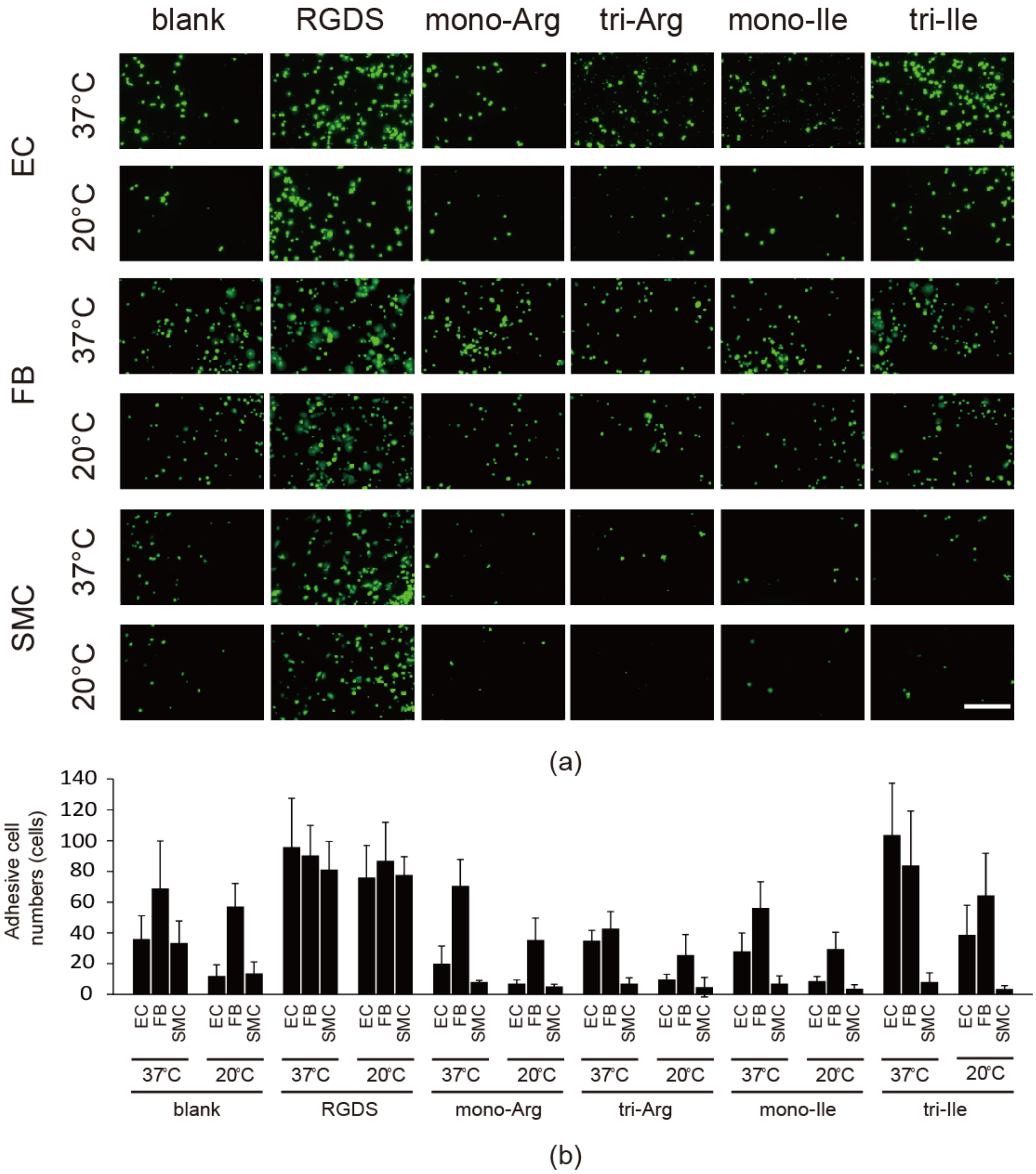


Fig. 5-5 Cell adhesion performances on the biomolecule–immobilized cell assay platform. (a) Fluorescent image of viable cells in the cell adhesion assay (Scale bar, 30 μm). (b) Quantitative results of (a) images (n=6). Blank (without biomolecules) and RGDS (positive control).

Arg では、20°C で FB の選択性が減弱されているが、37°C では顕著に FB 選択性が促進されていた。この結果は、疎水的な高分子表面の性質との組み合わせの効果であることを示している。一方で、tri-Arg 固定化表面では、20°C の親水的な条件において FB 選択性が確認されていたが、37°C の条件では、FB の接着性が EC と同等となる程までその選択性が大きく減弱されていた（FBs vs. ECs ($p > 0.05$))。これとは逆の傾向で、tri-Arg 固定化表面では、疎水的な条件において SMC の接着量に対して 14.6 倍の接着量を示すほど EC 選択的な接着が確認されたが、親水的な条件では、EC の接着性及び EC 選択性が減弱していた。これらの結果から、生体分子と固定先である高分子の性質との間において効果的な組み合わせの効果があることが示唆された。

5.4. 考察

生体分子の固定化アプローチは、医療応用される高分子材料表面上に効果的に生体機能を付与する手法の一つである。固定化される生体分子と固定先となる高分子材料のいずれも細胞の接着に大きく影響を及ぼすため、本章では、特に細胞接着に対してそれらを組み合わせた際の効果について検証した。表面の性質を変化させられる高分子膜に固定された生体分子の細胞接着能を評価するため、温度応答性高分子である poly(NIPAAm)をベースとする組み合わせプラットフォームを構築した。高分子材料の性質を示す指標として細胞接着との関係性が報告されている水接触角を用いた [24]。

水接触角は、生体材料の濡れ性を示す指標であるが、ある濡れ性の領域で細胞の接着が促進されることが報告されている [24]。そして、市販されている培養用基材では、その表面の濡れ性がその領域となるように制御されている。実際に、市販されている数種類の組織培養用基材 (6-well plate)を用いて、気相状態における水接触角を測定したところ、49.3°から 93.8°の範囲にあることがわかった (plate 1 (Greiner bio-one、Cellcoat Collagen Type 1、cat. 657950、lot 13-29-02-89): 47.0±1.0°及び、plate 2 (BD Biosciences、BD PureCoat Amine 6-well plate、cat. 4721、lot 3053352): 49.3±2.4°、plate 3 (Corning、Corning CellBIND Surface Polystyrene Sterile、cat. 3335、lot 22814004): 53.0±2.5°、plate 4 (Greiner bio-one、6 Well Advanced TC Plate、cat. 657960、lot E14113SB): 70.5±2.6°、plate 5 (Falcon、Multiwell PRIMARIA 6-well、cat. 353846、lot 3269538): 83.9±1.7°、plate 6 (Falcon、Multiwell 6-well、cat. 353046、lot 1272703): 85.9±5.6°、plate 7 (Greiner bio-one、6 Well Cell Culture Plate sterile with lid、cat. 657160、lot E9070HI): 88.8±2.2°、plate 8 (Thermo Fisher Scientific、Nunclon Delta Surface、cat. 140675、lot 7117287): 93.8±0.9°)。全ての製品において、良好な細胞培養の性能が観察されており、水接触角と細胞接着能の間の単純な相関性は確認されなかった。実際に、細胞接着能と高分子材料の表面特性の間のルールを説明できるデータは限定的なものである。言い換えれば、異なる水接触角を示す市販の高分子材料のいくつかの種類においても、細胞を培養することが出来ることから、固定化された生体分子の予想される性能を評価するために、最適な培養用基材を選択することは非常に難しいことがわかる。これらのことより、スクリーニングによって取得された生体分子を固体化した際の機能を評価するためには、基材と固定化条件の様々な組み合わせを評価する必要がある。

本章では、アミノ酸やペプチドのような生体分子を固定化する際に、その生体分子の機能が、固定先となる高分子材料の性質から強く影響を受けてしまう組み合わせの効果について実証した。本章にて構築された組み合わせプラットフォームの親水/疎水の状態変化では、小さな水接触角の変化しか確認できなかったが、細胞選択的な接着性に対する組み合わせの効果は顕著に観察された。

血清に含まれるタンパク質は、高分子表面に吸着し、細胞の接着性に影響を及ぼす重要な因子の一つである。そのため、本プラットフォーム上における、ECM 由来タンパク質であるフィブロネクチンや IV 型コラーゲンの二種類のタンパク質の吸着率について評価した (Table. 5-2)。Table. 5-2 の結果から、顕著な吸着は確認されなかったが、本研究にて用いた細胞選択的接着ペプチドは血清培地においてもその機能を維持することが報告されている [19]。そのため、細胞接着評価の結果は生体分子と高分子材料の組み合わせ効果を主に反映していると考えられる。

本章の研究を通して、生体分子の細胞接着性の機能が固定先の高分子の性質との組み合わせによって大きく影響を受けることが分かった。興味深いことに、細胞選択的な接着能も高分子の性質から強く影響を受けていた。Kanie らは、ペプチドの配列だけでなく、ペプチド自身の物理化学的な性質が細胞の選択的な接着を制御することを言及すると共に、Ile 単一ペプチドにおいて EC 選択的な接着促進効果が報告している [19]。本章の検証においても tri-Ile が EC を選択的に接着促進し、SMC 及び FB の接着を抑制する結果が得られた。また、本章では、物理化学的に特徴的な分子として正電荷をもつ Arg をベースとする生体分子や疎水的な性質を持つ Ile をベースとする生体分子が用いられた。FB は Arg 由来の正電

Table. 5-2 Adsorption of fibronectin and collagen type IV on the cell assay platform at 37°C and 20°C.

Average intensity (-)		Blank	RGDS	mono-Arg	tri-Arg	mono-Ile	tri-Ile	Background
Fibronectin	37°C	0.086 ± 0.005	0.087 ± 0.010	0.095 ± 0.002	0.098 ± 0.007	0.090 ± 0.003	0.107 ± 0.006	0.086 ± 0.005
	20°C	0.082 ± 0.005	0.082 ± 0.003	0.088 ± 0.003	0.090 ± 0.006	0.088 ± 0.005	0.104 ± 0.006	0.079 ± 0.004
Collagen type Ⅳ	37°C	0.097 ± 0.011	0.101 ± 0.003	0.110 ± 0.003	0.107 ± 0.002	0.110 ± 0.003	0.111 ± 0.004	0.106 ± 0.005
	20°C	0.080 ± 0.002	0.079 ± 0.002	0.078 ± 0.005	0.079 ± 0.006	0.077 ± 0.003	0.078 ± 0.004	0.076 ± 0.003

Adsorption of fibronectin and collagen type IV was measured with fluorescently labeled fibronectin and collagen by Fluoroskan Ascent (type 374; Labsystems, Helsinki, Finland) at 646 nm excitation and 678 nm emission. The fluorescently labeled fibronectin or collagen was dissolved in PBS (67 mg/L). The solution was dropped onto fabricated substrates. Substrates were incubated for 15 min at 37°C, washed once with PBS at 37°C, and the fluorescence intensity of the substrates was immediately measured using Fluoroskan Ascent. For the protein adsorption assay in hydrophilic conditions, the substrates were transferred into PBS at 20°C and incubated for 15 min. Then the fluorescence intensity of the substrates was measured.

荷をより好む傾向にあったが、tri-Arg では mono-Arg と比べて 37°C 及び 20°C いずれの条件においても FB 接着量は低かった。対照的に、Ile 由来の疎水性の性質は、EC 及び FB の接着を促進したが、高分子材料がより疎水的な条件で EC 選択的な性質が顕著に向上した。この結果は、Kanie らの報告とも一致する結果であった [19]。同一温度条件での mono-Ile と tri-Ile は、水接触角のような巨視的な測定では、大きな差は確認されなかったが、EC は Ile 残基の数を認識でき、mono-Ile と比較して tri-Ile でより接着することが分かった (20°C: $p < 0.01$、37°C: $p < 0.03$)。

これまでに、筆者らはペプチドアレイ技術を用いて様々な細胞選択的なペプチドを取得してきた [18, 19, 21, 22]。したがって、次なる課題は、医療応用に向けて取得したペプチドの機能が最適に発揮される高分子材料を的確に選択することであると考えている。また、本組み合わせプラットフォームはラベルフリーでの細胞回収にも応用可能である。まず、37°C において EC を選択的に捕捉し、20°C に 2 時間静置することで EC を選択的に回収できる。この応用は、初代培養における EC の濃縮操作に有用であると考えられる。

本研究では、poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)の高分子膜における、温度に応答した親水/疎水性の変化を利用するため、プラットフォームの性質として表面の濡れ性に着目した。しかしながら、生体分子と高分子の組み合わせ効果を説明するには、表面電荷及び硬さ、トポロジー的性質などの指標も重要である可能性が残る。そのため、本プラットフォームの表面ゼータ電位について Beckman Coulter Inc. (CA, USA) の DelsaNano HC Particle Analyzer を用いて測定した (Fig. 5-6)。しかしながら、表面の電荷の指標との相関性は確認されなかった。組み合わせ効果についての詳細な検証を通して、生体分子と固定先となる高分子材料の組み合わせを考慮した設計の重要性が提案された。更なる組み合わせ効果の検証として、濡れ性以外の性質との組み合わせによる影響についての研究が期待される。

5.5. 結言

生体材料などの医療応用される材料表面において細胞選択的な接着制御を実現するために、生体分子と高分子材料の性質との組み合わせによる効果が検証された。具体的には、生体分子が固定化された poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)からなるプラットフォームを構築し、温度によって高分子材料の性質を変化させることで、生体分子のもつ細胞選択的な接着効果が高分子材料表面の疎水性の性質によって顕著に

影響を受けることが明らかとなった。これらの結果は、生体分子の固定化による機能化には、固定先となる高分子材料の選択が非常に重要であることを示している。つまり、生体材料の設計開発において生体分子の固定化アプローチを用いる際には、生体分子と高分子材料の組み合わせに着目したこの研究が設計指針の一つとなると期待できる。

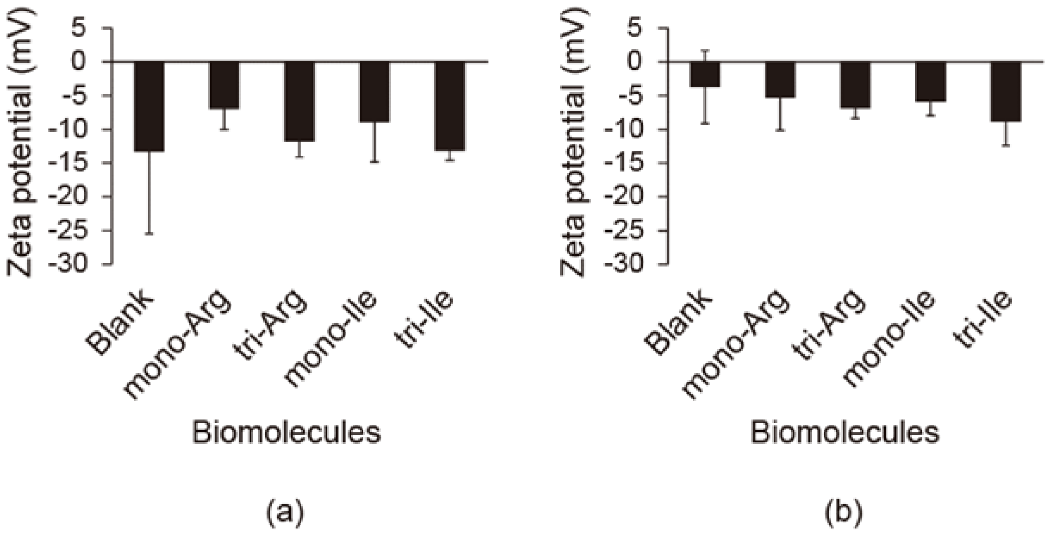


Fig. 5-6 Zeta potential analysis of the fabricated substrate surfaces at (a) 37°C and (b) 20°C. The zeta potential of the fabricated polymeric surfaces was measured by a DelsaNano HC Particle Analyzer. Prepared substrates were placed onto a measurement cell in the electrometer. The zeta potentials of the surfaces were measured at 37°C. The results of the zeta potential are expressed as the mean of three measurements with the standard deviation (SD).

5.6. 参考文献

1 Lu, S.; Sun, X.; Zhang, P.; Yang, L.; Gong, F.; Wang, C., Local hemodynamic disturbance accelerates early thrombosis of small-caliber expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Perfusion-Uk* **2013,** *28*, 440-448.

2 Pfeiffer, D.; Stefanitsch, C.; Wankhammer, K.; Muller, M.; Dreyer, L.; Krolitzki, B.; Zernetsch, H.; Glasmacher, B.; Lindner, C.; Lass, A.; Schwarz, M.; Muckenauer, W.; Lang, I., Endothelialization of electrospun polycaprolactone (PCL) small caliber vascular grafts spun from different polymer blends. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2014,** *102*, 4500-4509.

3 Bu, X.; Yan, Y.; Zhang, Z.; Gu, X.; Wang, M.; Gong, A.; Sun, X.; Cui, Y.; Zeng, Y., Properties of Extracellular Matrix-Like Scaffolds for the Growth and Differentiation of Endothelial Progenitor Cells. *Journal of Surgical Research* **2010,** *164*, 50-57.

4 Cardinal, K. O.; Williams, S. K., Assessment of the Intimal Response to a Protein-Modified Stent in a Tissue-Engineered Blood Vessel Mimic. *Tissue Engineering Part A* **2009,** *15*, 3869-3876.

5 Rafat, M.; Matsuura, T.; Li, F.; Griffith, M., Surface modification of collagen-based artificial cornea for reduced endothelialization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2009,** *88A*, 755-768.

6 Yu, Y.; Gao, Y.; Wang, H.; Huang, L.; Qin, J.; Guo, R.; Song, M.; Yu, S.; Chen, J.; Cui, B.; Gao, P., The matrix protein CCN1 (CYR61) promotes proliferation, migration and tube formation of endothelial progenitor cells. *Experimental Cell Research* **2008,** *314*, 3198-3208.

7 Aoki, J.; Serruys, P. W.; van Beusekom, H.; Ong, A. T. L.; McFadden, E. P.; Sianos, G.; van der Giessen, W. J.; Regar, E.; de Feyter, P. J.; Davis, H. R.; Rowland, S.; Kutryk, M. J. B., Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34 - The HEALING-FIM (healthy endothelial accelerated lining inhibits neointimal growth-first in man) registry. *Journal of the American College of Cardiology* **2005,** *45*, 1574-1579.

8 Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E., Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **1984,** *309*, 30-33.

9 Blindt, R.; Vogt, F.; Astafieva, I.; Fach, C.; Hristov, M.; Krott, N.; Seitz, B.; Kapurniotu, A.; Kwok, C.; Dewor, M.; BosserhofF, A. K.; Bernhagen, J.; Hanrath, P.; Hofmann, R.; Weber, C., A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *Journal of the American College of Cardiology* **2006,** *47*, 1786-1795.

10 Graf, J.; Ogle, R. C.; Robey, F. A.; Sasaki, M.; Martin, G. R.; Yamada, Y.; Kleinman, H. K., A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell-adhesion and binds the 67000 laminin receptor. *Biochemistry* **1987,** *26*, 6896-6900.

11 Komoriya, A.; Green, L. J.; Mervic, M.; Yamada, S. S.; Yamada, K. M.; Humphries, M. J., The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site(CS1) within the alternatively spliced type-III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *Journal of Biological Chemistry* **1991,** *266*, 15075-15079.

12 Larsen, C. C.; Kligman, F.; Tang, C.; Kottke-Marchant, K.; Marchant, R. E., A blomimetic peptide fluorosurfactant polymer for endothelialization of ePTFE with limited platelet adhesion. *Biomaterials* **2007,** *28*, 3537-3548.

13 Yin, M.; Yuan, Y.; Liu, C.; Wang, J., Development of mussel adhesive polypeptide mimics coating for in-situ inducing re-endothelialization of intravascular stent devices. *Biomaterials* **2009,** *30*,

2764-2773.

14 Werner, N.; Junk, S.; Laufs, U.; Link, A.; Walenta, K.; Bohm, M.; Nickenig, G., Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circulation Research* **2003,** *93*, E17-E24.

15 Kong, D.; Melo, L. G.; Mangi, A. A.; Zhang, L.; Lopez-Ilasaca, M.; Perrella, M. A.; Liew, C. C.; Pratt, R. E.; Dzau, V. J., Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. *Circulation* **2004,** *109*, 1769-1775.

16 Lau, A. K.; Leichtweis, S. B.; Hume, P.; Mashima, R.; Hou, J. Y.; Chaufour, X.; Wilkinson, B.; Hunt, N. H.; Celermajer, D. S.; Stocker, R., Probucol promotes functional reendothelialization in balloon-injured rabbit aortas. *Circulation* **2003,** *107*, 2031-2036.

17 Li, B.; Chen, J. X.; Wang, J. H. C., RGD peptide-conjugated poly(dimethylsiloxane) promotes adhesion, proliferation, and collagen secretion of human fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006,** *79A*, 989-998.

18 Kato, R.; Kaga, C.; Kanie, K.; Kunimatsu, M.; Okochi, M.; Honda, H., Peptide Array-Based Peptide-Cell Interaction Analysis. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2011,** *8*, 171-177.

19 Kanie, K.; Kato, R.; Zhao, Y. Z.; Narita, Y.; Okochi, M.; Honda, H., Amino acid sequence preferences to control cell-specific organization of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. *Journal of Peptide Science* **2011,** *17*, 479-486.

20 Khan, M.; Yang, J.; Shi, C.; Lv, J.; Feng, Y.; Zhang, W., Surface tailoring for selective endothelialization and platelet inhibition via a combination of SI-ATRP and click chemistry using Cys-Ala-Gly-peptide. *Acta Biomaterialia* **2015,** *20*, 69-81.

21 Kanie, K.; Narita, Y.; Zhao, Y. Z.; Kuwabara, F.; Satake, M.; Honda, S.; Kaneko, H.; Yoshioka, T.; Okochi, M.; Honda, H.; Kato, R., Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells. *Biotechnology and Bioengineering* **2012,** *109*, 1808-1816.

22 Kuwabara, F.; Narita, Y.; Yamawaki-Ogata, A.; Kanie, K.; Kato, R.; Satake, M.; Kaneko, H.; Oshima, H.; Usui, A.; Ueda, Y., Novel Small-Caliber Vascular Grafts With Trimeric Peptide for Acceleration of Endothelialization. *Annals of Thoracic Surgery* **2012,** *93*, 156-163.

23 Ye, K.; Wang, X.; Cao, L. P.; Li, S. Y.; Li, Z. H.; Yu, L.; Ding, J. D., Matrix Stiffness and Nanoscale Spatial Organization of Cell-Adhesive Ligands Direct Stem Cell Fate. *Nano Letters* **2015,** *15*,

4720-4729.

24 Tamada, Y.; Ikada, Y., Cell Attachment to Various Polymer Surfaces. In *Polymers in Medicine II*, Chiellini, E.; Giusti, P.; Migliaresi, C.; Nicolais, L., Eds. Springer US: 1986; Vol. 34, pp 101-115.

25 Yeung, T.; Georges, P. C.; Flanagan, L. A.; Marg, B.; Ortiz, M.; Funaki, M.; Zahir, N.; Ming, W. Y.; Weaver, V.; Janmey, P. A., Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **2005,** *60*, 24-34.

26 Lehnert, D.; Wehrle-Haller, B.; David, C.; Weiland, U.; Ballestrem, C.; Imhof, B. A.; Bastmeyer, M., Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *Journal of Cell Science* **2004,** *117*, 41-52.

27 Ebara, M.; Yamato, M.; Aoyagi, T.; Kikuchi, A.; Sakai, K.; Okano, T., A novel approach to observing synergy effects of PHSRN on integrin-RGD binding using intelligent surfaces. *Advanced Materials* **2008,** *20*, 3034-3038.

28 Ebara, M.; Yamato, M.; Aoyagi, T.; Kikuchi, A.; Sakai, K.; Okano, T., Temperature-responsive cell culture surfaces enable "on-off" affinity control between cell integrins and RGDS ligands. *Biomacromolecules* **2004,** *5*, 505-510.

29 Ebara, M.; Yamato, M.; Aoyagi, T.; Kikuchi, A.; Sakai, K.; Okano, T., The effect of extensible PEG tethers on shielding between grafted thermo-responsive polymer chains and integrin-RGD binding. *Biomaterials* **2008,** *29*, 3650-3655.

30 Idota, N.; Ebara, M.; Kotsuchibashi, Y.; Narain, R.; Aoyagi, T., Novel temperature-responsive polymer brushes with carbohydrate residues facilitate selective adhesion and collection of hepatocytes. *Science and Technology of Advanced Materials* **2012,** *13*.

31 Aoyagi, T.; Ebara, M.; Sakai, K.; Sakurai, Y.; Okano, T., Novel bifunctional polymer with reactivity and temperature sensitivity. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2000,** *11*, 101-110.

32 Suzuki, H.; Nurul, H. M.; Seki, T.; Kawamoto, T.; Haga, H.; Kawabata, K.; Takeoka, Y., Precise Synthesis and Physicochemical Properties of High-Density Polymer Brushes designed with Poly(N-isopropylacrylamide). *Macromolecules* **2010,** *43*, 9945-9956.

33 Nagase, K.; Kimura, A.; Shimizu, T.; Matsuura, K.; Yamato, M.; Takeda, N.; Okano, T., Dynamically cell separating thermo-functional biointerfaces with densely packed polymer brushes. *Journal of Materials Chemistry* **2012,** *22*, 19514-19522.

第 6 章

Biomaterials Informatics (BI) 的アプローチによる新規生体材料開発手法の提案

6.1. 緒言

移植後に患者自身の血管組織に置き換わるような、組織工学のコンセプトを応用した人工血管材料（TEVG: tissue-engineered vascular graft）の開発が盛んに取り組まれている [1,2]。このコンセプトの人工血管には、普通 poly(ε-caprolactone) (PCL)や poly(glycolic acid)、poly(lactic acid)などの生分解性高分子材料が採用されており、臨床研究の報告もある [1,2]。このような材料では、より生体親和性を高めるために細胞の接着性の向上が求められ、ECM タンパク質 [3] や抗体 [4]、ペプチド [5-7] 等の生体分子がコーティング材料として用いられてきた。

その分子の中でも、ペプチドは完全合成が可能であるため、大量生産時における製造コストや低い感染リスクの観点から魅力的である。ペプチドは、組織再生の初期段階で重要となる細胞接着を制御でき、多くの細胞種に対する制御により、組織の再構築が早められる。例えば、人工血管では、内皮細胞の接着が行われると、内腔が早期に内皮化し、抗血栓性だけでなく人工血管移植部の組織再生も促進することが知られる [8]。Kanie らによって、タイプの異なる細胞を選択的に接着促進させる、細胞選択的接着ペプチドがこれまでに複数報告されてきている。具体的には、ECM タンパク質由来の Cys-Ala-Gly (CAG) ペプチドが EC の接着を促進するが、SMC の接着は阻害するような効果が持つことが分かっており [9-11]、*in vivo* モデルにおいてもその効果が確認されている [9]。加えて、Kanie らは、いくつかの単一アミノ酸が数残基連なったペプチドも細胞選択的な接着能を有することを報告しており [12]、特に Ile の単一ペプチドには EC が選択的に接着しやすい傾向があり、そのアナログ配列にも同様な傾向があることが分かっている。これらの報告から、RGDS や REDV のような厳密な配列に依存して機能する細胞接着性ペプチドだけでなく [5, 13]、分子自身がもつ疎水度や電荷などの物理化学的な性質によって細胞選択的に接着性を制御するペプチドが存在することが示唆されている。

生体材料の設計において、高分子材料の性質が細胞の挙動に大きな影響を与えることが知られており、近年では、トポロジー的性質や機械的性質による影響に着目した、メカノバイオロジーの分野が注目されて始めている。具体的には、トポロジー的性質 [14, 15] や、機械的性質 [16] によって細胞の運命決定や分化系統を制御される事例が報告されている。また、Uto らは高分子材料の流動性や熱的性質がが細胞の接着や老化に影響を及ぼすことを報告している [17, 18]。

筆者らは、前報において、より高機能化された生体材料を開発するためには、上記のような高分子材料の性質と材料に固定化する生体分子の性質との組み合わせの効果について検証することが重要であると提唱してきた [19]。前報において、筆者らはペプチドのもつ細胞選択的な接着能が、固定先となる高分子材料の親水/疎水性の性質によって大きく変化することを報告している [19]。本研究では、細胞選択的な接着制御のためのペプチドと高分子材料の組み合わせ効果について更なる検証をするため、異なる流動性を有する生分解性材料上において細胞選択的接着ペプチドの組み合わせ効果について調査した。詳細として、まず poly(ε-caprolactone-*co*-D,L-lactide) (poly(CL-*co*-DLLA))のユニット比や重合度を変化させることで、様々な熱的性質や機械的性質、物理化学的性質、トポロジー的性質をもつ六種類の高分子基板を調製した。続いて、それぞれの高分子基板上に三残基の細胞選択的ペプチド四種類を被覆し、足場材料としての機能性を比較した (Fig. 6-1)。本研究では、TEVG への応用を目指し、血管内で接着を制御することが重要となる 3 種類の細胞（FB 及び EC、SMC）に注目し、各足場材料における細胞の接着選択性について評価した (Fig. 6-1)。さらに、ペプチドと高分子材料の性質との複合的な関係性について検証するために、細胞接着評価の結果について多変量解析による影響因子を分析し、バブルチャートマップを用いてその関係性を可視化した。マップ化されたデータから、ペプチドと高分子材料の性質の数種類の因子の組み合わせによって、細胞選択的な接着能を向上させられる条件があることが分かった。

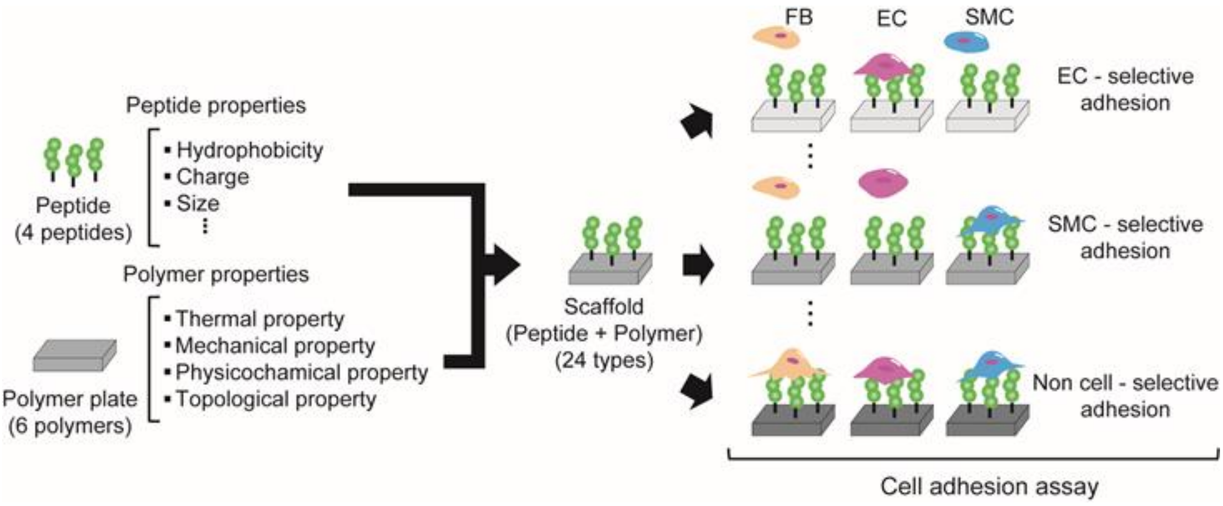


Fig. 6-1 Schematic image of this study. Cell adhesion performance was evaluated on the scaffolds (peptides + polymer) as a combinational effect of peptides and their immobilized polymer properties. Six types of poly(CL-*co*-DLLA) plates were fabricated and characterized. The plates were immobilized with four types of peptides. Cell adhesion was evaluated with three types of cells (FBs, ECs, and SMCs) to investigate cell-selective adhesion generated by the combinational effects of polymer properties and peptide properties.

6.2. 実験

6.2.1. 実験材料

異なる CL と DLLA の組成比と重合度の四分岐 poly(CL-*co*-DLLA)は、報告されている合成方法に基づいて日立化成株式会社 (東京、日本)に受託合成した[17, 18, 20]。直径 13 mm の丸型ガラススライド(CO13001)は、松浪硝子工業株式会社 (大阪、日本)から購入した。Toluene 及び 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride n-hydrate (DMT-MM)、phosphate-buffered saline (PBS)は、和光純薬工業株式会社 (大阪、日本)から購入した。Sulfosuccinimidyl 6-(4′-azido-2′-nitrophenylamino) hexanoate (sulfo-SANPAH)は、Thermo Fisher Scientific Inc. (神奈川県、日本)から購入した。また、Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)及び Met-Met (MM)のペプチドは、> 98%の純度のものを株式会社ペプチド研究所 (大阪、日本)から購入し、Gly-Cys-Ala-Gly (CAG)及び Gly-Ala-Thr-Lys (ATK)、Gly-Ile-Ile-Ile (III)、Gly-Arg-Arg-Arg (RRR)のペプチドは、> 90%の純度にて GL Biochem (Shanghai) Ltd. (Shanghai、中国)に受託合成した。Polycaprolactone (M_w: 80000)は、Sigma Aldrich (東京、日本)から購入した。

6.2.2. Poly(CL-*co*-DLLA)のキャラクタリゼーション

六種類の poly(CL-*co*-DLLA)は以下の測定により特徴付けられた (Table. 6-1)。熱的性質はセイコーインスツル株式会社 (千葉、日本)の DSC6100 を用いて測定された。流動性の性質は、アントンパール社 (東京、日本)のレオメーター (MCR 301)を用いて 37°C の条件で測定された。損失正接及びヤング率 (E value)は、報告されている方法で算出された[17, 21]。表面接触角は、協和界面科学株式会社 (埼玉、日本)の接触角計 (FACE CA-XP)を用いて、各 poly(CL-*co*-DLLA)がスピンコートされた高分子基板上の水滴の接触角が気相条件において測定された。高分子基板表面の粗さ測定には、株式会社ニコンインステック (東

Table 6-1 Characterization of the polymer plates.

Polymer contents in feed			Parameters of polymer plates										
			Tharmal property		Mechanical property				Physicochemical property	Topological property	Potential of immobilizing peptide		
Sample name	CL : DLLA	Unit per branch	Melting point [a] /°C	Delta H [a] /mJ mg^{-1}	Storage modulus [b] /Pa	Loss modulus [b] /Pa	E value [b] /Pa	Loss tangent [b] /-	Contact angle [c] /°	Roughness [d] /nm	Sulfur/Carbon ratio [e] /-	Nitrogen/Carbon ratio [e] /-	Oxygen/Carbon ratio [e] /-
P1	60 : 40	100	33.8	5	9.07	1.09×10^3	3.02×10^3	120.18	90.2	2196	0.024	0.082	0.292
P2		500	39.1	26	3.12×10^4	4.13×10^4	1.43×10^5	1.32	94.9	133	0.009	0.032	0.264
P3	70 : 30	100	36.9	32	1.81	3.23×10^2	8.95×10^2	178.45	92.8	676	0.023	0.088	0.242
P4		500	40.5	32	1.06×10^4	2.45×10^4	7.39×10^4	2.31	90.3	433	0.010	0.048	0.228
P5	80 : 20	100	45.2	47	1.72×10^6	2.39×10^5	4.81×10^6	0.14	93.4	605	0.031	0.099	0.234
P6		500	45.7	38	1.60×10^7	1.48×10^6	4.45×10^7	0.09	95.4	156	0.024	0.089	0.204

a. Determined by DSC (temperature: 0–120°C, heating rate: 5°C/min).

b. Determined by a rheometer (frequency: 0.1–100 rad/ s, strain: 0.1%, temperature: 37°C).

c. Measurement was carried out three times (temperature: 37°C).

d. The surface roughness was determined from each of the profiles obtained by a white light interferometric microscope.

e. Calculated from surface compositions obtained by an X-ray photoelectron spectrometer.

京、日本)の白色干渉顕微鏡 (BW-S501)を用いた。

高分子基板は、100 量体の poly(CL-*co*-DLLA)は 50 wt%、500 量体の poly(CL-*co*-DLLA)は 30 wt%の濃度となるようにトルエンに溶解し、ミカサ株式会社 (東京、日本)のスピンコーター (MS-A100)を用いて丸型のガラススライド上にキャストすることで調製した。キャスト後、60°C の条件での減圧乾燥にて溶媒を十分に除去した。本研究に用いられた高分子基板は、各モノマー組成比と重合度から、(CL:DLLA = 60:40、100 unit) : P1、(60:40、500 unit) : P2、(70:30、100 unit) : P3、(70:30、500 unit) : P4、(80:20、100 unit) : P5、(80:20、500 unit) : P6 と定義された。

6.2.3. ペプチド固定化 poly(CL-*co*-DLLA)基板の調製

ペプチドの固定化は、二つのステップから構成される [22]。第一ステップとして、sulfo-SANPAH を脱気した純水に溶解し、2.5 mg/mL となるように調製し、高分子基板が設置された容器に中に添加された。続いて、株式会社三永電機製作所 (大阪、日本)の落射型水銀キセノンランプ (SUPERCURE-203S)を用いて容器の底側から UV (照射波長: 365 nm、照射照度: 2.0 mW/cm^2、照射時間: 2 時間)を照射した。照射後、高分子基板を純水に浸漬し、軽く振とうさせることで洗浄を行った。洗浄操作を三回繰り返し、一晩純水中に浸漬した後に、高分子基板を減圧乾燥した。第二ステップとして、DMT-MM 及びペプチドを PBS 中に 12 mM 及び 2 mM の濃度となるようにそれぞれ溶解し、第一ステップの処理を施した高分子基板が設置された容器に添加し、室温で 2 時間浸漬した。その後、同量の 2 mM ペプチド溶液を追添して室温で 22 時間静置した。静置後、高分子基板を純水に浸漬し、軽く振とうさせることで洗浄を行った。洗浄操作を三回繰り返し、一晩純水中に浸漬した後に、高分子基板を減圧乾燥した。

高分子基板へのペプチドの導入ポテンシャルを評価するため、日本電子株式会社 (東京、日本)の X 線光電子分光 (XPS)装置 (JPS-9000MC/SpecXPS)を用いて、5 wt%の poly(CL-*co*-DLLA)溶液をキャストし、MM ペプチドが導入された高分子基板の表面元素分析を行った。測定には、10 kV の X 線(Al Kα)を用いた。酸素及び窒素、硫黄、炭素の元素についての組成比が算出された (Fig. 6-2)。

6.2.4. 細胞培養

細胞培養は、5.2.4 と同様の操作にて行った [19]。

6.2.5. 細胞接着評価

細胞接着評価は、細胞培養用 polystyrene (tissue culture polystyrene: TCPS)をコントロールとした。細胞はそれぞれ、最終継代時に Calcein-AM にて染色された後、2.00×10^4 cells/cm^2 の播種密度にて高分子基板上に播種された。37°C にて一日間培養した後、PBS にて三回洗浄した。続いて、オリンパス株式会社 (東京、日本)の蛍光顕微鏡及び Molecular Devices LLC. (CA、USA)のソフトウェア (MetaMorph)で細胞画像の撮影 (n = 6)を行った。撮影した蛍光画像中の接着細胞数のカウントには、株式会社ディテクト (東京、日本)の MorphIQ を用いた。異なる足場材料の細胞接着データを比較するために、算出された接着細胞数が各細胞のデータ内において、式 (6-1)を用いて標準化された。

$$Z = \frac{(X-\mu)}{\sigma} - (Z_{\min}) \qquad (6\text{-}1)$$

式 (6-1)中の Z 及び、X、μ、σ、Z_{min} はそれぞれ、標準化された細胞接着率、サンプルの細胞接着数、各細胞間の全サンプルデータの平均値及び標準偏差、三種類の細胞における Z の値の内で最も小さい値

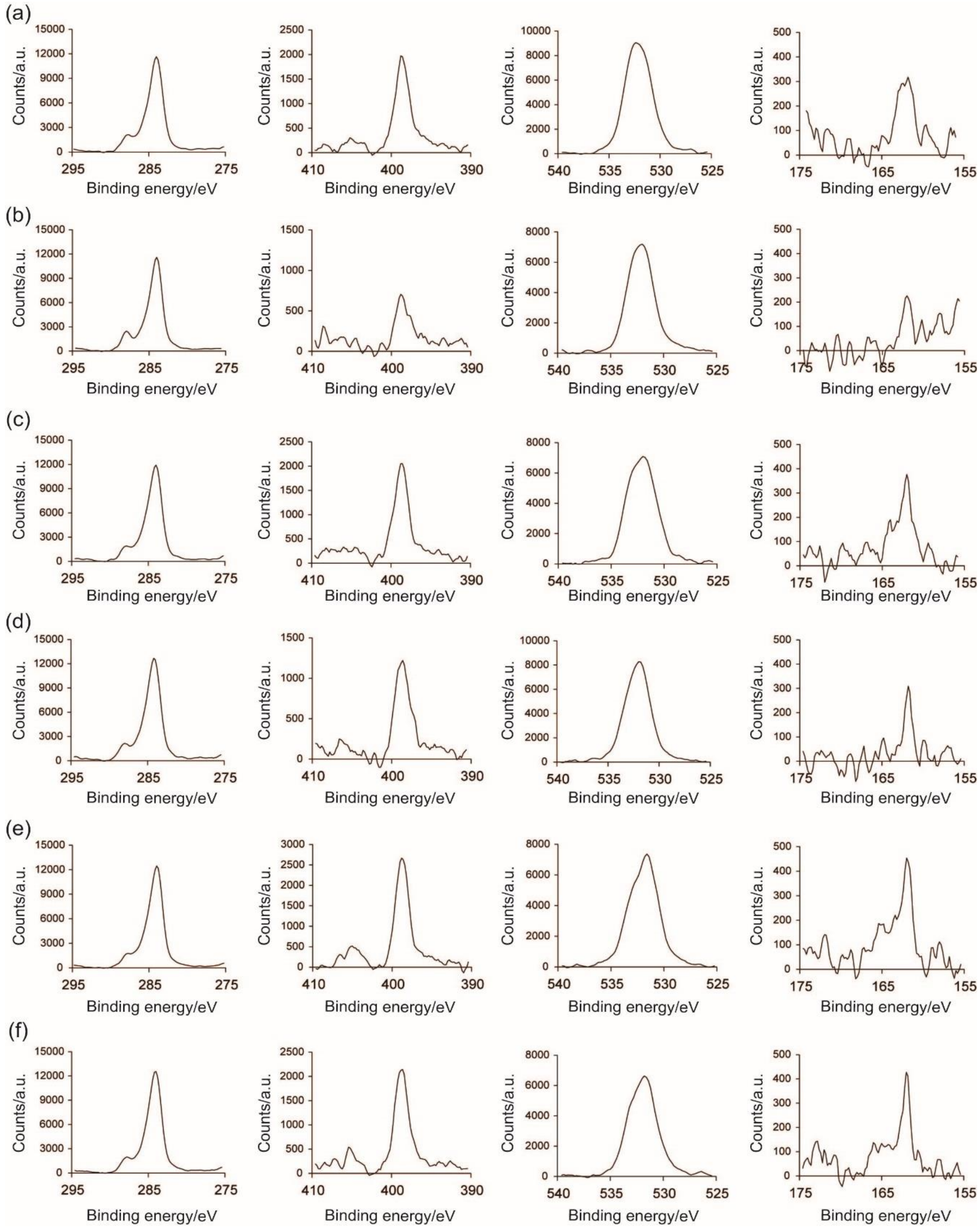


Fig. 6-2 Peptide immobilization performance of prepared polymer plates using an X-ray photoelectron spectrometer. Carbon 1s at 282 eV, nitrogen 1s at 397 eV, oxygen 1s at 530 eV, and sulfur 2p3/2 at 162 eV. (a) P1, (b) P2, (c) P3, (d) P4, (e) P5, and (f) P6.

である。式 (6-1)において、細胞間の比較検証のために、細胞ごとの標準化された細胞接着数から、Z の内で最も小さい値である Z_{min} (P1 の高分子基板上の SMC の接着率 Z を採用)を減じた。細胞接着評価の結果は、標準化された細胞接着率の平均値と標準偏差を用いて表記された。各足場材料についての細胞接着比の評価は標準化された細胞接着率の比率から算出された。二条件の有意差検定は Student の t 検定にて評価した。また、三条件以上の有意差検定は一元配置分散分析 (one-way ANOVA)にて行った。

6.2.6. 細胞接着評価の多変量解析

各細胞の接着率の予測モデルの構築のためのパラメータの選択は LASSO ロジスティック回帰分析にて行った。モデル構築及び予測精度の計算は、すでに報告されている解析手法で行った[23, 24]。主成分分析 (principle component analysis: PCA)は、マップ作成のために行った。主成分 1 (PC1)及び 2 (PC2)は LASSO ロジスティック回帰分析において選択されたパラメータが使われた。以上の解析は全て R ソフトウェア (R Development Core Team、https://www.r-project.org/)及び R パッケージ glmnet24 を用いた[25]。予測モデルが十分な精度に達した際に選択された指標が組み合わせの解釈に用いられた。

6.2.7. 細胞接着性マップの生体材料設計指針としての応用検証

市販の生分解性高分子材料である polycaprolactone (M_w: 80000) (PCL)をモデル高分子材料として、6.2.2.で述べた方法に従って、高分子材料基板の作製及びキャラクタリゼーションを行った。さらに、6.2.3.にて述べた方法にて各種ペプチドを固定化した細胞培養用足場材料を作製し、6.2.4.及び 6.2.5.に示す手法により細胞接着性の評価を行った。

6.3. 結果

6.3.1. 高分子材料の性質のキャラクタリゼーション

まず初めに、六種類の高分子基板の性質を定量的に評価するために、八種類の高分子の性質 (熱的性質に関する二指標及び機械的性質に関する四指標、物理化学的性質に関する指標、トポロジー的性質に関する指標)が測定された (Table. 6-1)。融点及び吸熱エンタルピーの熱的性質は DSC 測定により調べられた。測定の結果から、P1 及び P3 は融点が 37°C 以下であったことから、細胞培養環境 (37°C)において液体状態であることが分かった。残りの四種類の poly(CL-*co*-DLLA)は、37°C において固体状態であることが推察された。P1 では、他のサンプルと比べて、低い吸熱エンタルピーが観察されたことから、P1 が最もアモルファス状態にある材料であると考えられる。以上より、六種類の高分子基板が細胞培養環境のための温度帯において様々な熱的性質を有することが分かった。

続いて、poly(CL-*co*-DLLA)の貯蔵弾性率及び損失弾性率、ヤング率、損失正接などの機械的性質について調査するため、動的粘弾性測定を行った（Table. 6-1、Fig 6-3）。測定の結果、E value は 10^2 から 10^7 Pa の幅広いオーダーのバリエーションがあることが分かった。さらに、高分子基板の流動性の性質を示す損失正接も 10^{-2} から 10^2 Pa の幅広いのバリエーションであることが明らかとなった。これらの結果から、六種類の高分子基板が様々な機械的性質を有していることが分かった。

次に、水接触角測定によって、poly(CL-*co*-DLLA)の物理化学的な性質を評価した (Table. 6-1)。Table. 6-1 より、水接触角測定の結果は、90–96°においてのわずかな差が観察された。

さらに、高分子基板のトポロジー的性質について評価するため、基板表面の粗さを調査した (Table. 6-1)。測定の結果から、P1 がもっとも表面粗さの大きい材料であることが分かった。残りの基板表面は同様の粗さであることがわかった。

これらの四種類の性質に関する測定結果から、本研究で用いられた基板は幅広い高分子材料の性質をもつことが明らかとなり、八種類全ての指標に共線性は観察されなかった。

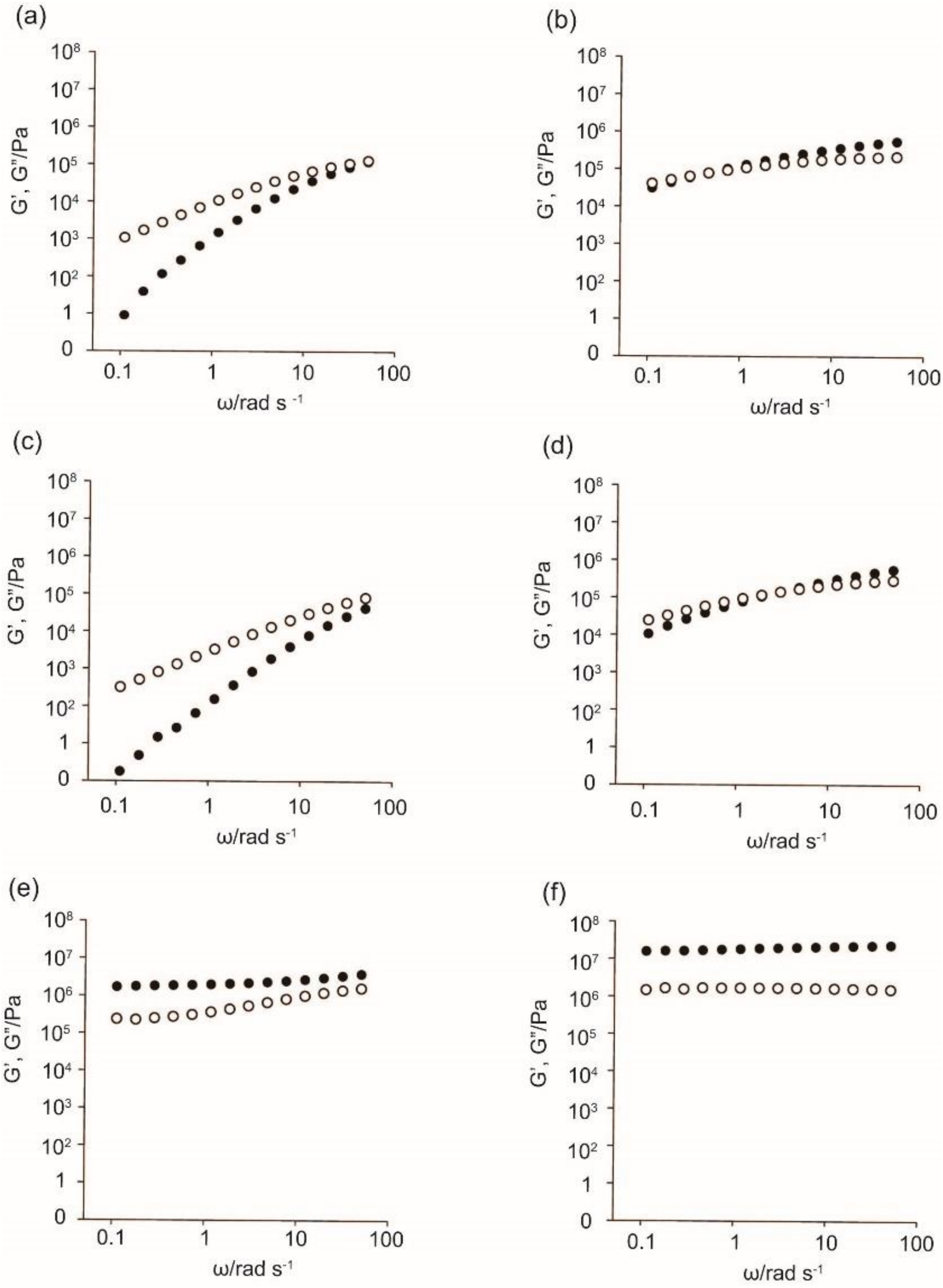


Fig. 6-3 Angular frequency dependence of the storage modulus (G', closed circles) and loss modulus (G", open circles) at 37°C. (a) P1, (b) P2, (c) P3, (d) P4, (e) P5, and (f) P6.

6.3.2. 細胞接着評価

作製した足場材料において FB 及び EC、SMC 間の細胞選択的な接着性について比較するため、各細胞の接着性が評価された (Fig. 6-4、5、6、7)。この評価では、ペプチドを固定化された高分子基板を足場材料と定義する。まず、各細胞間における RGDS ペプチドの効果が比較検証された。FB 及び SMC の接着は、殆どの RGDS 固定化足場材料上にて増加していたが、EC の接着は増加していなかった。FB においては、他の足場材料と比較して、P3 において接着が抑制された。これらの結果から、RGDS を用いた場合でも、高分子材料の性質との組み合わせ次第ではある細胞種の接着だけを減弱させせられることがわかった。したがって、RGDS は細胞選択的な接着ペプチドとは定義されていなかったが [19]、本検証では P4 の足場材料と組み合わすことで、FB 選択的な性質を示していた。

続いて、細胞選択的接着ペプチドとして報告されている、CAG (EC 選択性)及び ATK (SMC 選択性: Fig. 6-8)、III (EC 選択性)、RRR (FB 選択性)について細胞接着ポテンシャルが評価された (Fig. 6-7)。Fig. 6-7 から、FB の接着が細胞選択的接着ペプチドの固定化によって抑制されている傾向が観察された。特に P1-4 の足場材料において、FB の接着は 2-22 倍に抑制された。したがって、本研究で用いた足場材料は細胞選択的接着ペプチドとの組み合わせによって FB の接着を減少させた。一方、EC の接着に着目すると、ATK 固定化足場材料では、P5 を除いて 2-10 倍に増加していた (ATK vs. no peptide: $p < 0.05$)。また、CAG は P6 との組み合わせにおいて EC 接着が 4 倍に増加した (CAG vs. no peptide: $p < 0.05$)。RRR では、どの組み合わせにおいても EC は弱い接着性を示していた。これらの結果から、poly(CL-*co*-DLLA)の足場材料上では、EC の接着は、RGDS や RRR のような一般的な細胞接着性ペプチドの固定化では改善されないことがわかった。しかしながら、CAG や ATK、III のような細胞選択的接着ペプチドを poly(CL-*co*-DLLA)の足場材料上に固定化した際には、EC の接着が向上する可能性が確認された。SMC においても同様に、殆どの細胞選択的接着ペプチドが固定化された足場材料上で接着が改善された (III vs. no peptide: $p < 0.05$; ATK vs. no peptide (P1–4): $p < 0.05$; RRR vs. no peptide (P1–5): $p < 0.05$)。全ての CAG 固定化足場材料上において、SMC の接着は似ている傾向にあり、大きな差は確認されなかったが、III を固定化した P6 の足場材料上では、接着性が向上した。ATK 及び RRR では、P1 及び P2 との組み合わせによって、SMC の接着が 3-10 倍に増加した。したがって、SMC の接着は殆どの高分子基板と細胞選択的接着ペプチドの組み合わせにおいて増加する傾向にあったが、増加の度合いは組み合わせに依存することがわかった。

異なる細胞種間での細胞選択性を比較検証するため、各足場材料上の細胞接着比がそれぞれの標準化された細胞接着率から算出され、Fig. 6-7 (d)において比較された。CAG および III は、本来 EC 選択的接着ペプチドとしてスクリーニングから取得されたが [9,12]、CAG においては、EC 選択的な効果は P2 及び P4 との組み合わせにおいて確認された (FB vs. EC vs. SMC: $p < 0.05$)。RRR は、本来 FB 選択的接着ペプチドとして取得されたが [12]、FB 選択的な効果は P6 との組み合わせによって発揮された (FB vs. EC vs. SMC: $p < 0.05$)。さらに、ATK は、元々SMC 選択的接着ペプチドとして定義されていたが (Fig. 6-8)、P1 及び P3-6 の高分子基板との組み合わせでは、EC 選択的な接着の様が確認された (FB vs. EC vs. SMC: $p < 0.05$)。しかしながら、SMC の選択的な接着は P2 との組み合わせにおいて僅かであるが、発揮されていた (FB vs. EC vs. SMC: $p < 0.05$)。これらの結果から、固定先となる高分子材料との組み合わせによって、細胞選択的接着ペプチドの効果は向上、阻害、逆転されうることがわかった。したがって、分子自身の性質に依存する機能化ペプチドのような細胞選択的接着ペプチド組織工学的な足場材料を設計するためには、まず高分子とペプチドの性質最適な条件を探索することが重要である

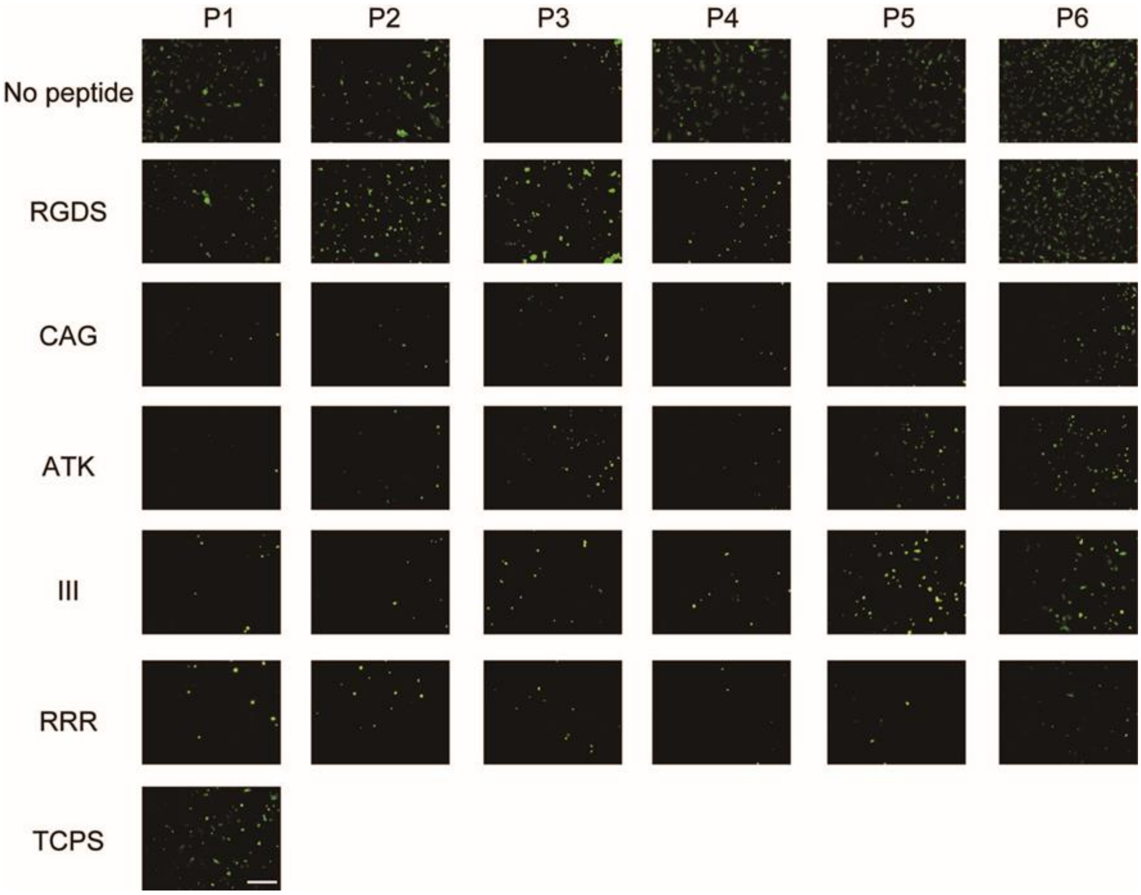


Fig. 6-4 FB adhesion on the polymer plates immobilized with or without peptides and TCPS. Representative fluorescent images of viable cells are shown (scale bar, 30 μm).

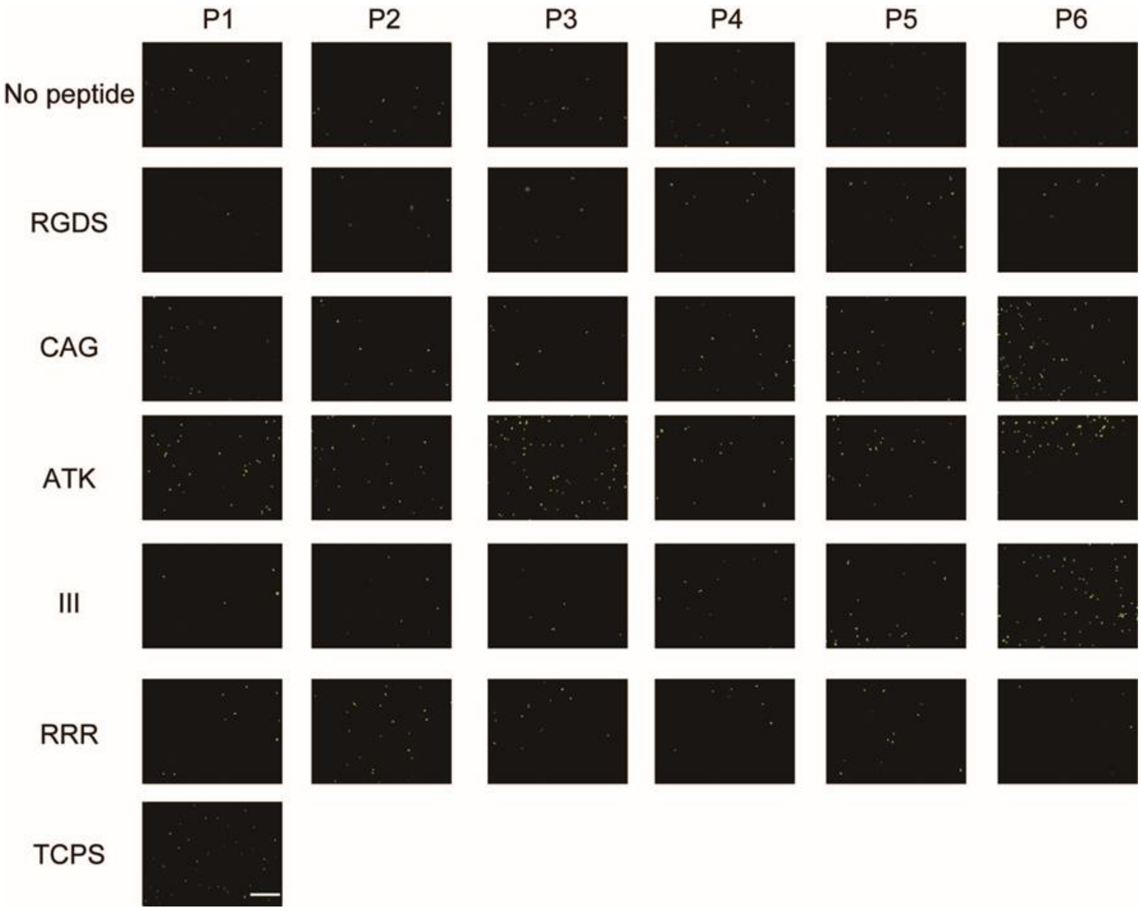


Fig. 6-5 EC adhesion on the polymer plates immobilized with or without peptides and TCPS. Representative fluorescent images of viable cells are shown (scale bar, 30 μm).

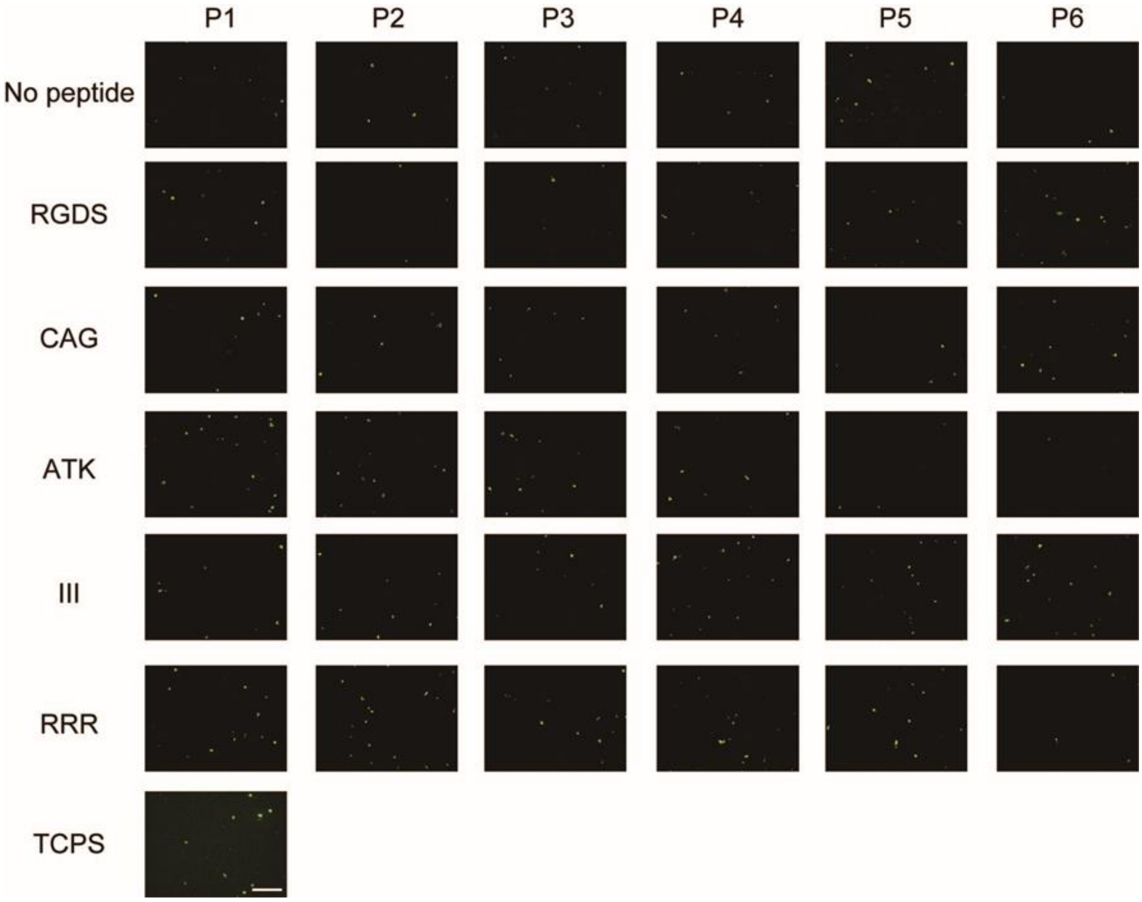


Fig. 6-6 SMC adhesion on the polymer plates immobilized with or without peptides and TCPS. Representative fluorescent images of viable cells are shown (scale bar, 30 μm).

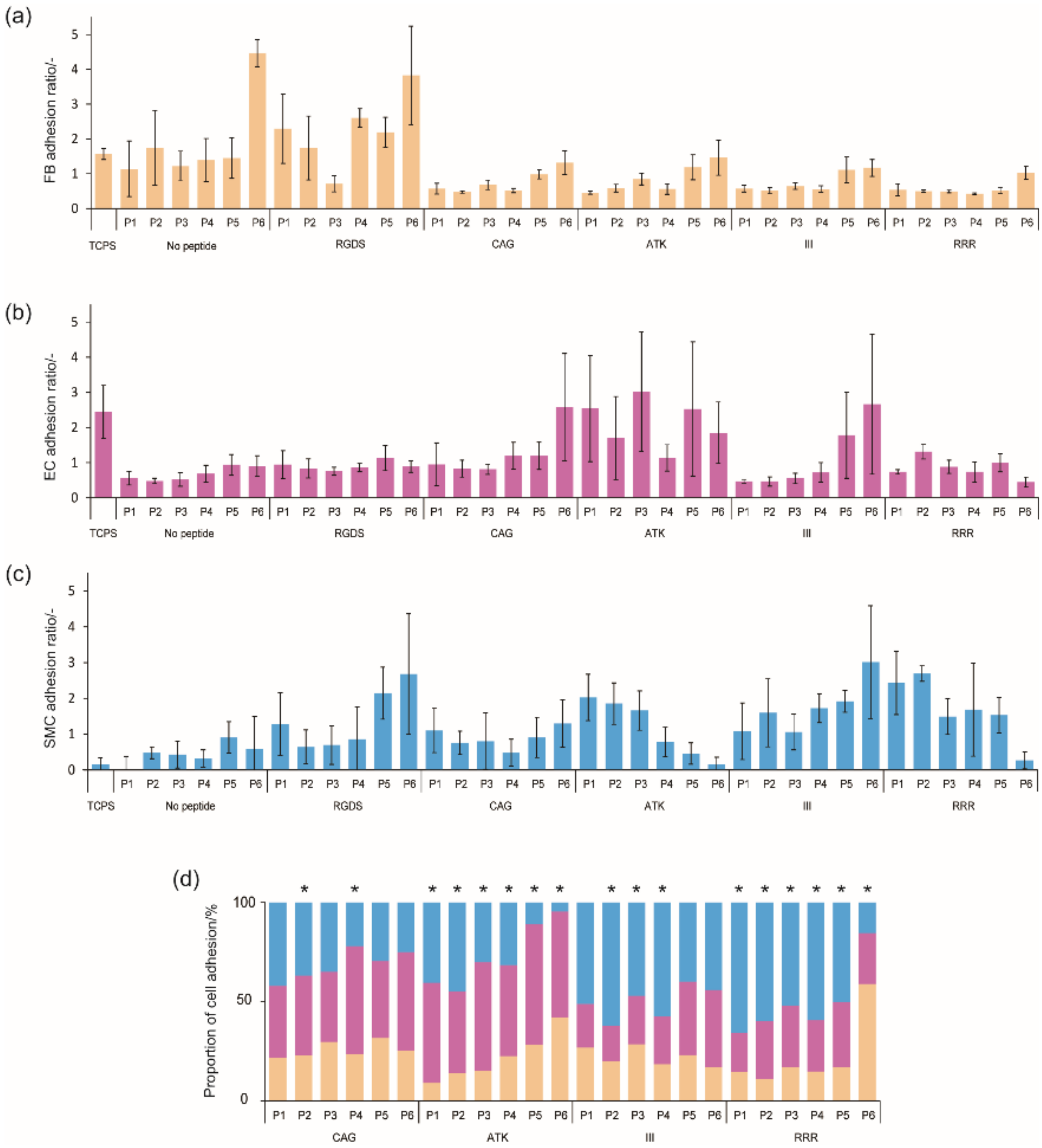


Fig. 6-7 Cell adhesion performances on the polymer plates immobilized with or without peptides and TCPS. The normalized cell adhesion rate is the number of adherent cells at 1 day after the seeding on the scaffold, which was first normalized within each cell type (standard normalization), and then normalized between cell types. See detailed definition in Material and methods. (a) Cell adhesion performance of FB. (b) Cell adhesion performance of EC. (c) Cell adhesion performance of SMC. (d) Summary of cell adhesion rates in three types of cells. The relative cell adhesion rates corresponding to each scaffold is shown as the proportion. The proportion value was calculated from the normalized cell adhesion rates in FB, EC, and SMC. The *p* values were evaluated by one-way ANOVA (*$p < 0.05$).

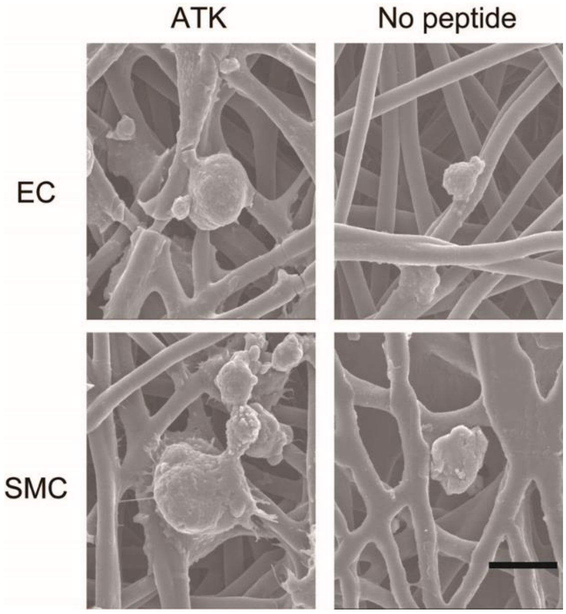


Fig. 6-8 SEM images of cell adhesion on PCL membranes immobilized with ATK or no peptide (scale bar, 15 μm). SEM images of morphology after 1 h of cell adhesion are shown. All images are the same magnification (2000×). The large fibrous three-dimensional background is due to the PCL polymer.

6.3.3. 細胞接着性に対するペプチドと高分子材料の組み合わせ効果のマップ化

ペプチドと高分子基板の組み合わせに対する細胞接着評価の結果から、細胞選択的な接着がペプチドと高分子材料のそれぞれの性質の組み合わせによって大きく影響を受けることが割った。しかしながら、ペプチドと高分子材料の関係性は単純ではないため、性質同士の組み合わせのルールを抽出し、理解することは難しいと考えられる。そのような複雑な組み合わせ関係性について整理し、より詳細に理解するため、ペプチドと高分子の性質の組み合わせに対する接着データの可視化を試みた。まず、各細胞の接着性に関与するペプチド及び高分子基板のパラメータの組み合わせを客観的に探索するために、足場材料の性質を示すパラメータを用意した。具体的には、高分子基板の性質を示すパラメータとして Table. 6-1 に示す 11 指標が用意された。また、ペプチドの性質を表すパラメータとしてアミノ酸インデックスから算出された各アミノ酸残基に対して 13 指標の計 39 指標が用意された [12, 26] (Table. 6-2)。高分子の性質を表す 11 指標には、従来から細胞接着との関係性が報告されてきた指標と同時に、細胞親和性を評価するための新たに提案された指標も含まれている。ペプチドの性質を表す 13 つのアミノ酸指標は前報においてペプチドの生体活性について効率的に説明可能な独立的な指標を選択した [12]。

次に、組み合わせにおけるルールを抽出するために、多変量回帰分析により指標の選抜を試みた。特に、不要な指標の係数を 0 と扱うスパース推定の性質をもつ Lasso 回帰を用いることで重要な指標を抜き出し、その重要な指標を用いて分析を行った。各細胞の接着性を予測する回帰モデルから、いくつかの指標が性質の組み合わせとして選抜された (Table. 6-3)。構築されたモデルの予測精度の結果から、指標を組み合わすことで、FB 及び EC の接着性が説明可能であることがわかった。各細胞の接着性予測モデルにおいて、モデルに用いられる係数はペプチド及び高分子材料の性質の重要性を示している。FB 及び EC の接着予測モデルでは、6 つのパラメータが共通して重要なパラメータとして選択された (Table. 6-3)。特に、損失弾性率の指標が FB 及び EC の両細胞の接着予測に対して顕著に寄与しており、高分子材料の性質を示す指標からは、損失弾性率と水接触角の指標が共通して選抜された。ペプチドの性質を示す指標では、各アミノ酸残基から共通の指標が一つずつ選抜された。FB の接着性の予測回帰モデルに注目すると、融点や吸熱エンタルピー量も選択されており、EC では足場材料表面の炭素に対する硫黄の元素組成比の指標が選択された。これらの結果から、足場材料の機能性における複雑な組み合わせの効果があり、ペプチドと高分子材料の両指標を用いることで、説明が可能であることがわかる。

細胞選択的な接着に対するペプチドと高分子材料の性質の複雑な組み合わせ効果について、その傾向を視覚的に捉えるために、PCA により 10 指標を 2 指標まで圧縮した (Table. 6-4)。Table. 6-4 より、解析に使われた指標が二つのグループに分割されることがわかった。具体的には、PC1 は高分子材料の性質を示す指標から構成され、一方で PC2 はペプチドの性質を示す指標から構成された。PCA から得られた PC1 及び PC2 からなるチャート上に各細胞の標準化された接着率 (Z)をバブル (円)の大きさで表現した (Fig. 6-9)。各細胞種間でバブルチャートマップを比較したところ、各細胞種において細胞選択的な接着に影響する原因が異なることが確認された。Fig. 6-9 (a)から、FB の接着はペプチドの性質 (PC2)による影響よりも、高分子材料の性質 (PC1)による影響が大きく、線形的な傾向であることがわかった。Fig. 6-9 (b)及び (c)からは、EC 及び SMC の接着性の傾向は複雑であったが、ペプチドと高分子材料の性質の組み合わせの効果が最大化される条件がマップ上に局所的に存在した。Fig. 6-9 (b)において、EC が接着しやすいペプチドの条件は、一残基目のサイズ (normalized van der Waals volume)が小さく、二残基目のα-helix 領域での自由エネルギー (free energy in the alpha helical region)が高く、三残基目のタンパク構造でのα-helix 配向性 (alpha helix indices for beta proteins)が高い性質をもち、PC2 のスコアが大きい値であることであった。しかしながら、PC2 のスコアが PC1 のスコアよりも低い条件においても、炭素に対する硫黄の元素比 (ペプチド導入率)及び、損失弾性率、水接触角が高い性質の高分子材料との組み合わせでは、EC の接着は良好であった。さらに、Fig. 6-9 (c)から、(1)PC1 及び PC2 のスコアが低い条件、

Table. 6-4 Principle component analysis (PCA) with all selected scaffold properties

		Parameter name	PC1	PC2
Polymer properties		Melting point	0.440	0.000
		Delta H	0.384	0.000
		Loss modulus	0.496	0.000
		Contact angle	0.444	0.000
		Sulfur/Carbon ratio	0.323	0.000
		Nitrogen/Carbon ratio	0.333	0.000
Peptide properties	1-residue	Normalized van der Waals volume	0.000	-0.575
	2-residue	Free energy in alpha helical region	0.000	0.523
		Amino acid distribution	0.000	0.129
	3-residue	Alpha helix indices for beta proteins	0.000	0.616
		Proportion of variance	31.6%	22.0%

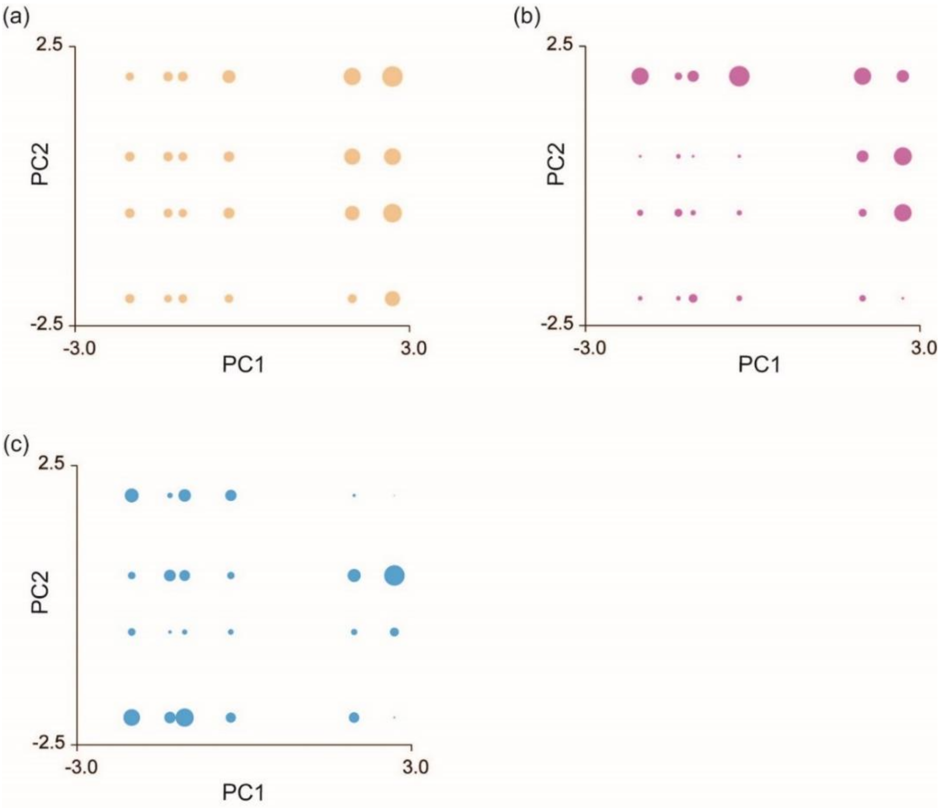


Fig. 6-9 Bubble chart maps of each cell adhesion constructed with scaffold properties (PC1: polymer properties, PC2: peptide properties). (a) FBs, (b) ECs, and (c) SMCs. The size of each bubble was determined by the corresponding the values of normalized cell adhesion rates in Fig. 6-7 (a)-(c).

または (2)PC1 のスコアが低く、PC2 のスコアが高い条件、(3)PC1 のスコアが高く、PC2 が中程度のスコアをもつ条件 (III ペプチド)などの局所的な組み合わせにおいて、SMC がよく接着がする傾向にあることがわかった。これらのようなペプチドと高分子材料の性質の組み合わせマップとして考えると、より機能的な足場材料を開発するには、ペプチドと高分子材料の両性質を十分に注意して設計する必要があるといえる。これらの結果から、足場材料を特徴付けるための測定データの多変量解析によって、より効果的に設計コンセプトを達成しうることが示唆された。

6.3.4. 細胞接着性に対するペプチドと高分子材料の組み合わせ効果のマップ化

市販されている生分解性高分子材料である PCL (M_w: 80000)を医療材料設計のモデル高分子材料として用いて、Fig. 6-9 にて示した細胞接着性のバブルチャートマップの医療材料設計指針としての応用可能性について検証した。まず、モデル高分子材料である PCL のキャラクタリゼーションとして、本研究にて細胞接着性の説明に重要であるとされた指標に関する測定を行った。その結果を Table 6-5 にまとめた。Table 6-5 の結果から、モデル構築のために用いた poly(CL-*co*-DLLA)の性質と比較して、37°C において結晶性が高く、硬い材料であることがわかった。また、僅かに接触角が低いことから、より親水的な傾向にあり、ペプチドの導入量に関しては、poly(CL-*co*-DLLA)の性質と似た傾向にあった。

PCL 基板上及びペプチドを導入した PCL 基板上での細胞接着性の結果を Fig. 6-9 にて示した細胞接着性のバブルチャートマップ上にプロットしたグラフを Fig. 6-10 に示す。Fig. 6-10 の結果から、モデル材料である PCL 基板における細胞接着性 (Fig. 6-10 中の赤丸)がマップの傾向に近いという結果が観察された。したがって、これらの結果は、Fig. 6-9 に示す細胞接着性の傾向マップが、高分子材料とペプチドを組み合わせた際の効果を予測するためのツールとしての応用可能であることを示唆している。本章にて作製したマップが、新たなサンプルとして入力した PCL の細胞接着性の結果を予測できた理由として、PCL がマップ構築に用いられた poly(CL-*co*-DLLA)と似た主鎖骨格や性質を有していたことが挙げられる。つまり、このマップを高分子材料とペプチドリガンドの組み合わせ効果の予測に用いるには、新たなサンプルとなる高分子材料及びペプチドリガンドの性質が、poly(CL-*co*-DLLA)や RRR 及び ATK ペプチドの性質と似ていることが必要である。言い換えると、物理化学的な性質が近いサンプルであれば、特殊な化学構造を有していても適応可能であると考えられる。

Table. 6-5 Characterization of the PCL plate

Melting point [a] (°C)	Delta H [a] (mJ/mg)	Loss modulus [b] (Pa)	Contact angle [c] (°)	Sulfur/Carbon [d] ratio (-)	Nitrogen/Carbon [d] ratio (-)
58.0	62.9	3.11×10^5	89.0	0.029	0.081

a. Determined by DSC (temperature: 0-120°C, heating rate: 5°C/min).

b. Determined by a rheometer (frequency: 0.1-100 rad/ s, strain: 0.1%, temperature: 37°C).

c. Measurement was carried out three times (temperature: 37°C).

d. Calculated from surface compositions obtained by an X-ray photoelectron spectrometer.

6.4. 考察

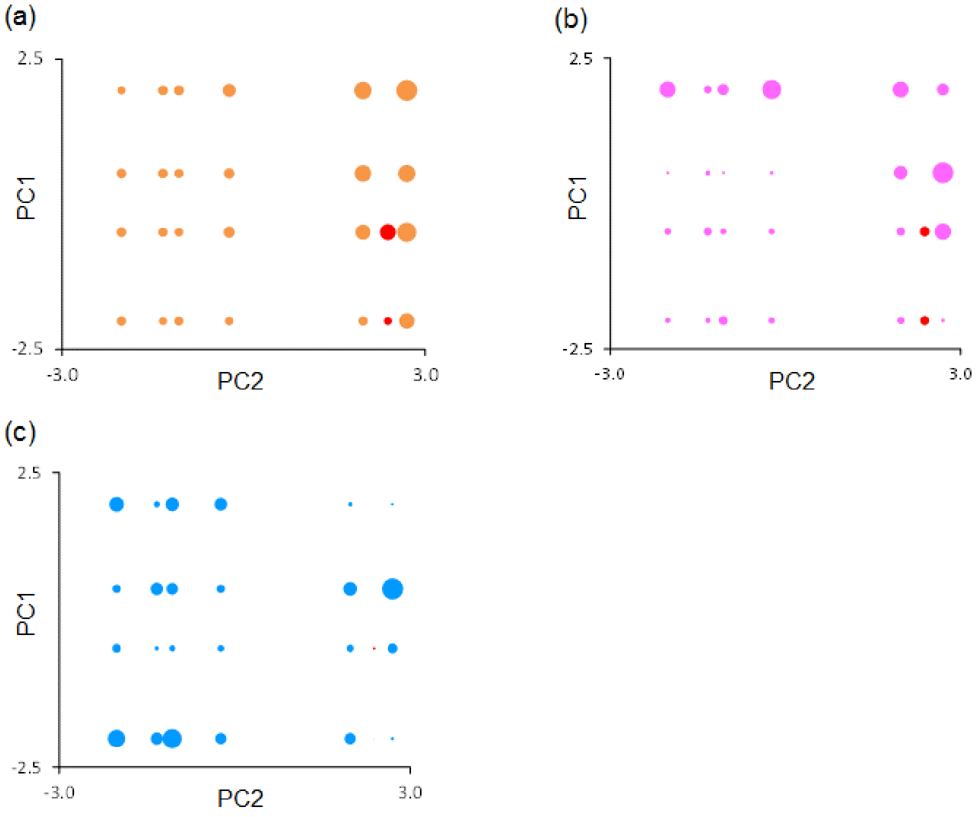


Fig. 6-10 Bubble chart maps of each cell adhesion constructed in Fig. 6-9. On the each maps, the values of normalized cell adhesion ratios on the PCL scaffolds were plotted with red bubble. (a) FBs, (b) ECs, and (c) SMCs.

生体分子によって機能化された生体親和的な高分子材料の設計において、様々な指標が細胞と高分子材料間の相互作用に影響を及ぼすことが報告されている [27]。組織工学的な応用のための精巧に設計された高分子材料上において生体分子の機能を最大化させられる足場材料を開発するためには、生体分子と高分子材料のそれぞれの指標の複雑な組み合わせを理解するための、より実践的かつ定量的なデータ解析が必要となる。そのため、筆者らは前報において、同一の細胞接着性ペプチドの機能が、固定先となる刺激応答性高分子材料表面の濡れ性を変化させることによって大きく増減されることを報告している [19]。しかしながら、近年の研究で濡れ性などの物理化学的な性質以外の物性値も足場材料の機能性を変化しうることが報告されてきた。具体的には、メカノバイオロジー分野の研究がトポロジー的な性質や機械的な性質が細胞の挙動に及ぼす影響について幅広く調査されている [14-16]。そのため、本研究では、細胞接着に関与する様々な高分子の性質 (熱的性質及び機械的性質、物理化学的性質、トポロジー的性質など)の効果について検証した。筆者らが知る限り、本研究の試みは高分子材料の性質と細胞選択的接着ペプチドとの組み合わせの効果についての初めての定量的な検証である。

本研究で用いた高分子基板は幅広い性質を有しており (Table 6-1)、ペプチドと高分子材料の様々な組み合わせの検証が可能である。さらに、本研究での検証は、一般的に知られている生物学的な細胞応答でなく、物性的に制御される細胞応答に着目している。例えば、作製された 6 種類の高分子基板の損失弾性率は 10^2 から 10^6 Pa の広範囲に渡っており (Table 6-1)、これまでの報告で検証されている損失弾性率の範囲を十分に包括している [17, 21]。細胞接着評価のデータから、P1 及び P3 の基板上にて FB がスフ

ェロイド様の凝集体を形成することがわかっており、この結果は前報において確認された、NIH3T3 の凝集体の形成の傾向と一致した[17]。また、RGDS 固定化 P3 の基板で同様の FB の応答が観察された。この結果は、高分子材料の性質がある条件では、インテグリンを介した接着のような生物学的な効果に打ち勝ってしまうことを示唆している。興味深いことに、パラメータ選抜においても流動性の性質に関連する損失弾性率のパラメータが選択されていた (Table 6-3)。水接触角は細胞の接着を誘導するための重要なパラメータである。しかしながら、本研究で用いた高分子基板の水接触角のバリエーションは小さかったが、細胞の接着は大きく変化することがわかった (Table 6-1、3)。これらの足場材料上において、FB 及び SMC の接着は、TCPS と比較して大きく増加したが、EC の接着は減少した。これらの結果から、生体分子が固定されていない高分子基板は、細胞の接着選択性を有していることが考えられる。つまり、ペプチドが配列による効果でなく、物性に基づいて細胞選択的な接着が制御できるという筆者らのコンセプトを支持する結果であった。Kanie らは、ペプチド配列が全く同一ではない様々なアナログ配列 (AAA 及び AAC、AAG など)も同様の細胞選択的な接着性を有することを報告している[9, 12]。しかしながら、本研究で得られた細胞接着性が合成高分子の性質によっても同様に制御されるという結果は、筆者らの研究コンセプトの領域を広げる結果であった。

本研究で得られた結果においてペプチドに注目すると、ペプチドの効果が最大化されるようなペプチドと高分子材料の性質の組み合わせの傾向があることがわかる。EC 選択的接着ペプチドである CAG は、元々ペプチドアレイスクリーニングによって取得されたが、PCL 製の足場材料上に応用したところ、in vitro 及び vivo のいずれにおいても十分な EC 選択的接着が確認された[9-11]。しかしながら、本研究で用いた足場材料では、CAG は P2 及び P4、P6 でのみ EC 選択的な接着の様子が観察された。詳細としては、P2 との組み合わせでは FB の接着率と比較して 1.7 倍、P4 及び P6 では FB 及び SMC の接着率と比較して 2.0 倍以上に改善された。つまり、これらの結果から、今回用いた高分子基板上では、ペプチドの接着性の機能が変化したと言える。また、P2 及び P4、P6 の高分子基板が RGDS と組み合わせられた場合の各細胞の接着の様子と比較すると、EC の接着が他の細胞と比較して 0.2-1.3 倍程度であった (Table 6-6)。したがって、ペプチドと高分子材料の性質との組み合わせによる効果によって、元々確認されていた CAG の機能が減少したと考えられる。ATK のペプチドは、Fig. 6-8 に示すように SMC 選択的な接着性が確認されており、RRR は FB 選択的な接着性を有することが前報にて報告されている[12, 19]。それぞれのペプチドの機能は、ある高分子基板上では維持されているものの、また別の高分子基板上では、その機能が変化 (減少)した。筆者らは、前報において、元々EC 選択的な性質を示していた III ペプチドの機能が、組み合わせる高分子材料の性質によって変化することを報告している[19]。これらの結果は、ペプチドと高分子材料それぞれの性質とそれらを組み合わせによって細胞の接着性が決まることを示唆している。言い換えると、異なるプラットフォームでのスクリーニングによって取得してきた機能性ペプチドは、高分子材料の性質によって簡単に変化してしまうリスクがある。したがって、本研究のような体系的な解析によって最適な条件を注意深く検証する必要がある。

本研究での細胞接着評価は、何れの細胞においても血清存在下での試験を行っている。そのため、どの条件においても血清中のタンパク質による影響を無視できない。そこで、PCL 基板を用いて、各種ペプチドを固定化した条件に対して、血清の有無による影響を検証した (Fig.6-11)。この結果から、まずペプチドを固定していない基板においては、細胞ごとの接着性に対する血清の影響の大きさは異なるものの、血清なしの条件ではやはり接着が抑制される結果となった。RGDS のペプチドを固定化した条件では、細胞ごとに PCL 材料基板への接着性の差は確認されたが、血清の有無では顕著な差は確認できなかった ($p > 0.05$)。これは、RGDS がタンパク質を介することなく、細胞表面の膜タンパクであるインテグリンへ直接相互作用するためであると考えられる。一方で、細胞選択的ペプチドである CAG や RRR の条件では、血清の有無による影響に非常に敏感であることがわかった ($p < 0.05$)。面白いことに、全体の傾向として、血清のない条件では細胞の接着性は下がるものと予想されたが、RRR のペプチドを固定化した基板においては、FB の接着は血清のない条件でその接着性が増加した。これは、FB が RRR を固定

Table 6-6 EC-selective adhesion performance of CAG and RGDS.

	CAG			RGDS	
	p value	EC adhesion / FB adhesion	EC adhesion / SMC adhesion	EC adhesion / FB adhesion	EC adhesion / SMC adhesion
P1	0.208	1.7	0.9	0.4	0.7
P2	0.044 *	**1.7**	**1.1**	**0.5**	**1.3**
P3	0.869	1.2	1.0	1.1	1.1
P4	0.002 *	**2.3**	**2.5**	**0.3**	**1.0**
P5	0.459	1.2	1.3	0.5	0.5
P6	0.061	**2.0**	**2.0**	**0.2**	**0.3**

The *p* values were evaluated by one-way ANOVA.

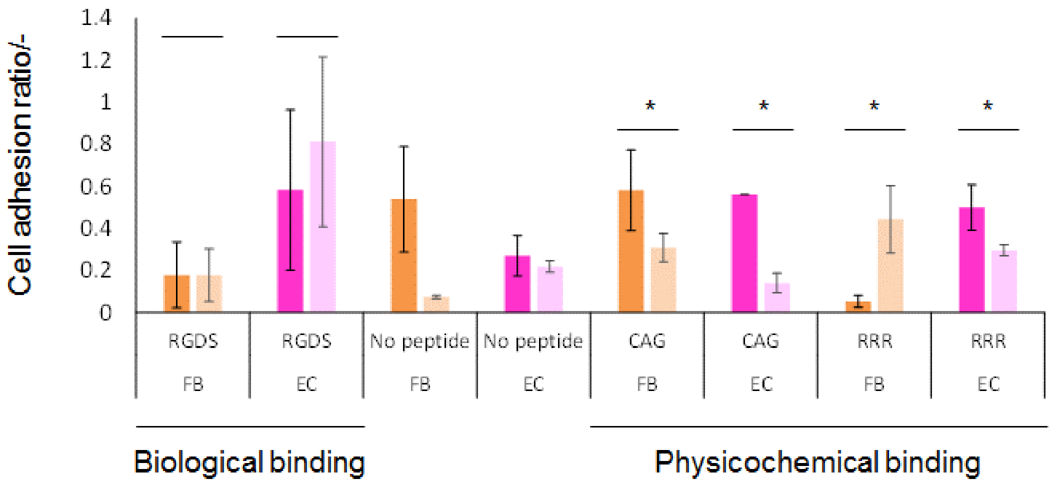


Fig. 6-11 Cell adhesion performances on the PCL plates immobilized with or without peptide at 1 day after the seeding. The cell adhesion ratio is the number of adherent cells on each scaffold divided by that on TCPS (FB with serum: yellow, FB without serum: light yellow, EC with serum: pink and EC without: light pink). The p values were evaluated by Student's t test (**p* < 0.05).

化した条件において接着しやすいという過去の報告とも一致する傾向である [12, 19]。しかしながら、過去の報告では血清存在下でも接着が向上する傾向が観察されていたが、過去の報告では固定化した材料が本研究で用いた PCL よりも親水的な材料 (poly(NIPAAm-*co*-CIPAAm)及び cellulose)であることがわかっている。今回の結果は、そうした基材の性質の違いによる影響に起因すると考えられる。また、RGDS ペプチドと RRR 及び CAG ペプチドにおける、血清の影響に対する異なる応答は、ペプチドリガンドの種類が生物学的な相互作用で機能する種類なのか、ペプチド自身のもつ物性の性質 (物理化学的な性質)で機能する種類なのか、の違いに起因すると考えられる。本研究で用いた細胞選択的接着ペプチドについては、それらを特異的に認識する膜タンパク質などは報告されておらず、むしろ物理化学的な性質によって機能していると報告されている [9, 12]。そのため、必然的に、表面に吸着するタンパク質の影響も大きくなることが予想されるが、血清中のタンパク質のうち、どのタンパク質がどのくらい吸着して、どのように影響を及ぼすか、を詳細に検証することは現実的に困難である。しかしながら、生体材料としての応用を考慮すると、最終的には、血清存在下における接着性が最も重要となることは明白である。

そのため、筆者は、血清存在下のような“ファジーな”環境での接着現象について、統計的な手法を通して客観的かつ多次元的に解釈することで、物理化学的な性質のリガンドを用いた際の生体材料設計における新たな知見の取得を期待した。本章の結果として、血清存在下において、ペプチドリガンドの性質と高分子材料の性質から細胞の接着性を予測することが可能であることが示唆されている。

本研究では、細胞選択的な足場材料を総合的に設計するために、足場材料の細胞選択的な機能と、ペプチド及び高分子材料の性質の組み合わせとの相関性が各細胞接着性マップ (Fig. 6-9、10)や細胞選択的接着マップ(Fig. 6-12)を用いて検証された。このようなマッピングによる解釈から、多変量解析を用いた、生体分子と高分子材料について特徴付ける有効なデータの利用の重要性が示唆された。ペプチドと高分子材料の組み合わせの効果のデータセット構築、蓄積されることで、ペプチドと高分子材料を最適に組み合わせるための指針のような応用が期待できる。さらに、答えとなる生物学的なデータは細胞接着数だけでなく、接着面積及び接着斑の数などのより詳細な接着性に関するデータや、増殖率や分化などの細胞機能も想定される。実際に、Lynn らによって、高分子マイクロアレイから得られる高分子材料の物性データに基づいて幹細胞のコロニー形成能を予測するモデルが構築されている [28]。

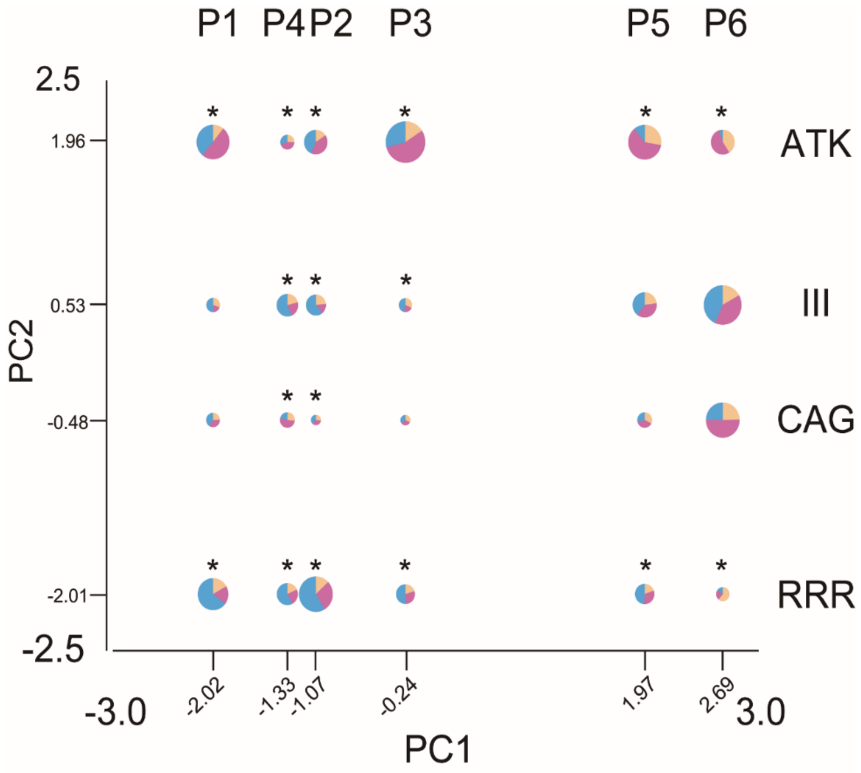


Fig. 6-12 A cell-selective adhesion map based on scaffold properties (PC1: polymer properties, PC2: peptide properties). The size of each circle was determined by the largest amount of cell adhesion among three types of cells (FBs (yellow), ECs (pink), SMCs (blue)). The proportion values of each cell in the circles were the same as the data for Fig. 6-7 (d). The p values were evaluated by one-way ANOVA (*$p < 0.05$).

6.5. 結言

医療への応用を目的として高分子足場材料上に細胞選択的な接着性を設計する際に、ペプチドと高分子材料の性質の組み合わせの効果が存在することが本研究において示された。これらの発見から、細胞選択的な接着性表面を設計するために、物性に基づく細胞との相互作用についてのペプチドと高分子材料の性質データの両面からの解析の重要性が示唆されている。さらに、取得データの解析は、細胞挙動の制御に重要な因子として、筆者らが提唱する物性をベースとした材料設計のコンセプトを裏づける結果であった。効果的な物性をベースとした細胞制御メカニズムは、最終的に完全合成による設計の可能性を秘めているため、医療用材料の設計コストや品質の安定性の向上に繋がることが期待できる。

6.6. 参考文献

1 Chen, G. P.; Ushida, T.; Tateishi, T., A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000,** *51*, 273-279.

2 Yokota, T.; Ichikawa, H.; Matsumiya, G.; Kuratani, T.; Sakaguchi, T.; Iwai, S.; Shirakawa, Y.; Torikai, K.; Saito, A.; Uchimura, E.; Kawaguchi, N.; Matsuura, N.; Sawa, Y., In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **2008,** *136*, 900-907.

3 Cardinal, K. O.; Williams, S. K., Assessment of the Intimal Response to a Protein-Modified Stent in a Tissue-Engineered Blood Vessel Mimic. *Tissue Engineering Part A* **2009,** *15*, 3869-3876.

4 Aoki, J.; Serruys, P. W.; van Beusekom, H.; Ong, A. T. L.; McFadden, E. P.; Sianos, G.; van der Giessen, W. J.; Regar, E.; de Feyter, P. J.; Davis, H. R.; Rowland, S.; Kutryk, M. J. B., Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34 - The HEALING-FIM (healthy endothelial accelerated lining inhibits neointimal growth-first in man) registry. *Journal of the American College of Cardiology* **2005,** *45*, 1574-1579.

5 Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E., Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **1984,** *309*, 30-33.

6 Graf, J.; Ogle, R. C.; Robey, F. A.; Sasaki, M.; Martin, G. R.; Yamada, Y.; Kleinman, H. K., A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell-adhesion and binds the 67000 laminin receptor. *Biochemistry* **1987,** *26*, 6896-6900.

7 Yin, M.; Yuan, Y.; Liu, C.; Wang, J., Development of mussel adhesive polypeptide mimics coating for in-situ inducing re-endothelialization of intravascular stent devices. *Biomaterials* **2009,** *30*, 2764-2773.

8 Kong, D.; Melo, L. G.; Mangi, A. A.; Zhang, L.; Lopez-Ilasaca, M.; Perrella, M. A.; Liew, C. C.; Pratt, R. E.; Dzau, V. J., Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered

endothelial progenitor cells. *Circulation* **2004,** *109*, 1769-1775.

9 Kanie, K.; Narita, Y.; Zhao, Y. Z.; Kuwabara, F.; Satake, M.; Honda, S.; Kaneko, H.; Yoshioka, T.; Okochi, M.; Honda, H.; Kato, R., Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells. *Biotechnology and Bioengineering* **2012,** *109*, 1808-1816.

10 Khan, M.; Yang, J.; Shi, C.; Lv, J.; Feng, Y.; Zhang, W., Surface tailoring for selective endothelialization and platelet inhibition via a combination of SI-ATRP and click chemistry using Cys-Ala-Gly-peptide. *Acta Biomaterialia* **2015,** *20*, 69-81.

11 Kuwabara, F.; Narita, Y.; Yamawaki-Ogata, A.; Kanie, K.; Kato, R.; Satake, M.; Kaneko, H.; Oshima, H.; Usui, A.; Ueda, Y., Novel Small-Caliber Vascular Grafts With Trimeric Peptide for Acceleration of Endothelialization. *Annals of Thoracic Surgery* **2012,** *93*, 156-163.

12 Kanie, K.; Kato, R.; Zhao, Y. Z.; Narita, Y.; Okochi, M.; Honda, H., Amino acid sequence preferences to control cell-specific organization of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. *Journal of Peptide Science* **2011,** *17*, 479-486.

13 Hubbell, J. A.; Massia, S. P.; Desai, N. P.; Drumheller, P. D., Endothelial Cell-Selective Materials for Tissue Engineering in the Vascular Graft Via a New Receptor. *Bio-Technology* **1991,** *9*, 568-572.

14 Chen, C. S.; Mrksich, M.; Huang, S.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E., Geometric control of cell life and death. *Science* **1997,** *276*, 1425-1428.

15 Ingber, D. E., Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2008,** *97*, 163-179.

16 Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E., Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **2006,** *126*, 677-689.

17 Uto, K.; Mano, S. S.; Aoyagi, T.; Ebara, M., Substrate Fluidity Regulates Cell Adhesion and Morphology on Poly(epsilon-caprolactone)-Based Materials. *Acs Biomaterials-Science & Engineering* **2016,** *2*, 446-453.

18 Mano, S. S.; Uto, K.; Aoyagi, T.; Ebara, M., Fluidity of biodegradable substrate regulates carcinoma cell behavior: A novel approach to cancer therapy. *AIMS Materials Science* **2016,** *3*, 66-82.

19 Kurimoto, R.; Kanie, K.; Idota, N.; Hara, M.; Nagano, S.; Tsukahara, T.; Narita, Y.; Honda, H.; Naito, M.; Ebara, M.; Kato, R., Combinational Effect of Cell Adhesion Biomolecules and Their Immobilized Polymer Property to Enhance Cell-Selective Adhesion. *International Journal of Polymer Science* **2016**.

20 Uto, K.; Muroya, T.; Okamoto, M.; Tanaka, H.; Murase, T.; Ebara, M.; Aoyagi, T., Design of super-elastic biodegradable scaffolds with longitudinally oriented microchannels and optimization of the channel size for Schwann cell migration. *Science and Technology of Advanced Materials* **2012,** *13*.

21 Cameron, A. R.; Frith, J. E.; Cooper-White, J. J., The influence of substrate creep on mesenchymal stem cell behaviour and phenotype. *Biomaterials* **2011,** *32*, 5979-5993.

22 Li, B.; Chen, J. X.; Wang, J. H. C., RGD peptide-conjugated poly(dimethylsiloxane) promotes adhesion, proliferation, and collagen secretion of human fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006,** *79A*, 989-998.

23 Sasaki, H.; Takeuchi, I.; Okada, M.; Sawada, R.; Kanie, K.; Kiyota, Y.; Honda, H.; Kato, R., Label-Free Morphology-Based Prediction of Multiple Differentiation Potentials of Human Mesenchymal Stem Cells for Early Evaluation of Intact Cells. *PloS One* **2014,** *9*.

24 Ito, K.; Hikida, A.; Kawai, S.; Vu Thi Tuyet, L.; Motoyama, T.; Kitagawa, S.; Yoshikawa, Y.; Kato, R.; Kawarasaki, Y., Analysing the substrate multispecificity of a proton-coupled oligopeptide transporter using a dipeptide library. *Nature Communications* **2013,** *4*.

25 Friedman, J.; Hastie, T.; Tibshirani, R., Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software* **2010,** *33*, 1-22.

26 Kawashima, S.; Pokarowski, P.; Pokarowska, M.; Kolinski, A.; Katayama, T.; Kanehisa, M., AAindex: amino acid index database, progress report 2008. *Nucleic Acids Research* **2008,** *36*, D202-D205.

27 Ye, K.; Wang, X.; Cao, L. P.; Li, S. Y.; Li, Z. H.; Yu, L.; Ding, J. D., Matrix Stiffness and Nanoscale Spatial Organization of Cell-Adhesive Ligands Direct Stem Cell Fate. *Nano Letters* **2015,** *15*, 4720-4729.

28 Lynn, D. M.; Anderson, D. G.; Putnam, D.; Langer, R., Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: Parallel synthesis and screening of degradable polymer library. *Journal of the American Chemical Society* **2001,** *123*, 8155-8156.

第 7 章

結言

序章では、プラスチック製品として馴染みの深い高分子材料の開発や産業化の歴史と共に、医療機器としての有用性について概説した。高分子材料を医療機器用の材料として用いる際の課題とその対策となるアプローチ方法を紹介しつつ、中でも生体由来小分子を高分子材料に固定化する方法について注目し、その課題を挙げた。本論文において、材料表面に固定化する分子をリガンドとして定義し、さらに、機能する作用力によって生物学的なリガンドと物理化学的なリガンドの二つのグループに分けて紹介した。特に物理化学的なリガンドを用いる際の課題として、固定先となる材料の性質との組み合わせによって本来のリガンド分子の持っている機能が変化してしまう現象を本論文の問題提起として挙げている。本論文では、本来単なるネガティブデータとして切り捨てられる上記の現象にあえて注目している。そして、その「リガンドと高分子材料との組み合わせの効果」について、材料の物性情報から生体内での相互作用 (生体分子の吸着や細胞の接着、増殖など)を情報解析技術を通して予測・分析する Biomaterials Informatics (BI)的なアプローチを用いた検証を行い、さらに、その検証から作成される組み合わせの傾向を示すマップを用いることで、リガンドの機能を最大限に発揮可能な材料設計法を提案するまでの流れを述べた。これらの内容を踏まえて、本論文は、これまで詳細に解明されていない、リガンド分子の本来の機能が変化してしまう現象の理解対して、BI 的なアプローチから検証し、組み合わせの効果が重要な指標の一つであることを提唱している。

第 2 章では、物理化学的なリガンドの最小ユニットとして、化学官能基をリガンドとしての利用可能性について検証し、まとめた。研究背景として、全身性エリテマトーデス (SLE)自己免疫疾患に着目し、病原物質であるγ-グロブリンを吸着する材料の開発を目標とた。具体的には、カルボキシ基をリガンドとして固定化した繊維状材料を設計し、γ-グロブリン選択的な吸着能について評価した結果、作製したカルボキシ基固定化繊維状材料では、血漿タンパク質の主成分であるアルブミンと比較して 2 倍以上選択的に吸着することを確認した。この事実から、物理化学的リガンドの候補分子として化学官能基レベルまで利用可能であることを明らかにし、BI 的なアプローチに対して新たな糸口となる可能性が示された。

第 3 章では、核酸分子をリガンドとして用いることで、物理化学的リガンドとしての利用可能性を検証している。2 章同様、自己免疫疾患に着目しながら、標的分子として抗 DNA 抗体を対象とし、抗 DNA 抗体を選択的に吸着可能な材料の開発を目指した。具体的には、以下の二つのアプローチに取り組み、検証した。一つ目は、抗血栓性繊維状材料に核酸リガンドを固定化するアプローチであり、二つ目は、核酸リガンドを methacrylate 化することにより合成した DNA コンジュゲートモノマーを用いて、高分子材料を作製し、繊維状へ成型加工するアプローチである。これらの検証の結果から、感染リスクフリーな材料設計として有用であることが示された。二つのアプローチから作製した材料を用いて、抗 DNA 抗体の吸着能評価を行った結果、DNA コンジュゲート高分子材料において、抗 DNA 抗体が有意に吸着する様子が確認された。今後の展望として、異なるタンパク質の吸着性を検証し、吸着選択性を評価することで、分子選択的に機能制御可能な物理化学的なリガンドとしての応用が期待されると共に、BI 的なアプローチへの展開が予想される。

第 4 章では、生体分子に比べてよりファジーな細胞を対象とした物理化学的リガンドの探索を目指し、細胞を選択的に制御するリガンドとして機能性ペプチドリガンドの探索技術を構築した。特に、骨形成を促進するような機能として、骨芽細胞や間葉系幹細胞の選択的な増殖や骨分化を促進しつつ、線維芽細胞の増殖を抑制するようなペプチドリガンドを探索するスクリーニング系を構築し、3 種類の骨形成促進ペプチドを取得した。この結果は、物理化学的なリガンドが細胞を対象とした機能制御が可能であることを示しており、生体分子だけでなく、細胞の機能についても BI 的なアプローチが有効である可能性を示唆するものである。

第 5 章では、物理化学的なリガンドを応用する際に生じる「リガンドと高分子材料との組み合わせの効果」について検証するため、濡れ性の異なる高分子材料と細胞接着制御ペプチドを組み合わせた際の細胞接着選択性への影響について調査した。結果として、濡れ性の変化によってペプチドリガンドの

元々有していた細胞選択的な接着機能が大きく変化してしまうことを確認した。さらに、この結果から、組み合わせの影響が高分子材料の物性値を用いて考察できることを明らかにした。この考察は、「リガンドと高分子材料との組み合わせの効果」をより詳細に組み合わせの影響を検証するために、物性情報を利用する BI 的なアプローチを行うためには非常に貴重なものである。

第 6 章では、5 章において確認された「リガンドと高分子材料との組み合わせの効果」についてより詳細に検証するため、BI 的なアプローチとして、リガンドと高分子材料の物性情報（濡れ性、電荷、疎水度 etc.）から細胞の接着性を情報解析技術により予測・分析することを試みた。これにより、リガンドと高分子材料の組み合わせの関係性の傾向について理解することができ、本章では、この傾向をマップを用いて示した。さらに、その傾向マップは、バイオマテリアルを設計・開発する際の第一段階の設計指針としても利用できることを、実際の医療機器設計を具体例としたケーススタディから検証した。つまり、この応用方法は、リガンド分子を用いたバイオマテリアルを設計する際の BI 的なアプローチによる新規の材料設計法であることを示唆している。

本論文で紹介したようにリガンドを用いる生体材料開発では、本来、生体環境を模倣するための機能性分子としてリガンド分子が用いられる。特に、そのリガンド分子の中でも物理化学的に作用するリガンドは BI 的なアプローチによって物性情報に置き換えることができる。したがって、この BI 的なアプローチでは、生物由来のリガンド分子を固定化した高分子材料を、リガンド分子を側鎖とする高分子材料として捉えることもでき、生体に倣いつつも完全化学合成によって設計することも可能となることも言及している。これは、生体模倣材料が低感染リスクでかつ安定的に製造できる可能性を示唆するものであり、本博士論文は、承認審査が厳しいわが国において非常に価値のある取り組みであったことを意味している。

これまで、様々な医療機器が開発されてきているが、ヒトの臓器や組織のパフォーマンスを超える医療機器は未だに報告されていない。高分子材料の特性は、ヒトの組織がとりうる範囲の性質を大きく包括している。しかしながら、生体組織との親和性の低さから、組織や臓器などの生体内環境に接触した際に生じる免疫反応に起因する線維化などの不具合が生じ、再手術や機器の交換が余儀なくされる。こうした課題に対し、生体との親和性をより最適に高めるために、本論文にて提言した“小分子リガンドと高分子材料の組み合わせによる効果”という新たな材料設計指標が足がかりとなり、安全かつ安価な医療材料の開発研究が発展していくことを期待する。

【発表リスト】

本研究は、以下に示す論文、学会において発表した。

【発表論文 (Proceedings 含む)】

1. **Rio Kurimoto**, Koki Namekawa, Amanda Ellis, Masanobu Naito and Mitsuhiro Ebara, "Selective Adsorption of Globulin on Nanofiber Meshes for Immunoadsorption Therapy", *New Journal of Chemistry*, 42 (4), 2916-2922, (2018)
2. **Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Koichiro Uto, Shun Kawai, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, Masanobu Naito, Mitsuhiro Ebara and Ryuji Kato, "Combinational Effects of Polymer Viscoelasticity and Immobilized Peptides on Cell Adhesion to Cell-Selective Scaffolds", *Analytical Sciences*, 32 (11), 1195-1202, (2016)
3. **Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Naokazu Idota, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Takehiko Tsukahara, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, Masanobu Naito, Mitsuhiro Ebara and Ryuji Kato, "Combinational Effect of Cell Adhesion Biomolecules and Their Immobilized Polymer Property to Enhance Cell-selective Adhesion", *International Journal of Polymer Science*, 2016, Article ID 2090985, (2016)
4. **Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Naokazu Idota, Koichiro Uto, Takehiko Tsukahara, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiro Ebara, "Property-tunable polymer platform for optimizing cell-adhesive peptide function", *Tissue Engineering Part A*, 21, S303. (2016)
5. Ryo Takai, **Rio Kurimoto**, Yasuhiro Nakagawa, Yohei Kotsuchibashi, Koki Namekawa and Mitsuhiro Ebara, "Towards a Rational Design of Zeolite-polymer Composite Nanofibers for Efficient Adsorption of Creatinine", *Journal of Nanomaterials*, 2016, Article ID 5638905, (2016)
6. Kei Kanie, **Rio Kurimoto**, Jing Tian, Katsumi Ebisawa, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, and Ryuji Kato, "Screening of Osteogenic Enhancing Short Peptides from BMPs for Biomimetic Material Applications", *Materials*, 9 (9),730, (2016)

【発表総説】

1. 蟹江 慧, **栗本 理央**, 荏原 充宏, 加藤竜司, "バイオマテリアル応用のための細胞接着ペプチドと合成高分子材料の組み合わせ効果", バイオサイエンスとインダストリー, 74, 6, 1-3. (2016)
2. **Rio Kurimoto**, Eri Niiyama and Mitsuhiro Ebara, "Section 4: Fibrous Materials, Chapter 5: Next Generation Technologies" in BIOMATERIALS NANOARCHITECTONICS. (2016)
3. **栗本 理央**, 高井 僚, 小土橋 陽平, 荏原 充宏, "災害時に透析患者を救うナノファイバーの開発", WEB journal, 21, 6, 7-9. (2015)

【国際学会及びシンポジウムにおける研究発表】

1. ○**Rio Kurimoto**, Koki Namekawa, Amanda Ellis, Masanobu Naito and Mitsuhiro Ebara, "Design of Nanofiber Meshes Adsorbing a Target Molecule Selectively for Immunoadsorption Therapy" (poster), MANA symposium 2018, Ibaraki, Japan 2018 年 3 月 (ポスター 査読なし)
2. ○Mirei Tsuge, **Rio kurimoto**, Akihiko Kikuchi, and Mitsuhiro Ebara, "Development of water absorptive

nanofiber meshes for hemodialysis treatments", MANA symposium 2018, Ibaraki, Japan 2018 年 3 月 (ポスター 査読なし)

3. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Koichiro Uto, Shun Kawai, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiro Ebara, "Combinational Effects of Viscoelastic Polymers and the Immobilized Peptides to Regulate Selective Cell Adhesion", 5th International Symposium Smart Biomaterials, Shanghai, China 2017 年 10 月 (ポスター 査読なし)
4. ○Mirei Tsuge, Ryo Takai, **Rio kurimoto**, Akihiko Kikuchi, and Mitsuhiro Ebara, "Development of water adsorptive nanofiber meshes for hemodialysis treatments", 5th International Symposium Smart Biomaterials, Shanghai, China 2017 年 10 月 (ポスター 査読なし)
5. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Koichiro Uto, Shun Kawai, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiro Ebara, "Combinational Effects between Smart Polymers and Peptides on Selective Cell Adhesion", TSUKUBA GLOBAL SCIENCE WEEK 2017, Ibaraki, Japan 2017 年 9 月 (ポスター 査読なし)
6. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Koichiro Uto, Shun Kawai, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiro Ebara, "Map analysis of combinational effects between viscoelastic polymers and peptides for design of selective cell adhesion surface", MANA symposium 2017, Ibaraki, Japan 2017 年 3 月 (ポスター 査読なし)
7. ○Ryo Takai, **Rio Kurimoto**, and Mitsuhiro Ebara, "Design of Zeolite/polymer Composite Nanofiber Meshes for a New Treatment of Kidney Failure Diseases", Second International Symposium on Biointerface Science and Engineering, Taipei, Taiwan 2016 年 9 月 (ポスター 査読なし)
8. ○Ryo Takai, **Rio Kurimoto**, Yohei Kotsuchibashi and Mitsuhiro Ebara, "Smart Nanofiber Meshes for development of wearable uremic toxins removal devices", TSUKUBA GLOBAL SCIENCE WEEK 2016, Ibaraki, Japan 2016 年 9 月 (ポスター 査読なし)
9. ○Ryo Takai, **Rio Kurimoto**, Yohei Kotsuchibashi and Mitsuhiro Ebara, "Effects of Zeolite-Polymer Nanofiber Composites on the Cytotoxicity of Macrophages", 2nd International Symposium on Nanoarchitectnics for Mechanobiology, Ibaraki, Japan 2016 年 7 月(ポスター 査読なし)
10. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Koichiro Uto, Shun kawai, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiro Ebara, "Combinational Effects of Viscoelasticity of Substrate and the Immobilized Peptides on Selective Cell Adhesion", 2nd International Symposium on Nanoarchitectnics for Mechanobiology, Ibaraki, Japan 2016 年 7 月(ポスター 査読なし)
11. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiro Ebara, "Design of a smart polymer platform in combinations with biomolecules", NanoCentre Annual Conference 2016, Adelaide, Australia 2016 年 6 月 (ポスター 査読なし)
12. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiro Ebara, "Design of a smart polymer platform in combination with biomolecule for biosensor", Japan-Thailand Joint Meeting on Functional Nanomaterials 2016, Bangkok, Thailand 2016 年 5 月 (口頭 査読なし)
13. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Koichiro Uto, Ryuji Kato, Masanobu Naito and Mitsuhiro Ebara, "Appropriate Combinations of Polymeric Materials and Peptides Could Provide Selective Cell Adhesion",

MANA symposium 2016, Ibaraki, Japan 2016 年 3 月 (ポスター 査読なし)

14. ○Ryo Takai, **Rio Kurimoto**, Yohei Kotsuchibashi and Mitsuhiro Ebara, "Fabrication of Smart Nanofiber Meshes for New Kidney Failure Diseases Treatment", MANA symposium 2016, Ibaraki, Japan 2016 年 3 月 (ポスター 査読なし)
15. ○Kei Kanie, Jing Tian, Katsumi Ebisawa, **Rio Kurimoto**, Tsuneharu Suzuki, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, and Ryuji Kato, "Screening of cell-differentiation peptides for enhancing bone regeneration", The 21th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, Chuncheon, South Korea 2015 年 10 月 (口頭 査読あり)
16. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Naokazu Idota, Koichiro Uto, Takehiko Tsukahara, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, Masanobu Naito, Ryuji Kato and Mitsuhiro Ebara, "Property-tunable polymer platform for optimizing cell-adhesive peptide function", 4rd TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) World Congress 2015, Boston, USA 2015 年 9 月 (ポスター 査読あり)
17. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Koichiro Uto, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Yuji Narita, Ryuji Kato, Masanobu Naito and Mitsuhiro Ebara, "Both substrate fluidity and immobilized peptides can regulate cell morphology", International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, Ibaraki, Japan 2015 年 7 月 (ポスター 査読なし)
18. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Koichiro Uto, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Ryuji Kato, Masanobu Naito and Mitsuhiro Ebara, "Design of Cellular-compatible Nano-interfaces Engineered by Polymer-peptide Combinations", NIMS conference 2015, Ibaraki, Japan 2015 年 7 月 (ポスター 査読なし)
19. ○Kei Kanie, Jing Tian, Katsumi Ebisawa, **Rio Kurimoto**, Tsuneharu Suzuki, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, and Ryuji Kato, "Screening of cell-differentiation peptides for enhancing bone regeneration", ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 2015 ANNUAL MEETING, Stockholm, Sweden 2015 年 6 月 (ポスター 査読あり)
20. ○Shun Kawai, Miki Horikawa, **Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Aika Ogata, Yuji Narita, Hiroyuki Honda, and Ryuji Kato, "Property based peptide design for cellular scaffold", 14th Annual World Preclinical Congress, Boston, USA 2015 年 6 月 (ポスター 査読あり)
21. ○Kei Kanie, **Rio Kurimoto**, Mitsuhiro Ebara, Naokazu Idota, Yuji Narita, Hiroyuki Honda and Ryuji Kato, "Design of hybrid biomaterials using artificial material and biological molecule", TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine) EU Chapter Meeting 2014, Genova, Italy 2014 年 6 月 (ポスター 査読あり)
22. ○**Rio Kurimoto**, "Design of medical device surface for vascular tissue regeneration", International Symposium on Smart Biomaterials, Ibaraki, Japan 2014 年 3 月 (ポスター 査読なし)
23. ○**Rio Kurimoto**, Kei Kanie, Mitsuhiro Ebara, Naokazu Idota, Tsuneharu Suzuki, Yuji Narita, Hiroyuki Honda and Ryuji Kato, "Design of medical device surface for vascular tissue regeneration", IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya, Japan 2013 年 9 月 (ポスター 査読なし)

【国内学会及びシンポジウムにおける研究発表】

1. ○柘植美礼, **栗本理央**, 荏原充宏, 菊池明彦, "血液透析代替システムを目指した吸水性ナノファイバーメッシュの作製及び性能評価", 第39回日本バイオマテリアル学会大会, 東京 2017年 11月 (ポスター)
2. ○**栗本理央**, 高井僚, 荏原充宏, "途上国での透析代替治療を目指したウェアラブルデバイスの開発", 第55回日本人工臓器学会大会, 東京 2017年 9月 (ポスター)
3. ○**栗本理央**, 高井僚, 荏原充宏, "途透析代替治療の実現に向けた尿毒素分子選択的なナノファイバーメッシュの作製", 第66回高分子学会年次大会, 千葉 2017年 5月 (ポスター)
4. ○柘植美礼, 高井僚, **栗本理央**, 荏原充宏, 菊池明彦, "途上国での血液透析代替システムの実現を目指した吸水性ナノファイバーメッシュの開発", 第66回高分子学会年次大会, 千葉 2017年 5月 (ポスター)
5. ○**栗本理央**, 蟹江慧, 宇都甲一郎, 河合駿, 原光生, 永野修作, 成田裕司, 本多裕之, 内藤昌信, 荏原充宏, 加藤竜司, "メカノバイオロジーにおける流動性材料と機能性生体分子の組み合わせによる細胞選択的な接着性制御の検討", 第16回日本再生医療学会総会, 宮城 2017年 3月 (口頭)
6. 蟹江慧, ○大口明日基, **栗本理央**, 下川淳, 北村雅人, 緒方藍歌, 成田裕司, 清水一憲, 本多裕之, 荏原充宏, 加藤竜司, "細胞機能性ペプチド修飾ポリカプロラクトンの設計と機能性評価", 第16回日本再生医療学会総会, 宮城 2017年 3月 (口頭)
7. ○高井僚, **栗本理央**, Allison Abdilla, 荏原充宏, "ナノファイバーメッシュを用いた携帯型尿毒素除去装置の開発", つくば医工連携フォーラム2017, 茨城 2017年 1月 (口頭)
8. ○柘植美礼, 高井僚, **栗本理央**, 菊池明彦, 荏原充宏, "血液透析代替システムの実現を目指した吸水性ナノファイバーメッシュの開発", つくば医工連携フォーラム2017, 茨城 2017年 1月 (ポスター)
9. ○高井僚, **栗本理央**, 荏原充宏, "携帯型尿毒症治療システムのためのゼオライト/EVOH ナノファイバーメッシュの開発", 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016, 福岡 2016年 11月 (口頭)
10. ○Ryo Takai, **Rio Kurimoto**, and Mitsuhiro Ebara, "Design of Zeolite-polymer Composite Nanofiber Meshes as a New Treatment of Kidney Failure Diseases", 第65回高分子討論会, 神奈川 2016年 9月 (口頭)
11. ○高井僚, **栗本理央**, 小土橋陽平, 滑川亘希, 荏原充宏, "ゼオライト含有 EVOH ナノファイバーメッシュを用いた腕時計型尿毒素除去装置の開発", 第65回高分子討論会, 神奈川 2016年 9月 (ポスター)
12. ○**栗本理央**, 蟹江慧, 宇都甲一郎, 河合駿, 原光生, 永野修作, 成田裕司, 加藤竜司, 内藤昌信, 荏原充宏, "合成高分子と短鎖ペプチドとの組み合わせ効果を用いた細胞選択的材料表面の設計", 日本生物工学若手研究者の集い　夏のセミナー2016, 東京 2016年 7月 (ポスター)
13. ○**栗本理央**, 蟹江慧, 宇都甲一郎, 原光生, 永野修作, 成田裕司, 内藤昌信, 荏原充宏, 加藤竜司, "細胞培養基材においてマテリアル物性がコーティング分子機能に与える影響の検

証”, 第15回日本再生医療学会総会, 大阪 2016年 3月 (ポスター)

14. 荏原充宏, ○<u>**栗本理央**</u>, Sharmy Mano, 宇都甲一郎, “バイオマテリアルの流動性が細胞に与える影響”, 第15回日本再生医療学会総会, 大阪 2016年 3月 (ポスター)

15. ○<u>**栗本理央**</u>, 蟹江慧, 宇都甲一郎, 原光生, 永野修作, 成田裕司, 加藤竜司, 内藤昌信, 荏原充宏, “新規医療機器開発のための材料スクリーニング ～合成ポリマーとペプチドの組み合わせによる細胞接着選択性の検証～”, つくば医工連携フォーラム2016, 茨城 2016年 1月 (ポスター)

16. ○高井僚, <u>**栗本理央**</u>, 小土橋陽平, 荏原充宏, “血液透析代替のためのナノファイバーメッシュの調製とデバイス化”, つくば医工連携フォーラム2016, 茨城 2016年 1月 (ポスター)

17. ○高井僚, <u>**栗本理央**</u>, 小土橋陽平, 荏原充宏, “透析治療の代替を目指した尿毒素吸着インテリジェント不織布の開発”, 第25回インテリジェント材料・システムシンポジウム, 茨城 2016年 1月 (口頭)

18. ○<u>**Rio Kurimoto**</u>, Kei Kanie, Mitsuo Hara, Shusaku Nagano, Yuji Narita, Ryuji Kato, Masanobu Naito and Mitsuhiro Ebara, “Design of cell assay platform with both of synthesizable biomolecules and polymers”, 第25回日本MRS年次大会, 神奈川 2015年 12月 (ポスター)

19. ○<u>**栗本理央**</u>, 蟹江慧, 宇都甲一郎, 原光生, 永野修作, 成田裕司, 加藤竜司, 内藤昌信, 荏原充宏, “高分子材料の粘弾性が及ぼす細胞接着ペプチド効果への影響についての検証”, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都 2015年 11月 (口頭)

20. ○<u>**栗本理央**</u>, 蟹江慧, 井戸田直和, 塚原剛彦, 原光生, 永野修作, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, 内藤昌信, 荏原充宏, “ペプチド修飾型医療機器表面設計のための細胞接着効果の検証”, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都 2015年 11月 (ポスター)

21. ○大口明日基, <u>**栗本理央**</u>, 原田知佳, 蟹江慧, 堀川美希, 下川淳, 北村雅人, 成田裕司, 本多裕之, 荏原充宏, 加藤竜司, “細胞接着ペプチド被覆型医療機器材料の設計”, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都 2015年 11月 (口頭)

22. ○高井僚, <u>**栗本理央**</u>, 小土橋陽平, 荏原充宏, “血液透析を代替するゼオライト含有EVOHナノファイバーメッシュの調製とデバイス化”, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都 2015年 11月 (ポスター)

23. ○堀川美希, 蟹江慧, <u>**栗本理央**</u>, 成田裕司, 竹澤俊明, 加藤竜司, “細胞選択的ペプチドを応用した高機能足場材料の開発”, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都 2015年 11月 (口頭)

24. ○蟹江慧, 田婧, 蛯沢克己, <u>**栗本理央**</u>, 鈴木庸元, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, “骨分化促進のための骨分化誘導ペプチドの探索”, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都 2015年 11月 (口頭)

25. ○蟹江慧, 田婧, 蛯沢克己, <u>**栗本理央**</u>, 鈴木庸元, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, “医療機器被覆応用を目指した骨再生促進ペプチドの探索”, 第67回 日本生物工学会大会, 鹿児島 2015年 10月 (ポスター)

26. ○<u>**栗本理央**</u>, 蟹江慧, 井戸田直和, 宇都甲一郎, 原光生, 永野修作, 塚原剛彦, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, 内藤昌信, 荏原充宏, “医療機器応用に向けた合成高分子と短鎖ペプチドの組み合わせによる細胞選択的材料表面の設計”, 日本生物工学若手研究者の集い 夏

のセミナー2015, 愛知 2015年 7月 (ポスター)

27. ○大口明日基, 栗本理央, 蟹江慧, 堀川美希, 原田知佳, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, "ミニマムECM分子被覆型医療機器材料設計法の開発", 日本生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー2015, 愛知 2015年 7月 (ポスター)
28. ○栗本理央, 蟹江慧, 井戸田直和, 宇都甲一郎, 荏原充宏, 塚原剛彦, 原光生, 永野修作, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, "高分子材料の物性変化による短鎖ペプチドの細胞接着性への影響", 化学工学会第80年会, 東京 2015年 3月 (ポスター)
29. 蟹江慧, ○堀川美希, 河合駿, 栗本理央, 緒方藍歌, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, "短鎖ペプチド全網羅マイクロアレイを用いた細胞培養基質としてのペプチド評価", 第14回日本再生医療学会総会, 神奈川 2015年 3月 (口頭)
30. ○栗本理央, 蟹江慧, 荏原充宏, 井戸田直和, 塚原剛彦, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, "医療材料機能化に向けた細胞接着に対するペプチドと材料表面の関係性評価", 第36回日本バイオマテリアル学会大会, 東京 2014年 11月 (口頭)
31. ○堀川美希, 蟹江慧, 栗本理央, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, "短鎖ペプチド全網羅マイクロアレイを用いた細胞培養基質としてのペプチド評価", 第66回日本生物工学会大会, 北海道 2014年 9月 (ポスター)
32. 蟹江慧, ○栗本理央, 荏原充宏, 井戸田直和, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, "医療機器高機能化のための表面・生体分子・細胞接着の最適化界面ツール", 第13回日本再生医療学会総会, 京都 2014年 3月 (口頭)
33. ○栗本理央, 蟹江慧, 荏原充宏, 井戸田直和, 鈴木庸元, 成田裕司, 本多裕之, 加藤竜司, "医療機器設計を目指したペプチド修飾材料表面の物性評価と細胞接着の関係", 第35回日本バイオマテリアル学会大会, 東京 2013年 11月 (口頭)

【受賞歴等】

1. "POSTER AWARD" (The 5th International Symposium on Smart Biomaterials), 2017 年 10 月
2. "Excellent Poster Award" (Tsukuba Global Science Week Student poster session on Materials Research), 2017 年 9 月
3. "Excellent Poster Presentation Award" (2nd International Symposium on Nanoarchitectnics for Mechanobiology), 2016 年 7 月
4. "トビタテ！留学 JAPAN 採用", 2016 年 5 月
5. "理事長賞" (国立研究開発法人 物質・材料研究機構), 2016 年 4 月
6. "優秀ポスター賞" (生物工学会 若手研究者の集い 夏のセミナー2015), 2015 年 7 月
7. "NIMS Internship Program Fellowship 採用" (国立研究開発法人 物質・材料研究機構), 2012 年 10 月

【アウトリーチ活動】

1. 平成 29 年度 小・中・高校生の科学体験学習支援事業 (堺町立静小学校), 2018 年 2 月
2. 第 5 回科学の甲子園ジュニア全国大会, 2017 年 12 月
3. つくばサイエンスコラボ 2017, 2017 年 11 月

4. いばらき子ども大学, 2017 年 8 月
5. 平成 29 年度 NIMS 一般公開, 2017 年 4 月
6. 平成 29 年度 小・中・高校生の科学体験学習支援事業（笠間市立南小学校), 2017 年 1 月
7. 科学フェスタ in 茨城空港, 2016 年 11 月
8. つくばサイエンスコラボ 2016, 2016 年 11 月
9. 美濃市青少年健全育成「市民のつどい 2016」, 2016 年 10 月
10. イノベーションキャンパス in つくば 2016, 2016 年 8 月
11. G7 茨城・つくば科学技術大臣会合, 2016 年 5 月
12. 平成 28 年度 NIMS オープンハウス, 2016 年 4 月
13. つくばサイエンスコラボ 2015, 2015 年 11 月
14. つくば科学出前レクチャー, 2015 年 6 - 10 月
15. 平成 27 年度 NIMS 一般公開, 2015 年 4 月

【報道】

1. TBS「ワザビト」（研究活動), 2018 年 1 月 28 日
2. 「おしえて！おしゃべりガイコツ」第 27 号（研究活動), 2017 年 7 月 18 日
3. 茨城新聞　紙面掲載　19 面（アウトリーチ活動), 2017 年 1 月 18 日
4. 読売新聞　紙面掲載　33 面 アウトリーチ活動), 2016 年 10 月 23 日
5. 「革新のイズム」（研究活動), 2016 年 10 月 14 日
6. 朝日新聞　紙面掲載　28 面（アウトリーチ活動), 2016 年 10 月 5 日
7. 毎日新聞　紙面掲載　31 面（アウトリーチ活動), 2016 年 7 月 23 日
8. 読売新聞　紙面掲載　33 面（アウトリーチ活動), 2016 年 7 月 13 日
9. 常陽新聞　紙面掲載　1 面（アウトリーチ活動), 2016 年 7 月 13 日
10. TBS「夢の扉+」（アウトリーチ及び研究活動), 2016 年 3 月 13 日
11. 日本経済新聞　紙面掲載　37 面（アウトリーチ活動), 2015 年 9 月 29 日
12. 日経産業新聞　紙面掲載　10 面（研究活動), 2015 年 7 月 14 日
13. 毎日新聞　紙面掲載　24 面（研究活動), 2015 年 6 月 26 日

【その他】

1. 2016 年 6 月　Nanotechnology Students' Summer School 2016 参加
2. 2016 年 11 月~2017 年 2 月　オーストラリア、アデレード Flinders University の Amanda V. Ellis 研究室へ留学 (トビタテ！留学 JAPAN のご支援を頂き留学)
3. "NIMS ジュニア研究員 採用" 2015 年 4 月

【謝辞】

本研究を行うにあたり、終始学生の成長を第一に考え、優しく、時に厳しくご指導とご鞭撻を賜りました筑波大学大学院数理物質科学研究科 荏原充宏 准教授、内藤昌信 准教授、名古屋大学大学院創薬科学研究科 加藤竜司 准教授、名古屋大学工学部化学・生物工学科 本多裕之 教授、名古屋大学大学院創薬科学研究科 蟹江慧 助教授に心より御礼申し上げます。

本論文の執筆にあたり、ご指導とご助言をくださいました筑波大学大学院数理物質科学研究科 陳国平 教授、長崎幸夫 教授、田口哲志 准教授に心より感謝いたします。

本論文第 2、3 章において留学時の研究のご指導と深いディスカッションに加え、現地での生活を支えてくださいました Flinders University (現 Melbourne University) Amanda V. Ellis 教授、Michael Wilson 氏に心より感謝申し上げます。

本論文第 2、3 章において頻繁な研究ディスカッション及び実験のご指導をくださいました日本医療科学大学保健医療学部 滑川亘希 助教授に心より感謝申し上げます。

本論文第 5 章において研究ディスカッション及び実験のご指導をくださいました早稲田大学理工学術院総合研究所 (現法政大学生命科学部講師) 井戸田直和 助教授、東京工業大学科学技術創成研究院 塚原剛彦 准教授に心より感謝申し上げます。

本論文第 5、6 章において研究ディスカッション及び実験のご指導をくださいました名古屋大学ベンチャービジネスラボラトリー 永野修作 准教授、名古屋大学大学院工学研究科 原光生 助教授、小栗良太 氏、武島隆宏 氏に心より感謝申し上げます。

本論文第 6 章において研究ディスカッション及び実験のご指導をくださいました物質・材料研究機構 宇都甲一郎 博士、データ解析の際に丁寧なディスカッション及び親切なご指導をくださいました名古屋大学大学院創薬科学研究科 河合駿 博士に心より感謝申し上げます。

本論文第 4、5、6 章において研究のディスカッションをくださいました名古屋大学大学院医学系研究科 成田裕司 講師に心より感謝申し上げます。

オーストラリア アデレードでの留学生活を支えてくださいました、Flinders University Bou Jack Simon 博士、Cheylan Mckinley さん、生活の支援及びプロジェクトの応援を下さいましたトビタテ!留学 JAPAN 関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、日頃より活発なディスカッションをくださり、私の研究生活を支え、実りのあるものにしてくださった物質・材料研究機構 中西淳 グループリーダー、吉川元起 グループリーダー、上木岳士 主任研究員、吉川千晶 主任研究員、山本翔太 博士、Sharmy Mano Saimon 博士、佐伯純子 氏、飛鷹房子 氏、松本美友希 氏、伊藤芳江 氏、深山達也 氏、岡田佳 氏、静岡理工科大学 小土橋陽平 講師、筑波大学大学院数理物質科学研究科 岡田孝治 博士、佐藤健 博士、新山瑛理 氏、高井僚氏、Elfire Polat 氏、東京理科大学大学院基礎工学研究科 野村奈生人 氏、田辺貫太 氏、柘植美礼 氏、矢野宥人 氏、大内創介 氏に深く感謝申し上げます。また、互いに切磋琢磨しながら、高めあえた同期である中川泰宏 博士、水田亮 博士、杉浦栞理 博士に改めて感謝申し上げます。

名古屋大学での出張実験を遂行するにあたり、研究及び生活のサポートを下さいました、名古屋大学大学院創薬科学研究科 岡田真衣 氏、池田友里圭 氏、森絵美 氏、堀川美希 氏、大口明日基 氏、金子喬士郎 氏、田婧 氏、名古屋大学大学院工学研究科、向井孝次 氏に心より感謝を申し上げます。

インターンシップ生として日頃の実験姿勢からたくさんの刺激を下さいました、Richard Garret 氏、Ee-Faye Chong 氏、稲垣拓也 氏、小林千伽子 氏、黃婉琹 氏、洪培軒 氏、米岡修一郎 氏、Allison Abdilla 氏、Kuan-Lin Ku 氏、Melanie Fuller 氏、Ziwen Wang 氏、欠端佑至 氏に感謝申し上げます。

研究のアウトリーチ活動にてお世話になりました物質・材料研究機構 MANA アウトリーチチームの葉山雅 氏、松井龍也 氏、津毛邦仁 氏、Difei Miao 氏へ心より感謝申し上げます。

最後に、日頃より私の生活を気にかけ、支えてくださった妻 詩歩、父 英一、母 和江に格別なる御礼を申し上げます。

平成 30 年 2 月 22 日　栗本理央