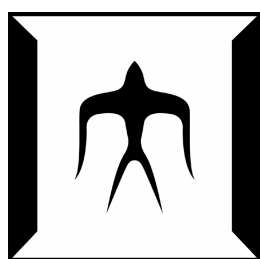


論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	血管新生調節能を有する新規細胞外マトリクスタンパク質の構築
Title(English)	
著者(和文)	中村真希子
Author(English)	Makiko Nakamura
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第7400号, 授与年月日:2008年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小島 英理
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第7400号, Conferred date:2008/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

血管新生調節能を有する
新規細胞外マトリクスタンパク質の構築



東京工業大学大学院生命理工学研究科
生命情報専攻

中村 真希子

第一章 序論	
1.1 緒言	4
1.2 再生医療と足場材料	
1.2.1 細胞外マトリクスの役割	7
1.2.2 細胞外マトリクスを応用した人工足場材料の設計	8
1.2.3 タンパク質材料による足場作製の意義	10
1.3 人工タンパク質足場材料の応用—血管再生	
1.3.1 血管新生とラミニンの関係	11
1.3.2 ラミニンにおける機能性ペプチドとその応用例	12
1.3.3 細胞外マトリクスを応用した血管新生モデルとその問題点	14
1.4 高機能性細胞外マトリクスの設計	
1.4.1 elastin-like peptide によるマトリクス骨格	16
1.4.2 機能性ペプチドの融合による細胞外マトリクスの設計	17
1.5 本研究の目的と意義	19
第二章 血管新生促進配列を融合した細胞外マトリクスの設計と特性評価	
2.1 緒言	28
2.2 実験方法	
2.2.1 実験試薬	29
2.2.2 プラスミド構築	29
2.2.3 融合タンパク質の発現・精製	30
2.2.4 細胞培養	31
2.2.5 細胞接着能評価	31
2.2.6 細胞増殖能評価	32
2.2.7 細胞遊走能評価	33
2.2.8 コラーゲンゲルモデルにおける管腔組織形成評価	33
2.3 実験結果及び考察	
2.3.1 血管新生促進マトリクスタンパク質の設計と発現・精製	35
2.3.2 構築した融合タンパク質間の特性比較	
2.3.2.1 細胞接着能比較	36
2.3.2.2 細胞遊走能比較	38
2.3.2.3 血管新生促進マトリクスにおける設計の影響	39
2.3.3 EREI2, EI4 の特性評価	
2.3.3.1 機能性ペプチドによる細胞接着能評価	40
2.3.3.2 細胞増殖能評価	40
2.3.4 コラーゲンゲルモデルにおける管腔組織形成評価	41
2.4 結言	43
第三章 コラーゲン結合型血管新生促進マトリクスの設計と特性評価	
3.1 緒言	51
3.2 実験方法	
3.2.1 実験試薬	52
3.2.2 プラスミド構築	52

3.2.3.	融合タンパク質の発現.....	53
3.2.4.	コラーゲン結合能評価.....	54
3.2.5.	細胞接着能・増殖能評価.....	55
3.2.6.	細胞遊走能評価.....	55
3.2.7.	コラーゲングルモデルにおける管腔組織形成評価.....	55
3.2.8.	細胞生存率評価.....	55
3.2.9.	RT-PCR.....	55
3.3	実験結果及び考察	
3.3.1	CBD 融合タンパク質の設計と発現.....	57
3.3.2	コラーゲン結合能評価	
3.3.2.1	各融合タンパク質間の特性比較.....	58
3.3.2.2	コラーゲン結合能の詳細検討.....	59
3.3.3	細胞接着能・細胞遊走能評価	
3.3.3.1	CBD 融合による細胞接着能・細胞増殖能への影響.....	60
3.3.3.2	fnCBD のもつ細胞接着能への考察.....	62
3.3.3.3	fnCBD 融合による細胞遊走能への影響.....	63
3.3.4	コラーゲングルモデルにおける管腔組織形成評価.....	63
3.3.5	コラーゲングルモデルにおける管腔形成マーカー発現量比較.....	65
3.4	結言.....	67
第四章 血管新生抑制配列を融合した細胞外マトリクスの設計と特性評価		
4.1	緒言.....	80
4.2	実験方法	
4.2.1	実験試薬.....	81
4.2.2	プラスミド構築.....	81
4.2.3	融合タンパク質の発現・精製.....	82
4.2.4	細胞接着能・細胞増殖能評価.....	82
4.2.5	細胞遊走阻害評価.....	82
4.2.6	コラーゲングルモデルにおける管腔組織形成評価.....	83
4.2.7	細胞生存率評価.....	83
4.3	実験結果及び考察	
4.3.1	GRGY2, GY4 の設計と発現・精製.....	84
4.3.2	細胞接着能・細胞増殖能評価.....	86
4.3.3	細胞遊走阻害効果.....	88
4.3.4	コラーゲングルモデルにおける管腔組織形成評価.....	88
4.4	結言.....	91
第五章 結論..... 100		
References..... 103		
謝辞..... 112		

第一章

序論

1.1 緒言

細胞生物学の研究が進み、細胞やタンパク質といった生体由来材料を用いることによる失われた臓器の復元・再生が、再生医療という名前のもとに現実となりつつある。中でも足場材料を基盤として細胞材料を組み合わせ、新しい組織を造る組織工学 (tissue engineering) は、再生医療を具体化するために非常に有効な方法であるといつてよい。そのため、今日では、再生医療を目的とする多くの研究者が、様々なアプローチをもって組織工学の分野に参集している。組織工学において目標とされる、生体組織の再現とは、どのようなものを指すのであろうか。

生体組織においては、さまざまな細胞がネットワークを形作り、一つの細胞社会を構築している。そこには、単一細胞の増殖だけではなく、計画的な細胞死までもが必要なものとしてプログラムされている。それはあたかも、それぞれの細胞が社会における一員であることを認識し、全体としての生を育むべく努力しているように思われる。よって、人工生体組織の実現においては、個々の細胞の生着・増殖能力だけではなく、細胞 - 細胞間でのネットワーク形成の再現も必要となる。こうした精巧なネットワークを人為的に実現するには、「細胞・足場・生体活性物質などの材料の再現」及び「それらの材料が機能的に配置された環境の再現」が必要であると考えられる。その中でまず注目されたのは、細胞が接着し、機能する上で必要となる足場材料の重要性である。足場材料とは、臓器造型の骨組みとなり、細胞を支持し生着させる働きを持つ物質を総称する。生体内では細胞外マトリクスタンパク質 (extracellular matrix protein; ECM) やヒドロキシアパタイトに代表され、合成高分子材料としてポリ乳酸なども一般的となりつつある。自在に成型可能な3次元足場材料をデザインすることにより、細胞のために整えられた空間を創ることができるため、ポリ乳酸・ポリグリコール酸に代表される造型が容易な生分解性高分子材料が台頭している。これらは生産性が高く、共重合体や高生体親和性材料とのハイブリッド材料を構築することで、様々な

機能も付加することができる^{1,2}。また、ECMの一つであるコラーゲン材料も、様々に造型する技術が進み、生体親和性の高さを生かして組織再生へ向けた動きが見られている^{3,4}。最近では2007年に承認された自家培養皮膚「ジェイス® (株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)」の報が耳に新しい⁵。現在では、あらかじめ構築した足場上に細胞と増殖因子などを播種することにより、ある程度生体組織を模した構築物を得ることができるようになっている。しかし、このアプローチにおいても、生体組織の忠実な再現は難しいと評価されている。足場中に播種された細胞や増殖因子は表層付近を中心に拡散するのみで、細胞を含む複数の因子を制御して配置できないことがその原因である。生体を模していくためには、異種の細胞を高精度で配列させたり、増殖因子の濃度勾配をコントロールしたりするような技術が必要であると考えられる。

そのような背景から、近年、温度応答性培養皿による細胞シート構築の報告^{6,7}やインクジェットプリンタによる細胞打ち出し技術の開発^{8,9}など、細胞を含んだ構築物を加工する技術の発展が見られている。前述した細胞-細胞間ネットワークを忠実に再現するためには細胞単位で配置を制御していくことが必要であるため、理想的な人工生体組織を実現するためには精度の高い細胞構築物の加工技術が不可欠となっていくであろう。こうした新しい技術の誕生に伴い、足場材料の重要性はさらに増したといえる。これらの技術によって配置された細胞が高い効率で機能しネットワークを形成するためには、高い細胞支持能力を持ち、細胞分化・増殖などのシグナルを高効率に細胞に伝えることが可能な高機能性足場材料が必要とされている。

そこで本研究では、高機能性足場材料を構築することを目的とし、機能性配列を融合した新規細胞外マトリクスタンパク質を開発する。具体的な生体組織として血管組織をモデルとし、血管新生における活性ペプチド配列を組み込んだ細胞外マトリクスタンパク質を用いることによって、より充実した人工血管モデルの構築を目指す。そして、血管新生過程におけ

る促進と抑制の調節を細胞外マトリクスのデザインによって再現することを試みる。

以降本章では、再生医療において注目されている足場材料について述べる。次に本研究で利用する材料の特性について概説し、本研究で構築する足場材料について、その作製の意義を明確にする。

1.2 再生医療と足場材料

再生医療における理想的な人工組織の構築には、足場材料が重要な鍵を握ると考えられている。生体内の環境により近づけた足場材料を得るために、生体における足場物質である細胞外マトリクスの研究が多く行われ、機能単位ごとの解析が進められている。本節では、既存の研究に基づき、細胞外マトリクスの働きと、それらを用いた人工足場材料の作製例を概観する。そして、現在足場材料に必要とされている特性について考察する。

1.2.1 細胞外マトリクスの役割

細胞が正常に成長し、分裂していくためには他の細胞や基質への接着が必要となる (Fig. 1-1)。生体組織中には細胞外マトリクス(ECM)がはりめぐらされており、細胞の接着と組織の骨組みを支持する役割を担う¹⁰。ECMは繊維状に広がった構造をとるものが多く、その構造と弾性で組織を支えている。細胞表面上には、ECMの特定部位を認識するレセプターが存在しており、インテグリンファミリーやプロテオグリカンなどが知られている¹¹。そのほかにもラミニン結合タンパク質など特定配列を認識するものが次々と同定されている^{12,13}。こうした細胞—ECM間の相互作用は細胞遊走や分化のシグナル導入にも関与していることが明らかとなっている。たとえば腫瘍から単離したラミニンを主としたマトリクス上で血管内皮細胞を培養すると、それぞれの細胞が遊走し、管状の構造に配列する¹⁴。こうした報告は、細胞がECMを認識することにより、何らかのシグナルを得るということを示唆している。よってECMは、あらゆる意味で細胞を周囲の環境とつなぐ役割を果たしていると結論付けられる。

このように多岐にわたる機能を持つECMであるが、生体由来のECMを直接人工生体組織に導入することには、障壁も存在する。まず抗原性の問題がある。コラーゲンは抗原性を持つ末端部分のポリペプチド鎖を消化したアテロコラーゲンが市販されているが^{15,16}(Fig.

1-2A)、そのほかのECMは抗原性について未知な部分が多く、臨床応用に踏み切ることへの懸念があげられる。また、生産性の点においても化学合成物質に比べて劣る。こうした欠点をクリアするために進められてきたのは、ECMの持つ機能部分だけを取り出して、人工足場材料へ応用する研究である¹⁷。

ECMの持つ構造単位の解析により、ある短いペプチド配列によって、ECMの持つ機能が司られている例が多数報告されている^{18,19}。たとえばフィブロネクチンに含まれる細胞接着に関与する配列は、GRGDS, PHSRN, REDVなどが同定されており、細胞の接着メカニズムなどを解析する一助となっている¹⁸。こうしたペプチド配列を持つものはフィブロネクチンのみではなく、その機能も多岐に渡っている。短いペプチド鎖であれば、大量合成も容易であり、他の担体への修飾方法も開発されていることから、この配列を利用することによって、他の担体にECMの機能を付加した人工足場材料を創製できる可能性を示している。

次項では、こうしたECMの性質を応用し、人工足場材料を構築しようとする試みについて述べる。

1.2.2 細胞外マトリクスを応用した人工足場材料の設計

前項で述べたように、ECMの持つ機能単位を用いることで、ECMの持つ利点を最大限に活用することができるといえる。複数の機能単位を組み合わせることで、既存のECMを超えた足場材料を生み出す可能性も秘めている。以下には、ECMの機能単位を応用した人工足場材料の設計例を挙げる。

ペプチド修飾によるハイブリッド化戦略

ポリ乳酸・ポリグリコール酸に代表される生分解性ポリマーは、その生産性と、成形が容易であることから再生医療の足場材料として多く用いられている²⁰。しかし、それらポリマー単体では細胞接着性に劣ることが欠点としてあげられる。よって、細胞接着機能を有する

ものでこれらの材料を修飾することができれば、目的とする細胞接着能を兼ね備えたハイブリッド材料となる。フィブロネクチン由来のGRGDSペプチドは、短い配列ながら高い細胞接着機能を持つ配列として知られ、ポリ乳酸²¹、ハイドロキシアパタイト²²、ポリエチレングリコール (PEG) ²³、アルギン酸²⁴などに化学修飾することにより、それらの分子に細胞接着性を付与することに成功している。ラミニン由来のIKVAV、YIGSR配列なども細胞接着性配列として同様の修飾に用いられることが多い^{25,26}。また、感温性を持つN-イソプロピルアクリルアミド (NiPAAM) にRGD、もしくはYIGSR配列を結合することにより、環境応答性と細胞親和性の双方を獲得した材料を創製した例も存在する²⁷。よって、こうしたペプチド修飾による戦略は、あらゆる有機物質に細胞接着性を付与する手法として一般的なものとなりつつある。

人工ポリペプチドマトリクス設計

ペプチド修飾による戦略においては、複数の材料から成るハイブリッド材料を構築しなければならず、修飾反応の過程を踏まなければ目的の材料を得られない。結果、得られた材料の機能性は修飾反応の効率に左右されてしまう。それに対して、ポリペプチドによる足場基盤を設計し、直接機能性ペプチドを組み込んだ一体型マトリクスタンパク質ができれば、生産性及び機能性に優れた材料となることが考えられる。こうした目的を実現するため、足場基盤となるポリペプチドの開発が盛んに行われている。Taniharaらはコラーゲンを模したトリペプチドPro-Hyp-Glyからなる材料を作製し、安定な繊維状構造を得た²⁸。Kitagawaらはさらにこれに改良を重ね、S-S結合を利用した自己組織化ペプチドを提案している²⁹(Fig. 1-2B)。これらの材料は、原コラーゲンの持つ抗原性などをクリアするものとして注目されている。

このように開発された足場基盤には、様々な機能性配列が組み込まれ、高機能性足場材料として再生医療に貢献している。上記の人工コラーゲン配列には、エラスチン由来の感温性を備えたpoly(GVGVP)配列やRGD配列との融合材料が作製され、感温性・細胞接着性など

を兼ね備えた材料として応用されている³⁰。また、蚕の産する絹に存在し絹様のファイバー構造を構成するGAGAGS配列の性質を利用し、様々な細胞接着性配列と融合させた人工 silk-like材料が開発されている³¹ (Pronectin F®: 三洋化成)。

その他にも天然に存在する配列を模したのではなく、純粋にペプチド間相互作用による繊維構造形成をデザインしたペプチド材料も存在する。RADの繰り返しであるRAD16 ペプチドは生理的条件下で高密度のファイバー構造を呈するようデザインされた自己組織化ペプチドである³² (Fig. 1-2C, PuraMatrix®: BD Biosciencesより市販)。この配列は細胞接着性を有しており、内皮細胞の管腔構造形成³³や骨分化を促進³⁴したという報告が見られる。また同様にデザインをほどこした骨格にラミニン由来接着配列を組み込み自己組織化した例も見られ、神経細胞の分化が報告されている^{35,36}(Fig. 1-2D)。

1.2.3 タンパク質材料による足場作製の意義

これまでに、再生医療における足場材料の設計例を挙げてきた。今後の再生医療に必要とされる足場材料の特性とは、「1. より高機能であること」「2. 安全性に優れていること」「3. 生産性に優れていること」であるといえる。これらの観点から、既存の ECM 単体では今後の需要を満足させることはできないと考えられる。2.および 3.の条件を満たすためには、人工的に生産できる足場材料の開発は必須条件であるが、1.の高機能性を実現するためには、様々な機能が一つの分子に集約した形が理想的であるといえる。生体組織中では、ECM や増殖因子など様々なタンパク質がシグナル因子として役割を担っている。こうした機能性タンパク質を足場材料に一体化させるためには、ポリペプチド基盤に機能性配列が融合した形をとることが、修飾効率によらず最も効率的な手段であると考えられ、生体環境に近づける有効な道である。

次節では、こうした人工タンパク質足場材料の特性を生かした設計をするために、本研究において着目した機能性配列と生体モデルについて述べる。

1.3 人工タンパク質足場材料の応用—血管再生

前節では、ECM の重要性と、その特性を生かした足場材料としてどのようなものが適しているのかを考察した。結果、人工タンパク質足場材料の有用性が浮き彫りとなったといえる。本節では、新たな高機能性足場材料を構築するにあたり、本研究で着眼した生体組織モデルと、そこに関与する ECM の機能ドメインを紹介する。

1.3.1 血管新生とラミニンの関係

血管は、全ての生体組織に張り巡らされており、酸素・栄養の供給源として非常に重要な器官である。その構造は管腔様であり、血管内皮細胞・平滑筋細胞などが層をなして裏打ちしている。その血管発生過程は、胎生期のものと既存血管組織におけるものの2通りに大別される。胎生期においては、中胚葉から分化した血管芽細胞が細胞集塊内で管腔を形成し、互いに融合して原始血管叢を形成するという過程を経る。この過程は脈管形成 (vasculogenesis) と呼ばれる³⁷。その後の全身への血管網の形成、または成熟固体の既存血管組織においては、血管新生刺激に反応して、基底膜や細胞外マトリクスが融解し、血管内皮細胞の増殖・遊走・管腔形成の過程により新生血管が出芽する。この過程が血管新生 (angiogenesis) である³⁸(Fig. 1-3)。つまり血管新生の過程は、シグナルを受けて細胞のネットワークを再構築させるというものであり、生体における細胞社会構築の縮図として、人工生体組織モデルの着眼点となりうる対象である。

また、1980年代に入り、Folkmanらにより毛細血管由来の内皮細胞を癌細胞の培養上清中で培養すると4~6週間後に毛細血管様の管腔構造を呈することが報告された³⁹。この報告により、内皮細胞は、ある環境下においては、生体外でも単独で血管の特徴的な構造である管腔を形成できることが示された。その後、様々な細胞外マトリクスを用いた3次元培養系において、もっと短期間で管腔形成が惹起されることも確認された⁴⁰。これらのことから、

内皮細胞はECMを含む3次元培養系において独立したネットワーク形成シグナルを認識し、組織形成へといたることが示唆された。よって内皮細胞の管腔組織形成は、生体外で制御可能な人工組織形成モデルとして非常に注目すべき現象である。

このモデルにおける管腔形成には、基底膜成分が重要であるとされている。基底膜とは、血管内皮細胞と平滑筋細胞の境界に存在する網目構造ECMであり、他にも筋細胞・神経細胞の周囲など複数の組織をつなぐ役割を果たしている。コラーゲンIVから成る3次元網目構造に、ラミニン・ナイドジェンなどのタンパク質、パルカンなどのプロテオグリカンが結合したモデルが提唱されている⁴¹。再構成基底膜モデルとして知られるMatrigelは、Engelbreth Holm Swarm腫瘍由来基底膜の網目構造を尿素変性で可溶化後、透析で尿素を除去した基底膜成分混合液である⁴²。37°Cに加温することによって、基底膜構造が再構築され、ゲル状となる。ここでMatrigelを用いて内皮細胞を培養すると、管腔形成は顕著に促進され、且つラミニン抗体の添加によってその形成能は抑制を受ける^{43,44}。よってラミニンが内皮細胞へのシグナル導入にある役割を果たしていることが示唆される。これらの背景を踏まえ、近年では、ラミニンの持つ機能性部位が多く同定され、血管新生への関与についても考察がなされている。活性が報告されたペプチド配列を用いた足場材料モデルも次々と生み出されている状況である。次項では、ラミニンにおける機能性部位を紹介し、その応用例を示す。

1.3.2 ラミニンにおける機能性ペプチドとその応用例

基底膜の主要タンパク質であるラミニンは、 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ の3本鎖からなる分子量50~90万のヘテロ3量体で、十字架構造をしている。5種の α 鎖、3種の β 鎖、3種の γ 鎖からなる12種のアイソフォームがこれまでに同定され、これらが組織特異的もしくは発生における各段階特異的に発現していることが知られている⁴⁵。たとえばラミニン-1は発生の初期段階で、ラミニン-2及び4は神経組織に、ラミニン-5,-6,-7は皮膚に、ラミニン-8,-9は血管内

皮に多く発現している。中でも発生の初期に発現するラミニン-1の注目度は最も大きく、神経組織・血管組織などの分化に関与する機能単位の解析対象である。ラミニンのもつ機能性部位の解析については、Nomizuらの功績が非常に大きい。彼らはラミニンの複雑な機能を個々の機能部位に分解するため、ラミニン-1のアミノ酸を網羅した合成ペプチドライブラリーにおける機能解析を行い、細胞接着活性のある配列のスクリーニングを行った^{46,47,48}。その結果、様々な活性部位を同定することに成功し、細胞接着活性だけでなく多様な生物活性を持つことを示している(Fig. 1-4)。その中で血管新生における活性部位も数種報告されており、IKVAVを含む配列は血管新生を促進し^{49,50}、YIGSRを含む配列はそれに反して血管新生の抑制⁵¹及び腫瘍の転移抑制^{52,53}などの活性を示した。それぞれの配列は細胞表面のレセプターの同定が行われたのみで、どのような作用機序をとるのかはまだ明らかとなっていない。同じラミニン分子の中で、血管新生促進と抑制の相反する機能が存在するという事実は非常に興味深いといえる。ラミニン分子は血管新生過程のon-offを左右する何らかの制御機構を持っており、ここで同定された機能配列がその中心を担っていると考察できる。

それらの機能配列の中でも、初期に同定されたものがIKVAV、YIGSRを含む配列である。特にIKVAV配列は神経突起の伸長を促進する機能も報告された^{54,55}ことから、早くから研究者に着目され、応用例も多い。その多くが基板上に合成ペプチドを固定化し、細胞の接着もしくは神経突起の伸長などを導く^{56,57,58}というものである。また、自己組織化するペプチド配列中に組み込み、IKVAV配列を高密度に提示したファイバー足場上で培養することにより、神経細胞への分化を促進させた例^{36,59}も存在する。また、ポリエチレングリコールにIKVAV、YIGSRを修飾することで細胞接着能を獲得した足場材料を得たという報告⁶⁰も見られる。これらの応用例から、ラミニンより同定されたIKVAV配列もしくはYIGSR配列が、ある特定の足場中に組み込まれた状態で効果的に機能できることがわかる。よって、ラミニンにおける機能性配列は、足場材料に応用する機能ドメインの一部として注目する価値があるといえる。

次項では、既存のECMを応用した管腔形成モデルとその問題点を考察することにより、

今必要とされる足場材料について論ずる。

1.3.3 細胞外マトリクスを応用した血管新生モデルとその問題点

前項までで、血管新生（Angiogenesis）が細胞のネットワーク形成モデルとして適していること、ラミニン-1において血管新生に関与する機能単位ペプチドの解析もすすんでいることを示した。よって、新たに構築する高機能マトリクスの応用対象として、ラミニン由来機能性配列を組み込んだ血管新生モデルの系が想起される。そこで本項では、既存のECMを用いた管腔形成モデルとその問題点を考察し、本研究で構築するマトリクス材料に必要な特性を確認する。

再構成基底膜モデルであるMatrigelは、強力に管腔構造の形成を促進する血管新生モデルとして知られている。実際にMatrigel上にヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を播種すると、HUVECは時間経過につれて遊走・浸潤し、20時間後にはFig. 1-5に示すようなほぼ完全な管腔状ネットワークを形成する⁶¹。同様の現象がコラーゲンゲル⁶²・フィブリンゲル⁶³を用いた3次元培養中でも見られるが、完全な管腔構造形成には数日の培養が必要であり、構成された構造体の完成度もMatrigelには及ばない。これらのゲル中にラミニンを添加すると、構築される構造はより充実する⁶⁴が、それでも全体的にMatrigelと比較できるところまでは至っていない。これらの背景から、現在では、管腔形成モデルとしてはMatrigelの利用が大半を占めている。しかしながら、Matrigelは腫瘍由来の抽出物であり、安全性の問題から、将来臨床応用されることは有り得ない。ラミニン成分自体が抗原性を持つ可能性も大きいため、Matrigel及びラミニンを用いずにより安全性の高い血管新生モデルを開発することが求められている。よって、抗原性を除いたコラーゲン材料として注目されているアテロコラーゲンを3次元培養モデルとし、ラミニンの機能性ドメインを抽出した人工足場材料を併用していくことで血管新生能を増強することができれば、安全性と管腔形成能の両方を満足するモデルとしてMatrigelを代替する有用なものとなる。次節では、そうした材料設計のための基

本戦略について述べる。

1.4 高機能性細胞外マトリクス設計

これまでの記述において、ECMにおける機能性ドメインを組み込んだポリペプチド材料の重要性が示された。また、人工組織形成モデルのひとつである血管新生モデル材料において、ラミニンの機能性ドメインを応用した人工タンパク質足場材料が有用に機能する可能性が示唆された。ここで議論されている機能性ペプチドは、単独でも作用可能であるが、短いペプチド配列のみでは効率的に細胞表面にアクセスできるとは考えにくい。また、複数のペプチド配列を連結したハイブリッド材料を設計する際には、適当なリンカー配列などをペプチド間に配する必要があるが生じる。そこで、機能性ペプチドを安定化し、且つペプチド間のリンカーとしての役割を果たすマトリクス骨格を選択することが重要となる。以降では、マトリクス骨格の選定及び実際に本研究で目指す細胞外マトリクス設計について述べる。

1.4.1 elastin-like peptide によるマトリクス骨格

機能性ペプチドを支持する骨格部分のドメインには、構造的に安定していることが要求される。当研究室では、既存の細胞外マトリクスを参考とし、エラスチン由来のヘキサペプチド繰り返し配列をマトリクス骨格として用いてきた^{65,66,67}。エラスチンは血管壁・筋組織などに大量に存在し、組織の弾性を生み出している細胞外マトリクスである(Fig. 1-6A)。エラスチン内には特徴的な繰り返し配列が数種存在し⁶⁸、中でもAPGVGVヘキサペプチド、もしくはGVGVVPペプチドの繰り返し部分は、安定な β スパイラル構造をとっていることが知られている^{69,70}(Fig. 1-6B)。実際に当研究室^{66,67}及びTirrell⁷¹、Urry^{72,73}らのグループにより、このエラスチン由来ペプチド配列を骨格として細胞接着配列GRGDSなどを組み込んだマトリクスが構築されている。これらのエラスチン骨格は細胞増殖活性が報告されている生体活性物質でもあり⁷⁴、加えてAPGVGV配列は、細胞遊走促進などの作用も併せ持つ^{75,76}。これらの知見から、こうしたエラスチン由来ポリペプチドを骨格として採用することにより、

安定な構造骨格を持ち、かつ生体活性も高いマトリクス材料を構築できる可能性が示唆されているため、本研究においても基本骨格として選択した。次項では、実際にエラスチン由来ポリペプチドを用いた本研究の設計案を示す。

1.4.2 機能性ペプチドの融合による細胞外マトリクスの設計

管腔形成モデルへの応用を踏まえ、本研究で着目したのはラミニン由来のIKVAVを含む配列とYIGSR配列、そしてRGDN配列である。それぞれ、IKVAV配列は血管新生を促進する機能⁴⁹、YIGSR及びRGDN配列は血管新生を抑制する機能がペプチドレベルの研究で明らかとされている⁷⁷。よって、先述したエラスチン由来ペプチドからなる骨格部分にこれらのペプチドを挿入することにより、擬似マトリクス材料として機能することが推測される。

当研究室の先行研究によって、APGVGVを12回繰り返した配列 (APGVGV)₁₂ (E12 と表記) をマトリクス骨格の基本単位とし、GRGDS配列をE12間に挿入した人工マトリクス材料を構築し、その機能が確認されている^{66,67}。また、APGVGV配列においては、その細胞遊走促進活性⁷⁶と、新生血管の増強作用⁷⁸が報告されていることから、血管新生促進作用を持つIKVAV配列と融合することにより、2つの機能性配列を融合したハイブリッド材料となる可能性がある。よって、本研究では、E12-IKVAVの融合タンパク質EIおよびEIの繰り返しタンパク質からなる融合タンパク質を作製し、その血管新生における促進効果を検討する。また、高い細胞接着能を持つフィブロネクチン由来のGRGDS配列をさらに融合したE12-GRGDS-E12-IKVAVからなる融合タンパク質EREIも作製する。この設計は、構築するマトリクスの細胞接着能を高め、シグナル導入効率の向上を得ることを目的とした。

また、血管新生抑制の機能を持つペプチドRGDN、YIGSRに関しては、細胞遊走活性を抑える方向に働く必要があるため、APGVGV配列ではなくGVGVP配列の繰り返しを骨格とした。そこに二つのペプチドを挿入したGVGVP18-RGDNのユニット(GR)、GVGVP18-YIGSRのユニット(GY)、GVGVP18-RGDN-GVGVP18-YIGSRのユニット(GRGY)

を作製した。機能性配列を 1 種類のみ持つ融合タンパク質においては、その機能性配列の示す役割を抽出して検討することができ、また、複数の配列が融合されたものについては、相乗効果を得ることができると考えられる。

1.5 本研究の目的と意義

本章においては、再生医療における足場材料の重要性を明示し、抗原性を持たず、且つ既存の ECM の機能が保存されているような人工マトリクス材料の開発が望まれていることを述べてきた。特に生体外における細胞ネットワーク構築例である血管新生モデルについては、ラミニンのもつ機能性部分を利用した安全性の高い培養モデルの開発が重要視されている。そこで要求されるマトリクス材料は、「安全性の高いものであること」「3次元培養に適応できること」「高機能であること」が条件であると考えられる。

したがって本研究では、エラスチン骨格による安定な構造中に複数の機能性ペプチドを挿入したポリペプチドマトリクスを提案する(Fig. 1-6C)。3次元培養モデルとしては、アテロコラーゲンによるゲル材料を選択し、構築したマトリクス材料をコラーゲンゲルと併用することにより、高機能な生体組織モデルを実現する。競合する実験系としては、自己組織化するポリペプチドゲルが挙げられる³²⁻³⁶。IKVAV、GRGDSなどの短いペプチド配列は組織化するペプチド内に組み込むことが可能であるため、コラーゲンなどの材料が不必要である。しかし増殖因子など、ペプチドと比較して大きい分子量のものの固定化は不可能であるため、遊離の状態を上から添加する方式を取らざるを得ない。本研究におけるマトリクス材料においては、将来的に増殖因子との融合タンパク質を構築することにより、マトリクス上への増殖因子の固定化・濃度勾配の制御などができる可能性を有している。

本研究では、血管新生を促進する材料と抑制する材料の2種を構築する。ラミニンにおいては、この相反する機能が1つの分子に存在しているが、ここで機能性ドメインのみを抽出し、分離したマトリクス材料を構築することにより、個々の機能に特化したアプローチが可能となると考えられる。2種のマトリクスによって内皮細胞の応答を制御し、ひいては血管新生の調節を行うことができれば、高精度な人工生体組織の構築に向けて有用な材料となると考えられる。

以降第2章では、まず血管新生促進を目的としたマトリクス材料の構築について述べる。

そこで得られた問題点を踏まえ、続いて第 3 章にて新たに構築したコラーゲン結合型血管新生促進マトリクスの特長について評価する。次に第 4 章において、血管新生抑制を目的としたマトリクス材料の構築と特長評価について述べる。第 5 章では、本研究で得られた結果を総括すると共に今後の展望について述べ、結論とする。

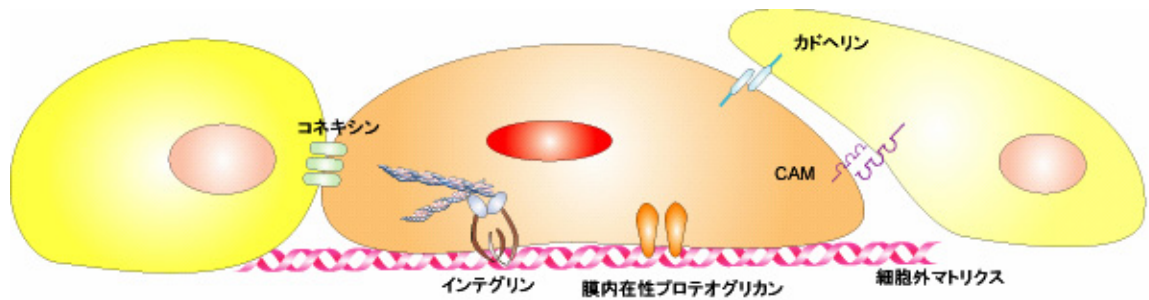


Fig. 1-1 細胞間認識と細胞接着

細胞は周辺細胞及び細胞外マトリクスを認識し、多数の接着因子が同時に作用している。

細胞—細胞外マトリクス間の接着因子：インテグリン、プロテオグリカンなど

細胞—細胞間の接着因子：コネキシン（ギャップ結合）、カドヘリン、セレクトリン、
cell adhesion molecule (CAM)など

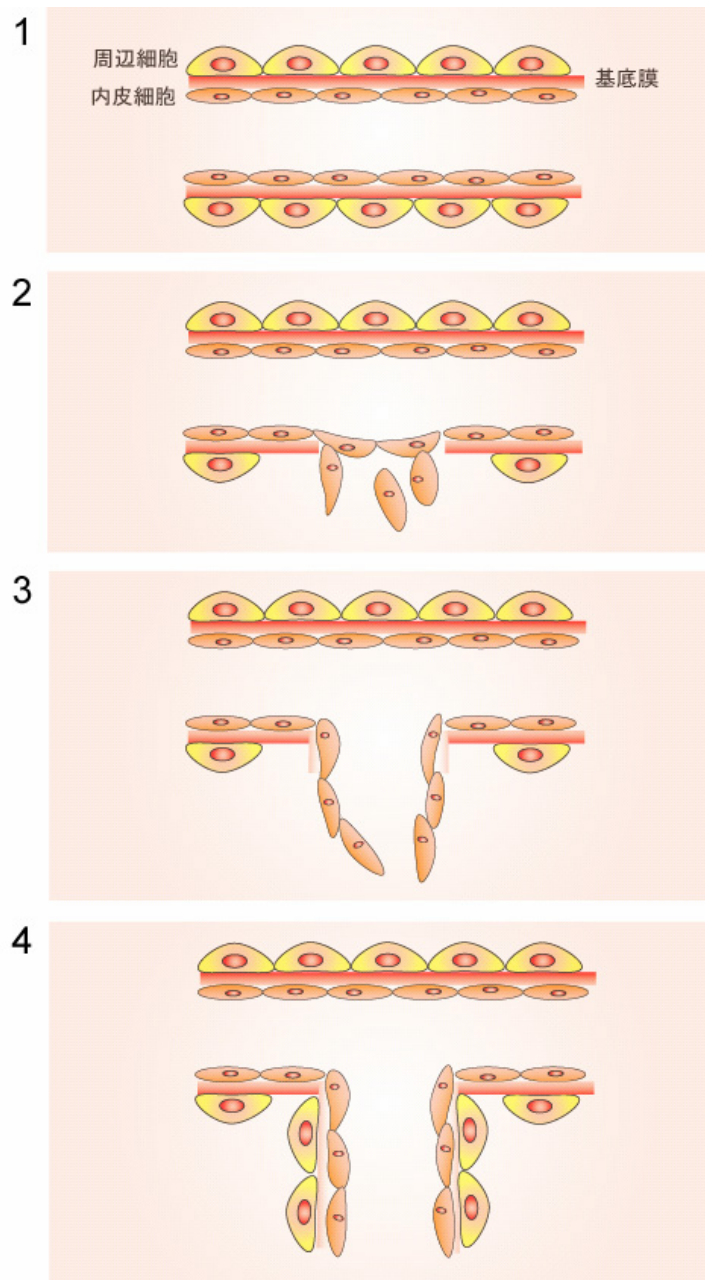


Fig. 1-3 血管新生のプロセス

- 1) 血管新生前の既存血管組織 2) 周辺細胞の解離→基底膜成分の消化→
 内皮細胞の増殖と遊走 3) 内皮細胞による管腔構造形成 4) 周辺細胞の増殖
 ・遊走と基底膜の再構築が行われ、成熟した新生血管が構築される

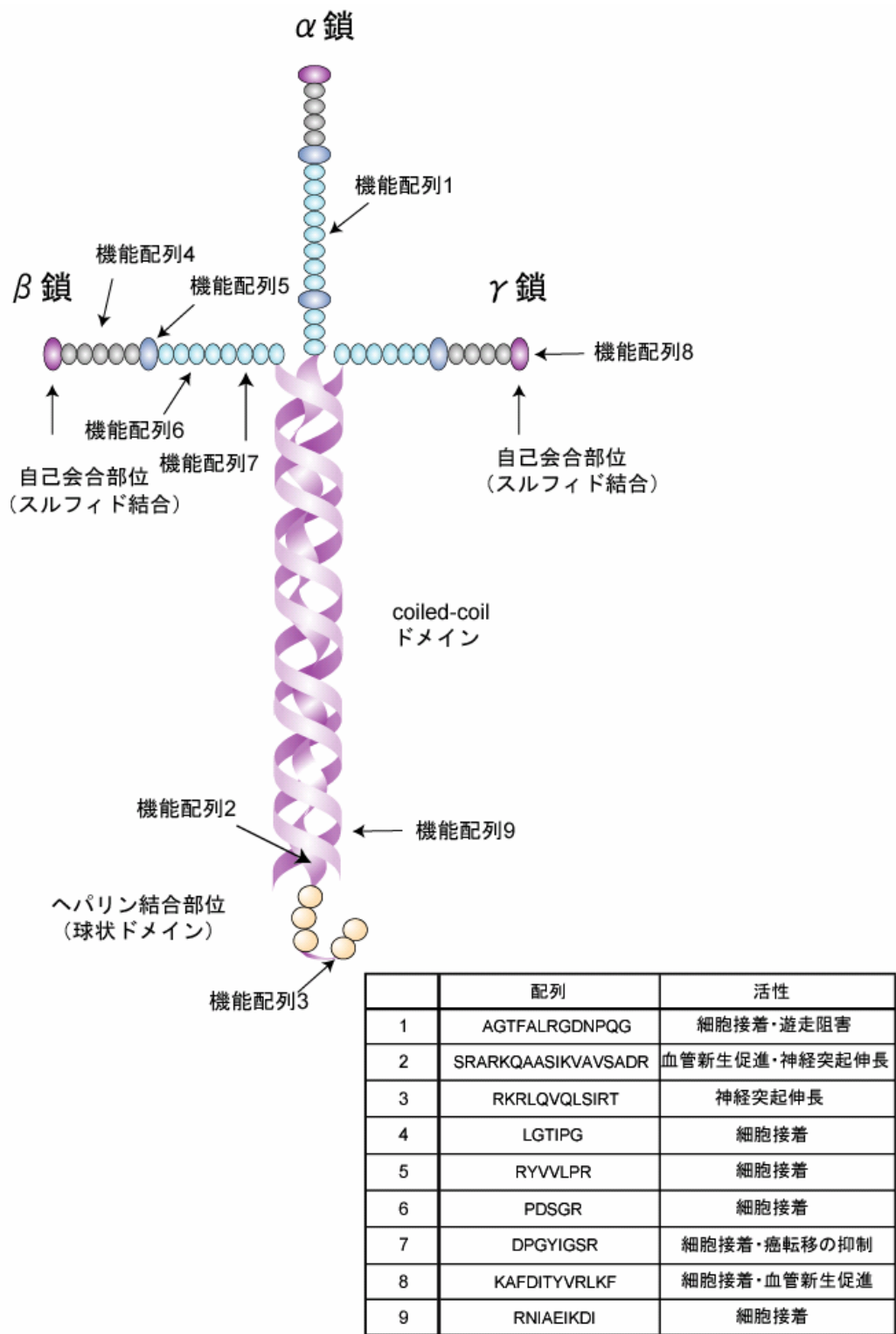


Fig. 1-4 Laminin-1の構造と機能配列

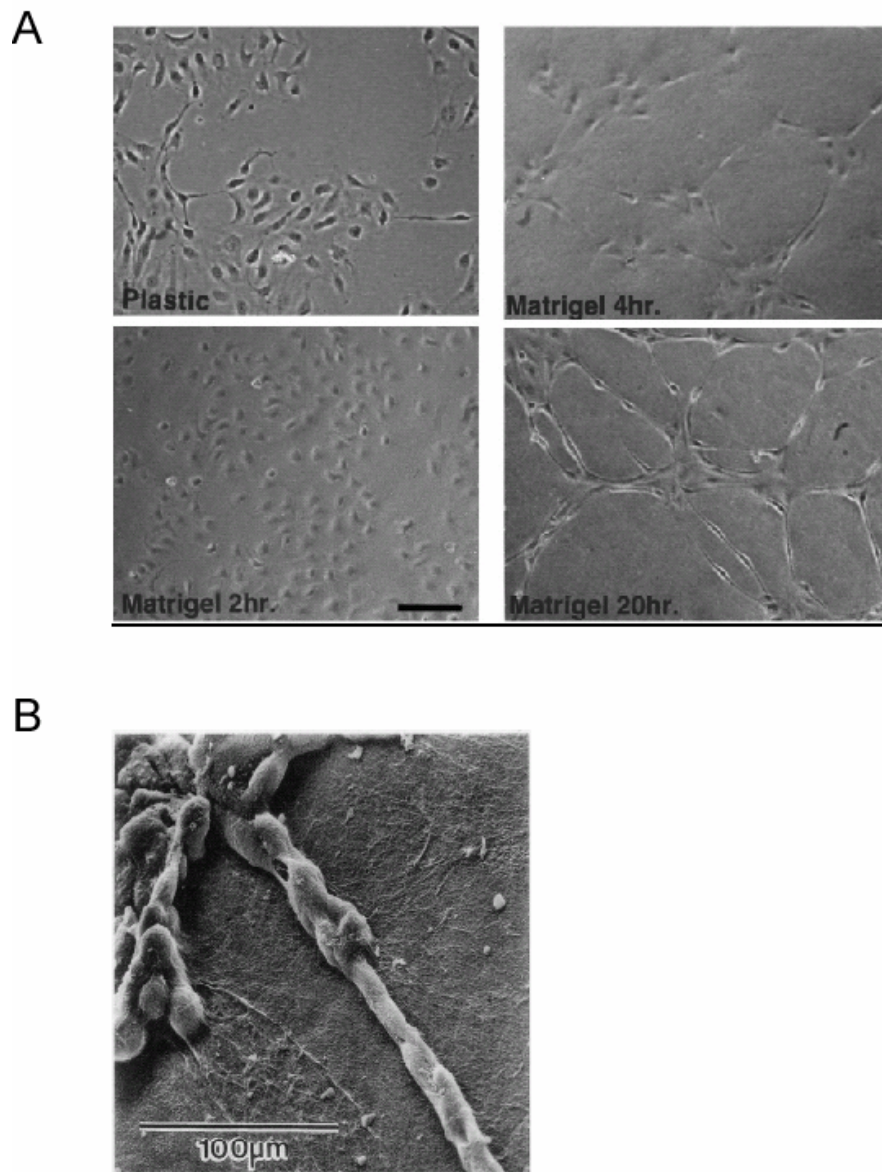


Fig. 1-5 Matrigelによる内皮細胞の管腔化

- A: Matrigel上に播種されたHUVECは、時間経過につれて遊走し、管腔様の構造をとる。 Bar: 100 μ m (文献61より引用)
- B: Matrigelによって得られた構造の拡大写真。細胞が立体構造をとっている様子がわかる。 (文献44より引用)

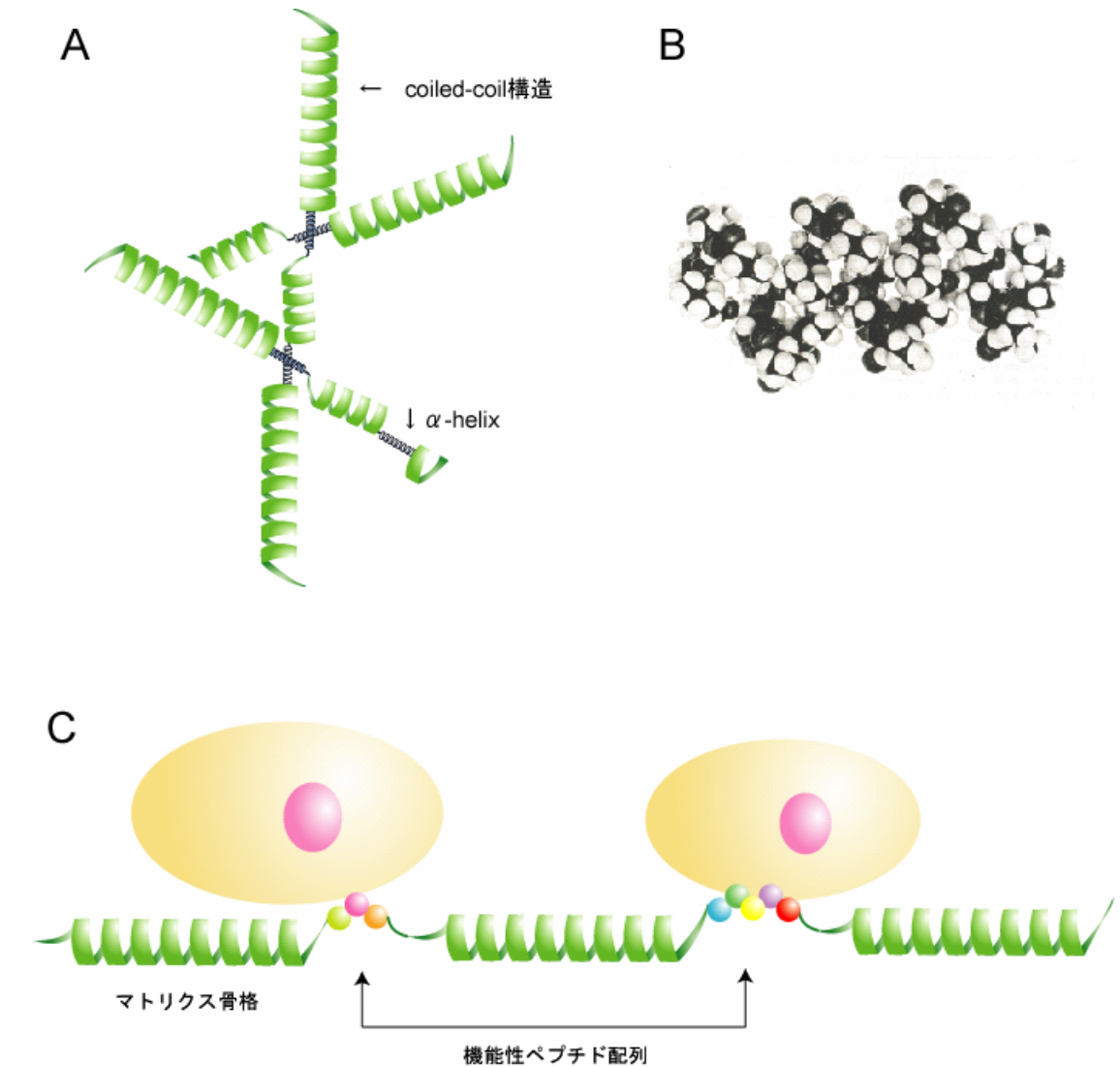


Fig. 1-6 エラスチン構造を利用した
細胞外マトリクスの設計

- A: エラスチンの構造モデル。コイルドコイル構造と α -ヘリックス構造が存在する。
- B: APGVGVペプチド配列の構造モデル。安定なスパイラル構造をとる。(文献69)
- C: 本研究で構築する細胞外マトリクス。エラスチン由来のマトリクス骨格内に機能性配列を組み込んだ基本単位を作製する。繰り返し単位の作製・複数の機能性配列の組み合わせなどにより、相乗効果が期待される。

第二章

血管新生促進配列を融合した 細胞外マトリクス設計と特性評価

2.1 緒言

第 1 章で述べたように、本研究ではアテロコラーゲンゲルにおける管腔形成能を補強する役割を担う血管新生促進マトリクスと、対して管腔形成を抑制するマトリクスの 2 種を構築し、生体組織における血管新生調節を生体外で再現することを目指す。まず第 2 章では、血管新生促進マトリクスの構築に着手した。具体的な機能性ドメインとしてラミニン由来の血管新生促進ペプチド IKVAV 配列に注目し、マトリクスを構造面から安定化させるエラスチン由来の APGVGV 繰り返し配列とフィブロネクチン由来の GRGDS 配列からなる融合タンパク質を数パターン構築した。そして作製したタンパク質のうち、細胞接着能及び細胞遊走能において有効な設計を決定し、アテロコラーゲンゲルに加えて血管内皮細胞の 3 次元培養を行うことで管腔形成の促進能力を検討する。

2.2 実験方法

2.2.1 実験試薬

DNA 増幅用プラスミド pBluescript SKII(-) は株式会社東洋紡より購入した。タンパク質発現用ベクター pET32c プラスミド及び大腸菌株 BL21(DE3)は Novagen 社より購入した。合成オリゴヌクレオチドは FASMAC 社に合成を委託した。遺伝子組換えに利用した制限酵素、及び DNA リガーゼは Takara 社より購入した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 及び内皮細胞培養培地 HuMedia EG-2 は KURABO 社より購入した。合成ペプチド CSRARKQAASIKVAVSADR は、三原研究室より提供していただいた。ウシ真皮由来アテロコラーゲン type I (Atelocell®, I-PC) は株式会社高研より購入した。その他の試薬は全て特級を使用した。

2.2.2 プラスミド構築

設計したマトリクスタンパク質の配列をコードした DNA 増幅用プラスミドを作製するに当たり、当研究室で以前に作製された APGVGV の 12 回繰り返し配列 (E12) を持つプラスミド pBS-E12、もしくは E12 と GRGDS 配列が連結された配列を持つ pBS-ER をクローニングベクターとして使用した。ラミニン-1 の $\alpha 1$ 鎖より同定された血管新生配列 (本研究では IKVAV 配列と表記) は、既存の文献⁴⁹を参考に 19 残基の配列を採用することとした (CSRARKQAASIKVAVSADR)。クローニングに用いた IKVAV 配列の合成オリゴは以下の通りである。なお、クローニングのために合成オリゴの 5'末端には制限酵素 *Bam*HI の認識配列、3'末端には *Bg*II と *Eco*RI の認識配列を付加した。

IKVAV-forward:

5'-GATCCTGTGCTCTCGTGCTCGTAAACAGGCTGCTTCTATCAAAGTTGCTGTTTCT
GCTGA CCGTAAGATC TTGTG-3'

IKVAV-reverse:

5'-AATTCACAAGATCTTACGGTCAGCAGAAACAGCAACTTTGATAGAAGCAGCCTGT
TTACGAGCACGAGAGCACAG-3'

この合成オリゴを 95°C の熱処理によりアニーリングさせた。またプラスミド pBS-E12 を制限酵素 *Bgl*II と *Eco*RI にて切断し、この断片をアニーリングさせたオリゴと共にライゲーションさせることにより、E12 と IKVAV 配列が連結されたプラスミド pBS-EI を得た。この pBS-EI を *Bam*HI と *Eco*RI によって切断して得た EI 断片を、*Bgl*II と *Eco*RI で切断した pBS-EI もしくは pBS-ER にクローニングすることにより、pBS-EI2 及び pBS-EREI を作製した。同様に pBS-EI4 と pBS-EREI2 も作製を行った。プラスミド pBS-E48 は、pBS-E12 配列に対して上記のクローニングを行うことにより作製した。以上作製されたベクターを *Bam*HI と *Eco*RI で切断した E48, EI, EI2, EI4, EREI, EREI2 断片をプラスミド pET32c に組み込むことにより、タンパク質発現用プラスミドを作製した。

2.2.3 融合タンパク質の発現・精製

タンパク質発現用プラスミドで形質転換した大腸菌 BL21(DE3) を、ampicillin 50 μ g/ml を含む LB 培地にて 37°C で振とう培養を行った。その後 660 nm の吸光度が 0.5 に達した時点で isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM となるよう添加し、さらに 30°C にて 3 時間振とう培養することでタンパク質の発現誘導を行った。

回収した大腸菌のペレットは Bug Buster Reagent (Novagen) に懸濁し、30 分室温にてローテーションを行って菌膜を破碎した。ただし EI4 タンパク質については、大腸菌ペレットを PBS に懸濁し、超音波によって破碎を行った。そして破碎された大腸菌ライセートを 17,000 g にて 15 分間の遠心を行い、上清を分取することにより可溶画分ライセートを得た。

可溶ライセート中に含まれる目的タンパク質は、コバルトイオンを配位した TALON Metal Affinity Resins (Clontech) とヒスチジンタグとの配位結合を利用して精製を行った。

ライセートを添加し 30 分間室温でインキュベートを行うことによってResinに目的タンパク質を吸着させ、非特異的に吸着したタンパク質を除去するためにカラムの 5 倍量のwash buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH=7.6) で 2 回洗浄を行った。さらに 10 mMのイミダゾールを含むwash bufferで 2 回洗浄を行った後、PBSにてResinを平衡化した。そこに終濃度 0.5 units/mlとなるようthrombin (Novagen)を添加し、室温で 1 時間インキュベートさせることにより、タグ部分を切断してResinから目的タンパク質を遊離した。そこで最終的にカラムより上清を分取して目的タンパク質を得た。得られたタンパク質は 0.22 μ m フィルターによりろ過滅菌を行い、12 %もしくは 15 %アクリルアミドゲルのSDS-PAGE に展開して精製の確認を行った。タンパク質濃度はBCA protein assay reagent kit (PIERCE)を用いて測定した。

2.2.4 細胞培養

HUVECはHuMedia EG-2 (2 % FBS, 10 ng / ml ヒト組み換え型上皮成長因子 (hEGF) , 1 μ g / ml ハイドロコチゾン, 50 μ g / ml ゲンタマイシン, 50 ng / mlアンフォテリシン B, 5 ng / mlヒト組み換え型塩基性繊維芽細胞増殖因子(hFGF-B), 10 μ g / mlヘパリン含有) 中にて 5 % CO₂, 37°Cの環境下で培養した。細胞の継代は0.1 %トリプシン処理にて行った。実験には購入時より 4~7 継代した細胞を使用した。

2.2.5 細胞接着能評価

固相表面にコーティングしたタンパク質の細胞接着能を評価するために、1, 10, 100 nMに PBSで希釈し 300 μ lとした融合タンパク質を浮遊培養用 24 well plate(SUMILON MS-8024R)に添加し、37°Cにて 1 時間インキュベートを行った。その後タンパク質溶液を除去し、HuMedia-EG2 に懸濁したHUVECを 6.0 \times 10⁴ cells /wellの密度で播種した。37 °Cにて 4 時間インキュベートした後に、各wellを撮影し、4 視野分の接着細胞数の平均を算出し

た。コントロールであるフィブロネクチン (sigma) は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ラミニン(sigma) 及び IKVAVペプチドは 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でコーティングを行い、対してPBSのみ添加したサンプルを noncoatとした。実験は各3回ずつ行った。

また接着阻害実験に際しては、浮遊細胞培養用 96 well plate (SUMILON MS-8096R)に PBS にて 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製したラミニン 100 μl で同様にコーティングを行った。1 % FBS/ 1 % penicillin・streptomycin を含有する Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)に懸濁した HUVEC に 5~20 pmol の融合タンパク質を添加し 100 μl としたものをラミニンコーティング済の 96 well plate に添加した。細胞密度は 5000 cells/wellとした。細胞播種後、37°Cで1時間インキュベートを行い、各 well を撮影して4視野分の接着細胞数の平均を算出した。IKVAV ペプチドについては 20 及び 5000 pmol を添加し、対して PBS のみ添加したサンプルをコントロールとした。実験は各5回ずつ行った。

2.2.6 細胞増殖能評価

細胞増殖能の評価に際しては、浮遊細胞培養用 96 well plate (SUMILON MS-8096R)を 100 nM の融合タンパク質 100 μl で 2.2.5 と同様にコーティングした。フィブロネクチンは 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、IKVAV ペプチドは 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でコーティングを行い、対して noncoat のサンプルではPBSのみ添加した。そこに HuMedia-EG2に懸濁した HUVEC を 2000 cells /well の密度で播種し、その後 37°Cでインキュベートを行った。培地交換は1日おきに行った。MTS assay は、Cell counting kit-8 (Dojindo)のプロトコルに則って行った。具体的には、培地をアスピレーションにより除去し、HuMedia EG-2 : Cell counting kit=10 : 1 とした混合液を 110 μl 添加して 37°Cで1時間インキュベートした。そして 450 nm の吸光を測定することにより生細胞数の評価とした。測定値は 3 well の平均値とし、各実験は3回ずつ行った。細胞播種後4時間経過したものを0日のサンプルとみなした。

2.2.7 細胞遊走能評価

細胞遊走能の評価については、現在主流となっている手法の一つであるBoyden Chamber法を採用した。8 μm ポアサイズのpolycarbonateフィルター (BD Biosciences) を 100 nM の融合タンパク質で 2.2.5 と同様にコーティングを行い、HuMedia EG-2 2 mlを入れた 6 well plate上にセットする。そのフィルター上にRPMI 1640 培地 (0.1 % BSA含有、無血清) 1 mlに懸濁したHUVECを 1.3×10^5 cells /wellの密度で播種し、37 °Cにて 4 時間インキュベートした。そしてフィルター上に接着している細胞を綿棒でこすることにより除去し、フィルターをPBSで洗浄した後に 100 % メタノールに浸漬して、フィルター下部に遊走した細胞の固定を行った。固定後にフィルターを再度PBSで洗浄し、Giemsa染色液 (Merck) にて室温で 15 分間染色を行った。PBSで洗浄した後に、各フィルターを撮影し、4 視野分の接着細胞数の平均を算出した。実験は各 5 回ずつ行った。ネガティブコントロールとしてはGRGDSP合成ペプチド (BACHEM) を 100 $\mu\text{g/ml}$ でコーティングして用いた。IKVAVペプチド及びラミニンは 20 $\mu\text{g/ml}$ でコーティングを行った。

2.2.8 コラーゲングルモデルにおける管腔組織形成評価

ここではコラーゲングルサンドイッチ培養法による内皮細胞の管腔化を試みた。24 well plateにコラーゲン含有Minimum Essential Medium 300 μl (コラーゲン終濃度 1.3 mg/ml、10 mM Hepes, 10 mM NaHCO_3) を添加した。コラーゲン含有培地を作製する際、融合タンパク質を 100 pmol添加した (IKVAVペプチドは 1 nmol添加)。そして 37°Cで 2 時間インキュベートすることにより、ゲル化を行った。そのコラーゲングル上にHuMedia EG-2 に懸濁したHUVECを 2.0×10^5 cells /wellの密度で播種し、37°Cで 1 時間インキュベートした。細胞の接着を確認した後、培地を除去し、上記と同様に調製したコラーゲン含有培地を 300 μl 添加し、37°Cで 2 時間ゲル化させた。最終的にHuMedia EG-2 500 μl を添加して、37°Cで 2 日間培養を行い、形態を顕微鏡下で観察した。分岐数の測定に関しては、

ランダムな 4 視野を撮影し、それぞれの管腔構造における分岐の数を目視で計数し平均値を集計した。実験は各 3 回ずつ行った。

2.3 実験結果及び考察

2.3.1 血管新生促進マトリクスタンパク質の設計と発現・精製

本研究では、ラミニンの持つ機能単位として研究がすすんだIKVAV配列に着目し、APGVGVの安定な繰り返し構造中にIKVAV配列を組み込んだ融合タンパク質の作製を試みた。具体的には、Grantらの研究⁴⁹において高い機能を発揮していたCSRARKQAASIKVAVSADR配列を今後IKVAV配列として用いていくこととした。

当研究室の先行研究において、APGVGVを12回繰り返した配列(E12)とフィブロネクチン由来の細胞接着配列GRGDSを連結した配列ERを構築し、さらにそのユニットを4回繰り返した融合タンパク質ER4の細胞接着能を報告している⁶⁶。このようにGRGDSなどの機能性ペプチドを繰り返し単位に組み込んでポリマー化することは、構築したマトリクスの機能性を高める戦略として用いられている。本研究でもこの戦略を応用し、IKVAV配列とE12配列を連結したEIユニットを構築した上で、さらにEIを2回もしくは4回繰り返した融合タンパク質を作製した。以降では、そのタンパク質をそれぞれEI2、EI4と呼ぶ。

また、細胞表面上でIKVAV配列を認識するレセプターはGRGDSと異なっているため、2種のペプチドを併用することによって接着能を増強した足場材料などが今までに報告されている⁷⁹。この報告を踏まえ、本研究でもGRGDSとIKVAV配列が同一分子中に存在する設計も併せて試みることにした。したがって、更なるバリエーションとして、ERとEIユニットを連結したEREI、そして2回繰り返したEREI2の2種を作製した。以上で、構築した融合タンパク質は、EI、EI2、EI4、EREI、EREI2の5種である。加えてコントロールとして、E12配列のみ繰り返したE48も作製した。作製したタンパク質をFig. 2-1Aにまとめる。

設計した融合タンパク質は、大腸菌BL21(DE3)株において強制発現を行った。先行研究⁶⁶より、疎水性配列のE12を含む融合タンパク質は、thioredoxin(trx)タグとの融合により容易に可溶画分へ回収できるようになるとの知見が得られていたため、pET32cベクターによ

り **trx** タグを N 末端に付加した状態で発現させることとした。精製時に **thrombin** によりこのタグ配列部分を切断し、目的タンパク質を得た。精製後の融合タンパク質サンプルを SDS-PAGE に展開した写真を Fig. 2-1B 及び C に示す。IKVAV 配列を含む融合タンパク質は大腸菌内での発現量が低下する傾向が見られ、EI4 タンパク質が最も回収量が少ないという結果となった。又この結果からは、精製されたタンパク質は全て、理論値よりも分子量が大きいくらいに見受けられる。マーカータンパク質と移動度が異なる決定的な原因は不明だが、精製の際用いたアフィニティーカラムには特異的な結合が見られているため、ここで得られたタンパク質を目的のものとみなして以降の実験に用いた。

2.3.2 構築した融合タンパク質間の特性比較

本章において構築した融合タンパク質は、繰り返し回数や含まれるペプチドの種類によるバリエーションを含んでいる。本項ではまず、構築したタンパク質間の特性比較を行うことにより、融合パターンによる特性への影響があるかどうかを検討する。そして以降の実験に用いる最適な融合タンパク質を決定する。議論の際には、細胞外マトリクスとして最も重要な機能である細胞接着能、そして血管新生の際に重要となる細胞遊走能の 2 つに注目した。

2.3.2.1 細胞接着能比較

Fig. 2-2A に、細胞接着能に関する評価の結果を示す。ここでは構築した融合タンパク質をプレート表面にコーティングし、その固相表面上に接着する細胞数を数えるという方法を選択した。10~100 nM の融合タンパク質をコーティングした表面への接着細胞数は、noncoat のサンプルよりも高くなることから、作製した融合タンパク質は全て細胞接着能を持つことが示された。まず EI, EI2, EI4 については、EI4 が最も高い細胞接着能を示し、それはラミニン及びフィブロネクチンの 80% 程度であった。その接着能は、コーティングに用いたタンパク質濃度依存的に変化し、100 nM 用いた場合においてほぼ飽和に達することが

示されている。EI 及び EI2 においては、タンパク質濃度依存的な変化が見られず、フィブロネクチンの 50~70%という接着細胞数であった。これは、EI と EI2 では効果的に細胞へペプチドを提示できていないことを示している。したがって、繰り返し数の 1 番多いバリエントである EI4 が、EI シリーズの中では最も有効なマトリクスとなったといえる。この理由としては、1 分子中の IKVAV ペプチド数が多いために高効率で細胞接着した、もしくは全体としての構造が変化しペプチドを表面に提示しやすくなったなどが考えられる。

EREI,EREI2 においては、いずれもタンパク質濃度に依存した細胞接着が見られた。高濃度で用いた場合には、若干 EREI2 のほうが EREI より高い接着細胞数を示し、ほぼフィブロネクチン・ラミニンと同等であった。EREI において低濃度—高濃度間での差異が小さいのは、EI 及び EI2 に見られたのと同じ状況であり、EREI も効果的なペプチド集積ができているとはいえない可能性がある。よって、タンパク質濃度依存が顕著に見られ、かつ 100 nM における接着能も高い EREI2 を選択することが正しいといえる。

また、EREI と EI・EI2 を比較してみると、EREI がより高い細胞接着能を示していることがわかる。EREI2 と EI4 においても、EREI2 の方が接着細胞数の平均値において EI4 より若干高くなる傾向が見られた。これらの傾向から、IKVAV 配列のみではなく GRGDS 配列がともに存在したバリエントのほうが接着能が上がると結論できる。

以上の結果を総合すると、作製した 5 種のバリエント中では、EREI2 と EI4 の細胞接着活性が高いことが示され、ペプチドを繰り返し単位に組み込む戦略によって有効なバリエントを得られたことがわかった。この接着能は今までに構築された ER4 タンパク質⁶⁶に劣らないものであり、細胞接着配列を持たない E48 タンパク質を大きく上回る。接着細胞の形態においても、EREI2 及び EI4 をコーティングした表面上に播種した HUVEC は、フィブロネクチンに見られるような良好に伸展した接着をみせた (Fig. 2-2B)。よって、ここで構築した EREI2 及び EI4 は、細胞外マトリクスタンパク質として有効であると考えられる。続く細胞遊走能の検討において、さらに細胞走化シグナルの導入能についても比較を行う。

2.3.2.2 細胞遊走能比較

細胞遊走は、血管新生においては中核をなす重要な過程である。IKVAV 配列の機能についても、細胞接着から何らかの形で遊走を促すシグナルを導入するとの推測がなされている。よって細胞遊走能の評価は、血管新生への関与を判定する上で非常に重要視されており、細胞接着能とあわせて血管新生促進マトリクスの基礎評価には欠かせない。

細胞遊走の評価方法として本研究では Boyden chamber 法を選択した。この方法では一定の大きさのポアを持つメンブレンフィルターを用いる。フィルターの下層に FBS・増殖因子などを含む培地を添加し、上層に無血清培地に懸濁した細胞を播種すると、当初細胞はフィルター上部に接着するが、下層の栄養物質を求めてポアを通過し、メンブレン下部に接着するような形となる (Fig. 2-3A)。一定時間後に未だ上部に接着している細胞を剥離し、下部に接着した細胞を遊走細胞として固定・染色の後に計数する。この際、細胞遊走を牽引するようなマトリクスがメンブレンにコーティングされていれば、メンブレンを通過する細胞数は多くなるため、構築したマトリクスタンパク質の細胞遊走能を判定できると考えられる。実際に実験を行った結果を Fig. 2-3B に示す。細胞遊走活性を持つ ECM であるラミニンにおける遊走細胞数を 100 とすると、GRGDSP ペプチドでは 40%前後であるのに対して、IKVAV ペプチドではほぼラミニン同等の細胞遊走が示された。構築したマトリクスタンパク質については、5 種全てにおいてラミニンの 80~130%という高い遊走能が示されたため、融合タンパク質内に組み込まれた IKVAV ペプチドの特性が保持されていることが確認できた。

EI, EI2, EI4 においては、EI4 において最も高い細胞遊走能が得られ、且つラミニンの結果を上回ることが示された。前項において EI4 はこの 3 種の融合タンパク質中で最も高い細胞接着能を示していたということから、IKVAV 配列と細胞との強固な接着により細胞遊走シグナルを効率的に導入できていることが示された。加えて、EI4 においてラミニンを上回る遊走能が示されたのは、細胞遊走促進能が報告されているエラスチン由来 APGVGV 配列によ

り、IKVAV 配列の機能がさらに増強されたためと考えられる。

そして、EREI と EREI2 においては、どちらもラミニンと同程度という結果となり、バリエーション間の差が見られなかった。このことから、RGD 配列より IKVAV 配列の方が細胞遊走への寄与が大きいことが示唆される。

以上を総合すると、5 種の融合タンパク質は全てラミニンと同等もしくは上回る細胞遊走能を持つことが示されたことから、血管新生モデルに応用可能な有効なマトリクスといえる。中でも EI4 タンパク質の遊走能が最も高いという結果から、IKVAV 配列のポリマー化が融合タンパク質の細胞遊走能獲得に貢献することが示された。

2.3.2.3 血管新生促進マトリクスにおける設計の影響

2.3.2.1～2 において、細胞接着能と細胞遊走能という観点から、構築したマトリクスタンパク質バリエーションの評価を行った。上記から得られた結果を総合すると、構築したマトリクスタンパク質は、それぞれ挿入された IKVAV ペプチドもしくは GRGDS ペプチドの特性を保持していることが示された。よって、マトリクス骨格として採用した E12 配列は、ペプチドの安定化に貢献できていることが示唆された。また、基本ユニットを繰り返したポリマー化により、全体としての特性が向上したマトリクスを構築できることも確認された。これらの結果から、E12 を骨格として機能性ペプチドを連結し、その繰り返し単位を作製する戦略が有効であることが示された。構築したマトリクスは、既存の ECM とほぼ同等の高い機能を持つことから、この設計戦略によって作製した融合タンパク質は、人工足場材料として応用可能であるといえる。

したがって、以降の実験においては、細胞接着能・細胞遊走能の双方において他のバリエーションより高い機能を示した EREI2 と EI4 について、より詳細な特性評価を行う。

2.3.3 EREI2, EI4 の特性評価

2.3.3.1 機能性ペプチドによる細胞接着能評価

前項における細胞接着能評価においては、固相に融合タンパク質を集積させた表面への細胞の接着を評価した。この方法においてはタンパク質の集積効率が接着評価に影響するため、構造も分子量も大きく異なる分子同士の正確な比較はできていないと考えられる。よって、IKVAV ペプチド単独の場合と EREI2, EI4 の細胞接着能の違いを評価するためには、遊離の状態での細胞との相互作用を検討する必要があると考えられる。

そこで、細胞懸濁液に融合タンパク質もしくは IKVAV ペプチドを添加し、ラミネンコートしたプレート表面上に播種することにより、より詳細な細胞接着能評価を行った。結果を Fig. 2-4 に示す。タンパク質無添加のコントロールと比較して、EREI2, もしくは EI4 を添加した場合においては、添加したタンパク質濃度に依存して細胞接着が阻害されることが確認できた。その阻害率は EREI2 と EI4 ではほぼ等しく 60%程度であった。細胞接着配列を持たない E48 においてはそのような阻害傾向はみられなかった。よって EREI2 と EI4 が、組み込まれている機能配列を用いて細胞と相互作用していることが確認できた。対して IKVAV ペプチド単独の場合では、20 pmol 添加した際の細胞接着阻害は 20%程度であり、EREI2 と EI4 で示されたような高い阻害率は、IKVAV ペプチドを 5000 pmol 用いなければ不可能であった。

以上の結果から、EREI2 と EI4 は、IKVAV ペプチドを単独で用いるよりも、より効率よく細胞表面にアクセスできていることが示された。よって、E12 骨格によりペプチド部分を安定化させ、機能性部位として細胞に提示することが可能であることが確認できた。

2.3.3.2 細胞増殖能評価

2.3.2 項において、EREI2 及び EI4 タンパク質は固相表面に集積可能であり、細胞接着能を持つことが確かめられた。加えて、人工細胞外マトリクスとして有効に働くためには、長期にわたり細胞を支持し、増殖能を維持させることが必要となる。よって本項では、融合タ

ンパク質をコーティングした表面へ播種した細胞の増殖曲線を描くことにより、構築したマトリクスタンパク質の細胞支持能力を評価することとした。結果を Fig. 2-5 に示す。評価方法としては、MTS assay による生細胞数測定をとった。得られた増殖曲線から、EREI2 および EI4 のコーティング上に播種された HUVEC は、フィブロネクチンとほぼ同等に増殖することが確認できた。未処理の表面もしくは E48 をコーティングした表面では、細胞は増殖できず、3 日後程度からその他のタンパク質と有意差がつく結果となった。よって、EREI2 と EI4 は、既存の ECM と同等に細胞を支持する働きを持つことから、細胞外マトリクスとして応用可能であることが確認できた。

次項では、こうした知見を踏まえ、実際に血管新生モデルである 3 次元コラーゲンゲルに EREI2 もしくは EI4 を添加し、HUVEC の管腔形成に影響を及ぼすかどうか観察する。

2.3.4 コラーゲンゲルモデルにおける管腔組織形成評価

上下 2 層のコラーゲンゲルにより細胞を挟み込んで培養する方法をコラーゲンゲルサンドイッチ培養法と呼ぶ (Fig. 2-6A)。この方法により培養した HUVEC は、管腔様の構造を形成することが確かめられており、血管新生のモデルとして用いられている⁶²。本研究では、抗原性を除いたコラーゲン材料として市販されているアテロコラーゲンを用い、サンドイッチ培養を試みた。

培養 2 日経過後の形態観察結果を Fig. 2-6B に示す。タンパク質無添加のコントロールで生じている管腔構造の様子と比較したところ、IKVAV pep. または EREI2, EI4 を添加しても特に構造の発達は見られなかった。管腔構造の充実度を測る指標として多く用いられている、管腔の分岐数を計数する手法によって評価を行ったものが Fig. 2-6C である。分岐数を集計すると、コントロールを有意に上回る数値が得られたが、IKVAV ペプチドのみを添加した場合とは有意差がない。IKVAV ペプチド 1 nmol に対して融合タンパク質は 100 pmol ずつで同程度の効果が得られたという利点はあるが、融合タンパク質を過剰量添加しても、効

果が上がる様子は見られなかった。よって、融合タンパク質を添加しても、血管新生を促進したといえる結果は得られなかった。

ここでコラーゲンゲルモデルにおいて、期待したような管腔形成促進の結果が得られなかった原因としては、

- 血管新生促進能は持っているが、今回の系においては発揮されていない
- 血管新生促進能が無い

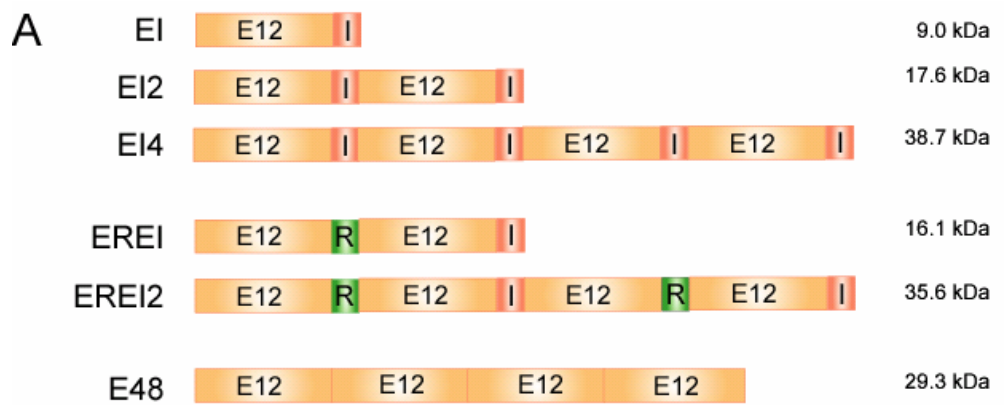
の2通りが挙げられる。コントロールより若干管腔構造の分岐数が向上していること、特性評価の結果においてはラミニンを上回る細胞遊走能が確認できていることから、ここでは前者の可能性を考慮することとした。

融合タンパク質に組み込まれている機能性ペプチドの効果をより効率的に発揮させるためには、機能性ペプチドと細胞との相互作用の効率を上げることが必要である。現状のように、融合タンパク質をコラーゲンゲル中に添加する方式では、作用効率を上げるためには多量のタンパク質を添加するしか方策が無いが、過剰量の存在はタンパク質の凝集などを引き起こし、細胞に悪影響を及ぼす懸念がある。そこで考えられる対策としては、構築した融合タンパク質の局所濃度を高くすることが有効である。コラーゲンファイバー上に融合タンパク質を固定化することが可能となれば、より細胞にアクセスする確率が高くなると考えられる。

2.4 結言

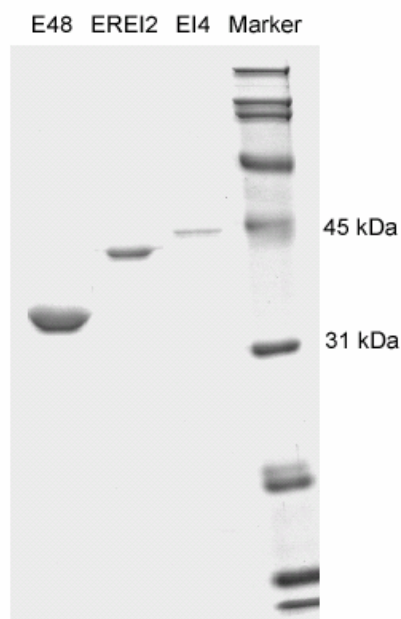
本章においては、血管新生促進を指向した細胞外マトリクスとして、ラミニン由来の機能性ペプチド IKVAV 配列を含む融合タンパク質を作製し、その特性評価を行った。作製したのは EI, EI2, EI4, EREI, EREI2 の 5 種である。評価の結果、作製した融合タンパク質全てにおいて、細胞接着能と細胞遊走能が確認できた。そしてその中でも、EI4 と EREI2 が最も機能性に優れていることが示された。よって、今回作製したタンパク質に組み込まれた機能性配列がその特性を維持できており、且つ、複数の機能配列の組み合わせや繰り返し単位の作製によって効果を相乗することが可能であることが示された。したがって、本研究において採用した、エラスチン由来の安定構造配列中に機能性配列を組み込み、その基本単位の繰り返しからなる融合タンパク質を作製するという設計案の有用性が示された。

しかしながら、今回作製した EREI2 と EI4 では、コラーゲンゲルモデルへ添加した際の明確な管腔形成促進は確認できなかった。これは、タンパク質機能の個別評価において確認できたフィブロネクチン同等の細胞接着能とラミニンを上回る細胞遊走能を効果的に利用することができていないためと考えられる。個別の評価の際には、プレートやメンブレンフィルターをコーティングするという方法により、融合タンパク質を固定化した形で用いていた。コラーゲンゲル中でも、こうした固定化を行うことにより、細胞表面へ効率的にアクセス可能な戦略をとる必要がある。よって次章では、本章で得られた知見を踏まえ、コラーゲンファイバー上へ固定化できる融合タンパク質の設計を行い、特性評価を行う。



E12: (APGVGV)₁₂
 I; CSRARKQAASIKVAVSADR
 R; GRGDS

B



C

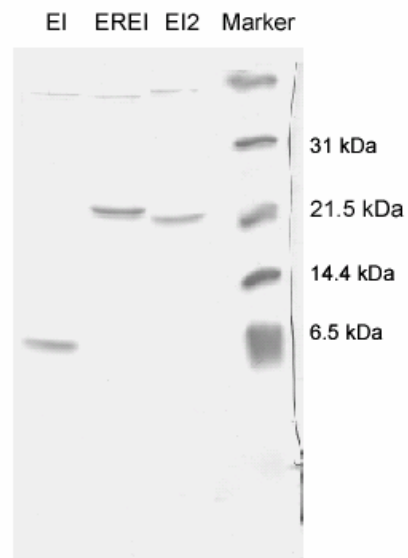


Fig. 2-1 IKVAVを含むマトリクスタンパク質の設計と発現・精製

A : EI, EREIをベースとする融合タンパク質の設計

B, C : 精製した融合タンパク質のSDS-PAGE泳動図

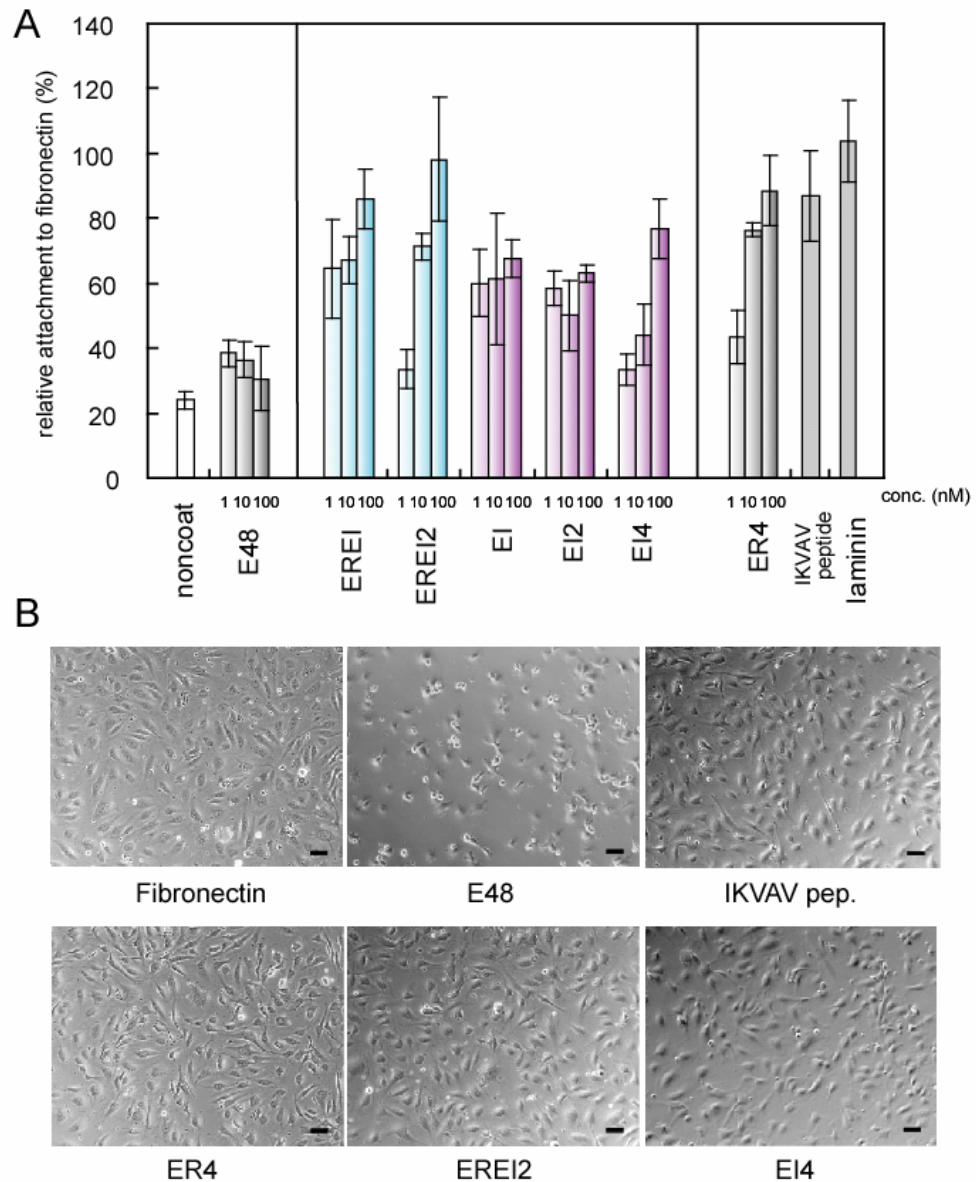


Fig. 2-2 構築したマトリクスタンパク質の細胞接着能

A : 各融合タンパク質への接着細胞数 (接着細胞数 × 100 / FNの接着細胞数)

B : 接着細胞の形態観察 Bar: 100 μm

100 nMのタンパク質をコーティングした表面上へ接着した細胞の形態を観察した。

fibronectin: 10 μg/ml, IKVAV pep. : 20 μg/ml (10 μM)

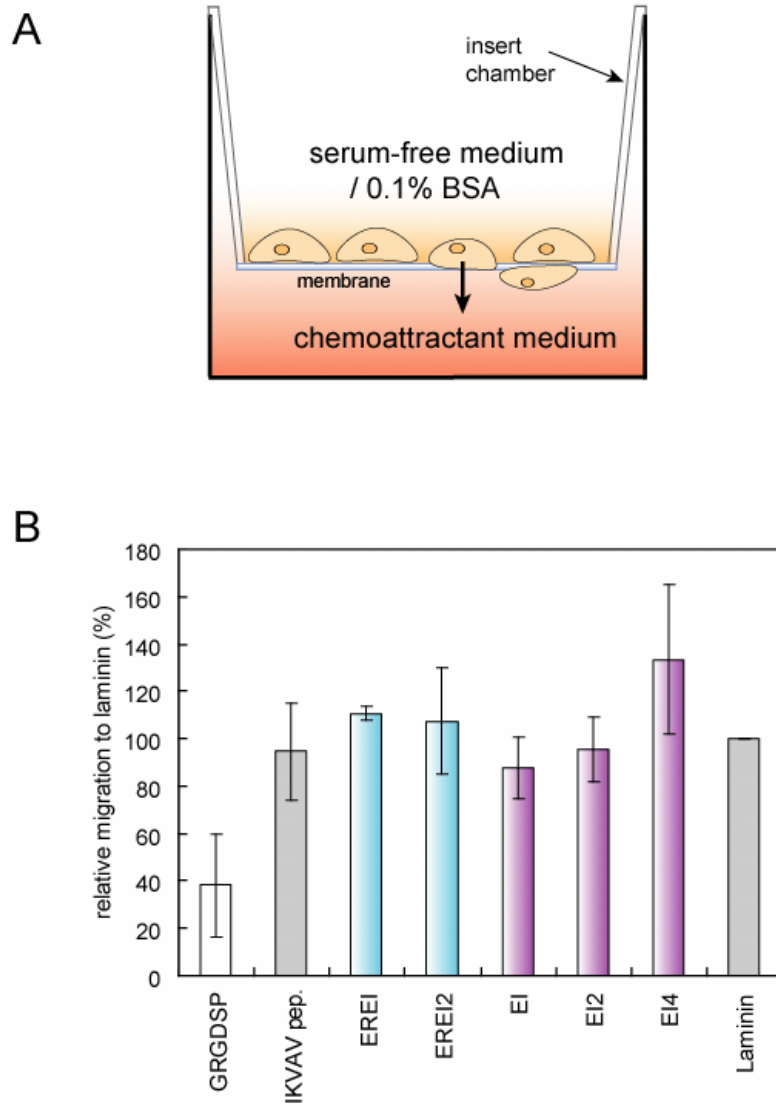


Fig. 2-3 構築したマトリクスの細胞遊走能評価

A : Boyden chamber法による細胞遊走能実験の概念図

B : 細胞遊走能比較 (遊走細胞数 × 100 / Lamininの遊走細胞数)

各融合タンパク質100 nMを用いてメンブレンフィルターをコーティングし、HUVECを播種した。4時間経過後にフィルターを通過して遊走した細胞数の計数を行った。GRGDSP : 100 μ g/ml IKVAV pep. : 20 μ g/ml Laminin : 20 μ g/ml

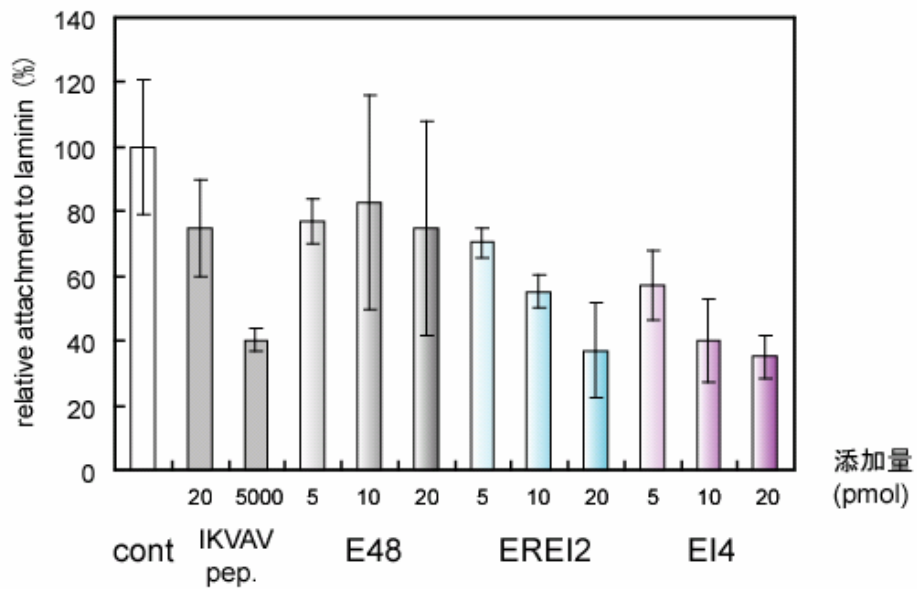


Fig. 2-4 EREI2,EI4の細胞接着能評価

Laminin上へ播種する細胞懸濁液に各融合タンパク質を添加し、接着阻害能を検討した。タンパク質無添加の場合を100 % (cont)とした際の接着細胞数の割合を示す。

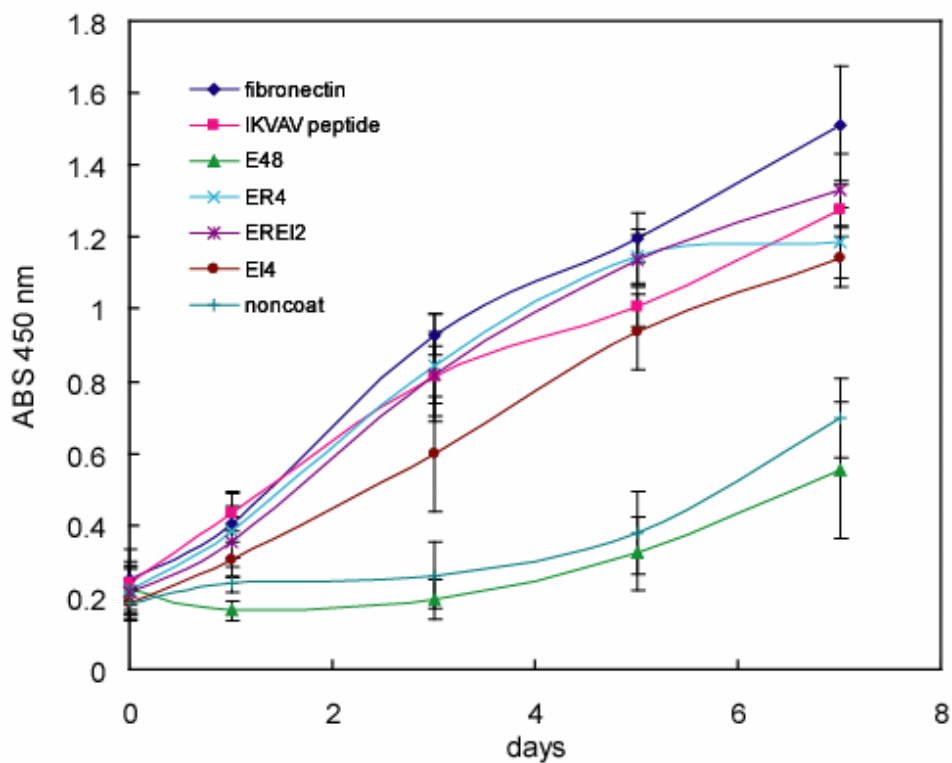


Fig. 2-5 EREI2,EI4の細胞増殖能

100 nMの融合タンパク質をコーティングした表面にHUVECを播種し、時間経過毎にMTS assayにより生細胞数変化の評価を行った。

fibronectin: 10 μ g/ml IKVAV pep. : 20 μ g/ml (10 μ M)

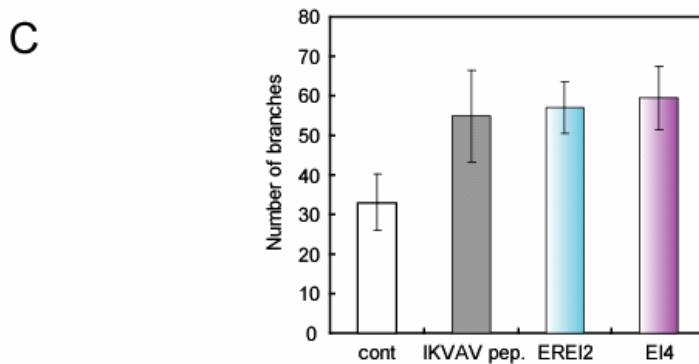
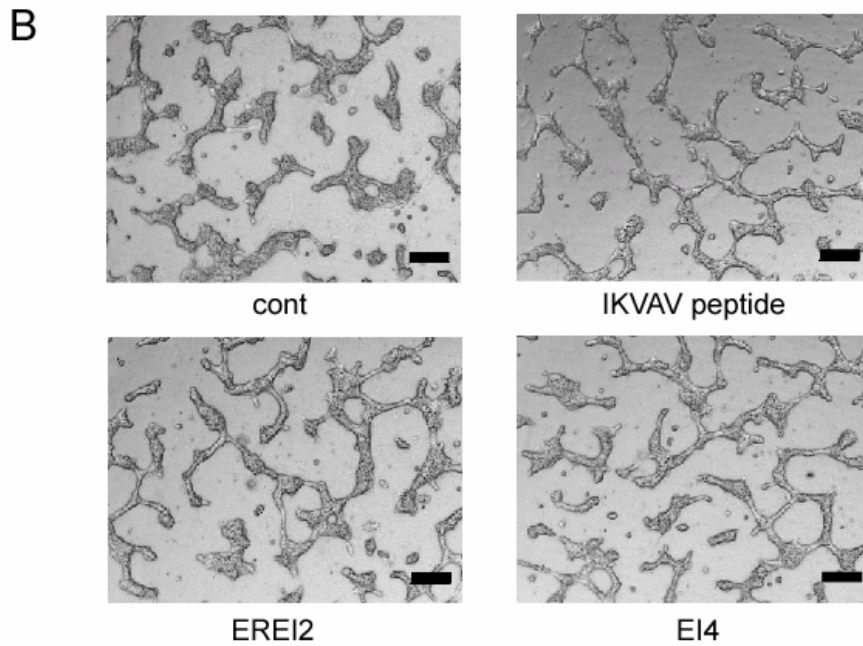
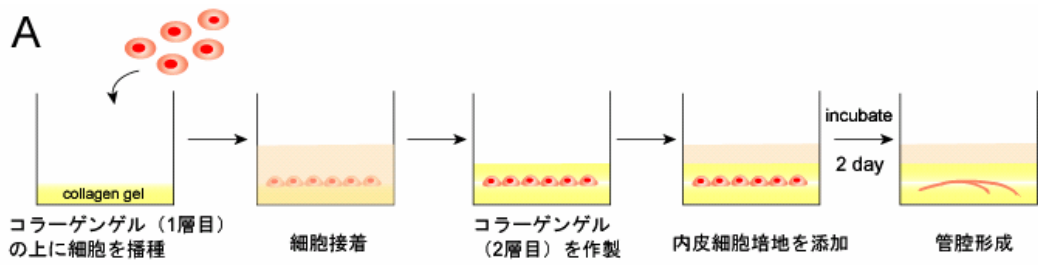


Fig. 2-6 コラーゲンゲルモデルにおける管腔形成評価

A : コラーゲンサンドイッチ培養法の概念図

B : マトリクス添加した際の管腔形成 100 pmolのタンパク質を添加したコラーゲンをゲル化させ、培養に用いた。Bar : 200 μ m C : 得られた管腔構造の分岐数

第三章

コラーゲン結合型血管新生促進 マトリクス設計と特性評価

3.1 緒言

前章においては、血管新生促進マトリクスの構築における設計案の有用性は示されたが、遊離状態の設計ではコラーゲングルモデルへ応用した際に効果を発揮できないことが確認された。構築した融合タンパク質は固相表面にコーティングした際には高い細胞接着能・細胞遊走能を示していたことから、ここで得られたマトリクスの特性を生かすためには、コラーゲンファイバー上への固定化が効果的であると考えられる。したがって、本章では、構築したマトリクスタンパク質の固定化を実現するために、コラーゲン結合型融合タンパク質を新たに作製する。

コラーゲン結合型融合タンパク質の作製にあたり、本研究で着目したのは、既存のタンパク質に存在するコラーゲン結合性配列 (collagen-binding domain; CBD) である。現在では様々なコラーゲン結合性配列が同定されており、その対象もコラゲナーゼ⁸⁰、von willebrand 因子^{81,82}、フィブロネクチン⁸³と多様である。それらのCBDを利用して、コラーゲン結合性を付与した融合タンパク質を構築することに成功した例が多数報告されている^{84,85,86}。

本研究では、多機能 ECM として知られるフィブロネクチン由来の CBD を選択し、第 2 章で構築したマトリクスタンパク質との融合タンパク質を新たに作製した。そして作製した融合タンパク質のコラーゲン結合能を ELISA 法にて確認し、最もコラーゲン結合性の高い設計を模索した。そこで決定した最適バリエーションの細胞接着能・細胞遊走能などの特性評価を行った後、コラーゲングルモデルに添加し、コラーゲン結合型融合タンパク質の機能について検討を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 実験試薬

PCRの際に使用した KOD plus® DNA polymerase は株式会社東洋紡より購入した。ウシ真皮由来のコラーゲン type IV は、株式会社高研より購入した。コラゲナーゼ (type S-1) は新田ゼラチン株式会社より購入した。ゼラチン粉末は Sigma 社より購入した。その他、実験を進めるにあたって必要な試薬は 2.2 に記載したとおりのものを使用した。

3.2.2 プラスミド構築

ヒトフィブロネクチン由来のコラーゲン結合性配列 (CBD) は、HUVEC より回収した total RNA より、RT-PCR を行うことによって得た。6 cm dish にコンフルエントに培養した HUVEC に TRIzol® reagent (Invitrogen) を添加し、添付のプロトコルに則って total RNA を抽出した。Superscript reverse transcriptase III® (Invitrogen) を用いて mRNA の逆転写を行った後、以下に示すプライマーを用いて KOD plus® DNA polymerase により CBD 配列を増幅した。後のクローニングのために、プライマー配列には 5'末端に *Bam*HI 認識配列、3'末端に *Bg*II 認識配列と *Eco*RI 認識配列を予め付加した。PCR 条件は、94°C 30 sec, 60°C 1 min, 72°C 1 min を 30 サイクルとした。

CBD-forward: 5'-cgggatcctg gcagctgttt accaaccg-3'

CBD-reverse: 5'-cggaattcac aagatctgcc actggatggg gtggga-3'

増幅された CBD 配列は、制限酵素 *Sma* I によって平滑切断された pBluescript SK II (-)ベクターにライゲーションし、DNA 増幅用プラスミド pBS-CBD を得た。

タンパク質発現用ベクターとしては、当研究室にて作製された、trx タグを除去した pET32c ベクターである pET32-NHis をクローニングに用いた。プラスミド pBS-CBD を *Bam*HI 及び *Eco*RI にて切断することで得た CBD 断片を、同じ制限酵素で切断した

pET32-NHisに組み込むことにより、pET32-NHis-CBDを作製した。また、pBS-EI, pBS-EI2, pBS-EI4, pBS-EREI, pBS-EREI2を *Bam*HI 及び *Eco*RI にて切断して得た EI, EI2, EI4, EREI, EREI2 断片を、同様に pET32-NHis ベクターにライゲーションすることにより、pET32-NHis-EI, pET32-NHis-EI2, pET32-NHis-EI4, pET32-NHis-EREI, pET32-NHis-EREI2 を構築した。同様にこれらの断片を *Bg*II と *Eco*RI を用いて切断した pET32-NHis-CBD ベクターに組み込むことにより、pET32-NHis-CBD-EI 以下 5 種の CBD 融合タンパク質発現用プラスミドを得た。加えて、pET32-NHis-EI 以下 5 種のプラスミドを *Bg*II と *Eco*RI を用いて切断し、*Bam*HI 及び *Eco*RI にて切断して得た CBD 断片を組みこんで pET32-NHis-EI-CBD 以下 5 種の CBD 融合タンパク質発現用プラスミドを作製した。

3.2.3 融合タンパク質の発現

CBD 融合タンパク質発現用プラスミドで形質転換した大腸菌 BL21(DE3)を、ampicillin 50 μ g/ml を含む LB 培地にて 37°C で振とう培養を行った。その後 660 nm の吸光度が 0.5 に達した時点で IPTG を終濃度 1 mM となるよう添加し、さらに 30°C にて 3 時間振とう培養することでタンパク質の発現誘導を行った。

回収した大腸菌のペレットは Tris 緩衝液(50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH = 8.0)に懸濁し、超音波破碎を行った。そして 17,000 g にて 15 分間の遠心を行い、不溶性画分のペレットを得た。得られた不溶性ペレットは 8 M urea を含む緩衝液(8 M urea, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8.0)に懸濁して可溶化し、その後 4 M urea, 2 M urea の段階透析を行った後、最終的に Tris 緩衝液(50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH = 8.0)に over night 透析して urea 成分を除去した。回収した後に 17,000 g にて 30 分間の遠心を行い、上清を分取し、最終的に 0.22 μ m フィルター滅菌を行って目的タンパク質を得た。得られたタンパク質は 10%アクリルアミドゲルの SDS-PAGE に展開して分子量サイズを確認し、タンパク質濃度は BCA protein assay reagent kit (PIERCE)を用いて測定し

た。

ELISA法によるコラーゲン結合能評価の際には、trxタグ及びヒスチジンタグを持つE48、EREI2、EI4 タンパク質を使用した（以後His-E48, His-EREI2, His-EI4 と表記）。これらのタンパク質は、2.2.3にてTALON resinに結合させた後、100 mM imidazoleを含むelution buffer（50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH=7.6）を添加することによりresinカラムから溶出した。その後PBSへ透析を行い、目的タンパク質を得た。

3.2.4 コラーゲン結合能評価

ここで用いたコラーゲン type I は、第二章と同様の atelocollagen (I-PC, pH=3.0 塩酸溶液) であり、pH=3.0 の塩酸を用いて 1 mg / ml に希釈してコーティングに用いた。コラーゲン type III (ウシ真皮由来、sigma) は pH=3.0 の酢酸溶液に溶解し、1 mg / ml に希釈してコーティングに用いた。コラーゲン type IV は type I と同様に pH=3.0 の塩酸で 1 mg / ml に希釈して用いた。ゼラチンのコーティングには、終濃度 0.9 % の NaCl を含有する 1 % ゼラチン溶液を作製した。ネガティブコントロールとしては、1 % BSA を含有する PBS を用いた。

上記のように調製された各コラーゲン溶液 100 μ l を 96 well ELISA plate (costar 3590) に添加し、37°Cにて 1 時間インキュベートを行った。0.05 % tween-20 を含有する PBS (PBS-T) 200 μ l にて 3 回洗浄を行った後、1 % BSA を含有する PBS 100 μ l を加えて 37°C にて 1 時間のブロッキングを行った。そして PBS-T を用いて洗浄した後、無血清 DMEM で希釈した CBD 融合タンパク質溶液を 100 μ l 添加して 37°C、1 時間インキュベートを行った。PBS-T による洗浄の後、anti-His tag antibody (sigma) 100 μ l を加えて同様にインキュベートした。以下同様に、PBS-T 洗浄と HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (sigma) の添加・インキュベートを行い、HRP substrate kit (KPL) を用いて HRP 活性を測定した。測定値は 2 well の平均値とし、各実験は 4 回ずつ行った。

3.2.5 細胞接着能・増殖能評価

細胞接着能及び細胞増殖能のアッセイに関しては、2.2.5 及び 2.2.6 と同様に行った。細胞増殖能評価の際には、アテロコラーゲン type I を pH=3.0 の塩酸を用いて 1 mg / ml に希釈してコーティングに用い、コントロールとした。

3.2.6 細胞遊走能評価

細胞遊走能のアッセイは 2.2.7 と同様に行った。

3.2.7 コラーゲングルモデルにおける管腔組織形成評価

コラーゲングルを用いたサンドイッチ培養、及び管腔構造の分岐数測定は 2.2.8 と同様に行った。

3.2.8 細胞生存率評価

96 well plateに融合タンパク質を添加したコラーゲングルを上下層 60 μ l ずつ作製して、HUVECのサンドイッチ培養を行った。ゲル組成は 2.2.8 と同様とし、HUVECは 3.3×10^4 cells / wellで播種した。2日間培養を行った後、培地を除去し、終濃度 0.02 %となるようコラーゲナーゼ溶液を添加して 37°Cにて 1 時間振とうすることによってコラーゲングルを分解した。その後 1 / 10 量のcell counting kit-8 (Dojindo)を添加し、さらに 37°Cで 1 時間静置した後に、450 nmの吸光度を測定した。測定値は 3 wellの平均値とし、各実験は 3 回ずつ行った。

3.2.9 RT-PCR

6 well plateに上下層 1.5 ml ずつのコラーゲングルを作製し、HUVECのサンドイッチ培養を行った。ゲル組成は 2.2.8 と同様とし、HUVECは 1.0×10^6 cells / wellの密度で播種した。

37°Cで2日間培養を行った後、3.2.8と同様に0.02%コラゲナーゼでゲルを分解させた。そして遠心によりHUVECを回収し、PBSにて2回洗浄を行った後、TRIzol® reagent (Invitrogen)を添加し、total RNAを抽出した。その後Superscript reverse transcriptase III® (Invitrogen)によりmRNAの逆転写を行い、以下に示すプライマーを用いてKOD plus® DNA polymeraseにより管腔形成マーカー遺伝子の配列を増幅した。PCR条件は、94°C 30 sec, 60°C 1 min, 72°C 1 minを20-30サイクルとした。

Tie-2 forward: 5'-ggatacgaacctgaagatgcg-3'

Tie-2 reverse: 5'-ccaaacgtgtgcagttcacaag-3'

Angiopoietin-2 (Ang-2) forward: 5'-aaagactgggaaggaatgagg-3'

Angiopoietin-2 (Ang-2) reverse: 5'-gatgttagaaatctgctggtcgg-3'

Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) forward: 5'-gtgctgaaggacacactaaagaaga-3'

Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) reverse: 5'-ttgcatccttctcaaagttgtagg-3'

GAPDH278: 5'-ccatcacctcttccaggag-3'

GAPDH853: 5'-cctgctcaccacettcttg-3'

3.3 実験結果及び考察

3.3.1 CBD 融合タンパク質の設計と発現

本章では、コラーゲンファイバー上に固定化可能な細胞外マトリクス設計案として、コラーゲン結合ドメイン (CBD) を応用することとした。コラーゲン結合性の配列は今までに多く報告されており、その長さも数十～数百アミノ酸まで多岐にわたる⁸⁰⁻⁸³。本研究では高機能性ECMを構築することを念頭においているため、ECMの一部として機能するCBDに着目し、フィブロネクチンに存在するCBD (fnCBD) を選択した。この配列は増殖因子などと融合された例が報告されており^{86,87}、その機能性に信頼がおける。フィブロネクチンの持つ様々な機能ドメインをFig. 3-1 に示す。既存の報告により、フィブロネクチンのN末端付近に存在するI6~I8 モジュールにかかった部位がコラーゲン及びゼラチンと相互作用することが確認されている⁸³。そして本研究で用いたfnCBDのアミノ酸配列をFig. 3-2 に示す。この配列は、増殖因子との融合タンパク質構築を報告している文献^{86,87}を参考としており、フィブロネクチン配列の 260 アラニンから 599 トリプトファンまで計 340 アミノ酸から構成される。コラーゲンとの結合の際には、II2~I7 モジュールにかけて存在する 14 アミノ酸が最も重要であるということが確認されており⁸³、本研究で用いたドメインのほぼ中央に位置する構成となっている。

本研究で構築したCBD融合タンパク質の設計をFig. 3-3Aに示す。参考文献⁸⁶からfnCBD及びfnCBDを融合したタンパク質は大腸菌の不溶性画分に封入されることが確認されており、第二章で融合タンパク質可溶化のために用いていたtrxタグ配列を付加しても可溶化するのは困難であると予想された。よってここでは、当研究室で作製された、trxタグ部分の配列が除かれたpET32cベクターであるpET32-NHisベクターを用いることとした。このベクターにより、組み込まれたタンパク質はN末端側にヒスチジンタグのみが付加された状態で発現する。また、ここではfnCBDと融合するパートナータンパク質によって、fnCBDが構造的な

障害などを受ける恐れがあるため、fnCBDとの融合パターンのバリエーションを検討した。EI, EI2, EI4, EREI, EREI2 の 5 種をそれぞれfnCBDのC末端側もしくはN末端側に連結したバリエーションを作製し、より高いコラーゲン結合能を示したものを採用することとした。そこにCBD配列単独のタンパク質を加え、計 11 種のバリエーションを作製した。

fnCBD融合タンパク質の発現および不溶性画分の可溶化は参考文献⁸⁶の手法に基づいて行った。得られた各融合タンパク質をSDS-PAGEに展開した結果をFig. 3-3Bに示す。作製したタンパク質は全てureaによって問題なく可溶化され、目的分子量の位置に見られることが確認できた。ここでもEI4を融合したタンパク質については、若干発現量が下がる傾向があるが、EI4単独の場合よりも多くのタンパク質を得ることができた。また各タンパク質の純度は高く、目的タンパク質以外のバンドがあまり見られないため、さらなる精製ステップは加えずに、Fig. 3-3Bに示したタンパク質を以降の実験に用いていくこととした。

3.3.2 コラーゲン結合能評価

3.3.2.1 各融合タンパク質間の特性比較

ここではまず、コラーゲン type I への結合能を各タンパク質間で比較することにより、作製したバリエーションの中で最もコラーゲン結合能の高いものの選択を行った。用いたネガティブコントロールは、fnCBD配列を持たずヒスチジンタグを持つHis-E48タンパク質である。ここでは、コラーゲンにてコーティングしたプレート上にfnCBD融合タンパク質を添加し、その後抗ヒスチジンタグ抗体によるELISA法によりコラーゲン結合能を評価した。

結果をFig. 3-4Aに示す。ネガティブコントロールに対してfnCBDタンパク質が非常に高い吸光度を示したことから、fnCBD配列のコラーゲン結合能が確認された。しかしながら、fnCBD融合タンパク質においては、融合パートナーによってその活性が大きく異なることが示された。全体的にfnCBDをN末端側に配したバリエーションはC末端側に配したものよりも結合能が低く、特にCBDEI2及びCBDEREIにおいてはHis-E48と有意な差が見ら

れない結果となった。唯一 CBDEREI2 のみ EREI2CBD とほぼ同じ活性を示した。EI2 および EREI を含む融合タンパク質は C 末端側に CBD を連結してもその活性が低いことから、この 2 種のタンパク質は構造的な理由から CBD とコラーゲンの相互作用を妨げていると考えられる。10 種のバリエーション中で活性が高かったものは、EICBD、EI4CBD、EREI2CBD、CBDEREI2 である。従って、第二章において EREI2 と EI4 の細胞接着・細胞遊走活性が高かったことを加味し、EI4CBD と EREI2CBD を今後の実験に用いるのが適当であると判断した。次項では、EI4CBD および EREI2CBD によるコラーゲン結合能の詳細を検討する。

3.3.2.2 コラーゲン結合能の詳細検討

Fig. 3-4A では過剰量の fnCBD 融合タンパク質を添加していたと考えられるので、添加するタンパク質の濃度を振って fnCBD 特異的なコラーゲン結合の確認を行った。その結果を Fig. 3-4B に示す。この結果から、EI4CBD および EREI2CBD は添加したタンパク質濃度に依存したコラーゲン結合能を示した。fnCBD を融合していないネガティブコントロールである His-EREI2 と His-EI4 においてはそのような傾向がみられないことから、fnCBD 特異的なコラーゲン結合が確認できた。しかし EREI2CBD は fnCBD と比較してコラーゲン結合能が落ちており、EREI2 を融合することによって fnCBD の機能が阻害を受けていることも示唆された。対して EI4CBD は fnCBD よりも高い吸光度を示した。この結果は、EI4 部分が凝集している可能性などを含め、EREI2CBD とのタンパク質構造の差異を示唆するものである。ELISA 法では詳細な解析が困難ではあるが、EREI2CBD と EI4CBD がコラーゲン上に固定化可能であることが、Fig. 3-4 の結果から確認できた。

次に CBD 融合タンパク質の特性評価として、コラーゲンタイプによる結合能の違いを検討した結果を Fig. 3-5 に示す。fnCBD においては、コラーゲン type I 及び III においては BSA の 7~8 倍の吸光度を示したが、type IV では 4 倍程度に下がり、ゼラチンに至っては 2 倍程度の吸光度しか見られなかった。対して fnCBD 融合タンパク質においては、コラー

ゲン type I, III, IV 全てにおいて BSA の 3~4 倍の吸光度であった。ゼラチンにおいては fnCBD との差異はなかった。この傾向は EREI2CBD と EI4CBD において共通であった。従って、融合タンパク質においては、fnCBD の持つコラーゲンタイプ別の結合特異性が失われていると考えられる。fnCBD においてコラーゲン I, III, IV を識別している機能が、他のタンパク質を融合することによって阻害されている恐れがある。よって、本研究で構築した融合タンパク質は、コラーゲンタイプ I, III, IV 全てに結合可能であるが、それらのコラーゲンタイプを他と識別することは不可能であるといえる。

以上の特性評価結果を総合すると、EREI2CBD 及び EI4CBD はコラーゲン上に固定化できることが示された。EREI2 もしくは EI4 との融合によって fnCBD の持つ特性が変化していることも確認されたが、本研究の目的である、コラーゲン type I のファイバーからなるゲルモデルへの応用を阻むものではないため、今後の実験に応用可能であると考えられる。

3.3.3 細胞接着能・細胞遊走能評価

前項においては、EREI2 及び EI4 を融合することにより、fnCBD の特性に影響が及ぼされるかどうか検討を行った。その結果、fnCBD のコラーゲン識別能に影響を与えているが、本研究で必要とするレベルのコラーゲン結合能獲得には支障がないことが確認された。よって本項では、EREI2 もしくは EI4 のもつ細胞接着能・細胞遊走能が fnCBD を付加したことにより阻害を受けることがあるのかどうか検討を行った。

3.3.3.1 CBD 融合による細胞接着能・細胞増殖能への影響

まず、2.3.2 と同様に固相表面にコーティングした融合タンパク質の細胞接着能評価を行った。結果を Fig. 3-6 に示す。Fig. 3-6A の接着細胞数を計数した結果から、EREI2CBD および EI4CBD においては、添加したタンパク質濃度依存的な接着細胞数の増加を示すことが確認された。EREI2CBD は 100 nM の濃度においてフィブロネクチン同等、EI4CBD においては 80%前後の接着能を示した。これは fnCBD を融合していないタンパク質とほぼ同

等であり、fnCBD を融合することによって細胞接着能は阻害されないことが確認できた。接着細胞の形態観察を行っても、ほぼフィブロネクチンと同等な、良好に伸展した接着細胞が観察できた (Fig. 3-6B)。加えて、ここで1あるいは10 nM という低濃度の EREI2CBD を用いた場合の接着細胞数を EREI2 と比較すると、fnCBD を融合した EREI2CBD のほうが有意に高い値を示していることが示された。EI4CBD においては、1 nM の場合に EI4 を上回っているが、そのほかの濃度ではそのような傾向は見られなかった。このことから、fnCBD を付加することで、特に GRGDS 配列の細胞接着能を増強している可能性が示唆された。

ここで fnCBD の細胞接着能についても検討した。Fig.3-6A に示した接着細胞数の計数結果は、fnCBD 単独でも細胞接着能をもつことを示している。その接着細胞数は添加したタンパク質濃度に依存して増加し、100 nM で用いるとほぼフィブロネクチン同等まで活性上昇した。しかし接着細胞の形態においては (Fig. 3-6B)、フィブロネクチンや EREI2CBD と比較して細長く伸びたような形態をとる細胞が増加しており、幅広く伸展した細胞が減少した。

よって、細胞接着能の検討を総合すると、fnCBD は単独ドメインにおいても細胞接着能をもつことが示唆された。その特性は GRGDS 配列を補佐する方向に働いているが、細胞への強固な接着・伸展においては GRGDS 配列の方が大きく貢献しているのではないかと考えられる。結果として、fnCBD を融合したタンパク質である EREI2CBD と EI4CBD においては、細胞接着能が阻害されることはなく、むしろ低濃度における効果は増強されることが確認できた。

そこで、2.3.3.2 と同様に、一定期間その細胞接着能を維持できるかどうかの検討として、細胞増殖能評価を行った。結果を Fig. 3-7 に示す。この結果から、fnCBD, EREI2CBD, EI4CBD はポジティブコントロールであるフィブロネクチン、コラーゲンとほぼ同じ細胞増殖曲線を示し、noncoat のサンプルを大きく上回っていた。この結果から、構築したタンパ

ク質は全て、fnCBD を融合しても細胞支持能力を失っていないことが示される。同時に、fnCBD の示した細胞接着能は一時的なものではなく、全長フィブロネクチンと吸光度の平均値において少し劣るものの、細胞が剥離せずに支持されていることが確認できた。

よって次項では、ここで確認された fnCBD の細胞接着能について考察を加える。

3.3.3.2 fnCBD のもつ細胞接着能への考察

本研究で用いたfnCBD(ヒトフィブロネクチンの260アラニン—599トリプトファン部位)においては、高濃度で用いればほぼ全長フィブロネクチンと同等の接着細胞数が得られることが明らかとなった。CBDを含むN末端の70 kDaからなるドメインについては、1980年代よりインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ との相互作用が報告されているが⁸⁸⁻⁹⁰、CBD内部における細胞接着部位の知見は未だ少ない。その中でもfnCBD内の275グリシン—479アラニンからなる部位については、低いながらもコラーゲン結合性と細胞接着能を示すという報告⁹¹が存在したが、その配列で示された細胞接着能は全長のフィブロネクチンの20%程度であり、フィブロネクチンの100倍以上の高濃度を用いて実現された。本研究で示されたfnCBDの細胞接着能は、明らかに上記の報告で示されたものを上回っていることから、275—479以外のfnCBD内部に細胞接着に関与する重要部位がある可能性がある。フィブロネクチン内で260—274、及び480—599に存在する機能性部位としては、Schorらの報告したIGDを含む配列が挙げられる^{92,93}。この配列は480イソロイシンから始まるIGDQ配列と572イソロイシンから始まるIGDS配列の2つであり、いずれもタイプIモジュールのループ部分に位置する⁹²。これらはインテグリン $\alpha v \beta 3$ と相互作用し、その機構はRGD配列を用いた接着機構と関連しあうものであるとされる。これらの配列に関しては未だ知見が少なく、機能の詳細が明らかではないが、本研究における細胞接着能の結果から、これらの配列が内皮細胞の接着に何らかの形で関与している可能性が高いといえる。

以上のことと、本研究で得られた結果を総合すると、本研究で用いたfnCBDには何らかの細胞接着部位が存在しており、Schorらの報告するIGDを含む配列との関連が推測される。

その機構の詳細は追っての検討が必要となるが、今後この fnCBD を EREI2 および EI4 のパートナーとして活用することへの支障はないと考えられる。

3.3.3.3 fnCBD 融合による細胞遊走能への影響

細胞接着に加えて、細胞遊走能における fnCBD の影響を評価した。結果を Fig. 3-8 に示す。この結果から、EREI2CBD と EI4CBD は、ラミニンを上回る細胞遊走能を示し、その遊走能は fnCBD を融合していない EREI2, EI4 とほぼ同等であった。fnCBD においては、細胞遊走能は低く、ネガティブコントロールである GRGDSP ペプチドとほぼ変わらない結果となった。よって、fnCBD を融合することによる構造的な障害などは受けず、IKVAV 配列による細胞走化シグナル導入が効率的に行われていることが確認できた。

以上の結果から、EREI2, EI4 において示されていた細胞接着能及び細胞遊走能は、fnCBD を融合しても阻害されないことが示された。細胞接着能においては、fnCBD によりむしろ増強できる可能性も持っているといえる。よって、以降の実験では、実際にコラーゲンゲルモデルに fnCBD 融合タンパク質を添加し、HUVEC の管腔形成能を評価していく。

3.3.4 コラーゲンゲルモデルにおける管腔組織形成評価

まず 2.3.4 と同様に、コラーゲンゲルサンドイッチ法により培養した HUVEC の形態観察を行った。結果を Fig. 3-9A に示す。HUVEC の形成した管腔構造は、EREI2CBD において最も充実しており、途切れることなく分岐の多いネットワークを構築していることが観察された。fnCBD、EREI2、EI4、IKVAV ペプチドをそれぞれ単独で添加したものについては、無添加のコントロールと比較して明確な差は判別できない。E48 と IKVAV ペプチドを混合して添加したサンプルも同様に効果が確認できなかった。よって、fnCBD を融合したことにより、明らかに管腔構造形成が促進されていることがこの観察から明らかとなった。

そこで、ここで得られた管腔構造の分岐数を計数した結果を Fig. 3-9B に示す。この結果

からも、上記の観察結果を裏付けるように、EREI2CBD において最も高い分岐数であることが示された。EI4CBD においては、分岐数において EI4 からの差異が見られないという結果となった。そして fnCBD においてもコントロールよりやや多い分岐数であることが示され、IKVAV ペプチドを添加した場合とほぼ同じであった。Boyden chamber assay (Fig. 3-8) により、fnCBD は HUVEC における細胞遊走能が低いことが示されているため、細胞表面との相互作用を通じて細胞接着を安定化した影響かと考えられる。

これら Fig. 3-9 から得られた結果を補足するため、同様の培養を行った HUVEC の生存率評価を行った。結果を Fig. 3-10 に示す。この結果より、EREI2CBD、EI4CBD の生細胞数がコントロールと比較して多くなることから、管腔構造ネットワークの充実が裏付けられた。ここでも fnCBD を添加したサンプルにおいて生細胞数の増加が見られたが、EREI2CBD・EI4CBD よりも平均値においてやや劣る結果となった。

以上の結果から、構築した融合タンパク質 EREI2CBD により、管腔構造形成を促進できることが示された。fnCBD を融合したことによりこの促進能が飛躍的に向上されたことから、コラーゲンファイバー上に固定化することによって細胞と血管新生促進ドメインとのアクセス効率が上がり、効率的なシグナル導入が可能になったことが分かる。しかしながら、EI4CBD においては、EREI2CBD に見られたような固定化効果が見られず、EI4 と同等であった。この結果から、EI4CBD はコラーゲン上への効果的な固定化がなされていないことが示唆される。コラーゲン結合能を評価した ELISA assay (Fig. 3-4B) においては、EI4CBD は CBD を上回る高い吸光度を示していたが、この吸光度シグナルは EI4CBD の凝集などによって得られたものであり、実際に有効に提示されたタンパク質量は少量であったのではないかと考えられる。また、fnCBD においても細胞ネットワークの充実が示されたが、EREI2CBD においては fnCBD を大きく上回る評価となることが確認された。次項では、管腔形成マーカーの発現量から考察を行い、総合的な管腔構造の評価を行う。

3.3.5 コラーゲンモデルにおける管腔形成マーカー発現量比較

血管新生の過程に関与する因子については多くの研究がなされており、内皮細胞の遊走や新生血管の分岐などに重要な役割を果たすものが報告されている。生体外の管腔形成モデルにおいても、それらの血管新生マーカーの発現量が2次元培養レベルと異なることなどが報告されている^{94,95}。残念ながら、管腔構造をとる場合のみに発現される遺伝子は未だ同定されていない現状であるが、本研究では、管腔形成のマーカーとして*in vivo*及び*in vitro*の双方で確認されている因子である、Matrix Metalloprotease-2(MMP-2)、Angiopoietin-2(Ang-2)、Tie-2の3種に着目した。

MMP-2は細胞外マトリクスを分解するプロテアーゼ成分であり、血管新生シグナルの刺激に応じて血管内皮細胞により大量に発現・活性化される⁹⁶。血管内皮細胞が遊走するためには、MMP-2による基底膜成分の消化が不可欠であり、癌組織における転移・浸潤にも関与する因子として知られている。

Tie-2は血管内皮細胞膜上に存在する受容体型のチロシンキナーゼである。Tie-2は血管内皮細胞と壁細胞の接着と解離、内皮細胞の遊走に関与することが知られている⁹⁷。Tie-2のリガンドにはAng-1およびAng-2が同定されており、Ang-1は壁細胞から分泌されてTie-2のリン酸化により活性化させるが、内皮細胞から分泌されるAng-2は活性化を導かないアンタゴニストとして働く。現在では、血管枝の安定期にはAng-1が優勢であって壁細胞—血管内皮細胞間の結合を促し、分岐血管の新生時にはAng-2が優勢となって細胞間の結合が弱くなり、内皮細胞が壁から解離・遊走するようになるというモデルが考えられている⁹⁷。よって、Tie-2及びAng-2の発現量を評価することにより、管腔構造をとるマーカーとしてのみにとどまらず、管腔の分岐形成の指標としても論じることができると考えられる。

RT-PCRにより上記の各マーカーのmRNA発現量を評価した結果をFig. 3-11に示す。タンパク質無添加のコントロールと比較して、fnCBD, EREI2CBD, EI4CBDを添加して培養した細胞ではTie-2・Ang-2・MMP-2のmRNA発現量が向上していることが示された。よ

って、コントロールよりも充実した管腔構造をとっていることが示され、Fig. 3-9による観察結果が裏付けられた。

加えて、サンプル間の違いを考察する。MMP-2の発現量においては、各サンプルとも大量に発現されており、差異は確認できなかった。しかしながら、Tie-2及びAng-2の発現量に関しては、EREI2CBDにおいて、fnCBDとEI4CBDを上回る発現量が示された。fnCBD－EI4CBD間には差異はなかった。この結果は、Fig.3-9Bにおいて、管腔構造の分岐数が $EREI2CBD > EI4CBD = fnCBD$ であったことと一致する。よって、このことから、EREI2CBDにおいて、管腔構造の分岐・ひいてはネットワーク構造の充実が導かれていることが示唆された。

3.4 結言

本章においては、フィブロネクチン由来のコラーゲン結合性配列 (fnCBD) を含有する融合タンパク質を作製し、コラーゲングルモデルに添加した際の管腔形成促進能を評価した。そこで構築した融合タンパク質 EREI2CBD はコラーゲン結合性を獲得し、細胞接着能・細胞遊走能も阻害されることなく維持していた。そしてコラーゲングルモデルに添加した際には、管腔構造形成が促進されることが確認された。この結果は第 2 章で構築した EREI2 タンパク質の結果を上回っており、本章におけるコラーゲン結合型融合タンパク質による固定化戦略が有効であったことが示された。

また、fnCBD 配列においても管腔分岐数・管腔形成マーカー発現量においてコントロールより有意な差が見られた。この効果は細胞と fnCBD がわずかながら相互作用すること起因すると考えられるが、fnCBD 上に接着した細胞の伸展度は低く、GRGDS 配列を用いた細胞接着の方が良好に細胞を支持できていることが示された。加えて管腔形成評価において EREI2CBD は fnCBD を大きく凌駕しており、IKVAV 配列による細胞遊走シグナルの導入が管腔形成に重要であることが示唆された。

EI4CBD においては、CBD の融合による管腔形成能の変化が見られなかった。EI4CBD は細胞接着能・細胞遊走能においては高い評価が得られていたため、効率的なコラーゲンファイバー上への固定化がなされていないことが原因と考えられる。今後は融合タンパク質の設計の改変などによって最適な融合タンパク質を検討する必要があると考えられる。

以上本章の結果を総合すると、本研究で構築した血管新生促進マトリクス EREI2CBD は、組み込まれた機能性配列の機能を損なうことなく発揮することにより、高機能性を実現した新規細胞外マトリクスと考えることができる。今後は、*in vivo* における血管新生能および増殖因子との融合案もあわせて検討し、血管新生を調節するマテリアルとしての発展を期待する。

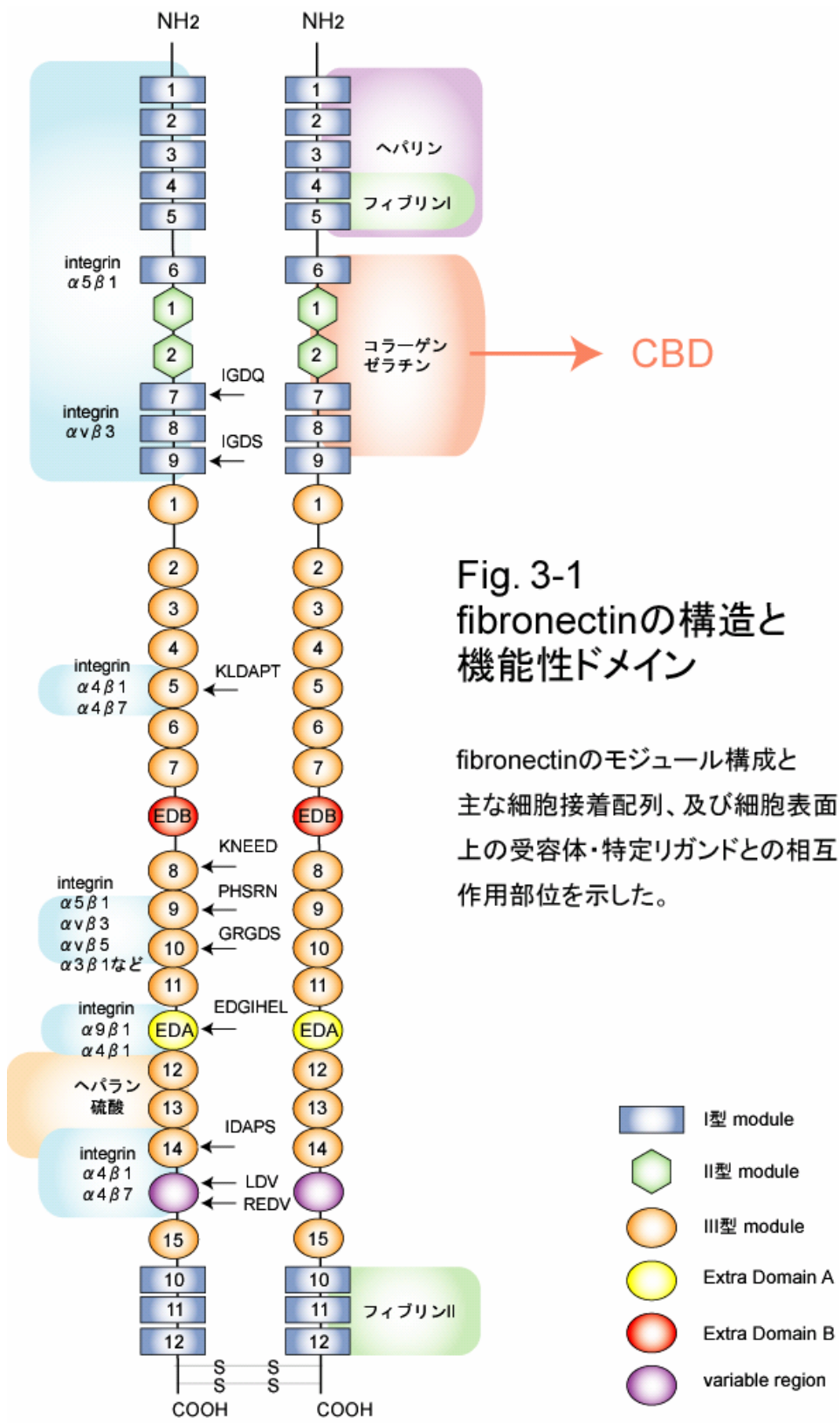


Fig. 3-1
fibronectinの構造と
機能性ドメイン

fibronectinのモジュール構成と
主な細胞接着配列、及び細胞表面
上の受容体・特定リガンドとの相互
作用部位を示した。

		fibronectinにおける モジュール名
1	AAVYQPQPHPQPPPYGHCVT	
21	DSGVVYSVGMQWLKTQGKQ	module I-6
41	MLCTCLGNGVSCQETAVTQT	
61	YGGNSNGEPCVLPFTYNGRT	module II-1
81	FYSCTTEGRQDGHLWCSTTS	
101	NYEQDQKYSFCTDHTVLVQT	
121	RGGNSNGALCHFPFLYNNHN	module II-2
141	YTDCTSEGRRDNMKWCGTTQ	
161	<u>NYDADQKFGFCPMAAHEEIC</u>	
181	<u>TTNEGVMYRIGDQWDKQHDM</u>	module I-7
201	GHMMRCTCVGNRGEWTCIA	
221	YSQLRDQCIVDDITYNVNDT	
241	FHKRHEEGHMLNCTCFGQGR	module I-8
261	GRWKCDPVDQCQDSETGTFY	
281	QIGDSWEKYVHGVRYQCYCY	module I-9
301	GRGIGEWHCQPLQTYPSSSG	
321	PVEVFITETPSQPNSHPIQW	340

Fig. 3-2 本研究で用いたCBD配列

全てアミノ酸1文字表記。260アラニンより599トリプトファンまでの340アミノ酸から構成される。下線部はコラーゲン結合における最重要部位とされている配列。

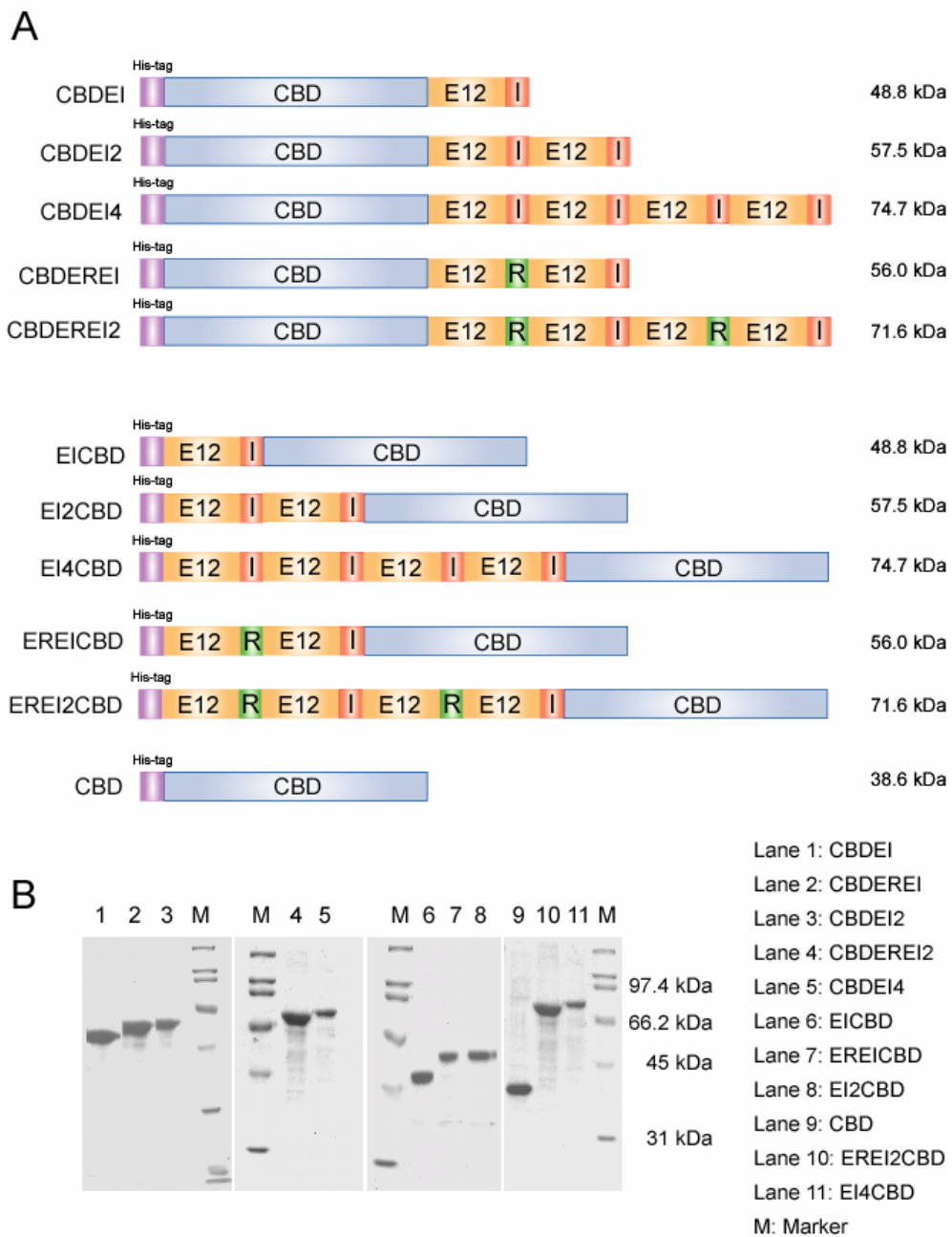


Fig. 3-3 コラーゲン結合型マトリクス設計と発現

A : コラーゲン結合ドメイン融合タンパク質の設計

B : 設計した融合タンパク質の発現

封入体画分をureaで可溶化後、透析にてureaを除いてSDS-PAGEに展開した。

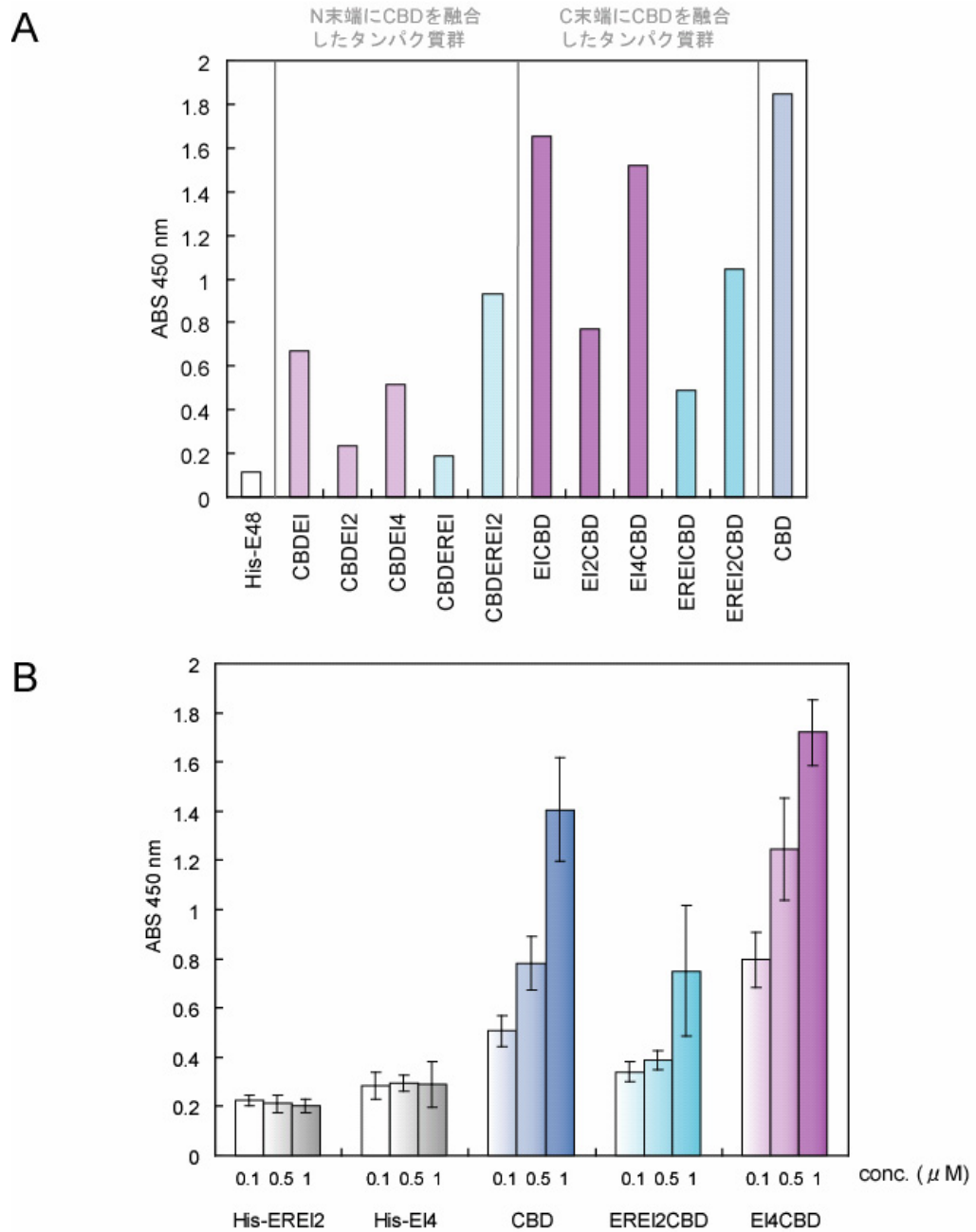


Fig. 3-4 構築したマトリクスのコラーゲン結合能

A : 抗His tag抗体を用いたELISA法によりコラーゲンtype Iへの結合能を評価した。融合タンパク質は2 μ Mを添加した。(n=2)

B : EREI2CBDとEI4CBDの濃度依存的コラーゲンtype I結合をELISA法にて評価した。(n=4)

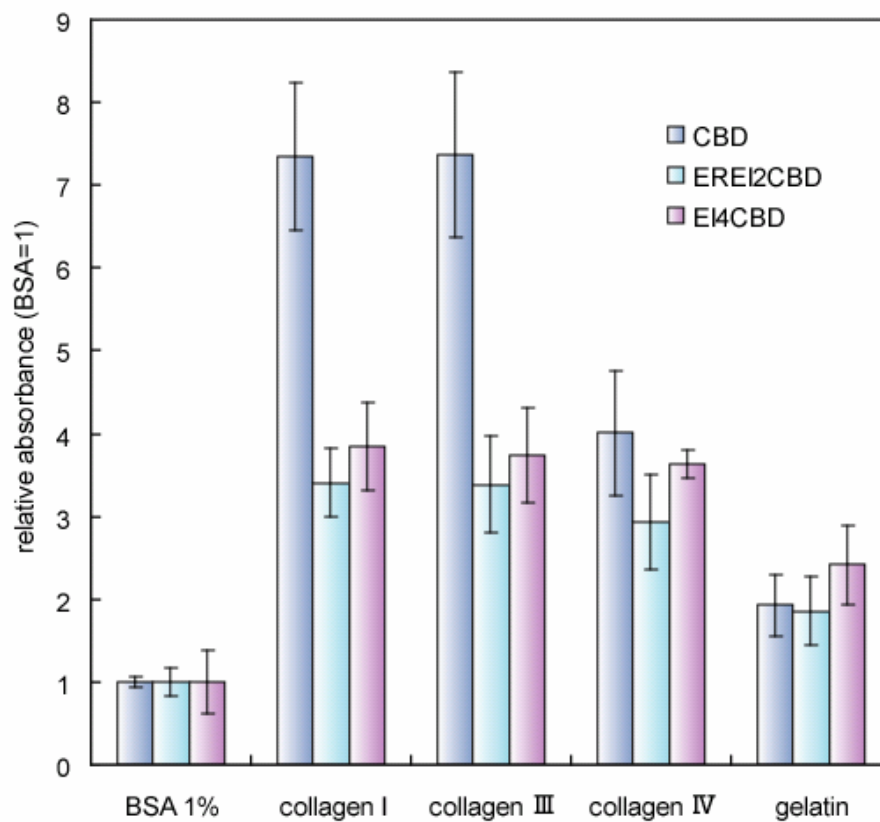


Fig. 3-5 EREI2CBDとEI4CBDの
コラーゲン特異的結合能

各種コラーゲンとCBD融合タンパク質の結合をELISA法にて評価した。
CBD融合タンパク質は100 nM添加した。
縦軸は各融合タンパク質のBSA 1%における吸光度を1とした際の
吸光度の割合を示す。(n = 4)

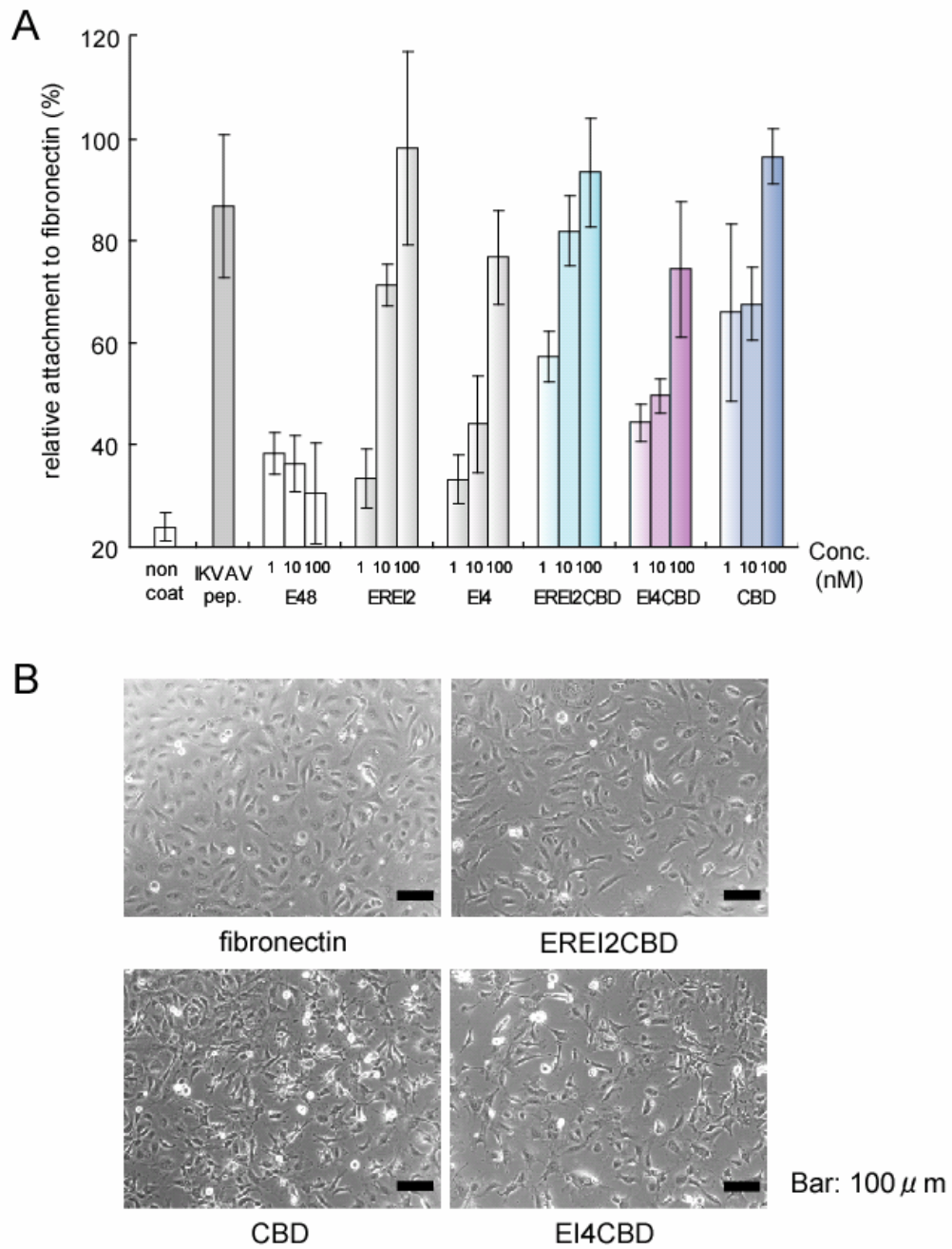


Fig. 3-6 コラーゲン結合型マトリクスの細胞接着能

A : 各融合タンパク質への接着細胞数 (接着細胞数 × 100 / FNの接着細胞数)

B : 接着細胞の形態観察 100 nMの各融合タンパク質をコーティングした表面上へ接着した細胞の形態を観察した。fibronectin: 10 μg/ml

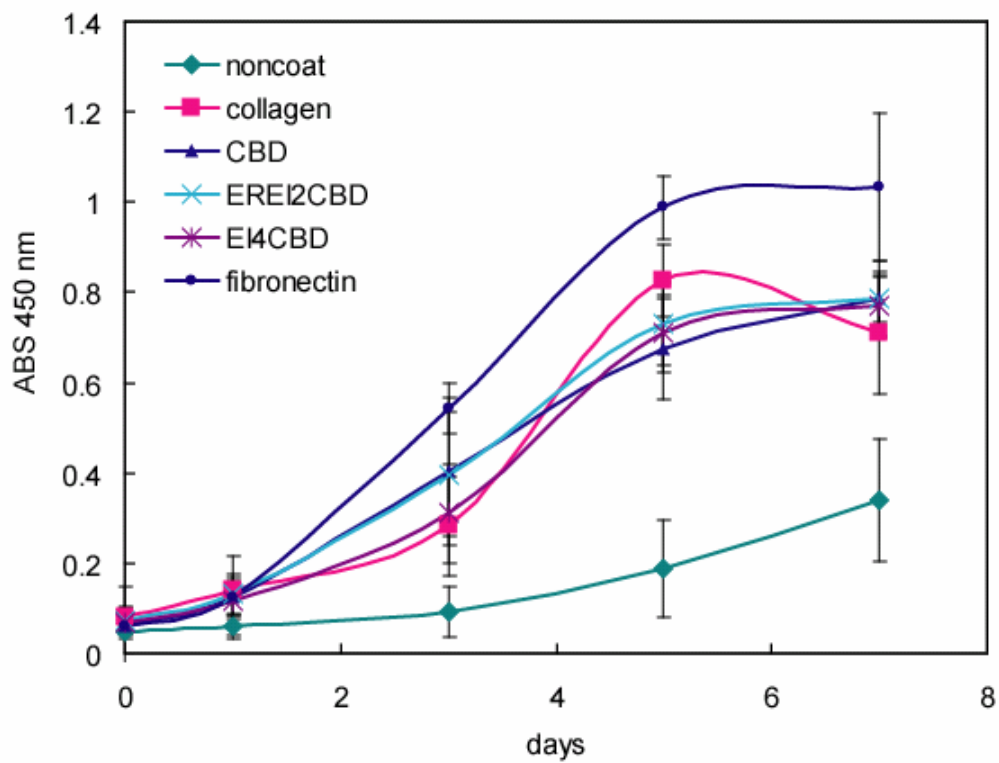


Fig. 3-7 コラーゲン結合型マトリクスの細胞増殖能

100 nMの融合タンパク質をコーティングした表面にHUVECを播種し、時間経過毎にMTS assayにより生細胞数変化の評価を行った。

fibronectin: 10 μ g/ml collagen : 1 mg/ml

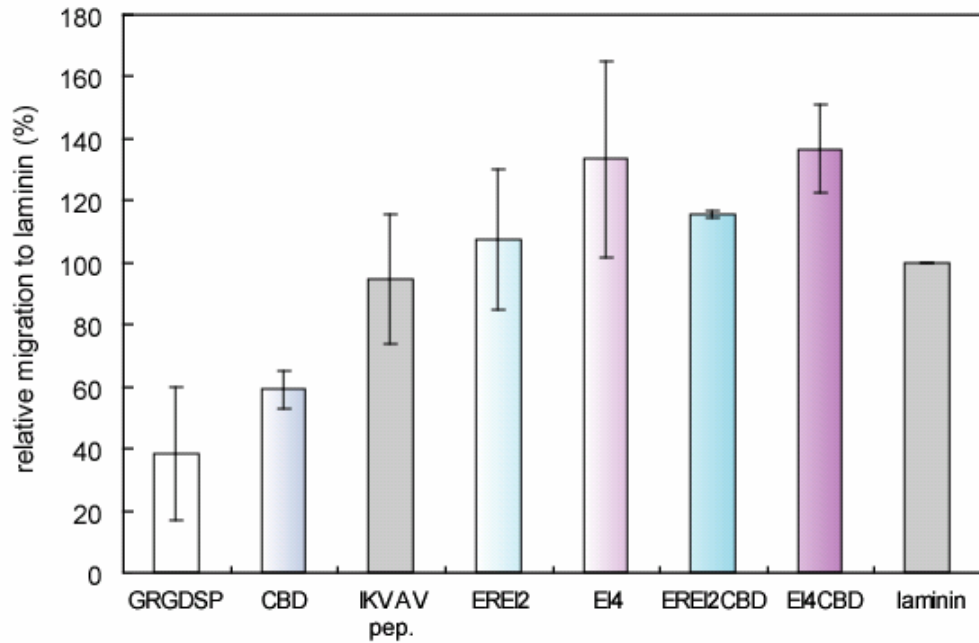
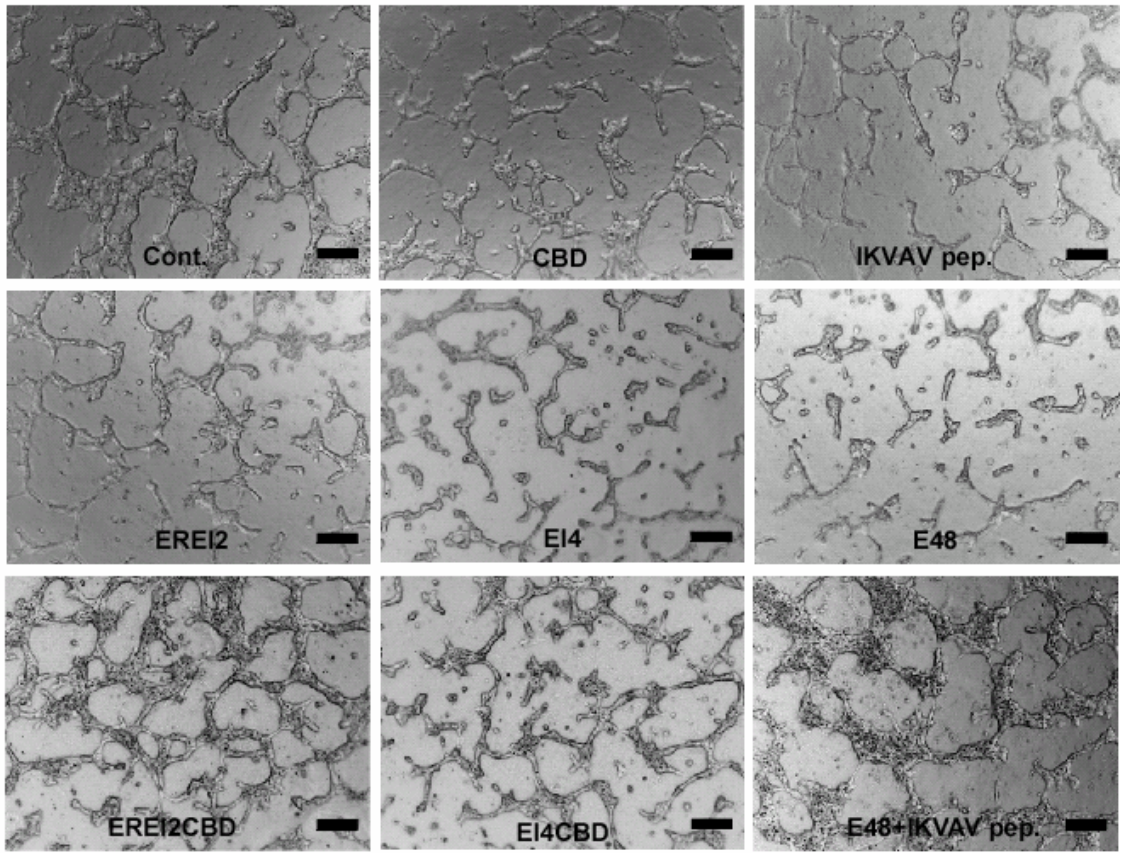


Fig. 3-8 コラーゲン結合型マトリクスの細胞遊走能

縦軸はラミニンをコーティングしたフィルターに播種した際の遊走細胞数に対する割合を表す。

A



Bar: 200 μ m

B

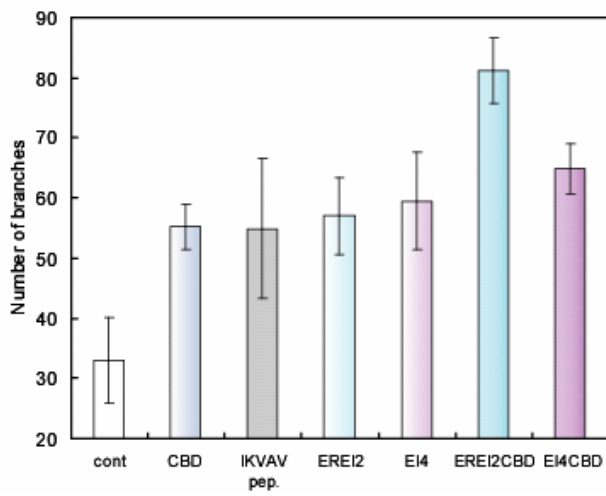


Fig. 3-9
 コラーゲンゲルモデル
 における管腔形成評価

A : 管腔形成の形態観察

B : 得られた管腔構造の分岐数

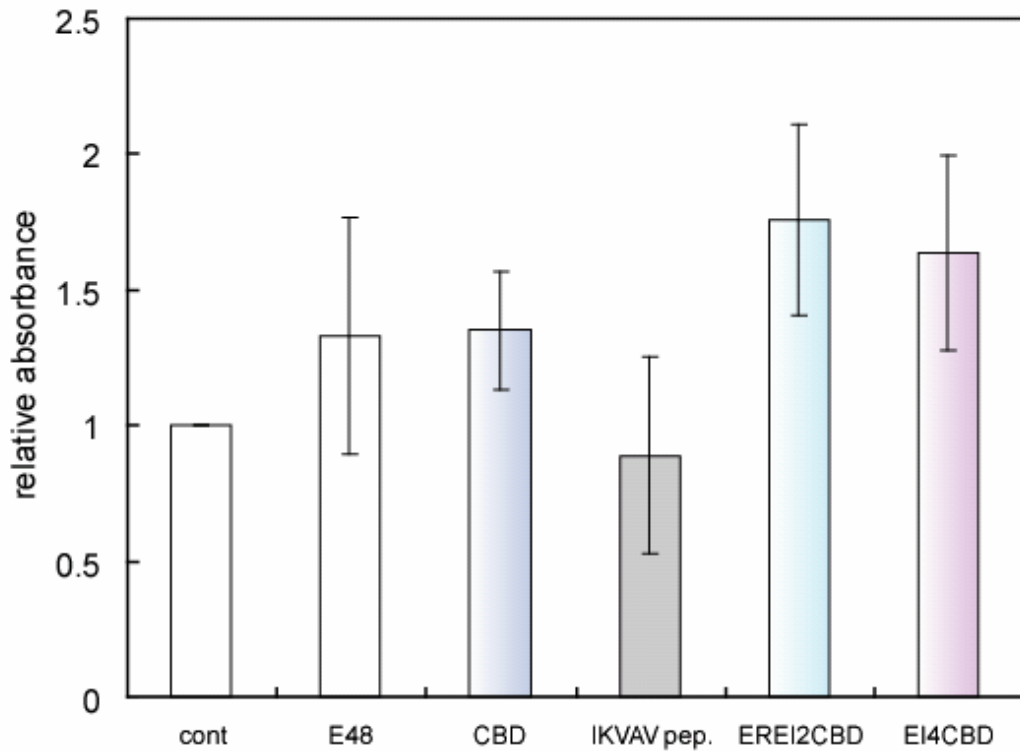


Fig. 3-10 コラーゲンゲルモデルにおけるHUVECの生存率評価

各融合タンパク質を添加したコラーゲンゲルにて2日間培養したHUVECにおいてMTS assayを行い、生細胞数の評価とした。縦軸はcont (タンパク質無添加) の吸光度に対する割合を表す。

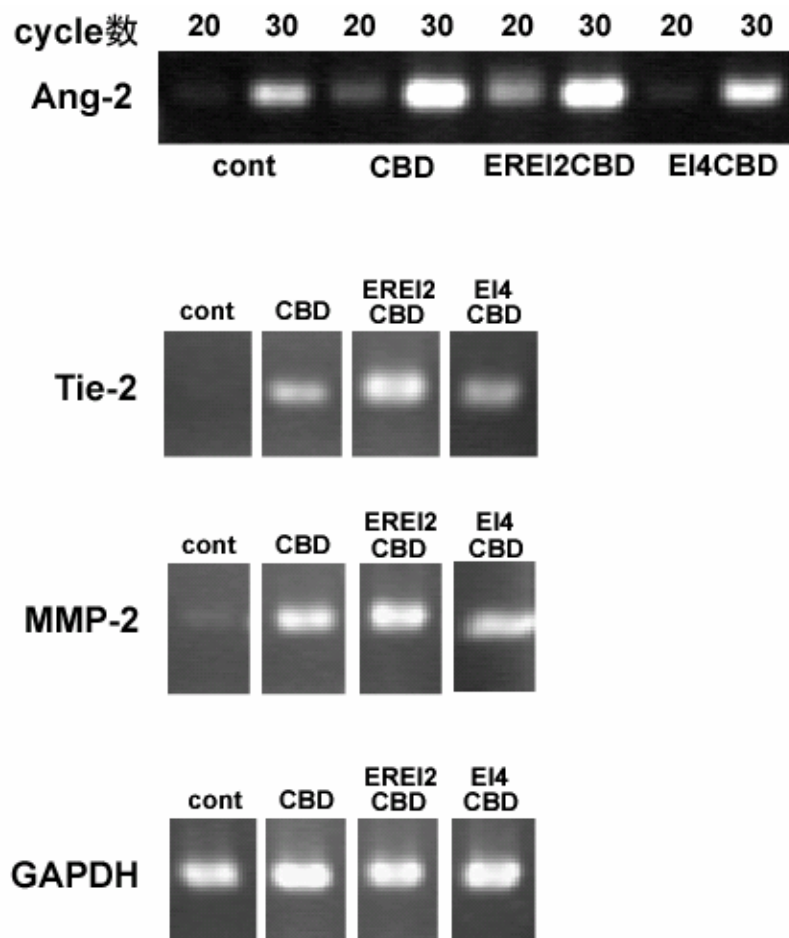


Fig. 3-11 血管新生マーカー遺伝子の発現量比較

各融合タンパク質100 pmolを添加したコラーゲンゲルにて2日間培養したHUVECよりRNAを抽出し、RT-PCR法によりマーカー遺伝子のmRNA量を評価した。Ang-2: Angiopoietin-2 MMP-2: Matrix Metalloproteinase-2

第四章

血管新生抑制配列を融合した 細胞外マトリクス設計と特性評価

4.1 緒言

第3章においては、ラミニン由来の血管新生促進配列とコラーゲン結合性配列を融合したマトリクスタンパク質を作製し、コラーゲングルに固定化することにより大幅に血管新生能が向上したコラーゲングルモデルを構築することを可能とした。しかし生体内でラミニンの果たしている役割は血管新生促進のみにとどまらず、血管新生を抑制することによりネットワーク構築の調節を行っている。本研究の目標である、生体環境により近づいた人工生体組織の構築のためには、こうした血管新生抑制と促進の調節機能を再現することも重要であると考えられる。

そこで本章では、血管新生促進マトリクスと対を成して血管新生の抑制機能を担うマトリクスタンパク質を構築した。ここで構築するマトリクスの機能の根幹を担うのは、ラミニン由来の血管新生抑制ドメインとして知られる YIGSR 配列である。第2章で得られた知見を生かし、エラスチン由来の繰り返し配列にこの YIGSR 配列を連結した基本単位で構成される繰り返し配列を作製することによって、血管新生抑制マトリクスタンパク質を構築した。そして作製されたマトリクスタンパク質の細胞接着能・細胞遊走能の評価を行い、コラーゲングルモデルに添加することによって管腔形成の阻害能を検討した。

ーリングした後に挿入することにより、G18とYIGSR配列が連結されたプラスミドpBS-GYおよびG18とRGDN配列が連結されたpBS-GRを得た。このpBS-GYとpBS-GRを*Bam*HIと*Eco*RIによって切断して得たGY断片とGR断片を、*Bgl*IIと*Eco*RIで切断したpBS-GYもしくはpBS-GRにクローニングすることにより、pBS-GY2、pBS-GRGY、pBS-GR2を作製した。同様の操作によりpBS-GY4とpBS-GRGY2、pBS-GR4も作製を行った。以上作製されたベクターを*Bam*HIと*Eco*RIで切断したGY4、GRGY2、GR4断片をプラスミドpET32cに組み込むことにより、タンパク質発現用プラスミドを作製した。

4.2.3 融合タンパク質の発現・精製

GY4、GRGY2、GR4タンパク質の発現・精製は全て2.2.3と同様に行った。コントロールタンパク質であるG72は、当研究室の先行研究⁹⁹によって得られたタンパク質を使用した。

4.2.4 細胞接着能・細胞増殖能評価

細胞接着能評価及び細胞増殖能評価については、全て2.2.5及び2.2.6と同様に行った。YIGSR合成ペプチドにおいては、6, 100, 300 μ g/ml (10, 170, 500 μ M)の濃度で固相表面のコーティングに用いた。細胞増殖能の測定の際には、300 μ g/mlでコーティングを行った。

4.2.5 細胞遊走阻害評価

細胞遊走能の評価としては、2.2.7と同様にBoyden chamber法により行った。pH=3.0のHCl溶液で希釈したコラーゲン type I 1 mg/mlにてコーティングしたメンブレンフィルターをHuMedia EG-2 2 mlを入れた6 well plate上にセットした。そのフィルター上にRPMI 1640培地(0.1% BSA含有、無血清) 1 mlに懸濁したHUVECを 1.3×10^5 cells/wellの密度で播種した。その際に細胞懸濁液中に200 pmolの融合タンパク質または530 nmolのYIGSR

ペプチドを添加した。37 °Cにて 4 時間インキュベートした後、フィルター下部に遊走した細胞の固定とGiemsa染色を行った。PBSで洗浄した後に、各フィルターを撮影し、4 視野分の接着細胞数の平均を算出した。実験は各 5 回ずつ行った。その他は特に記述しない限り 2.2.7 と同様に行った。

4.2.6 コラーゲンゲルモデルにおける管腔組織形成評価

コラーゲンゲルサンドイッチ培養及び管腔分岐数の測定は 2.2.8 と同様に行った。YIGSR 合成ペプチドにおいては、終濃度が 400 μ g/ml となるよう 330 nmol をコラーゲンゲルに添加した。

4.2.7 細胞生存率評価

コラーゲンゲルで培養を行った後の細胞生存率評価は、3.2.8 と同様に行った。YIGSR ペプチドは 4.2.6 で用いた濃度と同様になるよう調製して添加した。

4.3 実験結果及び考察

4.3.1 GRGY2, GY4 の設計と発現・精製

ラミニンの β 1鎖に存在するDPGYIGSR配列は、細胞に接着し血管新生を抑制することから、腫瘍の転移抑制・抗癌作用などが報告されている機能性配列である^{51,52,53}。血管新生促進を担うIKVAV配列とともに早期に同定され、以来合成ペプチドにより応用研究が進められてきた。それらの研究から、DPGYIGSR配列を3回繰り返した(DPGYIGSR)₃⁹⁸、分岐状にYIGSRを提示したcyclic YIGSR^{100,101}など、ポリマー化した配列を合成することによってこの配列の持つ細胞接着能及び血管新生抑制能が明らかとなっている。よって本研究においても、繰り返し単位配列の中にYIGSR配列を組み込むことにより、上記の報告と似た相乗効果が得られることが期待される。そこで本研究で構築する血管新生抑制マトリクス設計案には、機能向上の知見が得られた配列である(DPGYIGSR)₃を骨格中に組み込み、さらにその基本単位を繰り返すことによって高機能化を目指す。今後(DPGYIGSR)₃をYIGSR配列と表記する。加えて第3章から得られた知見を踏まえると、細胞表面レセプターの違う複数の接着性配列の導入によって、マトリクス足場の安定化が図れる可能性もある。ここでは、ラミニン α 1鎖より同定された14残基からなるRGDN配列に着目した。この配列はインテグリンと相互作用し、その細胞接着能を通じてMatrigelに添加された際の管腔形成阻害能などが報告されている⁷⁷。よって、本研究では、GRGDS配列ではなくRGDN配列をYIGSR配列のペアとして用いることを試みた。

そして、それらの配列を組み込むマトリクス骨格の選択も重要となる。第3章で用いたAPGVGV配列は、細胞遊走能促進の知見⁷⁶があり、本研究においてもIKVAV配列の細胞遊走機能を相乗していることが示唆されていた(Fig. 2-3B)。血管新生抑制のマトリクスを設計する際には、細胞遊走を阻害する方向に働く必要があるため、APGVGVをベースとしたマトリクスは避けなければならない。よってここでは、同じくエラスチン由来のGVGVVP繰り返し

し配列を採用した。GVGVVP配列は、APGVGVと1残基しか異ならないが、特性上は違う側面を持っている配列である。例えばGVGVVPの繰り返しからなる配列は温度の上昇-降下に合わせて凝集-解離を可逆的に行うが、APGVGVにおいてはその反応は不可逆である¹⁰²。だが構造上はどちらの配列も安定なスパイラル構造をとるとされている。当研究室では、GVGVVPを36回繰り返し返したもの (GVGVVP)₃₆¹⁰³もしくは72回繰り返し返したもの (GVGVVP)₇₂⁹⁹を作製し、基本特性を確認している。そこで本研究では、第2章で用いたE12配列と近い分子量となる (GVGVVP)₁₈ (G18) を基本単位とし、そこにRGDN配列もしくはYIGSR配列を連結した基本単位G18-RGDN(GR)またはG18-YIGSR(GY)を作製した。そしてさらにそれらの繰り返し単位を作製することでGR4、GY4、GRGY2を作製した。設計の概念図をFig. 4-1Aに示す。ここで繰り返し単位を4としたのは第2章でEREI2及びEI4において高い細胞接着・遊走活性が得られていたことによる。以降の実験において上記の3種の融合タンパク質の特性評価を行い、G18配列及びRGDN配列とYIGSR配列の組み合わせの設計が適しているのか評価を行うこととする。

設計した3種の融合タンパク質は、第2章と同様にタグを付加した状態で大量発現させ、精製時にタグ配列を切断することで得た。得られたタンパク質をSDS-PAGEに展開した結果をFig. 4-1Bに示す。これらのタンパク質は全て大量に発現され、高い精製度で得ることができた。各レーンにおいて40 kDa付近に見られるバンドは大腸菌由来の非特異吸着タンパク質であると見られるが、本研究における使用には問題ないと判断した。E12関連のタンパク質と異なり、マーカータンパク質と移動度が異なるということもなく、目的分子量の位置にバンドが見られたことから、目的の融合タンパク質が精製されていることが確認できた。GR4のみ発現量が他より低かったため、得られたタンパク質が比較的少量となったが、今後の実験には支障がないと思われる。

以降には、Fig.4-1 で得られたタンパク質を用いて行った特性評価の結果を論じる。G72タンパク質については、当研究室の先行研究⁹⁹において得られたものを用いた。

4.3.2 細胞接着能・細胞増殖能評価

まず、固相表面にコーティングしたタンパク質の細胞接着能の検討を行った。結果を Fig. 4-2 に示す。接着細胞数を計数した Fig. 4-2A の結果から、GR4、GRGY2、GY4 は、それぞれ添加したタンパク質濃度に依存した接着細胞数の増加をみせることが確認された。G72 においてはそのような傾向がないことから、挿入された細胞接着性配列が、その機能を維持していることが確認された。各タンパク質 100 nM における細胞の接着性は GY4 においてはやや低く、フィブロネクチンのおよそ 80% 程度であったが、GR4 及び GRGY2 においては、ほぼフィブロネクチン同等の高い細胞接着能が示された。よって、G18 をベースとした繰り返し単位のプレート上への集積及び機能ペプチドの提示には問題ないことが確認できた。一方、YIGSR 合成ペプチドの細胞接着能は低く、GY4 の 5000 倍もの高濃度を用いなければ同程度の細胞接着能を獲得できないことが示された。このことから、G18 を足場として用いることで、合成ペプチドを用いるよりも効率よく細胞が接着できるマトリクスを構築できたことが示唆された。

また、Fig. 4-2B に示すように、接着細胞の形態を観察すると、GR4・GRGY2・GY4 はいずれもフィブロネクチン同等の良好に伸展した細胞の様子が観察できた。G72 にも接着細胞が散見されるが、その数は GR4 らが凌駕している。そして、YIGSR ペプチドにおいては、接着はしていても丸い形状をとっている細胞が多く、融合タンパク質のほうが細胞にとって良好な足場を提供していることが覗える結果となった。

加えて、細胞表面とペプチドのアクセス効率を比較するため、細胞懸濁液に融合タンパク質もしくは YIGSR ペプチドを添加して、ラミニン上への細胞接着阻害効果を検討した。結果を Fig. 4-3A に示す。添加量 50 pmol における阻害率を比較すると、YIGSR ペプチドよりも融合タンパク質のほうが上回っており、特に GY4 においてはペプチド単独の場合の 2 倍近い阻害効果を示していた。コラーゲン上へ細胞を播種した場合にはこのような阻害効果はおこらなかった (Fig. 4-3B) ことから、融合タンパク質が挿入されたラミニン由来配列を

通して細胞と効率的にアクセスできていることが明らかとなった。また、この結果から、Fig. 4-2Aにおいて5000倍もの高濃度のペプチドを添加しなければ細胞接着が見られなかったのは、プレート上へのYIGSR合成ペプチドの集積効率が極端に低いためであったことが考察できる。

これらの結果から、G18に機能性配列を組み込んだ繰り返し単位の作製により、効率よく固相表面に集積し且つペプチドを安定化して細胞表面とのアクセス効率を上げたマトリクスを構築できたことが示された。固相表面へコーティングした場合の細胞接着能においてはRGDN配列を付加した融合タンパク質のほうがやや高いことから、固定化足場への細胞接着においてはGR4あるいはGRGY2が優れている可能性がある。

また、長時間における細胞支持力を検討するため、細胞増殖能の検討も行った。結果をFig. 4-4に示す。この結果から、構築したGR4・GRGY2・GY4タンパク質は、一週間にわたりフィブロネクチン同等に良好な細胞増殖曲線を描くことが確認できた。よって、構築した融合タンパク質が細胞外マトリクスとして有用であることが示された。そして、G72タンパク質についても細胞増殖能が確認された。Fig. 4-2において細胞接着を検討した際には、フィブロネクチンの30%程度の弱い接着細胞数が確認されており、増殖能においても5日目までは他の融合タンパク質に大きく遅れる増殖速度ではあるが、7日目にはほぼフィブロネクチンと同等の飽和状態まで増加することが示された。よって、細胞接着配列を含むGR4などには大きく機能的に劣るが、接着できた細胞においてはG72を足場として正常に増殖していくことができることが示された。これはAPGVGV繰り返し配列E48には示されていない性質である (Fig. 2-5)。エラスチン由来のGVGVVP配列における細胞増殖活性は既存の知見⁷⁴⁾においても示されている。コラーゲンゲルモデルに用いた際にこの増殖活性がなんらかの影響を及ぼすのか、以降4.3.4の実験において検討する。

4.3.3 細胞遊走阻害効果

構築したマトリクスタンパク質のコラーゲンゲルモデルにおける管腔形成阻害能を評価するためには、コラーゲン上に接着した細胞の遊走阻害効果を検討することが重要となる。よって本研究においても、コラーゲンをコーティングしたメンブレンフィルター上に播種する細胞懸濁液中に融合タンパク質を添加し、遊走細胞数の比較を行った。結果を Fig. 4-5 に示す。GR4 及び GRGY2 は、ほぼタンパク質無添加のコントロールと変化がないが、GY4 及び YIGSR ペプチドを添加した場合は遊走細胞数の有意な減少が見られた。コラーゲン上への細胞接着を妨げないことはすでに Fig. 4-3B において確認されているため、細胞数の減少は細胞遊走の阻害効果と結論できる。よって、GY4 は挿入された YIGSR ペプチドによる細胞遊走阻害効果を持つことが示された。そして RGDN 配列は細胞遊走の阻害効果を持たないことが示唆された。GY4 と YIGSR ペプチドの阻害効果比較においては、ほぼ同等であった。しかし YIGSR 合成ペプチドは GY4 の 2000 倍量以上添加しないとこの効果が得られないことから、ペプチドの作用効率は GY4 が上回っているといえる。よって、G18 による安定化及び繰り返し単位作製による相乗効果が得られていることが確認できた。

4.3.4 コラーゲンゲルモデルにおける管腔組織形成評価

これまでの実験において、構築した融合タンパク質が挿入した機能性ペプチドの特性を保持していることが確認された。よって、実際にそこで確認された特性がコラーゲンゲルモデルにおいて発揮されるかどうか検討を行った。コラーゲン溶液に融合タンパク質または YIGSR ペプチドを添加してゲル化したモデルを用いて HUVEC を 3 次元培養し、管腔形成への影響を評価することとした。結果を Fig. 4-6 に示す。Fig. 4-6A は、HUVEC のとった管腔構造を観察したものである。タンパク質無添加のコントロールと比較して、YIGSR ペプチドを添加したものにおいては、管腔構造が短くなり、分岐も少なくなってネットワークが途切れ途切れになっている。同様の現象が、GY4 を添加したサンプルからも見受けられる。

GRGY2、及び GR4 を添加したサンプルでも管腔が途切れた部分は存在するが、コントロールと明確に異なるとはいえない。そして G72 を添加したものにおいては、管腔化している部分もあるが、むしろ細胞が増殖して一箇所に凝集している部分が多い結果となった。

ここで得られた構造の分岐数を比較した結果を Fig. 4-6B に示す。ここでも GY4 と YIGSR ペプチドを添加したサンプルにおいて分岐数の有意な減少が見られた。GR4 および GRGY2 はコントロールとほぼ変わらない分岐数を示した。これらの結果は、Fig. 4-6A の観察結果を裏付けている。そして G72 を添加したものは、コントロールを上回る分岐数を示した。G72 で得られた分岐数は第 3 章において fnCBD 配列を添加して得られたものと同様であり (Fig. 3-9B)、Fig. 4-4 で見られた G72 の微弱な細胞接着能及び細胞増殖能が、細胞の管腔形成能に影響している可能性が示唆された。

加えて、同様の培養を行った細胞の生存率を評価した結果を Fig. 4-7 に示す。この結果からも、YIGSR ペプチドを含む融合タンパク質において生細胞数が下がる傾向がある。この生細胞数減少は、YIGSR 配列によって管腔形成が阻害されたために、ネットワーク形成に参加できなくなった細胞が死亡していったことが原因であると考えられる。YIGSR 合成ペプチドを添加したものにおいては、平均値はコントロールと比較して低下するものの、標準偏差が大きく有意差はとれなかった。G72 および GR4 はほぼコントロールレベルであった。

以上の結果を総合し、構築した融合タンパク質による管腔形成阻害について考察する。YIGSR 配列を挿入した融合タンパク質である GY4 は、YIGSR ペプチドよりも低濃度を用いて YIGSR ペプチド同等の管腔形成阻害効果を発揮することが確認された。このことから、G18 配列が YIGSR ペプチドを効率よく提示していること、加えて繰り返し配列を作るポリマー化戦略により相乗効果が得られていることが示されたといえる。よって、本研究におけるマトリクスタンパク質の構築戦略が有効であることが確認できた。しかしながら、既存の合成ペプチドを上回るには、複数の機能性配列を用いた更なる機能向上が必要である。ここ

で構築した GRGY2 タンパク質においては、管腔形成阻害能がむしろ低下しており、RGDN 配列との組み合わせによる向上効果は得ることができなかった。G18 の繰り返し配列から成る G72 タンパク質においても、むしろ細胞が増殖して管腔分岐数がやや増加する傾向を見せたことから、GY4 に組み込まれた YIGSR 配列の効果を骨格部分の G18 が抑制してしまっている可能性も考えられる。骨格部分の配列変更、もしくは RGDN 配列以外の機能性配列との融合によって、より高機能な YIGSR 融合タンパク質を得ることができるのではないかと考えられる。

4.4 結言

本章においては、血管新生において負の調節を司るマトリクスタンパク質を構築するために、血管新生を抑制するとの知見が得られているYIGSR配列およびRGDN配列をGVGVVPの繰り返しからなるマトリクス骨格に組み込んだ融合タンパク質を作製し、特性評価を行った。これまで得られていた知見^{51, 77}どおり、YIGSR合成ペプチドはコラーゲンに接着した細胞の遊走を抑制し、コラーゲングルモデルにおいては管腔形成の阻害能力を示すことが確認された。そして、本研究において構築したGY4 タンパク質は、YIGSR配列のポリマー化による相乗効果を発揮し、はるかに低濃度において合成ペプチドと同等の効果を得られたが、合成ペプチドを上回る高機能化は実現できなかった。RGDN配列を組みこんだGR4・GRGY2 タンパク質においては、GY4 タンパク質を上回る細胞接着能を示したことから、細胞支持能力の高い良好なマトリクスタンパク質として機能することが確かめられたが、細胞遊走の阻害及び管腔形成の抑制効果は得られなかった。

これらの結果を鑑みると、今回構築した融合タンパク質は、それぞれ機能性配列を細胞に提示し、相互作用させることは可能であったと考えられる。また、YIGSR 配列を組みこんだ融合タンパク質が血管新生抑制機能をもつことは確認できたため、YIGSR 配列を機能性配列として選択する方向性は正しいといえる。よって、より高機能性を獲得した融合タンパク質を得るためには、

- ・ GY4 をさらにポリマー化させ相乗効果を図る
- ・ GY4 をコラーゲンファイバー上に固定化することで効率的シグナル導入を図る
- ・ RGDN、G18 に替わる新たな配列と YIGSR 配列の組み合わせにより機能向上を図る

などの対策を講じる必要がある。上に挙げたような設計のバリエーションを検討し、より機能性の高い融合タンパク質を模索することが今後の課題であると考えられる。

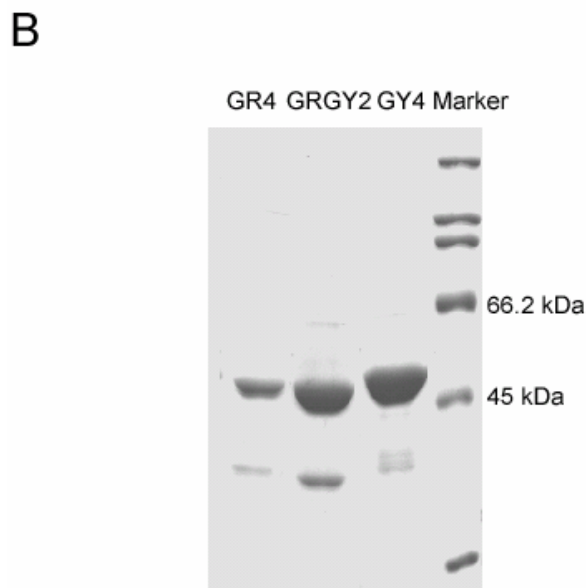
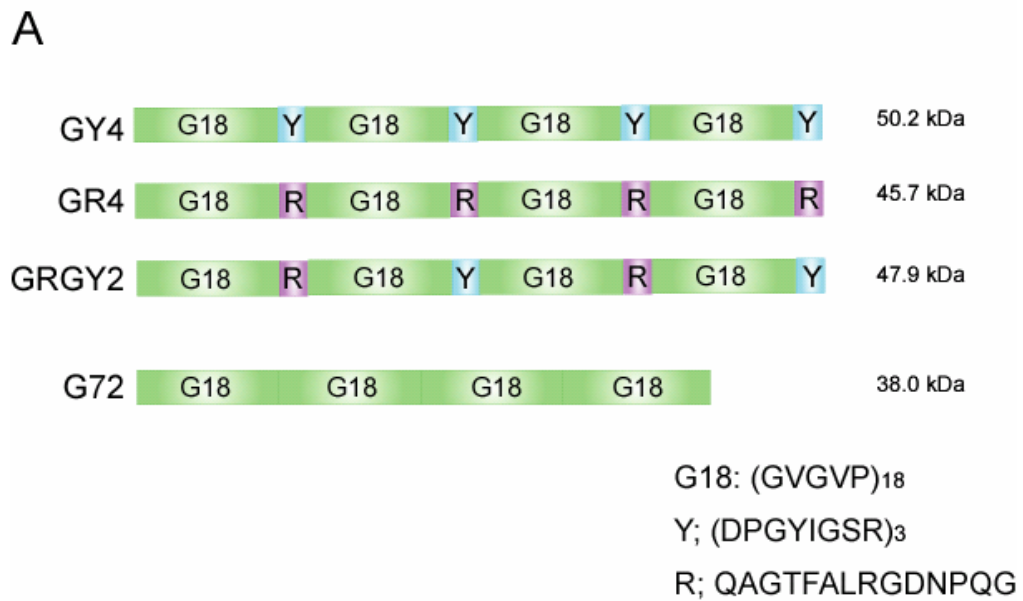


Fig. 4-1 血管新生抑制配列を含むマトリクスタンパク質の設計と発現・精製

A : GY、GRをベースとする融合タンパク質の設計

B : 精製した融合タンパク質のSDS-PAGE泳動図

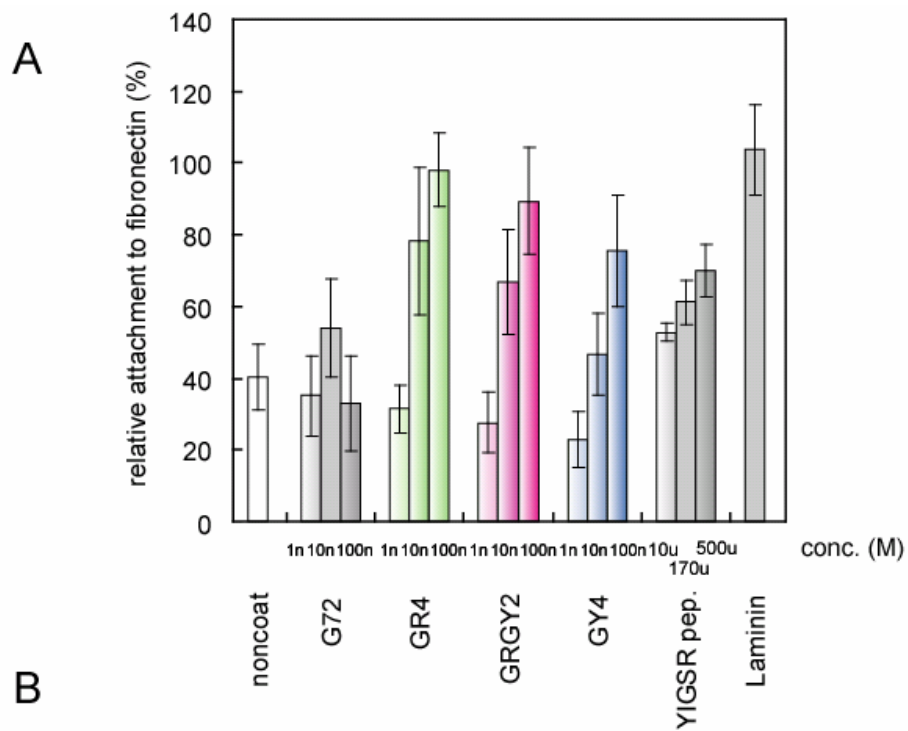


Fig. 4-2 構築したマトリクスの細胞接着能

A : 各融合タンパク質への接着細胞数 (接着細胞数 × 100 / FNの接着細胞数)

B : 接着細胞の形態観察 Bar: 100 μm

100 nMのタンパク質をコーティングした表面上へ接着した細胞の形態を観察した。

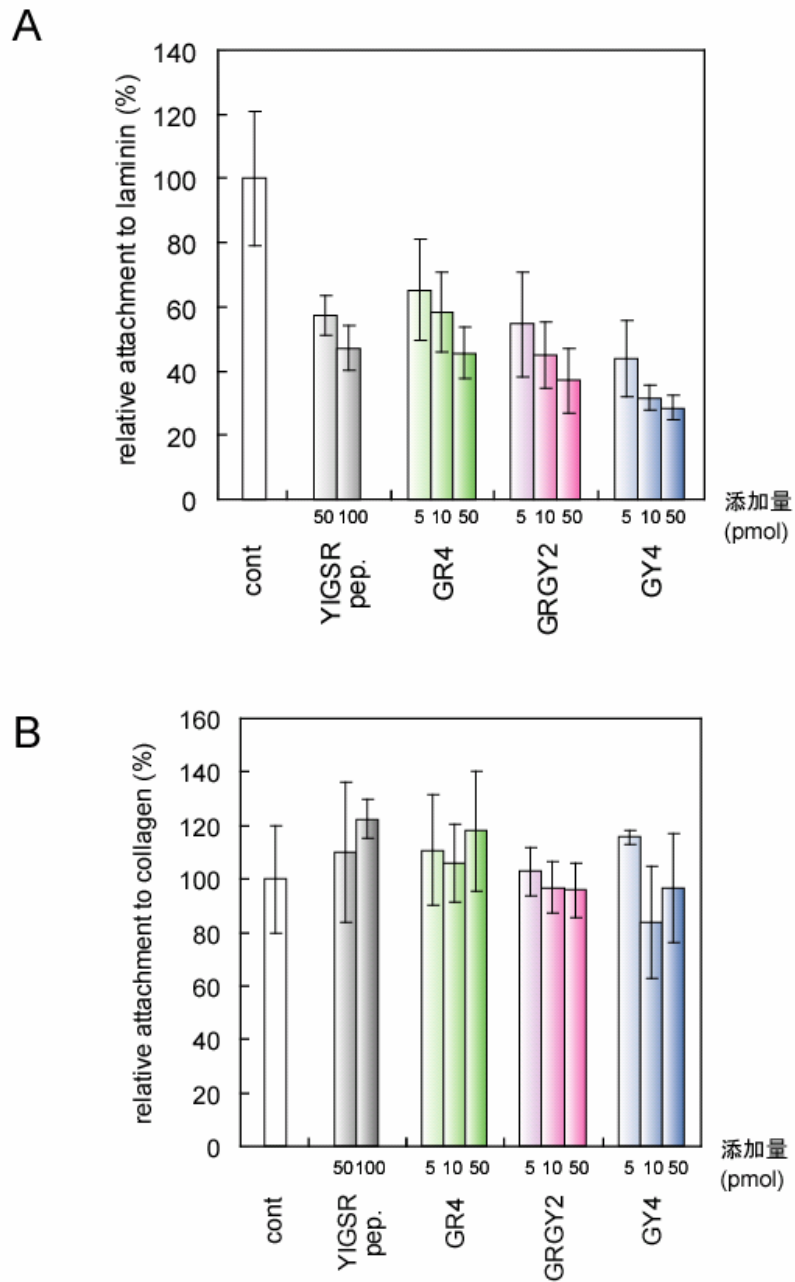


Fig. 4-3 構築したマトリクスの細胞接着能評価

ラミニン上 (A) またはコラーゲン上 (B) へ播種する細胞懸濁液に融合タンパク質を添加し、接着阻害能を検討。それぞれタンパク質無添加の場合(cont)を100%とした際の接着細胞数の割合を表す。

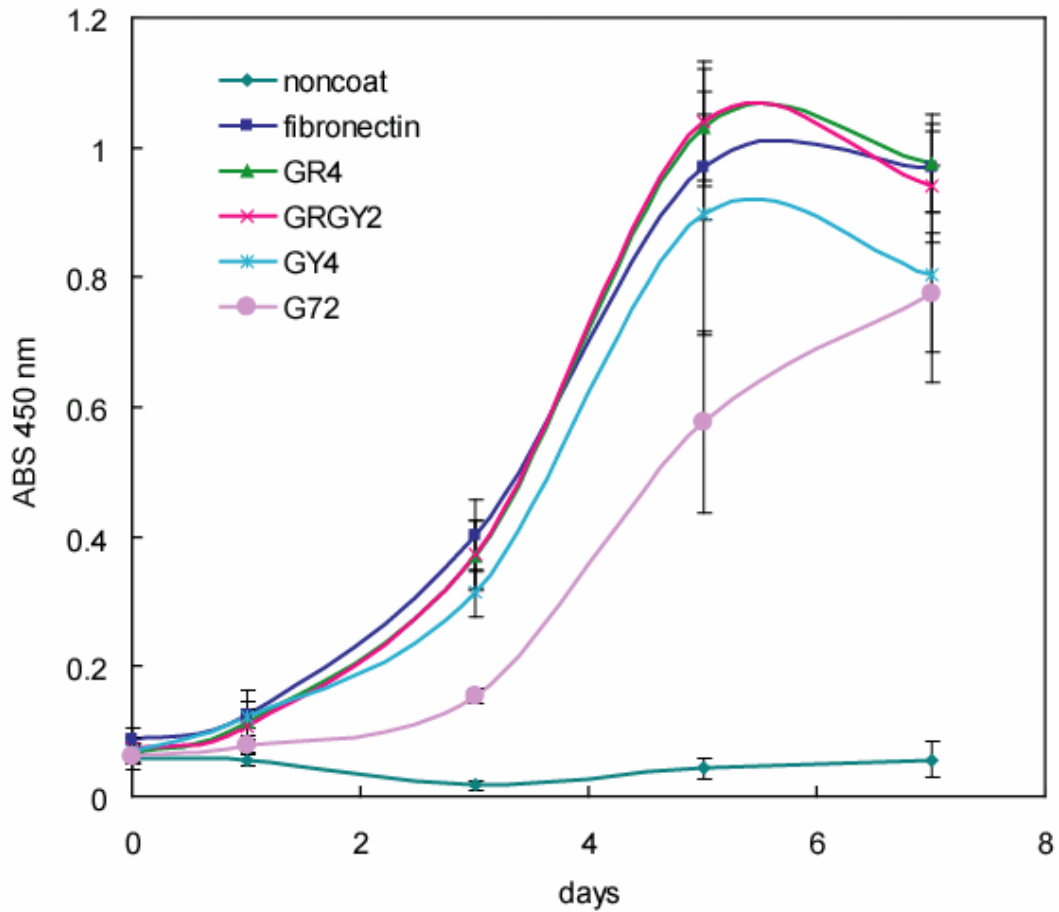


Fig. 4-4 構築したマトリクスの細胞増殖能

100 nMの融合タンパク質をコーティングした表面にHUVECを播種し、時間経過毎にMTS assayにより生細胞数変化の評価を行った。

fibronectin: 10 μ g/ml

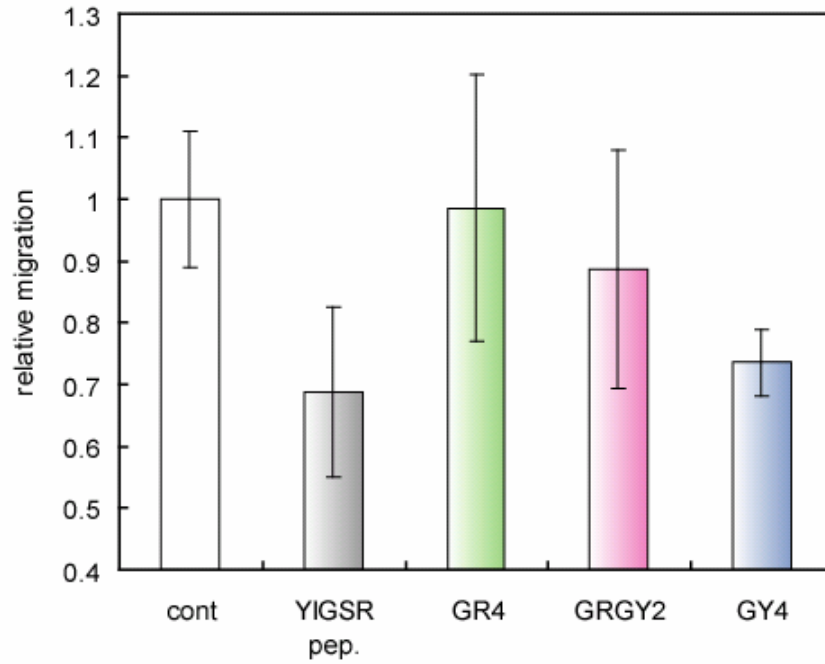
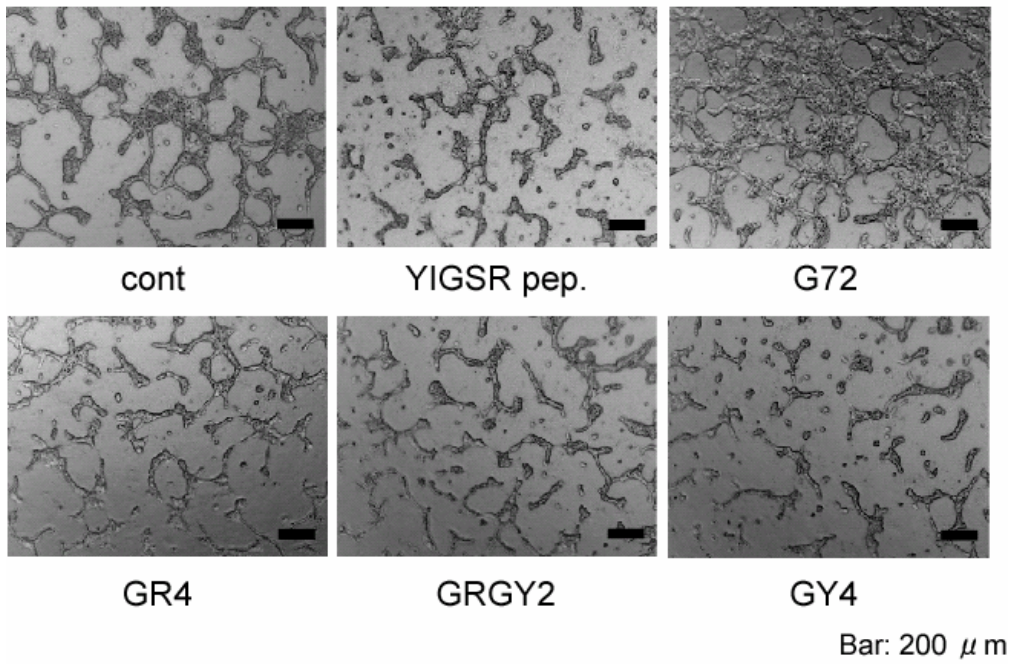


Fig. 4-5 構築したマトリクスの細胞遊走阻害能評価

コラーゲンコートしたフィルター上に細胞を播種する際に細胞懸濁液にマトリクスを添加することによって細胞遊走の阻害を検討。

縦軸はcont（マトリクス無添加）に対する遊走細胞数の割合を表す。

A



B

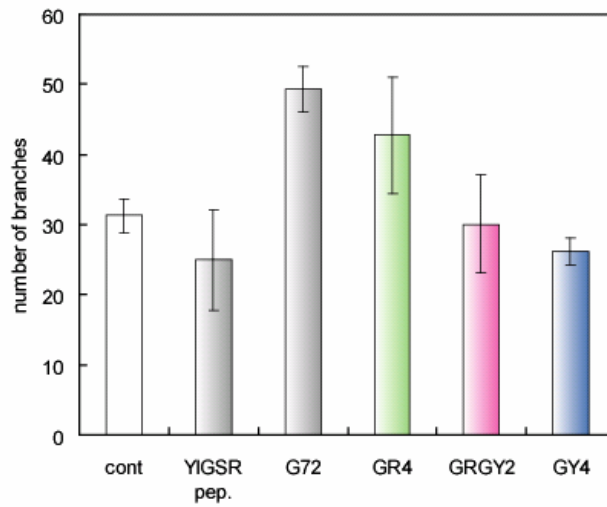


Fig. 4-6 コラーゲンゲルモデルにおける管腔形成評価

A : マトリクスを添加した際の管腔形成 100 pmolの融合タンパク質 (YIGSR pep.は330nmol)を添加したコラーゲンをゲル化させ、培養に用いた。B : 得られた管腔構造の分岐数

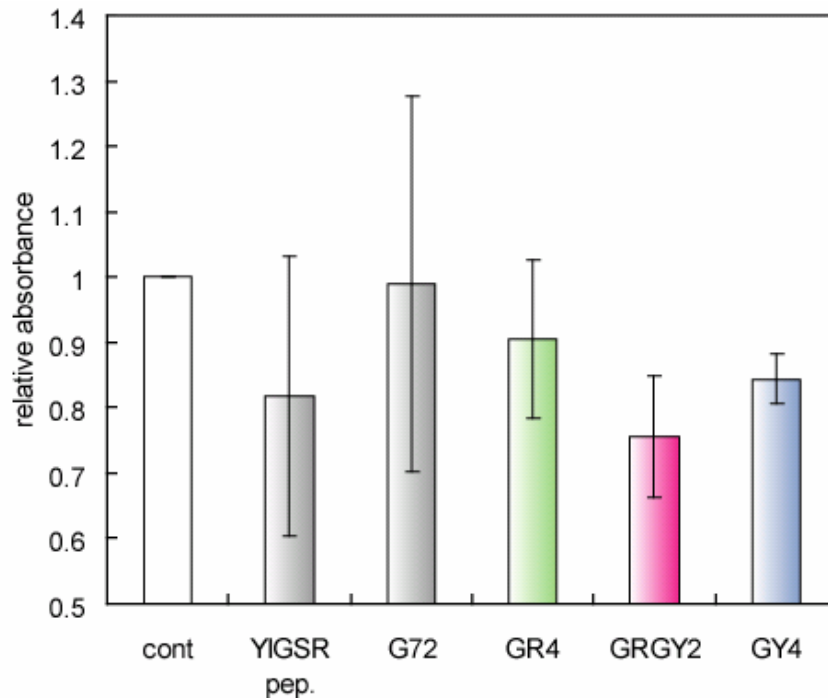


Fig. 4-7 コラーゲンゲルモデルにおける HUVECの生存率評価

各融合タンパク質を添加したコラーゲンゲルにて2日間培養したHUVECにおいてMTS assayを行い、生細胞数の評価とした。縦軸はcont (タンパク質無添加) の吸光度に対する割合を表す。

第五章

結論

5. 結論

本研究においては、安全性に優れ且つ既存の細胞外マトリクスの機能を最大限に発揮することのできるマトリクス材料の開発を目的として、血管新生において重要な役割を持つとされるラミニンの機能性配列を組み込んだ融合タンパク質を構築し特性評価を行った。着目した機能性配列は、血管新生の促進を司る IKVAV 配列と対して抑制の方向に働く YIGSR 配列である。融合タンパク質を作製する際には、エラスチン由来の安定な β スパイラル構造をとる繰り返し配列をマトリクス骨格として採用し、その骨格部分に機能性配列を連結することにより、短い機能性ペプチドを支持した設計とした。さらに、その基本単位を繰り返したポリマー化戦略をとることにより構造的に安定したタンパク質を獲得して、機能性の相乗効果を期待した。

第 2 章では、上記の設計に基づき血管新生促進配列である IKVAV 配列を機能中心として作製した融合タンパク質の特性評価を行った。その結果、これらの融合タンパク質は効率的に固相表面に集積し、それぞれの機能性ペプチドの特性である細胞接着能および IKVAV 配列の細胞遊走能を保持していることが明らかとなった。特に EI4 はラミニンを上回る細胞遊走能を示し、機能性配列の融合によって既存の ECM を凌駕する高機能性タンパク質を構築できる可能性が示唆された。よって、ここで採用したエラスチン由来の骨格構造が、機能性配列を支持し、細胞表面と効率よくアクセスすることを可能としていると考えられ、本研究における設計案の有用性が示された。しかしながら、コラーゲンゲルにこれらの融合タンパク質を添加した際の明らかな管腔形成促進能は認められなかった。このことから、作製した融合タンパク質を固定化し、コラーゲン足場と一体化させることが重要であることが示唆された。

その知見を踏まえ、第 3 章では、コラーゲン結合型の融合タンパク質を新たに作製した。その結果、フィブロネクチン由来のコラーゲン結合性配列fnCBDならびに GRGDS配列を共に融合したEREI2CBDタンパク質が最も高い活性を示し、管腔形成促進能を持つマトリクスタンパク質としての有用性を明らかとした。コラーゲンファイバー上にRGDなどの機能性ペプチドを修飾する手法は今までも報告されているが^{104,105}、EREI2CBDは化学修飾のステップが不要であり、今後さらに増殖因子などの活性タンパク質を融合できるポテンシャルを持っている。よって、安全性と高機能性の双方を満足する材料としてEREI2CBDは有用であると考えられる。しかしながら、本研究で構築したコラーゲン+EREI2CBDによる系を、既存のモデルの中で最も血管新生能の高いMatrigelと比較すると、未だ管腔形成速度の点で劣ると考えられる。増殖因子などの併用により、より高い促進能を持つマトリクスタンパク質を創製することが今後の課題である。

第 4 章では、ラミニンにおけるもう一つの血管新生関連ドメインである YIGSR 配列に着目し、血管新生抑制機能を持つ融合タンパク質の構築に着手した。血管新生は癌化組織における特徴でもあることから、過度の管腔形成促進を妨げ、調節を行う機能が重要となる。実際の生体組織においては、ラミニンが 1 分子内でこうした調節機能を司っていることが示唆されているが、ラミニンの持つ複雑な機能を明確化するためにも、機能ドメインを抽出して人工マトリクスに応用することは有効であるといえる。

しかしながら、ここで血管新生抑制を目的として構築した融合タンパク質については、明確な効果は得られなかった。細胞接着能は保持していることから、機能性配列の細胞への提示においては問題ないと考えられる。また、YIGSR 配列のみ含む融合タンパク質においては、弱いながら細胞遊走の阻害・管腔形成の抑制が見られているので、今後はより血管新生抑制能の高い設計の検討が課題となる。マトリクス骨格配列の最適化、および YIGSR の機能を補助し相乗するような機能性配列との併用により、4 章で得られた融合タンパク質の機

能をさらに向上したマトリクスを構築できると考えられる。

現在、再生医療において足場材料が重要視され、様々な研究が進められている。既存の ECM の持つ多岐にわたる機能のうち、その作用機序が明らかになっているものは少ないと
いってよい。今後も新たな機能性ドメインが次々と同定され、工学的応用へと移されていく
ものと考えられる。本研究において採用した設計案は、様々なペプチド配列を支持し、その
機能を保持させる能力に優れる。多くの有用な機能性ペプチドおよび活性タンパク質に対し
て対応可能な柔軟性を生かし、本研究が今後の高機能細胞外マトリクス開発の一助となるこ
とを期待する。

References

- [1] Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Shirasaki Y, Ochiai N, Tateishi T. The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. *J. Biomed. Mater. Res. A* **67**, 1170-1180 (2003)
- [2] Mathieu LM, Mueller TL, Bourban PE, Pioletti DP, Muller R, Manson JE. Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 905-916 (2006)
- [3] Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* **221**, 1-22 (2001)
- [4] Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat. Methods* **4**, 227-230 (2007)
- [5] Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-344 (1975)
- [6] Yang J, Yamato M, Shimizu T, Sekine H, Ohashi K, Kanzaki M, Ohki T, Nishida K, Okano T. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials* **28**, 5033-5043 (2007)
- [7] Tsuda Y, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Sasagawa T, Sekiya S, Kobayashi J, Chen G, Okano T. Cellular control of tissue architectures using a three-dimensional tissue fabrication technique. *Biomaterials* **28**, 4939-4946 (2007)
- [8] Xu T, Jin J, Gregory C, Hickman JJ, Boland T. Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials* **26**, 93-99 (2005)
- [9] Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, Iwasaki Y, Horie M, Morita I, Takatani S. Biocompatible Inkjet Printing Technique for Designed Seeding of Individual Living Cells. *Tissue eng.* **11**, 1658-1666 (2005)
- [10] Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J. Cell Sci.* **121**, 255-64 (2008).
- [11] Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins. *Pharmacol. Rev.* **50**, 197-263 (1998)
- [12] Powell SK, Kleinman HK. Neuronal Laminins and Their Cellular Receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 401-414 (1997)
- [13] Heino J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and

- signaling functions. *Matrix Biol.* **19**, 319-323 (2000)
- [14] Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 378-386 (2005)
- [15] Sano A, Maeda M, Nagahara S, Ochiya T, Honma K, Itoh H, Miyata T, Fujioka K. Atelocollagen for protein and gene delivery. *Adv. Drug Dev. Rev.* **55**, 1651-1677 (2003)
- [16] Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and Immunogenicity of Collagen. *J. Biomed. Mater. Res. B* **71**, 343-354 (2004)
- [17] Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **23**, 47-55 (2005)
- [18] Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* **115**, 3861-3863 (2002)
- [19] LeBaron RG, Athanasiou KA. Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials. *Tissue Eng.* **6(2)**, 85-103 (2000)
- [20] Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3413-3431 (2006)
- [21] Hu Y, Winn SR, Krajchich I, Hollinger JO. Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res. A* **64**, 583-590 (2003)
- [22] Durrieu MC, Pallu S, Guillemot F, Bareille R, Amedee J, Baquey CH. Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**, 779-786 (2004)
- [23] Burdick JA, Anseth KS. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* **23**, 4315-4323 (2002)
- [24] Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* **20**, 45-53 (1999)
- [25] Patel N, Padera R, Sanders GHW, Cannizzaro SM, Davies MC, Langer R, Roberts CJ, Tandler SJB, Williams PM, Shakesheff KM. Spatially controlled cell engineering on biodegradable polymer surfaces. *FASEB J.* **12**, 1447-1454 (1998)
- [26] Borkenhagen M, Cle'mence JF, Sigrist H, Aebischer P. Three-dimensional extracellular matrix engineering in the nervous system. *J. Biomed. Mater. Res. A* **40**, 392-400 (1998)
- [27] Li F, Carlsson D, Lohmann C, Suuronen E, Vascotto S, Kobuch K, Sheardown H, Munger R, Nakamura M, Griffith M. Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

100, 15346-15351 (2003)

[28] Kishimoto T, Morihara Y, Osanai M, Ogata S, Kamitakahara M, Ohtsuki C, Tanihara M. Synthesis of Poly(Pro-Hyp-Gly)_n by Direct Polycondensation of (Pro-Hyp-Gly)_n, Where n = 1, 5, and 10, and Stability of the Triple-Helical Structure. *Biopolymers* **79**, 163-172 (2005)

[29] Koide T, Homma DL, Asada S, Kitagawa K. Self-complementary peptides for the formation of collagen-like triple helical supramolecules. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 5230-5233 (2005)

[30] Morihara Y, Ogata S, Kamitakahara M, Ohtsuki C, Tanihara M. Thermosensitive Gel Formation of Novel Polypeptides Containing a Collagen-Derived Pro-Hyp-Gly Sequence and an Elastin-Derived Val-Pro-Gly-Val-Gly Sequence. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **43**, 6048-6056 (2005)

[31] Yang MY, Yamauchi K, Kurokawa M, Asakura T. Design of Silk-Like Biomaterials Inspired by Mussel-Adhesive Protein. *Tissue Eng.* **13**, 2941-2947 (2007)

[32] Zhang S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1171-1178 (2003)

[33] Narmoneva DA, Oni O, Sieminski AL, Zhang S, Gertler JP, Kamm RD, Lee RT. Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis. *Biomaterials* **26**, 4837-4846 (2005)

[34] Bokhari MA, Akay G, Zhang S, Birch MA. The enhancement of osteoblast growth and differentiation in vitro on a peptide hydrogel-polyHIPE polymer hybrid material. *Biomaterials* **26**, 5198-5208 (2005)

[35] Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers. *Science* **294**, 1684-1688 (2001)

[36] Silva GA, Czeisler C, Niece KL, Beniash E, Harrington DA, Kessler JA, Stupp SI. Selective Differentiation of Neural Progenitor Cells by High-Epitope Density Nanofibers. *Science* **303**, 1352-1355 (2004)

[37] Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J. Neurooncol.* **50**, 1-15 (2000)

[38] Risau W. Mechanisms of Angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674 (1997)

[39] Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* **288**, 551-556 (1980)

[40] Madri JA, Williams SK. Capillary Endothelial Cell by Matrix Components Cultures: Phenotypic Modulation. *J. Cell Biol.* **97**, 153-165 (1983)

[41] Lebleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and Function of Basement Membranes. *Exp. Biol. Med.* **232**, 1121-1129 (2007)

[42] Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR.

Isolation and Characterization of Type IV Procollagen, Laminin, and Heparan Sulfate Proteoglycan from the EHS Sarcoma. *Biochemistry* **21**, 6188-6193 (1982)

[43] Grant DS, Kleinman HK. Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS* **79**, 317-333 (1997)

[44] Bauer J, Margolis M, Schreiner C, Edgell CJ, Azizkhan J, Lazarowski E, Juliano RL. In Vitro Model of Angiogenesis Using a Human Endothelium-Derived Permanent Cell Line: Contributions of Induced Gene Expression, G-Proteins, and Integrins. *J. Cell. Physiol.* **153**, 437-449 (1992)

[45] Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* **218**, 213-234 (2000)

[46] Nomizu M, Kuratomi Y, Malinda KM, Song SY, Miyoshi K, Otaka A, Powell SK, Hoffman MP, Kleinman HK, Yamada Y. Cell Binding Sequences in Mouse Laminin α 1 Chain. *J. Biol. Chem.* **273**, 32491-32499 (1998)

[47] Nomizu M, Kuratomi Y, Ponce ML, Song SY, Miyoshi K, Otaka A, Powell SK, Hoffman MP, Kleinman HK, Yamada Y. Cell Adhesive Sequences in Mouse Laminin β 1 Chain. *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 311-320 (2000)

[48] Nomizu M, Kuratomi Y, Song SY, Ponce ML, Hoffman MP, Powell SK, Miyoshi K, Otaka A, Kleinman HK, Yamada Y. Identification of Cell Binding Sequences in Mouse Laminin γ 1 Chain by Systematic Peptide Screening. *J. Biol. Chem.* **272**, 32198-32205 (1997)

[49] Grant DS, Kinsella JL, Fridman R, Auerbach R, Piasecki BA, Yamada Y, Zain M, Kleinman HK. Interaction of Endothelial Cells With a Laminin A Chain Peptide (SIKVAV) In Vitro and Induction of Angiogenic Behavior In Vivo. *J. Cell. Physiol.* **153**, 614-625 (1992)

[50] Kanemoto T, Reich R, Royce L, Grotzinger D, Adler SH, Shiraishi N, Martin GR, Yamada Y, Kleinman HK. Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2279-2283 (1990)

[51] Sakamoto N, Iwahara M, Tanaka NG, Osada Y. Inhibition of Angiogenesis and Tumor Growth by a Synthetic Laminin Peptide, CDPGYIGSR-NH₂. *Cancer Res.* **51**, 903-906 (1991)

[52] Graf J, Iwamoto Y, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Robey FA, Yamada Y. Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis, and receptor binding. *Cell* **48**, 989-996 (1987)

[53] Iwamoto Y, Robey FA, Graf J, Sasaki M, Kleinman HK, Yamada Y, Martin GR. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation.

Science **238**, 1132-1134 (1987)

[54] Sephel GC, Tashiro K, Sasaki M, Grestorex D, Martin GR, Yamada Y, Kleinman HK. Laminin A chain synthetic peptide which supports neurite outgrowth. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **162**, 821-829 (1989)

[55] Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Yamada Y. A Synthetic Peptide Containing the IKVAV Sequence from the A Chain of Laminin Mediates Cell Attachment, Migration, and Neurite Outgrowth. *J. Biol. Chem.* **264**, 16174-16182 (1989)

[56] Kama L, Shain W, Turnera JN, Biziosa R. Selective adhesion of astrocytes to surfaces modified with immobilized peptides. *Biomaterials* **23**, 511-515 (2002)

[57] Heller DA, Garga V, Kelleher KJ, Lee T, Mahbubani S, Sigworth LA, et al. Patterned networks of mouse hippocampal neurons on peptide-coated gold surfaces. *Biomaterials* **26**, 883-889 (2005)

[58] Adams DN, Kao EY, Hypolite CL, Distefano MD, Hu WS, Letourneau PC. Growth Cones Turn and Migrate up an Immobilized Gradient of the Laminin IKVAV Peptide. *J. Neurobiol.* **62**, 134-147 (2005)

[59] Tysseling-Mattiace VM, Sahni V, Niece KL, Birch D, Czeisler C, Fehlings MG, Stupp SI, Kessler JA. Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **28**, 3814-3823 (2008)

[60] Gunn JW, Turner SD, Mann BK. Adhesive and mechanical properties of hydrogels influence neurite extension. *J. Biomed. Mater. Res. A* **72**, 91-97 (2005)

[61] Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, LaFlamme S, Burbelo PD, Goldstein AL, Kleinman HK. Matrigel induces thymosin β 4 gene in differentiating endothelial cells. *J. Cell Sci.* **108**, 3685-3694 (1995)

[62] Montesano R, Orci L, Vassalli P. In Vitro Rapid Organization of Endothelial Cells into Capillary-like Networks Is Promoted by Collagen Matrices. *J. Cell Biol.* **97**, 1648-1652 (1983)

[63] Olander JV, Bremer ME, Marasa JC, Feder J. Fibrin-Enhanced Endothelial Cell Organization. *J. Cell. Physiol.* **125**, 1-9 (1985)

[64] Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of Laminin and Basement Membrane in the Morphological Differentiation of Human Endothelial Cells into Capillary-like Structures. *J. Cell Biol.* **107**, 1589-1598 (1988)

[65] Kobatake E, Onoda K, Yanagida Y, Haruyama T, Aizawa M. Design of a thermostable cell adhesion protein. *Biotechnol. Techniques* **13**, 23-27 (1999)

[66] Kobatake E, Onoda K, Yanagida Y, Aizawa M. Design and Gene Engineering Synthesis of an Extremely Thermostable Protein with Biological Activity.

Biomacromolecules **1**, 382-386 (2000)

[67] Elloumi I, Kobayashi R, Funabashi H, Mie M, Kobatake E. Construction of epidermal growth factor fusion protein with cell adhesive activity. *Biomaterials* **27**, 3451-3458 (2006)

[68] Urry DW. What is Elastin; what is not. *Ultrastruct. Pathol.* **4**, 227-251 (1983)

[69] Urry DW, Ohnishi T, Long MM, Mitchell LW. Studies on the conformation and interactions of elastin: nuclear magnetic resonance of the polyhexapeptide. *Int. J. Pep. Prot. Res.* **7**, 367-378 (1975)

[70] Urry DW. Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers. *J. Phys. Chem. B* **101**, 11007-11028 (1997)

[71] Liu JC, Heilshorn SC, Tirrell DA. Comparative Cell Response to Artificial Extracellular Matrix Proteins Containing the RGD and CS5 Cell-Binding Domains. *Biomacromolecules* **5**, 497-504 (2004)

[72] Nicol A, Gowda DC, Urry DW. Cell adhesion and growth on synthetic elastomeric matrices containing ARG-GLY-ASP-SER-³. *J. Biomed. Mater. Res.* **26**, 393-413 (1992)

[73] Urry DW, Pattanaik A, Xu J, Woods TC, McPherson DT, Parker TM. Elastic protein-based polymers in soft tissue augmentation and generation. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **9**, 1015-1048 (1998)

[74] Wachi H, Seyama Y, Yamashita S, Suganami H, Uemura Y, Okamoto K, Yamada H, Tajima S. Stimulation of cell proliferation and autoregulation of elastin expression by elastin peptide VPGVG in cultured chick vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **368**, 215-219 (1995)

[75] Senior RM, Griffin GL, Mecham RP, Wrenn DS, Prasad KU, Urry DW. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a Repeating Peptide in Elastin, Is Chemotactic for Fibroblasts and Monocytes. *J. Cell Biol.* **99**, 870-874 (1984)

[76] Long MM, King VJ, Prasad KU, Freeman BA, Urry DW. Elastin Repeat Peptides as Chemoattractants for Bovine Aortic Endothelial Cells. *J. Cell. Physiol.* **140**, 512-518 (1989)

[77] Grant DS, Tashiro K, Segui-Real B, Yamada Y, Martin GR, Kleinman HK. Two Different Laminin Domains Mediate the Differentiation of Human Endothelial Cells into Capillary-like Structures In Vitro. *Cell* **58**, 933-943 (1989)

[78] Robinet A, Fahem A, Cauchard JH, Huet E, Vincent L, Lorimier S, Antonicelli F, Soria C, Crepin M, Hornebeck W, Bellon G. Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J. Cell Sci.* **118**, 343-356 (2005)

- [79] Kasai S, Ohga Y, Mochizuki M, Nishi N, Kadoya Y, Nomizu M. Multifunctional Peptide Fibrils for Biomedical Materials. *Biopolymers* **76**, 27-33 (2004)
- [80] Matsushita O, Jung CM, Minami J, Katayama S, Nishi N, Okabe A. A study of the Collagen-binding Domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* Collagenase. *J. Biol. Chem.* **273**, 3643-3648 (1998)
- [81] Takagi J, Asai H, Saito Y. A Collagen/gelatin-binding decapeptide derived from bovine propolypeptide of von Willebrand factor. *Biochemistry* **32**, 8530-8534 (1992)
- [82] Huizinga EG, Martijn PR, Kroon J, Sixma JJ, Gros P. Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure* **5**, 1147-1156 (1997)
- [83] Owens RJ, Baralle FE. Mapping of the collagen-binding site of human fibronectin by expression in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **5**, 2825-2830 (1986)
- [84] Kato K, Sato H, Iwata H. Ultrastructural Study on the Specific Binding of Genetically Engineered Epidermal Growth Factor to Type I Collagen Fibrils. *Bioconjugate Chem.* **18**, 2137-2143 (2007)
- [85] Zhao W, Chen B, Li X, Lin H, Sun W, Zhao Y, et al. Vascularization and cellularization of collagen scaffolds incorporated with two different collagen-targeting human basic fibroblast growth factors. *J. Biomed. Mater. Res. A* **82**, 630-636 (2007)
- [86] Ishikawa T, Terai H, Kitajima T. Production of a Biologically Active Epidermal Growth Factor Fusion Protein with High Collagen Affinity. *J. Biochem.* **129**, 627-633 (2001)
- [87] Ishikawa T, Eguchi M, Wada M, Iwami Y, Tono K, Iwaguro H, Masuda H, Tamaki T, Asahara T. Establishment of a Functionally Active Collagen-Binding Vascular Endothelial Growth Factor Fusion Protein In Situ. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1998-2004 (2006)
- [88] Dzamba BJ, Bultmann H, Akiyama SK, Peters DM. Substrate-specific Binding of the Amino Terminus of Fibronectin to an Integrin Complex in Focal Adhesions. *J. Biol. Chem.* **269**, 19646-19652 (1994)
- [89] McKeown-Longo PJ, Mosher DF. Interaction of the 70,000-mol-wt Amino-terminal Fragment of Fibronectin with the Matrix-assembly Receptor of Fibroblasts. *J. Cell Biol.* **100**, 364-374 (1985)
- [90] Tomashini-Johansson BR, Annis DS, Mosher DF. The N-terminal 70-kDa fragment of fibronectin binds to cell surface: fibronectin assembly sites in the absence of intact fibronectin. *Matrix Biol.* **25**, 282-293 (2006)
- [91] Steffensen B, Xu X, Martin PA, Zardeneta G. Human fibronectin and MMP-2 collagen binding domains compete for collagen binding sites and modify cellular

- activation of MMP-2. *Matrix Biol.* **21**, 399-414 (2002)
- [92] Schor SL, Ellis I, Banyard J, Schor AM. Motogenic activity of IGD-containing synthetic peptides. *J. Cell Sci.* **112**, 3879-3888 (1999)
- [93] Millard CJ, Ellis I, Pickford AR, Schor AM, Schor SL, Campbell ID. The Role of the Fibronectin IGD Motif in Stimulating Fibroblast Migration. *J. Biol. Chem.* **282**, 35530-35535 (2007)
- [94] Kahn J, Mehraban F, Ingle G, Xin X, Bryant JE, Vehar G, Schoenfeld J, Grimaldi CJ, Peale F, Draksharapu A, Lewin DA, Gerritsen ME. Gene Expression Profiling in an *in Vitro* Model of Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **156**, 1887-1900 (2000)
- [95] Glienke J, Schmitt AO, Pilarsky C, Hinzmann B, Weiü B, Rosenthal A, Thierauch KH. Differential gene expression by endothelial cells in distinct angiogenic states. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2820-2830 (2000)
- [96] Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* **66**, 1095-1104 (1991)
- [97] Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, et al. Tie 2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2 modulate VEGF-induced post-natal Vascularization. *Circ. Res.* **83**, 233-240 (1998)
- [98] Bushkin-Harav H, Garty NB, Littauer UZ. Down-regulation of a 67-kDa YIGSR-binding Protein upon Differentiation of Human Neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 13422-13428 (1995)
- [99] Fujita Y, Funabashi H, Mie M, Kobatake E. Design of a Thermocontrollable Protein Complex. *Bioconjugate Chem.* **18**, 1619-1624 (2007)
- [100] Nomizu M, Yamamura K, Kleinman HK, Yamada Y. Multimeric Forms of Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) Peptide Enhance the Inhibition of Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res.* **53**, 3459-3461 (1993)
- [101] Murata J, Saiki I, Azuma I, Nishi N. Inhibitory effect of a synthetic polypeptide, poly (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), on the metastatic formation of malignant tumour cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **11**, 97-99 (1989)
- [102] Miao M, Bellingham CM, Stahl RJ, Sitarz EE, Lane CJ, Keeley FW. Sequence and Structure Determinants for the Self-aggregation of Recombinant Polypeptides Modeled after Human Elastin. *J. Biol. Chem.* **278**, 48553-48562 (2003)
- [103] Mie M, Mizushima Y, Kobatake E. Novel Extracellular Matrix for Cell Sheet Recovery Using Genetically Engineered Elastin-Like Protein. *J. Biomed. Mater. Res. B* **86**, 283-290 (2008)
- [104] Duan X, McLaughlin C, Griffith M, Sheardown H. Biofunctionalization of collagen

for improved biological response: Scaffolds for corneal tissue engineering. *Biomaterials* **28**, 78-88 (2007)

[105] Duan X, Sheardown H. Incorporation of cell-adhesion peptides into collagen scaffolds promotes corneal epithelial stratification. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **18**, 701-711 (2007)

謝辞

博士論文研究を進めるにあたり、本学21世紀COEプログラム拠点「生命工学フロンティアシステム」及びグローバルCOEプログラム拠点「生命時空間ネットワーク進化型教育研究拠点」より多大なる援助を賜りました。拠点運営にご尽力くださった先生方に厚く御礼申し上げます。

実験を行うに際しまして、合成ペプチドを提供していただきました 本学教授 生物プロセス専攻 三原 久和 先生、ならびに三原研究室の方々に感謝いたします。

また、生体外での管腔形成モデルにつきまして技術指導をいただきました 富山大学教授 中村 真人 先生、ならびに神奈川科学技術アカデミー「中村バイオプリンティングプロジェクト」の研究員の方々に感謝いたします。

私が学部生として研究室に配属されてより6年間に亘り、ご指導を賜りました 本学准教授 小島 英理 先生に深く御礼申し上げます。また実験面での技術指導を賜りました 本学助教 三重 正和 先生、研究を支えてくださった小島研究室の皆様方に感謝いたします。

2008年6月

中村 真希子