

氏名（本籍）	おだぎり だい 小田切 大（東京都）		
学位の種類	博士（薬学）		
学位記番号	論博第326号		
学位授与の日付	平成26年3月20日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	受容体特異的なラミニン活性ペプチドを固定化した キトサン膜の生物活性と足場効果		
論文審査委員（主査）	教授	野水	基義
	教授	高木	教夫
	教授	林	良雄
	教授	馬場	広子

論文内容の要旨

近年、iPS細胞をはじめとする幹細胞の技術の進歩により、組織工学への注目度が高まっている。組織工学は組織移植に向けた機能的な組織、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。組織工学では細胞の分化、増殖の制御のみでなく、組織に近い三次元的な環境を提供することが重要だと考えられている。そのため、物理的、生物学的に細胞の足場としての機能に優れたインテリジェント型培養基材の開発が求められている。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ため、バイオマテリアルの研究ではECMの模倣が注目されている。薄い膜状のECMである基底膜は、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、これらは相互に結合し三次元超分子ネットワークを形成している。基底膜は皮膚や血管、筋肉、神経など全身に分布しており、支持体や境界として組織の構造的安定性に寄与するのみでなく、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、増殖や遊走などの生命現象を制御している。このように多彩な機能を有するため、基底膜は構成成分の機能及び作用機序の解明が注目され、組織工学からもバイオマテリアル開発への有用なツールとして期待されている。基底膜の構成成分であるラミニンは細胞接着に重要な役割を果たすほか、器官形成、血管新生、創傷治癒などに関与している。ラミニン-111は最も早く発見されたラミニンアイソフォームで、全アミノ酸配

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が同定されてきた．同定されたペプチドの中には，インテグリンやシンデカンなどのレセプターに特異的に結合するものも見出されている．これらの活性ペプチドは基底膜の主成分であるラミニンの複雑な機能を選択的に再現できるため，基底膜の機能を模倣した「人工基底膜」を開発するための材料として応用が期待される．また，ラミニン由来の活性ペプチドを塩基性高分子多糖であるキトサンに固定化させたペプチド-キトサン膜が，細胞接着をはじめとする生物活性を示し，細胞の足場材料として有用であることも報告されてきた．近年，細胞接着においてインテグリンとシンデカンが協調的に働いていることや，シンデカン結合ペプチドが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などが報告されている．このような背景から本申請論文では，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研究を行った．第 1 章では，多機能分子のラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールの生物活性を模倣した機能性膜を作製した．第 2 章では，2 種類のシンデカン結合ペプチドと 3 種類のインテグリン結合ペプチドを組み合わせた混合ペプチド-キトサン膜を作製し，シンデカンとインテグリンの相乗作用を解析した．第 3 章では，ペプチド-キトサン膜の足場効果に着目し，生物学的機能を効率よく誘導する足場材料としてのキトサン膜の最適化を行った．

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¹⁾

ラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュール由来の，シンデカン結合ペプチド AG73 (RKRLQVQLSIRT, mouse laminin $\alpha 1$ chain 2719-2730) と $\alpha 2\beta 1$ インテグリン結合ペプチド EF1zz (ATLQLQEGRLHFXDLGKGR, X: Nle, mouse laminin $\alpha 1$ chain 2749-2767) を種々の割合で混合してキトサン膜に固定化させ，シンデカンとインテグリンの両レセプターに作用する混合ペプチド-キトサン膜を作製し，HDF の細胞接着，細胞伸展活性を測定した (Fig. 1)．混合ペプチド-キトサン膜の細胞接着，伸展は，混合

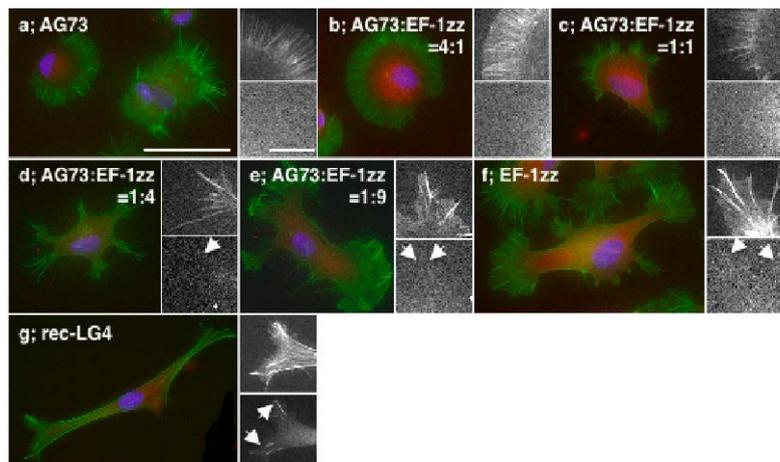


Fig. 1 Organization of actin stress fibers and localization of vinculin of Human Dermal Fibroblasts (HDF) on peptide-chitosan membranes.

比 AG73:EF1zz=1:9 のときに最も強い活性を示し，接着した HDF の形態は組換え LG4

タンパク質に接着したものと同様であった。次に EDTA とヘパリンの細胞接着阻害効果を評価した結果、混合比 AG73:EF1zz=1:4 と 1:9 のときに EDTA とヘパリンの両方で阻害され、その阻害効果は組換え LG4 タンパク質に対する接着阻害と同様であった。この結果から、混合ペプチド-キトサン膜 (AG73:EF1zz=1:4, 1:9) は、組換え LG4 タンパク質と同様にシンデカンとインテグリンの両レセプターを介して HDF に接着していることが示された。以上の結果より、AG73/EF1zz-キトサン膜 (AG73:EF1zz=1:9) は、シンデカンとインテグリンの両レセプターに同時に作用し、各ペプチドの活性を相乗的に増強させることによって、多機能分子のラミニン α 1 鎖 LG4 モジュールの生物活性を模倣した機能性膜となることが示された。

第 2 章 混合ペプチド-キトサン膜の生物活性²⁾

2 種類のシンデカン結合ペプチド AG73 (シンデカンのみに結合) と C16 (シンデカンと β 1 インテグリンに結合 : KAFDITYVRLKF, mouse laminin γ 1 chain 139-150), 3 種類のインテグリン結合ペプチド EF1zz (α 2 β 1 インテグリンに結合), A99a (α v β 3 インテグリンに結合 : ALRGDN, mouse laminin α 1 chain 1145-1150) と A2G10 (α 6 β 1 インテグリンに結合 : SYWYRIEASRTG, mouse laminin α 2 chain 2223-2234) をキトサン膜に固定化させ、シンデカンとインテグリンの両レセプターに同時に作用する混合ペプチド-キトサン膜を作製し、HDF の細胞接着活性、細胞伸展活性を評価した。C16 を混合したときは A99a のみ活性が増強されたが、AG73 を混合したときは 3 種類のインテグリン結合ペプチドの活性が増強された (Fig. 2)。AG73 はシンデカンのみに作用するため、インテグリン結合ペプチドと混合するのに適していることが示唆された。次に、シンデカン-1 を過剰発現させインテグリンを発現していない B-リンパ球細胞を用いて細胞接着活性を評価したところ、AG73-, C16-キトサン膜は細胞接着活性を示したが、混合ペプチド-キトサン膜の細胞接着活性は増強されなかった。この結果は、相乗的な活性増強

には、シンデカンとインテグリンの 2 種類のレセプターに同時に作用することが重要であることを示している。次に α 6 β 1 インテグリンに結合する A2G10 に着目し、AG73 との最適な混合比を調べた結果、

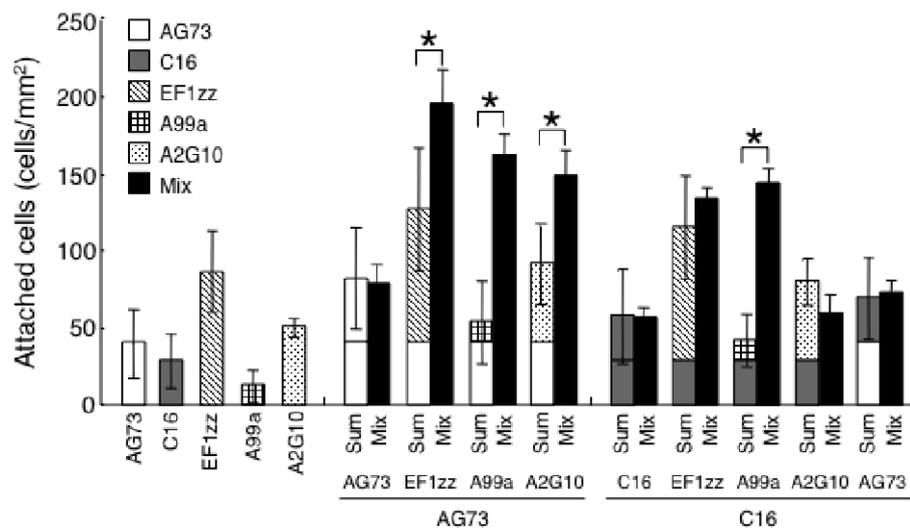


Fig. 2 HDF attachment activity on peptide-chitosan membranes.

A2G10/AG73-キトサン膜 (A2G10:AG73=25:1) は強い HDF の細胞接着活性を示した。A2G10/AG73 (25:1)-キトサン膜は、 $\alpha6\beta1$ インテグリンの生物学的な機能を解析するためのツールとして有用であり、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 ペプチド-キトサン膜の足場効果³⁾

6種類異なる量のキトサンをプレートにコートし (1.5-1500 ng/mm^2)、 $\alpha v\beta3$ 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。HDFの細胞接着活性、細胞伸展活性とPC12細胞の神経突起伸長活性を測定し、ペプチド-キトサン膜のキトサン量による足場効果を評価した (Fig. 3)。

A99a-キトサン膜の細胞接着、細胞伸展活性、細胞骨格形成はキトサン量に依存し、キトサン量 3 ng/mm^2 の

ときに最大となった。一方、AG73-キトサン膜の細胞接着活性、細胞伸展活性はキトサン量には依存せず、全てのキトサン量で大きな変化はなかった。次に神経突起伸長活性を評価した結果、A99a-キトサン膜では、キトサン量 30 ng/mm^2 以上で強い神経突起伸長活性を示した。一方、AG73-キトサン膜は、キトサン量で大きな変化はなかった。以上の結果より、インテグリンを介する生物活性は足場の影響を強く受け、シンデカンを介する生物活性は足場の影響を受けにくいことが示唆された。また、混合A99a/AG73-キトサン膜 (A99a:AG73=9:1) は、キトサン量が多いとき (150-1500 ng/mm^2) に効果的に細胞応答を誘導することが示された。以上より、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ことが示された。

本申請論文では、ラミニン由来のレセプター特異的に結合する細胞接着ペプチドをキトサン膜に固定化し、足場機能の評価を行った。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そ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ることができ、ECM を模倣したバイオマテリアルとして有用であると考えられる。また、キトサン量によるペプチド-キトサン膜の足場効果は、作用するレセプターによって異なることが明らかになり、用いる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

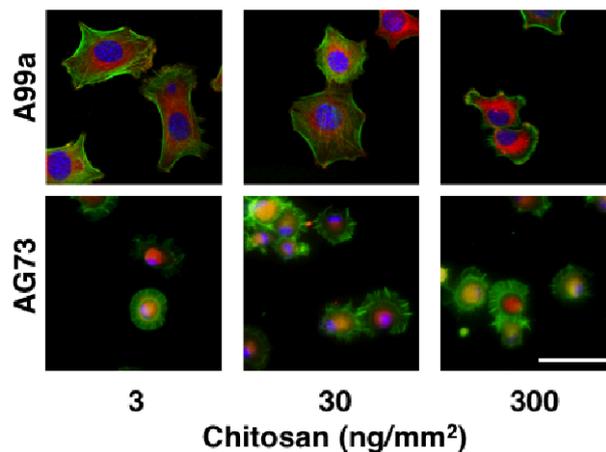


Fig. 3 Morphology and actin stress fibers of HDF on different amount of peptide-chitosan membranes .

きることが示唆された。本研究で作製したペプチド-キトサン膜が，組織に近い環境を提供するインテリジェント型培養基材として組織工学や再生医療などの医薬分野への応用に役立つことが期待される。

本研究成果の掲載

1) *Biomaterials* **30**: 1596-1603, 2009, 2) *Biopolymers* **100**: 751-759, 2013, 3) *Biomaterials* **31**: 3237-3243, 2010

論文審査の結果の要旨

小田切大氏の博士学位申請論文は、受容体特異性の異なるラミニン由来の活性ペプチドを組み合わせて足場の高分子多糖のキトサンに固定化することにより目的とする活性を発現させるとともに、足場の量を制御することにより組織に近い環境を提供するインテリジェント型培養基材の作成を目的に研究を行ったものである。

第1章では、約200アミノ酸からなるラミニン α 1鎖LG4モジュールの生物活性を模倣した機能性膜を作製した。このLG4モジュールはインテグリンとシンデカンに結合するため、インテグリンに結合するEF1ペプチドとシンデカンに結合するAG73ペプチドの比が1:9で固定化したキトサン膜が、細胞に対してシンデカンとインテグリンの両レセプターに同時に作用して相乗的に増強させ、ラミニン α 1鎖LG4モジュールの組換えタンパク質の生物活性を模倣できることを見いだした。

第2章では、2種類のシンデカン結合ペプチドと3種類のインテグリン結合ペプチドを組み合わせた混合ペプチド-キトサン膜を作製し、シンデカンとインテグリンの相乗作用を解析した。インテグリンの作用の増強にはシンデカンの作用が必要であることが示され、種々の受容体特異的なペプチド-キトサン膜の作成に成功した。

第3章では、ペプチド-キトサン膜の足場効果に着目し、生物学的機能を効率よく誘導する足場材料としてのキトサン膜の最適化を行った。異なるキトサン量をコートしたプレートに、受容体特異性の異なるペプチドを固定化させ生物活性を測定したところ、インテグリンを介する生物活性は足場の影響を強く受け、シンデカンを介する生物活性は足場の影響を受けにくいことなどがわかり、目的の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により、効果的な細胞応答を誘導できることを示した。本研究にて作製したペプチド-キトサン膜は、組織に近い環境を提供するインテリジェント型培養基材として組織工学、再生医療などの医薬分野への応用に役立つことが期待される。

以上、本申請論文は、本論文は、全体的にまとまっており新規性・応用性もあり、博士（薬学）の申請論文として価値あるものと判断できる。