

## 略号

A (Ala) : alanine  
C (Cys) : cysteine  
D (Asp) : aspartic acid  
E (Glu) : glutamic acid  
F (Phe) : phenylalanine  
G (Gly) : glycine  
H (His) : histidine  
I (Ile) : isoleucine  
K (Lys) : lysine  
L (Leu) : leucine  
M (Met) : methionine  
N (Asn) : asparagine  
P (Pro) : proline  
R (Arg) : arginine  
Q (Gln) : glutamine  
S (Ser) : serine  
T (Thr) : threonine  
V (Val) : valine  
W (Trp) : tryptophan  
X (Nle) : norleucine  
Y (Tyr) : tyrosine

1 文字表記 (3 文字表記) : 名称の順で示した.

iPS : induced pluripotent stem  
ECM : extracellular matrix  
HSPGs : heparan sulfate proteoglycans  
FAK : focal adhesion kinase  
LG4 : laminin globular 4  
rec-LG4 : recombinant-LG4  
MMP-9 : matrix metalloproteinase-9  
CM : conditioned media  
BCA : bicinchoninic acid

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis  
DIC : N, N'-diisopropylcarbodiimide  
DMF : N, N'-dimethylformamide  
Fmoc : 9-fluorenylmethoxycarbonyl  
HOBt : N-hydroxybenzotriazole  
HPLC : high performance liquid chromatography  
link amide resin : 4- (2,4-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl) -phenoxy resin  
TFA : trifluoroacetic acid  
ESI-MS : electrospray ionization-mass spectrometry  
MBS : N- (maleimidobenzoyloxy) -succinimide  
MB : maleimidobenzoyloxy  
PBS : phosphate-buffered saline without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$   
BSA : bovine serum albumin  
DMEM : dulbecco's modified eagle's medium  
DMEM-F12 : dulbecco's modified eagle's medium-nutrient mixture F12  
FBS : fetal bovine serum  
HS : horse serum  
HDF : human dermal fibroblasts  
PC12 : rat pheochromocytoma  
ARH-77 : human B-lymphoid cell line  
RPMI-1640 : Roswell park memorial institute-1640  
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid  
Trypsin-EDTA : 0.05 % Trypsin, 0.53 mM EDTA-4Na  
TBS : tris buffered saline  
PFA : paraformaldehyde  
DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole  
NGF : nerve growth factor  
PVDF : polyvinylidene difluoride  
HRP : horseradish peroxidase  
ECL : enhanced chemiluminescence

## 緒論

近年、山中らによって iPS 細胞の技術が開発されたことにより組織工学・再生医療への応用に向けた研究の注目度が高まっている<sup>1)</sup>。組織工学は機能的な組織又は臓器の創製を目的としており、細胞、足場、シグナルの三要素から構成される。組織工学の研究のゴールの一つとして、移植される細胞に対して組織に近い三次元的な環境を提供するバイオマテリアルの開発が挙げられる。現在、細胞培養において培養基材の表面改質が注目されており、様々な表面改質剤を用いて組織に近い環境を構築したインテリジェント型培養基材の研究開発が行われている。生体内では細胞外マトリックス (ECM) が細胞の足場として機能していることから、バイオマテリアルの開発においては ECM の模倣が理想的な足場材料の開発に必須と考えられている<sup>2,3)</sup>。

基底膜は、血管、筋肉、神経の周囲や表皮下など、全身に広く分布している薄い膜状の ECM で、IV 型コラーゲン、ラミニン、ナイドジェンなどのタンパク質や、パールカンなどのプロテオグリカンから構成されている。これらの分子は相互に結合することで三次元の超分子ネットワークを形成し、機械的な支持体や境界として組織の構造的安定性に寄与している<sup>4)</sup>。さらに、基底膜は細胞に積極的に働きかけることによって、細胞の接着、分化、増殖、遊走など、様々な生命現象をコントロールしている<sup>5)</sup>。このように基底膜は多彩な機能を有することから、組織工学の分野においてバイオマテリアル開発のターゲットとして注目されている。

基底膜の構成成分の一つであるラミニンは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖からなる十字架構造をした分子量約 50 万～90 万の糖タンパク質で、細胞接着に重要な役割を果たすほか、器官形成、神経突起伸長、血管新生、創傷治癒、がんの増殖・転移などに深く関与している<sup>6)</sup>。現在までに 5 種類の $\alpha$ 鎖 ( $\alpha 1$ - $\alpha 5$ )、3 種類の $\beta$ 鎖 ( $\beta 1$ - $\beta 3$ )、3 種類の $\gamma$ 鎖 ( $\gamma 1$ - $\gamma 3$ ) が同定され、それぞれのサブユニットの様々な組み合わせによって、16 種類のアイソフォームが報告されている<sup>7)</sup>。これらのアイソフォームは、組織あるいは発生段階で特異的に発現し、基底膜の構造や機能の維持に重要な役割を果たしている。ラミニン-111 は最も早くに発見されたアイソフォームであり、分解フラグメントや組換えタンパク質、合成ペプチドを用いた研究によって、その生物活性部位が解析されてきた<sup>8,9)</sup>。野水らはラミニン-111 のアミノ酸配列を網羅した 673 種類の合成ペプチドを用いたスクリーニングにより、多数の細胞接着活性配列 (細胞接着ペプチド) を同定してきた<sup>10-14)</sup>。同定された活性ペプチドの中には、レセプター特異的に結合するものが見出されている。例えば、AG73 (RKRLQVQLSIRT, mouse laminin  $\alpha 1$  chain 2719-2730) は膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) であるシンデカンをレセプターとし

て細胞接着，細胞遊走，神経突起伸長促進などの生物活性を示す<sup>10, 15-19)</sup>。また A99 (AGTFALRGDNPQG, mouse laminin  $\alpha$ 1 chain 1141-1153) は $\alpha$ v $\beta$ 3 インテグリン結合配列である RGD 配列を含み，細胞接着と共に細胞伸展を促進する<sup>19, 20)</sup>。EF1 (DYATLQLQEGRLHFMDLQ, mouse laminin  $\alpha$ 1 chain 2747-2765) は $\alpha$ 2 $\beta$ 1 インテグリンを介した細胞接着・細胞伸展を促進する<sup>21, 22)</sup>。これらのレセプター特異的な活性ペプチドはラミニンの複雑な機能を選択的に再現できるため，機能的なバイオマテリアル開発への応用が期待される。

インテグリンは，コラーゲン，ラミニン，フィブロネクチンなどの ECM 構成成分の主要な細胞膜表面レセプターとして広く知られており，細胞の成熟，発生，免疫反応やホメオスタシスに重要な役割を果たしている<sup>23-25)</sup>。細胞接着の初期段階でインテグリンは活性化され，続いて細胞内ドメインを介したインサイド-アウトシグナル伝達が起こる<sup>26, 27)</sup>。活性化されたインテグリンの細胞外ドメインが物理的に ECM と結合し，FAK，タリン，ビンキュリンなどの細胞内タンパク質との相互作用を通してアクチン細胞骨格が形成される<sup>28)</sup>。シンデカン<sup>1</sup>は膜貫通型 HSPGs で，細胞接着，細胞遊走，接着斑の集積，増殖因子の制御など多くの機能を担っている<sup>29-31)</sup>。最近の研究から，細胞接着においてシンデカンとインテグリンが協調的に働くことや，結合して接着複合体の形成，細胞伸展や細胞遊走を制御していることが明らかになってきた<sup>32-36)</sup>。例えば，シンデカン-1 は $\alpha$ 2 $\beta$ 1 インテグリンを介したコラーゲンへの接着をサポートしていることが報告されている<sup>37)</sup>。また，フィブロネクチンはシンデカン-2 と $\alpha$ 5 $\beta$ 1 インテグリンに結合し接着斑形成を誘導することが明らかにされている<sup>38)</sup>。さらに最近，シンデカン結合ペプチド AG73 は，I 型コラーゲン，ラミニン，フィブロネクチンなどのインテグリン結合タンパク質の生物活性を増強させる「促進剤」として機能することが報告されている<sup>39)</sup>。これらの報告から，ECM 構成成分がインテグリンとシンデカンに同時に作用することが生物学的機能の発現に重要であることがわかってきた。

野水らは，ラミニン由来の細胞接着ペプチドを細胞の足場となり得る高分子多糖のキトサンに固定化することで，組織工学に向けた「人工基底膜」とも呼べるバイオマテリアルの開発を目的に研究を行ってきた<sup>20, 21, 40-42)</sup>。キチンを脱アセチル化することで得られる塩基性多糖のキトサンは，既に縫合糸や人工皮膚として医療応用されている生体適合性に優れた高分子材料である<sup>43, 44)</sup>。ラミニン由来の細胞接着ペプチドを固定化させたキトサン膜は細胞接着をはじめとする様々な生物活性を示し，その生物活性はペプチドが相互作用するレセプター特異的なものであった<sup>20)</sup>。また，キトサン膜に固定化することでペプチドの細胞に対する活性は有意に上昇した<sup>20)</sup>。さらに，池本

らは *in vivo* での実験でペプチド-キトサン膜が創傷被覆を目的とした細胞移植に有用であることも示している<sup>42)</sup>。また近年では、生物活性ペプチドやタンパク質とキトサンを組み合わせるバイオマテリアルとして応用する試みが、様々な研究グループによって行われている<sup>45,46)</sup>。このように、ラミニン由来のレセプター特異的な活性ペプチドを固定化させたキトサン膜は、組織工学に向けたバイオマテリアルとして有力なツールとなり得ることが示されてきた。

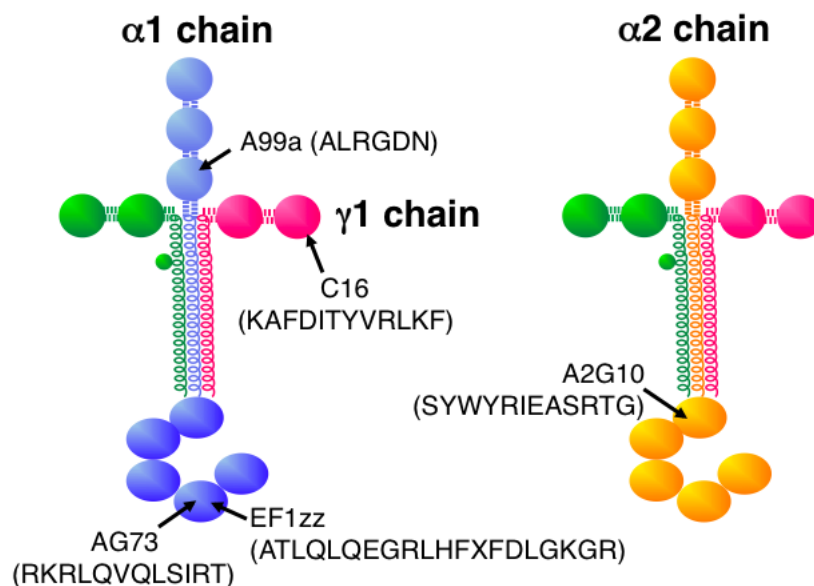
本申請論文では、効率よく細胞応答を誘導するインテリジェント型培養基材としてのペプチド-キトサン膜の創製を目的に、Scheme 1 及び Table 1 に示すペプチドを用いて、以下の3章において生化学的、細胞生物学的な研究を行った。

第1章では、多機能分子であるラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールに着目した。ラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールの生物活性を模倣した機能性膜の創製を目的に、AG73 と EF1zz を用いてシンデカンと $\alpha 2\beta 1$  インテグリンの両レセプターに同時に作用するペプチド-キトサン膜の作製を目指した。ラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュール由来の2種類の活性ペプチド AG73 と EF1zz (a modified peptide of EF1, ATLQLQEGRLHF~~X~~DLGKGR, X: Nle, mouse laminin  $\alpha 1$  chain 2749-2767) を種々の割合で混合し、キトサン膜に固定化することによりラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールの機能を模倣した混合ペプチド-キトサン膜を作製した。その生物活性を評価しラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールの生物活性と比較した。

第2章では、2種類のシンデカン結合ペプチド AG73, C16 (KAFDITYVRLKF, mouse laminin  $\gamma 1$  chain 139-150) と、それぞれ $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha \nu \beta 3$  及び $\alpha 6\beta 1$  インテグリンと結合する3種類のインテグリン結合ペプチド EF1zz, A99a (a modified peptide of A99, ALRGDN, mouse laminin  $\alpha 1$  chain 1145-1150) 及び A2G10 (SYWYRIEASRTG, mouse laminin  $\alpha 2$  chain 2223-2234) を用いて種々の組み合わせの混合ペプチド-キトサン膜を作製した。それらの細胞接着活性、細胞伸展活性を測定することで、キトサン膜上での各ペプチドの相乗的な効果を評価した。

第3章では、ペプチド-キトサン膜の足場効果に着目し、足場材料としてのキトサン膜を最適化し、ペプチド-レセプター間の相互作用や生物学的機能を効率よく誘導することを目的とした。キトサン量の異なる6種類の膜 (1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>) にラミニン $\alpha 1$ 鎖由来の $\alpha \nu \beta 3$  インテグリンに結合するペプチド A99a とシンデカンに結合するペプチド AG73 を固定化させたペプチド-キトサン膜を作製した。これら種々のペプチド-キトサン膜の足場効果を評価するために、細胞接着活性、細胞伸展活性、FAK のリン酸化、神経突起伸長活性を測定した。また、ペプチド-キトサン膜が効率よく生物活性を誘導するための最適なキトサン量を決定した。さらに、混合ペプチド

A99a/AG73-キトサン膜の足場効果についても評価した。



**Scheme 1. Laminin-derived bioactive peptides**

**Table 1. Laminin-derived bioactive peptides and their cell surface receptors**

Peptide	Sequence <sup>a</sup>	Chain (Residues) <sup>b</sup>	Receptor
A99a	ALRGDN <sup>c</sup>	Laminin $\alpha$ 1 chain (1145-1150)	$\alpha$ v $\beta$ 3 integrin
AG73	RKRLQVQLSIRT	Laminin $\alpha$ 1 chain (2719-2730)	Syndecan
EF1zz	ATLQLQEGRLHFXFDLGKGR (X: Nle)	Laminin $\alpha$ 1 chain (2749-2768)	$\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrin
A2G10	SYWYRIEASRTG	Laminin $\alpha$ 2 chain (2223-2234)	$\alpha$ 6 $\beta$ 1 integrin
C16	KAFDITYVRLKF	Laminin $\gamma$ 1 chain (139-150)	Syndecan/ $\beta$ 1 integrin

<sup>a</sup> Peptide-chitosan membranes were prepared using a CGG sequence at the N-termini and MB-chitosan.

<sup>b</sup> The all sequences are from mouse laminin  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, and  $\gamma$ 1 chain.

<sup>c</sup> A99a is a shorten and has similar biological activity of A99 (AGTFALRGDNPQG). A99a-chitosan membrane shows cell attachment activities as well as that of A99-chitosan membrane.

## 第1章

### ラミニン $\alpha$ 1鎖LG4モジュールの機能を模倣した混合ペプチド-キトサン膜

#### 第1節：序論

薄い膜状のECMである基底膜は、組織の再生、再構築において重要な役割を果たしている。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖からなるヘテロ3量体の基底膜タンパク質であるラミニンは、他のECM分子や細胞膜表面レセプターと相互作用し、様々な生物学的機能を果たしている<sup>6, 7, 47</sup>。これら分子の相互作用を制御することは、細胞接着、細胞遊走、血管新生、腫瘍の進行及び神経突起伸長といった生物学的なプロセスにおいて重要であると考えられている<sup>7, 47</sup>。これまでにラミニンは、5種類の $\alpha$ 鎖、3種類の $\beta$ 鎖、3種類の $\gamma$ 鎖が発見されており、それらの会合体として16種類のアイソフォームの存在が報告されている<sup>7</sup>。5種類の $\alpha$ 鎖のC末端にはGドメイン(LG1-5)と呼ばれる5つの球状ドメインが存在する。ラミニン $\alpha$ 1鎖はLG1-3モジュールやLG4-5モジュールを介して様々なインテグリンと相互作用することが知られている<sup>6</sup>。さらに、ラミニン $\alpha$ 1鎖LG4モジュールは、ヘパリン/ヘパラン硫酸、パールカン、スルファチド、 $\alpha$ -ジストログリカン、フィブリン-1と相互作用する<sup>48-53</sup>。これらの研究は、ラミニン $\alpha$ 1鎖LG4は多機能分子であり、様々な細胞表面レセプターと相互作用することを示唆している。

野水らは、ラミニン-111の全アミノ酸配列を網羅する673種類の合成ペプチドを用いて約20種類の細胞接着ペプチドを同定してきた<sup>10-13</sup>。これらの細胞接着ペプチドは細胞伸展、分化、神経突起伸長、血管新生、創傷治癒といった様々な生物活性を示すことが明らかになった<sup>15, 22, 54, 55</sup>。さらに、ペプチドスクリーニング法によって5種類の $\alpha$ 鎖のLG4モジュールから様々な生物活性ペプチドを同定してきた<sup>54</sup>。なかでも、ラミニン $\alpha$ 1鎖LG4モジュールから2種類の活性配列AG73 (RKRLQVQLSIRT, mouse laminin  $\alpha$ 1 chain 2719-2730) と EF1zz (a modified peptide of EF1, ATLQLQEGRLHFHFDLGGKGR, X: Nle, mouse laminin  $\alpha$ 1 chain 2749-2767) が同定された (Fig. 1-1)。AG73は膜貫通型HSPGsのシンデカンに結合し、ラフリング膜の形成を伴う細胞接着を促進するとともに、細胞遊走、浸潤、分化、マトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9, ゼラチナーゼ) 産生、神経突起伸長、血管新生を促進する<sup>10, 15, 16, 22, 57-59</sup>。EF1zzは $\alpha$ 2 $\beta$ 1インテグリンに結合し、アクチンストレスファイバーの形成を伴う細胞伸展を促進する<sup>21, 22, 60</sup>。さらに、組換えLG4タンパク質の様々なアミノ酸置換実験から、LG4モジュールのAG73部位はシンデカンを介した細胞接着に重要であり、EF1部位は主に $\alpha$ 2 $\beta$ 1インテグリンを介した細胞伸展に関わっていることが示

唆された<sup>61)</sup>。しかし、LG4 モジュールの中での AG73 部位と EF1 部位の相加的、あるいは相乗的な作用については詳細に検証されていない。

キチンを脱アセチル化して得られるキトサンは、生分解性であり、創傷治癒を促進することが知られている<sup>62,63)</sup>。キトサン膜は組織には接着するが、細胞接着活性は持たない<sup>20)</sup>。キトサンは縫合糸や人工皮膚などの形ですでに臨床応用されている<sup>64,65)</sup>。以前望月らは、組織工学への応用を目的に、ラミニン由来の活性ペプチドをキトサン膜に固定化し、ECM を模倣した機能性膜を作成した<sup>20, 21)</sup>。また、ペプチドの生物活性は、細胞やペプチドの種類に特異的であること、キトサン膜に固定化することでペプチドの活性が有意に増強されることを見出した<sup>20,66)</sup>。近年池本らは、取り扱いが容易なペプチド-キトサン膜を開発し、医療応用を目指した *in vivo* アッセイを行った。その結果、AG73-キトサン膜はケラチノサイトを創傷部位に移植するためのキャリアとして応用可能であることが明らかになった<sup>42)</sup>。さらに、AG73-キトサン膜は AG73 をコートしたプレートと同様に血管新生促進活性を保持していることが示されていた<sup>21)</sup>。これらの結果から、ペプチド-キトサン膜は細胞移植などの組織工学の分野への応用に向けた有力なツールとなり得ることが示唆された。

本章では、シンデカンと $\alpha 2\beta 1$  インテグリンの両レセプターに同時に作用するラミニン $\alpha 1$  鎖 LG4 モジュールの生物活性を模倣した機能性膜の創製を目的に、この LG4 モジュール由来の 2 種類の活性ペプチド AG73 と EF1zz を種々の割合で混合し、キトサン膜に固定化することにより混合ペプチド-キトサン膜を作製し、組換え LG4 タンパク質の生物活性と比較した。

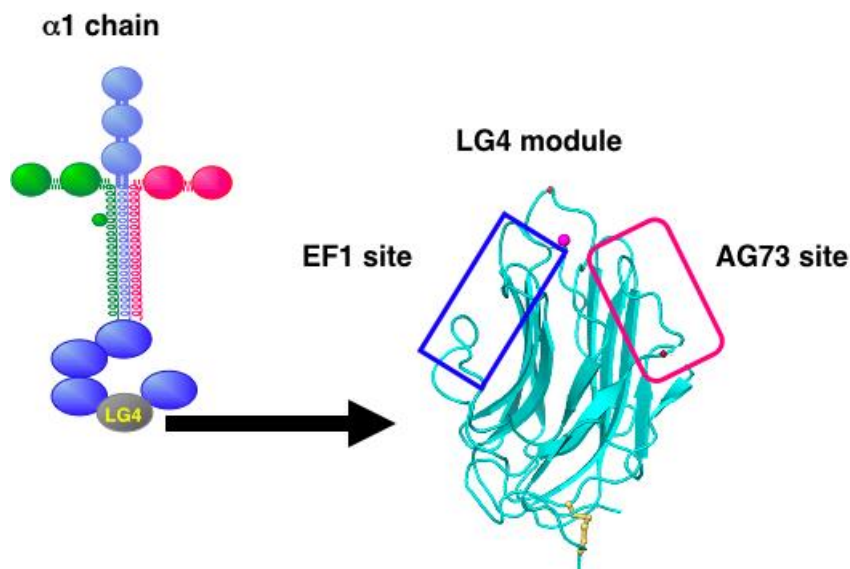


Fig. 1-1. Laminin  $\alpha 1$  chain LG4 module



## 第2節：実験材料および実験方法

### 1-2-1 ペプチド合成

ペプチドは 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) 固相合成法に従い手動にて合成した。ペプチド合成の樹脂 (レジン) にはリンクアミドレジン (Novabiochem, アミノ基 : 0.74 mmol/g) を用い, C 末端がアミドになるように合成を行った。Fmoc 保護アミノ酸は, 側鎖保護基が, Asn, Cys, Gln, His は trityl 基, Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr は *t*-butyl 基, Arg は 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl 基, Lys は *t*-butoxycarbonyl 基のものを用いた。レジンを *N,N*-dimethylformamide (DMF, 関東化学) で 3 回洗浄した後, 20% ピペリジン/DMF を加えて 20 分間振とうすることによってレジンの Fmoc 基の脱保護を行った。再びレジンを DMF で 4 回洗浄することによりピペリジンを除去した後, レジンのアミノ基に対して 5 当量の Fmoc 保護アミノ酸と diisopropylcarbodiimide (DIC, 国産化学), *N*-hydroxybenzotriazole (HOBT, 渡辺化学), および溶媒として DMF を適量加え, 1 時間振とうして縮合させた。1 時間後, 少量のレジンをとりニンヒドリンを用いた Kaiser 試験により, 反応状況を確認した。反応が完結していない場合は, 再び 5 当量の保護アミノ酸と DIC, HOBT, および DMF を適量加え, 1 時間振とうして縮合させた。反応が完結していることを確認した場合, アミノ酸が付加したレジンを DMF で 3 回洗浄し, 再び 20% ピペリジン/DMF にて 20 分間脱保護を行った。以後, 各アミノ酸の縮合と Fmoc 基の脱保護の操作を繰り返し, 得られた保護ペプチドレジンをメタノールで 3 回洗浄し, 乾燥させた。続いて, 保護ペプチドレジんに trifluoroacetic acid (TFA) : thioanisole : *m*-cresol : ethanedithiol : Milli-Q 水 (80:5:5:5:5, v/v/v/v/v) の混合液を加え, 室温で 3 時間攪拌することによって, 側鎖保護基の脱保護およびレジンからのペプチドの脱離を行った。次に, レジンをフィルターで除去し, 目的のペプチドを含むろ液を得た。ろ液にジエチルエーテルを加え, 析出した沈殿物を遠心分離により集め, 沈殿物を再度ジエチルエーテルで洗浄後, 遠心分離を行った。この操作を 3 回行い, 沈殿物を室温で乾燥させた後, 50% 酢酸/Milli-Q 水を適量加えて溶解させた (粗ペプチド)。得られた粗ペプチドは, 逆相 HPLC (Waters, Vydac 5C18, Mightysil RP-18 GP 250-10 column (関東化学), 0.1% TFA/Milli-Q 水および 0.1% TFA/アセトニトリルによるグラジエント) にて精製した。精製したペプチドを凍結乾燥し, 白色羽毛状の粉末を得た。ペプチドの純度は HPLC を, 分子量は質量分析 (ESI-MS) を用いて確認した。

### 1-2-2 Maleimidobenzoyloxy (MB) -キトサンの調製

Chitosan-10 (Wako, 428 mg, 2.66 mmol of sugar unit) を 2% 酢酸水溶液 (21 mL) に

溶解し、1 晩攪拌した。DMF (5 mL) を加えた後に *N*-(maleimidobenzoyloxy)-succinimide (MBS) (25 mg, 0.08 mmol) /DMF (2 mL) 溶液を氷冷下に加え、遮光して室温で 24 時間攪拌した。5% NH<sub>4</sub>OH 水溶液 (4 mL) を少量ずつ加え、遮光して 4°C で 3 時間攪拌した。DMF (200 mL) を加えた後、遠心分離によって沈殿させた。沈殿物に 75% メタノール水溶液 : 5% NH<sub>4</sub>OH 水溶液 (40:0.5, v/v) で 3 回洗浄した。最後に、100% メタノールを加え、遠心分離により得られた沈殿物を 20% 酢酸水溶液で溶解し、遮光して凍結乾燥し MB-キトサンとした (生成物 : 260 mg)。得られた MB-キトサンを、4% 酢酸に溶解し MB-キトサン溶液とした。

### 1-2-3 LG4 組換えタンパク質 (rec-LG4) の調製

Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて 293T 細胞に LG4 組換えタンパク質の N 末端に His tag を付加した rec-LG4 発現コンストラクト (pCepLG4) をトランスフェクションした<sup>61)</sup>。トランスフェクションした細胞を、10% ウシ血清 (FBS, Invitrogen), 100 units/mL ペニシリン, 100 mg/mL ストレプトマイシン (Invitrogen) および 5 mg/mL ピューロマイシン (Sigma) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 3 日間培養した。0.5 mg/mL ピューロマイシン含有 DMEM に培養液を換え、無血清条件下で培養液中に組換えタンパク質を分泌させた。組換えタンパク質を含む培養液 (Conditioned media: CM) は、12 時間おきに 5 日間回収し、遠心分離によって不純物を除き、Complete EDTA-free (Roche Applied Science) を加え -20°C で保存した。回収した CM は、80% 硫酸にて硫酸沈殿を行い、4°C, 8,000×g で 30 分間遠心した後、沈殿物を 10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole/Milli-Q からなるバインディングバッファーに再溶解させた。Nickel-charged agarose resins (Invitrogen) を Milli-Q 水で 2 回洗浄し、上記バッファーで平衡化させ CM へ加えた。4°C, 60 分インキュベート後、クロマトグラフィーカラム (Bio-Rad Laboratories) に移し、20 mM imidazole/PBS で洗浄した。洗浄後、His-tagged LG4 組換えタンパク質 (rec-LG4) を 250 mM imidazole/PBS で溶出させた。回収した LG4 組換えタンパク質溶液を、PBS に対して一晩透析を行った。透析した溶液を、Centricon (Millipore) を用いて濃縮した。タンパク質濃度の定量は BCA アッセイキット (Pierce) を用いて、キットの添付文書に記載されている方法に従って行った。タンパク質の精製度の確認は、還元条件下で 10% SDS-PAGE を行い、ゲルを Coomassie G-250 Blue (Wako) で染色することによって行った (純度 > 95%)。

#### 1-2-4 細胞培養

ヒト新生児皮膚線維芽細胞 (human dermal fibroblasts, HDF) は、株式会社イワキより購入した。ラット副腎髄質クロム親和性細胞腫 (PC12 細胞) は米国国立保健衛生研究所 (NIH) より供与頂いた。HDF の培養には 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, Invitrogen), 100 units/mL ペニシリン (Invitrogen), および 100 mg/mL ストレプトマイシン (Invitrogen) を含む DMEM を用いた。PC12 細胞の培養には 7.5% FBS, 7.5% ウマ血清 (horse serum, HS, Invitrogen), 100 units/mL ペニシリン, および 100 mg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM を用いた。全ての細胞は 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

#### 1-2-5 細胞接着活性の評価

MB-キトサン溶液 (4% 酢酸, 2 µg/mL) を 50 µL ずつ 96-well プレートに加え, 24 時間室温で乾燥させた。各 well に 1% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (100 µL) を加え, 10 分間塩基処理した後 PBS (100 µL) で 2 回洗浄した。0.1 mM ペプチド溶液 (0.1% トリフルオロ酢酸水溶液, 20 µL) と 1% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (20 µL) を加え, 室温で遮光して 2 時間インキュベートすることにより, ペプチド-キトサン膜を作製した。プレートを 1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, Sigma) /DMEM (150 µL) で 3 回洗浄し, 1% BSA/DMEM (150 µL) で 30 分間ブロッキングした。その後 0.1% BSA/DMEM (150 µL) で 2 回洗浄した。培養 HDF を PBS で洗浄し, トリプシン-EDTA (Invitrogen) によりディッシュから剥がした。剥がした細胞を血清入り培地に懸濁させ, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 20 分間インキュベートした後, 0.1% BSA/DMEM で 2 回洗浄した。HDF を 0.1% BSA/DMEM に懸濁し, この HDF 懸濁液を各 well に加え (2 × 10<sup>4</sup> cells/well/100 µL), 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件の下で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後, 0.2% クリスタルバイオレット/20% メタノール水溶液 (150 µL) を加えて接着した HDF を 15 分間染色し, Milli-Q 水で 2 回洗浄後, 室温で 1 晩風乾させた。接着した HDF を Bio Zero (Keyence) で観察し, BZ-analyzer software (Keyence) を用いて接着した HDF 数を well の中央付近の 3 領域 (1 領域: 0.67 mm<sup>2</sup>) でカウントし, その平均を接着 HDF 数として評価した。また伸展した HDF の面積を, BZ-analyzer software を用いて計測し細胞伸展活性を評価した。

rec-LG4 の HDF 接着活性は 96-well プレートをを用いて評価した。rec-LG4 (3 µg/well) を各 well に添加し, 4°C で 12 時間インキュベートした。プレートを 1% BSA/DMEM (150 µL) で 1 時間ブロッキングした後, 上述のように HDF 懸濁液を加えインキュベーションした後, HDF の細胞接着活性, 細胞伸展活性を評価した。

### 1-2-6 細胞接着に対する阻害アッセイ

ヘパリン, EDTA を用いた HDF の細胞接着阻害効果の評価は, 細胞接着活性の評価と同様の条件で行った. HDF 懸濁液 ( $8 \times 10^3$  cells/well/100  $\mu$ L) に, ヘパリンを 10 mg/mL, EDTA を 5 mM の濃度となるよう加え, HDF 懸濁液を各 well に 100  $\mu$ L ずつ加え, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 2 時間インキュベートした. インキュベーション後, 0.2% クリスタルバイオレット/20% メタノール水溶液を加えて接着した HDF を 15 分間染色し, Milli-Q 水で 2 回洗浄後, 室温で 1 晩風乾させた. その後, 上記の細胞接着活性の評価と同様の方法で接着 HDF 数を算出した.

### 1-2-7 免疫蛍光染色

HDF の細胞骨格免疫染色は 8 well チャンバースライド (Nalge Nunc) を用いて行った. 8 well チャンバースライドに用意したペプチド-キトサン膜を 0.1% BSA/DMEM (500  $\mu$ L) で 3 回洗浄した. 細胞接着アッセイと同様に HDF 懸濁液を調製 ( $8 \times 10^3$  cells/well/300 $\mu$ L) し, 各 well に 300  $\mu$ L 加えて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 2 時間インキュベートした. その後, HDF を 4% パラホルムアルデヒド (PFA), 5% スクロースを含むトリス緩衝生理食塩水 (tris-buffered saline, TBS) を用いて, 10 分間インキュベートすることにより固定化し, 0.1% Triton X-100 を含む PBS を用いて膜透過処理した. 固定した HDF を PBS で 30 分間洗浄し, 1% BSA/PBS を用いて室温で 1 時間ブロッッキングした. ブロッッキング後, マウスモノクローナル抗ヒトビンキュリン (hVIN-1, Sigma, 1:100) と共に 4°C で一晩インキュベートした. 0.05% Tween 20 を含む PBS で洗浄した後 (15 分間, 2 回), rhodamin red-labeled donkey anti-mouse IgG antibody (Jackson Immuno Research Laboratories, 1:50) と Alexa Fluoro 488 phalloidin (1 unit/m, Invitrogen, 1:100) と共に 2 時間室温でインキュベートし, それぞれビンキュリンとアクチンフィラメントを標識した. HDF の細胞核は 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, 1:10000) で標識した. 0.05% Tween 20 を含む PBS で 10 分間洗浄した後, Milli-Q 水により脱塩し, anti-fade を含む 50% グリセロール溶液により封入した. 蛍光顕微鏡 (Bio Zero) を用いて HDF を観察し, BZ-analyzer software を用いて画像処理をした.

### 1-2-8 神経突起伸長アッセイ

それぞれのプレートは 30 nM NaSeO<sub>3</sub> 含有 DMEM/F-12 (Invitrogen) で 3 回洗浄した. アッセイの 24 時間前に 100 ng/mL の神経成長因子 (NGF, Invitrogen) を加えた PC12 細胞を PBS で洗浄し, ピペッティングにより培養ディッシュより剥離した. PC12 細胞を培養用の培地に懸濁し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 30 分間のインキュベートでリカ

バリーさせた後、30 nM NaSeO<sub>3</sub> 含有 DMEM/F-12 で3回洗浄した。PC12 細胞を 100 mg/mL トランスフェリン (Sigma), 20 nM プログステロン (Sigma), 5 mg/mL インスリン (Invitrogen), 100 ng/mL NGF 及び 30 nM NaSeO<sub>3</sub> 含有 DMEM/F-12 に再懸濁し、各 well に加えて ( $3 \times 10^3$  cells/well/100  $\mu$ L) 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間インキュベートした。その後、予め 37°C に温めておいた 20%ホルマリンで 10 分間固定し、0.2% クリスタルバイオレット/20%メタノール水溶液で染色した。Milli-Q 水で 3 回洗浄した後、室温で 1 晩風乾させた。PC12 細胞を顕微鏡下 (Bio Zero) で観察し、BZ-analyzer software を用いて神経突起の長さを計測することで神経突起伸長活性を評価した。

### 1-2-9 統計解析法

2 群間の有意差の判定は Student-*t* 検定を用いて行い、危険率 5%以下で有意差ありとした。また、データは全て平均±標準偏差で表した。

### 第3節：実験結果

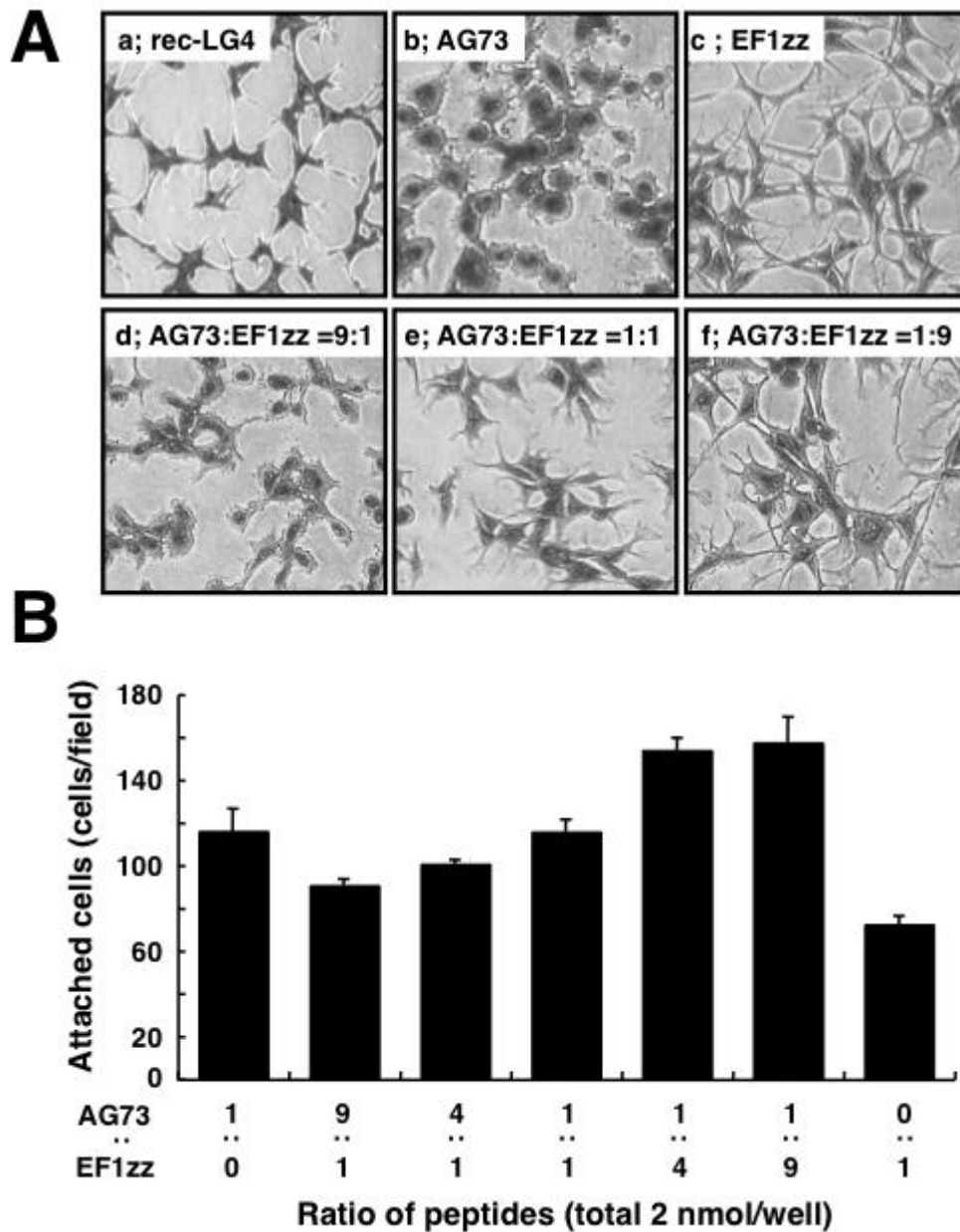
#### 1-3-1 ペプチド合成

AG73 (RKRLQVQLSIRT, mouse laminin  $\alpha$ 1 chain 2719-2730) と EF1zz (a modified peptide of EF1, ATLQLQEGRLHFXDLGKGR, X: Nle, mouse laminin  $\alpha$ 1 chain 2749-2767) の2種類の細胞接着ペプチドのN末端に Cys-Gly-Gly (CGG) の配列を付加した CGG ペプチドを合成した。

#### 1-3-2 LG4 組換えタンパク質 (rec-LG4) と混合ペプチド-キトサン膜の細胞接着活性

LG4 組換えタンパク質 (rec-LG4) は強い HDF の細胞接着と細胞伸展活性を示した (Fig. 1-2A, a). AG73-キトサン膜は強い HDF の細胞接着活性を示し, 接着した HDF は丸い形態を示すとともにラフリング膜の形成が認められた (Fig. 1-2A, b). EF1zz-キトサン膜は HDF の細胞接着活性を示し, 接着した HDF は伸展し細長かった (Fig. 1-2A, c). EF1zz-キトサン膜の HDF の細胞接着活性は AG73-キトサン膜よりも弱かった (Fig. 1-2B).

次に, AG73 と EF1zz を種々の割合で混合して固定化した (AG73:EF1zz=9:1, 4:1, 1:1, 1:4, 1:9) ペプチド-キトサン膜上での HDF の細胞接着活性を評価した. その結果, 接着した HDF の形態は AG73 と EF1zz の混合比によって変化することがわかった (Fig. 1-2A, d-f). 混合ペプチド-キトサン膜の HDF の細胞接着活性もまた AG73 と EF1zz の混合比に依存していることが示された (Fig. 1-2B). AG73:EF1zz (1:9) -キトサン膜は最も強い HDF の細胞接着と細胞伸展活性を示し, 接着した HDF は, LG4 組換えタンパク質に接着したものと同様に伸展した形態を示した (Fig. 1-2A, f).



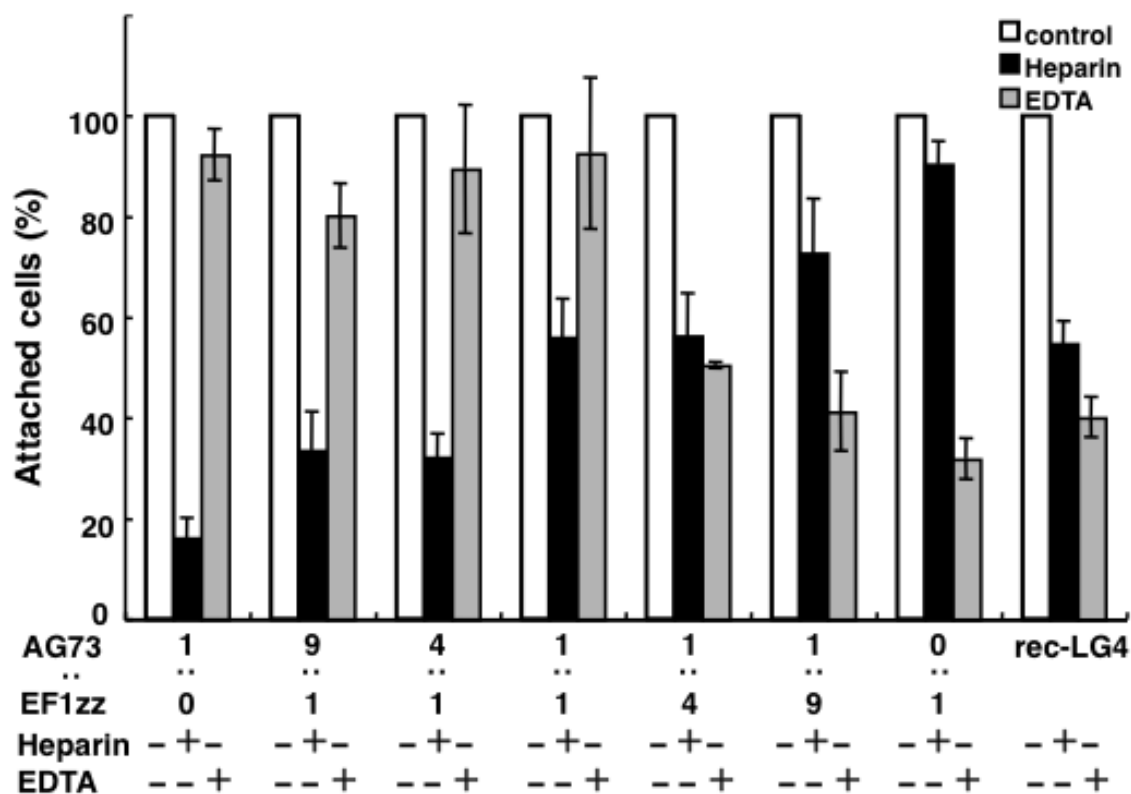
**Fig. 1-2. Cell morphology and attachment activity on peptide-chitosan membranes.**

A; CGG-AG73 and CGG-EF1zz were mixed in various ratios and were coupled to the MB-chitosan membranes (2 nmol/well) in 96-well plates. HDFs ( $2 \times 10^4$  cells) were allowed to attach to the peptide-chitosan membranes and to the rec-LG4 for 2 h and then stained with crystal violet. (a) rec-LG4; (b) AG73-chitosan membrane; (c) EF1zz-chitosan membrane; (d) AG73:EF1zz (9:1)-chitosan membrane; (e) AG73:EF1zz (1:1)-chitosan membrane; (f) AG73:EF1zz (1:9)-chitosan membrane. B; HDFs ( $2 \times 10^4$  cells) were allowed to attach to the mixed peptide-chitosan membranes for 2 h and then stained with crystal violet. The attached cells in three randomly selected fields were counted. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments.

### 1-3-3 細胞接着に及ぼす EDTA とヘパリンの影響

ペプチド-キトサン膜および rec-LG4 の HDF の細胞接着活性に対する EDTA とヘパリンの阻害効果を評価した (Fig. 1-3). ヘパリンの添加によって AG73-キトサン膜の HDF の細胞接着活性は有意に阻害されたが, EF1zz-キトサン膜の HDF の細胞接着活性はほとんど影響を受けなかった. 一方, EDTA の添加によって EF1zz-キトサン膜の HDF の細胞接着活性は有意に阻害されたが, AG73-キトサン膜の HDF の細胞接着活性は影響を受けなかった. この結果は, AG73-キトサン膜はシンデカンを介して HDF に接着し, EF1zz-キトサン膜はインテグリンを介して HDF に接着することを示している. 混合ペプチド-キトサン膜では, ヘパリンの添加によって AG73 の混合割合に比例して HDF の細胞接着阻害効果が増加した. また, EDTA の添加によって EF1zz の混合割合に比例して HDF の細胞接着阻害効果が増加した. rec-LG4 の HDF の細胞接着は EDTA とヘパリンの両方によって部分的に阻害され, その阻害効果は AG73:EF1zz (1:4 と 1:9)-キトサン膜の結果と類似していた. この結果から AG73:EF1zz (1:4 と 1:9)-キトサン膜は, rec-LG4 と同様にシンデカンとインテグリンの両方に作用していることが示唆された.



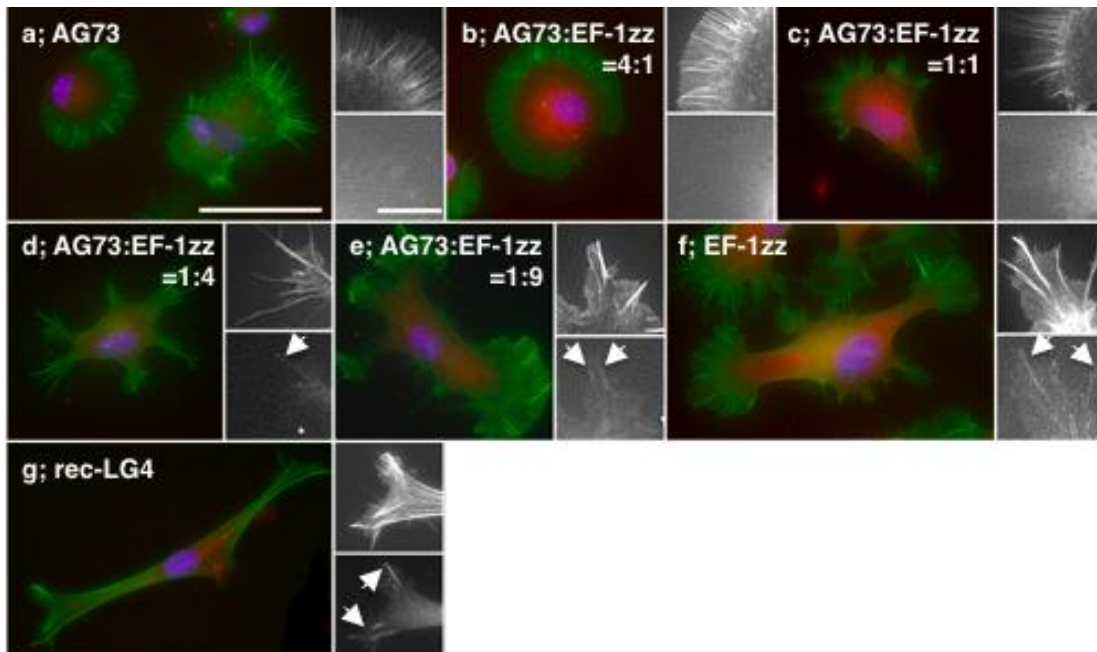


**Fig. 1-3. Effect of EDTA and heparin on HDF attachment to peptide-chitosan membranes.**

AG73 and EF1zz were mixed in various ratios and were couple to the MB-chitosan membranes (2 nmol/well) in 96-well plates. HDFs were allowed to attach to the peptide-chitosan membranes in the absence (white bars) or presence (grey bars) of 5mM EDTA, or presence (black bars) of 10 mg/mL heparin. EDTA or heparin was added to the cell suspension and then the cells were plated. After a 1-h incubation, the attached cells were assessed by crystal violet staining. Each value is depicted as percentage of the attached cell on the each peptide-chitosan membrane without inhibition. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of triplicate results. Triplicate experiments gave similar results.

### 1-3-4 免疫蛍光染色

次に、rec-LG4 とペプチド-キトサン膜に接着した HDF のアクチンとビンキュリンの免疫蛍光染色を行った。rec-LG4 に接着した HDF はアクチンストレスファイバーの形成と接着斑へのビンキュリンの集積が観察された (Fig. 1-4 g)。AG73-キトサン膜に接着した HDF はアクチンが細胞周囲に集積しラフリング膜が形成されたが、接着斑の形成とビンキュリンの集積は見られなかった (Fig. 1-4 a)。EF1zz-キトサン膜に接着した HDF はアクチンストレスファイバーの形成が観察された (Fig. 1-4 f)。AG73:EF1zz (1:9)-キトサン膜に接着した HDF は rec-LG4 に接着したものと同様にアクチンストレスファイバーの形成が観察された (Fig. 1-4 e and g)。この結果から、HDF の細胞骨格形成において、AG73:EF1zz (1:9)-キトサン膜は rec-LG4 と同様に機能していることが示唆された。

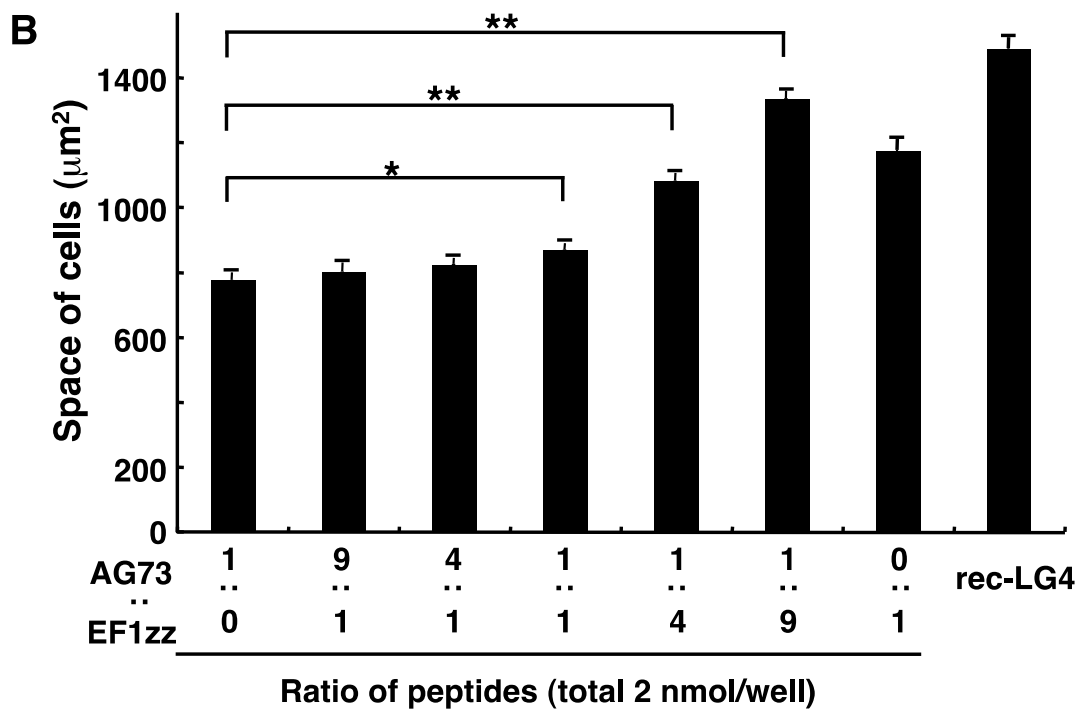


**Fig. 1-4. Organization of actin stress fibers and localization of vinculin of HDF on peptide-chitosan membranes.**

HDFs were plated on 8-well glass chambers coated with 3  $\mu\text{g}/\text{well}$  rec-LG4 or 2 nmol peptide-chitosan membranes for 2 h. Cells were fixed, and then stained with phalloidin, anti-vinculin antibody, and DAPI for actin filaments (green), focal contacts (red), and nucleus (blue). (a) AG73-chitosan membrane; (b) AG73:EF1zz (4:1)-chitosan membrane; (c) AG73:EF1zz (1:1)-chitosan membrane; (d) AG73:EF1zz (1:4)-chitosan membrane; (e) AG73:EF1zz (1:9)-chitosan membrane; (f) EF1zz-chitosan membrane; (g) rec-LG4 (Color panels). Localization of actin filaments (upper grey panel) and of vinculin (lower grey panel) is also shown in separate images. The arrows showed the vinculin staining of focal contacts. The scale bar in color panel indicates 50  $\mu\text{m}$  and in grey panel indicates 10  $\mu\text{m}$ .

### 1-3-5 ペプチド-キトサン膜に接着した細胞の面積

次に、ペプチド-キトサン膜に接着した HDF の面積を測定した (Fig. 1-5). rec-LG4 はコントロールとして用いた. AG73 と EF1zz を混合してキトサン膜に固定化したとき、接着した HDF の面積は増大した. AG73:EF1zz (1:9)-キトサン膜に接着した HDF の面積は rec-LG4 に接着したものと同程度であった. この結果からも、AG73:EF1zz (1:9)-キトサン膜は rec-LG4 と同様に HDF の細胞骨格を形成し、強い細胞伸展活性を示すことがわかった.

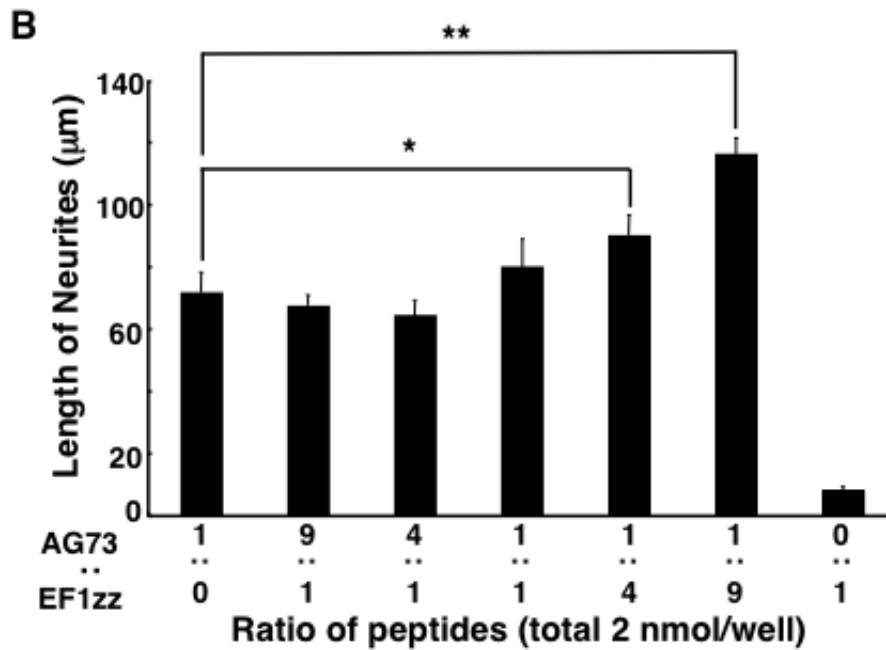
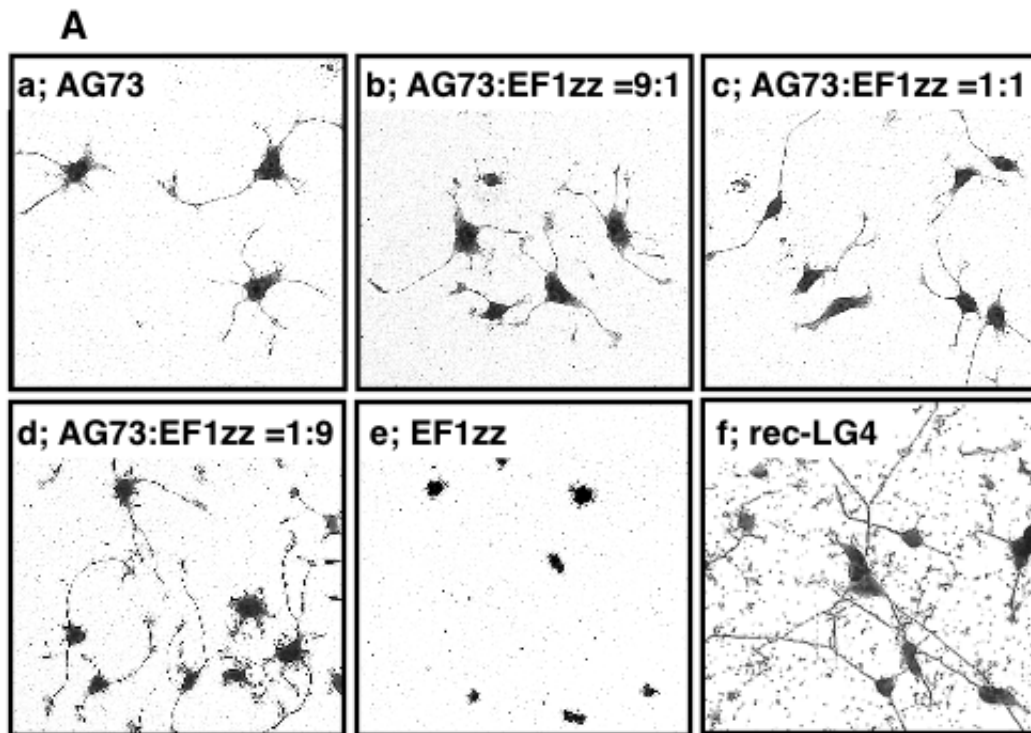


**Fig. 1-5. Cell size on peptide-chitosan membranes.**

Images were captured and size of the cells were measured using BZ-analyzer software (Keyence). Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.005.

### 1-3-6 神経突起伸長活性

次に、PC12 細胞を用いてペプチド-キトサン膜の神経突起伸長活性を評価した。rec-LG4 は細長い神経突起を伸長させた (Fig. 1-6A, f)。AG73-キトサン膜はやや太い神経突起の伸長活性を示した (Fig. 1-6A, a) が、EF1zz-キトサン膜は神経突起伸長活性を示さなかった (Fig. 1-6A, e)。AG73:EF1zz (1:9)-キトサン膜は、rec-LG4 と同様に強い神経突起伸長活性を示した (Fig. 1-6A, d)。また、AG73:EF1zz (1:9)-キトサン膜上の神経突起は最も長かった (Fig. 1-6B)。この結果は、単独では神経突起伸長活性を示さない EF1zz が、AG73 と共に働くことにより神経突起伸長活性を促進していることを示すものであり、混合ペプチド-キトサン膜が、rec-LG4 と同様にシンデカンとインテグリンの両方のレセプターを介して細胞に作用することを示唆している。



**Fig. 1-6. Neurite outgrowth activity on peptide-chitosan membranes.**

A; PC12 cells ( $3 \times 10^3$  cells) were cultured on rec-LG4 and peptide-chitosan membranes. After a 24 h-incubation, attached and extended cells were assessed by crystal violet staining. (a) AG73-chitosan membrane; (b) AG73:EF1zz (9:1)-chitosan membrane; (c) AG73:EF1zz (1:1)-chitosan membrane; (d) AG73:EF1zz (1:9)-chitosan membrane; (e) EF1zz-chitosan membrane; (f) rec-LG4. B; Images were captured and the length of the neurites was measured using BZ-analyzer software (Keyence). The graph is representative of at least three similar experiments and values  $\pm$  S.D. are indicated. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ .

#### 第4節：考察

組織工学の研究は、臨床応用への重要なアプローチであると考えられている。物理的にも生物学的にも組織の修復、再構築をサポートするバイオマテリアルは組織工学の分野において未だアンメットニーズである。生体内で細胞は、組織の維持、分化の誘導、再生、ホメオスタシスに重要な役割を果たし、三次元超分子ネットワークを形成している ECM で囲まれている。ECM を模倣することは、バイオマテリアル研究の手法の一つであると考えられている。薄い膜状の ECM である基底膜は様々な細胞表面レセプターを介して細胞と相互作用し、多くの生物学的機能を制御している。そのため、基底膜の模倣物は理想的なバイオマテリアルとなり得ると考えられる。基底膜成分の一つで多機能タンパク質であるラミニンは、様々な生物学的機能に重要な役割を果たしている。近年、多機能分子であるラミニン $\alpha$ 1 鎖 LG4 モジュールが、*in vivo* において $\alpha$ 1 鎖から切り離されて存在することが報告され<sup>67)</sup>、その機能の解明が注目されている<sup>61, 68)</sup>。

本章では、高機能性材料のターゲットとしてラミニン $\alpha$ 1 鎖 LG4 モジュールに注目し、混合ペプチド-キトサン膜を用いてその生物活性を模倣することを目的として研究を行った。その結果、AG73:EF1zz (1:9)-キトサン膜は、多機能分子である LG4 モジュールと同様に強力に細胞接着と神経突起伸長を促進した。また、混合ペプチド-キトサン膜は、シンデカン結合ペプチドと $\alpha$ 2 $\beta$ 1 インテグリン結合ペプチドの混合比に依存してその活性が変化し、種々の細胞機能をコントロールできることが明らかになった。これらの結果は、AG73 と EF1zz の混合比が 1:9 の時、シンデカンとインテグリンの相乗的な効果を得るのに最適な混合比であることを示している。

これまでに、インテグリンとシンデカンの相乗効果によって様々な細胞機能がコントロールされるという研究報告が多くなされてきた。例えば、ECM 構成タンパク質であるフィブロネクチンは、シンデカン-2 と $\alpha$ 5 $\beta$ 1 インテグリンに結合し接着斑形成を誘導することが報告されている<sup>38)</sup>。加えて、シンデカン-4 とインテグリンの両方と相互作用し、培養細胞の伸展や接着斑の集積をコントロールしていることも報告されている<sup>69, 70)</sup>。また、カルシノーマ細胞のビトロネクチンへの接着において、 $\alpha$ v $\beta$ 3 インテグリンのシグナリングにはシンデカン-1 の集積が必要であることが報告されている<sup>29)</sup>。その他にも、 $\alpha$ v $\beta$ 3 インテグリンは、細胞外ドメインで血小板増殖因子- $\beta$  (PDGF- $\beta$ ) と血管内皮増殖因子 2 (VEGF-2) と相互作用し、細胞増殖、細胞遊走をコントロールしていることも報告されている<sup>71)</sup>。以上の研究報告と同様に AG73:EF1zz (1:9)-キトサン膜においても、シンデカンとインテグリンの協調的な働きが誘導されたことが示唆される。このように多くの研究から、*in vivo* での細胞接着に

において、インテグリンとシンデカンなどの異なるレセプターが協調的に働くことは不可欠であると広く考えられている。以上より、細胞接着において活性ペプチドを単独で用いるよりも、異なるレセプターと相互作用するペプチドを混合して用いることで各ペプチドの生物活性が相乗的に増強されることが明らかになり、ラミニン $\alpha$ 1 鎖 LG4 モジュールの生物活性を模倣できることが示唆された。混合ペプチド-キトサン膜のアプローチはレセプター間の協調的な働きを誘導することができ、多様な細胞応答の研究に役立つものである。また、このアプローチはレセプターどうしのクロストークの評価に有用であり、細胞または組織特異的なバイオマテリアルの開発に役立つものである。

近年、取り扱いが容易なペプチド-キトサン膜が臨床応用可能であることが、AG73-キトサン膜をケラチノサイトの移植キャリアとして使用した *in vivo* アッセイによって証明された<sup>42)</sup>。ケラチノサイトを AG73-キトサン膜上で2時間培養し創傷部位に移植したとき、移植された細胞は AG73-キトサン膜から組織へ移動、分化し、重層上皮を形成したことが確認された。また最近、ケラチノサイトに対する接着活性を強く示すペプチドがラミニン $\alpha$ 5 鎖のペプチドライブラリーから同定された。ラミニン $\alpha$ 5 鎖由来の活性ペプチドをキトサン膜に固定化し、ケラチノサイトの移植に用いたところ、創傷部位に移植され生存しているケラチノサイトは分化することができ、肉芽組織の形成は減少した<sup>72)</sup>。

上記の結果から、ターゲットとするレセプターとペプチド-キトサン膜との相互作用は細胞の移植において重要であると考えられる。異なるレセプターに結合する複数のペプチドを固定化した混合ペプチド-キトサン膜は、レセプター間相互作用をコントロールでき、細胞移植のための新たなバイオマテリアルとしての応用が期待できる。

以上本章では、AG73 と EF1zz を混合して（混合比=1:9）キトサン膜に固定化させることによって、ラミニン $\alpha$ 1 鎖 LG4 モジュールの生物活性を模倣できることが明らかになった。このことから、混合ペプチド-キトサン膜を用いることによって、タンパク質の生物活性を模倣したバイオマテリアルを創製することが可能であると考えられ、今後のさらなる研究の発展が期待される。

## 第2章 混合ペプチド-キトサン膜の生物活性

### 第1節：序論

物理的にも生物学的にも組織の再生、修復をサポートするバイオマテリアルの開発は組織工学の分野において特に重要である。生体内の組織で細胞は、組織の維持、分化の誘導、組織再生、ホメオスタシスに重要な役割を果たしている ECM で囲まれている<sup>73)</sup>。現在、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの ECM 成分は細胞培養時の足場材料として利用されている<sup>74)</sup>。

薄い膜状の ECM である基底膜は皮膚、筋肉、神経、腎臓、血管、脂肪組織等に存在し、組織再生や再構築に重要な役割を果たしている<sup>5)</sup>。基底膜の主要成分であるラミニンは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖からなる巨大なヘテロ 3 量体の糖タンパク質である。ラミニンは細胞接着、細胞遊走、分化、神経突起伸長、血管新生等に重要な役割を果たしていることが知られている<sup>7)</sup>。以前から、2000 以上の合成ペプチドを用いたスクリーニングによって、数多くのラミニン由来の活性ペプチドが同定されてきた<sup>10-14, 22, 54, 75, 76)</sup>。約 20 種類のペプチドは、インテグリンとシンデカンを含む様々な細胞表面レセプターが同定され、バイオマテリアルとしての応用の可能性が示されてきた<sup>21, 77, 80)</sup>。例えば、シンデカン結合ペプチド AG73 (RKRLQVQLSIRT, mouse laminin  $\alpha$ 1 chain 2719-2730) は細胞接着、細胞遊走、神経突伸長、血管新生、腺房形成を促進する<sup>10, 15, 16, 81-83)</sup>。シンデカンとインテグリンに結合するペプチド C16 (KAFDITYVRLKF, laminin  $\gamma$ 1 chain 139-150) は細胞接着、細胞遊走を促進する<sup>11, 20, 84-86)</sup>。それぞれ $\alpha$ 2 $\beta$ 1、 $\alpha$ v $\beta$ 3及び $\alpha$ 6 $\beta$ 1インテグリン結合ペプチド EF1zz (a modified peptide of EF1, ATLQLQEGRLHFXFDLGKGR, X: Nle, mouse laminin  $\alpha$ 1 chain 2749-2768), A99a (a modified peptide of A99, ALRGDN, mouse laminin  $\alpha$ 1 chain 1145-1150) 及び A2G10 (SYWYRIEASRTG, mouse laminin  $\alpha$ 2 chain 2223-2234) は細胞接着、細胞伸展を促進する<sup>21, 41, 74, 79, 81, 87)</sup>。

キチンを脱アセチル化して得られるキトサンは、生分解性であり、創傷治癒を促進することが証明されている<sup>63, 64)</sup>。キトサン膜自体は組織には接着するが、細胞接着活性は持たない<sup>20)</sup>。キトサンは縫合糸や人工皮膚などの形ですでに臨床応用されている<sup>65, 66)</sup>。以前から、ラミニン由来活性ペプチドをキトサン膜に固定化し、ECM を模倣する研究が行われてきた<sup>20, 21)</sup>。ペプチドの生物活性は細胞またはペプチドに特異的であり、キトサン膜に固定化することでその活性は大きく増強された<sup>20, 66)</sup>。近年、取り扱い容易なペプチド-キトサン膜が開発され、*in vivo* アッセイによってその臨床応用の可能性が示された。AG73-キトサン膜がケラチノサイトの創傷部位への移植に効果



的に働くことが証明された<sup>42)</sup>。また、AG73-キトサン膜は、AG73をプレートにコートしたときと同様に血管新生促進活性を保持していることも証明された<sup>88)</sup>。これらの結果から、ペプチド-キトサン膜は細胞移植といった組織工学の分野への応用に向けた有力なツールとなり得ることが示唆された。さらに、AG73とEF1zzなどのインテグリン結合ペプチドを混合してキトサン膜に固定化すると、ペプチドの生物活性は相乗的に増強されることが明らかになった<sup>40)</sup>。この混合ペプチド-キトサン膜のアプローチは、ECMを模倣したバイオマテリアルとして応用可能であると考えられる。

本章では、異なるレセプターと相互作用するペプチドを混合してキトサン膜に固定化することで、各ペプチドの相乗的な生物活性の増強を目的とした。2種類のシンデカン結合ペプチドAG73、C16と、それぞれ $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 及び $\alpha 6\beta 1$ インテグリンと結合する3種類のインテグリン結合ペプチドEF1zz、A99a及びA2G10を用いて種々の組み合わせの混合ペプチド-キトサン膜を作製した。それらの細胞接着活性、細胞伸展活性を測定することで、キトサン膜上での各ペプチドの相乗的な効果を評価した。

## 第2節：実験材料および実験方法

### 2-2-1 ペプチド合成

第1章で記載した方法に従って行った。

### 2-2-2 細胞培養

HDF を第1章で記載した方法に従って培養した。シンデカン-1 を発現させたヒト B-リンパ球細胞 (ARH-77) は 10% FBS, 100 units/mL ペニシリンおよび 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを含む RPMI-1640 培地で培養した<sup>61)</sup>。

### 2-2-3 Maleimidobenzoyloxy (MB) -キトサンの調製

MB-キトサンの調製は第1章で記載した方法に従って行った。

### 2-2-4 細胞接着活性の評価

HDF 及び ARH-77 を用いた細胞接着活性の評価は第1章で記載した方法に従って行った。

### 2-2-5 細胞接着に対する阻害アッセイ

ヘパリン, EDTA を用いた HDF の細胞接着阻害効果の評価は第1章で記載した方法に従って行った。本章では, 抗インテグリン抗体を用いた HDF の細胞接着阻害効果の評価した。HDF 懸濁液 ( $1 \times 10^4$  cells/well/100  $\mu$ L) に, 抗インテグリン抗体を 30  $\mu$ g/mL の濃度となるように加え, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 15 分間インキュベートした後, HDF 懸濁液を各 well に播種し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後, 0.2% クリスタルバイオレット/20% メタノール水溶液を加えて接着した HDF を 15 分間染色し, Milli-Q 水で 2 回洗浄後, 室温で 1 晩風乾させた。その後, 上記の細胞接着活性の評価と同様の方法で接着 HDF 数を算出した。ラットモノクローナル抗ヒトインテグリン $\alpha$ 6 (GoH3) 抗体は, Santa Cruz Biotechnology 社より購入した。マウスモノクローナル抗ヒトインテグリン $\alpha$ 1 (FB12),  $\alpha$ 2 (P1E6),  $\alpha$ 3 (P1B5),  $\alpha$ v (P3G8),  $\beta$ 1 (6S6),  $\alpha$ v $\beta$ 3 (LM609) 抗体は Millipore 社より購入した。

### 2-2-6 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色を第1章で記載した方法に従って行った。

### 2-2-7 統計解析法

2 群間の有意差の判定は Student-*t* 検定を用いて行い, 危険率 0.1%以下で有意差ありとした. また, データは全て平均±標準偏差で表した.

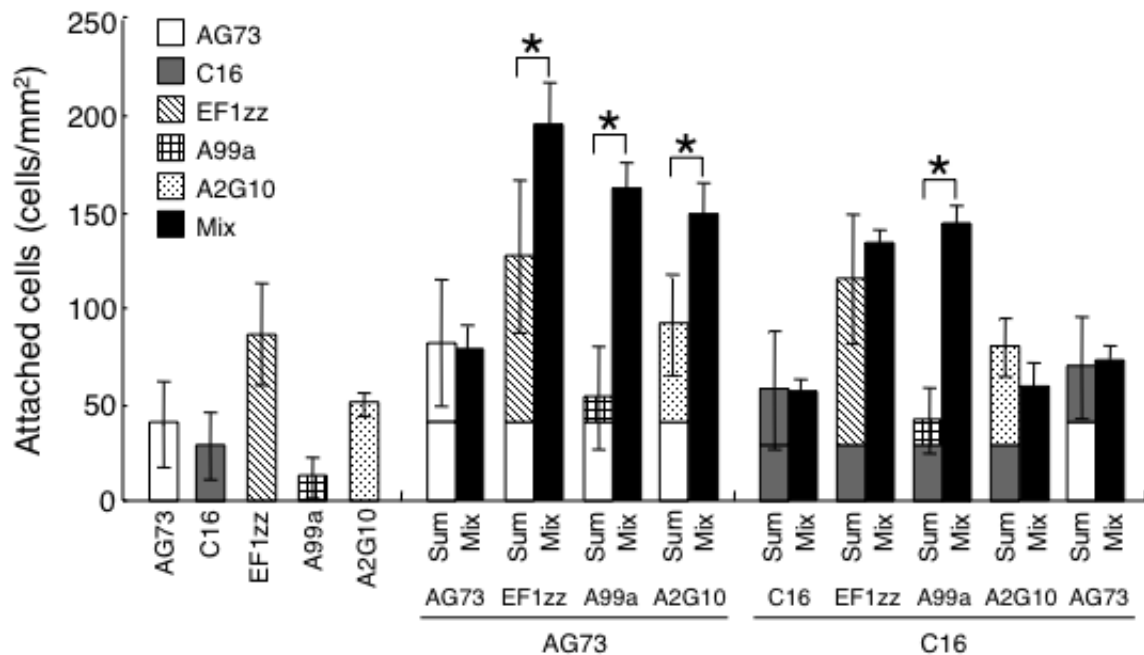
### 第3節：実験結果

#### 2-3-1 ペプチド合成

A99a, AG73, EF1zz, A2G10, C16 の5種類の細胞接着ペプチドのN末端に Cys-Gly-Gly (CGG) の配列を付加した CGG ペプチドを合成した.

### 2-3-2 混合ペプチド-キトサン膜の細胞接着活性

HDF を用いて、種々の混合ペプチド-キトサン膜の細胞接着活性を評価した (Fig. 2-1). その結果, EF1zz, A99a 及び A2G10 と AG73 を混合してキトサン膜に固定化したとき, 接着 HDF 数は各ペプチドを単独でキトサン膜に固定化したときの合計値よりも有意に増加した. 一方, 各インテグリン結合ペプチドと C16 を混合してキトサン膜に固定化したとき, A99a/C16-キトサン膜のみの接着 HDF 数が有意に増加し, EF1zz/C16-, A2G10/C16-キトサン膜の接着 HDF 数は各ペプチドを単独で用いたときの合計値と同程度であった. さらに, AG73/C16-キトサン膜についても相乗的な活性の増強は見られなかった. この結果から, AG73 は EF1zz, A99a 及び A2G10 の HDF の細胞接着活性を増強させ, C16 は A99a のみの細胞接着活性を増強させることが示唆された.

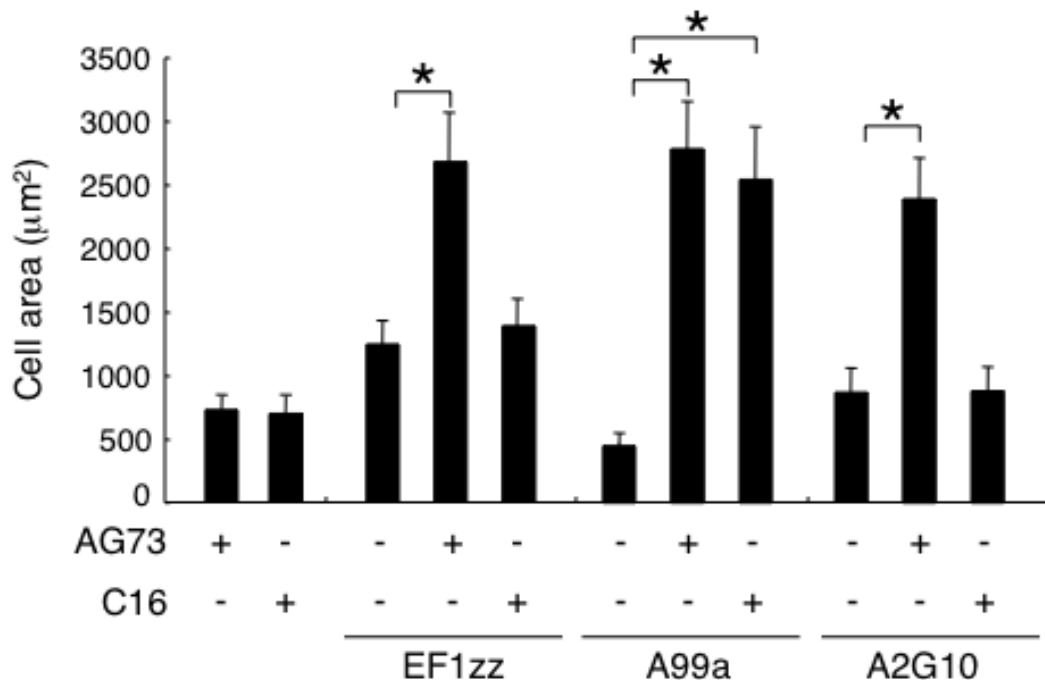


**Fig. 2-1. HDF attachment activity on peptide-chitosan membranes.**

Peptides (AG73: 3 pmol/mm<sup>2</sup>, C16: 6 pmol/mm<sup>2</sup>, EF1zz: 30 pmol/mm<sup>2</sup>, A99a: 30 pmol/mm<sup>2</sup>, A2G10: 75 pmol/mm<sup>2</sup>) were coupled to the MB-chitosan membranes in 96-well plates as described in Materials and Methods. HDFs ( $1 \times 10^4$  cells/well) were allowed to attach to the single or mixed peptide-chitosan membranes for 1 h and then stained with crystal violet. The attached cells in three randomly-selected fields were counted. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments. Sum: the sum of attached cell numbers on each single peptide-chitosan membrane. Mix: the attached cell numbers on mixed peptide-chitosan membranes. Triplicate experiments gave similar results. \*P < 0.001.

### 2-3-3 混合ペプチド-キトサン膜の細胞伸展活性

続いて HDF を用いて、種々の混合ペプチド-キトサン膜の細胞伸展活性を評価した (Fig. 2-2). EF1zz/AG73-, A99a/AG73-及び A2G10/AG73-キトサン膜は強い HDF の細胞伸展活性を示し、接着した HDF の面積は各ペプチドを単独で用いたときよりも有意に増大した. A99a/C16-キトサン膜も強い HDF の細胞伸展活性を示し、接着した HDF の面積は各ペプチドを単独で用いたときよりも有意に増大した. しかし C16 は、EF1zz と A2G10 の HDF の細胞伸展活性は増強させなかった. この結果から、HDF の細胞接着活性と同様に AG73 は EF1zz, A99a 及び A2G10 の HDF の細胞伸展活性を増強させ、C16 は A99a のみの細胞伸展活性を増強させることが示唆された.

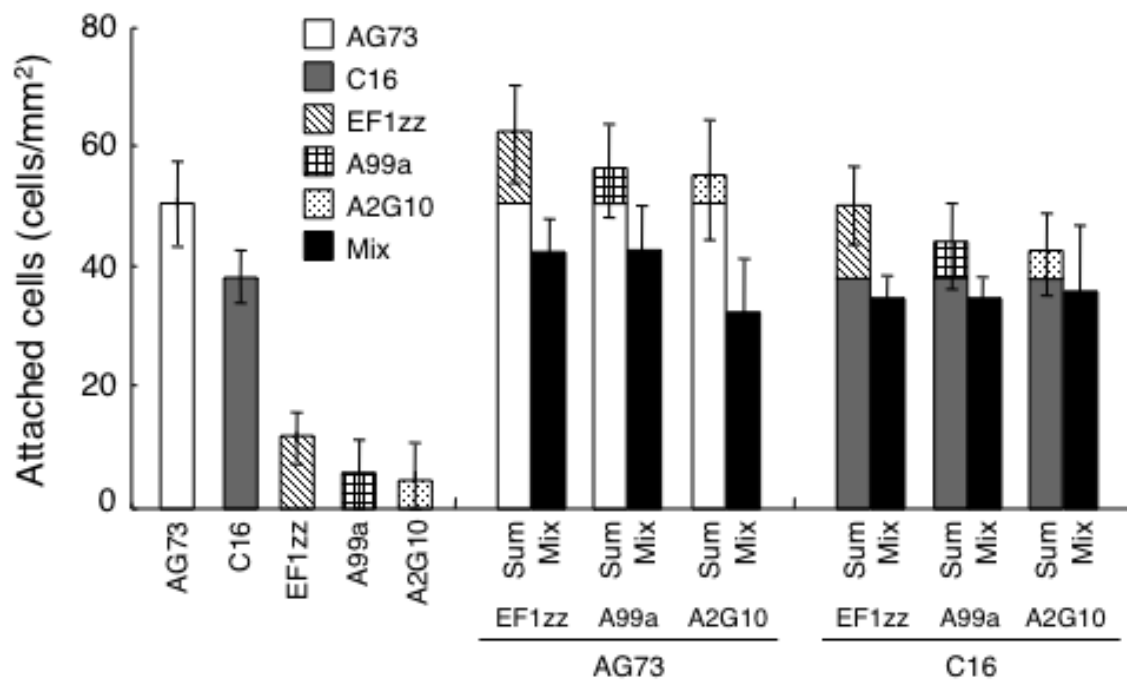


**Fig. 2-2. HDF spreading on peptide-chitosan membranes.**

Peptides (AG73: 3 pmol/mm<sup>2</sup>, C16: 6 pmol/mm<sup>2</sup>, EF1zz: 30 pmol/mm<sup>2</sup>, A99a: 30 pmol/mm<sup>2</sup>, A2G10: 75 pmol/mm<sup>2</sup>) were coupled to the MB-chitosan membranes in 96-well plates as described in Materials and Methods. HDFs ( $1 \times 10^4$  cells/well) were allowed to attach to the single or mixed peptide-chitosan membranes for 1 h and then stained with crystal violet. Images were captured and the area of the attached cells was measured using Bio Zero microscope. The attached cells in three randomly-selected fields were evaluated. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments. Triplicate experiments gave similar results. \*P < 0.001.

### 2-3-4 シンデカン-1 を発現させた B-リンパ球細胞を用いた細胞接着活性

次に、シンデカン-1 とそれぞれの混合ペプチド-キトサン膜の相互作用を調べるために、シンデカン-1 を過剰発現させた B-リンパ球細胞 (ARH-77) を用いて、混合ペプチド-キトサン膜の細胞接着活性を測定した (Fig. 2-3). ARH-77 は AG73 と C16-キトサン膜には接着したが、EF1zz-, A99a-及び A2G10-キトサン膜にはほとんど接着しなかった. また、混合ペプチド-キトサン膜に接着した ARH-77 数は、各ペプチドを単独で用いたときの合計値よりも減少した. この結果から、AG73 と C16 はシンデカン-1 と相互作用していること、ARH-77 の接着数を増加させる混合ペプチド-キトサン膜はなかったことが示された. この結果は、2 種類のペプチドの相乗的な細胞接着活性の増強を誘導するためには、複数ペプチドを混合するのみでなくシンデカンとインテグリンなどの異なるレセプターに同時に作用する必要があることを示唆するものである.

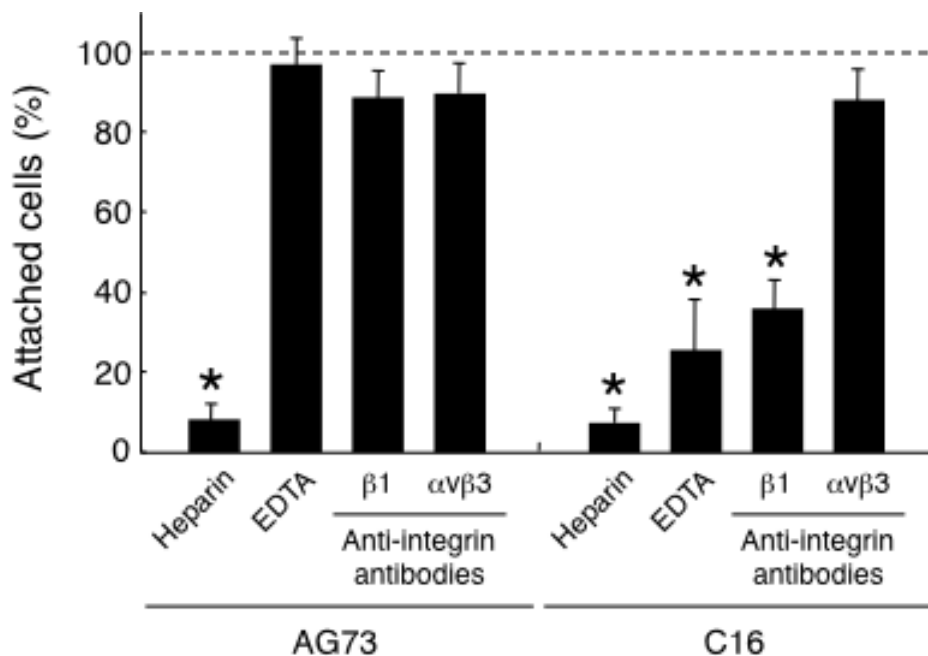


**Fig. 2-3. Syndecan-1-overexpressing ARH-77 cell attachment to peptide-chitosan membranes.**

Peptides (AG73: 3 pmol/mm<sup>2</sup>, C16: 6 pmol/mm<sup>2</sup>, EF1zz: 30 pmol/mm<sup>2</sup>, A99a: 30 pmol/mm<sup>2</sup>, A2G10: 75 pmol/mm<sup>2</sup>) were coupled to the MB-chitosan membranes in 96-well plates as described in Materials and Methods. Syndecan-1-overexpressing ARH-77 ( $1 \times 10^4$  cells/well) were allowed to attach to single or mixed peptide-chitosan membranes for 1 h and then stained with crystal violet. The attached cells in three randomly-selected fields were counted. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments. Sum: the sum of attached cell numbers on each single peptide-chitosan membrane. Mix: the attached cell numbers on mixed peptide-chitosan membranes. Triplicate experiments gave similar results.

### 2-3-5 細胞接着に対するヘパリン, EDTA 及び抗インテグリン抗体の影響

次に, AG73-と C16-キトサン膜が結合するレセプターの特異性を調べるために, ヘパリン, EDTA 及び抗インテグリン抗体の HDF の接着に与える影響を評価した (Fig. 2-4). AG73-キトサン膜の細胞接着活性はヘパリンのみによって阻害され, EDTA と各抗インテグリン抗体は影響を与えなかった. 一方, C16-キトサン膜の細胞接着活性はヘパリン, EDTA 及び抗 $\beta 1$  インテグリン抗体によって阻害されたが, 抗 $\alpha v\beta 3$  インテグリン抗体は影響を与えなかった. 抗 $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  及び $\alpha v$  インテグリン抗体は AG73-と C16-キトサン膜の細胞接着活性に影響を与えなかった (data not shown). この結果から, AG73 と C16 はシンデカンに結合することが示され, さらに C16 は EF1zz, A2G10 と同様に $\beta 1$  インテグリンとも相互作用することが示唆された.



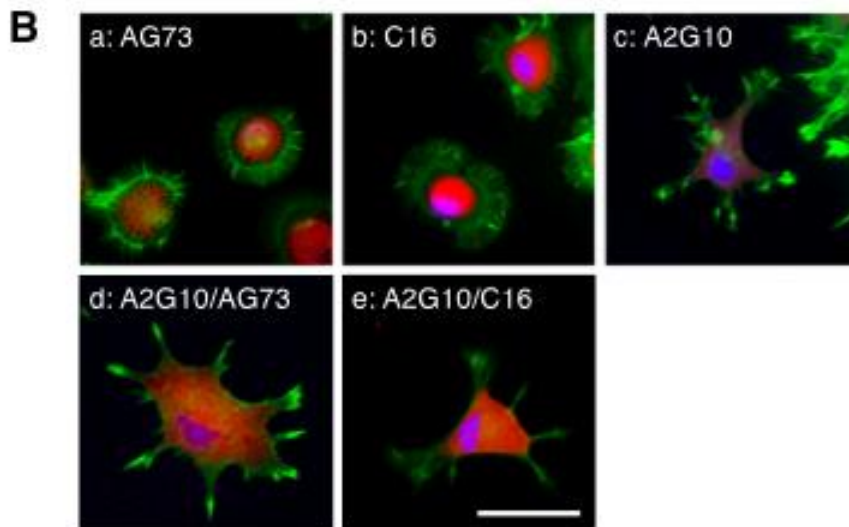
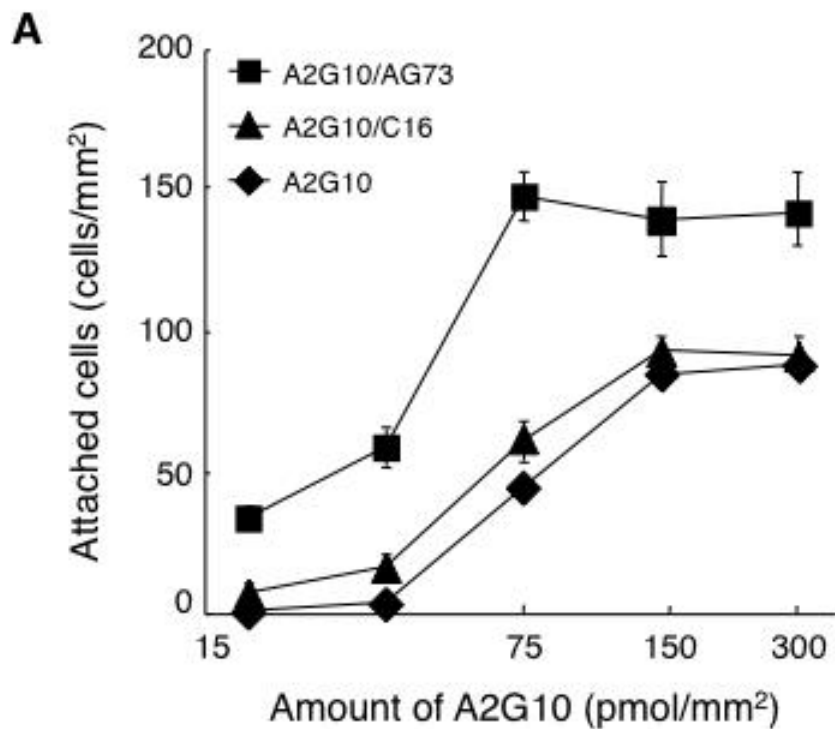
**Fig. 2-4. Effect of heparin, EDTA, and anti-integrin antibodies on HDF attachment to peptide-chitosan membranes.**

Peptides (AG73: 30 pmol/mm<sup>2</sup>, C16: 30 pmol/mm<sup>2</sup>) were coupled to the MB-chitosan membranes in 96-well plates as described in Materials and Methods. HDFs ( $1 \times 10^4$  cells/well) were allowed to attach to the peptide-chitosan membranes in the absence or presence of heparin (10  $\mu$ g/mL), EDTA (5 mM), or anti-integrin antibodies (30  $\mu$ g/mL). Heparin, EDTA, or anti-integrin antibodies were added to the cell suspension and then cells were plated. After a 1 h-incubation, the attached cells were assessed by crystal violet staining. The values are expressed as mean  $\pm$  S.D. of triplicate results. Triplicate experiments gave similar results. \*P < 0.001.



### 2-3-6 A2G10/AG73-, A2G10/C16-キトサン膜の細胞接着活性

次に、 $\alpha 6\beta 1$  インテグリン結合ペプチドの A2G10 に着目し、A2G10/AG73 と A2G10/C16 の最適な混合比を求めた。A2G10-, A2G10/AG73-及び A2G10/C16-キトサン膜は濃度依存的な HDF の細胞接着活性を示した (Fig. 2-5A)。A2G10/AG73-キトサン膜は、A2G10-キトサン膜と比較してより強い HDF の細胞接着活性を示し、混合比 A2G10:AG73 = 25:1 のときに強い細胞接着活性を示したことから、混合比 A2G10:AG73 = 25:1 が最適混合比であることが示唆された。次に、ペプチド-キトサン膜に接着した HDF の形態を観察した (Fig. 2-5B)。AG73-と C16-キトサン膜に接着した HDF はアクチンが細胞周囲に集積しラフリング膜が形成されたが、ビンキュリンの集積は見られなかった。A2G10-キトサン膜はわずかなアクチンストレスファイバーの形成が見られた。一方、A2G10/AG73-キトサン膜はアクチンストレスファイバーの形成とビンキュリンの集積を含む接着斑が観察された。A2G10/C16-キトサン膜に接着した HDF の形態は、A2G10-キトサン膜に接着したものと同様であった。



**Fig. 2-5. HDF attachment activity of the A2G10-chitosan membranes.**

A; Various amounts of A2G10 (15 - 300 pmol/mm<sup>2</sup>) were coupled to the MB-chitosan membranes in the absence or presence of AG73 (3 pmol/mm<sup>2</sup>) and C16 (6 pmol/mm<sup>2</sup>). The HDFs (1 x 10<sup>4</sup> cells/well) were allowed to attach to the peptide-chitosan membranes for 1 h and then stained with crystal violet. The attached cells in three randomly-selected fields were counted. Each value represents the mean ± S.D. of triplicate experiments. Triplicate experiments gave similar results. B; Morphology and actin stress fibers of HDFs on the peptide-chitosan membranes. HDFs (8 x 10<sup>3</sup> cells/well) were plated on 8-well glass chambers coated with peptide-chitosan membranes for 2 h. The attached cells were fixed, and then stained with phalloidin, anti-vinculin antibody, and DAPI for actin filaments (green), focal contacts (red), and nuclei (blue). (a) AG73 (30 pmol/mm<sup>2</sup>); (b) C16 (30 pmol/mm<sup>2</sup>); (c) A2G10 (75 pmol/mm<sup>2</sup>); (d) A2G10 (75 pmol/mm<sup>2</sup>)/AG73 (3 pmol/mm<sup>2</sup>); (e) A2G10 (75 pmol/mm<sup>2</sup>)/C16 (6 pmol/mm<sup>2</sup>). Bar indicates 50 μm.

#### 第4節：考察

ECM タンパク質は三次元超分子ネットワークを形成し、組織の発生や再生に重要な役割を果たしていることが知られている<sup>73)</sup>。現在、ECM の機能の模倣はバイオマテリアル研究の手法の一つと考えられている。細胞表面レセプターとして ECM と結合するインテグリンとシンデカン<sup>36)</sup>は、細胞内シグナル伝達において協調的に働いていることが報告されている<sup>36)</sup>。以前から、2種類のラミニン由来合成ペプチド AG73/EF1 及び AG73/A99 を用いた研究によって、それぞれシンデカン/ $\alpha 2\beta 1$  インテグリン及びシンデカン/ $\alpha v\beta 3$  インテグリンの協調的な作用が証明されてきた<sup>20, 40)</sup>。混合ペプチド AG73/EF1 はそれぞれ単独で用いたときに比べ、より強く速い細胞接着活性、細胞伸展活性を示し、より強力に FAK のリン酸化を促進した<sup>68)</sup>。さらに、AG73 と EF1zz を混合してキトサン膜に固定化することにより、各ペプチドの生物活性が相乗的に増強された<sup>40)</sup>。また近年、シンデカン結合ペプチドは、I型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどのインテグリン結合タンパク質の生物活性を増強させる「促進剤」として機能することが報告された<sup>39)</sup>。

本章では、2種類のシンデカン結合ペプチド AG73, C16 と、それぞれ $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  及び $\alpha 6\beta 1$  インテグリンと相互作用する3種類のインテグリン結合ペプチド EF1zz, A99a 及び A2G10 を用いて混合ペプチド-キトサン膜を作製し、その細胞接着活性、細胞伸展活性を評価した。キトサン膜は足場材料として使用し、シンデカン結合ペプチドとインテグリン結合ペプチドをキトサン膜に共有結合させた。その結果、混合ペプチド-キトサン膜がシンデカンとインテグリンに同時に作用することで細胞接着活性、細胞伸展活性が増強されることがわかり、バイオマテリアルとしての有用性が示された。AG73 は EF1zz, A99a 及び A2G10 の細胞接着活性、細胞伸展活性を増強させることができた。対照的に、C16 は A99a の細胞接着活性、細胞伸展活性のみ増強させた。この結果は、C16 は EF1zz と A2G10 の細胞接着活性、細胞伸展活性は増強できないことを示唆している。その原因として、AG73-キトサン膜はシンデカンのみと相互作用するのに対して、C16-キトサン膜はシンデカンと $\beta 1$  インテグリンの2種類のレセプターと相互作用していることが考えられる。C16 は $\beta 1$  インテグリンとの相互作用において EF1zz, A2G10 と競合するため、これらのペプチドの活性を増強できなかったことが示唆された。AG73 はシンデカンのみと相互作用することから、様々なタイプのインテグリン結合ペプチドとの混合に適していることがわかった。また、シンデカン-1 を過剰発現させた ARH-77 を用いて細胞接着活性を評価した結果、全ての混合ペプチド-キトサン膜で細胞接着活性の増強は認められなかった。この結果から、2種類のペプチドの相乗的な生物活性の増強を誘導するためには、複数ペプチドを混合

するのみでなくシンデカンとインテグリンなどの異なるレセプターに同時に作用することが必要であると示唆された。

次に、キトサン膜上での細胞接着活性における A2G10/AG73 の混合比の最適化を試みた。AG73 を種々の濃度の A2G10 と混合し細胞接着活性を評価したところ、A2G10 (75 pmol/mm<sup>2</sup>)/AG73 (3 pmol/mm<sup>2</sup>)-キトサン膜が強い細胞接着活性を示すことがわかった。この結果から、モル比 25:1 の混合比がシンデカンと $\alpha$ 6 $\beta$ 1 インテグリンを介した細胞接着において相乗効果を誘導する最適な混合比であることが示唆された。以上より、A2G10/AG73 (25:1)-キトサン膜は、 $\alpha$ 6 $\beta$ 1 インテグリンの生物学的な機能を解析するための有用なツールとなり得る上に、ECM を模倣したバイオマテリアルとしての応用が期待される。

これまでに多くの研究によって、インテグリンとシンデカンを含む様々な細胞膜タンパク質によって細胞応答がコントロールされていることが明らかにされてきた。また、アクチンストレスファイバーと接着斑の形成に関与するインテグリンのシグナル伝達にはシンデカンが必要であることも証明されてきた。例えば、ECM タンパク質であるフィブロネクチンはシンデカン-4 とインテグリンの両レセプターに結合し、細胞伸展と接着斑の集積を制御していることが報告されている<sup>69,70</sup>。また、カルシノーマ細胞の $\alpha$ v $\beta$ 3 インテグリンを介したビトロネクチンへの接着の際にはシンデカン-1 のクラスターリングが必要であることも報告されている<sup>29</sup>。加えて、 $\alpha$ v $\beta$ 3 インテグリンの細胞外ドメインは血小板増殖因子- $\beta$  (PDGF- $\beta$ ) と血管内皮増殖因子 2 (VEGF-2) と相互作用し、細胞増殖や細胞遊走をコントロールしているという報告もある<sup>36</sup>。これらの研究報告と同様に混合ペプチド-キトサン膜上においても、シンデカンとインテグリンが協調的に働いて細胞応答を制御していると推察される。

これらの研究から、*in vivo* での細胞接着において、シンデカンとインテグリンの両レセプターが同時に機能することは不可欠であると考えられる。本章で行った混合ペプチド-キトサン膜のアプローチでは、シンデカンとインテグリンの協調的な働きを誘導することができた。このアプローチは多様なレセプター間相互作用の研究に役立つものであり、細胞あるいは組織特異的なバイオマテリアルの開発に有用であると考えられる。

以上本章では、2 種類のシンデカン結合ペプチド AG73, C16 と、3 種類のインテグリン結合ペプチド EF1zz, A99a 及び A2G10 を用いた混合ペプチド-キトサン膜の細胞接着活性、細胞伸展活性を評価した。その結果、AG73 はシンデカンのみに結合することから 3 種類全てのタイプのインテグリン結合ペプチドの細胞接着活性、細胞伸展活性を増強させ、C16 はシンデカンと $\beta$ 1 インテグリンに結合することから $\beta$ 1 イン

テグリンには結合しない A99a の細胞接着活性，細胞伸展活性を増強させることが明らかになった。

### 第3章 ペプチド-キトサン膜の足場効果

#### 第1節：序論

組織工学は機能的な組織や臓器の代替物を創出することを目的としている<sup>89)</sup>。培養細胞の足場材料には天然由来物と人工合成物があり、それら自体は不活性である。そのため、ターゲットとする臓器に特異的な生物活性を足場材料に付与する試みが行われている。ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンなどのECM成分やそれら由来の活性ペプチドは、組織特異的な生物活性を足場材料に付与するための候補物質と考えられている<sup>89-91)</sup>。薄い膜状のECMである基底膜は、発生や組織の再生、再構築に重要な役割を果たしていることが知られている<sup>92)</sup>。生体内で基底膜は細胞の足場として機能していることから、組織工学の分野では基底膜の模倣が重要な研究テーマとなっている。基底膜の主要な構成タンパク質であるラミニンは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖からなる巨大なヘテロ3量体の糖タンパク質であり、皮膚、筋肉、神経、腎臓、血管あるいは脂肪組織等に存在する<sup>6)</sup>。ラミニンは細胞接着、細胞遊走、細胞増殖、神経突起伸長、血管新生の促進など基底膜機能のほとんどを有する多機能性タンパク質である<sup>6,7)</sup>。

以前から、2000以上の合成ペプチドを用いたシステムチックなスクリーニングによってラミニン由来の多くの活性ペプチドが同定されてきた<sup>10-13, 22, 67, 93, 94)</sup>。これらの活性ペプチドの多くは特異的に相互作用する細胞表面レセプターが同定され、バイオマテリアルとして組織工学への応用の可能性が示されてきた<sup>20, 21, 40, 42, 72, 88)</sup>。

キチンを脱アセチル化して得られるキトサンは、生分解性であり、創傷治癒を促進することが報告されている<sup>63, 64)</sup>。キトサン膜は組織には接着するが、それ自体には細胞接着活性はない<sup>20)</sup>。キトサンは縫合糸や人工皮膚などの形ですでに臨床応用されている<sup>65, 66)</sup>。以前から、ラミニン由来活性ペプチドをキトサン膜に固定化し、ECMを模倣する研究が行われてきた<sup>20, 21, 40)</sup>。ペプチドの生物活性は、キトサン膜に固定化することで大きく増強された<sup>20, 66)</sup>。近年、取り扱いが容易なペプチド-キトサン膜が開発され、*in vivo* アッセイによってその臨床応用への可能性が示された<sup>42)</sup>。ラミニン由来活性ペプチドを固定化したキトサン膜が、ケラチノサイトの創傷部位への移植に効果的に働くことが報告された<sup>42, 72)</sup>。また、AG73-キトサン膜は、AG73をプレートにコートしたときと同様に血管新生促進活性を保持していることも示された<sup>88)</sup>。これらの結果から、ペプチド-キトサン膜は細胞移植などの組織工学の分野への応用に向けて有用なツールとなり得ることが示唆された。ペプチド-キトサン膜の有用性が証明された一方で、キトサン膜の足場材料としての特性、ペプチドとレセプターとの相互作用に与える影響や生物活性に対する効果は未だ十分に研究されていない。

本章では、ペプチド-キトサン膜の足場効果に着目し、足場材料としてのキトサン膜を最適化し、ペプチド-レセプター間の相互作用や生物学的機能を効率よく誘導することを目的とした。キトサン量の異なる6種類の膜（1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>, Fig 3-1）にラミニン $\alpha$ 1鎖由来の $\alpha$ v $\beta$ 3インテグリン結合ペプチド A99a とシンデカン結合ペプチド AG73 を固定化させたペプチド-キトサン膜を作製した。これら種々のペプチド-キトサン膜の足場効果を評価するために、細胞接着活性、細胞伸展活性、FAKのリン酸化、神経突起伸長などの生物活性を測定した。また、ペプチド-キトサン膜が効率よく生物活性を誘導するための最適なキトサン量を決定した。さらに、混合ペプチド A99a/AG73-キトサン膜の足場効果についても評価した。

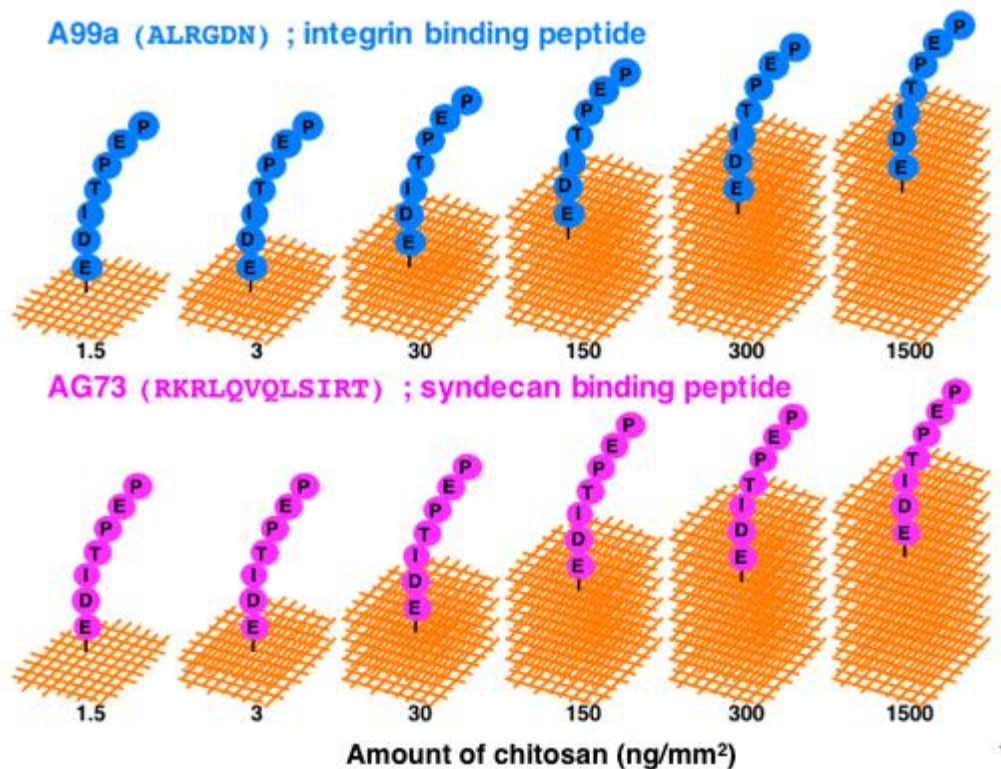


Fig. 3-1. Various peptide-chitosan membranes (1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>)

## 第2節：実験材料および実験方法

### 3-2-1 ペプチド合成

ペプチド合成は第1章で記載した方法に従って行った。

### 3-2-2 細胞培養

HDF と PC12 細胞を第1章で記載した方法に従って培養した。

### 3-2-3 Maleimidobenzoyloxy (MB) -キトサンの調製

MB-キトサンの調製は第1章で記載した方法に従って行った。

### 3-2-4 細胞接着活性の評価

はじめに、濃度の異なる6種類のMB-キトサン溶液(4%酢酸, 1-1000 µg/mL)を調製した。各MB-キトサン溶液を50 µLずつ96-wellプレートに加え24時間室温で乾燥させることにより、キトサン量の異なる6種類の膜(1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>, Fig 3-1)を作製した。各wellに1% NaHCO<sub>3</sub>水溶液(100 µL)を加え、10分間塩基処理した後PBS(100 µL)で2回洗浄した。ペプチド溶液(1 mM, 0.1%TFA水溶液, 50 µL)と1% NaHCO<sub>3</sub>水溶液(50 µL)を加え、室温で遮光して2時間インキュベートすることにより、6種類のキトサン量の異なるペプチド-キトサン膜を作製した(Fig 3-1)。以下、HDFの細胞接着活性の評価は第1章で記載した方法に従って行った。

### 3-2-5 細胞接着に対する阻害アッセイ

HDFの細胞接着に対する阻害の評価は第1章で記載した方法に従って行った。

### 3-2-6 神経突起伸長アッセイ

神経突起伸長の評価は第1章で記載した方法に従って行った。

### 3-2-7 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色は第1章で記載した方法に従って行った。

### 3-2-8 FAKのリン酸化の測定

HDF(2×10<sup>4</sup> cells/well/50 µL)を37°C, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で90分間培養した。その後、HDFを50 µLのSDSサンプルバッファーで溶解させ、7.5%のSDS-PAGEで分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜に転写した。この膜を3% BSAでブロッッキング



グし，抗リン酸化 FAK 抗体（Tyr397）もしくは抗 FAK 抗体（1:1000, Cell Signaling）を 4℃で一晩反応させ，標識 2 次抗体（HRP）（1:2000, GE Healthcare）で ECL キット（GE Healthcare）を用いて検出した．リン酸化された FAK の相対値を ImageJ 1.63 ソフトウェアを用いてバンドの濃さより解析した．

### 3-2-9 統計解析法

2 群間の有意差の判定は Student-*t* 検定を用いて行い，危険率 1%以下で有意差ありとした．また，データは全て平均±標準偏差で表した．

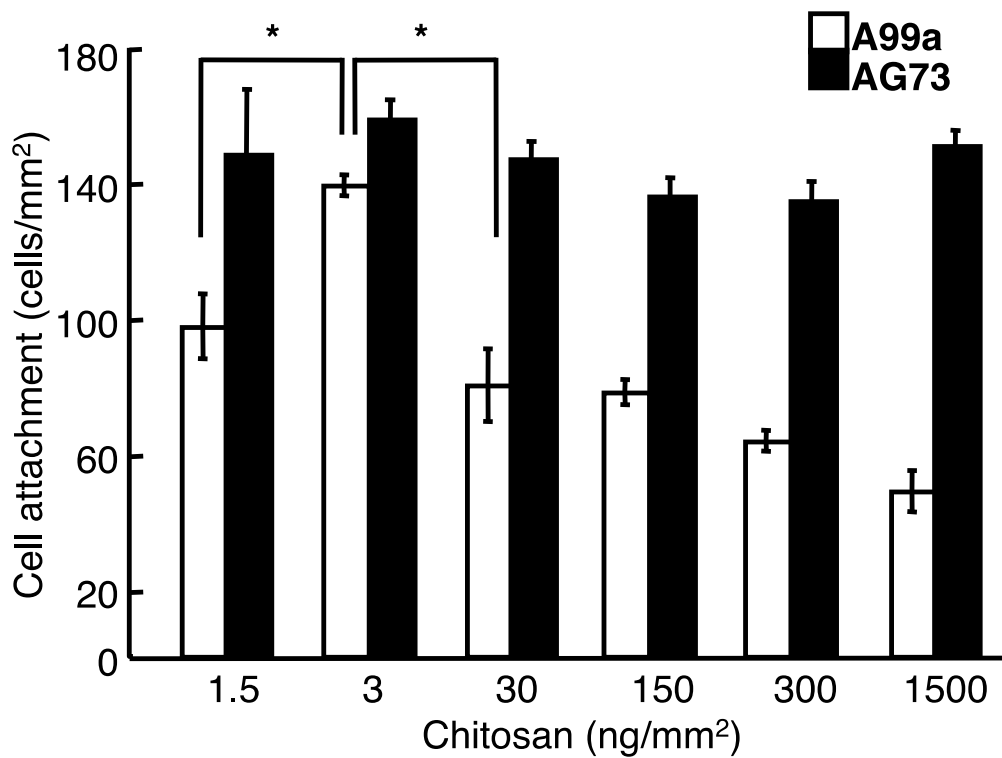
## 第3節：実験結果

### 3-3-1 ペプチド合成

A99a と AG73 の 2 種類の細胞接着ペプチドの N 末端に Cys-Gly-Gly (CGG) の配列を付加した CGG ペプチドを合成した。

### 3-3-2 ペプチド-キトサン膜の細胞接着活性

2 種類の細胞接着ペプチド (A99a, AG73) を用い、キトサン量の異なる 6 種類のペプチド-キトサン膜 ( $1.5-1500 \text{ ng/mm}^2$ , Fig 3-1) を作製した。HDF を用いて、これらのペプチド-キトサン膜の細胞接着活性を測定した (Fig. 3-2)。ペプチドの結合していないキトサン膜は細胞接着活性を示さなかった (data not shown)。また、A99a-キトサン膜は全てのキトサン量 ( $1.5-1500 \text{ ng/mm}^2$ ) で AG73-キトサン膜よりも弱い細胞接着活性を示した。A99a-キトサン膜の細胞接着活性は、キトサン量  $3 \text{ ng/mm}^2$  のときに最大となり、キトサン量の増加に伴い徐々に減少した。一方、AG73-キトサン膜の細胞接着活性は全てのキトサン量 ( $1.5-1500 \text{ ng/mm}^2$ ) においてほとんど変化しなかった。この結果から、A99a-キトサン膜の細胞接着活性はキトサン量に依存するが、AG73-キトサン膜の細胞接着活性はキトサン量の影響を受けにくいことが示唆された。



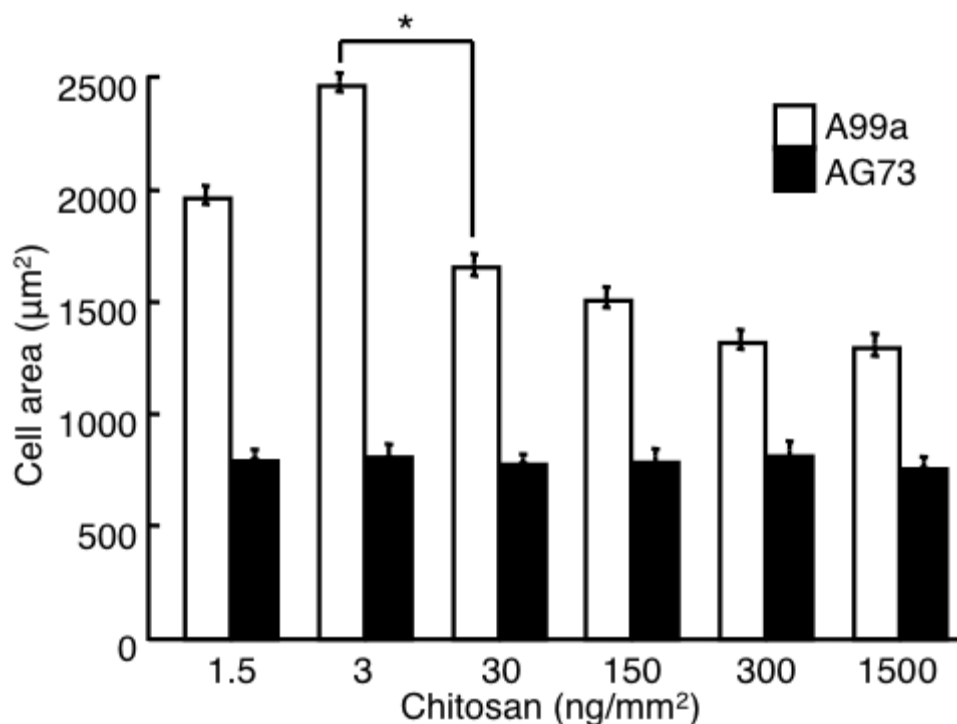
**Fig. 3-2. Cell attachment activity on peptide-chitosan membranes.**

CGG-A99a and CGG-AG73 (50 nmol/well) were coupled to the MB-chitosan membranes (1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>) in 96-well plates. HDFs ( $5 \times 10^3$  cells) were allowed to attach to the peptide-chitosan membranes for 2h and then stained with crystal violet. The attached cells in three randomly selected fields were counted. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments. \*P < 0.0005. Triplicate experiments gave similar results.

### 3-3-3 ペプチド-キトサン膜の細胞伸展活性

次に、HDFを用いて6種類のペプチド-キトサン膜 (1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>) の細胞伸展活性を評価した (Fig. 3-3). A99a-キトサン膜に接着したHDFはキトサン量に依存した細胞伸展を示した. 一方, AG73-キトサン膜に接着したHDFはいずれのキトサン量においても, AG73をプレートコートしたときと同様に丸い形態を示した.

A99a-キトサン膜では, キトサン量 1.5-3 ng/mm<sup>2</sup> のときHDFの面積は大きくなり, HDFは強く伸展した. 特に, キトサン量 3 ng/mm<sup>2</sup> のとき細胞伸展活性は最大となった. また, 細胞伸展活性はキトサン量の増加に伴い徐々に減少し, 細胞接着活性と同様にキトサン量に大きく依存した. 対照的に, AG73-キトサン膜の細胞伸展活性は全てのキトサン量 (1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>) において大きな変化はなく, 細胞接着活性と同様にキトサン量には依存しなかった. この結果から, インテグリンを介したHDFの細胞伸展は足場の影響を受けやすいことが示唆された.

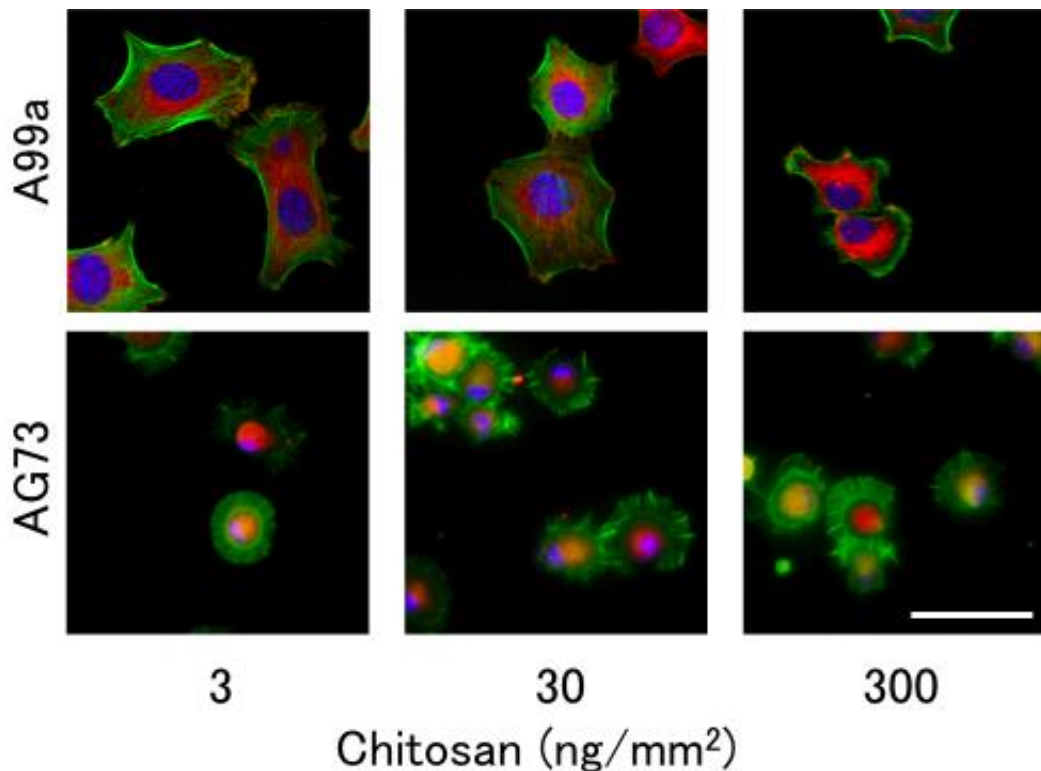


**Fig. 3-3. Cell spreading activity on peptide-chitosan membranes.**

CGG-A99a and CGG-AG73 (50 nmol/well) were coupled to the MB-chitosan membranes (1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>) in 96-well plates. HDFs ( $5 \times 10^3$  cells) were allowed to attach to the peptide-chitosan membranes for 2h and then stained with crystal violet. Images were captured and the area of the attached cells was measured using BZ-analyzer software (Keyence). Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments. \*P < 0.0005.

### 3-3-4 細胞形態の観察

次に、3種類のパプチド-キトサン膜 (3-300 ng/mm<sup>2</sup>) 上の HDF の細胞骨格と接着斑の形成を評価するために、アクチンとビンキュリンを免疫染色して観察した (Fig. 3-4). A99a-キトサン膜では、キトサン量が少ない 3 ng/mm<sup>2</sup> のとき HDF の細胞骨格・アクチンストレスファイバーと接着斑の形成が観察された. しかし、キトサン量の増加に伴ってアクチンストレスファイバーと接着斑の形成は減少した. 対照的に、AG73-キトサン膜では、キトサン量にかかわらず (3-300 ng/mm<sup>2</sup>), アクチンが細胞膜の周囲に集積したラフリング膜の形成が観察された. この結果から、足場としてのペプチド-キトサン膜の HDF の細胞骨格形成に与える影響はペプチドによって異なることが明らかになった.

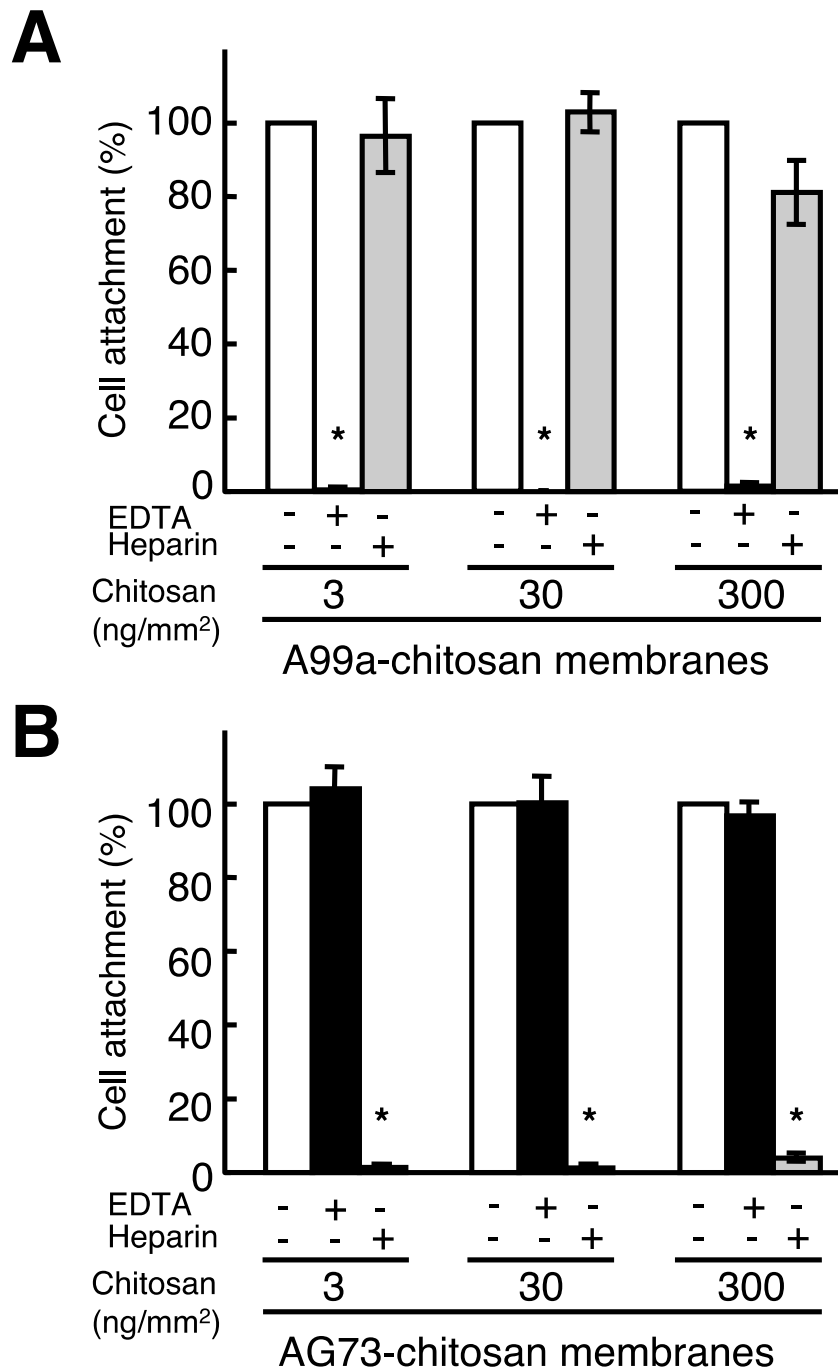


**Fig. 3-4. Morphology and actin stress fibers on peptide-chitosan membranes .**

HDFs ( $8 \times 10^3$  cells) were incubated on 8-well plastic chambers coated with A99a- and AG73-chitosan membranes (3-300 ng/mm<sup>2</sup>) for 2h. Cells were fixed, and then stained with phalloidin, anti-vinculin antibody, and DAPI for actin filaments (green), focal contacts (red), and nuclei (blue). Bar indicates 50  $\mu$ m.

### 3-3-5 細胞接着に対する EDTA とヘパリンの影響

次に、ペプチド-キトサン膜 (3-300 ng/mm<sup>2</sup>) への HDF の接着に対する EDTA とヘパリンの影響を評価した。EDTA は A99a-キトサン膜への HDF の接着を阻害したが、AG73-キトサン膜への接着には影響しなかった (Fig. 3-5A)。一方、ヘパリンは AG73-キトサン膜への HDF の接着を阻害したが、A99a-キトサン膜への接着には影響しなかった (Fig. 3-5B)。これらの結果は、A99a-キトサン膜への HDF の接着は二価カチオン依存的なインテグリンを介する接着であること、AG73-キトサン膜への HDF の接着はシンデカンなどの HSPGs を介する接着であることを示している。さらに、ペプチドのレセプター特異的な相互作用は、キトサンの量に影響されないことがわかった。



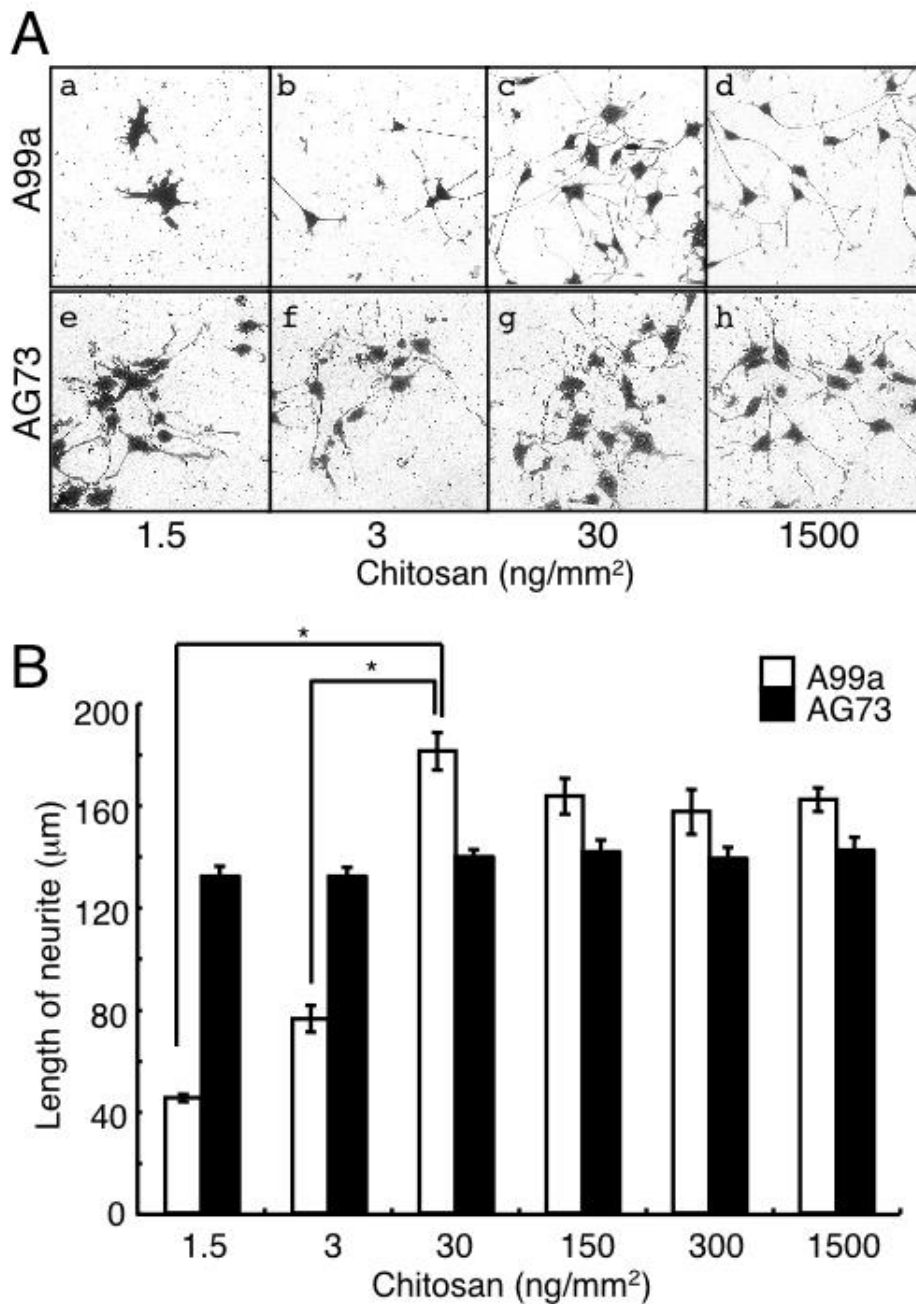
**Fig. 3-5. Effect of EDTA and heparin on HDF attachment to peptide-chitosan membranes.**

HDFs were allowed to attach to the peptide-chitosan membranes (A: A99a-chitosan membranes, B: AG73-chitosan membranes) in the absence (white bars) or presence (black bars) of 5 mM EDTA, or presence (gray bars) of 10  $\mu$ g/mL heparin. EDTA or heparin was added to the cell suspension and then the cells were plated. After a 1 h-incubation, the attached cells were assessed by crystal violet staining. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of triplicate results. \* $P < 0.0001$ . Triplicate experiments gave similar results.

### 3-3-6 ペプチド-キトサン膜の神経突起伸長活性

次に、6種類のペプチド-キトサン膜 (1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>) の神経突起伸長活性を、PC12細胞を用いて評価した (Fig. 3-6)。A99a-キトサン膜上では、キトサン量の増加に伴って神経突起伸長が促進し、キトサン量 30 ng/mm<sup>2</sup> 以上で A99a-キトサン膜は強い神経突起伸長活性を示した。この結果から、A99a-キトサン膜上の神経突起伸長活性はキトサン量に依存し、キトサン量 30 ng/mm<sup>2</sup> 以上で強い神経突起伸長活性が得られることがわかった。一方、AG73-キトサン膜は全てのキトサン量 (1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>) において神経突起伸長活性に大きな変化はなかった。以上より、インテグリンを介した神経突起伸長は足場としてのペプチド-キトサン膜の影響を強く受けることが示唆された。





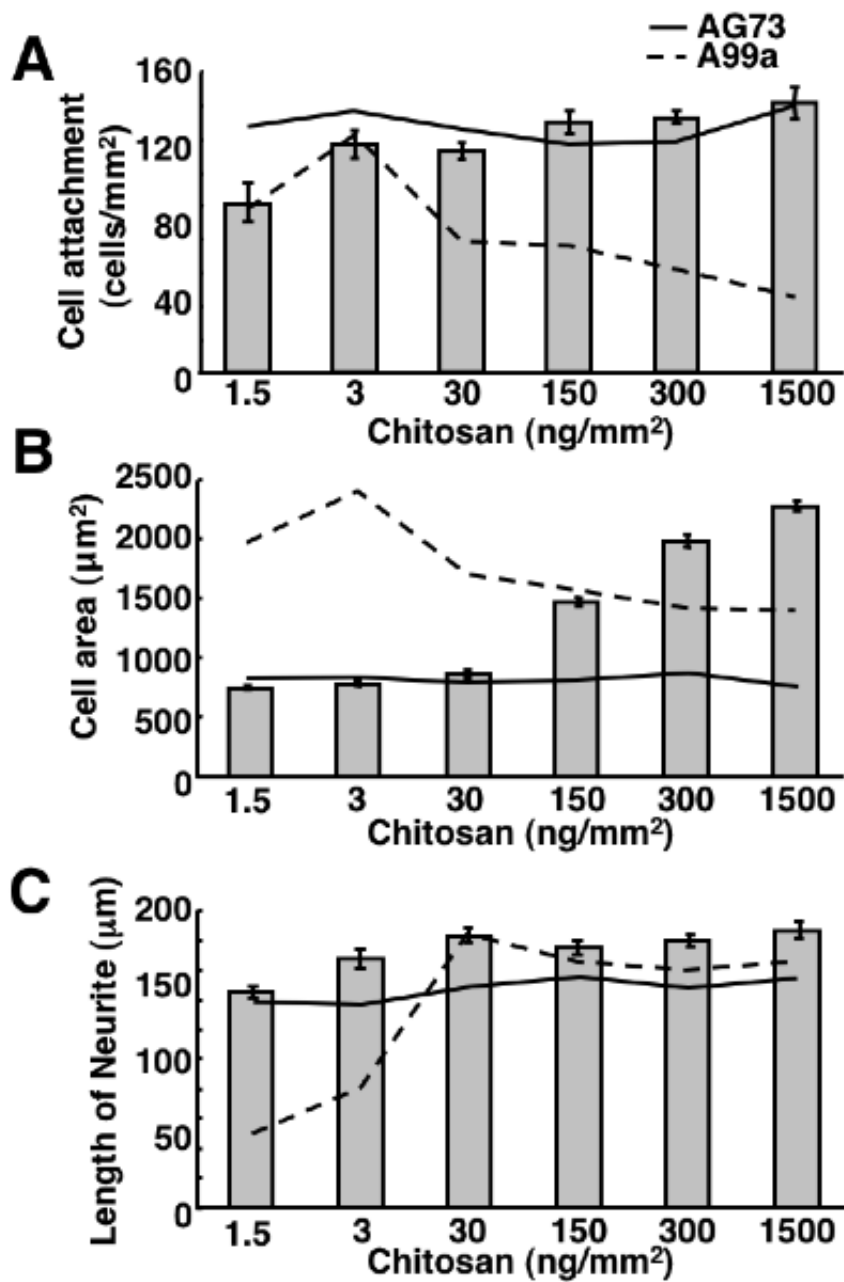
**Fig. 3-6. Neurite outgrowth activity on peptide-chitosan membranes.**

A; PC12 cells ( $3 \times 10^3$  cells) were cultured on A99a- and AG73-chitosan membranes (1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>) in 96-well plates. PC12 cells were assayed. After a 24 h-incubation, attached and extended cells were assessed by crystal violet staining. a-d; A99a-chitosan membranes (1.5, 3, 30, and 1500 ng/mm<sup>2</sup>), e-h; AG73- chitosan membranes (1.5, 3, 30, and 1500 ng/mm<sup>2</sup>). B; Images were captured and the length of the neurites were measured. The graph is representative of at least three similar experiments and values  $\pm$  S.D. are indicated. \*P < 0.0001.

### 3-3-7 A99a/AG73 混合ペプチド-キトサン膜の生物活性

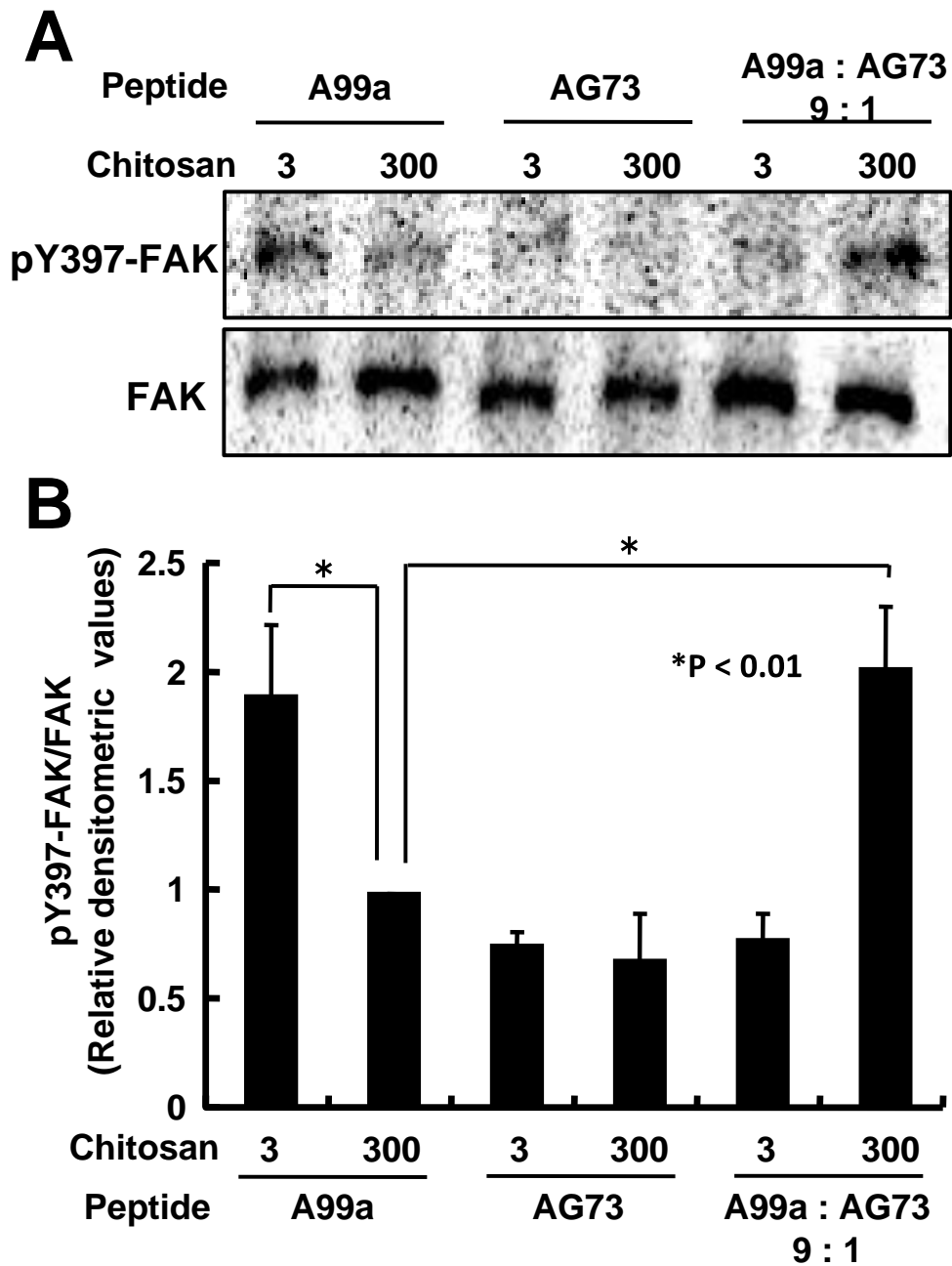
A99/AG73 混合ペプチド-キトサン膜が効果的に HDF の伸展とアクチンストレスファイバーの形成を促進することがすでに報告されている<sup>20)</sup>。本章においては、A99a/AG73 ペプチド-キトサン膜（混合比 A99a:AG73 = 9:1）の生物活性について詳細に評価した。

HDF を用いた A99a/AG73-キトサン膜の細胞接着活性と神経突起伸長活性は AG73-キトサン膜と同程度だった (Fig. 3-7A and C)。一方、HDF を用いた A99a/AG73-キトサン膜の細胞伸展活性は、キトサン量が少ないとき (1.5-30 ng/mm<sup>2</sup>) は AG73-キトサン膜と同程度であったが、キトサン量が多いとき (150-1500 ng/mm<sup>2</sup>) はその活性は増強された (Fig. 3-7B)。さらに、キトサン量が多いとき (300 ng/mm<sup>2</sup>)、A99a/AG73-キトサン膜に接着した HDF の Tyr397-FAK のリン酸化が促進された (Fig. 3-8)。一方、A99a-キトサン膜 (300 ng/mm<sup>2</sup>) と AG73-キトサン膜 (3, 300 ng/mm<sup>2</sup>) に接着した HDF の Tyr397-FAK のリン酸化は促進されなかった。これらの結果は、キトサン量が多いときに、A99a とインテグリンとの結合と AG73 とシンデカンとの結合は相互に協調的に働き、混合ペプチド-キトサン膜の生物活性を相乗的に増強させることを示唆している。



**Fig. 3-7. Cell attachment and spreading and neurite outgrowth activity on mixed peptide-chitosan membranes.**

CGG-AG73 (5 nmol/well) and CGG-A99a (45 nmol/well) were coupled to the MB-chitosan membranes (1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>) in 96-well plates. A; HDFs (5 x 10<sup>3</sup> cells) were allowed to attach to the peptide-chitosan membranes for 2 h and then stained with crystal violet. The attached cells in three randomly selected fields were counted. B; Images were captured and the area of the attached cells was measured using BZ-analyzer software (Keyence). C; The length of the neurites was measured. Images were captured and the length of the neurites was measured. The line in each graphs indicated in result in previous figure: A; solid line AG73, dot line A99a from Fig. 3-2, B; solid line AG73, dot line A99a from Fig. 3-3, C; solid line AG73, dot line A99a from Fig. 3-6. \*P < 0.0005. Triplicate experiments gave similar results.



**Fig. 3-8. Phosphorylation of FAK Tyr397 on mixed peptide-chitosan membranes.**

A; Tyr397-FAK phosphorylation and FAK of HDFs on A99a/AG73 (molar ratio A99a:AG73 = 9:1)-chitosan membranes were analyzed by immunoblotting. The HDFs were incubated on the various peptide-coated plates (50  $\mu$ l,  $2 \times 10^4$  cells/well) for 90 min, were lysed by 50  $\mu$ l of SDS sample buffer, and assessed by western blotting. B; Quantitation of A. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of triplicate results. \*P<0.01. Triplicate experiments gave similar results.

#### 第4節：考察

物理的にも生物学的にも優れた機能を持ち、組織の再生・修復をサポートする足場材料のデザインは組織工学の分野の重要な課題である<sup>95,96)</sup>。生体内で細胞は、組織の維持、発生の誘導、あるいは組織再生の促進に重要な役割を果たし3Dマトリックスを形成しているECMに囲まれている。バイオマテリアルの研究において、ECMを模倣することが新たな研究の方向性と考えられている<sup>90,91)</sup>。薄い膜状のECMである基底膜は、様々な細胞表面レセプターと相互作用し、多くの生物学的機能を制御している<sup>95)</sup>。基底膜の模倣物は、細胞工学や組織工学の分野において理想的なバイオマテリアルの一つであると考えられている<sup>96)</sup>。基底膜成分であるラミニンは多機能性タンパク質であり、基底膜において多くの生物学的機能を担っている<sup>6)</sup>。

本章では、細胞機能に対するペプチド-キトサン膜の足場効果を評価した。6種類の異なる量(1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>)のキトサン膜を足場材料として用い、インテグリン結合ペプチドとシンデカン結合ペプチドを共有結合させた。 $\alpha v \beta 3$ インテグリン結合ペプチドA99aを種々の量のキトサン膜に固定化した場合、その細胞接着活性はキトサン量に依存し、キトサン量3 ng/mm<sup>2</sup>のときに活性は最大であった。また、キトサン量3 ng/mm<sup>2</sup>のときには細胞伸展活性も最大となり、細胞骨格形成も強く促進された。さらに、キトサン量3 ng/mm<sup>2</sup>のときにはTyr397-FAKのリン酸化が促進された。これらの結果から、インテグリンを介したA99a-キトサン膜への細胞接着はキトサン量に依存することが示唆された。神経突起伸長活性が最大となったのは、キトサン量30 ng/mm<sup>2</sup>のときであった。以上より、A99a-キトサン膜は特定のキトサン量のときに生物活性が最大となると考えられる。対照的に、AG73-キトサン膜の細胞接着活性、神経突起伸長活性は全てのキトサン量(1.5-1500 ng/mm<sup>2</sup>)で変化しなかった。これらの結果から、インテグリンを介した細胞接着は足場条件が非常に重要となり、シンデカンを介した細胞接着は足場条件に依存しないことが示された。

多くの研究によって、細胞応答はインテグリンとシンデカンを含む様々な要因によって制御されていることが明らかになっている。例えば、ECMタンパク質であるビトロネクチンは、シンデカン-1とインテグリンの両方に作用し細胞伸展と接着斑の集積を制御していることが報告されている<sup>29,98)</sup>。フィブロネクチンはシンデカン-2と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンに結合し接着斑の形成を誘導しているという報告もなされている<sup>38)</sup>。これらの研究結果は、インテグリンとシンデカンが同時に機能することは細胞接着において非常に重要であることを示している。A99a/AG73-キトサン膜(3-30 ng/mm<sup>2</sup>)はインテグリンとシンデカンの両レセプターと効果的に相互作用し、細胞接着基質として有用であることが示された。固定化するペプチドごとにペプチド-キト

サン膜を最適化することによって、効率的なバイオマテリアルの開発が可能になることが示された。

A99a-キトサン膜の生物活性がキトサン量に依存することから、インテグリンを介した細胞接着は足場条件の影響を強く受けることがわかった。近年、足場材料の物理的強度が細胞接着において重要な要素であることが示されてきた<sup>100, 101</sup>。インテグリン-ECM 結合の初期段階では、接着斑の前駆体となる小さなタンパク質の複合体が形成されることにより、細胞を引っ張る力が発生する<sup>102</sup>。インテグリン-ECM 結合によって、細胞接着の初期から  $1-3 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$  のけん引力が生じている。一方で、ラメリポディアの形成によっては  $0.8-0.9 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$  のけん引力が生じている<sup>102</sup>。これらの結果から、AG73 の細胞接着がキトサン量に依存しないのは、ラメリポディアの形成による弱いけん引力のためであると考えられる。一方、A99a の細胞接着がキトサン量に依存する原因としては、接着斑の形成による強いけん引力に対して多量のキトサンは十分な強度を保持していないことが考えられる。さらに、A99a/AG73-キトサン膜（混合比=9:1）は、インテグリンとシンデカンに同時に結合したことによって、細胞接着の初期から生じるけん引力が減少し、キトサン膜が十分な強度を保持していなくても大きな接着斑の形成が促進されたと考えられる。以前から、 $\alpha 2\beta 1$  インテグリンに結合する EF1 と AG73 を混合した EF1/AG73-キトサン膜（混合比=9:1）は特に強い細胞接着活性を示すことが明らかにされている<sup>40</sup>。本章の結果においてもインテグリン結合ペプチドとシンデカン結合ペプチド（混合比=9:1）の混合ペプチド-キトサン膜が最も強い細胞接着活性を示した。また、A99a/AG73-キトサン膜はキトサン量が多いとき（ $150-1500 \text{ ng}/\text{mm}^2$ ）に効果的に細胞接着を促進することが示された。

近年、取り扱いが容易なペプチド-キトサン膜が臨床応用可能であることが、AG73-キトサン膜をケラチノサイトの移植キャリアとして使用した *in vivo* 実験により証明されている<sup>42</sup>。ケラチノサイトを AG73-キトサン膜上で2時間培養し創傷部位に移植したとき、移植されたケラチノサイトは AG73-キトサン膜から皮膚組織へ移動、分化し、重層上皮が形成されることが確認された。また、ペプチド-キトサン膜の表面はメッシュ状のスポンジのような構造であることが走査型電子顕微鏡を用いた解析により確認され、効果的に細胞接着を促進する足場材料として適していると考えられる（data not shown）。上記より、ターゲットとする細胞表面レセプターとペプチド-キトサン膜との相互作用を詳細に解析することは細胞移植において重要になると考えられ、本研究で得られたインテグリンとシンデカンに結合するペプチド-キトサン膜の最適化は、受容体特異的に働くバイオマテリアルの開発に有用な知見を与えるものである。

以上本章では、インテグリンを介した生物活性は足場の影響を受けやすく、シンデカンを介した生物活性は足場の影響を受けにくいことが示された。また、混合ペプチド-キトサン膜はキトサン量が多いときでも強い生物活性を示すことが明らかになった。これらのことから、目的やターゲットとするレセプターに合わせてペプチド-キトサン膜を最適化できることが示された。

## 総括

近年組織工学の分野では、細胞培養における培養基材の表面改質に関する試みが注目されており、様々な表面改質剤を用いてインテリジェント型培養基材の開発が行われている。薄い膜状の ECM である基底膜は、組織において物理的な役割と生物学的な役割の両方を果たしている<sup>4, 5)</sup>。そのため、基底膜の構成成分およびその分解フラグメントである組換えタンパク質や合成ペプチドは再生医療の観点からもバイオマテリアル開発のための材料として注目されている。野水らが同定してきたインテグリンやシンデカンなどの細胞表面レセプターに特異的に結合するラミニン由来ペプチドは、基底膜の生物学的機能を再現するためのツールとしてバイオマテリアルへの応用が期待される<sup>10-14)</sup>。望月らは、これらの細胞接着ペプチドを高分子多糖であるキトサンに結合させ新規バイオマテリアルの開発を目指してきた<sup>20, 21, 40-42)</sup>。このように、ラミニン由来のレセプター特異的な活性ペプチドを固定化させたキトサン膜は組織工学に向けたバイオマテリアルとして有力なツールとなり得ることが示されてきた。

本申請論文では、効率よく細胞応答を誘導するインテリジェント型培養基材としてのペプチド-キトサン膜の創製を目的に、生化学的、細胞生物学的に研究を行った。

第1章では、多機能分子であるラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールに着目した。ラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールの生物活性を模倣した機能性膜の創製を目的に、AG73 と EF1zz を用いてシンデカンと $\alpha 2\beta 1$  インテグリンの両レセプターに同時に作用するペプチド-キトサン膜の作製を目指した。ラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュール由来の2種類の活性ペプチド AG73 と EF1zz を種々の割合で混合し、キトサン膜に固定化することによりラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールの機能を模倣した混合ペプチド-キトサン膜を作製した。その生物活性を評価しラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールの生物活性と比較した。その結果、AG73:EF1zz (1:9) -キトサン膜は、多機能分子である LG4 モジュールと同様に強力に細胞接着と神経突起伸長を促進した。また、AG73:EF1zz (1:9) -キトサン膜は種々の細胞応答をコントロールでき、シンデカン結合ペプチドと $\alpha 2\beta 1$  インテグリン結合ペプチドの混合比に依存して活性が変化することが明らかになった。これらの結果より、混合比 AG73:EF1zz = 1:9 は、シンデカンとインテグリンの両レセプターを介した細胞接着において両レセプターの相乗的な効果を得るのに非常に重要な混合比であることが示唆された。さらに AG73:EF1zz (1:9) -キトサン膜上で、細胞はシンデカンとインテグリンの両レセプターを介して AG73 と EF1zz に同時に相互作用していることが示唆された。これらの結果から、混合ペプチド-キトサン膜のアプローチはレセプター間の協調的な働きを誘導することができ、多様な細胞応答の研



究に役立つものであると考えられる。

第2章では、2種類のシンデカン結合ペプチド AG73, C16 と、それぞれ $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  及び $\alpha 6\beta 1$  インテグリンと結合する3種類のインテグリン結合ペプチド EF1zz, A99a 及び A2G10 を用いて種々の組み合わせの混合ペプチド-キトサン膜を作製した。それらの細胞接着活性や細胞伸展活性を測定することで、キトサン膜上での各ペプチドの相乗的な効果を評価した。その結果、シンデカンとインテグリンに同時に作用することによって、細胞接着活性や細胞伸展活性が増強されることがわかり、バイオマテリアルとしての有用性が示唆された。シンデカンのみに作用する AG73 は EF1zz, A99a 及び A2G10 の細胞接着活性、細胞伸展活性を増強させることができた。一方、シンデカンと $\beta 1$  インテグリンに作用する C16 は A99a の活性のみ増強させた。シンデカンのみに作用する AG73 の方が、様々なタイプのインテグリン結合ペプチドとの混合に適していることがわかった。次に、A2G10/AG73 の混合比の最適化を試みた。その結果、A2G10/AG73 (25:1) -キトサン膜が強い細胞接着活性を示したことから、混合比 25:1 がシンデカンと $\alpha 6\beta 1$  インテグリンの相乗効果を誘導する最適な混合比であることが示唆された。以上より、A2G10/AG73 (25:1) -キトサン膜は、 $\alpha 6\beta 1$  インテグリンの生物学的な機能を解析するための有用なツールとなり得る上に、ECM を模倣したバイオマテリアルとしての応用が期待される。

第3章では、ペプチド-キトサン膜の足場効果に着目し、足場材料としてのキトサン膜を最適化し、ペプチド-レセプター間の相互作用や生物学的機能を効率よく誘導することを目的とした。キトサン量の異なる6種類の膜 ( $1.5-1500 \text{ ng/mm}^2$ ) にラミニン $\alpha 1$  鎖由来の $\alpha v\beta 3$  インテグリン結合ペプチド A99a とシンデカン結合ペプチド AG73 を固定化させたペプチド-キトサン膜を作製した。これら種々のペプチド-キトサン膜の足場効果を評価するために、細胞接着活性、細胞伸展活性、FAK のリン酸化、神経突起伸長といった生物活性を測定した。また、ペプチド-キトサン膜が効率よく生物活性を誘導するための最適なキトサン量を決定した。さらに、混合ペプチド A99a/AG73-キトサン膜の足場効果についても評価した。 $\alpha v\beta 3$  インテグリン結合ペプチド A99a を種々の量 ( $1.5-1500 \text{ ng/mm}^2$ ) のキトサン膜に固定化した場合、その細胞接着活性はキトサン量に依存し、キトサン量  $3 \text{ ng/mm}^2$  のときに細胞接着活性、細胞伸展活性は最大となり、細胞骨格形成も強く促進された。さらに、キトサン量  $3 \text{ ng/mm}^2$  のときには Tyr397-FAK のリン酸化が促進された。神経突起伸長活性においてはキトサン量  $30 \text{ ng/mm}^2$  が最適であることがわかった。一方、AG73-キトサン膜の細胞接着活性、神経突起伸長活性は全てのキトサン量 ( $1.5-1500 \text{ ng/mm}^2$ ) で変化しなかった。これらの結果から、インテグリンを介した細胞接着は足場条件が非常に重要となり、

シンデカンを介した細胞接着では足場条件に依存しないことが示唆された。また、混合 A99a/AG73-キトサン膜 (混合比=9:1) は、キトサン量が多いとき (150-1500 ng/mm<sup>2</sup>) に特に効果的に細胞応答を誘導することが示された。細胞培養において、ターゲットとする細胞やレセプターに合わせて足場材料を最適化することが、細胞応答の効果的な誘導に重要であると考えられる。

本申請論文では、ラミニン由来のレセプター特異的に作用する細胞接着ペプチドをキトサン膜に固定化し、細胞培養時の足場材料としての機能の評価を行った。AG73 や C16 といったシンデカン結合ペプチドは、インテグリン結合ペプチドと混合してキトサン膜に固定化することで種々のインテグリン結合ペプチドの生物活性を相乗的に増強させることを見出した。このように2種類の異なるレセプターに同時に作用する混合ペプチド-キトサン膜は、各ペプチドの生物活性を相乗的に増強させ得ることから、バイオマテリアルとして有用であると考えられる。また、ペプチド-キトサン膜の作用するレセプターによってキトサン量の影響を強く受けるものや、影響をあまり受けないものがあることを明らかにし、ターゲットとする細胞、レセプターやペプチドの種類によってペプチド-キトサン膜を最適化できることを見出した。本研究で作製したペプチド-キトサン膜は、ペプチド-レセプター間の相互作用やレセプター間の協調的な働きを効率よく誘導できることから、インテリジェント型培養基材として組織工学、再生医療といった医薬分野の研究に役立つことが期待される。

## 謝辞

本研究および本論文の作成にあたり，終始，御懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室 野水基義教授に深甚なる謝意を表します。

本研究および本論文の作成にあたり，多大なる御指導，御助言を賜りました東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室 吉川大和准教授，保住建太郎講師，ならびに片桐文彦助教に謹んで感謝の意を表します。

本研究および本論文の作成にあたり，多大なる御指導，御助言を賜りました東京薬科大学 生命科学部 生命分析化学研究室 内田達也准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究および本論文の作成にあたり，多大なる御協力を賜りました *National Institutes of Health, NCI* (米国 *NIH*, 国立がん研究所) 山田雄二博士，東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室 山縣夏美修士，藤森能修士，ならびに佐々木彩乃修士，東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室の皆様へ感謝の意を表します。

ペプチドの質量分析を行って下さいました東京薬科大学 中央分析センターの皆様へ感謝致します。

また，論文の作成にあたり，適切な御助言を賜りました，Hynda K. Kleinman 博士 (米国 *NIH*, 国立歯学頭蓋学研究所) に心より感謝の意を表します。

これまでの研究活動において，東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室の皆様をはじめ，多くの先輩同輩後輩の皆様には，本研究を遂行するにあたり様々な御指導，御協力を頂きました。御世話になりながらも，ここに御名前を言上することが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後に，終始にわたり応援し，協力してくれた家族に心より感謝致します。

## 掲載論文

本研究の内容は以下の論文に発表した。

### 第1章

Hozumi, K., Yamagata, N., Otagiri, D., Fujimori, C., Kikkawa, Y., Kadoya, Y., Nomizu, M.  
Mixed peptide-chitosan membranes to mimic the biological activities of a multifunctional laminin  $\alpha$ 1 chain LG4 module  
*Biomaterials*, **30**, 1596-1603 (2009).

### 第2章

Otagiri, D., Yamada, Y., Hozumi, K., Katagiri, F., Kikkawa, Y., Nomizu, M.  
Cell attachment and spreading activity of mixed laminin peptide-chitosan membranes  
*Biopolymers*, **100**, 751-759 (2013).

### 第3章

Hozumi, K., Otagiri, D., Yamada, Y., Sasaki, A., Fujimori, C., Wakai, Y., Uchida, T., Katagiri, F., Kikkawa, Y., Nomizu, M.  
Cell surface receptor-specific scaffold requirements for adhesion to laminin-derived peptide-chitosan membranes.  
*Biomaterials*, **31**, 3237-3243 (2010).

## 引用文献

- 1) Takahashi, K., Yamanaka, S., *Cell*, **126**, 663-676 (2006).
- 2) Renner, L., Jorgensen, B., Markowski, M., Salchert, K., Werner, C., Pompe, T., *J Mater Sci Mater Med*, **15**, 387-390 (2004).
- 3) Lutolf, M. P., Hubbell, J. A., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 47-55 (2005).
- 4) Yurchenco, P. D., Schittny, J. C., *FASEB J.*, **4**, 1577-1590 (1990).
- 5) Kruegel, J., Miosge, N., *Cell. Mol. Life Sci.*, **67**, 2879-2895 (2010).
- 6) Colognato, H., Yurchenco, P. D., *Dev. Dyn.*, **218**, 213-234 (2000).
- 7) Miner, J. H., Yurchenco, P. D., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20**, 255-284 (2004).
- 8) Yamada, K. M., *J. Biol. Chem.*, **266**, 12809-12812 (1991).
- 9) Yamada, Y., Kleinman, H. K., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**, 819-823 (1992).
- 10) Nomizu, M., Kim, W. H., Yamamura, K., Utani, A., Song, S. Y., Otaka, A., Roller, P. P., Kleinman, H. K., Yamada, Y., *J. Biol. Chem.*, **270**, 20583-20590 (1995).
- 11) Nomizu, M., Kuratomi, Y., Song, S. Y., Ponce, M. L., Hoffman, M. P., Powell, S. K., Miyoshi, K., Otaka, A., Kleinman, H. K., Yamada, Y., *J. Biol. Chem.*, **272**, 32198-32205 (1997).
- 12) Nomizu, M., Kuratomi, Y., Malinda, K. M., Song, S. Y., Miyoshi, K., Otaka, A., Powell, S. K., Hoffman, M. P., Kleinman, H. K., Yamada, Y., *J. Biol. Chem.*, **273**, 32491-32499 (1998).
- 13) Nomizu, M., Kuratomi, Y., Ponce, M. L., Song, S. Y., Miyoshi, K., Otaka, A., Powell, S. K., Hoffman, M. P., Kleinman, H. K., Yamada, Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **378**, 311-320 (2000).
- 14) Hozumi, K., Akizuki, T., Yamada, Y., Hara, T., Urushibata, S., Katagiri, F., Kikkawa, Y., Nomizu, M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **503**, 213-222 (2010).
- 15) Hoffman, M. P., Nomizu, M., Roque, E., Lee, S., Jung, D. W., Yamada, Y., Kleinman, H. K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 28633-28641 (1998).
- 16) Hoffman, M. P., Engbring, J. A., Nielsen, P. K., Vargas, J., Steinberg, Z., Karmand, A. J., Nomizu, M., Yamada, Y., Kleinman, H. K., *J. Biol. Chem.*, **276**, 22077-22085 (2001).
- 17) Weeks, B. S., Nomizu, M., Ramchandran, R. S., Yamada, Y., Kleinman, H. K., *Exp. Cell Res.*, **243**, 375-382 (1998).
- 18) Richard, B. L., Nomizu, M., Yamada, Y., Kleinman, H. K., *Exp. Cell Res.*, **228**, 98-105

- (1996).
- 19) Mochizuki, M., Philp, D., Hozumi, K., Suzuki, N., Yamada, Y., Kleinman, H. K., Nomizu, M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **459**, 249-255 (2007).
  - 20) Mochizuki, M., Kadoya, Y., Wakabayashi, Y., Kato, K., Okazaki, I., Yamada, M., Sato, T., Sakairi, N., Nishi, N., Nomizu, M., *FASEB J.*, **17**, 875-877 (2003).
  - 21) Mochizuki, M., Yamagata, N., Philp, D., Hozumi, K., Watanabe, T., Kikkawa, Y., Kadoya, Y., Kleinman, H. K., Nomizu, M., *Biopolymers*, **88**, 122-130 (2007).
  - 22) Suzuki, N., Nakatsuka, H., Mochizuki, M., Nishi, N., Kadoya, Y., Utani, A., Oishi, S., Fujii, N., Kleinman, H. K., Nomizu, M., *J. Biol. Chem.*, **278**, 45697-45705 (2003).
  - 23) Hynes, R. O. *Cell*, **110**, 673-687 (2002).
  - 24) van der Flier, A., Sonnenberg, A. *Cell Tissue Res.*, **305**, 285-298 (2001).
  - 25) Bokel, C., Brown, N. H. *Dev. Cell*, **3**, 311-321 (2002).
  - 26) Arnaout, M. A., Goodman, S. L., Xiong, J. P. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 495-507 (2007).
  - 27) Mclean, S. M., Mathew, M. R., Kelly, J. B., Murray, S. B., Bennet, H. G., Webb, L. A., Esakovitz, L., Mclean, J. S. *Br. J. Ophthalmol.*, **89** 1506-1509 (2005).
  - 28) Yamada, K. M., Pankov, R., Cukierman, E. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **36**, 959-966 (2003).
  - 29) Beauvais, D. M., Rapraeger, A. C. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **2**, 3 (2004).
  - 30) Rapraeger, A. C. *J. Cell Biol.*, **149**, 995-998 (2000)
  - 31) Woods, A., Couchman, J. R. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 578-583 (2001)
  - 32) Whiteford, J. R., Behrends, V., Kirby, H., Kusche-Gullberg, M., Muramatsu, T., Couchman, J. R. *Exp. Cell Res.*, **313**, 3902-3913 (2007).
  - 33) Streuli, C. H., Akhtar, N. *Biochem. J.*, **418**, 491-506 (2009).
  - 34) Couchman, J. R., Chen, L., Woods, A. *Int. Rev. Cytol.*, **207**, 113-150 (2001).
  - 35) Lopes, C. C., Dietrich, C. P., Nader, H. B. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **39**, 157-167 (2006).
  - 36) Morgan, M. R., Humphries, M. J., Bass, M. D. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 957-969 (2007).
  - 37) Vuoriluoto, K., Jokinen, J., Kallio, K., Salmivirta, M., Heino, J., Ivaska, J. *Exp. Cell Res.*, **314**, 3369-3381 (2008).
  - 38) Kusano, Y., Oguri, K., Nagayasu, Y., Munesue, S., Ishihara, M., Saiki, I., Yonekura, H., Yamamoto, H., Okayama, M. *Exp. Cell Res.*, **256**, 434-444 (2000).

- 39) Yamada, Y., Katagiri, F., Hozumi, K., Kikkawa, Y., Nomizu, M. *Biomaterials*, **32**, 4327-4335 (2011).
- 40) Hozumi, K., Yamagata, N., Otagiri, D., Fujimori, C., Kikkawa, Y., Kadoya, Y., Nomizu, M., *Biomaterials*, **30**, 1596-1603 (2009).
- 41) Hozumi, K., Otagiri, D., Yamada, Y., Sasaki, A., Fujimori, C., Wakai, Y., Uchida, T., Katagiri, F., Kikkawa, Y., Nomizu, M., *Biomaterials*, **31**, 3237-3243 (2010).
- 42) Ikemoto, S., Mochizuki, M., Yamada, M., Takeda, A., Uchinuma, E., Yamashina, S., Nomizu, M., Kadoya, Y., *J Biomed Mater Res A*, **79**, 716-722 (2006).
- 43) Chandy, T., Sharma, C. P., *Biomater. rtif. Cells. Artif. Organs*, **18**, 1-24 (1990).
- 44) Suh, J. K., Matthew, H. W., *Biomaterials*, **21**, 2589-2598 (2000).
- 45) Jason, W. Miklas., Susan, M. Dallabrida., Lewis, A. Reis., Nesreen, Ismail., Maria, Rupnick., Milica, Radisic., *PLoS ONE*, **8**, e72956 (2013).
- 46) Shin-Hee, Jun., Eun-Jung, Lee., Tae-Sik, Jang., Hyoun-Ee, Kim., Jun-Hyeog, Jang., Young-Hag, Koh., *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, **24**, 773-782 (2013).
- 47) Pattaroyo, M., Tryggvason, K., Virtanen, I., *Semin. Cancer Biol.*, **12**, 197-207 (2002).
- 48) Sung, U., O'Real, J. J., Yurchenko, P. D., *Eur. J. Biochem.*, **250**, 138-143 (1997).
- 49) Beckmann, G., Hanke, J., Bork, P., Reich, J. G., *J. Mol. Biol.*, **275**, 725-730 (1998).
- 50) Talts, J. F., Andac, Z., Gohring, W., Brancaccio, A., Timpl R. *EMBO J.*, **18**, 863-870 (1999).
- 51) Durbeej, M., Talts, J., F., Henry, M. D., Yurchenko, P., D. *Differentiation*, **69**, 121-134 (2001).
- 52) Wizemann, H., Garbe, J. H., Friedrich, M. V., Timpl, R., Sasaki, T., Hohenester, E. *J. Mol. Biol.*, **332**, 635-642 (2003).
- 53) Andac, Z., Sasaki, T., Mann, K., Brancaccio, A., Deutzmann, R., Timpl, R. *J. Mol. Biol.*, **287**, 253-264 (1999).
- 54) Nakahara, H., Nomizu, M., Akiyama, S. K., Yamada, Y., Yeh, Y., Chen, WT. *J. Biol. Chem.*, **271**, 27221-27224 (1996).
- 55) Nakahara, H., Mueller, S. C., Nomizu, M., Yamada, Y., Yeh, Y., Chen, WT. *J. Biol. Chem.*, **273**, 9-12 (1998).
- 56) Suzuki, N., Yokoyama, F., Nomizu, M., *Connect. Tissue Res.*, **46**, 142-152 (2005).
- 57) Kim, W. H., Nomizu, M., Song, S. Y., Tanaka, K., Kuratomi, Y., Kleinman, H. K. *Int. J. Cancer*, **77**, 632-639 (1998).
- 58) Kadoya, Y., Nomizu, M., Sorokin L. M., Yamashina, S., Yamada, Y. *Dev. Dyn.*, **212**,

- 394-402 (1998).
- 59) Suzuki, N., Ichikawa, N., Kasai, S., Yamada, M., Nishi, N., Morioka, H., Nomizu, M. *Biochemistry*, **42**, 12625-12633 (2003).
  - 60) Yokoyama, F., Suzuki, N., Kadoya, Y., Utani, A., Nakatsuka, H., Nishi, N., Nomizu, M. *Biochemistry*, **44**, 9581-9589 (2005).
  - 61) Hozumi, K., Suzuki, N., Nielsen, P. K., Nomizu, M., Yamada, Y. *J. Biol. Chem.*, **281**, 32929-32940 (2006).
  - 62) Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H., N., Eccleston G., M. *J. Pharm. Sci.*, **97**, 2892-2923 (2008).
  - 63) Jiang, T., Kumbar S. G., Nair, L. S., Laurencin, C. T. *Curr. Top. Med. Chem.*, **8**, 354-364 (2008).
  - 64) Cardenas, G., Anaya, P., von Plessing, C., Rojas, C., Sepulveda, J. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **19**, 2397-2405 (2008).
  - 65) Suh, J. K., Matthew, H. W. *Biolmateriamls*, **21**, 2589-2598 (2000).
  - 66) Kato, K., Utani, A., Suzuki, N., Mochizuki, M., Yamada, M., Nishi, N., Nomizu, M. *Biochemistry*, **41**, 10747-10753 (2002).
  - 67) Susanne, Scheele., Mats, Falk., Ahnders, Franzen., Fredrik, Ellin., Maria., Ferletta., Peter, Lonai., Bjorn, Andersson., Rupert, Timpl., Erik, Forsberg., Peter Ekblom., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1502-1506 (2005).
  - 68) Hozumi, K., Kobayashi, K., Katagiri, F., Kikkawa, Y., Kadoya, Y., Nomizu, M., *FEBS Lett.*, **584**, 3381-3385 (2010).
  - 69) Bloom, L., Ingham, K. C., Hynes, R. O., *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1521-1536 (1999).
  - 70) Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J. K., Mosher, D. F., Robinson, S.D., Hynes, R.O., Goetinck, P. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2805-2810 (1999).
  - 71) Borges, E., Jan, Y., Ruoslahti, E. *J. Biol. Chem.*, **275**, 39867-39873 (2000).
  - 72) Masuda, R., Mochizuki, M., Hozumi, K., Takeda, A., Uchinuma, E., Yamashina, S., Nomizu, M., Kadoya, Y. *Wound Repair Regen.*, **17**, 127-135 (2009).
  - 73) Frantz, C., Stewart, K. M., Weaver, V. M. *J. Cell Sci.*, **123**, 4195-4200 (2010).
  - 74) von der Mark, K., Park, J., Bauer, S., Schmuki, P. *Cell Tissue Res.*, **339**, 131-153 (2010).
  - 75) Urushibata, S., Hozumi, K., Ishikawa, M., Katagiri, F., Kikkawa, Y., Nomizu, M. *Arch. Biochem. Biophys.*, **497**, 43-54 (2010).
  - 76) Urushibata, S., Katagiri, F., Takaki, S., Yamada, Y., Fujimori, C., Hozumi, K.,



- Kikkawa, Y., Kadoya, Y., Nomizu, M. *Biochemistry*, **48**, 10522-10532 (2009).
- 77) Yamada, Y., Hozumi, K., Katagiri, F., Kikkawa, Y., Nomizu, M. *Biopolymers*, **94**, 711-720 (2010).
- 78) Yamada, Y., Hozumi, K., Nomizu, M. *Chemistry*, **17**, 10500-10508 (2011).
- 79) Yamada, Y., Hozumi, K., Aso, A., Hotta, A., Toma, K., Katagiri, F., Kikkawa, Y., Nomizu, M. *Biomaterials*, **33**, 4118-4125 (2012).
- 80) Hozumi, K., Sasaki, A., Yamada, Y., Otagiri, D., Kobayashi, K., Fujimori, C., Katagiri, F., Kikkawa, Y., Nomizu, M. *Biomaterials*, **33**, 4241-4250 (2012).
- 81) Sasaki, M., Kleinman, H. K., Huber, H., Deutzmann, R., Yamada, Y. *J. Biol. Chem.*, **263**, 16536-16544 (1988).
- 82) Weeks, B. S., Nomizu, M., Ramchandran, R. S., Yamada, Y., Kleinman, H. K. *Exp. Cell Res.*, **243**, 375-382 (1998).
- 83) Richard, B. L., Nomizu, M., Yamada, Y., Kleinman, H. K. *Exp. Cell Res.*, **228**, 98-105 (1996).
- 84) Sasaki, M., Yamada, Y. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17111-17117 (1987).
- 85) Kuratomi, Y., Nomizu, M., Tanaka, K.; Ponce, M. L., Komiyama, S., Kleinman, H. K., Yamada, Y. *Br. J. Cancer*, **86**, 1169-1173 (2002).
- 86) Ponce, M. L., Nomizu, M., Kleinman, H. K. *FASEB J.*, **15**, 1389-1397 (2001).
- 87) Bernier, S. M., Utani, A., Sugiyama, S., Doi, T., Polistina, C., Yamada, Y. *Matrix Biol.*, **14**, 447-455 (1995).
- 88) Mochizuki, M., Philp, D., Hozumi, K., Suzuki, N., Yamada, Y., Kleinman, H. K., Nomizu, M. *Arch. Biochem. Biophys.*, **459**, 249-255 (2007).
- 89) Mano, J. F., Silva, G. A., Azevedo, H. S., Malafaya, P. B., Sousa, R. A., Silva, S. S. *J. R. Soc. Interface*, **4**, 999-1030 (2007).
- 90) Badylak, S. F. *Biomaterials*, **28**, 3587-3593 (2007).
- 91) Badylak, S. F., Freytes, D. O., Gilbert, T. W. *Acta. Biomater.*, **5**, 1-13 (2009).
- 92) Timpl, R. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 618-624 (1996).
- 93) Makino, M., Okazaki, I., Kasai, S., Nishi, N., Bougaeva, M., Weeks, B. S., Nomizu, M. *Exp. Cell Res.*, **277**, 95-106 (2002).
- 94) Okazaki, I., Suzuki, N., Nishi, N., Utani, A., Matsuura, H., Shinkai, H., Nomizu, M. *J. Biol. Chem.*, **277**, 307070-307078 (2002).
- 95) Bacakova, L., Filova, E., Rypacek, F., Svorcik, S., Stary, V., *Physiol. Res.*, **53**, S35-45 (2004).

- 96) Badylak, S. F. *Anat. Rec. B. New Anat.*, **287**, 36-41 (2005).
- 97) Timpl, R. Brown, J. C. *Bioessays*, **18**, 123-132 (1996).
- 98) Kleinman H. K., Martin, G. R. *Semin. Cancer Biol.*, **15**, 378-386 (2005).
- 99) McQuade, K. J., Rapraeger, A. C. *J. Biol. Chem.*, **278**, 46607-46615 (2003).
- 100) Geiger, B., Spatz, J. P., Bershadsky, A. D. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 21-33 (2009).
- 101) Katsumi, A., Orr, A. W., Tzima, E., Schwartz, M. A. *J. Biol. Chem.*, **279**, 12001-12004 (2004).
- 102) Galbraith, C. G., Yamada, K. M., Sheetz, M. P. *J. Cell Biol.*, **159**, 695-705 (2002).