

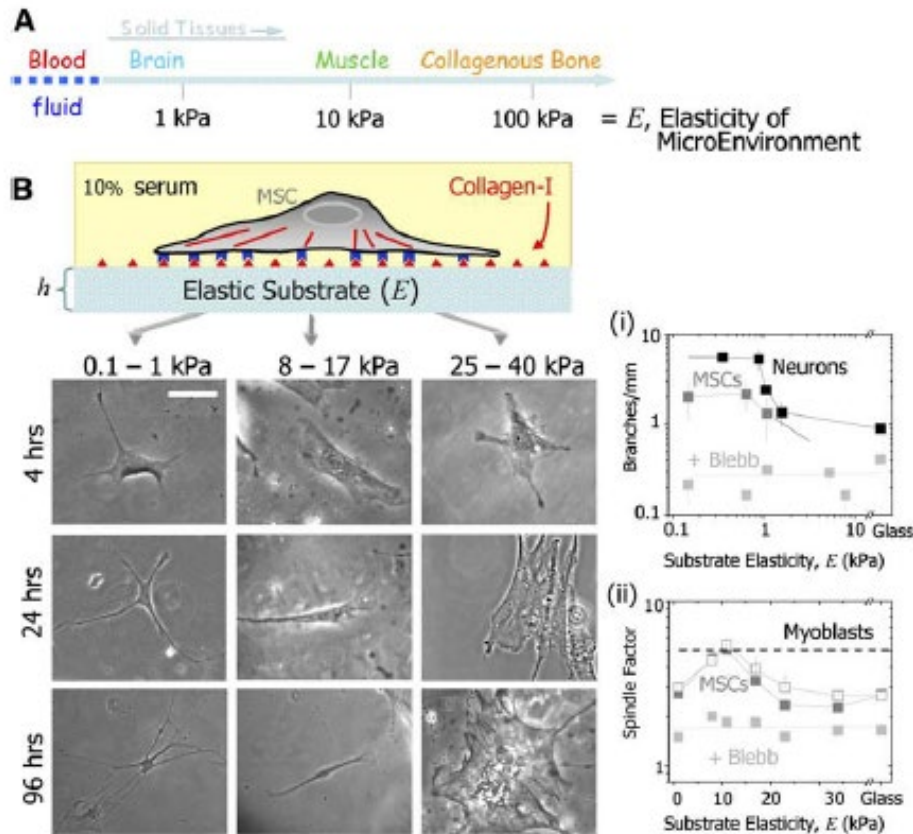
エラスチンの機能を再現する 人工タンパク質の開発

東海国立大学機構 名古屋大学
大学院工学研究科 エネルギー理工学専攻
教授 鳴瀧 彩絵

2019年1月18日

背景: マテリアルの力学特性が細胞挙動に与える影響

☑ 弾性率が細胞分化と相関



Engler et al., *Cell* **126**, 677 (2006)

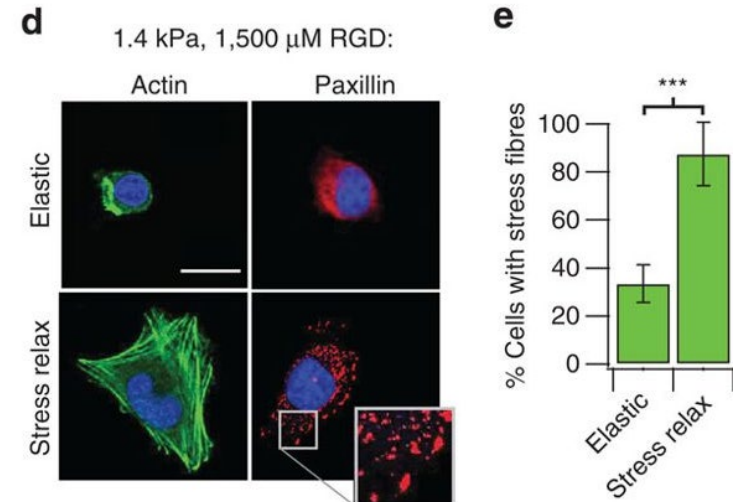
ほとんどは二次元培養系で実施

コラーゲンコーティング

合成高分子(弾性率可変)

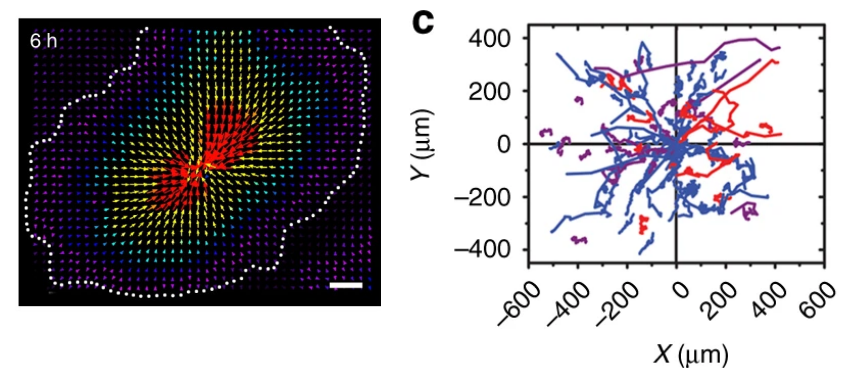
力学特性を制御可能な三次元足場の開発が必要

☑ 応力緩和するゲル上で細胞が伸展



Chaudhuri et al., *Nature Commun.* **6**, 6364 (2015)

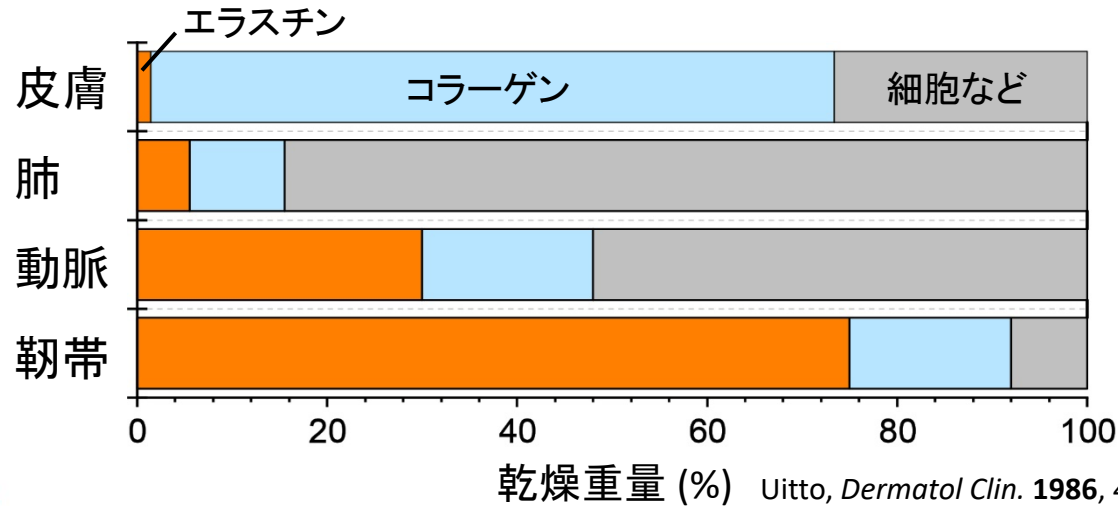
☑ 基材の変形による免疫細胞の遊走



Pakshir et al., *Nature Commun.* **10**, 1850 (2019)

エラスチン

生体組織に弾性・伸縮性を与える細胞外マトリックスタンパク質



Nakashima and Sueishi, *Am. J. Pathol.* 1992, 140, 959.

高度に化学架橋され、溶媒に不溶

水溶性エラスチン(市販品)

α-エラスチン: 天然エラスチンを熱シュウ酸処理

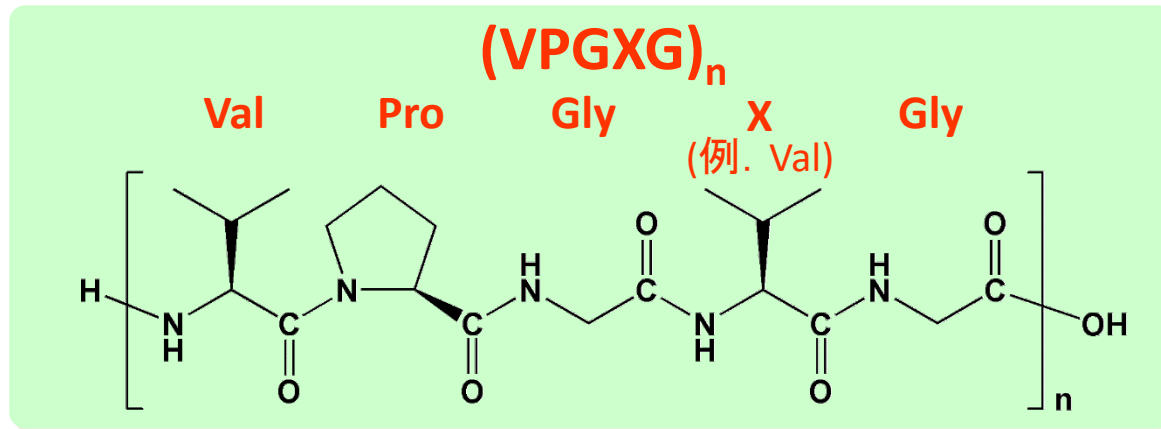
κ-エラスチン: 天然エラスチンを熱アルコール中でアルカリ処理

性能劣化
ロット差大

材料として
扱いづらい

エラスチン類似ポリペプチド

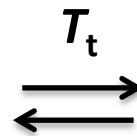
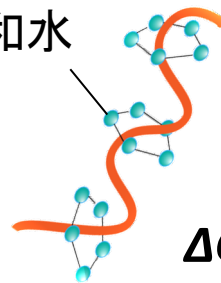
D. W. Urry, A. M. Tamburro ら



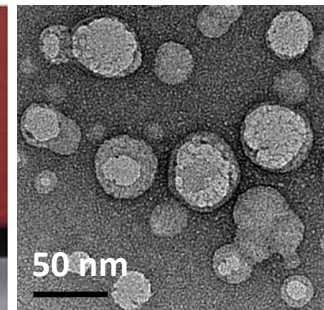
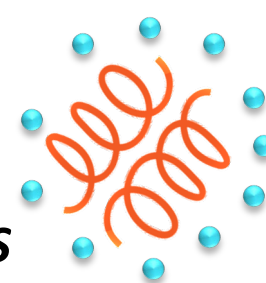
- エントロピー弾性
 - 下限臨界共溶温度 (LCST)
- } 天然エラスチンにも見られる性質



水和水



$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$



T_t は $(VPGXG)_n$ の X 残基を変えることで任意に調整可能

Janib et al.,
Integr. Biol., 2013, 5, 183.

異方的な構造(ファイバー、シートなど)への自己集合は困難

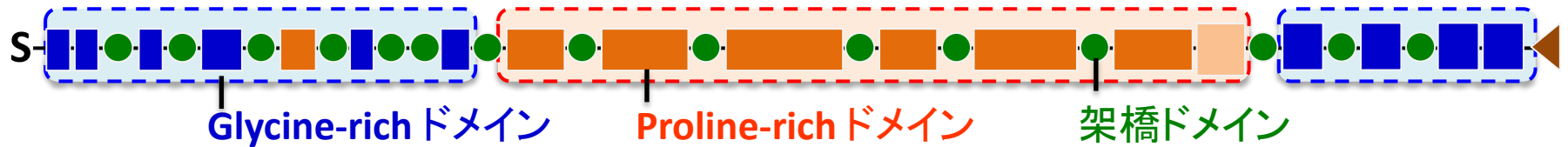
方向性を持たない疎水性相互作用による自己集合

我々の技術：人工タンパク質 GPG

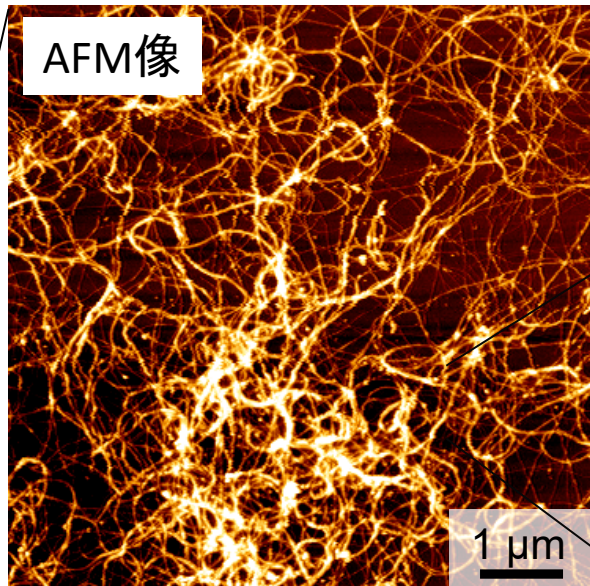
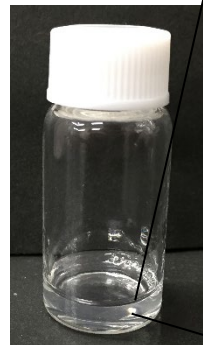


↑ 着想を得て単純化

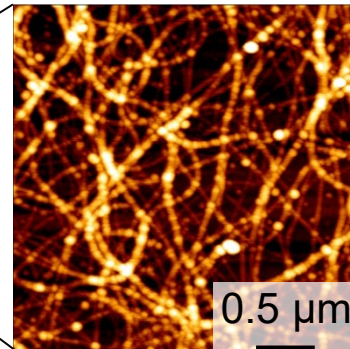
天然エラスチンのアミノ酸配列



自己集合性ナノファイバー



数珠状構造



ファイバー分散液
として得られる

- ・基材へのコーティング
- ・他素材との混合



新規な細胞足場材

GPG の自己集合



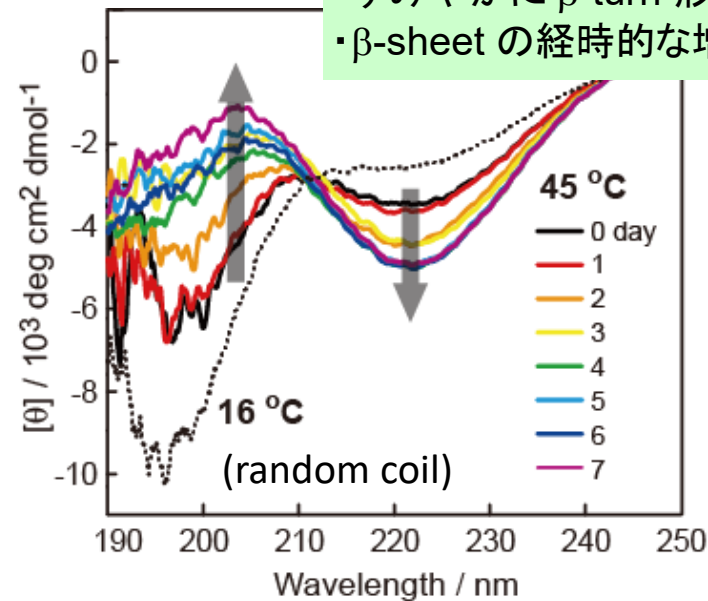
β-sheet 形成部位

温度応答性 (β-turn 形成) 部位

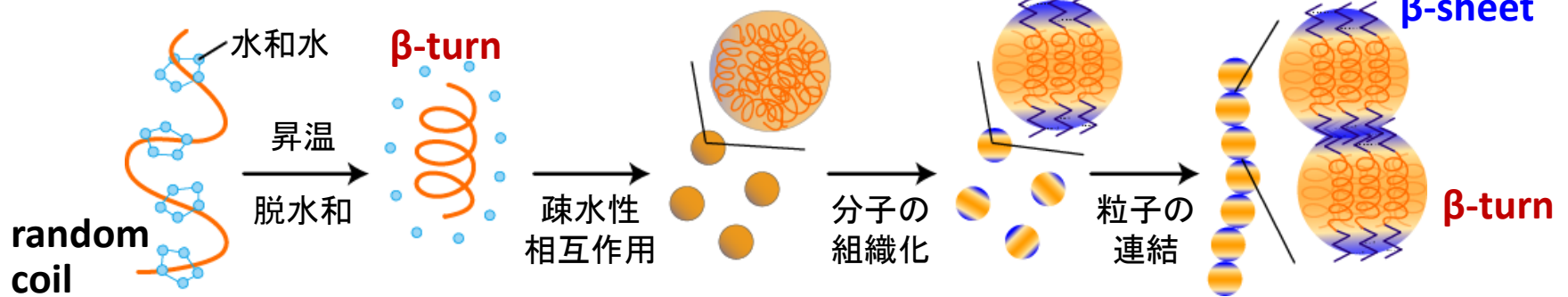
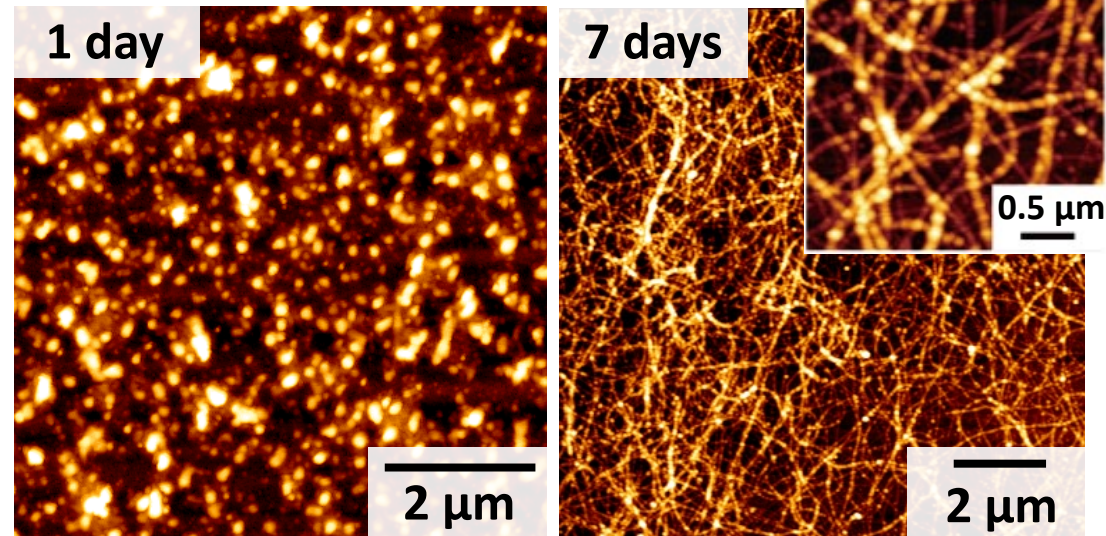
β-sheet 形成部位

▶ CD

昇温により
・すみやかに β-turn 形成
・β-sheet の経時的な増加



▶ AFM



☑ 有機溶媒 (10~30 vol %) の添加によりファイバー形成時間は 1 時間に短縮 (Biopolymers 2015, 103, 175)

GPG 誘導體

遺伝子工学の手法を用い、大腸菌を宿主として発現

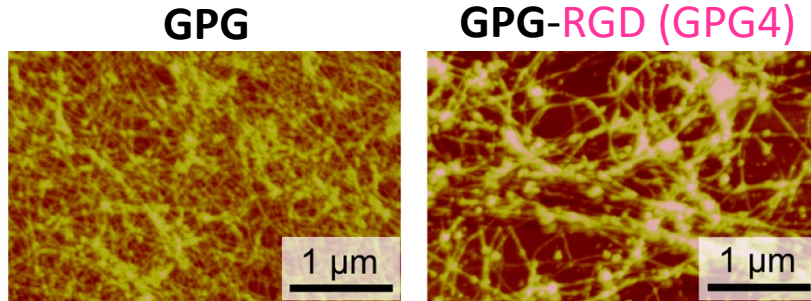
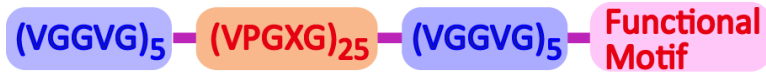
GPG	MKL-(VGGVG) ₅ -LWLGSG-(VPGX*G) ₂₅ -KL-(VGGVG) ₅ -LWLEHHHHHHH		<u>付与した機能</u>
GPG2	MKL-(VGGVG) ₅ -LWLGSG-(VPGX*G) ₂₅ -KL-(VGGVG) ₅ -LWLEHHHHHHH	KA AK 架橋可能配列	温度“非”応答性 (Chem. Lett. 2015)
GPG3	MKL-(VGGVG) ₅ -LWLGSG-(VPGX*G) ₂₅ -KL-(VGGVG) ₅ -LWLE	AYSSGAPPMPF 銀結合配列	抗菌性 (Nanomedicine 2013)
GPG4	MKL-(VGGVG) ₅ -LWLGSG-(VPGX*G) ₂₅ -KL-(VGGVG) ₅ -LWLEHHHHHHH	KA AK GRGDS 細胞接着配列	細胞接着性 (J. Biomed. Mater. Res. 2017)
GPG5	MKL-(VGGVG) ₅ -LWLGSG-(VPGX*G) ₂₅ -KL-(VGGVG) ₅ -LWLEHHHHHHH	KA AK GRE DV 細胞接着配列	内皮細胞接着性 (PCT/JP2020/041001)
GPPG	MKL-(VGGVG) ₅ -LWLGSG-(VPGX*G) ₂₅ -KLGS	G -(VPGX*G) ₂₅ -KL-(VGGVG) ₅ -LWLEHHHHHHH	(Int. J. Mol. Sci. 2019)

X* = V (80%) or F (20%)

☑ すべての誘導體でナノファイバー形成

機能設計が容易

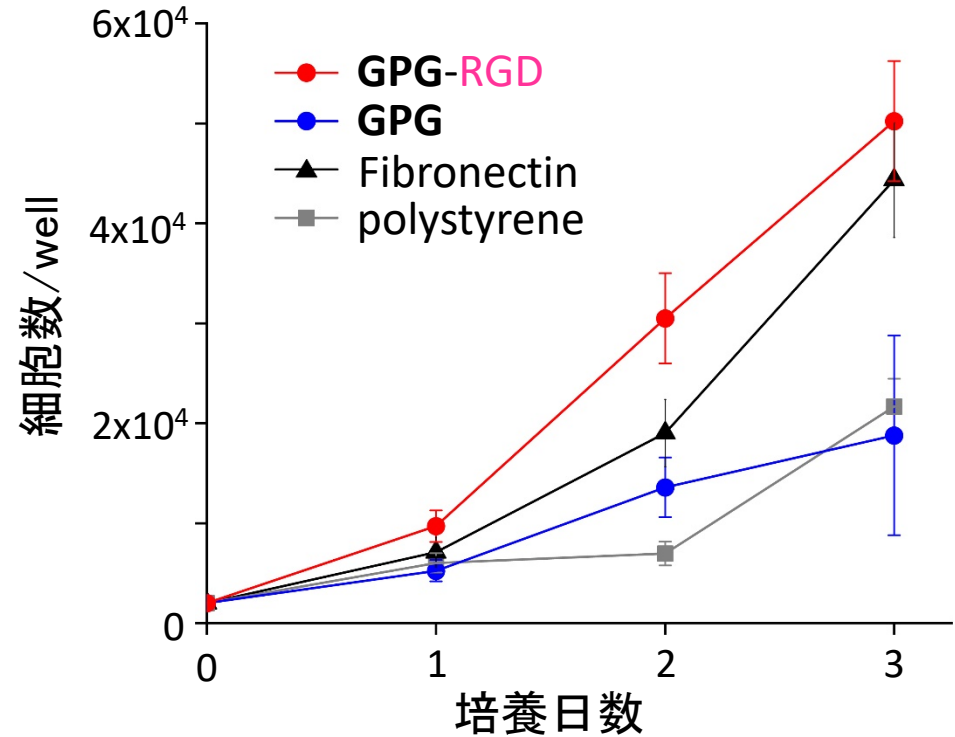
GPG ファイバー膜上での細胞培養 (線維芽細胞 NIH/3T3)



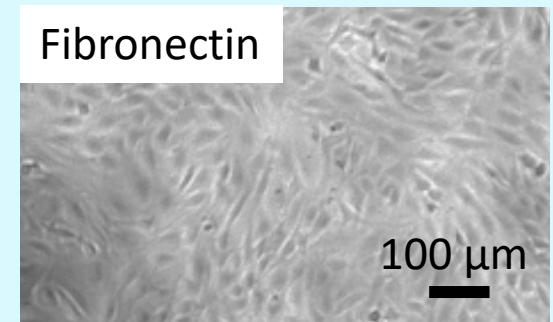
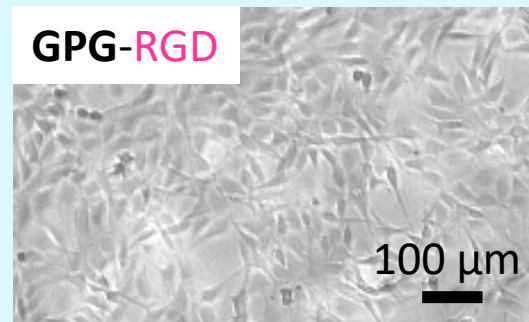
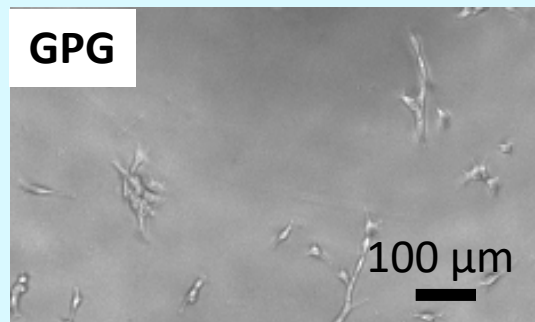
基板へのコーティング率 (PBS洗浄後)

GPG	GPG-RGD	Fibronectin
92.1	93.6	29.5 [%]

細胞増殖性 (Cell Counting Kit-8)



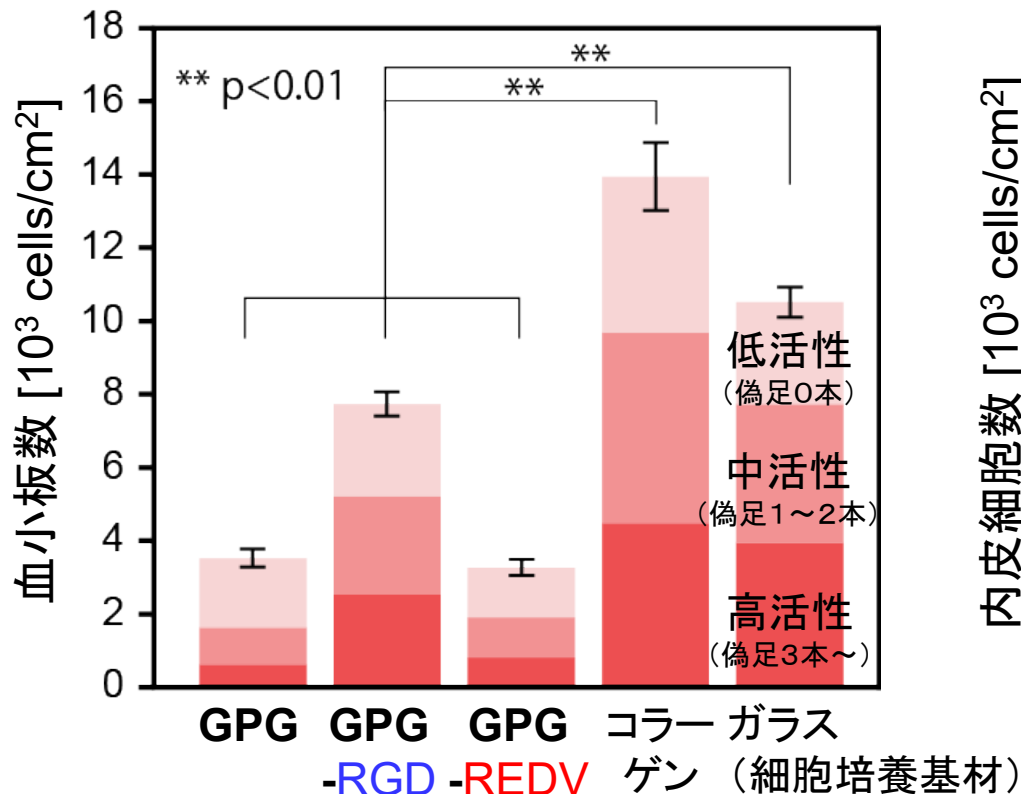
細胞初期接着 (24 h)



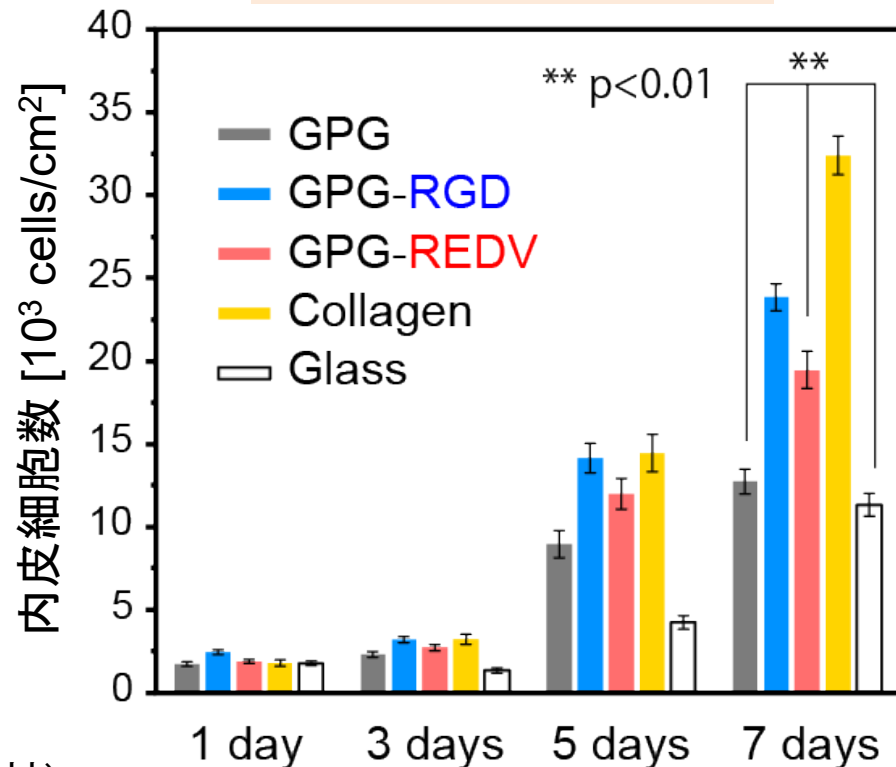
人工血管材料としての適正評価

- ①血小板低粘着性(抗血栓性) ②血管内皮細胞増殖性(速やかな内皮化)

ヒト血小板粘着性 (1 h)



ヒト内皮細胞増殖性



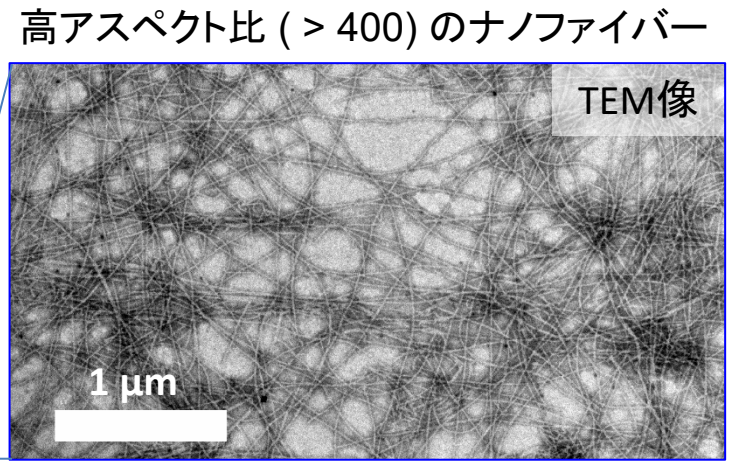
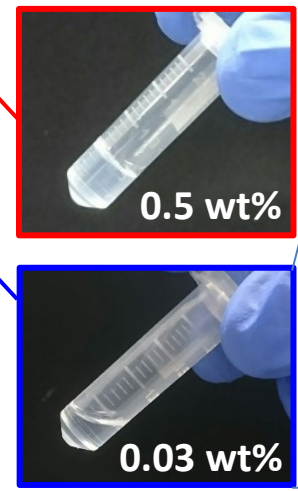
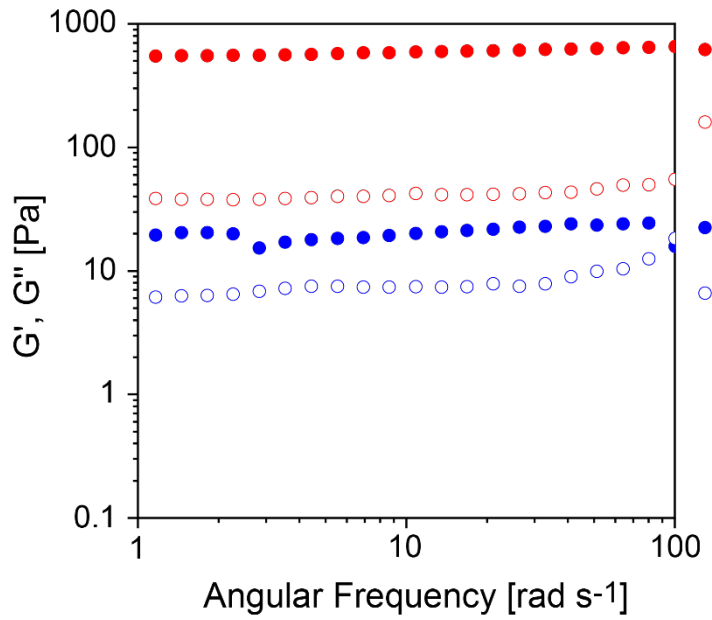
内皮細胞接着配列 **REDV** を付加した **GPG** は人工血管素材として適正な生物学的特性

(特願 2019-200444, PCT/JP2020/041001)



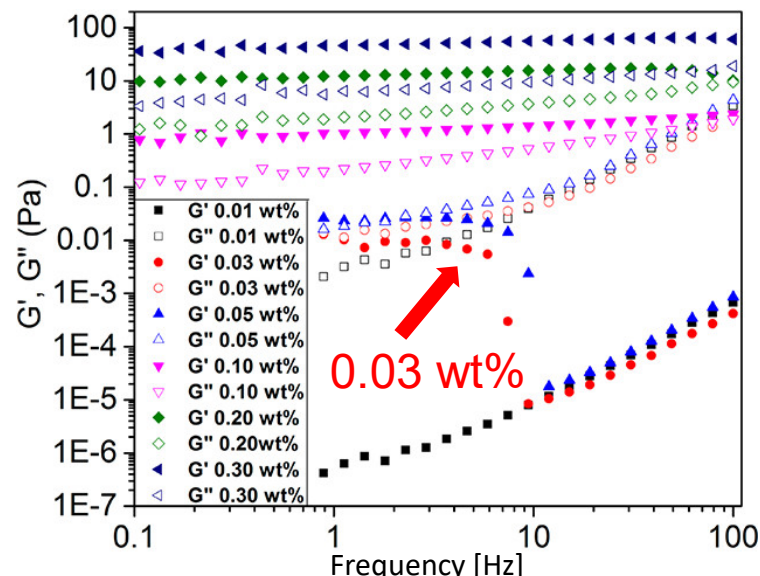
小口径 (内径 4 mm 以下) 人工血管の作製へ

ナノファイバー分散液／ハイドロゲルの動的粘弾性



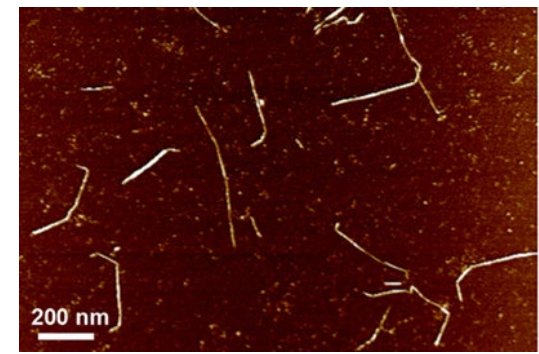
0.03 wt% の極低濃度でも G' (貯蔵弾性率) > G'' (損失弾性率)
 ⇒ ナノファイバーが液中でネットワーク構造を形成

Int. J. Mol. Sci. **2019**, *20*, 6262.



参考) セルロースナノファイバー分散液の動的粘弾性

0.03 wt% で G' (貯蔵弾性率) < G'' (損失弾性率) [粘性的]

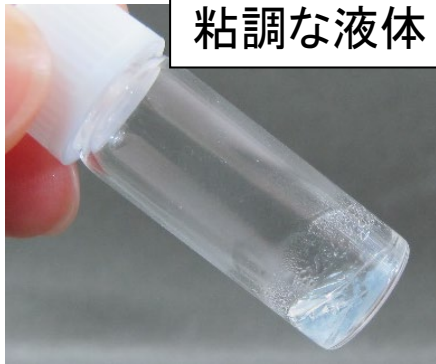


Geng et al, *Macromolecules* **2018**, *51*, 1498.

ハイドロゲルの形成

0.1

粘調な液体



0.2



0.3



0.4 (wt%)

ゲル形成



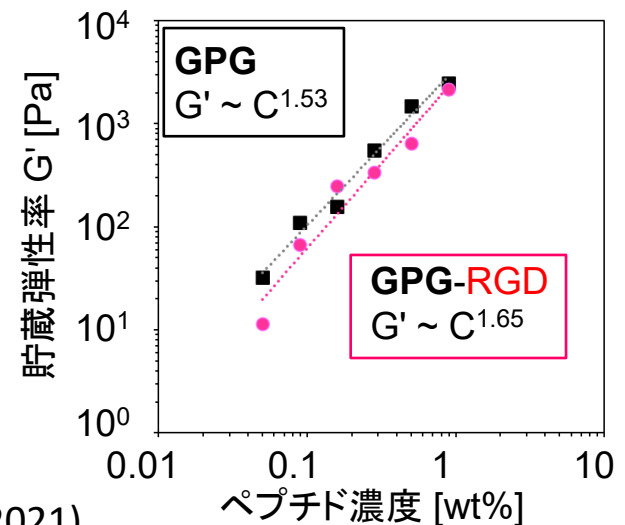
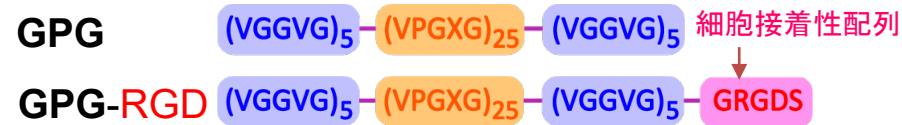
ペプチド濃度1wt%未満での物理ゲル形成は
世界初

配列	濃度
1) (IPAVG) ₁₆₈ (VPGXG) ₁₄₀ (IPAVG) ₁₆₈	10 wt%
2) (XPAVG) ₅₀	15 wt%

1) E. L. Chaikof et al., *Biomaterials* **30**, 409 (2009)

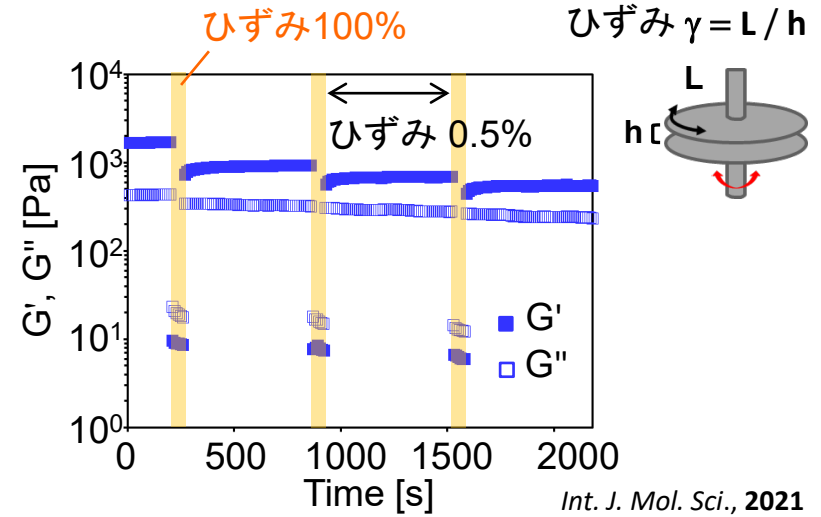
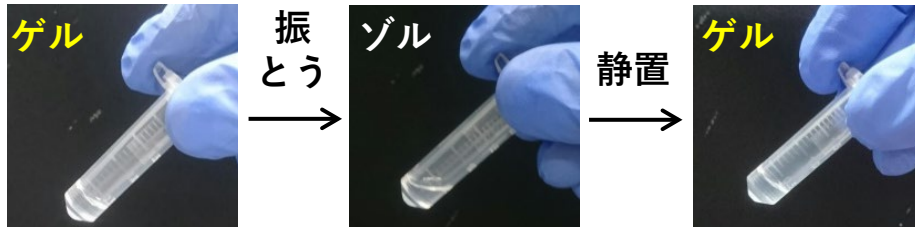
2) B. D. Olsen et al., *Biomacromolecules* **16**, 3762 (2015)

力学特性と生物学的特性を独立に制御可能

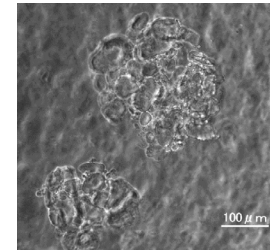
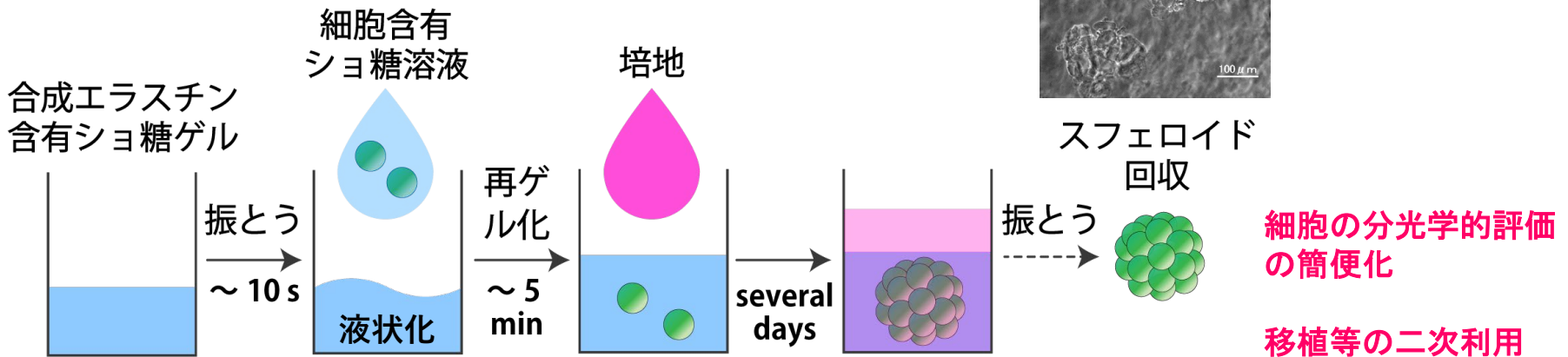


ハイドロゲルのチクソトロピー性（自己修復特性）

GPGハイドロゲルの自己修復性



簡便な細胞三次元培養と回収



従来技術とその問題点

- (1) 生物(ウシ、ブタ、ウマ等)から抽出したエラスチン
 - ・不溶性(水にも有機溶媒にも溶けない)のため加工が困難
 - ・可溶化処理(化学処理)により品質低下、ロット差大
 - ・生体利用においては、不純物に由来する問題点あり(石灰化等)

- (2) 人工エラスチン(エラスチン由来ポリペプチド)
 - ・弾性繊維を形成しない
 - ・成形加工が困難(化学架橋が必要)
 - ・物理ゲルの形成に10wt%以上必要

新技術の特徴・従来技術との比較

- 本人工エラスチンGPGは、37°Cへの加温により、水中でナノファイバーを形成 [沈殿形成なし, 透明なファイバー分散液]
- タンパク質濃度1wt%未満で物理ゲルを形成
- 物理ゲルの力学特性と生物学的特性を独立に制御可能
- 物理ゲルは自己修復性を示し、細胞の包埋と回収が可能
- ファイバー形成能を保持したまま機能化が可能
- 抗血栓性と内皮細胞接着性を両立できる

想定される用途

- 表面改質用コーティング剤
- 細胞三次元培養基材
- 人工血管用素材

実用化に向けた課題と 企業への期待

- 大量生産技術の開発
- 多様な細胞の三次元培養によるデータ取得
(未分化能維持等、細胞品質管理)

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ポリペプチド
- 出願番号 : 特願2019-200444
- 出願人 : 名古屋大学
- 発明者 : 鳴瀧彩絵, 大槻主税, 中村仁,
佐藤和秀, 夏日和宜

お問い合わせ先

名古屋大学大学

学術研究・産学官連携推進本部 柴田裕介

TEL 052-788-6055

e-mail y_shibata@aip.nagoya-u.ac.jp