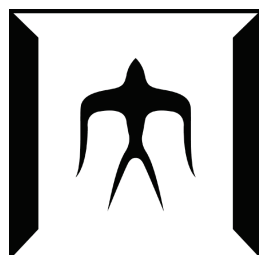


論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	三次元組織構築を目的とした多機能タンパク質足場材料の開発
Title(English)	
著者(和文)	水口佳紀
Author(English)	Yoshinori Mizuguchi
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10816号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小畠 英理,桑 昭苑,山口 雄輝,三原 久和,三重 正和
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10816号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 29 年度 博士論文

三次元組織構築を目的とした
多機能タンパク質足場材料の開発



東京工業大学大学院生命理工学研究科

生命情報専攻

水口 佳紀

担当教員 小畠 英理 教授

目次

第1章 序論	5
1.1 緒言	6
1.2 三次元生体組織構築	9
1.2.1 三次元細胞培養の重要性	9
1.2.2 三次元細胞培養技術	9
1.3 組織工学における足場材料	13
1.3.1 細胞外マトリックス（ECM）の役割	13
1.3.2 ECMを応用した機能性足場材料の設計	14
1.3.3 人工足場材料の課題	15
1.4 機能性ハイドロゲル材料の設計	16
1.4.1 超分子ハイドロゲル	16
1.4.2 自己組織化ペプチドハイドロゲル	16
1.4.3 自己組織化タンパク質ハイドロゲル	18
1.4.4 スマートバイオマテリアルとしての Elastin-like polypeptide (ELP)	21
1.4.5 三次元生体組織構築に向けたシグナル因子一体化戦略	23
1.5 本研究の目的と意義	25
第2章 Triple helix を利用した高機能性足場材料の構築	30
2.1 緒言	31
2.2 実験方法	32
2.2.1 実験試薬	32
2.2.2 プラスミド構築	32
2.2.3 融合タンパク質の発現及び精製	34
2.2.4 透過型電子顕微鏡（TEM）による構造評価	36
2.2.5 融合タンパク質の細胞接着能評価	36
2.2.6 遊離 bFGF 融合タンパク質の細胞増殖能評価	37
2.2.7 helix 融合タンパク質間の結合能評価	38
2.2.8 成長因子一体化 ECM における細胞増殖能評価	39
2.3 実験結果及び考察	40
2.3.1 融合タンパク質の発現及び精製	40
2.3.2 TEM による構造評価	40
2.3.3 融合タンパク質の細胞接着能評価	41
2.3.4 遊離 bFGF 融合タンパク質の細胞増殖能評価	41
2.3.5 helix 融合タンパク質間の結合能評価	42
2.3.6 成長因子一体化 ECM における細胞増殖能評価	42

2.4 結言	44
第3章 ELP を利用した温度応答性タンパク質ハイドロゲルの構築	56
3.1 緒言	57
3.2 実験方法	59
3.2.1 実験試薬.....	59
3.2.2 プラスミド構築.....	59
3.2.3 融合タンパク質の発現及び精製.....	60
3.2.4 ハイドロゲルの形成・形態評価.....	61
3.2.5 濁度変化による相転移温度測定.....	61
3.2.6 レオメーターによる粘弾性測定.....	61
3.2.7 TEM による構造評価	62
3.2.8 三次元培養下での細胞形態観察.....	62
3.3 実験結果及び考察.....	63
3.3.1 融合タンパク質の発現及び精製.....	63
3.3.2 ハイドロゲルの形成・形態評価.....	64
3.3.3 濁度変化による相転移温度測定.....	65
3.3.4 レオメーターによる粘弾性測定.....	65
3.3.5 TEM による構造評価	66
3.3.6 三次元培養下での細胞形態観察.....	67
3.4 結言	68
第4章 多機能タンパク質ハイドロゲルによる三次元血管組織の構築	79
4.1 緒言	80
4.2 実験方法	82
4.2.1 実験試薬.....	82
4.2.2 プラスミド構築.....	82
4.2.3 融合タンパク質の発現及び精製.....	82
4.2.4 細胞培養.....	83
4.2.5 融合タンパク質の細胞接着能評価.....	83
4.2.6 CUBE ゲルを用いた HUVEC の血管新性能評価	84
4.2.7 Real-time PCR による mRNA 発現量測定.....	84
4.2.8 ELISA による CUBE への成長因子保持能評価	85
4.2.9 成長因子一体化 CUBE ゲルを用いた HUVEC の血管新性能評価	86

4.3 実験結果及び考察.....	87
4.3.1 融合タンパク質の発現及び精製.....	87
4.3.2 融合タンパク質の細胞接着能評価.....	87
4.3.3 CUBE ゲルを用いた HUVEC の血管新性能評価	88
4.3.4 ELISA による CUBE への成長因子保持能評価	90
4.3.5 成長因子一体化 CUBE ゲルを用いた HUVEC の血管新性能評価	91
4.4 結言	93
 第 5 章 結論.....	 103
 References	 110
 謝辞	 125

第 1 章

序論

1.1 緒言

次世代医療の柱として注目されている再生医療は、生物に備わっている本来の再生能力を基に、失われた生体組織や臓器を再構築する治療法であり、対症療法中心の薬物治療や切除中心の外科的治療の限界を超える、根治治療を目指した新規治療法である。2007 年にヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells, iPS 細胞）が樹立され^[1]、再生医療に対する期待が世界的に高まっている。特に iPS 細胞を種々の細胞に誘導し、それらを三次元的に組織化することにより構築される臓器は、患者への移植片としてだけでなく、創薬や化粧品分野における動物実験の代替につながるため、期待は大きい。しかしながら、複数の細胞種から成る実用的な機能性三次元生体組織を作り出すことは難しく、その技術確立が課題となっている。

生体組織は、組織特有の多様な細胞が、成長因子等の生理活性シグナルを受けながら、細胞外マトリックス（extracellular matrix, ECM）と複合化した精巧な三次元ネットワークを形成することで組織としての機能が制御されている^[2]。したがって、機能性三次元生体組織を構築するには、播種された細胞が壊死することなく、それぞれの細胞機能を制御するための細胞周辺環境をデザインすることが必要である。

近年、細胞の配置とその周辺環境を機械で制御する技術として *Biofabrication* と呼ばれる新しい分野が登場し、その代表として 3D バイオプリンターを用いた細胞積層技術が注目を集めている^[3]。コンピュータの高い計算能力や制御能力を利用し、種々の細胞や ECM、シグナル因子を三次元的に配置することで、理論的には時空間的な細胞機能制御が可能となる（Figure 1-1）^[4]。しかしながら、細胞の足場となる既存のゲル材料は、機能性に乏しく、組織形成を制御することは困難である。そのため、細胞の物理的な保持だけでなく、細胞の接着や増殖、分化、組織形成といった細胞機能を時空間的に制御可能な高機能性ハイドロゲル材料の開発が求められている。

ハイドロゲルは、親水性ポリマー鎖が架橋されることにより形成した多量の水分子を保

持する三次元網目構造体である^[5]。それらが有する高い生体親和性，ECM との類似性といった注目すべき特徴から，ハイドロゲルは生医学分野における有望な材料として注目を集めており^[5-7]，再生医療，薬物/遺伝子送達，幹細胞やがん研究，遺伝子治療等の様々な分野での利用が進められている^[8-10]。

ハイドロゲルは大別すると，動物由来，植物由来，合成化合物が存在し，それぞれ一長一短の性質を持つ。Matrigel[®]^[11]やコラーゲン，ヘパリン等の動物由来のハイドロゲルは，それらが有する生物活性や生分解性の特性から使用実績が多いが^[12]，それらの機能や分解性，構造を制御できないこと，またロット間のばらつきや動物由来因子のコンタミネーション，免疫原性の可能性があるといった制限があることから，それらに含まれる成分が細胞に影響を及ぼす可能性のある実験系や臨床応用には適していない。一方で，アルギン酸等の植物由来のハイドロゲルは，動物由来の因子によるコンタミネーションの危険性はないが，生物活性を有していない。また，ポリエチレングリコール（PEG）やポリアクリルアミド等の合成ハイドロゲルは，制御可能な分解性や微小構造，高い機械的性質を有しているが^[13]，植物由来のハイドロゲルと同様に生物活性を有していないため，細胞活性を高める因子の導入が必要となってくる。例えば，Hans Clevers らは，フィブロネクチン由来の RGD ペプチド配列やラミニン由来の AG73 ペプチド配列を，機械的性質や生分解性を調整可能な PEG ゲルに導入することにより，腸幹細胞，腸オルガノイド培養のためのデザイナーマトリックスを考案している^[14]。

合成ハイドロゲルは，物理的，化学的，生物学的性質を制御可能であるが，通常，ゲルに機能を付与する場合，高分子鎖への化学修飾，あるいは機能性分子を組み入れた共重合反応を行う必要があり，ゲル調製の煩雑さに加え，特に機能性分子の導入率の限界や精密分子設計が難しいといった欠点がある。また，化学的架橋に依存したハイドロゲルは，未反応物質の残存，有機溶剤，光重合開始剤等による毒性の懸念がある。そこで近年，架橋剤を使わない温和な条件下で，モノマー分子の自己組織化によりゲルを形成させる超分子

ハイドロゲルが注目されており^[15-18]，優れた機能を発揮することが示されている^[19]．理論的にはモノマー分子の設計次第でハイドロゲルの構造・機能制御が可能であり，精密制御されたゲルの開発が期待されている．特に，機能性，生体適合性，生分解性の面から，タンパク質の構造安定化因子であるペプチドの二次構造骨格をモチーフとした超分子ハイドロゲルの開発が注目されており，自己組織化ペプチドによるナノファイバーを細胞の三次元足場材料として利用した例が多く報告されている^[20-22]．また，熱，電気，光，pH 等の外部環境変化に応答して膨潤収縮する刺激応答性ゲルの開発も盛んに行われており，三次元細胞培養可能なスマートバイオマテリアルとしての利用が期待されている^[23,24]．

しかしながら，生体組織の忠実な再現には至っておらず，残されている課題も多い．特に，細胞機能を時空間的に制御するには，細胞と ECM の三次元配置に加え，シグナル因子の空間的濃度勾配を制御しなければならないが，シグナル因子の作用は不安定で非持続性である^[25]．そこで，細胞増殖や分化等のシグナルを高効率に伝えることができるよう，ECM とシグナル因子を組み合わせた高機能性三次元足場材料の開発が求められる（Figure 1-2）．

本研究では，接着，増殖，分化，組織形成等の細胞機能を時空間的に制御可能な高機能性三次元足場材料を構築することを目的とし，生体微小環境を模倣した新規タンパク質ハイドロゲルの開発を行った．具体的には，生体親和性が高く特異性の高い分子認識により規定された分子設計が可能なタンパク質に着目し，helix ペプチドの coiled-coil 構造形成による自己組織化，及び elastin-like polypeptide (ELP) の温度応答性会合を利用した特異的分子間相互作用により，ゲル化能，及び非共有結合性のシグナル因子保持能を付加し，さらに機能性配列の導入により多機能タンパク質からなる超分子ハイドロゲルの構築を目指した．そして，本材料を用いて細胞の三次元培養を行い，細胞の機能制御を試みた．

以降本章では，三次元細胞培養技術について述べる．次に組織工学的アプローチに焦点を当て，機能性ゲル材料を創出する戦略について詳述する．最後に本研究で構築した機能性タンパク質について，その作製意義を明示し，本研究の目的と意義を明確にする．

1.2 三次元生体組織構築

再生医療の最終目標とも言うべき複雑な臓器を再生するには、iPS 細胞をはじめとした幹細胞研究だけでなく、三次元細胞培養技術の発展が不可欠である。本節では、三次元細胞培養の重要性について述べ、既存の三次元細胞培養技術を俯瞰する。

1.2.1 三次元細胞培養の重要性

シャーレ上での単層培養は簡便に細胞挙動を観察する実験系としては有用であるが、生体組織を構成する細胞は三次元的環境に置かれているため、生体内での環境を忠実に表していない。実際、三次元環境に置かれた細胞が、平面培養時とは全く異なる振る舞いを示したという報告が数多くなされている。例えば、ヒト肝細胞株を用いた実験では、ゲル中で三次元スフェロイド培養を行うことにより、単層培養よりも細胞における薬物代謝に関わる酵素活性が上昇する、といった報告がなされている^[26]。生体内における細胞の分化や臓器の発生、シグナル伝達等のあらゆる生命プロセスは、細胞と ECM との相互作用やサイトカイン等の化学物質の濃度勾配に依存しており^[27,28]、細胞を取り巻く微小環境（ニッチ）の性質が重要であることが次第に明らかになりつつある^[29]。これは二次元環境で再現することは困難であり、三次元環境下で細胞を培養することにより生体内での現象をより忠実に模倣することが可能になる。次項では、既存の三次元細胞培養技術を俯瞰し、現状の課題について言及する。

1.2.2 三次元細胞培養技術

動物細胞の三次元培養技術は 1970 年前後に開発されたマイクロビーズ担体^[30]とホロファイバー担体^[31]を利用した大量培養システムに端を発し、1980 年前後には、真皮由来線維芽細胞をコラーゲンゲル内に包埋培養して真皮様組織を再構築し^[32]、さらに表皮角化細胞を

重層培養することで表皮のオルガノイド（器官様構造体）を創出する三次元培養法が開発された^[33]。1986 年には、マウス腫瘍組織の抽出物（Matrigel®）を用いて基底膜様構造を再構成することに成功した^[34]。1990 年代に入ると、ECM 成分だけでなく生分解性ポリマー等のバイオマテリアルも足場材料として使用されるようになり、1993 年には、培養細胞とその足場材料から組織を再構築する「組織工学」の学際領域が確立された^[35]。そして 2000 年以降では、幹細胞生物学の急速な発展と共に、三次元培養技術は、再生医療の基盤技術として様々なアプローチが展開されている。以下に代表的な三次元培養技術における特徴を示す（Figure 1-3）。

プレート上でのスフェロイド形成

培養ディッシュ底面を細胞非接着表面とし、その中に直径 100 μm 程度の細胞接着表面をすることで、狭い領域内に細胞を凝集させ、スフェロイド形成を促すことができる^[36]。また、ナノファイバーあるいはナノサイズの格子を敷き詰めることで細胞の接着を抑制し、スフェロイドを形成させることが可能である^[37]。

液滴中でのスフェロイド形成

ハンギングドロップ法と呼ばれ、チップ先端が通る程度の小さな穴があいたディッシュを用い、穴の部分に培地の液滴をぶら下げるように保持させることで、細胞は重力に従ってドロップの底で凝集し、スフェロイドを形成する^[38]。この方法では、複数種の細胞の混在や、細胞塊の周りを別の細胞で覆ったりするなど、他の方法では難しい共培養系の構築が可能である。

細胞シート積層法

温度応答性高分子を固定化した細胞培養皿を用いることで、温度による培養細胞の接着・脱着の制御を行い^[39,40]、細胞シートを作製し^[41]、これを積層することにより立体組織の構築を行うアプローチである（Figure 1-3A）^[42]。通常、培養細胞の回収には、トリプシン

等の酵素処理を行うため ECM 成分や細胞膜タンパク質を分解してしまう。しかし、温度応答性培養皿を用いることにより、細胞の機能や構造を保持したまま培養細胞の剥離・回収が可能である^[43]。また、厚みのある組織構築には内部細胞の壊死を防ぐための血管網導入が必須であるが、肝実質細胞や線維芽細胞といった組織を構成する細胞シートと微細加工技術を用いて作製したマイクロパターン化血管内皮細胞シートを交互に積層し培養することで、血管内皮細胞の自発的な伸展を誘導し、毛細血管の構築を可能にしている^[44,45]。

細胞積層法・細胞集積法

通常の細胞培養法では、自発的な三次元構造体形成を誘導するほど大量の ECM は産生されず、また細胞の接触阻害機能のため単層構造しか得ることができないが、接着タンパク質として知られるフィブロネクチン (FN) とコラーゲンの変性体であるゼラチン (G) の交互積層薄膜 (FN-G 薄膜) をおよそ 6 nm の膜厚で細胞表面に形成させると、二層目の細胞を接着させることができる (細胞積層法) (Figure 1-3B)^[46-48]。この方法は細胞の配置を一層ずつ制御して多層構造を構築することができるが、各層の細胞が安定に接着するまで待つ必要があり、一日に二層の作製が限界である。そこで、単一細胞表面に FN-G 薄膜を形成させ、各細胞が三次元的に相互作用できるようにすることで、三次元組織体を短期間で作製できることが示されている (細胞集積法)^[49]。また、この方法を用いてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) や皮膚微小リンパ管内皮細胞 (NHDLMEC) のサンドイッチ培養を行うことで、毛細血管及びリンパ管網が共存した三次元組織体が構築されている (Figure 1-3C)^[49]。

多孔質担体内での培養

内部に細胞が入り込める孔を持つ担体を用いることで、人工的に生体内組織を模倣した環境で細胞培養を行うことができる (Figure 1-3D)。三次元多孔質担体は、細胞を三次元的に分布、局在させ、組織再生のための空間を提供する支持体として重要な役割を果たす^[50]。

材料には、ハイドロキシアパタイトやリン酸カルシウム等の無機材料を除いて、多くはポリ乳酸（PLA）やポリグリコール酸（PGA）等の合成高分子、あるいはコラーゲンやヒアルロン酸等の天然高分子が使用されている。

上述のスフェロイド形成法はハイスループット化しやすいといった特徴を有しているが、スフェロイドは単なる細胞塊であり、組織・臓器には程遠い。また、細胞シート積層法や細胞集積法は、三次元組織構築技術として有力な手法ではあるが、複雑な臓器再生には、まだ多くの課題が存在する。

生体外で三次元組織体を構築するためには、各種細胞の時空間的機能を制御し、組織化を誘導する工学的な細胞操作、「組織工学」技術^[35]が不可欠である。生体組織中の ECM は単に細胞間隙を埋める物理的な足場ではなく、細胞の機能を制御する重要な役割を担っている^[51]。特にコラーゲンやフィブロネクチン、ラミニン等の ECM 成分は、細胞膜におけるインテグリン等のレセプターを認識することができ、これらとの相互作用を介したシグナル伝達により細胞の接着や増殖、遊走、さらには細胞死を制御している。したがって、機能性三次元組織の構築には、細胞機能を制御するための細胞周辺の微小環境をデザインする必要がある。多孔質担体を用いた三次元培養法は有効なアプローチであると言える。しかしながら、三次元足場材料には、あらゆる細胞機能を制御できること、生体に悪影響を及ぼさない性質としての生体親和性、適切な力学的強度や多孔性等の様々な性質が要求される。次節では、組織工学における足場材料の役割を明示すると共に、人工足場材料の作製例を概観する。

1.3 組織工学における足場材料

生体外で組織再生を誘導するには、細胞機能を制御するための三次元足場材料が不可欠である。生体微小環境を再現するために、これまでに天然 ECM を模倣した様々な足場材料が開発されてきた。本節では、ECM の役割を明示し、それを応用した機能性足場材料の作製例を概観する。そして、人工足場材料の課題について言及し、求められる特性について考察する。

1.3.1 ECM の役割

ECM とは、細胞が分泌したタンパク質や多糖類が集合することにより形成した網状構造体であり^[2]、細胞表面に存在する ECM の特異部位を認識するレセプターを介して相互作用することで、組織における高次ネットワークを形成している^[52]。そして生体組織はこの密接な相互作用によって、集団としての機能が制御されている。すなわち、ECM は組織の支持・結合、物理的強度の保持といった物理的機能の他に、ECM に対するレセプターによるシグナル伝達を介して、細胞の遊走、増殖、分化、形態変化、代謝等を細胞外から調整する重要な役割を担っている^[11]。

ECM は様々な成分によって構成されており、大別すると、細胞を支持するコラーゲン等の構造タンパク質、シグナル因子の保持・徐放を行うヘパラン硫酸等のグリコサミノグリカン、細胞との接着を担うフィブロネクチン等の細胞接着性タンパク質からなる^[53]。これから ECM の特性を模倣することは人工足場材料設計の指針となっている。また、ECM の持つ構造単位の解析により、短鎖ペプチドモチーフが ECM の生物学的機能を担う例が多数報告されている^[54,55]。例えば、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、RGDS^[56]、REDV^[57]、EILDV^[58]等が同定されている。次項では、こうした ECM の性質を応用した機能性足場材料の設計例について述べる。

1.3.2 ECM を応用した機能性足場材料の設計

前項で組織工学における ECM の重要性について述べた。しかしながら、動物由来の ECM は抗原性や感染症の危険から、臨床応用には利用できない。また、生産性やコストの面でも化学合成物と比較して劣っており、製品のロット間での物性が安定しにくいといった課題が存在する。そのため、これらの欠点を克服し、かつ ECM の機能性部位を利用することにより既存の ECM 機能を超えた人工足場材料の開発が進められている。以下に ECM の機能モチーフを応用した人工足場材料の設計例を示す。

ペプチド修飾ハイブリッド材料

ポリ乳酸等の生分解性ポリマーは、生産性が高く、容易に成形でき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が^[59]、細胞接着性に劣るという欠点がある。そこで、細胞接着能を有する RGD 配列を化学修飾することにより、細胞接着性を付与することに成功したという報告がなされている^[60-63]。したがって、こうした足場材料にペプチド修飾を施す戦略は、機能性足場材料を構築する有効な手法の一つであると言える。

しかしながら、修飾反応の過程を踏む必要があるため、その機能性は修飾反応の効率に左右されてしまう。また、合成ポリマー繊維の場合、その直径は 10-50 μm 程度であり^[64]、接着する細胞サイズに匹敵するため、細胞における認識は平面培養と同一である。つまり、細胞表面のレセプター分子は、シグナル因子等の物質が豊富な培養液と接触している面の細胞膜上に集中するため、細胞間コミュニケーションが生体内と異なってくると考えられる。さらに、ポアサイズにおいても同様の課題があり、生体内での遊走、浸潤等の挙動が反映されにくいといった問題が生じる。したがって、直径の大きなポリマー繊維からなる多孔質担体では、機能性ペプチドを修飾したとしても、生体内環境を模倣することは困難である。

機能性配列融合ポリペプチド

修飾効率に左右されない，生体内環境を模倣した機能性に優れた足場材料を得るために，ポリペプチドから成る足場担体に機能性ペプチドを組み込んだマトリックスタンパク質の構築が試みられている．例えば，蚕由来の絹様ファイバー構造を形成するシルクフィブロイン配列（GAGAGS）に様々な細胞接着性配列を融合した人工 silk-like 材料が開発されている^[65,66]．ポリペプチドに機能性配列を融合することにより人工足場材料を構築する戦略は，修飾効率によらず，さらなる高機能化が望めるため，有効な手法であると言える．しかしながら，忠実な生体内環境の再現には，解決すべき課題が存在する．次項では，人工足場材料の課題について言及し，求められる特性について考察する．

1.3.3 人工足場材料の課題

機能性三次元生体組織の構築を *in vitro* で実現させるには，ECM の機能を模倣し，生体内環境を再現する必要がある．そのためには，以下の特性を有する足場材料の開発が求められる．1) 三次元細胞培養が可能であること．2) ナノレベルのポアサイズを有した多孔質性を示すこと．3) 細胞接着能を有すること．4) シグナル因子の保持と徐放が制御可能であること．5) 生体親和性，生体吸収性が高いこと．

これまでに合成高分子，天然高分子，無機材料，及びこれらの複合体等，様々な足場材料が報告されているが，いずれにおいても克服すべき課題を抱えているのが現状であり，上記の特性を満たした高機能性三次元足場材料の開発は未だ困難なままである．次節では，上記の課題を解決し，三次元生体組織構築に向けて近年注目されている，超分子ハイドロゲルについて概説し，本研究において開発を目指す高機能性ハイドロゲル材料構築のための戦略について述べる．

1.4 機能性ハイドロゲル材料の設計

機能性三次元生体組織の構築には、生体内環境を模倣した三次元足場材料が不可欠である。本節では、次世代の足場材料として有望な候補である超分子ハイドロゲルについて概説し、特にペプチドあるいはタンパク質をベースとした超分子ハイドロゲルについて詳述する。そして、本研究で着目した Elastin-like polypeptide (ELP) の性質を示し、高機能性ハイドロゲルを構築するための戦略について述べる。

1.4.1 超分子ハイドロゲル

超分子ハイドロゲルは、モノマー分子が水素結合や π - π 相互作用、イオン性相互作用、疎水性相互作用等の非共有結合を介して自己組織化した、超分子ポリマーから構築されている点を最大の特徴としている。この特徴が従来の高分子ハイドロゲルとは異なる物性や機能を生んでおり、これまでに様々な分子骨格での設計戦略が立てられてきた。特に、タンパク質の構造安定化因子であるペプチドの二次構造骨格をモチーフとした超分子ハイドロゲルは、生分解性、生体適合性が高く、特異性の高い分子認識から規定された分子設計が可能であることから、組織工学分野での応用が期待されている。次項では、生体内の精密分子間相互作用制御システムを模倣することにより構築される自己組織化ペプチドあるいはタンパク質をベースとした超分子ハイドロゲルについて述べる。

1.4.2 自己組織化ペプチドハイドロゲル

ペプチドはナノスフィアやナノチューブ、ナノテープ、ナノファイバー、またハイドロゲルへと自発的に自己組織化させることが可能であり、その最終的な形を決定づける構造因子は Zhang により解析されている^[67]。典型的なデザインは、相補的なイオン性部位が反復規則的に挿入されている配列であり、それぞれのペプチド分子に含まれる相補的なグル

ープの存在が，自己組織化を左右する^[68,69]．例えば，ペプチド RADARADARADARADA (RADA16-I) は安定な β -sheet 構造を形成し，ナノファイバーからなるハイドロゲルへと自己組織化する．また，Yu らは逆の電荷を持つペプチドペアからなるシステムを報告している^[70,71]．相互の誘引に基づくモジュール設計戦略は，自己の電荷による反発により，自発的なゲル化，凝集を防ぐことができる．ゲル化は二種類のペプチド（e.g. acetyl-WKVKVKVKVK-amide, acetyl-EWEVEVEVEV-amide）の混合，あるいは pH 変化によるイオン化抑制が引き金となる．Messersmith らは疎水性残基と親水性残基が交互に含まれる 16 アミノ酸残基からなる FEK-16 ($\text{H}_2\text{N}-(\text{FEFEFKFK})_2\text{-COOH}$) を評価している^[72]．このペプチドは，一方の面が疎水性側鎖，もう一方の面が親水性側鎖となる β -sheet 構造へと自己組織化し^[73]，mM 濃度の無機塩存在下において， $>10 \text{ mg/mL}$ で強く架橋した繊維からなるハイドロゲルを形成する．この性質を利用し，リポソームからの塩徐放により，自己組織化が制御可能であることが示されている^[72]．Schneider らはペプチド分子内の折りたたみ制御によって，自己組織化が引き起こされるペプチド MAX1 ($\text{VKVKVKVKV}_D\text{PPTKVVKVKVKV-NH}_2$) を報告している^[74]．このペプチドは，高い β -sheet 構造の傾向を有する V, K 残基，ターン構造を形成するようデザインされたテトラペプチド (V_DPPT) からなっており^[75]， β -hairpin 構造の形成が pH 及び温度に依存することを利用し，ハイドロゲル形成の可逆的な制御を可能にしている．温度変化による自己組織化は，ペプチドの疎水性度により制御可能であり，pH9 において MAX1 は 25°C でハイドロゲルを形成するが，変異体 V16T は 40°C でゲル化する．また，2 つの変異を入れることにより（V7T, V16T）ペプチドの親水性をさらに高めると，ゲル化は 60°C で引き起こされる^[76-78]．

このようにペプチドの二次構造骨格を利用した非共有結合性相互作用の精密な配向制御と多点認識の協同効果で，分子を高次に自己組織化させた超分子ハイドロゲルの構築が可能である．ペプチドの自己組織化により形成するナノファイバーは，ナノサイズ効果，超分子配列効果，超比表面積効果といった特有の性質を有しており^[79]，魅力的なナノ材料と

言える。また、ゲル化した自己組織化ペプチドは、ナノファイバーによる三次元構造が維持され、ECM と類似した構造を形成することから、自己組織化ペプチドからなるデザインーハイドロゲルは、従来の三次元足場材料に代わる理想的な合成 ECM になりうる。また、自己組織化ペプチドのみから構成されたハイドロゲルだけでなく、ペプチドやタンパク質の生体認識ブロックを利用することにより、合成ポリペプチドを自己組織化させ、3D 構造を形成させることも可能である^[80-82]。これにより、あらゆる機能を付加した超分子ハイドロゲルの開発が実現しうる。

1.4.3 自己組織化タンパク質ハイドロゲル

タンパク質を自己組織化させるための認識モチーフは自然界より見出されており、coiled-coil 構造や β -sheet 構造等が知られている。2つ以上の α -helix 鎖により形成する coiled-coil 構造は^[83-87]、秩序立ったハイドロゲル構造をデザインするためのモチーフとして有用である。典型的な coiled-coil 構造の1次構造は7残基反復配列からなり、“a, b, c, d, e, f, g”で表される。“a, d”には、疎水性残基が位置し、ヘリックス間の疎水性コアが形成されることで、境界面の安定化に寄与する。“e, g”には、極性残基が位置し、静電相互作用が形成されることで、coiled-coil 構造の安定化、及びヘリックス間の特異的会合に貢献する (Figure 1-4)。この構造規則性と多様性がペプチドモチーフを利用する最大の魅力であり、アミノ酸配列の適切な設計により、規定された立体構造を有するハイドロゲルの設計につながる^[81]。

例えば、ランダムコイルブロック (B) と2つの coiled-coil 構造形成ブロック (A) からなる ABA triblock copolymer の自己組織化に関する研究が多くなされている^[88-92]。このタンパク質の自己組織化は、末端ヘリックスのオリゴマー形成と中心部の水溶性ランダムコイルのバランスによって引き起こされるため、coiled-coil ドメインのアミノ酸配列の調整によって、温度や pH 応答性が生まれる。例えば、coiled-coil モチーフを含むタンパク質の熱安定性は、helix ペプチドにおけるアミノ酸置換により調整可能であり^[89]、この変化は自己組織化ハイ

ドロゲルの刺激応答性に強い影響を与える。A ブロックの分子間会合は、ゲル形成における物理架橋を生むが、ABA 鎖は分子内ループを形成する傾向が強い^[93]。そこで、一方の A ブロックを A ブロックと互いに会合しない coiled-coil 構造形成ドメインである C ブロックへと置換した ABC block copolymer がデザインされ、分子内ループ形成を抑制できることが示されている^[90]。

タンパク質ハイドロゲルの性質は、しばしばその生体高分子構造を反映する。例えば、エラスチンやシルク類似ポリマーは広く研究されている自己組織化マテリアルである^[94-96]。エラスチン類似ポリペプチド (Elastin-like polypeptide, ELP) ベースのハイドロゲルは、ペンタペプチドの反復配列 $(VPGVG)_m(VPGXG)_n$ から設計されている^[97-99]。これらは温度が 25°C 以上になると収縮する。この現象は逆温度転移と呼ばれ、ELP の温度応答性は、構造変化に続く会合、凝集の結果であり^[100]、疎水性相互作用によって駆動させるため、相転移温度は、タンパク質の組成、イオン強度、pH 等によって調整可能である^[97]。これまでに架橋剤や γ 線を用いて化学架橋された ELP ゲルは多く報告されているが^[101-104]、疎水性が高く不均一に凝集しやすい ELP を均一なゲルとすることは難しく、ELP の温度応答性を利用した物理ゲル作製のアイディアは以前より存在していたが、実現は容易ではなく報告例は少ない。

Wright らは異なる機械的性質を有する親水性を高めた ELP 配列からなる triblock copolymer を合成し^[105]、弾性ハイドロゲルとなることを報告している。しかし、ゲル形成には 25 wt% もの高濃度の ELP が必要であった。近年では、Glassman らが $([I_{0.6}V_{0.4}]PAVG)_n$ の配列を有する ELP が相分離せずに均一なゲルを形成することを報告しているが、この場合にもゲル化には 10 wt% 以上のポリペプチドを要する^[106]。

ELP への機能性タンパク質モチーフの導入は、その自己組織化能を阻害しないことが報告されており、望む性質を持たせるため、2 つの構造モチーフを有するタンパク質類似ポリマーがデザインされている。例えば、直列反復したシルク類似ブロック (GAGAGS) とエラスチン類似ブロック (GVGVVP) からなる、シルク-エラスチン類似ポリマーがデザインされて

おり、自己組織化しハイドロゲルを形成することが報告されている^[107-110]。このシルク類似ブロックは、熱や化学的安定性を持つ β -sheet からなる水素結合結晶を自発的に形成し、エラスチン類似ブロックは、共重合体の結晶性を低下させ、柔軟性や水溶性を向上させる役割をもつ。

以上のように、生体内の精密分子間相互作用システムを模倣することは、分子会合を制御する上で有効な手法の一つであると言える。これら人工ペプチドの利点は、望みの位置に望みのアミノ酸を配置し、望みの機能を発揮させることができるといった、分子設計の自由度の高さにあり、新しい構造や機能を持ったバイオマテリアルの構築が期待される。したがって、これらを利用することにより、あらゆる性質を調整可能なデザイナーハイドロゲルになりうる。

実際、超分子ハイドロゲルの三次元足場材料としての利用が進められており、前節 1.3. 「組織工学における足場材料」で示した ECM 由来の活性モチーフを組み込んだ、優れた生物機能性を有する第 2 世代のデザイナー自己組織化ペプチド足場材料が開発されている^[111-113]。例えば、Zhang らによって開発された自己組織化ペプチド RADA16 にフィブロネクチン由来の RGD や骨形成成長ペプチド OGP (ALKRQGRTLYGFGG), 骨髄ホーミングペプチド (BMHP1: SKPPGTSS, BMHP2: PFSSTKT), ラミニン由来の IKVAV 等で機能化されたものが開発され、骨分化^[111]や神経細胞、グリア細胞への分化^[112,113]を促進したという報告がなされている。

また、三次元培養系においては、細胞に傷害を与えることなく包埋や回収を簡便に行うことのできる材料が求められており、外部環境変化に応答して機能する“スマートバイオマテリアル”が注目されている。次項では、本研究で着目した温度応答性を有する ELP の特性とスマートバイオマテリアルとしての利用について述べる。

1.4.4 スマートバイオマテリアルとしての Elastin-like polypeptide (ELP)

熱, 電気, 光, pH 等の外部刺激に応答してゲルが自律的に機能する“スマートゲル”^[114,115]の開発が盛んに行われており, 特に医療や医薬分野での期待は大きく, 薬物輸送システム (drug delivery system, DDS)^[116]や人工皮膚等の再生医工学への応用^[117], ゲルの三次元環境を利用した三次元細胞培養^[23,24]等への利用が注目されている.

生体組織の弾性繊維の主要成分であるエラスチンは, 生体適合性が高いことに加えて, 温度に応答し構造を変化させる性質を持つことから, 刺激応答性材料としても期待されている. エラスチンの構造変化は可逆的であるため, 熱応答性バイオマテリアルの構築に有用であり, 前項で例示した通り, 他のタンパク質ドメインやモチーフを組み込むことで機能付加が可能である. したがって, 目的に応じた融合タンパク質を容易に設計できるといった利点がある. 実際, 温度変化に応答して可逆的に凝集, 可溶化するエラスチンの性質を利用したアプリケーションが開発されており, 中でもエラスチンの疎水性ドメインからなる ELP の有用性が示されている^[118-121]. エラスチン内には特徴的な繰り返しペプチド配列が数種存在し^[122], 主要な繰り返し配列として, ペンタペプチド (GVGVP)_n, 及びヘキサペプチド (APGVGV)_n が知られている^[98,123]. この 2 種類のペプチド繰り返し配列は性質が異なり, (GVGVP)_n は弾性機能を有し, 特徴的な温度応答性のコアセルベーションを示すが, 細胞には認識されない^[124]. 一方で, (APGVGV)_n は加熱による構造変化は不可逆的で, 弾性及びコアセルベーションを示さないが^[125], 種々の細胞の遊走, 増殖, 血管形成等を誘導する^[126-129]. したがって, ELP の性質を利用することにより温度応答性や高い生理活性を有する高機能性マトリックスを構築することができると考えられる. ここでは, スマートバイオマテリアルとしての利用が期待される, 温度応答性を有する (GVGVP)_n の特性とその応用について詳述する.

(GVGVP)_n の温度特性

(GXGVP)_n (X≠Pro) のポリペプチドは、低温においては水溶液中に分散した状態で存在しているが、相転移温度 (T_i) を越えると相分離を起こし (コアセルベーション), ミクロコアセルベートと呼ばれる凝集体を形成する. このプロセスは可逆的であり, T_i より温度を下げることで元の均一溶液に戻る. T_i は (GXGVP)_n における X のアミノ酸残基の種類, 鎖長, タンパク質濃度, イオン強度等の影響を受けることが知られており [97,100,130-134], X の位置に疎水性の強いアミノ酸残基を導入すると低温側へ, 親水性の強いアミノ酸残基を導入すると高温側へ T_i がシフトする. また, イオン強度やペプチドの鎖長, 濃度の増加に伴い, T_i が低温側にシフトすることも明らかにされており, 相転移が疎水性相互作用により引き起こされることが強く示唆されている. 以上のことから, コアセルベーションの駆動力は疎水性の (GVGVP)_n 鎖周辺の水分子が脱水和する際のエントロピーの増大であり, (GVGVP)_n の構造変化 (β -spiral 構造の形成) に伴う分子会合によるエントロピー減少を補償する形で凝集が進行するものと考えられている [135].

(GVGVP)_n の応用

(GVGVP)_n は生体適合性が高いことが示されており [124], 体内に導入可能なゲル材料として注目されている [136]. また, DDS のキャリアとしての利用も進み [137], 徐々に崩壊し薬剤を放出する手法 [138] や薬剤を架橋した (GVGVP)_n を加温により特定部位へ蓄積させる手法 [139-141] 等, 応用利用が進められている. 当研究室においても, (GVGVP)_n にポリアスパラギン酸 (polyD) を付加することにより, 親水性と負電荷の反発力を持たせ, (GVGVP)_n の配向を制御し, 生理条件下でナノ粒子を形成させることに成功している [142]. さらに, (GVGVP)_n と比較して高い構造安定性を有する (AVGVP)_n [137] を利用することにより, 温度変化に強く, より安定性の高いナノ粒子の構築に成功している [143]. したがって, (AVGVP)_n を利用することにより, 高い生体親和性と構造安定性を有する理想的な温度応答性スマートゲルの構築が期待できる. また, polyD はポリペプチドの中でも特に生分解性に優れた高分子であるた

め^[144,145]，移植用のバイオマテリアルとしての利用も検討されている^[146-147]．さらに，親水性が高いため，両親媒性ポリマーの親水性ドメインとして多く利用されている^[148]．したがって，polyD を利用することにより，ELP の凝集を制御し，かつ生体親和性の高い優れたスマートハイドロゲルの構築が期待できる．

しかしながら，いかに優れたゲル材料を用いたとしても，天然 ECM が有する細胞接着能や分化誘導能といった機能を兼ね備え，シグナル因子の活性を制御できなければ，目的の組織誘導は困難である．すなわち，組織形成の制御には，ECM との相互作用に加えて，シグナル因子の作用を含めた相乗的なシグナル伝達が必要であり，シグナル因子の徐放を時空間的に制御可能なマテリアルが理想的である^[149]．そこで次項では，三次元生体組織構築に向けたシグナル因子の一体化戦略について述べる．

1.4.5 三次元生体組織構築に向けたシグナル因子一体化戦略

ペプチドやタンパク質からなる超分子ハイドロゲルは，天然 ECM に類似した微小力学的環境を有しているため，生体内での細胞挙動の再現が期待できる．しかしながら，組織形成の制御には，シグナル因子の作用を時空間的に制御する必要がある．したがって，シグナル因子をゲル材料に内包し，徐放化を図るシステム^[150,151]では，シグナル因子はゲルから単純拡散で放出されるため，この拡散性の制御には限界があり，組織形成の制御は困難である．そこで，ECM にシグナル因子を化学的・遺伝子工学的に導入することで足場タンパク質と成長因子を共有結合的に一体化した ECM が報告されている^[152-154]．これらは一定の成果をあげているものの，化学修飾で結合させた場合，結合の位置や数の制御，レセプターへの認識効率の低下等の問題があり，遺伝子工学的に導入した場合においても，共有結合で足場に固定化されることによって，シグナル因子の自由度の低下に付随し，機能活性の低下，さらには適切に徐放されないことによる過剰なシグナル伝達によって，がん化や細胞死等の悪影響を及ぼす可能性がある．また，自己組織化ペプチドは一般的に化学合成

で作られるため、成長因子のような比較的高分子量の機能性モチーフを導入するのには向かず、報告例も少ない^[155]。

そこで、ECM 結合認識部位を利用し、成長因子にフィブロネクチン由来のコラーゲン結合ドメインを融合することにより^[156-159]、高い細胞増殖活性を示したことが報告されている。また、酵母転写因子 GCN4 ロイシンジッパーモチーフを模倣して設計された、ヘテロ 2 量体 coiled-coil 構造を形成する helix ペプチド^[160]を利用することにより、足場タンパク質にシグナル因子を非共有的に結合させる方法が報告されている^[161-163]。したがって、coiled-coil 構造を形成する helix ペプチドは前述した自己組織化ペプチドの構築だけでなく、成長因子の結合ドメインとしての利用も可能である。

また、成長因子に修飾を施すのではなく、成長因子自身が有する ECM 結合部位を利用し、成長因子が認識できるように合成 ECM を改変することにより、静電相互作用等を介して成長因子を非共有結合的に保持させた例が報告されている^[164,165]。例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor, bFGF）や血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）等の成長因子が、強い負電荷を有するヘパリンやヘパラン硫酸に特異的に結合することを利用し、これらを修飾したバイオマテリアルが開発されている^[166-168]。また、当研究室においても ECM タンパク質に polyD (D₂₀) を導入することにより、D₂₀ が bFGF の静電的保持を向上させたことを報告している^[169]。したがって、前述の polyD は ELP の凝集制御機能だけでなく、bFGF や VEGF といった塩基性領域を有する成長因子の保持・デリバリーへの利用においても期待できる。

以上のことから、これらの方法論を模倣することにより、シグナル因子の時空間的徐放制御可能なデザイナー超分子ハイドロゲルの構築が可能になると考えられる。

1.5 本研究の目的と意義

本章では，組織工学における三次元足場材料の重要性を明示し，細胞機能を時空間的に制御可能な高機能性ゲル材料の開発が求められていることについて述べた。

そこで本研究では，接着，増殖，分化，組織形成等の細胞機能を時空間的に制御可能な高機能性三次元足場材料を構築することを目的とし，生体微小環境を模倣した新規タンパク質ハイドロゲルの開発を行った (Figure 1-5)．具体的には，生体親和性が高く特異性の高い分子認識により規定された分子設計が可能なタンパク質に着目し，helix ペプチドの coiled-coil 構造形成による自己組織化，及び elastin-like polypeptide (ELP) の温度応答性会合を利用した特異的分子間相互作用により，足場材料の自己組織化，及びハイドロゲル形成を試みた．さらに生理活性ペプチドの導入により足場材料の機能化を行い，加えて，helix ペプチドの特異的分子認識あるいは polyD を介した静電的相互作用を利用することによりシグナル因子の一体化を図った．本戦略を取ることで，機能性足場材料からなるハイドロゲル材料が望める他，シグナル因子を位置特異的かつ高密度に配置可能であるため，その効果の増幅，長期化，及び制御が期待でき，ECM とシグナル因子による相乗的なシグナル伝達によって，細胞機能の精密制御が可能になると考えられる．したがって，本材料は，これまで開発が難しかった時空間的な細胞機能制御を実現する理想的なデザイナー超分子ハイドロゲルであり，特定の組織に適した微小環境の再現につながると考えられ，本研究におけるタンパク質ハイドロゲルの設計論は新規性が高く，組織工学分野における発展に大きく貢献することが期待できる．

以降，第 2 章では Triple helix を形成する 3 種類のペプチド (hA, hB, hC) ^[170-171] を利用することにより，シグナル因子一体化型の自己組織化高機能性足場材料の設計，及び構築を行い，その特性を評価した．次いで，第 3 章では，温度応答性を有する ELP，及びアンチパラレルホモ四量体 coiled-coil 構造を形成する Coil-LL ペプチド (CL) ^[172] に着目し，それぞれ架橋点として利用することにより，温度応答性を有するスマートハイドロゲルの構築を行い，

その特性を評価した。そして、第 4 章では、構築した温度応答性タンパク質ハイドロゲルに ECM 由来の生理活性ペプチドを導入することにより、機能化を行った。さらに、polyD を介して静電的に成長因子を保持させることにより、成長因子一体化多機能タンパク質ハイドロゲルを作製し、その評価を行った。最後に、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、結論とした。

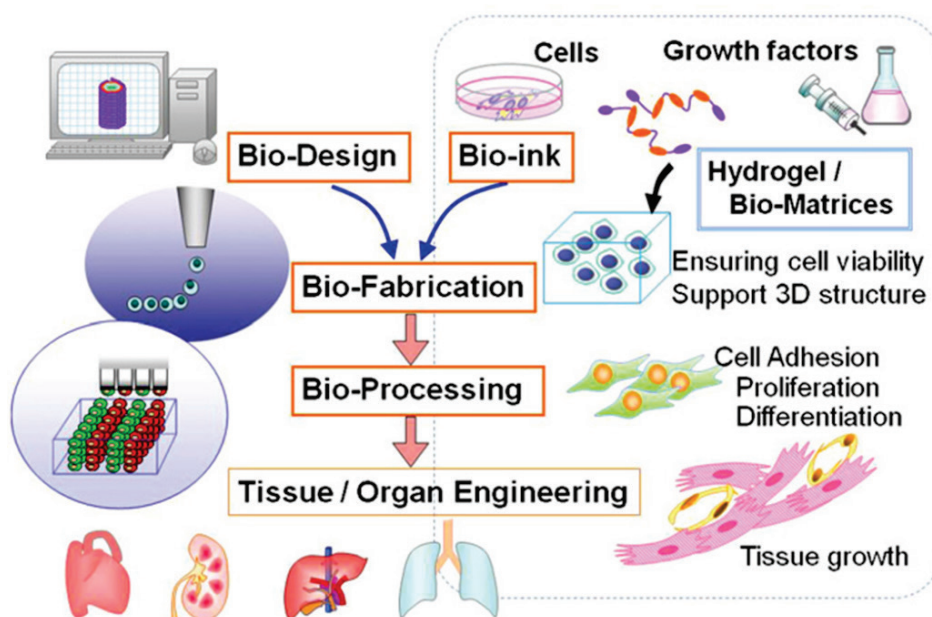


Figure 1-1 | 3D バイオプリンターを用いた細胞積層技術。 [4]

コンピュータの高い計算能力・制御能力を利用して，種々の細胞や ECM，シグナル因子を三次元的に配置することで，理論的には時空間的な細胞機能制御が可能となる．

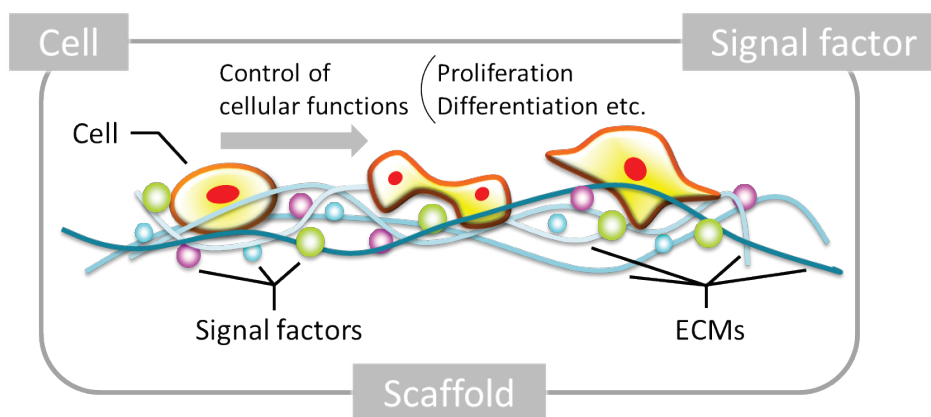


Figure 1-2 | 組織工学の概念図。 [35]

生体組織は，組織特有の様々な種類の細胞が，成長因子等の生理活性シグナルを受けながら，ECM と複合化した精巧な三次元ネットワークを形成することで組織としての機能が制御されている．したがって，細胞増殖や分化等のシグナルを高効率に伝えることができるよう，ECM とシグナル因子を組み合わせた高機能性三次元足場材料の開発が求められる．

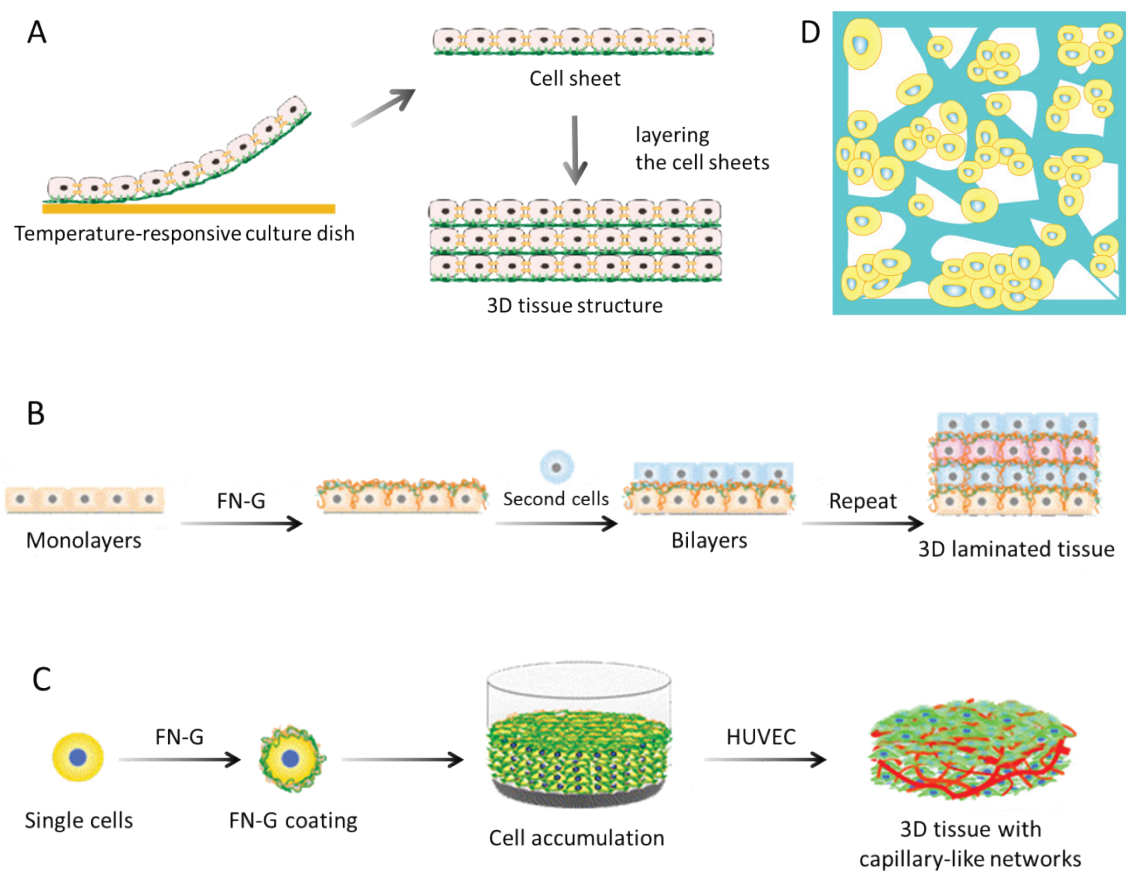


Figure 1-3 | 代表的な三次元細胞培養技術.

A: 細胞シート積層法^[39-45]. 温度応答性高分子を固定化した細胞培養皿を用いることで, 温度による培養細胞の接着・脱着の制御を行い, 細胞シートを作製し, これを積層することにより立体組織の構築を行う.

B: 細胞積層法^[46-48]. フィブロネクチン (FN) とゼラチン (G) の交互積層薄膜 (FN-G 薄膜) をおよそ 6 nm の膜厚で細胞表面に形成させることにより, 細胞を積層させる.

C: 細胞集積法^[49]. 単一細胞表面に FN-G 薄膜を形成させ, 各細胞が三次元的に相互作用できるようにすることで, 三次元組織体を構築する.

D: 多孔質担体内での培養^[50]. 内部に細胞が入り込める孔を持つ担体を用いることで, 人工的に生体内組織を模倣した環境で細胞培養を行うことができる.

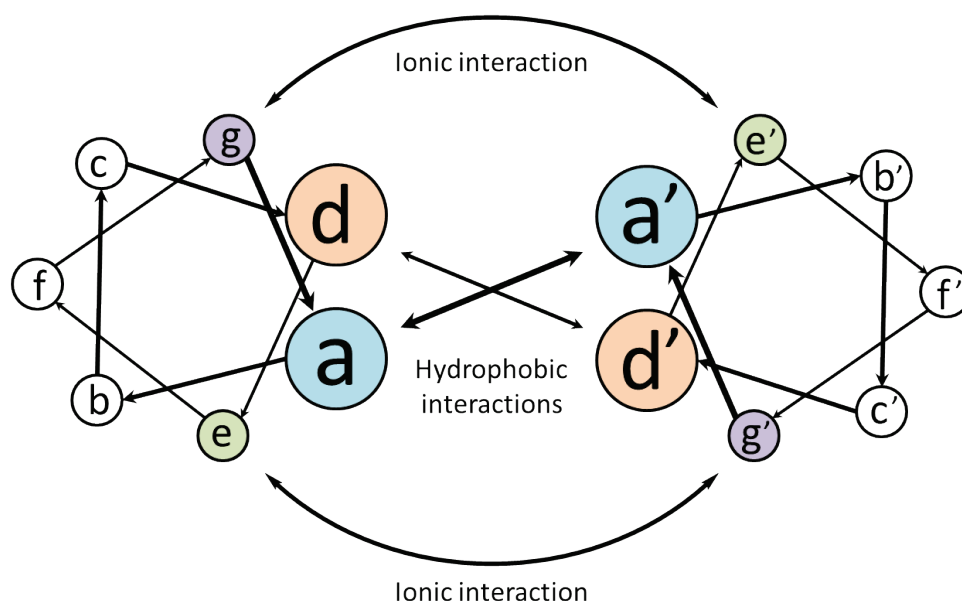


Figure 1-4 | coiled-coil モチーフを模倣した helix ペプチド. [86,160]

これらのペプチドは7残基反復配列における“a, d”の位置に疎水性残基が，“e, g”の位置にそれぞれ電荷の異なる極性残基が位置し，疎水性および静電相互作用が形成されることで，特異的な coiled-coil 構造を形成する．

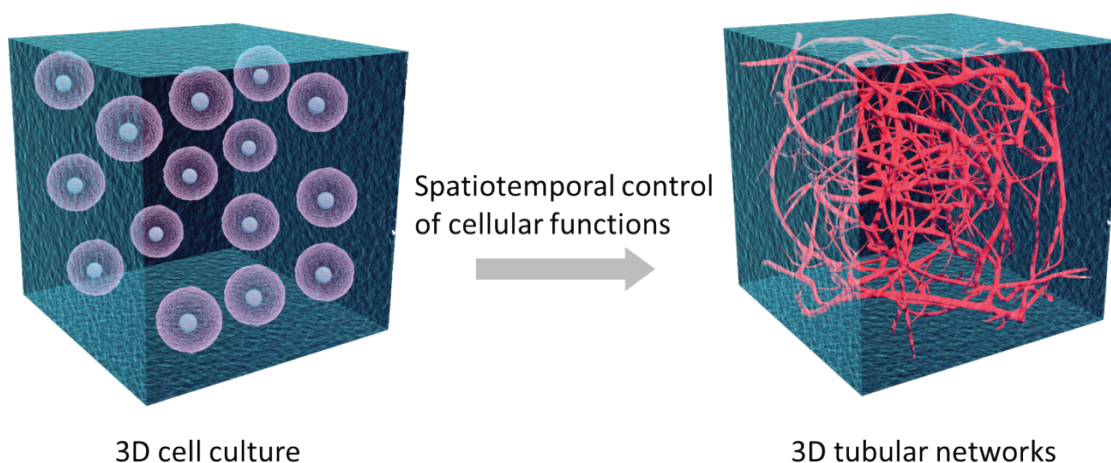


Figure 1-5 | 本研究における概念図．

自己組織化タンパク質からなる超分子ハイドロゲルを構築し，細胞をゲルに内包することで三次元培養を行う．自己組織化タンパク質ハイドロゲル中には，生理活性ペプチド，シグナル因子が存在し，生体微小環境を模倣した空間が形成される．これにより細胞機能の時空間的制御を試みた．本研究では，ヒト臍帯静脈内皮細胞（human umbilical vein endothelial cells, HUVEC）の三次元細胞培養を行い，三次元脈管ネットワーク形成の誘導を行った．

第 2 章

Triple helix を利用した 高機能性足場材料の構築

2.1 緒言

第 1 章では、機能性三次元生体組織を構築するには生体微小環境を再現することにより、細胞機能を時空間的に制御することが必要であると述べた。そこで本研究では、機能性ペプチド配列、及びシグナル因子を一体化した高機能性三次元足場材料の構築を目指した。

当研究室ではこれまでに、エラスチン由来の安定な構造骨格である APGVGV の 12 回繰り返し配列（E12）に細胞表面のインテグリンレセプターとの接着能を有する RGD 配列（R）を組み合わせた ERE タンパク質を遺伝子工学的に構築し、このタンパク質が ECM として利用可能であることを示してきた^[154]。しかしながら、ERE は自己組織化能を有さないため、三次元足場材料として利用することはできない。また、効果的な細胞機能制御のためには、シグナル因子の導入が不可欠である。そこで、この ERE タンパク質に自己組織化能、及びシグナル因子結合ドメインを付加するために、安定なヘテロ 3 量体を形成する、helix A (hA), helix B (hB), helix C (hC)^[170,171] を利用した（Figure 2-1）。なお、これらのヘリックスペプチドはヘテロ 3 量体だけでなく、結合力の異なるヘテロ 2 量体も形成する（A-C > B-C > A-B）。

まず、ERE の両末端に hA または hC を融合した hA-ERE-hA（ARA）、hC-ERE-hC（CRC）を遺伝子工学的に合成し、これらを混合することによって形成する自己組織化ナノファイバー（Figure 2-2A）の構築を試み、TEM による構造評価、及び細胞接着能評価を行った。

さらに、hB に塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）を融合した hB-bFGF の構築を行い、細胞増殖能評価、及び ARA-CRC からなる足場材料との coiled-coil 構造形成を介した結合能評価を行った。そして、構築したシグナル因子一体化型足場材料（Figure 2-2B）を用いて細胞増殖能評価を行い、高機能性足場材料としての有用性を検討した。

2.2 実験方法

2.2.1 実験試薬

プラスミドの作製時に用いた制限酵素及びその他の酵素類はタカラバイオ株式会社より購入した。遺伝子組換え及びタンパク質発現のために使用したプラスミドは Novagen 社より購入した。大腸菌 JM109 株はタカラバイオ株式会社, KRX 株は Promega 社, BL21(DE3)株は Novagen 社より購入した。オリゴ DNA は FASMAC 社に委託合成したものを使用した。TEM 観察用カーボン支持膜付グリッドはイーエムジャパン株式会社より購入した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 及び血管内皮細胞用培地 HuMedia EG-2 は KURABO 社より購入した。その他の試薬等は特筆しない限り特級のものを使用した。

2.2.2 プラスミド構築

本章では, E12-RGD-E12 (ERE) の両末端に helix A または helix C を融合した hA-ERE-hA (ARA), hC-ERE-hC (CRC), 及び hB の C 末端にフレキシブルなリンカー (GGGS)₈ を挟んで bFGF を融合した hB-(GGGS)₈-bFGF の構築を行った。hB-(GGGS)₈-bFGF に関して, bFGF が coiled-coil 構造を介して足場に固定化された時, 活性を失わず, 効率よく細胞にシグナルを送ることができるよう, hB と bFGF の間にリンカーを挟み, bFGF の自由度を高めた。また, 先行研究において, bFGF の C 末端側に他のタンパク質を融合した場合, 目的タンパク質の発現が見られなかったため, hB-(GGGS)₈ は bFGF の N 末端側に融合した。

プラスミドの構築には, 当研究室で作製済みの, pET32c-CHis-ERE, pET28b-hA-CHis, pET28b-hB-CHis, pET28b-hC-CHis, pBS-(GGGS)₈, pET32c-NHis-bFGF を用いた。プラスミド構築スキーム, 及び挿入したオリゴ DNA 配列を Figure 2-3, Figure 2-4 に示した。以下にそれぞれの構築スキームの詳細を示す。

pET28b-hA-ERE-hA-CHis

まず、アダプター配列 “*Bam*H I -*Bgl*II -*Bsp*H I -*Eco*R I ” (Figure 2-3B) を *Bam*H I , *Eco*R I で切断したクローニングベクターpUC18 に挿入することで pUC18-ERE-adapter を作製した。シーケンス確認後, *Bgl*II で切断を行い, このベクターに pET32c-NHis-ERE を *Bam*H I , *Bgl* II で処理することにより得られた ERE fragment を挿入し, 正しい向きに組み込まれているものを選択することで pUC18-ERE を得た。次に pUC18-ERE を *Bam*H I , *Eco*R I で処理することにより得られた ERE fragment を *Bam*H I , *Eco*R I で切断した pET28b-hA-CHis に挿入することで pET28b-hA-ERE-CHis を得た。続いて pET28b-hA-ERE-CHis を *Xba* I , *Bsp*H I で処理することにより得られた hA-ERE fragment を *Xba* I , *Nco* I で切断した pET28b-hA-CHis に挿入することで, タンパク質発現用プラスミド pET28b-hA-ERE-hA-CHis を作製した (Figure 2-3A).

pET28b-hC-ERE-hC-CHis

まず, pET28b-hA-ERE-hA-CHis 作製時に構築した pUC18-ERE を *Bam*H I , *Eco*R I で処理することにより得られた ERE fragment を *Bam*H I , *Eco*R I で切断した pET28b-hC-CHis に挿入することで, pET28b-hC-ERE-CHis を得た。続いて, pET28b-hC-ERE-CHis を *Xba* I , *Bsp*H I で処理することにより得られた hC-ERE fragment を *Xba* I , *Nco* I で切断した pET28b-hC-CHis に挿入することで, タンパク質発現用プラスミド pET28b-hC-ERE-hC-CHis を作製した (Figure 2-3A).

pET28b-hB-(GGGS)₈-bFGF-CHis

まず, pBS-(GGGS)₈ を *Bgl*II , *Eco*R I で処理することにより得られた (GGGS)₈ fragment を *Bam*H I , *Eco*R I で切断した pET28b-hB-CHis に挿入することで, pET28b-hB-(GGGS)₈-CHis を得た。続いて, アダプター配列 “*Nco* I -*Eco*R I -*Eco*R I *” (*¹ (Figure 2-4B) を *Nco* I , *Eco*R I で切断した pET32c-NHis-bFGF に挿入することで pET32c-NHis-adapter-bFGF を作製した (Figure 2-4A)。シーケンス確認後, *Nco* I , *Eco*R I で切断を行い, このベクターに pET28b-hB-(GGGS)₈-CHis

*¹: *Eco*R I * は *Eco*R I と同じ粘着末端を有しているが, 切断部位直前の 1 塩基を変えることで, *Eco*R I では切断できないように設計してある。

を *Nco* I, *Eco*R I で処理することにより得られた hB-(GGGS)₈ fragment を挿入することで、タンパク質発現用プラスミド pET32c-NHis-hB-(GGGS)₈-bFGF を作製した。

2.2.3 融合タンパク質の発現及び精製

hA-ERE-hA (ARA), hC-ERE-hC (CRC)

タンパク質発現用プラスミドで大腸菌 KRX 株を形質転換し、37℃において LB 培地 (kanamycin 20 µg/mL) 中で振盪培養を行った。O.D._{660 nm} = 0.6 に達した時点で、終濃度 0.1% の Rhamnose (Rham), 及び 1 mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、30℃にて 5 時間振盪培養することでタンパク質の発現誘導を行った。菌体は 10,000 rpm, 2 分の遠心により回収し、Benzonase Nuclease (Novagen) を添加した Bug Buster (Novagen) に懸濁し、30 分間室温にてローテーションを行うことにより溶菌させた。そして、破碎された大腸菌ライセートを 4℃, 8000 rpm 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。

可溶画分ライセート中に含まれる目的タンパク質は、ニッケルイオンを配位した His-select Nickel Affinity Resins (SIGMA) とヒスチジンタグ (His-tag) との配位結合を利用して、アフィニティー精製を行った。レジンを充填したポリプレップエンブティカラム (BioRad) を PBS で平衡化し、そこに可溶画分ライセートを添加した。4℃において、2 時間ローテーションを行い、目的タンパク質をレジンに吸着させた。フロースルーを除去し、非特異的に吸着したタンパク質を除去するために、レジンの 3 倍量の Wash buffer (20 mM Phosphate buffer, 0.5 M NaCl, pH 8.0) で 5 回洗浄を行った。さらに 5 mM Imidazole を含む Wash buffer で 3 回, 10 mM Imidazole を含む Wash buffer で 3 回, 15 mM Imidazole を含む Wash buffer で 1 回洗浄を行った。その後、Elution buffer (20 mM Phosphate buffer, 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazole, pH 7.4) をレジンと等量添加し、4℃で 30 分間インキュベートした後、目的タンパク質を溶出した。

hB-(GGGS)₈-bFGF (hB-bFGF)

タンパク質発現用プラスミドで大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換し、37℃において LB 培地 (ampicillin 50 µg/mL) 中で振盪培養を行った。O.D._{660 nm} = 0.6 に達した時点で、終濃度 10 µM の IPTG を添加し、16℃にて Overnight 振盪培養することでタンパク質の発現誘導を行った。菌体は 10,000 rpm, 2 分の遠心により回収し、Benzonase Nuclease (Novagen) を添加した Bug Buster (Novagen) に懸濁し、30 分間室温にてローテーションを行うことにより溶菌させた。そして、破碎された大腸菌ライセートを 4℃, 8000 rpm 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、同様にして His-tag を利用したアフィニティー精製を行うことにより回収した。レジン充填したポリプレップエンブティカラム (BioRad) に可溶画分ライセートを添加し、4℃において、2 時間ローテーションを行い、目的タンパク質をレジンを吸着させた。フロースルーを除去し、非特異的に吸着したタンパク質を除去するために、レジンの 3 倍量の Wash buffer (20 mM Phosphate buffer, 0.5 M NaCl, pH 8.0) で 5 回洗浄を行った。さらに 5 mM Imidazole を含む Wash buffer で 3 回、10 mM Imidazole を含む Wash buffer で 3 回洗浄を行った。その後、Elution buffer (20 mM Phosphate buffer, 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazole, pH 7.4) をレジンと等量添加し、4℃で 30 分間インキュベートした後、目的タンパク質を溶出した。

得られたタンパク質 ARA, CRC, hB-bFGF は、Amicon Ultra (Millipore) を用いた限外ろ過により、濃縮及び PBS へのバッファー置換を行った。そして、0.22 µm フィルターにより、ろ過滅菌を行い、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。hB-bFGF においては anti-bFGF antibody (Sigma) を用いて Dot blot を行うことにより発現を確認した。タンパク質濃度は BCA protein assay reagent kit (PIERCE) を用いて測定を行い、それぞれのタンパク質は 500 µL チューブに分注し、使用するまで -80℃に保存した。

2.2.4 透過型電子顕微鏡(TEM)による構造評価

観察にはカーボン支持膜付グリッドを用いた。支持膜は、事前に IB-2 型イオンコーター（株式会社エイコー）を用いて、3 mA, 30 秒間放電し、親水化処理を施した。これにより、タンパク質の吸着率を上げた。続いて、pH 7.0 の 3-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) を用いて 50 μ M に調製した ARA, CRC を当量混合し、4℃で 1 時間静置することにより自己組織化させた。サンプル 4 μ L を支持膜に 1 分間吸着させ、Milli-Q water (MQ) 4 μ L で wash した後、0.25%, pH 約 4.5 のリンタングステン酸 (PTA) を支持膜に滴下し、1 分間静置することによりネガティブ染色を行った。その後、室温において濾紙上で 2 時間以上、乾燥させた。さらに、メッシュを濾紙からケースに移し、一晚風乾させた。観察は透過型電子顕微鏡 H-7500 (HITACHI) を用い、120 kV の加速電圧で行った。

2.2.5 融合タンパク質の細胞接着能評価

固相表面にコーティングした helix 融合マトリックスタンパク質の細胞接着能を評価するために、浮遊培養用 96 well plate (SUMILON MS-8096R) に 100 nM に希釈したタンパク質 (ARA, CRC) を 100 μ L ずつ添加し、37℃にて 1 時間インキュベートを行い、プレート上に物理吸着させた。その後、タンパク質溶液を除去し、HuMedia-EG2 {2% ウシ胎児血清 (FBS), 10 ng/mL ヒト組換え型上皮成長因子 (hEGF), 1.34 μ g/mL ハイドロコーチゾン, 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} に懸濁した HUVEC を 10⁴ cells/well の密度で播種した。37℃にて 3 時間インキュベートした後に、PBS で洗浄することで非接着細胞を除去し、Cell counting kit-8 (CCK-8) (DOJINDO)により細胞接着能を評価した。CCK-8 は水溶性テトラゾリウム塩 (WST-8) を発色基質として用いており、WST-8 は還元されると 460 nm 付近に極大吸収を持つ水溶性ホルマザンを生成する。

細胞中の脱水素酵素により産生される NADH は、1-Methoxy PMS を介して WST-8 を橙色のホルマザンに還元する。このホルマザンの色素量は生細胞数と直線的な比例関係にあるため、吸光測定により高感度な生細胞数測定が可能である (Figure 2-5) ^[173,174]。WST-8 assay は、Cell counting kit-8 のプロトコルに従って行った。具体的には、培地の除去後、HuMedia-EG2 : Cell counting kit = 10 : 1 とした混合液を 100 μ L 添加して 37°C で 1 時間インキュベートを行い、その後 450 nm の吸光度を測定することにより生細胞数の評価を行った。測定値は 3 well の平均値とした。また、Calcein AM (DOJINDO) で染色を行い、各 well を蛍光顕微鏡で観察した。コントロールである ERE, Fibronectin も同様にコーティングを行い、対して PBS のみ添加したサンプルを non-coat とした。また、ERE を含まない hA-(GGGS)₈-hA (ALA), hC-(GGGS)₈-hC (CLC) もネガティブコントロールとして用意した。

2.2.6 遊離 bFGF 融合タンパク質の細胞増殖能評価

細胞増殖能は、融合タンパク質を添加した培地にて細胞を培養し、細胞数を WST-8 assay により評価した。細胞培養用 96 well plate (costar 3595) に HUVEC を 2000 cells/well の密度で播種し、bFGF を含まない HuMedia-EG2 に終濃度 0 nM, 10 nM, 100 nM, 500 nM となるように融合タンパク質 (hB-bFGF) を添加し、37°C でインキュベートを行った。培地交換は 1 日目, 4 日目に行い、その際に各濃度の融合タンパク質を添加した培地を使用した。WST-8 assay は、Cell counting kit-8 (DOJINDO) を用い、培地をアスピレーションにより除去し、HuMedia EG-2 {bFGF (-)} : Cell counting kit = 10 : 1 とした混合液を 100 μ L 添加して 37°C で 1 時間インキュベートを行い、その後 450 nm の吸光度を測定することにより生細胞数の評価を行った。測定値は 3 well の平均値とした。また、コントロールとして市販の Recombinant human bFGF (peprotech) を用い、同様にして培地に添加した。

2.2.7 helix 融合タンパク質間の結合能評価

helix 融合タンパク質, ARA, CRC, 及び hB-bFGF が設計通りに coiled-coil 構造の形成を介して結合しているかを確かめるため, ELISA 法を応用することで評価を行った.

タンパク質濃度依存的な結合評価

100 nM に PBS で希釈した ARA-CRC または ERE を浮遊培養用 96 well plate (SUMILON MS-8096R) に 100 μ L 添加し, 37°C で 1 時間インキュベートを行い, プレート上に物理吸着させた. その後タンパク質溶液を除去し, PBS-T (0.1% tween 20 含有 PBS) 200 μ L で 5 回洗浄後, Blocking One (ナカライテスク) 200 μ L を添加し, 37°C にて 1 時間インキュベートすることによりブロッキングを行った. ブロッキング後, 上清を除き, 200 μ L の PBS-T で 5 回洗浄を行った. その後, PBS で 0 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM に調製した hB-bFGF を 100 μ L 添加後, 37°C で 1 時間インキュベートし, PBS-T 200 μ L で 5 回洗浄を行った. そして, 5000 倍に希釈した 1 次抗体 rabbit-anti-bFGF (SIGMA) を 100 μ L 添加し, 室温で 40 分間抗原抗体反応を行った. PBS-T で 5 回洗浄後, 5000 倍に希釈した anti-rabbit-IgG (Santa Cruz Biotechnology) で 40 分間抗原抗体反応を行い, 再び PBS-T で 5 回洗浄後, 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) Horseradish peroxidase (HRP) substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., KPL) を 100 μ L 添加した. 2 分間反応させた後, 1N HCl を 100 μ L 添加することにより反応を停止させ, 450 nm の吸光度を測定した.

HRP は, 過酸化水素 H_2O_2 を酸化剤として, 基質 TMB を酸化することで 370 nm と 652 nm に極大吸収を持つ青色に発色させる. そして, 塩酸の反応停止液を加えることにより, 酸化反応が完結し, 450 nm に最大吸収を持つ黄色へ変化する (Figure 2-6) ^[175,176]. 得られるシグナルの強度は結合した HRP 標識抗体に比例するため, 吸光測定により高感度な検出が可能である.

hB ペプチドを用いた競合阻害による結合評価

100 nM に PBS で希釈した ARA-CRC を浮遊培養用 96 well plate (SUMILON MS-8096R) に、上記実験と同様にしてコーティング、洗浄、ブロッキングを行った。hB-bFGF を添加するステップにおいて hB-bFGF 終濃度を 100 nM とし、そこに helix B ペプチドを終濃度 0 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M となるように添加した。1 時間のインキュベート後、同様にして抗原抗体反応、及び発色反応を行った。

2.2.8 成長因子一体化 ECM における細胞増殖能評価

浮遊培養用 96 well plate (SUMILON MS-8096R) に 100 nM に希釈した融合タンパク質 (ARA, CRC) を 100 μ L ずつ添加し、37°C で 1 時間インキュベートを行い、プレート上に物理吸着させた。その後タンパク質溶液を除去し、200 μ L の PBS で 3 回洗浄後、10 nM に調製した hB-bFGF を 100 μ L 添加し、37°C で 1 時間インキュベートを行い、その後、200 μ L の PBS で 3 回洗浄を行った。そこに HuMedia-EG2 {hFGF-b (-)} に懸濁した HUVEC を 2000 cells/well となるように播種した。培地交換は 2 日目、5 日目、7 日目に行い、HuMedia-EG2 {hFGF-b (-)} を使用した。細胞数の測定は、Cell Counting Kit-8 を用いた WST-8 assay により 2, 7 日後の細胞数の変化を評価した。測定値は 3 well の平均値とした。また、コントロールとして市販の Recombinant human bFGF (peprotech) を用い、同様にして融合タンパク質 (ARA, CRC) と混合した。

2.3 実験結果及び考察

2.3.1 融合タンパク質の発現及び精製

設計した融合タンパク質 ARA, CRC は大腸菌 KRX 株において, hB-bFGF は BL21(DE3) 株において発現誘導を行った。各タンパク質はいずれも可溶画分から得られた。精製後の各タンパク質を SDS-PAGE で展開した結果を Figure 2-7 に示す。いずれのタンパク質も予想される位置にバンドが得られた。また、各タンパク質はほぼシングルバンドであった。さらに, hB-bFGF においては, anti-bFGF antibody を用いた Dot blot により発現を確認した (Figure 2-7D)。以上の結果から、目的のタンパク質を精製することができたと結論付けた。

2.3.2 TEM による構造評価

ARA, CRC の混合物が設計通りにナノファイバーを形成しているかを確認するため, TEM による形態観察を行った。その結果を Figure 2-8 に示す。ARA, CRC を混合したサンプルにおいて, ナノファイバーの形成が観察された。しかしながら, このナノファイバーは束を組んで, 直径 1000 nm 程度のファイバーを形成していた。そのため, 設計通りの自己組織化タンパク質の構築には成功したが, 本来の目的であるハイドロゲル形成には至らなかった。これは, ERE の高い疎水性に由来する凝集性により, 網目構造が潰れてしまったことが原因であると考えられる。凝集を制御し, ファイバーの太さを制御するには親水性ブロックの導入が有効であると考えられる。実際, ポリアスパラギン酸の導入により, その親水性と負電荷による反発力により ELP の凝集を制御し, サイズが制御されたナノ粒子が形成されることが示されている^[142,143]。したがって, ELP のような疎水性が強い ECM タンパク質の凝集は, ポリアスパラギン酸のような電荷を有するアミノ酸残基の導入により制御できる可能性がある。

2.3.3 融合タンパク質の細胞接着能評価

ARA, CRC からなる自己組織化ナノファイバーは、ハイドロゲルの形成には至らなかったが, Triple helix の形成を介した高機能性足場材料としての利用が可能であると考えられる. そこでまず, ARA, CRC の細胞接着能評価を行った. Figure 2-9A に WST-8 による細胞数計測の結果, Figure 2-9B に細胞観察の結果を示す. ARA, CRC をコーティングした表面への接着細胞量は, ネガティブコントロールである non coat 及び ERE を含まない hA-(GGGS)₈-hA (ALA), hC-(GGGS)₈-hC (CLC) よりも高くなることから, 作製した融合タンパク質は細胞接着能を持つことが示された. 融合タンパク質への細胞接着数は同濃度の ERE 及びフィブロネクチンと同等であり, helix を融合したタンパク質においても細胞接着能が保持されていることが示された. また, 細胞は伸展した形状をとっており, ERE 及びフィブロネクチンと同様の細胞形態であった.

2.3.4 遊離 bFGF 融合タンパク質の細胞増殖能評価

構築した hB-bFGF 融合タンパク質が成長因子としての活性を有しているか評価するため, hB-bFGF 融合タンパク質を添加した培地を用いて細胞の培養を行い, 細胞数の変化を評価した. HUVEC は, 低血清培養下では増殖の必須因子として bFGF の添加が必要とされている. WST-8 assay により各タンパク質を添加した時の細胞数の経時的変化を Figure 2-10 に示した. ネガティブコントロールである bFGF を含まない条件での培養と比較し, 構築した helix 融合タンパク質 hB-bFGF を加えた培養条件では顕著な細胞数の増加が見られた. また, 市販の bFGF と同等の活性が得られたことから, helix を融合したことによる bFGF の構造への影響はなく, 活性を保持することができたと考察できる. しかしながら, 増殖細胞数は hB-bFGF の濃度に依存しておらず, 500 nM の hB-bFGF を添加した条件において, 細胞増殖活性の低下が観察された. これは, タンパク質の精製時に取り除けなかった夾雑物質が,

高濃度において細胞毒性を誘起している可能性が考えられる。また、市販の bFGF を添加した場合において、10 nM の添加で細胞増殖活性が飽和に達し、濃度が高くなるにつれ、若干の活性低下が観察されていることから、夾雑物質に関わらず、高濃度における bFGF は細胞毒性を誘起する可能性も考えられる。したがって、添加する hB-bFGF 濃度は 10 nM 程度で十分であると考えられる。

2.3.5 helix 融合タンパク質間の結合能評価

helix 融合タンパク質 ARA-CRC, 及び hB-bFGF が設計通りに coiled-coil 構造の形成を介して結合しているかを確かめるため, Figure 2-11A に示す様に ELISA 法を応用することで評価を行った。

Figure 2-11B に ARA-CRC と hB-bFGF 間の結合能評価の結果を示す。グラフより, hB-bFGF の濃度依存的に結合量が増加していることが観察された。しかしながら, この結果は非特異的な結合が増加しているために, 全体の結合量が増えている可能性も示唆された。そこで, Figure 2-11C に示すような helix ペプチドを用いた競合阻害による評価を行った。

Figure 2-11D に競合阻害による結合評価の結果を示す。結果, helix B ペプチド濃度依存的に吸光度が減少していることが示された。このことから, helix 融合タンパク質は helix 部位特異的に結合しており, ARA-CRC と hB-bFGF は coiled-coil 構造の形成を介して部位特異的に結合していると考えられる。

2.3.6 成長因子一体化 ECM における細胞増殖能評価

Figure 2-12 に coiled-coil 構造の形成を介して, hB-bFGF を ARA-CRC からなる足場に固定化した状態での細胞増殖能評価の結果を示す。7 日間培養後, 10 nM hB-bFGF を固定化したものにおいて, hB を融合していない bFGF と比較して顕著な細胞数の増加が観察された。

この結果から，機能性足場タンパク質 ARA-CRC に coiled-coil 構造を介し，非共有結合的に固定化された hB-bFGF が，細胞に成長因子として作用し，細胞増殖を促進させたことが示された．コントロールとして hB を融合していない bFGF を用いた場合，bFGF を添加していない条件と比較し，細胞数の増加は認められるものの，その効果は hB-bFGF に比べ小さかった．hB を融合していない bFGF は ARA-CRC と結合できないため，培地交換で流出したものと考えられる．

2.4 結言

本章では, Triple helix を利用することで, ERE タンパク質に自己組織化能, 及びシグナル因子保持能を付加した高機能性足場材料の構築に成功した. まず, 足場材料骨格である ERE タンパク質の両末端に hA を結合した ARA, hC を結合した CRC の構築を行い, これらの融合タンパク質を混合することにより形成するナノファイバーを TEM で観察し, さらに細胞接着能を有することを示した. 次に, この ARA-CRC からなる足場材料に結合することのできる hB-bFGF の構築を行い, ELISA 法を応用することで, hB-bFGF が ARA-CRC に特異的に結合していることを示した. そして最後に, 構築したシグナル因子一体化型足場材料を用いて, 細胞増殖能の評価を行い, その優位性を示した.

以上より, 本章では, Triple helix を利用することにより, coiled-coil 構造の形成を介した足場材料の高機能化が可能であると結論付ける. したがって, 本手法を用いることにより, RGD 以外の機能性配列を組み込んだ足場骨格の自己組織化や bFGF 以外のシグナル因子を固定化することも可能であり, 目的組織に応じた細胞機能制御が可能になると考えられる (Figure 2-13).

しかしながら, 本研究の目的である三次元培養を行うためのハイドロゲルを構築することはできなかった. そこで次章では, 本章で得られた知見を踏まえ, 三次元空間を構築するための分子設計を行い, 高機能性タンパク質ハイドロゲルの開発を目指した.

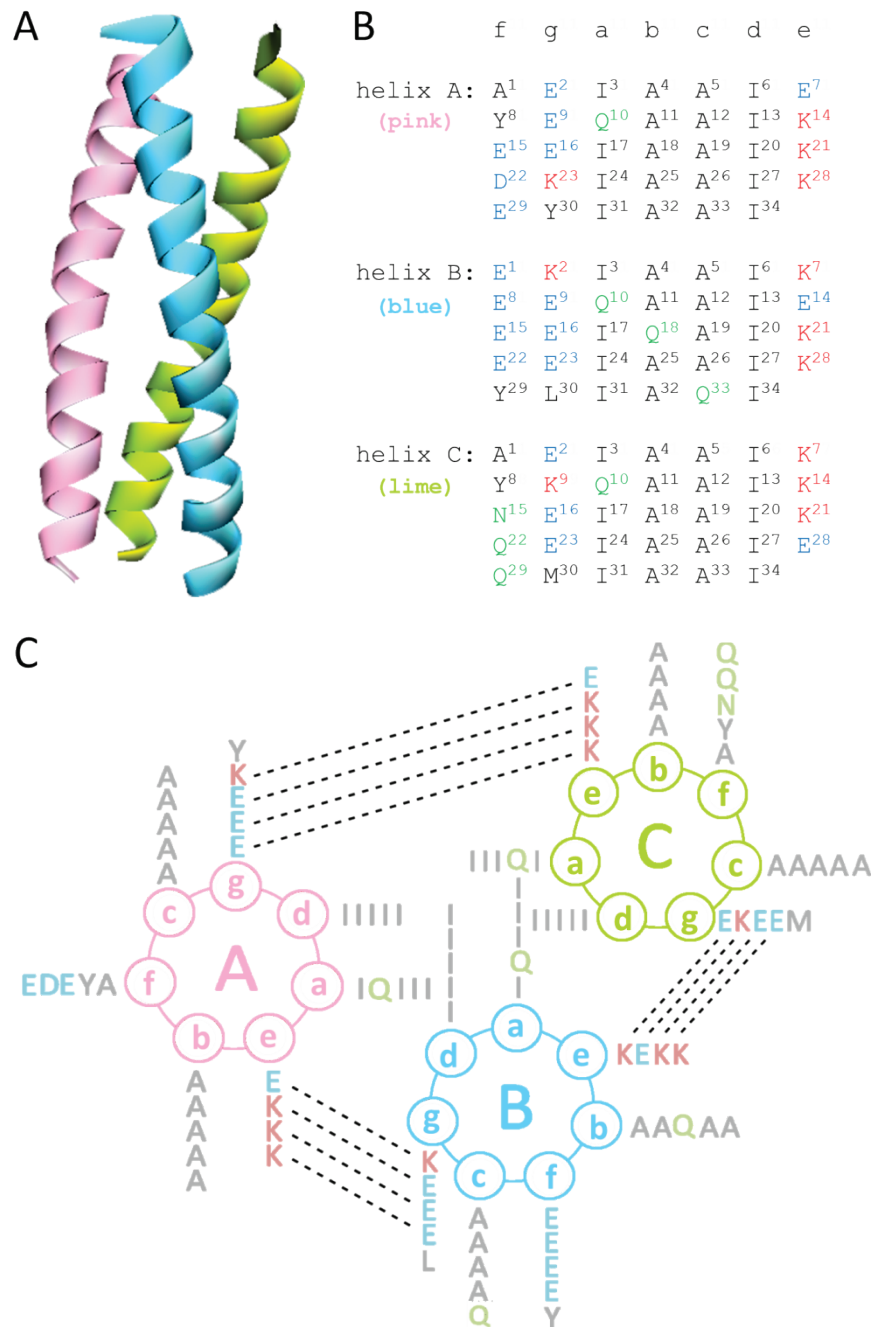


Figure 2-1 | Triple helix を形成する 3 種類の helix ペプチド. [170,171]

A: ヘテロトリマー-coiled-coil 構造を形成した hA, hB, hC の三次元構造。

B: hA, hB, hC のアミノ酸配列。7 残基反復配列における“a”と“d”の位置に Ile (I) が，“e”と“g”の位置に Lys (K) あるいは Glu (E) が配置されている。

C: Triple helix の結合様式。Glu と Lys 間のイオン性架橋と Ile の疎水性相互作用により，安定なヘテロ 3 量体 coiled coil 構造を形成する。

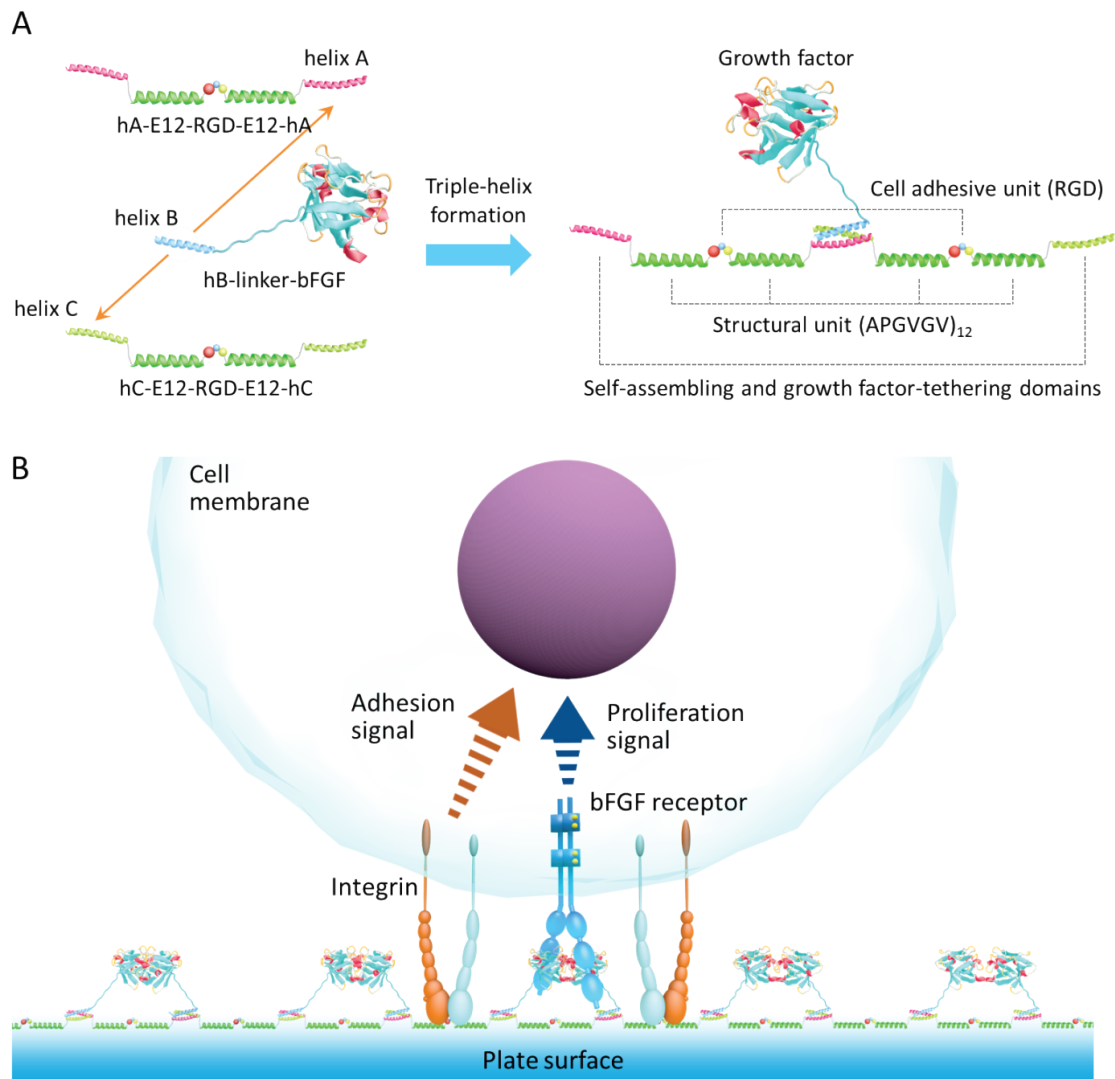


Figure 2-2 | 成長因子一体化自己組織化 ECM タンパク質の概念図。

A: ERE の両末端に hA または hC を融合した hA-ERE-hA (ARA), hC-ERE-hC (CRC) , 及び hB を融合した bFGF (hB-bFGF) を混合すると, hA, hB, hC 間で相互作用が生じ, Triple helix が形成されることにより, 自己組織化が起こり, bFGF が非共有結合的につながれたナノファイバーが形成する。

B: シグナル因子一体化高機能性足場材料上で細胞を培養することにより, 細胞はインテグリンからの細胞接着シグナルと bFGF からの細胞増殖シグナルを受け, この相乗的なシグナル伝達により効果的な細胞増殖が期待できる。

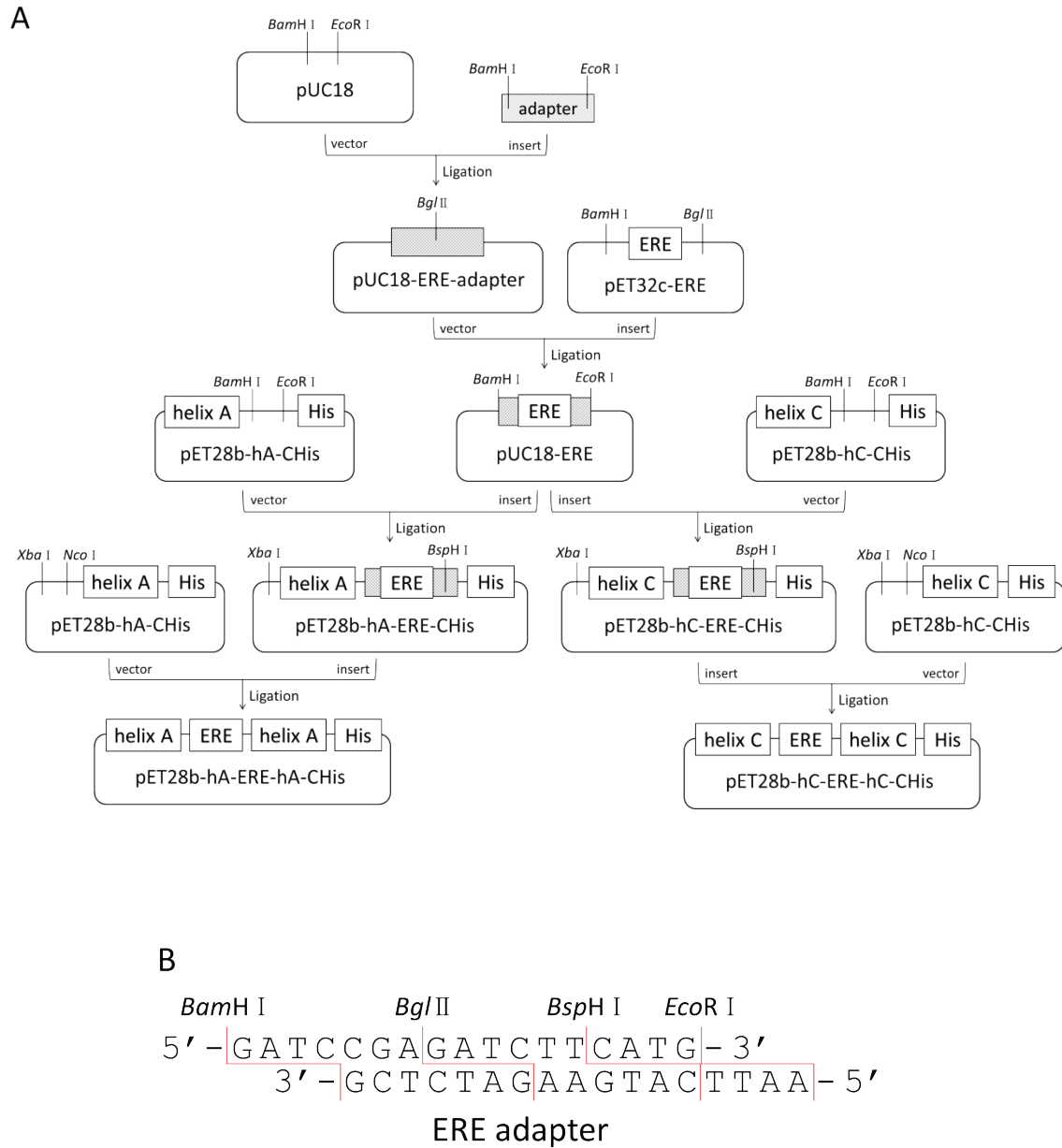


Figure 2-3 | helix 融合足場材料のプラスミド構築スキーム。

A: hA-ERE-hA (ARA), hC-ERE-hC (CRC) のプラスミド構築スキーム。

B: 挿入したオリゴ DNA 配列。ERE adapter。

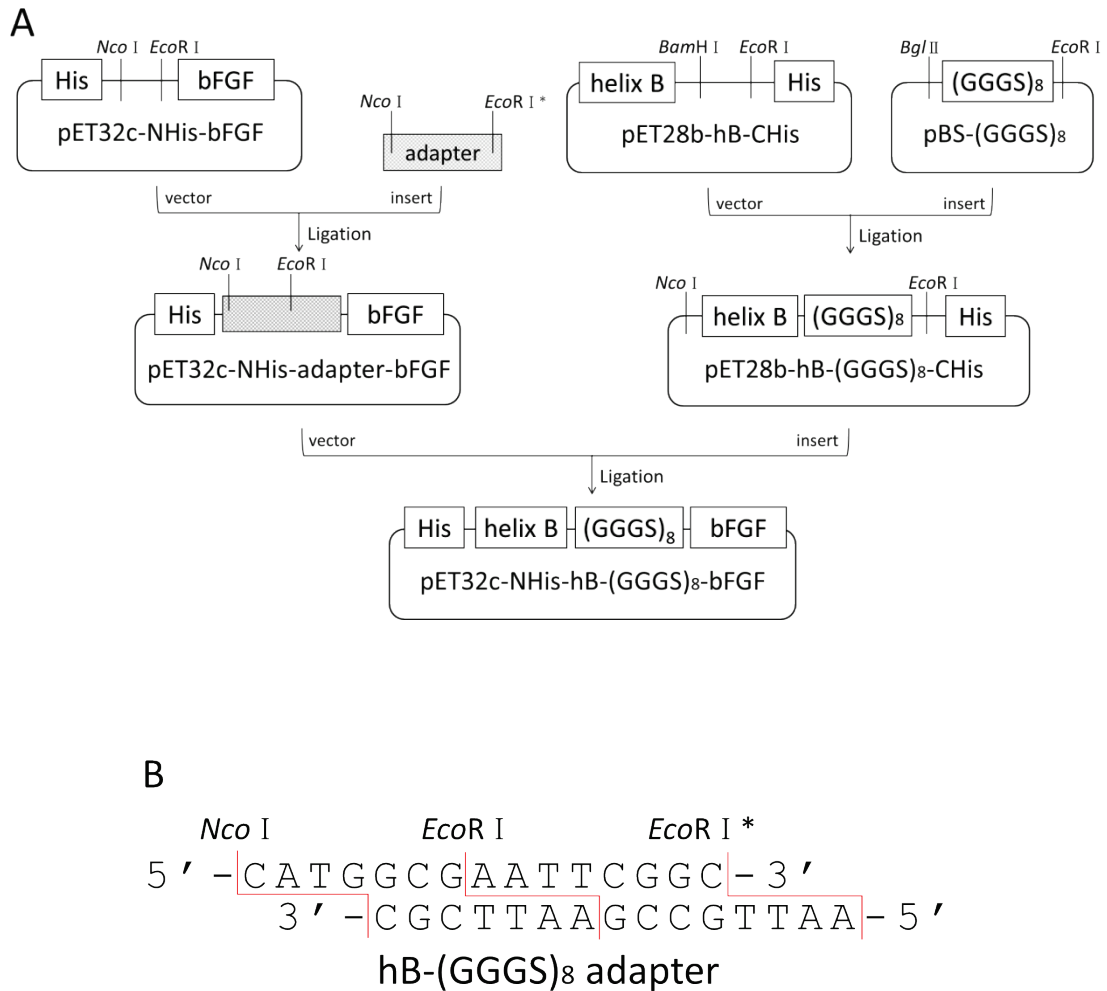


Figure 2-4 | helix 融合成長因子のプラスミド構築スキーム.

A: hB-bFGF のプラスミド構築スキーム.

B: 挿入したオリゴ DNA 配列. hB-(GGGS)₈ adapter. *EcoR I* *は *EcoR I* と同じ粘着末端を有しているが, 切断部位直前の 1 塩基を変えることで, *EcoR I* では切断できないように設計している.

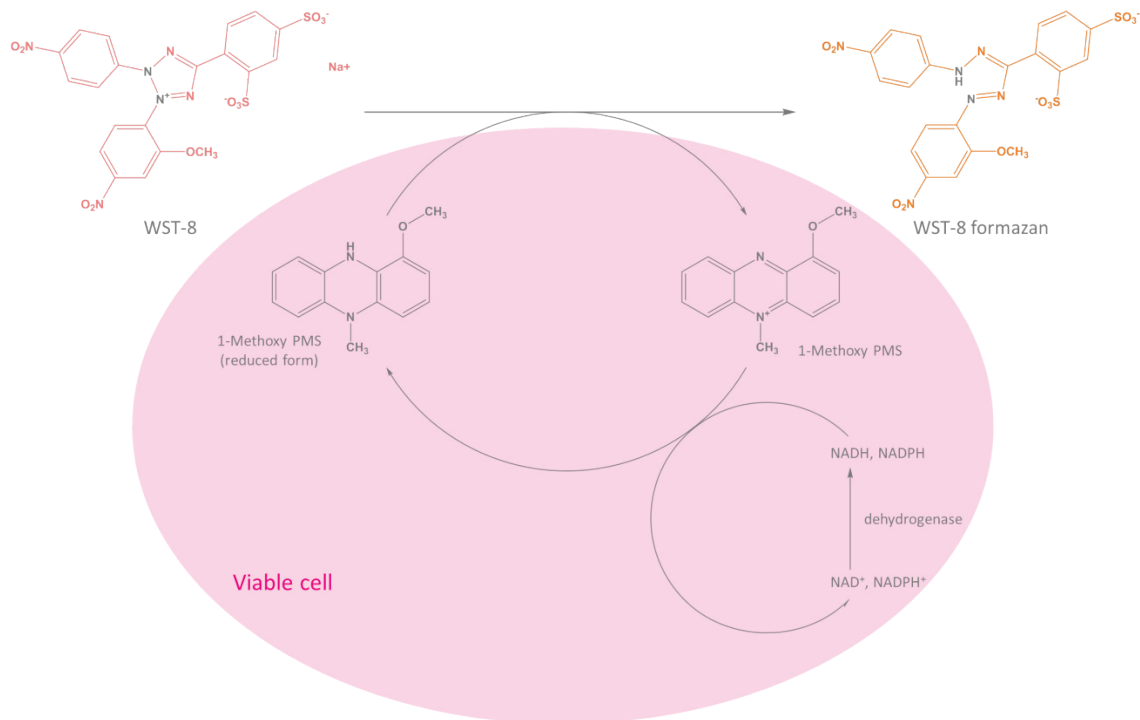


Figure 2-5 | WST-8 assay の原理. [173,174]

WST-8 が電子メディエーター存在下，細胞中の脱水素酵素により還元され，橙色の生成物（ホルマザン）を生じる．細胞内脱水素酵素活性に応じて産出される NADH, NADPH は，1-Methoxy PMS を介して WST-8 をホルマザンに還元する．このホルマザンの色素量は，生細胞数に比例する．

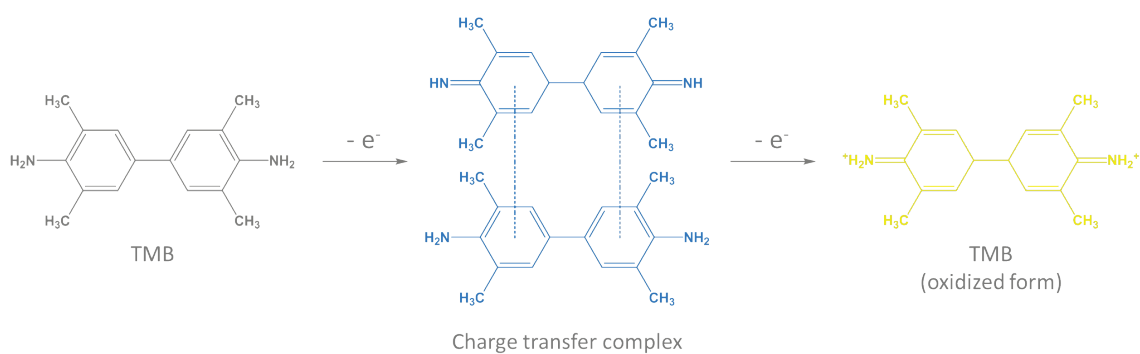


Figure 2-6 | テトラメチルベンジジン（TMB）の発色原理. [175,176]

Horse Radish Peroxidase (HRP) は，過酸化水素 H_2O_2 を酸化剤として，基質 TMB を酸化することで 370 nm と 652 nm に極大吸収を持つ青色に発色させる．そして，塩酸の反応停止液を加えることにより，酸化反応が完結し，450 nm に最大吸収を持つ黄色へ変化する．

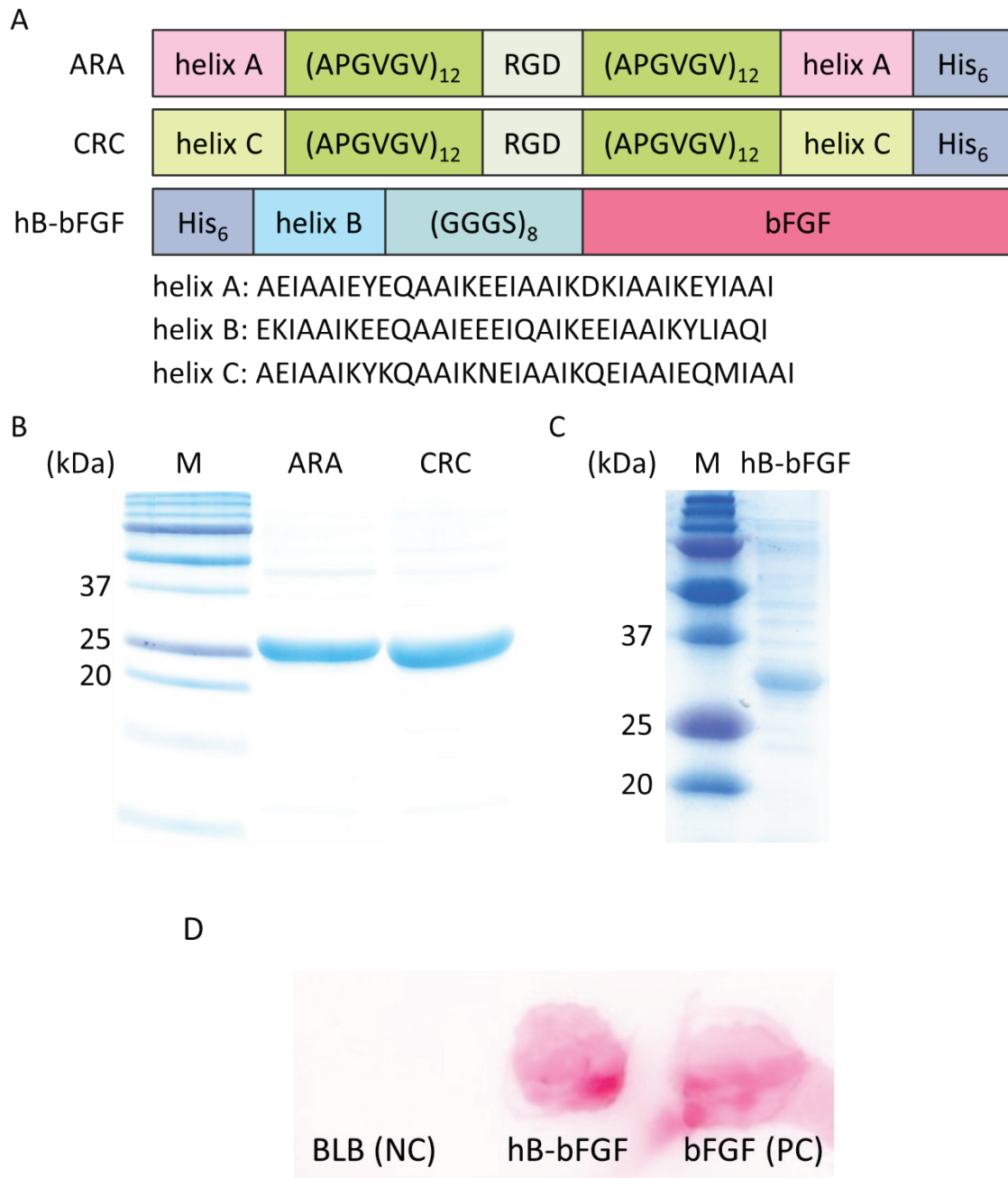


Figure 2-7 | ヘリックス融合タンパク質の発現と精製.

A: ヘリックス融合タンパク質の設計.

B: 精製後の ARA, CRC タンパク質の SDS-PAGE による展開. ARA, CRC: 24.4 kDa.

C: 精製後の hB-bFGF タンパク質の SDS-PAGE による展開. hB-bFGF: 30.0 kDa.

D: anti-bFGF antibody を用いた Dot blot による発現確認. Left: hB-(GGGS)₈-hB (BLB, negative control). Center: hB-(GGGS)₈-bFGF (hB-bFGF). Right: bFGF (positive control).

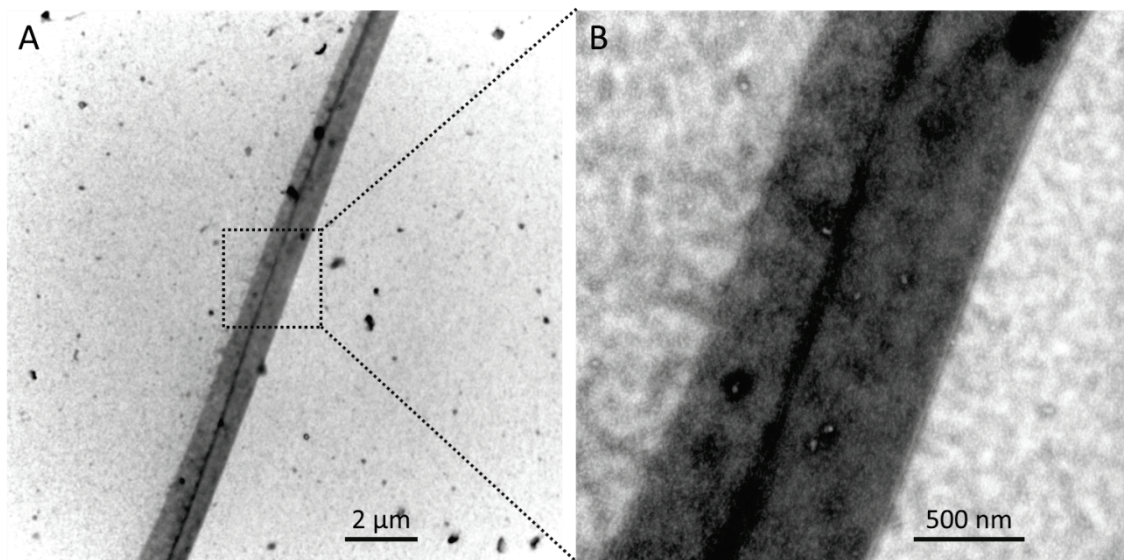


Figure 2-8 | ARA, CRC 混合物の TEM 観察結果.

50 μ M に調製した ARA, CRC を当量混合し, 4℃で 1 時間静置することにより自己組織化させた. 数 nm のファイバーが束を組み, 直径 1000 nm 程度の繊維が観察された. A: 10,000 倍観察. B: 60,000 倍観察.

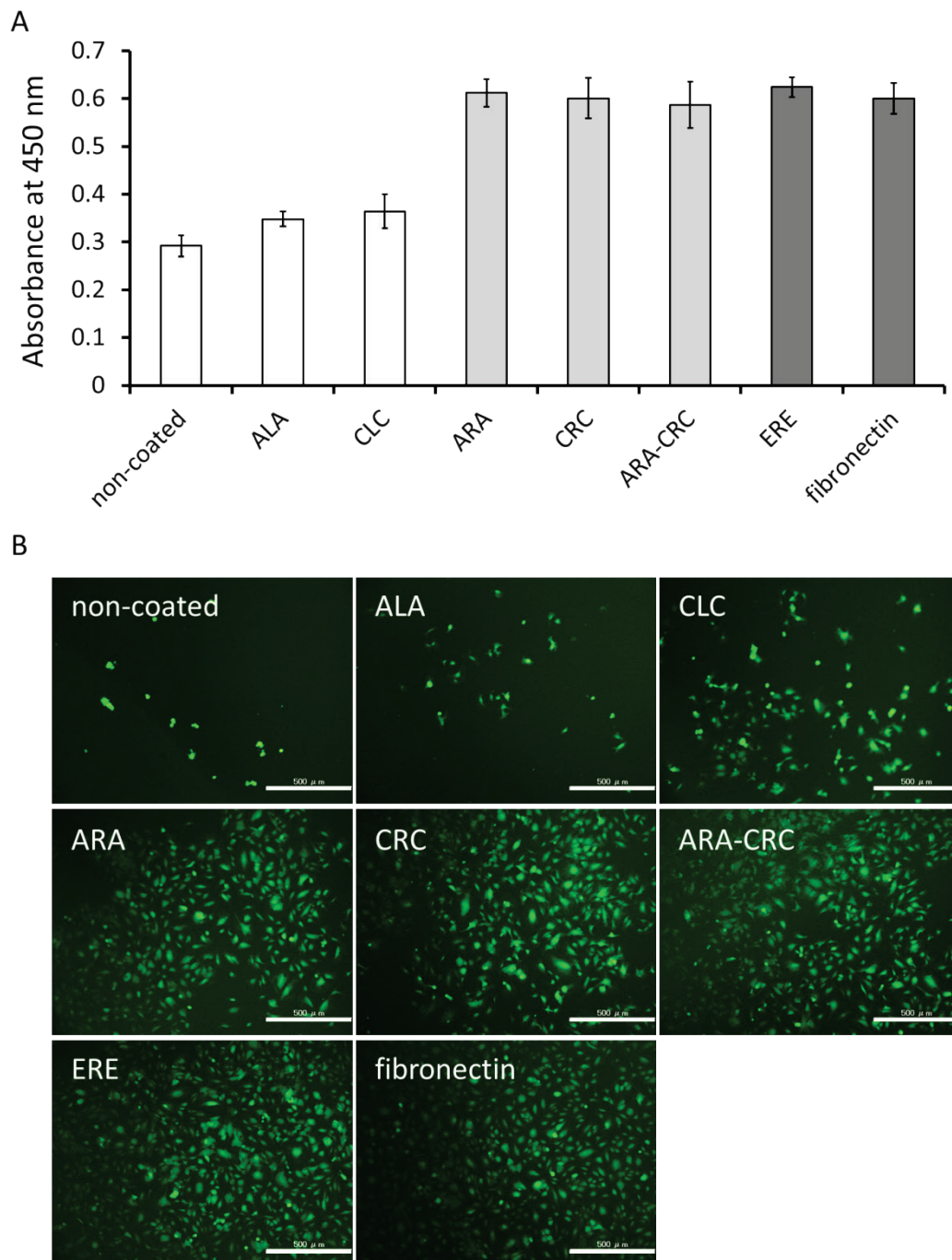


Figure 2-9 | ARA, CRC の細胞接着能評価.

A: WST-8 assay による生細胞数測定. ARA, CRC は同濃度の fibronectin と同等の細胞接着能を示した. Scale bar = 500 μ m.

B: 蛍光顕微鏡による Calcein-AM 染色後の細胞観察. ARA, CRC をコーティングしたものにおいて, 細胞の接着, 伸展が観察された.

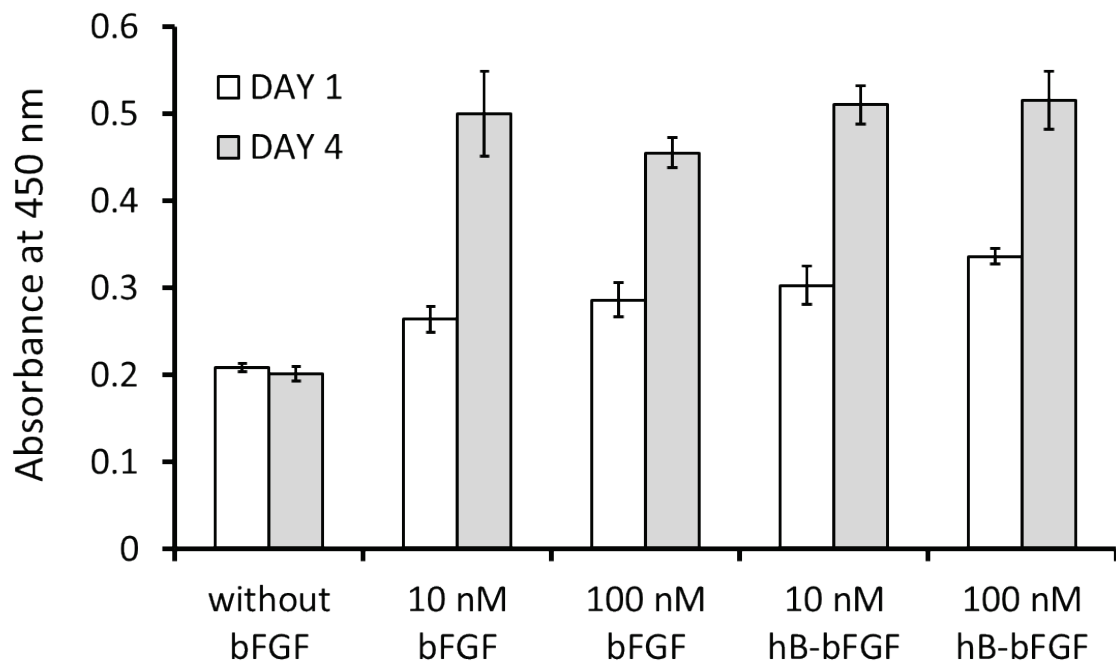


Figure 2-10 | 遊離 hB-bFGF の細胞増殖能評価.

hB-bFGF を加えた培養条件では顕著な細胞数の増加が観察され, 市販の bFGF と同等の活性を示した.

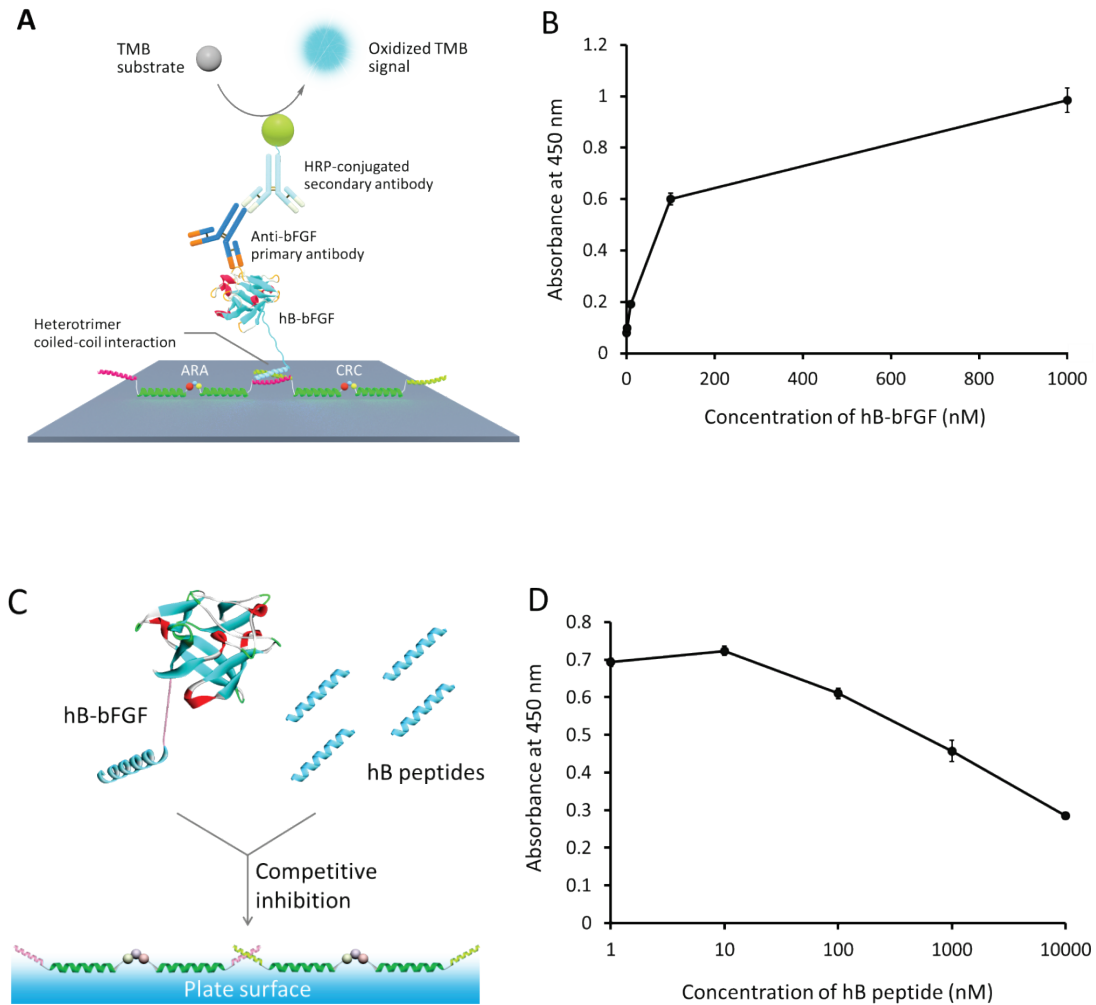


Figure 2-11 | helix 融合タンパク質間の結合能評価.

- A: ELISA による結合評価の概念図.
- B: hB-bFGF の濃度依存性による結合量変化.
- C: hB ペプチドによる競合阻害の概念図.
- D: hB ペプチドを用いた競合阻害による hB-bFGF 結合量の変化.

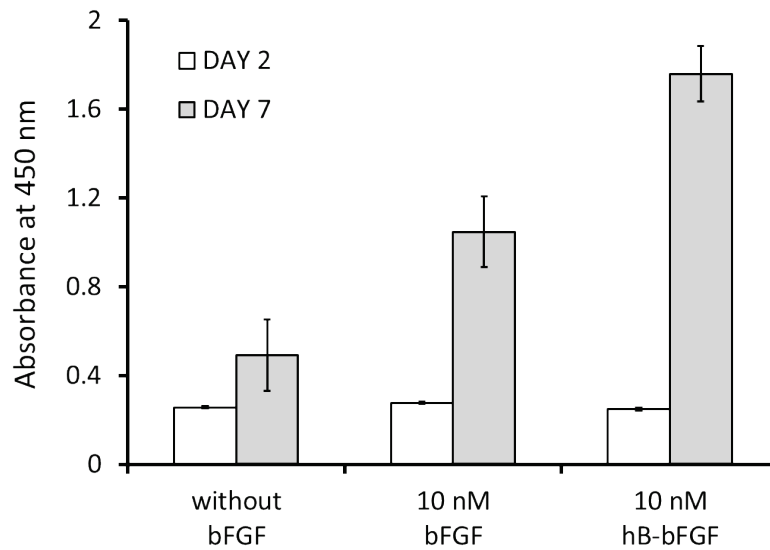


Figure 2-12 | bFGF 固定化足場材料における細胞増殖能評価.

hB-bFGF を ARA-CRC に固定化したものにおいて、hB を融合していない bFGF と比較して顕著な細胞数の増加が観察された。

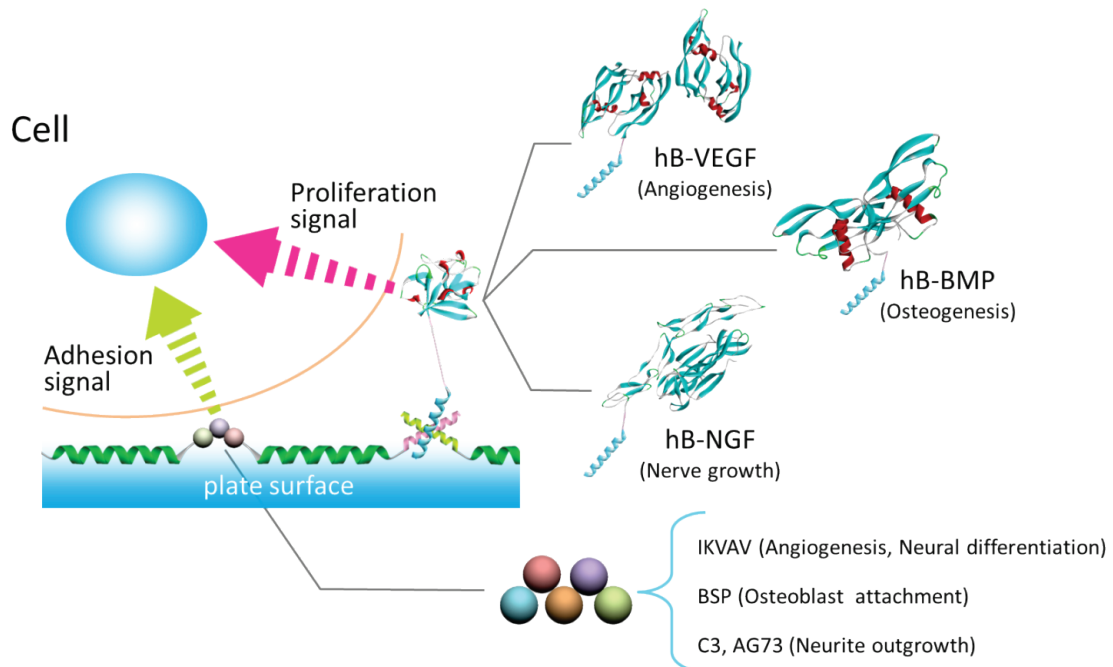


Figure 2-13 | 目的組織に応じた機能性足場材料の構築.

本手法の利点は、分子設計の自由度の高さにあり、目的組織に応じた、機能性ペプチド配列やシグナルタンパク質を組み込んだ高機能性足場材料の構築が可能である。

第3章

ELP を利用した温度応答性 タンパク質ハイドロゲルの構築

3.1 緒言

第2章では, Triple helix を組み込んだ分子設計により, 機能性足場骨格に自己組織化能, 及びシグナル因子保持能を付加することに成功した. しかしながら, ELP は疎水性が高く不均一に凝集しやすい性質をもつため, 均一なゲルとすることは難しく, 三次元培養を行うためのハイドロゲル創出には至らなかった. そこで本章では, ELP の凝集を制御し親水性を高めるためのブロックとしてポリアスパラギン酸 (polyD) に着目した. すでに, 当研究室において, polyD 融合 ELP (ELP-D) を構築し, この両親媒性の ELP-D は polyD ブロックの負電荷による電子的反発によりサイズが制御されたナノ粒子を形成することを示している (Figure 3-1A) ^[142,143]. また, ハイドロゲルの構築には三次元網目構造体を形成させるための架橋点の導入が不可欠であり, 第2章で示した coiled-coil 構造を形成する helix ペプチドの導入は有効であると考えられる. ハイドロゲルの力学的特性は架橋構造によって左右される事が報告されており ^[177], 架橋点の密度を増加させることにより, 機械的強度の高いゲルが得られる事が知られている ^[178]. したがって, coiled-coil 構造を形成する helix ペプチドの会合数や配向性を検討する必要がある, 3次元ネットワークの形成には多分岐かつアンチパラレル様式の coiled-coil モチーフが適していると考えられる. 本研究では, アンチパラレルホモ四量体 coiled-coil 構造を形成する Coil-LL ペプチド (CL) に着目し, CL を導入することにより, ハイドロゲルの構築を試みた. CL は非常に低い解離定数 ($K_d = 3.4 \times 10^{-16} \text{ M}^3$) と高い融解温度 ($T_m > 80^\circ\text{C}$) を有しているため, CL のマトリックスタンパク質への導入は安定なハイドロゲル形成に役立つことが期待できる. また本研究では, より実用性の高い三次元足場材料とするため, ELP の中でも可逆的な温度応答能, すなわち低温では分散状態で存在するが, 相転移温度 (T_i) を越えると相分離を起こし凝集体を形成する性質, を持つ (AVGVP)_n を採用することにより, 細胞に傷害を与えることなく, 細胞の包埋や回収を簡便に行うことを可能にした新規温度応答性ゲル化タンパク質の構築を行った. また, (AVGVP)_n モチーフは Figure 3-1B に示すように, 一度相転移温度 (T_i) を超え凝集体を形成すると,

T_i より大幅に冷却しない限り、その凝集体は解離しない^[137]。したがって、 $(AVGVP)_n$ から構成される温度応答性ハイドロゲルは、一度ゲルを形成すれば、 T_i 以下でも安定的に保持されると期待できる。また、さらに低い温度まで冷却すればゲルはゾル状態へ戻ることが推察されるため、トリプシンやコラゲナーゼ等のプロテアーゼを使用することなく、容易に細胞を回収可能であると考えられる。

本研究では、感温性ポリペプチド配列 $(AVGVP)_{42}$ に静電的反発により凝集を制御する polyD (D_n)、架橋点となる CL を連結した融合タンパク質 $(AVGVP)_{42}$ - D_n -CL (coiled-coil unit bound ELP: CUBE) を遺伝子工学的に構築した。CUBE モノマーは CL の coiled-coil 構造形成により自己組織化し、温度応答性の ELP がそれぞれ両末端に位置する四本腕のタンパク質複合体を形成する (Figure 3-2A)。温度上昇により、ELP の T_i 以上になると ELP の β -spiral 構造への構造変化が起き、これに伴った疎水性相互作用により CUBE の 3D ネットワークの形成が期待できる (Figure 3-2B)。また polyD を導入することによって、親水性と電子的反発によって ELP の不均一な凝集が抑制されるより、多孔質性が生まれ、ハイドロゲルの形成が期待できる。本章では、ELP の凝集制御機能、及びハイドロゲルの形成・形態に与える影響を確かめるため、 D_n の長さが異なる3種類 ($n=0, 44, 88$) の CUBE を作製した。そして、構築した CUBE の温度変化に依存したゲル化能、レオメーターによる粘弾性測定、TEM による構造評価を行った。さらに CUBE ゲル内で細胞培養が可能かを評価するため、ヒト肺基底上皮腺がん細胞 (A549) を用いて、三次元培養下での細胞形態観察を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 実験試薬

プラスミドの作製時に用いた制限酵素及びその他の酵素類はタカラバイオ株式会社より購入した。遺伝子組換え及びタンパク質発現のために使用したプラスミドは Novagen 社より購入した。大腸菌 JM109 株はタカラバイオ株式会社, BL21(DE3) 株は Novagen 社より購入した。オリゴ DNA は FASMAC 社に委託合成したものを使用した。TEM 観察用カーボン支持膜付グリッドはイーエムジャパン株式会社より購入した。ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞 (A549) は RIKEN BioResource Center より購入した。細胞培養培地 DMEM は和光純薬工業株式会社より購入した。その他の試薬等は特筆しない限り特級のものを使用した。

3.2.2 プラスミド構築

本章では, polyD の長さの異なる 3 種類の CUBEs: (AVGVP)₄₂-D_n-CL ($n=0, 44, 88$) の構築を行った。プラスミド構築スキーム, 及び挿入したオリゴ DNA 配列を Figure 3-3 に示した。以下にそれぞれの構築スキームの詳細を示す。

まず, アダプター配列 “*Xba* I -*Sal* I -*Nco* I ” (Figure 3-3B) を *Xba* I , *Nco* I で切断した pET28b-CHis に挿入することで pET28b-adapter-CHis を作製した。シーケンス確認後, *Nco* I , *Xho* I で切断を行い, このベクターに Coil-LL 遺伝子をコードする pUCFk-CL を *Nco* I , *Sal* I で処理することにより得られた CL fragment を挿入し, pET28b-adapter-CL-CHis を得た。

(AVGVP)₄₂-D₄₄, (AVGVP)₄₂-D₈₈ フラグメントを得るために, 当研究室で作製済みの pET28b-(AVGVP)₄₂-D₄₄-CHis, pET28b-(AVGVP)₄₂-D₈₈-CHis をそれぞれ *Xba* I , *Xho* I で切断した。得られたフラグメントを *Xba* I , *Sal* I で切断した pET28b-adapter-CHis にそれぞれ挿入することで, pET28b-(AVGVP)₄₂-D₄₄-CL-CHis, pET28b-(AVGVP)₄₂-D₈₈-CL-CHis を得た。

pET28b-(AVGVP)₄₂-CL-CHis は、pET28b-(AVGVP)₄₂-D₄₄-CL-CHis を *Sal* I , *Xho* I で処理し、セルフライゲーションさせ、polyD 遺伝子を除去することにより構築した。

3.2.3 融合タンパク質の発現及び精製

(AVGVP)₄₂-CL (ELP-CL), (AVGVP)₄₂-D₄₄-CL (ELP-D₄₄-CL), (AVGVP)₄₂-D₈₈-CL (ELP-D₈₈-CL: O-CUBE) をコードした各タンパク質発現用プラスミドで大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換し、37℃において LB 培地 (kanamycin 20 µg/mL) 中で振盪培養を行った。O.D._{660 nm} = 0.6 に達した時点で、終濃度 1 mM の IPTG を添加し、22℃にて Overnight 振盪培養することでタンパク質の発現誘導を行った。菌体は 10,000 rpm, 2 分の遠心により回収し、Benzonase Nuclease (Novagen) を添加した Bug Buster (Novagen) に懸濁し、30 分間室温にてローテーションを行うことにより溶菌させた。そして、破碎された大腸菌ライセートを 4℃, 8000 rpm 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。

可溶画分ライセート中に含まれる目的タンパク質は、Inverse transition cycling (ITC) ^[133] の改法により精製を行った。ITC 法は ELP が温度に依存して可逆的に凝集する性質を利用したタンパク質精製法である。一般的なタンパク質では、一度凝集すると再溶解できないため、ELP 融合タンパク質のみを回収することが可能である (Figure 3-4) ^[179]。

可溶画分ライセートに 4M NaCl 溶液をライセートの 1/10 量添加し、70℃で 10 分間加熱することにより、夾雑タンパク質を変性させた。変性後、タンパク質溶液を 30℃にて 3 分間の遠心を行うことで、凝集体を回収した。サンプルは PBS で懸濁し、4℃で 30 分間インキュベーション後、4℃にて 3 分間の遠心を行うことで、可溶化した融合タンパク質を回収した。精製度をさらに高めるため、回収した粗精製物を再度 70℃で 10 分間加熱を行うことで凝集体を形成させ、30℃にて 3 分間の遠心を行った。上清を取り除いた後、形成したタンパク質ハイドロゲルを MQ water に懸濁し、4℃で 10 分間インキュベーション後、4℃にて 20 分間の遠心を行うことで、可溶化した融合タンパク質を回収し、精製試料とした。

精製した融合タンパク質は、Amicon Ultra (Millipore) を用いた限外ろ過により、濃縮及び MQ water へのバッファー置換を行った後、SpeedVac を用いて乾燥させた。得られた融合タンパク質の精製度は、10%アクリルアミドゲルの SDS-PAGE に展開して評価を行った。収量は乾燥重量より求めた。

3.2.4 ハイドロゲルの形成・形態評価

精製した polyD の長さの異なる CUBEs: ELP-CL, ELP-D₄₄-CL, ELP-D₈₈-CL を PBS に溶解し、5% w/v に調整した。その後、ハイドロゲルを形成させるため、37℃で3分間インキュベーションを行った。そして、各 CUBE ハイドロゲルの透明度とゾル-ゲル転移の観察を行った。

3.2.5 濁度変化による相転移温度測定

濁度は紫外可視分光光度計 UV-1800 (SHIMADZU) を用い、マルチセル温度コントローラで、任意の温度で測定した。温度に対する濁度変化は、温度変化速度を 1℃/min とし、350 nm の透過光により測定を行った。温度は 4℃から測定を始め、50℃まで達した後、再度 4℃まで冷却した。相転移温度は、濁度が上昇し始めた時点の温度と定義した。

3.2.6 レオメーターによる粘弾性測定

温度に依存した CUBE 溶液と CUBE ゲルの機械的性質は、Kinexus pro+ レオメーター (Malvern Instruments) を用いて測定した。ELP-D₈₈-CL (O-CUBE) を PBS に溶解させ、3.5%, 5.0%, 10 % w/v にそれぞれ調整し、予め 15℃にセットしたレオメーターのサンドブラストプレート表面に移した。そしてサンプルを 1℃/min の温度傾度で 15℃から 40℃に加温、次いで 40℃から 15℃に冷却を行い、貯蔵弾性率 (G') 及び損失弾性率 (G'') を測定した。なお、測定の際の発振周波数は 0.5 Hz で行った。

3.2.7 TEM による構造評価

O-CUBE の加熱前後の構造を，TEM を用いて観察を行った．観察にはカーボン支持膜付グリッド（イーエムジャパン）を用いた．メッシュは事前に IB-2 型イオンコーター（株式会社エイコー）を用いて，3 mA，30 秒間放電し親水化処理を施すことにより，タンパク質の吸着率を上げた．続いて，PBS を用いて 2.5% w/v に調製した O-CUBE を支持膜に滴下し，25℃あるいは 37℃にて 3 分間インキュベーションを行った．MQ water で wash した後，4 倍希釈した EM スтейナー（日新 EM 株式会社）を支持膜に滴下し，1 min の静置により，ネガティブ染色を行った．その後，室温において濾紙上で 2 時間以上，乾燥させた．観察は JEM-1400Plus 透過型電子顕微鏡（日本電子株式会社）を用い，100 kV の加速電圧で行った．

3.2.8 三次元培養下での細胞形態観察

作製した O-CUBE ゲルで三次元培養が可能かどうかを評価するため，細胞をゲル内に包埋して三次元培養を行った．PBS で 5% w/v に調整した O-CUBE と DMEM（10% FBS，1% Penicillin/Streptomycin 含有）に懸濁した A549（ 1×10^6 cells/mL）を同量混合し，浮遊培養用 24 well plate（IWAKI 1820-024）に 50 μ L 滴下した．37℃にて 10 分間のインキュベーションを行い，ゲルを形成させた後，培地を加え 37℃にて培養を行い，1，4，7 日目に細胞観察を行った．また，7 日目に Calcein-AM（DOJINDO）で染色し，共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った．

3.3 実験結果及び考察

3.3.1 融合タンパク質の発現及び精製

構築した coiled-coil unit bound ELPs (CUBEs) を Figure 3-5A に示した。本研究では, polyD における ELP の凝集制御能を評価するため, polyD の長さの異なる CUBEs: (AVGVP)₄₂-D_n-CL ($n=0, 44, 88$) を構築した。もし, 超分子ポリマーの凝集性が強すぎれば, ネットワーク構造が崩れ, 不均一な凝集体を形成してしまう。一方で, 溶媒との親和性が高すぎれば, 超分子ポリマー間の絡み合いが低下し, ハイドロゲルではなく, 粘性の高い溶液となってしまう。したがって, polyD の導入による親水性の調整は, 三次元ネットワーク構造とハイドロゲル形成に重要である。アンチパラレルホモ四量体 coiled-coil 構造を形成する Coil-LL ペプチド (CL) は架橋点として, polyD を挟んで ELP と反対側に配置した。また本研究では, 形成するタンパク質複合体, 及びハイドロゲルの安定性を高めるため, タンデム化した CL: GN (ADELYRM LDALREH LQSLRRK)₂ LRSG を用いた。

CUBEs は大腸菌 BL21(DE3) 株を用いて発現誘導を行い, ITC の改法により可溶画分から精製を行った。精製した各 CUBEs の収量は, 培養液 1L 当たり, 少なくとも乾燥重量で 200 mg であり, ITC 法を利用することにより, 容易に大量に得られることが示された。各融合タンパク質の精製度は, SDS-PAGE で展開することにより評価を行った (Fig. 3-5B)。観察されたバンドは, 分子量から予想される位置より高い位置に現れた (ELP-CL: 27.2 kDa; ELP-D₄₄-CL 33.8 kDa; ELP-D₈₈-CL: 39.3 kDa)。この理由としては, ELP の特性^[180], 及び強く負に帯電した polyD に起因するものと考えられる。電気泳動の移動度は SDS のタンパク質に対する結合に依存するが, 親水性アミノ酸に対する SDS の相互作用は弱いことが知られている^[181]。したがって, polyD を導入した CUBEs の SDS-PAGE における移動は, 変則的に低速になったものと考えられる。融合タンパク質の精製度は, ほぼ単一バンドであったことから, 高水準であり, 以降の実験に十分な精製度であった。

3.3.2 ハイドロゲルの形成・形態評価

精製した CUBE_s (ELP-CL, ELP-D₄₄-CL, ELP-D₈₈-CL) を 5% w/v となるように PBS で調整し、37°C にてインキュベーションを行ったところ、各 CUBE 溶液は数分以内にハイドロゲルを形成した。これまでに報告されている ELP の物理ゲル形成には、10% w/v 以上もの高濃度のポリペプチドが必要であったが^[105,106]、CUBE のハイドロゲル形成は 2% w/v 以上の濃度で観察された。これはおそらく、ELP に導入した Coil-LL peptide (CL) が重要な役割を担っており、CL の導入による四分岐を提供する架橋点と精密な配向性によって、低濃度におけるハイドロゲル形成を実現したものと考えられる。

ハイドロゲルの透明度は、ポリアスパラギン酸の鎖長が長くなるに伴い向上した (Figure 3-6A)。ELP-CL は、強く脱水し、白く濁ったハイドロゲルを形成し、ELP-D₄₄-CL は半透明のハイドロゲルを形成した。一方で、ELP-D₈₈-CL は、非常に透明性の高いハイドロゲルを形成した。ハイドロゲルの透明性は、細胞観察といった細胞実験に影響を与えるが、多くの温度応答性ハイドロゲルは、架橋点の凝集により半透明あるいは白濁している^[182,183]。したがって、本研究の結果で示す通り、polyD の導入は CUBE に適度な親水性と静電的反発をもたらし、ELP の凝集を抑制することが可能であると言える。

CUBE_s のゾル-ゲル転移は温度に依存して誘導された (Figure 3-6B)。例えば、2.5% w/v の ELP-D₈₈-CL 溶液は 30°C でゲル化し、24°C で再溶解した。この温度応答性を含め、低濃度でのゲル化、透明性といった ELP-D₈₈-CL の性質は、生医学分野における様々なアプリケーションにとって有用であるといえる。本項以降、透明性の高いハイドロゲルを形成した ELP-D₈₈-CL に着目し、評価を行った。

3.3.3 濁度変化による相転移温度測定

ELP-D₈₈-CL (O-CUBE) の相転移温度 (T_i) を評価するため、連続的に温度を変化させながら様々な濃度における O-CUBE の濁度を測定した。Figure 3-7 に示す通り、各濃度における O-CUBE は、特定の温度（相転移温度）を境に濁度が上昇していることが観察された。また、冷却時における濁度変化は、加温時における濁度の上昇曲線より低い温度で緩やかに減少していることが観察された。これは、Figure 3-1B に示した (AVGVP)_n の特徴であり、その構造安定性が反映されている結果であると考えられる。また、それぞれの T_i は、濃度増加に伴い低温側にシフトしており (Table 3-1)、本結果からも polyD 及び CL の導入後においても ELP の性質が保持されていることが示された。

3.3.4 レオメーターによる粘弾性測定

O-CUBE の相転移に伴う機械的性質を評価するため、様々な濃度における O-CUBE の粘弾性を、連続的に温度を変化させながら測定した。昇温過程において、各濃度 (3.5%, 5.0%, 10.0% w/v) における O-CUBE 溶液は、それぞれ狭い温度範囲でゲル状態へと相転移を示した (Figure 3-8)。それらの相転移温度 (T_i) はタンパク質濃度の増加に従い、3.5%, 28.0°C; 5.0%, 26.3°C; 10.0%, 19.7°C のように減少した。一方で、降温過程におけるゾル状態への相転移はゆっくり誘導された。この結果は、前項 3.3.3 における濁度変化から求めた相転移温度と概ね一致しており、O-CUBE の温度応答性は、(AVGVP)_n 配列の性質をよく反映しており、素早いゲル化とハイドロゲルの安定性をもたらしている。この性質は、細胞の三次元培養だけでなく、細胞や成長因子等の輸送や足場担体として、ドラッグデリバリーシステム (DDS) やバイオファブリケーションに役立つと考えられる。

ゲル状態への相転移後において、O-CUBE は損失弾性率 (G'') よりも非常に高い貯蔵弾性率 (G') を示した。これは、弾性ハイドロゲルの形成を示している。また昇温過程にお

る G' は O-CUBE 濃度に依存して、3.5%, 202 Pa; 5.0%, 736 Pa; 10.0%, 4,629 Pa のように顕著に変化した (Figure 3-8D). 言い換えると, O-CUBE の機械的性質は, 濃度を変えることにより調整可能である. 細胞は周辺の微小環境における物理的性質を認識, 応答することができるため, ECM の弾性率は, 幹細胞の分化^[184,185]やオルガノイド形成^[14]等の細胞機能の調整に重要な役割を担っている^[186]. したがって, ECM の機械的性質の調整は, 細胞研究において不可欠である.

通常, 高濃度におけるタンパク質溶液は高粘度であるが, Figure 3-8C に示す通り, T_i 以下における 10% w/v の O-CUBE の G'' は 0.1 Pa 程度であり, 非常に小さい値であった. この理由として, polyD による静電的反発による効果が考えられ, この結果は, O-CUBE 溶液は粘性が少なく, 操作性に優れていることを示している.

3.3.5 TEM による構造評価

CUBE ハイドロゲルのネットワーク構造を評価するため, 加温前後における O-CUBE 溶液の形態観察を TEM によって行った (Figure 3-9). 25°Cでのインキュベーションではタンパク質ネットワークは観察されなかったが (Figure 3-9A), 37°Cでは多孔質構造の形成が観察された (Figure 3-9C). より高倍率では (Figure 3-9B, D), Coil-LL ペプチドを介して, 四量体のタンパク質複合体を形成していると予想される O-CUBE は, 25°Cにおいては分散していたのに対して (Figure 3-9B), 37°Cでは, タンパク質の複雑な会合体が観察された (Figure 3-9D). この結果より, O-CUBE のゲル化は, 温度変化に依存した O-CUBE の構造変化とそれに続くタンパク質会合に付随する多孔質構造の形成によるものであると考えられる. なお, ネガティブ染色は, 背景を染色する方法であるが (Figure 3-9B, D), 低倍率において (Figure 3-9A, C), 黒色に見えているものは, タンパク質の会合体であり, これは, 厚みを持ったハイドロゲル形成によって電子線が透過しにくくなった結果であると考えられる.

3.3.6 三次元培養下での細胞形態観察

作製した CUBE ゲル内で細胞の三次元培養が可能かどうかを評価するため、細胞をゲル内に封入して三次元培養を行い、1, 4, 7 日目に細胞の形態観察を行った。その結果を Figure 3-10 に示した。O-CUBE ゲルに内包することで三次元培養を行った細胞は、球状の細胞塊（スフェロイド）を形成し、生体内での細胞挙動に類似した形態を示した。また、日数の経過に伴い、スフェロイドは大きくなっており、このことから細胞は O-CUBE ゲル内で増殖可能であることが示された (Figure 3-10A)。さらに共焦点レーザー顕微鏡による観察結果に示す通り、細胞は三次元的に O-CUBE ゲル内で保持されており、長期的に培養可能であることが示された (Figure 3-10C)。したがって、CUBE ゲルは三次元足場材料として利用可能であることが明らかとなった。

3.4 結言

本章では、感温性ポリペプチド配列 (AVGVP)₄₂ に静電的反発により凝集を制御する polyD (D_n)、架橋点となる Coil-LL ペプチド (CL) を連結した融合タンパク質 (AVGVP)₄₂-D_n-CL (coiled-coil unit bound ELP: CUBE) を遺伝子工学的に構築し、温度変化に応答してハイドロゲルを形成することを示した。また形成したハイドロゲルは、polyD の鎖長に依存してゲルの透明性が変化することが観察され、D₈₈ を連結した CUBE においては、非常に透明性の高いハイドロゲルを形成した。そこで、本章では、最も透明度の高いゲルを形成した、(AVGVP)₄₂-D₈₈-CL (O-CUBE) に焦点を当て、さらなる評価を行った。

O-CUBE のゲル化における濃度と温度の関係性を調べた結果、2% w/v 以上でゲル化することが観察され、濃度増加に伴いゾル-ゲル転移温度が低温側にシフトし、ELP の性質を反映していることが示唆された。また、レオメーターを用いて粘弾性測定を行ったところ、濃度に依存して貯蔵弾性率 G' 、損失弾性率 G'' が増加する様子が観測され、濃度を調整することにより粘弾性を調整可能であることが示された。さらに O-CUBE の構造評価を TEM で行ったところ、加熱により構造を大きく変化させ、多孔質構造を形成している様子が観察された。最後に CUBE ゲルが三次元足場材料として利用可能かを評価するため、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 を O-CUBE ゲル内に内包し三次元培養を行った。A549 は日数経過に伴い、細胞同士が集まって形成した球状の細胞塊を大きくさせていく様子が観察され、CUBE ゲル内で細胞は増殖可能であり、長期的に培養可能であることが明らかとなった。

以上より、本章では、ELP と polyD, CL ペプチドを組み合わせることにより、細胞の三次元培養が可能な温度応答性タンパク質ハイドロゲルを構築可能であると結論付ける。次章では、CUBE の三次元足場材料としての有用性を示すため、CUBE のさらなる機能化を行い、細胞機能の時空間的制御を目指した。

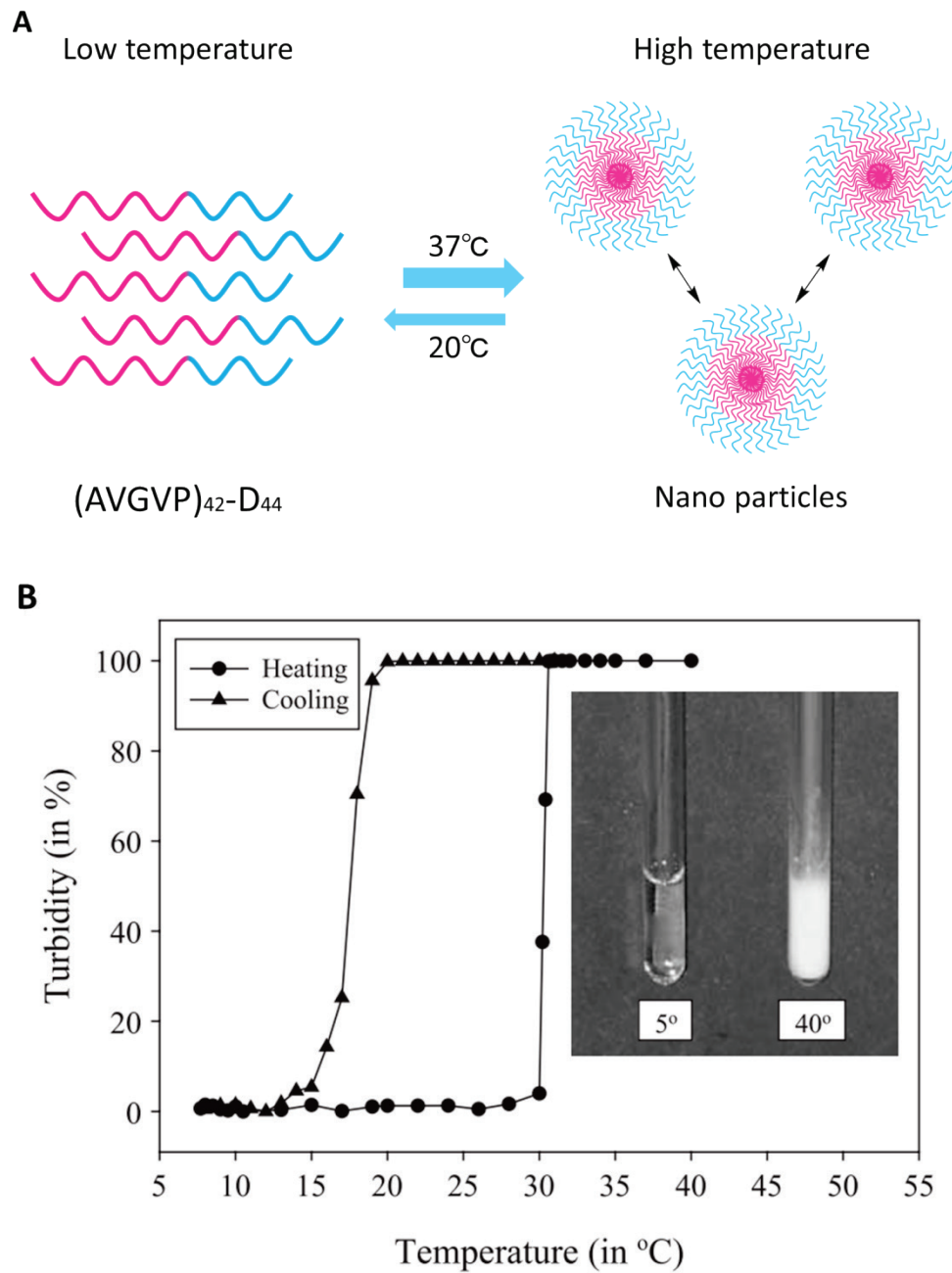


Figure 3-1 | (AVGVP)_n の凝集制御と構造安定性.

A: 温度応答性タンパク質ナノ粒子. 相転移温度以上になると, (AVGVP)₄₂ の作用で凝集が起こるが, ポリアスパラギン酸の反発により, 凝集体の成長が制限され, ナノ粒子が形成する. ^[142,143]

B: (AVGVP)_n の温度応答性. 30°C 付近で相転移温度 (T_i) を超え, 凝集体を形成する. 一度凝集体を形成すると, T_i より大幅に冷却しない限り, 凝集体は解離しない. ^[137]

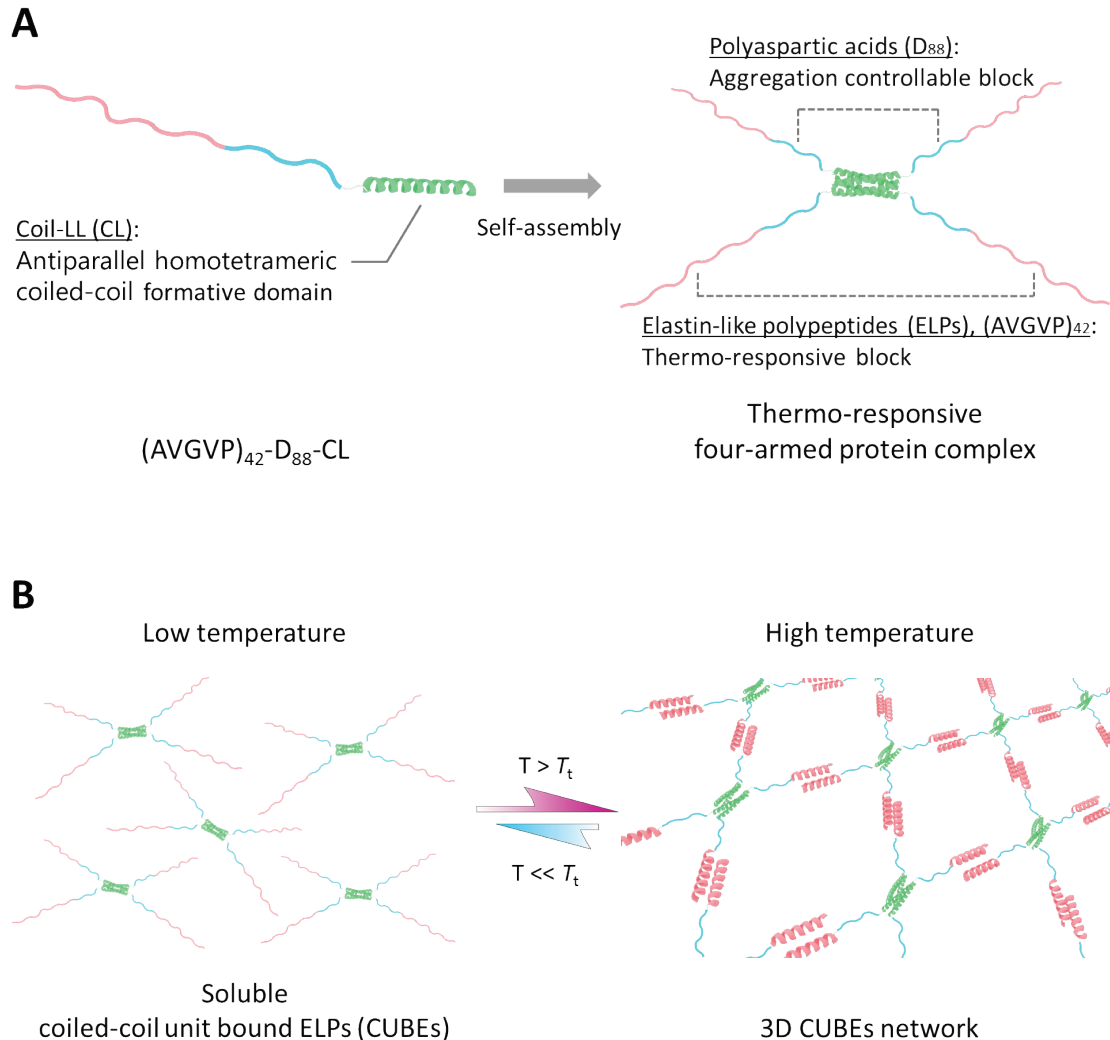


Figure 3-2 | 温度応答性タンパク質ハイドロゲルの概念図.

A: 温度応答性マトリックスタンパク質は、アンチパラレルホモ四量体 coiled-coil 構造を形成する Coil-LL ペプチド (CL) を介して、非共有結合的に会合し、温度応答性の ELP がそれぞれ両末端に位置する四本腕のタンパク質複合体を形成する。

B: 四本腕の coiled-coil unit bound ELPs (CUBEs) は、温度に依存して可逆的に 3D ネットワークを形成する。

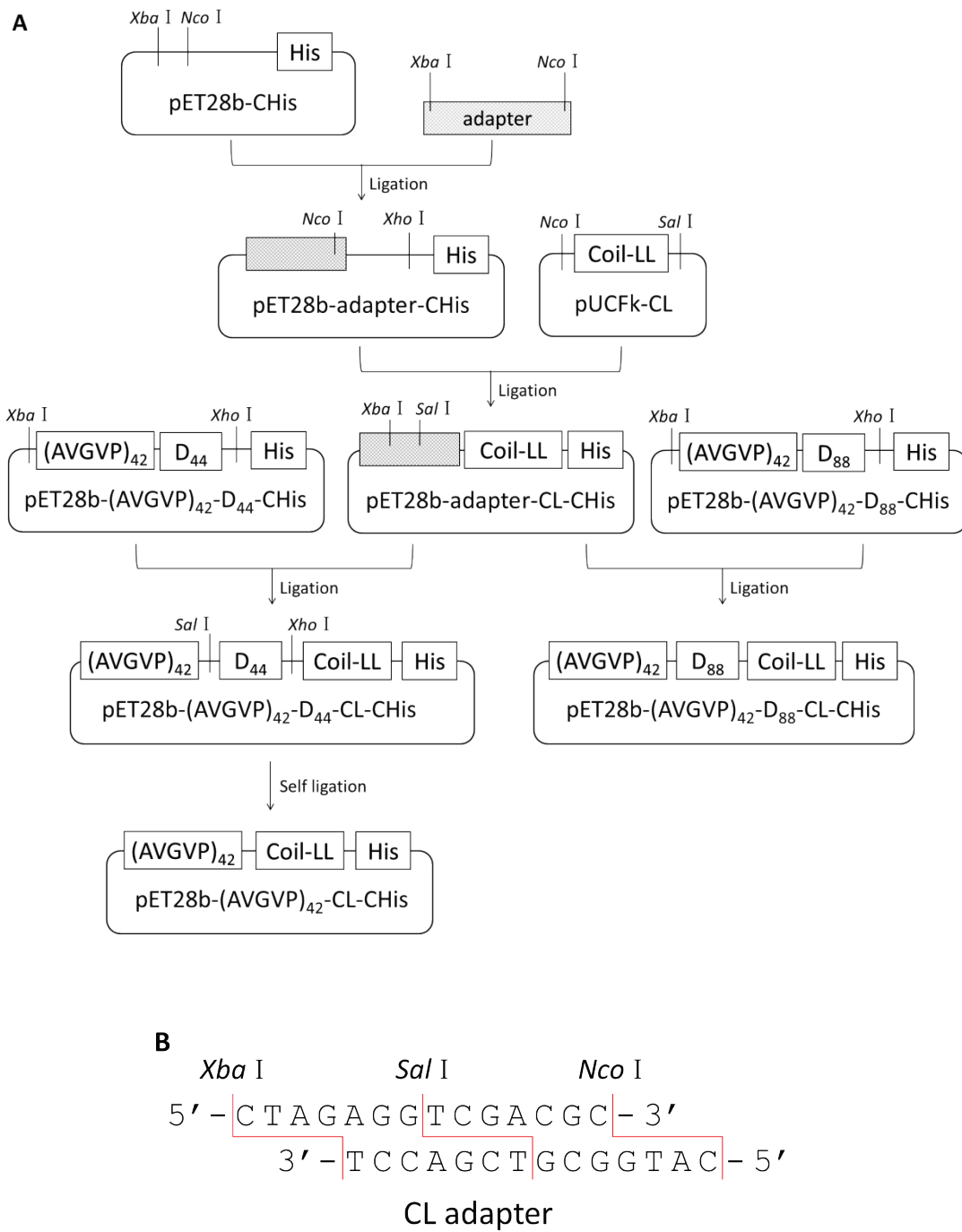


Figure 3-3 | CUBEs のプラスミド構築スキーム.

- A: polyD の長さの異なる CUBEs: $(AVGVP)_{42}$ - D_n -CL ($n=0, 44, 88$) のプラスミド構築スキーム.
 B: 挿入したオリゴ DNA 配列. CL adapter.

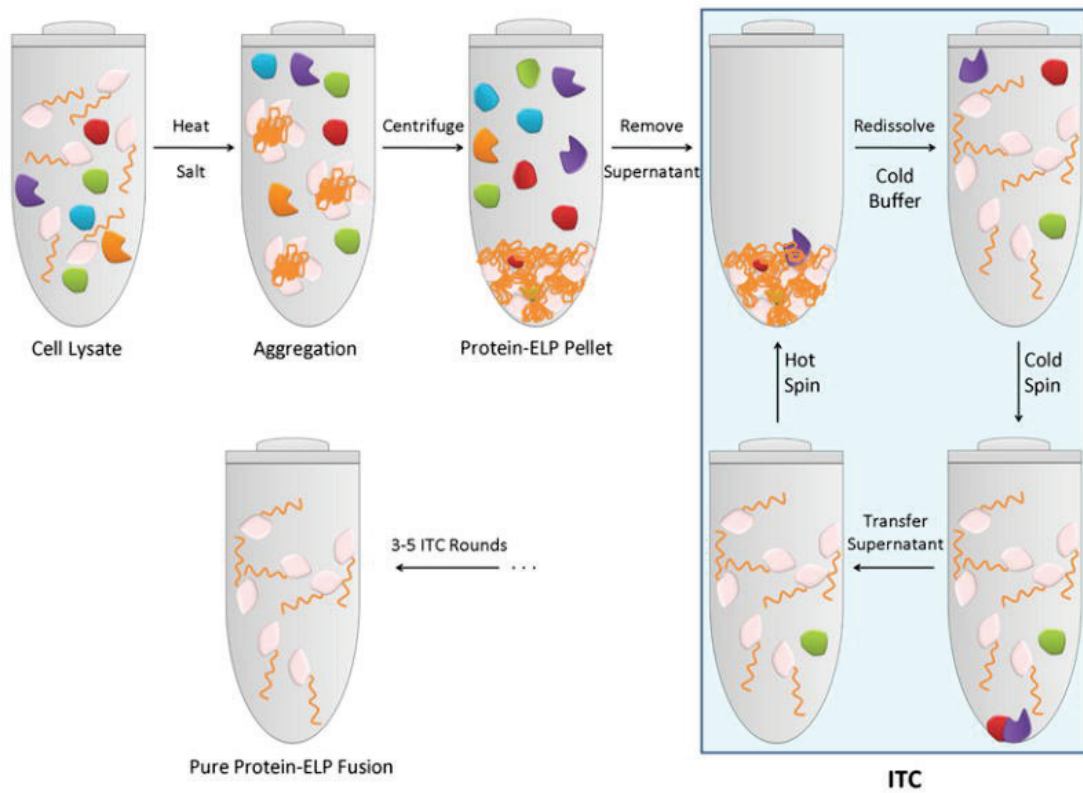


Figure 3-4 | ITC 法を利用した ELP 融合タンパク質の精製. [179]

ELP が温度に依存して可逆的に凝集する性質を利用したタンパク質精製法. 一般的なタンパク質は一度凝集すると再溶解できないため, ELP 融合タンパク質のみの回収が可能である.

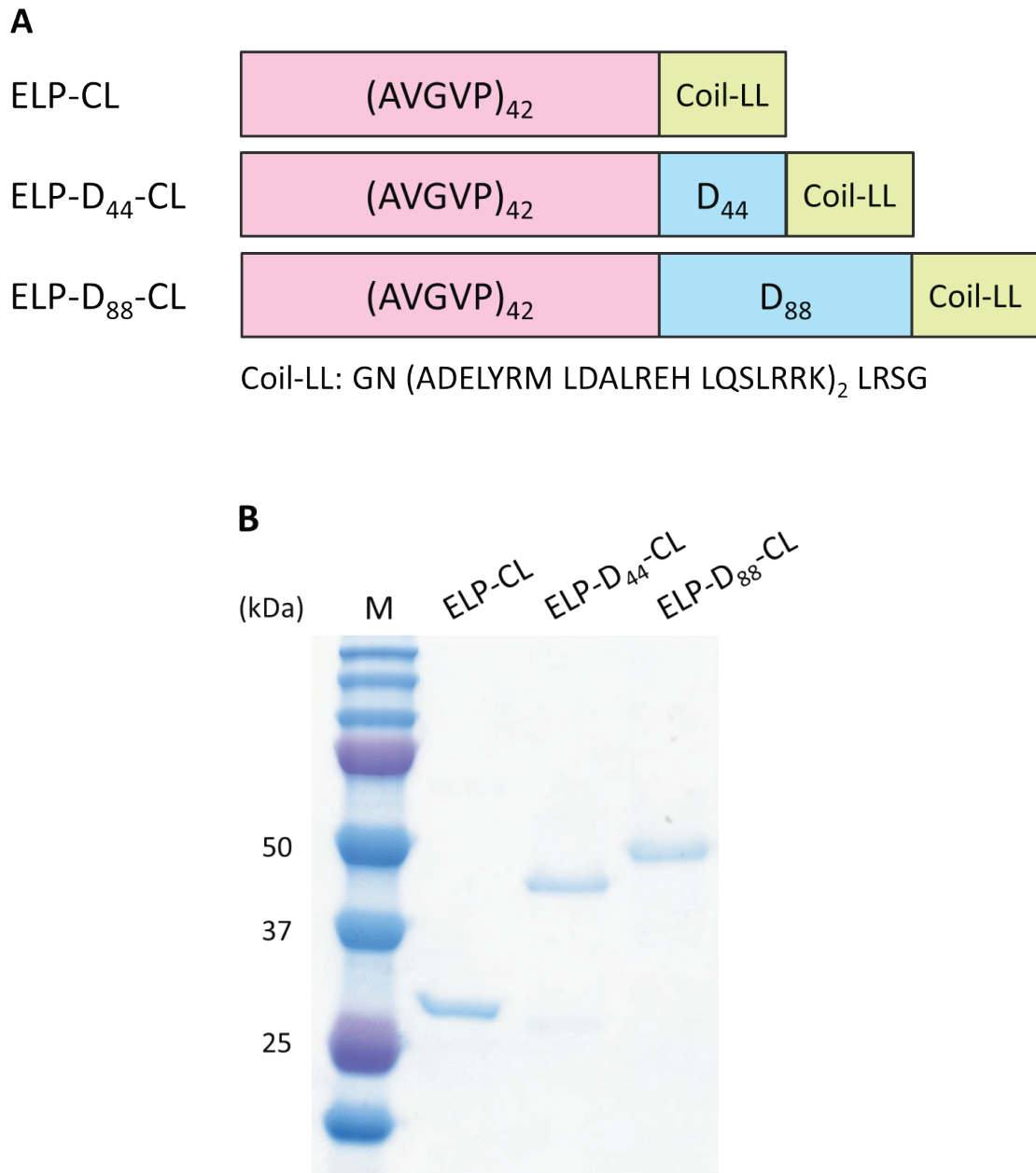


Figure 3-5 | Coiled-coil unit bound ELPs (CUBEs)の発現と精製.

A: polyD の長さの異なる CUBEs の設計.

B: 精製した CUBEs の SDS-PAGE による展開. ELP-CL: 27.2 kDa; ELP-D₄₄-CL 33.8 kDa; ELP-D₈₈-CL: 39.3 kDa.

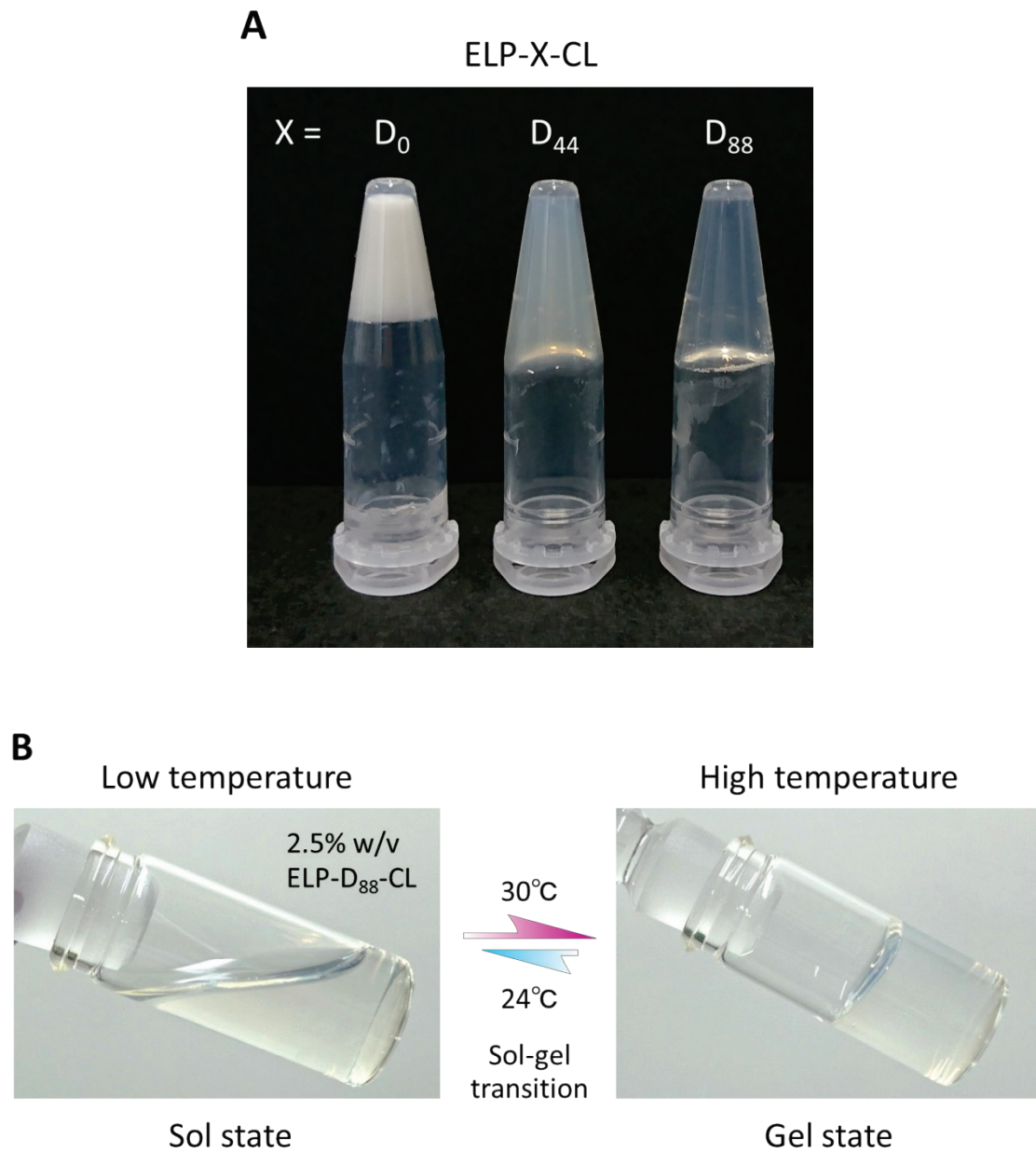


Figure 3-6 | CUBE ハイドロゲルの形成.

A: CUBE ハイドロゲルの透明度. ハイドロゲルの透明度は, polyD の鎖長に依存し向上した.
B: ELP-D₈₈-CL の温度応答性ゾル-ゲル転移.

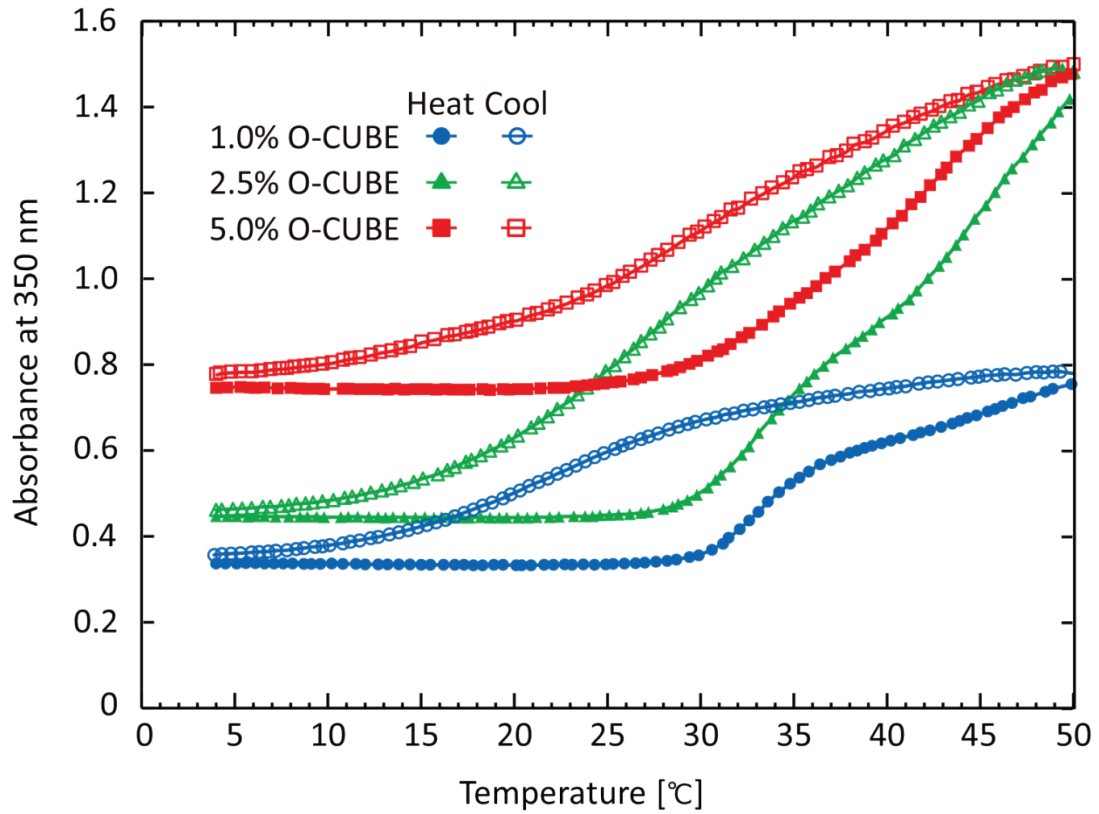


Figure 3-7 | O-CUBE の温度に対する濁度変化.

各濃度の O-CUBE は、1°C/min の温度傾度で 4°C から 50°C に加温、次いで 50°C から 4°C に冷却され、それぞれの温度に対する濁度を測定した。

Table 3-1 | 各濃度における O-CUBE の相転移温度.

O-CUBE concentration [% w/v]	T_t [°C]
1.0	30.6
2.5	28.5
5.0	26.4

相転移温度 (T_t) は、濁度が上昇し始めた時点の温度と定義した。

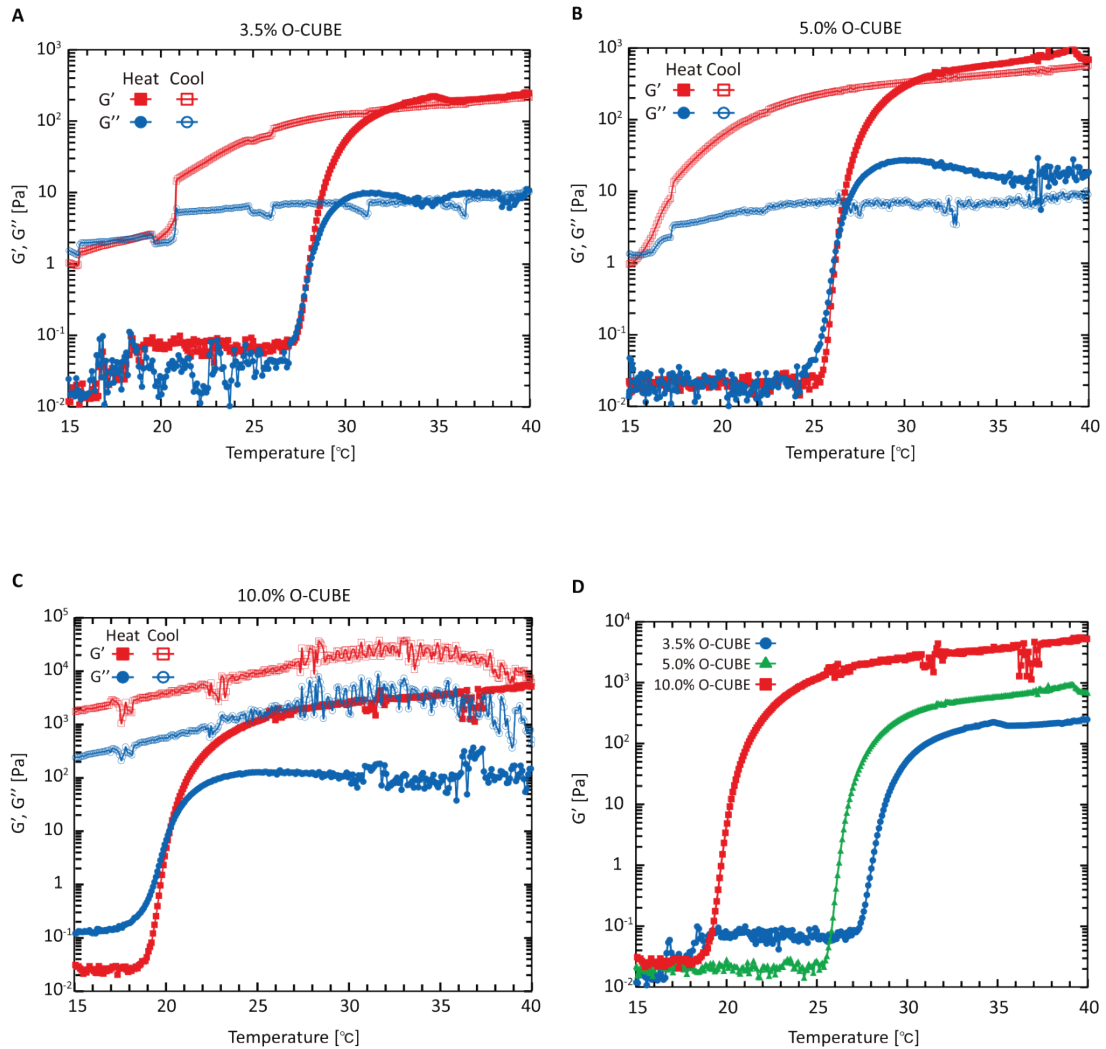


Figure 3-8 | 様々な濃度における O-CUBE の粘弾性測定.

A: 3.5 % w/v O-CUBE. B: 5.0% w/v O-CUBE. C: 10.0% w/v O-CUBE. サンプルは、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の温度傾度で 15°C から 40°C に加温、次いで 40°C から 15°C に冷却され、貯蔵弾性率 (G') 及び損失弾性率 (G'') を測定した。

D: 昇温過程における異なる濃度の O-CUBE の G' 変化.

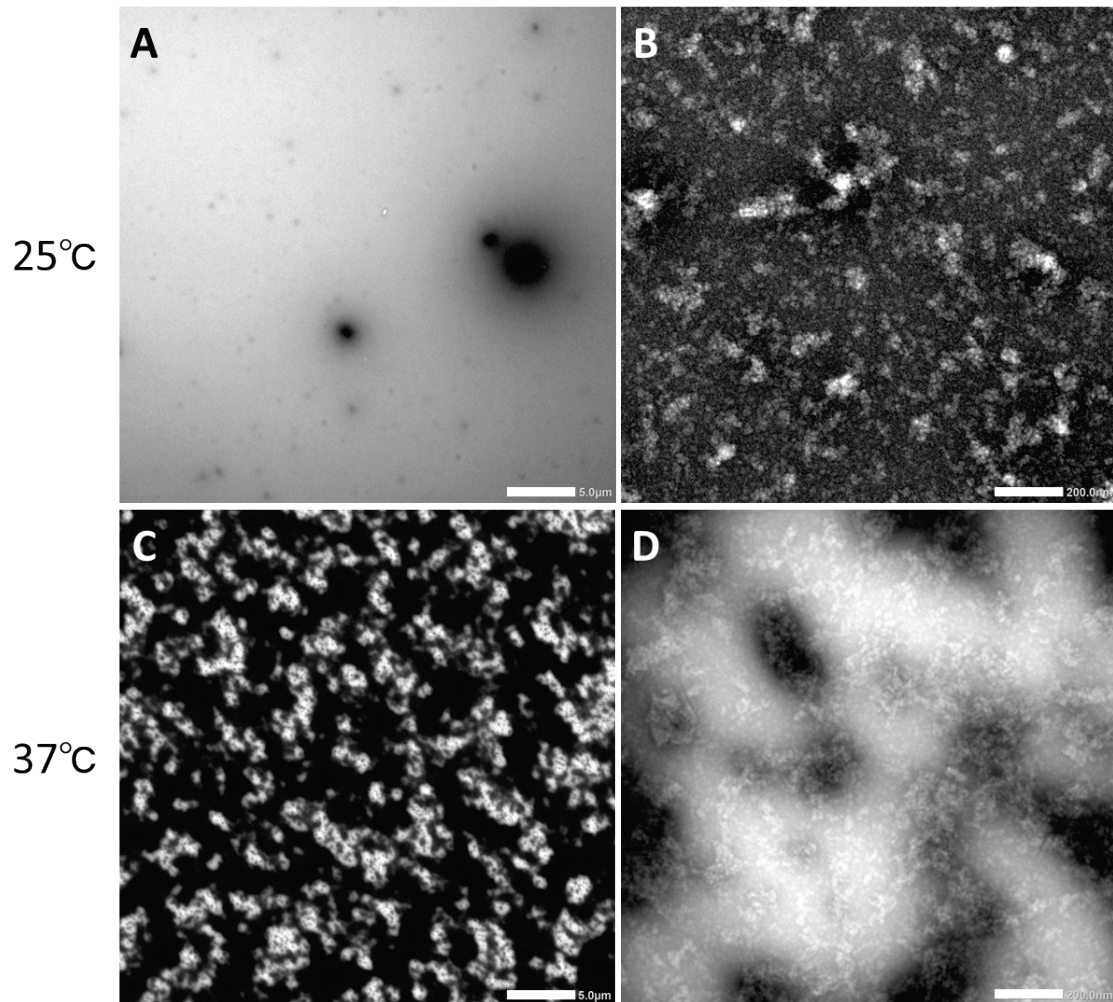


Figure 3-9 | CUBE ゲルの TEM 観察結果.

加熱前後の 2.5% w/v ELP-D₈₈-CL (O-CUBE) 溶液の形態観察. サンプルは, 3 分間のインキュベーション後, EM スтейナーでネガティブ染色を行った.

A, B: 25°C のインキュベーションにおける O-CUBE の構造.

C, D: 37°C のインキュベーションにおける O-CUBE の構造.

A, C: Magnification ×1,000. Scale bar = 5.0 μm.

B, D: Magnification ×20,000. Scale bar = 200.0 nm.

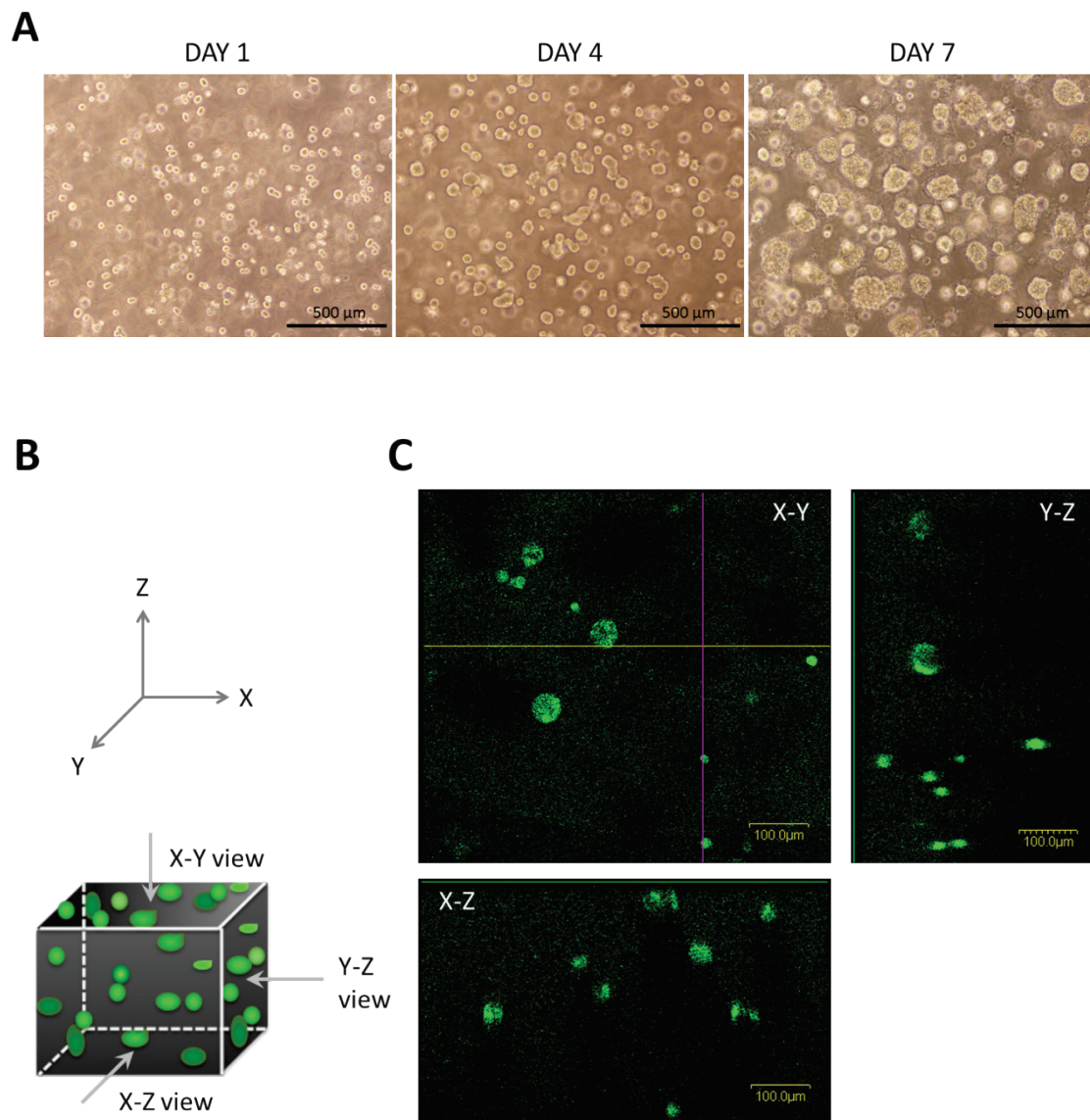


Figure 3-10 | CUBE ゲルを用いた三次元培養下での細胞形態観察.

- A: 各日における顕微鏡写真. A549 細胞を O-CUBE に内包し, 三次元培養を行った.
- B: 共焦点レーザー顕微鏡における観察方法の概念図.
- C: A549 細胞を O-CUBE ゲル内で 7 日間三次元培養後, Calcein-AM で染色し, 共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った.

第4章

多機能タンパク質ハイドロゲルによる 三次元血管組織の構築

4.1 緒言

第3章では、ELP と polyD, CL ペプチドを組み合わせることにより、三次元細胞培養のための足場材料として利用可能な新規温度応答性ゲル化タンパク質の開発に成功した。しかしながら、組織形成を制御するには単純なハイドロゲル担体のみでは困難であり、細胞機能を制御するための ECM の機能化が不可欠である。また、機能性三次元生体組織の構築には、播種された細胞の壊死を防ぐための三次元血管ネットワークが不可欠であり、三次元的な脈管形成、血管新生を誘導可能な高機能性三次元足場材料の開発が求められている。

機能性人工 ECM として利用可能なデザイナー超分子ハイドロゲルは、いくつかの研究グループから開発されており、それらは主に、骨格となる自己組織化ペプチドと細胞機能を制御するための生理活性ペプチドモチーフを組み合わせる戦略をとっている [111-113,187]。これらのバイオマテリアルは機能性 ECM としての有用性が示されており、この戦略は機能性三次元足場材料の構築に有効であると言える。しかしながら、細胞機能の精密な制御には生理活性ペプチドの導入のみだけでは不十分であり、成長因子の作用も含めた相乗的なシグナル伝達を可能にするために [155,188]、ECM は成長因子を保持し、その徐放を時空間的に制御できることが求められる [149,189]。

そこで本章では、CUBE ハイドロゲルの三次元足場材料としての有用性を示すために、CUBE に ECM 由来の生理活性ペプチド、及び成長因子保持機能を導入することにより、ECM 及び成長因子からの相乗的なシグナル伝達を通じて、HUVEC の血管新生を制御し、三次元血管ネットワーク形成を誘導可能な多機能タンパク質ハイドロゲルの構築を目指した (Figure 4-1)。

本研究では、 $\alpha_v\beta_3$ や $\alpha_2\beta_1$ インテグリンとの相互作用を介して、血管新生を誘導することが知られている骨シアロタンパク質 (BSP) 由来の RGD 配列 (bRGD) に着目し、この生理活性ペプチドを CUBE に導入することにより、機能化を行った (Figure 4-1A)。bRGD ペプチドはわずか 15 アミノ酸残基であり、CL の coiled-coil 構造形成、及び ELP の温度応答性会合

といった機能を阻害せず, (AVGVP)₄₂-D₈₈-CL (O-CUBE)と同様の三次元ネットワークの形成が期待できる (Figure 4-1B). 本融合タンパク質(AVGVP)₄₂-D₈₈-bRGD-CL (bRGD-CUBE) は O-CUBE と同様にして遺伝子工学的に構築し, 温度応答性のゲル化能, 及び bRGD ペプチド導入による細胞接着能, 血管新生能の評価を行った.

また, 本融合タンパク質の構成要素である polyD は ELP の凝集制御機能だけでなく, bFGF や VEGF といった塩基性領域を有する成長因子の保持・デリバリーへの利用においても期待できる. そこで, polyD を介したこれら成長因子の保持能を, ELISA を応用することにより評価を行った. さらに bRGD-CUBE に bFGF, VEGF を静電的に保持させ, 本成長因子一体化多機能タンパク質ハイドロゲル内で HUVEC の三次元培養を行い, 脈管形成能の評価を行った (Figure 4-1C).

4.2 実験方法

4.2.1 実験試薬

プラスミドの作製時に用いた制限酵素及びその他の酵素類はタカラバイオ株式会社より購入した。遺伝子組換え及びタンパク質発現のために使用したプラスミドは Novagen 社より購入した。大腸菌 JM109 株はタカラバイオ株式会社, BL21(DE3) 株は Novagen 社より購入した。オリゴ DNA は FASMAC 社に委託合成したものを使用した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 及び血管内皮細胞用培地 HuMedia EG-2 は KURABO 社より購入した。その他の試薬等は特筆しない限り特級のものを使用した。

4.2.2 プラスミド構築

本章では、温度応答性ゲル化タンパク質である O-CUBE に骨シアロタンパク質 (BSP) 由来の RGD 配列 (bRGD) を導入した (AVGVP)₄₂-D₈₈-bRGD-CL (bRGD-CUBE) の構築を行った。プラスミド構築スキームを Figure 4-2 に示した。以下に構築スキームの詳細を示す。

bRGD (CGGNGEPRGDTYRAY) 遺伝子をコードするオリゴ DNA を *EcoR* I, *Xho* I で切断した pET28b-(AVGVP)₄₂-D₈₈-CHis に挿入することで pET28b-(AVGVP)₄₂-D₈₈-bRGD-CL-CHis を作製した。

4.2.3 融合タンパク質の発現及び精製

(AVGVP)₄₂-D₈₈-bRGD-CL (ELP-D₈₈-R-CL: bRGD-CUBE) をコードしたタンパク質発現用プラスミドで大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換し、37℃において LB 培地 (kanamycin 20 µg/mL) 中で振盪培養を行った。O.D._{660 nm} = 0.6 に達した時点で、終濃度 1 mM の IPTG を添加し、22℃にて Overnight 振盪培養することでタンパク質の発現誘導を行った。菌体は 10,000 rpm, 2 分

の遠心により回収し、Benzonase Nuclease (Novagen) を添加した Bug Buster (Novagen) に懸濁し、30 分間室温にてローテーションを行うことにより溶菌させた。そして、破碎された大腸菌ライセートを 4℃, 8000 rpm 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。

可溶画分ライセート中に含まれる目的タンパク質は、第3章で示した他の CUBEs と同様にして、ITC^[133]の改法により精製を行った。精製した融合タンパク質は、Amicon Ultra (Millipore) を用いた限外ろ過により、濃縮及び MQ water へのバッファー置換を行った後、SpeedVac を用いて乾燥させた。得られた融合タンパク質の精製度は、10% アクリルアミドゲルの SDS-PAGE に展開して評価を行った。収量は乾燥重量より求めた。

4.2.4 細胞培養

HUVEC は HuMedia EG-2 {2% ウシ胎児血清 (FBS), 10 ng/mL ヒト組換え型上皮成長因子 (hEGF), 5 ng/mL ヒト組換え型塩基性繊維芽細胞増殖因子 (hFGF-b), 10 µg/mL ヘパリン, 1.34 µg/mL ハイドロコチゾン, 50 µg/mL ゲンタマイシン, 50 ng/mL アンフォテリシン B 含有} 中にて 5% CO₂, 37℃の環境下で培養した。実験には購入時より 3~8 継代した細胞を使用した。

4.2.5 融合タンパク質の細胞接着能評価

細胞接着能の評価は、96-well 浮遊培養用プレート (Sumilon® MS-8096R) 上で行った。ウェル表面を 1000 nM の融合タンパク質 (ELP-D₈₈-CL: O-CUBE, ELP-D₈₈-R-CL: bRGD-CUBE) でコーティングを行った。ノンコートプレートはネガティブコントロールとして使用した。37℃にて 1 時間インキュベート後、各ウェルを PBS で洗浄し、HUVEC を 1×10⁴ cells/well の密度で播種した。37℃にて 3 時間インキュベート後、各ウェルを PBS で洗浄し、Calcein-AM

(Dojindo) で接着細胞の染色を行った。染色後、蛍光顕微鏡にて細胞の形態観察を行った。

4.2.6 CUBE ゲルを用いた HUVEC の血管新性能評価

bRGD-CUBE の血管新性能を評価するため、O-CUBE と bRGD-CUBE の混合割合を調整することにより、異なる bRGD 濃度 (0-1.25 mM) の CUBEs を作製した。この際、CUBEs の終濃度は全て 5% w/v になるように統一した。HUVEC を 10 μ M の CellTraker™ Orange CMTMR fluorescence probe (Invitrogen) で染色後、50 μ L の 5% w/v CUBEs 溶液当たり 4×10^5 cells の密度になるように懸濁した。CUBEs-細胞懸濁液は、25 μ L のドロップレットとなるように、浮遊培養用 24-well plate (IWAKI 1820-024) の中央に滴下し、37℃にて 10 分間インキュベートを行うことによりゲル化させた。細胞を包埋したハイドロゲルは、HuMedia-EG2 に浸し、37℃にて培養を行った。一晚培養後、CUBEs ハイドロゲルに包埋した HUVEC の形態観察を、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV300) を用いて行った。

4.2.7 Real-time PCR による mRNA 発現量測定

bRGD-CUBE ゲル内で培養することにより HUVEC の血管新生が誘導されていることを、mRNA の発現量を測定することによって評価した。本実験では、管腔形成のマーカーとして *in vivo* 及び *in vitro* の双方で発現が確認されている因子である、Matrix Metalloprotease-2 (MMP-2), Angiopoietin-2 (Ang-2), Tyrosine kinase-2 with immunoglobulin-like and EGF-like domains (Tie-2) の 3 種に着目し、評価を行った。またリファレンス遺伝子として、細胞の生存維持や増殖に不可欠であり、細胞内で恒常的に発現しているハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、遺伝子発現量の相対値を比較した。

HUVEC を前項 4.2.6 と同様にして培養を行った。一晚培養後、細胞を包埋したハイドロゲルを冷 PBS で溶解させ、遠心分離により細胞を回収した。全 RNA は TRIzol™ Reagent

(Invitrogen) を用いた, 酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム法により抽出した. RNA 濃度は 260 nm の吸光度から求め, 逆転写 (reverse transcription, RT) 反応は Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen) と SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて行った. 合成した一本鎖相補的 DNA (complementary DNA, cDNA) は, FastStart Taq DNA Polymerase と二本鎖 DNA 特異的な SYBR® Green I dye を含む FastStart Essential DNA Green Master (Roche) を用い, 増幅させ real-time PCR を行った. 用いた PCR プライマーは Table 4-1 に示した. Real-time PCR は, LightCycler® Nano Instrument (Roche) を用い, (95°C 10 秒, 60°C 10 秒, 72°C 15 秒) ×45 サイクルの反応条件で行った. 定量化サイクル (Quantification cycle, C_q) 値は, LightCycler® Nano Software (Roche) にて任意の蛍光強度に達したサイクル数から求め, 相対的な遺伝子発現量は, $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 法^[190]により解析した.

Table 4-1 | Real-time PCR に用いたプライマーセット.

Gene analyzed	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')
<i>MMP-2</i>	gtgctgaaggacacactaaagaaga	ttgccatccttctcaaagttgtagg
<i>Ang-2</i>	aaagactgggaagggaatgagg	gatgtttagaaatctgctggcg
<i>Tie-2</i>	ggatacgaacctgaagatcg	ccaaacgtgtgcagttcacaag
<i>GAPDH</i>	278: ccataccatcttccaggag	853: cctgcttcaccacttcttg

4.2.8 ELISA による CUBE への成長因子保持能評価

100 nM に調整した ELP-CL または ELP-D₈₈-CL を浮遊培養用 96 well plate (Sumilon® MS-8096R) に 100 µL 添加し, 37°C で 1 時間インキュベートを行い, プレート上に物理吸着させた. その後タンパク質溶液を除去し, PBS-T (0.05% Tween 20 含有 PBS) 200 µL で 5 回洗浄後, Blocking One (ナカライテスク) 200 µL を添加し, 4°C にて一晩インキュベートすることによりブロッキングを行った. ブロッキング後, 上清を除き, 200 µL の PBS-T で 5 回

洗浄を行った。その後、100 nM に調製した bFGF, あるいは 25 nM に調製した VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ をそれぞれ 100 μ L 添加後、37°C で 1 時間インキュベートし、PBS-T 200 μ L で 5 回洗浄を行った。そして、5000 倍に希釈した 1 次抗体 rabbit-anti-bFGF (Santa Cruz Biotechnology), あるいは 200 倍に希釈した 1 次抗体 mouse-anti-VEGF (Abcam) を 100 μ L 添加し、37°C で 1 時間抗原抗体反応を行った。PBS-T で 5 回洗浄後、5000 倍に希釈した HRP 標識 anti-rabbit-IgG (Sigma), あるいは 1000 倍に希釈した HRP 標識 anti-mouse-IgG (Sigma) を 100 μ L 添加し、37°C で 1 時間抗原抗体反応を行い、再び PBS-T で 5 回洗浄後、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) Horseradish peroxidase (HRP) substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) を 100 μ L 添加した。2 分間反応させた後、1N HCl を 100 μ L 添加することにより反応を停止させ、450 nm の吸光度を測定した。

4.2.9 成長因子一体化 CUBE ゲルを用いた HUVEC の血管新性能評価

HUVEC を 10 μ M の CellTracker™ Orange CMTMR fluorescence probe (Invitrogen) で染色後、2 ng の bFGF, 2 ng の VEGF₁₆₅ を添加した 50 μ L の 5% w/v bRGD-CUBE (bRGD = 1.25 mM) 溶液当たり 4×10^5 cells の密度になるように懸濁した。各成長因子 (GFs) と bRGD-CUBE を含む細胞懸濁液は、25 μ L のドロップレットとなるように、浮遊培養用 24-well plate (IWAKI 1820-024) の中央に滴下し、37°C にて 10 分間インキュベートを行うことによりゲル化させた。細胞を包埋したハイドロゲルは、GFs を抜いた HuMedia-EG2 に浸し、37°C にて培養を行った。またコントロールとして、GFs を添加していない bRGD-CUBE, 及び同量の GFs を添加した HuMedia-EG2 を使用した。

一晩培養後、CUBEs ハイドロゲルに包埋した HUVEC の形態観察を、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV300) を用いて行った。さらに、血管新生マーカー遺伝子の発現量を 4.2.7 と同様にして評価した。

4.3 実験結果及び考察

4.3.1 融合タンパク質の発現及び精製

構築した(AVGVP)₄₂-D₈₈-bRGD-CL (ELP-D₈₈-R-CL: bRGD-CUBE) を Figure 4-3A に示した。bRGD-CUBE は, Figure 3-5 で示した他の CUBEs と同様に大腸菌 BL21(DE3) 株を用いて発現誘導を行い, ITC の改法により可溶画分から精製を行った。精製した bRGD-CUBE の収量は, 他の CUBEs と同様に培養液 1L 当たり, 少なくとも乾燥重量で 200 mg であり, ITC 法を利用することにより, 容易に大量に得られることが示された。bRGD-CUBE の精製度は, SDS-PAGE で展開することにより評価を行った (Figure 4-3B)。観察されたバンドは, 分子量から予想される位置より高い位置に現れた (O-CUBE: 39.3 kDa; bRGD-CUBE: 40.6 kDa)。この理由としては, 3.3.1 で述べたが, ELP の特性^[180], 及び強く負に帯電した polyD に起因^[181]するものと考えられる。融合タンパク質の精製度は, ほぼ単一バンドであったことから, 高水準であり, 以降の実験に十分な精製度であった。

また, bRGD-CUBE を加温することにより得られるハイドロゲルは, bRGD を導入していない O-CUBE と同様の温度応答性を示し, 透明性の高いハイドロゲルであった (Figure 4-3C)。したがって, bRGD モチーフの導入は, CUBE の会合やハイドロゲル形成, ゲルの透明度に影響を与えないことが示された。

4.3.2 融合タンパク質の細胞接着能評価

bRGD-CUBE の機能性を評価するため, まず二次元上での細胞接着能を HUVEC により調べた。ノンコート及び, O-CUBE をコーティングしたプレートはネガティブコントロールとして使用した。各プレートに細胞を播種し, 3 時間のインキュベーション後に細胞の形態観察を行った (Figure 4-4)。O-CUBE をコーティングしたプレート上で培養した HUVEC は, ほとんど接着しておらず, ノンコートのプレートと同等の細胞接着性であった。一方で,

bRGD-CUBEをコーティングしたプレート上では、強いHUVECの接着、伸展が観察された。このことから、bRGD-CUBEが細胞接着活性を有していると共に、生理活性ペプチドを導入することにより、容易にCUBEを機能化できることが示された。

4.3.3 CUBEゲルを用いたHUVECの血管新性能評価

機能性CUBEの三次元足場材料としての有用性を調査するため、bRGD-CUBEハイドロゲル内でHUVECを三次元培養し、血管新生活性の評価を行った。bRGD濃度の異なる(0-1.25 mM) CUBEハイドロゲルに包埋培養したHUVECの形態観察を行ったところ、16時間以内に三次元的な脈管類似構造を形成し、この細胞ネットワークの形成は、bRGD濃度に依存して促進された (Figure 4-5A)。

また、この観察結果を定量的に示すために、real-time PCRによって、管腔形成マーカーであるMMP-2, Ang-2, Tie-2の遺伝子発現を分析した。MMP-2は、内皮細胞が遊走する際に、新生血管周囲のECMタンパク質を分解する役割を担っており^[149, 192]、血管新生シグナルの刺激に応答し、血管内皮細胞から大量に分泌される。MMP-2による基底膜成分の消化は、血管内皮細胞の遊走に不可欠であり、ガン組織における浸潤・転移にも関与する因子として知られている。また、Ang-2とTie-2は、新生血管形成のシグナル伝達における重要なリガンド、レセプターである^[193, 194]。Tie-2は血管内皮細胞膜上に発現して機能するレセプター型チロシンキナーゼであり、血管内皮細胞と壁細胞の接着や解離、遊走に関与することが知られている。Tie-2のリガンドには、Ang-1及びAng-2が同定されている。Ang-1は壁細胞から分泌され、Tie-2のリン酸化を誘導し、内皮細胞と壁細胞の細胞間接着を促すことにより血管を安定化させる。一方で、Ang-2はリン酸化を誘導しないアンタゴニストとして働き、内皮細胞と壁細胞の接着を抑制することにより、内皮細胞の発芽、血管新生が誘導される^[193]。したがって、Ang-2及びTie-2の発現量を評価することにより、血管新生や管腔形成の指標として論じることができると考えられる。

これらの血管新生マーカー遺伝子の発現量は、bRGD 濃度依存的に亢進されており、細胞観察の結果に対応した結果となった (Figure 4-5B)。

以上の結果より、CUBE ゲル内に三次元的に配置された bRGD ペプチドは適切な構造を保っており、bRGD-CUBE は、HUVEC の三次元脈管ネットワーク形成を促進したことが示された。したがって、本機能性タンパク質ハイドロゲルは HUVEC の血管誘導に適した微小環境を提供していると考えられる。

bRGD は、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン及び $\alpha_2\beta_1$ インテグリンレセプターと相互作用することが知られている^[195, 196]。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンは、血管新生の際に強く上方制御され^[197]、これらの相互作用は、内皮細胞の血管新生に不可欠であると考えられている。一方で、I 型コラーゲンのインテグリンレセプターでもある、 $\alpha_2\beta_1$ インテグリンは、三次元血管内腔形成において重要な役割を担うことが示されている^[198]。注目すべきことに、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン特異的なフィブロネクチン由来の GRGDS を修飾した CUBE (R-CUBE) は、ゲル上培養において HUVEC の二次元的な脈管類似構造の形成を誘導したが、三次元的な血管新生は促進されなかった。したがって、三次元脈管形成の誘導は、おそらく $\alpha_v\beta_3$ だけでなく、 $\alpha_2\beta_1$ インテグリンレセプターの刺激が必要であると考えられる。実際、 β_1 と β_3 インテグリンは、血管内腔形成に関係することが示されており^[199]、これらの活性化の上方制御や阻害は、病的血管新生に関係している^[200]。したがって、インテグリン活性化の精密な制御は、治療的血管新生や腫瘍血管新生の理解に重要である。

本研究で設計した機能化 CUBE は、導入する生理活性ペプチドを変更することにより、容易にその機能性を調整可能であることから、組織工学における有用な三次元足場材料の候補になりうると期待できる。

4.3.4 ELISA による CUBE への成長因子保持能評価

CUBE は polyD によって強く負に帯電しているため、静電相互作用を利用し、塩基性ドメインを有する成長因子を保持できる可能性がある。実際、生体内においても、多数の硫酸基とカルボキシル基を持つヘパリン、ヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカンを介して、bFGF、VEGF などの成長因子の保持、拡散性を制御している^[166,167]。そこで ELP-D₈₈-CL においてもこのような機能を有しているかを調査するため、bFGF、VEGF₁₆₅ の CUBE への結合能を ELISA によって評価を行った。なお VEGF は選択的スプライシングによって、ヒトでは VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ 等のいくつかの亜型が存在し、ヘパリン結合サイトの有無、長さが異なっている (Figure 4-6) ^[191]。

ヘパリン結合ドメインを欠如している VEGF のスプライスアイソフォームである、VEGF₁₂₁ はネガティブコントロールとして使用した。リコンビナント bFGF 及び VEGF を ELP-CL あるいは ELP-D₈₈-CL をコーティングした表面と反応させ、保持された各成長因子を、特異的抗体を用いて検出した (Figure 4-7A, B)。bFGF は、ELP-CL をコーティングした表面上に比べ、ELP-D₈₈-CL をコーティングした表面において結合量が増大し強いシグナルを示した (Figure 4-7C)。同様に、VEGF₁₆₅ は、ELP-CL で修飾した表面上での結合量に対し、ELP-D₈₈-CL で修飾した表面においては、効率的な結合を示した (Figure 4-7D)。さらに、ELP-D₈₈-CL は、正電荷のヘパリン結合ドメインを有さない VEGF₁₂₁ よりも VEGF₁₆₅ に対して優位に相互作用した。

これらの結果より、ELP-D₈₈-CL は、成長因子の塩基性ドメインとマトリックスにおける D₈₈ 間の静電相互作用を介して、bFGF や VEGF₁₆₅ といったヘパリン結合性成長因子を特異的に認識していると言える。したがって、CUBE ハイドロゲルは、成長因子の持続的な徐放担体として利用可能であると考えられる。

4.3.5 成長因子一体化 CUBE ゲルを用いた HUVEC の血管新性能評価

CUBE ハイドロゲルと静電的に保持された成長因子 (GFs) による相乗作用を調査するため, HUVEC を, GFs を添加した bRGD-CUBE ゲル内で培養し, 血管新生活性を評価した. GFs 一体化 bRGD-CUBE ゲル内で包埋培養した HUVEC の形態観察を 16 時間の培養後に行った (Figure 4-8). HUVEC の形態変化は, GFs を抜いた条件においても観察された. しかしながら, 三次元脈管類似構造の形成は, GFs を添加することにより促進された. 特に, bFGF と VEGF₁₆₅ を保持させた bRGD-CUBE ハイドロゲルは, 血管新生活性を効率的に促進させた (Figure 4-8A). また, この観察結果を定量的に示すために, real-time PCR によって, 血管新生マーカーである MMP-2, Ang-2, Tie-2 の遺伝子発現を分析した (Figure 4-8B). GFs の添加は, MMP-2 と Ang-2 の遺伝子発現を促進させた. 特に, bFGF と VEGF₁₆₅ を保持させた bRGD-CUBE ハイドロゲルは, コントロールと同量の soluble GFs を使用しているのにも関わらず, 最も高い発現活性を示した. 同様に, bFGF を保持させた bRGD-CUBE ハイドロゲルは, 同量の bFGF を培地に添加したコントロールと比較して, より高い Ang-2 の発現を示した. MMP-2 の発現は, VEGF により誘導されることが示唆されており^[201], VEGF を固定化することにより, MMP-2 の発現が高まったと考えられる. 一方で, bFGF のみの固定では, 効率的なシグナル伝達が行われず, MMP-2 発現の有意差が見られなかったと考えられる. また, Tie-2 の発現においては, bFGF 及び VEGF 添加による有意差が観察されなかった. 今回の実験では, bFGF 及び VEGF を固定化することによるマトリックスとの相乗効果を検証するため, HUVEC の培養に通常添加される EGF を抜いた条件で評価を行っており, この EGF の存在が Tie-2 の発現に関係している可能性がある. 実際, アテロコラーゲン上での HUVEC の脈管形成評価において, bFGF, EGF, VEGF を組み合わせることにより, Tie-2 の発現を促進させることが示されている^[162]. したがって, より効率的に脈管形成, 血管新生を誘導するには, bFGF, VEGF に加え, EGF を組み合わせたマトリックスが有効であると考えられる. CUBE ゲルへの一体化を試みるのであれば, ヘパリン結合ドメインを有する EGF

ファミリーの増殖因子である Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)^[202] を利用する、あるいは ELP を遺伝子工学的に連結した ELP-EGF を用いるアプローチが有効である可能性がある。ELP-EGF は、CUBE のゲル化と同時に CUBE の ELP の架橋点部位に組み込まれ、固定化可能であると考えられる。さらに ELP と EGF 間にプラスミンや MMP 等のプロテアーゼ認識サイト^[203,204]を導入することにより、目的に応じた成長因子の徐放制御も可能になると考えられる。なお、本戦略をとることにより、ヘパリン結合性の成長因子だけでなく、あらゆるシグナル因子の時空間的徐放制御が実現できる可能性がある。

以上の結果より、CUBE ゲル中に保持された GFs は活性を失うことなく効率的に作用し、かつ局所濃度が高まることにより、HUVEC の三次元的な血管新生活性が促進されたことが示された。言い換えると、CUBE ゲルに GFs を保持させることにより、血管新生誘導のための GFs の使用量を減らすことが可能であると言える。FGF や VEGF ファミリーは、重要な血管新生因子であり、それらのクロストークは、腫瘍血管新生を含む異なる病的状態における血管形成の調整に重要な役割を担っていることが知られている^[205,206]。したがって、GFs の時空間的デリバリーは、細胞-ECM 間の相互作用と同様に三次元的な細胞機能を制御するうえで、不可欠であると言える。本研究で設計した多機能 CUBE ハイドロゲルは、GFs のデリバリーが可能であり、ECM と GFs からの相乗的なシグナル伝達の誘導を可能であることが示唆された。また前項 4.3.4 の結果と合わせて考えると、CUBE ゲルに対する GFs の結合力の違いを利用することにより、天然 ECM のように VEGF₁₂₁ や VEGF₁₆₅ のような GFs のハイドロゲル中における濃度勾配を制御できる可能性があり、より精密な細胞の機能制御につながる事が期待できる。

4.4 結言

本章では、前章で構築した温度応答性タンパク質である CUBE ハイドロゲルの三次元足場材料としての有用性を示すために、CUBE に ECM 由来の生理活性ペプチド、及び成長因子保持機能を導入することにより、ECM 及び成長因子からの相乗的なシグナル伝達を通じて、HUVEC の血管新生を制御し、三次元血管ネットワーク形成を誘導可能な多機能タンパク質ハイドロゲルの構築を行った。

本研究では、血管新生を誘導することが知られている BSP 由来の RGD 配列 (bRGD) に着目し、この生理活性ペプチドを CUBE に導入することにより、機能化を行った。本融合タンパク質 (AVGVP)₄₂-D₈₈-bRGD-CL (bRGD-CUBE) は他の CUBE_s と同様にして遺伝子工学的に構築し、大腸菌 BL21(DE3)株を用いて発現させ、ITC 法により精製を行った。bRGD-CUBE は、(AVGVP)₄₂-D₈₈-CL (O-CUBE) と同様に温度応答性ゾル-ゲル転移を示すと共に透明性の高いゲルを形成し、bRGD ペプチド導入後もゲル化能を保持していることが観察された。また、bRGD-CUBE の機能性を評価するため、まず二次元での細胞接着能を HUVEC により調べた結果、強い細胞の接着、伸展が観察された。このことから bRGD-CUBE が細胞接着活性を有していると共に、生理活性ペプチドを導入することにより、容易に CUBE を機能化できることが示された。そして、bRGD-CUBE 内で HUVEC を三次元培養し、脈管形成能の評価を行ったところ、bRGD 濃度依存的に HUVEC の三次元血管新生が誘導されている様子が観察された。また同時に血管新生マーカーの発現量測定を行ったところ、ターゲット遺伝子の発現亢進が観測され、bRGD 導入による血管新生促進能が明らかとなった。以上の結果より、CUBE ゲル内に三次元的に配置された bRGD は適切な構造を保持しており、本機能性タンパク質ハイドロゲルは HUVEC の血管誘導に適した微小環境を提供していることが示された。

また、本融合タンパク質の構成要素である polyD による静電相互作用を介した、塩基性領域を有する成長因子 (bFGF, VEGF) の保持・デリバリーへの利用が可能かを検討した。まず ELISA を応用することにより評価を行ったところ、ELP-D₈₈-CL は、成長因子の塩基性ドメインとマトリックスにおける D₈₈間の静電相互作用を介して、bFGF や VEGF₁₆₅ といったヘパリン結合性成長因子を特異的に認識していることが明らかとなった。さらに bRGD-CUBE に bFGF, VEGF を静電的に保持させ、本成長因子一体化多機能タンパク質ハイドロゲル内で HUVEC の三次元培養を行い、脈管形成能の評価を行ったところ、同量の成長因子を培地に添加した条件と比較して、有意に脈管形成が促進された。以上のことから、本研究で設計した多機能 CUBE ハイドロゲルは、成長因子のデリバリーが可能であり、ECM と成長因子からの相乗的なシグナル伝達の誘導が可能であると結論付ける。

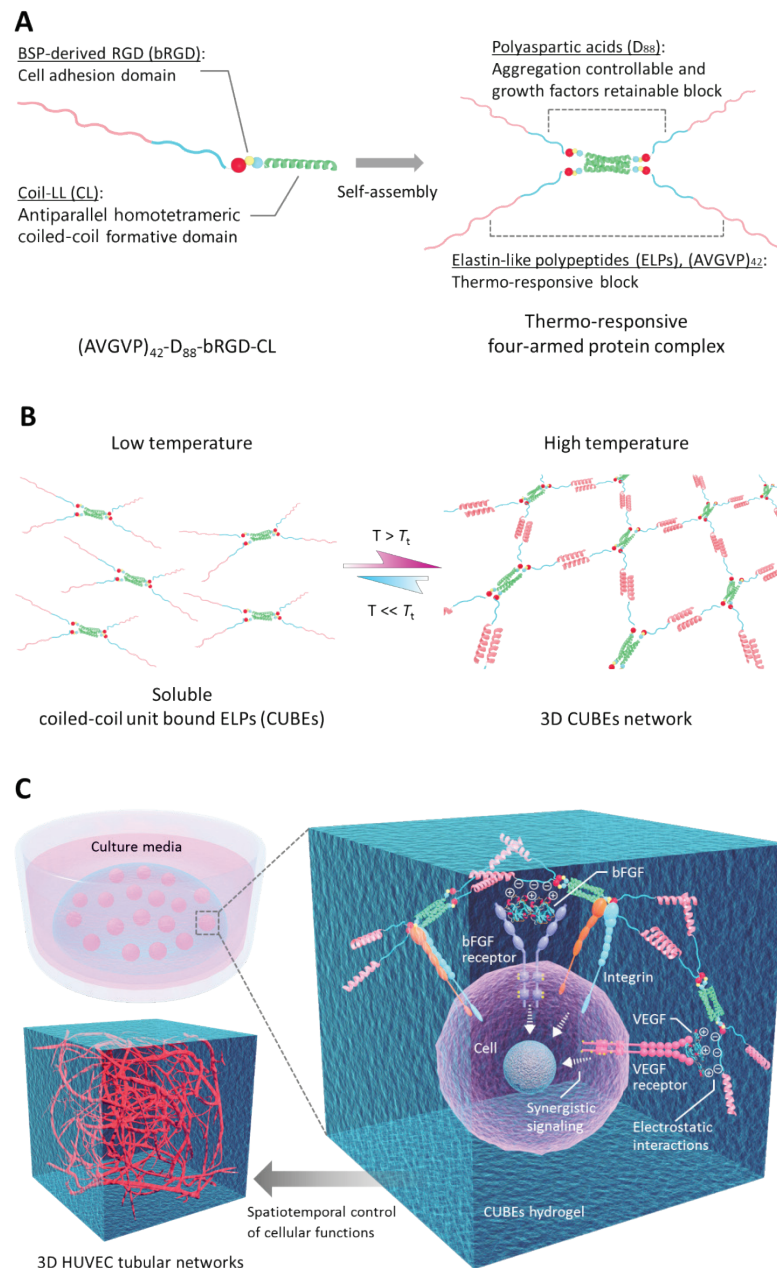


Figure 4-1 | 温度応答性多機能タンパク質ハイドロゲルの概念図.

A: ECM タンパク質はアンチパラレルホモ四量体 coiled-coil 構造を形成する CL を介して会合し, 温度応答性の ELP がそれぞれ両末端に位置する四本腕のタンパク質複合体を形成する.

B: bRGD-CUBE は, 温度に依存して可逆的に 3D ネットワークを形成する.

C: 多機能タンパク質ハイドロゲルによって誘導される相乗的なシグナル伝達による時空間細胞機能制御. bRGD-CUBE ハイドロゲル内で培養される HUVEC は, 血管新生が促進され, 三次元脈管ネットワークを形成する.

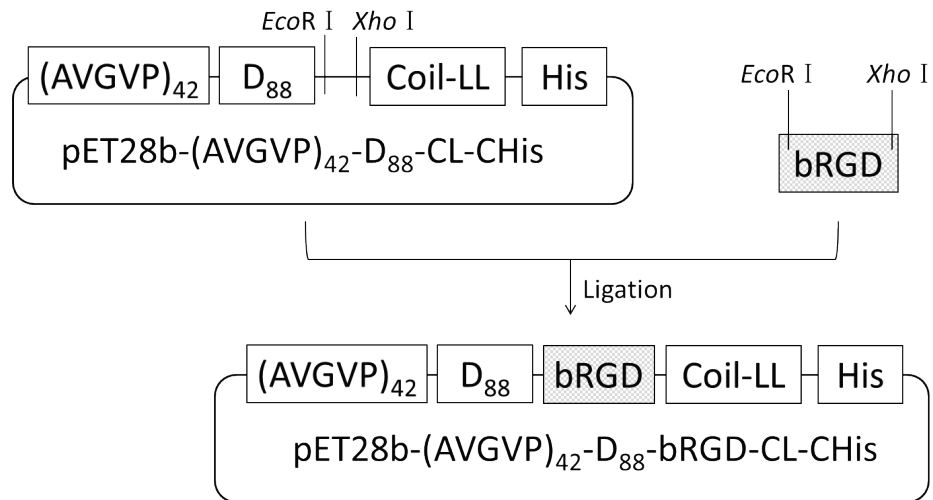


Figure 4-2 | bRGD-CUBE のプラスミド構築スキーム.

温度応答性ゲル化タンパク質である O-CUBE に骨シアロタンパク質 (BSP) 由来の RGD 配列 (bRGD)を導入することにより(AVGVP)₄₂-D₈₈-R-CL (bRGD-CUBE) を構築した.

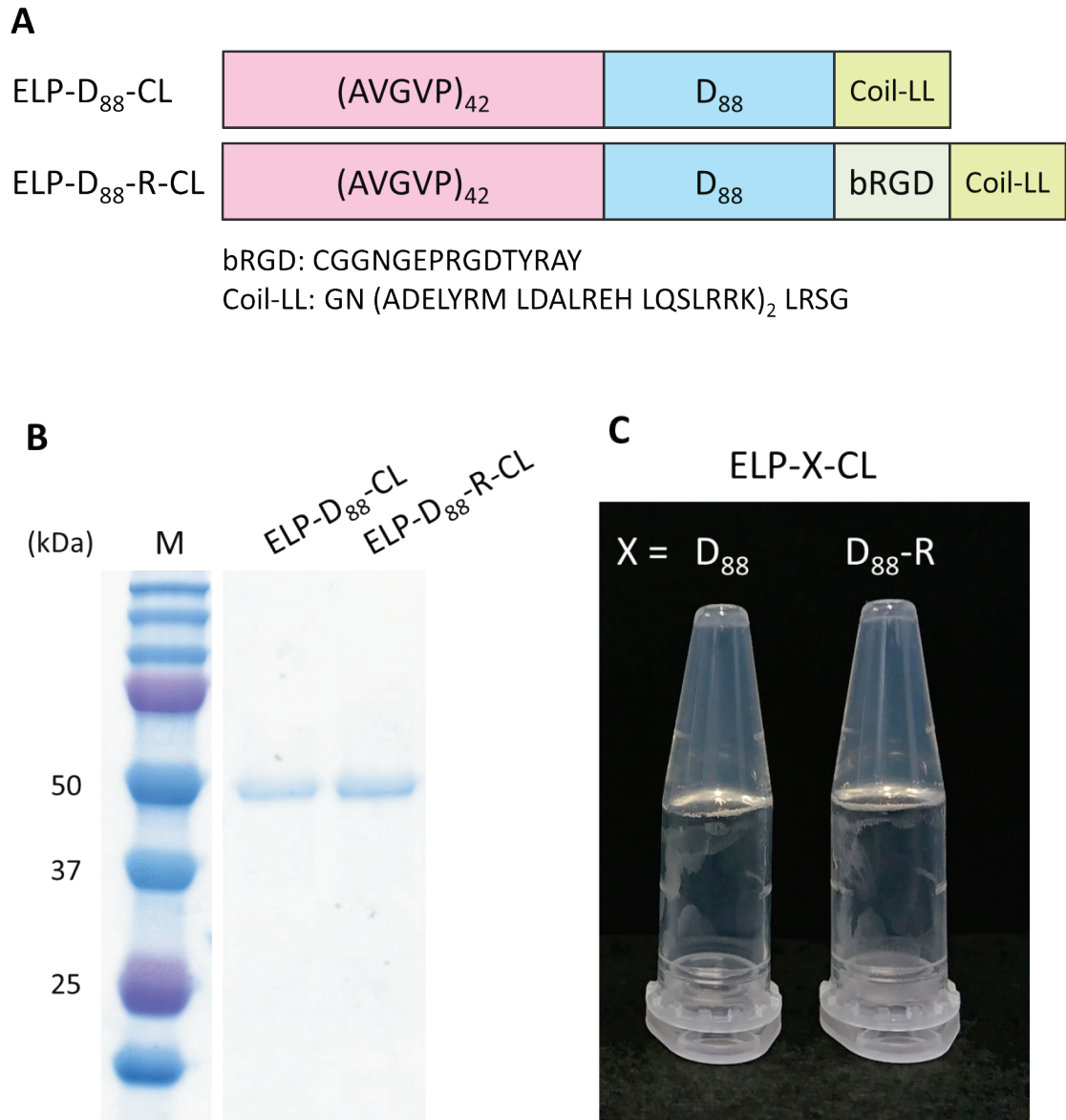


Figure 4-3 | 温度応答性多機能タンパク質ハイドロゲルの構築.

A: bRGD 修飾 CUBE の設計.

B: 精製した CUBE_s の SDS-PAGE による展開. ELP-D₈₈-CL: 39.3 kDa; ELP-D₈₈-R-CL: 40.6 kDa.

C: bRGD-CUBE ハイドロゲルの透明度.

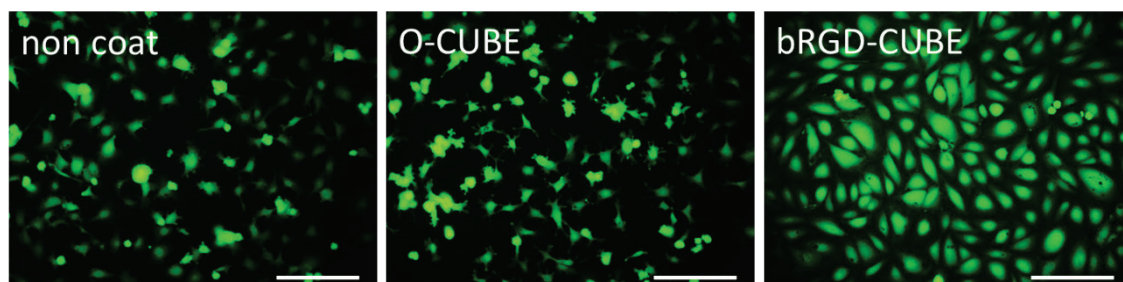


Figure 4-4 | bRGD-CUBE の細胞接着能評価.

各プレートに細胞を播種し、3時間のインキュベーション後に Calcein-AM で染色した細胞の形態観察を行った． bRGD-CUBE をコーティングしたものにおいて，強い HUVEC の接着，伸展が観察された． Scale bar = 200 μ m.

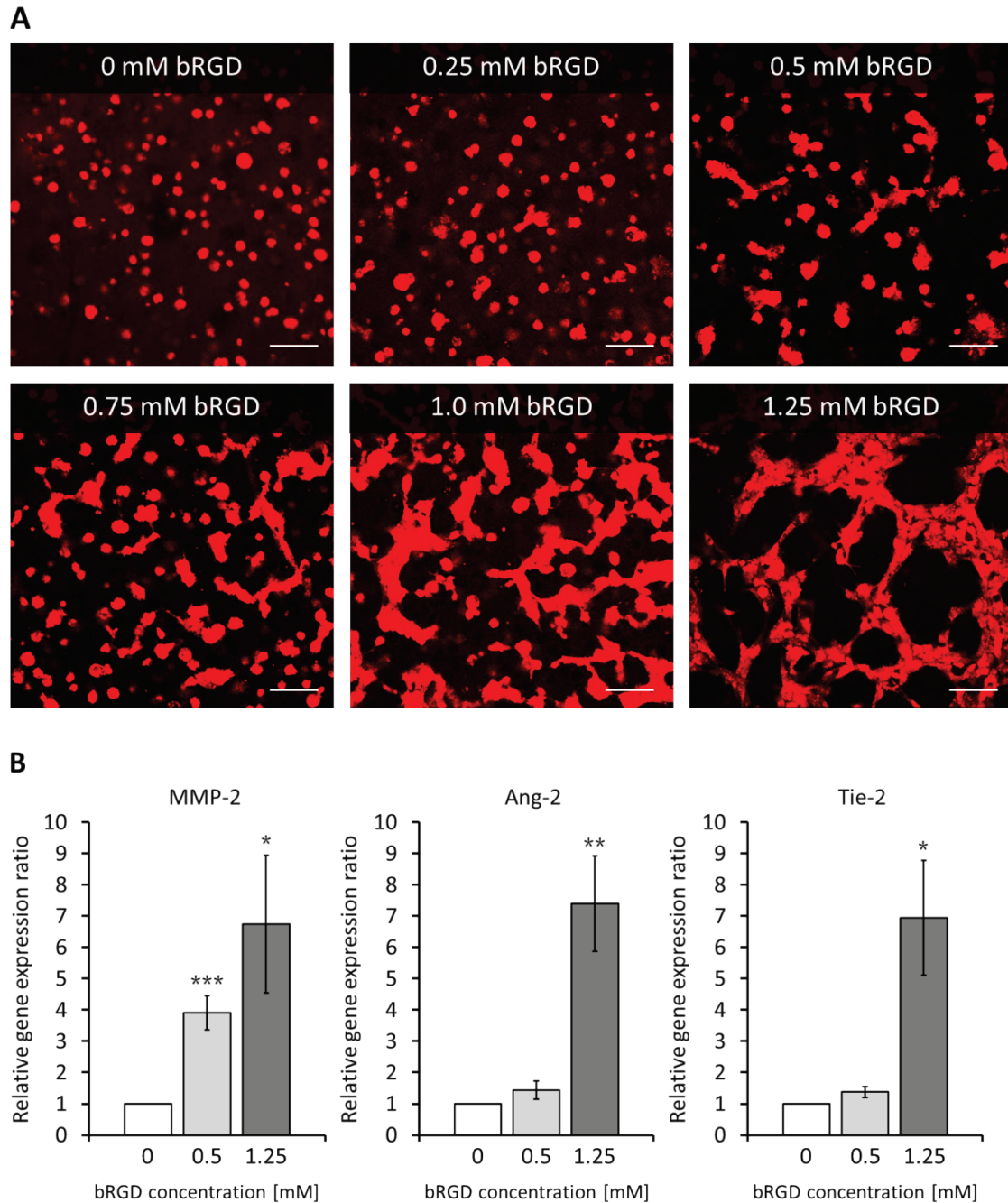


Figure 4-5 | bRGD-CUBE ハイドロゲルによる血管新生活性.

A: bRGD 濃度の異なる (0-1.25 mM) 5% w/v CUBE ハイドロゲルに包埋培養した HUVEC の形態観察. Scale bar = 50 μ m.

B: 血管新生マーカーの real-time PCR 解析. HUVEC を bRGD 濃度の異なる CUBE ハイドロゲルで包埋培養し, 16 時間後に細胞を回収し, real-time PCR を行った. エラーバーは, 平均値の標準誤差を表す. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

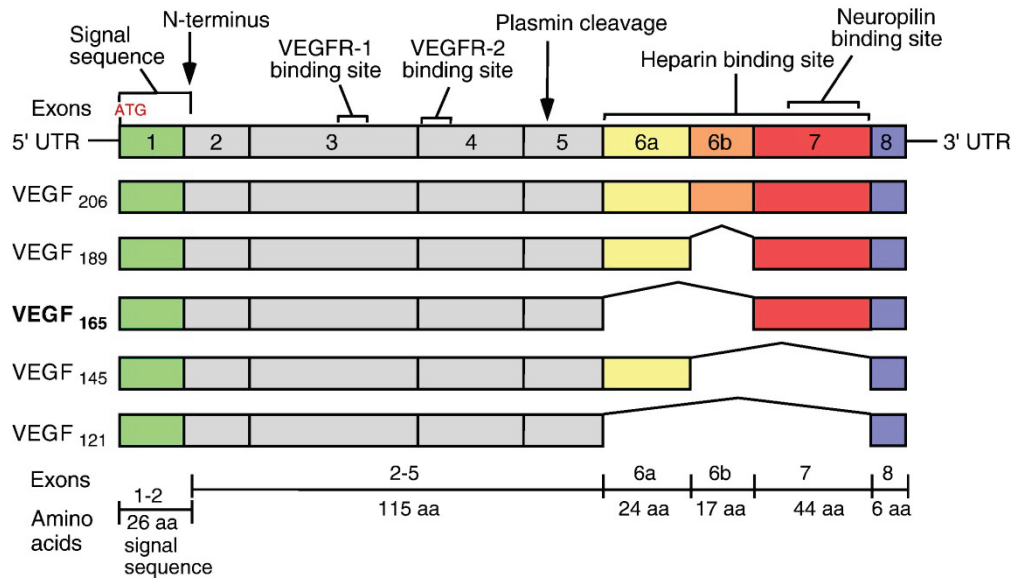


Figure 4-6 | ヒト VEGF-A mRNA スプライスバリエントのエクソン構造. [191]

VEGF-A をコードする遺伝子は, 異なる構造モチーフをコードする 8 つのエクソンから成る. 選択的スプライシングによって, アミノ酸残基数の異なるいくつかのアイソフォームが形成する.

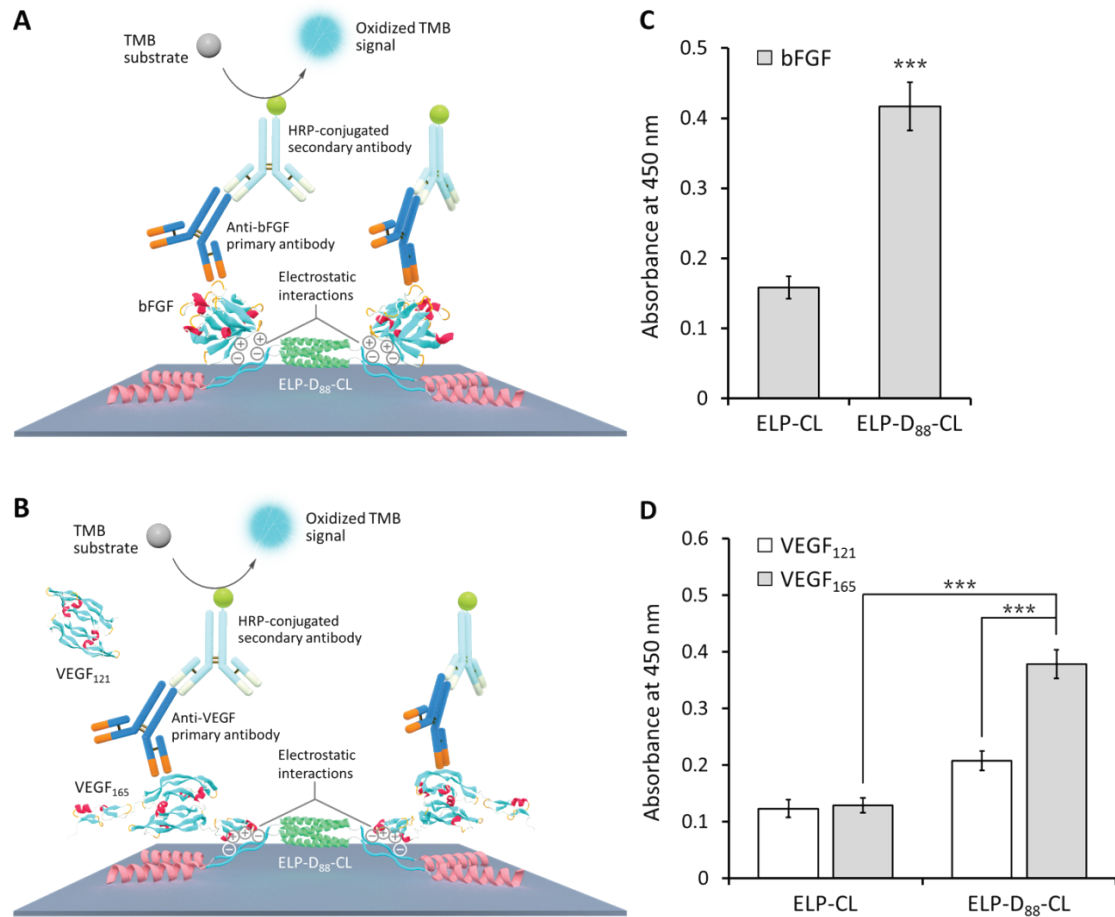


Figure 4-7 | 静電相互作用を介した ELP-D₈₈-CL と成長因子間の結合活性.

A, B: ELISA による結合評価の概念図.

A, C: bFGF と ELP-D₈₈-CL における D₈₈ ドメイン間の特異的結合.

B, D: VEGF₁₆₅ と ELP-D₈₈-CL における D₈₈ ドメイン間の特異的結合. ヘパリン結合ドメインを欠如している VEGF のスプライスアイソフォームである, VEGF₁₂₁ はネガティブコントロールとして使用した. エラーバーは, 平均値の標準誤差を表す. *** $P < 0.001$.

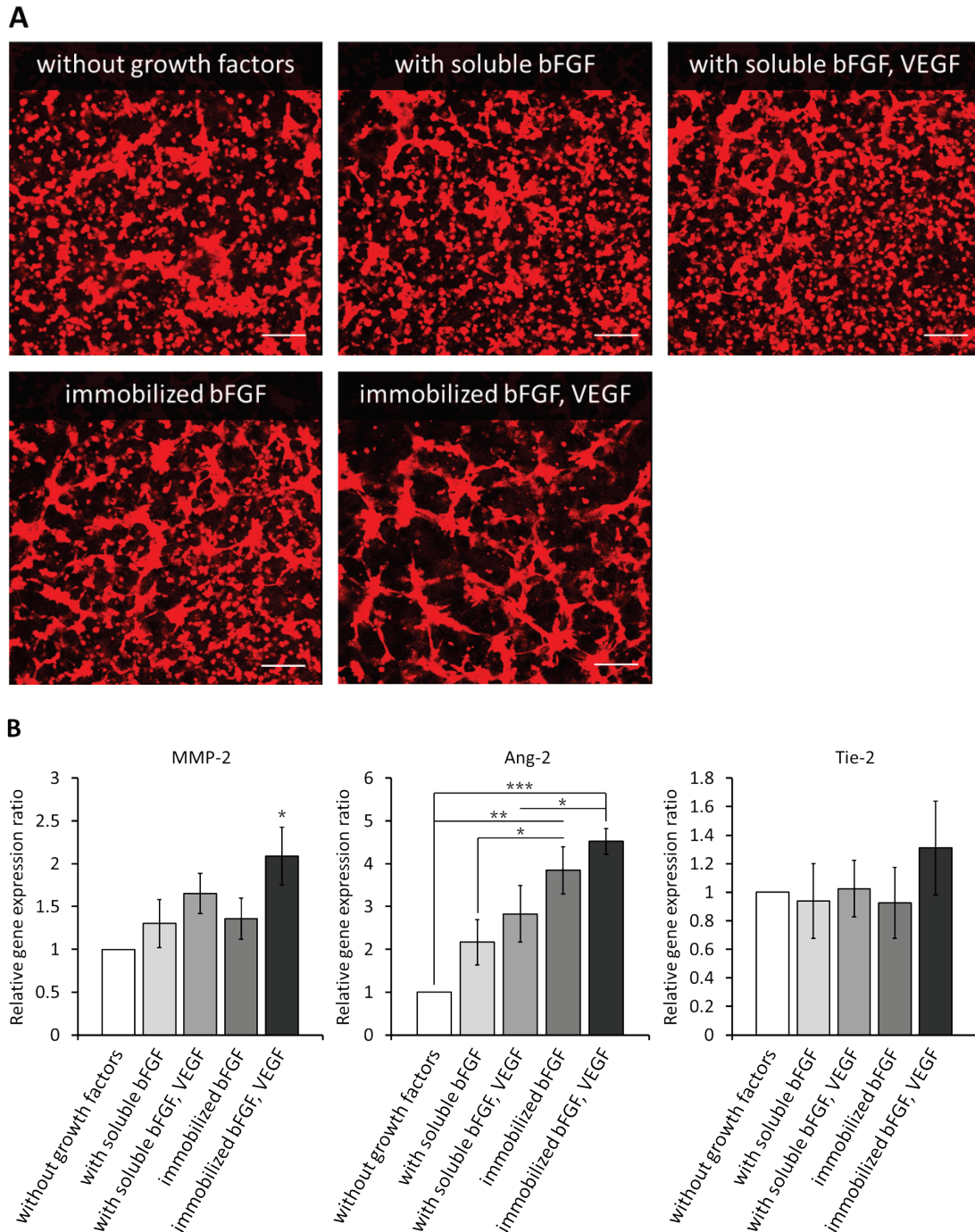


Figure 4-8 | 成長因子一体化 bRGD-CUBE ハイドロゲルによる血管新生活性。

A: 成長因子 (bFGF, VEGF₁₆₅) 含有 5% w/v bRGD-CUBE ハイドロゲル (bRGD = 1.25 mM) に包埋培養した HUVEC の形態観察。 Scale bar = 100 μ m.

B: 血管新生マーカーの real-time PCR 解析。 エラーバーは、平均値の標準誤差を表す。 * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

第 5 章

結論

5. 結論

機能性三次元生体組織を構築するには、生体微小環境を再現することにより、細胞機能を時空間的に制御することが必要である。そこで本研究では、接着、増殖、分化、組織形成等の細胞機能を時空間的に制御可能な高機能性三次元足場材料を構築することを目的とし、生体微小環境を模倣した新規タンパク質ハイドロゲルの開発を行った。具体的には、生体親和性が高く特異性の高い分子認識により規定された分子設計が可能なタンパク質に着目し、helix ペプチドの coiled-coil 構造形成による自己組織化、及び elastin-like polypeptide (ELP) の温度応答性会合を利用した特異的分子間相互作用により、ゲル化能、及び非共有結合性のシグナル因子保持能を付加し、さらに機能性配列の導入により多機能タンパク質からなる超分子ハイドロゲルの構築を目指した。本戦略を取ることで、特定の組織に適した三次元空間を提供するデザイナータンパク質ハイドロゲルの構築が可能になると考えられる。

第 2 章では、triple helix を利用することで、ERE タンパク質に自己組織化能、及びシグナル因子保持能を付加した高機能性足場材料の構築に成功した。まず、足場材料骨格である ERE の両末端に hA または hC を結合した ARA, CRC の構築を行い、これらの融合タンパク質を混合することにより形成するナノファイバーを TEM で観察し、さらに細胞接着能を有することを示した。次に、この ARA-CRC からなる足場材料に結合することのできる hB-bFGF の構築を行い、ELISA 法を応用することで、hB-bFGF が ARA-CRC に特異的に結合していることを示した。そして最後に、構築したシグナル因子一体化足場材料を用いて、細胞増殖能の評価を行い、その優位性を示した。以上より、hB-bFGF は triple helix の形成を介して ECM タンパク質に固定化されることにより、細胞増殖活性が長期的に維持されることが明らかとなった。本研究におけるマテリアル設計の有用性が示されたものの、ELP は疎水性が高く不均一に凝集しやすい性質をもつため、均一なゲルとすることは難しく、三次元培養を行

うためのハイドロゲル創出には至らなかった。このことから、タンパク質ハイドロゲルの構築には、ELP の凝集を制御するための親水性ブロックの導入が不可欠であることが示唆された。

以上の知見を踏まえ、第 3 章では、ELP の凝集を制御し親水性を高めるためのブロックとしてポリアスパラギン酸 (polyD) に着目し、さらに架橋点としてアンチパラレルホモ四量体 coiled-coil 構造を形成する Coil-LL ペプチド (CL) を導入することにより、ハイドロゲルの構築を試みた。また本研究では、より実用性の高い三次元足場材料とするため、ELP の中でも可逆的な温度応答能、すなわち低温では分散状態で存在するが、相転移温度 (T_i) を越えると相分離を起こし凝集体を形成する性質、を持つ (AVGVP)_n を採用することにより、細胞に傷害を与えることなく、細胞の包埋や回収を簡便に行うことを可能にした新規温度応答性ゲル化タンパク質の構築を行った。

感温性ポリペプチド配列 (AVGVP)₄₂ に静電的反発により凝集を制御する D₈₈、架橋点となる CL を連結した融合タンパク質 (AVGVP)₄₂-D₈₈-CL (coiled-coil unit bound ELP: CUBE) を遺伝子工学的に構築した。CUBE は、30℃付近でハイドロゲルを形成し、低温でゾル状態へ戻るという可逆的な温度応答性ゾル-ゲル転移を示した。また形成したハイドロゲルは、polyD の長さに依存してゲルの透明性が向上することが観察され、D₈₈ を連結した CUBE においては、非常に透明性の高いハイドロゲルを形成した。以降、最も透明度の高いハイドロゲルを形成した、(AVGVP)₄₂-D₈₈-CL (O-CUBE) に焦点を当て、評価を行った。

O-CUBE は、2% w/v 以上でゲル化し、このゲル化は CUBE ネットワークからなる多孔質構造の形成によるものであることが、TEM 観察の結果より明らかとなった。また CUBE 濃度増加に伴いゾル-ゲル転移温度が低温側にシフトし、導入した ELP の性質を反映していることが示唆された。加えて、CUBE ゲルの粘弾性は、濃度に依存して変化することから、ECM の機械的性質を調整可能であることが示された。最後に A549 細胞を O-CUBE ゲル内に内包し三次元培養を行い、長期的にゲル内で細胞の培養が可能であることが明らかとなった。

従来, ELP の温度応答能を利用したスマートゲル作製のアイディアは存在していたが, 疎水性が高く不均一に凝集しやすい ELP を均一なハイドロゲルとすることは難しく, 実現は容易ではなかった. しかしながら, 本研究において, ELP と polyD, CL ペプチドを組み合わせることにより, 細胞の三次元培養が可能な温度応答性タンパク質ハイドロゲルを構築可能であることが明らかとなった.

本研究においては, ELP の鎖長を一定とし polyD の鎖長が異なる CUBEs を構築し, 形成するハイドロゲルの透明性に影響を与えることを明らかにしたが, これは CUBE が形成する三次元ネットワーク構造が変化した結果であると考えられる. すなわち, polyD の鎖長が短くなるにつれ, 物理的なポリペプチド鎖長の減少に加え, 電子的反発が弱まることにより, 網目構造における細孔が小さくなる結果, 光の透過性が減少すると予想される. 本研究では評価しきれなかったが, 細孔の大きさは光の透過性だけでなく, 細胞の遊走やゲルの機械的性質, サイトカイン等の様々な物質のゲル中における拡散性等に影響を与えると考えられる. また, ELP の鎖長を調整することによっても同様に, 形成する三次元ネットワーク構造が変化することが予想される. 加えて, 本研究において O-CUBE 濃度を調整することにより, 形成するハイドロゲルの機械的性質を調整可能であると述べたが, ポリペプチド濃度の変化に伴って, 機械的性質だけでなく, 三次元ネットワーク構造が変化することに起因する様々なパラメータの変動が予想される. したがって, これらの因子が細胞に与える影響を考慮する必要がある, さらなる調査が必要であると考えられる. さらに CUBE に導入する coiled-coil 構造を形成する helix ペプチドにおいても同様に検討を行うことにより, より幅広い性質の制御が可能なマテリアル設計につながることを期待される. 本研究においては, anti-parallel 型かつ多分岐の coiled-coil 構造を形成することを基準とし, 安定的かつ性質が明らかとなっている anti-parallel ホモ四量体の coiled-coil 構造を形成する Coil-LL ペプチドを採用したが, anti-parallel 型でより多分岐 (eg. ホモ六量体, 八量体) の coiled-coil 構造を形成する helix ペプチドを利用することができれば, 架橋密度が増加するため, より機械的性質の高いハイドロゲルの構築

が期待できる。以上より、CUBE の骨格となる ELP, polyD の鎖長, 及び coiled-coil ドメインの種類を調整した CUBE_s を設計することにより, より精密制御された三次元微小空間の構築が期待できる。

第 4 章では, CUBE ハイドロゲルの三次元足場材料としての有用性を示すために, CUBE に ECM 由来の生理活性ペプチド, 及び成長因子保持機能を導入することにより, ECM 及び成長因子からの相乗的なシグナル伝達を通じて, HUVEC の血管新生を制御し, 三次元血管ネットワーク形成を誘導可能な多機能タンパク質ハイドロゲルの構築を行った。

CUBE に BSP 由来の RGD 配列 (bRGD) を導入することにより, 機能化を行った。本融合タンパク質 (AVGVP)₄₂-D₈₈-bRGD-CL (bRGD-CUBE) は (AVGVP)₄₂-D₈₈-CL (O-CUBE) と同様に温度応答性ゾル-ゲル転移を示すと共に透明性の高いゲルを形成し, bRGD ペプチド導入後もゲル化能を保持していることが観察された。また, bRGD-CUBE は, HUVEC の接着, 伸展を促進することから, bRGD の機能を反映していると共に, このように生理活性ペプチドを導入することにより, 容易に CUBE を機能化できることが示された。さらに, bRGD-CUBE 内で三次元培養した HUVEC は, 脈管形成が促進され, この活性は bRGD 濃度依存的であることが明らかとなった。したがって, CUBE ゲル内に三次元的に配置された bRGD は適切な構造を保っており, 本機能性タンパク質ハイドロゲルは HUVEC の血管誘導に適した微小環境を提供していることが示された。

また, O-CUBE は, 成長因子の塩基性ドメインとマトリックスにおける D₈₈ 間の静電相互作用を介して, bFGF や VEGF₁₆₅ といったヘパリン結合性成長因子を特異的に認識していることが明らかとなった。さらに bFGF, VEGF を静電的に保持させた bRGD-CUBE ハイドロゲル内で HUVEC の三次元培養を行い, 脈管形成能の評価を行ったところ, 同量の成長因子を培地に添加した条件と比較して, 有意に脈管形成が促進された。以上のことから, 本研究で設計した多機能 CUBE ハイドロゲルは, 成長因子のデリバリーが可能であり, ECM と成長因子からの相乗的なシグナル伝達の誘導が可能であることが示された。

本研究においては、CUBE を機能化する生理活性ペプチドとして、血管新生を誘導することが知られている骨シアロタンパク質 (BSP) 由来の RGD 配列 (bRGD) に着目し、bRGD-CUBE ハイドロゲルが HUVEC の三次元的な血管新生を誘導することを明らかにしたが、bRGD ペプチドだけでなく、複数種の生理活性ペプチドを組み合わせることにより、より生体組織に近い三次元血管組織の構築、あるいは治療的な血管新生や病的な血管新生等、目的に応じた細胞の機能制御が期待できる。Li らによると $\alpha_v\beta_3$ インテグリン特異的なマトリックスは、無秩序かつ蛇行した病的な血管を誘導するのに対して、 $\alpha_3/\alpha_5\beta_1$ インテグリン特異的なマトリックスは、秩序的で正常な血管が誘導される^[200]。したがって、例えば、がん組織モデルの構築には病的な血管新生を促す $\alpha_v\beta_3$ インテグリン特異的なマトリックスが適しており、一方で損傷組織の再生には正常かつ治療的な血管新生を促す $\alpha_3/\alpha_5\beta_1$ インテグリン特異的なマトリックスが適していると言える。以上より、刺激するインテグリンの種類を制御可能なマトリックスの構築により、目的に応じた血管新生の制御が可能になると考えられる。bRGD ペプチドは、 $\alpha_v\beta_3$ や $\alpha_2\beta_1$ インテグリンと相互作用することが知られており、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを強く刺激するため、病的な血管新生が進み、不安定な血管となる。治療的な血管新生を促すアプローチとしては、CUBE への RGD ペプチドの導入に加え、9 番目のフィブロネクチン III 型モジュール (III₉) に存在する PHSRN 配列の導入が有効である可能性がある。PHSRN ペプチドは RGD モチーフの相乗作用効果を示す配列として知られており、フィブロネクチンにおけるインテグリン認識の調節に関わっている^[207,208]。具体的には PHSRN ペプチドの導入により $\alpha_3/\alpha_5\beta_1$ インテグリンへの刺激も見込めるため、治療的な血管新生を誘導できる可能性がある。また、内皮細胞の接着、遊走、血管新生等の機能制御に関わる生理活性ペプチドとして、fibronectin III CS-5 由来の REDV 配列^[54]や laminin A 鎖由来の IKVAV 配列^[209]、laminin B1 鎖由来の YIGSR 配列^[210]等が同定されており、これら複数の生理活性ペプチドを組み合わせることで導入することにより、相乗的なシグナル伝達の誘導が望め、より効果的かつ精密な細胞機能制御につながることが期待される。

以上より，本研究では，helix ペプチドの coiled-coil 構造形成，及び ELP の温度応答性会合を利用した特異的分子間相互作用により，自己組織化能，シグナル因子保持能，及び温度応答性を有した，機能性足場タンパク質からなる三次元足場材料が構築可能であると結論付ける．本材料は，細胞の運命決定・機能調節に関わる生物学的，及び機械的性質を制御可能であり，特定の細胞・組織に適した微小環境の再現につながる可能性が示された．したがって，デザイナーCUBE ハイドロゲルは，生医学分野における様々なアプリケーションのための有用なスマートバイオマテリアルになりうると期待できる．本タンパク質ハイドロゲルの設計戦略が，テーラーメイドの機能性バイオマテリアル構築における新しい基盤を提供し，組織工学分野における発展の一助になれば幸いである．

References

- [1] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors" *Cell* **131**(5), 861-872 (2007).
- [2] Stevens MM, George JH. "Exploring and engineering the cell surface interface" *Science* **310**(5751), 1135-1138 (2005).
- [3] Calvert P. "Materials science. Printing cells" *Science* **318**(5848), 208-209 (2007).
- [4] Nakamura M, Iwanaga S, Henmi C, Arai K, Nishiyama Y. "Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication" *Biofabrication* **2**(1), 014110 (2010).
- [5] Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R. "Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology" *Adv Mater* **18**, 1345-60 (2006).
- [6] Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. "Hydrogels in regenerative medicine" *Adv Mater* **21**, 3307-29 (2009).
- [7] Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, Dehghani F. "Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering" *Tissue Eng Part B Rev* **16**, 371-83 (2010).
- [8] Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. "Microscale technologies for tissue engineering and biology" *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 2480-7 (2006)
- [9] Seliktar D. "Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications" *Science* **336**, 1124-8 (2012).
- [10] Khademhosseini A, Langer R. "Microengineered hydrogels for tissue engineering" *Biomaterials* **28**, 5087-92 (2007).
- [11] Kleinman HK, Martin GR. "Matrigel: basement membrane matrix with biological activity" *Semin Cancer Biol* **15**, 378-386 (2005).
- [12] Li Y, Rodrigues J, Tomás H. "Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications" *Chem Soc Rev* **41**, 2193-221 (2012).
- [13] Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM. "Designing materials to direct stem-cell fate" *Nature* **462**, 433-41 (2009).
- [14] Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A, Giger S, Bragina ME, Ordóñez-Morán P, et al. "Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture" *Nature* **539**, 560-4 (2016).
- [15] Estroff LA, Hamilton AD. "Water gelation by small organic molecules" *Chem Rev* **104**, 1201-18 (2004).

- [16] Loos M, Feringa BL, Esch JH. "Design and Application of Self-Assembled Low Molecular Weight Hydrogels" *J Org Chem* **2005**, 3615-31 (2005).
- [17] Sangeetha NM, Maitra U. "Supramolecular gels: functions and uses" *Chem Soc Rev* **34**, 821-36 (2005).
- [18] Pasini D, Kraft A. "Supramolecular self-assembly of fibres" *Curr Opin Solid State Mater Sci* **8**, 157-63 (2004).
- [19] Zhang S. "Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly" *Nat Biotechnol* **21**, 1171-8 (2003).
- [20] Kretsinger JK, Haines LA, Ozbas B, Pochan DJ, Schneider JP. "Cytocompatibility of self-assembled beta-hairpin peptide hydrogel surfaces" *Biomaterials* **26**(25), 5177-5186 (2005).
- [21] Jayawarna V, Ali M, Jowitt TA, Miller AF, Saiani A, Gough JE, Ulijn RV. "Nanostructured hydrogels for three-dimensional cell culture through self-assembly of fluorenylmethoxycarbonyl-dipeptides" *Adv Mater* **18**(5), 611-614 (2006).
- [22] 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**(5662), 1352-1355 (2004).
- [23] Luo Y, Shoichet MS. "A photolabile hydrogel for guided three-dimensional cell growth and migration" *Nat Mater* **3**(4), 249-253 (2004).
- [24] Lutolf MP, Hubbell JA. "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering" *Nat Biotechnol* **23**(1), 47-55 (2005).
- [25] Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, et al. "Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients" *Eur Respir J* **11**(3), 554-559 (1998).
- [26] Elkayam T, Amitay-Shaprut S, Dvir-Ginzberg M, Harel T, Cohen S. "Enhancing the drug metabolism activities of C3A--a human hepatocyte cell line--by tissue engineering within alginate scaffolds" *Tissue Eng* **12**(5), 1357-1368 (2006).
- [27] Scott M, Matsudaira P, Lodish H, Darnell J, Zipursky L, Kaiser C. "Molecular Cell Biology 5th ed" W.H. Freeman, San Francisco (2003).
- [28] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. "Molecular Biology of The Cell 4th ed" Garland Publishing, New York (2002).
- [29] Ingber DE. Tensegrity II. "How structural networks influence cellular information processing networks" *J Cell Sci* **116**(8), 1397-1408 (2003).
- [30] van Wezel AL. "Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture" *Nature* **216**(5110), 64-65 (1967).

- [31] Knazek RA, Gullino PM, Kohler PO, Dedrick RL. "Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro" *Science* **178**(4056), 65-66 (1972).
- [32] Bell E, Ivarsson B, Merrill C. "Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro" *Proc Natl Acad Sci USA* **76**(3), 1274-1278 (1979).
- [33] Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. "Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness" *Science* **211**(4486), 1052-1054 (1981).
- [34] Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR. "Basement membrane complexes with biological activity" *Biochemistry* **25**(2), 312-318 (1986).
- [35] Langer R, Vacanti JP. "Tissue engineering" *Science* **260**(5110), 920-926 (1993).
- [36] Ohtsuka H, Satomi T, Hirano A, Nagasaki Y, Kataoka K. "Two-dimensional array formation of multi-cellular spheroids on micro-patterned polymer brush surface" *Key Engineering Materials* **288-289**, 449-452 (2005).
- [37] Miyagawa Y, Okita H, Hiroyama M, Sakamoto R, Kobayashi M, Nakajima H, et al. "A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation" *Tissue Eng Part A* **17**(3-4), 513-521 (2011).
- [38] Napolitano AP, Dean DM, Man AJ, Youssef J, Ho DN, Rago AP, et al. "Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels" *BioTechniques* **43**(4), 496-500 (2007).
- [39] Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakai H, Sakurai Y. "Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces" *Biomaterials* **16**(4), 297-303 (1995).
- [40] Akiyama Y, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. "Ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control" *Langmuir* **20**(13), 5506-5511 (2004).
- [41] Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. "Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces" *J Biomed Mater Res* **45**(4), 355-362 (1999).
- [42] Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Fukai F, Okano T. "Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds" *Biomaterials* **26**(33), 6415-6422 (2005).
- [43] Yamato M, Okano T. "Cell sheet engineering" *Materials Today* **7**(5), 42-47 (2004).

- [44] Sasagawa T, Shimizu T, Sekiya S, Haraguchi Y, Yamato M, Sawa Y, Okano T. "Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology" *Biomaterials* **31**(7), 1646-1654 (2010).
- [45] Tsuda Y, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Sasagawa T, Sekiya S, et al. "Cellular control of tissue architectures using a three-dimensional tissue fabrication technique" *Biomaterials* **28**(33), 4939-4946 (2007).
- [46] Matsusaki M, Kadowaki K, Nakahara Y, Akashi M. "Fabrication of cellular multilayers with nanometer-sized extracellular matrix films" *Angew. Chem, Int. Ed. Engl.* **46**(25), 4689-1692 (2007).
- [47] Decher G. "Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites" *Science* **277**(5350), 1232-1237 (1997).
- [48] Kadowaki K, Matsusakii M, Akashi M. "Control of Cell Surface and Functions by Layer-by-Layer Nanofilms" *Langmuir* **26**(8), 5670-5678 (2010).
- [49] Nishiguchi A, Yoshida H, Matsusaki M, Akashi M. "Rapid construction of three-dimensional multilayered tissues with endothelial tube networks by the cell-accumulation technique" *Adv Mater* **23**(31), 3506-3510 (2011).
- [50] Nakao H, Hyon SH, Tsutsumi S, Matsumoto T, Takahashi J. "Control of pore size in L-lactide/epsilon-caprolactone copolymer foams for tissue regeneration by the freeze-drying method" *Dent Mater J* **22**(3), 262-271 (2003).
- [51] Hynes RO. "The extracellular matrix: not just pretty fibrils" *Science* **326**(5957), 1216-1219 (2009).
- [52] 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**(2), 197-263 (1998).
- [53] Daley WP, Peters SB, Larsen M. "Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine" *J Cell Sci* **121**(3), 255-264 (2008).
- [54] Pankov R, Yamada KM. "Fibronectin at a glance" *J Cell Sci* **115**(20), 3861-3863 (2002).
- [55] LeBaron RG, Athanasiou KA. "Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials" *Tissue Eng* **6**(2), 85-103 (2000).
- [56] Pierschbacher MD, Ruoslahti E. "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule" *Nature* **309**(5963), 30-33 (1984).
- [57] Humphries MJ, Akiyama SK, Komoriya A, Olden K, Yamada KM. "Identification of an alternatively spliced site in human plasma fibronectin that mediates cell type-specific adhesion" *J Cell Biol* **103**(6), 2637-2647 (1986).

- [58] Guan JL, Hynes RO. "Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1" *Cell* **60**(1), 53-61 (1990).
- [59] Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials* **27**(18), 3413-3431 (2006).
- [60] 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**(3), 583-590 (2003).
- [61] 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**(7), 779-786 (2004).
- [62] Burdick JA, Anseth KS. "Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering" *Biomaterials* **23**(22), 4315-4323 (2002).
- [63] Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials" *Biomaterials* **20**(1), 45-53 (1999).
- [64] 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**(4), 1170-1180 (2003).
- [65] Yang MY, Yamauchi K, Kurokawa M, Asakura T. "Design of silk-like biomaterials inspired by mussel-adhesive protein" *Tissue Eng* **13**(12), 2941-2947 (2007).
- [66] Anderson JP, Cappello J, Martin DC. "Morphology and primary crystal structure of a silk-like protein polymer synthesized by genetically engineered Escherichia coli bacteria" *Biopolymers* **34**(8), 1049-1057 (1994).
- [67] Zhang S. "Emerging biological materials through molecular self-assembly" *Biotechnol Adv* **20**, 321-39 (2002).
- [68] Zhang S, Holmes T, Lockshin C, Rich Proc A. "Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane" *Natl Acad Sci USA* **90**, 3334-8 (1993).
- [69] Yokoi H, Kinoshita T, Zhang S. "Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold" *Proc Natl Acad Sci USA* **102**(24), 8414-8419 (2005).
- [70] Ramachandran S, Tseng Y, Yu YB. "Repeated Rapid Shear-Responsiveness of Peptide Hydrogels with Tunable Shear Modulus" *Biomacromolecules* **6**, 1316-21 (2005).
- [71] Ramachandran S, Flynn P, Tseng Y, Yu YB. "Electrostatically Controlled Hydrogelation of Oligopeptides and Protein Entrapment" *Chem Mater* **17**, 6583-8 (2005).

- [72] Collier JH, Hu BH, Ruberti JW, Zhang J, Shum P, Thompson DH, Messersmith PB. "Thermally and Photochemically Triggered Self-Assembly of Peptide Hydrogels" *J Am Chem Soc* **123**, 9463–4 (2001).
- [73] West MW, Hecht MH. "Binary patterning of polar and nonpolar amino acids in the sequences and structures of native proteins" *Protein Sci* **4**, 2032–9 (1995).
- [74] Rajagopal K, Schneider JP. "Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications" *Curr Opin Struct Biol* **14**, 480–6 (2004)
- [75] Schneider JP, Pochan DJ, Ozbas B, Rajagopal K, Pakstis L, Kretsinger J. "Responsive Hydrogels from the Intramolecular Folding and Self-Assembly of a Designed Peptide" *J Am Chem Soc* **124**, 15030–7 (2002).
- [76] Pochan DJ, Schneider JP, Kretsinger J, Ozbas B, Rajagopal K, Haines L. "Thermally Reversible Hydrogels via Intramolecular Folding and Consequent Self-Assembly of a de Novo Designed Peptide" *J Am Chem Soc* **125**, 11802–3 (2003).
- [77] Veerman C, Rajagopal K, Palla CS, Pochan DJ, Schneider JP, Furst EM. "Gelation Kinetics of β -Hairpin Peptide Hydrogel Networks" *Macromolecules* **39**, 6608–14 (2006).
- [78] Larsen TH, Furst EM. "Microrheology of the Liquid-Solid Transition during Gelation" *Phys Rev Lett* **100**, 146001 (2008).
- [79] Vasita R, Katti DS. "Nanofibers and their applications in tissue engineering" *Int J Nanomedicine* **1**(1), 15–30 (2006).
- [80] Kopeček J, Yang J. "Hydrogels as smart biomaterials" *Polym Int* **56**, 1078–98 (2007).
- [81] Kopeček J. "Hydrogel biomaterials: A smart future?" *Biomaterials* **28**, 5185–92 (2007).
- [82] Bromley EH, Channon K, Moutevelis E, Woolfson DN. "Peptide and Protein Building Blocks for Synthetic Biology: From Programming Biomolecules to Self-Organized Biomolecular Systems" *ACS Chem Biol* **3**, 38–50 (2008).
- [83] Mason JM, Arndt KM. "Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications" *ChemBioChem* **5**, 170–6 (2004).
- [84] Yu YB. "Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential" *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 1113–29 (2002).
- [85] Lupas AN, Gruber M. "The Structure of α -Helical Coiled Coils" *Adv Protein Chem* **70**, 37–78 (2005).
- [86] Woolfson DN. "The Design of Coiled-Coil Structures and Assemblies" *Adv Protein Chem* **70**, 79–112 (2005).
- [87] Parry DA, Fraser RD, Squire JM. "Fifty years of coiled-coils and α -helical bundles: A close relationship between sequence and structure" *J Struct Biol* **163**, 258–69 (2008).

- [88] Petka WA, Harden JL, McGrath KP, Wirtz D, Tirrell DA. "Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins" *Science* **281**(5375), 389-392 (1998).
- [89] Xu C, Breedveld V, Kopeček J. "Reversible Hydrogels from Self-Assembling Genetically Engineered Protein Block Copolymers" *Biomacromolecules* **6**, 1739-49 (2005).
- [90] Shen W, Zhang K, Kornfield JA, Tirrell DA. "Tuning the erosion rate of artificial protein hydrogels through control of network topology" *Nat Mater* **5**, 153-8 (2006).
- [91] Shen W, Kornfield JA, Tirrell DA. "Structure and mechanical properties of artificial protein hydrogels assembled through aggregation of leucine zipper peptide domains" *Soft Matter* **3**, 99-107 (2007).
- [92] Xu C, Kopeček J. "Genetically Engineered Block Copolymers: Influence of the Length and Structure of the Coiled-Coil Blocks on Hydrogel Self-Assembly" *Pharm Res* **25**, 674-82 (2008).
- [93] Shen W. "Structure, dynamics, and properties of artificial protein hydrogels assembled through coiled-coil domains" PhD Thesis, etd-05132005-114413, California Institute of Technology (2005).
- [94] Apkarian RP, Wright ER, Seredyuk VA, Eustis S, Lyon LA, Conticello VP, Menger FM. "In-Lens Cryo-High Resolution Scanning Electron Microscopy: Methodologies for Molecular Imaging of Self-Assembled Organic Hydrogels" *Microsc Microanal* **9**, 286-95 (2003).
- [95] Nagapudi K, Brinkman WT, Thomas BS, Park JO, Srinivasarao M, Wright E, et al. "Viscoelastic and mechanical behavior of recombinant protein elastomers" *Biomaterials* **26**, 4695-706 (2005).
- [96] Rodriguez-Cabello JC, Prieto S, Reguera J, Arias FJ, Ribeiro A. "Biofunctional design of elastin-like polymers for advanced applications in nanobiotechnology" *J Biomater Sci Polym Ed* **18**, 269-86 (2007).
- [97] Urry DW. "Molecular machines: how motion and other functions of living organism can result from reversible chemical changes" *Angew Chem Int Ed Engl* **32**(6), 819-841 (1993).
- [98] Urry DW. "Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers" *J Phys Chem B* **101**(51), 11007-11028 (1997).
- [99] Urry DW. "Elastic molecular machines in metabolism and soft-tissue restoration" *Trends Biotechnol* **17**, 249-57 (1999).
- [100] Yamaoka T, Tamura T, Seto Y, Tada T, Kunugi S, Tirrell DA. "Mechanism for the phase transition of a genetically engineered elastin model peptide (VPGIG)₄₀ in aqueous solution" *Biomacromolecules* **4**(6), 1680-1685 (2003).
- [101] Lee J, Macosko CW, Urry DW. "Elastomeric Polypentapeptides Cross-Linked into Matrixes and Fibers" *Biomacromolecules* **2**, 170-9 (2001).

- [102] Lim DW, Nettles DL, Setton LA, Chilkoti A. "Rapid Cross-Linking of Elastin-like Polypeptides with (Hydroxymethyl)phosphines in Aqueous Solution" *Biomacromolecules* **8**, 1463-70 (2007).
- [103] Trabbic-Carlson K, Setton LA, Chilkoti A. "Swelling and Mechanical Behaviors of Chemically Cross-Linked Hydrogels of Elastin-like Polypeptides" *Biomacromolecules* **4**, 572-80 (2003).
- [104] Zhang YN, Avery RK, Vallmajo-Martin Q, Assmann A, Vegh A, Memic A, Olsen BD, et al. "A Highly Elastic and Rapidly Crosslinkable Elastin-Like Polypeptide-Based Hydrogel for Biomedical Applications" *Adv Funct Mater* **25**, 4814-26 (2015).
- [105] Wright ER, McMillan RA, Cooper A, Apkarian RP, Conticello VP. "Thermoplastic Elastomer Hydrogels via Self-Assembly of an Elastin-Mimetic Triblock Polypeptide" *Adv Funct Mater* **12**, 149-54 (2002).
- [106] Glassman MJ, Olsen BD. "Arrested Phase Separation of Elastin-like Polypeptide Solutions Yields Stiff, Thermoresponsive Gels" *Biomacromolecules* **16**, 3762-73 (2015).
- [107] Lao UL, Sun M, Matsumoto M, Mulchandani A, Chen W. "Genetic Engineering of Self-Assembled Protein Hydrogel Based on Elastin-like Sequences with Metal Binding Functionality" *Biomacromolecules* **8**, 3736-9 (2007).
- [108] Dinerman AA, Cappello J, Ghandehari H, Hoag SW. "Swelling behavior of a genetically engineered silk-elastinlike protein polymer hydrogel" *Biomaterials* **23**, 4203-10 (2002).
- [109] Megeed Z, Cappello J, Ghandehari H. "Genetically engineered silk-elastinlike protein polymers for controlled drug delivery" *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 1075-91 (2002).
- [110] Nagarsekar A, Crissman J, Crissman M, Ferrari F, Cappello J, Ghandehari H. "Genetic synthesis and characterization of pH- and temperature-sensitive silk-elastinlike protein block copolymers" *J Biomed Mater Res* **62**, 195-203 (2002).
- [111] Horii A, Wang X, Gelain F, Zhang S. "Biological Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds Significantly Enhance Osteoblast Proliferation, Differentiation and 3-D Migration" *PLoS ONE* **2**, e190 (2007)
- [112] Gelain F, Bottai D, Vescovi A, Zhang S. "Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds for Adult Mouse Neural Stem Cell 3-Dimensional Cultures" *PloS ONE* **1**, e119 (2006).
- [113] Li Q, Chau Y. "Neural differentiation directed by self-assembling peptide scaffolds presenting laminin-derived epitopes" *J Biomed Mater Res A* **94**, 688-99 (2010).
- [114] Osada Y, Matsuda A. "Shape memory in hydrogels" *Nature* **376**(6537), 219 (1995).
- [115] Osada Y, Gong JP. "Soft and wet materials: polymer gels" *Adv Mater* **10**(11), 827-837 (1998).
- [116] Miyata T, Uragami T, Nakamae K. "Biomolecule-sensitive hydrogels" *Adv Drug Deliv Rev* **54**(1), 79-98 (2002).

- [117] Lee KY, Mooney DJ. "Hydrogels for tissue engineering" *Chem Rev* **101**(7), 1869-1879 (2001).
- [118] Li B, Alonso DO, Daggett V. "Stabilization of globular proteins via introduction of temperature-activated elastin-based switches" *Structure* **10**(7), 989-998 (2002).
- [119] Lao UL, Mulchandani A, Chen W. "Simple conjugation and purification of quantum dot-antibody complexes using a thermally responsive elastin-protein L scaffold as immunofluorescent agents" *J Am Chem Soc* **128**(46), 14756-14757 (2006).
- [120] Kim JY, Mulchandani A, Chen W. "Temperature-triggered purification of antibodies" *Biotechnol Bioeng* **90**(3), 373-379 (2005).
- [121] Kim JY, O'Malley S, Mulchandani A, Chen W. "Genetically engineered elastin-protein A fusion as a universal platform for homogeneous, phase-separation immunoassay" *Anal Chem* **77**(8), 2318-2322 (2005).
- [122] Urry DW. "What is elastin; what is not" *Ultrastruct Pathol* **4**(2-3), 227-251 (1983).
- [123] Urry DW, Ohnishi T, Long MM, Mitchell LW. "Studies on the conformation and interactions of elastin: nuclear magnetic resonance of the polyhexapeptide" *Int J Pept Protein Res* **7**(5), 367-378 (1975).
- [124] Urry DW, Parker TM, Reid MC, Gowda DC. "Biocompatibility of the bioelastic materials, poly(GVGVP) and its γ -irradiation cross-linked matrix: summary of generic biological test results" *J Bioact Compat Polym* **6**(3), 263-282 (1991).
- [125] Rapaka RS, Okamoto K, Urry DW. Non-elastomeric polypeptide models of elastin. "Synthesis of polyhexapeptides and a cross-linked polyhexapeptide" *Int J Pept Protein Res* **11**(2), 109-127 (1978).
- [126] Senior RM, Griffin GL, R.P. 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**(3), 870-874 (1984).
- [127] Long MM, King VJ, Prasad KU, Urry DW. "Chemotaxis of fibroblasts toward nonapeptide of elastin" *Biochim Biophys Acta* **968**(3), 300-311 (1988).
- [128] Wrenn DS, Griffin GL, Senior RM, Mecham RP. "Characterization of biologically active domains on elastin: identification of a monoclonal antibody to a cell recognition site" *Biochemistry* **25**(18), 5172-5176 (1986).
- [129] Robinet A, Fahem A, Cauchard JH, Huet E, Vincent L, Lorimier S, et al. "Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP" *J Cell Sci* **118**(2), 344-356 (2005).

- [130] Urry DW, Luan CH, Parker TM, Gowda DC, Prasad KU, Reid MC, Safavy A. "Temperature of polypeptide inverse temperature transition depends on mean residue hydrophobicity" *J Am Chem Soc* **113**(11), 4346-4348 (1991).
- [131] Trabbic-Carlson K, Meyer DE, Liu L, Piervincenzi R, Nath N, LaBean T, Chilkoti A. "Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: a role for surface hydrophobicity?" *Protein Eng Des Sel* **17**(1), 57-66 (2004).
- [132] Meyer DE, Chilkoti A. "Purification of recombinant proteins by fusion with thermally responsive polypeptides" *Nat Biotechnol* **17**(11), 1112-1115 (1999).
- [133] Meyer DE, Trabbic-Carlson K, Chilkoti A. "Protein purification by fusion with an environmentally responsive elastin-like polypeptide: effect of polypeptide length on the purification of thioredoxin" *Biotechnol Prog* **17**(4), 720-728 (2001).
- [134] Reguera J, Urry DW, Parker TM, McPherson DT, Rodríguez-Cabello JC. "Effect of NaCl on the exothermic and endothermic components of the inverse temperature transition of a model elastin-like polymer" *Biomacromolecules* **8**(2), 354-358 (2007).
- [135] Reiersen H, Clarke AR, Rees AR. "Short elastin-like peptides exhibit the same temperature-induced structural transitions as elastin polymers: implications for protein engineering" *J Mol Biol* **283**(1), 255-264 (1998).
- [136] McMillan RA, Conticello VP. "Synthesis and characterization of elastin-mimetic protein gels derived from a well-defined polypeptide precursor" *Macromolecules* **33**(13), 4809-4821 (2000).
- [137] Herrero-Vanrell R, Rincón AC, Alonso M, Reboto V, Molina-Martinez IT, Rodríguez-Cabello JC. "Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release" *J Control Release* **102**(1), 113-122 (2005).
- [138] Betre H, Liu W, Zalutsky MR, Chilkoti A, Kraus VB, Setton LA. "A thermally responsive biopolymer for intra-articular drug delivery" *J Control Release* **115**(2), 175-182 (2006).
- [139] Chilkoti A, Dreher MR, Meyer DE, Raucher D. "Targeted drug delivery by thermally responsive polymers" *Adv Drug Deliv Rev* **54**(5), 613-630 (2002).
- [140] Bidwell GL 3rd, Fokt I, Priebe W, Raucher D. "Development of elastin-like polypeptide for thermally targeted delivery of doxorubicin" *Biochem Pharmacol* **73**(5), 620-631 (2007).
- [141] Hart DS, Gehrke SH. "Thermally associating polypeptides designed for drug delivery produced by genetically engineered cells" *J Pharm Sci* **96**(3), 484-516 (2007).
- [142] Fujita Y, Mie M, Kobatake E. "Construction of nanoscale protein particle using temperature-sensitive elastin-like peptide and polyaspartic acid chain" *Biomaterials* **30**(20), 3450-3457 (2009).

- [143] Matsumoto R, Hara R, Andou T, Mie M, Kobatake E. "Targeting of EGF-displayed protein nanoparticles with anticancer drugs" *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **102**, 1792-8 (2014).
- [144] Roweton S, Huang SJ, Swift G. "Poly(aspartic acid): synthesis, biodegradation, and current applications" *J Environ Polym Degr* **5**(3), 175-181 (1997).
- [145] Tabata K, Abe H, Doi Y. "Microbial degradation of poly(aspartic acid) by two isolated strains of *Pedobacter* sp. and *Sphingomonas* sp" *Biomacromolecules* **1**(2), 157-161 (2000).
- [146] Shinoda H, Asou Y, Suetsugu A, Tanaka K. "Synthesis and characterization of amphiphilic biodegradable copolymer, poly (aspartic acid-co-lactic acid)" *Macromol Biosci* **3**(1), 34-43 (2003).
- [147] Hara K, Tsujimoto H, Huang CC, Kawashima Y, Mimura H, Miwa N. "The effect of poly (aspartic acid-co-lactic acid) nanospheres on the lung metastasis of B16BL6 melanoma cells by intravenous administration" *Oncol Rep* **16**(6), 1215-1220 (2006).
- [148] Tang GP, Yang Z, Zhou J. "Poly (ethylenimine)-grafted-poly [(aspartic acid)-co-lysine], a potential non-viral vector for DNA delivery" *J Biomater Sci Polym Ed* **17**(4), 461-480 (2006).
- [149] Briquez PS, Clegg LE, Martino MM, Gabhann FM, Hubbell JA. "Design principles for therapeutic angiogenic materials" *Nat Rev Mater* **1**, 15006 (2016).
- [150] Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Müller R, Hubbell JA. "Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices" *Nat Biotechnol* **21**(5), 513-518 (2003).
- [151] Schneider A, Garlick JA, Egles C. "Self-assembling peptide nanofiber scaffolds accelerate wound healing" *PLoS ONE* **3**(1), e1410 (2008).
- [152] Ito Y, Chen G, Imanishi Y. "Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function" *Bioconjug Chem* **9**(2), 277-282 (1998).
- [153] Chen G, Ito Y. "Gradient micropattern immobilization of EGF to investigate the effect of artificial juxtacrine stimulation" *Biomaterials* **22**(18), 2453-2457 (2001).
- [154] Elloumi I, Kobayashi R, Funabashi H, Mie M, Kobatake E. "Construction of epidermal growth factor fusion protein with cell adhesive activity" *Biomaterials* **27**(18), 3451-3458 (2006).
- [155] Lin YD, Luo CY, Hu YN, Yeh ML, Hsueh YC, Chang MY, et al. "Instructive Nanofiber Scaffolds with VEGF Create a Microenvironment for Arteriogenesis and Cardiac Repair" *Sci Transl Med* **4**, 146ra109 (2012)
- [156] Owens RJ, Baralle FE. "Mapping the collagen-binding site of human fibronectin by expression in *Escherichia coli*" *EMBO J* **5**(11), 2825-2830 (1986).
- [157] Kitajima T, Terai H, Ito Y. "A fusion protein of hepatocyte growth factor for immobilization to collagen" *Biomaterials* **28**(11), 1989-1997 (2007).

- [158] Kato K, Sato H, Iwata H. "Ultrastructural study on the specific binding of genetically engineered epidermal growth factor to type I collagen fibrils" *Bioconjug Chem* **18**(6), 2137-2143 (2007).
- [159] Ishikawa T, Terai H, Kitajima T. "Production of a biologically active epidermal growth factor fusion protein with high collagen affinity" *J Biochem* **129**(4), 627-633 (2001).
- [160] O'Shea EK, Lumb KJ, Kim PS. "Peptide 'Velcro': design of a heterodimeric coiled coil" *Curr Biol* **3**(10), 658-667 (1993).
- [161] Kobatake E, Takahashi R, Mie M. "Construction of a bFGF-tethered extracellular matrix using a coiled-coil helical interaction" *Bioconjug Chem* **22**(10), 2038-2042 (2011).
- [162] Assal Y, Mie M, Kobatake E. "The promotion of angiogenesis by growth factors integrated with ECM proteins through coiled-coil structures" *Biomaterials* **34**(13), 3315-3323 (2013).
- [163] Mie M, Sasaki S, Kobatake E. "Construction of a bFGF-tethered multi-functional extracellular matrix protein through coiled-coil structures for neurite outgrowth induction" *Biomed Mater* **9**(1), 015004 (2014).
- [164] Kimura Y, Tabata Y. "Controlled Release of Stromal-Cell-Derived Factor-1 from Gelatin Hydrogels Enhances Angiogenesis" *J Biomater Sci Polym Ed* **21**, 37-51 (2010).
- [165] Ennett AB, Kaigler D, Mooney DJ. "Temporally regulated delivery of VEGF in vitro and in vivo" *J Biomed Mater Res* **79**, 176-84 (2006).
- [166] Pike DB, Cai S, Pomraning KR, Firpo MA, Fisher RJ, Shu XZ, et al. "Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF" *Biomaterials* **27**, 5242-51(2006).
- [167] Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH. "INCREASED angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF" *Biomaterials* **28**, 1123-31(2007).
- [168] Chow LW, Bitton R, Webber MJ, Carvajal D, Shull KR, Sharma AK, et al. "A bioactive self-assembled membrane to promote angiogenesis" *Biomaterials* **32**, 1574-82(2011).
- [169] Suttinont C, Mashimo Y, Mie M, Kobatake E. "Delivery of bFGF for tissue engineering by tethering to the ECM" *Biomed Res Int* **2015**, 208089 (2015).
- [170] Nautiyal S, Woolfson DN, King DS, Alber T. "A designed heterotrimeric coiled coil" *Biochemistry* **34**(37), 11645-11651 (1995).
- [171] Nautiyal S, Alber T. "Crystal structure of a designed, thermostable, heterotrimeric coiled coil" *Protein Sci* **8**(1), 84-90 (1999).
- [172] Betz SF, DeGrado WF. "Controlling topology and native-like behavior of de novo-designed peptides: design and characterization of antiparallel four-stranded coiled coils" *Biochemistry* **35**, 6955-62 (1996).

- [173] Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. "A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability" *Talanta* **44**(7), 1299-1305 (1997).
- [174] Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, Watanabe M. "A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay" *Anal Commun* **36**(2), 47-50 (1999).
- [175] Misono Y, Ohkata Y, Morikawa T, Itoh K. "Resonance raman and absorption spectroscopic studies on the electrochemical oxidation processes of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine" *J electroanal Chem* **436**(1-2), 203-212 (1997).
- [176] Josephy PD, Eling T, Mason RP. "The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates" *J Biol Chem* **257**(7), 3669-3675 (1982).
- [177] Okumura Y, Ito K. "The polyrotaxane gel: a topological gel by figure-of-eight cross-links" *Adv Mater* **13**(7), 485-487 (2001).
- [178] Lee KY, Rowley JA, Eiselt P, Moy EM, Bouhadir KH, Mooney DJ. "Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density" *Macromolecules* **33**(11), 4291-4294 (2000).
- [179] Hassouneh W, Christensen T, Chilkoti A. "Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins" *Curr Protoc Protein Sci* **6**, Unit 6.11. (2010).
- [180] McPherson DT, Xu J, Urry DW. "Product purification by reversible phase transition following Escherichia coli expression of genes encoding up to 251 repeats of the elastomeric pentapeptide GVGVP" *Protein Expr Purif* **7**(1), 51-57 (1996).
- [181] Werten MW, Wisselink WH, Jansen-van den Bosch TJ, de Bruin EC, de Wolf FA. "Secreted production of a custom-designed, highly hydrophilic gelatin in Pichia pastoris" *Protein Eng* **14**, 447-54 (2001).
- [182] Vo TN, Ekenseair AK, Kasper FK, Mikos AG. "Synthesis, physicochemical characterization, and cytocompatibility of bioresorbable, dual-gelling injectable hydrogels" *Biomacromolecules* **15**, 132-42 (2014).
- [183] Thérien-Aubin H, Wang Y, Nothdurft K, Prince E, Cho S, Kumacheva E. "Temperature-responsive nanofibrillar hydrogels for cell encapsulation" *Biomacromolecules* **17**, 3244-51 (2016).
- [184] Alakpa EV, Jayawarna V, Lampel A, Burgess KV, West CC, Bakker SCJ, et al. "Tunable supramolecular hydrogels for selection of lineage-guiding metabolites in stem cell cultures" *Chem* **1**, 298-319 (2016).

- [185] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification" *Cell* **126**, 677-89 (2006).
- [186] Trappmann B, Chen CS. "How cells sense extracellular matrix stiffness: a material's perspective" *Curr Opin Biotechnol* **24**, 948-53 (2013).
- [187] Sun Y, Li W, Wu X, Zhang N, Zhang Y, Ouyang S, et al. "Functional self-assembling peptide nanofiber hydrogels designed for nerve degeneration" *ACS Appl Mater Interfaces* **8**, 2348-59 (2016).
- [188] Wang L, Shansky J, Borselli C, Mooney D, Vandenburgh H. "Design and fabrication of a biodegradable, covalently crosslinked shape-memory alginate scaffold for cell and growth factor delivery" *Tissue Eng Part A* **18**, 2000-7 (2012).
- [189] Kim SH, Turnbull J, Guimond S. "Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor" *J Endocrinol* **209**, 139-51 (2011).
- [190] Livak KJ, Schmittgen TD. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method" *Methods* **25**, 402-8 (2001).
- [191] Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. "Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition" *Cell Signal* **19**(10), 2003-12 (2007).
- [192] Seliktar D, Zisch AH, Lutolf MP, Wrana JL, Hubbell JA. "MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing" *J Biomed Mater Res A* **68**, 704-16 (2004).
- [193] 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**, 233-40 (1998).
- [194] Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al. "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF" *Science* **284**, 1994e8 (1999).
- [195] Bellahcène A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF, et al. "Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis" *Circ Res* **86**, 885-91 (2000).
- [196] Harbers GM, Healy KE. "The effect of ligand type and density on osteoblast adhesion, proliferation, and matrix mineralization" *J Biomed Mater Res A* **75**, 855-69 (2005).
- [197] Brooks PC, Clark RA, Chersesh DA. "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis" *Science* **264**, 569-71 (1994).

- [198] Davis GE, Camarillo CW. "An $\alpha 2 \beta 1$ integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix" *Exp Cell Res* **224**, 39-51 (1996).
- [199] Zovein AC, Luque A, Turlo KA, Hofmann JJ, Yee KM, Becker MS, et al. $\beta 1$ integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev Cell* **18**, 39-51 (2010).
- [200] Li S, Nih LR, Bachman H, Fei P, Li Y, Nam E, et al. "Hydrogels with precisely controlled integrin activation dictate vascular patterning and permeability" *Nat Mater* **16**, 953-61 (2017).
- [201] Rodrigues M, Xin X, Jee K, Babapoor-Farrokhran S, Kashiwabuchi F, Ma T, et al. "VEGF secreted by hypoxic Müller cells induces MMP-2 expression and activity in endothelial cells to promote retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy" *Diabetes* **62**(11), 3863-73 (2013).
- [202] Iwamoto R, Mekada E. "Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor" *Cytokine Growth Factor Rev* **11**(4), 335-44 (2000).
- [203] Patterson J, Hubbell JA. "SPARC-derived protease substrates to enhance the plasmin sensitivity of molecularly engineered PEG hydrogels" *Biomaterials* **32**(5), 1301-10 (2011).
- [204] Patterson J, Hubbell JA. "Enhanced proteolytic degradation of molecularly engineered PEG hydrogels in response to MMP-1 and MMP-2" *Biomaterials* **31**, 7836-7845 (2010).
- [205] Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. "Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro" *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 824-31 (1992).
- [206] Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. "Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis" *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 159-78 (2005).
- [207] Altroff H, Schlinkert R, van der Walle CF, Bernini A, Campbell ID, Werner JM, Mardon HJ. "Interdomain tilt angle determines integrin-dependent function of the ninth and tenth FIII domains of human fibronectin" *J Biol Chem* **279**, 55995-6003 (2004).
- [208] Brown AC, Dysart MM, Clarke KC, Stabenfeldt SE, Barker TH. "Integrin $\alpha 3 \beta 1$ Binding to Fibronectin Is Dependent on the Ninth Type III Repeat" *J Biol Chem* **290**, 25534-47 (2015).
- [209] Grant DS, Kinsella JL, Fridman R, Auerbach R, Piasecki BA, Yamada Y, Zain M, Kleinman HK. "Interaction of endothelial cells with a laminin α chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo" *J Cell Physiol* **153**, 614-625 (1992).
- [210] Grant DS, Tashiro K-I, 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).

謝辞

本研究を行うにあたり，御多忙の中，終始に渡り適切な御指導，御助言を賜りました本学教授，小畠英理先生に厚く御礼申し上げます．また，日々の研究において多大なる御指導，御助言を下された本学准教授，三重正和先生に御礼申し上げます．実験技術の御指導や多くの助言を賜りました本学助教，眞下泰正先生に感謝致します．学部時代から現在に至るまで，先生方からは常に代わらぬ温かい御指導を賜りました．ここに改めて深く感謝の意を申し上げます．

博士課程教育リーディングプログラム「情報生命博士教育院」より多大なる援助を賜りました．そのため，研究活動に全力をあげることができました．運営に携わり御尽力くださった先生方，スタッフの皆様に心より御礼申し上げます．

本研究を進めるにあたり，透過型電子顕微鏡観察のサポートを頂きました，本学技術部バイオ技術センター技術職員，池田桂子様に感謝の意を申し上げます．

研究生活において，様々な御支援，御指導を頂きました諸先輩方，友人として私の研究生活を支えてくれた同期，及び学生生活を充実させてくれた後輩諸君に心より感謝ならびに御礼申し上げます．

最後に，これまで経済的，精神的に生活を支援し続けてくれた家族に深く感謝致します．

2018 年 1 月

水口佳紀